Molekularbiologische und funktionelle Charakterisierung von *ALCAM* und *SFRP1* als mögliche Schlüsselgene der gestörten Hämatopoese beim Myelodysplastischen Syndrom

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades in Naturwissenschaften vorgelegt beim Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin



von Jana Reins aus Berlin

Berlin, 18. Oktober 2010

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von September 2007 bis Oktober 2010 unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. med. Wolf-Karsten Hofmann im molekulargenetischen Labor der Abteilung für Hämatologie, Onkologie und Transfusionsmedizin an der III. Medizinischen Klinik der Charitè-Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin.

Dekan: Prof. Dr. Hartmut H. Hilger

Gutachter: Prof. Dr. Thomas Schmülling

Prof. Dr. Wolf-Karsten Hofmann

Datum der Disputation: 24.01.2011

Meinem Opa Hans † 06.03.2010

Α	EINL	EITUNG	1
	A.1 C	Die Hämatopoese	1
	A.2 C	Das Myelodysplastische Syndrom (MDS)	4
	A.2.1	Allgemeine Grundlagen des MDS	4
	A.2.2	Die gestörte Hämatopoese beim MDS	7
	A.2.3	Zytogenetische und molekulare Veränderungen beim MDS	8
	A.3 A	Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule (ALCAM)	9
	A.3.1	Die Rolle der Zelladhäsion in Geweben	9
	A.3.2	Strukturelle Charakterisierung von ALCAM	10
	A.3.3	Die funktionelle Rolle von ALCAM im gesunden Gewebe und seine pat	ho-
		genetische Bedeutung für die Tumorgenese	11
	A.3.4	Differentielle Genexpression von ALCAM in der linienspezifischen	
		Differenzierung von CD34+ Zellen aus MDS-Patienten	13
	A.4 S	Secreted Frizzled Related Protein 1 (SFRP1)	14
	A.4.1	WNT-Signalwege und ihre pathogenetische Bedeutung	14
	A.4.2	Inhibitoren des WNT-Signalweges	17
	A.4.3	Die Rolle des WNT-Antagonist SFRP1 im WNT-Signalweg und seine	
		pathogenetische Wirkung	19
	A.5 C	Grundlagen der epigenetischen Genexpressionsregulation	20
	A.5.1	DNA-Methylierung/-Demethylierung	20
	A.5.2	Bedeutung der DNA-Promotormethylierung in der Tumorgenese	21
,	A.6 Z	ielsetzung der Arbeit	23
в	МАТЕ		25
E	3.1 N	laterialien	25
	B.1.1	Patientenkollektive	25
	B.1.2	Humane Primärzellen und Zelllinien	31
	B.1.3	Geräte, Chemikalien und Materialien	32
	B.1	.3.1 Geräte	32
	B.1	.3.2 Chemikalien und Kits	33
	B.1	.3.3 Expressionsvektoren	34
	B.1	.3.4 Synthetische Oligonukleotide	34
	B.1	.3.5 Antikörper	31

B	.2 Metho	den	.36
	B.2.1 Z	ellbiologische Methoden	.36
	B.2.1.1	Aufreinigung mononukleärer hämatopoetischer Zellen aus dem	
		Knochenmark	.36
	B.2.1.2	Magnetische Zellseparation	.37
	B.2.1.3	Zellkultur und Zellzahlbestimmung	.38
	B.2.1.4	Einfrieren und Auftauen von Zellen	.39
	B.2.1.5	Transfektion von humanen Zelllinien	.39
	B.2.1.5	5.1 Transiente Transfektion	.40
	B.2.1.5	5.2 Stabile Transfektion mittels Selektionsmarker	.40
	B.2.1.6	Apoptosestudien mittels Annexin V-Markierung	.41
	B.2.1.7	Proliferationsstudien mittels WST1-Reagenz	.42
	B.2.1.8	Durchflusszytometrie	.43
	B.2.1.9	BFU-E Assay	.44
	B.2.2 M	olekularbiologische Methoden	.47
	B.2.2.1	Isolierung und Quantifizierung von Nukleinsäuren aus humanen Zellen.	.47
	B.2.2.1	1.1 RNA-Isolierung	.47
	B.2.2.1	I.2 DNA-Isolierung	.47
	B.2.2.1	I.3 RNA-Isolierung mittels <i>RNeasy Kit</i>	.48
	B.2.2.1	1.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	.48
	B.2.2.2	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	.48
	B.2.2.3	DNA-Gelelektrophorese	.49
	B.2.2.4	Reverse Transkription von RNA (cDNA-Synthese)	.49
	B.2.2.5	Semiquantitative real-time RT-PCR	.50
	B.2.2.6	Promotersequenzierung	.51
	B.2.2.7	Untersuchung der Promotormethylierung mittels Pyrosequencing-	
		Technologie	.52
	B.2.2.7	7.1 Primer- und Assaydesign	.53
	B.2.2.7	7.2 Bisulfitkonvertierung genomischer DNA	.55
	B.2.2.7	7.3 PCR	.55
	B.2.2.7	7.4 Immobilisierung des PCR-Einzelstrangs und Pyrosequenzierung	.56
	B.2.2.7	7.5 Auswertung	.57
	B.2.3 Aus	wertung von Mikroarray-Genexpressionsdaten mittels Genespring	.57
С	ERGEBNIS	SE	.60
C	.1 ALCA	М	.60
	C.1.1 M	ikroarraybasierte Genexpressionsanalyse von Knochenmark-, CD34+,	

CD71+ und Stromazellen aus MDS-Patienten60

C.1.2 <i>Real-time</i> RT-PCR Genexpressionsstudien: mRNA-Expression von KM-,	
CD34+, CD71+ und Stromazellen aus MDS-Patienten	61
C.1.3 Transfektion von Zelllinien zur Überexpression von ALCAM	64
C.1.3.1 Transiente Überexpression: Nachweis der ALCAM-Expression auf	
mRNA-Ebene	64
C.1.3.2 Stabile Überexpression von ALCAM in HEL-, U937- und K562-Zellen	65
C.1.3.2.1 Dosiswirkungsanalyse von Geneticin	65
C.1.3.2.2 Kontrolle der genomischen Integration und mRNA-Expression von AI CAM	66
C.1.4 Proliferationsstudien	67
C.1.4.1 Proliferationsverhalten der Zelllinie HEL mit transient überexprimiertem	
ALCAM	67
C.1.4.2 Proliferationsverhalten von leukämischen Zelllinien mit stabil über-	-
exprimiertem ALCAM	68
C.1.4.2.1 HEL-Zellen	68
C.1.4.2.2 U937-Zellen	70
C.1.4.2.3 K562-Zellen	/1
C.1.5 Apoptosestudien	72
C.1.5.1 Apoptosevernalten der Zeillinie HEL mit transient überexprimiertem ALCAM	72
C.1.5.2 Apoptosesverhalten leukämischer Zelllinien mit stabil überexprimiertem	
ALCAM	74
C.1.5.2.1 HEL-Zellen	74
C.1.5.2.2 U937-Zellen	75
C.1.5.2.3 K562-Zellen	76
C.1.6 Einfluss von ALCAM auf die erythroide Differenzierung von HEL-Zellen	77
C.2 SFRP1	81
C.2.1 Mikroarraybasierte Genexpressionsanalysen in Knochenmark- und	
CD34+ Zellen aus MDS-Patienten	81
C.2.1.1 SFRP1	81
C.2.1.2 WNT-Signalweg-assoziierte Gene	82
C.2.2 Real-time RT-PCR Genexpressionsstudien	85
C.2.2.1 Transkriptionelle Genexpression von SFRP1 im MDS und in akuten	
Leukämien	85
C.2.2.2 Transkriptionelle Genexpression des WNT-Rezeptors Frizzled3 (FZD3)	
im MDS und in akuten Leukämien	88
C.2.3 Untersuchung des <i>SFRP1</i> -Promotors	90
C.2.3.1 DNA-Methylierung des <i>SFRP1</i> -Promotors im MDS	90
C.2.3.2 DNA-Methylierung des SFRP1-Promotors in akuten Leukämien	93

	C.2.3	3.3 Sequenzierung des <i>SFRP1</i> -Promotors der MDS-Patienten	97
_	DIOLUL		100
D	DISKUS	SSION	100
C	0.1 <i>AL</i>	САМ	100
	D.1.1	Genexpression von ALCAM in hämatopoetischen Zellen von	
		MDS-Patienten	100
	D.1.2	Überexpression von ALCAM und sein Einfluss auf das Apoptose- und	
		Proliferationsverhalten von hämatopoetischen Zelllinien	105
	D.1.3	Die Bedeutung von ALCAM für die Differenzierung von humanen	
		Erythroleukämie-Zellen	107
	D.1.4	Mögliche funktionelle Rolle von ALCAM in der Pathogenese des MDS.	109
C).2 SF	RP1	112
	D.2.1	Genexpression von SFRP1 im MDS und akuten Leukämien	112
	D.2.2	Regulationsmechanismen der Genexpression von SFRP1 im MDS im	
		Vergleich zu akuten Leukämien	113
	D.2.3	Genexpression WNT-Signalweg-assoziierter Gene im MDS	118
	D.2.4	Bedeutung von SFRP1 und des WNT-Signalweges für die Entwicklung	
		des MDS	123
Е	ZUSAM	IMENFASSUNG	125
F	SUMMA	ARY	128
G	LITERA	TURVERZEICHNIS	131
LEE	BENSLAU	UF	125
			-
Put	olikatione	en	128
Κοι	ngressbe	eiträge	146
Dar	nksagung	g	147
Ehr	enwörtli	che Erklärung	148

A EINLEITUNG

A.1 Die Hämatopoese

Die Hämatopoese beschreibt den Prozess der Blutbildung und findet beim Erwachsenen im roten Knochenmark statt, welches hauptsächlich im Brustbein, den Rippen, dem Beckenkamm und der Wirbelsäule lokalisiert ist. Dabei ist die Myelopoese vom Reifungsprozess der Lymphozyten in der Lymphopoese zu unterscheiden. Ausgehend von einer pluripotenten Stammzelle des Knochenmarks entwickeln sich multipotente Vorläuferzellen (Progenitorzellen) der myeloischen und lymphatischen Zellreihe. Die myeloische Reihe umfasst die Reifung der Erythrozyten, Thrombozyten, Makrophagen und Granulozyten. Lymphatische Vorläuferzellen differenzieren zu T- und B-Lymphozyten sowie zu natürlichen Killerzellen. Das Knochenmarkstroma bietet ein geeignetes Umfeld für das Wachstum und die Entwicklung der Stamm- und Vorläuferzellen. Es bildet ein mikrovaskuläres Netzwerk aus Adipozyten, Fibroblasten, Retikulumzellen, Endothelzellen, Makrophagen, Osteoblasten und Osteoklasten. Zudem sind Stromazellen in der Lage die für die Differenzierung, Ausreifung und Regulation der Stammzellen notwendigen Wachstumsfaktoren wie Koloniestimulierender Faktor (colony stimulating factors, CSF) Stammzellfaktor (stem cell factor, SCF) und Interleukine zu sezernieren. Hämatopoetische Wachstumsfaktoren sind Glykoprotein-Hormone, die die Zellproliferation und Apoptose regulieren, die Differenzierung und Reifung stimulieren und die Funktion der reifen Zellen beeinflussen können. Die Stimulation der Differenzierung der einzelnen hämatopoetischen Zellreihen erfolgt über die linienspezifischen Zytokine Erythropoetin (EPO) in der Erythropoese, Thrombopoetin (TPO) in der Megakaryopoese (Thrombopoese) und Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor (G-CSF) sowie Granulozyten/Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor (GM-CSF) in der Granulopoese. Abbildung 1 fasst die Hämatopoese in einem Modell schematisch zusammen.





Abb. 1: Vereinfachtes Modell der Hämatopoese. Die hämatopoetische Stammzelle differenziert zu multipotenten Progenitorzellen, die sich linienspezifisch in myeloische und lymphatische Progenitorzellen irreversibel ausdifferenzieren. In der Lymphopoese entwickeln sich reife T-Lymphozyten (T-Zellen), B-Lymphozyten (B-Zellen) und natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen). In der Myelopoese differenzieren aus den myeloischen Progenitorzellen die Vorläufer der Erythrozyten und Thrombozyten (MEP) und die der Granulozyten und Makrophagen (GMP). Durch linienspezifische Wachstumsfaktoren (EPO, TPO, GM-CSF und G-CSF) entwickeln sich die reifen Zellen (adaptiert und modifiziert nach Passegue *et al.*, 2003).

Die Bildung der roten, hämoglobinhaltigen Blutkörperchen wird als Erythropoese bezeichnet und findet über die Vorläuferzellen MEP (*megakaryotic/erythroid progenitors*) zu Proerythroblasten, Pronormoblasten, Retikulozyten bis zum reifen kernlosen Erythrozyten statt. Mit zunehmendem Reifegrad nimmt der Hämoglobingehalt zu. Gleichzeitig kommt es zum Verlust der Zellorganellen und schließlich zum Ausstoß des Zellkerns. Neben Vitamin B₁₂, Folsäure und Spurenelementen stellt humanes Erythropoetin (EPO) den Hauptregulator der Erythrozytenproduktion dar. Es wird zu 90 % in der Niere und zu 10 % in der Leber synthetisiert. EPO initiiert die Hämoglobinsynthese und kontrolliert die Proliferation, Differenzierung und das Überleben erythroider Vorläuferzellen.

In der Megakaryopoese reifen die MEP (*megakaryotic/erythroid progenitors*) zu Megakaryoblasten, Megakaryozyten mit mindestens 8 Zellkernen und durch endomitotische Abschnürung des Zytoplasmas zu den kernlosen Thrombozytenplättchen, die essentiell für den primären Wundverschluss bei Gefäßverletzungen sind. Sie enthalten gerinnungsaktive Substanzen, die für die Blutstillungs- und Gerinnungsfunktion von entscheidender Bedeutung sind. Das Zytokin Thrombopoetin ist der wichtigste Regulationsfaktor der Megakaryopoese bzw. der Thrombopoese und wird in der Leber und den Nieren synthetisiert.

Innerhalb der Granulopoese differenzieren neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten sowie Monozyten. Aus der gemeinsamen Vorläuferzelle GMP (granulocytic/myelomonocytic progenitors) entwickeln sich die Myeloblasten, Metamyelozyten zu stab- und segmentkernigen Promyelozyten, Myelozyten, Granulozyten. Die Granulozyten dienen der Identifizierung, dem Abtöten und der Phagozytose von Fremdkörpern, Bakterien und Pilzen sowie von körpereigenen geschädigten oder toten Zellen. Angeregt durch körpereigene Mediatoren oder bakterielle Chemokine migrieren sie an den Infektionsort (Chemotaxis). Die Monozyten entwickeln sich ebenfalls aus der gemeinsamen Vorläuferzelle der granulozytären Reihe, über Monoblasten, Promonozyten zu Monozyten. Nach einer kurzen Zirkulationsdauer im Blut (20-40 h) können sie ins Gewebe einwandern und dort zu Makrophagen differenzieren. Monozyten und Makrophagen bilden ein funktionell zusammengehörendes Abwehrsystem. Gesteuert und reguliert wird die Granulopoese durch Interleukine, G-CSF und GM-CSF.

Die komplexen Vorgänge der humanen Hämatopoese unterliegen strikten Regulationsmechanismen. Störungen oder der Verlust dieser Mechanismen können schwerwiegende pathophysiologische Veränderungen des blutbildenen Systems nach sich ziehen und hämatologische Neoplasien zur Folge haben. Die vorgelegte Arbeit beschäftigt sich mit genetischen und epigenetischen Veränderungen während der Pathogenese des Myelodysplastischen Syndroms, dessen Erkrankungsbild sich durch eine stark dysregulierte Hämatopoese auszeichnet.

A.2 Das Myelodysplastische Syndrom (MDS)

A.2.1 Allgemeine Grundlagen des MDS

Beim Myelodysplastischen Syndrom handelt es sich um eine klonale Erkrankung der hämatopoetischen Stammzelle, die eine ineffektive Hämatopoese verursacht und für ein erhöhtes Risiko einer Transformation in eine Akute Myeloische Leukämie (AML) verantwortlich sein kann. Morphologische Dysplasien des Knochenmarks, abnormale Differenzierung und Reifung von myeloischen Zellen, Zytopenien sowie genetische Instabilität sind charakteristische Parameter dieser heterogenen Gruppe myeloischer Neoplasien (Valent und Wieser, 2009). Die Erkrankung tritt hauptsächlich im höheren Lebensalter mit einem medianen Altersspiegel zwischen dem 60. und 75. Lebensjahr auf (Aul *et al.*, 1998). Das klinische Bild und die Prognose der Erkrankung hängen von verschiedenen Faktoren wie Patientenalter und -geschlecht, Sub- oder Risikotyp, zytogenetische und genetische Aberrationen sowie vom Therapieansprechen ab.

Als Grundlage für therapeutische Entscheidungen beim MDS wurde 1982 die *French-American-British* (FAB) Klassifikation erarbeitet (Bennett *et al.*, 1982). Die Hauptkriterien dieser Klassifikation sind der Blastenanteil im peripheren Blut und im Knochenmark sowie der Umfang der dysplastischen Veränderungen. Wie in Tabelle 1 aufgeführt werden 5 Subtypen unterschieden: refraktäre Anämie (RA), refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten (RARS), refraktäre Anämie mit Exzess von Blasten (RAEB), refraktäre Anämie mit Blastenexzess in Transformation (REAB-T) und Chronisch Myelomonozytäre Leukämie (CMML).

	Knochenmark			res Blut
Subtyp	Blasten (%)	Ringsid. (%)	Blasten (%)	Monozyten
RA	< 5	≤ 15	≤ 1	-
RARS	< 5	> 15	≤ 1	-
CMML	≤ 20	-	< 5	> 1×10 ⁹ /l
RAEB	5-20	-	< 5	-
RAEB-T	21-30	-	≥ 5	±> 1×10 ⁹ /l

Tab.	1:	FAB-Klassifikation	des	MDS
------	----	--------------------	-----	-----

Ringsid.: Ringsideroblasten

Die FAB-Klassifikation ist nach wie vor von großer Bedeutung und bildete die Grundlage für die 2000 eingeführte *World-Health-Organisation* (WHO) Klassifikation (Bennett, 2000). Tabelle 2 fasst die morphologischen und zytogenetischen Kriterien der 8 Untergruppen der weiter entwickelten WHO-Klassifikation für Myelodysplastische Syndrome zusammen (Vardiman *et al.*, 2002).

WHO-Subtyp	Blastena	anteil (%)	Weitere Veränderungen
	рВ	KM	
Refraktäre Anämie (RA)	≤ 1	< 5	Einlinien-MDS (erythropoetische
			Dysplasien)
Refraktäre Anämie mit	≤ 1	< 5	Einlinien-MDS (erythropoetische
Ringsideroblasten (RARS)			Dysplasie, >15% Ringsidero-
			blasten im KM)
Refraktäre Zytopenie mit	≤ 1	< 5	Mindestens bilineäre Dysplasie
multilineärer Dysplasie (RCMD)			
Refraktäre Zytopenie mit	≤ 1	< 5	Mindestens bilineäre Dysplasie,
multilineärer Dysplasie und			>15% Ringsideroblasten im KM
Ringsideroblasten (RCMD-RS)			
Refraktäre Zytopenie mit	< 5	5 -9	Einlinien- oder Mehrlinien-MDS,
Blastenüberschuss I (RAEB I)			keine Auer-Stäbchen
Refraktäre Anämie mit	5 -19	10 - 19	Einlinien- oder Mehrlinien-MDS,
Blastenüberschuss II (RAEB II)			evtl. Auer-Stäbchen
5q-Syndrom	< 5	< 5	Isolierter 5q-Defekt
Unklassifiziertes MDS (MDS-U)	≤ 1	< 5	Keine der anderen Kategorien

Tab. 2: WHO-Klassifikation des MDS

pB: periphäres Blut; KM: Knochenmark

Das 1997 eingeführte *International Prognostic Scoring System* (IPSS) ermöglicht durch zusätzliche Parameter, Aussagen hinsichtlich der Prognose und des Verlaufs der Erkrankung treffen zu können (Greenberg *et al.*, 1997). Dabei werden unter anderem der Blastenanteil im Knochenmark, zytogenetische Aberrationen, die Anzahl der Zytopenien und das Patientenalter berücksichtigt (Tab. 3).

Scoring-Punkte	Knochenmarkblasten	Karyotyp	Anzahl der
	(%)		Zytopenien
0	< 5	normal, -Y, del 5q (5q-)	0/1
0,5	5-10	alle anderen	2/3
1	-	komplexe Anormalien	-
1,5	11-20	-	-
2	21-30	-	-

Tab. 3: International Prognostic Scoring System (IPSS) des MDS.

0 Punkte: *Low risk MDS*, Niedrigrisiko-MDS; 0,5-1,0 Punkte: *Intermediate-1 MDS*, Intermediär-1 MDS, Int-1 MDS; 1,5-2,0 Punkte: *Intermediate-2 MDS*, Intermediär-2 MDS, Int-2 MDS; ≥2,5 Punkte: *High risk MDS*, Hochrisiko-MDS; Komplexe Anomalien: ≥ 3 Abnormalitäten oder Chromosom 7-Anomalien.

Ungefähr die Hälfte der Patienten ist zum Zeitpunkt der Erstdiagnose asymptomatisch. Erst im Rahmen einer Routineuntersuchung des Blutes wird häufig ein stark verminderter Hämoglobinwert unter 10 g/dL festgestellt (Anämie). Oftmals sind damit Müdigkeit, Kopfschmerzen oder Leistungsminderung verbunden. Zusätzlich können die Patienten eine Thrombopenie und/oder Leukopenie aufweisen. Auch wenn ein Großteil der Patienten an ihre niedrigen Hämoglobinwerte adaptiert sind sowie symptom- und beschwerdefrei leben, berichtet jeder dritte Patient bei Erstdiagnose von wiederkehrenden Infektionen, insbesondere des Bronchialsystems, bedingt durch die Leukopenie (Hofmann et al., 1993). Eine Thrombopenie tritt bei etwa 50% der Patienten auf. Bei einigen Patienten geht die Erkrankung mit schweren Blutungen des Gastrointestinaltraktes. der ableitenden Harnwege, der Netzhaut oder im Zentralnervensystem einher (Hofmann und Koeffler, 2002).

Neben der Abhängigkeit der Überlebenszeit vom FAB-/WHO-Subtyp der Erkrankung stellt das IPSS Korrelationen zwischen Risikotyp, Überlebenszeit und Transformationsrate her. Die mediane Überlebenszeit Patienten von der Niedrigrisikogruppe low risk MDS beträgt 6 Jahre, während die Überlebenszeit von Patienten mit erhöhtem Blastenanteil im Knochenmark stark verkürzt und für die Hochrisikogruppe high risk MDS nur noch bei 6 Monaten liegt (Hofmann et al., 2004). Mit zunehmender Anzahl der Blasten im Knochenmark steigt die Häufigkeit der Transformation eines high risk MDS in eine AML.

A.2.2 Die gestörte Hämatopoese beim MDS

Das MDS ist durch verschiedene Dysplasiezeichen einer oder mehrerer Zellreihen der Hämatopoese gekennzeichnet, die sich im peripheren Blut in Form einer Anämie, Leukopenie und/oder Thrombopenie äußern. Die für das MDS charakteristischen Zytopenien sind auf ein reduziertes Ansprechen der myeloischen Vorläuferzellen auf physiologische Wachstums- und Differenzierungssignale zurückzuführen (Merchav et al., 1991). Man geht beim MDS von einem Mehrschrittprozess aus, der die Überführung einer gesunden hämatopoetischen Stammzelle über einen präleukämischen Zustand in einen leukämischen Zustand beinhaltet. Dieser mehrstufige Prozess bedingt zunächst Progenitorzellen eine verstärkte Apoptose der mit dem Ergebnis einer hämatopoetischen Insuffizienz, die sich in den Zytopenien des peripheren Blutbildes widerspiegelt (frühe Stadien des MDS). Auf der Stufe der sich daran anschließenden genetischen Progression kommt es unter anderem durch die Expression antiapoptotischer Gene zum Verlust der funktionellen Apoptose und zur Stammzelltransformation, was mit der Zunahme des Blastenanteils im Blut und Knochenmark einhergeht (späte Stadien des MDS) und schließlich das Krankheitsbild des MDS in eine AML überführen kann.

Einige Charakteristika der gestörten Hämatopoese beim MDS sind nachfolgend kurz aufgeführt. Die Dyserythropoese ist durch Funktionsstörungen der Differenzierung und des Wachstums erythroider Vorläuferzellen gekennzeichnet. Die Erythrozyten können unter anderem mikro- (vermindertes Volumen) oder makrozytär (vergrößertes Volumen) sein. Zusätzlich können Hypochromasie (verminderter Hämoglobingehalt aufgrund von Eisenmangel), Poikilozytose (verschieden geformte, nicht runde Erythrozyten) und Ringsideroblasten auftreten. Ringsideroblasten sind Erythroblasten mit (halb-) kreisförmiger Anordnung von Eisengranula, die den Protein- und Energiestoffwechsel des Erythroblasten stören und eine beschleunigte Apotose verursachen. Als mögliche Ursache der gestörten Erythropoese vermutet man Defekte in der Signaltransduktion des EPO-Rezeptors (von Schilling *et al.*, 2003).

Die Dysgranulopoese ist durch eine reduzierte Segmentierung (Hyposegmentation) und Granulation (Hypogranulation, die oft mit einem Peroxidasedefekt einhergeht) der neutrophilen Granulozyten charakterisiert. Vor allem in den reifen Granulozyten manifestieren sich Dysplasien, wie die Pseudo-Pelgersche Kernanomalie (verminderte Kernsegmentierung) (von Schilling *et al.*, 2003). Im Knochenmark tritt das Phänomen

der "atypischen Lokalisation unreifer granulozytopoetischer Vorstufen" von paratrebekulär zu markzentral (ALIP) auf (Tricot *et al.*, 1984).

Die Megakaryopoese weist ebenfalls morphologische Veränderungen auf. Mikroskopisch auffällig blasse Thrombozyten und zahlreiche Riesenthrombozyten im peripheren Blut oder Thrombozyten-Aggregationsstörungen kennzeichnen unter anderem die Dysmegakaryopoese. Am häufigsten findet man im Knochenmark Mikrokaryozyten mit hypolobuliertem Kern, gelegentlich aber auch pleomorphe Megakaryozyten mit asynchroner Reifung von Kern und Zytoplasma. Zusätzlich sind dysplastische Veränderungen der Vorläuferzellen zu sehen, unter anderem in Form von Promyelozyten und Myelozyten mit verminderter Granulation.

A.2.3 Zytogenetische und molekulare Veränderungen beim MDS

Das MDS umfasst eine heterogene Gruppe von klonalen Veränderungen des Knochenmarks, die eine Reihe von gestörten hämatologischen Merkmalen wie eine erhöhte Apoptose von erythroiden Progenitorzellen sowie eine unreife Megakaryopoese und Granulopoese nach sich ziehen. Die leukämische Transformation der normalen Stammzelle ist ein Mehrschrittprozess aus genetischen und epigenetischen Alterationen, dessen zugrunde liegenden Mechanismen beim MDS noch nicht vollständig aufgeklärt sind. Eine mögliche Ursache liegt in der von Knudson formulierten "Two-Hits"-Theorie (Knudson, Jr., 1974). Das Modell geht davon aus, dass beide Allele eines Gens inaktiviert sein müssen, um onkogene Effekte auszulösen. Die Wahrscheinlichkeit dafür ist zwar sehr gering, jedoch bedarf es bei einer genetischen Prädisposition nur ein weiteres spontanes Mutationsereignis. Die Akkumulation von molekularen Veränderungen, verschiedenen wie spontane DNA-Mutationen, chromosomale Aberrationen oder epigenetische Alterationen in den Stammzellen oder den hämatopoetischen Vorläuferzellen des Knochenmarks können zur Fehlregulation oder sogar zum funktionellen Verlust von Transkriptionsfaktoren sowie von Genen des Zellzyklus, der DNA-Reparatur oder der Tumorsuppression führen (Hofmann et al., 2002).

Mehr als 30% der MDS-Patienten weisen zytogenetische Aberrationen auf, die unter anderem Deletionen des Chromosom 5 (5q-Syndrom), 12 und 20, Monosomie des Chromosom 7 sowie verschiedene Translokationen umfassen (Mihara *et al.*, 2007). Neben den chromosomalen Defekten ist eine Reihe an Punktmutationen im MDS bekannt, die eine Inaktivierung oder eine konstitutive Aktivierung betroffener Gene verursachen können. Kritische Zielgene solcher Punktmutationen sind unter anderem Rezeptorkinasen und Signalmoleküle wie FLT3, JAK2, N-, H- und K-RAS, Transkriptionsfaktoren wie AML1/RUNX1, C/EBP und GATA-1 sowie weitere multifunktionale Polypeptide wie NPM1 (Nolte und Hofmann, 2008; Valent und Wieser, 2009). Zudem sind TET2-Mutationen eine der häufigsten genetischen Aberrationen beim MDS (Langemeijer et al., 2009; Mullighan, 2009). Einige dieser Mutationen wie beispielsweise FLT3 und N-RAS sind mit einer schlechten Prognose assoziiert und erhöhen das Risiko einer Transformation zur AML (Paguette et al., 1993; Shih et al., Die transkriptionelle Inaktivierung durch DNA-Hypermethylierung 2004). von stellt einen weiteren Mechanismus der Pathogenese Genpromotoren von hämatopoetischen Zellen dar und wird nachstehend im Kapitel A.5 beschrieben. Häufig hypermethylierte Gene beim MDS sind beispielsweise P15, HIC1, CDH1 und ER, deren silencing vor allem in frühen Stadien der Erkrankung mit einer schlechten Prognose assoziiert ist (Aggerholm et al., 2006).

A.3 Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule (ALCAM)

Die Analyse der Expression des Zelladhäsionsmoleküls *ALCAM* in hämatopoetischen Zellen aus Patienten mit MDS sowie funktionelle Untersuchungen zur Charakterisierung des Moleküls sind Bestandteile der nachstehenden Arbeit. Der folgende Abschnitt stellt *ALCAM* und bisher publizierte Kenntnisse zu seiner funktionellen Rolle zusammengefasst vor.

A.3.1 Die Rolle der Zelladhäsion in Geweben

Die Zelladhäsion in Geweben erfolgt mittels sogenannter Zelladhäsionsmoleküle durch direkten Kontakt zwischen den Zellen oder der sie umgebenden extrazellulären Matrix. Dabei handelt es sich um integrale Membranproteine, die aus der Zelle in den extrazellulären Raum ragen und auf der Zelloberfläche mit anderen Proteinen in Wechselwirkung treten. Adhäsive Zell-Zell-Interaktionen sind sowohl für das Überleben, Proliferation, Differenzierung und Funktion der Zellen als auch für die interzelluläre Kommunikation in zahlreichen physiologischen Prozessen essentiell. Zelladhäsionsmoleküle besitzen einerseits eine mechanische Funktion für die Integrität von Geweben, andererseits übernehmen sie eine funktionelle Rolle bei der Signalübermittlung. Somit sind sie an der Entwicklung und dem Erhalt von Gewebestrukturen, der Embryonalentwicklung und der neuronalen Differenzierung, aber auch an pathologischen Prozessen der Tumorentstehung beteiligt. Sie vermitteln unter anderem die Bindung von myeloischen Progenitorzellen, Leukozyten und Thrombozyten an Bestandteile der extrazellulären Matrix, des Endothels, anderer Oberflächen oder untereinander. Somit sind sie entscheidend an Reaktionen der Immunantwort und Wundheilung sowie in die Leukozytenaktivierung involviert. Zelladhäsionsproteine lassen sich in die 4 Familien der Selektine, Cadherine, Integrine und Immunglobuline unterteilen (Springer, 1990). Das Zelladhäsionsmolekül *ALCAM* wird der Familie der Immunglobuline zugeordnet.

A.3.2 Strukturelle Charakterisierung von ALCAM

Das Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule (ALCAM) zählt zu einer kleinen Subgruppe von transmembranen Glykoproteinen der Immunoglobulin-Superfamilie (IgSF) und wird auf dem Chromosom 3q13.1-2 kodiert. Es besteht aus 16 Exons, die einen DNA-Abschnitt von 150 kb überspannen (Ikeda und Quertermous, 2004). Das reife Protein hat ein Molekulargewicht von 105 kDa (Nelissen *et al.*, 2000) und ist strukturell durch 5 extrazelluläre Immunglobulin-Domänen charakterisiert, die membrandistal 2 N-terminale Domänen des variablen Typs (V-Typ) und membranproximal 3 Domänen des konstanten Typs (C-Typ) umfassen und das charakteristische VVC₂C₂C₂-Motiv bilden (Abb. 2).



Abb. 2: Schematische Darstellung der Polypeptidstruktur von ALCAM. D1-D5: 5 extrazelluläre Immunglobulin-Domänen (D1-D2: variabler V-Typ, D3-5: konstanter C-Typ), TM: Transmembrandomäne, Cyt: Zytoplasmadomäne (Adaptiert von (Swart, 2002)

Das Protein ist über seine transmembrane Region in die Zellmembran verankert und ragt mit einem kurzen C-terminalen Abschnitt intrazellulär in das Zytoplasma der Zelle (Swart, 2002). Seine Aminosäuresequenz ist hochkonserviert und weist in höheren Vertebraten bis zu 95% Sequenzhomologie auf (Swart, 2002). Zu seinem Homolog BEN/SC1/DMGRASP aus Hühnern weist es eine Ähnlichkeit von circa 90% auf, zu

dem humanen Melanom-Adhäsionsmolekül Mel-CAM/MEMD/MUC18/CD146 sind es 50% Ähnlichkeit (van Kempen et al., 2001). Weitere tierische Homologe wurden im Fisch (Neurolin) und in der Maus (mALCAM) beschrieben (Cortes et al., 1999). Durch seine strukturelle Anordnung in der Zelle vermittelt ALCAM Zell-Zell-Verbindungen sowohl durch heterophile als auch durch homophile Interaktionen (Degen et al., 1998; Bowen et al., 2000), wobei bisherige Studien gezeigt haben, dass die N-terminale V-Typ Domäne D1 für beide Interaktionstypen als Haupt-Ligandenbindungsdomäne notwendig ist (Bowen et al., 1996; van Kempen et al., 2001). Immunohistologische Untersuchungen und Northern Blot-Analysen detektierten ALCAM auf aktivierten Leukozyten und hämatopoetischen Progenitorzellen (Uchida et al., 1997a; Swart, 2002). Als Ligand von CD6 vermittelt ALCAM die heterophile Zell-Zell-Interaktion von T-Zellen und aktivierten Leukozyten (Bowen et al., 1995), was dem Glykoprotein seinen Namen verliehen hat. Die heterophile CD6-ALCAM-Adhäsion zeichnet sich durch die Interaktion der membranproximalen SRCR- (scavenger receptor cysteine-rich) Domäne D3 des CD6-Rezeptors mit der aminoterminalen V-Typ-Domäne D1 von ALCAM aus (Bowen und Aruffo, 1999). Die 3 membranproximalen C-Typ-Domänen formen oligomere Module und interagieren so über die membrandistalen V-Typ-Domänen mit dem CD6-Rezeptor. Diese Oligomerisierung wurde ebenfalls bei der homophilen ALCAM-Adhäsion beobachtet, wobei die V-Typ-Domänen D1 miteinander Ligandenbindung eingehen (Swart, 2002).

A.3.3 Die funktionelle Rolle von *ALCAM* im gesunden Gewebe und seine pathogenetische Bedeutung für die Tumorgenese

ALCAM ist funktionell in eine Reihe von physiologischen Prozessen wie in die Gewebearchitektur, die Thymusentwicklung, Entwicklung der Immunantwort, Neurogenese, Osteogenese, Hämatopoese und auch in die Tumorprogression involviert (van Kempen et al., 2001). Dabei spielt die homophile ALCAM-vermittelte Zelladhäsion eine essentielle Rolle für die Tumorzellclusterbildung und -metastasierung. Der Mechanismus der ALCAM-vermittelten Zelladhäsion ist eng mit dem Aktinzytoskelett und der Clusterbildung der Moleküle assoziiert. Die dazu etablierten Adhäsionsexperimente zeigten, dass die ALCAM-vermittelte Zelladhäsion in leukämischen Zelllinien (K562 und KG1) durch die Behandlung mit Cytochalasin D (CytD), einem Aktinzytoskelettinhibitor, induziert wurde (Nelissen et al., 2000). Die dabei vom Zytoskelett freigesetzten ALCAM-Moleküle bildeten an der Zelloberfläche Cluster, die sowohl für stabile homophile als auch für heterophile Zell-ZellVerbindungen wichtig zu sein scheinen. Des Weiteren fungiert ALCAM als Zelloberflächensensor, registriert somit Sättigung des Zellwachstums und initiiert wachstumsregulatorische Prozesse (Swart *et al.*, 2005).

Neben der biologisch notwendigen und strikt regulierten Expression von *ALCAM* in gesunden Zellen und Geweben wurden in verschiedenen Studien Veränderungen in der Expression in einer Reihe von onkogenen Zelllinien (Swart, 2002) und malignen Tumoren detektiert (Ofori-Acquah und King, 2008). Während der Tumorgenese und Progression nutzen maligne Gewebe Zelladhäsionsmoleküle für die Ausbildung der Primärtumore und Metastasen. Der Prozess der Metastasierung umfasst die Invasion und die anschließende Absiedlung von Tumorzellen in entfernte Gewebe. Sie durchbrechen die Blut-Gewebe-Schranke und wandern mit dem Blut oder der Lymphe in andere Körperteile, siedeln sich dort an und bilden Metastasen. Diese Prozesse bedingen den Verlust der Zelladhäsion und –kommunikation und resultieren im unkontrollierten Zellwachstum der Tumore. Das folgende theoretische Modell stellt die funktionelle Rolle von *ALCAM* im Mechanismus des Tumorwachstums und der Progression anhand des malignen Melanoms hypothetisch dar.

Um den Effekt einer reduzierten homophilen Tumorzelladhäsion funktionell beschreiben zu können, wurden Melanomzellen mit einem ALCAM-Expressionsvektor transfiziert, dessen exprimiertes Protein nicht die D1- und D2-Domänen des N-terminalen, extrazellulären Abschnitts aufwies und somit nicht zur Ligandenbindung konstituiert war. vektorbasierte Reduktion der Zelladhäsion verminderte Die deutlich das Aggregationsvermögen und erhöhte zugleich die Motilität der Melanomzellen sowie ihr Potential, in entfernte Gewebe einzudringen. Im Mausmodell führte die Inokulation der transfizierten Zellen zur rapiden Metastasierung (van Kempen et al., 2004). Die sukzessive Tumorprogression, ausgehend vom Primärtumor, anschließende Zellclusterbildung und Zellinvasion bis hin zur Metastasierung, ist mit der Aktivierung einer Reihe von spezifischen Wachstumsfakoren, Oberflächenrezeptoren, verschiedenen Proteinkinase C-Isoformen, Rho-GTPasen sowie weiteren Komponenten der proteolytischen Signalkaskade verbunden. Die wachsende primäre Tumormasse aktiviert diese Signalkette, so dass die Vermutung nahe liegt, dass ALCAM den Stimulus für die Aktivierung proteolytischer Vorgänge im Zytoskelett generiert (Swart et al., 2005). Welche mechanistischen Hintergründe diese dynamische Kontrolle durch ALCAM im Melanom hat, ist unklar. Die Expression von ALCAM kann in verschiedenen

Malignitäten variieren. So ist *ALCAM* in einigen Tumoren wie im Melanom, in frühen Stadien des Kolorektalkarzinoms sowie im Blasenkarzinom erhöht exprimiert, in anderen Tumoren wiederum wie in Brust- und hochgradigen Prostatakarzinomen herunterreguliert (Ofori-Acquah und King, 2008). Diese Heterogenität der Expressionsstärke von *ALCAM*, seiner Lokalisation und die Abhängigkeit vom Tumorgrad in verschiedenen soliden Malignitäten charakterisiert *ALCAM* als Paradoxon in der Tumorgenese. Die dysregulierte *ALCAM*-Expression ist für die Beurteilung der Progression vieler Tumore prognostisch relevant (Swart *et al.*, 2005; Verma *et al.*, 2005; Burkhardt *et al.*, 2006; Kahlert *et al.*, 2009).

A.3.4 Differentielle Genexpression von *ALCAM* in der linienspezifischen Differenzierung von CD34+ Zellen aus MDS-Patienten

In vergangenen Studien ist gezeigt worden, dass ALCAM auf der Oberfläche von CD34+ Zellen des fetalen und adulten Knochenmarks sowie von mesenchymalen Stammzellen exprimiert wird. Zudem wurde das Adhäsionsprotein auf adulten Knochenmarkstromazellen nachgewiesen (Cortes et al., 1999). Inwiefern jedoch ALCAM eine Rolle bei der Pathogenese hämatologischer Malignitäten spielt, ist derzeit noch weitgehend unbekannt. Um weitere Einblicke in die molekularen Mechanismen der Pathogenese des MDS zu erhalten, wurden in kürzlich etablierten in-vitro Differenzierungsversuchen selektierte CD34+ Zellen aus dem Knochenmark gesunder Probanden und aus MDS-Patienten der hohen Risikotypen (intermediate-2 und low risk MDS) und der niedrigen Risikotypen (*low risk* und *intermediate-1* MDS) linienspezifisch mittels Erythropoetin, Thrombopoeitin und GM-CSF stimuliert (Gueller et al., 2010c). Zu Versuchsbeginn und zu weiteren 3 Zeitpunkten (Tag 4, 7 und 11) nach Stimulation Genexpressionsprofile mittels Mikroarray-Hybridisierung wurden (HG-U133A, Affymetrix, Santa Clara, CA) erstellt. Detailierte Genexpressionprofile zeigten, dass ALCAM zu allen gemessen Zeitpunkten in der Erythropoese und Megakaryopoese der high risk MDS-Patienten im Vergleich zu gesunden Normalpersonen 3-fach erhöht exprimiert wurde. Dieses Ergebnis wurde zusätzlich mittels real-time RT-PCR-Quantifizierung konfirmiert. Die aberrante Expression von Genen, die für die Differenzierung der erythroiden Zellen wichtig sind, scheinen ein häufiges, gemeinsames Merkmal bei der Entwicklung des MDS zu sein. Die differenzierungsassoziierte Hochregulation der Genexpression von ALCAM lässt eine Involvierung bei der Progression des MDS vermuten und bildet die Grundlage für Teile der vorliegenden Arbeit.

A.4 Secreted Frizzled Related Protein 1 (SFRP1)

Weitere Bestandteile der vorliegenden Arbeit waren experimentelle Analysen zum Genexpressionsverlauf sowie zu Mechanismen der Genregulation des WNT-Anatagonisten *SFRP1* in hämatopoetischen Zellen von MDS-Patienten unter-schiedlichen IPSS-Risikotyps. Der nachfolgende Abschnitt soll einen Überblick der bisherigen Erkenntnisse zu *SFRP1* und seiner Rolle im WNT-Signalweg geben.

A.4.1 WNT-Signalwege und ihre pathogenetische Bedeutung

Der WNT-Signalweg ist ein evolutionär hochkonservierter Signaltransduktionsmechanismus, der unter anderem in die Regulation der Zelldifferenzierung, Proliferation und Apoptose adulter Gewebe, in die Embryonalentwicklung und Hämatopoese involviert ist (Khan und Bendall, 2006). In Abhängigkeit von der Interaktion des spezifischen WNT-Liganden mit seiner transmembranen Rezeptorisoform Frizzled (FZD) unterscheidet man die Aktivierung des kanonischen, β-Catenin-abhängigen WNT-Signalweges von den nicht-kanonischen WNT-Signalwegen, dem *Planar Cell Polarity* Signalweg (PCP) und dem WNT/Ca²⁺-Signalweg (Janssens *et al.*, 2006). Neunzehn WNT-Liganden und 10 verschiedene FZD-Isoformen wurden bisher im humanen Genom identifiziert. Im Folgenden wird ein Überblick für die 3 molekularen Signalwege gegeben.

Der kanonische WNT/β-Catenin-Signalweg

In Abwesenheit des WNT-vermittelten FZD-Stimulus wird das zentrale Molekül des kanonischen WNT-Signalweges, das intrazelluläre β-Catenin, durch den so genannten Destruction Complex im Zytoplasma degradiert. Dieser Proteinkomplex besteht hauptsächlich aus dem Tumorsuppressor APC (adenomatous polyposis coli), dem Scaffold Protein Axin, und den Phosphokinasen Glykogen-Synthase-Kinase3β (GSK3β) und Kaseinkinase1 α (CK1 α). Er bewirkt die Phosphorylierung von β -Catenin, dessen Ubiquitinierung und schließlich den Abbau durch das Proteasom. Findet eine WNTvermittelte FZD-Stimulierung z.B. durch WNT1, WNT3a oder WNT8 statt, kommt es zur Oligomerisierung mit den transmembranen Ko-Rezeptoren LRP5 oder LRP6 (Janssens et al., 2006), was wiederum 2 Signale initiiert. Zum einen führt dies zur Phosphorylierung von LRP durch die Phosphokinasen GSK3ß und CK1a, wodurch die Rekrutierung des Scaffold Proteins Axin an die Membraninnenseite und der Zerfall des Destruction *Complex* vermittelt wird, zum anderen FZD-abhängigen zur

Phosphorylierung von *Disheveled* (Dsh), das ebenfalls den Abbau von β-Catenin durch die Inhibierung des *Destruction Complex* verhindert (Cadigan und Liu, 2006). Die dephosphorylierte Form von β-Catenin akkumuliert im Zytosol und wird in den Nukleus importiert. Dort ist β-Catenin durch seine transkriptionaktivierende Wirkung befähigt, die Expression von WNT-Zielgenen durch die Assoziation mit den Transkriptionsfaktoren LEF-1 (Behrens *et al.*, 1996) und TCF (Hoppler und Kavanagh, 2007) sowie mit Ko-Aktivatoren wie dem CREB-Bindeprotein (CBP) zu induzieren (Hecht *et al.*, 2000) (Abb. 3A). Zielgene der WNT/β-Catenin-Signaltransduktion sind zum Beispiel regulatorische Gene der Zellproliferation, Gewebshomöostase und Differenzierung.

Der nicht-kanonische Planar Cell Polarity Signalweg (PCP)

Der PCP-Signalweg spielt hauptsächlich eine Rolle bei der Zellmigration und –polarität während der embryonalen Gastrulation und initiiert sein Ausgangssignal über die Bindung eines WNT-Liganden an seinen spezifischen Rezeptor der FZD-Familie. Der zentrale Mediator ist das Phosphoprotein *Disheveled* (Dsh), das zum einen die Aktivierung von RhoA (*Ras homologous A*) und RhoK (*Rho associated kinase*) und zum anderen die GTPasen Rho und Rac sowie die Aktivität der Jun-N-terminalen Kinase (JNK) reguliert und somit einen cJUN (*jun oncogene*)-abhängigen Transkriptionsstart vermittelt (Abb. 3B).

Der nicht-kanonische WNT/Ca²⁺-Signalweg

Der WNT/Ca²⁺-Signalweg basiert ebenfalls auf der Initiierung des Signals durch die spezifische Interaktion eines WNT-Liganden mit eines seiner FZD-Rezeptorisoformen. Ebenfalls allen 3 Signalwegen gemeinsam ist die Signalweiterleitung über Dsh, dessen genaue Wirkungsweise weitgehend ungeklärt ist. Abweichend vom kanonischen WNT-Signalweg wird hier das Signal unabhängig von β-Catenin vermittelt. Vielmehr wird es unter Beteiligung heterotrimerer GTP-bindender Proteine, der Phospholipase C (PLC) und der Proteinkinase C (PKC) über die Freisetzung von intrazellulären Ca²⁺-Ionen weitergeleitet. Die Erhöhung des Ca²⁺-Spiegels aktiviert die Calcium/Calmodulinabhängigen Kinase II (CamKII), wobei das Signal final in der Aktivierung spezifischer Transkriptionfaktoren mündet (Janssens *et al.*, 2006) (Abb. 3C). Zu den nichtkanonischen WNT-Proteinen zählen unter anderem WNT4, WNT11 und WNT5a, dem als erster WNT-Ligand auch eine antagonistische Wirkung zum WNT/β-Catenin-Signalweg nachgewiesen werden konnte.



Abb. 3: Übersicht der bekannten WNT-Signalwege: (A) kanonischer WNT/β-Catenin-Signalweg, (B) nicht-kanonischer *Planar Cell Polarity* Signalweg (PCP), (C) nicht-kanonischer WNT/Ca²⁺-Signalweg (adaptiert und modifiziert von Widelitz, 2005)

Treten Alterationen der Komponenten der Signalkaskade auf, können lebenswichtige regulatorische Prozesse gestört und onkogene Veränderungen zum Beispiel in Darm-, Brust-, Prostata- und Hautzellen (Tsukamoto *et al.*, 1988; Korinek *et al.*, 1997; Morin *et al.*, 1997; Polakis, 2000) sowie in fetalen als auch in adulten hämatopoetischen Progenitor- oder Stammzellen verursacht werden (Austin *et al.*, 1997; Reya, 2003). Darüber hinaus wurde dem WNT-Signalweg eine entscheidende Rolle in der Pathogenese von akuten Leukämien und somit eine Beteiligung an der Leukämogenese nachgewiesen (Mikesch *et al.*, 2007).

Wie bereits erwähnt ist allen 3 Signalwegen die Initiierung der Signalkaskade durch die Interaktion eines WNT-Liganden mit seinem transmembranen Rezeptor FZD gemeinsam. Neben einer ganzen Reihe von WNT-Liganden tragen 10 verschiedene FZD-Isoformen zur Spezifität des WNT-Signalweges bei, wobei bisher nur einige Liganden und Rezeptoren bestimmten Wegen zugeordnet werden konnten. Die FZD-Rezeptoren bilden eine Proteinfamilie, die durch 7 Transmembrandomänen, eine

N-terminale extrazelluläre cysteinreiche Domäne (CRD) und durch einen variablen C-terminalen Abschnitt gekennzeichnet ist (Huang und Klein, 2004).

Die Expression der Rezeptorisoform FZD3 wurde sowohl in gesunden, hämatopoetischen Zellen als auch in leukämischen Zelllinien nachgewiesen (Sercan et al., 2010). Das reife Protein wird von 6 Exons auf dem Chromosomabschnitt 8g21 kodiert (Sala et al., 2000). In früheren Arbeiten zum WNT-Signalweg in Leukämien war FZD3 stets ein wichtiger Bestandteil der Untersuchungen. So wurde es als prädominat verstärkt exprimierte Rezeptorisoform in CLL identifiziert und in Zusammenhang mit der Aktivierung des kanonischen WNT-Signalweges gebracht (Lu et al., 2004). Zudem wurde in weiteren Studien an ALL gezeigt, dass eine verstärkte FZD3-Expression mit der transkriptionellen Herunterregulation und Promotorhypermethylierung verschiedener WNT-Inhibitoren assoziiert war (Roman-Gomez et al., 2007), weshalb FZD3 für die vorliegende Arbeit zusätzlich interessant erschien und zum Verständnis funktioneller Zusammenhänge im MDS beitragen könnte.

A.4.2 Inhibitoren des WNT-Signalweges

Extrazelluläre Antagonisten des WNT-Signalweges sind in der Lage, die Signalweiterleitung zu inhibieren. Es werden zwei Klassen unterschieden. Die 1. Klasse interagiert primär mit den WNT-Proteinen und umfasst den *WNT Inhibitory Factor-1* (WIF1), *Cerberus* (Cer) sowie die Familie der *Secreted Frizzled Related Proteins* (SFRP). Die 2. Klasse bildet die Familie der Dickkopf-Proteine (DKK), die vorrangig mit Teilen des WNT-Rezeptor-Komplexes interagiert.

Obwohl WIF-1 anders als die SFRP keine Sequenzhomologie zur cysteinreichen Domäne der FZD-Rezeptoren aufweist, findet eine inhibitorische Wirkung durch Interaktion mit WNT-Proteinen statt (Kawano und Kypta, 2003). Durch diese Eigenschaft fungiert WIF-1 auch als Tumorsuppressor. Eine Herunterregulation der Expression von *WIF-1* trägt zur Pathogenese der betroffenen Zellen bei (Kawakami *et al.*, 2009).

Cerberus zählt wie WIF-1 und die SFRP zur Klasse von WNT-Anatgonisten, die über die Interaktion mit WNT-Proteinen die Aktivierung der WNT-Signalkette inhibiert (Kawano und Kypta, 2003). Da über die Rolle von Cerberus in der Tumorgenese und

Leukämogenese bisher keine Kenntnisse existieren, soll dieser WNT-Antagonist nur kurz erwähnt bleiben.

Die Familie der Dickkopf-Proteine besteht aus 4 glykosylierten, extrazellulär abgesonderten WNT-Antagonisten (DKK1-4), deren humanen Homologe 2 cysteinreiche, hochkonservierte Bereiche beinhalten (Mikheev et al., 2004). Die Dickkopf-Proteine bilden eine eigene Klasse von WNT-Inhibitoren. Sie interagieren nicht wie die SFRP mit WNT-Proteinen, um deren Bindung mit ihren Rezeptoren und somit die Aktivierung der WNT-Signalkaskade zu verhindern. Vielmehr wird den LRP-Ko-Rezeptoren und der Familie der Kremen-Proteine eine wichtige Funktion in der Signalinhibierung zuteil. Durch Bindung von DKK an Kremen wird die Internalisierung von LRP vermittelt und die Signalweiterleitung unterbrochen (Kawano und Kypta, 2003). Die transkriptionelle Herunterregulation der DKK1-Expression führte in Brustkrebs zur erhöhten Proliferation des betroffenen Gewebes (Zhou et al., 2010). In Patienten mit Akuter Lymphoblastischer Leukämie (ALL) wurde ein Verlust der DKK3-Expression beobachtet, was eine Beteiligung an der Leukämogenese vermuten ließ (Roman-Gomez et al., 2004). Den DKK-Proteinen wurde durch ihre inhibitorischen Eigenschaften eine wichtige Rolle bei pathologischen Entwicklungsprozessen zugesprochen.

Die SFRP bilden eine Familie aus circa 32-40 kDa großen Glykoproteinen mit inhibitorischem Einfluss auf den WNT-Signalweg. Bisher wurden 5 SFRP in Säugetieren identifiziert und beschrieben. Diese extrazellulären Proteine zeichnen sich durch eine N-terminal lokalisierte cysteinreiche Domäne aus, die 30-50 % Sequenzhomologie mit Frizzled (FZD), den membranständigen Rezeptoren der WNT-Proteine, aufweist (Shi *et al.*, 2007). Auf Grund dieser Sequenzhomologie wird die Bindung von SFRP mit den WNT-Proteinen ermöglicht und die Aktivierung des WNT-Signalweges durch die Interaktion des WNT-Liganden an seinen FZD-Rezeptor unterbleibt. Dementsprechend kann eine transkripionelle Inaktivierung von *SFRP zu* einer bevorzugten Bindung der WNT-Proteine an die FZD-Rezeptoren führen, was wiederum die Initiierung der Signalkaskade bewirkt. Die transkriptionelle Inaktivierung von *SFRP* wurde bereits in verschiedenen Krebserkrankungen nachgewiesen (Shi *et al.*, 2007). So wurde gezeigt, dass der Verlust oder eine Verminderung von *SFRP* zur Pathogenese von soliden Tumoren und hämatologischen Malignitäten wie AML und ALL beitragen kann (Jost *et al.*, 2008; Valencia *et al.*, 2009). Im Folgenden wird auf die pathogenetische Wirkung von *SFRP1* im WNT-Signalweg ausführlicher eingegangen.

A.4.3 Die Rolle des WNT-Antagonisten *SFRP1* im WNT-Signalweg und seine pathogenetische Wirkung

SFRP1 ist eines von 5 in Säugetieren bekannten SFRP, die auf Grund ihrer Sequenzhomologie in zwei Subfamilien gruppiert werden. Dabei ist SFRP1, dessen Gen auf dem Chromosom 8p12 kodiert ist, näher mit SFRP2 und SFRP5 verwandt (36% bzw. 56% Homologie) als mit SFRP3 und SFRP4 der zweiten Subfamilie (19% 17% Homologie). Das Protein besteht so wie auch alle anderen Familienbzw. mitglieder aus 3 strukturellen Einheiten (Abb. 4): einem N-terminalen Signalpeptid, einer cysteinreichen Domäne (CRD) und einer C-terminalen Netrin-Domäne (Bhat et al., 2007). Die CRD überspannt circa 120 Aminosäuren, wovon 10 konservierte Cysteinreste sind. Zudem weist sie eine 30-50%-ige Sequenzhomologie zur CRD des membranständigen FZD-Rezeptors auf. Die C-terminale Hälfte von SFRP1 enthält so wie alle anderen SFRP eine so genannte Netrin-Domäne, die essentiell an der WNT-Liganden-Interaktion beteiligt ist. Sie besteht aus 6 Cysteinresten und verschiedenen hochkonservierten Segmentabschnitten hydrophober Aminosäuren. In Drosophila melanogaster ist gezeigt worden, dass die Netrin-Domäne von SFRP1 und SFRP5 eine Hyaluronsäure-Binderegion aufweist, die in die Interaktion mit wingless, dem Drosophila-Ortholog des humanen WNT1, involviert ist (Uren et al., 2000).



Abb. 4: Schematische Darstellung der Struktur des WNT-Antagonisten *SFRP1* und des Rezeptors Frizzled. Die Sequenzen weisen starke Homologie in der cysteinreichen Domäne (CRD) auf (adaptiert von Kawano und Kypta, 2003).

Durch seine antagonistische Wirkung wird *SFRP1* eine regulatorische Funktion im WNT-Signalweg zuteil. Aufgrund der Sequenzhomologie zur CRD von FZD ergeben sich 2 mögliche Mechanismen der WNT-Signalweg-Inhibierung: 1) durch direkte Interaktion mit WNT-Liganden oder 2) durch Bildung eines direkt inaktivierenden Komplexes mit FZD (Bafico *et al.*, 1999). Der Verlust oder die Verminderung von

SFRP1 durch eine reprimierte Genexpression legt die Vermutung einer aberranten Aktivierung der WNT-Signalkaskade nahe. Verminderte Expressionslevel von *SFRP1* konnten in einer Reihe von humanen Malignitäten nachgewiesen werden, beispielsweise in soliden Tumoren wie Gebärmutterhals- (Ko *et al.*, 2002), Brust-(Ugolini *et al.*, 2001), Eierstock- und Nierenkarzinomen (Zhou *et al.*, 1998) sowie in hämatologischen Neoplasien wie Akute Myeloische Leukämie (Jost *et al.*, 2008) und Chronisch Lymphatische Leukämie (Liu *et al.*, 2006). Dadurch wurde immer deutlicher, dass die abnormale Aktivierung des WNT-Signalweges mit dem Verlust der Genexpression von *SFRP1* assoziiert ist und zu malignem Wachstum solider und hämatopoetischer Zellen führen kann. Als wesentlicher Bestandteil der vorliegenden Arbeit sollten erstmals Kenntnisse zur *SFRP1*-Expression im MDS gewonnen werden.

A.5 Grundlagen der epigenetischen Genexpressionsregulation

A.5.1 DNA-Methylierung/-Demethylierung

Egger et al. definierten den Begriff der Epigenetik als alle meiotisch und mitotisch vererbbaren Veränderungen in der Genexpression, die nicht in der DNA-Sequenz selbst kodiert sind (Egger et al., 2004). Das heißt, dass anders als bei den üblichen aenetischen Veränderungen bei der epigenetischen Genregulation die Nukleotidsequenz erhalten bleibt und durch überlagerte Vorgänge wie DNA-Methylierung/-Demethylierung und Konformationsänderung des Chromatins durch Acetylierung/Deacetylierung Phosphorylierung/Dephosphorylierung sowie durch reversibel modifiziert wird. Der wichtigste und gerade in der Kanzerogenese bedeutsamste epigenetische Genregulationsmechanismus ist die Methylierung des DNA-Bausteins Cytosin. In regulatorischen Abschnitten des Promotors befinden sich gehäuft CG-Palindrome, so genannte CpG-Inseln. Innerhalb dieser Bereiche erfolgt postreplikativ die Modifizierung des Cytosinrestes durch 3 unabhängige DNA-Methyltransferasen, den DNMT1-3 (Bestor, 2000). Dabei wird eine Methylgruppe auf das 5. Kohlenstoffatom des Cytosins übertragen. Im Säugergenom liegen 70-80% aller CpG-Stellen methyliert vor (Razin et al., 1985), was 2,5-7% aller Cytosinreste im Genom entspricht (Adams und Burdon, 1982). Die synergistische Wirkung von Bindungshemmung bestimmter Transkriptionsfaktoren und die Interaktion von Histon-Deacetylasen mit Methyl-CpG-bindenden Proteinen bewirken die Heterochromatisierung der DNA-Doppelhelix, wodurch Promotorregionen für den

Transkriptionsapparat unzugänglich bleiben und die Genexpression konstitutiv inaktiviert wird. Eine verstärkte Methylierung im Promotor eines Gens blockiert die Aktivität in diesem Gen. Der Methylierungsgrad in solchen CpG-Inseln kann dementsprechend ein Maß für die Aktivität darstellen, mit der das zugehörige Gen transkribiert wird. In der Pathogenese von Tumoren und hämatologischen Malignitäten spielt die Promotormethylierung von Tumorsuppressorgenen eine bedeutende Rolle. Proteine solcher Gene sind häufig in regulatorische Mechanismen des Zellzyklus und der Zellproliferation involviert wie zum Beispiel *P15* oder *P53*. Zudem ist die DNA-Methylierung/-Demethylierung in eine Reihe von Prozessen involviert, die unter anderem die embryonale Entwicklung, die X-Chromosom-Inaktivierung, das genomische Imprinting oder die Chromosomenstabilität betreffen (Robertson, 2005).

A.5.2 Bedeutung der DNA-Promotormethylierung in der Tumorgenese

Die Tumorgenese ist ein komplexer Prozess, der durch multiple genetische und epigenetische Alterationen zu Funktionsstörungen von Tumorsuppressorgenen und anderen krebsrelevanten Genen führt. Dies betrifft vor allem Gene, deren Defekte unter anderem Zellwachstum, Apoptose. DNA-Reparatur, Gewebeinvasion und Metastasierung beeinflussen. Die Erhöhung von Wachstumssignalen durch die Aktivierung von Onkogenen oder die Eliminierung von wachstumslimitierenden Signalen durch die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen ermöglicht einen selektiven Wachstumsvorteil von Tumorzellen (Costello und Plass, 2001). Neben dem Auftreten von Mutationen, Deletionen oder dem Verlust der Heterozygotie spielt vor allem die DNA-Methylierung/-Demethylierung eine wichtige Rolle bei der Tumorentwicklung. Das kann sowohl den Verlust der Methylierung von normalerweise methylierten Zellen (Hypomethylierung) als auch die zusätzliche Methylierung von normalerweise nichtmethylierten Stellen oder Sequenzabschnitten bedeuten (Hypermethylierung) (Plass, 2002). Beide Mechanismen können dabei getrennt voneinander oder aber auch in Kombination auftreten.

Die DNA-Hypomethylierung von CG-Dinukleotiden der CpG-Inseln hat die Aktivierung der Transkription von Genen zur Folge, die normalerweise methyliert und somit transkriptionell inaktiv in gesunden somatischen Zellen vorliegen (Strichman-Almashanu *et al.*, 2002). Der Verlust der DNA-Methylierung ist ein häufiges und frühes Ereignis in der Onkogenese vieler Tumortypen. Sie tritt als genomweite sowie als spezifische Hypomethylierung auf, was in der Aktivierung oder Überexpression von Onkogenen wie

beispielsweise von *BCL-2* in Leukämien (Hanada *et al.*, 1993), γ-Synuclein (*SNCG*) in Brust-und Eierstockkarzinomen (Gupta *et al.*, 2003) und *K-RAS* in Lungen- und Kolonkarzinomem (Feinberg und Vogelstein, 1983) resultiert. Des Weiteren können Zellzyklus-Kontrollgene wie *Cyclin D2* bei Magenkarzinomen (Oshimo *et al.*, 2003) oder das metastaseassoziierte Gen *S100A4* bei Kolonkarzinomen (Nakamura und Takenaga, 1998) betroffen sein. Zudem kann Hypomethylierung in repetitiven Sequenzen der Retrotransposons und Sequenzen endogener Retroviren (HERV) auftreten, deren Cytosine in normalen somatischen Zellen dicht methyliert sind, wodurch die Transkription dieser transponierbaren Elemente normalerweise inhibiert wird (Lavie *et al.*, 2005). Mutationen im DNA-Methyltransferasegens *DNMT3B* und im *ATRX*-Gen seien als mögliche Ursachen fehlregulierter DNA-Methylierung nur kurz erwähnt (Feinberg und Tycko, 2004).

Die transkriptionelle Inaktivierung von Genen durch Promotorhypermethylierung ist einer der ursächlichsten Mechanismen in der Entstehung von Krebs (Shi et al., 2007). Das betrifft vor allem Tumorsuppressorgene und Gene, die Tumorinvasion und Metastasierung unterdrücken sowie Gene der Angiogenese, DNA-Reparatur, Therapie-/Chemoresistenz, Zellzyklus-Kontrolle und Differenzierung (Momparler und Bovenzi, 2000; Costello und Plass, 2001). Beispielsweise wurde eine starke Promotorhypermethylierung der Zyklinkinase-Inhibitoren P15 und P16 in hämatologischen Neoplasien wie AML und MDS (Hopfer et al., 2007; Desmond et al., 2007; Raj et al., 2007), des BRCA1-Gens in Brustkrebs (Esteller et al., 2000), des DNA-Mismatch Reparaturgens hMLH1 im Kolorektalkarzinom (Herman et al., 1998) und des WNT-Signalwegregulators APC im Kolonkarzinom (Deng et al., 2004) gezeigt. Die Mechanismen der DNA-Methylierung, die zu einem abweichenden Methylierungsmuster in Tumoren führen, sind bisher nicht genau geklärt. Eine Reihe von Studien erklären die Promotorhypermethylierung verschiedener tumorrelevanter Gene unter anderem mit einer Überexpression der DNMT1 (Sun et al., 1997; Etoh et al., 2004). Die DNA-Hypermethylierung gewinnt als therapeutisches Angriffsziel bei der Behandlung myeloischer Malignitäten immer mehr an Bedeutung. Die Therapie von MDS-Patienten mit dem DNA-Methylierungsinhibitor 5`-Aza-2`-Desoxycytidin führte beispielsweise zur Re-expression des Zellzykluskontrollgens P15 und anderen Tumorsuppressorgenen, was einem besseren klinischen Verlauf dieser Patienten nach sich zog (Daskalakis et al., 2002; Musolino et al., 2010).

In verschiedenen Krebserkrankungen, wie Nieren- (Awakura *et al.*, 2008), Bauchspeicheldrüsen- (Bu *et al.*, 2008), Magen- (Zhao *et al.*, 2007), Kolorektal- (Suzuki *et al.*, 2002) und Brustkarzinomen (Suzuki *et al.*, 2008), ist die Promotorhypermethylierung ein grundlegender Mechanismus der transkriptionellen Inaktivierung von *SFRP1*. Ein ähnlicher Zusammenhang wurde in kürzlich veröffentlichten Studien an verschiedenen Leukämien, wie Akute Myeloische Leukämie (AML) (Jost *et al.*, 2008), Akute Lymphoblastische Leukämie (ALL) (Roman-Gomez *et al.*, 2007) und Chronisch Lymphatische Leukämie (CLL) (Liu *et al.*, 2006), dargestellt. Diese Beobachtungen ließen *SFRP1* eine funktionelle Rolle als Tumorsuppressor zuteil werden. Jedoch gab es bisher keine Kenntnisse dazu über Patienten mit Myelodysplastischen Syndrom.

A.6 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Evaluierung des Genexpressionsverhaltens von *ALCAM* und *SFRP1* während der hämatopoetischen Differenzierung beim MDS und der normalen Hämatopoese. Nach Identifizierung dieser Gene als neue Schlüsselgene der Dyshämatopoese beim MDS sollte anhand funktioneller Studien die Rolle von *ALCAM* in der Pathogenese des MDS untersucht werden. Als weiterer Bestandteil sollte erstmals der DNA-Methylierungsstatus und potentielle Mutationen des *SFRP1*-Promotors detektiert werden, um Rückschlüsse auf die Expressionsregulation dieses Gens zu erhalten. Im Einzelnen wurden folgende Fragestellungen untersucht:

- 1. Stellt *ALCAM* anhand seines Genexpressionsmusters in hämatopoetischen Zellen ein potentielles Schlüsselgen hinsichtlich seiner Bedeutung in der gestörten Hämatopoese des MDS dar?
- 2. Kann ein geeignetes MDS-Modellzellsystem zur Überexpression von ALCAM etabliert werden, um Untersuchungen zur funktionellen Charakterisierung durchzuführen?
- 3. Welche Rolle spielt *ALCAM* hinsichtlich seiner Bedeutung für die Proliferation, Apoptose und Differenzierung bei der Progression des MDS?

- 4. Stellt *SFRP1* aufgrund seiner differentiellen Genexpression ein neues Schlüsselgen für die ineffektive Hämatopoese beim MDS dar? Unterscheidet sich die Genexpression in Zellen der MDS-Niedrigrisikogruppen von Zellen der hohen Risikogruppen? Wie verhält sich im Vergleich dazu die *SFRP1*-Genexpression in akuten Leukämien?
- 5. Durch welche Regulationsmechanismen wird die Genexpression von *SFRP1* im MDS im Vergleich zu akuten Leukämien kontrolliert?
- 6. Welche Hinweise auf eine Beteiligung von *SFRP1* und des WNT-Signalweges an der Pathogenese des MDS ergeben sich aus den Genexpressionsanalysen?

Die experimentell gewonnenen Daten sollen dazu beitragen, die Komplexität des Pathogenesemechanismus beim MDS besser zu verstehen.

B MATERIALIEN UND METHODEN

B.1 Materialien

B.1.1 Patientenkollektive

In den folgenden real-time RT-PCR-Analysen wurde die transkriptionelle Genexpression des Zelladhäsionsmoleküls ALCAM, des WNT-Antagonisten SFRP1 sowie seiner Rezeptorisoform FZD3 untersucht. Dafür gingen die Daten von insgesamt 78 zur Verfügung stehenden Patienten mit einem Myelodysplastischen Syndrom unterschiedlichen Risikotyps zum Zeitpunkt der Erstdiagnose ein. Für die vergleichende Analyse des Expressionsverhaltens dieser Gene wurden 24 Normalpersonen (NP) als gesunde Kontrollen in die Untersuchung einbezogen. Zusätzlich wurde die SFRP1- und FZD3-Genexpression in 23 Patienten mit AML sowie in 21 Patienten mit ALL analysiert, um Unterschiede der mRNA-Expression dieser Gene im MDS und in akuten Leukämien validieren zu können. Die jeweilige Patientencharakteristik ist den Tabellen 4-7 zu entnehmen.

Die Einteilung des MDS-Risikotyps erfolgte nach dem International Prognostic Scoring System (Greenberg et al., 1997). Demnach wurden die MDS-Patienten dem Niedrigrisiko- (low risk), Intermediär 1- (intermediate-1, int-1), Intermediär 2-(*intermediate-2, int-2*) und Hochrisikotyp (*high risk*) zugeordnet. Den Patienten wurde im Rahmen einer speziellen MDS-Sprechstunde Knochenmark und peripheres Blut für diagnostische Untersuchungen entnommen. In diesem Zusammenhang wurde den Patienten erläutert welche begleitenden wissenschaftlichen Untersuchungen möglich wären. Wenn sich der Patient mit diesen zusätzlichen Analysen und der Speicherung der resultierenden Daten einverstanden erklärte. wurden zusätzliche Knochenmarkproben sowie peripheres Blut entnommen. Die Knochenmarkaspiration Blutentnahme der gesunden Kontrollpersonen erfolgte ebenfalls nach und Einverständniserklärung und ausschließlich für wissenschaftliche Analysen. Tabelle 8 fasst die Anzahl der untersuchten Patienten des jeweiligen Entitätsund Erkrankungstypus für die jeweiligen Gene zusammen.

Init.	Alter	m/w	WHO (FAB)	Zytogenetik	IPSS
	(Jahre)				
O. B.	69	m	RARS	46XY	Low risk
G. B.	66	W	5q-Syndrom	46XX,del(5)(q12q31)	Low risk
U. F.	75	W	5q-Syndrom	46XX,del(5)(q13q33)	Low risk
I. B.	81	W	RARS	k. A.	Low risk
L. H.	73	m	RCMD-RS	46XY	Low risk
G. H.	72	m	RCMD-RS	46XY	Low risk
G. K.	70	m	RCMD-RS	46XY	Low risk
H. K.	70	W	RARS	46XX	Low risk
M. M.	63	m	(RA)	46XY	Low risk
I. M.	69	W	RCMD-RS	46XX,del(20)(q11q13)	Low risk
M. M.	44	m	RCMD	46XY	Low risk
S. S.	63	W	RCMD	46XX,del(5)(q15q33)	Low risk
М. Т.	64	W	(RARS)	46XX, del(5)(q31)	Low risk
H. W.	86	m	RCMD-RS	46XY	Low risk
B. Z.	79	W	RCMD-RS	46XX	Low risk
E. U.	76	m	RARS	46XY	Low risk
W. E.	72	m	(-)	(-)	Low risk
F. B.	78	W	k. A.	46XX	Low risk
D. A.	67	m	RCMD-RS	46XY +8	Int-1 risk
Н. В.	45	m	RARS	46XY [16]	Int-1 risk
K. B.	59	m	RCMD	46X,-Y,+21[23]/46,XY[2]	Int-1 risk
H. D.	70	m	RCMD	46XY,inv(7)[4]/46,XY[21]	Int-1 risk
G. D.	72	m	RAEB II	46XY	Int-1 risk
D. K.	86	W	(-)	(-)	Int-1 risk
G. F.	72	W	RCMD-RS	46XX	Int-1 risk
K. G.	68	W	RCMD	46XX	Int-1 risk
H. H.	92	m	RAEB I	k. A.	Int-1 risk
D. K.	73	m	RCMD	k. A.	Int-1 risk
M. S.	67	m	RAEB I	46XY	Int-1 risk
G. L.	72	W	RCMD	48XX,+9,+16;49,XX,+8,+9,+16;46,XX	Int-1 risk
M. O.	67	m	RCMD-RS	46XY	Int-1 risk
J. W.	71	m	RCMD	46XY,del(20)(q11q13)[25]	Int-1 risk
L. P.	67	m	RAEBI	46XY,del(11)(q23q25)	Int-1 risk
G. R.	70	m	RCMD	46XY,del(5)	Int-1 risk
L. S.	68	m	RCMD	46XY	Int-1 risk
B. S.	81	W	RCMD	46XX	Int-1 risk
R. I.	56	W	RARS	46XX	Int-1 risk
G. I.	69	m	RCMD	46XY	Int-1 risk
M.W.	67	W	RCMD-RS	45X,-X	Int-1 risk
M. E.	56	w	RARS	46XX[27]	Int-1 risk
F. F.	93	m	k. A.	46XY,del(4)(q12q23)	int-1 risk
W. H.	/4	m		46XY	Int-1 risk
H. S.	/8	W	5q-Syndrom	46XX,del(5)(q12q23)	int-1 risk
H. R.	89	m	RAEB II	Komplex aberranter Karyotyp	Int-1 risk
G. R.	71	W	RAEB II	46XY,del(5)(q13q31)	Int-1 risk

Tab. 4: Patientencharakteristik MDS

I. S. 77 w RAEB I 46XX,tr(1;17)(p36q23) Int-2 risk H. B. 67 w RCMD 46XX,inv(7)(q11.2q22) Int-2 risk H. B. 70 m RAEB II 46XY,del(20)(q12) Int-2 risk P. F. 66 m 5q-Syndrom 46XY,del(5)(q13q31),-7,+8 Int-2 risk D. K. 73 m RCMD-RS 46XY Int-2 risk E. K. 69 w RAEB II Komplex aberranter Karyotyp Int-2 risk I. L. 81 w RAEB II 46XX Int-2 risk E. L. 63 w RAEB II Komplex aberranter Karyotyp Int-2 risk G. M. 83 m RAEB I 46XY Int-2 risk G. S. 69 m RAEB I 46XY Int-2 risk K. S. 66 m RAEB II 46XY Int-2 risk K. S. 66 m RAEB II 46XY Int-2 risk K. S. 66 m RAEB II 46XY Int-2 risk G. S. 55	Fortsetzu	Fortsetzung Tabelle 4					
H. B. 67 w RCMD 46XX,inv(7)(q11.2q22) Int-2 risk H. B. 70 m RAEB II 46XY,del(20)(q12) Int-2 risk P. F. 66 m 5q-Syndrom 46XY,del(5)(q13q31),-7,+8 Int-2 risk D. K. 73 m RCMD-RS 46XY,del(3)(q13q31),-7,+8 Int-2 risk E. K. 69 w RAEB II Komplex aberranter Karyotyp Int-2 risk I. L. 81 w RAEB II 46XY Int-2 risk E. L. 63 w RAEB II 46XY Int-2 risk G. M. 83 m RAEB II 46XY Int-2 risk G. M. 83 m RAEB I 46XY Int-2 risk G. S. 69 m RAEB II 46XY Int-2 risk K. S. 66 m RAEB II 46XY Int-2 risk K. S. 66 m RAEB II 46XY Int-2 risk K. S. 66 m RAEB II 46XY Int-2 risk K. S. 70 m	I. S.	77	W	RAEB I	46XX,t(1;17)(p36q23)	Int-2 risk	
H. B. 70 m RAEB II 46XY,del(20)(q12) Int-2 risk P. F. 66 m 5q-Syndrom 46XY,del(5)(q13q31),-7,+8 Int-2 risk D. K. 73 m RCMD-RS 46XY,del(20)(q12) Int-2 risk L. K. 69 w RAEB II Komplex aberranter Karyotyp Int-2 risk I. L. 81 w RAEB II Komplex aberranter Karyotyp Int-2 risk E. L. 63 w RAEB II Komplex aberranter Karyotyp Int-2 risk G. M. 83 m RAEB I 46XY Int-2 risk G. S. 69 m RAEB I 46XY Int-2 risk K.S. 66 m RAEB II 46XY Int-2 risk K.S. 66 m RAEB II 46XY Int-2 risk K.S. 66 m RAEB II 46XY Int-2 risk K.S. 77 m RAEB II 46XY Int-2 risk K.V. 80 m (-) (-) Int-2 risk K.V. 80 <t< td=""><td>H. B.</td><td>67</td><td>W</td><td>RCMD</td><td>46XX,inv(7)(q11.2q22)</td><td>Int-2 risk</td></t<>	H. B.	67	W	RCMD	46XX,inv(7)(q11.2q22)	Int-2 risk	
P. F. 66 m 5q-Syndrom 46XY,del(5)(q13q31),-7,+8 Int-2 risk D. K. 73 m RCMD-RS 46XY,+8 Int-2 risk E. K. 69 w RAEB I (II) Komplex aberranter Karyotyp Int-2 risk L. L. 81 w RAEB II 46XX Int-2 risk E. L. 63 w RAEB II Komplex aberranter Karyotyp Int-2 risk G. M. 83 m RAEB I 46XX Int-2 risk G. S. 69 m RAEB I 46XY Int-2 risk G. S. 69 m RAEB II 46XY Int-2 risk G. S. 66 m RAEB II 46XY Int-2 risk S. T. 77 m RAEB II 46XY Int-2 risk G. S. 55 w RAEB II 46XY Int-2 risk G. N. 83 m RAEB II 46XY Int-2 risk L. J. 75 m RAEB II 46XY,del 20q Int-2 risk H. D. 82 m RAEB II	H. B.	70	m	RAEB II	46XY,del(20)(q12)	Int-2 risk	
D. K. 73 m RCMD-RS 46XY,+8 Int-2 risk E. K. 69 w RAEB I (II) Komplex aberranter Karyotyp Int-2 risk I. L. 81 w RAEB II 46XX Int-2 risk E. L. 63 w RAEB II 46XX Int-2 risk G. M. 83 m RAEB I 46XY Int-2 risk G. M. 83 m RAEB I 46XY Int-2 risk G. S. 69 m RAEB I 46XY Int-2 risk K. S. 66 m RAEB II 46XY Int-2 risk K. S. 66 m RAEB II 46XY Int-2 risk L. Z. 77 m RAEB III 46XY Int-2 risk G. S. 55 w RAEB II 46XY Int-2 risk K. V. 80 m (-) (-) Int-2 risk K. V. 80 m (-) (-) Int-2 risk <td>P. F.</td> <td>66</td> <td>m</td> <td>5q-Syndrom</td> <td>46XY,del(5)(q13q31),-7,+8</td> <td>Int-2 risk</td>	P. F.	66	m	5q-Syndrom	46XY,del(5)(q13q31),-7,+8	Int-2 risk	
E. K. 69 w RAEB I (II) Komplex aberranter Karyotyp Int-2 risk I. L. 81 w RAEB II 46XX Int-2 risk E. L. 87 m RAEB II Komplex aberranter Karyotyp Int-2 risk E. L. 63 w RAEB II 46XX Int-2 risk G. M. 83 m RAEB I 46XY Int-2 risk I. R. 38 w RAEB I Komplex aberranter Karyotyp Int-2 risk G. S. 69 m RAEB II 46XY Int-2 risk K. S. 66 m RAEB II 46XY Int-2 risk K. S. 66 m RAEB II 46XY Int-2 risk K. Z. 77 m RAEB II 46XY Int-2 risk G. S. 55 w RAEB II 46XY Int-2 risk K. V. 80 m (-) (-) Int-2 risk L. J. 75 m RAEB II 46XY Int-2 risk L. J. 75 m RAEB II 46XY	D. K.	73	m	RCMD-RS	46XY,+8	Int-2 risk	
I. L. 81 w RAEB II 46XX Int-2 risk E. L. 87 m RAEB II Komplex aberranter Karyotyp Int-2 risk E. L. 63 w RAEB II 46XX Int-2 risk G. M. 83 m RAEB I 46XY Int-2 risk I. R. 38 w RAEB I 46XY Int-2 risk K. S. 66 m RAEB I 46XY Int-2 risk K. S. 66 m RAEB II 46XY Int-2 risk S. T. 77 m RAEB II 46XY Int-2 risk G. S. 55 w RAEB II 46XY Int-2 risk G. N. 83 m r.(-) (-) Int-2 risk G. N. 83 m RAEB II 46XY Int-2 risk M. V. 80 m (-) (-) Int-2 risk G. N. 83 m RAEB II 46XY Int-2 risk H. D. 82 m RAEB II 46XY,del20q Int-2 risk H. D. 73 m	E. K.	69	W	RAEB I (II)	Komplex aberranter Karyotyp	Int-2 risk	
E. L. 87 m RAEB II Komplex aberranter Karyotyp Int-2 risk E. L. 63 w RAEB II $46XX$ Int-2 risk G. M. 83 m RAEB I $46XY$ Int-2 risk I. R. 38 w RAEB I Komplex aberranter Karyotyp Int-2 risk G. S. 69 m RAEB II $46XY$ Int-2 risk S. T. 77 m RAEB II $46XY$ Int-2 risk L. Z. 77 m RAEB II $46XY$ Int-2 risk G. S. 55 w RAEB II $46XY$ Int-2 risk K. V. 80 m (-) (nt-2 risk G. N. 83 m RAEB II $46XY$ Int-2 risk K. V. 80 m (-) (nt-2 risk Int-2 risk H. D. 82 m RAEB II $46XY$, del 20q Int-2 risk H. D. 82 m RAEB II $46XY$, del 20q Int-2 risk J. 73 m RAEB II $46XY$, del 20q	I. L.	81	W	RAEB II	46XX	Int-2 risk	
E. L. 63 w RAEB II 46XX Int-2 risk G. M. 83 m RAEB I 46XY Int-2 risk I. R. 38 w RAEB I Komplex aberranter Karyotyp Int-2 risk G. S. 69 m RAEB II 46XY Int-2 risk K. S. 66 m RAEB II 46XY Int-2 risk S. T. 77 m RAEB II 46XY Int-2 risk G. S. 55 w RAEB II 46XY Int-2 risk G. N. 83 m RAEB II 46XY Int-2 risk K. V. 80 m (-) (-) Int-2 risk G. N. 83 m RAEB II 46XY,del 20q Int-2 risk H. D. 82 m RAEB II 46XY,del 20q Int-2 risk H. D. 82 m RAEB II 46XY,del 20q Int-2 risk H. G. 70 m AAEB II 46XY,del 20q Int-2 risk J. J. 73 m RAEB II KA.A. High risk	E. L.	87	m	RAEB II	Komplex aberranter Karyotyp	Int-2 risk	
G. M. 83 m RAEB I 46XY Int-2 risk I. R. 38 w RAEB I Komplex aberranter Karyotyp Int-2 risk G. S. 69 m RAEB II 46XY Int-2 risk K. S. 66 m RAEB II 46XY Int-2 risk S. T. 77 m RAEB II 46XY Int-2 risk K. Z. 77 m RAEB II 46XY Int-2 risk G. S. 55 w RAEB II 46XY Int-2 risk K. V. 80 m (-) (-) Int-2 risk G. N. 83 m RAEB II 46XY,413 Int-2 risk H. D. 82 m RAEB II 46XY,del 20q Int-2 risk H. D. 82 m RAEB II 46XY,del 20q Int-2 risk H. G. 70 m AAL 47XY,+118]/46XY [10] High risk J. J. 73 m RAEB II k. A. High risk S. O. 48 w RAEB I Komplex aberranter Karyotyp	E. L.	63	W	RAEB II	46XX	Int-2 risk	
I. R. 38 w RAEB I Komplex aberranter Karyotyp Int-2 risk G. S. 69 m RAEB I 46XY Int-2 risk K. S. 66 m RAEB II 46XY Int-2 risk S. T. 77 m RAEB II 46XY Int-2 risk L. Z. 77 m RAEB II 46XY Int-2 risk G. S. 55 w RAEB II 46XY Int-2 risk K. V. 80 m (-) (-) Int-2 risk G. N. 83 m RAEB II 46XY,tall Int-2 risk L. J. 75 m RAEB II 46XY,del 20q Int-2 risk H. D. 82 m RAEB II 46XY,del 20q Int-2 risk H. G. 70 m AML 47XY,+118]/46XY [10] High risk J. J. 73 m RAEB II k. A. High risk S. O. 48 w RAEB II k. A. High risk S. O. 48 w RAEB II 46XY	G. M.	83	m	RAEB I	46XY	Int-2 risk	
G. S. 69 m RAEB I 46XY Int-2 risk K. S. 66 m RAEB II 46XY Int-2 risk S. T. 77 m RAEB II 46XY Int-2 risk L. Z. 77 m RAEB II 46XY Int-2 risk G. S. 55 w RAEB II 46XY Int-2 risk K. V. 80 m (-) (-) Int-2 risk G. N. 83 m RAEB II 46XY, del 20q Int-2 risk L. J. 75 m RAEB II 46XY, del 20q Int-2 risk H. D. 82 m RAEB II 46XY, del 20q Int-2 risk H. D. 82 m RAEB II 46XY, del 20q Int-2 risk H. G. 70 m AML 47XY,+11[8]/46XY [10] High risk J. J. 73 m RAEB II k. A. High risk S. O. 48 w RAEB I Komplex aberranter Karyotyp High risk R. P. 51 m RAEB II K	I. R.	38	W	RAEB I	Komplex aberranter Karyotyp	Int-2 risk	
K. S. 66 m RAEB II 46XY Int-2 risk S. T. 77 m RAEB II 46XY Int-2 risk L. Z. 77 m RAEB II 46XY Int-2 risk G. S. 55 w RAEB II 46XY Int-2 risk K. V. 80 m (-) (-) Int-2 risk G. N. 83 m RAEB II 46XY Int-2 risk L. J. 75 m RAEB II 46XY,del 20q Int-2 risk H. D. 82 m RAEB II 46XY,del 20q Int-2 risk H. D. 82 m RAEB II 46XY,del 20q Int-2 risk H. D. 82 m RAEB II 46XY,del 20q Int-2 risk J. J. 73 m RAEB II 46XY (fol) High risk J. J. 73 m RAEB II k. A. High risk S. O. 48 w RAEB II Komplex aberranter Karyotyp High risk R. P. 51 m RAEB II 46XY	G. S.	69	m	RAEB I	46XY	Int-2 risk	
S. T. 77 m RAEB II 46XY Int-2 risk L. Z. 77 m RAEB II 46XY Int-2 risk G. S. 55 w RAEB II 47XX,+13 Int-2 risk K. V. 80 m (-) (-) Int-2 risk G. N. 83 m RAEB II 46XY Int-2 risk L. J. 75 m RAEB I 46XY,del 20q Int-2 risk H. D. 82 m RAEB II 46XY,del (20)(q11q13) High risk R. M. 64 m (-) (-) High risk J. J. 73 m RAEB II k. A. High risk J. J. 73 m RAEB II k. A. High risk S. O. 48 w RAEB I Komplex aberranter Karyotyp High risk R. P. 82 w AML 47XX,+8 High risk G. S. 42 m RAEB II 46XY High risk G. S. 74 w k. A. 47XX,+8 High risk	K. S.	66	m	RAEB II	46XY	Int-2 risk	
L. Z. 77 m RAEB II 46XY Int-2 risk G. S. 55 w RAEB II 47XX,+13 Int-2 risk K. V. 80 m (-) (-) Int-2 risk G. N. 83 m RAEB II 46XY Int-2 risk L. J. 75 m RAEB I 46XY,del 20q Int-2 risk H. D. 82 m RAEB II 46XY,del(20)(q11q13) High risk R. M. 64 m (-) (-) High risk J. J. 73 m RAEB II k. A. High risk J. J. 73 m RAEB II k. A. High risk S. O. 48 w RAEB I Komplex aberranter Karyotyp High risk S. O. 48 w RAEB I Komplex aberranter Karyotyp High risk A. P. 51 m RAEB II 46XY High risk C. S. 42 m RAEB II k. A. High risk U. S. 71 w RAEB II 46XX, del7q31 High risk R. H. 68 w RAEB I Hypotetraploider, komplex aberranter Karyotyp K. P. 85 m AML-M2 46XY High risk	S. T.	77	m	RAEB II	46XY	Int-2 risk	
G. S. 55 w RAEB II 47XX,+13 Int-2 risk K. V. 80 m (-) (-) Int-2 risk G. N. 83 m RAEB II 46XY Int-2 risk L. J. 75 m RAEB II 46XY,del 20q Int-2 risk H. D. 82 m RAEB II 46XY,del 20q Int-2 risk H. D. 82 m RAEB II 46XY,del 20q Int-2 risk H. D. 82 m RAEB II 46XY,del (20)(q11q13) High risk R. M. 64 m (-) (-) High risk J. J. 73 m RAEB II 46XY (10) High risk J. J. 73 m RAEB II k. A. High risk S. O. 48 w RAEB I Komplex aberranter Karyotyp High risk S. O. 48 w RAEB II 46XY High risk G. S. 74 w k. A. 47XX,+8 High risk G. S. 71 w RAEB II 46XX,de	L. Z.	77	m	RAEB II	46XY	Int-2 risk	
K. V.80m(-)(-)Int-2 riskG. N.83mRAEB II $46XY$, del 20qInt-2 riskL. J.75mRAEB I $46XY$, del 20qInt-2 riskH. D.82mRAEB II $46XY$, del (20)(q11q13)High riskR. M.64m(-)(-)High riskH. G.70mAML $47XY$, +11[8]/46XY [10]High riskJ. J.73mRAEB IIk. A.High riskJ. J.73mRAEB IIk. A.High riskS. O.48wRAEB IKomplex aberranter KaryotypHigh riskS. O.48wRAEB II46XYHigh riskS. O.48wRAEB II46XYHigh riskG. S.74wk. A.47XX, +8High riskC. S.42mRAEB IIk. A.High riskU. S.71wRAEB IIk. A.High riskR. S.81w46XXHigh riskR. S.81w46XXHigh riskR. H.68wRAEB IHypotetraploider, komplex aberranterHigh riskK. P.85mAML-M246XYHigh risk	G. S.	55	W	RAEB II	47XX,+13	Int-2 risk	
G. N.83mRAEB II $46XY$ Int-2 riskL. J.75mRAEB I $46XY$, del 20qInt-2 riskH. D.82mRAEB II $46XY$, del(20)(q11q13)High riskR. M.64m(-)(-)High riskH. G.70mAML $47XY$, +11[8]/46XY [10]High riskJ. J.73mRAEB IIk. A.High riskJ. J.73mRAEB IIk. A.High riskS. O.48wRAEB IKomplex aberranter KaryotypHigh riskR. P.82wAML $47XXX$ High riskA. P.51mRAEB II $46XY$ High riskC. S.42mRAEB II $46XX$ High riskU. S.71wRAEB II $46XX$ High riskR. S.81w $46XX$ High riskR. H.68wRAEB II $46XY$ High riskK. P.85mAML-M2 $46XY$ High risk	K. V.	80	m	(-)	(-)	Int-2 risk	
L. J.75mRAEB I $46XY,del 20q$ $Int-2 risk$ H. D.82mRAEB II $46XY,del(20)(q11q13)$ High riskR. M.64m(-)(-)High riskH. G.70mAML $47XY,+11[8]/46XY [10]$ High riskJ. J.73mRAEB IIk. A.High riskH. K.76m $46XY$ High riskS. O.48wRAEB IKomplex aberranter KaryotypHigh riskR. P.82wAML $47XXX$ High riskA. P.51mRAEB II $46XY$ High riskE. S.74wk. A. $47XX,+8$ High riskC. S.42mRAEB II $k. A.$ High riskG. S.71wRAEB II $k. A.$ High riskR. S.81w $46XX$ High riskR. H.68wRAEB IHypotetraploider, komplex aberranterHigh riskK. P.85mAML-M2 $46XY$ High risk	G. N.	83	m	RAEB II	46XY	Int-2 risk	
H. D. 82 m RAEB II 46XY,del(20)(q11q13) High risk R. M. 64 m (-) (-) High risk H. G. 70 m AML 47XY,+11[8]/46XY [10] High risk J. J. 73 m RAEB II k. A. High risk H. K. 76 m RAEB II k. A. High risk S. O. 48 w RAEB I Komplex aberranter Karyotyp High risk R. P. 82 w AML 47XXX High risk A. P. 51 m RAEB II 46XY High risk C. S. 42 m RAEB II 46XY High risk U. S. 71 w RAEB II k. A. High risk R. S. 81 w 46XX High risk R. H. 68 w RAEB I Hypotetraploider, komplex aberranter High risk K. P. 85 m AML-M2 46XY High risk	L. J.	75	m	RAEB I	46XY,del 20q	Int-2 risk	
R. M.64m(-)(-)High riskH. G.70mAML $47XY,+11[8]/46XY$ [10]High riskJ. J.73mRAEB IIk. A.High riskH. K.76m46XYHigh riskS. O.48wRAEB IKomplex aberranter KaryotypHigh riskR. P.82wAML47XXXHigh riskA. P.51mRAEB II46XYHigh riskE. S.74wk. A.47XX,+8High riskC. S.42mRAEB IIk. A.High riskU. S.71wRAEB II46XXHigh riskR. S.81w46XXHigh riskR. H.68wRAEB IHypotetraploider, komplex aberranterHigh riskK. P.85mAML-M246XYHigh risk	H. D.	82	m	RAEB II	46XY,del(20)(q11q13)	High risk	
H. G.70mAML47XY,+11[8]/46XY [10]High riskJ. J.73mRAEB IIk. A.High riskH. K.76m46XYHigh riskS. O.48wRAEB IKomplex aberranter KaryotypHigh riskR. P.82wAML47XXXHigh riskA. P.51mRAEB II46XYHigh riskE. S.74wk. A.47XX,+8High riskC. S.42mRAEB IIk. A.High riskU. S.71wRAEB II46XX,del7q31High riskR. S.81w46XXHigh riskHigh riskR. H.68wRAEB IHypotetraploider, komplex aberranterHigh riskK. P.85mAML-M246XYHigh risk	R. M.	64	m	(-)	(-)	High risk	
J. J.73mRAEB IIk. A.High riskH. K.76m46XYHigh riskS. O.48wRAEB IKomplex aberranter KaryotypHigh riskR. P.82wAML47XXXHigh riskA. P.51mRAEB II46XYHigh riskE. S.74wk. A.47XX,+8High riskC. S.42mRAEB IIk. A.High riskU. S.71wRAEB II46XX,del7q31High riskR. S.81w46XXHigh riskR. H.68wRAEB IHypotetraploider, komplex aberranterHigh riskK. P.85mAML-M246XYHigh risk	H. G.	70	m	AML	47XY,+11[8]/46XY [10]	High risk	
H. K.76m46XYHigh riskS. O.48wRAEB IKomplex aberranter KaryotypHigh riskR. P.82wAML47XXXHigh riskA. P.51mRAEB II46XYHigh riskE. S.74wk. A.47XX,+8High riskC. S.42mRAEB IIk. A.High riskU. S.71wRAEB II46XX,del7q31High riskR. S.81w46XXHigh riskR. H.68wRAEB IHypotetraploider, komplex aberranterHigh riskK. P.85mAML-M246XYHigh risk	J. J.	73	m	RAEB II	k. A.	High risk	
S. O.48wRAEB IKomplex aberranter KaryotypHigh riskR. P.82wAML47XXXHigh riskA. P.51mRAEB II46XYHigh riskE. S.74wk. A.47XX,+8High riskC. S.42mRAEB IIk. A.High riskU. S.71wRAEB II46XX,del7q31High riskR. S.81w46XXHigh riskR. H.68wRAEB IHypotetraploider, komplex aberranterHigh riskK. P.85mAML-M246XYHigh risk	H. K.	76	m		46XY	High risk	
R. P.82wAML47XXXHigh riskA. P.51mRAEB II46XYHigh riskE. S.74wk. A.47XX,+8High riskC. S.42mRAEB IIk. A.High riskU. S.71wRAEB II46XX,del7q31High riskR. S.81w46XXHigh riskR. H.68wRAEB IHypotetraploider, komplex aberranterHigh riskK. P.85mAML-M246XYHigh risk	S. O.	48	W	RAEB I	Komplex aberranter Karyotyp	High risk	
A. P.51mRAEB II46XYHigh riskE. S.74wk. A.47XX,+8High riskC. S.42mRAEB IIk. A.High riskU. S.71wRAEB II46XX,del7q31High riskR. S.81w46XXHigh riskR. H.68wRAEB IHypotetraploider, komplex aberranterHigh riskK. P.85mAML-M246XYHigh risk	R. P.	82	W	AML	47XXX	High risk	
E. S.74wk. A.47XX,+8High riskC. S.42mRAEB IIk. A.High riskU. S.71wRAEB II46XX,del7q31High riskR. S.81w46XXHigh riskR. H.68wRAEB IHypotetraploider, komplex aberranterHigh riskK. P.85mAML-M246XYHigh risk	A. P.	51	m	RAEB II	46XY	High risk	
C. S.42mRAEB IIk. A.High riskU. S.71wRAEB II46XX,del7q31High riskR. S.81w46XXHigh riskR. H.68wRAEB IHypotetraploider, komplex aberranterHigh riskK. P.85mAML-M246XYHigh risk	E. S.	74	W	k. A.	47XX,+8	High risk	
U. S.71wRAEB II46XX,del7q31High riskR. S.81w46XXHigh riskR. H.68wRAEB IHypotetraploider, komplex aberranterHigh riskK. P.85mAML-M246XYHigh risk	C. S.	42	m	RAEB II	k. A.	High risk	
R. S.81w46XXHigh riskR. H.68wRAEB IHypotetraploider, komplex aberranterHigh riskK. P.85mAML-M246XYHigh risk	U. S.	71	W	RAEB II	46XX,del7q31	High risk	
R. H.68wRAEB IHypotetraploider, komplex aberranterHigh riskK. P.85mAML-M246XYHigh risk	R. S.	81	W		46XX	High risk	
Karyotyp K. P. 85 m AML-M2 46XY High risk	R. H.	68	W	RAEB I	Hypotetraploider, komplex aberranter	High risk	
K. P. 85 m AML-M2 46XY High risk					Karyotyp		
	K. P.	85	m	AML-M2	46XY	High risk	

Init.: Initialien; ² zum Zeitpunkt der Erstdiagnose; m/w: männlich/weiblich; WHO: *World-Health-Organisation* Klassifikation; wenn WHO nicht bekannt Angabe der FAB-Klassifikation in Klammern; FAB: *French-American-British* Klassifikation; IPSS: *International Prognostic Scoring System; low risk*: Niedrigrisiko-MDS; *int-1 risk: intermediate risk MDS*, intermediär-1 MDS; *int-2 risk: intermediate risk MDS*, intermediär-2 MDS; *high risk*: Hochrisiko-MDS; k. A.: keine Angabe; (-): Diagnose unbekannt, da Behandlung an anderem Zentrum.

Tub. 0. T allemente	Tub. 0. 1 alientenendratienstik / Ime							
Initialien	Alter [*] (Jahre)	m/w	Zytogenet. Risiko	FAB				
H. W.	59	m	1	M2				
B. W.	66	m	2	M4				
D. V.	58	w	2	M5a				
W. R.	65	m	k. A.	k. A.				
J. S.	53	m	2	k. A.				
A. N.	29	W	3	M2				
M. J.	39	m	3	M4				
D. P.	40	W	2	M1				
A. K.	55	m	2	M2				
K. P.	70	m	3	M4				
Y. B.	29	W	k. A.	k. A.				
H. L.	74	m	2	M4				
P. L.	46	W	1	M2				
K. O.	71	m	3	M4				
M. K.	26	m	2	M2				
W. W.	56	m	2	M1				
G. W.	71	m	k. A.	M4/M5				
C. F.	54	W	2	M5a				
R. K.	71	W	2	M1				
U. S.	41	m	2	M4				
L. Z.	66	m	k. A.	k. A.				
K. S.	57	m	k. A.	k. A.				
P. G.	59	m	2	M4				

Tab. 5: Patientencharakteristik AML

zum Zeitpunkt der Erstdiagnose; m/w: männlich/ weiblich; k. A.: keine Angabe, da unbekannt; 1: *good risk*, 2: *standard risk*, 3: *high risk;* FAB: *French-American-British* Klassifikation

Alter [*] (Jahre)	Geschlecht	Diagnose	BCR/ABL
			(nur bei c-ALL)
60	m	c-ALL	e1a2
56	m	c-ALL	neg.
29	m	c-ALL	neg.
34	m	c-ALL	neg.
18	m	c-ALL	neg.
45	m	c-ALL	e1a2
17	m	c-ALL	neg.
20	m	T-ALL	-
16	m	T-ALL	-
16	m	T-ALL	-
20	m	T-ALL	-
20	m	T-ALL	-
24	m	T-ALL	-
21	m	T-ALL	-
	Alter (Jahre) 60 56 29 34 18 45 17 20 16 16 16 20 20 20 24 21	Alter (Jahre) Geschlecht 60 m 56 m 29 m 34 m 18 m 45 m 17 m 20 m 16 m 20 m 20 m 21 m	Alter (Jahre)GeschlechtDiagnose60mc-ALL56mc-ALL29mc-ALL34mc-ALL18mc-ALL45mc-ALL17mc-ALL20mT-ALL16mT-ALL16mT-ALL20mT-ALL20mT-ALL20mT-ALL20mT-ALL20mT-ALL20mT-ALL20mT-ALL21mT-ALL

Tab. 6: Patientencharakteristik ALL

Fortsetzung Tabelle	6			
G. P.	55	m	B-ALL	-
B. W.	43	W	B-ALL	-
S. P.	46	W	B-ALL	-
H. E.	50	W	B-ALL	-
F. O.	27	m	B-ALL	-
I. U.	77	W	B-ALL	-

zum Zeitpunkt der Erstdiagnose; m/w: männlich/weiblich; c-ALL: *common* ALL, B-ALL: B-Linien-ALL; T-ALL: T-Linien-ALL; neg.: negativ; e1a2: Bruchpunkt im ersten Exon des BCR/ABL-Fusionsgens

Initialien	Alter [*] (Jahre)	m/w
C. O.	55	W
K. W.	84	W
M. F.	77	W
B. M.	67	W
B. E.	73	W
G. P.	85	W
H. S.	75	W
W. B.	83	m
R. G.	66	W
H. F.	83	W
B. R.	23	m
J. L.	28	W
W. N.	73	m
K. P.	66	m
H. Z.	65	W
M. M.	23	m
T. E.	31	m
N. R.	22	m
C. S.	26	m
M. V.	28	W
K. F.	28	W
K. W.	29	W
D. P.	25	m
S. E.	23	W

Tab. 7: Charakteristik der gesunden Normalpersonen

zum Zeitpunkt der Knochenmarkaspiration; m/w: männlich/weiblich
SFRP1				
	KM	CD34+	CD71+	Stroma
low risk MDS	18	11	n.a.	n.a.
Int-1 MDS	27	12	n.a.	n.a.
Int-2 MDS	19	11	n.a.	n.a.
High risk MDS	14	10	n.a.	n.a.
AML	23	n.v.	n.a.	n.a.
ALL	21	n.v.	n.a.	n.a.
NP	24	18	n.a.	n.a.
FZD3				
	KM	CD34+	CD71+	Stroma
low risk MDS	18	11	n.a.	n.a.
Int-1 MDS	27	11	n.a.	n.a.
Int-2 MDS	17	10	n.a.	n.a.
High risk MDS	14	10	n.a.	n.a.
AML	23	n.v.	n.a.	n.a.
ALL	21	n.v.	n.a.	n.a.
NP	23	16	n.a.	n.a.
ALCAM				
	KM	CD34+	CD71+	Stroma
low risk MDS	18	12	12	6
Int-1 MDS	26	13	5	11
Int-2 MDS	19	11	3	3
High risk MDS	14	11	3	6
NP	24	19	6	16

Tab. 8: Zusammenfassung der Patienten und Normalpersonen für real-time RT-PCR-basierteGenexpressionsanalysen

n.a.: nicht analysiert; n.v.: nicht vorhanden

Zusätzlich wurden mikroarraybasierte Genexpressionprofile generiert. Die Datensätze der in Tabelle 9 aufgeführten Patientenkohorten und Normalpersonen wurden für die Erstellung der Expressionsdaten ausgewählter Gene herangezogen.

		MDS	NP
KM	LR	31	24
	HR	21	
CD34+	LR	20	14
	HR	11	
CD71+	LR	12	6
	HR	5	
Stroma	LR	9	4
	HR	7	

Tab. 9: Zusammenfassung der Patienten und Normalpersonen für mikroarraybasierte Genexpressionsanalysen

LR: umfasst Patienten mit *low risk* und *int-1 risk* MDS; HR: umfasst Patienten mit *int-2 risk* und *high risk* MDS

B.1.2 Humane Primärzellen und Zelllinien

Die leukämischen Suspensionszelllinien HEL, K562 und U937 wurden in einem Zellkulturinkubator unter Standardkulturbedingungen bei 37 °C und 5% CO₂ gehalten. Die Zellen wurden alle 3-4 Tage mit frischem Nährmedium versorgt. Des Weiteren wurden aus mononukleären Zellen des Vollknochenmarks Stromazellen von MDS-Patienten generiert und wie unter Abschnitt B.2.1.3 beschrieben kultiviert. Die einzelnen Mediumkomponenten und genauen Konditionen können den Tabellen 10 und 11 entnommen werden.

Tab. 10: Mediumkomponenten

Hersteller
GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe
GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe
Sigma-Aldrich, Steinheim
PAN Biotech, Aldenbach
Biochrom AG, Berlin

Zellen	Herkunft	Zusätze
HEL	Humane Erythroleukämie	10% FCS, 1% L-Glu, 1% A/A
K562	Humane Chronische Myeloische	10% FCS, 1% A/A
	Leukämie (CML)	
U937	Humane Promyelozyten-	10% FCS, 1% A/A
	Leukämie	
Stromazellen	Primäres Vollknochenmark	IMDM, 20% FCS, 1% A/A

 Tab. 11:
 Kultivierungsbedingungen

B.1.3 Geräte, Chemikalien und Materialien

B.1.3.1 Geräte

Neben der in einem molekularbiologisch arbeitenden Labor üblichen Grundausstattung (Zentrifugen, Pipetten, Gelelektrophoresezubehör, UV-Transilluminator mit Kamera, Waagen, Vortexer, Heizblöcke, CO₂-Zellkulturinkubator, Sterilwerkbank, Mikroskop mit Kamera, Gefriertruhen, pH-Meter, Wasserbad) wurden zusätzlich folgende Geräte verwendet:

0	A B B B B B B B B B B	
Gerät	Gerätebezeichnung	Hersteller
Thermocycler	Primus96	peqLab, Erlangen
Thermocycler	PTC-200	MJ Research, Waltham, USA
Rotorgene Cycler	RG-6000	Corbett Research, Sydney,
		Australien
Spectrophotometer	NanoDrop ND-1000	peqLab, Erlangen
ELISA-	Sunrise	TECAN, Crailsheim
Plattenlesegerät		
Pyrosequencer	PyroMark ID System	Qiagen, Hilden
Präparierstation des	Pyromark Vacuum Prep	Qiagen, Hilden
Pyrosequencers	Workstation	
Elektroporator	Nucleofactorl	Lonza, Basel, Schweiz
FACS-Gerät	FACScan	Becton Dickinson, Heidelberg

B.1.3.2 Chemikalien und Kits

Die für diese Arbeit verwendeten Chemikalien und Substanzen können der Tabelle 13 entnommen werden. Alle verwendeten Kits sowie die Zusammensetzung der selbst hergestellten Puffer und Lösungen werden in den nachstehend dargestellten Methoden im Einzelnen aufgeführt. Alle selbst hergestellten Puffer und Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt.

Chemikalie/Substanz	Hersteller
Agarose für	
DNA-Gelelektrophorese	Serva, Heidelberg
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
BSA (30%)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Chloroform	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfooxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DMSO für Zellkultur	AppliChem, Darmstadt
EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethanol (99%)	J.T.Baker, Deventer, Niederlande
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glykogen	Roche Diagnostic, Mannheim
Isopropanol	J.T.Baker, Deventer, Niederlande
Kaliumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Fluka, Buchs, Schweiz
10x TBE	Invitrogen, Karlsruhe
Titriplex III	Merck, Darmstadt
Trizol	Invitrogen, Karlsruhe
Trypanblau	GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin	GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe

Tab. 13: Übersicht verwendeter Chemikalien und Substanzen

B.1.3.3 Expressionsvektoren

Zur Überexpression von *ALCAM* in leukämischen Zelllinien wurde ein 1752 bp großes Fragment von *ALCAM* an den Restriktionsschnittstellen für die Endonukleasen EcoRI und XhoI in die *Multi Cloning Site* des Expressionsvektors pcDNA3.1-myc-HisA (Invitrogen) inseriert (Abb. 5). Der Vektor pcDNA3.1-myc-HisA ohne Fragment diente in den nachstehenden Versuchen als Kontrolle. Die Vektoren wurden von Dr. Daniel Nowak (III. Medizinische Klinik, Hämatologie/Onkologie, Universitätsmedizin Mannheim) zur Verfügung gestellt.



Abb. 5: Vektorkarte pcDNA3.1-myc-HisA-*ALCAM*. CMV Promotor: 209-863 bp, T7 Promotor: 863-882 bp, *ALCAM*: 902-2718 bp, *myc*-Epitop: 2716-2745 bp, Polyhistidin Tag 6xHis: 2761-2778 bp, f1 Replikationsursprung: 3077-3490 bp, SV40 Promotor: 3555-3879 bp, Geneticin-Resistenzgen: 3915-4709 bp, SV40 Polyadenylierungssignal: 4885-5015 bp, Ampicillin-Resistenzgen: 6216-7076 bp (komplementärer Strang)

B.1.3.4 Synthetische Oligonukleotide

Die erforderliche quantitative und qualitative Analyse der untersuchten Gene wurde mittels synthetischer Oligonukleotid-Primer in der semiquantitativen *real-time* RT-PCR (B.2.2.5) und/oder in der standardisierten PCR-Amplifikation (B.2.2.2) durchgeführt. Die Konstruktion der Primersequenz erfolgte unter Anwendung der Spezialsoftware Primer3

(http://frodo.wi.mit.edu/primer3/). Alle verwendeten Oligonukleotide (Tab. 14) wurden von der Firma Metabion (Martinsried, Deutschland) synthetisiert.

Bezeichnung	Funktion	Nukleotidsequenz $(5 \rightarrow 3)$
SFRP1 fw	Forward	AGATGCTTAAGTGTGACAAGTTCCC
	RT-PCR Primer	
SFRP1 rev	revers	TGGCCTCAGATTTCAACTCGT
	RT-PCR Primer	
SFRP1 Probe	RT-PCR Probe	FAM-ACCGAAGCCTCCAAGCCCCAAG-TAMRA
ALCAM fw	Forward	CAGTTCCTGCCGTCTGCT
	RT-PCR Primer	
ALCAM rev	revers	ATAATGGTATCTCCATATGCT
	RT-PCR Primer	
ALCAM Probe	RT-PCR Probe	FAM-GTCTTCAGGCCAGGCCTTGGATG-TAMRA
GPI fw	forward	TCTTCGATGCCAACAAGGAC
	RT-PCR Primer	
GPI rev	revers	GCATCACGTCCTCCGTCA
	RT-PCR Primer	
GPI Probe	RT-PCR Probe	JOE-TTCAGCTTGACCCTCAACACCAAC-TAMRA
FZD3 fw	forward	TGGCTATGGTGGATGATCAAAG
	RT-PCR Primer	
FZD3 rev	revers	TGGAGGCTGCCGTGGTA
	RT-PCR Primer	
FZD3 Probe	RT-PCR Probe	FAM-AGGAAGCATCCACAGCAAAGTGAGCAG-
		TAMRA
SFRP1 Mut fw	forward	CTGACGGACGTGGTAACGAGTG
	Sequenzierprimer	
SFRP1 Mut rev	revers	CAGGTTGGGCAGCACCATCTTC
	Sequenzierprimer	
G418 fw	forward PCR Primer	ATGCCTGCTTGCCGAATATC
G418 rev	revers PCR Primer	AAGAACTCGTCAAGAAGGCG

Tab. 14: Übersicht der verwendeten Oligonukleotid-Primer

B.1.3.5 Antikörper

Bezeichnung	Funktion	Hersteller
anti-Mouse IgG1-FITC/IgG2a-PE	FACS-Antikörper;	Beckman Coulter,
	Isotypkontrolle	Krefeld
anti-CD71-PE	FACS-Antikörper	Immunotech, Prag,
		Tschechien
Anti-GlyA (CD235a) –PE	FACS-Antikörper	Beckman Coulter,
		Krefeld
Anti CD34+ MicroBeads	Magnetische Microbeads	Miltenyi Biotec,
	zur Zellseparation	Bergisch Gladbach
Anti CD71+ MicroBeads	Magnetische Microbeads	Miltenyi Biotec,
	zur Zellseparation	Bergisch Gladbach

Tab. 15: Übersicht der verwendeten Antikörper

B.2 Methoden

B.2.1 Zellbiologische Methoden

B.2.1.1 Aufreinigung mononukleärer, hämatopoetischer Zellen aus dem Knochenmark

Nach Aspiration wurde das heparinisierte Vollknochenmark der Patienten und der gesunden Normalpersonen unverzüglich weiter verarbeitet, wobei mononukleäre Zellen mittels Ficoll Paque PLUS (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) über Dichtegradientenzentrifugation isoliert wurden. Dazu wurden in einem 50 ml-Reaktionsgefäß maximal 10 ml Knochenmark mit PBS (Dulbecco w/o Ca²⁺, Mg²⁺, Biochrom AG) in einem Gesamtvolumen von 35 ml verdünnt. Anschließend wurde das Gemisch vorsichtig auf 15 ml Ficoll-Lösung in einem 50 ml-Reaktionsgefäß geschichtet. Nach 30 min Dichtegradientenzentrifugation (1460 rpm, ohne Bremse, Raumtemperatur) wurde zwischen 2 Schichten ein mittlerer Ring aus mononukleären Zellen sichtbar, welcher mit einer 5 ml-Pasteurpipette abgenommen und mit 10-20 ml PBS gewaschen wurde. In einem weiteren Zentrifugationsschritt (10 min, 4 °C, 1400 rpm, mit Bremse) wurden alle mononukleären Zellen sedimentiert. Wenn erforderlich wurde das Zellpellet mit 1-2 ml Red Cell Lysis Buffer (RCLB) zur Lyse von vorhandenen

Erythrozyten behandelt. Nach einem abschließenden Wasch- und Zentrifugationsschritt (5 min, Raumtemperatur, 1400 rpm) wurden die Zellen in 5-10 ml PBS resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Für RNA- und DNA-Isolierung wurden 1,0 x 10^7 Zellen in Trizol aufgenommen und bei -20 °C bis zur Weiterverarbeitung (B.2.2.1) gelagert. Zusätzlich wurden 0,5-1,0 x 10^7 Zellen für die Kultivierung von Stromazellen verwendet (B.2.1.3). Bei Bedarf wurden verschiedene Zelltypen mittels magnetischer Zellseparation über ihre individuellen Oberflächenmarker angereichert.

RCLB: $8,29 ext{ g NH}_4CL$ (Ammoniumchlorid) $1,0 ext{ g KHCO}_3$ (Kaliumhydrogencarbonat) $0,372 ext{ g EDTA Titriplex III}$ ad 1000 ml H₂Osteril filtrieren, Lagerung bei 4 $^{\circ}$ C

B.2.1.2 Magnetische Zellseparation

Für die Aufreinigung bestimmter Zelltypen eignet sich die magnetische Zellseparation. In der vorliegenden Arbeit wurden CD34+ und CD71+ Zellen aus mononukleären Zellen des Vollknochenmarks unter Verwendung der Magnetic Cell Separation Technologie (MACS, Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach) entsprechend den Herstellerangaben isoliert. CD34 ist ein Oberflächenmarker der Stammzellen und stammzellnahen Zellen des blutbildenen Systems. CD71 markiert unreife Zellen der erythroiden Differenzierungslinie. Die MACS Technologie basiert auf dem Einsatz von magnetischen MicroBeads. die über spezifische Antikörper an diese Oberflächenmarkerproteine der Zellen binden. Die Beads-gebundenen Proteine wurden in einer speziellen Säule (MACS Separation Column) vom Magnetfeld eines Zellseparators zurückgehalten und durch mehrmaliges Waschen mit MACS-Puffer gereinigt. Zur Separation von CD34+ Zellen wurde das human CD34 MicroBead Kit unter Anleitung des Herstellers verwendet. Das human CD71 MicroBead Kit wurde zur Anreicherung von CD71+ Zellen verwendet. Die gereinigte Zellfraktion wurde außerhalb des Magnetfeldes in ein Reaktionsgefäß eluiert, zentrifugiert und für die nachfolgende RNA-/DNA-Isolierung in Trizol aufgenommen.

MACS-Puffer (steril): 2 ml 0,5 M EDTA 2,5 ml 30% BSA 500 ml PBS

B.2.1.3 Zellkultur und Zellzahlbestimmung

Zellkulturarbeiten wurden stets unter sterilen Bedingungen an einer biologischen Sterilwerkbank durchgeführt. Plastikmaterialien und Lösungen, soweit nicht steril vom Hersteller bezogen, wurden 30 min bei 121 ℃ und 1 bar Überdruck autoklaviert. Glaswaren wurden für 5 bis 8 h bei 250 ℃ hitzesterilisiert.

Die Zelllinien HEL, U937 und K562 wurden in Zellkulturflaschen (75 cm²) unter Standardkulturbedingungen (37 °C und 5% CO₂) kultiviert. Die Zusammensetzungen der Nährmedien sind Tabelle 11 des Abschnitts B.1.2 zu entnehmen. Das Zellwachstum wurde alle 1-2 Tage visuell mittels Phasenkontrastmikroskop beobachtet. Nach Bedarf, in der Regel alle 3-4 Tage, wurde das verbrauchte Medium dekantiert und mit frischem Nährmedium entsprechend dem Mischungsverhältnis von 1:5 ersetzt.

Die adhärenten Stromazellkulturen der MDS-Patienten wurden ebenfalls unter Standardkulturbedingungen gehalten und entsprechend ihrer Verdopplungszeit alle 2-3 Tage vollständig mit neuem Medium versorgt. Bei Erreichen einer Konfluenz von circa 80% erfolgte die Passagierung der Zellen. Dazu wurde das verbrauchte Medium vollständig dekantiert, die verbleibende adhärente Zellschicht mit 10 ml PBS gewaschen und nach einigen Minuten Inkubation in 1 ml Trypsin vom Flaschenboden abgelöst. Nach Ablösung wurden die Zellen im Verhältnis 1:2 in neue Zellkulturflaschen überführt und auf ein Endvolumen von 20 ml mit Nährmedium aufgefüllt. Die neue Zellpassage wurde nummeriert und wie beschrieben weiterkultiviert. Nach 4 Passagen wurden 1,0 x 10^7 Stromazellen zur DNA-/RNA-Isolierung in Trizol aufgenommen (B.2.2.1). Zur Bestimmung der Zellzahl und Viabilität wurden die Zellen mit Trypanblau gefärbt. Diese Lösung kann durch die zerstörte Zellmembran toter Zellen eindringen und das Zytosol blau färben. Lebende Zellen bleiben im Phasenkontrastmikroskop durchsichtig weiß und lassen sich so von den toten unterscheiden. Die Zellen wurden in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt und nach folgender Formel berechnet.

Zellzahl/ml =

Zellzahl Anzahl der gezählten * Großguadrate

Verdünnungsfaktor * 10⁴ (Kammerfaktor)

B.2.1.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur langfristigen Kryokonservierung wurden jeweils 0,5-1,0 x 10⁷ Zellen 10 min bei 1460 rpm zentrifugiert und in 1 ml Nährmedium mit 20% FCS und 10% des Frostschutzmittels DMSO in einem Kryoröhrchen resuspendiert. Durch Lagerung in einer Einfrierbox (Nalgene Labware, Thermo Fisher Scientific, Rochester, USA) wurde ein langsames Abkühlen der Zellen von 1 °C pro Minute bei -80 °C gewährleistet. Nach 24 h wurden die Proben zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff (-196 °C) überführt.

Zur erneuten Kultivierung der Zellen wurden diese nach dem Auftauen bei 4 ℃ in 4 ml FCS aufgenommen und 10 min bei 1460 rpm sedimentiert. Nach Entfernen des Überstands wurde das Pellet in 10 ml Nährmedium aufgenommen, in eine Zellkulturflasche überführt und unter Standardkulturbedingungen kultiviert.

B.2.1.5 Transfektion von humanen Zelllinien

Transfektion ist ein Prozess, bei dem exogene Nukleinsäuren in eukaryotische Zellen gebracht werden. In der vorliegenden Arbeit wurde der Expressionsvektor pcDNA3.1-myc-HisA-ALCAM sowie der insertfreie Kontrollvektor mittels Elektroporation unter Verwendung des Cell Line Nucleofactor Kit V (Lonza, Basel, Schweiz) in die humanen Leukämie-Zelllinien HEL, K562 und U937 integriert. Bei dieser physikalischen Transfektionsmethode der Elektroporation wurden die Zellen in einer DNA-haltigen Lösung einem kurzen Stromimpuls ausgesetzt, der in der Zytoplasmamembran temporäre Poren erzeugte, durch die Vektor-DNA in die Zellen gelangte. Zunächst wurden die geplanten Untersuchungen zur funktionellen Charakterisierung von ALCAM mit transient transfizierten Zellen durchgeführt. Bei der transienten Transfektion verbleibt der Vektor nur kurzweilig in der Zelle. In einigen Fällen jedoch gelangt die Vektor-DNA in den Zellkern und integriert in die Wirt-DNA. Die Generierung solcher stabilen Zellpopulationen bezeichnet man als stabile Transfektion und erfolgte in der vorliegenden Arbeit durch Selektion mit dem vektorkodierten Antibiotikaresistenzmarker gegen Geneticin (G418). Die stabile Integration ins Genom der Zellen gewährleistete eine konstitutive Überexpression von ALCAM während der Funktionsuntersuchungen.

B.2.1.5.1 Transiente Transfektion

Pro Ansatz wurden 2,5 x 10⁶ Zellen mit 2 µg Vektor-DNA transfiziert. Die Zellen wurden zunächst 1-2 Tage bis zur logarithmischen Wachstumsphase kultiviert, anschließend gezählt und bei einer Zelldichte von circa 300.000-600.000 Zellen pro ml durch Zentrifugation (10 min, 1000 rpm, Raumtemperatur) geerntet. Der Mediumüberstand wurde verworfen und das Zellpellet in 100 µl Transfektionsreagenz des Cell Line Nucleofactor Kit V resuspendiert. Anschließend wurde das Gemisch in eine Elektroporationsküvette überführt, in der die Vektor-DNA vorgelegt war. Die Elektroporation erfolgte unverzüglich mit einem Elektroporator (Nucleofactor I) unter Verwendung des zellinienspezifischen Programms (HEL und K562: X-01; U937: V-01). Anschließend wurde das Gemisch mit einer Einweg-Pasteurpipette in 4-5 ml vorgewärmtes Nährmedium in 6 well Zellkulturplatten überführt und bei Standardkulturbedingungen inkubiert. Nach 24 h Inkubationszeit wurden Proben der Zellsuspensionen entnommen, RNA isoliert und die ALCAM-Genexpression anhand der semiquantitativen real-time RT-PCR überprüft. Die Transfektionsansätze, die eine deutliche Überexpression von ALCAM zeigten, wurden für weitere Proliferations- und Apoptoseanalysen eingesetzt.

B.2.1.5.2 Stabile Transfektion mittels Selektionsmarker

Die vektorkodierte Antibiotikaresistenz gegen Geneticin wurde zur Selektion stabiler Zellen verwendet. Das Aminoglykosid Geneticin (G418) bindet irreversibel an die große 80S-Ribosomenuntereinheit und blockiert die Proteinsynthese durch Hemmung der ribosomalen Funktion der Zellen.

Dosis-Wirkungs-Analyse von Geneticin

Da die effektive Dosis des Antibiotikums bei verschiedenen Zelltypen variiert, wurde zuvor die Geneticin-Toleranzdosis je Zelllinie bestimmt. Diese Zytotoxizitätsbestimmung war notwendig, um zwischen nativer und erworbener Resistenz gegen eine bestimmte Dosis Geneticin zu diskriminieren. Dazu wurden 20.000 untransfizierte Zellen in 1 ml Medium in *24 well* Zellkulturplatten ausgesät. Je Geneticin-Konzentration wurden 3 Ansätze kultiviert. Es wurden Antibiotika-Endkonzentrationen zwischen 300-1300 µg/ml getestet. Das Medium wurde zweimal wöchentlich durch frisches Selektionsmedium ersetzt. Während dieses Zeitraumes wurden das Wachstum und die Zellmorphologie regelmäßig unter dem Mikroskop beobachtet. Die optimale

Endkonzentration des Antibiotikums lag vor, wenn circa 99% der untransfizierten Zellen 14 Tage unter Selektionsdruck nicht überlebten.

Stabile Transfektion

Um stabile genetisch modifizierte Zellen zu generieren, wurden die Zelllinien zunächst wie in Abschnitt B.2.1.5.1 beschrieben transfiziert. Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurden die Transfektionsansätze durch Zugabe der zelllinienspezifischen Geneticin-Konzentration unter Selektionsdruck gesetzt. Unter regelmäßiger Erneuerung des Selektionsmediums konnten nur Zellen mit stabil integriertem Vektor überleben. Das Wachstum und die Zellmorphologie wurden regelmäßig unter dem Mikroskop beobachtet. Nach circa 14 Tagen wurden die stabilen Zellpopulationen unter anhaltendem Selektionsdruck weiter kultiviert. Vor der Durchführung von Proliferations-, Apoptose- und *in-vitro* Differenzierungsstudien wurde die genomische Integration der *ALCAM*-Expressionskassette mittels semiquantitativer *real-time* RT-PCR überprüft.

B.2.1.6 Apoptosestudien mittels Annexin V-Markierung

Unter Apoptose versteht man den "programmierten" oder "geplanten" Zelltod, der eine wichtige regulatorische Funktion in der Entwicklung und im Erhalt des Organismus übernimmt. Durch Markierung von Zellen mit Annexin V kann man apoptotische Zellen durchflusszytometrisch nachweisen. Apoptotische und nekrotische Zellen translozieren das bei lebenden Zellen an der Zellmembraninnenseite befindliche Phosphatidylserin nach außen, so dass Annexin V binden kann. Um nekrotische Zellen von apoptotischen Zellen zu unterscheiden, kombiniert man daher die Annexin V-Markierung mit einer Propidiumiodidfärbung. Propidiumiodid (PI) dringt nur in durchlässige Membranen nekrotischer Zellen ein und führt dort zu einer Interkalation zwischen den benachbarten Basenpaaren der DNA.

Um den Einfluss einer verstärkten *ALCAM*-Expression auf die Apoptoserate zu untersuchen, wurden 1 x 10⁶ Zellen der *ALCAM*-überexprimierenden Zellpopulation (im Folgenden als VA bezeichnet), der Kontrollpopulation (im Folgenden als VCo bezeichnet) und der untransfizierten Zelllinie in 5 ml Nährmedium in *6 well* Zellkulturplatten ausgesät. Zu Versuchsbeginn und nach 24, 48, 72, 96 h und am Tag 5 (d5) wurden jeweils 0,5 ml der Zellsuspension aus der Versuchskultur entnommen und für die Apoptosemessung vorbereitet. Die Markierung der Zellen erfolgte nach Herstellerangaben mit dem *Annexin-V-FLUOS Staining Kit* (Roche Diagnostic,

Mannheim). Über die Markierung mit Annexin-V-FITC (Flourescin-5-Isothiocyanat) und PI wurden mittels Durchflusszytometrie (B.2.1.8) apoptotische (Annexin-positiv und PI-negativ) und nekrotische (Annexin-negativ und PI-positiv) von viablen (Annexin- und PI-negativ) Zellen unterschieden und quantifiziert.

B.2.1.7 Proliferationsstudien mittels WST1-Reagenz

Zur Quantifizierung des Proliferationsverhaltens und der Zellviabilität wurde das *Cell Proliferation Reagent* WST-1 (Roche Diagnostic, Mannheim) verwendet. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der photometrischen Messung der Aktivität von mitochondrialen Dehydrogenasen über die Umsetzung des WST1-Reagenz zu Formazan. Der dabei entstehende Farbumschlag wurde photometrisch mit einem ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*)-Plattenlesegerät bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen und diente als Maß für den Anteil metabolisch aktiver Mitochondrien und somit für die Zellaktivität. In Vorbereitung zu jedem Messzeitpunkt wurde WST1-Lösung 1:2 mit Nährmedium verdünnt und jedem Einzelansatz 20 µl mit einer Multistep-Pipette (Eppendorf, Hamburg) hinzugefügt.

Titration der optimalen Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahlkonzentration für das optimale Zellwachstum wurden 1500, 3000, 5000 und 10.000 Zellen der Linien U937, K562 und HEL in jeweils 70 µl und 100 µl zu je 5 Ansätzen ausgesät. Die proliferative Aktivität wurde zu Versuchsbeginn und an weiteren Zeitpunkten nach 24, 48, 72, 96 h und 5 Tagen (d5) photometrisch bestimmt. Anschließend wurde der Expansionsverlauf der Zellen in Wachstumskurven dargestellt und die optimale Ausgangszellzahl je Zelllinie determiniert.

Proliferationsstudien

Zur Quantifizierung des Einflusses von *ALCAM* auf das Zellwachstum wurde die optimale zelllinienspezifische Ausgangszellzahl der zu untersuchenden Zellsuspensionen (VA, VCo sowie untransfizierte Zellen) in einer *96 well* Zellkulturplatte in 8 Ansätzen für 6 Zeitpunkte (0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, d5) ausgesät und unter Standardkulturbedingungen kultiviert. Um eine schnelle Verdunstung des Mediums zu vermeiden, wurden die Zellkulturplatten mit Klarsichtfolie verschlossen. Nach WST1-Gabe und einer Inkubationszeit von 3 h unter Standardkulturbedingungen wurde die Absorption bei 450 nm bestimmt. Dabei diente Nährmedium als Referenz.

B.2.1.8 Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrie (Flourescence activated cell sorting, FACS) dient der Messung und Detektion einzelner Zellen einer Zellsuspension, die sich durch Oberflächenmarkerproteine oder Antikörpermarkierung ihrer interkalierenden Substanzen nach Floureszenz- und Streulichtverhalten näher charakterisieren lassen. Dabei gelangen die Zellen in einem Flüssigkeitsstrom (circa 500 Zellen/Sekunde) perlschnurartig durch eine Stahlkapillare und werden an einem Laserstrahl vorbeigeführt. Entsprechend der Zellgröße und -granularität wird der einfallende Laserstrahl abgelenkt und gebrochen. Dabei gibt das Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter, FSC) Informationen zur Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht (Side Scatter, SSC) zur Granularität der Zelle. Avitale und tote Zellen sind in einem Dot Plot als separate Population im linken unteren Bereich dargestellt, der für die anschließende Analyse durch Abgrenzung (Gate) ausgeschlossen wird. Die eigentliche Analyse erfolgt durch Anregung der floureszenzmarkierten Antikörper oder floureszierender nukleinsäurebindender Farbstoffe mit dem Laserstrahl, wobei Lichtsignale spezifischer Wellenlänge (z.B. FITC: 525 nm, PE: 575 nm) vom Flourenszenzfarbstoff emittiert und als optische Punkte in einem Dot Plot dargestellt werden. Die Auswertung erfolgte mit der Datenverarbeitungssoftware Flow Jo (TreeStar, Ashland, USA). Für alle durchflusszytometrischen Messungen wurden 0,5-1,0 ml Zellsuspension aus den Versuchskulturansätzen entnommen und in ein FACS-Röhrchen überführt. Anschließend wurden die Zellen entsprechend der zu untersuchenden Eigenschaften vorbereitet und mit den vorgesehenen Geräteparametern gemessen.

Annexin V

Nach Inkubation der Zellen mit dem *Annexin V FLUOS Staining Kit* (B.2.1.6) wurden die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen und anschließend in Abhängigkeit von der Zelldichte in 0,5-2,0 ml FACS-Puffer resuspendiert. Die Messung zum Nachweis von apoptotischen Zellen mittels FITC-markierten Annexin V sowie nekrotischer Zellen mittels Propidiumiodid erfolgte in den Kanälen FL-1 bzw. FL-2.

Bindung direkt konjugierter FACS-Antikörper

Für die Markierung mit spezifischen, Floureszenzfarbstoff-konjugierten FACS-Antikörpern wurden die Zellen zunächst in 1 ml PBS gewaschen, 5 min bei 1460 rpm zentrifugiert und in 100 µl des entsprechenden Nährmediums resuspendiert. Bei der Bindung spezifischer Antikörper an die Oberflächenproteine der Zellen können durch Interaktion mit unspezifischen Bindungsstellen zusätzliche Signale entstehen. Durch Inkubation mit 2 µl *human FcR Blocking Reagent* (Miltenyi Biotech) wurden diese so genannten Fc-Rezeptoren nach 15 min bei 4 ℃ gesättigt. Nach Blockierung der unspezifischen Bindestellen wurden 2 µl des Floureszenzfarbstoff-konjugierten Antikörpers den Zellen zugesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 4 ℃ im Dunkeln wurden die Zellen in 1 ml PBS gewaschen und anschließend in Abhängigkeit von der Zelldichte in 0,5-2,0 ml PBS resuspendiert. Bei jeder FACS-Analyse wurde für jede Probe eine Isotypkontrolle (Iso) durch Markierung der Zellen mit dem FACS-Antikörper anti mouse-IgG1-FITC/IgG2a-PE mitgeführt. Die Messung zum Nachweis von CD71- sowie Glycopherin A (CD235a) -positiven Zellen erfolgte mittels spezifischer Phycoerythrin- (PE-) konjugierter Antikörper (Tab. 15 des Abschnitts B.1.3.5) im Kanal FL-2 des FACS-Gerätes.

B.2.1.9 BFU-E Assay

Der BFU-E Assay dient der Detektion von sogenannten *Burst forming units* unter EPO-Stimulation zur Charakterisierung von hämatopoetischen Funktionsstörungen der erythroiden Differenzierungslinie. Die erythroide Leukämie-Zelllinie HEL ist in der Lage, unter Gabe von Erythropoetin linienspezifisch zu differenzieren. Auf Grund dieser Differenzierungseigenschaft wurde HEL für die Untersuchung des Einflusses von *ALCAM* auf das Differenzierungsverhalten von hämatopoetischen Zellen als Modellzelllinie ausgewählt.

Titration der optimalen Zellzahl

Zunächst wurde die optimale Zellzahl für die Durchführung des BFU-E Assays ermittelt. Dazu wurden 1000, 2500, 5000 und 7500 untransfizierte Zellen als Triplikate nach folgender Anleitung auf semisolidem Methylzellulose-Medium ausgesät und 12 Tage unter Standardkulturbedingungen inkubiert. Zur Bestimmung der optimalen Zellzahl stand das methylzellulosebasierte Medium MethoCult®H4034 Optimum (Stemcell Technologies, Vancouver, Kanada) zur Verfügung, das bereits die benötigten humanen Zytokine SCF, IL-3, EPO sowie GM-CSF enthielt. Das Medium wurde bei Lieferung zunächst in 3,5 ml-Aliquots portioniert und zur Langzeitlagerung bei -20 °C aufbewahrt. Zu Beginn der Zellzahltitration wurde je zu testende Zellzahl ein Aliquot aufgetaut und bei 37 °C zwischengelagert. Aus einem 3,5 ml-Aliquot standen je zu testende Zellzahl 3 Einzelansätze zur Verfügung. Die Zellen befanden sich zu Versuchsbeginn in der logarithmischen Phase des Zellvermehrungszyklus, in der nichtlimitierende, optimale Wachstumsbedingungen herrschten. Nach Auszählung der Zellzahl wurde die entsprechend benötigte Anzahl an Zellen geerntet, durch Zentrifugation (10 min, 1000 rpm) sedimentiert, vorsichtig in 350 µl RPMI1640-Medium resuspendiert und bei 37 °C auf einem Thermoschüttler bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt. Im weiteren Verlauf wurden die Zellen zum vorgewärmten MethoCult-Medium hinzugefügt, jeweils 1 min auf einem Vortexer gut durchmischt und 5 min ruhen gelassen. Danach wurde das Medium-Zell-Gemisch in eine 5 ml-Spritze (Nadelstärke 18) aufgezogen und je 1 ml luftblasenfrei in 3 kleine Petrischalen (*gridded dishes*) mit einem Durchmesser von 35 mm überführt. Durch leichtes Schwenken wurde eine gleichmäßige Verteilung des Gemischs auf dem Schalenboden gewährleistet. Die geschlossenen Einzelansätze wurden wie in Abbildung 6 dargestellt in einer größeren Petrischale (100 mm Durchmesser) für 12 Tage unter Standardkulturbedingungen inkubiert. Um ein Austrocknen des Kulturmediums zu vermeiden, wurde zusätzlich je eine mit Wasser befüllte unverschlossene 35 mm-Petrischale den Versuchsansätzen hinzugefügt.



Abb. 6: Schematische Darstellung zum Versuchsablauf des BFU-E Assays

Nach Ende der Inkubationszeit wurde die Anzahl der gewachsenen BFU-E im Phasenkontrastmikroskop quantifiziert. Die optimale Zellzahl je Unikat ergab sich aus der Übersichtlichkeit und Zählbarkeit der BFU-E (nach Herstellerangaben je Unikat 25-150 Kolonien). Eine BFU-E wird nach Herstellerangaben als Kolonie definiert, wenn diese mehr als 200 erythropoetische Vorläuferzellen umfasst. BFU-E bestehen aus Vorläuferzellen unreiferen Differenzierungsgrades als CFU-E (*Colony forming units*) und benötigen neben EPO zusätzlich IL-3 und SCF für optimales Zellwachstum.

Linienspezifische Differenzierung von HEL-Zellen mittels BFU-E Assay

Es wurde die optimale Zellzahl der untransfizierten HEL-Zellen sowie der *ALCAM*überexprimierenden Zellen HEL-VA und der Vektorkontrolle HEL-VCo unter sterilen Bedingungen als 3,5-fach-Ansatz geerntet, zentrifugiert und in vorgewärmtem RPMI1640-Medium resuspendiert. Für diesen Versuch wurde das Methylzellulose-Medium MethoCult®H4230 ohne Zytokine (Stemcell Technologies) verwendet. Diese wurden erst bei Versuchsbeginn hinzugefügt (Tab. 16). Des Weiteren wurde dem Medium zur Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks der stabil transfizierten Zellen Geneticin beigesetzt.

Bezeichnung	Stocklösung	Endkonzentration	Firma
Humanes SCF	10 ng/μl	50 ng/ml	Miltenyi Biotech, Bergisch
			Gladbach
Humanes IL-3	10 ng/μl	100 ng/ml	Miltenyi Biotech, Bergisch
			Gladbach
Humanes EPO	1 U/μl	5 U/ml	R&D Systems,
			Wiesbaden-Nordenstadt
Geneticin	50 mg/ml	1000 μg/ml	GIBCO, Invitrogen,
			Karlsruhe

Tab. 16: Zytokin- und Antibiotikazusammensetzung des Methylzellulose-Mediums

Der Versuch wurde wie bereits beschrieben durchgeführt. Für jeden Zelltyp wurde ein separater Kontrollansatz ohne Zytokine vorbereitet und inkubiert. Nach einer Inkubationsdauer von 13 Tagen wurde die Anzahl der BFU-E im Mikroskop bestimmt und einzelne, repräsentative Beispielkolonien fotografiert. Anschließend wurden die Zellen mehrfach mit PBS aus dem semisoliden Medium gewaschen. In durchflusszytometrischen Messungen (siehe B.2.1.8 *Bindung direkt konjugierter FACS-Antikörper*) wurde der Anteil der CD71+ und Glycopherin A+ (CD235a+) Zellen der

jeweiligen Zellpopulation nach Kultivierung mit und ohne linienspezifischen Zytokinen bestimmt und miteinander verglichen.

B.2.2 Molekularbiologische Methoden

B.2.2.1 Isolierung und Quantifizierung von Nukleinsäuren aus humanen Zellen

B.2.2.1.1 RNA-Isolierung

Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte nach einer modifizierten Phenol/Chloroform-Methode, die eine gleichzeitige Isolierung von genomischer DNA ermöglichte. In Abhängigkeit der verfügbaren Zellen wurden bis zu 1 x 10⁷ Zellen in 1 ml Trizol resuspendiert und zur vollständigen Permeabilisierung der Zellmembran 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 200 µl Chloroform vermischt und erneut 5-10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zentrifugation bei 10.600 rpm und 4 ℃ wurde die wässrige Phase (oben) von der organischen Phase (unten) chemisch getrennt. Die klare, wässrige obere Phase enthielt RNA, die vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß dekantiert wurde. Die Fällung der RNA erfolgte mit 3 µl Glykogen und 500 µl Isopropanol 10 min bei Raumtemperatur und durch anschließende Zentrifugation (15 min, 10.600 rpm, 4 ℃). Der Überstand wurde vorsichtig verworfen und das RNA-Pellet mit 70%-igen Ethanol vermischt. Nach erneuter Zentrifugation (10 min, 10600 rpm, 4 ℃) wurde der Überstand unter Verwendung einer Kapillarspitze vollständig abgenommen und das RNA-Pellet an der Luft getrocknet. Anschließend wurde die RNA in 20-50 µl sterilen H₂O gelöst, 30 min auf Eis inkubiert und spektralphotometrisch mit dem Nanodrop quantifiziert. Bis zur Weiterverwendung wurde die RNA bei -80 ℃ gelagert.

B.2.2.1.2 DNA-Isolierung

Die verbleibende organische Phase der Phenol/Chloroform-Methode enthielt die genomische DNA. Sie wurde mit 300 µl reinem Ethanol vermischt und 5 min bei Raumtemperatur und 7000 rpm zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -80 °C aufbewahrt. Die gefällte DNA wurde mit 1 ml 0,1 M Natriumcitrat (10% Ethanol) gewaschen und nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur und mehrfachem Invertieren in einem erneuten Zentrifugationsschritt sedimentiert. Dieser Waschschritt wurde ein weiteres Mal wiederholt. Anschließend wurde das Pellet mit 1 ml 70%-igem Ethanol vermischt,

15 min bei Raumtemperatur inkubiert und erneut zentrifugiert (5 min, 7000 rpm, Raumtemperatur). Der Überstand wurde vollständig abgenommen und das verbleibende DNA-Pellet an der Luft getrocknet. Abschließend wurde die DNA in 200 μl 8 mM NaOH gelöst und bis zur Weiterverwendung bei 4 °C gelagert.

B.2.2.1.3 RNA-Isolierung mittels *RNeasy Kit*

Eine weitere Möglichkeit der RNA-Isolierung bietet das *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Hilden). Auf Grund des integrierten DNase-Verdaus wurde diese Methode hauptsächlich für die RNA-Isolierung von transfizierten Zellen angewendet. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Verwendung eines Säulensystems, das die Bindung der RNA an eine Silika-Gelmembran ermöglicht. Durch mehrere Waschschritte wird die RNA gereinigt und je nach Menge des Ausgangsmaterials in 20-50 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Die Präparation erfolgte nach dem Herstellerprotokoll *Purification of Total RNA from Animal Cells Using Spin Technology.* Die DNAse-Behandlung wurde unter Verwendung des *RNAse-free DNAse Sets* (Qiagen) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Die Behandlung der RNA mit DNase gewährleistete den Ausschluss von Kontaminationen mit Vektor-DNA aus dem Transfektionsvorgang.

B.2.2.1.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Quantifizierung der gelösten DNA und RNA erfolgte mit einem UV/Vis-Spektralphotometer (NanoDrop). Dabei genügte ein Volumen von 1,5 µl, um eine präzise Konzentrationsangabe zu erhalten. Zusätzlich wurde die OD_{260nm}/OD_{280nm}-Ratio angegeben. Sie gibt Auskunft über Proteinverunreinigungen der Nukleinsäure. Für reine DNA liegt das Optimum bei 1,8, für reine RNA bei 2,0.

B.2.2.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

PCR-Amplifikationen wurden mit spezifischen Primerpaaren und wenn nicht anders angegeben in einem Reaktionsansatz von 15 µl sowie unter der Verwendung von 30 Amplifikationszyklen durchgeführt. Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes und die Konditionen der Reaktion wurden wie folgt gewählt:

Reaktionsansatz (1x)		Thermocyclerpro	ogramm
H ₂ O	5 µl	Denaturierung	10 min 95 ℃
Peqlab Hotstart-Mix (2x)	7,5 μl	Denaturierung	30 s 95 ℃
fw/rev Primer (1:10)	0,75 μl	Annealing	58 ℃ > 30
Template	1 µl	Elongation	1 min 72 ℃)
Gesamtvolumen	15 µl	Elongation	10 min 72 ℃

Material und Methoden

B.2.2.3 DNA-Gelelektrophorese

Um die Größe und die Homogenität des PCR-Fragments zu überprüfen, erfolgte die Auftrennung desselbigen durch Gelelektrophorese. Dazu wurden nach erfolgter PCR-Amplifikation 8-10 µl des jeweiligen Reaktionsansatzes mit Ladepuffer (5x Loading Buffer Blue, Bioline) versehen, in die dafür vorgesehenen Taschen des ausgehärteten Agarosegel (1-2%) aufgetragen und elektrophoretisch der Größe nach bei 100 V aufgetrennt. Der Anteil der Agarose im Gel richtete sich nach der erwarteten Fragmentgröße. Als Gel- und Laufpuffer wurde 0,5x TBE (Stock 10x TBE) verwendet. Die Visualisierung der DNA erfolgte durch Interkalation von Ethidiumbromid (10 mg/ml) mittels eines UV-Transilluminators bei 302 nm. Je nach erwarteter Fragmentgröße diente ein 500 bp-, 1 kb- oder 2 kb-Marker als Größenstandard (Hyperladder DNA Marker, Bioline).

B.2.2.4 Reverse Transkription von RNA (cDNA-Synthese)

Zur Generierung von cDNA wurde 1 µg RNA unter Verwendung des *QuantiTect Reverse Transcription Kit* (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben umgeschrieben. Das Gesamtreaktionsvolumen betrug 20 µl und wurde zur Weiterverwendung für die semiquantitative *real-time* RT-PCR 1:10 verdünnt. Die RT-Reaktionen wurden wie folgt durchgeführt:

Komponenten	Volumen (1x)	
gDNA Wipeout Buffer 7x	2 μΙ	
RNase freies H ₂ O	variabel	
RNA	variabel bis 12 μl (1 μg)	
Inkubation 2	min bei 42 °C	
Reverse Transkriptase	1 μΙ	
<i>RT-Buffer</i> , 5x	4 μΙ	
RT-Primermix	1 µl	
Gesamtvolumen 20 µl		
Inkubation 15 min bei 42 °C		
Hitzeinaktivierung 3 min bei 95 °C		

B.2.2.5 Semiquantitative *real-time* RT-PCR

Um die relativen mRNA-Expressionslevel der ausgewählten Gene in Patienten und gesunden Normalpersonen determinieren und vergleichen zu können, wurden RT-PCR-Analysen semiguantitative real-time unter Verwendung von sequenzspezifischen Taqman-Sonden, die auch als Probe bezeichnet werden, durchgeführt. Die Besonderheit der Taqman-Sonden besteht darin, dass sie an einem Ende mit einem Quencher und am anderen Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff (z. B. TAMRA und FAM) versehen sind. Die als Template benötigte cDNA wurde wie unter B.2.2.4 beschrieben generiert. Das Kandidatengen ("gene of interest", GOI) und das verwendete house keeping Gen Glukose-Phosphat-Isomerase (GPI) wurden jeweils mit 250 nM der spezifischen Probe und je 600 nM des entsprechenden forward und reverse Primers in individuellen Reaktionansätzen als Triplikate in einem RG-6000 real-time PCR Cycler amplifiziert. Die spezifischen Primer und Probes sowie deren Flourenszenzmarkierung sind der Tabelle 14 des Abschnitts B.1.3.4 zu entnehmen.

Die Analyse der Daten erfolgte unter Verwendung der Rotor Gene Software Version 6.0. Die relativen Genexpressionslevel wurden mit der 2^{-ΔΔCT}-Methode (Livak und Schmittgen, 2001) determiniert. Statistisch signifikante Unterschiede wurden anhand des ungepaarten t-Tests ermittelt. Die Zusammensetzung und Bedingungen der RT-PCR wurden wie folgt gewählt:

Reaktionsansatz (1x)	
H ₂ O	3,875 μl
IQ-Supermix (2x)	12,5 μl
Fw/rev Primer (1:10)	1,5 µl
Probe (1:10)	0,625 μl
Template cDNA	5 µl
Gesamtvolumen	25 µl

real-time PCR Cycler-Programm		
Denaturierung	3 min 95 ℃	
Denaturierung	15 s 95 ℃	
Annealing/ Elongation	1 min 60 ℃	
Zyklenanzahl	50	

B.2.2.6 Promotersequenzierung

Die genomische DNA der MDS-Patienten wurde auf mögliche Mutationen im *SFRP1*-Promotor untersucht. Zur Vorbereitung der Sequenzierreaktionen wurden PCR-Amplifikationen mit dem Primern SFRP1 Mut *fw* und SFRP1 Mut *rev* (Tab. 14 des Abschnitts B.1.3.4) in einem Gesamtreaktionsvolumen von 25 µl unter Verwendung von 35 Zyklen wie folgt durchgeführt (Pehlivan *et al.*, 2009):

Reaktionsansatz (1x) Thermocyclerprogramm		Thermocyclerprogramm
H ₂ O	7,75 μl	Denaturierung 10 min 95 ℃
Peqlab Hotstart-Mix (2x)	12,5 µl	Denaturierung 45 s 95 ℃
Fw/rev Primer (1:10)	0,5 µl	Annealing 45 s 58 ℃ 35
5% DMSO	1,25 μl	Elongation 1 min 72 °C
Template (500 ng)	2,5 µl	Elongation 10 min 72 °C

Die PCR-Produkte wurden mittels *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen) gereinigt und anschließend bidirektional sequenziert (ABI PRISM Big Dye Terminator System, Applied Biosystems, Darmstadt). Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit der Software Vector NTI (Invitrogen, Karlsruhe).

B.2.2.7 Untersuchung der Promotormethylierung mittels *Pyrosequencing*-Technologie

Pyrosequencing ist eine neuartige und sensitive Methode zur Detektion und Quantifizierung von DNA-Methylierung. Die Technik basiert auf dem *"sequencing by synthesis*"-Prinzip und stellt eine Alternative zu den bisher verwendeten Standardmethoden wie methylierungsspezifische PCR (MSP), floureszenzbasierte *real-time* PCR oder COBRA-Assay dar.



Abb. 7: Schematische Darstellung der Pyrosequenzierungsmethode. (A) Modifikation genomischer DNA mit Methyl-Cytosin (obere Reihe) und Cytosin ohne Methylgruppe (untere Reihe) nach Bisulfitkonvertierung (BK) und PCR. (B) Prinzip der Pyrosequenzierreaktion. CTP: Cytosin-Triphosphat, pp_i: Pyrophosphat, ATP: Adenosintriphosphat.

Das in Abbildung 7 dargestellte Funktionsprinzip besteht darin, dass eine DNA-Polymerase den Gegenstrang des zu untersuchenden, biotinylierten DNA-Einzelstrangs synthetisiert. Die Strangverlängerung erfolgt durch Zugabe von Nukleotidtriphosphaten (NTP), wobei der Einbau eines basenkomplementären Nukleotids Pyrophosphat (PP_i) freisetzt. Die ATP-Sulfurylase katalysiert die Bildung von Adenosintriphoshat (ATP), was wiederum die Luziferase-vermittelte Umwandlung von Luziferin in Oxyluziferin antreibt und dabei ein detektierbares Lichtsignal aussendet. Die Intensität des Lichtsignals ist proportional zur Anzahl der eingebauten Nukleotide gleichen Typs. Ist das angebotene Nukleotid nicht basenkomplementär, findet kein Einbau statt und das Lichtsignal bleibt aus. Dargestellt werden die Lichtsignale als Peaks in einem so genannten "Pyrogramm".

Die in Tabelle 17 aufgeführten Reagenzien und Materialien wurden für die Durchführung der DNA-Methylierungsanalysen verwendet.

Bezeichnung	Hersteller
EpiTect bisulfite conversion Kit	Qiagen, Hilden
Hotstart-Mix S	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Streptavidin/Sepharose-Beads	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Binding Buffer (10x)	Qiagen, Hilden
Annealing Buffer (10x)	Qiagen, Hilden
Wash Buffer (10x)	Qiagen, Hilden
Nukleotidtriphosphate	
(ATP, GTP, CTP, TTP)	PyroMark Gold Q96 Reagents Kit,
Enzym	Qiagen, Hilden
Substrat	

Tab. 17: Übersicht der verwendeten Reagenzien und Materialien für die Pyrosequenzierung

B.2.2.7.1 Primer- und Assaydesign

Unter Verwendung der PSQ Assay Design Software 1.0 wurden geeignete PCR- und Sequenzierprimer (Tab. 18) sowie der Assay für die nachstehenden Promotormethylierungsanalysen generiert.

Bezeichnung	Nukleotidsequenz $(5 \rightarrow 3)$	Annealing	Fragment-
		[C °]	länge [bp]
SFRP1-2 fw	GTATTTTAGTTTTGTAGTT		
SFRP1-2 rev (B)	BIOTIN-CAAACTTCCAAAAACCTC	49	243
SFRP1 Seq.1	GATYGGGTAGTAGTTTGYGG		
SFRP1 Seq.2	GTTTTYGGAGTTAGTGTYG		
CDKN2B fw	AGTTTAGGTTTTTTAGGAAGGAGAG		
CDKN2B rev (B)	BIOTIN-CCTAAAACCCCAACTACCTAAATC	58	295
CDKN2B Seq.	GTGGGAAAGAAGGGA		

Tab. 18: Übersicht der verwendeten Primer für Pyrosequenzierung

Zusätzlich wurde die Promotormethylierung des zyklinabhängigen Kinase-Inhibitors CDKN2B (p15^{INK4B}) im Knochenmark und in CD34+ Zellen der MDS-Patienten untersucht. Eine aberrante Hypermethylierung des *CDKN2B*-Promotors ist ein häufiges Ereignis (Uchida *et al.*, 1997b) während der Entwicklung des MDS und diente deshalb als Positivkontrolle. Die zu analysierende Sequenz des *CDKN2B*-Promotors startete an Position -66 *upstream* des Transkriptionsstarts und überspannte nach Bisulfit-konvertierung folgende Region: AGAGTGTYGTTAAGTTTAYGGTAAYGGTGGATTATT YGGGTYGTTGYGYGT.

581	YGGTYGTAGGAGTTWYGYGTATTTTAGTTTTGTAGTTTTYGGAGTTAGT	630
631	GTYG <mark>YGYGTTYGTYGTTTYGYGTTTTTTGTTY</mark> GTYGTATTTTYGGGAGTY Region 1	680
681	GGGGYGTATTTAGTTYGTAGYGTYGTTTTTYGTTYGYGTYGTTTTYGATY	730
731	GTAGGTYGAGGGTYGTTATTGGTYGGGGGGGATYGGGTAGTAGTTTGYGG	780
781		830
831	TTGGAAGTTTGYGGTAGGAYGYGYGYGGGGGAGGYGGYGGAGGTAGTTT	880
851	YGAYGTYGYGGAGAATAGGGYGTAGAGTYGGTAGGGTAG	930
931	GYGAGGGGGGTYGTYGYGGGGTAGTTTTGGGYGTGTTGTTGGYGTTGG	980
981	GYGYGGYGTTTTTGGTYGTGGGTTYGGTTAGYGAGTAYGATTAYGTGAG	1030
1031	TTTTTAGTYGGATATYGGTTYGTATTAGAGYGGGYGTTTTTATATTAA	1051

Abb. 8: Genomische Mappe der bisulfitkonvertierten Sequenz von *SFRP1* (Ausschnitt). Die Regionen 1 und 2 geben die analysierten Sequenzen und deren Positionen im Promotor an. CpG sind als YG angegeben. Beginn des kodierenden Bereichs (Exon 1) am Translationsstart ATG (fettgedruckt).

B.2.2.7.2 Bisulfitkonvertierung genomischer DNA

Grundlage zur Anwendung der *Pyrosequencing*-Technologie ist die Behandlung genomischer DNA mit Bisulfit, wobei unmethylierte Cytosine in Uracil und durch anschließende PCR-Amplifikation in Thymin umgewandelt werden. Cytosine, die eine Methylgruppe am fünften Kohlenstoffatom besitzen, sind vor dieser Modifikation geschützt und verbleiben als Cytosin. Dadurch wird ein "pseudo"-C/T-Polymorphismus kreiert, dessen Quantifizierung den Methylierungsgrad jedes einzelnen CG-Dinukleotids (CpG) der genomischen DNA angibt. Ungefähr 500 ng genomische DNA wurden unter Verwendung des EpiTect *bisulfite conversion Kit* (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers bisulfitkonvertiert. Nach Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte die Einstellung der bisulfitkonvertierten DNA auf eine Endkonzentration von 5 ng/µl.

B.2.2.7.3 PCR

25 ng konvertierte DNA (5 μl) wurden für die PCR-Amplifikation der zu untersuchenden Promotorregionen eingesetzt. Die 50 μl-Reaktionansätze enthielten jeweils 400 nM des *forward* und *revers* Primers, wobei der reverse Primer am 5`-Ende biotinyliert war. Die PCR erfolgte in einer *96 well* PCR-Platte unter Verwendung von 45 Zyklen und wurde wie folgt durchgeführt:

Reaktionsansatz (1x)		Thermocyclerprogramm	
H ₂ O	18 µl	Denaturierung	10 min 95 ℃
Peqlab Hotstart-Mix S (2x)	25 µl	Denaturierung	30s 95℃
<i>Fw/rev</i> Primer (1:10)	1 µl	Annealing	30 s siehe Tab. 18
Template (25 ng)	5 μl	Elongation	30s 72℃
Gesamtvolumen	50 µl	Elongation	10 min 72 ℃

Anschließend wurde die Amplifikation des zu erwartenden PCR-Fragments nach elektrophoretischer Separation in einem 2%-igen Agarosegel stichprobenartig überprüft.

B.2.2.7.4 Immobilisierung des PCR-Einzelstrangs und Pyrosequenzierung

Zur Immobilisierung des biotinylierten reversen PCR-Einzelstrangs wurde dem PCR-Reaktionsvolumen 40 µl eines Streptavidin/Sepharose-Binding-Buffer-Gemischs (1:10) hinzugefügt und mehrere Minuten auf einem Schüttler vermischt. Währenddessen wurde eine spezielle Einspritzkartusche gemäß der Herstellervorgabe mit den 4 Nukleotidtriphosphaten (ATP, CTP, GTP, TTP) sowie mit einem spezifischen Enzymund Substratgemisch befüllt und in die dafür vorgesehene Vorrichtung im Gerät platziert. Des Weiteren erfolgte die Vorbereitung der 96 well Primerplatte. Sie wurde mit Annealing-Buffer befüllt, der 200 nM des spezifischen Sequenzierprimers enthielt. Die Primerplatte sowie die PCR-Platte wurden auf der Pyromark Vacuum Prep Workstation positioniert und der Arbeitsablauf gestartet. Mittels eines speziellen Handgerätes und einer daran angeschlossenen Vakuumpumpe erfolgte die Denaturierung und Entfernung des nicht-biotinylierten PCR-Einzelstranges. Der verbleibende biotinylierte Einzelstrang wurde durch Abschalten des Vakuums von den Fritten des Handgerätes in die Positionen der vorbereiteten 96 well Primerplatte entlassen und für 2 min bei 80 °C hybridisiert. Nach 5-minütiger Abkühlung bei Raumtemperatur wurde die Platte in den Pyrosequenzierer platziert und das spezifische Assayprogramm gestartet. Die quantitativen Pyrosequenzierungsreaktionen wurden mit dem Pyromark ID System (Qiagen) durchgeführt.

B.2.2.7.5 Auswertung

Unter Verwendung der Pyro Q-CpG Analyse-Software (Qiagen) wurden die Qualität der Pyrosequenzierung (als Farbkodierung), eventuelle Fehlermeldungen und die mittlere Methylierung (*mean methylation*) aus 5 analysierten CpGs für jede Probe angegeben. Das Verhältnis der methylierten Cytosine zum Gesamtcytosingehalt einer CpG-Position wurde als Methylierung in Prozent angegeben. Es wurden ausschließlich Daten verarbeitet, die den vorgeschriebenen Qualitätsanforderungen entsprachen. Der Verlauf der Pyrosequenzierreaktionen und die Methylierungswerte der einzelnen CpG je Probe wurden in einem "Pyrogramm" dargestellt.

B.2.3 Auswertung von Mikroarray-Genexpressionsdaten mittels Genespring

Die Mikroarray-Technologie stellt eine molekularbiologische Untersuchungsmethode zur Erfassung von globalen, differentiellen Genexpressionsprofilen dar. Dabei findet eine gleichzeitige Analyse mehrerer tausend Gene bzw. Genfragmente in einem einzelnen Experiment statt. Im Rahmen des Microarray Innovations in LEukemia (MILE)-Forschungsprogramms wurden Oligonukleotid Mikroarray-Hybridisierungen (HG-U133 Plus 2.0; Affymetrix Inc., Santa Clara, USA) durchgeführt. Aus dieser Studie wurden unter anderem Genexpressionsprofile von AML- und MDS-Patienten generiert (Haferlach et al., 2008; Mills et al., 2009; Haferlach et al., 2010), dessen Daten für die nachstehenden Expressionsanalysen zur Verfügung standen. Des Weiteren stammten Teile der vorliegenden Datensätze aus verschiedenen Genexpressionsstudien vorangegangener Projekte (Komor et al., 2005; Gueller et al., 2010b). Die mikroarraybasierten Genexpressionsdaten wurden in eine Microsoft Excel Datenbank exportiert und mit Hilfe des Programms GeneSpring 4.2 (Silicon Genetics Inc., San Carlos, USA) in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Martin Neumann (AG Baldus, Hämatologie/Onkologie, Charitè Campus Benjamin Franklin) analysiert. Die Expression der untersuchten Gene wurde durch die in Tabelle 19 aufgeführten probe sets repräsentiert.

Tab. 19: Detailierte Übersicht der untersuchten Gene der mikroarraybasierten Genexpressionsanalysen

			A.()
Gen	Beschreibung	Genbank ID	Affymetrix
		(mRNA)	Probe Set ID
SFRP1	Secreted frizzled-related protein 1	NM_003012.4	202035_s_at
			202036_s_at
			202037_s_at
			228413_s_at
ALCAM	Activated leucocyte cell adhesion	NM 001627.2	201951 at
	molecule	—	201952 at
WNT1	wingless-type MMTV integration	NM 005430.3	208570 at
	site family member 1		20007.0_u
	WNT-Ligand 2		2056/8 at
	windloss type MMTV integration	NIM 004195 2	205040_ai
VVINTZD	site femily member OD	NM_004404.0	200400_5_al
	site family, member 2D	NIM_024494.2	206459_S_al
WINT3	wingless-type MINI V Integration	NM_030753.3	221455_s_at
	site family, member 3		229203_at
			231743_at
WNT4	wingless-type MMTV integration	NM_030761.4	208606_at
	site family, member 4		230751_s_at
			1556689_s_at
WNT5A	wingless-type MMTV integration	NM_003392.3	205990 s at
	site family, member 5A	—	213425 at
WNT5B	wingless-type MMTV integration	NM 030775.2	221029 s at
	site family, member 5B	NM_032642.2	223537 s at
			230299 s at
WNT6	wingless-type MMTV integration	NM 0065223	200200 <u>5</u> at
WINTO	site family member 6	1111_000322.0	71022 of
	Site family, member o		71900_al
	winglood type MMTV integration		222000_5_al
WINT/A	wingless-type wiver v integration	INIM_004625.3	210246_al
	site family, member / A		000/05
WN17B	wingless-type MMTV integration	NM_058238.2	238105_x_at
	site family, member 7B		
WNT8A	wingless-type MMTV integration	NM_058244.2	224259_at
	site family, member 8A		
WNT8B	wingless-type MMTV integration	NM_003393.3	207612_at
	site family, member 8B		
WNT9B	wingless-type MMTV integration	NM 003396.1	1552973 at
	site family, member 9B	—	—
WNT10A	wingless-type MMTV integration	NM 025216.2	223709 s at
	site family member 10A	0101.011	2207 00_0_u
WNT10B	wingless-type MMTV integration	NM 003394 2	206213 at
WINTIOD	site family, member 10P	1101_000004.2	200210_at
	windless type MMTV integration		006707 of
VVINTTT	wingless-type wivit v integration	INIVI_004020.2	200/3/_al
WN114	wingless-type MIM I V integration	NM_003395.2	1553045_at
	site family, member 14 (WNT9A)		230643_at
WNT16	wingless-type MMTV integration	NM_057168.1	221113_s_at
	site family, member 16	NM_016087.2	224022_x_at

Fortsetzung T	abelle 19		
FZD1	Frizzled homolog 1	NM_003505.1	204451_at
			204452_s_at
FZD2	Frizzled homolog 2	NM_001466.2	210220_at
FZD3	Frizzled homolog 3		219683_at
FZD4	Frizzled homolog 4	NM_012193.2	218665_at
			224337_s_at
FZD5	Frizzled homolog 5	NM_003468.3	206136_at
			221245_s_at
FZD6	Frizzled homolog 6	NM_003506.3	203987_at
		NM_001164615.1	
		NM_001164616.1	
FZD7	Frizzled homolog 7	NM_003507.1	203705_s_at
			203706_s_at
FZD8	Frizzled homolog 8	NM_031866.2	216587_s_at
			224325_at
			227405_s_at
FZD9	Frizzled homolog 9	NM_003508.2	207639_at
FZD10	Frizzled homolog 10	NM_00/19/.2	219764_at
LEF1	Lymphoid enhancer-binding	NM_016269.4	210948_at
	factor-1	NM_001130/14.2	221557_at
		NM_001130/13.2	221558_at
TOPA	Turner existing fraction 4	NM_001166119.1	
ICF1	I ranscription factor-1	NM_000545	210515_at
	Drata and care of Mus		216930_at
	Protoonkogen C-Myc		202431_s_at
CCND1		NIM_053056	208/11_s_at
	Cyclin D1		208/12_at
CTININBT	p-Gatenin (cadnerin-associated	XIVI_UUTT33660	1554411_at
	protein)		201533_at
			223679_at

C ERGEBNISSE

C.1 ALCAM

C.1.1 Mikroarraybasierte Genexpressionsanalyse von Knochenmarkzellen, CD34+, CD71+ und Stromazellen aus MDS-Patienten

Grundlage für die Identifikation von ALCAM als mögliches Schlüsselgen der gestörten Hämatopoese beim MDS war die detailierte Datenanalyse der mikroarraybasierten Genexpressionprofile. Dazu wurden die normalisierten Signalstärken der niedrigen IPSS-Risikogruppen low risk und int-1 MDS (nachfolgend als LR-MDS zusammengefasst) sowie der höheren IPSS-Risikogruppen int-2 und high risk MDS (nachfolgend als HR-MDS zusammengefasst) mit denen der gesunden Normalpersonen (NP) verglichen.

Das Knochenmark beider Risikogruppierungen zeigte einen Expressionsanstieg von *ALCAM* im Vergleich zum Knochenmark der gesunden Normalpersonen auf, wobei das Expressionslevel in den HR-MDS-Patienten etwas höher als in den LR-MDS-Patienten lag und im Vergleich zu den gesunden Normalpersonen statistische Signifikanz aufwies. Zudem wurde *ALCAM* von CD34+ Zellen beider Risikogruppierungen leicht erhöht exprimiert. Ein deutlicher Expressionsanstieg wurde ebenfalls in den CD71+ Zellen der HR-MDS-Patienten detektiert, nicht jedoch in den äquivalenten Zellen der LR-MDS-Patienten, deren Expressionslevel ähnlich dem der Normalpersonen war. Zudem war auffällig, dass die *ALCAM*-Expression der Stromazellen mit zunehmendem MDS-Risikotyp leicht abnahm. Tabelle 20 und Abbildung 9 fassen die mittleren Signalstärken in den spezifischen Zelltypen der untersuchten Patientenkollektive (Tab. 8) numerisch und grafisch zusammen.

		-	
Zelltyp	HR-MDS	LR-MDS	NP
KM	1,31 ± 0,16	1,18 ± 0,11	$0,96 \pm 0,04$
CD34+	1,18 ± 0,16	$1,08 \pm 0,14$	$0,96 \pm 0,07$
CD71+	$1,28 \pm 0,43$	$0,50 \pm 0,14$	$0,59 \pm 0,22$
Stroma	7,20 ± 1,62	8,75 ± 1,22	10,19 ± 1,17

Tab. 20: Mikroarraygenerierte mittlere Expressionssignalstärken von ALCAM (Mittelwert ± S.E.M.)



Abb. 9: Mikroarraybasierte Genexpressiondaten von *ALCAM* im Knochenmark (A), CD34+ Zellen (B), CD71+ Zellen (C) und Stromazellen (D) von LR- und HR-MDS-Patienten im Vergleich zu gesunden Normalpersonen (NP) dargestellt als Scatter Dot Plot. Die individuellen Signalstärken stellen den Median der *ALCAM*-repräsentierenden *probe sets* dar. Angegeben ist der Mittelwert \pm *S.E.M.* Statistische Signifikanz: *P< 0,05

C.1.2 *Real-time* RT-PCR Genexpressionsstudien: mRNA-Expression von KM-, CD34+, CD71+ und Stromazellen aus MDS-Patienten

Die durch Mikroarray-Hybridisierung generierten Genexpressionsdaten von ALCAM der individuellen Zelltypen wurden anhand eines unabhängigen Patientenkollektivs in *real-time* RT-PCR-Analysen verifiziert.

Die relative Expression von *ALCAM* im Knochenmark der LR-MDS-Patienten (1,23 \pm 0,15) und HR-MDS-Patienten (1,32 \pm 0,17) war deutlich höher als in den gesunden Normalpersonen (0,49 \pm 0,06), was mit den Resultaten der Mikroarrayanalysen konform ging. Der Expressionsunterschied zu den gesunden Normalpersonen erreichte in beiden MDS-Risikogruppierungen statistische Signifikanz (P=0,0014 und P=0,0002). Die relative Expression von *ALCAM* in CD34+ Zellen der HR-MDS-Patienten betrug 3,85 \pm 0,62 und war statistisch signifikant höher (P=0,048) als die Expression in den gesunden Normalpersonen (2,25 \pm 0,40). Die *ALCAM*-Expression in den äquivalenten Zellen der LR-MDS-Patienten (2,24 \pm 0,52) wies keinen Unterschied zu den gesunden Normalpersonen auf. Abweichend von den Mikroarraydaten, war die relative *ALCAM*-Expression in den CD71+ Zellen der HR-MDS- (1,06 \pm 0,37) und der LR-MDS-

Patienten (1,01 \pm 0,09) 2,5- bzw. 2,4-fach höher als in den äquivalenten Zellen der gesunden Normalpersonen (0,42 \pm 0,09). Der Expressionsabfall von *ALCAM* in den Stromazellen konnte nicht bestätigt werden. Mittels *real-time* RT-PCR wurden in den Stromazellen nur maginale Expressionsunterschiede zwischen den Risikogruppierungen (9,80 \pm 2,34 und 11,26 \pm 2,61) und den Normalpersonen (10,69 \pm 1,80) dedektiert. Tabelle 21 und Abbildung 10 fassen die Resultate der Validierung numerisch und grafisch zusammen.

Tab. 21: Zusammenfassung der *ALCAM*-Expressionsdaten aus Knochenmark-, selektierten CD34+ und CD71+ Zellen sowie aus Stromazellen von Patienten mit LR- und HR-MDS sowie von gesunden Normalpersonen: Relative Expressionslevel, Expressionanstieg im Vergleich zu gesunden Normalpersonen, Statistische Signifikanz (P-Wert).

	Relative ALCAM-	n-facher	P-Wert
	Expression (<i>mean</i> ±	Expressionsanstieg ^a	
	<i>S.E.M</i> .)		
Knochenmarkzellen			
LR-MDS	1,23 ± 0,15	2,5	0,0014
HR-MDS	1,32 ± 0,17	2,7	0,0002
Normalpersonen	$0,49 \pm 0,06$	k.A.	k.A.
CD34+ Zellen			
LR-MDS	$2,24 \pm 0,52$	k.E.	n.s.
HR-MDS	$3,85 \pm 0,62$	1,7	0,0480
Normalpersonen	$2,25 \pm 0,40$	k.A.	k.A.
CD71+ Zellen			
LR-MDS	1,01 ± 0,09	2,4	n.s.
HR-MDS	$1,06 \pm 0,37$	2,5	n.s.
Normalpersonen	$0,42 \pm 0,09$	k.A.	k.A.
Stromazellen			
LR-MDS	$9,80 \pm 2,34$	k.E.	n.s.
HR-MDS	11,26 ± 2,61	k.E.	n.s.
Normalpersonen	10,69 ± 1,80	k.A.	k.A.

k.A: keine Angabe, k.E.: kein Expressionsanstieg im Vergleich zu Normalpersonen, n.s.: statistisch nicht signifikant, ^a n-facher Expressionsanstieg im Vergleich zu Normalpersonen



Abb. 10: Transkriptionelle Genexpression des Zelladhäsionsmoleküls *ALCAM*. Die relative Expression von *ALCAM* wurde in Knochenmarkzellen (A), CD34+ Zellen (B), CD71+ Zellen (C) und Stromazellen (D) von Patienten mit LR- und HR-MDS analysiert. Gesunde Normalpersonen dienten als Kontrollgruppe (NP). Die Expressionslevel wurden mittels semiquantitativer *real-time* RT-PCR bestimmt und auf das *house keeping* Gen *GPI* normalisiert. Die Balken geben den Mittelwert ± *standard error of the mean* (S.E.M.) an. Statistische Signifikanz: *P< 0,05, **P < 0,01, *** P < 0,0001.

C.1.3 Transfektion von Zelllinien zur Überexpression von ALCAM

C.1.3.1 Transiente Überexpression: Nachweis der *ALCAM*-Expression auf mRNA-Ebene

Um die Rolle von *ALCAM* in der dysregulierten Hämatopoese funktionell charakterisieren zu können, wurde zunächst die humane Leukämie-Zelllinie HEL in separaten Versuchsansätzen mit dem *ALCAM*-Überexpressionsvektor pcDNA3.1-myc-HisA-*ALCAM* und dem insertfreien Kontrollvektor pcDNA3.1-myc-HisA transient transfiziert und als Modellzellsystem verwendet.

Die Transfektion der HEL-Zellen erfolgte durch Zugabe von 2 µg Vektor-DNA pro 2,5 x 10⁶ Zellen und 100 µl Transfektionsreagenz mittels Elektroporation und anschließender Inkubation in serumhaltigem Kulturmedium. Die *ALCAM*-überexprimierende Zellpopulation wird nachstehend als HEL-VA, die Zellen der Vektorkontrolle als HEL-VCo bezeichnet.

Der Transfektionserfolg wurde nach 48 h und nach weiteren 3 Tagen Kultivierung anhand des temporären mRNA-Expressionslevels von *ALCAM* mittels *real-time* RT-PCR überprüft. In Abbildung 11 sind die gemittelten Expressionswerte der transfizierten Zellpopulationen HEL-VCo und HEL-VA grafisch dargestellt. Es zeigte sich deutlich, dass *ALCAM* in HEL-VA sowohl 48 h als auch 5 Tage nach Transfektion im Vergleich zur Vektorkontrolle HEL-VCo mehrfach überexprimiert wurde. Die mittlere relative Expression der gemessenen Triplikate betrug nach 48 h 0,42 in HEL-VCo-Zellen und 7,22 in HEL-VA-Zellen, was einen 17-fachen Expressionsanstieg bedeutete. Nach 5 Tagen lagen die Expressionen der HEL-VCo-Zellsuspensionen im Mittel bei 1,16 und der HEL-VA-Zellsuspensionen bei 5,28. Damit war die Überexpression von *ALCAM* nach 5 Tagen zwar noch nachweisbar, der Expressionsanstieg fiel aber deutlich geringer (4,5-fach) aus. Das wies auf einen zeitlichbedingten Verlust des Expressionsvektors durch Zellteilung hin, was nachfolgende Funktionsstudien somit zeitlich limitierte.



Abb. 11: *Real-time* RT-PCR: mRNA-Expression von *ALCAM* 48 h (A) und 5 Tage (B) nach transienter Transfektion der Zelllinie HEL mit dem Expressionsvektor pcDNA3.1-myc-HisA-*ALCAM* (HEL-VA) und dem Leervektor pcDNA3.1-myc-HisA (HEL-VCo) als Negativkontrolle. Die relative Expression ergibt sich aus dem Mittelwert der gemessenen Triplikate und ist als *mean* \pm *S.E.M.* angegeben.

C.1.3.2 Stabile Überexpression von *ALCAM* in HEL-, U937- und K562-Zellen

Zudem wurden im weiteren Verlauf alle Funktionsstudien mit Zellpopulationen durchgeführt, die das Transgen stabil ins Zellgenom integrierten. Die stabile genomische Integration und ein stetiger Selektionsdruck durch Geneticin gewährleistete die Überexpression von *ALCAM* über lange Zeiträume, was einen Einsatz dieser Zellen für Langzeitstudien beispielsweise für *in-vitro* Differenzierungsversuche ermöglichte.

C.1.3.2.1 Dosiswirkungsanalyse von Geneticin

Die Bestimmung der zytotoxischen Konzentration des zur Selektion der stabil transfizierter Zellen verwendeten Antibiotikums Geneticin erfolgte an untransfizierten HEL-, U937- und K562-Zellen. Somit konnte für jede Zelllinie die individuelle Geneticin-Konzentration ermittelt werden, die nötig war, um Zellen ohne Selektionsmarker Erhöhung der Geneticin-Konzentration wurde eine zunehmende abzutöten. Mit Steigerung der zytotoxischen Wirkung auf die Zellen verursacht. 14 Tage nach Testbeginn wurde die Geneticin-Konzentration bestimmt, bei der die nativen Zellen nahezu vollständig starben. Diese Konzentration stellte die optimale Selektionbedingung für die genetisch modifizierte Population dar, die durch Integration des Expressionsvektors ins Zellgenom sowohl das Transgen als auch das
Resistenzgen gegenüber Geneticin exprimierte. Für alle 3 Zelllinien lag diese Konzentration bei 1000 µg Geneticin pro ml Kulturmedium (Daten nicht dargestellt).

C.1.3.2.2 Kontrolle der genomischen Integration und mRNA-Expression von ALCAM

Die Überprüfung der stabilen Transfektion im Sinne einer Integration des Vektors in das Genom der als Modellsysteme verwendeten Zelllinien HEL, U937 und K562 erfolgte zum einen durch den Nachweis des Geneticin-Resitenzgens mittels PCR-Amplifikation und zum anderen durch die Bestimmung der mRNA-Expression von *ALCAM* mittels *real-time* RT-PCR. Dazu wurde Gesamt-RNA isoliert, DNase-behandelt und anschließend revers transkribiert. Die generierte cDNA wurde als Template für die PCR-Amplifikation des Geneticin-Resistenzgens und für die Ermittlung der relativen mRNA-Expression von *ALCAM* eingesetzt. Abbildung 12 zeigt das durch Elektrophorese aufgetrennte 223 bp große Geneticin-Resistenzgenfragment der *ALCAM*-überexprimierenden Zellen (VA) und der Vektorkontrolle der Zelllinien HEL, U937 und K562 nach PCR-Amplifikation in einem 2%-igen Agarosegel. Der Einsatz von Vektor-DNA als PCR-Template diente als Posititivkontrolle.



Abb. 12: PCR-Amplifikation des Geneticin-Resistenzgens stabil transfizierter HEL-, U937- und K562-Zellen vor Beginn der Funktionsstudien. 1: cDNA der *ALCAM*-überexprimierenden Zellpopulation (VA), 2: cDNA der Kontrollpopulation (VCo), 3: cDNA der untransfizierten Zelllinie als Negativkontrolle, 4: Vektor-DNA pcDNA3.1-myc-HisA-*ALCAM* und 5: Vektor-DNA pcDNA3.1-myc-HisA-leer als Positiv-kontrollen, 6: H₂O als Negativkontrolle, M: Marker

Des Weiteren zeigt Abbildung 13 die relative mRNA-Expression von *ALCAM* in den untransfizierten Zellen, den *ALCAM*-überexprimierenden Zellen (VA) und in den Kontrollzellen (VCo). In allen 3 generierten Modellzelllinien konnte eine mehrfache Überexpression von *ALCAM* nachgewiesen werden. Die Überprüfung der mRNA-

Expression fand vor jeder Versuchsdurchführung statt, so dass bei allen nachfolgend aufgeführten Versuchen und Versuchswiederholungen davon ausgegangen werden konnte, dass *ALCAM* kontinuierlich überexprimiert im Zellsystem vorlag (Einzeldaten nicht dargestellt).



Abb. 13: *Real-time* RT-PCR: mRNA-Expression von *ALCAM* nach stabiler Transfektion der Zelllinien (A) HEL, (B) U937 und (C) K562 mit dem integrierten Expressionsvektor pcDNA3.1-myc-HisA-*ALCAM* (VA) und dem Kontrollvektor pcDNA3.1-myc-HisA-leer (VCo).

C.1.4 Proliferationsstudien

Ein Bestandteil der Studien zur funktionellen Charakterisierung von *ALCAM* war die Erstellung von Wachstumskurven und WST1-Messungen, wodurch ein möglicher Einfluss der Überexpression von *ALCAM* auf das Proliferationsverhalten leukämischer Zellen festgestellt werden sollte.

C.1.4.1 Proliferationsverhalten der Zelllinie HEL mit transient überexprimiertem *ALCAM*

Zunächst wurden Wachstumskurven der transient ALCAM-überexprimierenden HELerste Rückschlüsse Zellen und der Kontrollzellen erstellt, um auf das Proliferationsverhalten ziehen zu können. Hierzu wurden 1 x 10⁶ Zellen der Zelllinie HEL mit dem ALCAM-Expressionsvektor sowie dem leeren Kontrollvektor in 3 Ansätzen transient transfiziert und unter Standardkulturbedingungen in 5 ml Nährmedium inkubiert. An den folgenden 6 Tagen wurde die Gesamtzellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Ergebnisse der Auszählung wurden über den gemessenen Versuchszeitraum in einer Wachstumskurve dargestellt (Abb. 14). Ein Vergleich der beiden Kurvenverläufe zeigt deutlich, dass nur eine geringfügig verminderte Expansion der ALCAM-überexprimierenden Zellen stattfand.



Abb. 14: Wachstumskurven der transient *ALCAM*-überexprimierenden Zellen HEL-VA und der Vektorkontrolle HEL-VCo.

Aus diesen Ergebnissen konnten keine eindeutigen Rückschlüsse auf das Proliferationsverhalten von leukämischen Zellen mit überexprimierten *ALCAM* gezogen werden. Die generierten Wachstumskurven ließen jedoch die Vermutung zu, dass *ALCAM*-Überexpression zu einer verminderten Proliferation führen könnte. Diese Vermutung wurde anschließend unter Verwendung stabiler Populationen verschiedener Modellzelllinien überprüft.

C.1.4.2 Proliferationsverhalten von leukämischen Zelllinien mit stabil überexprimiertem *ALCAM*

Da eine transiente Integration des *ALCAM*-Expressionsvektors nur geringfügige Rückschlüsse auf ein abnormales proliferatives Verhaltensmuster der verwendeten Zelllinie vermuten ließ, wurden die Funktionsuntersuchungen mit den genetisch stabil modifizierten Zelllinien HEL, U937 und K562 und den dazugehörigen Kontrollen durchgeführt. Dazu wurde jeweils die untransfizierte Zelllinie als weitere Vergleichskontrolle einbezogen. Nachfolgend werden die Untersuchungsergebnisse der jeweiligen Zelllinie im Einzelnen aufgeführt.

C.1.4.2.1 HEL-Zellen

Zunächst wurde die optimale Zellzahl wie unter B.2.1.7 beschrieben eruiert. Die Auswertung der Proliferationsverläufe der zu testenden Ausgangszellzahlen ergab, dass die Ausaat von 10.000 Zellen in 70 µl Nährmedium für den zu messenden Zeitraum optimale Wachstumsbedingungen für nachfolgende WST1-Analysen gewährleistete (Abb. 15, rot gekennzeichnet).





Die anschließenden Proliferationsstudien ergaben eine verminderte proliferative Aktivität der *ALCAM*-überexprimierenden Zellpopulation HEL-VA im Vergleich zu den Kontrollpopulationen. Dies wurde sowohl anhand der WST1-Messungen (Abb. 16 A) als auch in den Wachstumskurven (Abb. 16 B) deutlich. Zellen mit stabil integriertem *ALCAM* expandierten geringer als unveränderte HEL-Zellen oder Zellen der Vektorkontrolle HEL-VCo.



Abb. 16: Proliferationstudien der Versuchszelllinie HEL. Zeitlicher Verlauf der Zellexpansion mittels photospektrometrischer Bestimmung im ELISA-Plattenlesegerät 3 h nach WST1-Gabe (A) und anhand von Wachstumskurven (B) der untransfizierten HEL-Zellen, der *ALCAM*-überexprimierenden Zellpopulation HEL-VA (rot markiert) und der Kontrollpopulation HEL-VCo.

C.1.4.2.2 U937-Zellen

Der Einsatz von 10.000 Zellen in 70 µl Medium pro Ansatz gewährleistete für den zu untersuchenden Versuchszeitraum optimale Wachstumsbedingungen für nachfolgende Analysen mittels WST1-Assay (Abb. 17, rot gekennzeichnet).



Abb. 17: Bestimmung der optimalen Zellzahl der Versuchszelllinie U937. Dargestellt sind die Proliferationsverläufe für 1500, 3000, 5000 und 10.000 Ausgangszellen in 70 μl Nährmedium.

Die direkte Gegenüberstellung der *ALCAM*-überexprimierenden Zellpopulation U937-VA und der Kontrollen zeigte keine differentiellen Proliferationsverläufe. Besonders deutlich wurde dies anhand der WST1-Messungen (Abb. 18 A), die einen nahezu identischen Expansionsverlauf der 3 Zelltypen offenbarten. Die Wachstumskurven der Zellpopulationen U937 und U937-VA zeigten einen ähnlichen Proliferationsverlauf, während die Zellen der Vektorkontrolle U937-VCo abweichend davon deutlich geringer expandierten (Abb. 18 B).



Abb. 18: Proliferationstudien der Versuchszelllinie U937. Zeitlicher Verlauf der Zellexpansion mittels photospektrometrischer Bestimmung im ELISA-Plattenlesegerät 3 h nach WST1-Gabe (A) und anhand von Wachstumskurven (B) der untransfizierten U937-Zellen, der *ALCAM*-überexprimierenden Zellpopulation U937-VA (rot) und der Vektorkontrolle U937-VCo.

C.1.4.2.3 K562-Zellen

Die optimale Zellzahl der dritten verfügbaren Leukämie-Zelllinie lag ebenfalls bei 10.000 Zellen in 70 µl Medium pro Ansatz, was die Gewährleistung optimaler Wachstumsbedingungen für nachfolgende Analysen mittels WST1-Assay bot (Abb. 19, rot gekennzeichnet).



Abb. 19: Bestimmung der optimalen Zellzahl der Versuchszelllinie K562. Dargestellt sind die Proliferationsverläufe für 1500, 3000, 5000 und 10.000 Ausgangszellen in 70 μl Nährmedium.

Ähnlich dem Proliferationsverhalten der U937-Zellen konnte anhand dieser Zelllinie kein Einfluss von *ALCAM* auf die proliferative Aktivität der Zellen beobachtet werden. Die WST1-generierte Proliferationkurve von K562-VA verlief zwischen den dazugehörigen Kontrollen (Abb. 20 A). Bei Betrachtung der Wachstumskurven zeigte sich ein ähnlicher Verlauf aller 3 Zellpopulationen (Abb. 20 B).



Abb. 20: Proliferationstudien der Versuchszelllinie K562. Zeitlicher Verlauf der Zellexpansion mittels photospektrometrischer Bestimmung im ELISA-Plattenlesegerät 3 h nach WST1-Gabe (A) und anhand von Wachstumskurven (B) der untransfizierten K562-Zellen, der *ALCAM*-überexprimierenden Zellpopulation K562-VA (rot) und der Vektorkontrolle K562-VCo.

Die Proliferationsstudien umfassten die Untersuchung der modifizierten Zelllinien HEL, U937 und K562, um ein mögliches aberrantes Proliferationsverhalten durch eine verstärkte Expression von *ALCAM* zu zeigen. Dabei wies die modifizierte HEL-Zelllinie eine verminderte proliferative Aktivität auf. Die Zelllinien U937 und K562 zeigten keinen Effekt von *ALCAM* auf das Zellwachstum. Die Ergebnisse wurden in einer Versuchswiederholung bestätigt.

C.1.5 Apoptosestudien

Zur Bestimmung des Einflusses einer *ALCAM*-Überexpression auf die Apoptoserate wurden apoptotische und nekrotische Zellen durchflusszytometrisch mittels Markierung der Zellen mit Annexin V und Propidiumiodid quantifiziert. Der prozentuale Anteil der apoptotischen und nekrotischen Zellen ergab sich aus der Subtraktion des ermittelten Anteils der vitalen Zellpopulation von der Gesamtpopulation.

C.1.5.1 Apoptoseverhalten der Zelllinie HEL mit transient überexprimiertem ALCAM

Es wurden 2,5 x 10⁶ HEL-Zellen mit dem *ALCAM*-Expressionsvektor sowie mit dem insertfreien Kontrollvektor in Triplikaten transfiziert und unter Standardkulturbedingungen in 5 ml Nährmedium inkubiert. Nach 24 h, 48 h und 72 h wurde der prozentuale Gesamtanteil der apoptotischen und nekrotischen Zellen bestimmt und miteinander verglichen.

Tab. 22: Prozentualer Anteil der apoptotischen/nekrotischen Zellen an der Gesamtzellpopulation der transient *ALCAM*-überexprimierenden HEL-Zellen (HEL-VA) und der Vektorkontrolle (HEL-VCo) als Triplikate.

	apopto	tische/nekrotische Zell	en [%]
	24 h	48 h	72 h
	53,62	44,76	34,75
	47,12	42,05	37,64
HEL-VC0	52,28	49,37	35,98
	56,56	56,05	40,98
	56,03	55,60	49,95
	63,80	45,67	54,68

Der Anteil avitaler Zellen war durch die Anwendung der Elektroporation zum Zweck der Transfektion sowohl bei HEL-VA als auch bei der Kontrolle HEL-VCo zu allen 3 Zeitpunkten stark erhöht. Nach Revitalisierung der Zellen nahm dieser Anteil mit fortschreitender Zeit ab. Zu allen 3 Messzeitpunkten wurde eine erhöhte Apoptoserate der HEL-VA-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen detektiert. So ergab sich eine numerische Differenz der gemittelten Anteile apoptotisch/nekrotischer Zellen von 7,79 nach 24 h, 7,05 nach 48 h und 12,41 nach 72 h (Tab. 22). Zu diesem Messzeitpunkt erreichte die Differenz statistische Signifikanz (P = 0,039). Abbildung 21 veranschaulicht das unterschiedliche Apoptoseverhalten der untersuchten Zellpopulationen in einem Balkendiagramm.



Abb. 21: Apoptoseraten der transient *ALCAM*-überexprimierenden Zellen HEL-VA im Vergleich zur den Kontrollzellen HEL-VCo 24 h, 48 h und 72 h nach Transfektion durch Elektroporation. Dargestellt ist der Mittelwert ± S.E.M. Statistische Signifikanz: *P < 0,05

Die dargestellten Resultate der Apoptosestudien transient transfizierter HEL-Zellen lassen im Hinblick auf die funktionelle Charakterisierung von *ALCAM* erstmals vermuten, dass eine verstärkte Expression von *ALCAM* mit einer erhöhten Apoptoserate in leukämischen Zellen im Zusammenhang stehen könnte. Die Daten konnten in mehreren unabhängigen Versuchsansätzen verifiziert werden.

C.1.5.2 Apoptosesverhalten leukämischer Zelllinien mit stabil überexprimiertem ALCAM

Je Einzelansatz wurden 900.000 Zellen in 3 ml Nährmedium ausgesät und kultiviert. Durch Markierung der Zellen mit FITC-konjugiertem Annexin V und Propidiumjodid wurde der prozentuale Anteil der apoptotischen und nekrotischen Zellen an der Gesamtzellpopulation durchflusszytometrisch zu Versuchsbeginn (0 h) und an 5 weiteren Zeitpunkten in Duplikaten bestimmt. Die Ergebnisse wurden in einer Versuchswiederholung validiert und bestätigt. Nachstehend werden je Zelllinie die Ergebnisse einer Versuchsreihe im Einzelnen aufgeführt.

C.1.5.2.1 HEL-Zellen

Die durchflusszytometrischen Analysen zum Apoptoseverhalten der *ALCAM*überexprimierenden HEL-Zellen (HEL-VA) ergaben einen deutlich erhöhten Anteil der apoptotischen und nekrotischen Zellen an der Gesamtpopulation im Vergleich zu den untransfizierten HEL-Zellen und der dazugehörigen Vektorkontrolle zu allen gemessenen Zeitpunkten. Am stärksten wurde dieses Verhalten 48 h nach Versuchsbeginn deutlich. Tabelle 23 gibt einen Überblick der Daten einer Versuchsreihe.

	apoptotische/nekrotische Zellen [%]					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	d 5
HEL	14,46	13,75	11,34	12,23	20,85	23,78
	12,20	11,31	10,26	12,70	19,70	23,43
HEL-VA	19,83	22,18	23,53	20,20	21,93	28,35
	19,80	21,56	22,58	20,77	19,51	26,12
HEL-VCo	16,58	15,44	15,00	13,85	15,23	18,07
	16,65	14,42	13,67	12,35	15,03	19,44

Tab. 23: Prozentualer Anteil der apoptotischen und nekrotischen Zellen (Duplikate)

Abbildung 22 stellt die generierten Dot Plots der FACS-Analyse der vorliegenden Versuchsreihe für 48 h vergleichend dar. Im unteren linken Quadrat ist die vitale Zellpopulation dargestellt. Das obere linke Quadrat fasst die apoptotisch-positiven/nekrotisch-negativen Zellen und das obere rechte Quadrat die apoptotischund nekrotisch-positiven Zellen zusammen. Im Vergleich zu den Kontrollpopulationen zeigte HEL-VA in diesen Quadraten eine stärkere Akkumulation von Zellen, was einen erhöhten Anteil apoptotischer/nekrotischer Zellen widerspiegelt. Das untere rechte Quadrat stellt die apoptotisch-negativen/nekrotisch-positiven Zellen dar. Der Anteil dieser Zellen blieb in allen 3 Zellsuspensionen unverändert.



Abb. 22: Repräsentative Dot Plots der FACS-Analyse nach Annexin V- und PI-Markierung der untransfizierten HEL-Zellen (A), der *ALCAM*-überexprimierenden Zellpopulation HEL-VA (B) und der Vektorkontrolle HEL-VCo (C) nach 48 h. Im unteren linken Quadrat ist die vitale Zellpopulation dargestellt. Die schwarzen Pfeile markieren einen erhöhten Anteil der apoptotisch-positiven/ nekrotisch-negativen sowie der apoptotisch-/nekrotisch-positiven Zellpopulation von HEL-VA.

C.1.5.2.2 U937-Zellen

Die FACS-Analyse der *ALCAM*-überexprimierenden U937-Zellen (U937-VA) ergab zu allen gemessenen Zeitpunkten keinen deutlich erkennbaren Unterschied im Apoptoseverhalten verglichen mit den Kontrollen (Abb. 23). Insgesamt war der Anteil der apoptotischen und nekrotischen Zellen an der Gesamtpopulation aller 3 Zelltypen zu allen gemessenen Zeitpunkten unverändert niedrig. Tabelle 24 fasst alle Daten der Analyse zusammen.

	apoptotische/nekrotische Zellen [%]					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	d 5
U937	3,21	3,95	2,60	3,05	2,29	3,39
	2,78	3,11	2,95	2,85	2,38	2,97
U937-VA	1,85	3,15	1,83	2,14	1,62	2,47
	1,92	2,84	1,78	1,92	1,96	2,35
U937-VCo	3,49	6,28	5,18	5,47	3,89	4,22
	3,39	6,29	4,80	5,67	4,49	4,42

Tab. 24: Prozentualer Anteil der apoptotischen und nekrotischen Zellen (Duplikate)



Abb. 23: Repräsentative Dot Plots der FACS-Analyse nach Annexin V- und Propidiumiodid-Markierung der untransfizierten U937-Zellen (A), der *ALCAM*-überexprimierenden Zellpopulation U937-VA (B) und der Vektorkontrolle U937-VCo (C) nach 48 h. Im unteren linken Quadrat ist die vitale Zellpopulation, im oberen linken Quadrat sind die apoptotisch-positiven/nekrotisch-negativen Zellen, im unteren rechten Quadrat die apoptotisch-negativen/nekrotisch-positiven Zellen und im oberen rechten Quadrat die apoptotisch-und nekrotisch-positiven Zellen dargestellt.

C.1.5.2.3 K562-Zellen

Die FACS-Analyse einer weiteren genetisch modifizierten Zelllinie ergab zunächst eine geringfügige Verminderung der Apoptose der *ALCAM*-überexprimierenden K562-VA-Zellen im Vergleich zu den Kontrollpopulationen zu Versuchsbeginn und nach 24 h. Dieser Unterschied war jedoch in den darauf folgenden Messzeitpunkten nur noch redundant nachweisbar und könnte demnach artifiziell sein (Abb. 24). Tabelle 25 fasst alle Daten der Analyse zusammen.

	apoptotische/nekrotische Zellen [%]					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	d 5
K562	17,19	10,07	7,86	8,60	9,99	13,27
	16,12	9,47	7,11	8,81	9,74	12,09
K562-VA	10,74	7,20	6,26	8,19	6,94	8,97
	11,53	6,81	6,41	9,16	7,16	8,23
K562-VCo	16,91	12,97	10,56	12,39	10,35	10,23
	18,54	14,43	10,93	12,50	9,85	8,86

Tab. 25: Prozentualer Anteil der apoptotischen und nekrotischen Zellen (Duplikate)



Abb. 24: Repräsentative Dot Plots der FACS-Analyse nach Annexin V- und Propidiumiodid-Markierung der untransfizierten K562-Zellen (A), der *ALCAM*-überexprimierenden Zellpopulation K562-VA (B) und der Vektorkontrolle K562-VCo (C) nach 48 h. Im unteren linken Quadrat ist die vitale Zellpopulation dargestellt. Das obere linke Quadrat fasst die apoptotisch-positiven/nekrotischnegativen Zellen, das untere rechte Quadrat die apoptotisch-negativen/nekrotisch-positiven Zellen und das obere rechte Quadrat die apoptotisch-positiven Zellen zusammen.

Die Apoptosestudien umfassten die Untersuchung der genetisch stabil modifizierten Zelllinien HEL, U937 und K562. Diese Studien haben gezeigt, dass *ALCAM*-Überexpression zum Anstieg der Apoptoserate der Zelllinie HEL führt. Das weist darauf hin, dass das Zelladhäsionsmolekül ursächlich für die verminderte Gesamtviabilität der Zellen sein könnte.

C.1.6 Einfluss von ALCAM auf die erythroide Differenzierung von HEL-Zellen

Ein weiterer Bestandteil zur Charakterisierung der Rolle von *ALCAM* in der dysregulierten Hämatopoese waren Untersuchungen zum Einfluss des Proteins auf das erythroide Differenzierungsverhalten leukämischer Zellen, da beim MDS vor allem die Reifung der erythroiden Zellreihe gestört ist. Als Modellsystem für den BFU-E Assay wurde die humane Erythroleukämie-Zelllinie HEL verwendet. Zunächst wurde die optimale Zellzahl bestimmt. Sie betrug pro Einzelansatz 1500 Zellen (Daten nicht dargestellt). Unter Verwendung dieser Zellzahl betrug die Anzahl der quantivizierbaren Kolonien für die untransfizierte Zellpopulation nach 12-tägiger Versuchsdauer 80 bis 100.

Für den nachfolgenden BFU-E Assay wurden je Zelltyp Triplikate mit 1500 Zellen pro Einzelansatz wie unter B.2.1.9 beschrieben ausgesät. Dafür wurden die Zellen aus der Flüssigkultur entnommen und in semisolides Methylzellulose-Medium mit definierten Wachstumsfaktoren überführt, um so das Wachstums- und Differenzierungsverhalten der leukämischen Zelllinie unter Einfluß der *ALCAM*-Überexpression zu bewerten. Nach 12 Tagen wurden die Kulturen durch Auszählung der BFU-E unter dem Phasenkontrastmikroskop ausgewertet. Abbildung 25 stellt die Anzahl der gewachsenen BFU-E ohne Zugabe von EPO und nach EPO-Stimulation vergleichend dar.

HEL-VA-Zellen bildeten ohne Zugabe von EPO weniger BFU-E (68 ± 1) als untransfizierte Zellen (106 ± 11) und Zellen der Vektorkontrolle HEL-VCo (82 ± 7). Die Anzahl der Kolonien der untransfizierten Zellen nahm nach Stimulation mit EPO deutlich zu (167 ± 17), während das Differenzierungspotential der *ALCAM*-überexprimierenden HEL-VA-Zellen deutlich abnahm (29 ± 3). Im Gegensatz dazu war die Anzahl der BFU-E, die aus der Vektorkontrolle HEL-VCo hervorgingen, kaum erhöht (85 ± 6).



Abb. 25: BFU-E Assay ohne (-EPO) und mit EPO-Stimulation (+EPO) von untransfizierten HEL-Zellen, *ALCAM*-überexprimierenden HEL-Zellen (HEL-VA) und Kontrollzellen (HEL-VCo). Dargestellt ist der Mittelwert ± *standard error of the mean* (S.E.M.) aus Triplikaten.

Abbildungen 26 A-C stellt beispielhaft die Morphologie BFU-E-bildender Einheiten von HEL-VA-, HEL-VCo- und untransfizierter HEL-Zellen unter EPO-Stimulation vergleichend dar. Im Gegensatz dazu zeigen die Abbildungen 26 D-F beispielhaft Zellmorphologien, die keine BFU-E darstellen und somit nicht in die Quantifizierung und Beurteilung des Einflusses von *ALCAM* auf die Erythropoese hämatopoetischer Zellen eingingen.



Abb. 26: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen repräsentativer BFU-E der untransfizierten HEL-Zellen (A), der *ALCAM*-überexprimierenden Zellen HEL-VA (B) und der Kontrollzellen HEL-VCo (C) nach 12 Tagen EPO-Stimulation. Beispiele für nicht-BFU-E-bildende Zellmorphologien untransfizierter HEL-Zellen (D), *ALCAM*-überexprimierender Zellen HEL-VA (E) und der Kontrollzellen HEL-VCo (F) nach 12 Tagen EPO-Stimulation.

Nach Auszählung der Kolonien wurden die Zellen mehrmals mit PBS aus dem semisoliden Methylzellulose-Medium gewaschen und für die durchflusszytometrische FACS-Analyse der CD71- und CD235a-positiven Populationen der jeweiligen Zelltypen vorbereitet und gemessen. Tabelle 26 fasst die prozentualen Anteile der detektierten Oberflächenproteine ohne und mit EPO-Stimulation vergleichend zusammen und ermöglicht dadurch Rückschlüsse auf den Differenzierungsgrad der untersuchten Zellen. Zu jeder Messreihe wurde eine Isotypkontrolle mitgeführt.

Der Anteil der CD71+ Zellen der *ALCAM*-überexprimierenden Population HEL-VA war ähnlich dem der untransfizierten Zellen und blieb auch nach EPO-Stimulation mit circa 75% unverändert. Der Anteil der CD71+ Zellen der Vektorkontrolle HEL-VCo lag etwas höher bei circa 82% und blieb nach EPO-Stimulation ebenfalls unverändert. Auffällig war, dass der CD235a+ Anteil der HEL-VA-Zellen sowohl vor als auch nach 12-tägiger EPO-Stimulation leicht vermindert im Vergleich zu den untransfizierten Zellen und deutlich vermindert im Vergleich zu den Kontrollzellen HEL-VCo war. Deren Anteil an CD235a+ lag mit 65% und 66% deutlich über denen der untransfizierten HEL-Zellen (55% und 50%) und der HEL-VA-Zellen (51% und 47%). Eine geringfügige Abnahme der reiferen Vorläuferzellen von 51% auf 47% konnte für die *ALCAM*-überexprimierende Zellpopulation nach EPO-Stimulation beobachtet werden. Ein ähnliches Verhalten wurde jedoch auch für die untransfizierte Zellpopulation beobachtet.

Tab. 26: Übersicht der FACS-Datenanlyse des BFU-E Assays mit und ohne EPO-Stimulation (Angaben in %)

-EPO					+El	P0	
	lsotyp	CD71+	CD235+		Isotyp	CD71+	CD235+
HEL	6,98	78,21	55,79	HEL	6,32	75,21	50,75
HEL-VA	10,46	75,67	51,48	HEL-VA	10,14	75,88	47,20
HEL-VCo	10,48	82,99	65,00	HEL-VCo	8,76	81,65	66,03

Zusammengefasst zeigte die Differenzierungsstudie, dass die vektorbedingte *ALCAM*-Überexpression in einer deutlich verminderten Anzahl an BFU-E resultierte. Der Differenzierungsgrad änderte sich jedoch überraschenderweise nach EPO-Stimulation aller 3 Zelltypen nur maginal.

C.2 SFRP1

C.2.1 Mikroarraybasierte Genexpressionsanalyse in Knochenmark- und CD34+ Zellen aus MDS-Patienten

Um *SFRP1* als weiteres mögliches Kandidatengen der gestörten Hämatopoese beim MDS identifizieren zu können, wurden zunächst mikroarraybasierte Genexpressionsprofile der verschiedenen hämatopoetischen Zelltypen von *low risk* und *int-1 risk* MDS-Patienten (zusammengefasst als LR-MDS) sowie von *int-2 risk* und *high risk* MDS-Patienten (zusammengefasst als HR-MDS) im Vergleich zu gesunden Normalpersonen (NP) generiert. Zudem wurden die Genexpressionsdaten der 10 WNT-Rezeptoren *FZD*, der 18 *WNT*-Liganden und ausgewählter WNT-Signalweg-assoziierter Gene ermittelt. Die individuellen Expressionsdaten der Patienten wurden aus dem Mittelwert der Expressionssignale der in Tabelle 19 des Abschnitts B.2.3 aufgelisteten *Probe sets* generiert soweit das Gen nicht nur von einem individuellen *Probe set* repräsentiert wurde.

C.2.1.1 SFRP1

SFRP1 wurde im Knochenmark sowie in CD34+ Zellen von MDS-Patienten beider Risikogruppierungen im Vergleich zu Normalpersonen differentiell exprimiert. In beiden Zelltypen der HR-MDS-Patienten wurde eine stärkere Expressionsabnahme als in den LR-MDS-Patienten beobachtet. Die mittlere Signalstärke der *SFRP1*-Expression betrug in den Knochenmarkzellen der HR-MDS-Patienten 0,88 \pm 0,11, der LR-MDS-Patienten 1,34 \pm 0,25 und der gesunden Normalpersonen 1,60 \pm 0,13 (Abb. 27 A). Daraus ergab sich eine Abnahme der mittleren Expression in den HR-MDS-Patienten um 45% und in den LR-MDS-Patienten um 16% im Vergleich zu den gesunden Normalpersonen. Der Unterschied der Expression von *SFRP1* im Knochenmark der HR-MDS-Patienten zur Expression der gesunden Normalpersonen war statistisch signifikant (P=0,0001).

In den CD34+ Zellen betrug die mittlere Signalstärke der *SFRP1*-Expression in den HR-MDS-Patienten 1,07 \pm 0,21, in den LR-MDS-Patienten 1,19 \pm 0,11 im Vergleich zu 1,32 \pm 0,23 in den gesunden Normalpersonen (Abb. 27 B). Daraus resultierte eine Abnahme der mittleren Expression um 19% in den HR-MDS-Patienten und um 10% in den LR-MDS-Patienten. Die Expressionsunterschiede waren nicht statistisch signifikant.



Abb. 24: Mikroarraybasierte Genexpressiondaten von *SFRP1* im Knochenmark (A) und in CD34+ Zellen (B) von LR-MDS- und HR-MDS-Patienten im Vergleich zu gesunden Normalpersonen (NP) dargestellt als Scatter Dot Plot. Die individuellen Signalstärken stellen den Median der *ALCAM*repräsentierenden *probe sets* dar. Angegeben ist der Mittelwert \pm *S.E.M.* Statistische Signifikanz: *** P < 0,0001.

C.2.1.2 WNT-Signalweg-assoziierte Gene

WNT-Liganden

Zusätzlich wurden die Genexpressionsmuster der 18 WNT-Gene in Knochenmarkzellen MDS-Patienten der Niedrigrisikogruppierung LR-MDS (n=31) und aus der Hochrisikogruppierung HR-MDS (n=21) mit denen der gesunden Normalpersonen (n=24) verglichen (Abb. 25). Bei der Betrachtung der spezifischen Genexpression der einzelnen WNT-Gene konnten Kandidaten determiniert werden, die im Vergleich zu gesunden Normalpersonen in MDS-Patienten deutlich hochreguliert waren. Die Expression von WNT3 und insbesondere von WNT11 war in den LR-MDS, aber deutlich stärker in den HR-MDS-Patienten erhöht. Eine offensichtliche Expressionszunahme wies ebenfalls WNT6 und WNT8B in HR-MDS-Patienten auf. Auffällig war, dass neben einer Reihe von unveränderten Genexpressionsmustern auch WNT-Gene identifiziert werden konnten, deren Expression in MDS-Patienten im Vergleich zur Expression der gesunden Normalpersonen deutlich herunter reguliert war.

In HR-MDS-Patienten war die Expression von *WNT7B* um circa ein Drittel, von *WNT7A* um circa 50% vermindert. In Patienten der niedrigen Risikotypen wiesen die Expressionsprofile dieser Gene nur eine geringfügige Verminderung der Transkription auf. Weiterhin konnte eine verminderte Genexpression von *WNT10B* sowohl in HR-MDS- als auch in LR-MDS-Patienten im Vergleich zu gesunden Normalpersonen festgestellt werden.



Abb. 25: Mikroarraybasierte Genexpressiondaten der WNT-Liganden im Knochenmark von LR-MDSund HR-MDS-Patienten im Vergleich zu gesunden Normalpersonen (NP) als Balkendiagramm dargestellt. (+) : Expressionszunahme, (-): Expressionsabnahme im Vergleich zu NP

WNT-Rezeptoren FZD

Ein weiterer Bestandteil der Mikroarraydatenanalyse war die Ermittlung der Expressionswerte aller 10 *FZD*-Isoformen in Knochenmarkzellen von MDS-Patienten. Im Vergleich zu den gesunden Normalpersonen war in den HR-MDS-Patienten die Expression von *FZD3* und *FZD10* zweifach und die von *FZD7* um 50% erhöht. Anders als für *FZD3* wurde zusätzlich im Knochenmark der LR-MDS-Patienten ein leichter Anstieg der *FZD7*- und *FZD10*-Expression verzeichnet. Dagegen wies die *FZD5*-Expression eine annähernd 2-fache Zunahme in beiden MDS-Risikotypen auf. Die Analyse der WNT-Rezeptoren *FZD1*, *2*, *4*, *6* und *8* ergab keine differentiellen Expressionswerte dieser Gene.



Abb. 26: Mikroarraybasierte Genexpressiondaten aller Frizzled-Isoformen (*FZD*) im Knochenmark von LR-MDS- und HR-MDS-Patienten im Vergleich zu gesunden Normalpersonen (NP) als Balkendiagramm dargestellt. (+): Expressionszunahme, (-): Expressionsabnahme im Vergleich zu NP

WNT-Signalwegkomponenten und -Zielgene

Abschließend wurden die Expressionsdaten ausgewählter Gene des WNT-Signalweges sowie *downstream* gelegener Zielgene generiert (Abb. 27). Die Expression der WNT-Transkriptionsfaktorkomponente *LEF1* war sowohl in den LR-MDS-Patienten als auch in den HR-MDS-Patienten deutlich herunter reguliert. Überraschenderweise blieben die Expression von *TCF1*, einer weiteren Komponente des WNT-Transkriptionsfakor-Komplexes sowie die Expression von *CTNNB1* (β-Catenin), dem Hauptregulator des kanonischen WNT-Signalweges, unverändert. In HR-MDS-Patienten konnte ein leichter Expressionsanstieg des WNT-Zielgens *C-MYC* verzeichnet werden. Ein deutlicher Expressionsanstieg des WNT-Zielgens *CCDN1* (Cyclin D1) wurde sowohl in den LR-MDS- als auch in den HR-MDS-Patienten detektiert.



Abb. 27: Mikroarraybasierte Genexpressiondaten ausgewählter WNT-Pathwaygene und WNT-Zielgene im Knochenmark von LR-MDS- und HR-MDS-Patienten im Vergleich zu gesunden Normalpersonen (NP) als Balkendiagramm dargestellt. (+): Expressionszunahme, (-): Expressionsabnahme im Vergleich zu NP

C.2.2 Real-time RT-PCR Genexpressionsstudien

Die durch Mikroarrayanalysen generierten Expressionsdaten wurden anhand eines unabhängigen Patientenkollektivs mittels semiquantitativer *real-time* RT-PCR verifiziert. Dabei wurde die Expression des WNT-Antagonisten *SFRP1* sowie des WNT-Rezeptors *FZD3* in Knochenmark- und CD34+ Zellen von Patienten mit MDS unterschiedlichen IPSS-Risikotyps mit der Expression von Patienten mit AML und ALL sowie mit gesunden Normalpersonen verglichen. Für diese Untersuchung stand ein umfangreiches Patientenkollektiv aus 78 MDS-Patienten unterschiedlichen Risikotyps zur Verfügung, so dass in der nachstehende Datenerhebung zwischen *low risk, int-1, int-2* und *high risk* MDS-Patienten unterschieden wurde.

C.2.2.1 Transkriptionelle Genexpression von *SFRP1* im MDS und in akute Leukämien

Die anhand der Mikroarrayanalysen nachgewiesene Herunterregulation von *SFRP1* mit zunehmender MDS-Risikogruppierung konnte mittels *real-time* RT-PCR-Untersuchungen bestätigt werden. Eine deutlich verminderte, relative Genexpression wurde in Knochmarkproben von 15 (83%) *low risk*, 23 (85%) *int-1*, 17 (89%) *int-2* und in 11 (79%) *high risk* MDS Patienten beobachtet. Des Weiteren wies das Knochenmark

von 22 (96%) AML- und 18 (86%) ALL-Patienten eine stark verminderte *SFRP1*-Expression auf. Die daraus resultierende durchschnittliche Herunterregulierung der *SFRP1*-Expression im Vergleich zu gesunden Normalpersonen war wie folgt: 3,4-fach in *low risk*, 3,0-fach in *int-1*, 7,9-fach in *int-2*, 15,4-fach in *high risk* MDS sowie 19,8-fach in AML- und 17,3-fach in ALL-Patienten. Alle Unterschiede erwiesen sich als statistisch hochsignifikant (Tab. 27, Abb. 28 A).

Zudem konnte eine verminderte mRNA-Expression in selektierten CD34+ Zellen aller MDS-Risikotypen nachgewiesen werden: in 10 (91%) *low risk*, 11 (92%) *int-1*, 11 (100%) *int-2* und 8 (80%) *high risk* MDS-Patienten (Tab. 27, Abb. 28 B). Daraus ergab sich folgende durchschnittliche SFRP1-Herunterregulierung verglichen zur Expression in gesunden Normalpersonen: 3,3-fach in *low risk*, 2,0-fach in *int-1*, 18,4-fach in *int-2* und 7,7-fach in *high risk* MDS. Alle Unterschiede erwiesen sich als statistisch signifikant. CD34+ Zellen aus AML- und ALL-Patienten standen der Analyse nicht zur Verfügung und konnten dementsprechend nicht in die Datenerhebung einbezogen werden.



Abb. 28: Signifikante transkriptionelle Herunterregulierung des WNT-Inhibitors *SFRP1*. Die relative Expression von *SFRP1* wurde (A) in Knochenmarkzellen von Patienten mit *low risk* (n=15), *int-1* (n=23), *int-2* (n=17) und *high risk* MDS (n=11), AML (n=22) und ALL (n=18) sowie (B) in CD34+ Zellen von Patienten mit *low risk* (n=10), *int-1* (n=11), *int-2* (n=11) und *high risk* MDS (n=8) analysiert. Gesunde Normalpersonen (NP, KM: n=24, CD34+: n=18) dienten jeweils als Kontrollgruppe. Die Expressionslevel wurden mittels semiquantitativer *real-time* RT-PCR bestimmt und auf das *house keeping* Gen *GPI* normalisiert. Dargestellt ist der Mittelwert ± standard error of the mean (S.E.M.). Statistische Signifikanz: *P< 0,05, **P < 0,01, *** P < 0,0001.

Im Knochenmark stieg mit zunehmendem MDS-Risikotyp die Herunterregulation von *SFRP1* kontinuierlich um ein Vielfaches an. In AML- und ALL-Patienten zeigte sich die Herunterregulation am stärksten. In den CD34+ Zellen der MDS-Niedrigrisikogruppen fiel die Herunterregulation von *SFRP1* zwar deutlich geringer aus als in den äquivalenten Zellen der MDS-Hochrisikogruppen, jedoch konnte eine graduelle Expressionsabnahme mit zunehmendem MDS-Risikotyp ähnlich wie im Knochenmark nicht beobachtet werden.

Tabelle 27 gibt einen Überblick über die Anzahl der untersuchten Patienten, den Anteil der Patienten, die eine Herunterregulation der *SFRP1*-Expression aufwiesen sowie über das Vielfache der Herunterregulation und die statistische Signifikanz.

Tab. 27: Zusammenfassung der *SFRP1*-Expressionsdaten in Knochenmark- und CD34+ Zellen: Patientenproben, relative Expressionslevel, Herunterregulation im Vergleich zu gesunden Normalpersonen, Statistische Signifikanz (P-Wert).

	Patienten ^a	Relative SFRP1-	n-fache	P-Wert
		Expression ^b	Herunterregulation ^c	
Knochenmark				
Low risk MDS	15/18 (83%)	0,81 ± 0,24	3,4	0,0002
Int-1 MDS	23/27 (85%)	$0,94 \pm 0,16$	3,0	<0,0001
Int-2 MDS	17/19 (89%)	$0,35 \pm 0,09$	7,9	<0,0001
<i>High risk</i> MDS	11/14 (79%)	0,18 ± 0,06	15,4	<0,0001
AML	22/23 (96%)	$0,14 \pm 0,04$	19,8	<0,0001
ALL	18/21 (86%)	0,16 ± 0,04	17,3	<0,0001
NP	n=24 (k.A.)	$2,78 \pm 0,36$	k.A.	k.A.
CD34+ Zellen				
Low risk MDS	10/11 (91%)	0,28 ± 0,11	3,3	0,0066
Int -1 MDS	11/12 (92%)	$0,47 \pm 0,11$	2,0	0,0376
Int -2 MDS	11/11 (100%)	$0,05 \pm 0,02$	18,4	<0,0001
High risk MDS	8/10 (80%)	$0,12 \pm 0,09$	7,7	0,0018
NP	n=18 (k.A.)	$0,92 \pm 0,15$	k.A.	k.A.

k.A: keine Angabe, NP: gesunde Normalpersonen ^a Anzahl der herunterregulierten Patienten/Gesamtpatientenzahl, in Klammern dahinter: prozentualer Anteil der Proben mit herunterregulierter *SFRP1*-Expression verglichen mit Normalpersonen, ^b *mean* ± *S.E.M.*, ^c n-fache Herunterregulation im Vergleich zu Normalpersonen

Zusammengefasst ergaben die *real-time* RT-PCR-Analysen eine signifikante transkripionelle Herunterregulierung von *SFRP1* sowohl im Knochenmark als auch in den CD34+ Zellen aller IPSS-Risikotypen des MDS sowie in AML und ALL verglichen zu den gesunden Normalpersonen. Diese Datenlage bestätigte somit die Tendenz des *SFRP1*-Expressionsverlaufs der mikroarraygenerierten Datenerhebung.

C.2.2.2 Transkriptionelle Genexpression des WNT-Rezeptors *Frizzled3* (*FZD3*) im MDS und in akuten Leukämien

Um hinsichtlich einer Beteiligung des WNT-Signalweges an der Pathogenese beim MDS funktionelle Zusammenhänge beschreiben zu können, wurde zusätzlich das Genexpressionslevel der WNT-Rezeptorisoform *FZD3* in hämatopoetischen Zellen von MDS-Patienten im Vergleich zu Patienten mit AML und ALL mittels *real-time* RT-PCR evaluiert.

In Zellen des Knochenmarks lagen die relativen Expressionslevel von *FZD3* der Patienten mit *low risk, int-1, int-2* und *high risk* MDS, AML und ALL deutlich höher als in gesunden Normalpersonen (Tab. 28, Abb. 29 A). Im Detail ergaben die *real-time* RT-PCR-Analysen eine statistisch signifikant erhöhte transkripionelle Expression von *FZD3* im Knochenmark von Patienten mit *low risk* (P=0,0385), *int-1* (P=0,0122) und *high risk* MDS (P=0,0132) sowie mit ALL (P=0,496) verglichen mit den Expressionslevel der gesunden Normalpersonen. In Patienten mit *int-2* MDS und AML war *FZD3* zwar deutlich erhöht exprimiert, der Unterschied erreichte jedoch nicht das Level der statistischen Signifikanz. Die resultierende durchschnittliche Hochregulation der *FZD3*-Expression verglichen mit den gesunden Normalpersonen war im Einzelnen wie folgt: 1,91-fach in *low risk*, 2,43-fach in *int-1*, 1,75-fach in *int-2*, 2,82-fach in *high risk* MDS sowie 1,60-fach in AML- und 2,46-fach in ALL-Patienten.

In selektierten CD34+ Zellen war die Expression von *FZD3* in den hohen Risikotypen *int-2* und *high risk* MDS circa 2-fach höher als in den gesunden Normalpersonen, der Unterschied erwies jedoch als nicht statistisch signifikant. Die Expression in den Niedrigrisikotypen *low risk* und *int-1* MDS verhielt sich ähnlich der Expression in den gesunden Normalpersonen (Tab. 28, Abb. 29 B).



Abb. 29: Transkriptionelle Hochregulierung des WNT-Rezeptors *FZD3* (A) in Knochenmarkzellen von Patienten mit *low risk* (n=18), *int-1* (n=27), *int-2* (n=17) und *high risk* MDS (n=14), AML (n=23) und ALL (n=19) sowie (B) in CD34+ Zellen von Patienten mit *low risk* (n=11), *int-1* (n=11), *int-2* (n=10) und *high risk* MDS (n=10). Gesunde Normalpersonen (NP, KM: n=23, CD34+: n=16) dienten jeweils als Kontrollgruppe. Die Expressionlevel wurden mittels semiquantitativer *real-time* RT-PCR bestimmt und auf das Haushaltsgen *GPI* normalisiert. Die Balken geben den Mittelwert ± *standard error of the mean* (S.E.M.) an. Statistische Signifikanz : *P< 0,05, **P < 0,01, *** P < 0,0001.

Tabelle 28 gibt einen Überblick über die Anzahl der untersuchten Patienten, die relative *FZD3*-Expression, über das Vielfache der transkriptionellen Hochregulation sowie zur statistischen Signifikanz. Im Gegensatz zu *SFRP1* konnte kein gradueller Verlauf des Expressionsanstiegs von *FZD3* mit zunehmendem MDS-Risikotyp bis hin zur akuten Leukämie weder im Knochenmark noch in den CD34+ Zellen festgestellt werden.

	Patienten ^a	Bolativo EZD3-	n-facho	P-Wort
	T allement		il lache	i wen
		Expression ^b	Hochregulation ^c	
Knochenmark				
Low risk MDS	n=18	8,29 ± 1,95	1,91	0,0385
Int-1 MDS	n=27	$10,56 \pm 2,14$	2,43	0,0122
Int-2 MDS	n=17	7,61 ± 2,01	1,75	n.s.
High risk MDS	n=14	12,25 ± 3,78	2,82	0,0132
AML	n=23	$6,97 \pm 2,75$	1,60	n.s.
ALL	n=19	10,69 ± 3,38	2,46	0,0496
NP	n=23	$4,33 \pm 0,59$	k.A.	k.A.
CD34+ Zellen				
Low risk MDS	n=11	15,15 ± 3,53	0,82	n.s.
Int -1 MDS	n=11	15,79 ± 6,89	0,85	n.s.
<i>Int -2</i> MDS	n=10	40,86 ± 14,51	2,22	n.s.
High risk MDS	n=10	39,77 ± 14,80	2,16	n.s.
NP	n=16	18,37 ± 3,61	k.A.	k.A.

Tab. 28: Zusammenfassung der *FZD3*-Expressionsdaten in Knochenmark- und CD34+ Zellen: Patientenproben, relative Expressionslevel, transkriptionelle Hochregulation im Vergleich zu gesunden Normalpersonen, Statistische Signifikanz (P-Wert).

k.A: keine Angabe, n.s.: statistisch nicht signifikant, NP: gesunde Normalpersonen, ^a Anzahl der analysierten Patienten, ^b mean \pm S.E.M., ^c n-fache Hochregulation im Vergleich zu Normalpersonen

C.2.3 Untersuchung des SFRP1-Promotors

C.2.3.1 DNA-Methylierung des *SFRP1*-Promotors im MDS

DNA-Promotormethylierung kann einen möglichen Regulationsmechanismus der stark verringerten mRNA-Expression von *SFRP1* im MDS darstellen. Um dies zu überprüfen, wurden die DNA-Methylierungslevel der Promotorregionen 1 und 2 stromaufwärts des Translationsstarts ATG sowohl im Knochenmark als auch in CD34+ Zellen bestimmt. Unter Anwendung der *Pyrosequencing*-Technologie wurde der Methylierungsstatus ausgewählter CpG-Positionen im *SFRP1*-Promotor in allen herunterregulierten MDS-Proben untersucht. Für eine übersichtlichere grafische Darstellung der Ergebnisse wurden die *low risk* und *int-1* MDS-Patienten sowie die *int-2* und *high risk* MDS-Patienten zusammengefasst (KM: *low/int-1 risk* MDS n=38, *int-2/high risk* MDS n=28, NP n=24; CD34+: *low/int-1 risk* MDS n=21, *int-2/high risk* MDS n=18).



Abb. 30: DNA-Promotormethylierung von *SFRP1* im MDS. Die Methylierung der Promotorregion 1 und 2 wurde mittels *Pyrosequencing* in Knochenmark- (A+B) und CD34+ Zellen (C+D) von Patienten mit *low/int-1 risk* und *int-2/high risk* MDS sowie von gesunden Normalpersonen (NP) quantifiziert. Der Methylierungwert einer Probe entspricht der mittleren Methylierung aus 5 CpG-Positionen. Der Methylierungsstatus des *CDKN2B*-Promoters von MDS-Patienten diente als Positivkontrolle (E+F). Hypermethylierung wurde definiert als mittlere Methylierung \geq 15% (gestrichelte Linie).

Die Auswertung der Pyrosequenzierungsdaten zeigte, dass die durchschnittliche mittlere Methylierung der untersuchten Promotorregionen mit steigendem MDS-Risikotyp zunahm. Eine deutliche Promotorhypermethylierung wurde im Knochenmark von nur 4 (6%) Proben für Promoterregion 1 und von 7 (11%) Proben für Promoterregion 2 (Abb. 30 A-B), in selektierten CD34+ Zellen von 5 (12%) Proben für Region 1 und von 2 (5%) Proben für Region 2 (Abb. 30 C-D) detektiert. Der Promotormethylierungsstatus einer Probe wurde als hypermethyliert definiert, wenn die mittlere Methylierung aus 5 analysierten CpG-Positionen ≥ 15% betrug.

Als Positivkontrolle wurde der Methylierungsstatus des *CDKN2B*-Promoter bestimmt, der in 27% der Knochenmarkproben und 33% der CD34+ Proben eine mittlere Methylierung von mehr als 15% und somit Hypermethylierung aufwies (Abb. 30 E-F). Mit diesen Ergebnissen wurde zusätzlich gezeigt, dass vor der Probenentnahme keine Behandlung der Patienten mit demethylierenden Therapeutika stattfand.

Beim Vergleich der Signalstärken der T/C-Polymorphismen der gemessenen CpG-Positionen in den individuellen Pyrogrammen wurde deutlich, dass der Anteil der methylierten Cytosine im untersuchten Promotorbereich der MDS-Patienten ähnlich wie in den Normalpersonen meist nur sehr gering war. Dies spiegelte deutlich eine geringe Methylierung dieser Bereiche wider und wird anhand von Beispielpyrogrammen in Abbildung 31 veranschaulicht.



Abb. 31. Beispielhafte Pyrogramme der DNA-Methylierungsanalysen der *SFRP1*-Promotorregion 2. Pyrogramm eines *high risk* MDS-Patienten (A) und einer gesunden Normalperson (B). Die Y-Achse repräsentiert die Signalstärke, während die X-Achse die Einspritzreihenfolge der Nukleotide angibt. Einzelne CpG-Positionen sind hellgrau gekennzeichnet. Die Methylierungswerte ergeben sich aus dem Anteil der methylierten Cytosine am gesamten Cytosingehalt (T/C-Ratio) und wird in Prozent angegeben. Ein niedriger C-peak (schwarzer Pfeil) weist auf einen geringen Anteil an methylierten Cytosinen hin, ein hoher C-Peak wiederum auf einen erhöhten Anteil an dieser Position.

C.2.3.2 DNA-Methylierung des SFRP1-Promotors in akuten Leukämien

Für eine vergleichende Analyse der *SFRP1*-Promotormethylierung wurde zusätzlich das Knochenmark der AML- und ALL-Patienten untersucht. Im Gegensatz zu den Knochenmarkproben der MDS-Patienten ergaben die *Pyrosequencing*-Analysen der Promotorregion 1 eine starke DNA-Hypermethylierung in 12 (57%) AML- und in 16 (84%) ALL-Patienten (Abb. 32 A). Ähnliche Ergebnisse wurden durch die Analyse der Promotorregion 2 erzielt, wodurch 12 (57%) AML- und 12 (63%) ALL-Proben als hypermethyliert identifiziert wurden (Abb. 32 B).

Die Unterschiede der durchschnittlichen mittleren Methylierung beider untersuchten Promotorregionen waren sowohl in den AML- als auch in den ALL-Knochenmarkproben im Vergleich zu den gesunden Normalpersonen statistisch hochsignifikant ($P \le 0,0001$).



Abb. 32. DNA-Promotormethylierung von *SFRP1* in akuten Leukämien. Die Methylierung der Promotorregion 1 (A) und 2 (B) wurde mittels *Pyrosequencing*-Technik in Knochenmarkzellen von Patienten mit AML und ALL quantifiziert. Der einzelne Methylierungwert entspricht der mittleren Methylierung aus 5 CpG-Positionen. Hypermethylierung wurde als mittlere Methylierung \geq 15% definiert (gestrichelte Linie).

Daraus ergab sich eine deutliche Assoziation der Promotorhypermethylierung mit der transkriptionellen Inaktivierung der *SFRP1*-Expression in AML- und ALL-Patienten. In Abbildung 33 wurde die relative Expression gegen die mittlere Promotormethylierung aufgetragen. Sie zeigt für beide Promotorregionen eine verstärkte Akkumulation von Datenpunkten bei einer relativen Expression zwischen 0 und 1 sowie bei einer mittleren Methylierung über 15%. Das bedeutet, dass in 58% (Region 1) bzw. 66% (Region 2) der untersuchten AML- und ALL-Patienten die Herunterregulation der transkriptionellen *SFRP1*-Expression mit einer DNA-Promotorhypermethylierung assoziiert war. Diese Assoziation besteht in MDS-Patienten nicht.



Abb. 33: Assoziation der verminderten *SFRP1*-Expression mit der Promotorhypermethylierung in Patienten mit AML und ALL (roter Rahmen) dargestellt für Promotorregion 1 (A) und 2 (B).

Abbildung 34 stellt repräsentative Pyrogramme der untersuchten *SFRP1*-Promotorregion 2 eines AML- und ALL-Patienten sowie einer gesunden Normalperson vergleichend dar. Bei der direkten Gegenüberstellung der C-Peakhöhen in den CpG-Positionen der individuellen Pyrogramme wird deutlich, dass der Anteil der methylierten Cytosine im untersuchten Promotorbereich der ALL- und AML-Probe deutlich höher lag als in der Normalpersonen, was eine klare Hypermethylierung dieser Bereiche widerspiegelte. Α





Abb. 34: Beispielhafte Pyrogramme der DNA-Methylierungsanalysen der *SFRP1*-Promotorregion 2 eines ALL-Patienten (A), AML-Patienten (B) und einer gesunden Normalperson (C). Die Y-Achse repräsentiert die Signalstärke, während die X-Achse die Einspritzreihenfolge der Nukleotide angibt. Einzelne CpG-Positionen sind hellblau gekennzeichnet. Die Methylierungswerte ergeben sich aus dem Anteil der methylierten Cytosine am gesamten Cytosingehalt (T/C-Ratio) und wird in Prozent angegeben. Ein niedriger C-peak weist auf einen geringen Anteil an methylierten Cytosinen hin, ein hoher C-Peak wiederum auf einen erhöhten Anteil an dieser Position (schwarze Pfeile).

Abbildung 35 fasst abschließend zusammen, dass in den akuten Leukämien AML und ALL die Intensität der Promotormethylierung und der Anteil der hypermethylierten Proben an der Gesamtkohorte deutlich erhöht war, während nur wenige der untersuchten MDS-Proben eine Promotormethylierung über 15% aufwiesen.



Abb. 35: Überblick *SFRP1*-Promotormethylierung der Region 1 (weiß) und 2 (schwarz) in Knochenmarkproben von Patienten mit *low risk/int-1*, *int-2/ high risk* MDS, AML und ALL im Vergleich zu gesunden Normalpersonen. Dargestellt wurde der prozentuale Anteil der Patienten des jeweiligen mittleren Methylierungsbereichs unterteilt in 0-15%, 16-30%, 31-45% und \geq 46%.

C.2.3.3 Sequenzierung des SFRP1-Promotors der MDS-Patienten

Ein weiterer möglicher Regulationsmechanismus stellen Mutationen innerhalb des Promotors dar, die eine kontinuierliche Expression von *SFRP1* verringern oder sogar verhindern könnten. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurde ein 646 bp großes SFRP1-Fragment, das mitunter den gesamten Promotorbereich überspannte bidirektional sequenziert. Die Analyse der Sequenzen ergab, dass sich keine inaktivierenden Mutationen innerhalb des *SFRP1*-Promotors befinden. In 45 von 72 analysierten MDS-Proben trat jedoch eine polymorphe *in-frame* Deletion aus 3 Nukleotiden (AGC) ab Position +38 stromabwärts des Translationsstarts auf. Von diesen 45 Proben waren 12 homozygot und 33 heterozygot deletiert, was einen Gesamtanteil von 63% der analysierten MDS-Patienten ergab. Die Mutation betrifft die Kodone 13 (GCA) und 14 (GCC), die jeweils die Aminosäure Alanin kodieren. Das resultierende Kodon kodiert ebenfalls Alanin und führt nicht zu einer Leserasterverschiebung (Abb. 36).



Abb. 36: Polymorphe *in-frame* Deletion aus 3 Nukleotiden (AGC) innerhalb des 1. Exons, deren resultierendes Kodon ebenfalls Alanin kodiert (A). Repräsentative Chromatogrammausschnitte der *forward* Sequenzierung eines nicht deletierten, heterozygot deletierten und homozygot deletierten Patienten (B).

Des Weiteren wurden Zusammenhänge zwischen Auftreten bzw. Ausmaß der Deletion (nicht deletiert, heterozygot deletiert und homozygot deletiert), der MDS-Risikogruppe und der *SFRP1*-Expression überprüft. Die Verteilung der Häufigkeiten der heterozygot deletierten, homozygot deletierten und nicht deletierten Proben war bei den *low risk/int1* und *int2/high risk* MDS-Patienten annähernd gleich (Abb. 37 A). Der prozentuale Anteil der heterozygot deletierten, homozygot deletierten sowie nicht deletierten Proben an der jeweiligen Riskogruppe war wie folgt: 49%, 16% und 35% für *low risk/int1* MDS sowie 42%, 16% und 42% für *int2/high risk* MDS. Zudem wurde kein Zusammenhang zwischen der Expressionstärke von *SFRP1*, Heterozygotie, Homozygotie und dem Nichtauftreten der Deletion im jeweiligen MDS-Risikotyp beobachtet (Abb. 37 B).



Abb. 37: Evaluierung der Zusammenhänge zwischen der Häufigkeit des Genotyps der Deletion, der relativen mRNA-Expression und dem Risikotyp der untersuchten MDS-Patienten. Prozentualer Anteil (A) und relative Expression von *SFRP1* (B) der heterozygot, homozygot und nicht-deletierten MDS-Patienten gruppiert nach Risikotyp.

Zusammengefasst hat die Datenanalyse der Sequenzierungen gezeigt, dass keine inaktivierenden Mutationen innerhalb des *SFRP1*-Promotors auftraten. Die nachgewiesene *in frame* Deletion im 1. Exon stellt einen bereits beschriebenen Deletionspolymorphismus (AGC/-/CAG) dar und trat unabhängig vom Risikotyp und vom *SFRP1*-Expressionslevel auftrat. Es wurden keine weiteren Korrelationen zwischen der transkriptionellen Herunterregulierung von *SFRP1*, dem individuellen Genotyp der beschriebenen Deletion und dem MDS-Risikotyp nachgewiesen.

D DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurden das Zelladhäsionsmolekül ALCAM und der WNT-Antagonist SFRP1 untersucht. Nachstehend werden die Resultate der erfolgten Analysen im Einzelnen diskutiert und theoretische Zusammenhänge ihrer Beteiligung an der Pathogenese des MDS vorgestellt.

D.1 ALCAM

Der erste Teil der Arbeit hatte zum einen das Ziel, das Expressionsverhalten von *ALCAM* in primären, hämatopoetischen Zellen von MDS-Patienten unterschiedlichen IPSS-Risikotyps zu validieren. Zum anderen sollte anhand eines Modellzellsystems die funktionelle Rolle von *ALCAM* in der Pathogenese des MDS charakterisiert werden, um *ALCAM* als Schlüsselgen der gestörten Hämatopoese identifizieren zu können.

D.1.1 Genexpression von *ALCAM* in hämatopoetischen Zellen von MDS-Patienten

In der Pathogenese von soliden und hämatologischen Neoplasien spielen Veränderungen auf molekularer Ebene eine entscheidende Rolle. Durch vergleichende Expressionsstudien ausgewählter Gene aus unterschiedlichen Stadien, Gewebe- und Zelltypen der Erkrankungen ließen sich in den vergangenen Jahren signifikante Genexpressionsmuster identifizieren. Dies bildete die Grundlage für die Einteilung und Klassifizierung sowie für die Beurteilung des Krankheitsverlaufs und des Therapieansprechens dieser Malignitäten.

In den letzten Jahren bekam das Zellsdhäsionsmolekül ALCAM zunehmend prognostische Relevanz und wird heute in der Diagnostik und Therapie verschiedener maligner Tumore als Marker verwendet. Eine Reihe von Studien mit geeigneten Immunohistologie, Detektionssystemen wie *in-situ* Hybridisierung, Mikroarray-Hybridisierung und real-time RT-PCR ermöglichten die Erstellung von Genexpressionsprofilen (GEP) und erbrachten Kenntnisse zur Lokalisation des Proteins. Die Genexpressionslevel von ALCAM wiesen in Abhängigkeit vom Tumortyp und dem Progressionsstadium eine starke Heterogenität auf. Anhand von malignen Melanomzellen wurde für ALCAM erstmals eine Beteiligung an der Kanzerogenese nachgewiesen (Swart et al., 2005).

Diskussion

Die Erstellung von differentiellen Genexpressionsprofilen ergab eine deutliche Überexpression von ALCAM in metastasierenden Melanom-Zelllinien. Allerdings waren diese GEP nicht aussagekräftig für die Progression der Erkrankung. Erst immunohistochemische Analysen aller Progressionsstadien, vom "Muttermal" bis zur Metastase, zeigten einen deutlichen Zusammenhang zwischen der Intensität der ALCAM-Expression und dem pathologischen Stadium der Erkrankung. Je fortgeschrittener der Tumor in seiner Entwicklung war, desto höher manifestierte sich die Expression von ALCAM. Mit dieser Korrelation bekam ALCAM diagnostische und prognostische Relevanz bei der Beurteilung von malignen Melanomen (Swart et al., 2005). Im Gegensatz dazu ergaben Studien an Prostatatumoren unterschiedlicher Stadien, dass ALCAM in den meisten low grade Tumoren (Grad 1-3) deutlich überexprimiert war, während es in Tumoren höheren Grades (Grad 4 und 5) auffällig niedrig exprimiert vorlag (Kristiansen et al., 2003). Ähnlich verhielt sich das Expressionsmuster von ALCAM auch in Brustkarzinomen. Während kleinere Tumore und Tumore niedrigeren Grades mit einer höheren Expression von ALCAM assoziiert waren, zeigten sich gehäuft geringe Expressionslevel in hochgradigen, fortgeschrittenen Tumoren mit Metastasenbildung, negativem prognostischen Index und schlechtem klinischem Verlauf. Die prognostische Relevanz betreffend, legten diese Befunde nahe, dass eine reduzierte ALCAM-Expression bei Brustkrebserkrankungen als Indikator für eine schlechte Prognose anzusehen ist (Ofori-Acquah und King, 2008; Kulasingam et al., 2009). In Kolorektalkarzinomen wurde die zytoplasmatische und die membrangebundene Immunoreaktiviät von ALCAM untersucht und festgestellt, dass eine starke membranassoziierte Lokalisation von ALCAM mit einem kürzeren Überleben der Patienten verknüpft war. Eine zytoplasmatische Expression wurde dagegen in frühen Stadien der Erkrankung beobachtet. Diese Studien implizierten, dass eine membranassoziierte Überexpression von ALCAM mit einem fortgeschritteneren Stadium und einer schlechteren Prognose bei Darmtumoren verbunden ist (Weichert et al., 2004). In manifestierten Speiseröhrenkarzinomen, aber auch in Dysplasien früheren dieser Krebseerkrankung, Stadiums wurden erhöhte ALCAM-Expressionlevel nachgewiesen, so dass ALCAM hier eine Rolle bereits bei der frühen Diagnose zuteil wurde (Verma et al., 2005).

Neben seiner adhäsiven Funktion in der Progression solider Tumore übernimmt *ALCAM* eine funktionelle Rolle bei der homophilen Interaktion hämatopoetischer Stammzellen, myeloischer und erythroider Vorläuferzellen und der umgebenen
Stromazellen (Cortes et al., 1999). Dies lässt sehr stark eine Beteiligung von ALCAM an der Entwicklung und Differenzierung hämatopoetischer Zellen (Hämatopoese) vermuten. Jedoch wurden bisher keine funktionellen Untersuchungen und Genexpressionsanalysen zu ALCAM in malignen Neoplasien hämatopoetischen Ursprungs durchgeführt. Einige Hinweise zur Expression gaben Mikroarray-Studien, die ALCAM im Knochenmark von Patienten mit AML identifizierten (Schoch et al., 2002). Erst genomweite Mikroarray-Genexpressionsanalysen von linienspezifischen in-vitro Differenzierungsversuchen von selektierten CD34+ Zellen aus MDS-Patienten identifizierten ALCAM als differentiell exprimiertes Kandidatengen während der Pathogenese des MDS (Gueller et al., 2010a). Gueller et al. stellten fest, dass ALCAM nach erythroider Differenzierung von CD34+ Zellen des MDS-Hochrisikotyps 3-fach überexprimiert vorlag im Gegensatz zu CD34+ Zellen gesunder Probanden. Dies bildete die Grundlage für die vorliegende Arbeit, in der erstmals die Genexpressionslevel von ALCAM in hämatopoetischen Stammzellen bzw. stammzellnahen Zellen (CD34+), erythroiden Progenitorzellen (CD71+), Knochenmark- und Stromazellen von Patienten mit MDS eruiert wurden.

Die durchgeführten mikroarraybasierten Genexpressionsstudien an selektierten CD71+ Vorläuferzellen des Knochenmarks ergaben zunächst ausschließlich einen Expressionanstieg von ALCAM in MDS-Patienten der Hochrisikogruppe (HR-MDS). Die Expression in der Niedrigrisikogruppe (LR-MDS) verhielt sich ähnlich der gesunden Normalpersonen. In den anschließenden, sensitiveren RT-PCR-Studien wurden diese Ergebnisse verifiziert. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Expression der erythroiden, CD71+ Vorläuferzellen des Knochenmarks sowohl in den Patienten der MDS-Hochrisikogruppierung (HR-MDS) als auch in der MDS-Niedrigrisikogruppierung (LR-MDS) 2,5-fach höher lag als in den äquivalenten Zellen der gesunden Probanden. Ein ähnliches Bild ergab die Expressionsanalyse der unselektierten mononukleären Zellen des Vollknochenmarks. In beiden Risikogruppierungen zeigte sich eine statistisch signifikante 2,5- bzw. 2,7-fach höhere Expression als in den gesunden Normalpersonen. Fasst man die Kenntnisse aus den erfolgten Untersuchungen zusammen wird deutlich, dass ALCAM im Vollknochenmark sowie in selektierten erythroiden Vorläuferzellen aus MDS-Patienten verstärkt exprimiert wird. Da die Pathogenese des MDS vor allem während der Erythropoese durch die Reifungsstörung der erythroider Vorläuferzellen zu sauerstoff-transportierenden Erythrozyten gekennzeichnet ist, lassen diese Ergebnisse die Vermutung zu, dass eine übermäßige Expression von *ALCAM* in CD71+ Zellen des Knochenmarks zum klinischen Bild der ineffizienten Erythropoese des MDS beitragen könnte.

In früheren Studien stellte die Arbeitsgruppe um Uchida *et al.* fest, dass das Adhäsionsmolekül HCA, welches identisch zu *ALCAM* ist, von gesunden, hämatopoetischen Stammzellen exprimiert wird (Uchida *et al.*, 1997a). Betrachtet man die Resultate der durchgeführten Expressionsstudien an CD34+ Zellen der vorliegenden Arbeit, konnten zum einen die Beobachtungen von Uchida *et al.* bestätigt und zum anderen sogar ein signifikanter Expressionsanstieg in MDS-Patienten der Hochrisikogruppierung festgestellt werden. Bezugnehmend auf den klinischen Verlauf der Erkrankung könnte dies bedeuten, dass eine verstärkte Expression von *ALCAM* in hämatopoetischen Stammzellen und stammzellnahen Zellen mit einer fortgeschrittenen Pathogenese der höheren MDS-Risikotypen korreliert. Des Weiteren bestätigt dies die Stammzelltheorie des MDS wonach die ineffektive Hämatopoete aus pathogenetischen Ereignissen in den hämatopoetischen Stammzellen resultiert.

Neben den hämatopoetischen Stammzellen enthält das Knochenmark zusätzlich eine Population an mesenchymalen Stammzellen (MSC). Mesenchymale Stammzellen sind bindegewebige Vorläuferzellen, die sich durch Teilung selbst erhalten und verschiedenartig differenzierte Tochterzellen hervorbringen (Osteozyten, Chondrozyten, Myozyten, Fibrozyten und Adipozyten), um so zur Regeneration von verschiedenen Geweben, zum Beispiel der Herzmuskulatur, Leber und Skelettmuskulatur, beizutragen. Erstmals von Bruder et al. wurde ALCAM auf der Oberfläche mesenchymaler Stammzellen nachgewiesen (Bruder et al., 1998). Vermutlich besteht ein funktioneller Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von ALCAM auf ihrer Zelloberfläche und ihrer Fähigkeit, von ihren Nischen aus zu Orten zu wandern, an denen Gewebewachstum stattfindet oder ein Gewebedefekt vorliegt (Chamberlain et al., 2007). Zudem scheint ebenfalls ein Zusammenhang zwischen der ALCAM-Expression mesenchymaler Stammzellen und der Entstehung von bösartigen Tumoren zu bestehen. In Riesenzelltumoren wies ein Großteil der untersuchten Zellen den mesenchymalen Stammzellmarker für ALCAM auf, was einen gesteigerten Anteil an MSC-ähnlichen Zellen im Tumorgewebe suggerierte (Wulling et al., 2003). Diese Beobachtungen an mesenchymalen Stammzellen sowie die Tatsache, dass ALCAM in hämatopoetischen Stammzellen und stammzellnahen Zellen (CD34+ Zellen) der MDS-

Hochrisikogruppierung (HR-MDS) signifikant erhöht war, impliziert ALCAMexprimierenden Zellen mit Stammzellcharakter eine Beteiligung an der Kanzerogenese. Die Differenzierung und Proliferation hämatotopoetischer Stamm- und Progenitorzellen ist eng durch Wachstumsfaktoren, Chemokine und Zelladhäsionsmoleküle reguliert. Zellen des Knochenmarkstromas bilden durch ihre zytoplasmatischen Ausläufer ein stützendes Gerüst, stehen darüber aber auch in direktem Zell-Zell-Kontakt mit hämatopoetischen Zellen und regulieren über die Freisetzung von Wachstumsfaktoren vor allem die Reifung erythrozytärer Zellen (Lichtman, 1984). Alterationen der funktionellen Eigenschaften des Knochenmarkstromas können ursächlich für die fehlerhafte Entwicklung von blutbildenden Zellen beim MDS sein (Tauro et al., 2001). Aufgrund der regulatorischen Relevanz der Stromazellen zieht die Expression von ALCAM im Knochenmarkstroma ein besonderes Interesse auf sich. In gesunden Spendern wurde mittels durchflusszytometrischer Messungen eine hohe Expression von ALCAM an der Zelloberfläche von selektierten Stromazellen detektiert (Cortes et al., 1999). Diese Resultate konnten anhand der in der vorliegenden Arbeit erstellten RT-PCR-basierten Genexpressionsprofile bestätigt werden. Da die Proben aller untersuchten Zelltypen auf ein und dieselbe Probe normalisiert wurden, stehen alle Expressionswerte in Relation zueinander. Das ermöglichte einen quantitativen Vergleich der relativen Expressionsstärken zwischen den Zelltypen. Basierend darauf wurden hohe Expressionslevel von ALCAM sowohl im Stroma der untersuchten gesunden Normalpersonen als auch im Stroma der MDS-Patienten detektiert. Die Expressionslevel der Stromaproben lagen deutlich über denen der Knochenmark-, CD34+ und CD71+ Proben, was die Befunde der bisherigen Studie von Cortes et al. unterstützt. Überraschend war jedoch, dass in der vorliegenden RT-PCR-Evaluierung differentielle Genexpression von ALCAM in den Stromazellen keine der unterschiedlichen Risikogruppierungen des MDS im Vergleich zu den gesunden Probanden vorlag. Die Expressionslevel befanden sich auf einem ähnlich hohen Niveau.

Cortes *et al.* zeigten, dass *ALCAM*-exprimierende Stromazellen durch homophile Zell-Zell-Interaktion sowohl mit selektierten Stromazellen als auch mit CD34+, hämatopoetischen Vorläuferzellen interagierten, was eine Beteiligung von *ALCAM* an der adhäsiven Interaktion von hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen mit dem umgebenen Stroma impliziert. Da jedoch kein abweichendes Expressionsmuster in den Stromazellen der MDS-Patienten zu verzeichnen war, scheint der pathogenetische Einfluß von *ALCAM* vermutlich nicht vom Knochenmarkstroma auszugehen. In Anlehnung an die Untersuchungen der hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen von Cortes *et al.* und Uchida *et al.* lassen die Resultate der vorliegenden Expressionsstudien in den Knochenmark-, den CD34+ sowie den CD71+ Zellen die Vermutung zu, dass eine differentielle Expression von *ALCAM* durchaus in die deregulierten Hämatopoese der myeloischen Reihe involviert sein könnte.

D.1.2 Überexpression von *ALCAM* und sein Einfluss auf das Apoptose- und Proliferationsverhalten von hämatopoetischen Zelllinien

Die Zellproliferation und der "programmierte" Zelltod (Apoptose) bilden in der normalen Hämatopoese gesunder Individuen ein dynamisches Gleichgewicht. Beide Phänomene werden durch eine Vielzahl regulatorischer Prozesse bestimmt. Die Störung dieser Prozesse spiegelt sich in der Entstehung maligner Tumore und hämatologischer Neoplasien wider. Diese Malignitäten sind häufig genetisch instabil und akkumulieren genetische Veränderungen (Hoeijmakers, 2001). Dies kann im weiteren Verlauf zu einem Verlust der Proliferations- und Apoptosekontrolle führen.

Im Gegensatz zu den akuten Leukämien, deren Zelltodsignalwege inhibitorisch gestört sind, ist das MDS unter anderem durch ein gesteigertes Apoptoseverhalten der hämatopoetischen Vorläuferzellen geprägt (Parker und Mufti, 1998; Van de Loosdrecht und Vellenga, 2000). Das betrifft vor allem die erythroiden Vorläuferzellen, dessen frühzeitiger Zelltod zu einer ineffektiven Erythropoese führt. Die genauen Ursachen für die veränderte Apoptose sind nicht vollständig verstanden und sollen hier anhand einiger Beispiele nur kurz erwähnt werden. Man vermutet Defekte in den Stromazellen des Knochenmarks (Raza et al., 1995) oder auch negative Einflüsse von Proteinen der Tumornekrosefaktor-Superfamilie (TNF) und seinen Rezeptoren (Van de Loosdrecht und Vellenga, 2000). In Studien dazu konnte eine gesteigerte Apoptose von MDS-Zellen mit einer erhöhten Menge des Transmembranrezeptors TNFα in mononukleären Zellen des Knochenmark korreliert werden (Raza et al., 1996). Weiterhin konnte eine erhöhte Expression des Transmembranrezeptors FAS (CD95/APO1), der zur selben Superfamilie wie TNFα gehört (Parker und Mufti, 1998; Fontenay-Roupie *et al.*, 1999), des Wildtyp-P53 (Kurotaki et al., 2000) und des Onkogens C-MYC (Rajapaksa et al., 1996) im Knochenmark von MDS-Patienten detektiert werden, was mit einer erhöhten Caspaseaktivität und Apoptose einher ging. Andere Autoren haben veränderte Mengen regulatorischer Zytokine wie beispielsweise Interleukin-1- β (IL1- β), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8), SCF und GM-CSF in Serum oder Knochenmark von MDS-Patienten

identifiziert (Bowen *et al.*, 1993; Maurer *et al.*, 1993; Visani *et al.*, 1993). Zudem scheint die leukämische Progression auch mit einem reduzierten Verhältnis von proapoptotischen (Bax, Bad) zu anti-apoptotischen (Bcl-2, Bcl-XL) Proteinen verknüpft zu sein (Parker und Mufti, 2000).

Anhand der Erythroleukämie-Zelllinie HEL als Modellsystem für die Charakterisierung der pathogenetischen Progression des MDS konnte in den vorliegenden Apoptosestudien ein erhöhter Zelltod der *ALCAM*-überexprimierenden HEL-Zellen beobachtet werden. Die Daten weisen eindeutig darauf hin, dass *ALCAM* die Apoptose erythroleukämischer Zellen fördernd beeinflusst, was dem Zelladhäsionsprotein eine funktionelle Rolle beim MDS impliziert.

Die Regulation des Zellwachstums bildet ein Gleichgewicht aus Apoptose und Zellproliferation. Dieser Prozess umfasst das kontrollierte Durchlaufen der Zelle durch die 4 definierten, klar voneinander abgegrenzten Phasen des Zellzyklus (G1-, S-, G0und M-Phase). Ein Verlust der Proliferationskontrolle durch Deregulation von Wachstumsfaktoren oder Kontrollgenen ist unter anderem ursächlich für das unkontrollierte Zellwachstum von malignen Tumoren. Neben den soliden Tumoren sind auch hämatologische Neoplasien durch eine unkontrollierte Zellteilung unreifer hämatopoetischer Zellen (Blasten) der myeloischen Differenzierungslinien gekennzeichnet. So nimmt man an, dass im MDS eine erhöhte Zellteilung die exessive Apoptoserate partial kompensiert, wobei die hohe apoptotische Aktivität das Niveau der Proliferation in den individuellen MDS-Subtypen stets übersteigt (Parker et al., 2000). Untersuchungen dazu haben gezeigt, dass die Apoptose/Proliferation-Ratio untersuchter CD34+ Zellen aus frühen MDS-Stadien (RA/RARS) bei größer 2 lag und mit steigendem Subtyp abnahm (Parker und Mufti, 2000). In der vorliegenden Arbeit konnten unter Verwendung des Proliferationsreagenz WST1 über die Aktivität der vitaler Zellen Rückschlüsse das Atmungskette auf proliferative Verhalten zellteilungsaktiver leukämischer Zellen gezogen werden. Entgegen den theoretischen Erwartungen wurde ein vermindertes Zellwachstum ALCAM-überexprimierender Zellen der Modellzelllinie HEL detektiert. Demnach kann man vermuten, dass die erhöhte Apoptoserate die Zellexpansion derart übersteigt, dass sich das Gesamtwachstum der Versuchskultur verminderte, was in Anlehnung an die Biologie des MDS theoretisch den Phänotyp des hypoplastischen MDS erklären könnte. Patienten mit hypoplastischem/-zellulärem MDS (h-MDS) repräsentieren eine kleine aber signifikante

Patientengruppe (circa 10%) innerhalb der myelodysplastischen Erkrankungen (Bennett und Orazi, 2009). Das bedeutet, dass im Gegensatz zu Patienten mit typischerweise hyperzellulären oder normozellulären Knochenmark Patienten mit hypozellulärem MDS eine Knochenmarkzellularität von weniger als 30% aufweisen. Dieser Erkrankungstypus ist häufig mit dem Auftreten von Bi- oder Panzytopenien zum Diagnosezeitpunkt assoziiert. Studien an MDS-Patienten haben gezeigt, dass hypozelluläres Knochenmark mit einer verstärkten intramedullaren Apoptose korreliert (Goyal *et al.*, 1999). Bezugnehmend darauf und unter Berücksichtigung der Tatsache, dass HEL als Modellzelllinie zur funktionellen Charakterisierung von *ALCAM* verwendet wurde, sprechen die dargestellten Resultate der Apoptose- und Proliferationsstudien für eine Beteiligung des Zelladhäsionmoleküls an der Dysregulation der Hämatopoese beim MDS.

D.1.3 Die Bedeutung von *ALCAM* für die Differenzierung von humanen Erythroleukämie-Zellen

Wie bereits erwähnt, ist das Auftreten von Zytopenien aller 3 Zellreihen des Blutes charakteristisch für das Erkrankungsbild von MDS-Patienten. Die Verminderung an differenzierten Zellen der jeweiligen Reihe ist auf ein reduziertes Ansprechen der jeweiligen myeloischen Vorläuferzellen auf seine physiologischen Wachstums- und Differenzierungssignale zurückzuführen (Merchav *et al.*, 1991). Beim MDS resultiert dies in einer ineffektiven Hämatopoese, die vor allem die erythroide Linie betrifft.

Die Ursachen der Dyserythropoese liegen unter anderem in einer erhöhten Apoptose, in Defekten des Wachstums sowie in einer abnormalen Differenzierung der erythroiden Vorläuferzellen begründet. Diese Wachstumsdefekte betreffen die Vorläuferzellen schon in der frühen Phase der Entwicklung, so dass sie zwar unreife Blasten bilden, jedoch nicht zu reifen Erythrozyten ausdifferenzieren können (Claessens et al., 2002). In-vitro Differenzierungsversuche früherer Arbeiten haben gezeigt, dass nach Stimulation mit Erythropoetin CD34+ Zellen aus dem Knochenmark von MDS-Patienten signifikant weniger Kolonien (BFU-E) in semisolidem Kulturmedium bildeten als die Kontrollgruppen. Innerhalb dieser Studie wurde ebenfalls festgestellt, dass die Differenzierungsstörung mit einer erhöhten Apoptose dieser Zellen korrelierte (Claessens et al., 2002). In anderen in-vitro Studien wurde eine veränderte Koloniebildung nach linienspezifischer Differenzierung hämatopoetischer Vorläuferzellen aus MDS-Patienten in Abhängigkeit vom individuellen klinischen

Erkrankungsbild beobachtet. Dabei zeigte sich, dass MDS-Patienten mit normalem BFU-E-Wachstum eine deutlich bessere Prognose für den klinischen Verlauf der Erkrankung zu erwarten hatten als Patienten mit abnormalem Wachstumsmuster (Juvonen *et al.*, 1999).

Die vorliegende Arbeit beinhaltet *in-vitro* Studien zur Erfassung des Einflusses von *ALCAM* auf das Wachstums- und Differenzierungsverhalten der Erythroleukämie-Zelllinie HEL. Das verwendete Modellsystem sollte Informationen zur Beteiligung von *ALCAM* an der ineffektiven Erythropoese beim MDS liefern. Die Quantifizierung der Zellpopulationen der *in-vitro* differenzierten Kulturen zeigten, dass die Zellen der *ALCAM*-überexprimierenden Population (HEL-VA) im Vergleich zu untransfizierten HEL-Zellen und Zellen der Vektorkontrolle HEL-VCo eine deutlich verminderte Zahl an BFU-E-bildenden Einheiten aufwies, was eine erythroide Differenzierungs- und Wachstumsstörung durch die vorliegende *ALCAM*-Überexpression widerspigeln könnte. Das verminderte Koloniewachstum der HEL-VA-Zellen korreliert mit den Resultaten der vorliegenden Apoptose- und Proliferationsstudien, die ein dysreguliertes Zellwachstum der *ALCAM*-überexprimierenden Zellen zeigten.

Im Gegensatz dazu stehen die anschließend durchgeführten durchflusszytometrischen Untersuchungen der verschiedenen HEL-Zellpopulationen zur Quantifizierung der CD71- und Glycopherin A-positiven Anteile. CD71 ist ein Oberflächenprotein des Transferrin-Rezeptors, das hämoglobinsynthetisierende unreife Vorstufen der Erythrozyten und Retikulozyten, nicht jedoch reife Erythrozyten kennzeichnet. Reife Erythrozyten werden durch das Oberflächenprotein CD235a (Glycopherin A) dargestellt. Nach Stimulation mit Erythropoetin veränderte sich der Anteil der Zellen der jeweiligen Differenzierungsstufe unter den angegebenen Konditionen nur marginal. Vermutlich ist das ausbleibende Ansprechen der Zellen auf den Differenzierungsstimulus mit der Zusammensetzung der Zytokine des in-vitro Experiments zu begründen. Dennoch könnte die geringfügige Verminderung der Glycopherin A+ Zellpopulation der HEL-VA-Zellen möglicherweise auf eine Störung in der Ausreifung erythroider Zellen bedingt durch die Überexpression von ALCAM hinweisen.

Ein vermindertes Koloniewachstum der *ALCAM*-überexprimierenden Zellen könnte das klinische Merkmal der ineffizienten Erythropoese von MDS-Patienten widerspiegeln, die durch Defekte der Zellproliferation und -differenzierung der erythroiden Linie begünstigt

wird (Hofmann und Koeffler, 2002). Um diese Aussage jedoch bestätigen zu können, bedarf es einer Optimierung der verwendeten Differenzierungskonditionen des *in-vitro* Modellsystems.

D.1.4 Mögliche funktionelle Rolle von ALCAM in der Pathogenese des MDS

Aus den dargestellten Resultaten der vorliegenden Arbeit lässt sich ein hypothetisches Modell zum Einfluss von *ALCAM* auf die Hämatopoese beim MDS ableiten. Dieser Zusammenhang wird nachstehend theoretisch erläutert.

MDS um eine klonale Wie bereits beschrieben handelt es sich beim Knochenmarkerkrankung, die vermutlich von mehreren genetischen und epigenetischen Veränderungen der hämatopoetischen Stammzellen ausgeht. Man nimmt an, dass sowohl genetisch bedingte als auch exogene Faktoren an der schrittweisen Entwicklung des MDS beteiligt sind. Nach einem initialen Ereignis der Stammzellschädigung tragen sekundäre Veränderungen dazu bei, dass die genetisch instabilen Zellen klonal expandieren können. Mit fortschreitendem Verlauf der Erkrankung kommt es zu weiteren genetischen Veränderungen. Man könnte demnach die Vermutung aufstellen, dass beim MDS regulatorische Mechanismen der ALCAM-Expression durch verschiedene genetische Ereignisse gestört sind, so dass es zu einer konstitutiven Überexpression von ALCAM in der Zelle kommt. Zieht man die ALCAM-Expressionsdaten der CD34+ Zellen hinzu, scheint das initiale Ereignis der Regulationsstörung der ALCAM-Expression in den CD34+ Zellen, also in den hämatopoetischen Stammzellen und stammzellnahen Zellen des Knochenmarks, stattzufinden. Beim Vergleich der Expressionsdaten wird deutlich, dass ALCAM in den Zellen der Niedrigrisiko-Patienten ein ähnliches Expressionslevel wie in den gesunden Normalpersonen aufwies, während in der Hochrisikogruppierung die Expression deutlich erhöht war. Das könnte also bedeuten, dass erst mit fortschreitendem Krankheitsverlauf und zunehmendem Sub-/Risikotypus eine Überexpression in den hämatopoetischen Stammzellen und stammzellnahen Zellen auftritt. In den CD71+ Zellen war die Expression von ALCAM in beiden Risikogruppierungen auf einem ähnlichen Level mehrfach erhöht. Dies spricht abermals für genetische Ereignisse ausgehend von den CD34+ Zellen des Knochenmarks. Dennoch stellt sich die Frage, warum ALCAM in den CD34+ Zellen der Niedrigrisikogruppierung ALCAM nicht aberrant exprimiert wird. Dies lässt sich vermutlich dadurch erklären, dass die genetischen Veränderungen der hämatopoetischen Stammzellen im frühen Stadium der

verschiedene Erkrankung geringfügig sind und möglicherweise durch Regulationsmechanismen kompensiert werden können. Ausgehend von der "Two Hits"-Theorie von Knudson führt erst ein homozygotes genetisches Ereignis zu einem veränderten Phänotyp. Das heißt, erst durch die Akkumulation weiterer genetischer "Hits" kommt es zur Progression der Erkrankung, die sich klinisch in höheren Sub-/Risikotypen widerspiegelt. Demnach könnten erst weitere genetische Ereignisse die Kompensation vermutlicher Regulationsstörungen der ALCAM-Expression aufheben oder beide Allele eines regulatorischen Gens für ALCAM pathogenetisch verändern. Dies könnte zur konstitutiven Überexpression von ALCAM in CD34+ Zellen der hohen Risikotypen führen. Die Vermutung, dass die genetische Fehlregulation von ALCAM von den hämatopoetischen Stammzellen oder stammzellnahen Zellen ausgeht, würde die Theorie der Stammzellerkrankung für das MDS unterstützen.

Ein weiterer Gesichtspunkt spricht dafür, dass die Alteration der Expression und der daraus resultierende funktionelle Einfluß von ALCAM auf die Hämatopoese von der Stufe der hämatopoetischen Stammzellen ausgehen könnten. Das Expressionslevel von ALCAM in den Stromazellen erwies sich als ähnlich dem der gesunden Normalpersonen. Deshalb scheint der Einfluss einer Überexpression von ALCAM nicht von der Ebene der Stromazellen auszugehen. Eine normale Versorgung mit Wachstumsfaktoren durch homophile ALCAM-vermittelte Zell-Zell-Interaktion der hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen wäre von seiten der Stromazellen gewährleistet. Diese Zell-Zell-Adhäsion kann aber vermutlich durch eine verstärkte Expression von ALCAM nicht seitens der hämatopoetischen Stammund Progenitorzellen aufrecht erhalten werden, so dass die Versorgung durch das umgebene Stroma verändert und somit die weitere Differenzierung zu blutbildenden Zellen gestört ist. Final könnte dies in einer erhöhten Apoptoserate hämatopoetischer Vorläuferzellen resultieren, wie anhand der genetisch modifizierten HEL-Zelllinie als Modellzellsystem gezeigt wurde.

Welche regulatorischen Gene dabei betroffen sind, bleibt zu klären. Bisher geben nur wenige Studien Auskunft zur transkriptionellen Regulation von *ALCAM*. Der Promotor ist reich an GC-Boxen und enthält verschiedene positiv und negativ wirkende regulatorische Abschnitte wie beispielsweise DNA-Bindungsstellen für die Transkritptionsfaktoren Nukleofaktor-Kappa B (NF-κB) und Aktivatorprotein-1 (AP-1) (Ofori-Acquah und King, 2008). Bei NF-κB handelt es sich nicht um ein einzelnes Protein, sondern um verschiedene Proteine, deren gemeinsames Kennzeichen die

sogenannte Rel-Homologie-Domäne ist. Zu den NF-Kappa B-Elementen zählen unter anderem die Rel-Proteine c-rel und v-rel, die nachweislich die *ALCAM*-Expression in Lymphom-Zelllinien aus Vögeln erhöhten (Zhang *et al.*, 1995). *High risk* MDS und auch AML sind unter anderem durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktor NF-κB gekennzeichnet (Grosjean-Raillard *et al.*, 2008), so dass eine Überexpression von *ALCAM* durch NF-κB theoretisch möglich scheint. Weiterhin wurde eine negativregulatorische Rolle von *cis*-Elementen für das Aktivatorprotein-1 (AP-1) im *ALCAM*-Gen festgestellt. Dabei zeigte sich, dass eine verstärkte Expression des *FOS*-ähnlichen Antigens 2 (*FRA-2*), ein Mitglied der AP-1-Familie, die Expression von *ALCAM* deutlich verminderte (Ofori-Acquah und King, 2008). Dementsprechend könnte eine Inhibierung von *FRA-2* zum Beispiel durch Mutation zu einer Überexpression von *ALCAM* führen. Gegenwärtig ist jedoch im MDS nichts darüber bekannt, so dass diese Vermutung rein hypothetisch bleibt.

Ob die verstärkte Expression von *ALCAM* die homophile Zell-Zell-Interaktion der hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen inhibierend beeinflusst oder ob durch eine verstärkte *ALCAM*-vermittelte Zelladhäsion Differenzierungs- und Entwicklungprozesse der hämatopoetischen Zellen gestört werden und wie die Mechanismen der Störung aussehen könnten, sind einige Fragen, die in weiterführenden Arbeiten zu klären wären.

Ziel des ersten Teils dieser Arbeit war die funktionelle Charakterisierung des Zelladhäsionsmoleküls *ALCAM* beim MDS. Zunächst wurden Genexpressionsanalysen in primären Zellen von MDS-Patienten unterschiedlichen Risikotyps durchgeführt, die *ALCAM* als Schlüsselgen in der Pathogenese des MDS identifizierten. Anschließend erfolgte die Etablierung eines humanen Modellzellsystems, das die Evaluierung einer potentiellen Rolle von *ALCAM* bei der Entstehung des MDS ermöglichen und Informationen zur Bedeutung von *ALCAM* hinsichtlich des Apoptose-, Proliferations- und Differenzierungsverhaltens im Falle der Überexpression liefern sollte. Generell fehlt es jedoch an geeigneten MDS-Modellzelllinien, um die Pathogenese des MDS experimentell ergründen zu können. Dementsprechend wurde auf die leukämischen Zelllinien HEL, K562 und U937 zurückgegriffen. Die Zelllinien K562 und U937 zeigten keinerlei Effekte der *ALCAM*-Überexpression. Bei der Zelllinie HEL handelt es sich um eine humane Erythroleukämie-Zelllinie, die einige Aspekte der MDS-Erkrankung widerspiegelt. Da beim MDS weitestgehend die Entwicklung der "roten" Linie betroffen

ist, schien diese Zelllinie für die Modelletablierung am geeignetesten zu sein. Anhand dieses Modellsystems konnte gezeigt werden, dass ALCAM das apoptotische Verhalten dieser Zellen begünstigt. Ein Einfluss auf die Proliferation und das Differenzierungsverhalten konnte vermutet, jedoch nicht eindeutig bewiesen werden. Die aus den Ergebnissen gezogenen Rückschlüsse wurden oft sehr hypothetisch erläutert, sollten aber mögliche funktionelle Zusammenhänge anregen. Demnach bleibt Bestandteil weiterer Arbeiten eine fundierte Verifizierung anhand geeigneter Modellsysteme wie beispielsweise an primären CD34+ Zellen, deren vektorbedingte ALCAM-Überexpression weitere Aufklärung zur Enstehung des Myelodysplastischen Syndroms ermöglichen soll.

D.2 SFRP1

Der zweite Teil der Arbeit umfasste zum einen die Genexpressionsanalysen primärer Zellen hinsichtlich des Expressionsverhaltens insbesondere des WNT-Antagonisten *SFRP1* sowie der WNT-Rezeptoren FZD, der WNT-Liganden und ausgewählter WNT-Signalweg-assoziierter Gene. Zum anderen wurde die Regulation der Genexpression von *SFRP1* in MDS-Patienten unterschiedlichen Risikotyps untersucht. Die Datenanalyse erfolgte im Vergleich zu gesunden Normalpersonen sowie zu Patienten mit AML und ALL. Obwohl bereits Studien zur Genexpression und DNA-Promotormethylierung von *SFRP1* in akuten Leukämien existieren, wurde hier erstmals die Technik der Pyrosequenzierung angewendet, um publizierte Promotormethylierungsdaten zu validieren.

D.2.1 Genexpression von SFRP1 im MDS und in akuten Leukämien

Obwohl bereits eine transkriptionelle Herunterregulation von *SFRP1* in einer Reihe von soliden Tumoren wie Gebärmutterhals- (Ko *et al.*, 2002), Brust- (Ugolini *et al.*, 2001), Eierstock- und Nierenkarzinomen (Zhou *et al.*, 1998) sowie in verschiedenen hämatologischen Malignitäten beschrieben wurde, lagen bisher keine Daten einer detaillierten Expressionsanalyse von *SFRP1* in hämatopoetischen Zellen aus Patienten mit MDS vor. Erstmals in der vorliegenden Arbeit wurde das Expressionsverhalten von *SFRP1* in MDS-Patienten unterschiedlichen IPSS-Risikotyps validiert. Die mikroarraybasierte Genexpressionsanalyse ermöglichte die Identifizierung von *SFRP1* als potentielles Kandidatengen in der pathogenetischen Entwicklung des MDS. Die

Daten zeigten, dass SFRP1 sowohl im Knochenmark als auch in CD34+ Zellen differentiell exprimiert wurde und im Vergleich zu gesunden Normalpersonen eine verminderte Expression aufwies. Diese Tendenz des Expressionsverhaltens von SFRP1 im MDS wurde anhand von real-time RT-PCR-Analysen manifestiert, die eine signifikante, transkriptionelle Herunterregulierung von SFRP1 im Knochenmark und in selektierten CD4+ Zellen aus MDS-Patienten unterschiedlichen IPSS-Risikotyps ergaben. Mit steigendem Risikotyp wurde eine sukzessive Verminderung des Expressionslevels beoachtet. Das bedeutet, dass sich in high risk MDS-Patienten eine deutlich stärkere Abnahme der relativen Expression als in low risk MDS-Patienten zeigte. Die Genexpression in Knochenmarkzellen zeigte sogar einen graduellen Verlauf, wobei das Level ausgehend von normalen Zellen, hin zu Zellen aus low risk MDS-Patienten und high risk MDS-Zellen und schließlich zu Zellen aus Patienten mit akuter Leukämie abnahm. Die Expressionsabnahme von SFRP1 in AML- und ALL-Patienten war ebenfalls statistisch hochsignifikant, was die Ergebnisse kürzlich publizierter Studien an ALL und AML bestätigte (Roman-Gomez et al., 2007; Jost et al., 2008). Eine stark verminderte Expression von SFRP1 scheint somit nicht nur in verschiedenen soliden Tumoren mit der Malignität der Erkrankung assoziiert zu sein, sondern auch ein gemeinsames Merkmal innerhalb der hämatologischen Neoplasien. SFRP1 könnte also durch die sukzessive Abnahme seiner Expression mit steigendem IPSS-Risikotyp diagnostische und prognostische Relevanz als Marker für das klinische Bild und die Prädikation des Krankheitsverlaufs des MDS bis hin zur Transformation in eine AML erlangen.

Anhand der RT-PCR-Expressionsstudien konnte erstmals gezeigt werden, dass die transkriptionelle Expression von *SFRP1* im MDS ähnlich wie in verschiedenen anderen humanen Neoplasien im Vergleich zu gesunden Personen deutlich vermindert vorliegt, was eine potentielle Involvierung in die aberrante Aktivierung des WNT-Signalweges vermuten läßt.

D.2.2 Regulationsmechanismen der Genexpression von *SFRP1* im MDS im Vergleich zu akuten Leukämien

In der Vergangenheit haben eine Reihe von Studien an verschiedenen soliden Tumoren und auch hämatologischen Neoplasien gezeigt, dass das *gene silencing* von *SFRP1* epigenetisch durch DNA-Hypermethylierung seines Promotors reguliert wird. Beispielsweise in Brust- (Lo *et al.*, 2006), Bauchspeicheldrüsen- (Bu *et al.*, 2008) und

Magenkrebs (Zhao *et al.*, 2007) wurde nachgewiesen, dass zum einen die Expression von *SFRP1* in den malignen Geweben im Vergleich zu gesunden Organen signifikant herunterreguliert war und zum anderen, dass diese verminderte Expression mit einer starken Hypermethylierung des *SFRP1*-Promotors assoziiert vorlag. Diese Assoziation besteht ebenfalls in Leukämien, wie in bereits publizierten Arbeiten an AML- (Valencia *et al.*, 2009), CLL- (Liu *et al.*, 2006) und ALL-Patienten (Roman-Gomez *et al.*, 2007) beschrieben wurde. Aus all diesen Beoachtungen etablierte sich die funktionelle Rolle von *SFRP1* als Tumorsuppressor, was dem Gen in der Diagnostik und Prognosik maligner Neoplasien klinische Relevanz als Marker verlieh.

In weiteren molekularbiologischen Untersuchungen hämatopoetischer Zellen von AML-Patienten, deren SFRP1-Promotor deutlich hypermethyliert war, wurde eine erhöhte Expression der Transkriptionsfakoren TCF1 und LEF1 sowie des WNT-Zielgens CCND1 (Cyclin D1) im Vergleich zur Expression des nicht-methylierten Patientenkollektivs festgestellt. Innerhalb dieser Studien wurden AML- und ALL-Zelllinien, deren SFRP1-Expression epigenetisch herunterreguliert war, mit dem demethylierenden Agenz 5`-Aza-2`-Desoxycytidin behandelt. Anschließend konnte eine Induktion der Re-expression von SFRP1, eine Reduktion des dephosphorylierten β-Catenins sowie eine Repression dieser Signalwegkomponenten beobachtet werden (Roman-Gomez et al., 2007; Jost et al., 2008; Valencia et al., 2009). Diese Beobachtungen implizierten sehr stark, dass durch Demethylierung des SFRP1-Promotors eine Inaktivierung des WNT-Signalweges induziert wurde (Valencia et al., 2009). Somit trugen diese Studien repräsentativ zur Charakterisierung von SFRP1 bei und wiesen nach. dass epigenetisches Silencing von SFRP1 durch Promotorhypermethylierung zur aberranten Aktivierung des WNT-Signalweges führt, wodurch für SFRP1 eine Beteiligung von an der Leukämogenese angenommen werden kann.

Die in der vorliegenden Arbeit dargelegten *Pyrocequencing*-basierten DNA-Methylierungsanalysen der Region 1 des *SFRP1*-Promotors ergaben eine exzessive Promotorhypermethylierung in 57% der AML- und 84% der ALL-Knochenmarkproben. Diese Ergebnisse konnten durch die Untersuchung einer zweiten Promotorregion bestätigt werden (AML: 57%, ALL: 63%). Zudem konnte eine Assoziation der Promotorhypermethylierung mit der verminderten Expression von *SFRP1* dargestellt werden, was mit vorangegangenen Studien an verschiedenen anderen Malignitäten

konform geht. Die kürzlich publizierten Ergebnisse der Studien an akuten Leukämien von Jost *et al.* und Roman-Gomez *et al.* konnten somit durch die dargelegten Daten bestätigt werden. Anders als in der vorliegenden Arbeit wurde in diesen Arbeiten zur Detektion des Methylierungsstatus des *SFRP1*-Promotors von Patienten mit AML und ALL die Technik der Methylierungsspezifischen PCR (MSP) angewendet. Mittels dieser Untersuchungsmethode wurde im Knochenmark eine Hypermethylierung des *SFRP1*-Promotors in 29% der untersuchten AML-Patienten und in 38% der ALL-Patienten detektiert. Anhand der hier angewandten *Pyrosequencing*-Technik konnte nicht nur die Hypermethylierung des *SFRP1*-Promotors als epigenetischer Regulationsmechanismus der Expression bestätigt, sondern zudem eine exaktere Quantifizierung der Promotormethylierung in akuten Leukämien vorgenommen werden.

Über mögliche Regulationsmechanismen wie DNA-Hypermethylierung des Promotors sowie dessen Assoziation mit der *SFRP1*-Herunterregulation existierten bisher keine publizierten Studien an Patienten mit MDS. Erstmals in der vorliegenden Arbeit wurden DNA-Methylierungs- und Mutationsanalysen im *SFRP1*-Promotor durchgeführt, um 2 mögliche Mechanismen der Genexpressionsregulation von *SFRP1* im MDS zu untersuchen.

Obwohl die durchschnittliche mittlere Promotormethylierung im Knochenmark und in CD34+ Zellen mit steigendem MDS-Risikotyp zunahm, fand eine frequente Hypermethylierung des SFRP1-Promotors ähnlich wie in den akuten Leukämien im MDS nicht statt. Demethylierung der analysierten DNA-Proben durch die Behandlung der MDS-Patienten mit demethylierenden Agenzien wie 5`-Azacytidine oder 5`-Aza-2`-Desoxycytidin (Decitabine) im Rahmen einer bereits begonnenen Therapie konnte ausgeschlossen werden. Zum einen wurden alle Knochenmarkaspirationen nachweislich zum Zeitpunkt der Erstdiagnose durchgeführt, zum anderen ergab sich der Ausschluss über die nachgewiesene Hypermethylierung des CDKN2B-Promotors als Positivkontrolle. In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass die Hypermethylierung des CDKN2B-Promoters ein häufiges Ereignis in der Pathogenese des MDS ist (Uchida et al., 1997b). In Konkordanz mit diesem Ergebnis wiesen 27% der Knochenmarkproben MDS-Patienten und 33% der CD34+ Proben der untersuchten CDKN2-Promotorhypermethylierung Demnach ist die fehlende SFRP1auf. Promotormethylierung nicht auf die Behandlung der MDS-Patienten mit demethylierenden Therapeutika zurückzuführen.

Obwohl eine signifikante Herunterregulation der SFRP1-Expression im MDS detektiert wurde, korrelierte diese nicht mit einer konstitutiven Hypermethylierung seines Promotors. Möglicherweise steht die SFRP1-Herunterregulation mit anderen epigentischen Mechanismen wie beispielsweise Histonmethylierung oder Histon-Deacetylierung im Zusammenhang. Der Vorgang der Histon-Deacetylierung stabilisiert die Chromatin-struktur der DNA, was zur Kondensation des Chromatins und dadurch zur Transkriptionsrepression führt. Im Gegensatz dazu bewirkt Histon-Acetylierung die Auflockerung der Chromatinstruktur, so dass die Transkriptionsmaschinerie an Promotoren der Zielgene binden und deren Expression aktivieren kann (Ropero und Esteller, 2007). In Studien an Brustkarzinomen wurde festgestellt, dass die SFRP1-Expression in einigen Patientenproben stark vermindert oder sogar absent war, der SFRP1-Promotor dagegen aber keine detektierbare Hypermethylierung aufwies. Dies wurde auch in der Brustkrebs-Zelllinie SKBR3 beobachtet. Behandelte man diese Zelllinie mit dem Histon-Deacetylase-Inhibitor Trichostatin A (TSA) konnte eine Restoration der SFRP1-Expression detektiert werden (Lo et al., 2006). Histon-Deacetylase-Inhibitoren hemmen dabei die biologische Funktion der Histon-Deacetylasen, wodurch die Re-expression einer Reihe von tumorrelevanten Genen wie Tumorsuppressorgene induziert wird (Pruitt et al., 2006). Die epigenetische Regulation der Genexpression durch Histon-Deacetylierung ist ein häufiges Ereignis in der Pathogenese des MDS, weshalb der therapeutische Einsatz von HDAC-Inhibitoren oft Anwendung in der Behandlung von MDS-Patienten findet (Nolte und Hofmann, 2008). dass Diese Erkenntnisse lassen die Vermutung zu, ein epigenetischer Modifikationsmechanismus unabhängig von dem der DNA-Methylierung in die Regulation der SFRP1-Expression im MDS theoretisch involviert sein könnte.

Neben dem WNT-Signalweg spielt unter anderem der Hegdehog-Signalweg eine entscheidene Rolle in der Kanzerogenese. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass der Hedgehog-Signalweg in die Inhibierung des WNT-Signalweges involviert ist (Katoh und Katoh, 2006a). Diesen Kenntnissen zufolge sind beide Signalwege in einem interagierenden Netzwerk miteinander verknüpft. Die Transkription des Gliomaassoziierten Hedgehog-Onkogens GLI aktiviert die Expression einer Reihe von Hedgehog-Zielgenen. SFRP1 wurde als eines dieser Zielgene identifiziert. Die GLIabhängige Transkription von SFRP1 könnte somit einen weiteren Regulationsmechanismus für die Inhibierung der SFRP1-Expression im MDS darstellen. In gesunden intestinalen Stamm- und Progenitorzellen aktivierte die Bindung der GLI-

Transkriptionsfaktoren die Genexpression von *SFRP1*, was inhibitorische Effekte auf den kanonischen WNT-Signalweg nach sich zog (Katoh und Katoh, 2006a; Katoh und Katoh, 2006b). Ein Zusammenbruch der Hedgehog-abhängigen Transkription von *SFRP1* könnte theoretisch zur Aufhebung dieser inhibitorischen Effekte führen und in einer Re-aktivierung des WNT-Signalweges resultieren.

Zusätzlich wurde in der vorliegenden Arbeit ein 646 bp großes SFRP1-Fragment bidirektional sequenziert, um Mutationen innerhalb des Promotors zu identifizieren, die möglicherweise eine transkriptionelle Herunterregulation von SFRP1 im MDS verursachen. Es wurden jedoch keine inaktivierenden Mutationen im SFRP1-Promotor der untersuchten MDS-Patienten detektiert. Lediglich eine Deletion aus 3 Nukleotiden (AGC) stromabwärts des Translationsstarts wurde in 63% (45 von 72) der untersuchten MDS-Patienten beobachtet. Dabei handelte es sich jedoch um einen bereits beschriebenen Deletionspolymorphismus (AGC/-/CAG). In einer kürzlich veröffentlichten Studie wiesen 50 % (24 von 48) der Patienten mit einer Chronischen Myeloischen Leukämie (CML) diese Deletion auf (Pehlivan et al., 2009), bei der das 13. und 14. Kodon für die Aminosäure Alanin betroffen waren. Das aus der Deletion resultierende Kodon kodiert ebenfalls Alanin, so dass der Leserahmen unverändert blieb und die Deletion somit keine Leseraster- oder gar missense Mutation darstellte. Die Proteinsynthese von SFRP1 wird folglich nicht inhibierend beeinflusst. Durch diese Untersuchungen konnten Mutationen innerhalb des Promotors als möglicher Regulationsmechanismus der SFRP1-Expression im MDS ausgeschlossen werden.

In einer Reihe weiterer publizierter Studien wurde gezeigt, dass interstitiale Deletionen auf dem kurzen Arm des Chromosom 8 im Zusammenhang mit verschiedenen malignen Erkrankungen wie Prostata- (Crundwell *et al.*, 1996), Plattenepithelzellen-(Kuo *et al.*, 1998) und Kolorektalkarzinomen (Chughtai *et al.*, 1999) stehen. *SFRP1* ist ebenfalls auf dem kurzen Arm des Chromosom 8 im Abschnitt q12-q11.1 kodiert. Mutationsanalysen dieses Bereiches in Patienten mit Kolorektalkarzinom haben eine heterozygote Deletion innerhalb des ersten Exons sowie eine Insertion bestehend aus 3 Nukleotiden in der Signalsequenz von *SFRP1* detektiert (Caldwell *et al.*, 2004). LOH-Untersuchungen (*Loss of Heterozygosity*, Verlust der Heterozygotie) mit Mikrosatellitenmarkern, die den kodierenden Bereich des *SFRP1*-Gens flankierten, zeigten, dass circa ein Viertel der untersuchten Patienten mit Hepatozellularkarzinom in mindestens einem Marker LOH aufwiesen und mit einer verminderten transkriptionellen *SFRP1*-Expression korrelierten (Shih *et al.*, 2006). Diese Ergebnisse wurden in einer weiteren Studie an Patienten mit Hepatozellularkarzinom bestätigt. Mit einer Ausnahme, wiesen bei dieser Analyse alle Patienten mit LOH (17,6% der Gesamtpatientenkohorte) eine herunterregulierte *SFRP1*-Expression auf (Huang *et al.*, 2007). Des Weiteren wurde in einigen Patientinnen mit Brustkarzinom die herunterregulierte *SFRP1*-Expression mit *copy number loss* assoziiert (Armes *et al.*, 2004). Diese Erkenntnisse legen die Vermutung nahe, dass die Expression von *SFRP1* im MDS durch zusätzliche genetische Alterationen reguliert sein könnte, dies im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch nicht untersucht wurde.

Da weder eine kontinuierliche Promotorhypermethylierung noch inaktivierende Mutationen innerhalb des *SFRP1*-Promotors oder des 1. Exons regulatorisch im Zusammenhang mit der transkriptionellen Herunterregulation der *SFRP1*-Expression standen, wurden verschiedene andere regulatorische Mechanismen der Inaktivierung von *SFRP1* im MDS rein hypothetisch dargeboten. Eindeutig ist jedoch, dass der Verlust der *SFRP1*-Expression ein gemeinsames Ereignis sowohl in soliden Tumoren als auch in hämatologischen Malignitäten darstellt. Dadurch wird *SFRP1* eine potentielle Rolle in der Pathogenese zuteil, was hiermit erstmals auch für das Myelodysplastische Syndrom angenommen werden kann.

D.2.3 Genexpression WNT-Signalweg-assoziierter Gene im MDS

Die Aktivierung des WNT-Signalweges erfordert die Interaktion der WNT-Liganden mit ihren spezifischen Transmembranrezeptoren *Frizzled* (*FZD*), wobei der Verlauf der Signalkaskade von der individuellen Ligandenbindung an seinen Rezeptor abhängt. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Mikroarray-Genexpressionsanalysen sollen erste Hinweise auf das Expressionsverhalten der *FZD*- und *WNT*-Gene, insbesondere *FZD3*, sowie verschiedener WNT-Signalkomponenten und -Zielgene im Knochenmark von Patienten mit MDS liefern. Im Folgenden wird auf ausgewählte differentiell exprimierte Kandidatengene genauer eingegangen.

Die mikroarraygenerierten GEP der Rezeptorisoformen *FZD3*, *FZD5*, *FZD7* und *FZD10* wiesen im Vergleich zu den gesunden Normalpersonen vor allem in MDS-Patienten der Hochrisikogruppierung (HR-MDS) eine erhöhte Genexpression auf. Untersuchungen von CLL- (Lu *et al.*, 2004) und ALL-Patienten (Roman-Gomez *et al.*, 2007) haben eine erhöhte Expression von *FZD3* und seine Assoziation mit der Aktivierung des WNT-

Signalweges gezeigt. Die vorliegenden Mikroarray-Expressionsdaten der untersuchten MDS-Knochenmarkproben der Hochrisikogruppierung zeigten ebenfalls einen substaniellen Expressionsanstieg des WNT-Rezeptors *FZD3*. Zusätzlich wurde die Genexpression von *FZD3* mittels *real-time* RT-PCR in einem unabhängigen Patientenkollektiv verifiziert, wobei ein Expressionsanstieg in allen MDS-Risikogruppen zu verzeichnen war. Basierend auf diesen Ergebnissen liegt die Vermutung nahe, dass im MDS zwischen dem *gene silencing* von *SFRP1* und der transkriptionellen Hochregulation von *FZD3* eine Assoziation besteht, die ähnlich wie in CLL und ALL im Zusammenhang mit einer Aktivierung des WNT-Signalweges und somit mit der Pathogenese der Erkrankung stehen könnte.

Neben verschiedenen humanen Krebszelllinien, wurde in der CML-Zelllinie K562 eine erhöhte Expression der Rezeptorisoform *FZD5* festgestellt, was den Autoren eine Rolle von *FZD5* in der Pathogenese der CML durch die Aktivierung der WNT-Signalkaskade implizierte (Saitoh *et al.*, 2001). Im MDS wurde ein circa zweifacher Expressionsanstieg von *FZD5* sowohl in den Hochrisiko- als auch in den Niedrigrisikogruppen verzeichnet, was selbige Vermutung auch für das MDS nahe legt.

Die Expression eines weiteren Rezeptors der FZD-Familie, FZD7, zeigte im Vergleich zu gesunden Normalpersonen sowohl in der Niedrigrisikogruppierung als auch in der Hochrisikogruppierung der MDS-Patienten eine deutliche Zunahme. Eine erhöhte Genexpression von FZD7 wurde bereits in einer Reihe von soliden Tumoren wie Kolon-(Ueno et al., 2009a) und Hepatozellularkarzinom (Bengochea et al., 2008a) beschrieben. Die Studien an Patienten mit Kolonkarzinom ergaben, dass die FZD7-Expression mit zunehmendem Tumorgrad anstieg, so dass die Autoren eine Assoziation zwischen der Stärke der FZD7-Expression und dem allgemeinen Überleben (overall survival) der Patienten feststellten. Diese Beobachtungen suggerierten für FZD7 eine Beteiligung an der Progression von Kolonkarzinomen durch die Aktivierung des WNT-Signalweges (Ueno et al., 2009b). Da die Expressionszunahme in den hohen Risikogruppen des MDS ebenfalls deutlich höher lag als in den niedrigen Risikogruppen, könnte die Expressionsstärke von FZD7 auch im MDS mit dem klinischen Verlauf assoziiert sein. Neben der erhöhten Expression von FZD7 ergaben die Genexpressionanalysen in Patienten mit Hepatozellularkarzinom zusätzlich eine transkriptionelle Hochregulation verschiedener WNT-Liganden sowie eine verminderte Expression von SFRP1 (Bengochea et al., 2008b), was anhand der vorliegenden GEP

auch in MDS-Patienten festgestellt werden konnte. Für die Rezeptorisoform *FZD10* wurde ebenfalls ein Zusammenhang zwischen der Expressionstärke und der Pathogenese verschiedener maligner Zellen und Gewebe durch die Aktivierung des WNT-Signalweges vermutet (Terasaki *et al.*, 2002) wie beispielsweise in Kolorektalkarzinomen (Nagayama *et al.*, 2009). Da in den MDS-Patienten vor allem in den höheren Risikogruppen ein deutlicher Expressionsanstieg von *FZD10* im Vergleich zu den gesunden Normalpersonen detektiert wurde, könnte man ebenfalls eine pathogenetische Rolle von FZD10 bei der Progression maligner hämatopoetischer Zellen beim MDS vermuten.

In ausgedehnten Studien an Hepatozellularkarzinomen zeigte sich ein weiterer interessanter Ansatz, der eine Beteiligung an der Aktivierung des kanonischen WNT-Signalweges durch die funktionelle Interaktion zwischen dem Rezeptor FZD7 und dem Wnt-Liganden WNT3 beschrieb (Kim et al., 2008). Innerhalb dieser Studien wurde mittels real-time RT-PCR-Analysen neben einer erhöhten FZD7-Expression eine deutlich erhöhte WNT3-Expression in der Mehrheit der untersuchten Patientenproben festgestellt. In der vorliegenden Arbeit zum MDS wurde anhand der mikroarraybasierten GEP aller WNT-Liganden ein ähnliches Expressionsverhalten dieser Gene detektiert, so dass dies ein weiterer Hinweis auf die Aktivierung des kanonischen WNT-Signalweges in der Entwicklung des MDS sein könnte. Neben WNT3 zeigten auch die WNT-Liganden WNT6, WNT8b und WNT11 vor allem in der hohen MDS-Risikogruppierung einen deutlichen Expressionsanstieg im Vergleich zu den gesunden Normalpersonen. Obwohl über die Expression und die funktionelle Rolle von WNT6 und WNT8b in gesunden und malignen Zellen wenig bekannt ist, wurde eine erhöhte Expression dieser Gene in Proben von Brustkrebspatientinnen beobachtet, was ihnen eine potentielle Rolle in der malignen Transformation zuwies (Benhaj et al., 2005). In einer weiteren Arbeit wurde WNT8b als WNT-Ligand des kanonischen WNT-Signalweges beschrieben (Widelitz, 2005). Zudem konnte eine signifikant erhöhte Expression von WNT6 in hämatopoetischen Zellen von Patienten mit CLL nachgewiesen werden (Lu et al., 2004), was eine Beteiligung von WNT6 an der Pathogenese von Neoplasien hämatopoetischen Ursprungs, wie das MDS, durchaus vermuten lässt.

Zudem zeigten die Genexpressionsanalysen, dass der WNT-Ligand *WNT11* im Knochenmark der untersuchten MDS-Patienten deutlich höher exprimiert war als in den gesunden Normalpersonen. Diese Beobachtungen suggerieren eine mögliche Beteiligung in die Kanzerogenese ähnlich wie bereits in Studien zu *WNT11* an Magen-

und Gebärmutterhalskarzinom-Zelllinien beschrieben wurde (Kirikoshi *et al.*, 2001). *WNT11* zählt nachweislich zu den typischen WNT-Liganden des nicht-kanonischen WNT-Signalweges. Somit könnte die erhöhte Expression von *WNT11* ein Indiz für eine Beteiligung des aktivierten nicht-kanonischen WNT-Signalweges beim MDS sein.

Auch wenn es keine fundierten Kenntnisse zu diesen WNT-Liganden in Leukämien myeloischen Ursprungs existieren, könnten die bisherigen Beobachtungen als Hinweise auf eine mögliche pathogenetische Beteiligung an der Entwicklung des MDS dienen.

Des Weiteren wurde in den dargestellten Mikroarray-Genexpressionstudien die Expression der ausgewählten WNT-Signalwegkomponenten LEF1, TCF1 und CTNNB1 (β-Catenin) sowie der WNT–Zielgene C-MYC und CCND1 (Cyclin D1) untersucht. Wie unter Abschnitt A.4.1 beschrieben, stellt ß-Catenin den zentralen Regulator des kanonischen WNT-Signalweges dar. Die Aktivierung der Signalkaskade ist mit der Dephosphorylierung von β-Catenin verknüpft, was zur Stabilisierung und Translokation zum Nukleus führt (Wodarz und Nusse, 1998). Demnach spiegelt sich die Aktivierung des
ß-Catenin-abhängigen WNT-Signalweges in einer erhöhten Expression von dephosphorylierten β-Catenin wider. Dies wurde unter anderem bereits in AML gezeigt, wonach β-Catenin diagnostische und prognostische Relevanz erlangte (Ysebaert et al., 2006). Die Genexpressionsstudien der vorliegenden Arbeit ergaben jedoch keine differentielle Genexpression von CTNNB1 in den untersuchten MDS-Patienten im Vergleich zu den gesunden Normalpersonen. Da die Resultate der Expressionanalysen CTNNB1 nur die transkriptionelle Genexpression von widerspiegelte und posttranslationale Modifikationen des Proteins durch Phosphorylierung/ Dephosphorylierung dabei nicht berücksichtigt wurden, ließen sich keine Rückschlüsse auf eine mögliche Akkumulation von dephosphorylierten β-Catenin im MDS ziehen. Vielmehr würden Western Blot-Analysen von Vollknochenmarkproben aus MDS-Patienten Auskunft über die Proteinexpression geben, was im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht möglich war.

In der fortschreitenden Signalkaskade interagiert β-Catenin mit dem Transkriptionsfaktorkomplex TCF1/LEF1. Dieser bindet an die Promotorbereiche verschiedener WNT-Zielgene, wodurch deren Expression initiiert wird, darunter auch die Expression des Onkogen *C-MYC* und des Zellzyklusregulators *CCND1* (Staal und Clevers, 2005). In den bereits erwähnten Studien von Valencia *et al.* und Roman-Gomez *et al.* zum WNT-Signalweg in AML und ALL wurde demonstriert, dass erhöhte

Expressionslevel von *TCF1*, *LEF1*, *CCND1* sowie *C-MYC* mit der Aktivierung des WNT-Signalweges durch die epigenetische Herunterregulation von *SFRP1* assoziiert waren. Überraschenderweise blieb im MDS die Expression von *TCF1* unverändert und *LEF1* wies in beiden Risikogruppierungen sogar eine verminderte Expression im Vergleich zu den gesunden Normalpersonen auf. Demensprechend stehen diese Ergebnisse im Widerspruch zu einer Beteiligung des aktivierten kanonischen WNT-Signalweges an der Pathogenese des MDS. Andererseits bedarf es zunächst einer Verifizierung der mikroarraybasierten Expressionsresultate und weiterer Untersuchungen, bevor die Aktivierung des kanonischen WNT-Signalweges als pathogenetischer Prozess beim MDS eindeutig ausgeschlossen werden kann.

Für eine Aktivierung des kanonischen WNT-Signalweges im MDS sprechen wiederum die erhöhten Genexpressionslevel der WNT-Zielgene CCND1 und C-MYC, deren verstärkte Transkriptionsaktivierung die Proliferation von Zellen während der Kanzerogenese aberrant beeinflussen kann. Cyclin D1 reguliert zusammen mit seinen Homologen Cyclin D2 und D3 sowie mit ihren katalytischen Partnern den Cyclinabhängigen Kinasen CDK4 und 6 die initialen Schritte der Zellvermehrung und den Eintritt in die S-Phase. Eine verstärkte Expression von CCND1 wurde in einer Reihe von humanen Malignitäten beobachtet und mit verschiedenen Tumorphänotypen assoziiert (Gladden und Diehl, 2005). In Knochenmarkzellen von MDS-Patienten steht eine nukleäre Lokalisation von Cyclin D1 im Zusammenhang mit der intramedullaren Apoptose (Saberwal et al., 2003), so dass eine verstärkte Expression von CCND1 womöglich eine erhöhte apoptotische Aktivität hämatopoetischer Zellen im MDS zur Folge hat. Dies entspräche dem klinischen Bild des MDS und wurde bereits in MDS-Patienten des FAB-Typs CMML gezeigt (Economopoulou et al., 2010). Das Proto-Onkogen C-MYC gehört wie CCND1 zu einer Gruppe von Genen, deren Deregulation zu einem Kontrollverlust der Balance zwischen Proliferation und Apoptose führt (Alarcon et al., 1996). Es spielt als potentieller Induktor der Apoptose eine wichtige Rolle in der Pathogenese verschiedener Malignitäten, was auch im MDS beschrieben wurde (Rajapaksa et al., 1996). In Konkordanz zu diesen Beobachtungen ergaben die Ergebnisse der aktuellen Mikroarray-Genexpressionsanalyse deregulierte Expressionen von CCND1 und C-MYC in Knochenmarkzellen von MDS-Patienten, deren erhöhte Werte unter anderem aus der Aktivierung des WNT-Signalweges resultieren könnten.

Die mikroarraybasierten GEP gaben erste Hinweise auf differentiell exprimierte Gene des WNT-Signalweges in Patienten mit MDS. Um jedoch fundierte Rückschlüsse auf das Expressionsverhalten der vorgestellten Gene ziehen zu können, bedarf es einer stringenten Verifizierung durch unabhängige Detektionssysteme wie die *real-time* RT-PCR-Technik.

D.2.4 Bedeutung von *SFRP1* und des WNT-Signalweges für die Entwicklung des MDS

In mehreren Arbeiten wurde bereits beschrieben, dass die aberrante Aktivierung des WNT-Signalweges ein entscheidener Faktor in der Pathogenese von hämatologischen Erkrankungen wie beispielsweise von akuten und chronischen Leukämien ist (Lu *et al.*, 2004; Jamieson *et al.*, 2004; Simon *et al.*, 2005). Die WNT-Signalkaskade wird durch die Bindung des WNT-Liganden an den transmembranen Rezeptor FZD initiiert. Nach dieser WNT-vermittelten FZD-Stimulation wird in Abhängigkeit von der Interaktion mit dem spezifischen WNT-Liganden und der FZD-Isoform zwischen dem kanonischen und nicht-kanonischen Signalweg unterschieden. Der kanonische WNT-Signalweg ist sowohl in die Zelldifferenzierung und –entwicklung von Geweben als auch in die Regulation der Differenzierung und Proliferation von hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen involviert (Brandon *et al.*, 2000). Dementsprechend ist es nicht überraschend, dass eine aberrante, kanonische WNT-Signalaktivierung bereits in über 40 verschiedenen soliden Tumoren und auch in Malignitäten mit hämatopoetischem Ursprung beobachtet wurde (Giles *et al.*, 2003).

Hämatopoetische Stammzellen sind in der Lage, sich stetig selbst zu erneuern (*self renewal*) und multipotente, lymphatische und myeloische Vorläuferzellen zu bilden, die linienspezifisch zu reifen Zellen des peripheren Blutes differenzieren (siehe A.1). Studien haben gezeigt, dass ein konstitutiv aktivierter kanonischer WNT-Signalweg eine Inhibierung der multiplen linienspezifischen Differenzierung und der Selbsterneuerung hämatopoetischer Stammzellen nach sich zog, was wiederum Fehlbildungen des Knochenmarks verursachte (Scheller *et al.*, 2006; Kirstetter *et al.*, 2006). Diese Fehlentwicklungen des blutbildenden Systems sind charakteristische Merkmale sowohl von "echten" Leukämien als auch vom Krankheitsbild des MDS. Ein auslösender Faktor dabei könnte die Herunterregulation von *SFRP1* sein. Zusammengefasst könnte die Detektion erhöhter Expression auf eine Aktivierung des kanonischen WNT-

Signalweges durch eine verstärkte funktionelle WNT-Liganden/Rezeptor-Interaktion im MDS hinweisen. Des Weiteren gibt es zunehmend Beweise dafür, dass die nichtkanonischen WNT-Signalwege ebenfalls eine wichtige Rolle in der normalen und malignen Hämatopoese spielen. *In-vitro* Versuche an embryonalen Stammzellen haben gezeigt, dass *WNT11* in die Aktivierung des nicht-kanonischen Signalweges involviert war, dessen Initiation von der spezifischen FZD7-WNT11-Interaktion vermittelt wurde (Kokolus und Nemeth, 2010). Basierend auf diesen Beobachtungen und den Ergebnissen der vorliegenden Mikroarray-Genexpressionsstudien, die eine erhöhte Expression von *WNT11* und *FZD7* nachwiesen, könnte eine transkriptionelle Herunterregulation von *SFRP1*, wie sie hier für das MDS beschrieben wurde, theoretisch zur Aktivierung des nicht-kanonischen WNT-Signalweges führen und somit zur Pathogenese des MDS beitragen.

Zusammengefasst ergibt sich daraus das Fazit, dass *SFRP1* als WNT-Inhibitor einen Tumorsuppressor-Kandidaten darstellt (Suzuki *et al.*, 2005), dessen verminderte Genexpression zur Pathogenese von Zellen und Geweben beiträgt, was die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auch für das MDS implizieren. Ob und inwiefern dabei kanonische oder nicht-kanonische WNT-Signalkaskaden im MDS eine Rolle bei der aberranten Initiation von krebsrelevanten Transkriptionsfaktoren, Wachstumsfaktoren oder Regulatoren der Apoptose und der Proliferation (Janssens *et al.*, 2006) spielen, bleibt anhand fundierter funktioneller Analysen in weiteren Arbeiten zu klären.

E ZUSAMMENFASSUNG

Das Myelodysplastische Syndrom ist eine Störung des Wachstums und der Differenzierung hämatopoetischer Zellen im Knochenmark, die auf verschiedene pathophysiologisch relevante genetische und epigenetische Ereignisse zurückzuführen ist. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung von *ALCAM* und *SFRP1* als potentielle pathogeneserelevante Gene beim MDS. Grundlage für diese Arbeit waren Genexpressionsanalysen, die ein aberrantes Expressionsmuster von *ALCAM* und *SFRP1* in hämatopoetischen Zellen von MDS-Patienten unterschiedlicher IPSS-Risikoklassifizierung identifizierten. Die Etablierung eines *in-vitro* Modellzellsystems zur funktionellen Charakterisierung von *ALCAM* sowie Analysen zur transkriptionellen Genregulation von *SFRP1* waren weitere experimentelle und inhaltliche Bestandteile dieser Arbeit. Die Ergebnisse können in Anlehnung an die einzelnen Fragestellungen des Abschnitts A.1.6 wie folgt zusammengefasst werden:

1. Stellt *ALCAM* anhand seines Genexpressionsmusters in hämatopoetischen Zellen ein potentielles Schlüsselgen hinsichtlich einer Bedeutung in der gestörten Hämatopoese des MDS dar?

Anhand der Mikroarray- und *real-time* RT-PCR-Genexpressionsanalysen konnte erstmals eine erhöhte transkriptionelle Genexpression des Zelladhäsionmoleküls *ALCAM* in verschiedenen hämatopoetischen Zellen von MDS-Patienten gezeigt werden. Die vergleichende Analyse mit den gesunden Normalpersonen identifizierte *ALCAM* als neues potentielles Schlüsselgen der ineffektiven Hämatopoese beim MDS.

2. Kann ein geeignetes MDS-Modellzellsystem zur Überexpression von *ALCAM* etabliert werden, um Untersuchungen zur funktionellen Charakterisierung durchzuführen?

Basierend auf den Expressionsergebnissen sollte anhand verschiedener leukämischer Zelllinien durch vektorbasierte *ALCAM*-Überexpression ein Modellzellsystem etabliert werden, dass die funktionelle Rolle von *ALCAM* in der gestörten Hämatopoese beim MDS charakterisiert. Da es gegenwärtig sehr schwierig ist, eine Zelllinie mit dem Modellcharakter des MDS zu etablieren, dienten die humanen Zelllinien HEL, U937 und K562 als Versuchssysyteme für Apoptose- und Proliferationsstudien. Die Erythroleukämie-Zelllinie HEL wurde zudem für linienspezifische Differenzierungs-

versuche unter Stimulation mit Erythropoetin verwendet. Es fand jedoch kein Ansprechen der Zellen auf den Differenzierungsstimulus statt.

3. Welche Rolle spielt *ALCAM* hinsichtlich seiner Bedeutung für die Proliferation, Apoptose und Differenzierung bei der Progression des MDS?

Die *in-vitro* Daten der Apoptosestudien der *ALCAM*-überexprimierenden Zellen der Versuchszelllinie HEL zeigten eine erhöhte Apoptose, was gut mit dem klinischen Bild des MDS korreliert, wonach eine veränderte Apoptose erythroider Vorläuferzellen die Insuffizienz der Hämatopoese beim MDS nach sich zieht. Die Resultate der durchgeführten Proliferations- und *in-vitro* Differenzierungsstudien gaben lediglich Hinweise auf eine potentielle Rolle von *ALCAM* in der dysregulierten Hämatopoese des MDS, so dass eine Verifizierung dieser Rückschlüsse Bestandteil fortführender Arbeiten bleibt.

4. Stellt *SFRP1* aufgrund seiner differentiellen Genexpression ein neues Schlüsselgen für die ineffektive Hämatopoese beim MDS dar? Unterscheidet sich die Genexpression in Zellen der Niedrigrisikogruppen von Zellen der hohen Risikogruppen? Wie verhält sich im Vergleich dazu die *SFRP1*-Genexpression in akuten Leukämien?

In weiteren Mikroarray- und RT-PCR-Genexpressionsanalysen wurde erstmals eine signifikante transkriptionelle Herunterregulation des WNT-Antagonisten *SFRP1* in mononukleären Zellen und CD34+ Zellen des Knochenmarks von MDS-Patienten der verschiedenen IPSS-Risikogruppen sowie in Patienten mit AML und ALL detektiert. Die Genexpression in den Knochenmarkzellen zeigte einen graduellen Verlauf, wobei das Level ausgehend von normalen Zellen, hin zu Zellen von *low risk* MDS-Patienten bis *high risk* MDS-Patienten und schließlich zu Patienten mit akuter Leukämie abnahm. Demnach war die Expressionsabnahme in den akuten Leukämien am stärksten. Die vergleichende Analyse in den äquivalenten Zellen der gesunden Normalpersonen wies massive Alterationen im transkriptionellen Programm der MDS-Patienten auf, wodurch *SFRP1* als neues Schlüsselgen der dysregulierten Hämatopoese beim MDS identifiziert werden konnte.

5. Durch welche Regulationsmechanismen wird die Genexpression von *SFRP1* im MDS im Vergleich zu akuten Leukämien kontrolliert? In Anlehnung an Promotormethylierungsanalysen in einer Reihe von soliden Tumoren und hämatologischen Malignitäten, die eine DNA-Hypermethylierung des *SFRP1*-Promotors zeigten, wurde der Promotormethylierungsstatus in den hämatopoetischen Zellen von MDS-Patienten unter Anwendung der *Pyrosequencing*-Technik untersucht. Im Zuge dieser Untersuchungen wurde festgestellt, dass eine frequente DNA-Hypermethylierung nicht der primäre Regulationsmechanismus der transkriptionellen Herunterregulation von *SFRP1* im MDS ist. Zusätzlich durchgeführte DNA-Sequenzierungen der regulatorischen Bereiche des *SFRP1*-Promotors deckten keine inaktivierenden Mutationen auf, die für die verminderte Expression des WNT-Antagonisten verantwortlich sein könnten. Möglicherweise ist die Genexpression von *SFRP1* durch andere regulatorische Mechanismen wie Histon-Deacetylierung, Deletionen, LOH oder durch Störungen des Hedgehog-Signalweges kontrolliert. Im Vergleich dazu wurde eine frequente *SFRP1*-Promotorhypermethylierung erstmals anhand von *Pyrosequencing*-Analysen im Knochenmark von AML- und ALL-Patienten detektiert.

6. Welche Hinweise auf eine Beteiligung von *SFRP1* und des WNT-Signalweges an der Pathogenese des MDS ergeben sich aus den Genexpressionsanalysen?

Die Evaluierung der Expressionsdaten ergab eine Assoziation der verminderten *SFRP1*-Expression mit der Hochregulation der Expression des WNT-Rezeptors *FZD3* sowie weiterer WNT-Signalweg-assoziierter Gene, die in einem funktionellen Zusammenhang mit einer aberranten Aktivierung des WNT-Signalweges in MDS-Zellen stehen könnte. Demnach lassen die Resultate eine potentielle Beteiligung des WNT-Signalweges an der Pathogenese des MDS vermuten.

SFRP1 und *ALCAM* wurden als neue, differentiell exprimierte Schlüsselgene in der Hämatopoese des MDS identifiziert. Zudem konnte bestätigt werden, dass die MDS-Patienten bereits auf Ebene der Stammzellen oder stammzellnahen Zellen Defekte aufwiesen, was der Theorie entspräche, wonach das MDS eine klonale Stammzellerkrankung des Knochenmarks ist. Die funktionelle Beteiligung von *SFRP1* und *ALCAM* am Pathomechanismus des MDS konnte im Rahmen dieser Arbeit zwar nur teilweise aufgeklärt werden, Hinweise und Indizien lassen jedoch eine potentielle Rolle in der gestörten Hämatopoese vermuten.

F SUMMARY

Myelodysplastic syndromes (MDS) are clonal disorders of hematopoetic stem cells resulting in bone marrow failure and ineffective hematopoiesis. Chromosomal abnormalities, genetic alterations and epigenetic deregulations are possible underlying causes of the multiple dyshaematopoietic features of MDS. The aim of the present thesis was the identification and characterization of *ALCAM* and *SFRP1* which were specified as potential pathogenetic genes in MDS. Gene expression analyses have identified specific expression pattern of *ALCAM* and *SFRP1* in hematopoietic cells from patients with different risk-types of MDS. Furthermore, the establishment of an *in-vitro* model system elucidating the functional role of *ALCAM* as well as analyses discovering mechanisms of the transcriptional regulation of the *SFRP1* gene were additional experimental questions to be answered by the present work. The results are summarized as follows:

1. Due to the specific gene expression pattern of *ALCAM* in hematopoietic MDS cells, does *ALCAM* display a potential target gene involved in the dysregulated hematopoiesis of MDS?

For the first time, oligonucleotide microarray and real time RT-PCR based gene expression analysis revealed an increased transcriptional expression of the cell adhesion molecule *ALCAM* in different hematopoietic cell types from patients with MDS as compared to normal controls. Due to these results *ALCAM* was identified as a putative target gene of the ineffective hematopoiesis in MDS.

2. Is the establishment of an appropriate *in-vitro* MDS model using *ALCAM* overexpression possible to characterize the functional role of *ALCAM* in MDS?

Based on expression results several human leukemic cell lines were used to establish an *ALCAM* over-expression *in-vitro* model to characterize the functional role of *ALCAM* in dysregulated hematopoiesis of MDS. With current methods it is difficult to establish a cell line mimicing the character of MDS. Therefore, the human cell lines HEL, U937 and K562 were used for studying *ALCAM*-specific apoptosis and proliferation. Additionally, the erythroleukemic cell line HEL was subjected to erythroide differentiation under stimulation with erythropoietin. However, a specific response to the differentiation stimulus could be not be detected.

3. What is the specific role of *ALCAM* in the progression of MDS with regard to its relevance for proliferation, apoptosis and differentiation?

The in vitro apoptosis data of the *ALCAM* overexpressing HEL cells showed an increased apoptosis rate correlating with the clinical characteristics of MDS such as an increased apoptosis of erythroid progenitor cells resulting in insufficient hematopoiesis. The results of the proliferation and *in-vitro* differentiation studies demonstrate a potential role of *ALCAM* in the dyshematopoiesis of MDS. A verification of these indications needs to be investigated in further studies.

4. Due to the specific gene expression pattern of hematopoietic MDS cells, is *SFRP1* a potential target gene for dyshematopoiesis of MDS? Are there any differences of the *SFRP1* gene expression in low/ int-1 and int-2/high risk MDS as compared to acute leukemia?

Further oligonucleotide microarray and real time RT-PCR analyses have detected a significant transcriptional down-regulation of the WNT antagonist *SFRP1* in CD34+ and mononuclear bone marrow cells from patients with different IPSS risk-types of MDS as well as in bone marrow of patients with AML and ALL. The gene expression pattern in bone marrow cells showed a gradual decline from healthy bone marrow cells with the highest expression compared to cells from low risk MDS, high risk MDS and acute leukemia (AML and ALL) patients showing the lowest expression. The comparative analysis with cells from healthy volunteers revealed an alteration of the transcriptional gene expression program identifying *SFRP1* as a target gene of dysregulated hematopoiesis in MDS.

5. How is the transcriptional down-regulation of *SFRP1* regulated in MDS as compared to acute leukemia?

According to recently published promoter methylation analyses in several solid tumors and hematological malignancies showing DNA hypermethylation of the *SFRP1* promoter, the promoter methylation status was assessed in hematopoietic cells of MDS patients with different risk-types using the pyrosequencing technique. These analyses have shown that the *SFRP1* down-regulation is not primarily mediated by promoter hypermethylation in MDS. Moreover, no inactivating mutations in the promoter of the WNT antagonist *SFRP1* in any of the MDS patients were detected by bi-directional promoter sequencing. It is likely that *SFRP1* down-regulation in MDS is controlled by additional regulatory mechanisms, e.g. histone deacetylation, deletions, loss of heterozygosity or alterations in the hedgehog pathway. For the first time, the employment of pyrosequencing technology to analyze the *SFRP1* promoter methylation in bone marrow cells of patients with AML and ALL has detected a frequent *SFRP1* promoter hypermethylation in these patients as compared to MDS and normal controls.

6. Which implications for the involvement of *SFRP1* and the WNT signalling pathway in the pathogenesis of MDS can be obtained from the gene expression analyses?

We detected an association of the transcriptional down-regulation of *SFRP1* and upregulation of the Wnt receptor *FZD3* as well as further WNT pathway-related genes in MDS. These findings indicate potential roles for the Wnt inhibitor *SFRP1* and aberrant activation of the WNT signalling pathway in pathogenesis of MDS.

SFRP1 and *ALCAM* have been identified as differentially expressed target genes in dyshematopoiesis of MDS. In addition, the results of the presented experiments indicate that hematopoietic stem cells of MDS patients already show genetic defects. These findings confirm the theory of MDS that is caused by a variety of genetic deregulations of the hematopoietic stem cells. Indeed, within this thesis the functional involvement of *SFRP1* and *ALCAM* in the pathomechanism of MDS was not completely elucidated. However, the observations revealed several indications for their important role in dyshematopoiesis.

G LITERATURVERZEICHNIS

- Adams RL, Burdon RH. DNA methylation in eukaryotes. CRC Crit Rev Biochem 1982; 13 (4):349-84.
- Aggerholm A, Holm MS, Guldberg P, Olesen LH, Hokland P. Promoter hypermethylation of p15INK4B, HIC1, CDH1, and ER is frequent in myelodysplastic syndrome and predicts poor prognosis in early-stage patients. Eur J Haematol 2006; **76** (1):23-32.
- Alarcon RM, Rupnow BA, Graeber TG, Knox SJ, Giaccia AJ. Modulation of c-Myc activity and apoptosis in vivo. Cancer Res 1996; **56** (19):4315-9.
- Armes JE, Hammet F, de SM, *et al.* Candidate tumor-suppressor genes on chromosome arm 8p in early-onset and high-grade breast cancers. Oncogene 2004; **23** (33):5697-702.
- Aul C, Bowen DT, Yoshida Y. Pathogenesis, etiology and epidemiology of myelodysplastic syndromes. Haematologica 1998; **83** (1):71-86.
- Austin TW, Solar GP, Ziegler FC, Liem L, Matthews W. A role for the Wnt gene family in hematopoiesis: expansion of multilineage progenitor cells. Blood 1997; 89 (10):3624-35.
- Awakura Y, Nakamura E, Ito N, Kamoto T, Ogawa O. Methylation-associated silencing of SFRP1 in renal cell carcinoma. Oncol Rep 2008; **20** (5):1257-63.
- Bafico A, Gazit A, Pramila T, *et al.* Interaction of frizzled related protein (FRP) with Wnt ligands and the frizzled receptor suggests alternative mechanisms for FRP inhibition of Wnt signaling. J Biol Chem 1999; **274** (23):16180-7.
- Behrens J, von Kries JP, Kuhl M, et al. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. Nature 1996; **382** (6592):638-42.
- Bengochea A, de Souza MM, Lefrancois L, *et al.* Common dysregulation of Wnt/Frizzled receptor elements in human hepatocellular carcinoma. Br J Cancer 2008a; **99** (1):143-50.
- Bengochea A, de Souza MM, Lefrancois L, *et al.* Common dysregulation of Wnt/Frizzled receptor elements in human hepatocellular carcinoma. Br J Cancer 2008b; **99** (1):143-50.
- Benhaj K, Gur B, Bozkurt B, et al. Expression profiling of Wnt pathway genes in breast cancer. In: 2005:P4.18.
- Bennett JM. World Health Organization classification of the acute leukemias and myelodysplastic syndrome. Int J Hematol 2000; **72** (2):131-3.

- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, *et al.* Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. Br J Haematol 1982; **51** (2):189-99.
- Bennett JM, Orazi A. Diagnostic criteria to distinguish hypocellular acute myeloid leukemia from hypocellular myelodysplastic syndromes and aplastic anemia: recommendations for a standardized approach. Haematologica 2009; **94** (2):264-8.
- Bestor TH. The DNA methyltransferases of mammals. Hum Mol Genet 2000; **9** (16):2395-402.
- Bhat RA, Stauffer B, Komm BS, Bodine PV. Structure-function analysis of secreted frizzled-related protein-1 for its Wnt antagonist function. J Cell Biochem 2007; **102** (6):1519-28.
- Bowen D, Yancik S, Bennett L, Culligan D, Resser K. Serum stem cell factor concentration in patients with myelodysplastic syndromes. Br J Haematol 1993; 85 (1):63-6.
- Bowen MA, Aruffo A. Adhesion molecules, their receptors, and their regulation: analysis of CD6-activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM/CD166) interactions. Transplant Proc 1999; **31** (1-2):795-6.
- Bowen MA, Aruffo AA, Bajorath J. Cell surface receptors and their ligands: in vitro analysis of CD6-CD166 interactions. Proteins 2000; **40** (3):420-8.
- Bowen MA, Bajorath J, Siadak AW, *et al.* The amino-terminal immunoglobulin-like domain of activated leukocyte cell adhesion molecule binds specifically to the membrane-proximal scavenger receptor cysteine-rich domain of CD6 with a 1:1 stoichiometry. J Biol Chem 1996; **271** (29):17390-6.
- Bowen MA, Patel DD, Li X, *et al.* Cloning, mapping, and characterization of activated leukocyte-cell adhesion molecule (ALCAM), a CD6 ligand. J Exp Med 1995; **181** (6):2213-20.
- Brandon C, Eisenberg LM, Eisenberg CA. WNT signaling modulates the diversification of hematopoietic cells. Blood 2000; **96** (13):4132-41.
- Bruder SP, Ricalton NS, Boynton RE, *et al.* Mesenchymal stem cell surface antigen SB-10 corresponds to activated leukocyte cell adhesion molecule and is involved in osteogenic differentiation. J Bone Miner Res 1998; **13** (4):655-63.
- Bu XM, Zhao CH, Zhang N, *et al.* Hypermethylation and aberrant expression of secreted frizzled-related protein genes in pancreatic cancer. World J Gastroenterol 2008; **14** (21):3421-4.
- Burkhardt M, Mayordomo E, Winzer KJ, *et al.* Cytoplasmic overexpression of ALCAM is prognostic of disease progression in breast cancer. J Clin Pathol 2006; **59** (4):403-9.
- Cadigan KM, Liu YI. Wnt signaling: complexity at the surface. J Cell Sci 2006; **119** (Pt 3):395-402.

- Caldwell GM, Jones C, Gensberg K, *et al.* The Wnt antagonist sFRP1 in colorectal tumorigenesis. Cancer Res 2004; **64** (3):883-8.
- Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. Stem Cells 2007; **25** (11):2739-49.
- Chughtai SA, Crundwell MC, Cruickshank NR, *et al.* Two novel regions of interstitial deletion on chromosome 8p in colorectal cancer. Oncogene 1999; **18** (3):657-65.
- Claessens YE, Bouscary D, Dupont JM, *et al.* In vitro proliferation and differentiation of erythroid progenitors from patients with myelodysplastic syndromes: evidence for Fas-dependent apoptosis. Blood 2002; **99** (5):1594-601.
- Cortes F, Deschaseaux F, Uchida N, *et al.* HCA, an immunoglobulin-like adhesion molecule present on the earliest human hematopoietic precursor cells, is also expressed by stromal cells in blood-forming tissues. Blood 1999; **93** (3):826-37.
- Costello JF, Plass C. Methylation matters. J Med Genet 2001; 38 (5):285-303.
- Crundwell MC, Chughtai S, Knowles M, *et al.* Allelic loss on chromosomes 8p, 22q and 18q (DCC) in human prostate cancer. Int J Cancer 1996; **69** (4):295-300.
- Daskalakis M, Nguyen TT, Nguyen C, *et al.* Demethylation of a hypermethylated P15/INK4B gene in patients with myelodysplastic syndrome by 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine) treatment. Blood 2002; **100** (8):2957-64.
- Degen WG, van Kempen LC, Gijzen EG, *et al.* MEMD, a new cell adhesion molecule in metastasizing human melanoma cell lines, is identical to ALCAM (activated leukocyte cell adhesion molecule). Am J Pathol 1998; **152** (3):805-13.
- Deng G, Song GA, Pong E, Sleisenger M, Kim YS. Promoter methylation inhibits APC gene expression by causing changes in chromatin conformation and interfering with the binding of transcription factor CCAAT-binding factor. Cancer Res 2004; 64 (8):2692-8.
- Desmond JC, Raynaud S, Tung E, *et al.* Discovery of epigenetically silenced genes in acute myeloid leukemias. Leukemia 2007; **21** (5):1026-34.
- Economopoulou C, Pappa V, Papageorgiou S, *et al.* Cell cycle and apoptosis regulatory gene expression in the bone marrow of patients with de novo myelodysplastic syndromes (MDS). Ann Hematol 2010; **89** (4):349-58.
- Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. Nature 2004; **429** (6990):457-63.
- Esteller M, Silva JM, Dominguez G, *et al.* Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. J Natl Cancer Inst 2000; **92** (7):564-9.

- Etoh T, Kanai Y, Ushijima S, *et al.* Increased DNA methyltransferase 1 (DNMT1) protein expression correlates significantly with poorer tumor differentiation and frequent DNA hypermethylation of multiple CpG islands in gastric cancers. Am J Pathol 2004; **164** (2):689-99.
- Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. Nat Rev Cancer 2004; **4** (2):143-53.
- Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation of ras oncogenes in primary human cancers. Biochem Biophys Res Commun 1983; **111** (1):47-54.
- Fontenay-Roupie M, Bouscary D, Guesnu M, *et al.* Ineffective erythropoiesis in myelodysplastic syndromes: correlation with Fas expression but not with lack of erythropoietin receptor signal transduction. Br J Haematol 1999; **106** (2):464-73.
- Giles RH, van Es JH, Clevers H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. Biochim Biophys Acta 2003; **1653** (1):1-24.
- Gladden AB, Diehl JA. Location, location, location: the role of cyclin D1 nuclear localization in cancer. J Cell Biochem 2005; **96** (5):906-13.
- Goyal R, Qawi H, Ali I, *et al.* Biologic characteristics of patients with hypocellular myelodysplastic syndromes. Leuk Res 1999; **23** (4):357-64.
- Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, *et al.* International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. Blood 1997; **89** (6):2079-88.
- Grosjean-Raillard J, Ades L, Boehrer S, *et al.* Flt3 receptor inhibition reduces constitutive NFkappaB activation in high-risk myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. Apoptosis 2008; **13** (9):1148-61.
- Gueller S, Komor M, Nowak D, *et al.* Identification of defects in the transcriptional program during lineage-specific in vitro differentiation of CD34(+) cells selected from patients with both low- and high-risk myelodysplastic syndrome. Exp Hematol 2010a.
- Gueller S, Komor M, Nowak D, *et al.* Identification of defects in the transcriptional program during lineage-specific in vitro differentiation of CD34(+) cells selected from patients with both low- and high-risk myelodysplastic syndrome. Exp Hematol 2010c.
- Gueller S, Komor M, Nowak D, *et al.* Identification of defects in the transcriptional program during lineage-specific in vitro differentiation of CD34(+) cells selected from patients with both low- and high-risk myelodysplastic syndrome. Exp Hematol 2010b.
- Gupta A, Godwin AK, Vanderveer L, Lu A, Liu J. Hypomethylation of the synuclein gamma gene CpG island promotes its aberrant expression in breast carcinoma and ovarian carcinoma. Cancer Res 2003; **63** (3):664-73.

- Haferlach T, Kohlmann A, Basso G, et.al. The Clinical Utility of Microarray-Based Gene Expression Profiling in the Diagnosis and Sub-Classification of Leukemia: Final Report on 3252 Cases from the International MILE Study Group. In: 2008.
- Haferlach T, Kohlmann A, Wieczorek L, *et al.* Clinical utility of microarray-based gene expression profiling in the diagnosis and subclassification of leukemia: report from the International Microarray Innovations in Leukemia Study Group. J Clin Oncol 2010; **28** (15):2529-37.
- Hanada M, Delia D, Aiello A, Stadtmauer E, Reed JC. bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Blood 1993; **82** (6):1820-8.
- Hecht A, Vleminckx K, Stemmler MP, van Roy F, Kemler R. The p300/CBP acetyltransferases function as transcriptional coactivators of beta-catenin in vertebrates. EMBO J 2000; **19** (8):1839-50.
- Herman JG, Umar A, Polyak K, *et al.* Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; **95** (12):6870-5.
- Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. Nature 2001; **411** (6835):366-74.
- Hofmann WK, de VS, Komor M, *et al.* Characterization of gene expression of CD34+ cells from normal and myelodysplastic bone marrow. Blood 2002; **100** (10):3553-60.
- Hofmann WK, Koeffler HP. Important features of myelodysplastic syndrome. Int J Hematol 2002; **76 Suppl 2**:222-7.
- Hofmann WK, Lubbert M, Hoelzer D, Phillip KH. Myelodysplastic syndromes. Hematol J 2004; **5** (1):1-8.
- Hofmann WK, Stauch M, Hoffken K. [Granulocyte function in myelodysplastic syndrome before and after low-dose cytarabine therapy]. Dtsch Med Wochenschr 1993; 118 (41):1469-73.
- Hopfer O, Komor M, Koehler IS, *et al.* DNA methylation profiling of myelodysplastic syndrome hematopoietic progenitor cells during in vitro lineage-specific differentiation. Exp Hematol 2007; **35** (5):712-23.
- Hoppler S, Kavanagh CL. Wnt signalling: variety at the core. J Cell Sci 2007; **120** (Pt 3):385-93.
- Huang HC, Klein PS. The Frizzled family: receptors for multiple signal transduction pathways. Genome Biol 2004; **5** (7):234.
- Huang J, Zhang YL, Teng XM, *et al.* Down-regulation of SFRP1 as a putative tumor suppressor gene can contribute to human hepatocellular carcinoma. BMC Cancer 2007; **7**:126.

- Ikeda K, Quertermous T. Molecular isolation and characterization of a soluble isoform of activated leukocyte cell adhesion molecule that modulates endothelial cell function. J Biol Chem 2004; 279 (53):55315-23.
- Jamieson CH, Ailles LE, Dylla SJ, *et al.* Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. N Engl J Med 2004; **351** (7):657-67.
- Janssens N, Janicot M, Perera T. The Wnt-dependent signaling pathways as target in oncology drug discovery. Invest New Drugs 2006; **24** (4):263-80.
- Jost E, Schmid J, Wilop S, *et al.* Epigenetic inactivation of secreted Frizzled-related proteins in acute myeloid leukaemia. Br J Haematol 2008; **142** (5):745-53.
- Juvonen E, Aimolahti A, Volin L, Ruutu T. The prognostic value of in vitro cultures of erythroid and megakaryocyte progenitors in myelodysplastic syndromes. Leuk Res 1999; **23** (10):889-94.
- Kahlert C, Weber H, Mogler C, *et al.* Increased expression of ALCAM/CD166 in pancreatic cancer is an independent prognostic marker for poor survival and early tumour relapse. Br J Cancer 2009; **101** (3):457-64.
- Katoh Y, Katoh M. Hedgehog signaling pathway and gastrointestinal stem cell signaling network (review). Int J Mol Med 2006a; **18** (6):1019-23.
- Katoh Y, Katoh M. WNT antagonist, SFRP1, is Hedgehog signaling target. Int J Mol Med 2006b; **17** (1):171-5.
- Kawakami K, Hirata H, Yamamura S, *et al.* Functional significance of Wnt inhibitory factor-1 gene in kidney cancer. Cancer Res 2009; **69** (22):8603-10.
- Kawano Y, Kypta R. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. J Cell Sci 2003; **116** (Pt 13):2627-34.
- Khan NI, Bendall LJ. Role of WNT signaling in normal and malignant hematopoiesis. Histol Histopathol 2006; **21** (7):761-74.
- Kim M, Lee HC, Tsedensodnom O, *et al.* Functional interaction between Wnt3 and Frizzled-7 leads to activation of the Wnt/beta-catenin signaling pathway in hepatocellular carcinoma cells. J Hepatol 2008; **48** (5):780-91.
- Kirikoshi H, Sekihara H, Katoh M. Molecular cloning and characterization of human WNT11. Int J Mol Med 2001; **8** (6):651-6.
- Kirstetter P, Anderson K, Porse BT, Jacobsen SE, Nerlov C. Activation of the canonical Wnt pathway leads to loss of hematopoietic stem cell repopulation and multilineage differentiation block. Nat Immunol 2006; **7** (10):1048-56.

Knudson AG, Jr. Heredity and human cancer. Am J Pathol 1974; 77 (1):77-84.

- Ko J, Ryu KS, Lee YH, *et al.* Human secreted frizzled-related protein is down-regulated and induces apoptosis in human cervical cancer. Exp Cell Res 2002; **280** (2):280-7.
- Kokolus K, Nemeth MJ. Non-canonical Wnt signaling pathways in hematopoiesis. Immunol Res 2010; **46** (1-3):155-64.
- Komor M, Guller S, Baldus CD, et al. Transcriptional profiling of human hematopoiesis during in vitro lineage-specific differentiation. Stem Cells 2005; 23 (8):1154-69.
- Korinek V, Barker N, Morin PJ, *et al.* Constitutive transcriptional activation by a betacatenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. Science 1997; **275** (5307):1784-7.
- Kristiansen G, Pilarsky C, Wissmann C, *et al.* ALCAM/CD166 is up-regulated in lowgrade prostate cancer and progressively lost in high-grade lesions. Prostate 2003; **54** (1):34-43.
- Kulasingam V, Zheng Y, Soosaipillai A, et al. Activated leukocyte cell adhesion molecule: a novel biomarker for breast cancer. Int J Cancer 2009; **125** (1):9-14.
- Kuo M, Crundwell MC, Knowles MA, et al. Allelic deletion at 8p11.2 is a frequent event in head and neck cancer and identifiable using FISH on tumour imprints. Br J Surg 1998; **85**:1563.
- Kurotaki H, Tsushima Y, Nagai K, Yagihashi S. Apoptosis, bcl-2 expression and p53 accumulation in myelodysplastic syndrome, myelodysplastic-syndrome-derived acute myelogenous leukemia and de novo acute myelogenous leukemia. Acta Haematol 2000; **102** (3):115-23.
- Langemeijer SM, Kuiper RP, Berends M, *et al.* Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. Nat Genet 2009; **41** (7):838-42.
- Lavie L, Kitova M, Maldener E, Meese E, Mayer J. CpG methylation directly regulates transcriptional activity of the human endogenous retrovirus family HERV-K(HML-2). J Virol 2005; **79** (2):876-83.
- Lichtman MA. The relationship of stromal cells to hemopoietic cells in marrow. Kroc Found Ser 1984; **18**:3-29.
- Liu TH, Raval A, Chen SS, *et al.* CpG island methylation and expression of the secreted frizzled-related protein gene family in chronic lymphocytic leukemia. Cancer Res 2006; **66** (2):653-8.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods 2001; **25** (4):402-8.
- Lo PK, Mehrotra J, D'Costa A, *et al.* Epigenetic suppression of secreted frizzled related protein 1 (SFRP1) expression in human breast cancer. Cancer Biol Ther 2006; **5** (3):281-6.
- Lu D, Zhao Y, Tawatao R, *et al.* Activation of the Wnt signaling pathway in chronic lymphocytic leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A 2004; **101** (9):3118-23.
- Maurer AB, Ganser A, Buhl R, *et al.* Restoration of impaired cytokine secretion from monocytes of patients with myelodysplastic syndromes after in vivo treatment with GM-CSF or IL-3. Leukemia 1993; **7** (11):1728-33.
- Merchav S, Wagemaker G, Souza LM, Tatarsky I. Impaired response of myelodysplastic marrow progenitors to stimulation with recombinant haemopoietic growth factors. Leukemia 1991; **5** (4):340-6.
- Mihara K, Takihara Y, Kimura A. Genetic and epigenetic alterations in myelodysplastic syndrome. Cytogenet Genome Res 2007; **118** (2-4):297-303.
- Mikesch JH, Steffen B, Berdel WE, Serve H, Muller-Tidow C. The emerging role of Wnt signaling in the pathogenesis of acute myeloid leukemia. Leukemia 2007; **21** (8):1638-47.
- Mikheev AM, Mikheeva SA, Liu B, Cohen P, Zarbl H. A functional genomics approach for the identification of putative tumor suppressor genes: Dickkopf-1 as suppressor of HeLa cell transformation. Carcinogenesis 2004; **25** (1):47-59.
- Mills KI, Kohlmann A, Williams PM, *et al.* Microarray-based classifiers and prognosis models identify subgroups with distinct clinical outcomes and high risk of AML transformation of myelodysplastic syndrome. Blood 2009; **114** (5):1063-72.
- Momparler RL, Bovenzi V. DNA methylation and cancer. J Cell Physiol 2000; **183** (2):145-54.
- Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, et al. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. Science 1997; **275** (5307):1787-90.
- Mullighan CG. TET2 mutations in myelodysplasia and myeloid malignancies. Nat Genet 2009; **41** (7):766-7.
- Musolino C, Sant'antonio E, Penna G, *et al.* Epigenetic therapy in myelodysplastic syndromes. Eur J Haematol 2010.
- Nagayama S, Yamada E, Kohno Y, *et al.* Inverse correlation of the up-regulation of FZD10 expression and the activation of beta-catenin in synchronous colorectal tumors. Cancer Sci 2009; **100** (3):405-12.
- Nakamura N, Takenaga K. Hypomethylation of the metastasis-associated S100A4 gene correlates with gene activation in human colon adenocarcinoma cell lines. Clin Exp Metastasis 1998; **16** (5):471-9.
- Nelissen JM, Peters IM, de Grooth BG, van KY, Figdor CG. Dynamic regulation of activated leukocyte cell adhesion molecule-mediated homotypic cell adhesion through the actin cytoskeleton. Mol Biol Cell 2000; **11** (6):2057-68.
- Nolte F, Hofmann WK. Myelodysplastic syndromes: molecular pathogenesis and genomic changes. Ann Hematol 2008; **87** (10):777-95.

- Ofori-Acquah SF, King JA. Activated leukocyte cell adhesion molecule: a new paradox in cancer. Transl Res 2008; **151** (3):122-8.
- Oshimo Y, Nakayama H, Ito R, *et al.* Promoter methylation of cyclin D2 gene in gastric carcinoma. Int J Oncol 2003; **23** (6):1663-70.
- Paquette RL, Landaw EM, Pierre RV, *et al.* N-ras mutations are associated with poor prognosis and increased risk of leukemia in myelodysplastic syndrome. Blood 1993; **82** (2):590-9.
- Parker JE, Mufti GJ. Ineffective haemopoiesis and apoptosis in myelodysplastic syndromes. Br J Haematol 1998; **101** (2):220-30.
- Parker JE, Mufti GJ. Excessive apoptosis in low risk myelodysplastic syndromes (MDS). Leuk Lymphoma 2000; **40** (1-2):1-24.
- Parker JE, Mufti GJ, Rasool F, *et al.* The role of apoptosis, proliferation, and the Bcl-2related proteins in the myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia secondary to MDS. Blood 2000; **96** (12):3932-8.
- Passegue E, Jamieson CH, Ailles LE, Weissman IL. Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? Proc Natl Acad Sci U S A 2003; **100 Suppl 1**:11842-9.
- Pehlivan M, Sercan Z, Sercan HO. sFRP1 promoter methylation is associated with persistent Philadelphia chromosome in chronic myeloid leukemia. Leuk Res 2009; **33** (8):1062-7.
- Plass C. Cancer epigenomics. Hum Mol Genet 2002; 11 (20):2479-88.
- Polakis P. Wnt signaling and cancer. Genes Dev 2000; 14 (15):1837-51.
- Pruitt K, Zinn RL, Ohm JE, *et al.* Inhibition of SIRT1 reactivates silenced cancer genes without loss of promoter DNA hypermethylation. PLoS Genet 2006; **2** (3):e40.
- Raj K, John A, Ho A, *et al.* CDKN2B methylation status and isolated chromosome 7 abnormalities predict responses to treatment with 5-azacytidine. Leukemia 2007; 21 (9):1937-44.
- Rajapaksa R, Ginzton N, Rott LS, Greenberg PL. Altered oncoprotein expression and apoptosis in myelodysplastic syndrome marrow cells. Blood 1996; **88** (11):4275-87.
- Raza A, Mundle S, Iftikhar A, et al. Simultaneous assessment of cell kinetics and programmed cell death in bone marrow biopsies of myelodysplastics reveals extensive apoptosis as the probable basis for ineffective hematopoiesis. Am J Hematol 1995; 48 (3):143-54.
- Raza A, Mundle S, Shetty V, et al. Novel insights into the biology of myelodysplastic syndromes: excessive apoptosis and the role of cytokines. Int J Hematol 1996;
 63 (4):265-78.

- Razin A, Feldmesser E, Kafri T, Szyf M. Cell specific DNA methylation patterns; formation and a nucleosome locking model for their function. Prog Clin Biol Res 1985; 198:239-53.
- Reya T. Regulation of hematopoietic stem cell self-renewal. Recent Prog Horm Res 2003; **58**:283-95.
- Robertson KD. DNA methylation and human disease. Nat Rev Genet 2005; 6 (8):597-610.
- Roman-Gomez J, Cordeu L, Agirre X, *et al.* Epigenetic regulation of Wnt-signaling pathway in acute lymphoblastic leukemia. Blood 2007; **109** (8):3462-9.
- Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Agirre X, *et al.* Transcriptional silencing of the Dickkopfs-3 (Dkk-3) gene by CpG hypermethylation in acute lymphoblastic leukaemia. Br J Cancer 2004; **91** (4):707-13.
- Ropero S, Esteller M. The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. Mol Oncol 2007; **1** (1):19-25.
- Saberwal G, Broderick E, Janssen I, *et al.* Involvement of cyclin D1 and E2F1 in intramedullary apoptosis in myelodysplastic syndromes. J Hematother Stem Cell Res 2003; **12** (4):443-50.
- Saitoh T, Hirai M, Katoh M. Molecular cloning and characterization of human Frizzled-5 gene on chromosome 2q33.3-q34 region. Int J Oncol 2001; **19** (1):105-10.
- Sala CF, Formenti E, Terstappen GC, Caricasole A. Identification, gene structure, and expression of human frizzled-3 (FZD3). Biochem Biophys Res Commun 2000; **273** (1):27-34.
- Scheller M, Huelsken J, Rosenbauer F, *et al.* Hematopoietic stem cell and multilineage defects generated by constitutive beta-catenin activation. Nat Immunol 2006; **7** (10):1037-47.
- Schoch C, Kohlmann A, Schnittger S, *et al.* Acute myeloid leukemias with reciprocal rearrangements can be distinguished by specific gene expression profiles. Proc Natl Acad Sci U S A 2002; **99** (15):10008-13.
- Sercan Z, Pehlivan M, Sercan HO. Expression profile of WNT, FZD and sFRP genes in human hematopoietic cells. Leuk Res 2010; **34** (7):946-9.
- Shi Y, He B, You L, Jablons DM. Roles of secreted frizzled-related proteins in cancer. Acta Pharmacol Sin 2007; **28** (9):1499-504.
- Shih LY, Huang CF, Wang PN, *et al.* Acquisition of FLT3 or N-ras mutations is frequently associated with progression of myelodysplastic syndrome to acute myeloid leukemia. Leukemia 2004; **18** (3):466-75.
- Shih YL, Shyu RY, Hsieh CB, *et al.* Promoter methylation of the secreted frizzledrelated protein 1 gene SFRP1 is frequent in hepatocellular carcinoma. Cancer 2006; **107** (3):579-90.

- Simon M, Grandage VL, Linch DC, Khwaja A. Constitutive activation of the Wnt/betacatenin signalling pathway in acute myeloid leukaemia. Oncogene 2005; **24** (14):2410-20.
- Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. Nature 1990; **346** (6283):425-34.
- Staal FJ, Clevers HC. WNT signalling and haematopoiesis: a WNT-WNT situation. Nat Rev Immunol 2005; **5** (1):21-30.
- Strichman-Almashanu LZ, Lee RS, Onyango PO, *et al.* A genome-wide screen for normally methylated human CpG islands that can identify novel imprinted genes. Genome Res 2002; **12** (4):543-54.
- Sun L, Hui AM, Kanai Y, Sakamoto M, Hirohashi S. Increased DNA methyltransferase expression is associated with an early stage of human hepatocarcinogenesis. Jpn J Cancer Res 1997; **88** (12):1165-70.
- Suzuki H, Gabrielson E, Chen W, *et al.* A genomic screen for genes upregulated by demethylation and histone deacetylase inhibition in human colorectal cancer. Nat Genet 2002; **31** (2):141-9.
- Suzuki H, Toyota M, Carraway H, et al. Frequent epigenetic inactivation of Wnt antagonist genes in breast cancer. Br J Cancer 2008; **98** (6):1147-56.
- Suzuki H, Toyota M, Nojima M, Mori M, Imai K. [SFRP, a family of new colorectal tumor suppressor candidate genes]. Nippon Rinsho 2005; **63** (4):707-19.
- Swart GW. Activated leukocyte cell adhesion molecule (CD166/ALCAM): developmental and mechanistic aspects of cell clustering and cell migration. Eur J Cell Biol 2002; **81** (6):313-21.
- Swart GW, Lunter PC, Kilsdonk JW, Kempen LC. Activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM/CD166): signaling at the divide of melanoma cell clustering and cell migration? Cancer Metastasis Rev 2005; **24** (2):223-36.
- Tauro S, Hepburn MD, Bowen DT, Pippard MJ. Assessment of stromal function, and its potential contribution to deregulation of hematopoiesis in the myelodysplastic syndromes. Haematologica 2001; **86** (10):1038-45.
- Terasaki H, Saitoh T, Shiokawa K, Katoh M. Frizzled-10, up-regulated in primary colorectal cancer, is a positive regulator of the. Int J Mol Med 2002; **9** (2):107-12.
- Tricot G, De Wolf-Peeters C, Vlietinck R, Verwilghen RL. Bone marrow histology in myelodysplastic syndromes. II. Prognostic value of abnormal localization of immature precursors in MDS. Br J Haematol 1984; 58 (2):217-25.
- Tsukamoto AS, Grosschedl R, Guzman RC, Parslow T, Varmus HE. Expression of the int-1 gene in transgenic mice is associated with mammary gland hyperplasia and adenocarcinomas in male and female mice. Cell 1988; **55** (4):619-25.

- Uchida N, Yang Z, Combs J, *et al.* The characterization, molecular cloning, and expression of a novel hematopoietic cell antigen from CD34+ human bone marrow cells. Blood 1997a; **89** (8):2706-16.
- Uchida T, Kinoshita T, Nagai H, *et al.* Hypermethylation of the p15INK4B gene in myelodysplastic syndromes. Blood 1997b; **90** (4):1403-9.
- Ueno K, Hazama S, Mitomori S, *et al.* Down-regulation of frizzled-7 expression decreases survival, invasion and metastatic capabilities of colon cancer cells. Br J Cancer 2009b; **101** (8):1374-81.
- Ueno K, Hazama S, Mitomori S, *et al.* Down-regulation of frizzled-7 expression decreases survival, invasion and metastatic capabilities of colon cancer cells. Br J Cancer 2009a; **101** (8):1374-81.
- Ugolini F, Charafe-Jauffret E, Bardou VJ, *et al.* WNT pathway and mammary carcinogenesis: loss of expression of candidate tumor suppressor gene SFRP1 in most invasive carcinomas except of the medullary type. Oncogene 2001; **20** (41):5810-7.
- Uren A, Reichsman F, Anest V, *et al.* Secreted frizzled-related protein-1 binds directly to Wingless and is a biphasic modulator of Wnt signaling. J Biol Chem 2000; **275** (6):4374-82.
- Valencia A, Roman-Gomez J, Cervera J, *et al.* Wnt signaling pathway is epigenetically regulated by methylation of Wnt antagonists in acute myeloid leukemia. Leukemia 2009; **23** (9):1658-66.
- Valent P, Wieser R. Update on genetic and molecular markers associated with myelodysplastic syndromes. Leuk Lymphoma 2009; **50** (3):341-8.
- Van de Loosdrecht AA, Vellenga E. Myelodysplasia and apoptosis: new insights into ineffective erythropoiesis. Med Oncol 2000; **17** (1):16-21.
- van Kempen LC, Meier F, Egeblad M, *et al.* Truncation of activated leukocyte cell adhesion molecule: a gateway to melanoma metastasis. J Invest Dermatol 2004; **122** (5):1293-301.
- van Kempen LC, Nelissen JM, Degen WG, *et al.* Molecular basis for the homophilic activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM)-ALCAM interaction. J Biol Chem 2001; **276** (28):25783-90.
- Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. Blood 2002; **100** (7):2292-302.
- Verma A, Shukla NK, Deo SV, Gupta SD, Ralhan R. MEMD/ALCAM: a potential marker for tumor invasion and nodal metastasis in esophageal squamous cell carcinoma. Oncology 2005; 68 (4-6):462-70.
- Visani G, Zauli G, Tosi P, et al. Impairment of GM-CSF production in myelodysplastic syndromes. Br J Haematol 1993; **84** (2):227-31.

- von Schilling C, Günther C, Haferlach T, Ruelfs T, Lipp T. Myelodysplastische Syndrome (MDS). MANUAL Leukämien, myelodysplastische und myeloproliferative Syndrome, 2003.
- Weichert W, Knosel T, Bellach J, Dietel M, Kristiansen G. ALCAM/CD166 is overexpressed in colorectal carcinoma and correlates with shortened patient survival. J Clin Pathol 2004; **57** (11):1160-4.
- Widelitz R. Wnt signaling through canonical and non-canonical pathways: recent progress. Growth Factors 2005; 23 (2):111-6.
- Wodarz A, Nusse R. Mechanisms of Wnt signaling in development. Annu Rev Cell Dev Biol 1998; **14**:59-88.
- Wulling M, Delling G, Kaiser E. The origin of the neoplastic stromal cell in giant cell tumor of bone. Hum Pathol 2003; **34** (10):983-93.
- Ysebaert L, Chicanne G, Demur C, *et al.* Expression of beta-catenin by acute myeloid leukemia cells predicts enhanced clonogenic capacities and poor prognosis. Leukemia 2006; **20** (7):1211-6.
- Zhang G, Slaughter C, Humphries EH. v-rel Induces ectopic expression of an adhesion molecule, DM-GRASP, during B-lymphoma development. Mol Cell Biol 1995; **15** (3):1806-16.
- Zhao CH, Bu XM, Zhang N. Hypermethylation and aberrant expression of Wnt antagonist secreted frizzled-related protein 1 in gastric cancer. World J Gastroenterol 2007; **13** (15):2214-7.
- Zhou XL, Qin XR, Zhang XD, Ye LH. Downregulation of Dickkopf-1 is responsible for high proliferation of breast cancer cells via losing control of Wnt/beta-catenin signaling. Acta Pharmacol Sin 2010; **31** (2):202-10.
- Zhou Z, Wang J, Han X, Zhou J, Linder S. Up-regulation of human secreted frizzled homolog in apoptosis and its down-regulation in breast tumors. Int J Cancer 1998; **78** (1):95-9.

LEBENSLAUF

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

Publikationen

Reins, J., Mossner, M., Neumann, M., Platzbecker, U., Schumann, C., Thiel, E., Hofmann, W.-K., Transcriptional down-regulation of the Wnt antagonist *SFRP1* in haematopoietic cells of patients with different risk types of MDS. Leukemia Research 2010; 34: 1610-1616.

Reins, J., Mossner, M., Richter, L., Kmetsch, A., Thiel, E., Haase, D., Hofmann, W.-K., DNA modifications by sodium bisulfite conversion followed by whole genome amplification have substantial impact on quantitative methylation analysis using pyrosequencing. BioTechniques 2010; In Revision

Heesch, S., Bartram, I., Neumann, M., **Reins, J**., Mossner, M., Schlee, C., Stroux, A., Haferlach, T., Goekbuget, N., Hoelzer, D., Hofmann, W.-K., Thiel, E., Baldus, C. Aberrant expression of IGFBP7 in acute leukemia is regulated by DNA methylation. Cancer Science 2011; Jan;102(1):253-9

Kongressbeiträge

Transcriptional down-regulation of the *Wnt*-antagonist *SFRP1* and its promoter methylation in bone marrow mononuclear cells from patients with different risk-types of MDS, ALL and AML. Reins, J., Mossner, M., Kmetsch, A., Platzbecker, U., Thiel, E., Hofmann, W.-K., Posterpräsentation, 14. Kongress der European Hematology Association (EHA), Juni 2009, Berlin

Does DNA modification by sodium bisulfite conversion followed by whole genome amplification impact on quantitative methylation analysis using pyrosequencing? Reins, J., Mossner, M., Richter, L., Haase, D., Kmetsch, A., Thiel, E., Hofmann, W.-K., Posterpräsentation, Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen, Österrreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie, Okober 2009, Mannheim

Transcriptional down-regulation of the Wnt antagonist *SFRP1* **in haematopoietic cells of patients with different risk-types of MDS, AML and ALL.** Reins, J., Mossner, M., Kmetsch, A., Platzbecker, U., Thiel, E., Hofmann, W.-K., Posterpräsentation, 51nd American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting and Exposition, Dezember 2009, New Orleans, USA

Transcriptional up-regulation of the activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM) in hematopoietic cells of patients with AML and different risk-types of MDS. Reins, J., Neumann, M., Nowak, D., Thiel, E., Hofmann, W.-K., Posterpräsentation, Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen, Österrreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie, Okober 2010, Berlin

Danksagung

Mein aufrichtiger Dank geht an Prof. Dr. Wolf-Karsten Hofmann, der es mir ermöglichte diese Doktorarbeit anzufertigen und mich während dieser Zeit stets unterstützte, wissenschaftlich betreute und inspirierte, auch über Berlins Grenzen hinaus. Zudem danke ich ihm für die unermüdliche Motivation und Förderung meiner Arbeit.

PD Dr. Claudia Baldus danke ich für die wissenschaftliche Weiterbetreuung, Hilfe und Kritik.

Dr. Daniel Nowak danke ich für die wissenschaftliche Vorbereitung und Einarbeitung in das Doktorarbeitsthema sowie für das entgegen gebrachte Vertrauen.

Ein großer Dank gilt vor allem den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der gesamten Arbeitsgruppe Hofmann/Baldus, die mich mit Rat und Tat unterstützt haben. Sie ermöglichten mir eine spannende Zusammenarbeit und eine schöne gemeinsame Zeit an der Charitè. Ein besonderer Dank geht dabei an Max Mossner, der stets ein offenes Ohr hatte, mich mit grenzenloser Hilfsbereitschaft unterstütze und sich mit höchster Genialität Problemen und Fragestellungen zuwandte. Des Weiteren möchte ich Martin Neumann für seine kollegiale Unterstützung und Sandra Heesch für ihre Erfahrungswerte, Anregungen, gemeinsamen "Abendbrote" und das Teilen des "Leides" während der Doktorarbeitszeit danken.

Mein größter Dank aber gilt meiner Familie insbesondere meinen Eltern, die mich seit ich denken kann in allem unterstützt und mir stets grenzenloses Vertrauen entgegengebracht haben. Danke, dass ihr mir so tolle Eltern seid!

Ohne die zwischenmenschliche und soziale Unterstützung meiner Freunde wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Sie gaben mir Ausgleich zum Laboralltag, teilten Erfolg und Leid und waren stets für mich da. Insbesondere möchte ich Katrin Wegner für unvergessliche 4 Jahre Vinetastr.1, Kristian Rabe für seine IT-Notfallversorgung, Ulrike Karbowski für ihre Geduld und Hagen Schlicke für seine unermüdliche Telefonierbereitschaft danken. Ihr seid die Besten!

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Biowissenschaften zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

"Molekularbiologische und funktionelle Charakterisierung von ALCAM und SFRP1 als mögliche Schlüsselgene der gestörten Hämatopoese beim Myelodysplastischen Syndrom"

in der Medizinischen Klinik III, Abteilung Hämatologie, Onkologie und Transfusionsmedizin des Charitè Universitätsklinikums Berlin, Campus Benjamin Franklin unter der Leitung von Prof. Dr. Wolf-Karsten Hofmann selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen biologischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden im Publikationsorgan Leukemia Research 2010; 34: 1610-1616 veröffentlicht.

Berlin, den 18. Oktober 2010

Dipl. Biol. Jana Reins