

Mechanismen der BCR/ABL-unabhängigen Resistenz gegenüber Imatinib und Nilotinib in der chronisch myeloischen Leukämie

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Meike Kähler

Kiel 2018

Erster Gutachter: Prof. Dr. Dr. Ingolf Cascorbi

Zweite Gutachterin: Prof. Dr. Manuela Dittmar

Tag der mündlichen Prüfung: 09. Oktober 2018

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
1.1 Chronisch myeloische Leukämie	1
1.1.1 Krankheitsbild & Inzidenz.....	1
1.1.2 Pathogenese.....	1
1.1.3 Aufbau und Funktion von BCR/ABL	3
1.2 Therapie der chronisch myeloische Leukämie	5
1.2.1 Wirkmechanismus.....	7
1.2.2 Tyrosinkinaseinhibitoren der neueren Generationen	8
1.3 Therapieresistenzen	9
1.3.1 BCR/ABL-abhängige Resistenzmechanismen.....	10
1.3.2 BCR/ABL-unabhängige Resistenzmechanismen	11
1.3.2.1 Arzneistofftransporter	11
I Rolle und Funktion von Arzneistofftransportern.....	11
II ABC-Transporter ABCG2.....	12
1.3.2.2 Veränderungen des Transkriptoms & alternative Signalwege	12
1.3.2.3 Epigenetische Veränderungen	13
1.3.2.4 Posttranskriptionelle Regulation	15
I Posttranskriptionelle Regulation durch microRNAs	15
II Bedeutung von microRNAs in der Onkologie	16
III ABCG2-bindende microRNAs	16
IV RNA-bindende Proteine	17
1.3.2.5 <i>Dormancy, Quiescence</i> & Leukämische Stammzellen	19
1.3.2.6 Klonale Evolution	21
1.4 Ziel & Fragestellung der vorliegenden Arbeit	24
2 Material	25
2.1 Geräte & Material	25
2.2 Chemikalien und Reagenzien	27
2.3 Kits	28

2.4 Antikörper	29
2.5 Chips	29
2.6 MicroRNAs	30
2.7 Plasmide	30
2.8 Primer	31
2.9 TaqMan-Assays	32
2.10 Zelllinien	33
2.11 Software/Websites	33
3 Methoden	34
3.1 Zellbiologische Methoden	34
3.1.1 Zellkultur.....	34
3.1.2 Bestimmung der Zellzahl und Mikroskopie.....	34
3.1.3 Einfrieren und Auftauen der Zellen.....	34
3.1.4 Kultivierung von Imatinib- und Nilotinib-resistenten Zellen.....	35
3.1.5 Transiente Transfektion.....	35
3.1.6 CRISPR/Cas9-Genomeditierung von <i>ZFP36L1</i> & <i>ZFP36L2</i>	36
3.1.6.1 Transfektion & Zellsort.....	36
3.1.6.2 Analyse der potentiellen Klone.....	37
3.1.6.3 Wiederherstellung der <i>ZFP36L1</i> & <i>ZFP36L2</i> -Expression in den <i>Knockout</i> -Zellen (<i>Rescue</i>).....	38
3.1.7 Apoptose-Assay.....	38
3.1.8 Analyse von Apoptose und Nekrose in Echtzeit.....	39
3.1.9 BrdU-Proliferationsassay.....	40
3.1.10 Messung der Zytotoxizität.....	41
3.1.11 Viabilitätsassay.....	41
3.1.12 Zelloberflächenfärbung.....	41
3.1.13 Transportassay.....	42
3.2 Molekularbiologische Methoden	43
3.2.1 Isolation der genomischen DNA.....	43
3.2.2 Polymerase-Ketten-Reaktion zur Mutationsanalyse.....	43
3.2.3 Agarose-Gelelektrophorese.....	43
3.2.4 Klonierung.....	43
3.2.5 RNA-Extraktion.....	44
3.2.6 Reverse Transkription.....	44
3.2.7 Quantitative <i>Real Time</i> - Polymerase-Ketten-Reaktion.....	45

3.2.8	Analyse der Genexpression mittels Microarrays	46
3.2.9	Genomweite Methylierungsanalyse	47
3.2.10	Exom-Sequenzierung.....	48
3.2.11	Sanger-Sequenzierung.....	48
3.3	Biochemische Methoden.....	49
3.3.1	Zelllyse.....	49
3.3.2	Proteinbestimmung.....	49
3.3.3	Western Blot.....	49
3.4	Statistik.....	50
4	Ergebnisse	51
4.1	Einfluss und Regulation von ABCG2 während der Imatinib-Resistenzentwicklung	52
4.1.1	Differenzielle Expression von ABCG2 während der Imatinib-Resistenzentwicklung	52
4.1.2	Effekte der miR-Inhibition auf Überleben und Apoptose Imatinib-sensitiver und Imatinib-resistenter Zellen	54
4.1.3	Effekte und Veränderungen Imatinib-sensitiver Zellen nach miR-212- Inhibition	57
4.1.4	Funktionelle Analyse der miR-212-Inhibition und des ABCG2-vermittelten Efflux	58
4.2	Rolle von ZFP36L1 & ZFP36L2 in der Imatinib-Resistenz.....	61
4.2.1	Expressionsveränderungen von ZFP36L1 und ZFP36L2 während der Imatinib- Resistenzentwicklung	61
4.2.2	Etablierung eines ZFP36L1 und ZFP36L2-Knockout mittels CRISPR/Cas9-Genomeditierung	62
4.2.3	Einfluss von ZFP36L1 bzw. ZFP36L2-Defizienz auf die Imatinib-Sensitivität	65
4.3	Transkriptionelle, genetische & epigenetische Veränderungen in der TKI-Resistenzentwicklung.....	73
4.3.1	Transkriptionelle Veränderungen in der Imatinib-Resistenz	74
4.3.1.1	Vergleich der biologischen Replikate der Imatinib-Resistenz.....	74
4.3.1.2	Vergleich der Genexpression von unbehandelten und Imatinib-resistenten Zellen ...	75
4.3.1.3	Transkriptionelle Veränderungen im Verlauf der Imatinib-Resistenzentwicklung	80

4.3.1.4 Validierung der differentiellen Expression potentieller Kandidatengene	87
4.3.2 Genetische Veränderungen während der Imatinib-Resistenzentwicklung.....	90
4.4 Vergleich der Imatinib- & Nilotinib-Resistenz	99
4.4.1 Transkriptionelle Veränderungen in der Nilotinib-Resistenz.....	99
4.4.2 Transkriptioneller Vergleich der Imatinib- und Nilotinib-Resistenz	103
4.4.3 Validierung der differentiellen Expression potentieller Kandidatengene.....	106
4.5 Epigenetische Analyse der Imatinib- & Nilotinib-Resistenz	108
4.5.1 Epigenetische Effekte in der Imatinib-Resistenz.....	110
4.5.2 Epigenetische Veränderungen in der Nilotinib-Resistenz.....	112
5 Diskussion	115
5.1 Kritische Betrachtung der in vitro-Analyse der TKI-Resistenz.....	115
5.2 Beitrag der miR-212/ABCG2-Achse in der Imatinib-Resistenz	116
5.2.1 Inhibition der miR-212 führt zu reduzierter Imatinib-Sensitivität.....	116
5.2.2 Beitrag der miR-212/ABCG2-Achse in der Progression der Imatinib-Resistenz	119
5.3 Einfluss der RNA-bindenden Proteine ZFP36L1 & ZFP36L2 in der	
Imatinib-Resistenz	120
5.3.1 Deletion der Zinkfingerdomänen in <i>ZFP36L1</i> und <i>ZFP36L2</i> mittels	
CRISPR/Cas9-Genomeditierung	121
5.3.2 Einfluss des <i>ZFP36L1</i> & <i>ZFP36L2-Knockout</i> während der	
Kurzzeit-Imatinib-Behandlung	122
5.3.3 Effekt des <i>ZFP36L1</i> & <i>ZFP36L2-Knockout</i> während der Langzeit-Imatinib-Behandlung.	125
5.4 Transkriptionelle, genetische und epigenetische Analyse der Imatinib- und	
Nilotinib-Resistenz.....	129
5.4.1 Transkriptionelle Veränderungen in der Imatinib-Resistenz.....	129
5.4.2 Dynamische Veränderungen der Transkription im Verlauf der Imatinib-Resistenz	132
5.4.3 Genetische Veränderungen in der Imatinib-Resistenz.....	134
5.4.4 Transkriptionelle Veränderungen in der Nilotinib-Resistenz	137
5.4.5 Epigenetische Analyse der Imatinib- und Nilotinib-Resistenz.....	140
5.4.6 Veränderungen der Methylierung in der Imatinib-Resistenz.....	141
5.4.7 Veränderungen der Methylierung in der Nilotinib-Resistenz	142

5.5 Zusammenfassung der Imatinib- und Nilotinib-Resistenzmechanismen	143
5.6 Ausblick	145
6 Zusammenfassung.....	147
7 Summary.....	149
8 Referenzen	151
9 Danksagung	171
10 Lebenslauf.....	172
11 Publikationsliste	174
12 Anhang.....	176
12.1 Sequenz der <i>BCR/ABL</i> -Kinasedomäne der TKI-resistenten Zellen	176
12.2 Sequenzen des <i>ZFP36L1</i> & <i>ZFP36L2-Knockout</i>	178
12.3 Exemplarische Darstellung der Ergebnisse des <i>STR-Profilings</i>	180
12.4 Vollständige <i>STRING</i> – und <i>KEGG-Pathway-Analyse</i>	182
12.5 Medien & Puffer	189
13 Erklärung.....	191

Abkürzungsverzeichnis

(c)DNA	(komplementäre) Desoxyribonukleinsäure
(e)GFP	<i>(enhanced) green fluorescent protein</i>
3' UTR	3' untranslatierte Region
5' UTR	5' untranslatierte Region
ABCB1	<i>ATP binding cassette subfamily B member 1</i>
ABCG2	<i>ATP binding cassette subfamily G member 2</i>
ABL	Abelson-Kinase
AGP	<i>alpha 1 acid glycoprotein</i>
AKT	Proteinkinase B
ALL	akute lymphoblastische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
ANOVA	<i>analysis of variances</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ARE	Adenosin-Uracil reiche Elemente
ARID5B	<i>AT rich interactive domain 5 B</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BCL-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BCR	<i>breakpoint cluster region</i>
BCRP	<i>breast cancer resistance protein</i>
CAS	<i>p130 CRK-associated substrate</i>
Cas9	<i>CRISPR-associated protein 9</i>
CCyR	<i>complete cytogenetic response</i> , komplette zytogenetische Remission
c-fms	<i>colony-stimulating factor 1 receptor</i>
c-Kit/CD117	<i>KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase</i>
CML	chronisch myeloische Leukämie
CMML	chronische myelomonozytische Leukämie
CMR	<i>complete molecular remission</i> , komplette molekulare Remission
CpG	Dinukleotid aus Cytosin-Phosphat-Guanin

CRISPR	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
CRKL	<i>CRK-like protein</i>
Ct, ΔCt	<i>threshold cycle, delta threshold cycle</i>
CYP3A4	<i>cytochrome P450 family 3 subfamily A member 4</i>
CYP3A5	<i>cytochrome P450 family 3 subfamily A member 5</i>
Dko	<i>Doppel-Knockout</i>
DMSO	<i>Dimethylsulfoxid</i>
DNMT	<i>DNA-Methyltransferase</i>
dNTPs	<i>Desoxynukleotidtriphosphate</i>
ds	<i>double-stranded, doppelsträngig</i>
EPHB6	<i>EPH receptor B6</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sort</i>
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
FCS	<i>fetal calf serum, fötales Kälberserum</i>
FITC	<i>Fluoresceinisothiocyanat</i>
FN1	<i>fibronectin 1</i>
GAB2	<i>GRB2-associated binding protein</i>
GAPDH	<i>Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase</i>
GDP	<i>Guanosindiphosphat</i>
GIST	<i>Gastrointestinaler Stromatumor</i>
GRB2	<i>growth factor receptor-bound protein</i>
gRNA	<i>guide RNA</i>
GTP	<i>Guanosintriphosphat</i>
HIPK2	<i>homeodomain interacting protein kinase 2</i>
Hs	<i>Homo sapiens</i>
HSP	<i>heat shock protein</i>
IGF1	<i>insulin-like growth factor 1</i>
IM	<i>Imatinib</i>
JAK	<i>Janus Kinase</i>

kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LNA	<i>locked nucleic acids</i>
LPS	Lipopolysaccharid
Mamm U6	mammalian U6 RNA
MAP	<i>mitogen activated protein</i>
MBD	<i>methyl-CpG binding domain</i>
MCyR	<i>minor cytogenetic response</i> , geringfügige zytogenetische Remission
MEM	<i>minimal essential medium</i>
miR, miRNA	microRNA
MMR	<i>major molecular response</i> , molekulare Remission
MRD	<i>minimal residual disease</i> , Minimale Resterkrankung
NAV2	<i>neuron navigator 2</i>
NBF	<i>nucleotide binding fold</i>
NC	Negativkontrolle
NES	<i>nuclear export sequence</i>
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
NMU	<i>neuromedin U</i>
ns	nicht signifikant
nt	Nukleotide
OCT-1	<i>organic cation transporter 1</i>
PAM	<i>protospacer adjacent motif</i>
P-bodies	<i>processing bodies</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PCyR	<i>partial cytogenetic response</i> , partielle zytogenetische Remission

PDGFR	<i>platelet-derived growth factor receptor</i>
P-gp	<i>permeability-glycoprotein</i>
Ph⁺	Philadelphia-Chromosom positiv
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PLA2G4A	<i>phospholipase A2, group IV A</i>
PS	Phosphatidylserin
PSQ	Pyrosequenzierung
PTPRB	<i>protein tyrosine phosphatase, receptor type B</i>
qRT-PCR	quantitative <i>real time</i> -Polymerase-Ketten-Reaktion
RAF	rapidly accelerated fibrosarcoma
RBMS1	<i>RNA binding motif, single stranded interacting protein 1</i>
RELN	<i>reelin</i>
RFU	<i>relative fluorescence units</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RLU	<i>relative light units</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RZ	Resistenzzüchtung
SAM	S-Adenosylmethionin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH2	SRC homology 2
SH3	SRC homology 3
SLC	<i>solute carrier family</i>
SLC22A1	<i>solute carrier family 22 member 1</i>
SNV	<i>single nucleotide variant</i>
SOS	<i>son of sevenless</i>
SRC	SRC Kinase (zusammengesetzt aus <i>cellular</i> und <i>sarcoma</i>)

SRGN	<i>serglycin</i>
ss	<i>single-stranded</i> , einzelsträngig
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
STRING	<i>Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins</i>
Taq	<i>thermus aquaticus</i>
TBST	<i>TRIS-buffered saline</i> + Tween 20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
TNF-α	<i>tumor necrosis factor alpha</i>
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSS	<i>transcription start side</i> , Transkriptionsstart
TTP	Tristetraprolin
U	Units
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
ZC3H12C	<i>zinc finger CCH-type containing 12 C</i>
ZFD	Zinkfingerdomäne
ZFP36	<i>zinc finger protein 36</i>
ZFP36L1	<i>zinc finger protein 36 C3H type-like 1</i>
ZFP36L2	<i>zinc finger protein 36 C3H1 type-like 2</i>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Translokation t(9;22)(q34;q11) zur Entstehung des Philadelphia-Chromosom und des BCR/ABL-Fusionsgens in der CML.....	2
Abbildung 2: BCR/ABL-abhängige Signalwege.....	4
Abbildung 3: Chemische Strukturen der in der CML eingesetzten Tyrosinkinaseinhibitoren der ersten Generation Imatinib und Nilotinib.....	8
Abbildung 4: BCR/ABL-abhängige und –unabhängige Resistenzmechanismen in der CML.....	9
Abbildung 5: Schematische Abbildung der DNA-Methylierung in Tumoren.....	14
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Entwicklung einer Tumormasse durch Tumorstammzellen.....	20
Abbildung 7: Schematische Darstellung der klonalen Evolution und Entstehung einer heterogenen Tumormasse.....	22
Abbildung 8: Schematische Darstellung des Ablaufs des CRISPR/Cas9-vermittelten <i>Knockout</i> der Zinkfingerdomänen von <i>ZFP36L1/ZFP36L2</i>	37
Abbildung 9: Schematische Abbildung des <i>in vitro</i> -Resistenzmodells der CML-Zelllinie K-562	51
Abbildung 10: <i>ABCG2</i> mRNA- und Proteinlevel von unbehandelten und Imatinib-resistenten Zellen (0,1; 0,3; 0,5 & 2 μ M IM)	53
Abbildung 11: MiR-212-abhängige Veränderungen der Imatinib-Sensitivität unbehandelter und Imatinib-resistenter Zellen (0,1; 0,3; 0,5 & 2 μ M)	55
Abbildung 12: MiR-328-abhängige Veränderungen der Imatinib-Sensitivität unbehandelter und Imatinib-resistenter Zellen (0,5 & 2 μ M IM)	56
Abbildung 13: Zeit- und Konzentrationsabhängige Effekte der miR-212-Inhibition in unbehandelten K-562-Zellen	58
Abbildung 14: Effekte der miR-212-Inhibition auf die <i>ABCG2</i> -Proteinexpression.....	59
Abbildung 15: Effekte der miR-212-Inhibition auf den <i>ABCG2</i> -vermittelten Transport	60
Abbildung 16: <i>ZFP36L1/ZFP36L2</i> mRNA- und Proteinexpression während der Imatinib-Resistenzentwicklung.	62
Abbildung 17: Schematische Darstellung der <i>ZFP36L1</i> & <i>ZFP36L2</i> -Knockoutzelllinien.	63
Abbildung 18: Nachweis der Deletion der Zinkfingerdomänen in <i>ZFP36L1</i> sowie <i>ZFP36L2</i> nach CRISPR/Cas9-Genomeditionierung (<i>Knockout</i>) sowie nach Wiederherstellung der <i>ZFP36L1/ZFP36L2</i> -Expression (<i>Rescue</i>).....	64
Abbildung 19: Mikroskopische Analyse der <i>ZFP36L1/ZFP36L2</i> -Knockout-Zellen im Vergleich zu unbehandelten K-562-Zellen	65
Abbildung 20: Imatinib-Sensitivität im <i>ZFP36L1</i> & <i>ZFP36L2</i> -Knockout- und <i>Rescue</i>	67
Abbildung 21: Veränderung der Proliferation der <i>ZFP36L1</i> & <i>ZFP36L2</i> -Knockout-Zellen unter Imatinib-Behandlung mit 0,1 & 0,3 μ M	68
Abbildung 22: Analyse der Apoptose und Nekrose der <i>ZFP36L1</i> & <i>ZFP36L2</i> -Knockout-Zellen während der Imatinib-Behandlung mit 0,1 & 0,3 μ M IM.	70
Abbildung 23: Mikroskopische Analyse der Effekte des <i>ZFP36L1/ZFP36L2</i> -Knockout während der Imatinib-Resistenzzüchtung.	71
Abbildung 24: Ablauf der Genexpressionsanalyse der Imatinib-Resistenz	75
Abbildung 25: Venn-Diagramm der differenziell exprimierten Gene des Vergleichs der K-562 vs. K-562 ^{0,5} und K-562 ²	76

Abbildung 26: Cluster-Analyse nach Spearman-Rank-Korrelation der in der Imatinib-Resistenz differenziell exprimierten Gene (K-562 vs. K-562 ^{0,5} und K-562 ²).	78
Abbildung 27: STRING-Analyse der in der Imatinib-Resistenz konzentrationsunabhängig differenziell exprimierten Gene (K-562 ^{0,5} & K-562 ²)	79
Abbildung 28: Ablauf der Untersuchung der im Verlauf der Imatinib-Resistenzentwicklung differenziell exprimierten Gene	80
Abbildung 29: Venn-Diagramm der im Verlauf der Imatinib-Resistenzentwicklung differenziell exprimierten mRNAs (K-562 vs. K-562 ^{0,5} vs. K-562 ²)	81
Abbildung 30: Cluster-Analyse nach Spearman-Rank-Korrelation der im Verlauf der Imatinib-Resistenz dynamisch exprimierten Gene (K-562 vs. K-562 ^{0,5} vs. K-562 ²)	83
Abbildung 31: Bestätigung der Genexpression der potentiellen Kandidatengene mit differenzieller Expression in bzw. während der Imatinib-Resistenz (0,5; 2 μ M) mittels qRT-PCR.	88
Abbildung 32: SNV-Muster der detektierten Punktmutationen in unbehandelten und Imatinib-resistenten Zellen (0,5 & 2 μ M)	90
Abbildung 33: SNV 96-Plot zur Analyse des bevorzugten Basenkontexts der SNVs	91
Abbildung 34: Bevorzugtes Auftreten der SNVs am transkribierten oder untranskribierten DNA-Strang im Vergleich der Imatinib-Resistenzzüchtungen (0,5; 2 μ M) mit unbehandelten Zellen	92
Abbildung 35: Tumorsignaturen der unbehandelten und Imatinib-resistenten Zelllinien.	93
Abbildung 36: Analyse der Allelfrequenz der SNVs in den biologischen Replikaten der Imatinib-Resistenz	95
Abbildung 37: Ablauf der Genexpressionsanalyse zum Vergleich der Imatinib- (K-562 ²) und Nilotinib-Resistenz (K-562 ^N)	100
Abbildung 38: Cluster-Analyse nach Spearman-Rank-Korrelation der in der Nilotinib-Resistenz (K-562 ^N) differenziell exprimierten Gene. Abgebildet sind die signifikanten mRNAs mit einem <i>fold change</i> ± 3 und korrigiertem p-Wert $p < 0,05$	102
Abbildung 39: STRING-Analyse der in Nilotinib-Resistenz differenziell exprimierten Gene.	102
Abbildung 40: Venn-Diagramm der in der Imatinib (K-562 ²) und Nilotinib-Resistenz (K-562 ^N) differenziell exprimierten Gene	104
Abbildung 41: Bestätigung der differenziellen Expression der potentiellen Kandidatengene mittels qRT-PCR.	107
Abbildung 42: Circos-Plot der differenziell methylierten CpGs in der Imatinib- (K-562 ² ; Mitte) & Nilotinib-Resistenz (K-562 ^N ; innen)	109
Abbildung 43: Schematische Darstellung des Ablaufs der Analyse der Methylierung sowie Verteilung der in den K-562 ² differenziell methylierten CpGs, die differenziell exprimierten Genen zugeordnet werden konnten.	110
Abbildung 44: Schematische Darstellung der Analyse der Methylierung sowie Verteilung der assoziierten CpGs in der Nilotinib-Resistenz (K-562 ^N).	113
Abbildung 45: Modell der miR-212/ABCG2-Achse in der Entwicklung der Imatinib-Resistenz.	117
Abbildung 46: Modell des zugrundeliegenden Mechanismus hinter den Effekten des <i>ZFP36L1/ZFP36L2-Knockout</i> während der Kurzzeit-Imatinib-Behandlung	123
Abbildung 47: Schematische Zusammenfassung der Effekte der <i>ZFP36L1</i> - und <i>ZFP36L2-Knockout</i> während der Imatinib-Resistenzentwicklung	127
Abbildung 48: Modell der Imatinib-Resistenzentwicklung	144

Abbildung 49: Modell der Nilotinib-Resistenzentwicklung.....	145
Abbildung 50: <i>Short tandem repeat</i> -Analyse zur Erstellung eines genetischen <i>Fingerprints</i> der K-562-Zellen.	180
Abbildung 51: <i>Short tandem repeat</i> -Analyse zur Erstellung eines genetischen <i>Fingerprints</i> der 0,5 μ M Imatinib-resistenten K-562-Zellen der 1. Resistenzzüchtung	180
Abbildung 52: <i>Short tandem repeat</i> -Analyse zur Erstellung eines genetischen <i>Fingerprints</i> der 2 μ M Imatinib-resistenten K-562-Zellen der 1. Resistenzzüchtung	181
Abbildung 53: <i>Short tandem repeat</i> -Analyse zur Erstellung eines genetischen <i>Fingerprints</i> der 100 nM Nilotinib-resistenten K-562-Zellen der 1. Resistenzzüchtung.....	181
Abbildung 54: STRING-Analyse der differenziell regulierten Gene während der Entstehung der Imatinib-Resistenz aus dem Vergleich von K-562 und K-562 ^{0,5}	182

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete primäre & sekundäre Antikörper.....	29
Tabelle 2: Tabellarische Auflistung der verwendeten microRNA-mimics (pre-miRs) oder -inhibitoren (anti-miR, power inhibitor) sowie Negativkontrollen.	30
Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Plasmide.	30
Tabelle 4: Tabellarische Auflistung der verwendeten Primer.	31
Tabelle 5: Liste der für die Genexpressionsanalyse verwendeten TaqMan-Assays.	32
Tabelle 6: Verwendete microRNA-TaqMan-Assays.	32
Tabelle 7: Anzahl der differenziell exprimierten Gene in den biologischen Replikaten der Imatinib-Resistenzzüchtungen.	74
Tabelle 8: KEGG-Pathways mit assoziierten in der Imatinib-Resistenz konzentrationsunabhängig differenziell exprimierten Genen (K-562 vs. K-562 ^{0,5} und K-562 ²).	78
Tabelle 9: Im Verlauf der Imatinib-Resistenz dynamisch exprimierte Gene mit einem <i>fold change</i> ± 3 und korrigiertem p-Wert $< 0,05$	83
Tabelle 10: KEGG-Pathway-Analyse mit assoziierten differenziell exprimierten Genen aus dem Vergleich von K-562 mit K-562 ^{0,5}	85
Tabelle 11: Differenzielle exprimierte Gene aus dem Vergleich der K-562 ^{0,5} und K-562 ²	86
Tabelle 12: Anzahl der SNVs in den biologischen Replikaten der Imatinib-Resistenz.....	94
Tabelle 13: Liste der in den K-562 ² -Zellen angereicherten SNVs aus beiden Imatinib- Resistenzzüchtungen.....	97
Tabelle 14: Anzahl der differenziell exprimierten Gene in den biologischen Replikaten der Nilotinib-Resistenzzüchtung (K-562 ^N) mit <i>fold change</i> $> \pm 3$ und korrigiertem p-Wert $p < 0,05$	99
Tabelle 15: KEGG-Pathway-Analyse mit zugeordneten differenziell exprimierten Genen aus dem Vergleich der K-562 mit K-562 ^N	103
Tabelle 16: Auswahl der gemeinsam in den K-562 ² und K-562 ^N differenziell exprimierten Gene mit einem <i>fold change</i> ± 3 und korrigiertem p-Wert $p < 0,05$ in mindestens einer Zelllinie.	105
Tabelle 17: Vergleich der Veränderungen der Methylierung in den biologischen Replikaten der Imatinib & Nilotinib-Resistenz.	108
Tabelle 18: Liste der in den K-562 ² differenziell exprimierten Gene, für die differenziell methylierte CpGs in der Promotorregion assoziiert werden konnten	111
Tabelle 19: Liste der in der Nilotinib-Resistenz differenziell exprimierten Gene, für die differenziell methylierte CpGs in der Promotorregion assoziiert werden konnten	114
Tabelle 20: Differenziell exprimierte Gene der Imatinib-Resistenz (K562 vs. K-562 ^{0,5} ; K-562 ²).....	183
Tabelle 21: Differenziell exprimierte Gene aus dem Vergleich der K-562 und K-562 ^{0,5} -Zellen, die KEGG-Pathways zugeordnet werden konnten.	184
Tabelle 22: Liste der differenziell exprimierten Gene, für die differenziell methylierte CpGs assoziiert werden konnten	186
Tabelle 23: Differenziell exprimierte Gene aus dem Vergleich K-562 vs. K-562 ^N , die KEGG- Pathways oder denen differenziell methylierte CpGs zugeordnet werde konnten.	188

1 Einleitung

1.1 Chronisch myeloische Leukämie

1.1.1. Krankheitsbild & Inzidenz

Die myeloproliferative Neoplasie chronisch myeloische Leukämie (CML), die 1845 zeitgleich von Rudolf Virchow und John Hughes Bennett durch die Akkumulation der weißen Blutzellen beschrieben wurde, ist eine maligne onkologische Erkrankung des hämatopoetischen Systems. Dabei kommt es zu einer Akkumulation reifer, während der Progression auch undifferenzierter neutrophiler Granulozyten, einer Leukozytose mit Linksverschiebung, Basophilie und Splenomegalie. CML entwickelt sich in einem dreistufigen Prozess, von einer mehrjährigen chronischen Phase mit anschließender mehrmonatiger akzelerierter Phase und finaler Blastenkrise, die häufig innerhalb von wenigen Wochen tödlich endet [1, 2]. Die chronische Phase zeichnet sich zunächst durch Anämie, Gewichtsverlust, Fieber und Nachtschweiß aus, wobei ca. 50 % der Patienten asymptomatisch bleiben [3]. Im Laufe der Progression in der akzelerierten Phase treten durch die Splenomegalie bedingte Schmerzen im linken Oberbauch auf. Es kommt zudem zu einer verstärkten Leukozytose und Akkumulation unreifer Blutzellen. In der letzten Phase, der Blastenkrise, ähnelt das Krankheitsbild dem einer akuten Leukämie mit >30 % unreifer Blasten im Blut und Knochenmark und dadurch bedingter Hemmung der physiologischen Hämatopoese, Infektanfälligkeit, Anämie und Blutungen [4].

Insgesamt handelt es sich bei der CML mit einer Inzidenz von 1:100.000 Einwohner in Europa um eine seltene Neoplasie, die jedoch ca. 25 % aller Leukämien ausmacht [5]. Dabei tritt die CML hauptsächlich bei Erwachsenen im Alter zwischen 50 und 60 Jahren auf [6].

1.1.2. Pathogenese

Im Gegensatz zu vielen anderen Neoplasien mit heterogenen Mutationsmustern und Aberrationen handelt es sich bei der CML um eine homogene Erkrankung, die durch die reziproke Translokation $t(9;22)(q34;q11)$ entsteht. Dabei wird ein Teil des q-Arms des Chromosom 9 auf Chromosom 22 übertragen [7], wodurch das sogenannte Philadelphia-Chromosom, das aberrante Chromosom 22, entsteht, welches nach dem Ort der Entdeckung durch Nowell & Hungerford 1960 benannt ist [8]. Dieses Philadelphia-Chromosom kann bei ca. 95 % aller CML-Fälle nachgewiesen werden und ist daher charakteristisch mit der CML

assoziiert. Durch die Translokation entsteht auf dem Philadelphia-Chromosom ein Fusionsgen aus den Genen *BCR* und *ABL* (eigentlich *ABL1*, im Folgenden *ABL* genannt).

Bei *BCR* handelt es sich um das *breakpoint cluster region*-Gen, einer Bruchpunkt-reichen Region auf Chromosom 22, dessen physiologische Funktion weitgehend unklar ist. Bei *ABL*, kurz für das 230 kb-große Gen der *Abelson*-Kinase, physiologisch auf Chromosom 9 kodiert, handelt es sich um eine zytosolische Tyrosinkinase, die eine große Relevanz in der Regulation von Wachstum und Mitose hat. Durch die Fusion von *BCR* und *ABL* auf dem Philadelphia-Chromosom entsteht das *BCR/ABL*-Fusionsprotein (Abb. 1).

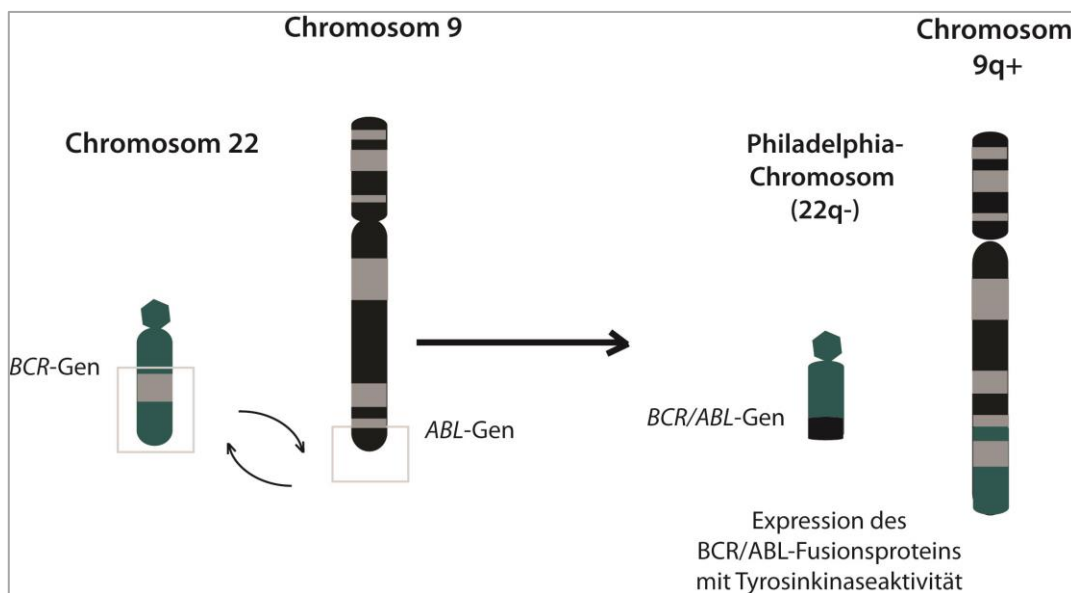


Abbildung 1: Translokation $t(9;22)(q34;q11)$ zur Entstehung des Philadelphia-Chromosom und des *BCR/ABL*-Fusionsgens in der CML. Der q-Arm des Chromosom 9 mit dem dort kodierten *ABL*-Gen wird auf das Chromosom 22 mit kodiertem *BCR*-Gen transloziert, wodurch das Philadelphia-Chromosom mit fehlendem q-Arm (22q-) sowie das Chromosom 9q+ entstehen. Das so entstandene *BCR/ABL*-Fusionsgen auf dem Philadelphia-Chromosom kodiert für die *BCR/ABL*-Tyrosinkinase. Modifiziert nach (Mughal, 2003).

Da *BCR* unter der transkriptionellen Kontrolle eines starken Promotors steht, führt die Translokation von *ABL* an das *BCR*-Gen auf Chromosom 22 zur konstitutiven Expression des *BCR/ABL*-Fusionsproteins. Physiologisch ist die Expression von *ABL* streng reguliert, ein Zustand, der in der CML entartet. Die konstitutive Expression und Aktivierung von *BCR/ABL* führt zur malignen Transformation der Zellen.

1.1.3 Aufbau und Funktion von BCR /ABL

Das BCR/ABL-Fusionsprotein setzt sich aus dem BCR-Protein und der Tyrosinkinase ABL zusammen. Bei BCR handelt es sich um ein Phosphoprotein, welches N-terminal die Aktivität einer Serin/Threonin-Kinase, sowie C-terminal die Domäne eines *GTPase-activating proteins for p21^{rac}*, eines Guanosinnukleotidaustauschfaktors für p21, besitzt [10, 11]. Daneben sind noch weitere Domänen zur Bindung von Adaptorproteinen vorhanden (siehe unten).

Die Tyrosinkinase ABL besteht aus 2 Bereichen, dem N-terminalen *N-lobe* und dem größeren C-terminalen *C-lobe*, die durch eine *hinge*-Region miteinander verbunden sind. Der *N-lobe* besteht aus einem β -Faltblatt und einer α -Helix (Helix α C), sowie *SRC homology* (SH2 und SH3)-Domänen, die die Tyrosinkinaseaktivität regulieren [12]. Die beiden Stränge des β -Faltblatts im *N-lobe* sind durch einen Glycin-reichen *P-loop* verbunden, der zur Bindung des ATP beiträgt. Im *C-lobe* befindet sich das katalytische Zentrum an dem die Phosphatübertragung an Zielproteine stattfindet. Ebenso ist hier der *activation loop* mit konserviertem DFG-Motiv (Aspartat, Phenylalanin, Glycin 381-383) lokalisiert, der der Aktivierung der Kinase dient [12].

Am C-Terminus befinden sich Domänen zur Bindung von Adaptorproteinen, zur DNA-Bindung und zur Verankerung mit dem Aktin-Zytoskelett. Daneben sind hier die Kernlokalisationssequenzen für den Import und Export kodiert, welche die Lokalisation von ABL je nach Stimulus bedingen [13]. Physiologisch shuttelt ABL zwischen Nukleus und Zytoplasma. Das BCR/ABL-Fusionsprotein verbleibt ausschließlich im Zytoplasma [14].

Zu den von BCR/ABL über die Phosphorylierung von Zielproteinen regulierten Signalwegen gehören der Ras-MAP-Kinaseweg, der JAK/STAT-Signalweg sowie Signale über PI3K/AKT und BCL-X_L. Damit wird die zelluläre Proliferation, die Differenzierung, die Transkription sowie die Apoptose der Zellen reguliert [15]. Daneben wird auch der Zell-Zell-Kontakt und die Interaktion mit der extrazellulären Matrix über die BCR/ABL-Kinase beeinflusst [16].

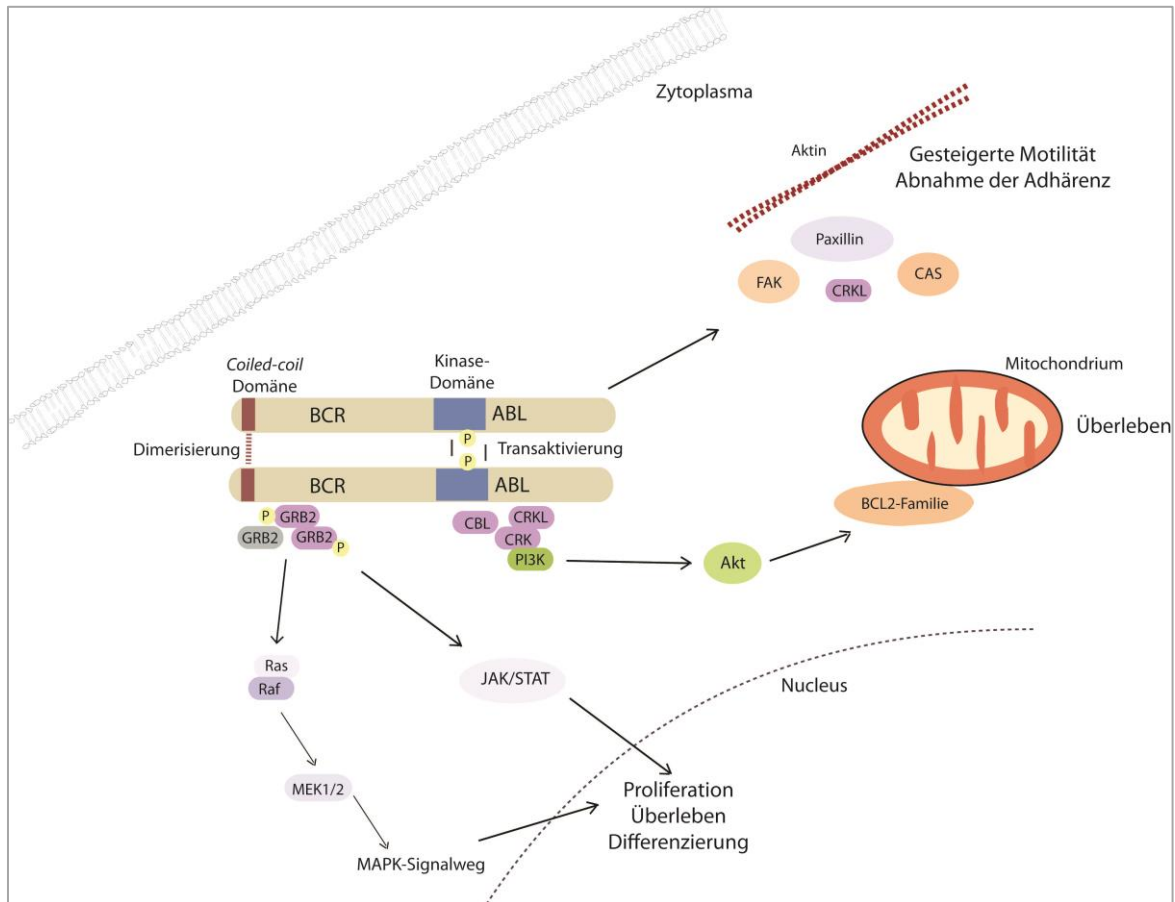


Abbildung 2: BCR/ABL-abhängige Signalwege. Nach Dimerisierung der BCR/ABL-Kinase, vermittelt durch die *Coiled-coil*-Domänen des BCR, kommt es zur Dimerisierung und Transaktivierung der Kinase durch Auto- und Transphosphorylierung. Im Folgenden werden Adaptorproteine, wie GRB2, SOS und GAB2, rekrutiert. Diese tragen zur Aktivierung des JAK/STAT-Signalwegs und des Ras-MAP-Signalwegs, und damit zur Regulation der Proliferation, des Überlebens und der Differenzierung bei. Daneben wird über CBL, CRK und CRKL der PI3K-AKT-Signalweg aktiviert, was hauptsächlich zur Hemmung der Apoptose über die BCL-2-Familie führt. Daneben wird über FAK, CAS und Paxillin die Adhärenz der Zellen sowie die Motilität reguliert. AKT: Proteinkinase B; BCL-2: B-cell lymphoma 2; CAS: p130 CRK-associated substrate; CRKL: CRK-like protein; FAK: focal adhesion kinase; GAB2: GRB2-associated binding protein; GRB2: growth factor receptor-bound protein 2; JAK: Janus kinase; MEK: MAP-mitogen-activated protein kinase kinase; PI3K: Phosphoinositid-3-Kinase; RAF: rapidly accelerated fibrosarcoma; SOS: son of sevenless; STAT: signal transducer and activator of transcription. Modifiziert nach (CCR Molecular Pathways, American Association for Cancer Research, 2011; Weisberg et al., 2007).

Nach Dimerisierung von BCR/ABL an der N-terminalen *coiled-coil*-Domäne von BCR erfolgt die Autophosphorylierung der Kinase [17]. Durch die Bindung des *growth factor receptor-bound protein 2* (GRB2) an Tyrosin 177 am N-Terminus von BCR wird unter anderem der Ras-MAP-Kinaseweg aktiviert [18, 19]. Dazu wird durch die Rekrutierung des Guanosinaustauschfaktors *son of sevenless* (SOS) durch Interaktion der SH3-Domäne, den damit verbundenen Austausch von Guanosindiphosphat (GDP) zu Guanosintriphosphat (GTP) und Bindung des *GRB2-associated binding protein* (GAB2) sowie Aktivierung von Ras, letztendlich die Phosphorylierungskette der *mitogen-activated protein* (MAP)-Kinasen

stimuliert (Abb. 2) [20]. Der Komplex aus GRB2, GAB2 und SOS kann des Weiteren den PI3K-AKT-Signalweg durch Phosphorylierung die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) und die Proteinkinase B (AKT) ansteuern, was zur Hemmung des Transkriptionsrepressor *forkhead O* (FOXO) und damit zur gesteigerten Genexpression führt [21]. AKT fördert weiterhin die Proliferation über Phosphorylierung von mTor (*mammalian target of rapamycin*) und hemmt die Apoptose durch Phosphorylierung des pro-apoptischen BAD (*BCL-2 associated agonist of cell death*) und Freisetzung des anti-apoptischen BCL-X_L (*B cell lymphoma extra large*) [14]. Der PI3K/AKT-Signalweg kann außerdem über die Protoonkogene CBL, CRK und CRKL (*CRK-like protein*) aktiviert werden [22].

Darüber hinaus wird durch BCR/ABL der JAK/STAT-Signalweg aktiviert, welcher durch die Phosphorylierung und Dimerisierung vor allem des *signal transducer and activator of transcription 5* (STAT5) zur verstärkten Aktivierung der Genexpression von z.B. BCL-X_L zur Antiapoptose oder Cyclin D1 zur Zellzyklusprogression von der G₁-Phase zur S-Phase führt [23]. Auch das Protoonkogen MYC wird über BCR/ABL aktiviert, was ebenfalls zur verstärkten Transkription und Proliferation führt [24]. Außerdem führt BCR/ABL über die die Aktivierung der *focal adhesion kinase* (FAK), CAS und Paxillin zu einer gesteigerten Motilität und verminderten Adhärenz der Zellen. Letztendlich führen alle diese Signalwege zum Verlust der Regulation der Zellzykluskontrolle und zellulären Expansion.

1.2 Therapie der chronisch myeloischen Leukämie

Bei der Therapie der CML ist das übergeordnete Ziel zunächst die Hemmung der Proliferation der Tumorzellen im Blut. Um den Therapieerfolg zu quantifizieren, werden verschiedene Remissionsebenen nach drei, sechs oder 12 Monaten Therapie angegeben. Zunächst gilt es, die hämatologische Remission zu erreichen, eine Normalisierung der Anzahl der Leukozyten sowie die Abwesenheit einer Splenomegalie [17]. Danach wird die Präsenz von Philadelphia-Chromosom-positiven (Ph⁺)-Zellen im Blut über die komplette zytogenetische Remission (CCyR) und die molekulare Remission (*major molecular response* (MMR)) über den Level an *BCR/ABL*-Fusionsgen quantifiziert und auf eine internationale Skala bezogen [25]. Hierbei werden ein Wert von 0,1 % *BCR/ABL*-Transkript nach 12 Monaten Therapie sowie das Fehlen des Transkripts als komplette molekulare Remission (CMR) bezeichnet. Therapieversagen wird klassifiziert als Ausbleiben der hämatologischen

Remission nach drei Monaten, bzw. Vorhandensein von Ph⁺-Zellen zu >95 % nach sechs Monaten bzw. zu >35 % nach drei Monaten und Nichterreichen der MMR nach 18 Monaten Therapie [17, 26]. Die Therapie der chronischen Phase bzw. der akzelerierten Phase der CML unterscheidet sich von der der Blastenkrise, da, aufgrund der Ähnlichkeit der Blastenkrise mit akuten Leukämien, häufig zusätzlich klassische Chemotherapeutika wie z.B. Anthrazykline oder das Alkaloid Vincristin eingesetzt werden [27].

Bis zum Beginn des 21. Jahrhunderts wurde die CML mit Strahlentherapie oder Chemotherapeutika, wie z.B. Busulfan oder Hydroxyurea, mit nur mäßigem Erfolg therapiert [26]. In den 1980er Jahren wurde die allogene Stammzelltransplantation eingesetzt, um die CML-Zellen vollständig zu deletieren, jedoch war dies mit hoher Sterblichkeit und limitierter Anzahl an Spendern verbunden [28]. Zur gleichen Zeit begann der Einsatz von Interferon- α und führte zu gesteigertem Überleben und zytogenetischer Remission bei ca. 33 % der Patienten [29]. In Kombination mit Hydroxyurea konnte die Überlebenschancen der Patienten auf 57 % im 5 Jahre-Langzeitüberleben gesteigert werden [30]. Beides stellte jedoch keine zufriedenstellenden Therapieerfolge dar.

Da die zugrunde liegende Mutation der CML mit dem *BCR/ABL*-Fusionsgen seit den 70er Jahren bekannt war [31], wurde mittels *rational drug designs* versucht einen Wirkstoff zu generieren, der die *BCR/ABL*-Kinasedomäne spezifisch hemmt. Dazu wurde das chemische Grundgerüst eines Proteinkinase C-Inhibitors chemisch modifiziert, so dass eine spezifische Hemmung der *BCR/ABL*-Kinase ermöglicht wurde [32]. Dieser *small molecule inhibitor* Imatinib führte zu wegweisenden Fortschritten in der Therapie der CML, mit einer Überlebenschancen von 95 %, 96 % hämatologischer Remission, 75 % zytogenetischer Remission und 56 % molekularer Remission [33, 34]. Damit wurde CML von einer Neoplasie mit schlechter Prognose zu einer gut therapierbaren Erkrankung und einer Modellerkrankung für die zielgerichtete Krebstherapie. Zusätzlich dazu sind die unerwünschten Arzneimittelwirkungen von Imatinib im Vergleich zu denen der klassischen Chemotherapeutika deutlich vermindert. Häufig treten Komplikationen des Gastrointestinaltrakts, wie z.B. Nausea, Emesis, aber auch Beteiligung der Haut in Form von Hautirritationen und Ausschlägen auf. In schwereren Fällen kann es zu Myelosuppression, Herzversagen und Leberfunktionsstörungen kommen [35]. Dennoch führen ausgeprägte

unerwünschte Wirkungen, vor allem Neutropenie und Thrombozytopenie bei ca. 10 % der Patienten zur Unterbrechung oder zum Abbruch der Therapie [33].

Nach bisherigen Therapieempfehlungen wird die Gabe von Imatinib (oder entsprechenden anderen Tyrosinkinaseinhibitoren (TKIs)) lebenslang fortgesetzt, da sonst die Gefahr eines Rückfalls besteht [25]. In Diskontinuierungsstudien wurde Imatinib bei einer MMR unter einem Grenzwert von 10^{-4} - 10^{-5} *BCR/ABL*-Transkripten abgesetzt, woraufhin bei 40 % der Patienten die MMR erhalten blieb [36, 37]. Für den intermittierenden Einsatz von Imatinib fehlen jedoch ausreichende Studien [38]. Aufgrund der Kontraindikation ist die Therapie mit Imatinib bei Schwangerschaft zu beenden und schwangere Patientinnen einer engmaschigen Verlaufskontrolle zu unterführen [25].

1.2.1 Wirkmechanismus

Das 2-Phenylaminopyrimidin Imatinib bindet an die inaktive Typ II-Konformation des *BCR/ABL*-Proteins, blockiert ATP sterisch an der Bindung in die katalytische Domäne und inhibiert damit die Phosphorylierung von Zielproteinen [32, 39]. Dadurch werden die angesteuerten Signalwege abgeschaltet und damit die Proliferation und das Wachstum der Zellen gehemmt, wodurch apoptotischer Zelltod eingeleitet wird. Imatinib bindet nicht nur an die Kinase-Domäne von *BCR/ABL*, sondern auch *ABL*, was einige der Nebenwirkungen aufgrund der Hemmung der physiologischen Funktion von *ABL* erklärt [40]. Daneben hemmt Imatinib die Kinase *c-Kit* (CD117), eine membranständige Tyrosinkinase, welches in gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) aufgrund der Überexpression dieser Kinase eine weitere therapeutische Indikation darstellt [41]. Des Weiteren wird der *platelet-derived growth factor receptor* (PDGFR) von Imatinib gehemmt, ein Rezeptor, der in der CMML, der chronisch myelomonozytischen Leukämie von Bedeutung ist [42]. Auch der *colony stimulating factor 1* (M-CSF) *receptor c-fms* wird von Imatinib gehemmt, wobei jedoch nicht geklärt ist, ob diese Hemmung tatsächlich zur Inhibition der Proliferation von Monozyten und Makrophagen führt und damit von potentiell therapeutischen Nutzen im Mammakarzinom, Ovarialkarzinom oder bei entzündlichen Erkrankungen sein kann [43].

1.2.2 Tyrosinkinaseinhibitoren der neueren Generation

Trotz des wegweisenden Erfolges in der Therapie der CML mit Imatinib erleiden Patienten Rückfälle oder sind *per se* therapieresistent. Zu der Behandlung dieser wurden neue TKIs entwickelt, die sich hinsichtlich ihrer Potenz, ihres Kinasespektrums und hinsichtlich der Mutationen in der BCR/ABL-Kinase, bei denen sie eingesetzt werden können, unterscheiden (siehe 1.3.1). Nilotinib besitzt eine ca. 20-50 x höhere inhibitorische Potenz als Imatinib, hat allerdings bedingt durch die Wartezeiten vor und nach Einnahme eine komplexe Posologie. Außerdem kann Nilotinib zu Hyperglykämie führen, was den Einsatz bei *Diabetes mellitus* verhindert [44]. Neben Imatinib und Nilotinib können außerdem Dasatinib, Bosutinib oder Ponatinib eingesetzt werden. Diese unterscheiden sich in ihrer Potenz, Spezifität und der Wirkung bei Mutationen in der BCR/ABL-Kinase [26, 45]. Der pan-BCR/ABL-Inhibitor Ponatinib als Wirkstoff der 3. Generation wirkt als einziger BCR/ABL-Inhibitor auch bei der T315I-Mutation, dem Aminosäureaustausch an Position 315 von Threonin zu Isoleucin, der sterisch die Bindung von Imatinib, aber auch von Nilotinib, Dasatinib und Bosutinib inhibiert, da Ponatinib eine charakteristische Kohlenstoff-Kohlenstoff-Dreifachbindung besitzt, die die Bindung auch bei dieser Mutation ermöglicht [17].

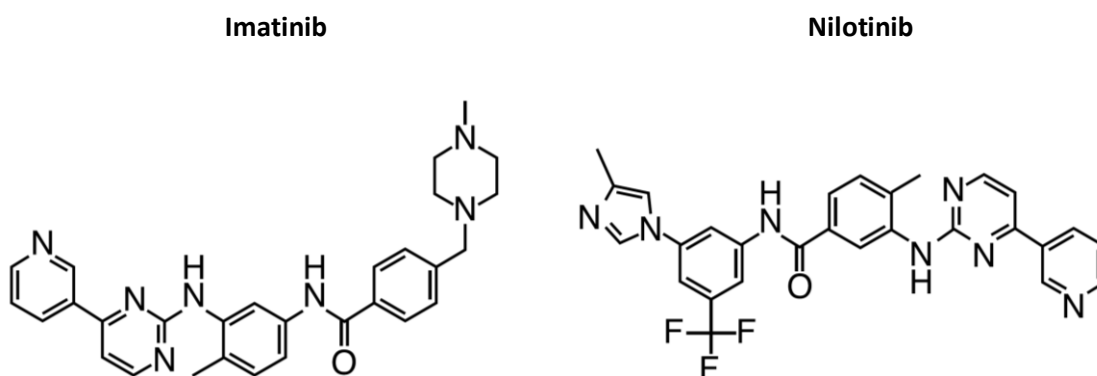


Abbildung 3: Chemische Strukturen der in der CML eingesetzten Tyrosinkinaseinhibitoren der ersten Generation Imatinib und Nilotinib. Modifiziert nach (Eiring and Deininger, 2014).

Alle genannten TKIs haben eine hohe Bioverfügbarkeit und werden metabolisiert über die Cytochrom P450-Enzyme CYP3A4 oder CYP3A5 [47]. Diese können durch ihre breiten Substratspektren und die Vielzahl an Induktoren und Inhibitoren zu Arzneimittelinteraktionen führen. Dabei kann die angestrebte TKI-Plasmakonzentration durch die gleichzeitige Einnahme eines Induktors, z.B. des Antibiotikums Rifampicin oder durch Lebensmittel wie Johanniskraut, vermindert und folglich die Wirkung reduziert

werden, was im Hinblick auf Therapieresistenzen oder Rückfälle von potentiell Interesse ist [48].

1.3 Therapieresistenzen

Ein Problem in der Chemotherapie der CML ist die Häufigkeit an Therapieresistenzen. Man geht davon aus, dass ca. 1/3 aller CML-Patienten mäßiges oder kein Ansprechen auf Imatinib zeigen oder Rückfälle erleiden [16]. Die Imatinib-Resistenzen sind dabei entweder intrinsisch, d.h. vor Beginn der Therapie vorhanden, oder sie werden im Verlauf der Therapie erworben. Zurückzuführen sind diese Resistenzen auf vielfältige Mechanismen: Überexpression von Arzneistoff-relevanten Proteinen, Veränderungen in Zielstrukturen, Reduktion der Arzneistoffkonzentration oder Entkommen der Zellzykluskontrolle [49]. In der CML können Therapieresistenzen anhand ihrer Mechanismen unterteilt werden in BCR/ABL-abhängige Mechanismen oder BCR/ABL-unabhängige Mechanismen, die im folgenden Abschnitt erläutert werden [50, 51].

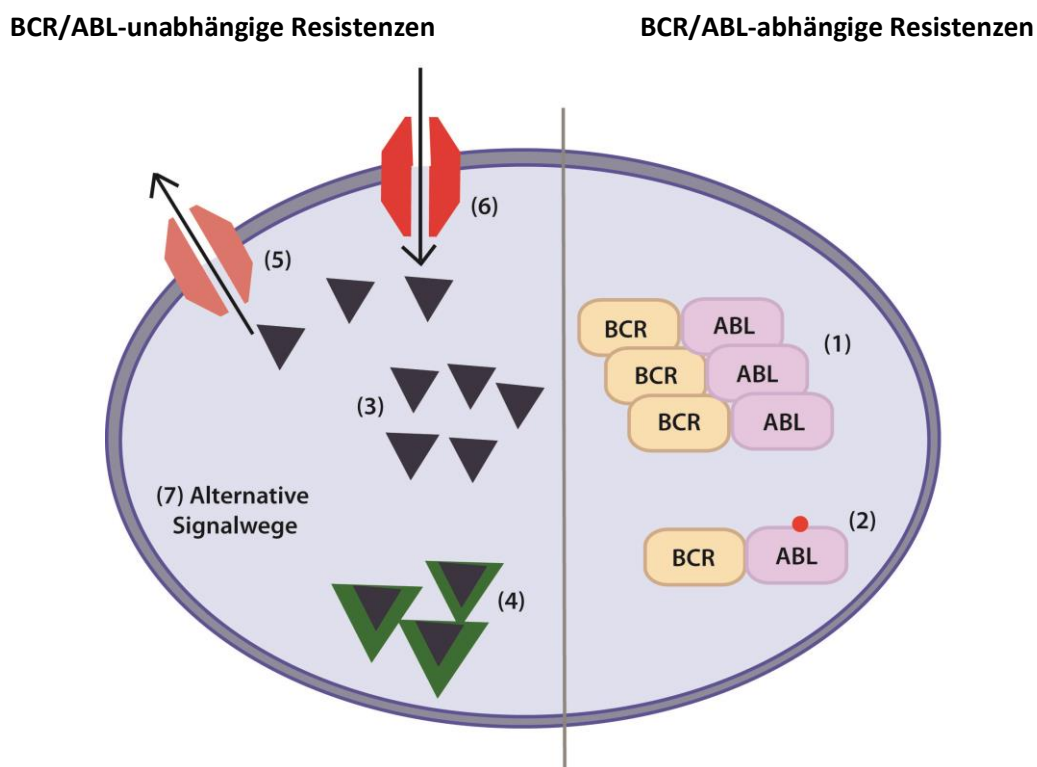


Abbildung 4: BCR/ABL-abhängige und –unabhängige Resistenzmechanismen in der CML. BCR/ABL-abhängige Mechanismen: (1) Amplifikation oder Überexpression der BCR/ABL-Kinase; (2) Punktmutationen in der BCR/ABL-Kinase. BCR/ABL-unabhängige Mechanismen: (3) Veränderungen der intrazellulären TKI-Konzentration; (4) Intrazelluläre Bindung der TKIs; (5) Verstärkter TKI-Export durch Arzneistofftransporter; (6) Verminderter TKI-Import; (7) Alternative Signaltransduktion unterhalb der BCR/ABL-Kinase. TKI: Tyrosinkinaseinhibitor. Modifiziert nach (Hamad *et al.*, 2013).

1.3.1 BCR/ABL-abhängige Resistenzmechanismen

Bei BCR/ABL-abhängigen Mechanismen handelt es sich um Veränderungen, die direkt mit der BCR/ABL-Kinase zusammenhängen oder diese beeinflussen. Dieses geschieht entweder durch Mutation der Zielstruktur und damit verbundener verminderter oder depletierter TKI-Bindung oder durch Duplikation oder Amplifikation der Kinase, wodurch die eingesetzte TKI-Dosis nicht ausreicht, um die entsprechende Menge an BCR/ABL zu hemmen [26].

Die häufigste Ursache für Therapieresistenzen in der CML sind Mutationen in BCR/ABL mit einem Auftreten in ca. 60-75 % aller Resistenzen. Bisher sind über 55 Mutationen in BCR/ABL beschrieben, die einen Einfluss auf die Wirkung von Imatinib haben, indem entweder die Bindung von Imatinib sterisch verhindert oder die Konformation der BCR/ABL-Kinase in den aktiven Zustand überführt wird, den Imatinib nicht bindet. Da die Bindung von Imatinib an die inaktive Konformation von BCR/ABL durch Wasserstoffbrücken und hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert wird, können Punktmutationen die Bindung von Imatinib verhindern [46]. Durch die Elimination eines Sauerstoffatoms verhindert der Austausch von Threonin zu Isoleucin an Position 315 (T315I) durch die Isoleucin-Seitengruppe sterisch den Zugang von Imatinib zur ATP-Bindestelle und sorgt dafür, dass Imatinib unwirksam wird. Diese Mutation wird auch als *gatekeeper mutation* bezeichnet, da die Bindetasche in BCR/ABL durch die Isoleucin-Seitenkette verschlossen wird [52]. Daneben gibt es Punktmutationen im *P-loop*, wie z.B. der Austausch von Glycin 250 zu Glutamat (G250E) oder von Tyrosin 253 zu Histidin (Y253H), die zur Destabilisierung oder dem Verlust der Bindung von Imatinib führen [12]. Im *activation loop* der BCR/ABL-Kinase führt der Ersatz von Histidin durch Arginin an Position 396 (H296R) dazu, dass die Konformation des *activation loops* nicht in der geschlossenen Position gehalten werden kann, was ebenfalls zum Wirkverlust von Imatinib führt [12]. Aufgrund dieser Mutationen ist eine umfassende molekulare Diagnostik der Mutationen in der BCR/ABL-Kinase notwendig, um den nach den Leitlinien optimalen TKI für die Therapie zu ermitteln [25].

Neben Mutationen kann die Expression von *BCR/ABL per se* erhöht sein, so dass vermehrt Transkript vorhanden und Protein translatiert wird, was zu einer BCR/ABL-abhängigen Resistenz führen kann. Diese Amplifikation führt dazu, dass die Menge an TKI nicht ausreicht, um die entsprechende Menge an BCR/ABL zu inhibieren und die Signaltransduktion zu hemmen [53-55].

1.3.2 BCR/ABL-unabhängige Resistenzmechanismen

Neben den oben beschriebenen BCR/ABL-abhängigen Mechanismen, die direkt auf die BCR/ABL-Kinase zurückzuführen sind, gibt es eine Vielzahl von Resistenzen, die nicht mit diesen Mechanismen zu erklären sind. Die Reduktion des intrazellulären TKI-Spiegels durch verminderten Import in oder verstärkten Export aus der Zelle, die Bindung von Imatinib im Plasma an Serumproteine, vor allem durch das *alpha 1 acid glycoprotein* (AGP), aber auch modifizierte Signaltransduktion, zelluläre Ruhestadien oder leukämische Stammzellen, sowie genetische und epigenetische Veränderungen anderer Genloci können zur Resistenzentwicklung in der CML beitragen. Diese Mechanismen sind Gegenstand der Forschung und werden nachfolgend beschrieben.

1.3.2.1 Arzneistofftransporter

I – Rolle und Funktion von Arzneistofftransportern

Ein Mechanismus, der zur Chemoresistenz von Tumorzellen beitragen kann, ist die veränderte Expression von membranständigen Arzneistofftransportern. Dabei spielt neben der verminderten Expression von Importern, z.B. des *organic cation transporters 1* (OCT1, SLC22A1), die Überexpression von Efflux-Transportern der *ATP-binding cassette* (ABC)-Familie eine große Rolle [56]. Bei ABC-Transportern, für die bisher 48 Familienmitglieder beschrieben sind, handelt es sich um xenobiotische Efflux-Transporter. Diese besitzen 1-2 ATP-Bindedomänen, auch Nukleotidbindestellen (*nucleotide-binding folds*, NBF) genannt, sowie 1-2 Transmembrandomänen. Diese Transporterfamilie wird in sieben Untergruppen unterteilt, ABCA bis ABCG, welche sowohl in physiologischen als auch malignen Prozessen eine Rolle spielen. Zu den wichtigsten Vertretern der letzteren gehören P-Glykoprotein (P-gp, ABCB1) oder das *breast cancer resistance protein* (BCRP, ABCG2). Die Importer der *solute carrier*-Familie (SLC) führen überwiegend zur erleichterten Diffusion der Arzneistoffe in die Zelle oder vermitteln den Transport sekundär aktiv, wohingegen beim Transport über ABC-Transporter Energie benötigt wird. Diese wird durch die Spaltung von ATP freigesetzt und primär aktiv für das Ausschleusen von Arzneistoffen, vor allem Zytostatika, Beta-Blockern oder Antibiotika, aber auch endogener Substanzen, wie Cholesterin in den Gallenkanälen oder der Tubulusemembran, in den Extrazellulärraum verwendet [57, 58]. Die in 1.2 und 1.2.2 beschriebenen TKIs, die zur Behandlung der CML eingesetzt werden, sind mit Ausnahme von

Bosutinib, für das die Datenlage nicht eindeutig ist, Substrate sowohl von ABCB1 als auch von ABCG2 [47, 59, 60].

II - ABC-Transporter ABCG2

ABCG2 (*ATP-binding cassette subfamily Group member 2*) besteht aus einer NBF sowie einer Transmembrandomäne und bildet erst nach Homodimerisierung ein funktionelles Protein [61]. Besonders hohe Expression zeigt ABCG2 an der apikalen Membran der Blut-Gewebe-Schranke der Plazenta, des Gehirns, des Darms sowie der Leber und Niere, aber auch in Stammzellen, weshalb es als Stammzellmarker angesehen wird [62-64]. Neben dieser physiologischen ABCG2-Expression ist eine Überexpression häufig in Chemotherapie-resistenten Tumorzellen zu finden [65]. Zu den Substraten von ABCG2 zählen neben den TKIs Topotecan, Anthrazykline, Methotrexat und andere Chemotherapeutika [66].

Wie oben erwähnt, spielt neben ABCG2 ABCB1 eine große Bedeutung für den Arzneistofftransport. Im Gegensatz zu ABCG2 besitzt ABCB1 2 NBFs und 2 Transmembrandomänen, zeigt aber ebenso die höchste Expression im Darm, der Leber und der Niere [67]. Die Überexpression sowohl von ABCB1 als auch ABCG2 und damit verbundenem vermehrtem Efflux der Chemotherapeutika aus der Zelle wurde beschrieben für eine Vielzahl von Tumorentitäten, z.B. akute myeloische Leukämie oder Mammakarzinom [68], und eine Vielzahl von Chemotherapeutika, z.B. Vincristin [56] oder TKIs wie Imatinib [69, 70]. In der CML ist der Beitrag dieser beiden Transporter kontrovers diskutiert, da es sowohl Hinweise auf eine Rolle von ABCB1 [71-73] als auch von ABCG2 [74-76] gibt. Darüber hinaus gibt es Daten, die auf eine dynamische Transporterexpression im Verlauf der Resistenzentwicklung hindeuten [77]. In verschiedenen Arbeiten konnte außerdem nicht abschließend geklärt werden, ob es sich bei den TKIs, vor allem bei Imatinib, um Substrate oder Inhibitoren von ABCG2 handelt [58], daher sind weitere Studien notwendig, um den Zusammenhang zwischen TKI-Resistenz und ABCG2 zu untersuchen.

1.3.2.2 Veränderungen des Transkriptoms & alternative Signalwege

Durch die konstitutive Aktivität der BCR/ABL-Kinase in den CML-Zellen wird eine Vielzahl von Signalwegen beeinflusst, die die Proliferation, Apoptose oder den Zell-Zell-Kontakt steuern (siehe 1.1.3). Dabei stellt sich bei der TKI-Resistenz die Frage, ob die Signaltransduktion der

resistenten CML-Zellen auf BCR/ABL angewiesen ist oder durch Veränderungen der Expression von Proteinen der Signaltransduktion oder Aktivierung anderer Signalwege unabhängig von BCR/ABL geworden ist. Das Prinzip der Abhängigkeit der Signaltransduktion von einem Protein wird auch als *oncogene addiction* bzw. die Aktivierung anderer Signalwege als *addiction switching* bezeichnet [78]. Zellen, die in ihrer Signaltransduktion unabhängig von BCR/ABL sind, können daher resistent gegenüber der Therapie mit TKIs sein. Dabei sind transkriptionellen Veränderungen denkbar, die zur differenziellen Aktivierung von Signalwegen führen könnten [15]. Die Mechanismen, die diesen Veränderungen zugrunde liegen und zur Resistenz führen können, sind nach wie vor Gegenstand der Forschung.

1.3.2.3 Epigenetische Veränderungen

Transkriptionelle Veränderungen unterliegen neben der Aktivierung oder Repression von Transkriptionsfaktoren auch epigenetischer Regulation. Die Genexpression wird durch komplexe Mechanismen von epigenetischen Veränderungen, wie z.B. DNA-Methylierung oder Histon-Modifikationen durch Acetylierung oder Ubiquitinylierung, als auch durch posttranskriptionelle Veränderungen gesteuert. Damit werden wichtige physiologische Prozesse wie die Inaktivierung des X-Chromosoms, *Imprinting* oder Embryonalentwicklung, aber auch Karzinogenese beeinflusst [79]. Bei der Methylierung handelt es sich um eine kovalente Anheftung einer Methylgruppe an den Cytosin-Pyrimidinring. Dabei werden vor allem die Cytosin-Basen methyliert, auf die direkt eine Guanin-Base folgt (Cytosin-Phosphat-Guanin, CpG). Die Methylgruppen werden durch DNA-Methyltransferasen (DNMT) auf die Cytosine übertragen, in dem die Methylgruppe von S-Adenosylmethionin (SAM) auf das 5. Kohlenstoffatom des Cytosins transferiert wird. Dabei ist DNMT1 für die Aufrechterhaltung der Methylierung während der DNA-Replikation zur Bildung neuer DNA-Stränge zuständig, während DNMT3a und DNMT3b neue Methylierungsmuster etablieren. Alle DNMT-Isoformen zeigen die höchste Expression während der Embryonalentwicklung, sind jedoch auch in postmitotischen, differenzierten Zellen vorhanden [80].

CpGs sind häufig in bestimmten Sequenzabschnitten in der DNA mit einem gehäuften Auftreten an CpGs, sogenannte *CpG islands*, geclustert, die vor allem in Promotorregionen zu finden sind. Diese CpG-reichen Regionen sind im Gegensatz zu den CpGs im restlichen Genom häufig unmethyliert [81]. Eine Veränderung der Methylierung im Promotorbereich

steht im Zusammenhang mit veränderter Genexpression, wobei nicht abschließend geklärt ist, ob eine Hypo- oder Hypermethylierung eines spezifischen Promotors zur Aktivierung der Genexpression führt.

Bei der Tumorentwicklung oder Progression finden massive Veränderungen der Methylierung statt. Tendenziell findet vor allem eine Hypomethylierung von Onkogenen sowie eine Hypermethylierung von Tumorsuppressorgenen einhergehend mit deren transkriptionellen Repression statt [82]. Daneben wird die globale Abnahme der Methylierung in Zusammenhang mit genomischer Instabilität gebracht, die die Entstehung von Mutationen erleichtert [81], (Abb. 5). Dazu konnte gezeigt werden, dass eine Hypermethylierung einer CpG-reichen Region zur Bindung von *methyl-CpG binding domain* (MBD)-Proteinen, die zu einer engeren Packung der DNA und damit zur Bildung von transkriptionell-inaktivem Heterochromatin führt [83, 84].

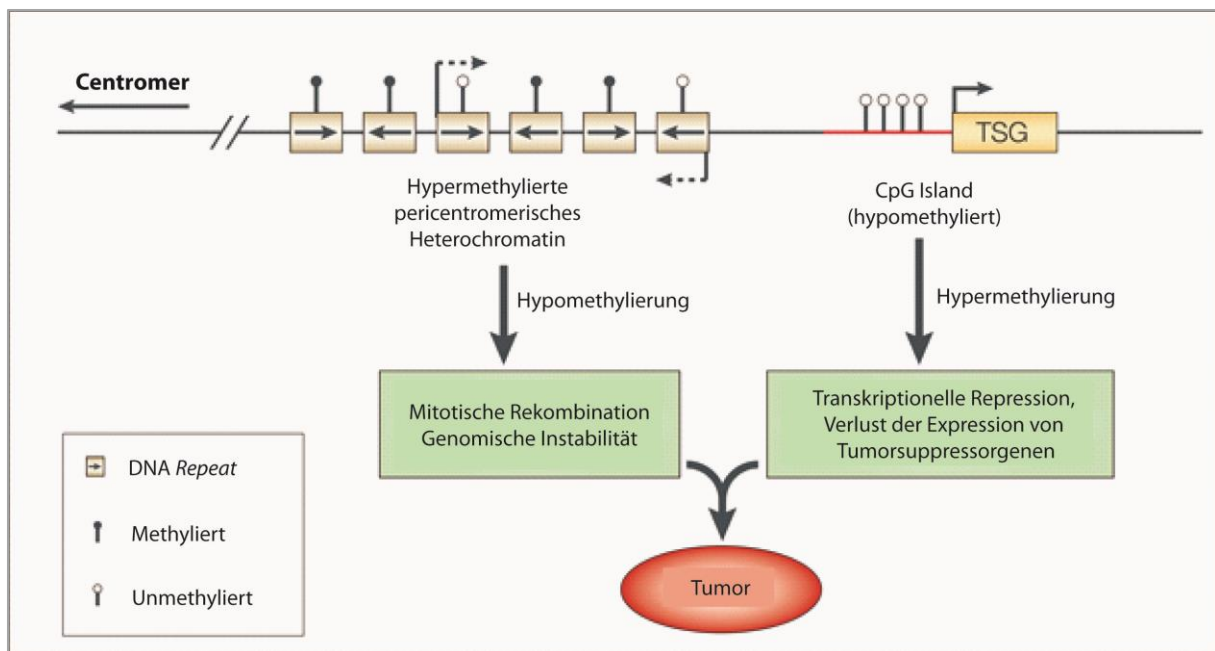


Abbildung 5: Schematische Abbildung der DNA-Methylierung in Tumoren. Unter physiologischen Bedingungen ist die genomische DNA in Promotorbereichen, vor allem in CpG-Islands, tendenziell hypomethyliert, während intergenische Regionen eher hypermethyliert sind. Die Hypermethylierung von *CpG Islands* kann zur transkriptionellen Repression vor allem von Tumorsuppressorgenen führen, wohingegen eine Hypomethylierung des restlichen Genoms zur genomischen Instabilität und damit zur Akkumulation von Mutationen beiträgt. Dieses Prinzip trifft vor allem auf Onkogene und Tumorsuppressorgene zu, steht aber in starker Abhängigkeit von der Bindung der Art des Transkriptionsfaktors. TSG: Tumorsuppressorgen. Modifiziert nach (Robertson, 2005).

Neben der Veränderung der Methylierung in Promotoren können auch intergenische Regionen oder intragenische Regionen, sogenannte *gene bodies* oder CpGs innerhalb des 1.

Exons der kodierenden Sequenz eines Gens, methyliert sein. Für letztere gibt es mehrere Hinweise, dass eine Hypermethylierung im 1. Exon ähnliche Effekte auf die Transkription auslösen kann wie die in den Promotoren [86, 87]. Neuere Studien zeigten jedoch, dass der Effekt der Methylierungsveränderung abhängig von der Bindung der jeweiligen Transkriptionsfaktoren zu sein scheint. Somit können sowohl eine Hypo- als auch eine Hypermethylierung zu einem Anstieg der Transkription führen [88].

In der CML gibt es mehrere Hinweise auf einen Einfluss der Methylierung im Zusammenhang mit Progression und Prognose, vor allem hinsichtlich der Unterschiede in den CML-Phasen. Dabei konnte unter anderem gezeigt werden, dass der *ABL*-Promotor in frühen Stadien der CML eine Hypermethylierung zeigt [89]. Neben dem Einfluss der Methylierung auf spezifische Gene konnte in CML-Patienten beobachtet werden, dass die genomweite Methylierung im Laufe der Progression zur Blastenkrise ansteigt [90]. Dennoch ist nicht bekannt, inwieweit sich die genomweite Methylierung im Laufe der Entwicklung einer TKI-Resistenz verändert bzw. welchen Einfluss die TKIs auf die Methylierung distinkter Gene haben.

1.3.2.4 Posttranskriptionelle Veränderungen

Neben der transkriptionellen Kontrolle der Genexpression kann diese auch posttranskriptionell durch Hemmung der mRNA-Translation reguliert werden. Dieses kann entweder durch microRNAs oder proteinogen über RNA-bindende Proteine bewerkstelligt werden, die im Folgenden beschrieben werden.

I - Posttranskriptionelle Regulation durch microRNAs

Bei microRNAs handelt es sich um 17-24 nt lange RNAs, die in die posttranskriptionelle Regulation der Genexpression involviert sind. Dazu binden sie an die 3' UTR ihrer spezifischen Ziel-mRNAs und sorgen entweder für deren Degradation oder die Hemmung der Translation, was zur Reduktion der Proteinexpression führt. Dafür werden die microRNAs nach der Transkription zu microRNA-5p/3p-Duplexen (auch miRNA/miRNA* genannt) prozessiert und einer der beiden Stränge (häufig der *guide*-Strang) in den *RNA-induced silencing complex* (RISC) inseriert [91, 92]. Dabei erfolgt die Auswahl des microRNA-Stranges nach thermodynamischen Kriterien, da häufig der am 5' Ende weniger stabile Strang in den

RISC inseriert wird. Dennoch sind beide microRNA-Stränge funktionell und können zur Repression der mRNA führen [93]. Die Bindung der microRNA an die 3' UTR der Ziel-mRNA erfolgt über imperfekte Basenpaarung der *seed*-Sequenz, einer Sequenz 2-7 nt vom 5' Ende der microRNA entfernt, wodurch deren Abbau oder Repression der Translation induziert wird [94].

II - Bedeutung von microRNAs in der Onkologie

Während der malignen Transformation von Tumorzellen finden sowohl genetische als auch epigenetische Veränderungen statt. Als Folge dieser epigenetischen Veränderungen kommt es zu einer aberranten Expression von microRNAs, die durch die Regulation ihrer Ziel-mRNAs Proliferation, Zell-Zyklus-Kontrolle, Zelltod, Invasion oder Differenzierung regulieren [49]. Die Relevanz der microRNAs in der Onkologie hinsichtlich ihrer Wirkung als Onkogene, aber auch Tumorsuppressoren ist in den letzten Jahren klar geworden [49, 95]. In verschiedenen Tumoren, z.B. Mammakarzinom, Glioblastom oder Pankreaskarzinom, konnte eine miR-21-Überexpression im Zusammenhang mit Überleben, Invasion und Metastasierung nachgewiesen werden [93]. Die miR-200-Familie reguliert hingegen die epithelialen-mesenchymalen Transition von soliden Tumoren [96]. Auch verschiedene Onkogene, wie Ras oder MYC werden durch microRNAs reguliert [97, 98].

In Leukämien ist eine Vielzahl von differenziell exprimierten microRNAs beschrieben, die zu Veränderungen von Proliferation, Zelltod oder Differenzierung beitragen. In der CML wurde z.B. das microRNA-cluster 17-92 identifiziert, welches MYC reguliert, das wiederum als Onkogen das Zellwachstum fördert [99] sowie die miR-203, die direkt an die 3' UTR von *BCR/ABL* bindet [100].

III - ABCG2-bindende microRNAs

Neben den oben erwähnten Beispielen für die Relevanz von microRNAs in der Onkologie wird auch die Expression von ABC-Transportern über microRNAs reguliert [62, 101-103]. Für den Effluxtransporter ABCG2 sind mehrere microRNAs identifiziert worden, die an die *ABCG2* 3' UTR binden und die Expression von *ABCG2* posttranskriptionell regulieren, unter anderem miR-212 und miR-328 [62]. Bei der miR-212 handelt es sich um einen potentiellen Tumorsuppressor mit aberranter Expression in verschiedenen Tumoren [104]. In soliden

Tumoren, wie dem Osteosarkom, hepatozellulärem Karzinom oder nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom, konnte gezeigt werden, dass die miR-212 das zelluläre Wachstum hemmt [105, 106] und zu erhöhter Apoptose beiträgt [107]. Des Weiteren kann die miR-212-Expression als prognostischer Marker in der akuten myeloischen Leukämie (AML) genutzt werden [108].

In einer vorherigen Studie konnte gezeigt werden, dass die miR-212 und auch die miR-328 während der *in vitro*-Imatinib-Resistenzentwicklung in einer CML-Zelllinie einen inversen Expressionsverlauf zu ABCG2 besitzt, die ABCG2-Expression allerdings nur über die miR-212-Interaktion mit der ABCG2 3' UTR reguliert wird [76]. Für die Brustkrebszelllinie MCF-7 konnte jedoch gezeigt werden, dass die miR-328 die ABCG2 3' UTR bindet [109]. Wie die miR-212, ist auch die miR-328 in verschiedenen Tumoren differenziell exprimiert, hemmt die Proliferation im Cervixkarzinom und steigert die zelluläre Motilität im hepatozellulären Karzinom [110, 111]. In der AML ist die miR-328 ein potentieller Biomarker für die Prognose [112]. Für die CML konnte außerdem ein Verlust der miR-328-Expression in der Blastenkrise beobachtet werden [113]. Die Relevanz der miR-212 in der TKI-Resistenz ist jedoch noch nicht geklärt. Daher ist es von Interesse zu analysieren, welchen Beitrag die veränderte Expression von miR-212 und miR-328 im Zusammenhang mit ABCG2 zur Entstehung und Entwicklung der Imatinib-Resistenz in der CML hat.

IV - RNA-bindende Proteine

Bei RNA-bindenden Proteinen (RBP) handelt es sich um eine Familie aus ca. 1500 Mitgliedern, die an die 3' UTR ihrer Ziel-mRNAs binden und damit posttranskriptionell die Genexpression, nach dem gleichen Prinzip wie microRNAs, beeinflussen können. Eine Gruppe innerhalb dieser Familie ist die *12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) inducible sequence 11 (Tis11)*-Familie, die sequenzspezifisch an *AU-rich elements (ARE)* innerhalb der 3' UTR der mRNA bindet und zu deren Degradation führt [114]. Bei AREs handelt es sich um Sequenzabschnitte in der mRNA, die sich durch eine hohe Anzahl an Adenosin und Uracil, aber auch spezifischen *Repeats* auszeichnen [115].

Die Tis11-Familie besteht strukturell aus 2 Zinkfingern mit einem konservierten Cystein-Cystein-Histidin (CCCH)-Motiv (sogenannte Tandem-Zinkfinger motive), durch die sie die AREs binden. Zu den wichtigsten humanen Familienmitgliedern gehört das *zinc finger*

protein 36 (ZFP36) (Tis11, Tristetraprolin (TTP)), *zinc finger protein 36 C3H type-like 1* (ZFP36L1, Tis11b) und *zinc finger protein 36 C3H1 type-like 2* (ZFP36L2, Tis11d). Diese unterscheiden sich in ihren Ziel-mRNAs und gewebespezifischer Expression, vermitteln jedoch alle die Deadenylierung bzw. das *decapping* der mRNAs mit UUAUUUAUU-ARE-Sequenz unter Rekrutierung von Effektorproteinen, wie der poly(A)-spezifischen Ribonuklease PARN oder der *decapping*-Enzyme Dcp1/2 [116]. Alle drei Mitglieder zeigen die höchste zelluläre Expression im Nukleus, besitzen aber eine Leucin-reiche Nuklearexportsequenz (NES) sowie eine Nuklearlokalisationssequenz (NLS), über die der dynamische Transport zwischen Zellkern und Zytoplasma vermittelt wird [117].

Die höchste Expression zeigt ZFP36 in Milz, Thymus, Lunge, Intestinum und Leber [118]. ZFP36L1 ist hochexprimiert in Niere, Leber, Lunge, Pankreas und Herz, jedoch nicht in Leukozyten und im Thymus [119]; ZFP36L2 in Lunge, Leber, Skelettmuskel, Niere, Pankreas und Plazenta [120]. Insgesamt ist das Expressionslevel der Tis11-Familienmitglieder dennoch eher gering und wird erst nach Behandlung mit bestimmten Stimulantien, z.B. durch TPA, aber auch Insulin oder Lipopolysaccharid (LPS), sowie Chemotherapeutika wie Rituximab, induziert, wodurch sich die subzelluläre Lokalisation hinzu Stressgranula bzw. *processing bodies* (*P-bodies*), zytoplasmatischen Anhäufungen von verschiedenen Proteinen bzw. Enzymen und RNA, ändert [114, 121]. Dabei werden die mRNAs in Stressgranula vorwiegend sortiert und translatiert, wohingegen sie in *P-bodies* häufig degradiert werden [122]. Interessanterweise scheint die Expression, potentiell auch die zelluläre Lokalisation oder Funktion, durch Proteinphosphorylierung beeinflusst zu werden. So konnte z.B. gezeigt werden, dass eine Phosphorylierung von ZFP36 zu dessen Inaktivierung führen kann [115].

Eine Vielzahl von Ziel-mRNAs, die für die Tis11-Familie beschrieben sind, wie z.B. der *tumor necrosis factor alpha* (TNF- α), der *vascular endothelial growth factor* (VEGF) oder der *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) [119, 123, 124], spielt eine Rolle bei der Modulation von immunologischen Prozessen, so dass ein Verlust der ZFP36/L1/L2-Expression zu verstärkter Immunantwort und Zellaktivierung bis hin zu chronisch entzündlichen Erkrankungen führen kann [116].

In der Karzinogenese verschiedener Tumore konnte der Verlust der Expression der Tis11-Familie und der damit verbundenen posttranskriptionellen Regulation beobachtet werden, weshalb ZFP36, ZFP36L1 und ZFP36L2 eine Rolle als Tumorsuppressoren zugeschrieben wird

[114-116, 125]. Dementsprechend wurde ein Verlust der Expression von ZFP36, ZFP36L1 und ZFP36L2 mit gesteigertem Überleben und verminderter Apoptose assoziiert [126]. In verschiedenen humanen Krebszelllinien konnte dennoch eine Überexpression der Tis11-Familie gezeigt werden [117]. Zusätzlich dazu kommt der Tis11-Familie, vor allem ZFP36L1 und ZFP36L2, eine wichtige Rolle in der Regulation der Hämatopoese zu, da für die *Knockout*-Modelle beider Gene ein Defizit an reifen Erythrozyten bzw. Leukozyten beobachtet wurde [127, 128].

Außerdem wird ZFP36L1 und ZFP36L2 eine wichtige Funktion bei der Abschaltung der zellulären Proliferation zum Erreichen von *Quiescence*, zellulären Ruhestadien, zugeschrieben (siehe 1.3.2.5). Im murinen ZFP36L1/ZFP36L2-Doppel-*Knockout* konnte eine abnormale Entwicklung der B-Lymphozyten beobachtet werden, einhergehend mit einer Akkumulation von unreifen Vorläuferzellen, da die *Quiescence* vor dem B-Zell-Checkpoint durch das Fehlen von ZFP36L1 und ZFP36L2 nicht erreicht werden kann [129]. Damit kommen ZFP36L1 und ZFP36L2 zentrale Rollen zur Limitation der zellulären Proliferation zu, was sie zu interessante Kandidaten in der Onkologie, im Speziellen in Lymphomen und Leukämien.

In der CML ist die Bedeutung von ZFP36L1 und ZFP36L2 bei der Entstehung der Imatinib-Resistenz nicht geklärt. Die Implikation beider Proteine in der Hämatopoese legt jedoch die Vermutung nahe, dass ZFP36L1 und/oder ZFP36L2 eine Rolle bei der malignen Entartung der Zellen, der Progression oder Therapieresistenz besitzen könnten.

1.3.2.5 Dormancy, Quiescence & Leukämische Stammzellen

Bei der Therapie eines Tumors mit Chemotherapeutika können häufig minimale Resterkrankungen (*minimal residual disease*, MRD), Metastasen oder Rückfälle einer bestimmten Tumorsubpopulation beobachtet werden. Diese können zurückgehen auf Tumorstammzellen bzw. auf schlafende, ruhende Zellstadien, die auch als *Dormancy* oder *Quiescence* bezeichnet werden.

Das Konzept der Tumorstammzellen geht davon aus, dass es in einer heterogenen Masse an Tumorzellen eine kleine Anzahl an Zellen gibt, die fähig zur Selbsterneuerung, aber auch zur Differenzierung sind. Dazu teilen sich die Tumorstammzellen asymmetrisch, wobei eine

Tochterzelle eine undifferenzierte, unsterbliche Stammzelle bleibt und die andere diese Eigenschaften verliert und sich differenziert. Durch diese Differenzierung entsteht eine Tumorzellpopulation mit heterogenen Eigenschaften (Abb. 6)[130].

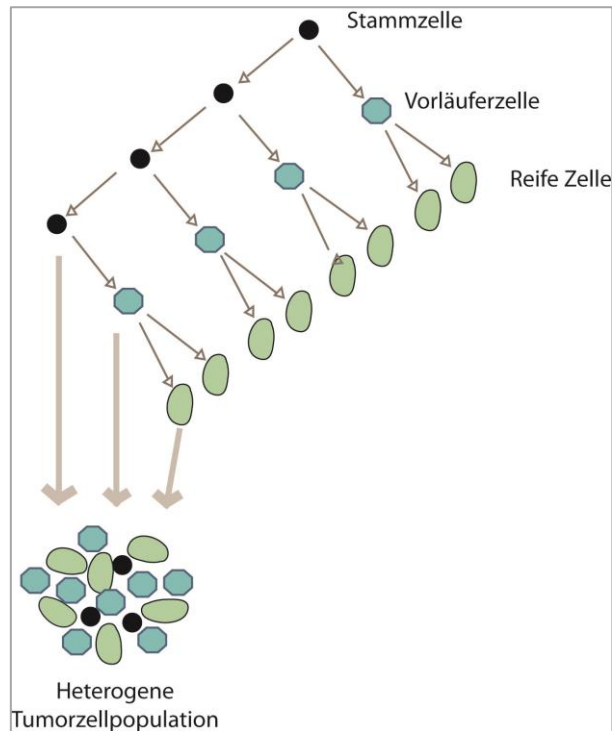


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Entwicklung einer Tumormasse durch Tumorstammzellen. Aus einer Krebsstammzelle entwickeln sich durch asymmetrische Teilung eine Stammzelltochter sowie eine Zelle, die zu einer reifen Tumorzelle differenziert. Die heterogene Tumorzellpopulation besteht aus den Vorläuferzellen, aus differenzierten Tumorzellen sowie den Tumorstammzellen. Modifiziert nach (Fulawka *et al.*, 2014).

Neben den Tumorstammzellen gibt es Tumorzellen, die häufig nur eine sehr geringe Proliferationsrate besitzen, die einem Ruhestadium ähnelt [131]. Dieses wird als *Dormancy* oder *Quiescence* bezeichnet und kann aufgrund der geringen Anzahl an Zellen oder Limitationen der Nachweismethode in der Diagnostik häufig nicht identifiziert werden. Außerdem entziehen sich diese Zellen häufig der Therapie, da sich diese zumeist gegen proliferierende Zellen richten [17]. Neben dem Auftreten dieser Ruhezustände in Tumoren hat *Dormancy* bzw. *Quiescence* eine Relevanz in physiologischen Prozessen, da z.B. bei der Entwicklung der B-Zellen nach der VDJ-Rekombination, bei der die B-Zellen auf Autoimmunreaktivität am B-Zell-Checkpoint getestet werden. Dazu wird die Proliferation der B-Zellen limitiert und die Zellen sind für den B-Zell-Checkpoint in *Quiescence*. Interessanterweise konnte für diesen gezeigt werden, dass die Hemmung der Proliferation

und das Zustandekommen der *Quiescence* abhängig von der Expression von ZFP36L1/L2 ist [129].

Bei der Chemotherapie entziehen sich Tumorstammzellen, wie auch Zellen in Ruhestadien häufig der Therapie, da sie nur eine geringe Proliferationsrate besitzen und damit für klassische Zytostatika, aber auch aufgrund der modulierten Genexpression von z.B. Oberflächenmarkern, auch für neuere Chemotherapeutika nicht angreifbar sind.

In der CML sind CD34⁺CD38⁺-leukämische Stammzellen beschrieben, die jedoch aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu physiologischen hämatopoetischen Stammzellen nicht ausreichend charakterisiert sind. Es konnte jedoch eine Imatinib-resistente MRD in der CML über einen langen Zeitraum beobachtet werden, so dass vermutet wird, dass leukämische Stammzellen an der Aufrechterhaltung der Population beteiligt sind [132, 133]. In Studien konnte gezeigt werden, dass die CML-Stammzellen nur ein geringes Ansprechen auf TKIs besitzen, da sie, anders als differenzierte CML-Zellen, nicht vollständig auf die Funktion von BCR/ABL angewiesen sind (keine *oncogene addiction* zeigen) oder vor der Wirkung der TKIs abgeschirmt sind [17, 133, 134]. *In vitro* konnte außerdem gezeigt werden, dass Ph⁺-positive Stammzellen sich in Anwesenheit von Imatinib in *Quiescence* begeben [135]. Zu den transkriptionellen Expressionsunterschieden von Tumorstammzellen gehören interessanterweise auch Veränderungen in microRNAs, wie es z.B. für die miR-150, miR-23a und miR-130a in Tumorstammzellen beobachtet werden konnte [136].

Damit stellen Tumorstammzellen bzw. Zellen in Ruhestadien ein großes Problem in der Chemotherapie dar. Dennoch ist nicht abschließend geklärt, welche Bedeutung leukämische Stammzellen und die *Dormancy/Quiescence* im Zuge der Imatinib-Resistenzentwicklung haben.

1.3.2.6 Klonale Evolution

Während der Therapie mit TKIs sind die CML-Zellen fortwährend dem Selektionsdruck des TKIs ausgesetzt, wodurch sich bestimmte Mutationen in den Zellen anreichern können. Die Zellen unterliegen fortwährend Selektionsdruck, wobei entsprechend Charles Darwins Evolutionstheorie genau die Zellen evolutionär im Vorteil sind, die unter der gegebenen Wirkstoffkonzentration durch ihre erworbenen Mutationen die höchste Proliferation zeigen.

Diese Zellen werden sich aus der heterogenen Masse an Tumorzellen durchsetzen und verglichen mit den Ausgangszellen veränderte Tumoreigenschaften besitzen. Dieser Prozess wird als klonale Evolution bezeichnet.

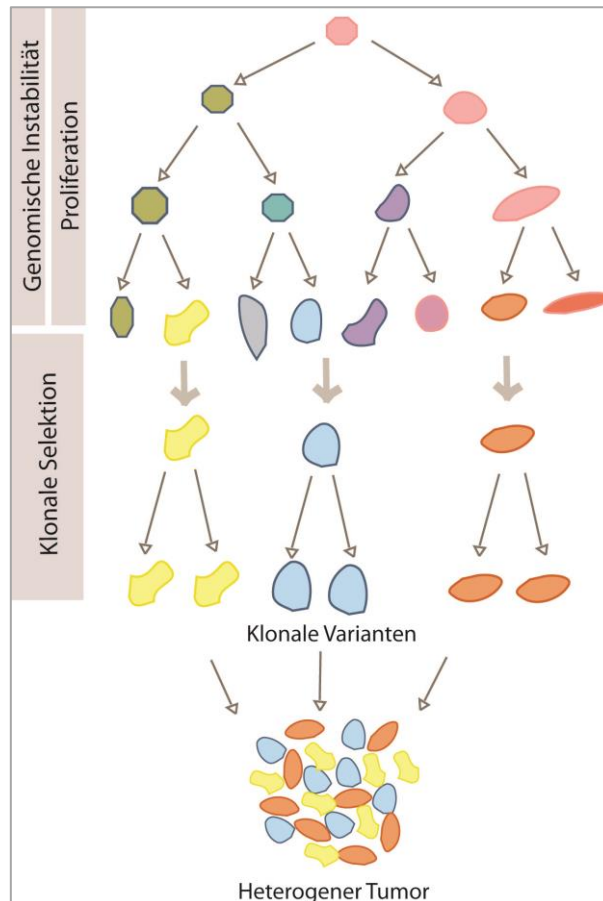


Abbildung 7: Schematische Darstellung der klonalen Evolution und Entstehung einer heterogenen Tumormasse. Zunächst entstehen durch massive Proliferation der ursprünglich homogenen Tumorzellen Neumutationen, die zu Veränderungen der Eigenschaften führen. Dabei setzen sich durch klonale Selektion die Klone durch, die gegenüber anderen proliferativ im Vorteil sind. Dabei entsteht eine heterogene Tumormasse, die sich nach dem gleichen Mechanismus weiterentwickelt. Modifiziert nach (Fulawka *et al.*, 2014).

Für die CML ist bekannt, dass sich im Laufe der Progression zur Blastenkrise vermehrt verschiedene genetische Aberrationen entwickeln, unter anderem eine Trisomie 8 (mit 53 % Häufigkeit) oder eine Mutation des *IKAROS family zinc finger 1* (IKZF1), bei dem es sich um einen wichtigen Transkriptionsfaktor der hämatopoetischen Differenzierung handelt [46]. Daneben konnte gezeigt werden, dass in der DNA-Methyltransferase DNMT3A, aber auch in *runt-related transcription factor 1* (RUNX1), häufig Mutationen während der Behandlung mit TKIs auftreten [137].

Damit gibt es verschiedene Hinweise, dass klonale Evolution in der CML eine Rolle spielt. Der Beitrag in der Imatinib-Resistenzentwicklung ist jedoch nicht vollständig geklärt. Dieses ist von besonderem Interesse im Hinblick auf Therapieresistenzen und Rückfälle bei dem Einsatz von TKIs.

1.4 Ziel & Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Die Therapie der CML hat durch die Entwicklung der spezifischen BCR/ABL-TKIs zu einer drastischen Verbesserung der Prognose und gesteigertem Patientenüberleben geführt. Jedoch erleiden viele Patienten Rückfälle oder Therapieresistenzen, deren Ursache nicht auf Mutationen in der BCR/ABL-Kinase zurückzuführen ist.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Mechanismen zu analysieren, die diesen Therapieresistenzen zugrunde liegen. Dazu soll ein *in vitro*-Resistenzmodell der Imatinib- und Nilotinib-Resistenz etabliert und mit folgenden Fragestellungen umfassend untersucht werden:

Als erstes soll der Beitrag des ABCG2-Effluxtransportes und dessen Regulation durch microRNAs bei der Entstehung und Entwicklung der Imatinib-Resistenz analysiert werden. Dazu soll mittels Transfektionsexperimenten getestet werden, welchen Beitrag die ABCG2-regulierenden microRNAs miR-212 und miR-328 auf die Imatinib-Sensitivität in unbehandelten und Imatinib-resistenten CML-Zellen haben.

Als zweites soll untersucht werden, welchen Einfluss die RNA-bindenden Proteine ZFP36L1 und ZFP36L2 auf die Entstehung und Manifestation der Imatinib-Resistenz haben. Dazu soll ein *ZFP36L1 & ZFP36L2*-Einzel- und Doppel-*Knockout* in K-562-Zellen mittels CRISPR/Cas9-Genomeditierung durchgeführt und die Zellen hinsichtlich der Veränderung der Imatinib-Sensitivität in Kurzzeit- und Langzeitbehandlung mit Imatinib analysiert werden.

Als drittes soll in einem hypothesenfreien Ansatz untersucht werden, welche transkriptionellen, genetischen und epigenetischen Veränderungen in der TKI-Resistenz auftreten. Dazu werden die genomweiten transkriptionelle Veränderungen in der Imatinib- und Nilotinib-resistenten Zellen des *in vitro*-Modells analysiert. Des Weiteren sollen genetische Aberrationen in kodierenden Genen während der Imatinib-Resistenzentwicklung durch eine Exom-Sequenzierung untersucht werden. Außerdem sollen in epigenetischen Analysen der Einfluss der Methylierung im Laufe der Imatinib- und Nilotinib-Resistenz charakterisiert werden.

2 Material

2.1 Geräte & Material

Firma	Gerät/Material
Agfa (Köln)	Entwicklungsmaschine Curix 60
BD Biosciences (Heidelberg)	FACSCalibur Durchflusszytometer Polysterene Rundboden Gefäße 0,6 ml Plastipak™ Spritzen (1-2 ml)
Bandelin electronic (Berlin)	Ultraschall-Homogenisator Sonopuls GW70
Binder GmbH (Tuttlingen)	Brutschrank B28
Biometra (Göttingen)	Schüttelplattform WT12
Bio-Rad Laboratories (München)	Mini PROTEAN® Gelkammer Mini PROTEAN® System Gelgießstand, Glasplatten 1,0 mm, 15-well Kamm Power Pac™ 300 Power Supply Subcell® GT Cell Elektrophoresekammer T100™ Thermocycler
CEA GmbH (Hamburg)	Röntgenfilme CEA RP NEW 18 x 24
Eppendorf AG (Hamburg)	Kühlzentrifuge 5415 R Laborzentrifuge 5810 Mehrkanalpipette 200 µl Multipette®pro Pipetten (0,5 – 1000 µl), Combitips (0,1 – 2,5 ml) Thermomixer compact
GE Healthcare (München)	Whatman™ Filterpapier 3 MM CHR
GFL (Burgwedel)	Wasserbad
Greiner Bio-One (Frickenhausen)	Cryo S™ Schraubdeckelgefäße
Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt)	Pipetus-accu
Implen (München)	NanoPhotometer
Intas (Göttingen)	Intas iX20 Imager
Leica (Wetzlar)	Fluoreszenzmikroskop DMIL
Lonza (Köln)	Nucleofector™ 2b
Millipore (Schwalbach)	Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran Milli-Q Wasseraufreinigungsanlage
neoLab (Berlin)	Vortex Genie 2

Nerbe plus (Winsen/Luhe)	Microtiter 96-well-Platte V-Form
Ohaus (Greifensee, Schweiz)	Navigator™ Laborwaage
Olympus GmbH (Hamburg)	Mikroskop Olympus CK2
Optik Labor Ltd (Lancing, UK)	Zählkammer Fuchs-Rosenthal
Phase (Lübeck)	Semi-Dry Blotter
Schott (Mainz)	Glasgefäße
Tecan (Crailsheim)	Tecan Infinite® M200 pro
Thermo Fisher Scientific (Darmstadt)	Affymetrix™ GeneChip® Scanner
	Affymetrix™ Fluidics Station 450
	Affymetrix™ Hybridization Oven 640
	Heraeus™ Multifuge 3 S-R
	HeraSafe™ Zellkulturbank
	HeraCell™ Zellkulturbrutschrank
	Hyperkassette™ 18 x 24 cm
	MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plates
	MicroAmp® Optical Adhesive Film
	Nalgene® Cryo-Einfrierkontainer
	Nunc™ 96-well-Platten, schwarz, durchsichtiger Boden
	Nunc™ 96-well-Platten, weiß
	QuantStudio™ 7
	Qubit® Fluorometer 2.0
Tuner Biosystems (San Diego, USA)	Veritas™ Luminometer

Soweit nicht anderweitig beschrieben, stammen die Verbrauchsmaterialien von Sarstedt (Nürnbrecht).

2.2 Chemikalien und Reagenzien

Soweit nicht anderweitig beschrieben, wurden die Reagenzien und Chemikalien bezogen von Carl Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (München), und Th. Geyer (Renningen). Die Tyrosinkinaseinhibitoren Imatinib und Nilotinib wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der Novartis GmbH (Nürnberg).

Firma	Chemikalie/Reagenz
Biochrom (Berlin)	Fötales Kälberserum Ultra Pure H ₂ O
Bio-Rad Laboratories (München)	BioRad Protein Assay Standard II
Biozym (Hessisch Oldendorf)	dNTPs (25 mM each)
Intas (Göttingen)	HD Green
Merck (Darmstadt)	L-Alanyl-L-Glutamin (200mM)
Millipore (Schwalbach)	Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate
New England Biolabs (Frankfurt am Main)	Restriktionsenzyme XhoI, PstI
Pall (Dreieich)	Mini Kleenpak™ Syringe Filter 0,2 µM
PanReac AppliChem (Darmstadt)	Acrylamid/Bisacrylamid
PeqLab Biotech (Erlangen)	peqGOLD TriFast
Roche (Basel, Schweiz)	Cell Proliferation Reagent WST-1 Solution
Santa Cruz (Dallas, USA)	ABCG2-Inhibitor Ko-143 ImmunoCruz Western Blotting Luminol Reagent
Thermo Fisher Scientific (Darmstadt)	10 x PBS 6x Loading Dye AmpliTaq Gold® 360 MasterMix GeneRuler™ 100 bp/1 kb DNA Ladder GIBCO® Opti-MEM GIBCO® RPMI-1640 Medium Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml) Taq Polymerase TaqMan® Universal PCR Master Mix without AmpErase® UNG

2.3 Kits

Firma	Kit
Lonza (Köln)	Amaxa® Nucleofector™ Kit V
Merck (Darmstadt)	Calbiochem® BrdU Cell Proliferation Assay
Promega (Mannheim)	Caspase-Glo® 9 Assay
	CytoTox-Glo® Cytotoxicity Assay
	PureYield™ Plasmid Midiprep Kit
	RealTime Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Kit
	StemElite™ ID Kit
Qiagen (Hilden)	Plasmid Mini Kit
Takara Clontech (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich)	In-Fusion® HD Cloning Kit
Thermo Fisher Scientific (Darmstadt)	Ambion® WT PLUS Expression Kit
	GeneJet™ Gel Extraction Kit
	GeneChip® Hybridization, Wash and Stain Kit
	GeneChip® WT Terminal Labeling and Hybridization Kit
	Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit
	miRVana™ miRNA Isolation Kit

2.4 Antikörper

Tabelle 1: Verwendete primäre & sekundäre Antikörper. Die Blockierlösung besteht aus dem jeweiligen Prozentsatz an Milchpulver.

Name	Klon	Herkunft	Verdünnung (%) in Blockierlösung	Firma
anti-ABCG2	BXP-21	Maus	1:1000 in 1 %	Abcam (Cambridge, UK)
anti-ZFP36L1/L2	#2119	Kaninchen	1:1000 in 1 %	CST (Danvers, USA)
anti-GAPDH	GT239	Maus	1:2000 in 2 %	GeneTex (Irvine, USA)
anti-mouse (horseradish peroxidase- conjugated second antibody)	NXA931	Schaf	1:1000 in 1 %	GE Healthcare (München)
anti-rabbit (horseradish peroxidase- conjugated second antibody)	7074	Ziege	1:1000 in 1 %	CST (Danvers, USA)
FITC-konjugierter anti-human CD338 (ABCG2)	5D3	Maus	100 µg/ml	BioLegend (San Diego, USA)
FITC-konjugierte Isotypkontrolle	MG2b-57	Maus	100 µg/ml	BioLegend (San Diego, USA)

2.5 Chips

Firma	Chip
Thermo Fisher Scientific (Darmstadt)	Affymetrix® HuGene 2.0 ST
Illumina (San Diego, USA)	EPIC Bead Chips 850 K

2.6 MicroRNAs

Tabelle 2: Tabellarische Auflistung der verwendeten microRNA-mimics (pre-miRs) oder -inhibitoren (anti-miR, power inhibitor) sowie Negativkontrollen.

Name	Katalognummer	Firma
anti-miR-Negativkontrolle	AM17010	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt)
anti-miR-212-3p	AM10340	
anti-miR-328-3p	AM10034	
pre-miR-Negativkontrolle	AM17110	
pre-miR-212-3p	PM10340	
pre-miR-328-3p	PM10034	
LNA power inhibitor Negativkontrolle A	206065	Exiqon (Vedbaek, Dänemark)
LNA hsa-miR-212-3p	130783	

2.7 Plasmide

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Plasmide.

Name	Vektor	Firma
<i>ZFP36L1</i> gRNA 2	pU6-gRNA	Sigma-Aldrich (München)
<i>ZFP36L1</i> gRNA 3	pU6-gRNA	
<i>ZFP36L2</i> gRNA 2	pU6-gRNA	
<i>ZFP36L2</i> gRNA 3	pU6-gRNA	
CMV-Cas9-2A-GFP	pCMV	
pEGFP-N3	Leervektor	erhalten von Vicki Wätzig
pEGFP- <i>ZFP36L1</i>	pEGFP-N3	
pEGFP- <i>ZFP36L2</i>	pEGFP-N3	

2.8 Primer

Die Primer zur Amplifikation der gewünschten Gene wurden mittels des NCBI Primer Blast-Tool (ncbi.nih.gov) designt und von Sigma-Aldrich (München) oder Thermo Fisher Scientific (Darmstadt) synthetisiert. Die lyophilisierten Primer wurden in einer Konzentration von 100 µM angesetzt und für die weitere Verwendung 1:10 verdünnt.

Tabelle 4: Tabellarische Auflistung der verwendeten Primer (F-Vorwärtsprimer, R-Rückwärtsprimer, S-Sequenzierprimer). Für die verwendeten *Annealing*-Temperaturen siehe 3.1.6.2, 3.2.2 und 3.2.4.

Name	Länge	Modifikation/Besonderheiten	Sequenz (5'→3')
BCR_F	19 nt		GTGCAGCGTGGAGGGAGAA
ABL_R	19 nt	als Sequenzierprimer verwendet	CAGGCTCTCGGGTGCAGTC
ZFP36L1_T5F	20 nt	als Sequenzierprimer verwendet	TCCTGGCTGGAGAAGGCAAA
ZFP36L1_T5R	20 nt		ACCCTGCCAGCTCCAAGTT
ZFP36L2_T1F	22 nt		GAGAAGCTGAGGCTGTGGTGCA
ZFP36L2_T1R	20 nt		AACCTGCATGCACTCGCCCA
ZFP36L2_Del_S	20 nt	als Sequenzierprimer verwendet	GAACAAATTCGGGACCGCT
ZFP36L1_F	33 nt		GGA CT CAG AT CT CGA AT GACC ACC ACCCTCGTG
ZFP36L1_R	40 nt		CGCGGTACCGTCGACTTAGTCATC TGAGATGGAAAGTCTG
ZFP36L2_F	37 nt		GGA CT CAG AT CT CGA AT GT CG ACC ACACTTCTGTCCG
ZFP36L2_R	36 nt		CGCGGTACCGTCGACTCAGTCGTC GGAGATGGAGAG
ZFP36L2_S	20 nt		GTGCAAGTACGGCGAAAAGT
pEGFP-N3_SF	21 nt		AGCTGGTTTAGTGAACCGTCA
pEGFP_N3_SR	20 nt		GTGAACAGCTCCTCGCCCTT

2.9 TaqMan-Assays

Alle TaqMan-Assays wurden von Thermo Fisher Scientific (Darmstadt) bezogen.

Tabelle 5: Liste der für die Genexpressionsanalyse verwendeten TaqMan-Assays.

Genname	Katalognummer
18S	Hs99999901_s1
ABCB1	Hs00184500_m1
ABCG2	Hs01053790_m1
ARID5B	Hs04276403_m1
CD226	Hs00170832_m1
EPHB6	Hs01071144_m1
FN1	Hs01549976_m1
GAPDH	Hs02786624_g1
HIPK2	Hs00179759_m1
IGF1	Hs03986524_m1
NAV2	Hs00367843_m1
NMU	Hs00183624_m1
PLA2G4A	Hs00996912_m1
PTPRB	Hs00160781_m1
RBMS1	Hs00377856_m1
RELN	Hs01022646_m1
SRGN	Hs01004159_m1
ZC3H12C	Hs00286919_m1
ZFP36L1	Hs00245183_m1
ZFP36L2	Hs00272828_m1

Tabelle 6: Verwendete microRNA-TaqMan-Assays.

Name	Katalognummer
U6 snRNA	001973
hsa-miR-212-3p	000515

2.10 Zelllinien

Für diese Arbeit wurde die CML-Zelllinie K-562 verwendet. Dabei handelt es sich um eine humane Ph⁺-positive myeloische Leukämiezelllinie einer 53-jährigen CML-Patientin in Blastenkrise. Diese Zelllinie wurde von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (ACC-10; DSMZ, Braunschweig) bezogen.

2.11 Software/Websites

Firma	Software/Website
BD Biosciences (Heidelberg)	BD CellQuest Pro
FlowJo LLC (Ashland, USA)	FlowJo v.10
GraphPad (La Jolla, USA)	Prism 7.0
Illumina (San Diego, USA)	Genome Studio v2.0
Matrix Optics (Petaling Jaya, Malaysia)	Cell [^] F
Canada's Michael Smith Genome Science Centre (Vancouver, Kanada)	Circos
Stanford University (Stanford, USA)	Cluster 3.0
Tecan (Crailsheim)	i-Control 1.7 Software
The Perl Foundation (Holland, USA)	Perl v5.26.2
Thermo Fisher Scientific (Darmstadt)	Affymetrix [®] Expression Console GeneChip [®] Operating Software Transcriptome Analysis Console v3.0 QuantStudio [™] Real-Time PCR Software
Twist Bioscience (San Francisco, USA)	Genome Compiler
STRING-Analysen	string-db.org
KEGG- <i>Pathway-Prediction</i>	DAVID Bioinformatics Resources 6.8 david.ncifcrf.gov
Primer Design	ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/
Tumorsignaturen	COSMIC Catalogue of Somatic Mutations in Cancer v84; cancer.sanger.ac.uk/cosmic

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Zellkultur

Die K-562-Suspensionszellen wurden in RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific), supplementiert mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS, Biochrom) sowie 1 % Penicillin/Streptomycin (Thermo Fisher Scientific), im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Bei Erreichen von ca. 80 % Konfluenz wurden die Zellen in Falcon-Röhrchen überführt und 5 min bei 200 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in frischem Zellkulturmedium in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:10, entsprechend der Zelldichte, resuspendiert und in neue Zellkulturflaschen überführt.

3.1.2 Bestimmung der Zellzahl und Mikroskopie

Für die Verwendung einer bestimmten Zellzahl in Experimenten wurden die Zellsuspensionen mittels einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer unter dem Olympus CK2-Mikroskop gezählt und in der gewünschten Dichte ausgesät oder verwendet. Für die weitere mikroskopische Analyse wurde das Fluoreszenzmikroskop DMIL (Leica) und die Cell^{AF} Software verwendet (Matrix Solutions).

3.1.3 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Um kultivierte Zellen einzufrieren, wurde das wie in 3.1.1 beschriebene herunterzentrifugierte Zellpellet in Einfriermedium (90 % FCS, 10 % DMSO) aufgenommen und die Zellsuspension in Cryo-Röhrchen überführt. Diese wurden in einem Einfriercontainer bei -80 °C über Nacht eingefroren, um einen langsamen, stetigen Einfriervorgang zu gewährleisten. Am nächsten Tag wurden die Röhrchen direkt bei -80 °C gelagert.

Zum Auftauen der Zellen aus -80 °C wurden die entsprechenden Cryo-Röhrchen bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut, in 7 ml vorgewärmtem Zellkulturmedium aufgenommen und in Falcon-Röhrchen überführt. Die Suspension wurde für 8 min bei 200 x g zentrifugiert, der Überstand abgenommen, das Pellet in 20 ml Zellkulturmedium resuspendiert, in eine Zellkulturflasche überführt und wie in 3.1.1 beschrieben im Brutschrank inkubiert.

3.1.4 Kultivierung von Imatinib- und Nilotinib-resistenten Zellen

Imatinib- bzw. Nilotinib-resistente Zellen wurden erzeugt, indem die Zellen mit ansteigender Konzentration des jeweiligen TKIs inkubiert wurden. Dazu wurden die Zellen einer initialen Konzentration (0,1 μ M Imatinib; 5 nM Nilotinib (Novartis, Nürnberg)) ausgesetzt bis die zelluläre Proliferation wiederhergestellt war (10-14 d). Danach wurden die Konzentrationen an Imatinib/Nilotinib schrittweise erhöht (0,3, 0,5, 1, 2 μ M Imatinib; 20, 30, 50, 75, 100 nM Nilotinib), bis die finale Konzentration von 2 μ M Imatinib bzw. 100 nM Nilotinib erreicht wurde. Die Imatinib- und Nilotinib-resistenten Zellen aller Konzentrationen wurden bis zur weiteren Verwendung wie in 3.1.3 beschrieben bei -80 °C eingefroren. Um zu testen, ob die Subzelllinien der einzelnen Resistenzen Mutationen in BCR/ABL aufwiesen, wurden diese mittels Polymerase-Ketten-Reaktion, Agarose-Gelelektrophorese und anschließender Sanger-Sequenzierung analysiert (siehe 3.2.11). Die Zelllinien der Imatinib-Resistenz (0,5, 2 μ M), der Nilotinib-Resistenz (100 nM) sowie die unbehandelten Zellen wurden auf ihre Authentizität und Kreuzkontaminationen untersucht, indem das StemElite ID Kit (Promega) verwendet wurde. Hierbei wird aus 10 *short tandem repeats* der genomischen DNA ein genetisches Profil, ein *Fingerprint*, erstellt, mit dem sich die Zellen mit den Ursprungszellen vergleichen lassen. Diese Analyse erfolgte an 100 ng genomischer DNA (für die Isolation der DNA siehe 3.2.1) im Institut für Humangenetik, UKSH, Kiel.

3.1.5 Transiente Transfektion

Um Transfektionsexperimente mit dem Ziel der Expression oder Repression eines Zielgens durchzuführen, wurde die transiente Transfektion mittels Nukleofektion verwendet. Dabei werden durch einen kurzen elektrischen Puls Poren in die Zellmembran und in die Kernhülle inseriert, durch die die gewünschten Nukleinsäuren direkt in den Kern gelangen können und dort transkribiert werden. Die transiente Transfektion der Zellen erfolgte unter Verwendung des Amaxa Nucleofector Kit V und des Nucleofector 2 b (Lonza, Köln). Dazu wurden 1-2 x 10⁶ Zellen (1 x 10⁶ bei microRNA-Mimics oder -Inhibitoren; 2 x 10⁶ bei Plasmiden) für jeden Transfektionsansatz verwendet und entsprechend der Herstellerangaben transfiziert. Für die Modulation des microRNA-Levels wurden 25 nM der pre-miRs, sowie 75 nM der anti-miRs (Pre-miR-Negativkontrolle, Anti-miR-Negativkontrolle sowie 212-3p, 328-3p; Thermo Fisher Scientific, Darmstadt) verwendet. In weiteren Versuchen wurden Locked Nucleic Acids (LNA)

verwendet, da diese durch einen Ringschluss am 2. Sauerstoff und 4. Kohlenstoffatom stärker vor der zellulären Degradation geschützt sind. Von diesen wurden 75 und 150 nM verwendet (Negativkontrolle A, 212-3p; Exiqon, Vedbaek, Dänemark). Für die Transfektion von Plasmiden wurden 2-5 µg des entsprechenden Plasmids (siehe Tab. 3) eingesetzt. Nach der Transfektion wurden die Zellen in vorgewärmtem Zellkulturmedium mit Supplementen (10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % Glutamin (Thermo Fisher Scientific); im Folgenden Transfektionsmedium genannt) aufgenommen und in 12-well Platten überführt. Nach Inkubation im Brutschrank für 6-24 h wurden die Zellen für weitere Experimente ausgesät.

3.1.6 CRISPR/Cas9-Genomeditierung von *ZFP36L1* und *ZFP36L2*

3.1.6.1 Transfektion & Zellsort

Die Methode des *Knockout* von Zielgenen mittels der CRISPR/Cas9-Methode (*Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated*) wurde verwendet, um in der Zelllinie K-562 die Zinkfingerdomänen von *ZFP36L1* und *ZFP36L2*, sowie im Doppel-*Knockout* beider Gene zu deletieren.

Bei dem CRISPR/Cas9-System handelt es sich um ein bakterielles adaptives Abwehrsystem gegen virale Fremd-DNA, welche durch spezifische Bindung des CRISPR/Cas9-Komplexes, bestehend aus der CRISPR-RNA (crRNA) sowie der *trans-activating*-RNA (tracrRNA) und der Cas9-Endonuklease, Doppelstrangbrüche in die Fremd-DNA inseriert. Für die Genomeditierung wurde dieses System adaptiert, so dass durch die Verwendung von guideRNAs (gRNAs) Doppelstrangbrüche an spezifischen Genloci induziert werden können. Diese gRNAs binden durch das *protospacer-adjacent motif* (PAM) spezifisch an das gewünschte Zielgen und rekrutieren Effektor-nuklease Cas9. Dies induziert einen Doppelstrangbruch, der durch die endogene DNA-Reparaturmaschinerie repariert wird. Während dieser Reparatur kann es zur Insertion oder Deletion von Genabschnitten sowie zu Leserahmenverschiebungen der Gensequenzen kommen. Werden mehrere guideRNAs verwendet, kann der Bereich zwischen den guideRNAs spezifisch deletiert werden [138].

Für diese Arbeit wurden die Zinkfingerdomänen der Gene *ZFP36L1* sowie *ZFP36L2* durch die Verwendung von 2 guideRNAs, mit Bindestellen direkt vor bzw. hinter den Zinkfingerdomänen, deletiert (Abb. 8).

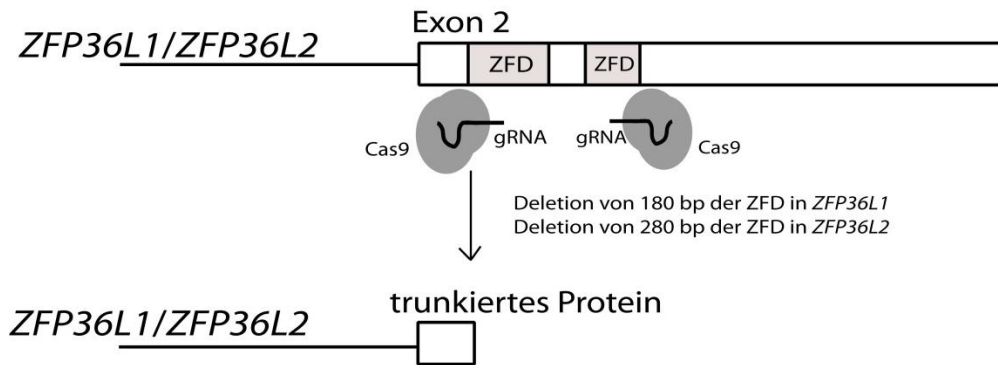


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Ablaufs des CRISPR/Cas9-vermittelten *Knockout* der Zinkfingerdomänen von *ZFP36L1/ZFP36L2*. Die Zinkfingerdomänen (ZFD) im 2. Exon von *ZFP36L1* bzw. *ZFP36L2* wurden mittels spezifischer guideRNAs (gRNA) und Verwendung des Cas9-Enzyms deletiert. Dabei wurde die genetische Information von 180 bp der Zinkfingerdomänen (ZFD) in *ZFP36L1* bzw. 280 bp in *ZFP36L2* entfernt, wodurch trunkierte Proteine entstehen.

1×10^6 K-562-Zellen wurden zunächst wie in 3.1.5 beschrieben mittels Nukleofektion transfiziert, wobei $5 \mu\text{g}$ der Plasmide, kodierend für die guideRNAs für *ZFP36L1* (*ZFP36L1* gRNA 2, gRNA 3) und *ZFP36L2* (*ZFP36L2* gRNA 2, gRNA3) sowie das GFP-getagte Cas9-Enzym (CMV-Cas9-2A-GFP; Sigma Aldrich, siehe Tab.3), verwendet wurden. Nach der Nukleofektion wurden die Zellen für 72 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach dieser Zeit wurden einzelne GFP-positive Zellen mittels Fluoreszenz-aktivierten Zellsorts (FACS) in jeweils vier 96 well-Platten pro Ansatz sortiert, in denen $50 \mu\text{l}$ konditioniertes Medium (d.h. K-562-Transfektionsmedium, welches 24 h auf diesen Zellen inkubiert und 1:2 mit frischem Zellkulturmedium verdünnt wurde) vorgelegt war. Die Klone wurden im Brutschrank inkubiert und regelmäßig mikroskopisch analysiert, sowie frisches Zellkulturmedium dazugegeben. Nach 2 Wochen wurden die Klone, die eine Konfluenz von ca. 80 % erreichten, erst auf 48 und dann auf 24 well-Platten überführt. Die weitere Kultivierung der deletierten Klone erfolgte wie in 3.1.1 beschrieben. Der Zellsort erfolgte am Institut für Immunologie, UKSH, Kiel.

3.1.6.2 Analyse der potentiellen Klone

Nach dem Erreichen einer entsprechenden Zellzahl wurden die Klone mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) und Sanger-Sequenzierung auf das Vorhandensein der Deletion im Zielgen untersucht. Dazu wurden PCR-Analysen direkt an Zelllysaten durchgeführt, indem zunächst 1 ml der Zellsuspensionen (entspricht $\sim 1 \times 10^3$ Zellen) abgenommen, 5 min bei

200 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen wurde. Die Zellpellets wurden mittels des Direct PCR Lysis Kit (Peqlab) sowie der Proteinase K (Thermo Fisher Scientific) entsprechend der Herstellerangaben im Rotationsofen 5 h bei 45 °C lysiert und die Reaktion 45 min bei 85 °C beendet. Die Lysate wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Für die PCRs wurden 25 µl Reaktionsansätze mit 2 x AmpliTaq Gold 360 Master Mix (Thermo Fisher Scientific), je 0,2 µM Primer (für *ZFP36L1* T5F/R, für *ZFP36L2* T1F/R) und 2 µl der Lysate als Template verwendet. Die PCR wurde im Thermocycler 10 min bei 95 °C sowie für 35 Zyklen bestehend aus 95 °C 30 s, 57 °C für *ZFP36L1* bzw. 61 °C für *ZFP36L2* für 20 s sowie 40 s bei 72 °C inkubiert. Danach folgte die finale Elongation bei 72 °C für 7 min. Nach der PCR wurden die Proben auf ein 1,5 % Agarose-Gel aufgetragen (siehe 3.2.3). Die heterozygoten Klone wurden in Einfriermedium eingefroren, die Klone ohne Deletion verworfen. Die PCR-Produkte der potentiell homozygot deletierten Klone wurden mittels Sanger-Sequenzierung (siehe 3.2.11) analysiert, um die Deletion zu bestätigen. Die Klone der Einzel-*Knockouts* wurden weiterkultiviert bzw. bei -80 °C eingefroren und gelagert. Der *ZFP36L2*-deletierte Klon wurde für den Doppel-*Knockout* nach dem beschriebenen Verfahren transfiziert, um *ZFP36L1* ebenfalls zu deletieren.

3.1.6.3 Wiederherstellung der *ZFP36L1* & *ZFP36L2*-Expression in den *Knockout*-Zellen (*Rescue*)

Für den *Rescue* der *ZFP36L1* & *ZFP36L2*-Expression in den homozygot deletierten *Knockout*-Zellen wurden diese wie in 3.1.5 beschrieben mit Expressionsplasmiden transient transfiziert. Dabei wurden 5 µg der für das bzw. die fehlenden Gene kodierenden Plasmide in die Zellen inseriert (siehe Tab. 3). Nach der Transfektion wurden die Zellen 24 h im Brutschrank inkubiert, bevor sie für die weiteren Versuche ausgesät wurden. Der Nachweis der Wiederherstellung der *ZFP36L1* bzw. *ZFP36L2*-Expression erfolgte mittels RNA-basierter PCR. Dabei wurden die Expression der Zellen entsprechend der in 3.1.6.2. beschriebenen PCR analysiert.

3.1.7 Apoptose-Assay

Um Effekte auf die Apoptose zu analysieren, wurde die Aktivierung der Initiatorcaspase Caspase-9 mittels des Caspase Glo 9-Assays (Promega) untersucht. Diese steht am Beginn

der Caspase-Kaskade die letztendlich zur Bildung des sogenannten Apoptosoms und dem apoptotischen Zelltod führt. In diesem wird die Aktivität der intrazellulären Caspase-9 anhand der Spaltung eines nicht-lumineszierenden Substrats, welches eine Caspase-9-spezifische LEHD-Schnittstelle besitzt, in ein lumineszierendes Aminoluciferin, photometrisch quantifiziert. Dazu wurden 5×10^4 Zellen/50 μ l Zellmedium mit 2 μ M Imatinib für 24-48 h im Brutschrank behandelt. Danach wurden die Zellen mit 50 μ l des Caspase-Reagenz, mit gelöstem Substrat und MG-132-Inhibitor zur Reduktion der Hintergrundlumineszenz, 5 min auf dem Schüttler und 2 h im Dunklen bei RT inkubiert. Danach erfolgte die photometrische Analyse am Luminometer. Für die Analyse der Effekte auf die Apoptose wurden die Leerwerte (ohne Zellen) abgezogen, sowie auf die Kontrollzellen normalisiert.

3.1.8 Analyse von Apoptose und Nekrose in Echtzeit

Neben dem oben erwähnten Apoptose-Assay zur Analyse der Apoptose als Endpunktassay wurde das RealTime-Glo Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay (Promega) zur Detektion von Apoptose und Nekrose über einem Zeitraum von 72 h durchgeführt. Hierbei kann nicht nur der apoptotische Zelltod über die Präsenz von Phosphatidylserin und die Bildung von apoptotischen Körpern detektiert werden, sondern auch die Nekrose, die einhergeht mit einem Verlust der Membranintegrität und der Freisetzung zytoplasmatischer Bestandteile in den Extrazellularraum.

Der Versuch beruht zum einen auf der Detektion des Apoptosemarkers Phosphatidylserin (PS) auf der äußeren Zellmembran durch die Fusionproteine Annexin V-SmBIT und Annexin V-LgBIT, die aus Annexin V und jeweils einem Teil der NanoBit Luciferase bestehen. Bei der Translokation von PS auf die äußere Membran während des apoptotischen Prozesses führt die Komplementation der beiden Proteine zur Bildung einer funktionellen Luciferase, deren erzeugtes Lumineszenzsignal entsprechend quantifiziert werden kann. Zum anderen wird durch das zellmembranundurchgängige Necrosis Detection Reagenz die DNA von Zellmembranpermeabilisierten, nekrotischen Zellen gebunden und ein Fluoreszenzsignal erzeugt, welches der Quantifizierung der Nekrose dient.

Für dieses Assay wurden 1×10^4 Zellen/50 μ l Medium der Imatinib-behandelten Zellen auf einer weißen 96-well-Platten ausgesät und 100 μ l 2x Detection Label-Reagenz hinzupipettiert. Dieses wurde angesetzt aus 1 x Annexin NanoBIT Substrat, CaCl_2 , 1 x

Necrosis Detection Reagenz, 1 x Annexin V-SmBIT sowie 1x Annexin V-LgBIT, welche jeweils 1:500 in Zellkulturmedium verdünnt wurden. Die Inkubation erfolgte für einen Zeitraum von 72 h, mit Messungen nach 0, 24, 48 und 72 h. Die Detektion der Apoptose erfolgt durch Lumineszenz, die der Nekrose durch Exzitation bei 485 nm und Emission bei 525 nm am Tecan Reader. Für die Analyse der Effekte auf die Apoptose bzw. Nekrose wurden die Leerwerte (ohne Zellen) abgezogen, sowie auf die nativen Zellen normalisiert.

3.1.9 BrdU-Proliferationsassay

Mittels des BrdU-Proliferationsassays (Calbiochem, Darmstadt) wurde untersucht, wie sich die Proliferation der Zellen unter Imatinib-Behandlung verändert. Dazu wird der Einbau des Bromodesoxyuridin (BrdU), eines Thymidin-Nukleotidderivats, in die neu synthetisierte DNA proliferierender Zellen mittels eines Immunoassays nachgewiesen.

Dazu wurden 2×10^4 Imatinib-behandelte Zellen/100 μ l Medium in 96-well-Platten ausgesät und mit 20 μ l BrdU-Label (1:2000 in Zellkulturmedium verdünnt) für 24 h im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Platte 10 min bei 200 x g zentrifugiert und die Überstände entfernt. Die Zellen wurden nachfolgend mittels 200 μ l Fixative/Denaturing Solution 30 min fixiert. Nach der Fixierung wurden die Überstände entfernt und das Immunoassay durch 1 h-Inkubation mit 100 μ l Anti-BrdU-Antikörpers (1:100 in Antibody Dilution Buffer verdünnt), drei Waschsritten mit Wash Buffer (1:20 verdünnt mit dH₂O), gefolgt von der 30 min-Inkubation mit 100 μ l Peroxidase Goat Anti-Mouse IgG HRP Conjugate (1:1000 in Conjugate Diluent, angesetzt und durch einen 0,2 μ m Filter filtriert) sowie weiteren drei Waschsritten mit Wash Buffer sowie einem mit dH₂O durchgeführt. Der Nachweis der Antikörperbindung erfolgte über eine Farbreaktion für die zunächst 100 μ l Substrate Solution zu den Zellen pipettiert und 15 min im Dunklen inkubiert wurde und die nachfolgend mittels 100 μ l Stop Solution beendet wurde. Die Quantifizierung erfolgte spektrometrisch bei 450 und 540 nm am Tecan-Reader. Für die Analyse der Proliferation wurden die Leerwerte (ohne Zellen) abgezogen, sowie auf die nativen Zellen normalisiert.

3.1.10 Messung der Zytotoxizität

Um die Anzahl an toten Zellen zu messen, wurde das CytoTox-Glo-Assay (Promega) durchgeführt. Hier wird die Aktivität einer intrazellulären Protease gemessen, die das Reagenz in ein lumineszierendes Luciferin spaltet. Diese Aktivität kann nur dann gemessen werden, wenn die intrazelluläre Protease durch den Tod der Zellen und der damit verbundenen Permeabilisierung der Zellmembran aus dem Zytoplasma entlassen wird. Für dieses Assay wurden 5×10^4 Zellen/50 μ l Zellkulturmedium auf 96 well-Platten ausgesät und mit 2 μ M Imatinib für 24-48 h im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden 25 μ l des Cytotox-Reagenz zu den Zellen pipettiert und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Lumineszenz am Luminometer gemessen. Die Effekte auf die Zytotoxizität wurden jeweils durch Abzug der Leerwerte (ohne Zellen) und Normalisierung auf die Kontrollzellen berechnet.

3.1.11 Viabilitätsassay

Das WST-1-Viabilitätsassay (Roche) wurde durchgeführt, um zu testen, ob die Zellen nach Transfektion und/oder einer Behandlung mit Imatinib veränderte Sensitivität zeigten. Dieses Assay dient als Maß für die Aktivität der mitochondrialen Atmungskette, da das WST-1-Reagenz durch mitochondriale Dehydrogenasen in ein lösliches Formazan umgesetzt wird, welches spektrometrisch verfolgt werden kann. Damit kann indirekt ein Rückschluss auf die Zellviabilität geschlossen werden. Für dieses Assay wurden 5×10^4 der zu testenden Zellen in 100 μ l Zellkulturmedium in 96 well-Platten ausgesät und mit bzw. ohne Imatinib für 24-48 h im Brutschrank kultiviert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 10 μ l des WST-1-Reagenz zu den Zellen pipettiert, die Platten kurz geschwenkt und für 2 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurde der Farbumschlag spektrometrisch bei 440 nm sowie 600 nm als Referenzwert im Tecan-Reader analysiert. Die Effekte auf die Zellviabilität wurden jeweils berechnet, indem von den Proben der Blank-Wert (ohne Zellen) abgezogen, sowie auf die Kontrollzellen normalisiert wurde.

3.1.12 Zelloberflächenfärbung

Die Färbung von ABCG2 an der Zelloberfläche erfolgte mittels eines FITC-gelabelten Antikörpers und Durchflusszytometrie. Dazu wurden 1×10^5 Zellen pro Versuchsansatz

pelletiert (5 min, 200 x g, 4 °C) und mit kaltem PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen in 96 well-Platten mit V-Boden transferiert, pelletiert und mit Waschpuffer (PBS, supplementiert mit 1 % BSA) gewaschen. Die Färbung erfolgte durch Inkubation mit dem monoklonalen FITC-konjugierten ABCG2-Antikörper (5D3) bzw. der Isotypkontrolle (MG2b-57; je 100 µg/ml, beides BioLegend, San Diego, USA) für 25 min bei 4 °C. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen zweimal mit Waschpuffer gewaschen und anschließend in 1 % Paraformaldehyd/PBS fixiert. Die Analyse der Färbung erfolgte am FACSCalibur Durchflusszytometer und der CellQuest Pro Software (BD Biosciences, Heidelberg). Für weitere Analysen wurde FlowJo v.10 (FlowJo LLC, Ashland, USA) verwendet. Als Positivkontrolle für die ABCG2-Expression dienten die 0,5 µM Imatinib-resistenten K-562. Die Messung der Proben sowie die Datenauswertung erfolgten in Zusammenarbeit mit Daniel Gonnermann (Institut für Immunologie, UKSH, Kiel).

3.1.13 Transportassay

Um den ABCG2-vermittelten Efflux zu analysieren, wurde ein Transportassay durchgeführt, bei dem das fluoreszierende ABCG2-Substrat Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, München) verwendet wurde. Die Fluoreszenz dieses Farbstoffs lässt sich im Zellüberstand nachweisen und dient damit der Quantifizierung des Efflux. Dazu wurden 5×10^5 Zellen pro Ansatz verwendet und 5 min bei 200 x g und 4 °C pelletiert. Das Pellet wurde in 1 ml RPMI ohne Zusätze aufgenommen. Danach erfolgte die Prä-Inkubation mit bzw. ohne dem ABCG2-Inhibitor Ko-143 (600 nM; Santa Cruz, Dallas, USA) für 30 min im Brutschrank. Zu allen Versuchsansätzen wurde 0,5 µg/ml Hoechst 33342 gegeben und ebenfalls für 30 min im Brutschrank inkubiert. Alle weiteren Schritte nach dieser Inkubationszeit erfolgten bei 4 °C. Die Zellen wurden bei 200 x g für 5 min pelletiert und mit kaltem Opti-MEM gewaschen. Nach dem Waschen wurde das Pellet in 200 µl kaltem Opti-MEM aufgenommen und 30 min im 37 °C-warmen Wasserbad inkubiert, um den Efflux zu ermöglichen. Die Kontrollproben, sowie die Proben nach der Inkubation wurden auf Eis gelagert und bei 200 x g für 5 min und 4 °C pelletiert. Die Zellüberstände wurden in schwarze 96 well-Platten mit durchsichtigem Boden transferiert und im Tecan Reader bei 350 nm Exzitations- sowie 460 nm Emissionswellenlänge gemessen. Die Daten wurden normalisiert auf native Zellen bzw. die Kontroll-transfizierten Zellen und 0 min Proben der transfizierten Ansätze.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Isolation der genomischen DNA

Die Isolation der genomischen DNA aus Zelllinien erfolgte mittels des Genra Puregene Kit (Qiagen) unter Verwendung von 1×10^6 Zellen entsprechend der Herstellerangaben. Die Konzentration der isolierten DNA, sowie deren Qualität wurden photometrisch am NanoDrop bzw. Qubit bei 260 und 280 nm gemessen. Die DNA wurde bis zur weiteren Verwendung in Gefäße mit Schraubverschluss überführt und bei 4 °C gelagert.

3.2.2 Polymerase-Ketten-Reaktion zur Mutationsanalyse

Zur Amplifikation des gewünschten Genabschnittes des *BCR/ABL*-Fusionsgen wurde die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) verwendet. Dazu wurden Reaktionsansätze aus 10 x Puffer, 1,5 mM $MgCl_2$, 1 U *Taq* DNA Polymerase, 0,2 mM dNTPs sowie 0,5 μ M der Primer pipettiert. Die PCR erfolgte durch initiale Denaturierung bei 94 °C für 3 min, 32 Zyklen bestehend aus 94 °C für 30 s, 65 °C für 30 s und 72 °C für 1 min 45 s, sowie finaler Elongation bei 72 °C für 5 min. Bis zum Auftragen auf ein Agarose-Gel wurden die PCR-Proben bei 4 °C gelagert.

3.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Um DNA-Fragmente anhand ihrer Größe aufzutrennen, wurden Agarose-Gelelektrophoresen durchgeführt. Dazu wurden 1,5-2 % Agarose unter Erhitzen in TBE-Puffer aufgelöst, mit 0,001 % HD Green vermischt und die Gele in Gelgießstände gegossen. Nach dem Aushärten wurden die Gele mit den Proben, verdünnt mit 6 x Ladepuffer, sowie einem 100 bp bzw. 1 kb Marker als Größenstandard beladen und bei 120 V für 25-40 min laufen gelassen. Die Detektion des DNA-interkalierenden HD Green erfolgte am Intas iX20 Imager (Intas, Göttingen).

3.2.4 Klonierung

Die Klonierung einer gewünschten Zielsequenz in einen Expressionsvektor erfolgte mittels des In-Fusion HD Cloning Kits (Takara). Dazu wurde zunächst die kodierende Sequenz von *ZFP36L1* bzw. *ZFP36L2* unter Verwendung des CloneAmp Hifi PCR Premix amplifiziert und die

PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und mittels des GeneJet Gel Extraction Kits (Thermo Fisher Scientific) entsprechend der Herstellerangaben aus dem Gel extrahiert. Die PCR-Produkte wurden mittels des Cloning Enhancers sowie unter Verwendung der Restriktionsenzyme XhoI und PstI (NEB) entsprechend der Herstellerangaben in den Vektor pEGFP-N3 ligiert und in kompetenten Bakterien vermehrt. Dazu wurden die hitzekompetenten *Stellar Competent* - Bakterien mit dem Plasmid auf Eis für 30 min inkubiert und mittels 60 s *heat shock*-Transformation bei 42 °C permeabilisiert, in 400 µl LB-Medium aufgenommen und 1 h bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurden die Bakterien pelletiert, in 150 µl LB-Medium aufgenommen und auf LB-Agarplatten mit 50 µg/ml Kanamycin über Nacht im Brutschrank bei 37 °C kultiviert. Am nächsten Tag konnten die gewachsenen Kolonien in 5 ml LB-Kanamycin-Medium aufgenommen und über Nacht im Schüttler bei 37 °C vermehrt werden. Aus diesen Kulturen konnte mittels des Plasmid Mini Kits (Qiagen) die Plasmid-DNA isoliert werden. Die Plasmid-DNA wurde mittels Sanger-Sequenzierung überprüft und bei positivem Ergebnis die entsprechenden Bakterien in 200 ml LB-Kanamycin-Kulturen amplifiziert und die Plasmid-DNA mittels des PureYield Plasmid Midiprep Kits (Promega) isoliert. Die Konzentrationsbestimmung der Plasmid-DNA erfolgte jeweils photometrisch bei 260 nm am NanoDrop, die Lagerung bei -20 °C.

3.2.5 RNA-Extraktion

Die RNA-Isolation aus Zellkulturen erfolgte mittels des peqGold TriFast-Reagenz (Peqlab) entsprechend der Herstellerangaben. Das Verfahren beruht auf einer Lyse der Zellen mit anschließender Aufreinigung der wässrigen, RNA-haltigen Phase und wurde nach Herstellerangaben unter Verwendung von 500 µl TriFast-Reagenz durchgeführt. Die Konzentration der RNA wurde photometrisch bei 260 nm mittels NanoDrop gemessen und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.2.6 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription von isolierter RNA war notwendig, da die RNA selbst nicht als Template für die quantitative real-time-PCR zur Verfügung stehen kann. Dazu wird die RNA mittels *random-hexamer* und Oligo-dT-Primern, die spezifisch an die Poly-Adenosin-Enden

der mRNA binden, durch eine Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Daher wurde die RNA mittels des Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific) unter Verwendung von 2 µg RNA entsprechend der Herstellerangaben 10 min bei 25 °C, 30 min bei 65 °C und 5 min bei 85 °C in komplementäre cDNA umgeschrieben. Diese wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.2.7 Quantitative *Real Time*-Polymerase-Ketten-Reaktion

Um quantitative Aussagen über die RNA-Expression eines Gens zu erhalten, wurden quantitative real time-PCRs (qRT-PCR) durchgeführt. Hierbei wird die Expression einer mRNA/microRNA mit der eines *housekeeping-genes*, also einer mRNA bzw. microRNA mit ubiquitärer, gleichmäßiger Expression in allen Geweben und Zelllinien, verglichen und damit Rückschlüsse auf das Verhältnis mehrerer mRNAs/microRNAs zueinander ermöglicht. Hierzu wurden TaqMan-Assays verwendet, die aus einer Sonde sowie einem Vorwärts- und Rückwärtsprimer bestehen. An der Sonde sind ein *Quencher* sowie ein Fluorophor gekoppelt. In einer PCR-Reaktion wird das Zielgen amplifiziert und im Zuge der Amplifikation die Fluorophore der Sonde abgespalten. Die so erzeugte Fluoreszenz wird dann detektiert und über die ΔC_t -Methode quantifiziert.

Dazu wurden 20 Reaktionsansätze pipettiert, bestehend aus 2 x TaqMan Universal Master Mix, without UNG, H₂O, 50 ng cDNA-Template sowie den TaqMan-Assays. Die Ansätze wurden in 96 well-Platten pipettiert, die Platten versiegelt, gevortext und bei 200 x g 1 min zentrifugiert. Danach wurden die qRT-PCRs im QuantStudio 7 entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Die Versuche erfolgten jeweils in Triplikaten, einer Negativkontrolle sowie unter Verwendung der *housekeeping-genes 18 S*, *GAPDH*, bzw. *Mammalian U6* für microRNA-Expressionsmessungen. Für die Auswertung nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode [139] wurden den C_t -Werten der Zielgene zunächst die der *housekeeping-genes* abgezogen, so dass sich ein ΔC_t -Wert ergibt. Im nachfolgenden Schritt wurden diese auf die Kontrollzellen (NC) bezogen ($\Delta\Delta C_t$) und durch $2^{-\Delta\Delta C_t}$ als relative Expressionswerte angegeben.

3.2.8 Analyse der Genexpression mittels Microarrays

Um die Genexpression bzw. deren Veränderungen zu messen, wurden GeneChip HuGene 2.0 ST-Arrays (Affymetrix) durchgeführt. Mit diesen können sowohl die mRNA-Expression sowie nicht-kodierende Transkripte gemessen werden. Dazu wird die eingesetzte RNA zunächst in cDNA umgeschrieben, der komplementäre Doppelstrang synthetisiert und die RNA degradiert. Danach erfolgt die Amplifikation der *antisense* cRNA mittels einer T7 RNA Polymerase. Diese cRNA wird dann aufgereinigt und nachfolgend in einzelsträngige ss-DNA umgeschrieben und das RNA-Template entfernt. Die einzelsträngige ss-DNA wird wiederum aufgereinigt, fragmentiert und Biotin-gelabelt und auf die Arrays hybridisiert. Diese werden nach der Hybridisierung, gewaschen und gefärbt, bevor die Detektion im Scanner erfolgt.

Die Analysen wurden durchgeführt an jeweils 2 biologischen Replikaten der K-562, K-562^{0,5}, K-562² und K-562^N. Dabei wurden für jede Zelllinie vier technische Replikate gemessen. Für die Messung wurden 3×10^6 Zellen eingesetzt und die RNA mittels des miRVana miRNA Isolation Kit (Ambion) isoliert und 350 ng RNA Ausgangsmaterial eingesetzt. Die Durchführung der Expressionsanalysen erfolgte gemäß der Herstellerangaben unter Verwendung des WT Plus Reagent Kits, des GeneChip Hybridization, Wash and Stain Kits sowie der GeneChip Human Gene 2.0 ST Chips auf dem Thermocycler GeneAmp PCR System 9700, sowie des GeneChip Hybridization Oven 645, der Fluidics Station 450 sowie des Scanner 300 7 G und Command Console Software (Affymetrix).

Die Auswertung der Genexpression erfolgte unter Verwendung der Expression Console und Transcriptome Analysis Console (Affymetrix). Dazu wurden die Zelllinien der Imatinib- (0,5; 2 μ M) und Nilotinib (100 nM) -Resistenz verglichen und die Gene als differenziell exprimiert angesehen, die in t-Tests und nach p-Wert-Korrektur mit *false discovery rate* einen korrigierten p-Wert $\leq 0,05$ und einen *fold change* ± 2 besaßen. Die differenziell exprimierten Gene wurden gefiltert, in dem die Gene aus der Analyse ausgeschlossen wurden, die keine klare Genannotation besaßen. Die differenziell exprimierten Gene wurden mittels *Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins* (STRING)-Analysen auf gemeinsame Interaktionen unter Verwendung von 0,7 als Konfidenzlevel der potentiellen Interaktion analysiert, um Netzwerke und Interaktionen zu identifizieren. Zusätzlich dazu wurden *Pathway*-Analysen mittels der *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG)-*Pathways* durchgeführt, um die Signalwege zu analysieren, in denen die differenziell exprimierten

Gene angereichert vorkommen. Des Weiteren wurden die differenziell exprimierten Gene, wie auch die gemessenen Proben, nach Z-Transformation der Expressionswerte mittels Cluster 3.0 hinsichtlich der Ähnlichkeit ihrer Expression in funktionelle Cluster unter Verwendung der Spearman-Rank-Korrelation hierarchisch geclustert.

3.2.9 Genomweite Methylierungsanalyse

Mittels des Infinium MethylationEPIC BeadChips (Illumina) wurde die Methylierung von TKI-sensitiven und –resistenten Zelllinien untersucht. Dabei wird die Methylierung von ~850.000 CpGs des gesamten Genoms analysiert. Die Methode beruht auf dem Austausch von unmethylierten Cytosinen in Uracil mittels Bisulfit-Konversion und der anschließenden Messung des Nukleotideinbaus auf Einzelbasenebene.

Die Analysen wurden durchgeführt an den K-562, K-562² und K-562^N unter Verwendung von 250 ng DNA. Die Durchführung erfolgte in Kooperation mit Ole Ammerpohl, Institut für Humangenetik, UKSH Kiel bzw. Universitätsklinikum Ulm. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels der Genome Studio Software (MethylationEPIC v.1.0_B4) unter Verwendung von 1 % *false discovery-rate* sowie Analyse der differenziellen Methylierung mittels ANOVA mit p-Wert-Korrektur nach *false discovery rate* und ein *Cutoff* von $\pm 0,20$ des β -*Values* (als Maß für die Veränderung der Methylierung) gesetzt. Dabei wurden die CpGs als differenziell methyliert angesehen, die einen korrigierten p-Wert $\leq 0,05$ und eine differenzielle Methylierung von >20 % Unterschied zwischen den untersuchten Proben (K-562 vs. K-562²; K-562 vs. K-562^N) zeigten. Dabei erfolgte die Analyse zunächst für die beiden biologischen Replikate unabhängig und nachfolgend wurden die CpGs ermittelt, die eine differenzielle Methylierung in beiden biologischen Replikaten besaßen. Für die weitere Auswertung sowie Filterung der Daten wurden die differenziell methylierten CpGs differenziell exprimierter Gene mittels PERL v5.26.2 anhand des ersten annotierten Gennamens des CpGs zugeordnet. Im nächsten Schritt wurden die CpGs entfernt, deren Veränderung der Methylierung in den biologischen Replikaten der Resistenzzüchtung nicht in die gleiche Richtung erfolgte. Die Filterung der Daten mittels PERL sowie die Erstellung von Circos-Plots unter Verwendung der Circos-Software [140] wurden in Zusammenarbeit mit Ruwen Böhm, Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie, UKSH Kiel, durchgeführt.

3.2.10 Exom-Sequenzierung

Das *Whole Exome Sequencing* wurde verwendet, um die proteinkodierenden Gene im Genom zu sequenzieren. Dabei wird, anders als bei *Whole Genome Sequencing*-Methoden, nicht das gesamte Genom sequenziert, sondern nur der Teil, der als Exom in mRNA transkribiert und in Aminosäuren translatiert wird und der Fokus in der Analyse insbesondere auf proteinmodifizierenden Mutationen gelegt.

Die Analysen wurden durchgeführt an der K-562, K-562^{0,5}, K-562² und K-562². Die *Inview Human Exome Advance*-Sequenzierung erfolgte an 1 µg DNA mittels Illumina Sequenzierungstechnologie unter Verwendung einer *Random-geprimten cDNA-Library*, 60 x *Coverage* sowie 4 x 150 bp Readlänge bei GATC, Konstanz. Für die Auswertung des Gesamtvergleichs der Imatinib-Resistenzzüchtungen wurden zunächst die *single nucleotide variants* (SNV) identifiziert, die in mindestens 1 Probe auftreten und in min. 5 % der *Reads* vorhanden waren. Des Weiteren wurde eine *Pathway-Enrichment*-Analyse durchgeführt, um zu testen, ob die SNVs in bestimmten Signalwegen vermehrt akkumulierten, sowie ein SNV-Muster für die einzelnen Proben aus dem Gesamt-Pool an SNVs erstellt. Um zu testen, ob die SNVs bestimmten Tumorsignaturen entsprachen, wurden diese mit dem *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer* (COSMIC) abgeglichen. Für die Einzelauswertungen der Imatinib-Resistenzzüchtungen wurde ein *Cutoff* von ±20 % gesetzt, und alle SNVs einbezogen, die im Vergleich von unbehandelten Zellen mit 0,5 µM Imatinib-resistenten Zellen auftraten und damit die Veränderung zu den 2 µM Imatinib-resistenten Zellen verfolgt. Die Auswertung der Exom-Sequenzierung erfolgte in Kooperation mit Daniela Esser, Institut für Experimentelle Medizin, UKSH Kiel.

3.2.11 Sanger-Sequenzierung

Die Sequenzierung von PCR-Produkten erfolgte am Institut für klinische Molekularbiologie (IKMB), Kiel. Dazu wurden 25 µl PCR-Produkt bzw. 300 ng Plasmid mit den entsprechenden Sequenzierprimern (siehe Tab. 4) verwendet. Die Analyse der Sequenzierungsergebnisse erfolgte mittels der Genome Compiler Software (Twist Bioscience).

3.3 Biochemische Methoden

3.3.1 Zellyse

Die Erzeugung von Zelllysaten für die Durchführung von Western Blots erfolgte durch Verwendung von denaturierendem Lysepuffer sowie Ultraschall an $1-2 \times 10^6$ Zellen pro Versuchsansatz. Dazu wurden die Zellen bei $200 \times g$ 5 min pelletiert und der Überstand verworfen. Die Pellets wurden mit kaltem PBS gewaschen und, je nach Größe des Zellpellets, in 50-100 μ l Lysepuffer aufgenommen (20 mM TRIS, pH 7.4; 2 % Natriumdodecylsulfat (SDS); 1 % Proteaseinhibitor), 5 min bei 95 °C inkubiert und sonifiziert. Nach Zentrifugation bei $15.000 \times g$ für 15 min bei 4 °C zur Trennung von unlöslichem Material wurde der Überstand in neue Eppendorf-Gefäße überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.3.2 Proteinbestimmung

Zur Bestimmung der Menge an isoliertem Protein in Lysaten mittels Bradford-Methode wurde das Roti-Nanoquant-Reagenz (Carl Roth) verwendet. Diese Methode beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes Coomassie-Brillantblau nach unspezifischer Bindung an kationische und hydrophobe Aminosäuren von 465 zu 595 nm. Dazu wurden 20 μ l der 1:30 mit Lysepuffer vorverdünnten Proben, sowie 0,1 mg/ml und 0,2 mg/ml Proteinstandard Protein Assay Standard II (Bio-Rad) und eines Blanks mit 980 μ l des Roti-Nanoquant-Reagenz in Küvetten vermischt, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und spektrometrisch bei 595 nm vermessen. Aus den so ermittelten Referenzwerten lässt sich mittels linearer Regression die Proteinkonzentration bestimmen.

3.3.3 Western Blot

Für die Durchführung von Western Blots wurden 10-20 μ g Protein auf 10 oder 12 % SDS-Polyacrylamid-Gelen (für die Zusammensetzung sowie die verwendeten Puffer siehe 12.5) aufgetrennt und auf Polyvinylidendifluorid-Membranen (Millipore, Schwalbach) übertragen. Dazu wurden die Proben in 5 x Probenpuffer (60 mM TRIS pH 6.8, 25 % Glycerol, 2 % SDS, 14,4 mM β -Mercaptoethanol) verdünnt, 5 min bei 95 °C erhitzt, auf die Gele aufgetragen und zunächst 15 min bei 100 V und dann bei 150 V laufen gelassen, bis die Lauffront die Gelkante erreicht hat. Für den Transfer auf die Membranen wurden die Gele 60 min bei 43 mA pro Gel geblottet. Die Membranen wurden mit 4 % Milchpulver, gelöst in TBST (TRIS-

buffered saline with Tween-20), blockiert. Danach erfolgte die Inkubation mit den primären Antikörpern (für Verdünnungen siehe Tab. 1) über Nacht unter Rotation bei 4 °C. Nach 2 Waschschritten mit TBST wurden die Membranen mit dem sekundären Antikörper für 30 min inkubiert (siehe Tab. 1). Nach weiteren drei Waschschritten mit TBST wurden die Membranen mittels des *enhanced chemiluminescence* (ECL)-Systems und Hyperfilmen (CEA GmbH; Millipore) entwickelt.

Vor Inkubation mit dem *Housekeeper* GAPDH wurden die Membranen mittels 2 % SDS, 62,5 mM TRIS und 100 mM β -Mercaptoethanol 30 min bei 50 °C gestrippt. Nach Waschen mit TBST und Blockieren der Membranen mit Milchpulver erfolgte die Inkubation mit dem primären und sekundären Antikörpern wie oben beschrieben.

3.4 Statistik

Die Auswertung der Genexpressions-, Methylierungs- und Exom-Daten erfolgte wie bereits beschrieben. Für die weitere experimentelle Auswertung, soweit nicht beschrieben, wurden die Daten mittels t-tests bzw. ANOVA mit nachfolgendem Dunnet's Test ausgewertet. P-Werte $\leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen. Die Auswertung erfolgte mittels GraphPad Prism 7.0.

4 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung BCR/ABL-unabhängiger Mechanismen in der Imatinib- und Nilotinib-Resistenz. Hierzu wurde ein TKI-Resistenzmodell etabliert, in dem unbehandelte K-562-CML-Zellen gegen Imatinib bzw. dem *second line*-Wirkstoff Nilotinib resistent gezüchtet wurden. Für Imatinib erfolgte die Resistenzzüchtung bis hin zur angestrebten Plasmakonzentration von 2 μM , für Nilotinib bis 100 nM.

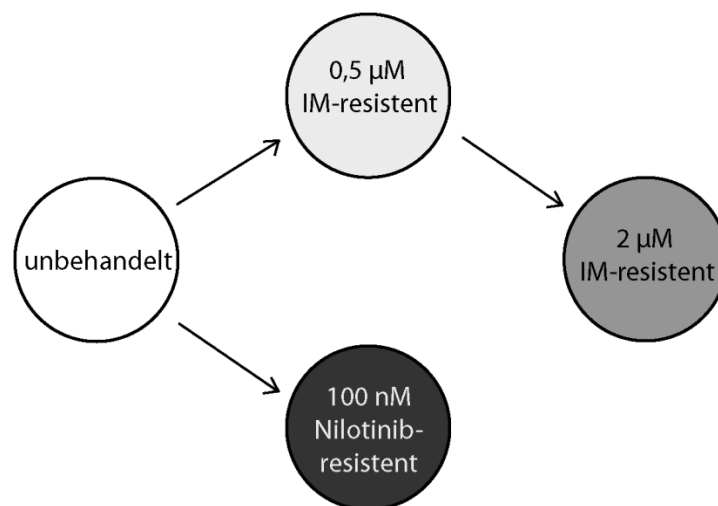


Abbildung 9: Schematische Abbildung des *in vitro*-Resistenzmodells der CML-Zelllinie K-562. Die Zellen wurden resistent gezüchtet gegen Imatinib (0,5 μM IM; 2 μM IM) sowie 100 nM Nilotinib. Die Authentizität der Zelllinien wurde für alle Zelllinien mittels *short tandem repeats* bestätigt (siehe 8.4). Bei der Analyse der BCR/ABL-Kinasedomäne mittels PCR und Sanger-Sequenzierung konnten für alle Zelllinien keine Mutationen festgestellt werden, so dass den hier untersuchten Resistenzen BCR/ABL-unabhängige Mechanismen zugrunde liegen (siehe 8.2). IM: Imatinib.

4.1 Einfluss und Regulation von ABCG2 während der Imatinib-Resistenzentwicklung

4.1.1 Differenzielle Expression von ABCG2 während der Imatinib-Resistenzentwicklung

Zunächst wurde die ABCG2-Expression auf mRNA-Ebene mittels quantitativer RT-PCR sowie auf Proteinebene mittels Western Blotting bzw. Durchflusszytometrie im Vergleich von unbehandelten und Imatinib-resistenten K-562-Zelllinien (nativ; 0,1-2 μM) untersucht. Hierdurch sollten die Ergebnisse der vorherigen Studie hinsichtlich des ABCG2-Expressionsverlaufs [76] in dem hier etablierten Imatinib-Resistenzmodell überprüft werden.

In den durchgeführten Analysen zeigte ABCG2 sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene eine erhöhte Expression bei niedrigen Imatinib-Konzentrationen (mit Maxima bei 0,3-0,5 μM). Im Vergleich zu unbehandelten Zellen ergab sich jedoch eine deutliche Herunterregulation bei 2 μM Imatinib (Abb. 10). Dieser Expressionsverlauf zeigte sich sowohl auf mRNA-Ebene (B), als auch im Gesamtprotein (A) sowie als an der Oberfläche-lokalisierter Transporter (C).

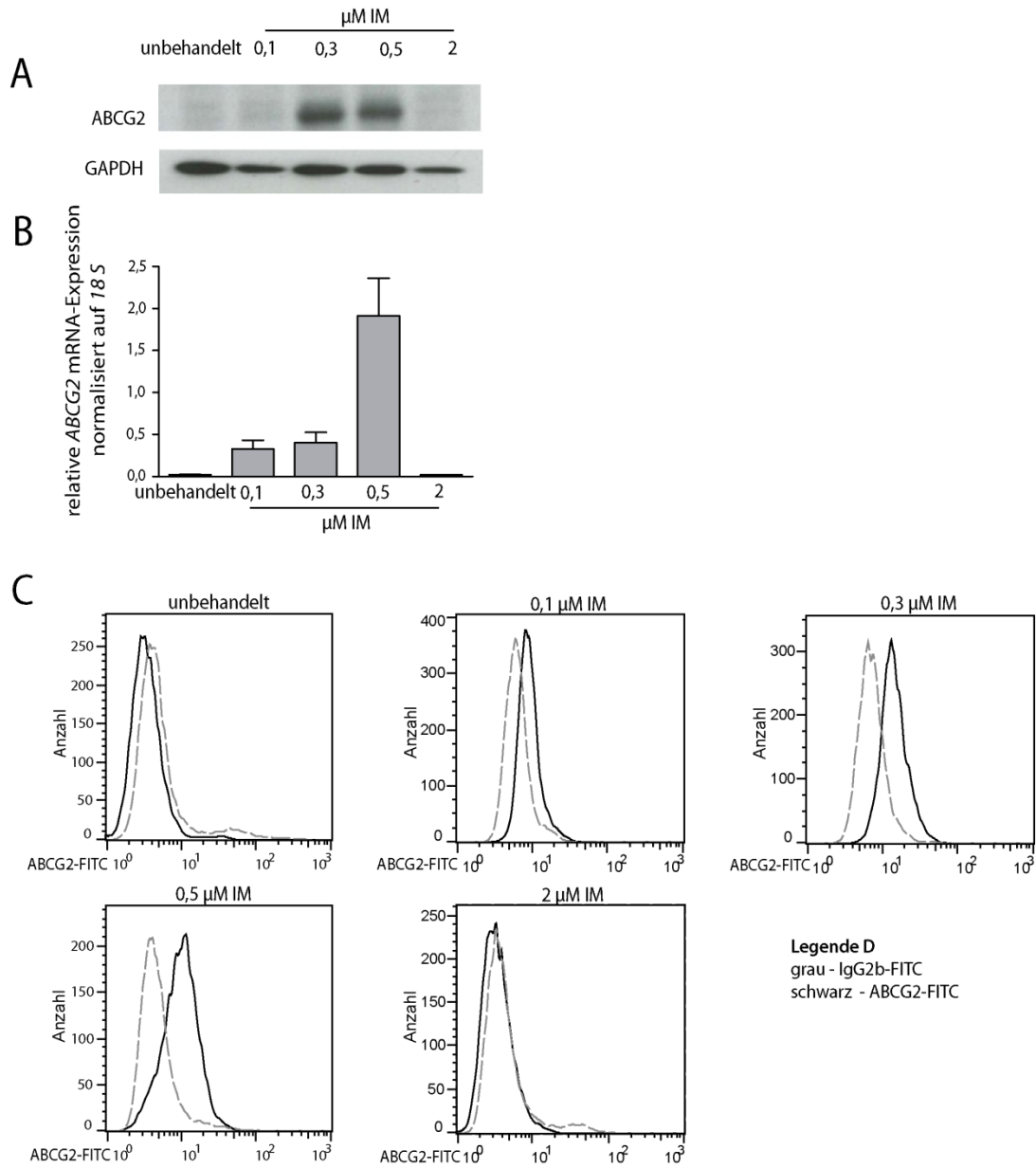


Abbildung 10: ABCG2 mRNA- und Proteinlevel von unbehandelten und Imatinib-resistenten Zellen (0,1; 0,3; 0,5 & 2 μM IM). (A) Western Blot-Analyse des ABCG2-Proteinlevels während der Imatinib-Resistenzentwicklung im Vergleich zu GAPDH. Dargestellt ist ein Western Blot aus drei identischen Ergebnissen; (B) ABCG2 mRNA-Expression der unbehandelten und Imatinib-resistenten Zellen analysiert mittels qRT-PCR, normalisiert auf 18 S; (C) Oberflächenfärbung von funktionellem ABCG2-Protein der unbehandelten und Imatinib-resistenten Zelllinien. Grau: FITC-gelabelte Isotypkontrolle; schwarz: FITC-konjugierter ABCG2-Ak. N=3; dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD. IM: Imatinib. Modifiziert nach (Kaehler *et al.*, 2017).

4.1.2 Effekte der miR-Inhibition auf Überleben und Apoptose Imatinib-sensitiver und Imatinib-resistenter Zellen

Die *ABCG2*-Expression wird posttranskriptionell besonders durch miR-212, aber auch miR-328 reguliert [76]. Diese microRNAs zeigten inverse Expressionsverläufe zu dem *ABCG2*-Protein während der Imatinib-Resistenzentwicklung, mit der geringsten Expression bei geringen Imatinib-Konzentrationen (0,3; 0,5 μ M). Daher stellte sich die Frage, ob die Imatinib-Sensitivität direkt durch Veränderung des endogenen Levels der microRNAs beeinflussen lässt.

Zu diesem Zweck wurden Transfektionsexperimente mit miR-Mimics (pre-miR) und miR-Inhibitoren (anti-mir) der miR-212 und mir-328 durchgeführt und die Effekte auf die Zellviabilität anhand der Funktion der mitochondrialen Atmungskette im WST-1-Assay, sowie die Apoptose mittels Caspase 9 Glo-Assay 48 h nach Transfektion und Inkubation mit 2 μ M Imatinib untersucht.

Die Transfektionsexperimente zeigten, dass die Erhöhung des intrazellulären miR-212-Levels mittels pre-miR-212 keinen Effekt auf die Zellen hatte (Abb.11). Stattdessen führte die Inhibition der miR-212 durch die verwendete anti-miR-212 in unbehandelten, Imatinib-sensitiven Zellen zu einem 1,4-fachen Anstieg der Zellviabilität ($p=0,01$) und 22 % Reduktion der Apoptose ($p=0,01$). Diese Effekte waren jedoch limitiert auf die Imatinib-sensitiven Zellen und konnten in Imatinib-resistenten Zellen nicht beobachtet werden. Eine Veränderung des miR-328-Levels mittels pre-miR-328 oder anti-miR-328 hingegen führte in allen getesteten Zelllinien zu keinen Veränderungen der Imatinib-Sensitivität (Abb.12).

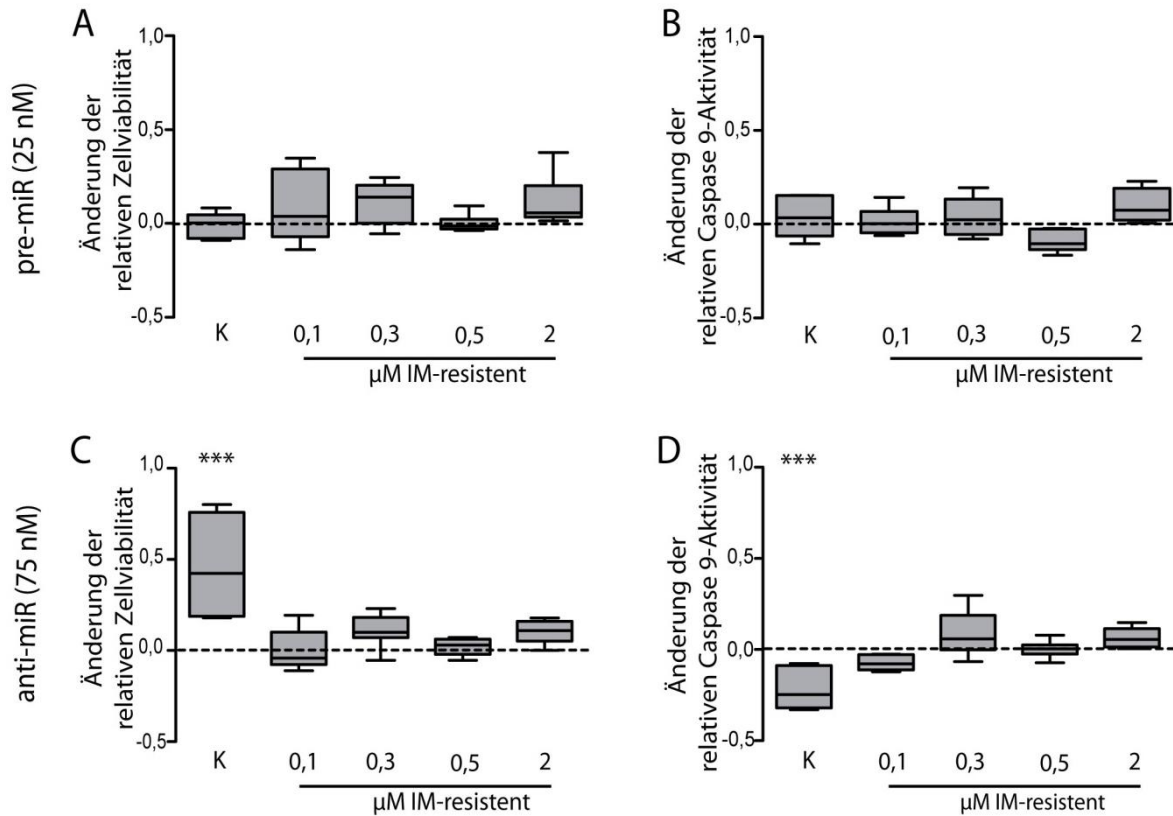


Abbildung 11: MiR-212-abhängige Veränderungen der Imatinib-Sensitivität unbehandelter und Imatinib-resistenter Zellen (0,1; 0,3; 0,5 & 2 μM). Analyse der Zellviabilität mittels WST-1-Assay (A) sowie der Apoptose mittels Lumineszenz-basiertem Caspase 9 Glo-Assay (B) nach Transfektion von pre-miR-212 und anti-miR-212 (C und D). Die Zelllinien wurden mit der Negativkontrolle, 25 nM miR-Mimic oder 75 nM miR-Inhibitor transfiziert und für 48 h mit 2 μM IM inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte sowie SD der auf die Negativkontroll-transfizierten Zellen normalisierten Daten als Box-Whisker-Plots. Die Statistische Analyse erfolgte mittels *Two-way* ANOVA mit nachfolgendem Dunnet's Test; $n=3$. *** $p < 0,01$. IM: Imatinib; K: unbehandelte, imatinib-sensitve Zellen. Modifiziert nach (Kaehler *et al.*, 2017).

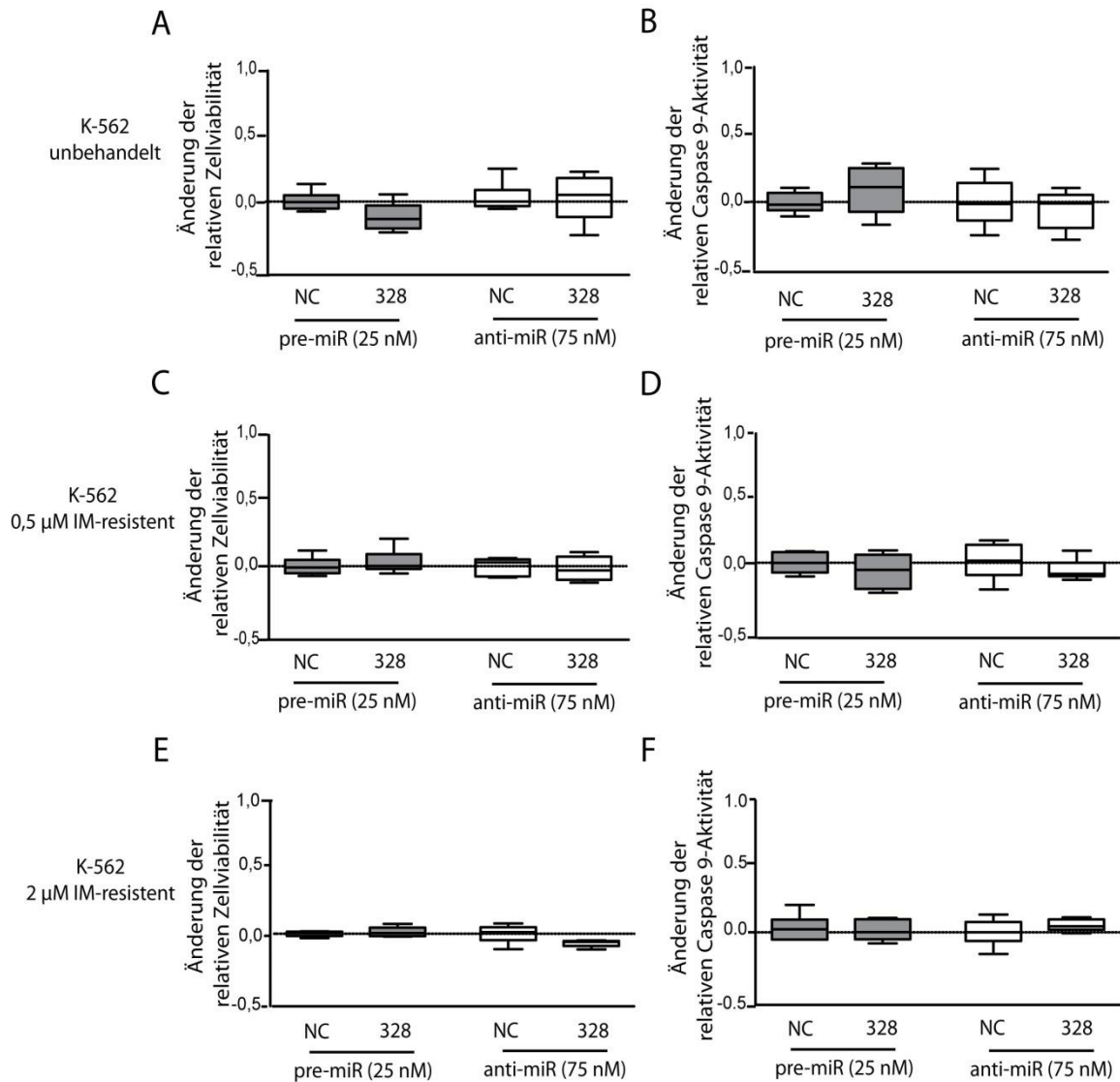


Abbildung 12: MiR-328-abhängige Veränderungen der Imatinib-Sensitivität unbehandelter und Imatinib-resistenter Zellen (0,5 & 2 μ M IM). Analyse der Zellviabilität mittels WST-1-Assay (A, C, E) sowie der Apoptose mittels Caspase 9 Glo-Assay (B, D, F) nach Transfektion von pre-miR-328 (grau) und anti-miR-328 (weiß). Die Zelllinien wurden mit der Negativkontrolle (NC), 25 nM miR-Mimic oder 75 nM miR-Inhibitor transfiziert und für 48 h mit 2 μ M IM inkubiert. Die Daten sind als Mittelwert \pm SD mittels Box-Whisker-Plots normalisiert auf die Negativkontroll-transfizierten Zellen dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mittels *Student's* T-Test; n=3. IM: Imatinib; NC: Negativkontrolle. Modifiziert nach (Kaehler *et al.*, 2017).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass in Anwesenheit von Imatinib, die Inhibition der miR-212 zu einem verbessertem Zellüberleben von Imatinib-sensitiven, aber nicht Imatinib-resistenten Zellen führt.

4.1.3 Effekte und Veränderungen Imatinib-sensitiver Zellen nach miR-212-Inhibition

Die Inhibition der miR-212 zeigte nach 48 h eine Abnahme der Imatinib-Sensitivität in Imatinib-sensitiven Zellen. Dieses ließ die Frage aufkommen, ob die beobachteten Effekte der miR-212-Inhibition auf die Imatinib-Sensitivität in Imatinib-sensitiven Zellen zeit- und konzentrationsabhängig waren. Dazu wurden Transfektionsexperimente mit 75 und 150 nM *locked nucleic acid* (LNA) power-miR-212-Inhibitoren für 24 h und 48 h durchgeführt und nachfolgend die Effekte auf die Imatinib-Sensitivität untersucht. Dabei wurde die Apoptoserate mittels Caspase 9 Glo-Assay sowie die Zytotoxizität mittels Cytotox Glo-Assay luminometrisch untersucht.

Es zeigten sich 24 h nach Inhibition der miR-212 mittels 75 nM LNA-Inhibitor nur marginale Effekte auf die Imatinib-Sensitivität. Nach 48 h war die Zytotoxizität jedoch um 10 % ($p=0,03$) und die Apoptoserate um 18 % ($p=0,01$) reduziert. Die Verdopplung der Inhibitorkonzentration führte zu einer 24 % Reduktion der Zytotoxizität, aber zu keiner Veränderung der Apoptoserate (Abb. 13). Daher wurden für die weiteren Experimente 75 nM miR-212-Inhibitor verwendet.

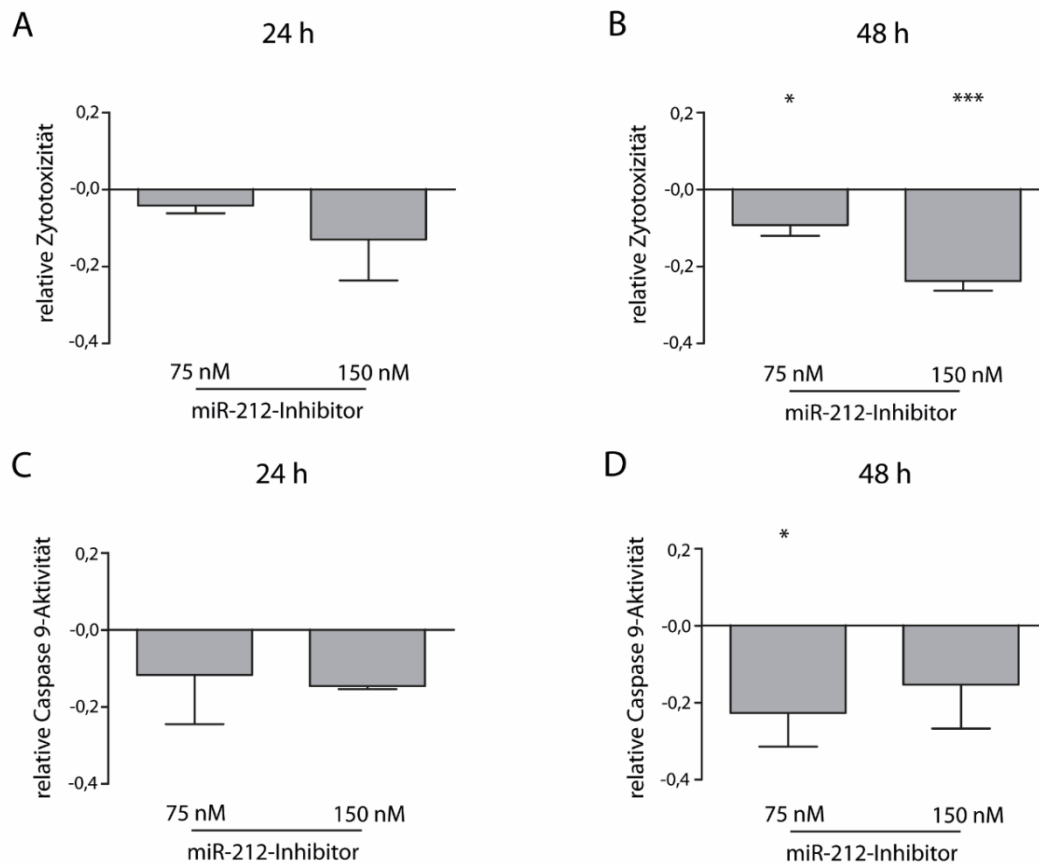


Abbildung 13: Zeit- und Konzentrationsabhängige Effekte der miR-212-Inhibition in unbehandelten K-562-Zellen. Analyse der Veränderungen der Zytotoxizität nach 24 h (A) und 48 h (B) sowie der Caspase 9-Aktivität nach 24 h (C) und 48 h (D) miR-212-Inhibition mit 75 nM und 150 nM LNA *power inhibitor* und Behandlung mit 2 μ M IM. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD der auf die Negativkontrolle normalisierten Daten. Die statistische Analyse erfolgte mittels *Two-Way ANOVA* mit nachfolgendem *Dunnet's Test*; n=3; *p < 0,05, ***p < 0,001. IM: Imatinib. Modifiziert nach (Kaehler *et al.*, 2017).

4.1.4 Funktionelle Analyse der miR-212-Inhibition und des ABCG2-vermittelten Efflux

Im nächsten Schritt sollte geprüft werden, ob die Inhibition der miR-212-Bindung zu einer Veränderung der ABCG2-Expression führt.

Dazu wurde zunächst die Expression von ABCG2 an der Zellmembran 24 h und 48 h nach Transfektion der Imatinib-sensitiven Zellen mit dem miR-212-Inhibitor bzw. der Negativkontrolle mittels Oberflächenfärbung und Durchflusszytometrie untersucht. Die Inhibition von miR-212 führte bereits nach 24 h zu einem Anstieg des ABCG2-Proteinlevels an der Zelloberfläche im Vergleich zur Negativkontrolle (Abb. 14, A). Dieser Anstieg konnte nach 48 h ebenfalls beobachtet werden (Abb. 14, B).

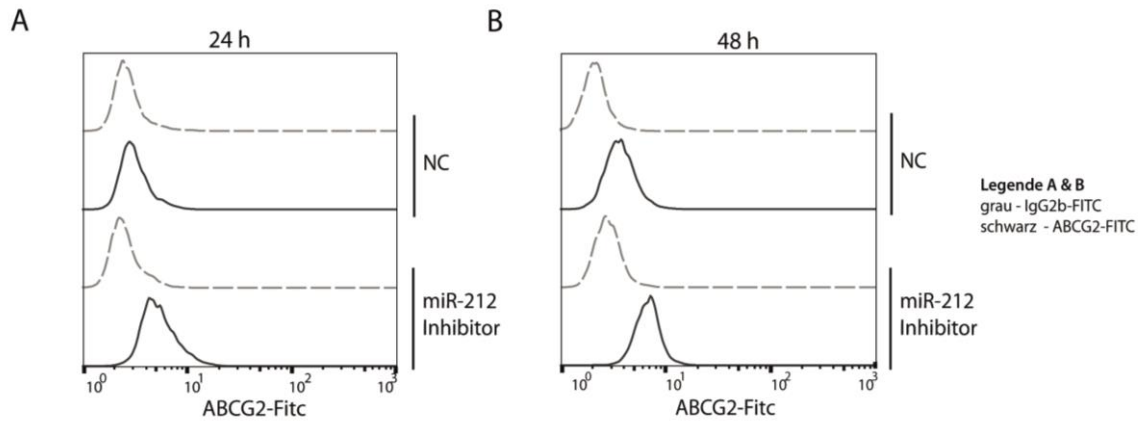


Abbildung 14: Effekte der miR-212-Inhibition auf die ABCG2-Proteinexpression.

ABCG2-Oberflächenexpression 24 h (A) und 48 h (B) nach Transfektion von unbehandelten Zellen mit 75 nM miR-212 LNA-Inhibitor bzw. Negativkontrolle (NC), analysiert mittels Oberflächenfärbung und Durchflusszytometrie. Grau: FITC-gelabelte Isotypkontrolle, schwarz: FITC-konjugierter ABCG2-Ak. N=3. NC: Negativkontrolle. Modifiziert nach (Kaehler *et al.*, 2017).

Als Nächstes stellte sich die Frage, ob die Expressionsunterschiede in ABCG2 sich auch in einem Anstieg des ABCG2-abhängigen Transports widerspiegeln. Dazu wurde ein Transportassay durchgeführt, in dem der Efflux des fluoreszierenden ABCG2-Substrats Hoechst 33342 24 h nach Transfektion mit 75 nM miR-212-Inhibitor fluorometrisch bestimmt wurde. Die miR-212-Inhibition in Imatinib-sensitiven Zellen resultierte in einem 2,5-fachem Anstieg des Hoechst 33342-Effluxes ($p=0,02$) im Vergleich zur Negativkontrolle (Abb. 15, A). Dieser Efflux konnte durch die Verwendung des ABCG2-Inhibitors Ko-143 gehemmt werden ($p=0,03$). Hierdurch wurde bestätigt, dass der gemessene Transport ABCG2-vermittelt war. Der Anstieg des Substrat-Effluxes nach miR-212-Inhibition korrespondierte mit der hohen ABCG2-Expression 0,5 μ M Imatinib-resistenter Zellen und deutet somit auf einen starken Anstieg des ABCG2-Proteins in den miR-212-inhibierten Zellen (Abb. 15, B).

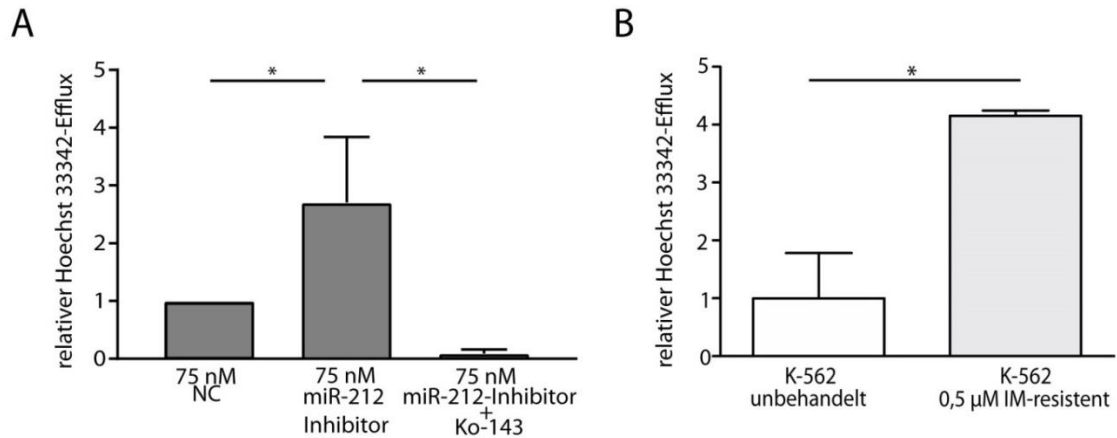


Abbildung 15: Effekte der miR-212-Inhibition auf den ABCG2-vermittelten Transport. (A) ABCG2-abhängiger Transport 24 h nach Transfektion mit 75 nM miR-212-Inhibitor, analysiert durch Hoechst 33342-Fluoreszenz im Zellüberstand nach 30 min Inkubationszeit. Die Daten wurden normalisiert auf 0 min der entsprechenden Probe sowie den Negativkontrolltransfizierten Zellen (NC). (B) ABCG2-Efflux in unbehandelten K-562 sowie 0,5 µM Imatinib-resistenten Zellen nach 30 min Inkubation mit Hoechst 33342. Dargestellt sind der Mittelwert \pm SD der auf die unbehandelten Zellen normalisierten Daten. *Two-way*-ANOVA mit nachfolgendem Dunnet's Test, sowie *Student's* T-Test; $n=3$; $*p < 0,05$. Modifiziert nach (Kaehler *et al.*, 2017).

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der miR-212 zu einer Heraufregulation der Expression und Zunahme der Aktivität des Effluxtransporters ABCG2 und gleichzeitig zu einer reduzierten Imatinib-Sensitivität führt. Damit könnte die identifizierte miR-212/ABCG2-Achse zu der Entstehung der Imatinib-Resistenz nativer CML-Zellen beitragen.

4.2 Rolle von *ZFP36L1* & *ZFP36L2* in der Imatinib-Resistenz

Bei der Exposition der K-562-Zellen mit Imatinib in dem hier untersuchten *in vitro*-CML-Resistenzmodell war auffällig, dass die Zellen zunächst eine hohe Zelltodrate aufwiesen und nur wenige Zellen überlebten. Diese überlebenden Zellen besaßen dann für einen Zeitraum von 10 bis 14 Tagen nur eine geringe Proliferationsrate, bis die zelluläre Proliferation vollständig wiederhergestellt war und die Zellen als resistent gegenüber der eingesetzten Imatinib-Konzentration angesehen werden konnten. Ein derartiges zelluläres Ruhestadium entspricht den Kriterien der *Dormancy*.

Zwei der wichtigen Proteine, die in der *Dormancy* beschrieben wurden, sind die RNA-bindenden Proteine *ZFP36L1* und *ZFP36L2*. In B-Zellen konnte gezeigt werden, dass ein *Knockout* von *ZFP36L1* und *ZFP36L2* zu einer Akkumulation von unreifen B-Vorläuferzellen führt, da der B-Zell-Checkpoint nicht erreicht werden konnte. Dieser schien einherzugehen mit einem *ZFP36L1*-vermitteltem Rückgang der Proliferation und physiologischen *Dormancy* [129]. Daher sollte die Hypothese untersucht werden, dass *ZFP36L1* und *ZFP36L2* bezüglich der Entstehung und des Verlaufs der Imatinib-Resistenz in der CML eine Rolle spielen.

4.2.1 Expressionsveränderung von *ZFP36L1* und *ZFP36L2* während der Imatinib-Resistenzentwicklung

Zunächst wurde untersucht, wie sich die Expression von *ZFP36L1* und *ZFP36L2* während der Imatinib-Resistenzentwicklung verändert. Dazu wurden die mRNA- und Proteinlevel von *ZFP36L1* und *ZFP36L2* mittels qRT-PCR und Western Blot-Analyse in Imatinib-sensitiven und –resistenten Zellen untersucht.

Sowohl die *ZFP36L1*- als auch die *ZFP36L2*-mRNA-Expression waren in 0,5 μ M Imatinib-resistenten Zellen deutlich erhöht, während in den 2 μ M Imatinib-resistenten Zellen für beide Proteine nur eine geringe Expression zu erkennen war (Abb. 16, A). Ebenso war ein Anstieg der *ZFP36L1*-Expression sowohl in 0,5 μ M ($p=0,03$) als auch in 2 μ M Imatinib-resistenten Zellen ($p=0,04$) im Vergleich zu unbehandelten Zellen zu erkennen (Abb. 16, B), wohingegen für *ZFP36L2* eine hohe Expression in 0,5 μ M Imatinib-resistenten Zellen (4,5-fach, $p=0,04$), jedoch keine signifikanten Unterschiede in der 2 μ M Imatinib-Resistenz

festgestellt werden konnte (Abb. 16, C). Diese Expressionsunterschiede indizieren eine potentielle Rolle der beiden Proteine im Verlauf der Imatinib-Resistenz.

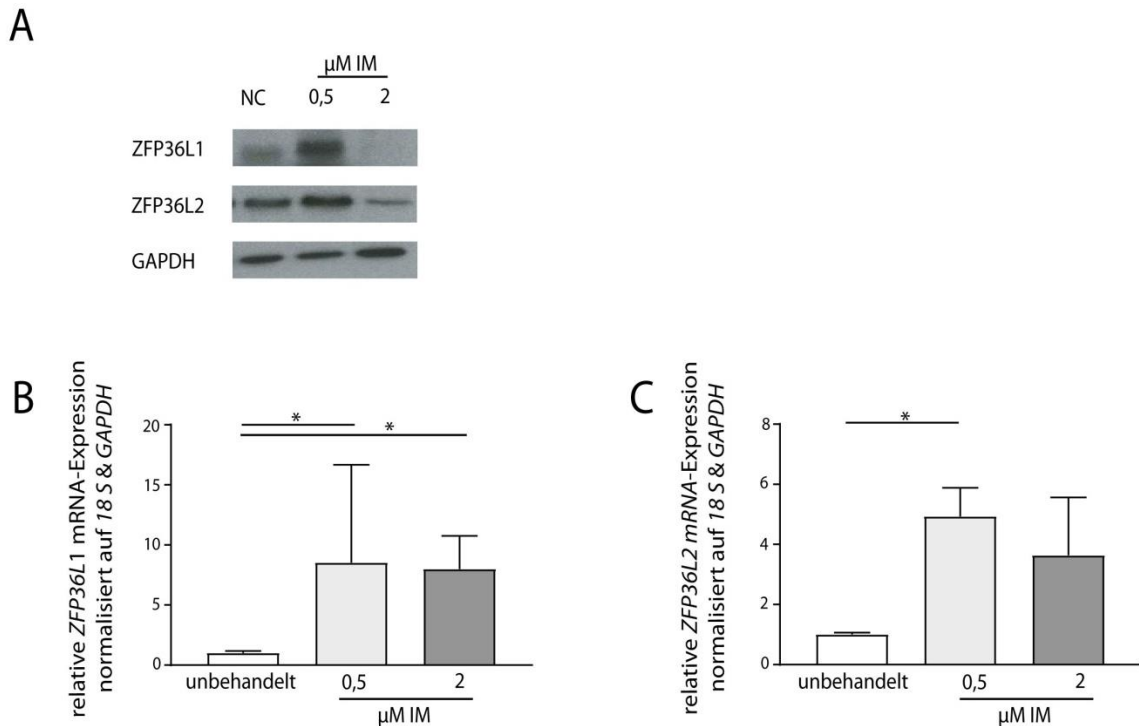


Abbildung 16: ZFP36L1/ZFP36L2 mRNA- und Proteinexpression während der Imatinib-Resistenzentwicklung. (A) Western Blot-Analyse von ZFP36L1 und ZFP36L2 in unbehandelten Zellen (NC), sowie Imatinib-resistenten Zellen (0,5 μ M, 2 μ M) im Vergleich zu dem endogenen Kontrollgen GAPDH. Dargestellt in ein Western Blot aus drei identischen Ergebnissen. (B) mRNA-Expression von ZFP36L1 sowie ZFP36L2 (C) bezogen auf 18 S und GAPDH, gemessen mittels qRT-PCR. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD der auf die unbehandelten Zellen normalisierten Daten. Die statistische Analyse erfolgte mittels *Two-Way-ANOVA* mit nachfolgendem Dunnet's Test; n=3. * p < 0,05. IM: Imatinib.

4.2.2 Etablierung eines ZFP36L1- und ZFP36L2-Knockout mittels CRISPR/Cas9-Genomeditierung

Um den Einfluss von ZFP36L1 und ZFP36L2 in der Imatinib-Resistenz zu untersuchen, wurden Deletionen von ZFP36L1 und ZFP36L2 sowie ein ZFP36L1/ZFP36L2-Doppel-Knockout beider Gene in K-562-CML-Zellen mittels CRISPR/Cas9-Genomeditierung erzeugt, indem mit Hilfe von zwei spezifischen guideRNAs die für die Zinkfingerdomänen-kodierende Sequenz aus dem Genom der Zellen entfernt wurde. Hierzu wurden zunächst die ZFP36L1- und ZFP36L2-Einzel-Knockouts vorgenommen, bevor der Doppel-Knockout an ZFP36L2-defizienten Zellen erfolgte (Abb. 17). Anhand der Sequenzierung zeigte sich, dass es sich bei den Einzel-Knockouts von ZFP36L1 und ZFP36L2 um Deletionen mit einer Leserahmenverschiebung

handelt. Für den Doppel-*Knockout* beider Gene kam es bei der zusätzlichen Deletion von *ZFP36L1* zu einer Deletion ohne Leserahmenverschiebung, so dass für dieses Gen ein Protein mit fehlender Zinkfingerdomäne translatiert werden kann (siehe 12.2).

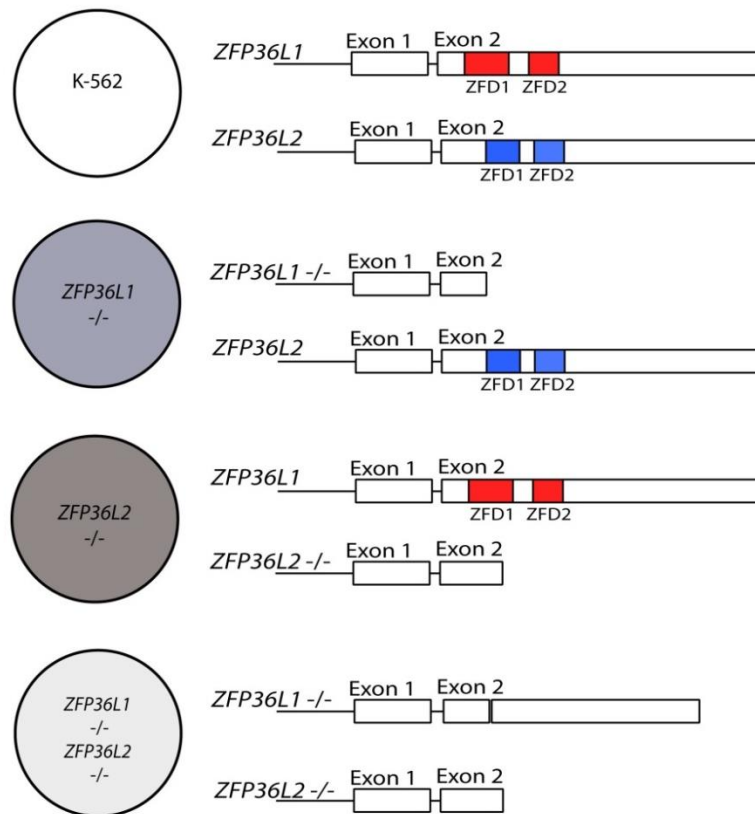


Abbildung 17: Schematische Darstellung der *ZFP36L1* & *ZFP36L2*-Knockoutzelllinien.

In K-562-Zellen sind funktionelle *ZFP36L1* & *ZFP36L2*-Proteine exprimiert, die aus 2 Exonen bestehen, wobei im 2. Exon jeweils 2 Zinkfingerdomänen (ZFD) kodiert sind. Für den *ZFP36L1*-*Knockout* wurden die ZFDs (rot) mittels CRISPR/Cas9-Genomeditierung entfernt, so dass im *ZFP36L1*-Einzel-*Knockout* (*ZFP36L1* $-/-$) nach Leserahmenverschiebung ein verkürztes Protein ohne ZFDs und C-terminalen Domänen entsteht. Die Expression von *ZFP36L2* bleibt in diesen Zellen erhalten. Nach dem gleichen Verfahren wurde die Deletion der ZFD (blau) von *ZFP36L2* durchgeführt, wodurch hier nach Leserahmenverschiebung ebenfalls ein trunkiertes *ZFP36L2*-Protein ohne C-terminalen Domänen entsteht (*ZFP36L2* $-/-$), *ZFP36L1* wurde weiterhin exprimiert. Für den Doppel-*Knockout* wurde die Deletion von *ZFP36L1* zusätzlich in den *ZFP36L2*-defizienten Zellen durchgeführt, wobei keine Leserahmenverschiebung stattfand, so dass ein *ZFP36L1*-Protein ohne ZFD exprimiert wird (*ZFP36L1/ZFP36L2* $-/-$), die C-terminalen *ZFP36L1*-Domänen jedoch erhalten bleiben. Diese Zelllinien dienen als Grundlage für die Analyse der Imatinib-Sensitivität in Abhängigkeit von *ZFP36L1/ZFP36L2*.

Auf transkriptioneller Ebene wurden die Deletionen mittels RNA-basierter PCR nachgewiesen. Dazu wurde die RNA der *Knockout*-Zellen isoliert, diese in komplementäre cDNA transkribiert und die Zinkfingerregion mittels PCR amplifiziert. In Kontrollzellen ohne Deletion konnten Produkte mit einer Länge von 605 bp amplifiziert werden, wohingegen nach der Deletion von 180 bp in *ZFP36L1* ein Produkt von 425 bp sowie nach Deletion von

280 bp in *ZFP36L2* ein Produkt von 325 bp nachgewiesen werden konnte. Diese Banden zeigten sich für die Einzel-*Knockout* sowie den *ZFP36L1/ZFP36L2*-Doppel-*Knockout* (Dko) (Abb. 18, A). Für letzteren war auffällig, dass nur 1 % der ausgesäten Einzelzellen proliferierte und letztendlich in nur 0,5 % der Klone die Deletion homozygot nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz dazu waren 11 % der Klone im *ZFP36L1-Knockout* bzw. 17 % der Klone des *ZFP36L2-Knockouts* positiv für die Deletion.

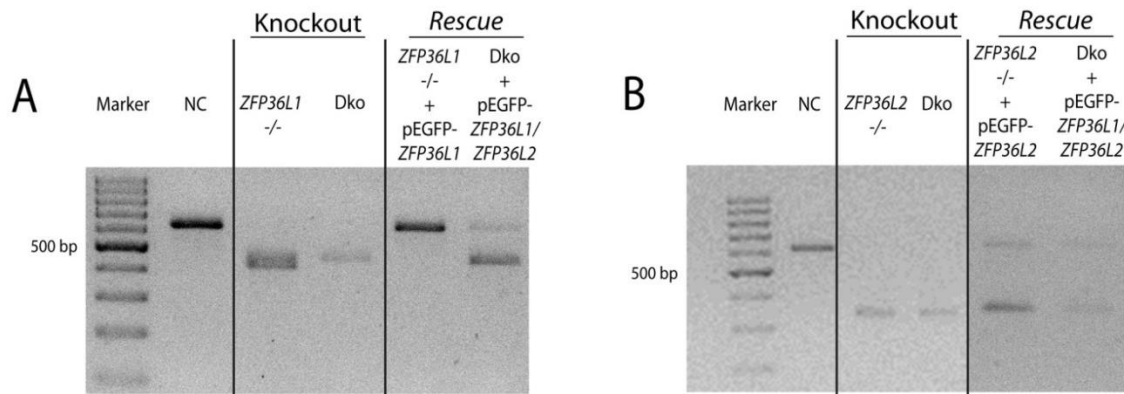


Abbildung 18: Nachweis der Deletion der Zinkfingerdomänen in *ZFP36L1* sowie *ZFP36L2* nach CRISPR/Cas9-Genomeditierung (*Knockout*) sowie nach Wiederherstellung der *ZFP36L1/ZFP36L2*-Expression (*Rescue*). Nachweis der homozygoten Deletion der Zinkfingerdomänen in *ZFP36L1* im Einzel- sowie Doppel-*Knockout* sowie der wiederhergestellten *ZFP36L1*-Expression in beiden Zelllinien durch Transfektion eines *ZFP36L1*-Expressionsplasmids (pEGFP-*ZFP36L1*). (A). Nachweis der homozygoten Deletion in *ZFP36L2* sowie *Rescue* der *ZFP36L2*-Expression nach Transfektion eines *ZFP36L2*-Expressionsplasmids (pEGFP-*ZFP36L2*) im Einzel- und Doppel-*Knockout* (B). Für den Nachweis wurde die RNA der Zellen isoliert, in cDNA transkribiert und die Zinkfingerregion mittels PCR amplifiziert. Marker: 500 bp Marker; 2 % Agarose-Gel. NC: Negativkontrolle; *ZFP36L1* -/-: *ZFP36L1*-Einzel-*Knockout*; *ZFP36L2* -/-: *ZFP36L2*-Einzel-*Knockout*; Dko: *ZFP36L1/ZFP36L2*-Doppel-*Knockout*.

Im mikroskopischen Vergleich der homozygot deletierten Einzel- und Doppel-*Knockout*-Zellen zeigte sich, dass die Zellen des *ZFP36L1/ZFP36L2*-Doppel-*Knockout* eine reduzierte Proliferation besaßen und im Vergleich zu den Einzel-*Knockout*-Zellen deutlich vergrößert waren (Abb. 19). Es fiel auf, dass die Einzel-*Knockout*-Zellen semiadhärent am Boden der Zellkulturflasche saßen, dabei handelte es sich jedoch nicht um eine klassische Adhärenz, die durch enzymatisch gelöst werden muss. Diese Semiadhärenz war im *ZFP36L1/ZFP36L2*-Doppel-*Knockout* weniger ausgeprägt und konnte in den unbehandelten Zellen nicht beobachtet werden.

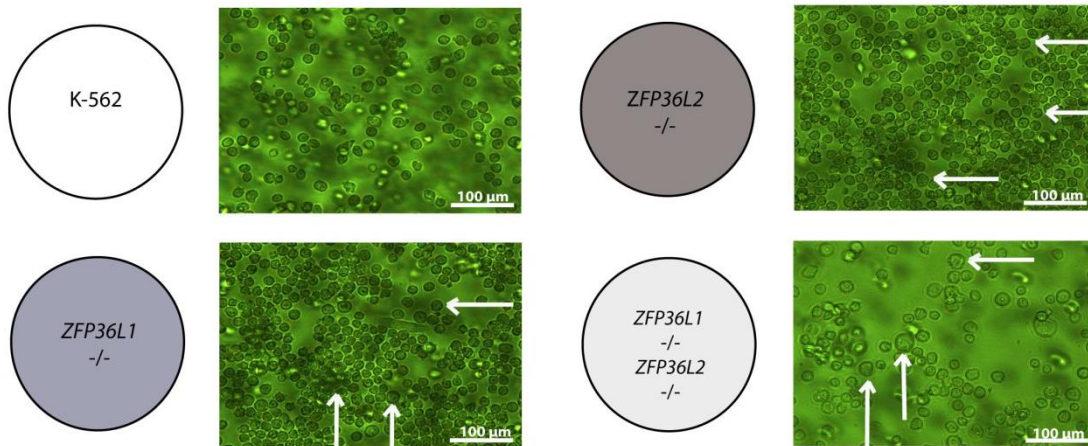


Abbildung 19: Mikroskopische Analyse der ZFP36L1/ZFP36L2-Knockout-Zellen im Vergleich zu unbehandelten K-562-Zellen. Für die morphologische Untersuchung der Zellen wurden 1×10^6 Zellen ausgesät und nach 48 h Inkubation im Brutschrank mikroskopisch untersucht. Die Zellen der Einzel-Knockouts besaßen eine hohe Zelldichte und waren semiadhärent am Boden lokalisiert (siehe Pfeile). Im Vergleich dazu wuchsen die Doppel-Knockout-Zellen deutlich langsamer und bildeten größere, semiadhärente Zellen aus (siehe Pfeile). K-562: unbehandelte Zellen; ZFP36L1 -/-: ZFP36L1-Knockout; ZFP36L2 -/-: ZFP36L2-Knockout; ZFP36L1 -/- ZFP36L2 -/-: ZFP36L1/ZFP36L2-Doppel-Knockout.

4.2.3 Einfluss von ZFP36L1 & ZFP36L2 auf die Imatinib-Sensitivität

Im nächsten Schritt wurde untersucht, welchen Einfluss der Einzel- und ZFP36L1/ZFP36L2-Doppel-Knockout von ZFP36L1 und ZFP36L2 auf die Imatinib-Sensitivität in der akuten Imatinib-Behandlung hat. Dazu wurden die Knockout-Zellen sowie unbehandelte K-562-Zellen für 48 h mit $2 \mu\text{M}$ Imatinib kultiviert und die Effekte auf Zellviabilität und Apoptose untersucht.

Während in den ZFP36L1- und ZFP36L2-Einzel-Knockouts keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrollzellen zu erkennen waren, wiesen die ZFP36L1/ZFP36L2-Doppel-Knockout-Zellen im Vergleich zu der Negativkontrolle (NC) einen deutlichen Anstieg der Zellviabilität unter Imatinib-Behandlung auf (2,7-fach, $p=0,0007$; Abb. 20, A). Eine ähnliche Tendenz zeigte sich auch in der Apoptose, in der die Doppel-Knockout-Zellen eine 41 % Reduktion der Apoptose zeigten ($p<0,0001$; Abb. 20, B). Im Gegensatz dazu zeigten sich bei der Behandlung der ZFP36L1- sowie der ZFP36L2-defizienten Einzel-Knockout-Zellen keine Unterschiede in der Apoptose.

Um nachzuweisen, dass die Effekte direkt auf das Fehlen von *ZFP36L1* bzw. *ZFP36L2* zurückzuführen waren, wurden die *Knockout*-Zellen mit Expressionsplasmiden transfiziert, um die Expression des fehlenden Proteins wiederherzustellen. Die Expression von *ZFP36L1* konnte im *Rescue* vollständig wiederhergestellt werden, wohingegen im *ZFP36L1/ZFP36L2*-Doppel-*Knockout* weiterhin das editierte *ZFP36L1* nachweisbar war (Abb. 18, A). Ein ähnliches Bild zeigte sich im *ZFP36L2-Rescue*, in dem sowohl für den Einzel-*Knockout* als auch den *ZFP36L1/ZFP36L2*-Doppel-*Knockout* die mutierte und nicht-mutierte Form des *ZFP36L2* nachgewiesen werden konnte (Abb. 18, B). Bei der Analyse der Apoptose und Zellviabilität konnten für die *ZFP36L1/ZFP36L2*-Doppel-*Knockout*-Zellen keine signifikanten Effekte auf die Zellviabilität und Apoptose nachgewiesen werden (Abb. 20 C, D), jedoch waren die Effekte nicht vollständig auf das Level der Kontrollzellen zu reduzieren.

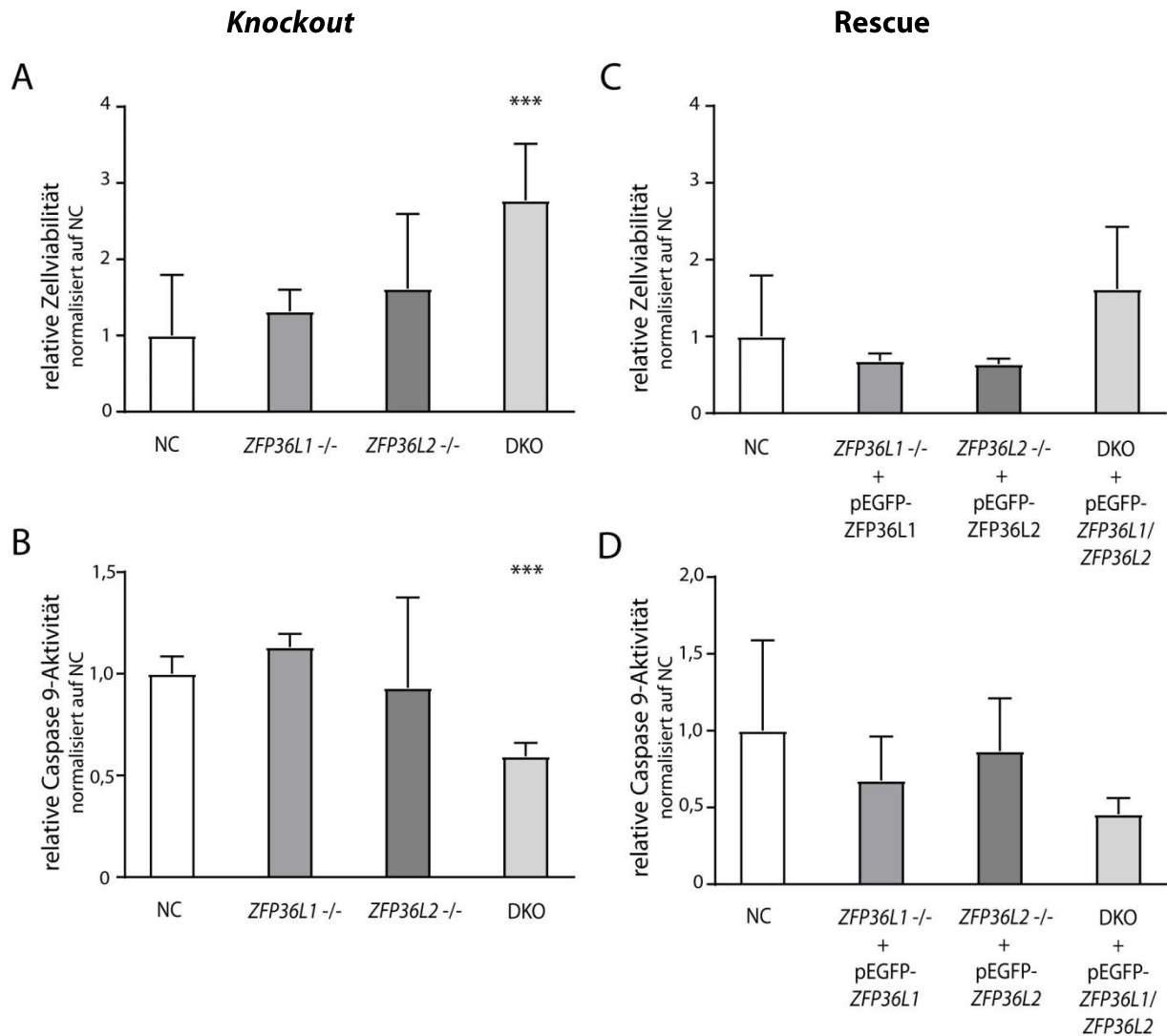


Abbildung 20: Imatinib-Sensitivität im ZFP36L1 & ZFP36L2-Knockout- und Rescue.

Analyse der Zellviabilität (A) und der Caspase 9-Aktivität (B) der ZFP36L1/ZFP36L2-Knockout-Zellen nach Behandlung mit 2 μ M IM für 48 h. Rescue der Knockout-Zellen durch Transfektion mit ZFP36L1/ZFP36L2-Expressionsplasmiden mit nachfolgender Analyse der Zellviabilität (C) und der Caspase 9-Aktivität (D) nach Behandlung mit 2 μ M IM für 48 h.; Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD normalisiert auf die jeweilige NC. Statistische Analyse mittels Two-way-ANOVA und nachfolgendem Dunnet's Test; n=6; *** p<0,001. NC: Negativkontrolle, ZFP36L1^{-/-}: ZFP36L1-Knockout, ZFP36L2^{-/-}: ZFP36L2-Knockout, DKO: ZFP36L1/ZFP36L2-Doppel-Knockout.

Als nächstes wurde untersucht, welchen Einfluss die ZFP36L1/ZFP36L2-Defizienz während der Imatinib-Resistenzentwicklung, also unter Langzeit-Imatinib-Behandlung, hat. Hier wurden die Einzel- und Doppel-Knockout-Zellen in Zellkulturflaschen ausgesät und unter ansteigender Imatinib-Konzentration (0,1; 0,3 μ M) kultiviert. Dabei wurden die Zellen, entsprechend des Vorgehens in dem hier etablierten *in vitro*-CML-Modell gegen die gegebene Imatinib-Konzentration resistent gezüchtet, in dem die Zellen so lange der Imatinib-Dosis ausgesetzt wurden, bis die zelluläre Proliferation wiederhergestellt war.

Zeitgleich zur Zellaussaat wurde die Proliferation sowie der apoptotische und nekrotische Zelltod in einem Zeitraum von 72 h nach Beginn der Imatinib-Gabe analysiert und morphologische Unterschiede mikroskopisch untersucht.

Zur Analyse der zellulären Proliferation der Zellen während der Imatinib-Behandlung wurde ein BrdU-Inkooperationsassay durchgeführt. Dazu wurden die Zellen nach Zugabe von Imatinib während der Resistenzzüchtung auf 96-well Platten ausgesät und das Assay nach 24 h Inkubation durchgeführt.

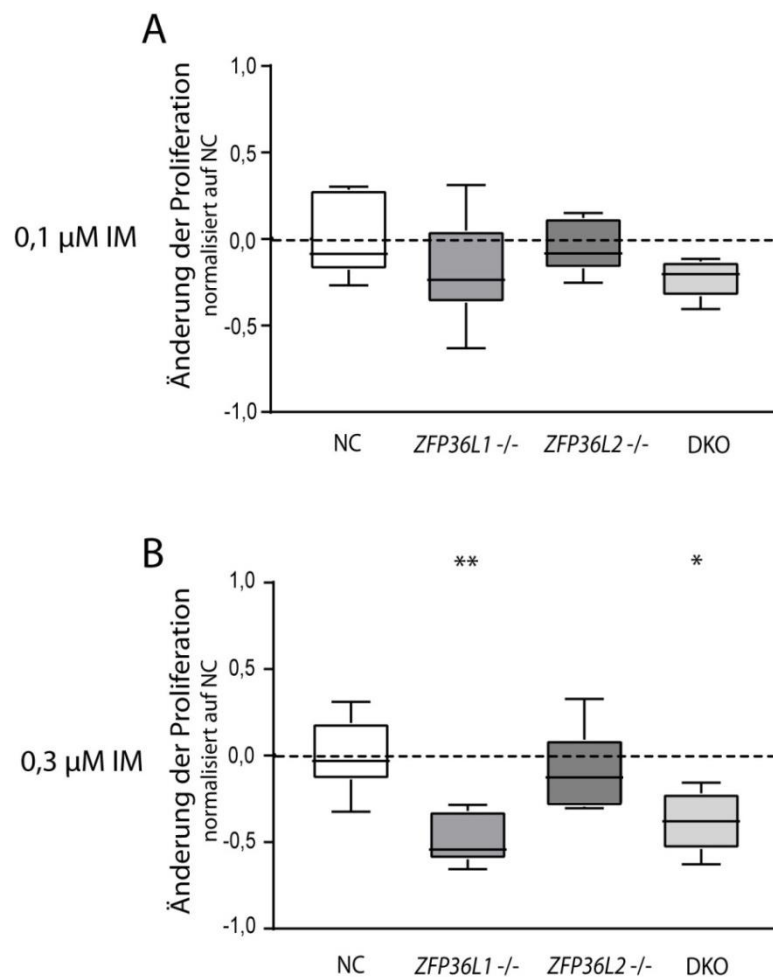


Abbildung 21: Veränderung der Proliferation der ZFP36L1 & ZFP36L2-Knockout-Zellen unter Imatinib-Behandlung mit 0,1 & 0,3 µM. Die Zellen wurden 0,1 µM IM (A) ausgesetzt und die Effekte der ZFP36L1/ZFP36L2-Einzel- sowie Doppel-Knockouts auf die zellulären Proliferation mittels BrdU-Inkooperationsassay nach 24 h gemessen. Nach dem gleichen Vorgehen wurden die Zellen 0,3 µM IM ausgesetzt (B). Die Daten wurden normalisiert auf die Negativkontrolle (NC). Dargestellt sind Box-Whisker-Plots der auf die NC normalisierten Daten. Die statistische Analyse erfolgte mittels *Two-Way-ANOVA* und nachfolgendem Dunnett's Test; n=6; * p<0,05; ** p<0,01. IM: Imatinib; ZFP36L1 -/-: ZFP36L1-Knockout, ZFP36L2 -/-: ZFP36L2-Knockout, DKO: ZFP36L1/ZFP36L2-Doppel-Knockout.

Bei der Behandlung mit 0,1 μ M Imatinib konnte keine Veränderung der Proliferation in den *Knockout*-Zellen festgestellt werden (Abb. 21, A). Bei der Inkubation mit 0,3 μ M Imatinib hingegen zeigte sich, dass die Proliferation der *ZFP36L1-Knockout*-Zellen (47,5 %, $p=0,003$) sowie der *ZFP36L1/ZFP36L2-Doppel-Knockout*-Zellen (38,1 %, $p=0,011$) im Vergleich zu den Kontrollzellen deutlich reduziert war (Abb. 21, B). Die Proliferation der *ZFP36L2-Knockout*-Zellen war jedoch im Vergleich zu den Kontrollzellen nicht verändert.

Parallel zu den Proliferationsassays wurden Zelltodanalysen durchgeführt und Apoptose und Nekrose nach 24, 48 und 72 h Imatinib-Inkubation untersucht.

Wie in Abb. 22 zu erkennen, konnten signifikante Unterschiede zwischen den nativen K-562-Zellen und den *ZFP36L1/ZFP36L2*-Einzel- und *Doppel-Knockout*-Zellen festgestellt werden. Bei der Behandlung mit 0,1 μ M IM wiesen alle *Knockout*-Zellen eine signifikante Reduktion in der Apoptose ($p<0,001$) (A), sowie für *ZFP36L1*-defiziente und *ZFP36L1/ZFP36L2-Doppel-Knockout*-Zellen, auch in der Nekrose ($p<0,001$) (B) auf. Bei der Inkubation mit 0,3 μ M IM konnte ebenso eine signifikante Verminderung von Apoptose und Nekrose in allen *Knockout*-Zellen im Vergleich zu den nativen K-562-Zellen beobachtet werden. Generell ähnelte der Verlauf hier der Behandlung mit 0,1 μ M IM.

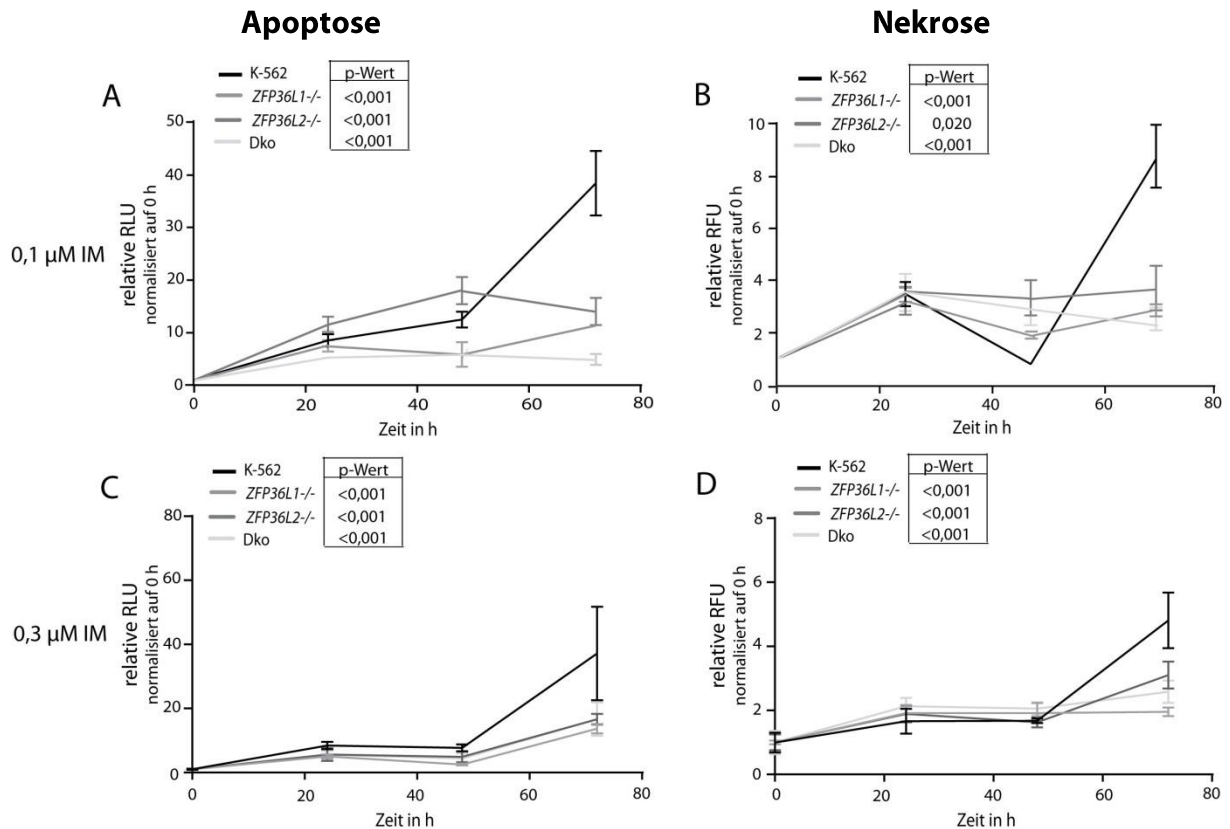


Abbildung 22: Analyse der Apoptose und Nekrose der ZFP36L1 & ZFP36L2-Knockout-Zellen während der Imatinib-Behandlung mit 0,1 & 0,3 µM IM. Die Zellen wurden 0,1 µM IM ausgesetzt und die Effekte der Einzel-Knockouts sowie Doppel-Knockouts von ZFP36L1/ZFP36L2 auf apoptotischen (A) und nekrotischen (B) Zelltod mittels des Real Time Glo Annexin V and Necrosis Assay innerhalb von 72 h (0; 24; 48; 72 h) gemessen. Nach dem gleichen Prinzip wurde die Behandlung mit 0,3 µM IM durchgeführt und die Apoptose (C) und Nekrose (D) untersucht. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte \pm SD, normalisiert auf den Wert der jeweiligen Zelllinie bei 0 h. Die statistische Analyse erfolgte mittels *Two-Way-ANOVA* und nachfolgendem *Dunnet's Test*; $n=6$. IM: Imatinib; ns: nicht signifikant; RFU: *relative fluorescence units*; RLU: *relative luminescence units*; ZFP36L1 -/-: ZFP36L1-Knockout, ZFP36L2 -/-: ZFP36L2-Knockout, DKO: ZFP36L1/ZFP36L2-Doppel-Knockout.

Des Weiteren wurde untersucht, wie sich die zelluläre Morphologie während der Imatinib-Resistenzentwicklung verändert. Dazu wurden die Zellen innerhalb von 72 h nach Imatinib-Zugabe mit den entsprechenden Imatinib-Konzentrationen (0,1; 0,3 µM) mikroskopisch analysiert.

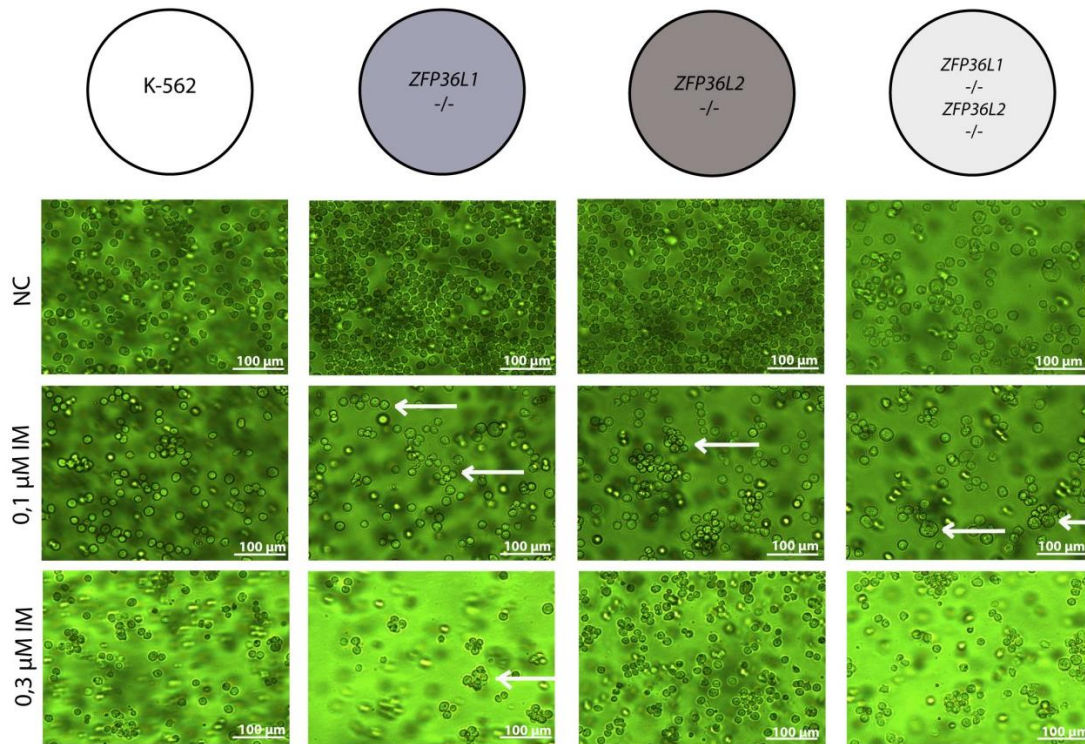


Abbildung 23: Mikroskopische Analyse der Effekte des *ZFP36L1/ZFP36L2*-Knockout während der Imatinib-Resistenzzüchtung. Die nativen K-562-Zellen, sowie die *ZFP36L1/ZFP36L2*-Einzel- und Doppel-Knockouts wurden zunächst mit 0,1 μM Imatinib behandelt und nach 72 h mikroskopisch analysiert. Dabei zeigte sich eine Veränderung der Morphologie, indem die zuvor beobachtete Semiadhärenz verloren ging (Pfeile). Nach dem gleichen Vorgehen wurden die Zellen während der Imatinib-Resistenzzüchtung bei Behandlung mit 0,3 μM IM mikroskopisch analysiert, was mit einer reduzierten Proliferation und Abnahme der Zelldichte im *ZFP36L1-Knockout* und im Doppel-Knockout einherging (Pfeile). IM: Imatinib; NC: Negativkontrolle; *ZFP36L1^{-/-}* : *ZFP36L1-Knockout*, *ZFP36L2^{-/-}*: *ZFP36L2-Knockout*, DKO: *ZFP36L1/ZFP36L2*-Doppel-Knockout.

Während die nativen K-562-Zellen unter Imatinib-Behandlung nur marginale Unterschiede in der Morphologie zeigten, wiesen die Zellen der Einzel-Knockouts eine deutliche Veränderung auf (Abb. 23). Die beobachtete Semiadhärenz der Zellen ging durch die Behandlung mit Imatinib verloren (Abb. 19). Bei den *ZFP36L1/ZFP36L2*-Doppel-Knockout-Zellen waren ebenfalls nur geringe morphologische Unterschiede in der Imatinib-Behandlung zu erkennen. Des Weiteren war auffällig, dass die *ZFP36L1/ZFP36L2*-defizienten Zellen unter Imatinib-Behandlung über 72 h hinaus im Vergleich zu nativen K-562-Zellen deutlich langsamer wuchsen und die Dauer bis zur Wiederherstellung der zellulären Proliferation unter der Imatinib-Konzentration verlängert war. Dieses war für die *ZFP36L1*-defizienten Zellen (4-fache Dauer) sowie die des *ZFP36L1/ZFP36L2*-Doppel-Knockout (2-fache Dauer) besonders ausgeprägt. Bei einer Konzentration von 0,3 μM Imatinib konnte dieses in der mikroskopischen Betrachtung für die *ZFP36L1*-defizienten sowie die *ZFP36L1/ZFP36L2*-

Doppel-*Knockout*-Zellen bestätigt werden, während die nativen und *ZFP36L2*-defizienten Zellen vermehrt proliferierten und sich in ihrer Morphologie stark ähnelten (Abb. 23, 0,3 μM).

Insgesamt deuten diese Daten darauf hin, dass *ZFP36L1* und *ZFP36L2* einen Einfluss auf Apoptose und Proliferation in der Imatinib-Resistenzentwicklung haben. Es konnte gezeigt werden, dass ausschließlich die *ZFP36L1/ZFP36L2*-Doppel-*Knockout*-Zellen bei der Kurzzeit-Imatinib-Behandlung protektiert sind. Während der Langzeit-Imatinib-Behandlung waren hingegen der Zelltod und auch die Proliferationsrate beim Fehlen von *ZFP36L1*, aber auch im *ZFP36L1/ZFP36L2*-Doppel-*Knockout* vermindert. Darüber hinaus erschien die zelluläre Morphologie durch das Fehlen von *ZFP36L1/ZFP36L2* moduliert.

4.3 Transkriptionelle, genetische & epigenetische Veränderungen in der TKI-Resistenzentwicklung

Neben der gezielten Analyse des ABCG2-Transporters und der RNA-bindenden Proteine *ZFP36L1* & *ZFP36L2* wurde in einem hypothesenfreien Ansatz untersucht, welche anderen BCR/ABL-unabhängigen Mechanismen für die TKI-Resistenzentwicklung relevant sein könnten. Dazu wurden transkriptionelle, genetische und epigenetische Analysen mit folgenden Fragestellungen durchgeführt:

Imatinib-Resistenz:

1. Welche Gene sind in der Imatinib-Resistenzentwicklung differenziell exprimiert?
Vergleich unbehandelte Zellen – Imatinib-resistente Zellen (0,5 μ M; 2 μ M)
2. *Verlauf der Imatinib-Resistenz:*
Wie verändert sich die Genexpression im Verlauf der Imatinib-Resistenz?
Vergleich unbehandelt vs. 0,5 μ M IM vs. 2 μ M IM
3. Welche genetischen Aberrationen treten während der Imatinib-Resistenzentwicklung auf?

Analyse der Nilotinib-Resistenz & Vergleich der Imatinib- und Nilotinib-Resistenz:

1. Welchen Mechanismen unterliegt die Nilotinib-Resistenz?
Vergleich unbehandelt vs. 100 nM Nilotinib
2. Welche Rolle spielen epigenetische Faktoren in der Imatinib & Nilotinib-Resistenz?

4.3.1 Transkriptionelle Veränderungen in der Imatinib-Resistenz

4.3.1.1 Vergleich der biologischen Replikate der Imatinib-Resistenz

Um die transkriptionellen Unterschiede zwischen unbehandelten und Imatinib-resistenten Zellen zu analysieren, wurden die mRNA-Expressionsprofile der Zellen mittels Affymetrix HuGene 2.0 ST GeneChips untersucht. Dazu wurde die Resistenzzüchtung in zwei biologischen Replikaten durchgeführt und die mRNA-Expression pro Resistenzzüchtung in vier technischen Replikaten gemessen. Zunächst wurden die Gene ermittelt, die in beiden biologischen Replikaten mit einem *fold change* von ± 2 und einem korrigierten p-Wert $p < 0,05$ differenziell exprimiert waren. Damit sollten die Gene identifiziert werden, die eine rekurrent veränderte Expression in der Resistenzentwicklung zeigen.

Tabelle 7: Anzahl der differenziell exprimierten Gene in den biologischen Replikaten der Imatinib-Resistenzzüchtungen. Angegeben sind die Gene mit *fold change* ± 2 und korrigiertem p-Wert $p \leq 0,05$. K-562: unbehandelte, Imatinib-sensitive Zellen; K-562^{0,5}: 0,5 μM Imatinib-resistente Zellen; K-562²: 2 μM Imatinib-resistente Zellen.

Vergleich	Anzahl der differenziell exprimierten Gene in		
	beiden Resistenzzüchtungen	Resistenzzüchtung 1	Resistenzzüchtung 2
K-562 vs. K-562 ^{0,5}	636	650	651
K-562 vs. K-562 ²	317	756	950
K-562 ^{0,5} vs. K-562 ²	136	1514	265

Es fiel auf, dass die Anzahl der veränderten Gene im Vergleich von unbehandelten (K-562) mit 0,5 μM Imatinib-resistenten Zellen (K-562^{0,5}) zu 97 % zwischen beiden Resistenzzüchtungen übereinstimmten (Tab. 7). Bei der höheren Imatinib-Konzentration von 2 μM (K-562²) waren jedoch deutliche Unterschiede erkennbar, vor allem im Vergleich von K-562^{0,5} und K-562² mit nur 136 differenziell exprimierten Genen, die in den Resistenzzüchtungen übereinstimmten.

4.3.1.2 Vergleich der Genexpression von unbehandelten und Imatinib-resistenten Zellen

Im nächsten Schritt wurden die Gene ermittelt, die in der Imatinib-Resistenz, unabhängig von der Imatinib-Konzentration, eine veränderte Expression besaßen. Dazu wurden die K-562 mit K-562^{0,5} und K-562² verglichen (Abb. 24).

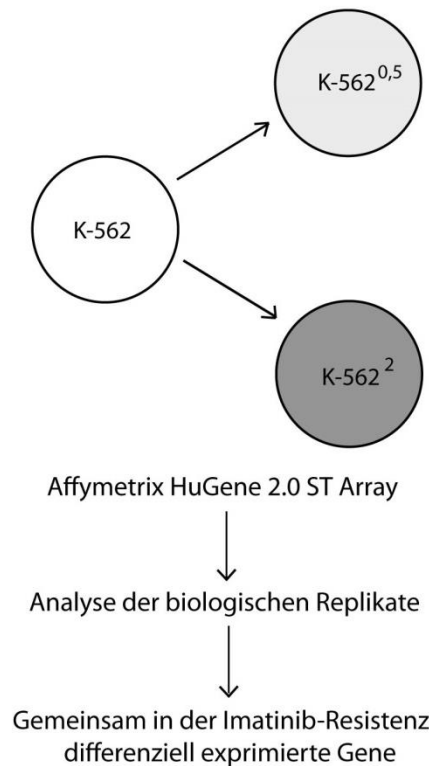


Abbildung 24: Ablauf der Genexpressionsanalyse der Imatinib-Resistenz. K-562: unbehandelte, Imatinib-sensitive Zellen; K-562^{0,5}: 0,5 μ M Imatinib-resistente Zellen; K-562²: 2 μ M Imatinib-resistente Zellen.

Von den 151 in der Imatinib-Resistenz konzentrationsunabhängig differenziell exprimierten Genen waren 67 in den Imatinib-resistenten Zellen heraufreguliert und 84 herunterreguliert. Es gab keine Gene, die in beiden Imatinib-resistenten Zelllinien eine gegensätzliche Expression zeigten (Abb. 25)

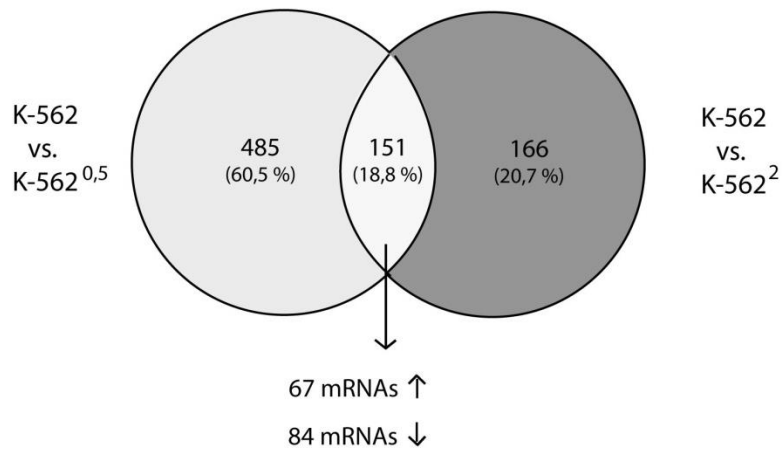


Abbildung 25: Venn-Diagramm der differenziell exprimierten Gene des Vergleichs der K-562 vs. K-562^{0,5} und K-562². Angegeben ist die Anzahl an signifikant differenziell exprimierten Genen mit *fold change* ± 2 und korrigiertem p-Wert $p < 0,05$ aus dem Vergleich von K-562 mit K-562^{0,5} sowie K-562² als Zahlenwert sowie in Prozent. Unten angegeben ist die Anzahl der mRNAs, die in den Imatinib-resistenten Zellen herauf- (Pfeil nach oben) oder herunterreguliert (Pfeil nach unten) waren. K-562: unbehandelte, Imatinib-sensitive Zellen; K-562^{0,5}: 0,5 μM Imatinib-resistente Zellen; K-562²: 2 μM Imatinib-resistente Zellen.

Als nächstes wurde eine Cluster-Analyse aller Z-transformierten Genexpressionswerte durchgeführt (Abb. 26). Aufgrund der Vielzahl der differenziell exprimierten Gene wurde ein *fold change* ± 3 für diese Abbildung gewählt.

Es ließen sich prinzipiell zwei Gruppen erkennen, wobei die Gene entweder in den K-562 gering exprimiert waren und bei der Imatinib-Resistenz heraufreguliert wurden oder einen inversen Expressionsverlauf mit einer Herunterregulation in der Imatinib-Resistenz im Vergleich zu den K-562 aufwiesen (Abb. 26). Auffällig war weiterhin, dass die biologischen Replikate der K-562^{0,5}-Zellen große Übereinstimmungen zeigten, wohingegen bei den K-562²-Zellen deutliche Unterschiede in den beiden biologischen Replikaten zu erkennen waren. Dabei wiesen die K-562²-Zellen der 2. Resistenzzüchtung in ihrer Expression eine höhere Ähnlichkeit zu den K-562^{0,5}-Zellen auf, als es in der 1. Resistenzzüchtung der Fall war.

Ergebnisse

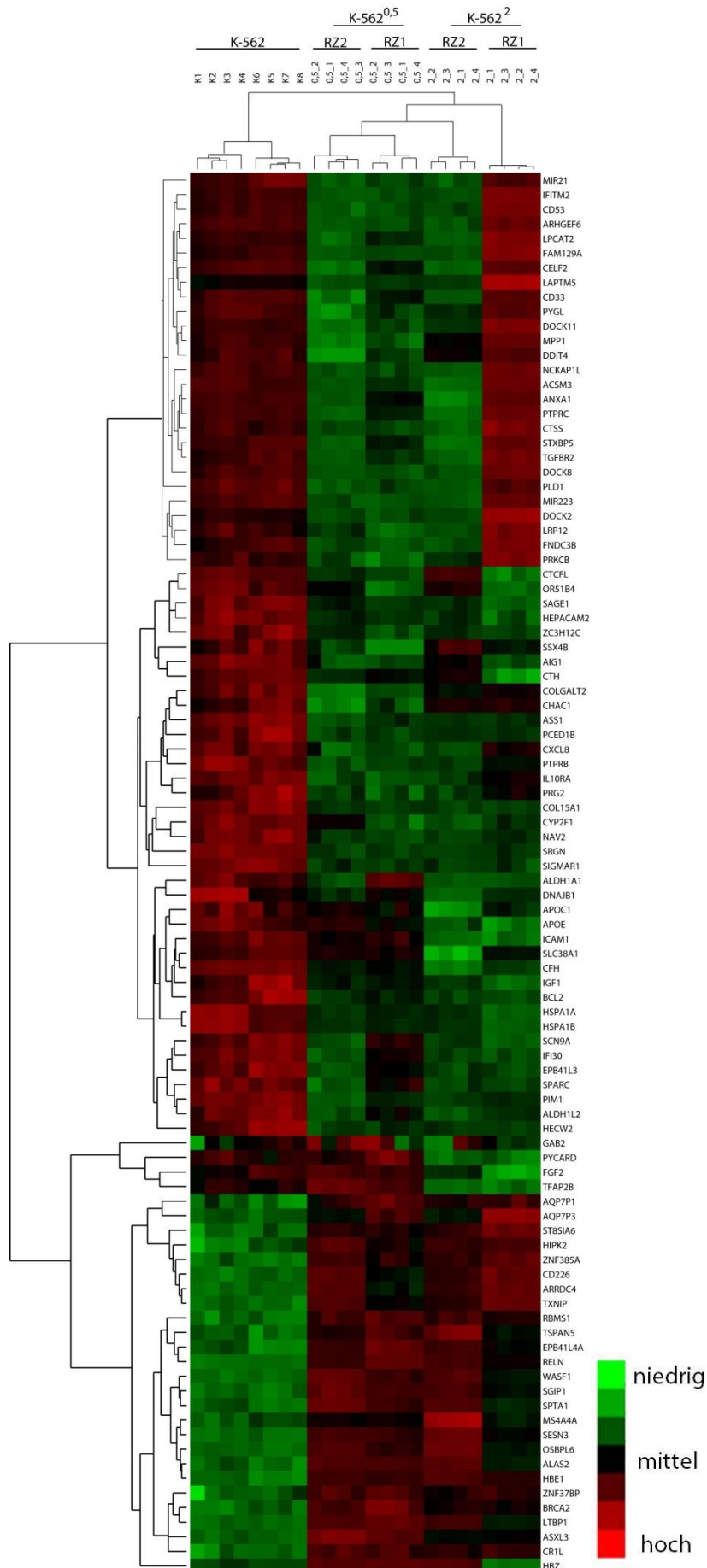


Abbildung 26: Cluster-Analyse nach Spearman-Rank-Korrelation der in der Imatinib-Resistenz differenziell exprimierten Gene (K-562 vs. K-562^{0,5} und K-562²). Gezeigt sind die differenziell exprimierten Gene mit einem *fold change* ± 3 und einem korrigiertem p-Wert $< 0,05$ aus dem Vergleich von K-562 mit K-562^{0,5} sowie K-562². K-562: unbehandelte, Imatinib-sensitive Zellen; K-562^{0,5}: 0,5 μM Imatinib-resistente Zellen; K-562²: 2 μM Imatinib-resistente Zellen.

Zusätzlich zu der Cluster-Analyse wurde eine Analyse der *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)-Pathways* durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass die differenziell exprimierten Gene in der Imatinib-Resistenz hauptsächlich der physiologischen (PI3K-AKT-Signalweg) aber auch der pathologischen Signaltransduktion (Signalwege in Tumoren) sowie der Zellinteraktion (Fokale Adhäsion, *adherens junction*) zugeordnet werden konnten (Tab. 8).

Tabelle 8: KEGG-Pathways mit assoziierten in der Imatinib-Resistenz konzentrationsunabhängig differenziell exprimierten Genen (K-562 vs. K-562^{0,5} und K-562²). Der p-Wert bezieht sich auf die Signifikanz der Assoziation in den KEGG-Pathways. K-562: unbehandelte, Imatinib-sensitive Zellen; K-562^{0,5}: 0,5 μM Imatinib-resistente Zellen; K-562²: 2 μM Imatinib-resistente Zellen.

<i>KEGG-Pathway</i>	p-Wert	Im <i>Screening</i> identifizierte Gene, die dem genannten <i>Pathway</i> zugeordnet werden konnten
PI3K-AKT-Signalweg	0,011	<i>BCL2, KIT, FN1, IGF1, LAMC1, PIK3AP1, RELN</i>
Signalwege in Tumoren	0,062	<i>BCL2, BRCA, KIT, FN1, IGF1, LAMC1</i>
Fokale Adhäsion	0,026	<i>BCL2, HSPA1A, HSPA1B, LAMC1</i>
Toxoplasmose	0,027	<i>BCL2, HSPA1A, HSPA1B, LAMC1</i>
<i>Adherens junction</i>	0,058	<i>WASF1, PTPRB, PTPRJ</i>
Proteinprozessierung im Endoplasmatischen Retikulum	0,024	<i>BCL2, HSPA1A, HSPA1B</i>
Nicht kleinzelliges Bronchialkarzinom	0,079	<i>BCL2, FN1, LAMC1</i>
Epstein-Barr Virusinfektion	0,028	<i>BCL2, HSPA1A, HSPA1B</i>

Um Interaktionen der differenziell exprimierten Gene festzustellen, wurden STRING (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins*)-Analysen durchgeführt. Hierbei konnte eine differenzielle Herunterregulation eines Netzwerkes von Serglycin (*SRGN*), Fibronectin 1 (*FN1*), *insuline-like growth factor 1 (IGF1)*, *v-kit Hardy-Zuckerman sarcoma viral oncogene (KIT)*, B-cell CLL/lymphoma 2 (*BCL2*) und Wilms tumor 1 (*WT1*) in der Imatinib-Resistenz festgestellt werden (Abb. 27). Diese Gene konnten anhand der KEGG-Analyse vor allem den PI3K-AKT-Signalweg und pathologischer Signaltransduktion maligner Erkrankungen zugeordnet werden (Tab. 8).

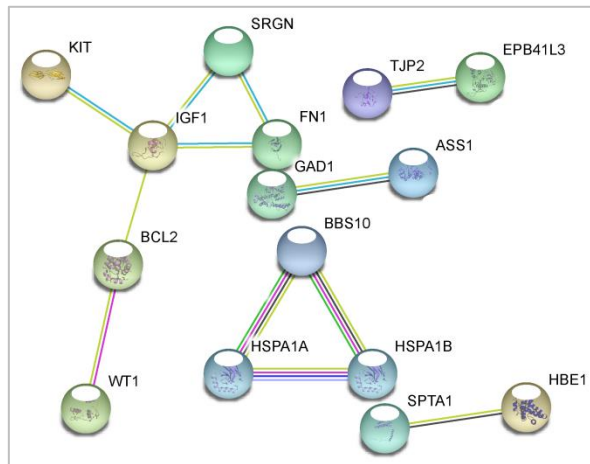


Abbildung 27: STRING-Analyse der in der Imatinib-Resistenz konzentrationsunabhängig differenziell exprimierten Gene (K-562^{0,5} & K-562²). Die Farbe der Linie gibt die Art der Interaktion an: Türkis: Datenbanken; violett: experimentell bestätigte Interaktion; blau: genetische Nachbarschaft; rot: Genfusion, hellblau: Proteinhomolog; gelb: *textmining*, schwarz: Co-Expression; hellblau: Proteinhomolog. Dargestellt sind die Knotenpunkte mit einem *interaction score* von 0,7. K-562^{0,5}: 0,5 μ M Imatinib-resistente Zellen; K-562²: 2 μ M Imatinib-resistente Zellen.

Daneben erschienen Interaktionen des *heat shock 70 kDa protein 1A (HSPA1A)* und -B mit *Bardet-Biedl syndrome 10 (BBS10)*, wobei erstere signifikant herunterreguliert waren, wohingegen *BBBS10* einen Anstieg der Expression zeigte (Abb. 27, Tab. 8). Die Hitzeschockproteine *HSPA1A* und *HSPA1B* konnten in den *KEGG-Pathways* vor allem infektiösen Erkrankungen und der Prozessierung von Proteinfaltung im Endoplasmatischen Retikulum zugeordnet werden (Tab. 8).

Insgesamt deuten die Gemeinsamkeiten der Resistenz unabhängig der Imatinib-Konzentration auf eine differenzielle Regulation der Zelladhärenz aber auch einer Veränderung der Signaltransduktion hin.

4.3.1.3 Transkriptionelle Veränderungen im Verlauf der Imatinib-Resistenzentwicklung

Aufgrund der Vielzahl an Genen, die nur in einer der beiden Imatinib-Konzentrationen identifiziert werden konnte, stellte sich die Frage, ob die Mechanismen der Resistenz IM-konzentrationsabhängig sind und im Laufe der Resistenzentwicklung adaptieren. Hierzu sind die Gene mit einer dynamischen Expression im Laufe der Resistenzentwicklung von besonderer Relevanz. Um dieses zu analysieren, wurden die K-562 mit K-562^{0,5} und K-562^{0,5} mit K-562² verglichen, um differenziell exprimierte Gene zu identifizieren.

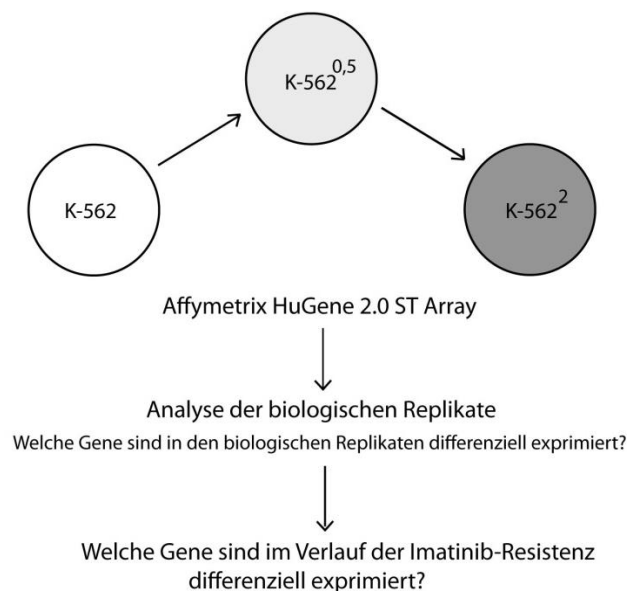


Abbildung 28: Ablauf der Untersuchung der im Verlauf der Imatinib-Resistenzentwicklung differenziell exprimierten Gene. K-562: unbehandelte, Imatinib-sensitive Zellen; K-562^{0,5}: 0,5 μ M Imatinib-resistente Zellen; K-562²: 2 μ M Imatinib-resistente Zellen.

Bei der Untersuchung der transkriptionellen Veränderungen in der Imatinib-Resistenzentwicklung waren 591 mRNAs differenziell exprimiert zwischen K-562 und K-562^{0,5} (Abb. 29), während zwischen K-562^{0,5} und K-562² lediglich 91 mRNAs eine differenzielle Expression zeigten. Sowohl im Vergleich von K-562 mit K-562^{0,5} als auch von K-562^{0,5} mit K-562², d.h. dynamisch exprimiert, waren 45 mRNAs. Von diesen waren 30 bei der Entwicklung von K-562^{0,5} zunächst hochreguliert und K-562² herunterreguliert waren, während 15 Gene einen dazu inversen Expressionsverlauf besaßen.

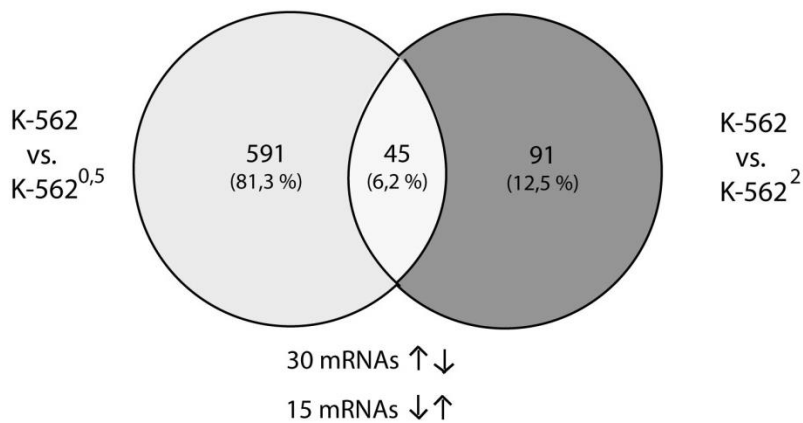


Abbildung 29: Venn-Diagramm der im Verlauf der Imatinib-Resistenzentwicklung differenziell exprimierten mRNAs (K-562 vs. K-562^{0,5} vs. K-562²). Angegeben ist die Anzahl der signifikant differenziell exprimierten Gene mit *fold change* ± 2 und korrigiertem p-Wert $< 0,05$ aus dem Vergleich von K-562 mit K-562^{0,5} sowie K-562^{0,5} mit K-562² als Zahlenwert sowie in Prozent. Unten angegeben ist die Anzahl der mRNAs, die in K-562^{0,5} bzw. K-562² herauf- (Pfeil nach oben) oder herunterreguliert (Pfeil nach unten) waren. K-562: unbehandelte, Imatinib-sensitive Zellen; K-562^{0,5}: 0,5 μM Imatinib-resistente Zellen; K-562²: 2 μM Imatinib-resistente Zellen.

Als nächstes wurde eine Cluster-Analyse aller differenziell exprimierten Gene für diese Vergleiche durchgeführt. Der Übersichtlichkeit halber wurden dabei nur die Gene eingeschlossen, die einen *fold change* ± 3 bzw. ± 5 und korrigierten p-Wert $< 0,05$ aufwiesen. Dabei bildeten die unbehandelten Zellen ein klares abgegrenztes Cluster zu den K-562^{0,5} (Abb. 30). Ähnlich zu den Clustern in der Analyse der Entstehung der Imatinib-Resistenz zu erkennen war, wiesen die beiden Replikate der K-562² entweder große Übereinstimmungen mit den K-562 (wie im Falle der RZ1) oder zu den K-562^{0,5} (RZ2) auf.

Ergebnisse

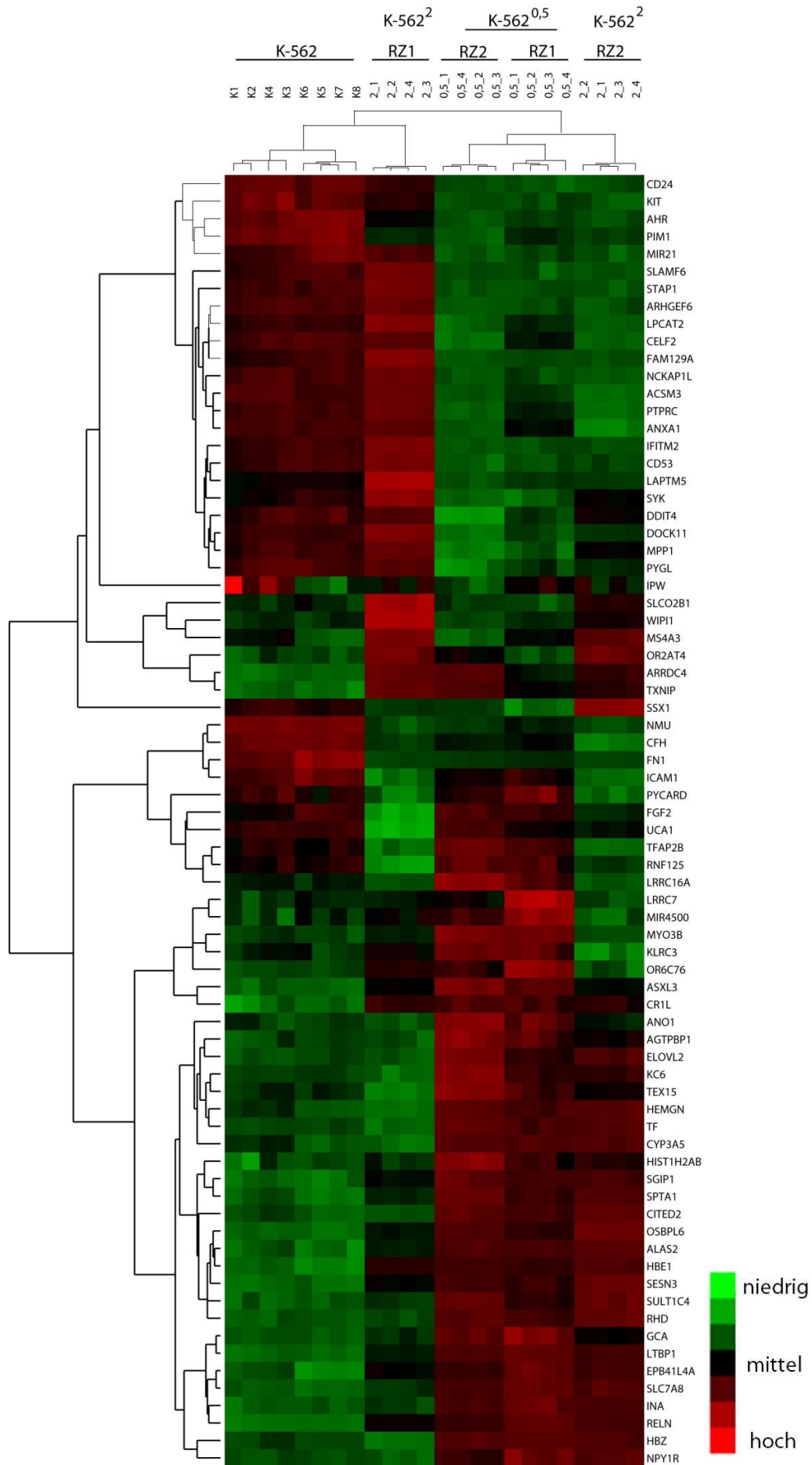


Abbildung 30: Cluster-Analyse nach Spearman-Rank-Korrelation der im Verlauf der Imatinib-Resistenz dynamisch exprimierten Gene (K-562 vs. K-562^{0,5} vs. K-562²). Gezeigt sind die signifikant differenziell exprimierten Gene aus dem Vergleich von K-562 mit K-562^{0,5} mit einem *fold change* von ± 5 , sowie einem *fold change* von ± 3 aus den Vergleich von K-562^{0,5} und K-562²; jeweils mit einem korrigiertem p-Wert $< 0,05$. K-562: unbehandelte, Imatinib-sensitive Zellen; K-562^{0,5}: 0,5 μM Imatinib-resistente Zellen; K-562²: 2 μM Imatinib-resistente Zellen.

Im nächsten Schritt wurden die 45 Gene näher betrachtet, die eine dynamische Expression im Verlauf der Imatinib-Resistenz zeigten. Dazu wurden zunächst KEGG-*Pathway*- und STRING-Analysen durchgeführt. Es konnten jedoch keine signifikanten Vorhersagen der KEGG-*Pathways* und keine Interaktionen in der STRING-Analyse getroffen werden. Eine Übersicht der Gene mit dem größten *fold change* ist in Tab. 9 dargestellt.

Tabelle 9: Im Verlauf der Imatinib-Resistenz dynamisch exprimierte Gene mit einem *fold change* ± 3 und korrigiertem p-Wert $< 0,05$. K-562: unbehandelte, Imatinib-sensitive Zellen; K-562^{0,5}: 0,5 μM Imatinib-resistente Zellen; K-562²: 2 μM Imatinib-resistente Zellen.

Gen/mRNA	Gennamen	<i>fold change</i> K-562 vs. K-562 ^{0,5}	<i>fold change</i> K-562 ^{0,5} vs. K-562 ²
SSX1	<i>synovial sarcoma, X breakpoint 1</i>	-7,48	7,81
DOCK11	<i>dedicator of cytokinesis 11</i>	-5,80	4,66
PYGL	<i>phosphorylase, glycogen, liver</i>	-4,99	3,11
MPP1	<i>membrane protein, palmitoylated 1</i>	-3,90	3,63
DDIT4	<i>DNA-damage-inducible transcript 4</i>	-3,49	3,08
SYK	<i>spleen tyrosine kinase</i>	-2,63	3,70
AGL	<i>amylo-alpha-1,6-glucosidase</i>	2,23	-2,39
OR6C76	<i>olfactory receptor, family 6, subfamily C, member 76</i>	3,53	-2,39
HIST1H2AB	<i>histone cluster 1, H2ab</i>	4,01	-2,20
ANO1	<i>anoctamin 1</i>	3,34	-3,26
AGTPBP1	<i>ATP/GTP binding protein 1</i>	3,89	-2,86
LIPH	<i>lipase, member H</i>	2,80	-4,12
KC6	<i>keratoconus gene 6</i>	4,33	-3,15
MYO3	<i>myosin IIIB</i>	3,94	-3,62
KLRC3	<i>killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 3</i>	3,68	-4,46
TEX15	<i>testis expressed 15</i>	4,20	-4,80
GCA	<i>granulosa cell calcium binding protein</i>	6,00	-3,06
LRRC16A	<i>leucine rich repeat containing 16A</i>	3,58	-6,46
ASXL3	<i>additional sex combs like transcriptional regulator 3</i>	15,94	-4,40

Zu diesen Genen gehörten der Transkriptionsrepressor *synovial sarcoma X breakpoint 1* (*SSX1*), der Guanin-Nukleotid austauschfaktor *dedicator of cytokinesis 11* (*DOCK11*), sowie mit dazu inverser Expression das Zinkfingerprotein *additional sex combs like transcriptional regulator 3* (*ASXL3*). Interessant waren außerdem die Tyrosinkinase *spleen tyrosine kinase* *SYK* mit einer reduzierten Expression in K-562^{0,5} und Erhöhung in K-562².

Neben den im Verlauf der Imatinib-Resistenzentwicklung dynamisch exprimierten Genen war es von Interesse, die Gene zu analysieren, die in den einzelnen Vergleichen (d.h. K-562 vs. K-562^{0,5}; K-562^{0,5} vs. K-562²) signifikante Veränderungen der Expression zeigten. Dazu wurden zunächst die 591 differenziell exprimierten Gene aus dem Vergleich von K-562 mit K-562^{0,5} untersucht. 193 Gene waren in K-562^{0,5}-Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen herunterreguliert, während 398 Gene eine erhöhte Expression in diesen Zellen zeigten. Um diese Gene weiterführend zu untersuchen, wurden STRING-Analysen durchgeführt. Hierbei zeigte sich ein komplexes Netzwerk aus verschiedenen potentiell interagierenden Proteinen, welches zur Veranschaulichung im Anhang (12.4) zu finden ist. Dabei war eine Vielzahl von verschiedenen Netzwerken bei der Entwicklung von K-562 unbehandelten Zellen zu K-562^{0,5} differenziell exprimiert.

Um die differenziell exprimierten Gene näher zu charakterisieren, wurden *KEGG-Pathway*-Analysen durchgeführt (Tab. 10).

Tabelle 10: KEGG-Pathway-Analyse mit assoziierten differenziell exprimierten Genen aus dem Vergleich von K-562 mit K-562^{0,5}. Dargestellt sind die KEGG-Pathways mit >10 assoziierten Genen. K-562: unbehandelte, Imatinib-sensitive Zellen; K-562^{0,5}: 0,5 µM Imatinib-resistente Zellen.

KEGG-Pathway	Im Screening identifizierte assoziierte Gene
Proteoglykane in Tumoren	<i>GAB1, MDM2, ANK1, CAMK2D, FN1, FZD3, FZD5, FZD7, IGF1R; IGF1, MIR21, MSN, PIK3CG, PDCD4, PRKCB, THBS1, VEGFA</i>
Signalwege in Tumoren	<i>APC, BCL2, BRCA2, CXCL8, GNA11, KIT, MDM2, RUNX1T1, SKP2, COL4A5, CCNE2, FGF13, FN1, FZD3, FZD5, FZD7, IGF1R, IGF1, LAMB1, LAMC1, PIK3CG, PIK3R2, PLCB4, PRKCB, SLC2A1, TGFBR2, VEGFA</i>
FCyR-vermittelte Phagozytose	<i>FCGR2A, GAB2, WASF1, CFL2, DOCK2, PIK3CG, PIK3R2, PLD1, PRKCB, PTPRC; VAV1</i>
Fokale Adhäsion	<i>BCL2, ARHGAP5, COL4A5, FN1, IGF1R, IGF1, LAMB1, LAMC1, PIK3CG, PRKCB, RELN, THBS1, VEGFA, VAV1</i>
Masern	<i>TNFAIP3, TNFRSF10A, CCNE2, HSPA1A, HSPA1B, IFIH1, MSN, PIK3CG, PIK3R2, TNFSF10, TP73</i>
Regulation des Aktin-Zytoskeletts	<i>APC, IQGAP2, NCKAP1L, ARHGEF6, WASF1, CFL2, ENAH, FGF13, FN1, MSN, PIK3CG, PIK3R2, TMSB4X, VAV1</i>
PI3K-AKT- Signalweg	<i>BCL2, KIT, MDM2, MYB, COL4A5, CCNE2, FGF13, FN1, IGF1R, IGF1, LAMB1, LAMC1, PIK3CG, PIK3AP1, PIK3R2, PPP2R3A, RELN, THBS1, VEGFA</i>
Ras-Signalweg	<i>GAB1, GAB2, Kit, RASA2, EXOC2, FGF13, IGF1R, IGF1, KSR1, PIK3CG, PIK3R2, PLD1, PRKCB, VEGFA</i>
Epstein-Barr Virus-Infektion	<i>BCL2, MDM2, POLR2A, POL2E, SKP2, TNFAIP3, HSPA1A, HSPA1B, IL10RA, PIK3CG, PIK3R2, VIM</i>
Transkriptionelle Missregulation in Tumoren	<i>CXCL8, MDM2, PBX1, RUNX1T1, WT1, FUT8, HIST1H3H, HIST2H3A, IGF1R, IGF1; TGFBR2</i>
Virale Karzinogenese	<i>MDM2, RASA2, SKP2, VAC14, CCNE2, DDB1, HIST1H2BG, HIST1H2BN, HIST1H4H; KAT2B, PIK3CG, PIK3R2</i>
HTLV-1 Infektion	<i>APC, MYBL2, MYB, VAC14, ANAPC4, FZD3, FZD5, FZD7, KAT2B, PIK3CG, PIK3R2, PCNA, SLC2A1, TGFBR2</i>

Bei dieser *Pathway*-Analyse konnten viele Gene der Signaltransduktion, wie z.B. dem PI3K-AKT- oder Ras-Signalweg, zugeordnet werden. Laut Datenbank waren darüber hinaus viele dieser Gene in verschiedenen Tumoren dysreguliert (Tab. 10). Des Weiteren konnten KEGG-*Pathways* identifiziert werden, die mit einer Aktivierung des Immunsystems bei viralen Infektionen und einer viral-verursachten Karzinogenese einhergehen, z.B. HTLV-1-Infektion und Epstein-Barr-Virus-Infektionen oder solche, die an der zellulären Motilität, über das Aktin-Zytoskeletts und die fokale Adhäsion, beteiligt sind.

Insgesamt waren bei der Resistenzentwicklung zu 0,5 μ M IM eine Vielzahl von Genen differenziell exprimiert, die verschiedenen Signalwegen, vor allem der Signaltransduktion und Adaption des Immunsystems zugeordnet werden konnten.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, welche Veränderungen der Genexpression in der späteren Imatinib-Resistenz, d.h. im Vergleich von K-562^{0,5} und K-562², auftreten. Im Gegensatz zu den Veränderungen der Genexpression der K-562 zu K-562^{0,5} mit Änderungen eines komplexen Netzwerk konnten in der STRING-Analyse dieser Gene keine Interaktionen identifiziert, sowie bei der KEGG-Pathway-Analyse keine Assoziationen identifiziert werden. Die differenziell exprimierten Gene mit dem größten *fold change* sind in Tab. 11 aufgeführt.

Tabelle 11: Differenzielle exprimierte Gene aus dem Vergleich der K-562^{0,5} und K-562². Angegeben sind die Gene mit einem *fold change* ± 3 und korrigiertem p-Wert $p < 0,05$. K-562^{0,5}: 0,5 μ M Imatinib-resistente Zellen; K-562²: 2 μ M Imatinib-resistente Zellen.

Gen/mRNA	Genname	<i>fold change</i> K-562 ^{0,5} vs. K-562 ²
TFAP2B	<i>transcription factor AP-2 beta</i>	-4,92
FGF2	<i>fibroblast growth factor 2</i>	-4,75
PYCARD	<i>PYD and CARD domain containing</i>	-3,59
LRRC7	<i>leucine rich repeat containing 7</i>	-3,35
ICAM1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>	-3,22
RNF125	<i>ring finger protein 125</i>	-3,19
UCA1	<i>urothelial cancer associated 1</i>	-3,14
RNASE1	<i>ribonuclease RNase A family 1</i>	-3,02
WIPI1	<i>WD repeat domain, phosphoinositide interacting 1</i>	3,34
SLCO2B1	<i>solute carrier organic anion transporter family, member 2B1</i>	3,48
OR2AT4	<i>olfactory receptor, family 2, subfamily AT, member 4</i>	3,51
MS4A3	<i>membrane-spanning 4-domains, subfamily 4, member 3</i>	4,20
IPW	<i>imprinted in Prader-Willi syndrome</i>	4,40

Insgesamt fiel auf, dass die zwischen K-562^{0,5} und K-562² differenziell exprimierten Gene wenige Gemeinsamkeiten aufwiesen, die auf ähnliche zugrundeliegende Signalwege hindeuten. In der 1. Resistenzzüchtung der K-562^{0,5} zu K-562² waren 1514 Gene differenziell exprimiert, während in der 2. Resistenzzüchtung 265 Gene eine veränderte Expression zeigten (Tab. 7).

Zusammenfassend zeigten diese Daten, dass während der Imatinib-Resistenzentwicklung die Mehrzahl der identifizierten Gene eine differenzielle Expression bei der Entwicklung von K-562^{0,5} aufwies, die Anzahl der Gene mit Transkriptionsveränderung in den K-562² jedoch deutlich reduziert war. Außerdem konnten große Unterschiede in den biologischen Replikaten der Resistenzzüchtung der K-562²-Zellen identifiziert werden. Dieses ließ die Frage aufkommen, ob eine gemeinsame Auswertung der biologischen Replikate der Resistenzzüchtung der K-562²-Zellen die zugrundeliegenden Resistenzmechanismen aufdecken kann.

4.3.1.4 Validierung der differenziellen Expression potentieller Kandidatengene

Aus den Analysen der transkriptionellen Veränderungen in bzw. im Verlauf der Imatinib-Resistenz ergaben sich verschiedene potentielle Kandidaten, die einen Beitrag bei der Entstehung oder Progression der Imatinib-Resistenz haben könnten. Dabei wurden die Gene zur Bestätigung der differenziellen Expression ausgewählt, die die größte Veränderung der Transkription (den größten *fold change*) aufwiesen oder für die Interaktionen in der STRING-Analyse identifiziert werden konnten. Zusätzlich dazu konnten für diese Gene in der Imatinib-Resistenz differenzielle methylierte CpGs assoziiert werden (siehe 4.5.1). Diese Gene wurden zur Bestätigung der differenziellen Expression während bzw. in der Imatinib-Resistenz mittels qRT-PCR analysiert. Von den 11 ausgewählten Kandidaten zeigten 10 einen signifikanten Expressionsunterschied zwischen K-562, K-562^{0,5} und K-562² und konnten damit bestätigt werden.

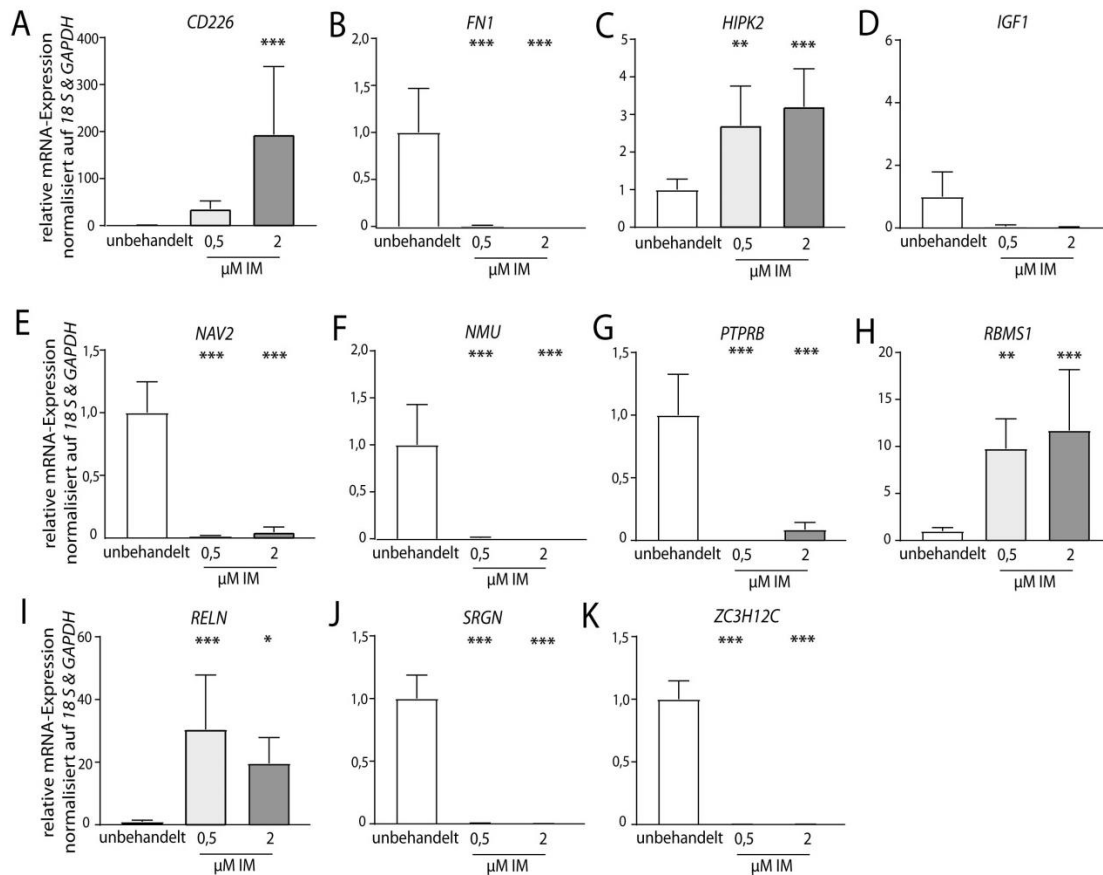


Abbildung 31: Bestätigung der Genexpression der potentiellen Kandidatengene mit differenzieller Expression in bzw. während der Imatinib-Resistenz (0,5; 2 µM) mittels qRT-PCR. Die mRNA-Expression wurde jeweils normalisiert auf *18S* und *GAPDH*. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD, normalisiert auf die unbehandelten Zellen. Die statistische Analyse erfolgte mittels *Two-Way-ANOVA* mit nachfolgendem *Dunnet's Test*; N=6. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. IM: Imatinib.

Insgesamt entsprachen diese beobachteten Expressionen dem im *Screening* identifizierten Expressionsmuster der Gene. Es zeigte sich, dass das Oberflächenmolekül *CD226*, die Serin/Threonin-Kinase *HIPK2* und das RNA-bindende Protein *RBMS1* eine Expressionserhöhung mit Zunahme der Imatinib-Konzentration aufwiesen, wohingegen das extrazelluläre Matrix-Protein *RELN* zwar in K-562^{0,5} erhöht, in K-562² wiederum reduziert war. Das Zelladhäsionsprotein *FN1*, die Phosphatase *PTPRB* sowie das ATP-bindende Protein *NAV2*, das Neuropeptid *NMU*, das für hämatopoetische Zellen-spezifische Proteoglykan *SRGN* und das Zinkfingerprotein *ZC3H12C* waren in der Imatinib-Resistenz signifikant reduziert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Expression der zur Validierung der ausgewählten Kandidaten bis auf eine Ausnahme (*IGF1*) bestätigt werden konnte. Damit

stellen die validierten Gene einen möglichen Ansatzpunkt für die weitere funktionelle Analyse des Beitrags in der Imatinib-Resistenz dar.

4.3.2 Genetische Veränderungen während der Imatinib-Resistenzentwicklung

Bereits in den Genexpressionsanalysen zeigte sich eine hohe Variation bei der Entwicklung von 2 μM Imatinib-resistenten Zellen, welches möglicherweise auf die Selektion bestimmter Klone hindeuten kann. Daher stellte sich die Frage, ob im Laufe der Resistenzentwicklung bestimmte Mutationen in den Zellen akkumulieren, wie sich die Heterogenität der Zellen verhält und ob eine klonale Evolution während der Resistenzentwicklung auftritt. Um dieses zu untersuchen, wurde eine Exom-Sequenzierung durchgeführt mit dem Ziel kleine Mutationen (*single nucleotide variants, SNV*) in kodierenden Regionen nachzuweisen. Zunächst wurde analysiert, wie viele kleine Mutationen im Vergleich zum humanen Referenzgenom in den unbehandelten und Imatinib-resistenten Zellen vorhanden sind. Dazu wurde ein *Cutoff* bei 5 % der *reads* gesetzt, um die falsch positiven SNVs zu eliminieren.

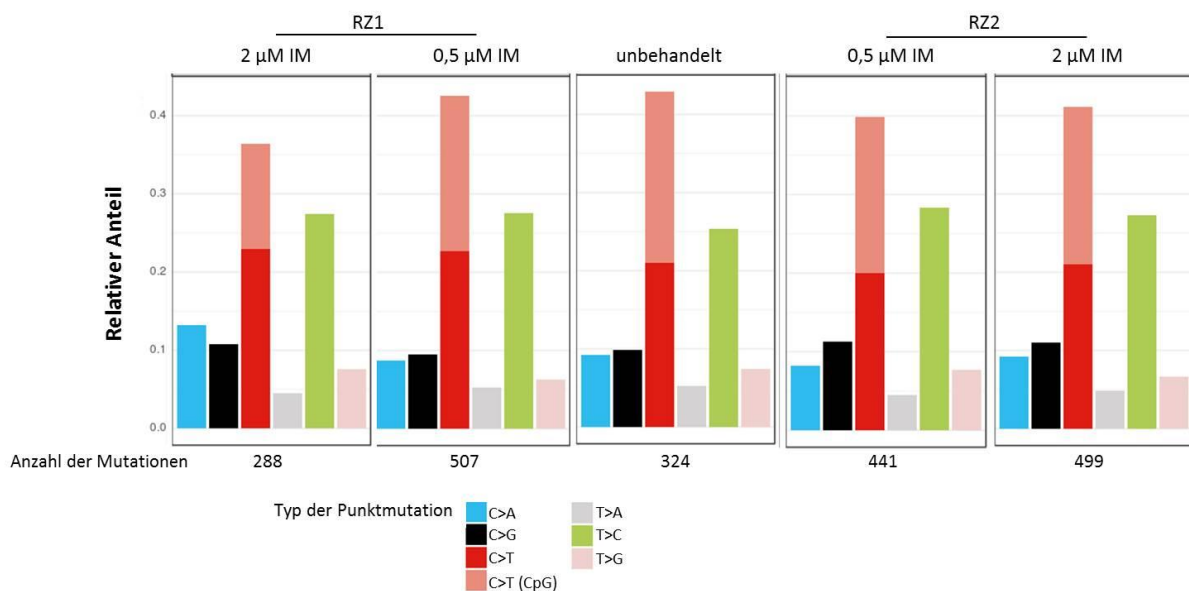


Abbildung 32: SNV-Muster der detektierten Punktmutationen in unbehandelten und Imatinib-resistenten Zellen (0,5 & 2 μM). Angegeben sind der relative Anteil sowie die absolute Anzahl an Mutationen mit deren Nukleotidaustausch. IM: Imatinib; RZ1: Resistenzzüchtung 1; RZ2: Resistenzzüchtung 2. Die Abbildung wurde in Zusammenarbeit mit Daniela Esser, Institut für Experimentelle Medizin, UKSH Kiel erstellt.

Die unbehandelte, Imatinib-sensitive K-562-Zelllinie wies 324 kleine Mutationen auf, während die Anzahl in den Imatinib-Resistenzzüchtungen stark variierte (RZ1 (0,5 μM , 2 μM): 507, 288; RZ2 (0,5 μM , 2 μM): 441, 499, Abb. 32). Dabei war auffällig, dass es sich bei den meisten SNVs um C>T-Punktmutationen sowohl in CpGs als auch in anderen genomischen Bereichen handelte. Außerdem waren viele T>C-Austausche in den Proben zu detektieren.

Als nächstes wurde getestet, ob die SNVs bevorzugt in einem bestimmten Basenkontext auftreten, also ein bestimmtes Nukleotid vermehrt 5' oder 3' des SNVs zu finden ist. Dazu wurde die jeweilige Mutation mit den möglichen 5' bzw. 3' Basen anhand ihrer Häufigkeit analysiert, wobei sich 96 mögliche Kombinationen ergeben (SNV96-Analyse).

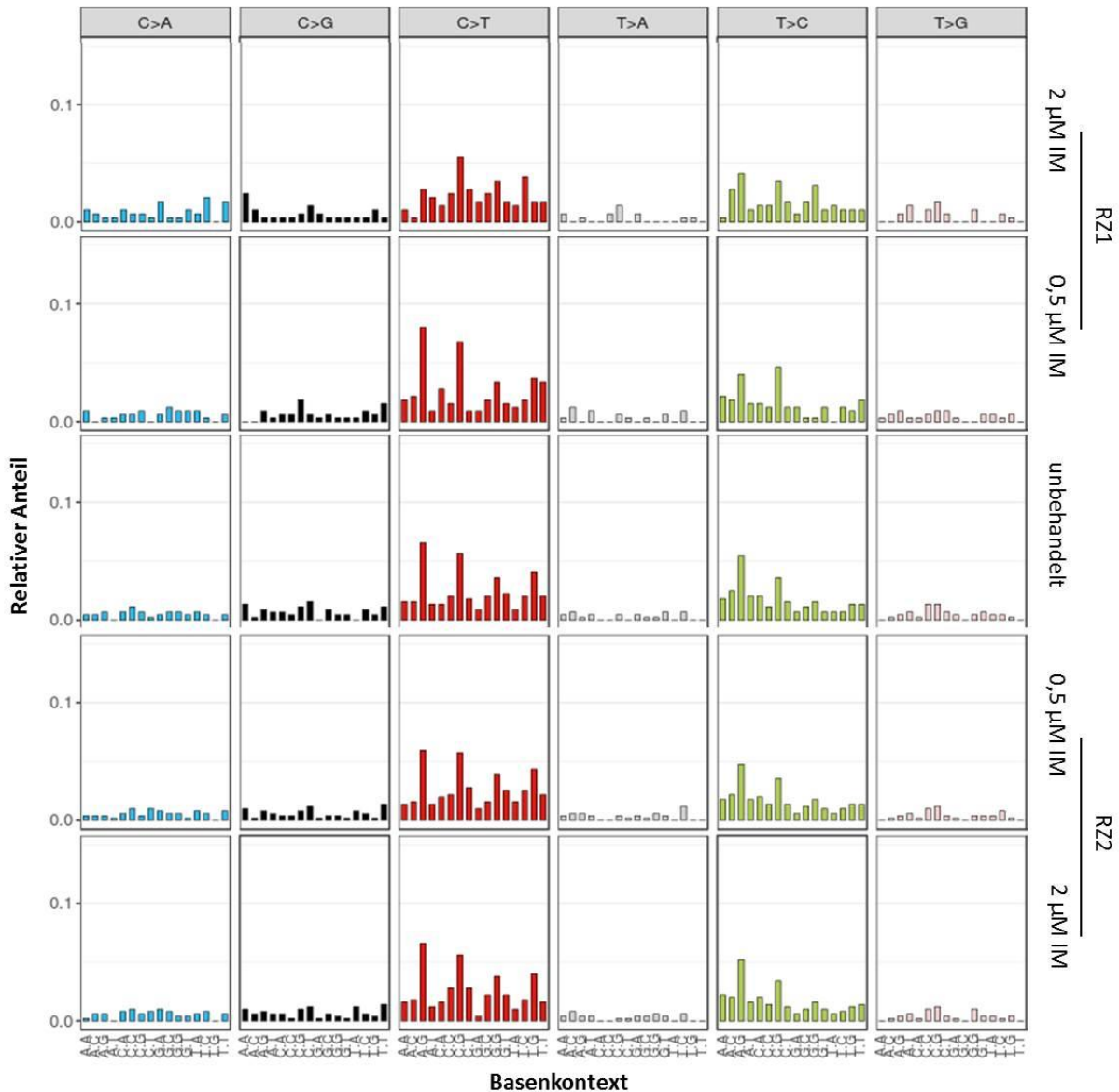


Abbildung 33: SNV 96-Plot zur Analyse des bevorzugten Basenkontexts der SNVs. Angegeben ist der relative Anteil der jeweiligen SNVs mit den möglichen 5' sowie 3' Basen der unbehandelten sowie 0,5 & 2 µM IM-resistenten Zellen der Resistenzzüchtung 1 (RZ1) sowie Resistenzzüchtung 2 (RZ2). IM: Imatinib. Die Abbildung wurde in Zusammenarbeit mit Daniela Esser, Institut für Experimentelle Medizin, UKSH Kiel erstellt.

Alle Zellen wiesen ein vermehrtes Auftreten von C>T unabhängig der benachbarten Nukleotide auf (Abb. 33), was dem in Abb. 32 detektierten Muster entspricht. Ähnliches zeigt

sich auch für den T>C-SNV. Jedoch konnten für alle möglichen Punktmutationen keine signifikant bevorzugten 5' und 3' Basen beobachtet werden.

Weiterführend wurde untersucht, ob die SNVs bevorzugt an einem der beiden DNA-Stränge auftreten, also vermehrt am transkribierten oder nicht-transkribierten Strang zu finden sind (Abb. 34). Mit Ausnahme von T>G bei der RZ1 der 0,5 μ M Imatinib-resistenten Zellen gab es jedoch keine signifikanten Effekte, die auf eine bevorzugte Wahl des Stranges hindeuten.

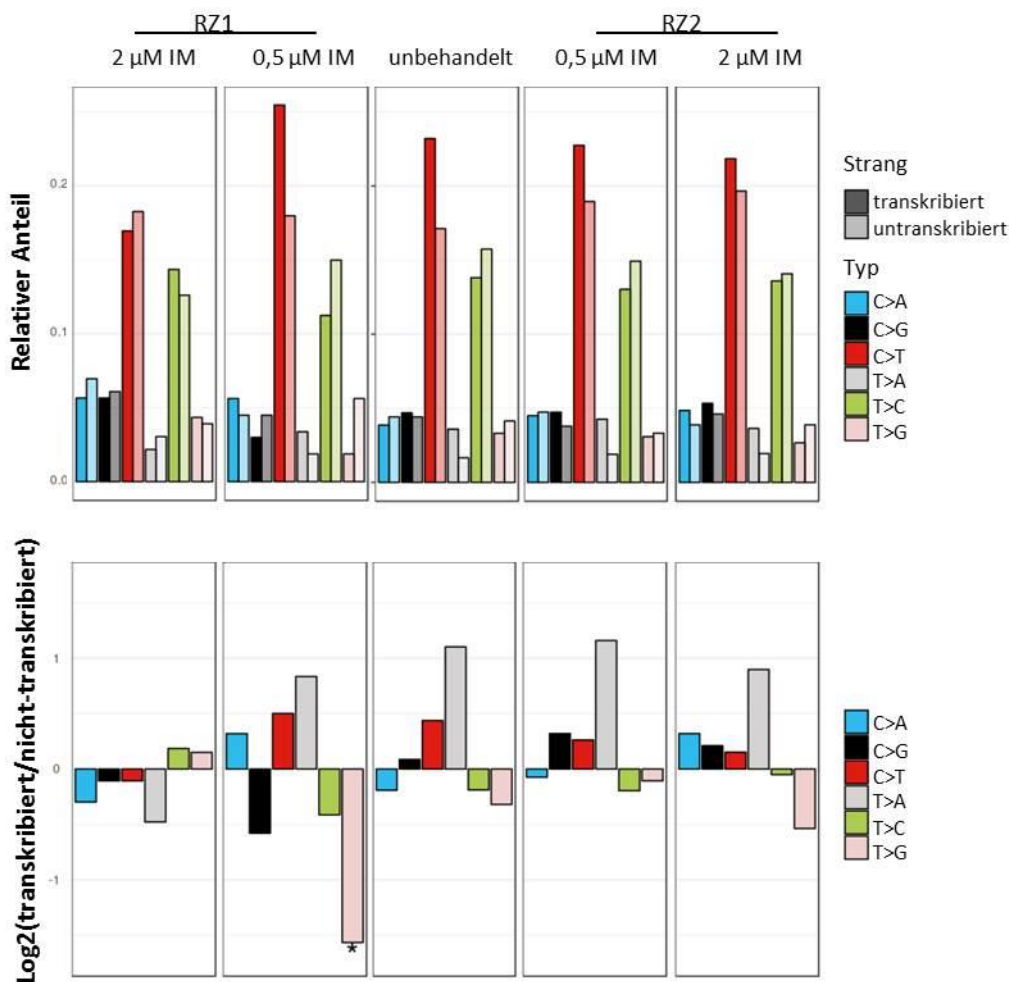


Abbildung 34: Bevorzugtes Auftreten der SNVs am transkribierten oder untranskribierten DNA-Strang im Vergleich der Imatinib-Resistenzzüchtungen (0,5; 2 μ M) mit unbehandelten Zellen. Dargestellt sind die relativen Anteile der Punktmutationen am jeweiligen Strang (oben) sowie das Log₂-transformierte Verhältnis der SNV des transkribierten und nicht-transkribierten Stranges der 0,5 & 2 μ M IM-resistenten Zellen der Resistenzzüchtung 1 (RZ1) und Resistenzzüchtung 2 (RZ2); * - $p < 0,05$. IM: Imatinib. Die Abbildung wurde in Zusammenarbeit mit Daniela Esser, Institut für Experimentelle Medizin, UKSH Kiel erstellt.

Für eine Vielzahl von Tumoren ist bekannt, dass sie ein distinktes Mutationsmuster und damit eine Tumorsignatur aufweisen. Diese Signaturen sind in dem *Catalogue of Somatic*

Mutations in Cancer (COSMIC) des Wellcome Sanger Institutes zusammengefasst. Um zu analysieren, ob die detektierten SNVs mit bekannten Tumorsignaturen assoziiert sind, wurden diese mit den bekannten Tumorsignaturen abgeglichen.

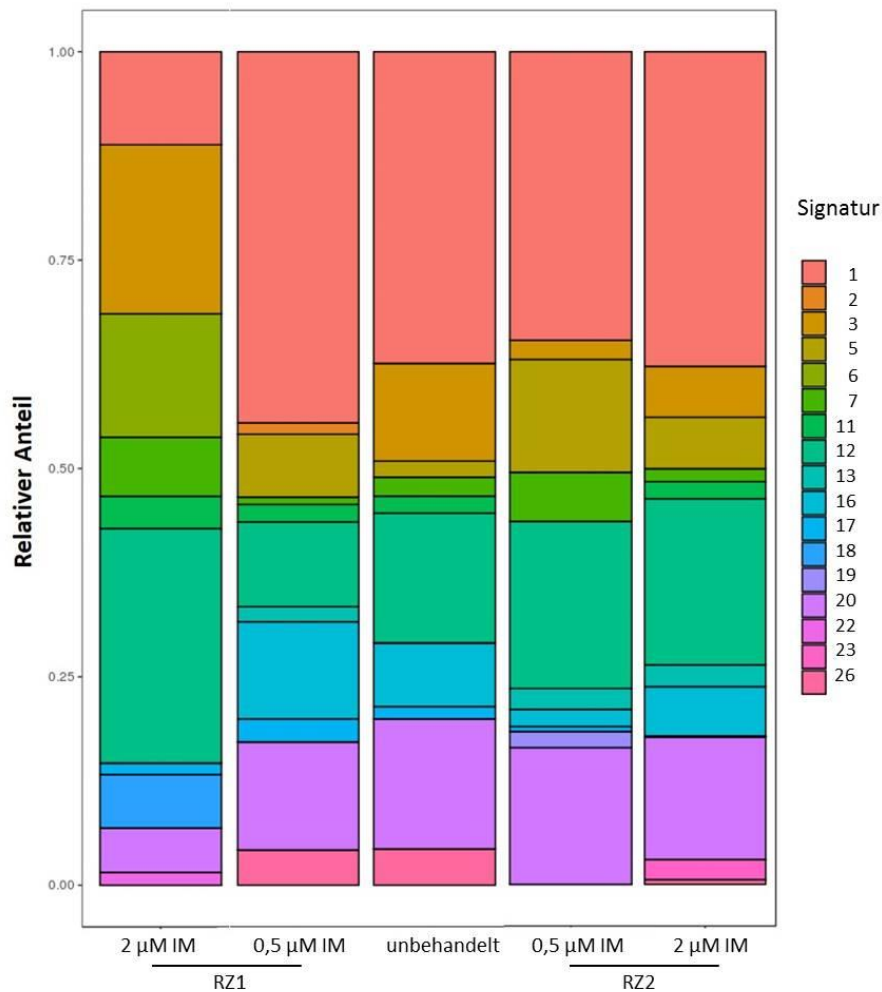


Abbildung 35: Tumorsignaturen der unbehandelten und Imatinib-resistenten Zelllinien. Dargestellt sind der relative Anteil der Tumorsignaturen der unbehandelten Zellen sowie der 0,5 μM & 2 μM Imatinib-resistenten Zellen der Resistenzzüchtung 1 (RZ1) sowie der Resistenzzüchtung 2 (RZ2). Die Benennung und Zuordnung der Signaturen erfolgte nach dem *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer* (Cosmic) des Wellcome Sanger Institutes. IM: Imatinib. Die Abbildung wurde in Zusammenarbeit mit Daniela Esser, Institut für Experimentelle Medizin, UKSH Kiel erstellt.

Generell konnten die detektierten SNVs einer Vielzahl von verschiedenen Tumorsignaturen zugeordnet werden (Abb. 35). Den größten relativen Anteil haben die Signaturen 1 und 12, die häufig bei der C>T-Desaminierung zu finden sind. Bei dieser Analyse fiel generell auf, dass es zwischen unbehandelten und 0,5 μM Imatinib-resistenten Zellen keine großen Veränderungen gab (Abb. 35, Mitte). Die größten Unterschiede gab es bei der ersten

Resistenzzüchtung von 0,5 μM zu 2 μM Imatinib-resistenten Zellen, jedoch nicht bei der zweiten Resistenzzüchtung.

Im nächsten Schritt wurden die SNV in den Resistenzzüchtungen genauer untersucht und analysiert, welche Mutationen in beiden Replikaten auftreten. Es zeigte sich, dass während der Resistenzentwicklung zu 0,5 μM Imatinib-resistenten Zellen 54 Mutationen in beiden Vergleichen auftreten, wobei es sich bei 70,4 % um SNVs handelt, die zu einem Aminosäureaustausch führen (Tab. 12). Eine ähnliche Anzahl der SNVs konnte im Vergleich von unbehandelten Zellen zu 2 μM Imatinib-resistenten Zellen beobachtet werden (57 SNVs; 71,9 % Aminosäureaustausch). Zusätzlich dazu traten in beiden Vergleichen jeweils ein SNV verbunden mit der Entstehung eines Stoppcodons sowie jeweils 15 synonyme SNVs ohne Veränderung der Proteinsequenz auf. Im Verlauf der Imatinib-Resistenzentwicklung zwischen 0,5 μM und 2 μM traten 21 Mutationen in beiden Resistenzzüchtungen auf, bei denen es sich um 13 Aminosäureaustausche (61,9 %) und acht synonyme Polymorphismen handelte.

Tabelle 12: Anzahl der SNVs in den biologischen Replikaten der Imatinib-Resistenz. Die Zahlen geben die Anzahl an identifizierten SNV aus dem Vergleich der K-562, K-562^{0,5} und K-562² mit einer Allelfrequenz $\geq 5\%$ an. Austausch: Aminosäureaustausch, nicht-synonymer SNV; *Stopgain*: Entstehung eines Stoppcodons; Synonym: keine Veränderung der Aminosäure; IM: Imatinib; K-562: unbehandelte, Imatinib-sensitive Zellen; K-562^{0,5}: 0,5 μM Imatinib-resistente Zellen; K-562²: 2 μM Imatinib-resistente Zellen.

Vergleich	Anzahl der SNVs		
	beide Resistenzzüchtungen	Resistenzzüchtung 1	Resistenzzüchtung 2
K-562 vs. K-562^{0,5}	54	110	149
	38 Austausch		
	1 <i>Stopgain</i>		
	15 synonym		
K-562 vs. K-562²	57	135	132
	41 Austausch		
	1 <i>Stopgain</i>		
	15 synonym		
K-562^{0,5} vs. K-562²	21	87	136
	13 Austausch		
	8 synonym		

Für die SNVs, die in den biologischen Replikaten identifiziert werden konnten, wurden *Pathway-Enrichment-Analysen* durchgeführt, um zu untersuchen, ob die detektierten SNVs in bestimmten Signalwegen oder Funktionen vermehrt auftreten. Dabei zeigten sich, mit Ausnahme des Vergleichs von K-562 mit K-562² mit einem zugeordneten Signalweg (Spliceosom, p=0,003), jedoch keine signifikanten Akkumulationen.

Auffällig war, dass bei dem Vergleich der K-562^{0,5} mit den K-562² mit 21 SNV in beiden biologischen Replikaten nur eine geringe Anzahl der Mutation in beiden biologischen Replikaten zu finden war, während die Gesamtzahl der SNVs sich in den Replikaten deutlich unterschied. Daher wurden, neben der Gesamtauswertung der biologischen Replikate, die Resistenzzüchtungen einzeln ausgewertet, um zu untersuchen, ob sich ein bestimmter Subklon in den Zellen durchsetzt und ob sich die Tumorerogenität verändert. Dazu wurden die SNVs identifiziert, die bei der Resistenzzüchtung von unbehandelten Zellen zu K-562^{0,5} auftreten und verfolgt, wie sich deren Präsenz in den K-562² verhält.

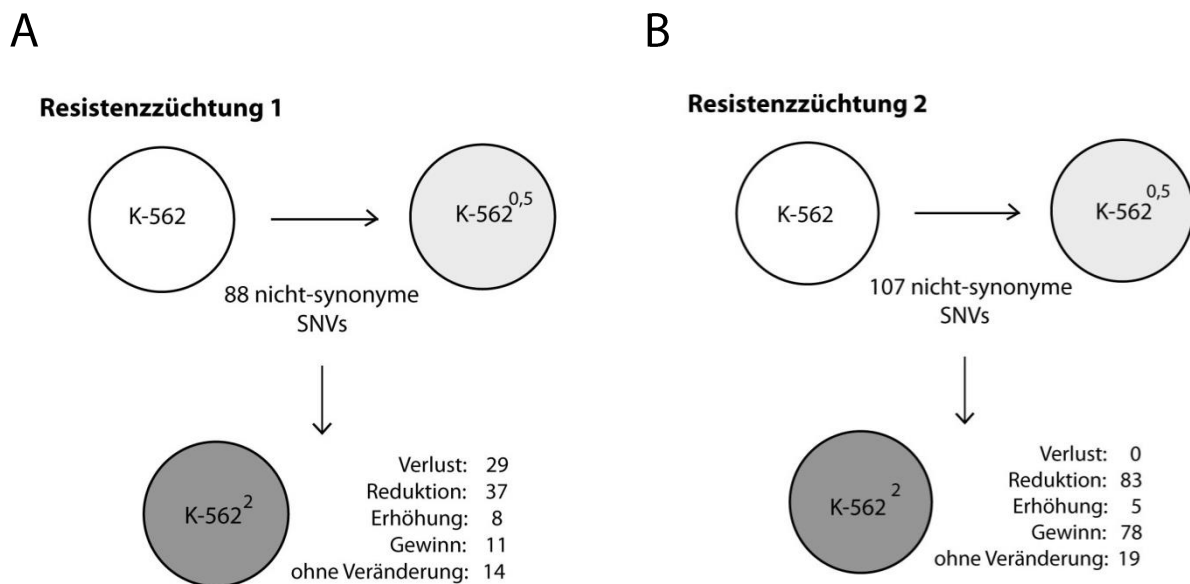


Abbildung 36: Analyse der Allelfrequenz der SNVs in den biologischen Replikaten der Imatinib-Resistenz.

(A) Resistenzzüchtung 1: Bei der Entwicklung von 0,5 µM IM-resistenten Zellen (K-562^{0,5}) traten 88 nicht-synonyme SNVs auf. Von diesen gingen 29 bei der Progression zu 2 µM IM-resistenten Zellen (K-562²) verloren; 37 zeigten ein geringeres Vorkommen. 11 SNVs konnten zusätzlich detektiert werden, 8 weitere waren bereits in den K-562^{0,5} vorhanden, zeigten in den K-562² jedoch eine höhere Präsenz. 14 SNVs zeigten keine Veränderungen. (B) Resistenzzüchtung 2: In dieser Resistenzzüchtung konnten 107 nicht-synonyme SNVs in den K-562^{0,5} detektiert werden, von denen 83 in K-562² reduziert und 5 erhöht waren. Außerdem konnten 78 SNVs zusätzlich detektiert werden. 19 SNVs waren ohne Veränderung. Alle der zuvor detektierten SNVs konnte in den K-562² identifiziert werden. K-562: unbehandelte, Imatinib-sensitive Zellen; K-562^{0,5}: 0,5 µM Imatinib-resistente Zellen; K-562²: 2 µM Imatinib-resistente Zellen.

Es zeigten sich deutliche Unterschiede in den beiden Replikaten der Imatinib-Resistenzzüchtung mit 88 bzw. 107 nicht-synonymen SNVs bei der Entwicklung von K-562^{0,5}-Zellen (Abb. 36). Bei der Progression konnten in der 1. Resistenzentwicklung 29 SNVs nicht mehr detektiert werden (Allelfrequenz 0%). Daneben waren 37 SNVs mit $\pm 20\%$ im Vergleich zu K-562^{0,5} reduziert, wovon acht ein erhöhtes Aufkommen zeigten. Zusätzlich dazu konnten 11 SNVs identifiziert werden, die in den K-562²-Zellen spontan hinzugewonnen wurden. 14 der 88 SNVs zeigten keine Veränderungen bei dem Fortschreiten der Resistenzentwicklung (Abb. 36, A).

In der 2. Resistenzentwicklung konnten 107 SNVs identifiziert werden, von denen keiner in den K-562²-Zellen verloren ging, jedoch 83 ein reduziertes Vorkommen zeigten (Abb. 36, B). Fünf der bereits in K-562^{0,5}-Zellen vorhandenen SNVs traten vermehrt auf und 78 neue Mutationen konnten in den K-562² zusätzlich detektiert werden. 19 SNVs zeigten zwischen den Imatinib-Konzentrationen keine Unterschiede in ihrer Abundanz. Generell schien also der Großteil der SNVs in beiden Resistenzzüchtungen vermindert zu sein, wohingegen nur eine geringe Anzahl an SNVs ein erhöhtes Auftreten hatte. Diese waren von besonderem Interesse, da dies auf eine klonale Selektion und die Präsenz einer geringen Anzahl an Klonen hindeuten könnte. Diese SNVs sind tabellarisch in Tab. 13 aufgeführt.

Tabelle 13: Liste der in den K-562²-Zellen angereicherten SNVs aus beiden Imatinib-Resistenzzüchtungen. Angegeben sind die SNVs mit ihrem Nukleotidaustausch und der Frequenz in den K-562², die in einer oder beiden Resistenzzüchtungen auftraten. RZ1: Resistenzzüchtung 1; RZ2: Resistenzzüchtung 2; K-562^{0,5}: 0,5 µM Imatinib-resistente Zellen; K-562²: 2 µM Imatinib-resistente Zellen.

Gensymbol	Genname	Mutation	Frequenz im Vergleich zu K-562 ^{0,5}
beide Resistenzzüchtungen			
RBMX	<i>RNA binding motif protein, X-linked</i>	C>G	1,69 RZ1 1,27 RZ2
Resistenzzüchtung 1			
AHNAK2	<i>AHNAK nucleoprotein 2</i>	A>T	1,33
CNDP1	<i>carnosine dipeptidase 1</i>	C>A	1,34
MAP6	<i>microtubule associated protein 6</i>	A>C	1,45
NPIPB11	<i>nuclear pore complex interacting protein family member B11</i>	C>T	1,23
PRR36	<i>proline rich protein 36</i>	G>T	1,94
SLC44A4	<i>solute carrier family 44 member 4; thiamine pyrophosphate transporter 1</i>	T>C	1,57
VCX	<i>variable charge, X-linked</i>	A>G	1,54
Resistenzzüchtung 2			
CNTLN	<i>Centlein</i>	G>C	2,38
DSPP	<i>dentin sialophosphoprotein</i>	A>G	1,36
TTBK1	<i>tau tubulin kinase 1</i>	C>G stopgain	1,34
TWNK	<i>twinkle MtDNA helicase</i>	G>C	1,41

In diesen unabhängigen Auswertungen der Imatinib-Resistenzzüchtungen konnte ein Austausch von Cytosin zu Guanin des *RBMX*, dem auf dem X-Chromosom kodierten *RNA binding motif protein* identifiziert werden, welches in den 2 µM Imatinib-resistenten Zellen angereichert war. Daneben wurden Mutationen in Zytoskelett-assoziierten Genen, wie der *tau tubulin kinase 1 (TTBK1)*, *microtubule associated protein 6 (MAP6)* und *Centlein (CNTLN)* gefunden, sowie auch in nukleären Proteinen, wie der *twinkle MtDNA helicase (TWNK)*, *nuclear pore complex interacting protein family member B11 (NPIPB11)*, *AHNAK nucleoprotein 2 (AHNAK2)* oder dem bereits erwähnte *RBMX*.

Insgesamt deuten die Daten der Exom-Sequenzierung auf deutliche Unterschiede in den Imatinib-Resistenzzüchtungen der 2 μ M Imatinib-resistenten Zellen hin, mit einer Abnahme der Anzahl an SNVs bzw. differenziellen Mutationsmustern. Daneben scheint es, dass distinkte Mutationen im Verlauf der Imatinib-Resistenz auftreten und eine klonale Evolution einhergehend mit einer Abnahme der Tumorerogenität geschieht.

4.4 Vergleich der Imatinib- & Nilotinib-Resistenz

Neben Imatinib als Wirkstoff der ersten Wahl in der Therapie der CML wachsen zunehmend auch der Einsatz und die Bedeutung der neueren BCR/ABL-Inhibitoren, wie z.B. Nilotinib, insbesondere bei Therapieresistenzen gegenüber Imatinib. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit untersucht, welche Unterschiede es zwischen Nilotinib-resistenten und Imatinib-resistenten CML-Zellen hinsichtlich der Genexpression, aber auch der Methylierung gibt.

4.4.1 Transkriptionelle Veränderungen in der Nilotinib-Resistenz

Zunächst wurde untersucht, wie sich die Genexpression in der Nilotinib-Resistenz gegenüber unbehandelten Zellen verändert. Dieses wurde entsprechend dem Vorgehen in der Imatinib-Resistenz ebenfalls in biologischen Replikaten durchgeführt. Im Vergleich der biologischen Replikate der 100 nM Nilotinib-Resistenz zeigten sich deutliche Unterschiede in beiden Resistenzzüchtungen hinsichtlich der Anzahl an differenziell exprimierten Genen mit nur 18,7 % der Gene, die in beiden biologischen Replikaten identifiziert werden konnten (Tab. 14).

Tabelle 14: Anzahl der differenziell exprimierten Gene in den biologischen Replikaten der Nilotinib-Resistenzzüchtung (K-562^N) mit *fold change* $>\pm 3$ und korrigiertem *p*-Wert $p < 0,05$. K-562: unbehandelte, Imatinib-sensitive Zellen; K-562^N: 100 nM Nilotinib-resistente Zellen.

Vergleich	Anzahl der differenziell exprimierten Gene in		
	beide Resistenzzüchtungen	Resistenzzüchtung 1	Resistenzzüchtung 2
K-562 vs. K-562^N	469	1429	614

Aus den signifikant differenziell exprimierten Genen der biologischen Replikate wurden zunächst die Gene ermittelt, die in der Nilotinib-Resistenz zu finden waren. Im nächsten Schritt wurden die differenziell exprimierten Gene der 100 nM Nilotinib-Resistenz (K-562^N) mit den K-562² verglichen, um die Gene zu identifizieren, die in beiden TKI-Resistenzen Veränderungen in ihrer Expression zeigten (Abb. 37).

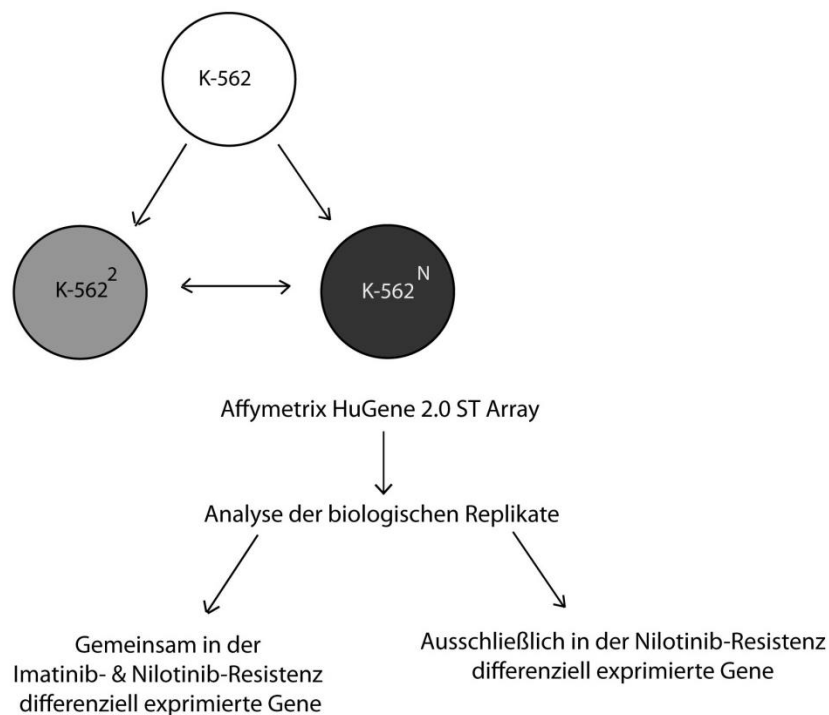


Abbildung 37: Ablauf der Genexpressionsanalyse zum Vergleich der Imatinib- (K-562²) und Nilotinib-Resistenz (K-562^N). K-562: unbehandelte, Imatinib-sensitive Zellen; K-562²: 2 μ M Imatinib-resistente Zellen; K-562^N: 100 nM Nilotinib-resistente Zellen.

Um die in der Nilotinib-Resistenz (Vergleich K-562 vs. K-562^N) differenziell exprimierten Gene näher zu untersuchen, wurden diese mittels ihrer Z-transformierten Expressionswerte geclustert (Abb. 38). Dabei war auffällig, dass nur ein geringer Teil der Gene in den K-562^N eine niedrige Expression hatten, jedoch die Expression der meisten differenziell exprimierten Gene in den resistenten Zellen erhöht war.

Ergebnisse

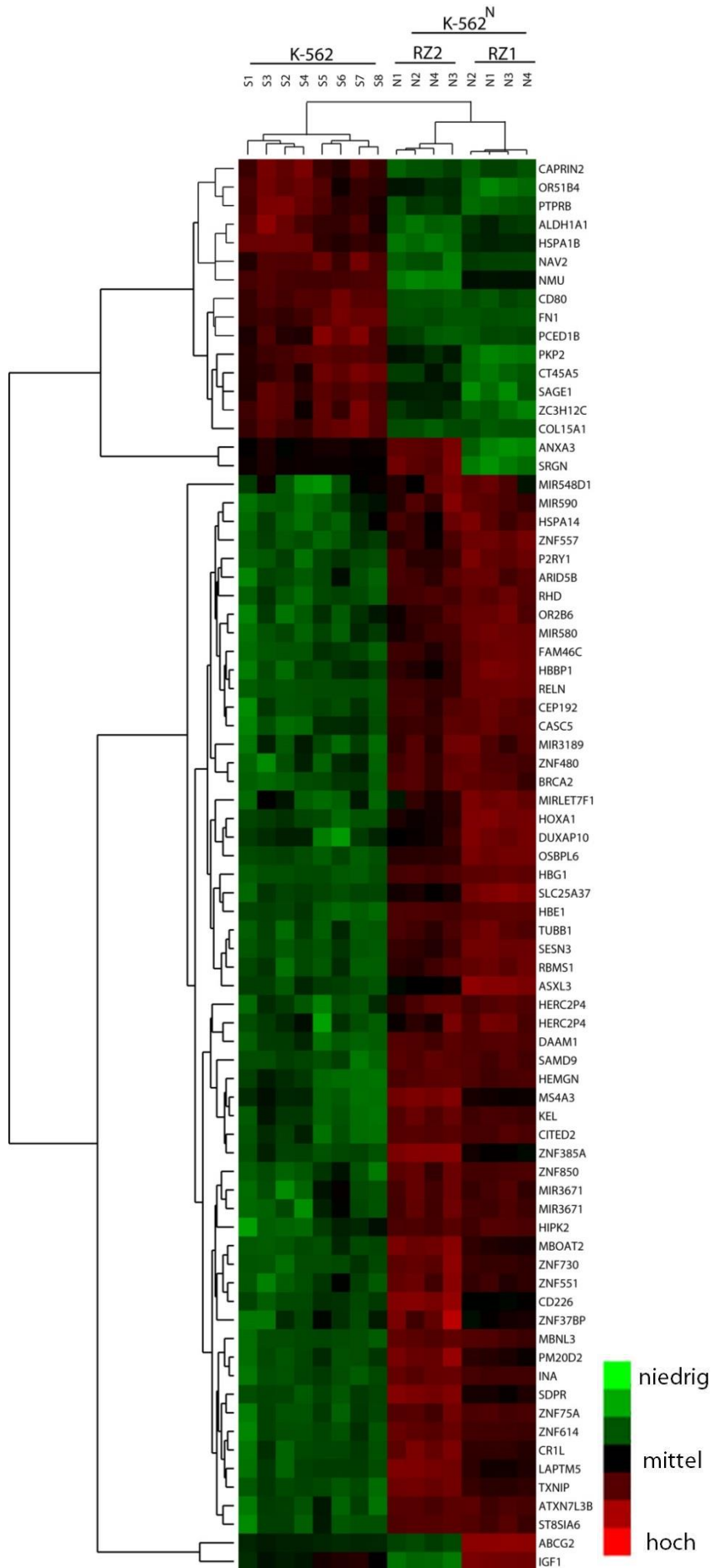


Abbildung 38: Cluster-Analyse nach Spearman-Rank-Korrelation der in der Nilotinib-Resistenz (K-562^N) differenziell exprimierten Gene. Abgebildet sind die signifikanten mRNAs mit einem *fold change* ± 3 und korrigiertem p-Wert $p < 0,05$. K-562: unbehandelte, Imatinib-sensitive Zellen; K-562^N: 100 nM Nilotinib-resistente Zellen.

Im nächsten Schritt wurden die ausschließlich in den K-562^N-Zellen differenziell exprimierten Gene näher untersucht. Dabei konnte eine Überexpression von 154 Genen in der Nilotinib-Resistenz festgestellt werden, während 34 Gene eine Herunterregulation in den resistenten Zellen aufzeigten. Für diese Gene wurde zunächst eine STRING-Analyse durchgeführt, um potentielle Netzwerke und Interaktionen zu identifizieren (Abb. 39). Zur weiteren Charakterisierung der Gene wurden KEGG-Pathway-Analysen durchgeführt (Tab. 15).

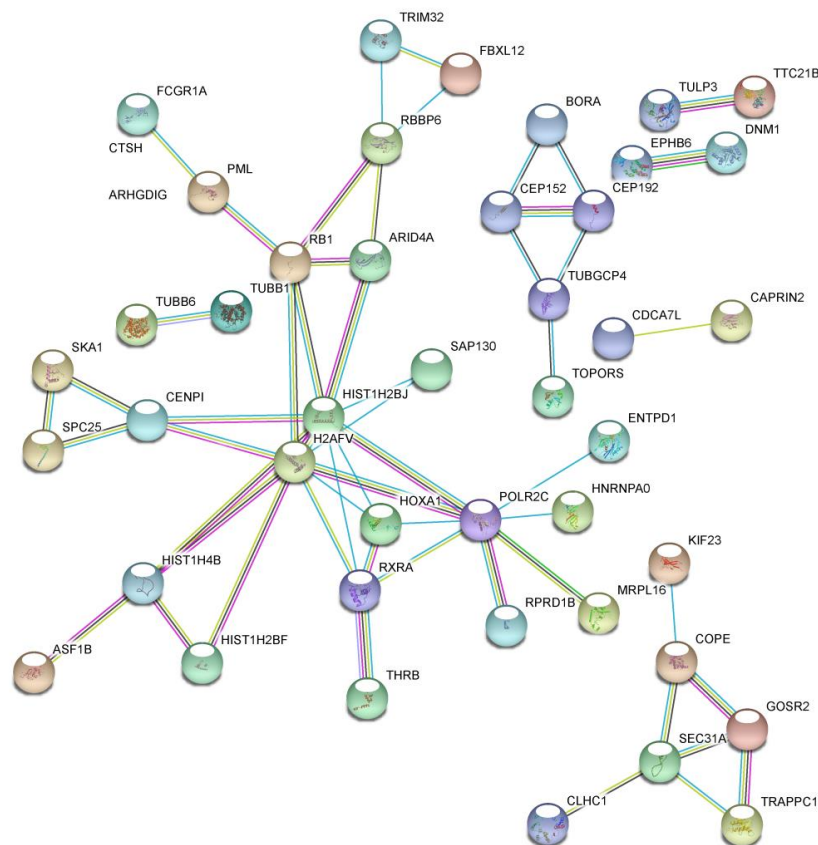


Abbildung 39: STRING-Analyse der in Nilotinib-Resistenz (K-562^N) differenziell exprimierten Gene. Die Farbe der Linie gibt die Art der Interaktion an: Türkis: Datenbanken; violett: experimentell bestätigte Interaktion; blau: genetische Nachbarschaft; rot: Genfusion, hellblau: Gen-Kookkurrenz; gelb: *textmining*, schwarz: Co-Expression; hellblau: Proteinhomolog. Dargestellt sind die Knotenpunkte mit einem *interaction score* von 0,7.

Tabelle 15: KEGG-Pathway-Analyse mit zugeordneten differenziell exprimierten Genen aus dem Vergleich der K-562 mit K-562^N. K-562: unbehandelte, Imatinib-sensitive Zellen; K-562^N: 100 nM Nilotinib-resistente Zellen.

KEGG-Pathway	Im <i>Screening</i> identifizierte Gene
Systemischer Lupus Erythematoses	FCGR1A, H2AFV, HIST1H2BF, HIST1H2BJ
Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom	RB1, RXRA, SOS2
FCyR-vermittelte Phagozytose	FCGR1A, DNMT1, PLA2G4A

Generell fiel auf, dass es sich im Hauptnetzwerk der STRING-Analyse um Gene handelt, die im Zusammenhang mit Histonen bzw. DNA-Modifikationen standen. In den KEGG-Pathways konnten Signalwege im Zusammenhang mit der Immunantwort (Phagozytose, Autoimmunerkrankung) sowie Dysregulation im Nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom assoziiert werden.

4.4.2 Transkriptioneller Vergleich der Imatinib- und Nilotinib-Resistenz

Neben den Veränderungen der Genexpression in der Nilotinib-Resistenz war es von Interesse, die Gene zu identifizieren, die sowohl in der Nilotinib- als auch der Imatinib-Resistenz differenziell exprimiert waren. Dazu wurden zunächst die Gene ermittelt, die in beiden TKI-Resistenzen eine differenzielle Expression zeigten.

Dabei zeigte sich, dass der Großteil der differenziell exprimierten Gene für die jeweilige Resistenz spezifisch ist, d.h. ausschließlich in einer der beiden resistenten Zelllinien zu finden war (31,1 % in K-562², 53,5 % in K-562^N; Abb. 40). In beiden TKI-Resistenzzüchtungen konnte eine differenzielle Expression von 105 Genen (15,4 %) beobachtet werden.

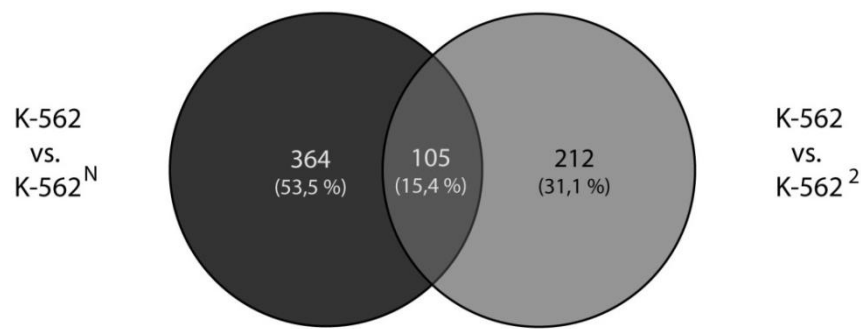


Abbildung 40: Venn-Diagramm der in der Imatinib (K-562²) und Nilotinib-Resistenz (K-562^N) differenziell exprimierten Gene. Angegeben ist die Anzahl an signifikant differenziell exprimierten Genen mit *fold change* ± 2 und korrigiertem p-Wert $< 0,05$ aus dem Vergleich von K-562 mit K-562² und K-562^N als Zahlenwert sowie in Prozent. K-562: unbehandelte, Imatinib-sensitive Zellen; K-562²: 2 μ M Imatinib-resistente Zellen; K-562^N: 100 nM Nilotinib-resistente Zellen.

Von diesen 105 Genen wurden STRING-Analysen zur Charakterisierung von Netzwerken und Interaktionen sowie Untersuchungen der assoziierten KEGG-Pathways durchgeführt. Allerdings konnten für diese weder Interaktionen noch KEGG-Pathways vorhergesagt werden. Deshalb wurden für die nähere Analyse, die 46 Gene betrachtet, die den größten *fold change* in der Expression besaßen. Dabei konnten im Vergleich der Imatinib- und Nilotinib-Resistenz 16 Gene herausgefiltert werden, die eine Herunterregulation in beiden resistenten Zelllinien zeigten. Im Gegensatz dazu waren 29 Gene in beiden resistenten Zelllinien im Vergleich zu K-562 heraufreguliert. Hingegen gab es nur ein Gen, die Argininsuccinat-Synthase 1 (*ASS1*), die in K-562² herunterreguliert (3,8-fach), aber in K-562^N 2,3-fach heraufreguliert war (Tab. 16).

Tabelle 16: Auswahl der gemeinsam in den K-562² und K-562^N differenziell exprimierten Gene mit einem *fold change* ± 3 und korrigiertem p-Wert $p < 0,05$ in mindestens einer Zelllinie. K-562: unbehandelte, Imatinib-sensitive Zellen; K-562²: 2 μ M Imatinib-resistente Zellen; K-562^N: 100 nM Nilotinib-resistente Zellen.

Gen/mRNA	Genname	<i>fold change</i> K-562 vs. K-562 ²	<i>fold change</i> K-562 vs. K-562 ^N
FN1	<i>fibronectin 1</i>	-11,24	-11,95
NMU	<i>neuromedin U</i>	-23,40	-8,53
COL15A1	<i>collagen, type XV, alpha1</i>	-6,23	-5,03
HSPA1B	<i>heat shock 70 kDa protein 1B</i>	-6,23	-5,03
HSPA1A	<i>heat shock 70 kDa protein 1A</i>	-6,26	-5,01
SAGE1	<i>sarcoma antigen 1</i>	-6,03	-4,08
PCED1B	<i>PC-esterase domain containing 1B</i>	-3,53	-3,6
PTPRB	<i>protein tyrosine phosphatase, receptor type B</i>	-3,27	-2,94
ZC3H12C	<i>zinc finger CCCH-type containing 12C</i>	-3,21	-2,81
CTH	<i>cystathionine gamma-lyase</i>	-4,49	-2,53
AMIGO2	<i>adhesion molecule with Ig-like domain 2</i>	-3,10	-2,50
ASS1	<i>argininosuccinate synthase 1</i>	-3,84	2,31
ARRDC4	<i>arrestin domain containing 4</i>	8,96	2,39
WASF1	<i>WAS protein family, member 1</i>	3,03	2,39
NIN	<i>ninein</i>	3,85	2,54
ZNF75A	<i>zinc finger protein 75a</i>	2,86	3,22
ATXNL3B	<i>ataxin 7-like 3B</i>	3,02	3,36
BRCA2	<i>breast cancer 2</i>	2,24	3,52
ST8SIA6	<i>ST8-alpha-N-acetylneuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 6</i>	5,06	3,77
KEL	<i>KELL blood group</i>	2,38	4,05
CD226	<i>CD226 molecule</i>	6,07	4,18
ZNF385A	<i>zinc finger protein 385A</i>	4,14	4,19
ASXL3	<i>additional sec combs like transcriptional regulator 3</i>	3,62	4,61
OSBPL6	<i>oxysterol binding protein-like 6</i>	5,21	5,00
ZNF37BP	<i>zinc finger protein 37B pseudogene</i>	3,45	5,45
CR1L	<i>complement component (3b/4b) receptor 1-like</i>	4,79	6,24
SESN3	<i>sestrin 3</i>	6,85	6,63
TXNIP	<i>thioredoxin interacting protein</i>	9,90	9,08
HBE1	<i>hemoglobin, epsilon 1</i>	12,99	11,82
RELN	<i>reelin</i>	9,93	11,89

Bei den Kandidaten fiel Reelin (*RELN*) mit der höchsten Zunahme der Expression in beiden TKI-Resistenzen (9,93-fach/11,89-fach) auf, welches bereits in der Imatinib-Resistenz identifiziert werden konnte. Auch eine differenzielle Expression von *CD226*, *ZC3H12C*, *NMU*, *FN1* und *PTPRB* konnte zusätzlich in der Nilotinib-Resistenz festgestellt werden. Auffällig waren außerdem die Hitzeschockproteine *HSPA1A* sowie *HSPA1B* mit einer deutlichen Reduktion (-6 bzw. -5-fach) sowie das Hämoglobin $\epsilon 1$ (*HBE1*), welches in beiden TKI-Resistenzen deutlich erhöht war (9,9 -fach in K-562², 11,82-fach in K-562^N).

4.4.3 Validierung der differentiellen Expression potentieller Kandidatengene

Die Expression der in der Nilotinib- bzw. sowohl in der Nilotinib- als auch in der Imatinib-Resistenz differentiell exprimierten Gene wurde mittels qRT-PCR validiert. Dazu wurden die Gene mit der größten transkriptionellen Veränderung in der Nilotinib-Resistenz (dem höchsten *fold change*) ausgewählt, zu denen in der Nilotinib-Resistenz differentiell methylierte CpGs zugeordnet werden konnten (siehe 4.5.2).

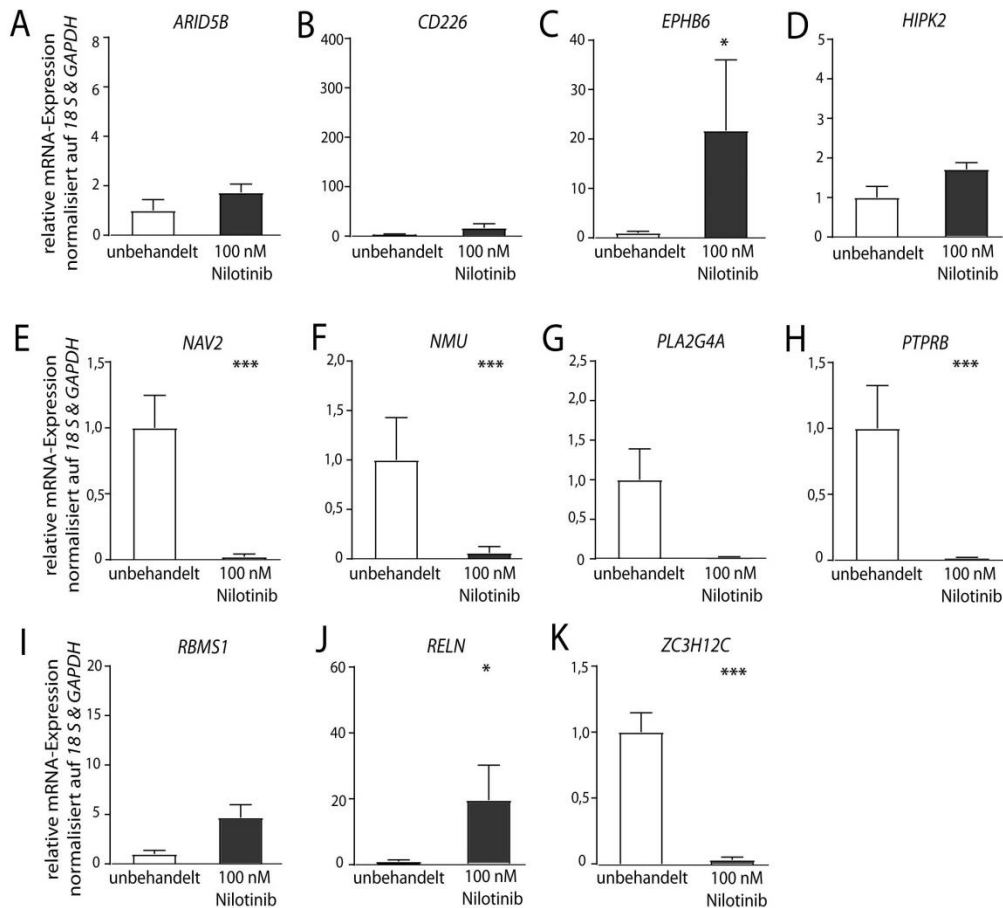


Abbildung 41: Bestätigung der differentiellen Expression der potentiellen Kandidatengene mittels qRT-PCR. Die mRNA-Expression wurde jeweils normalisiert auf *18 S* und *GAPDH*. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD, normalisiert auf die jeweiligen Daten der unbehandelten Zellen. Die statistische Analyse erfolgte mittels *Two-way-ANOVA* mit nachfolgendem *Dunnet's Test*; N=6. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Von den 11 ausgewählten Kandidaten konnte die differentielle Expression von sechs Genen in der Nilotinib-Resistenzentwicklung bestätigt werden. Der Ephrinrezeptor *EPHB6* sowie *RELN* waren in den Nilotinib-resistenten Zellen signifikant höher exprimiert, wohingegen *NAV2*, *NMU*, *PTPRB* und *ZC3H12C* in der Nilotinib-Resistenz signifikant reduziert waren.

Insgesamt konnten somit bestimmte Kandidaten aus der Imatinib-Resistenz auch in der Nilotinib-Resistenz bestätigt werden. Allerdings scheint der Großteil der differentiell exprimierten Gene für die jeweilige Resistenz spezifisch zu sein. Des Weiteren war auffällig, dass die biologischen Replikate der Nilotinib-Resistenz große Unterschiede aufwiesen.

4.5 Epigenetische Veränderungen in der Imatinib- und Nilotinib-Resistenz

Die Genexpression kann über eine Vielzahl von Mechanismen sowohl transkriptionell als auch post-transkriptionell moduliert werden. Dabei ist nicht hinreichend geklärt, welchen Einfluss TKIs, vor allem Imatinib und Nilotinib, auf die Methylierung haben, aber auch wie sich die Methylierung in TKI-Resistenzentwicklungen verändert.

Um diese Veränderungen der Methylierung in der Imatinib- und Nilotinib-Resistenz zu untersuchen, wurden 850 k-Arrays durchgeführt, mit denen die genomweite Methylierung gemessen werden kann. Für die Analyse wurde ein *Detection Cutoff* $p < 0,01$ zur Elimination falsch positiver Ergebnisse gesetzt und die CpGs in weitere Analysen eingeschlossen, die einen mittleren β -Value von $\pm 0,2$ (20 %) Unterschied in der Methylierung in den getesteten Proben und einen korrigierten p-Wert von $p < 0,05$ besaßen. Des Weiteren wurden die CpGs ohne klare Genassoziation entfernt. Anschließend wurden die CpGs identifiziert, die in beiden Resistenzzüchtungen differenziell methyliert waren (Tab. 17).

Tabelle 17: Vergleich der Veränderungen der Methylierung in den biologischen Replikaten der Imatinib & Nilotinib-Resistenz. Angegeben ist die Anzahl an differenziell methylierten CpGs in den Resistenzzüchtungen der K-562² und K-562^N mit einer Differenz in $\beta \geq \pm 0,2$ und einem korrigierten p-Wert $p \leq 0,05$. K-562: unbehandelte, Imatinib-sensitive Zellen; K-562²: 2 μ M Imatinib-resistente Zellen; K-562^N: 100 nM Nilotinib-resistente Zellen.

Vergleich	Anzahl der differenziell methylierten CpGs		
	beide	Resistenzzüchtung 1	Resistenzzüchtung 2
	Resistenzzüchtungen		
K-562 vs. K-562 ²	33.643	85.128	80.010
K-562 vs. K-562 ^N	29.317	221.481	47.914

Ähnlich zu den Ergebnissen der genomweiten Expressionsanalysen zeigten sich in den biologischen Replikaten deutliche Unterschiede in dem Methylierungsmuster in der Imatinib- und Nilotinib-Resistenz. Insgesamt sind in den K-562² 3,9 % aller CpGs differenziell methyliert. Dabei traten mit 85.128 bzw. 80.010 veränderten CpGs im Vergleich zu K-562-Zellen relativ ähnliche Gesamtzahlen an veränderten CpGs in den Resistenzzüchtungen auf.

In der Nilotinib-Resistenz hingegen war ein großer Einfluss der Methylierung in der ersten (221.481 CpGs), aber nicht in der zweiten Resistenzzüchtung (47.914 CpGs) zu erkennen.

Insgesamt waren 3,45 % aller gemessenen CpGs im Vergleich zu K-562-Zellen in den biologischen Replikaten in der Nilotinib-Resistenz differenziell methyliert.

Um die chromosomale Lokalisation der differenziell methylierten CpGs darzustellen und einen Eindruck über die Hyper- und Hypomethylierung zu generieren, wurden Circos-Plots erstellt (Abb. 42).

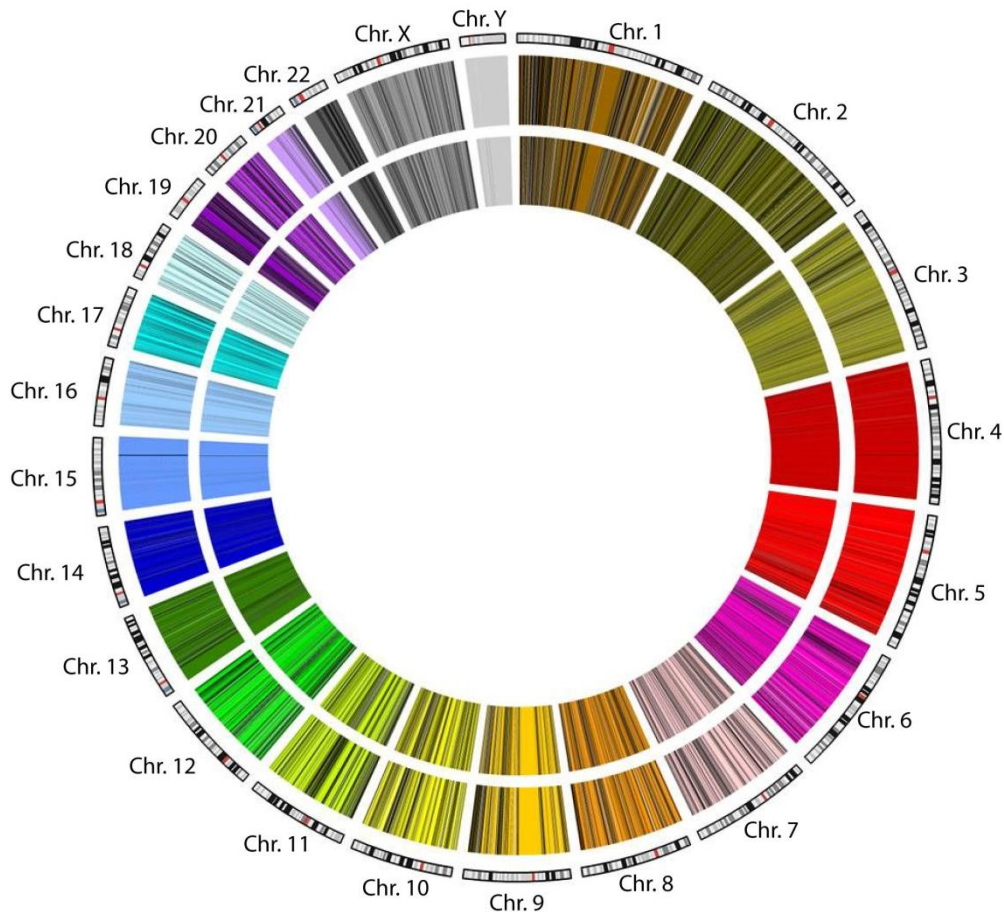


Abbildung 42: Circos-Plot der differenziell methylierten CpGs in der Imatinib- (K-562²; Mitte) & Nilotinib-Resistenz (K-562^N; innen). Schwarze Linien indizieren hypermethylierte, weiße Linien hypomethylierte CpG (Differenz in $\beta \geq \pm 0,2$, korrigierter p-Wert $p < 0,05$) aus dem Vergleich der 2 μM Imatinib- bzw. 100 nM Nilotinib-resistenten Zellen mit unbehandelten Zellen. Im äußeren Ring dargestellt sind die Chromosomen mit ihren Banden entsprechend der Annotation des UCSC Genome Browsers. K-562²: 2 μM Imatinib-resistente Zellen; K-562^N: 100 nM Nilotinib-resistente Zellen.

Es zeigte sich, dass die Methylierung über eine Vielzahl von Chromosomen verändert ist, aber distinkte Chromosomen (vor allem 4, 14 und 15) kaum Veränderungen zeigten. Des Weiteren war zu erkennen, dass sich die Methylierungsmuster der Imatinib- und Nilotinib-Resistenz zwar ähneln, aber nicht komplett übereinstimmen.

4.5.1 Epigenetische Effekte in der Imatinib-Resistenz

Zunächst wurden die Veränderungen der Methylierung in der Imatinib-Resistenz näher untersucht. Dazu wurden zunächst die 33.643 differenziell methylierten CpGs aus den biologischen Replikaten der Imatinib-Resistenz mit den differenziell exprimierten Genen aus den genomweite Expressionsanalysen verglichen. Dies diente der Identifizierung der Gene, die nicht nur eine differenzielle Expression zeigten, sondern auch Veränderungen der Methylierung, was auf eine potentielle Regulation der Transkription durch Methylierung hindeutet.

Im Vergleich zu K-562 waren in der 2 μ M Imatinib-Resistenz 317 Gene differenziell exprimiert (Abb. 43). Von diesen konnten zu 177 Genen 1405 CpGs zugeordnet werden, die eine differenzielle Methylierung in den K-562² aufwiesen und deren Veränderung der Methylierung in den biologischen Replikaten der Resistenzzüchtung in die gleiche Richtung verlief. 513 CpGs (36,5 %) waren in den K-562² hypermethyliert, während 892 (63,5 %) der CpGs eine Hypomethylierung zeigten.

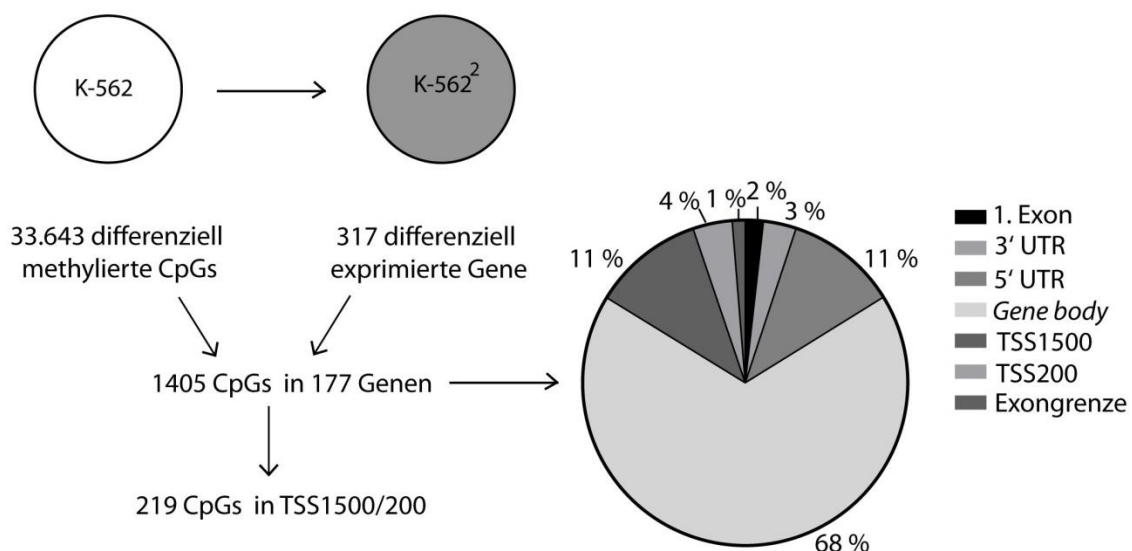


Abbildung 43: Schematische Darstellung des Ablaufs der Analyse der Methylierung sowie Verteilung der in den K-562² differenziell methylierten CpGs, die differenziell exprimierten Genen zugeordnet werden konnten. K-562: unbehandelte, Imatinib-sensitiven Zellen; K-562²: 2 μ M Imatinib-resistente Zellen; TSS1500: bis -1500 bp vor Transkriptionsstart; TSS200: bis 200 bp vor Transkriptionsstart; UTR: *untranslated region*.

Für die 1405 in der Imatinib-Resistenz differenziell methylierten CpGs wurde als nächstes die genomische Lokalisation näher betrachtet. Dabei zeigte sich, dass der Großteil der CpGs mit 68 % in *Gene bodies*, d.h. inmitten eines Gens, lagen. Insgesamt 11 % der CpGs waren in

5' UTRs, 3 % in 3' UTRs sowie 2 % innerhalb der ersten Exone lokalisiert. Daneben konnte 1 % der CpGs an Exongrenzen detektiert werden. Für die weiteren Analysen besonders interessant waren die CpGs, die direkt vor dem Transkriptionsstart eines Gens lokalisiert waren und damit einen direkten Einfluss auf die Bindung von Transkriptionsfaktoren nehmen können. In der Imatinib-Resistenz konnten insgesamt 219 CpGs in der promotornahen Region -1500 bp (TSS1500, 11 %) bzw. -200 bp (TSS200, 4 %) vor dem Transkriptionsstart von 104 Genen mit differenzieller Methylierung identifiziert werden.

Tabelle 18: Liste der in den K-562² differenziell exprimierten Gene, für die differenziell methylierte CpGs in der Promotorregion assoziiert werden konnten. Aufgeführt sind die Gene mit mindestens drei differenziell methylierten CpGs in der TSS200/1500 sowie die Richtung der Änderung der Methylierung in den K-562². K-562²: 2 µM Imatinib-resistente Zellen; TSS: *transcription start side*.

Gen/mRNA	Gename	Anzahl der differenziell methylierten CpGs	Richtung der Änderung der Methylierung in den K-562 ²
AIM	<i>absent in melanoma 1</i>	4	<i>hypermethyliert</i>
BCL2	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>	7	<i>hypomethyliert</i>
CD2AP	<i>CD2-associated protein</i>	4	<i>hypermethyliert</i>
DHRS3	<i>dehydrogenase/reductase (SDR family) member 13</i>	8	<i>hypermethyliert</i>
DNASE2	<i>desoxyribonuclease II, lysosomal</i>	7	<i>hypermethyliert</i>
EPB41L3	<i>erythrocyte membrane protein band 4.1-like 3</i>	3	<i>hypomethyliert</i>
FAM83A	<i>family with sequence similarity 83, member A</i>	4	<i>hypermethyliert</i>
FGF2	<i>fibroblast growth factor 2</i>	3	<i>hypermethyliert</i>
FLNA	<i>filamin A, alpha</i>	4	<i>hypermethyliert</i>
ICAM1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>	9	<i>hypermethyliert</i>
IFI30	<i>interferon, gamma-inducible protein 30</i>	4	<i>hypermethyliert</i>
KIT	<i>v-kit Hardy-Zuckerman 4 sarcoma viral oncogene</i>	9	<i>hypomethyliert</i>
MS4A4A	<i>membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 4</i>	3	<i>hypermethyliert</i>
MYBL2	<i>v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog-like 2</i>	3	<i>hypermethyliert</i>
NCK2	<i>NCK adaptor protein 2</i>	3	<i>hypermethyliert</i>
NMU	<i>neuromedin U</i>	5	<i>hypermethyliert</i>
NR2F2	<i>nuclear receptor subfamily 2, group F, member 2</i>	3	<i>hypermethyliert</i>
PDE4DIP	<i>phosphodiesterase 4D interacting protein</i>	4	<i>hypermethyliert</i>
PDGFA	<i>platelet-derived growth factor</i>	8	<i>hypermethyliert</i>

	<i>alpha polypeptide</i>		
PDS5B	<i>PDS5, regulator of cohesion maintenance, homolog B</i>	3	<i>hypermethyliert</i>
PTPRB	<i>protein tyrosine phosphatase, receptor type B</i>	5	<i>hypomethyliert</i>
SH3KBP1	<i>SH3-domain kinase binding protein 1</i>	8	<i>hypermethyliert</i>
SLC24A3	<i>solute carrier family 24 (sodium/potassium/calcium exchanger), member 3</i>	3	<i>hypermethyliert</i>
SLC38A1	<i>solute carrier family 38, member 1</i>	3	<i>hypermethyliert</i>
SLC4A7	<i>solute carrier family 4, member 7</i>	3	<i>hypomethyliert</i>
SOCS1	<i>suppressor of cytokine signaling 1</i>	3	<i>hypermethyliert</i>
SPARC	<i>secreted protein, acidic, cysteine-rich</i>	4	<i>hypomethyliert</i>
TRIB3	<i>tribbles pseudokinase 3</i>	3	<i>hypermethyliert</i>

Insgesamt konnten für 55,8 % (117) der im *Screening* als differenziell exprimiert identifizierten Gene differenziell methylierte CpGs zugeordnet werden, von denen 28 eine differenzielle Methylierung von mehr als 3 CpGs in der promotornahen Region -1500 bp bzw. -200 bp vor dem Transkriptionsstart besaßen. Dabei zeigte sich eine Hypermethylierung des *ICAM1* (9 CpGs), *DHRS3* (8 CpGs), *PDGFA* (8 CpGs), *SH3KBP1* (8 CpGs) sowie eine Hypomethylierung von *KIT* (9 CpGs) und *BCL2* (7 CpGs). Für *NMU* und *PTPRB*, deren differenzielle Expression in der Imatinib-Resistenz bestätigt werden konnte, wurde ebenfalls eine differenzielle Methylierung von jeweils 5 CpGs festgestellt (Tab. 18).

4.5.2 Epigenetische Veränderungen in der Nilotinib-Resistenz

Neben der 2 µM Imatinib-resistenten wurden die 100 nM Nilotinib-resistenten Zellen hinsichtlich einer differenziellen Methylierung im Vergleich zu unbehandelten Zellen untersucht. Dabei konnten 29.317 CpGs in beiden biologischen Replikaten der K-562^N identifiziert werden, wobei die Unterschiede zwischen den beiden Replikaten hier deutlich waren (Tab. 17). Dennoch wurden im nächsten Schritt die 29.317 differenziell methylierten CpGs mit den 452 differenziell exprimierten Genen der Nilotinib-Resistenz assoziiert (Abb. 44).

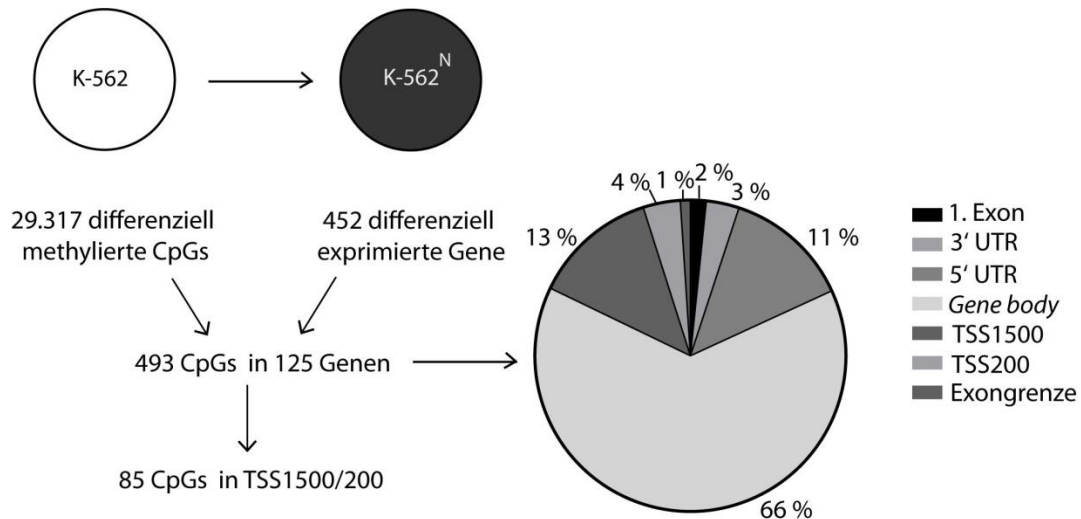


Abbildung 44: Schematische Darstellung der Analyse der Methylierung sowie Verteilung der assoziierten CpGs in der Nilotinib-Resistenz (K-562^N). K-562: unbehandelte, Imatinib-sensitive Zellen; K-562^N: 100 nM Nilotinib-resistente Zellen; TSS1500: bis -1500 bp vor Transkriptionsstart; TSS200: bis -200 bp vor Transkriptionsstart; UTR: *untranslated region*.

Nach Filterung der CpGs, deren Veränderung der Methylierung in den biologischen Replikaten der Resistenzzüchtung die gleiche Richtung verlief, konnten von diesen 452 differenziell exprimierten Genen 125 Gene zu 493 differenziell methylierten CpGs zugeordnet werden. Von diesen 493 waren 99 hypomethyliert und 394 in der Nilotinib-Resistenz hypermethyliert. Diese 493 assoziierten, differenziell methylierten CpGs konnten wiederum anhand ihrer genetischen Lokalisation eingeteilt werden (Abb. 44). 66 % der CpGs waren in *Gene bodies* lokalisiert, wohingegen 2 % der CpGs an Exongrenzen sowie 2 % innerhalb des 1. Exons zu finden waren. 3 % der CpGs lagen in 3' oder 5' UTRs (11 %), sowie 13 % in der TSS150 und 4 % in der TSS200 vor dem Transkriptionsstart. Für die weitere Analyse wurde der Fokus auf die 85 CpGs gelegt, die in der promotornahen Region von 46 Genen zu finden waren.

Tabelle 19: Liste der in der Nilotinib-Resistenz differenziell exprimierten Gene, für die differenziell methylierte CpGs in der Promotorregion assoziiert werden konnten. Aufgelistet sind die Gene mit mindestens drei CpGs in der TSS200/1500. K-562^N: 100 nM Nilotinib-resistente Zellen; TSS: *transcription start side*.

Gen/mRNA	Genname	Anzahl der differenziell methylierten CpGs	Richtung der Änderung der Methylierung in den K-562 ^N
CA5B	<i>carbonic anhydrase VB, mitochondrial</i>	5	<i>hypomethyliert</i>
MCM5	<i>minichromosome maintenance complex component 5</i>	4	<i>hypomethyliert</i>
NMU	<i>neuromedin U</i>	5	<i>hypomethyliert</i>
PTPRB	<i>protein tyrosine phosphatase, receptor type B</i>	4	<i>hypermethyliert</i>
RPRD1B	<i>regulation of nuclear pre-mRNA domain containing 1B</i>	3	<i>hypomethyliert</i>
SPARC	<i>secreted protein, acidic, cysteine-rich</i>	3	<i>hypomethyliert</i>
TAS2R60	<i>taste receptor, type 2, member 60</i>	6	<i>hypermethyliert</i>
ZNF227	<i>zinc finger protein 227</i>	8	<i>hypermethyliert</i>

Bei der Analyse der zu den Genen zugeordneten CpGs zeigte sich eine veränderte Methylierung von acht Genen, darunter eine Hypermethylierung von *ZNF227* mit acht CpGs, *TAS2R60* mit sechs CpGs und *PTPRB* mit vier CpGs. Außerdem konnte eine Hypomethylierung von *CA5B* (5 CpGs), *MCM5* (4 CpGs), *NMU* (5 CpGs), *RPRD1B* (3 CpGs) und *SPARC* (3 CpGs) beobachtet werden. Von diesen Genen konnte die differenzielle Expression in der Nilotinib-Resistenz von *NMU* und *PTPRB* bereits validiert werden.

5 Diskussion

Trotz großer klinischer Erfolge in der Behandlung der CML bleiben Krankheitsrezidive und Therapieresistenzen ein Problem. Ursächlich sind neben den Aberrationen in der BCR/ABL-Kinase zusätzlich auftretende Resistenzmechanismen, die unabhängig von der BCR/ABL-Kinase entstehen [50]. Ziel dieser vorliegenden Arbeit war es, umfassende Einblicke in BCR/ABL-unabhängige Resistenzmechanismen der CML zu erlangen. Dazu wurde ein *in vitro*-Resistenzmodell der CML-Zelllinie K-562 etabliert und dieses umfassend auf zell- und molekularbiologischer Ebene untersucht.

5.1 Kritische Betrachtung der *in vitro*-Analyse der TKI-Resistenz

Das hier analysierte *in vitro*-Resistenzmodell wurde generiert, um rekurrent auftretende Resistenzmechanismen in der BCR/ABL-unabhängigen TKI-Resistenz zu identifizieren. Die angestrebte Imatinib-Plasmakonzentration in Patienten entspricht 1 µg/ml (1,7 µM), wobei die tatsächlich im Blut gemessenen Plasmakonzentrationen einer hohen Schwankung unterliegen (0,2-2 µg/ml; 0,34-3,4 µM) [48, 142, 143]. Bestimmte Kompartimente, wie das Knochenmark, könnten zusätzlich für Imatinib schwer erreichbar sein, so dass die lokale Imatinib-Bioverfügbarkeit deutlich geringer sein könnte [144]. Interindividuelle Unterschiede in der TKI-Plasmakonzentration können durch variable Biotransformation durch CYP3A4, z.B. bei Komedikation mit CYP3A4-Inhibitoren oder -Induktoren, wie auch durch Begleiterkrankungen, z.B. Leber-, Nieren- oder Gastrointestinalerkrankungen, bedingt sein [48, 145-147]. Daher wurden mit 0,5 und 2 µM Imatinib zwei verschiedene Konzentrationen für dieses Modell gewählt, die typischen therapeutischen Konzentrationsintervallen entsprechen sollen.

Bei der Wahl der Nilotinib-Konzentration von 100 nM wurde berücksichtigt, dass dieser TKI eine 20-fach höhere inhibitorische Potenz als Imatinib aufweist [25].

Die hier durchgeführten *in vitro*-Studien der genomweiten Expressionsanalyse erfolgten nicht nur in technischen, sondern auch in biologischen Replikaten, indem die Resistenzzüchtung von Imatinib- und Nilotinib-resistenten Zellen zweimal voneinander unabhängig stattfand. Dieses unterscheidet die hier durchgeführte Analyse von ähnlichen *Screening*-Ansätzen, bei denen ausschließlich technische Replikate verschiedener TKI-

Konzentrationen verwendet wurden [148-150]. Durch den Vergleich von biologischen Replikaten können zum einen die Resistenzmechanismen identifiziert werden, die rekurrent in den biologischen Replikaten auftreten und damit die generellen Mechanismen der Imatinib- bzw. Nilotinib-Resistenz näher untersucht werden. Zum anderen können durch die Analyse der einzelnen Replikate potentielle Unterschiede und Variationen in den Resistenzmechanismen, z.B. in der Genexpression oder in genetischen Aberrationen, betrachtet werden. Daraus lassen sich zudem Veränderungen in der genetischen Heterogenität, klonaler Evolution und Selektion erkennen und Resistenzmechanismen ableiten, die in technischen Replikaten in dieser Form nicht zu identifizieren sind. Die Anzahl der biologischen Replikate war in der genomweiten Expressions- und Methylierungsanalyse sowie in der Exom-Sequenzierung auf zwei begrenzt. Eine weitere Erhöhung der Anzahl an biologischen Replikaten der Resistenzzüchtung wäre sinnvoll, um weitere spezifische Resistenzmechanismen aufzudecken bzw. die hier gewonnen Erkenntnisse zu bestätigen.

Das hier etablierte *in vitro*-Resistenzmodell wurde aus der CML-Zelllinie K-562 generiert. Eine direkte Translation der *in vitro*-Experimente auf die klinische Situation *in vivo* hinsichtlich Zell-Zell-Interaktion, genetischer Heterogenität oder Wirkstoffverteilung ist jedoch nicht möglich und bleibt daher offen [151]. Zwar gibt es bereits klinische Studien zur TKI-Resistenz bei hämatologischen Erkrankungen [152-155], jedoch sind CML-Primärzellen zur Untersuchung dynamischer, konzentrationsabhängiger Veränderungen der TKI-Resistenz technisch nicht geeignet [151]. Mittels des hier verwendeten *in vitro*-TKI-Resistenzmodells bot sich dagegen die Möglichkeit unter standardisierten Bedingungen die Veränderungen der TKI-Resistenz umfassend zu charakterisieren.

5.2 Beitrag der miR-212/ABCG2-Achse in der Imatinib-Resistenz

5.2.1 Inhibition der miR-212 führt zu reduzierter Imatinib-Sensitivität

In der vorliegenden Arbeit wurde der Beitrag der miR-212/ABCG2-Achse in der Entwicklung der Resistenz gegenüber Imatinib *in vitro* untersucht. Es zeigte sich, dass die Abnahme der miR-212-Expression zu einer verminderten Imatinib-Sensitivität führte, die in direktem Zusammenhang mit dem Efflux-Transporter ABCG2 stand. Die Inhibition der miR-212-Expression resultierte in einer Zunahme der ABCG2-Expression auf der Zelloberfläche, wodurch letztendlich der ABCG2-vermittelte Imatinib-Efflux gesteigert wurde. Diese

Resultate legten die Vermutung nahe, dass hierdurch die intrazelluläre Imatinib-Konzentration vermindert wird.

Der Anstieg der Zellviabilität und die Abnahme der Apoptose nach Inhibition der miR-212 mittels anti-miR-Transfektion waren jedoch ausschließlich auf Imatinib-sensitive, native CML-Zellen limitiert, wohingegen Imatinib-resistente Zellen keine Veränderungen der Imatinib-Sensitivität aufwiesen. Daher scheint es, dass die miR-212/ABCG2-Achse zu der Entwicklung der akuten Resistenz gegen geringe bis mittlere Konzentrationen an Imatinib beiträgt (Abb. 45), wie es bereits für andere Arzneistoffe und Efflux-Transporter, z.B. Mitoxantron und miR-519c/ABCG2 in Kolonkarzinomzellen oder Rifampicin und miR-379/ABCC2 in hepatozellulären Karzinomzellen, gezeigt werden konnte [102, 156].

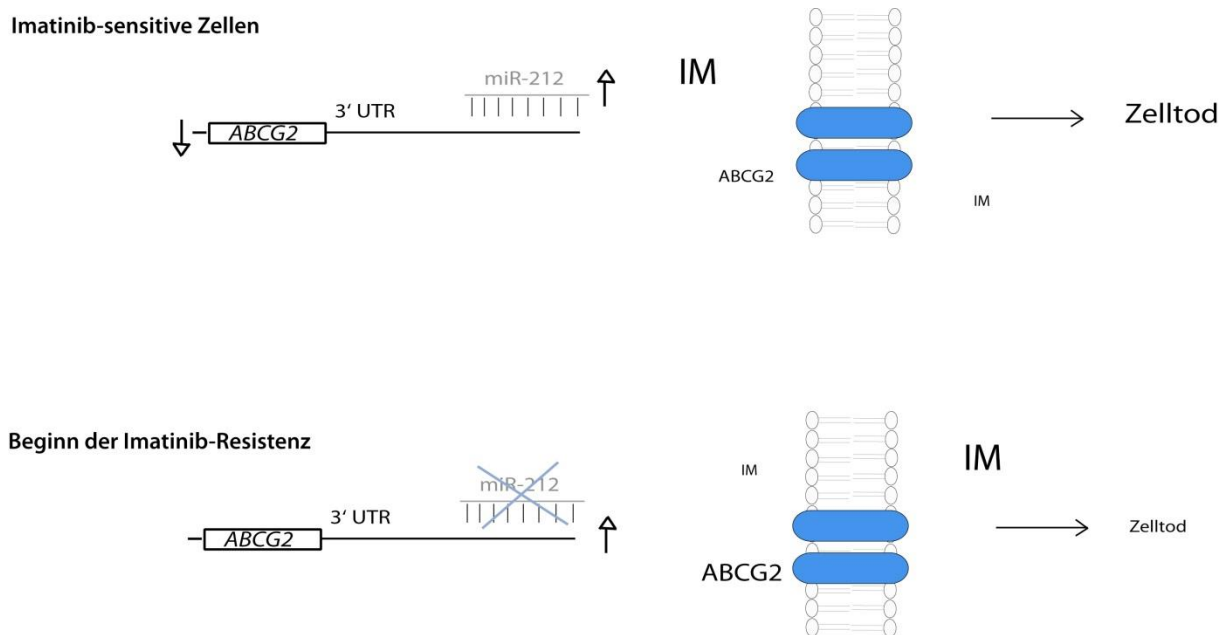


Abbildung 45: Modell der miR-212/ABCG2-Achse in der Entwicklung der Imatinib-Resistenz.

Imatinib-sensitive Zellen weisen eine hohe miR-212-Expression auf, während *ABCG2* nur schwach exprimiert ist (durch die Pfeile angedeutet). Hier findet nur ein geringer Imatinib-Efflux aus den CML-Zellen statt, die Zelltodrate steigt (dargestellt durch die Schriftgrößen). Mit Beginn der Imatinib-Resistenzentwicklung vermindert sich die miR-212-Expression, wodurch ein Anstieg der *ABCG2*-Expression resultiert (siehe Pfeile). Als Folge kommt es zu einem Anstieg des *ABCG2*-vermittelten Imatinib-Effluxes und zu vermindertem Zelltod. IM: Imatinib; UTR: *untranslated region*.

Da die Inhibition der miR-212 in einer Abnahme der Imatinib-Sensitivität resultierte, war zu erwarten, dass die Zunahme des intrazellulären miR-212-Niveaus in Imatinib-sensitiven Zellen zu einer Steigerung des Zelltods führt. Tatsächlich wurde nach Transfektion von miR-212-Mimics jedoch keine Änderung der Zellviabilität oder der Apoptoserate beobachtet. Möglicherweise schützen andere Mechanismen die Zellen vor den Effekten einer

Überexpression der miR-212, wie z.B. eine intrazelluläre Degradation [113, 157] oder die Aktivierung von entgegengesetzten Signalwegen [15].

Der Effekt der miR-212 auf die akute Imatinib-Sensitivität konnte in dem hier untersuchten *in vitro*-Modell auf eine Regulation von ABCG2 zurückgeführt werden. Dennoch ist es möglich, dass die Steigerung der Imatinib-Sensitivität durch Inhibition der miR-212 nicht ausschließlich über ABCG2 vermittelt wird. Es ist bekannt, dass microRNAs pleiotrope Effekte über die Regulation einer Vielzahl an Ziel-mRNAs ausüben kann. Die Expression der miR-212 ist in einer Vielzahl verschiedener Tumore dereguliert, z.B. im Nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom oder im hepatozellulären Karzinom. Im Nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom konnte gezeigt werden, dass miR-212 den TRAIL-vermittelten Zelltod durch die Degradation des anti-apoptotischen Proteins PED/PEA-15 (*phosphoprotein enriched in astrocytes 15*) steigert sowie die synaptische Acetylcholinesterase bindet und damit eine Tumorsuppressorfunktion einnimmt [107, 158]. In hämatologischen Neoplasien, insbesondere der chronisch lymphatischen Leukämie, führt die Expressionssteigerung der miR-212 nach Stimulation des B-Zell-Rezeptors zu einer pathologischen Entwicklung und Proliferation der B-Zellen. Zu den Ziel-mRNAs in diesem Kontext gehören die Stammzellfaktoren SOX4 und MYC [159-161]. Interessanterweise trägt SOX4 wiederum zur Progression der BCR/ABL-positiven akuten lymphoblastischen Leukämie bei [162]. Dementsprechend können weiterführende Analysen von alternativen Signalwegen sowie der miR-212-Ziel-mRNAs zu einem besseren Verständnis der beobachteten Reduktion der miR-212-Expression bei der Entstehung der Imatinib-Resistenz beitragen.

Zusätzlich zu miR-212 wurden Transfektionsexperimente mit miR-328 durchgeführt, da für diese microRNA ebenfalls ein zu ABCG2 inverser Expressionsverlauf in der Imatinib-Resistenz beschrieben werden konnte [76]. In Mitoxantron-resistenten Mammakarzinomzellen wurde eine inhibitorische Regulation der ABCG2-Expression durch die miR-328 gezeigt [109]. Dabei blieb der Nachweis der direkten Bindung der ABCG2 3'UTR durch miR-328 strittig, da der durch Pan *et al.* geführte Beleg der direkten miR-328-Regulation von ABCG2 durch Turrini *et al.* nicht bestätigt werden konnte [76, 109]. Hinsichtlich des Einflusses der miR-328 in der Imatinib-Resistenz wurde in CML-Blasten eine MAPK-hnRNP E2 (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein E2*)-vermittelte Inhibition der miR-328-Expression beobachtet [113], die im Einklang mit einer reduzierten miR-328-Expression während der Imatinib-

Resistenzentwicklung stand. In den hier durchgeführten Experimenten konnte jedoch keine Veränderung der Imatinib-Sensitivität nach Inhibition oder Überexpression der miR-328 beobachtet werden. Möglicherweise spiegelt diese Expressionsveränderung im Verlauf der Imatinib-Resistenz nur einen Effekt der Imatinib-Behandlung wider und ist kein Resultat der sich entwickelnden Resistenz.

5.2.2 Beitrag der miR-212/ABCG2-Achse in der Progression der Imatinib-Resistenz

In den Analysen zur ABCG2-Expression im Verlauf der Imatinib-Resistenz konnte eine Überexpression von ABCG2 in Zellen mit einer Resistenz gegenüber geringen Imatinib-Konzentration (0,5 μM) festgestellt werden. Dies entspricht Beobachtungen in Arzneistoff-resistenten soliden Tumoren (z.B. Mitoxantron-resistente Mammakarzinomzellen oder Hydroxycamptothecin-resistente Kolonkarzinomzellen), in denen ebenfalls eine hohe ABCG2-Expression beschrieben wurde [163, 164]. Bei einer höheren Imatinib-Wirkstoffkonzentration (2 μM) war die Expression von ABCG2 jedoch nur sehr gering, weshalb die Resistenzmechanismen im Verlauf der Imatinib-Resistenz ABCG2-unabhängig zu sein scheinen. Möglicherweise findet bei höheren Imatinib-Konzentrationen eine Kompensation des Imatinib-Efflux durch andere ABC-Transporter, vor allem ABCB1/P-gp, statt [70, 165, 166] oder alternative Signalwege tragen zur Entwicklung der Resistenz bei [15]. In dem hier untersuchten Modell der Imatinib-Resistenz konnte lediglich eine geringe ABCB1-Expression nachgewiesen werden, weshalb ABCB1 in dem hier analysierten Imatinib-Konzentrationsbereich keinen Einfluss zu haben scheint [141]. Eine Überexpression von ABCB1 wurde allerdings für höhere Imatinib-Konzentrationen (>2 μM) in verschiedenen Zelllinien und in CML-Patienten beschrieben und könnte damit zusätzlich zur Erklärung der Resistenz gegenüber höheren Imatinib-Konzentrationen beitragen [71, 167]. Der Einfluss von alternativen Signalwegen wurde in dieser Arbeit auf Ebene der transkriptionellen Veränderungen analysiert und wird nachfolgend unter 5.4 diskutiert.

Interessanterweise konnte die Transfektion von miR-212 die Imatinib-Sensitivität Imatinib-resistenter Zellen nicht beeinflussen, die ABCG2-Regulation durch miR-212 in Imatinib-resistenten Zellen scheint aufgehoben zu sein. Möglicherweise entgeht ABCG2 während der

Imatinib-Resistenzentwicklung der miR-212-vermittelten Regulation durch Expression verkürzter 3' UTRs und die ABCG2-Expression bleibt folglich aufrechterhalten. Hinweise hierfür fanden sich in einer Studie in Kolonkarzinomzellen, in der gezeigt werden konnte, dass in Mitoxantron-resistenten Zellen die Expression von alternativen, kürzeren ABCG2 3' UTRs gesteigert war und die Regulation durch miR-519c ausblieb. Als Erklärung hierfür wurde das Fehlen der entsprechenden microRNA-Bindestelle in den verkürzten 3' UTRs herangezogen [102]. Umgekehrt konnte in Experimenten mit K-562-Zellen eine Expression von längeren ABCB1 3' UTR-Varianten in Imatinib-sensitiven Zellen beobachtet werden, während Imatinib-resistente Zellen gleichfalls kürzere 3' UTRs aufwiesen [168].

Insgesamt konnte in diesen Analysen gezeigt werden, dass die miR-212/ABCG2-Achse einen Beitrag zur Entstehung der Imatinib-Resistenz liefert, aber im Verlauf der Resistenz entkoppelt wird. Diese Entkopplung deutet auf dynamische Veränderungen der Resistenzmechanismen hin, wie bereits z.B. für ABC-Transporter gezeigt werden konnte [77], und impliziert eine potentielle Rolle anderer Mechanismen, die im weiteren Teil dieser Arbeit analysiert wurden.

5.3 Einfluss der RNA-bindenden Proteine ZFP36L1 & ZFP36L2 in der Imatinib-Resistenz

In dem hier etablierten *in vitro*-Modell der Imatinib-Resistenz (K-562, K-562^{0,5}, K-562²) konnte beobachtet werden, dass nach initialer Gabe von Imatinib der Großteil der CML-Zellen abstirbt, ein geringer Teil der Zellen überlebt, sich aber zunächst nicht teilt. Erst nach etwa 10-14 d, abhängig von der Imatinib-Konzentration, war die zelluläre Proliferation wiederhergestellt und die Zellen konnten als resistent gegenüber der gegebenen Imatinib-Konzentration (0,1-2 µM) betrachtet werden. Ein zelluläres Ruhestadium ohne Proliferation wird als *Dormancy* bzw. zelluläre *Quiescence* bezeichnet [169] und spielt unter anderem in der Hämatopoese eine Rolle.

In einer Studie an B-Zellen konnten Galloway *et al.* zeigen, dass die RNA-bindenden Proteine ZFP36L1 und ZFP36L2 notwendig für das Erreichen der *Quiescence* am B-Zell-Checkpoint und während der VDJ-Rekombination sind [129]. Ein ähnliches Prinzip konnte auch bei der physiologischen T-Zell-Entwicklung gezeigt werden, da im murinen *ZFP36L1/ZFP36L2*-Doppel-*Knockout* eine gestörte Thymusentwicklung einhergehend mit einer akuten

lymphoblastischen T-Zell-Leukämie (T-ALL) beobachtet werden konnte [170]. In der akuten myeloischen Leukämie konnte eine *frameshift-mutation* in ZFP36L2 identifiziert werden, die zu dessen Funktionsverlust führt und zur Pathogenese beiträgt [171]. Aus diesem Grund sind ZFP36L1 und ZFP36L2 von potentiell Interesse in hämatopoetischen Zellen und assoziierten Neoplasien.

In dieser Arbeit stellte sich die Frage, welche Rolle ZFP36L1 und ZFP36L2 in dem hier untersuchten CML-Modell der Imatinib-Resistenz haben. Dabei war von Interesse zu analysieren, welchen Einfluss das Fehlen von ZFP36L1 und ZFP36L2 hinsichtlich des beobachteten Ruhestadiums bei der Entwicklung der CML-Resistenz hat. Dazu wurde eine Deletion der Zinkfingerdomänen von ZFP36L1 und ZFP36L2 in K-562-Zellen mittels CRISPR/Cas9-Genomeditierung durchgeführt und das Ansprechen der *Knockout*-Zellen auf Imatinib im Vergleich zu Kontrollzellen während der Lang- und Kurzzeitbehandlung untersucht.

5.3.1 Deletion der Zinkfingerdomänen in ZFP36L1 und ZFP36L2 mittels CRISPR/Cas9-Genomeditierung

In CRISPR/Cas9-Experimenten in der K-562-Zelllinie konnte eine Effizienz von bis zu ca. 46 % inserierten Doppelstrangbrüchen beobachtet werden [172, 173]. Bei der hier durchgeführten CRISPR/Cas9-Genomeditierung fiel auf, dass die Effizienz der Methode im Einzel-*Knockout* von ZFP36L1 bzw. ZFP36L2 nur bei ca. 10-20 % positiver Klone lag. Bei der zusätzlichen Deletion in ZFP36L1 für den ZFP36L1/ZFP36L2-Doppel-*Knockout* der Zinkfingerdomänen beider Proteine hingegen war nur 1 % der GFP-positiven Klone tatsächlich positiv für den ZFP36L1/ZFP36L2-Doppel-*Knockout*. Dieses ließ vermuten, dass entweder die Effizienz der Methode *per se* besonders gering war oder die Zellen im Doppel-*Knockout* vermehrt dem Zelltod unterlagen. Da die Effizienz der CRISPR/Cas9-Genomeditierung in den hier durchgeführten Einzel-*Knockout* deutlich höher als im Doppel-*Knockout* war, ist davon auszugehen, dass die geringe Effizienz im ZFP36L1/ZFP36L2-Doppel-*Knockout* tatsächlich Rückschlüsse auf die zelluläre Bedeutung beider Proteine in den Zellen zulässt und die ZFP36L1/ZFP36L2-defizienten Zellen eine geringere Überlebensrate besaßen.

Der Nachweis der Deletion in den Zinkfingerdomänen erfolgte auf DNA- und mRNA-Ebene, da der zur Verfügung stehende Antikörper gegen ZFP36L1 und ZFP36L2 an den N-Terminus

der beiden Proteine bindet und damit im Western Blot auch das nicht-funktionelle, Zinkfingerdomänen-deletierte Protein erkannt wird. Da der polyklonale Antikörper auch an phosphorylierte Isoformen der ZFP36L1- und ZFP36L2-Proteine bindet, entstehen multiple Banden, so dass die Größenreduktion der Proteine im *Knockout* nicht nachgewiesen werden kann. Auf DNA und mRNA-Ebene zeigte sich deutlich die homozygote Deletion der Zinkfingerdomänen in beiden Genen.

Bei der Kultivierung der genomeditierten Zelllinien konnte eine vergleichsweise langsame Proliferation der beiden Einzel-*Knockouts*, aber auch des Doppel-*Knockouts*, im Vergleich zu Kontrollzellen festgestellt werden. Dieses könnte vor allem für den Doppel-*Knockout* der Grund der geringen Effizienz der Methode sein. Zusätzlich dazu unterschieden sich die Zellen in ihrer Morphologie durch eine Semiadhärenz, d.h. die Zellen waren vermehrt am Boden der Zellkulturflasche zu finden. Die Interaktion musste aber nicht durch Verdau der Extrazellulären Matrix aufgehoben werden. Des Weiteren fielen Größenunterschiede auf, da die Doppel-*Knockout*-Zellen in ihrer Morphologie vergrößert und blastenähnlich waren [174]. Dabei ist nicht geklärt, durch welche Mechanismen diese Veränderungen in der Morphologie zustande kommen. Denkbar wäre, dass ein *ZFP36L1* bzw. *ZFP36L2*-Defizit zu einer gesteigerten Translation von Adhäsionsproteinen in der Zelle führt. Dazu könnte z.B. VEGF gehören, eine putative Ziel-mRNA beider Zinkfingerproteine, für die gezeigt werden konnte, dass dessen Expression, einhergehend mit einem Fehlen von *ZFP36*, in einer Änderung der zellulären Morphologie in verschiedenen soliden Tumoren resultiert [125]. Die Veränderung der Morphologie könnte auch mit einer Dedifferenzierung der CML-Zellen zusammenhängen, da für *ZFP36L1* eine negative Regulation der erythroiden Differenzierung von CD34⁺-Zellen gezeigt werden konnte [128]. Um dieses zu untersuchen, sollte in weiteren Experimenten die Expression potentieller Ziel-mRNAs analysiert sowie die putativen Signalwege charakterisiert werden.

5.3.2 Einfluss des *ZFP36L1* & *ZFP36L2*-*Knockout* während der Kurzzeit-Imatinib-Behandlung

Unter kurzzeitiger Imatinib-Behandlung von 48 h zeigte sich, dass die *ZFP36L1/ZFP36L2*-Doppel-*Knockout*-Zellen im Vergleich zu den unbehandelten und Einzel-*Knockout*-Zellen eine erhöhte Zellviabilität sowie eine reduzierte Apoptoserate aufwiesen (Abb. 46).

Kurzzeit-Imatinib-Behandlung

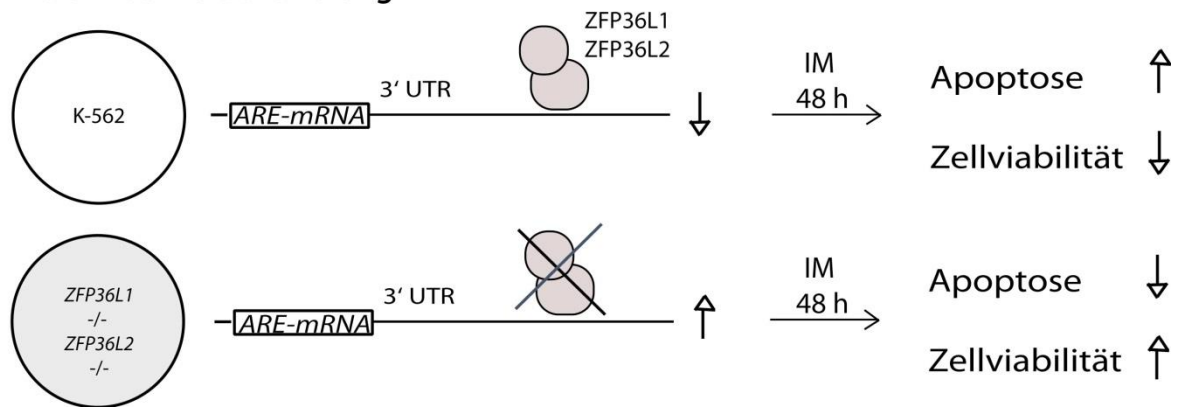


Abbildung 46: Modell des zugrundeliegenden Mechanismus hinter den Effekten des *ZFP36L1/ZFP36L2-Knockout* während der Kurzzeit-Imatinib-Behandlung. In nativen K-562-Zellen können ARE-mRNAs über ZFP36L1 und ZFP36L2 degradiert werden, was in der Kurzzeit-Imatinib-Behandlung von 48 h zu einem drastischen Anstieg der Apoptose und Abnahme der Zellviabilität führt. Im *ZFP36L1/ZFP36L2-Doppel-Knockout* akkumulieren die Ziel-mRNAs, was zu einer Reduktion der Apoptose und einem Anstieg der Zellviabilität führt. ARE: AU-rich element; IM: Imatinib; UTR: untranslated region.

Interessanterweise konnten in diesen Versuchen keine Unterschiede der *ZFP36L1*- oder *ZFP36L2*-Einzel-*Knockout*-Zellen zu den Kontrollzellen festgestellt werden. Möglich ist, dass der Einzel-*Knockout* von einem der beiden Zinkfingerproteine in der Kurzzeit-Imatinib-Behandlung nicht ausreicht, da das jeweils andere Protein die Funktion zumindest partiell übernehmen kann. Für *ZFP36L1* und *ZFP36L2* sind einige redundante Funktionen hinsichtlich gemeinsamer Ziel-mRNAs beschrieben, z.B. TNF und GM-CSF [114]. Daher ist es durchaus möglich, dass im Einzel-*Knockout* keine Effekte beobachtet werden konnten, da das Fehlen des jeweiligen Zinkfingerproteins durch das andere Zinkfingerprotein kompensiert werden kann und damit erst Effekte im Doppel-*Knockout* beider Proteine sichtbar werden [114, 115].

Um nachzuweisen, dass die beobachtete Reduktion der Imatinib-Sensitivität in den *ZFP36L1/ZFP36L2-Doppel-Knockout*-Zellen tatsächlich auf das Fehlen von *ZFP36L1* bzw. *ZFP36L2* zurückgeht, wurde die *ZFP36L1* bzw. *ZFP36L2*-Expression in den *Knockout*-Zellen mittels Transfektion von *ZFP36L1/ZFP36L2*-Expressionsplasmiden wiederhergestellt (*Rescue*). Im Nachweis des *Rescue* der *ZFP36L1* bzw. *ZFP36L2*-Expression war zu erkennen, dass vor allem im *ZFP36L1/ZFP36L2-Doppel-Knockout* die *ZFP36L1/ZFP36L2*-Expression nicht auf das endogene Level angehoben werden konnte. Dieses könnte an einer geringen Transfektionseffizienz der *ZFP36L1/ZFP36L2-Doppel-Knockout*-Zellen liegen, so dass die Expression des transfizierten Wildtyp-*ZFP36L1* und -*ZFP36L2* gering ist. Bei der Analyse der Zellviabilität des *Rescue* des *ZFP36L1/ZFP36L2-Doppel-Knockouts* konnte diese dennoch auf

das Maß der Kontrollzellen reduziert werden. Bei der Analyse der Apoptoserate in den *Rescue*-Zellen konnte ebenfalls ein verminderter Effekt beobachtet werden, jedoch war dieser nicht so deutlich reduziert wie die Zellviabilität.

Neben der geringen Transfektionsrate im *Rescue* der *ZFP36L1/ZFP36L2*-Doppel-*Knockout*-Zellen könnte der partielle *Rescue* mit einer Kompetition des Wildtyp-Proteins mit den verkürzten Proteinen zusammenhängen. *ZFP36L1* und *ZFP36L2* besitzen am N- und C-Terminus jeweils eine Aktivierungsdomäne über die unter anderem die Bindung der *decapping*-Enzyme, wie *hDcp1* oder *hDcp2*, vermittelt wird, wobei der N-terminalen Domäne hinsichtlich der Bindung dieser Enzyme eine größere Bedeutung zukommt [175]. Daneben konnte gezeigt werden, dass beiden Domänen an dem Transport von Ziel-mRNAs zu *P-bodies* beteiligt sind, wobei hier die C-terminale Domäne bedeutender scheint [176]. Da im *ZFP36L1/ZFP36L2*-Doppel-*Knockout* die Expression durch den *Rescue* nicht vollständig wiederhergestellt werden konnte, ist denkbar, dass die verkürzten Proteine die mRNA-*decay*-Enzyme weiterhin binden können, aber die Bindung der Ziel-mRNAs durch das Fehlen der Zinkfingerdomänen nicht möglich ist. Damit könnten im *Rescue* in der Anwesenheit von Wildtyp-Proteinen die *decay*-Enzyme bereits durch das verkürzte Protein blockiert sein, so dass die Effektorfunktion im *Rescue* nicht vollständig wiederhergestellt werden kann. Ein ähnliches Prinzip konnte bereits durch Mutationsstudien mit Zinkfingerdomänen-mutierten *ZFP36*-Proteinen gezeigt werden, bei denen es zu einer Akkumulation von Ziel-mRNAs in den Zellen kam [177, 178].

Da diese Wiederherstellung der *ZFP36L1/ZFP36L2*-Expression zu einer Reduktion des zuvor beobachteten Effekts des Doppel-*Knockouts* führt, ist nicht davon auszugehen, dass eine potentielle Mutation in einem anderen Protein als *off target*-Effekt der CRISPR/Cas9-Genomeditierung ursächlich für die zellulären Veränderungen ist. Folglich war es mit diesen Experimenten gelungen nachzuweisen, dass die Veränderungen der Imatinib-Sensitivität höchstwahrscheinlich direkt im Zusammenhang mit dem Fehlen von *ZFP36L1* und *ZFP36L2* standen.

5.3.3 Effekt des *ZFP36L1* & *ZFP36L2*-*Knockout* während der Langzeit- Imatinib-Behandlung

Während der unter Langzeit-Imatinib-Behandlung entwickelten Imatinib-Resistenz war auffällig, dass die *ZFP36L1/ZFP36L2*-Doppel-*Knockout*-Zellen bei der Behandlung mit 0,1 und 0,3 μM Imatinib eine reduzierte Apoptoserate im Vergleich zu den Kontrollzellen aufwiesen. Hier zeigten auch die Einzel-*Knockout*-Zellen eine signifikante Reduktion in der Apoptoserate verglichen mit Kontrollzellen, jedoch waren diese Effekte nicht so stark ausgeprägt wie für die *ZFP36L1/ZFP36L2*-Doppel-*Knockout*-Zellen. Dieses konnte vor allem für die *ZFP36L2*-*Knockout*-Zellen beobachtet werden, deren Apoptoserate in allen Experimenten zwischen den unbehandelten und *ZFP36L1*-defizienten-Zellen lag. Interessanterweise gehören anti-apoptotische Proteine, wie z.B. Bcl-2 oder c-IAP2, zu den Ziel-mRNAs der *ZFP36*-Familie, was im Falle des Verlusts von *ZFP36*, *ZFP36L1* oder *ZFP36L2* mit gesteigertem Überleben und verminderter Apoptose in Tumorzellen assoziiert werden konnte [126, 179, 180]. Möglicherweise ist die Verminderung der Apoptose direkt mit einem Anstieg der Expression von anti-apoptotischen Proteinen in den *ZFP36L1/ZFP36L2*-*Knockout*-Zellen verbunden.

Des Weiteren konnte eine signifikante Reduktion der Nekrose in allen *Knockout*-Zellen beobachtet werden. Die Hemmung der BCR/ABL-Kinase durch Imatinib führt zu einer Inhibition der proliferativen sowie einer Aktivierung der pro-apoptotischen Signaltransduktion, unter anderem über Hemmung des anti-apoptotischen BCL-X_L und Freisetzung pro-apoptotischen BAX [23]. Daher ist davon auszugehen, dass der Anstieg der Apoptoserate unter Imatinib-Behandlung das primäre Resultat der aktivierten Apoptose durch die Imatinib-Inkubation ist. Die Reduktion der Apoptoserate in den *ZFP36L1/ZFP36L2*-*Knockout*-Zellen scheint daher auf eine Hemmung der pro-apoptotischen Signalwege zurückzuführen sein. Der beobachtete Anstieg der Nekrose entsteht damit wahrscheinlich sekundär durch die verbliebenen Zellbestandteile und nicht direkt durch Imatinib oder den *ZFP36L1*- oder *ZFP36L2*-*Knockout*.

Zusätzlich fiel auf, dass die Einzel-*Knockout*-Zellen unter Imatinib-Behandlung die zuvor beobachtete Semiadhärenz verloren und morphologisch den K-562-Zellen ähnelten. Dieses war auch bei den Doppel-*Knockout*-Zellen der Fall, jedoch war diese Veränderung der Morphologie nicht so stark ausgeprägt, da weiterhin Blasten-ähnliche Zellen zu finden waren. Dennoch legt diese veränderte Morphologie den Schluss nahe, dass Imatinib, aber

auch ZFP36L1 und ZFP36L2 einen Einfluss auf die Morphologie und Adhärenz der Zellen nimmt, was hinsichtlich der Phosphorylierung der Proteine des Zytoskeletts bereits gezeigt werden konnte [181]. Diese gesteigerte Adhärenz und Motilität durch Imatinib konnte des Weiteren im Zusammenhang mit einer Überexpression der *protein tyrosine kinase 2* (Pyk2) in K-562-Zellen [182] sowie über Integrin-vermittelte Regulation in Blasenkarzinomzellen der Ratte [183] beobachtet werden. Möglicherweise stehen diese Veränderungen der Morphologie auch im Zusammenhang mit einer erythroiden Differenzierung, welche ebenfalls als Resultat der Imatinib-Behandlung beschrieben ist [184, 185].

Interessanterweise konnte bei einer Konzentration von 0,3 μM eine verminderte Proliferation in den ZFP36L1- sowie ZFP36L1/ZFP36L2-Doppel-Knockout-Zellen nachgewiesen werden. Dieses entspricht den Beobachtungen während der Kultivierung dieser Zellen, bei denen ein reduziertes Wachstum festgestellt werden konnte. Prinzipiell deuten diese Ergebnisse daraufhin, dass ZFP36L1 für die Effekte entscheidend ist, da die Anwesenheit von ZFP36L2 allein nicht ausreichend ist, um Einfluss auf die Proliferation auszuüben. Die Veränderungen im *Knockout* sind daher wahrscheinlich hauptsächlich auf das Fehlen von ZFP36L1 zurückzuführen. Damit konnte bei der Langzeit-Imatinib-Behandlung sowohl eine Reduktion der Apoptose als auch der Proliferationsrate in ZFP36L1-defizienten Zellen im Vergleich zu den K-562-Kontrollzellen beobachtet werden (Abb. 47).

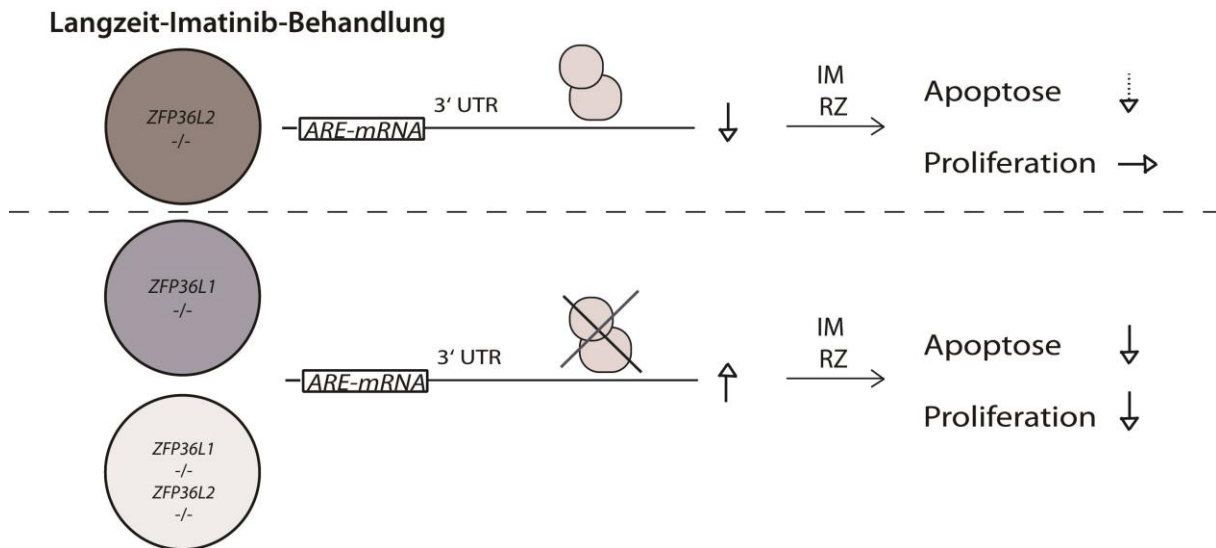


Abbildung 47: Schematische Zusammenfassung der Effekte der ZFP36L1- und ZFP36L2-Knockout während der Imatinib-Resistenzentwicklung. Im *Knockout* von ZFP36L2 können die für die Proliferation und Apoptose zuständigen ARE-mRNAs über ZFP36L1 degradiert werden, was zu einer im Vergleich zu nativen K-562-Zellen nur marginal reduzierter Apoptose- und unveränderter Proliferationsrate führt. Im ZFP36L1-Knockout sowie im ZFP36L1/ZFP36L2-Doppel-Knockout führt das Fehlen von ZFP36L1 zu einer verminderten Apoptose und reduzierter Proliferation. ARE: AU-rich elements; IM: Imatinib; RZ: Resistenzzüchtung; UTR: untranslated region.

Prinzipiell ist für ZFP36L1 eine größere Rolle bei der Modulation der Apoptose beschrieben, als für die Regulation von proliferativen mRNAs [115, 186]. In Analysen der ZFP36L1- und ZFP36L1/ZFP36L2-Knockout-Zellen ohne Anwesenheit von Imatinib konnte eine differenzielle Expression apoptotischer Proteine, z.B. Bax, Caspase-3 und Bcl-2 beobachtet werden, während die Expression proliferativer Proteine, z.B. MYC, AKT oder ERK, unverändert blieb (unpublizierte Daten, Julian Rodin). Daher könnte die verminderte Apoptose, wie bereits beschrieben, mit einer Überexpression von anti-apoptotischen Proteinen durch die fehlende Degradation der Ziel-mRNAs im ZFP36L1-Knockout einhergehen.

Im ZFP36L1- und ZFP36L1/ZFP36L2-Doppel-Knockout konnte eine Reduktion der Proliferation unter Imatinib-Behandlung im Vergleich zu den Kontrollzellen beobachtet werden. In vorherigen Studien in T- und B-Zellen führt das Fehlen von ZFP36L1 zum Nicht-Erreichen der *Dormancy* einhergehend mit einer malignen Akkumulation der Zellen [129, 170]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass ZFP36L1 (und ZFP36L2) einen inhibitorischen Einfluss auf die Zellproliferation haben, welches über den Abbau der Zellzyklusproteine Cyclin-D und p-53 vermittelt wird [187]. Daher war zu vermuten, dass ein Fehlen von ZFP36L1 zu einem Anstieg der Proliferation der CML-Zellen führen würde und die Zellen unter Imatinib-Behandlung das zelluläre Ruhestadium (die *Dormancy*) nicht erreichen

können. In den hier durchgeführten Experimenten konnte jedoch ein negativer Einfluss auf die Proliferation im *ZFP36L1*- sowie im *ZFP36L1/ZFP36L2*-Doppel-Knockout während der Imatinib-Resistenzentwicklung beobachtet werden. Dieses deutet daraufhin, dass *ZFP36L1* für das Erreichen des Ruhestadiums bei der Entwicklung der Imatinib-Resistenz in dieser Form keine Rolle spielt. Die Durchführung weiterer Experimente unter Verwendung von Ki-67-Antikörpern oder von 5(6)-Carboxyfluoresceindiacetat N-Succimidylester (CFSE) als Biomarker für proliferierende Zellen könnten diese Daten weiter bestätigen [188, 189]. Zusätzlich wären Experimente im weiteren Verlauf der Imatinib-Resistenz notwendig, um die Effekte abschließend zu bewerten.

Möglicherweise ist die verminderte Proliferation direkt auf einen Effekt der Präsenz von Imatinib zurückzuführen. Im pathophysiologischen Signalweg in der CML führt die konstitutive Aktivierung der BCR/ABL-Kinase zu einer Hemmung der Apoptose und Steigerung der proliferativen Signaltransduktion [14]. Durch die Inhibition der Kinase durch Imatinib kommt es zu einer Hemmung der Proliferation und indirekt zu einer gesteigerten Apoptose durch einen Überschuss an pro-apoptotischen Signalen [190]. Es ist denkbar, dass das Fehlen von *ZFP36L1* zu einer Hemmung der Apoptose führt, da die pro-apoptotischen Signale durch die ausbleibende Degradation von anti-apoptotischen *ZFP36L1*-Ziel-mRNAs kompensiert werden. Möglicherweise kommt es damit zu einem *feedback*-Mechanismus, der zu einer Hemmung der Proliferation unter Imatinib-Behandlung führt. Damit könnte die Entstehung von Imatinib-resistenten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen verzögert sein.

Generell deuten diese Versuche bezüglich des Einflusses von *ZFP36L1* und *ZFP36L2* in der CML darauf hin, dass durch das Fehlen, vor allem von *ZFP36L1*, das Gleichgewicht aus Proliferation und Apoptose gestört wird und die Zellen vermindert apoptotischen Zelltod einleiten, aber auch in ihrer Proliferation gehemmt sind. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass inaktivierende Mutationen in *ZFP36L1* und *ZFP36L2* in der Progression verschiedener Tumore klonal selektioniert werden und damit potentiell *driver-mutations* (also Mutationen in Krebsgenen, die direkt zur Entartung der Zellen führen) darstellen [191]. Eine weitere Charakterisierung und Analyse der CML-Zellen könnte zeigen, welcher Regulation die *ZFP36L1*-vermittelten Effekte auf die Imatinib-Sensitivität unterliegen und welchen Beitrag *ZFP36L1* (und *ZFP36L2*) bezüglich einer klonalen Selektion in der CML-Progression und der Imatinib-Resistenz haben.

5.4 Transkriptionelle, genetische und epigenetische Analyse der Imatinib- und Nilotinib-Resistenz

Neben der gezielten Analyse des Beitrages des ABC-Transporters ABCG2 sowie dessen Regulation durch die miR-212 und der Untersuchung von *ZFP36L1* und *ZFP36L2* wurde in einem hypothesenfreien Ansatz untersucht, welche weiteren BCR/ABL-unabhängigen Resistenzmechanismen in dem hier etablierten *in vitro*-Zelllinienmodell eine Rolle spielen könnten.

5.4.1 Transkriptionelle Veränderungen in der Imatinib-Resistenz

Ziel der Analyse der transkriptionellen Veränderungen der Imatinib-resistenten Zellen war es, die Gene zu ermitteln, die eine differenzielle Expression und damit eine potentielle Bedeutung bei der Entstehung der Resistenz oder in dessen Verlauf haben, um damit die zugrundeliegenden Resistenzmechanismen aufzuklären.

In der Analyse der Veränderungen der Genexpression bei der Entwicklung von 0,5 μ M Imatinib-resistenten Zellen aus nativen K-562 (K-562 vs. K-562^{0,5}) zeigte sich eine differenzielle Expression einer Vielzahl von Genen, während die 2 μ M Imatinib-resistenten Zellen in ihrem Expressionsprofil eher den nativen Zellen ähnelten. Diese Diskrepanz konnte in vergleichbaren Studien ebenfalls beobachtet werden, in denen 400 nM Imatinib-resistente Zellen größere transkriptionelle Unterschiede zu nativen Zellen besaßen als die der höheren Imatinib-Konzentrationen [148]. Dennoch stellte sich die Frage, welche Resistenzmechanismen rekurrent in beiden Imatinib-Konzentrationen auftreten und damit möglicherweise zentral der Imatinib-Resistenz unterliegen. Dazu wurden die Gene analysiert, deren Veränderung der Genexpression in der Imatinib-Resistenz in die gleiche Richtung verlief.

In der Analyse der differenziellen Genexpression in der Entstehung der Imatinib-Resistenz (Vergleich K-562 vs. K-562^{0,5} und K-562²) konnte eine Expressionsveränderung von Genen der Signaltransduktion, der Zellinteraktion und Adhärenz festgestellt werden. In einer ähnlichen Studie von Chung *et al.* mit Analyse der Genexpression in der Imatinib-Resistenz in einem Konzentrationsbereich von 200-800 nM Imatinib konnte eine Überexpression von Genen der Transkription und Apoptose gezeigt werden, wohingegen die Expression von Genen des Protein- und Energiemetabolismus reduziert war [148]. Daneben konnte in einer

Studie der transkriptionellen Veränderungen bei CML-Patienten zwischen dem Zeitpunkt der Diagnosestellung und nach einem Monat Imatinib-Therapie eine vermehrte Apoptose sowie eine verminderte DNA-Reparatur gezeigt werden [190]. Dieses entspricht den hier beobachteten Veränderungen der Signaltransduktion, aber auch der Herunterregulation der Proteinprozessierung in der Imatinib-Resistenz. Eine Modulation des Zellmetabolismus konnte in der hier durchgeführten Analyse auf transkriptioneller Ebene nicht festgestellt werden.

Die Analyse der KEGG-Pathways ergab eine Überrepräsentation von differenziell exprimierten Genen in der Imatinib-Resistenz (K-562^{0,5}, K-562²) in Signalwegen, die mit der Zelladhärenz verbunden waren. Zu diesen assoziierten Genen zählten das Glykoprotein *FN1*, das Proteoglykan *SRGN* und das Oberflächenglykoprotein *CD226*, deren differenzielle Expression in der Imatinib-Resistenz (K-562^{0,5}, K-562²) bestätigt werden konnten. Während die Expression von *FN1* und *SRGN* in der Imatinib-Resistenz (K-562^{0,5}, K-562²) reduziert war, konnte eine Überexpression von *CD226* im Verlauf der Imatinib-Resistenz mit der höchsten Expression in den 2 µM Imatinib-resistenten Zellen festgestellt werden. Ein Zusammenhang der *FN1*-Expression mit Migration und Zelladhärenz konnte in leukämischen dendritischen Zellen gezeigt werden, wohingegen die Reduktion der *SRGN*-Expression auf eine potentielle Differenzierung hindeuten könnte, da *SRGN* als Biomarker unreifer hämatopoetischer Zellen gilt [192, 193]. *CD226* hingegen ist an der Zelladhärenz über CD112/Nectin-1 oder CD155/Poliovirus-Rezeptor (PVR) bei der Erkennung von Tumorzellen durch NK-Zellen beteiligt [194, 195]. Möglicherweise deutet die Reduktion von *FN1* und *SRGN* auf eine verminderte Adhärenz und zunehmende Differenzierung in der Imatinib-Resistenz hin, wohingegen der Zell-Zell-Kontakt über *CD226* gesteigert werden könnte. Dieses entspricht Beobachtungen der Veränderung der Zelladhärenz von CML-Zellen unter Imatinib-Behandlung. Die Expression von BCR/ABL führt zu einer gesteigerten Zellmotilität und verminderten Zelladhärenz, welche durch Imatinib aufgehoben werden [196]. In CD34⁺ CML-Zellen konnte eine Reduktion der Adhärenz nach sieben Tagen Imatinib-Behandlung gezeigt werden [197]. Daneben zeigten Studien zu der Interaktion des Knochenmarkstroma mit CML-Zellen, dass die gesteigerte Zell-Zell-Interaktion zu einer Protektion vor Imatinib führt [198]. In Studien an Imatinib-resistenten Stroma-Tumoren konnte außerdem eine gesteigerte Imatinib-Sensitivität durch Inhibition der *focal adhesion*-Kinasen beobachtet

werden, die an der Regulation der Adhärenz beteiligt sind [199, 200]. Entsprechend der Beobachtungen in dieser Arbeit könnte eine Reduktion der Adhärenz eine Kompensation der gesteigerten Adhärenz durch Imatinib darstellen. Damit könnte es sich bei der Veränderung der Adhärenz und der Zell-Zell-Interaktion um Mechanismen handeln, die direkt zur Resistenz gegen Imatinib beitragen.

In dieser Arbeit konnte im *Knockout* der Zinkfingerproteine *ZFP36L1* und *ZFP36L2* eine Adhärenz der Zellen beobachtet werden, die während der Imatinib-Inkubation aufgehoben wurde. Diese verminderte Adhärenz unter Imatinib-Behandlung steht wahrscheinlich im Zusammenhang mit der Entwicklung der Imatinib-Resistenz. Zwar handelt es sich bei *FN1*, *SRGN* und *CD226* nicht um putative Ziel-mRNAs von *ZFP36L1* oder *ZFP36L2*, jedoch könnte eine Analyse der in der Imatinib-Resistenz differenziell exprimierten Gene potentielle Ziel-mRNAs von *ZFP36L1* oder *ZFP36L2* identifizieren, die im Zusammenhang mit der Veränderung der Adhärenz in Anwesenheit von Imatinib stehen könnten. Dieses könnte in molekularbiologischen Analysen weitergehend untersucht werden.

Zu den weiteren Genen, die einen hohen *fold change* im Vergleich der nativen mit den Imatinib-resistenten Zellen (K-562^{0,5}, K-562²) aufwiesen, gehören *RELN*, *NMU* und *NAV2*. Dabei zeigte *RELN* eine Expressionserhöhung im Verlauf der Imatinib-Resistenz, mit der höchsten Expression in den 0,5 µM Imatinib-resistenten Zellen, wohingegen *NMU* und *NAV2* in der Imatinib-Resistenz herunterreguliert waren. Während *NAV2* eine Überexpression im kolorektalen Karzinom zeigt und damit einen negativen prognostischen Faktor darstellt, konnte die verstärkte Expression des Neuropeptids *NMU* im Zusammenhang mit autokrinen Wachstumssignalen in myeloischen Leukämiezellen identifiziert werden [201, 202]. Für das sekretierte Extrazelluläre Matrix-Glykoprotein *RELN* konnte in der AML, aber auch der adulten T-Zell-ALL eine Assoziation von Mutationen mit einer primären Chemoresistenz gezeigt werden [203, 204]. Für diese Gene ist der Zusammenhang in der CML bzw. mit Therapieresistenzen jedoch ungeklärt.

Zusätzlich konnte in der Imatinib-Resistenz (K-562^{0,5}, K-562²) eine differenzielle Expression von Genen der Signaltransduktion, z.B. PI3K-AKT-Signalweg oder Signalwege in Tumoren, beobachtet werden. Dabei konnte eine Expressionserhöhung von *HIPK2*-Kinase und eine Reduktion der *PTPRB*-Phosphatase in der Imatinib-Resistenz bestätigt werden. Die verminderte *PTPRB*-Expression entspricht den Beobachtungen im Angiosarkom, bei denen

häufig inaktivierende Mutationen in *PTPRB* beobachtet werden, die mit einer verstärkten Aktivierung des MAP-Kinase-Signalwegs assoziiert sind [205, 206]. Des Weiteren können DNA-Schäden zu einer c-Abl-vermittelten Phosphorylierung von HIPK2 führen, welches zur Akkumulation des Proteins und gesteigerter Apoptose führt [207]. Da die c-ABL-Kinase durch Imatinib gehemmt wird [39], könnte eine gesteigerte *HIPK2*- sowie eine Reduktion der *PTPRB*-Expression eine Kompensation der Inhibition darstellen. Eine verstärkte Aktivierung der HIPK2-Kinase, aber auch des MAP-Kinase-Signalwegs könnten als alternative Signalwege unterhalb der BCR/ABL-Kinase zu einer Imatinib-Resistenz beitragen.

Generell weisen diese Daten daraufhin, dass in der Imatinib-Resistenz distinkte Veränderungen der Genexpression zu beobachten sind, die der Signaltransduktion und der Zelladhärenz zugeordnet werden konnten. Damit könnten alternative Signalwege zur Adaption der Signaltransduktion, z.B. über die *HIPK2* und *PTPRB*, und zu einer Verminderung der Zelladhärenz, z.B. über *FN1* oder *SRGN*, direkt an der Entstehung der Imatinib-Resistenz beitragen.

5.4.2 Dynamische Veränderungen der Transkription im Verlauf der Imatinib-Resistenz

Neben den konzentrationsunabhängig auftretenden Imatinib-Resistenzmechanismen, die im Vergleich beider Imatinib-resistenten Zellen mit den nativen Zellen identifiziert werden konnten, wurden die dynamischen Expressionsveränderungen der Genexpression im Verlauf der Imatinib-Resistenz (K-562 vs. K-562^{0,5} vs. K-562²) näher analysiert.

Dabei konnte eine dynamische Expression, d.h. eine Veränderung der Genexpression im Vergleich der K-562 mit den K-562^{0,5} sowie ein gegenläufiger Verlauf im Vergleich zu den K-562², von 45 Genen identifiziert werden, die jedoch keinen klaren Signalwegen zugeordnet werden konnten. Dies könnte an der geringen Anzahl der Gene liegen, da die Algorithmen für wenig Gene häufig keine Vorhersagen treffen können.

Bei der Analyse des Vergleichs von nativen Zellen mit 0,5 μ M Imatinib-resistenten Zellen konnte eine veränderte Expression von Genen der Signaltransduktion, der Adhärenz und immunologischer Prozesse beobachtet werden. Während die Expressionsveränderungen von Genen der Signaltransduktion und Adhärenz bereits in der konzentrationsunabhängigen

Imatinib-Resistenz auftraten und damit potentielle Resistenzmechanismen darstellen, die im Verlauf der Resistenzentwicklung an Bedeutung gewinnen, war die Veränderung immunologischer Prozesse (u.a. FC γ R-vermittelte Phagozytose, Virale Karzinogenese) spezifisch für die 0,5 μ M Imatinib-resistenten Zellen. Für Imatinib konnte eine Aktivierung von NK-Zellen zur Verbesserung der Anti-Tumor-Immunreaktion bereits beschrieben werden [208]. Zusätzlich dazu scheint besonders niedrig dosiertes Imatinib die Hämatopoese und das Immunsystem zu stimulieren [209]. Die differenzielle Expression von Genen immunologischer Prozesse könnte daher zu einer Adaption der Signalwege und damit zu einer Veränderung der Rezeptorexpression in den CML-Zellen beitragen. Daher ist es möglich, dass in der Imatinib-Resistenz die Erkennung der CML-Zellen und die Aktivierung des Immunsystems kompensiert werden und die CML-Zellen damit einer Depletion durch Immunzellen entgehen könnten. Da es sich bei den K-562 um eine Monozyten-ähnliche Zelllinie handelt [210], könnte die Adaption immunologischer Prozesse auch mit einer Differenzierung unter Imatinib-Exposition zusammenhängen. Eine Veränderung der Morphologie sowie eine erythroide Differenzierung dieser Zellen einhergehend mit einer Zunahme der Hämoglobin-Produktion unter Imatinib-Behandlung konnte bereits beschrieben werden [184, 211, 212]. Daher könnte die Überrepräsentation immunologischer Signalwege auf eine veränderte Signaltransduktion während der Differenzierung dieser Zelllinie zurückzuführen sein.

Bei der Analyse der transkriptionellen Veränderungen im weiteren Verlauf der Imatinib-Resistenz (im Vergleich von 0,5 μ M und 2 μ M Imatinib) konnten keine übereinstimmenden Signalwege identifiziert werden. Zusätzlich fiel bei der Betrachtung der zugehörigen Cluster-Analyse auf, dass die biologischen Replikate der 2 μ M Imatinib-Resistenzzüchtung deutliche Unterschiede in ihrer Expression aufwiesen und häufig eine entgegengesetzte Richtung der Veränderung der Genexpression zeigten. Dieses wurde bereits bei den Analysen im Vergleich der nativen K-562 mit den 2 μ M Imatinib-resistenten Zellen beobachtet. Damit stellte sich die Frage, ob eine gemeinsame Auswertung der biologischen Replikate der 2 μ M Imatinib-resistenten Zellen auf diese Art zielführend ist oder ob beide Replikate einzeln analysiert werden sollten, da sich die potentiellen Resistenzmechanismen in den 2 μ M Imatinib-resistenten Zellen möglicherweise unterscheiden. Um dieses näher zu untersuchen, wurden für diese Arbeit genetische Analysen durchgeführt.

Insgesamt könnten die Ergebnisse der dynamischen Genexpression in der Imatinib-Resistenzentwicklung daraufhin deuten, dass bis zu einer Imatinib-Konzentration von 0,5 μM eine Veränderung der Zelladhärenz, der Signaltransduktion und immunologischer Prozesse an der Entstehung der Imatinib-Resistenz beteiligt sind, von denen einige in der Resistenz gegenüber 2 μM Imatinib weiterhin von Bedeutung sind. Eine Vielzahl der transkriptionellen Veränderungen scheint jedoch spezifisch für die jeweilige Imatinib-Konzentration zu sein. Damit liegt die Vermutung nahe, dass bei der Weiterentwicklung der Imatinib-Resistenz bei höheren Imatinib-Konzentrationen auch andere Prozesse eine Rolle spielen.

5.4.3. Genetische Veränderungen in der Imatinib-Resistenz

Um zu untersuchen, ob genetische Veränderungen zur Erklärung der transkriptionellen Veränderungen in der Imatinib-Resistenz beitragen, wurde eine Exom-Sequenzierung zum Vergleich der nativen K-562 mit den 0,5 μM und 2 μM Imatinib-resistenten Zellen durchgeführt.

In der Analyse der Gesamtzahl an Mutationen in den Imatinib-resistenten Zellen zeigte sich, dass die nativen K-562-Zellen bereits 324 SNVs aufwiesen. Diese Anzahl der Mutationen der nativen K-562-Zellen stimmte nicht mit der Anzahl der in kodierenden Genen detektierten Mutationen der K-562 (541) aus dem COSMIC-Katalog (COSS905940) überein [213]. Da in der hier durchgeführten Exom-Sequenzierung nur Mutationen in kodierenden Genen identifiziert werden können, die einen Einfluss auf die Transkription haben (wie z.B. Leserahmenverschiebungen oder kleine Deletionen), können Mutationen in intra- oder intergenischen Regionen sowie *Stopgain*-Mutationen, die zur einem vollständigen Expressionsverlust führen, nicht detektiert werden [214]. Möglicherweise ist diese Diskrepanz in der Anzahl an Mutationen daher auf unterschiedliche Detektions- oder Analysemethoden zurückzuführen.

Im Vergleich der Anzahl der SNVs in nativen Zellen war die Anzahl der SNVs in beiden 0,5 μM Imatinib-Resistenzzüchtungen deutlich höher. In den 2 μM Imatinib-resistenten Zellen reduzierte sich die SNV-Anzahl in der ersten Resistenzzüchtung, wohingegen die Anzahl in der zweiten zunahm. Dieses deutet auf eine Zunahme der genetischen Heterogenität bei der Entwicklung der 0,5 μM Imatinib-resistenten Zellen und damit auf eine klonale Evolution hin, während die Veränderungen bei den 2 μM Imatinib-resistenten Zellen eher auf eine klonale

Selektion hinweisen. In CML-Patienten konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der genetischen Aberrationen während der Progression zunimmt [153, 215]. In klinischen Studien mit Patienten in akzelerierter CML-Phase konnte eine zytogenetische klonale Evolution einhergehend mit einem erhöhten Risiko an Therapieversagen beobachtet werden [137, 216]. Zusätzlich dazu konnte eine klonale Evolution in CML-Blasten sowie in Azacytidin-behandelten Ph⁺ AML festgestellt werden [4, 217]. Dieses entspricht den Beobachtungen der Zunahme der Anzahl an Mutationen im Verlauf der Imatinib-Resistenzentwicklung.

Bei der Assoziation zu bekannten Tumorsignaturen konnte keine klare Zuordnung der Signaturen zur Erklärung der Mutationsmuster erfolgen. Viele dieser Tumorsignaturen sind mit soliden Tumoren, insbesondere mit Karzinomen des Magens, der Leber und der Brust sowie mit Prozessen der Tumorentstehung assoziiert, die durch distinkte Veränderungen der DNA, wie z.B. durch Tabakrauch oder UV-Licht, hervorgerufen werden [218]. Da es sich bei der CML um eine homogene hämatopoetische Neoplasie mit distinkter t(9;22)-Translokation handelt, waren diese Abweichungen von den Tumorsignaturen jedoch zu erwarten.

Die Analyse der biologischen Replikate der 2 µM Imatinib-Resistenz im Vergleich zu 0,5 µM Imatinib-resistenten Zellen deutete auf heterogene Mechanismen hin. In der ersten Imatinib-Resistenzzüchtung konnte eine Abnahme der Anzahl an SNVs sowie eine Zunahme der Allelfrequenz der auftretenden SNVs festgestellt werden. In der zweiten Resistenzzüchtung konnte ein ähnliches Prinzip beobachtet werden, jedoch traten hier im gleichen Maße neue SNVs auf, so dass die Gesamtzahl an SNVs insgesamt anstieg. Diese Daten deuten auf eine klonale Selektion bei der Weiterentwicklung der 2 µM Imatinib-resistenten Zellen aus den 0,5 µM Imatinib-resistenten Zellen hin. Die weitere Analyse dieser klonalen Selektion in der CML ist im Hinblick auf potentielle Kombinationstherapien, wie Interferon-α oder Cytarabin [33, 35], oder einen potentiellen sequentiellen Einsatz von TKIs (oder neuen Wirkstoffkombinationen) von Interesse, um die Therapie bedingt durch die adaptierenden Eigenschaften der Klone anzupassen.

Die biologischen Replikate der Imatinib-Resistenzzüchtungen wiesen interessanterweise Mutationen in DNA-Reparatur- und Zytoskelett-assoziierten Proteinen auf. Dabei konnte eine Mutation in *RBMX* identifiziert werden, die in beiden biologischen Replikaten auftrat. *RBMX* ist in die DNA-Reparaturmaschinerie eingebunden und damit in die zelluläre

Stressantwort involviert [219]. Der hier detektierte Aminosäureaustausch von Arginin zu Prolin könnte zu einer veränderten Faltung des Proteins mit folgendem Funktionsverlust führen. Damit könnte möglicherweise die DNA-Reparatur beeinträchtigt werden, welches zu einer Akkumulation von weiteren Mutationen führen könnte. Diese Vermutung wird durch Genexpressionsstudien gestützt, bei denen eine reduzierte DNA-Reparatur in der Imatinib-Resistenz beobachtet wurde [190]. Eine klonale Selektion von Klonen mit verminderter DNA-Reparatur wäre danach plausibel. Zusätzlich konnte in HeLa-Zellen gezeigt werden, dass der Verlust von RBMX zu einer Destabilisierung des Chromatin-Gerüsts führen kann und RBMX damit die Rolle eines Cohesin-Regulators zukommt [220]. Daneben konnten in beiden Resistenzzüchtungen eine *missense*-Mutation in *MAP6* bzw. die Entstehung eines Stoppcodons in *TTBK1*, beobachtet werden. Dabei kommt vor allem *MAP6* eine Funktion bei der Assemblierung der mitotischen Spindel und eine Rolle als Tumorsuppressor zu, da *MAP6*-Mutationen mit der Lymphomagenese im Mantelzelllymphom assoziiert werden konnten [221, 222]. Möglicherweise stehen die hier beobachteten Mutationen in *MAP6* und *TTBK1*, aber auch in *RBMX*, im Zusammenhang mit einer zunehmenden genomischen Instabilität durch die Inhibition der DNA-Reparatur bzw. dem abnormalen Aufbau des Spindelapparates. Damit könnte der potentielle Funktionsverlust dieser Proteine zu einer genomischen Instabilität in der Imatinib-Resistenz führen, die weitere genetische Aberrationen bedingt.

Insgesamt deuten die Daten der Exom-Sequenzierung auf eine klonale Selektion im Verlauf der Imatinib-Resistenzentwicklung hin. Dabei konnten distinkte Mutationen in Genen der DNA-Reparatur (wie *RBMX*) und des Spindelapparates (z.B. *MAP6*, *TTBK1*) festgestellt werden, die möglicherweise zu einem Anstieg der genomischen Instabilität in der Imatinib-Resistenz führen können. Der Einfluss dieser Gene sollte in weiteren Experimenten hinsichtlich des Beitrags des Proteins und des Effekts der Mutation in der Imatinib-Resistenz näher analysiert werden.

5.4.4 Transkriptionelle Veränderungen in der Nilotinib-Resistenz

Der Tyrosinkinasehemmstoff der 2. Generation Nilotinib gewinnt zunehmend an Bedeutung in der Therapie der CML. Dabei wird Nilotinib bei Resistenzen gegenüber Imatinib eingesetzt, wobei allerdings auch Resistenzen gegenüber Nilotinib auftreten können [25, 44]. Es ist jedoch nicht geklärt, welche Resistenzmechanismen der Nilotinib-Resistenz unabhängig von Mutationen in BCR/ABL unterliegen und inwiefern diese von der Imatinib-Resistenz abweichen.

Die Analysen der Nilotinib-Resistenz erfolgten in biologischen Replikaten, wobei deutliche Unterschiede in der Anzahl an differenziell exprimierten Genen (1429 zu 614) in den Nilotinib-Resistenzzüchtungen festgestellt werden konnten. Trotz dieser Unterschiede wurde der Fokus auf die Gene gelegt, die in beiden Resistenzzüchtungen zu finden waren, um die rekurrenten Resistenzmechanismen der Nilotinib-Resistenz zu analysieren. Dennoch könnte die Einzelanalyse der biologischen Replikate in weiteren Untersuchungen zeigen, wodurch sich die Resistenzmechanismen in den beiden Resistenzzüchtungen unterscheiden und ob gegebenenfalls, wie in der Imatinib-Resistenz, eine klonale Selektion stattfindet.

Bei der Analyse der gemeinsamen Veränderungen der Genexpression in der Nilotinib- und Imatinib-Resistenz konnte nur eine geringe Anzahl an Genen identifiziert werden. Daher stellte sich die Frage nach der Vergleichbarkeit der beiden TKI-Konzentrationen. Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei 2 μM um die angestrebte Imatinib-Plasmakonzentration in CML-Patienten und bei 100 nM um die Nilotinib-Konzentration, die der 20-fach höheren Potenz des Wirkstoffes entspricht [44]. In einer *in vitro*-Studie an K-562-Zellen zum Vergleich von 50 und 250 nM Nilotinib-Resistenz konnte beobachtet werden, dass sich die Expressionsprofile gegenüber verschiedenen Konzentrationen an Nilotinib-resistenten Zellen deutlich unterscheiden. Zusätzlich konnten drastische Unterschiede der Nilotinib-resistenten Zellen zu den Imatinib-resistenten Zellen (800 nM) gezeigt werden [149]. Dennoch ist nicht klar, ob die Resistenzmechanismen der 100 nM Nilotinib-Resistenz eher denen der 0,5 oder 2 μM Imatinib-Resistenz ähneln. Dieses könnte in weiteren Studien mit zusätzlichen Analysen des Verlaufs der Nilotinib-Resistenz weiter untersucht werden.

In der hier durchgeführten Analyse der Nilotinib-Resistenz konnte eine Veränderung der Transkription von Histonen bzw. DNA-modifizierenden Proteinen identifiziert werden. Dieses

entspricht den Ergebnissen aus der oben genannten *in vitro*-Studie zur Analyse der Nilotinib-Resistenzentwicklung, in der ebenfalls eine Anreicherung von Genen nukleärer Prozesse, z.B. DNA-Replikation und –Reparatur oder mRNA-Prozessierung und Transport, unabhängig von der Nilotinib-Konzentration festgestellt werden konnte [149]. Des Weiteren konnte eine Inhibition der Histondeacetylase durch Nilotinib gezeigt werden [223, 224]. In der hier durchgeführten Analyse zeigte sich eine Expressionserhöhung der Histone *HIST1H2BJ*, *HIST1H2BV* und *H2AFV* in der Nilotinib-Resistenz. Dieses deutet daraufhin, dass in der Nilotinib-Resistenz die DNA-Kondensation beeinflusst werden könnte, da diese Proteine direkt an der Verpackung der DNA beteiligt sind [225]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der Expression von Histonen mit einer gesteigerten genomischen Instabilität zusammenhängt und ungebundene Histone die DNA-Reparatur beeinflussen können [226, 227]. Möglicherweise besteht in der Nilotinib-Resistenz ein Zusammenhang zwischen der Expressionssteigerung der Histone, der gesteigerten genomischen Instabilität und einem Verlust der DNA-Reparatur, was möglicherweise die Entstehung der Resistenz begünstigen könnte.

Des Weiteren konnten in der Nilotinib-Resistenz eine Überrepräsentation von Genen mit Assoziation zu immunologischen Prozessen, wie z.B. der Phagozytose, festgestellt werden. Diese Zuordnung deutet möglicherweise auf eine Veränderung der Physiologie dieser Zelllinie hin oder steht, wie bereits für die Imatinib-Resistenz in 5.4.2 beschrieben, im Zusammenhang mit einer Hemmung des Immunsystems. Für Makrophagen oder NK-Zellen konnte unter Imatinib- und Nilotinib-Behandlung bereits eine Aktivierung der Immunantwort gezeigt werden [228-230]. Daher könnten die Expressionsveränderungen von Genen mit Assoziation zu immunologischen Prozessen mit einer Kompensation der Aktivierung des Immunsystems in der Nilotinib-Resistenz zusammenhängen. Die Veränderung der Expression dieser Gene könnte zu einer Veränderung der Rezeptorexpression führen, so dass die Erkennung der CML-Zellen durch das Immunsystem beeinträchtigt wird (siehe 5.4.2). Damit könnte die durch Nilotinib-gesteigerte Aktivierung des Immunsystems kompensiert werden und die Nilotinib-Resistenz sich manifestieren.

Kim *et al.* konnten zeigen, dass die Nilotinib-Resistenz mit einer Aktivierung der Zelladhärenz, ATPase- und Tyrosinkinaseaktivität einhergeht [149]. Allerdings konnten in der hier durchgeführten Analyse diese Prozesse in der Nilotinib-Resistenz nicht identifiziert

werden. Dies könnte mit der Tatsache zusammenhängen, dass diese Signalwege nicht rekurrent in beiden biologischen Replikaten der Nilotinib-Resistenz auftreten und daher nicht in die Analyse der gemeinsam in den biologischen Replikaten vorhandenen transkriptionellen Veränderungen eingeschlossen wurden. Möglicherweise treten diese nur in einer der Resistenzzüchtungen auf und stellen daher keine reproduzierbaren Resistenzmechanismen dar. Eine Analyse mit weiteren biologischen Replikaten wäre nötig, um diese Diskrepanzen näher zu untersuchen.

In der Nilotinib-Resistenz konnte eine differenzielle Expression von *EPHB6*, *NAV2*, *NMU*, *PTPRB*, *RELN* und *ZC3H12C* beobachtet werden. Die Analyse der genomweiten Methylierung deutete außerdem auf eine potentielle Regulation der Transkription dieser Gene durch Methylierung hin. Insgesamt konnte ein Expressionsanstieg des *EPHB6*, sowie der bereits in der Imatinib-Resistenz validierten Gene *NAV2*, *NMU*, *PTPRB*, *RELN* und *ZC3H12C* bestätigt werden. Dabei waren *EPHB6* und *RELN* in den resistenten Zellen überexprimiert, während die anderen Gene eine Herunterregulation aufwiesen. Für den kinase-defizienten Ephrin-Rezeptor *EPHB6* konnte in pädiatrischer T-ALL eine Überexpression beobachtet werden, die interessanterweise im Zusammenhang mit einem besseren Therapieansprechen auf Doxorubizin assoziiert werden konnte [231]. Außerdem konnte eine funktionelle Rolle von *EPHB6* in der Physiologie von B-Zellen gezeigt werden [232]. Jedoch ist der Zusammenhang mit der CML ungeklärt. Insgesamt war auffällig, dass nur für sechs der 11 zur Validierung ausgewählten Gene tatsächlich eine differenzielle Expression in der Nilotinib-Resistenz bestätigt werden konnte.

Für die gemeinsamen transkriptionellen Veränderungen der Genexpression in der Imatinib- und Nilotinib-Resistenz konnten in den STRING- und KEGG-*Pathway*-Analysen keine Überrepräsentationen von Signalwegen identifiziert werden. Unter den Genen mit differenzieller Expression war jedoch ein Gen, die Argininsuccinat-Synthase 1, auffällig, welches in der Imatinib-Resistenz in seiner Expression herunterreguliert war, aber in der Nilotinib-Resistenz eine gesteigerte Expression zeigte. Dabei handelt es sich um ein Enzym, welches an der Biosynthese von Arginin beteiligt ist. In verschiedenen Leukämien, vor allem AML, konnte gezeigt werden, dass die Tumorzellen eine Abhängigkeit von der Aminosäure Arginin aufwiesen und die Arginin-Depletion ein möglichen Therapieansatz darstellen könnte

[233, 234]. Möglicherweise spielt dies in der Nilotinib-Resistenz eine Rolle, stellt aber keinen Resistenzmechanismus gegenüber Imatinib dar.

Diese Analysen deuten darauf hin, dass sich die Imatinib- und Nilotinib-Resistenz in den Veränderungen der Genexpression deutlich unterscheiden, es aber auch Gemeinsamkeiten in distinkten Genen bzw. Mechanismen hinsichtlich einer Zunahme genomischer Instabilität oder Kompensation der Erkennung durch das Immunsystem gibt.

5.4.4 Epigenetische Analyse der Imatinib- und Nilotinib-Resistenz

Epigenetische Veränderungen sowohl im gesamten Genom als auch einzelner Gene können für verschiedene Arzneistoffe beobachtet werden [235]. Anhand von *in silico*-Studien wurde geschätzt, dass 5 % aller Arzneistoffe epigenetische Effekte ausüben, in dem sie schwach bis ausgeprägt z.B. die DNA-Methylierung oder Histon-Acetylierung beeinflussen [236, 237]. Jedoch ist die Veränderung der Methylierung durch TKIs noch weitgehend unerforscht und bezieht sich häufig auf die Analyse einzelner Gene [89]. Daher stellte sich die Frage, inwieweit sich die genomweite Methylierung in der Imatinib- und Nilotinib-Resistenz verändert.

Die Gesamtzahl der veränderten CpGs in den Imatinib- und Nilotinib-resistenten Zellen war mit ca. 3 % aller gemessenen CpGs relativ gering. Ein genomweiter Effekt durch eine klassische epigenetische Modulation, wie z.B. durch die Zytostatika 5-Azacytidin oder Decitabin, die eine globale Hypomethylierung durch Hemmung der DNMTs verursachen [238, 239], scheint folglich für die TKIs nicht vorhanden zu sein. Die Veränderung der Methylierung beschränkt sich daher wahrscheinlich auf einzelne Gene.

Bei der Analyse der Veränderung der Methylierung in den biologischen Replikaten der Imatinib- und Nilotinib-Resistenz (Vergleich K-562 vs. K-562², K-562^N) fiel auf, dass die Anzahl der differenziell methylierten CpGs in den 2 µM Imatinib-Resistenzzüchtungen nahezu identisch war, wohingegen in den 100 nM Nilotinib-Resistenzzüchtungen eine große Diskrepanz festgestellt werden konnte. Dennoch konnte in beiden TKI-Resistenzzüchtungen letztendlich eine ähnliche Anzahl an differenziell methylierten CpGs in den biologischen Replikaten identifiziert werden. Diese Unterschiede in der Methylierung der biologischen Replikaten der Nilotinib-Resistenzzüchtung entsprechen den Beobachtungen der Analyse der

genomweiten Expressionsunterschiede, in denen deutliche Diskrepanzen zwischen den biologischen Replikaten zu erkennen waren. Dieses deutet auf unterschiedliche Resistenzmechanismen in den biologischen Replikaten der Nilotinib-Resistenzzüchtungen hin. Diese Unterschiede in der Expression konnten für die 2 μ M Imatinib-resistenten Zellen ebenfalls beobachtet werden, waren allerdings in der Methylierung nicht zu beobachten.

Der Fokus dieser Arbeit lag auf der Analyse der Veränderungen der Methylierung, die rekurrent in den biologischen Replikaten auftreten und zur Erklärung der differentiellen Expression in der TKI-Resistenz beitragen können. Deshalb wurde trotz der oben beschriebenen Unterschiede zwischen den Resistenzzüchtungen auf die weitere Analyse der Methylierung in den Einzelreplikaten verzichtet. Dennoch könnten weitere Untersuchungen helfen, den Einfluss der Methylierung auch hinsichtlich der Unterschiede zwischen den biologischen Replikaten während der TKI-Resistenzentwicklung weiter aufzuklären.

5.4.6 Veränderung der Methylierung in der Imatinib-Resistenz

In der hier vorliegenden Arbeit konnte eine Veränderung der Methylierung in der Imatinib-Resistenz von 1405 CpGs in 177 Genen gezeigt werden. Während eine Vielzahl dieser differentiell methylierten CpGs häufig genomweit lokalisiert waren, konnte eine Veränderung der Methylierung von 219 CpGs in den Promotorregionen von 104 Genen beobachtet werden. Dieses deutet auf eine differentielle Genexpression aufgrund unterschiedlicher Bindung von Transkriptionsfaktoren in der Entwicklung der Imatinib-Resistenz hin [88]. In verschiedenen Studien der CML konnte ein Einfluss der Methylierung gezeigt werden. So wird z.B. die Methylierung des *phosphatase and tensin homolog (PTEN)* durch Imatinib über eine verstärkte Aktivierung von DNA-Methyltransferasen reguliert [240]. Außerdem ist die Methylierung bestimmter Gene, unter anderem *autophagy related 16 like 2 (ATG16L2)*, im Zuge der CML-Progression verändert [241]. In einer weiteren Studie mit Imatinib-resistenten CML-Patienten konnte gezeigt werden, dass die durchschnittliche Anzahl der hypermethylierten Gene in Imatinib-resistenten CMLs im Vergleich zu Imatinib-sensitiven CMLs erhöht war [153]. Dies steht im Gegensatz zu der hier beobachteten Hypomethylierung von 63,5 % der differentiell methylierten CpGs. Die Änderung der Methylierung einzelner Gene entspricht jedoch den Beobachtungen aus dem vorliegenden CML-Modell, in dem eine Hypermethylierung des *miR-212*-Promotor in 0,5 und 2 μ M

Imatinib-resistenten Zellen einhergehend mit einer Expressionssteigerung der *miR-212* gezeigt werden konnte. Der *ABCG2*-Promotor hingegen wies während der Imatinib-Resistenz keine Veränderung der Methylierung auf [141]. Daher scheint die Änderung der Methylierung in der Imatinib-Resistenz wahrscheinlich limitiert auf einzelne Gene. Um den Einfluss einer Hypo- oder Hypermethylierung im Promotor dieser Gene zu untersuchen, sind jedoch weitere Analysen notwendig.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Veränderung der Methylierung in der Imatinib-Resistenz vorliegt, jedoch in ihrem Umfang keiner klassischen epigenetischen Modulation entspricht. Vielmehr deuten diese Daten auf die Regulation der Genexpression bestimmter Gene hin, die wiederum einen Einfluss auf die Imatinib-Resistenzentwicklung haben können.

5.4.7 Veränderung der Methylierung in der Nilotinib-Resistenz

Insgesamt waren die Veränderungen der Methylierung in der Nilotinib-Resistenz im Vergleich zur Imatinib-Resistenz deutlich geringer. Zusätzlich fiel auf, dass von den differenziell methylierten CpGs nur eine geringe Anzahl ($n=85$) in den Promotorregionen von 46 assoziierten differenziell exprimierten Genen lokalisiert war. Dieses deutet auf einen geringen Einfluss der Methylierung in der Nilotinib-Resistenz hin. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Expression der DNA-Methyltransferasen DNMT1, DNMT3a und DNMT3b in der Anwesenheit von Nilotinib herunterreguliert sind, während auch die globale Methylierung reduziert ist [242]. Diese Veränderung der Methylierung steht im Gegensatz zu der hier beobachteten Hypermethylierung von ca. 80 % der differenziell methylierten CpGs. Eine differenzielle Expression der DNA-Methyltransferasen konnte in der hier durchgeführten Analyse der Nilotinib-Resistenz nicht beobachtet werden, was möglicherweise auf eine Wiederherstellung der Expression in der Nilotinib-Resistenz hindeutet. Stattdessen konnte eine differenzielle Expression von Histonen in den Nilotinib-resistenten Zellen beobachtet werden. Dieses deutet daraufhin, dass möglicherweise andere DNA-Modifikationen in der Nilotinib-Resistenz eine Rolle spielen könnten. In einer Studie in hepatischen Sternzellen konnte gezeigt werden, dass die Induktion der Apoptose durch Nilotinib über die Inhibition der Histon-Deacetylasen vermittelt wird [243]. Möglicherweise spielt eine Adaption der Histon-Modifikationen zur Kompensation von Nilotinib in der

Resistenzentwicklung der CML eine Rolle. Die Veränderungen der Histon-Modifikationen in der TKI-Resistenz könnte daher in weiterführenden Studien analysiert werden.

In der Nilotinib-Resistenz konnte eine Änderung der Methylierung einiger Gene beobachtet werden. Insgesamt deuten diese Ergebnisse auf eine Veränderung der Methylierung von bestimmten Genen in der Nilotinib-Resistenz, jedoch nicht auf genomweite Effekte hin. Stattdessen könnten möglicherweise andere epigenetischen Faktoren, z.B. der Histon-Modifikationen, in der Nilotinib-Resistenz eine Rolle spielen.

5.5 Zusammenfassung der Imatinib- und Nilotinib-Resistenzmechanismen

Ziel der hier durchgeführten Arbeit war es, BCR/ABL-unabhängige Resistenzmechanismen der CML-Zelllinie K-562 gegenüber den TKIs Imatinib- und Nilotinib auf transkriptioneller, genetischer und epigenetischer Ebene aufzuklären.

Bei der Analyse von behandelten und nicht-behandelten Zellen besteht dabei die Schwierigkeit, dass die Inhibition der BCR/ABL-Kinase durch Imatinib oder Nilotinib selbst zu einer Adaption der BCR/ABL-abhängigen Signalwege führt, die in einer verminderten Proliferation und gesteigerter Apoptose der Zellen resultieren kann [14]. Daher ist einerseits möglich, dass einige der beobachteten Veränderungen das Resultat pharmakodynamischer Effekte der TKIs sind, aber nicht Ausdruck einer Resistenz, andererseits Folge alternativer Signalwege darstellen, die direkt mit der entwickelten Resistenz zusammenhängen. Es ist daher notwendig, den Einfluss der identifizierten Zielgene auf die TKI-Sensitivität zu analysieren, wie es in der vorliegenden Arbeit am Beispiel der miR-212/ABCG2-Achse und des ZFP36L1-*Knockouts* gezeigt werden konnte.

In der Entwicklung der Resistenz gegenüber 0,5 μ M Imatinib änderte sich die mRNA-Expression einer Vielzahl von Genen, was auf eine Adaption der Signaltransduktion, der Zelladhärenz und der Modulation der Immunsystems hindeutet. Im Verlauf der Resistenz gegenüber 2 μ M Imatinib konnten große Unterschiede zwischen den biologischen Replikaten festgestellt werden. Die genetischen Analysen deuten hierbei auf eine klonale Selektion und einen Verlust der genetischen Heterogenität im Verlauf der Imatinib-Resistenz hin. Zusätzlich dazu waren etwa zwei Drittel der differenziell methylierten CpGs hypomethyliert (Abb. 48). In beiden Imatinib-Konzentrationen (0,5 & 2 μ M Imatinib) konnte eine differenzielle

Expression von Genen der Signaltransduktion und Zelladhärenz beobachtet werden, die potentiell durch Änderung der Promotoraktivität zustande kommt.

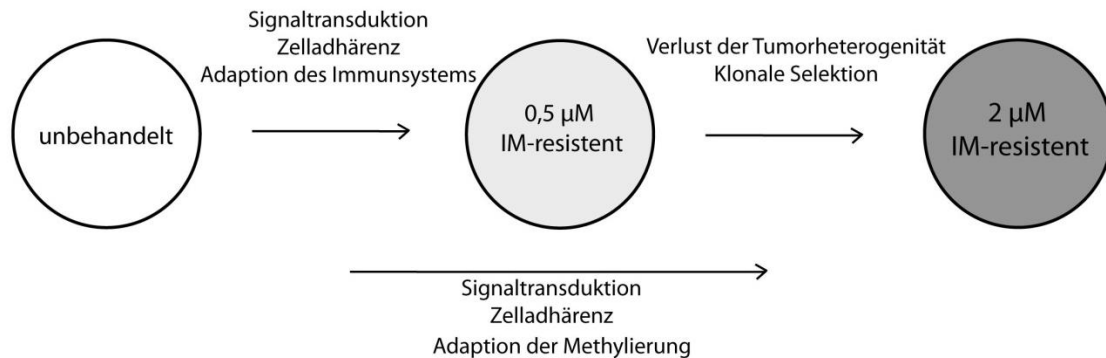


Abbildung 48: Modell der Imatinib-Resistenzentwicklung.

Bei der Entwicklung von 0,5 µM IM-resistenten CML-Zellen finden transkriptionelle Veränderungen von Genen der Signaltransduktion, der Zelladhärenz und der Adaption des Immunsystems statt. Bei der Weiterentwicklung zu 2 µM IM-resistenten Zellen kommt es weiterhin zu einem Verlust der Tumorheterogenität und einer klonalen Selektion. Unabhängig von der Imatinib-Konzentration konnte eine Veränderung von Genen der Signaltransduktion und der Zelladhärenz beobachtet werden. Zusätzlich dazu konnte eine Adaption der Methylierung in bestimmten Genen festgestellt werden. IM: Imatinib

Bei der Resistenz gegenüber 100 nM Nilotinib konnte eine Expressionsveränderung vor allem von DNA-modifizierenden Proteinen beobachtet werden. Daneben deuten die beobachteten Unterschiede der biologischen Replikate daraufhin, dass es eine klonale Selektion distinkter Klone stattfindet, wie es anhand der genetischen Analyse der Imatinib-Resistenz hier gezeigt werden konnte. Hinsichtlich der epigenetischen Effekte scheint der Einfluss von Nilotinib im Vergleich zur Imatinib-Resistenz deutlich geringer und ebenfalls nur distinkte Gene zu betreffen (Abb. 49).



Abbildung 49: Modell der Nilotinib-Resistenzentwicklung.

Bei der Entwicklung von 100 nM Nilotinib-resistenten Zellen konnte eine transkriptionelle Veränderung von Genen beobachtet werden, die mit DNA-Modifikationen assoziiert waren. Daneben konnte eine Änderung der Methylierung in distinkten Genen festgestellt werden. Die Unterschiede in den biologischen Replikaten deuten außerdem auf eine klonale Selektion in der Resistenzzüchtung.

Im Vergleich der beiden TKI-Resistenzen deuten die Analysen auf spezifische Resistenzmechanismen in der Imatinib- und Nilotinib-Resistenz hin, obwohl eine Veränderung der Zelladhärenz und Motilität in beiden Resistenzen überschneidend gezeigt werden konnte.

5.6 Ausblick

In dieser Arbeit wurden verschiedene BCR/ABL-unabhängige Resistenzmechanismen gegenüber Imatinib und Nilotinib umfassend untersucht. Um diese näher zu charakterisieren, sind jedoch weiterführende Analysen notwendig.

Die hier untersuchten Resistenzmechanismen wurden an einem *in vitro*-CML-Modell identifiziert und analysiert. Daher erscheint es notwendig, diese Ergebnisse in Primärmaterial von CML-Patienten zu bestätigen. In verschiedenen Studien an CML-Patienten konnten hierzu im Hinblick auf bestimmte Gene z.B. der Zusammenhang zwischen epigenetischen Veränderungen, klonaler Evolution und Fortschreiten der CML gezeigt werden [153, 244].

Für die Bestätigung der epigenetischen Analysen könnten zunächst Bisulfit-Pyrosequenzierungen zur Validierung der differentiellen Methylierung mit anschließender Analyse der Transkriptionsfaktorbindestellen in den Promotoren der differentiell exprimierten Genen, z.B. *ZC3H12C*, *PTPRB* oder *NAV2*, durchgeführt werden. In einer nachfolgenden Chromatin-Immunpräzipitationsanalyse (ChIP) unter Verwendung der

Antikörper gegen die putativen Transkriptionsfaktoren könnte zusätzlich ermittelt werden, welche Transkriptionsfaktoren die entsprechenden Promotoren binden, um damit Rückschlüsse auf die zugrundeliegenden Signalwege zu ziehen.

Daneben könnten mittels Sanger-Sequenzierung zunächst die Mutationen in den potentiellen Kandidaten der hier durchgeführten Exom-Sequenzierung, vor allem von *RBMX*, bestätigt werden, um dann den Einfluss der mutierten Proteine in einem Überexpressions- oder *Knockout*-System zu untersuchen.

Aufgrund der hier beobachteten klonalen Evolution wäre es denkbar, den Einsatz von Kombinationstherapien mit bzw. von Imatinib oder Nilotinib, bzw. einen sequenziellen Einsatz der Wirkstoffe *in vitro* zu analysieren. Dazu könnten potentielle Arzneistoffkombinationen von TKI mit epigenetischen Modulatoren, wie z.B. 5-Azacytidin, bzw. neue Arzneistoffziele hinsichtlich einer Inhibition der hier identifizierten Signaltransduktion und Zelladhärenz getestet werden.

Bezüglich der hier identifizierten Rolle der miR-212/ABCG2-Achse in der Imatinib-Resistenz könnten in weiteren Experimenten mittels ChIP- und Western Blot-Analyse getestet werden, wie Imatinib die Expression der *miR-212* reguliert und welche Signalwege dabei involviert sind. Des Weiteren könnte die Durchführung von Interaktionsstudien und Luziferaseassays nützlich sein, um weitere Zielgene der miR-212 zu identifizieren, die an dem beobachteten Effekt beteiligt sein könnten.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der *Knockout* von *ZFP36L1* zu einer Reduktion der Apoptose- und der Proliferationsrate der CML-Zellen unter Imatinib-Behandlung führt. *ZFP36L1* vermittelt über die Bindung an ARE-mRNAs deren Degradation, so dass über Interaktionsstudien die direkten Ziel-mRNAs bzw. die Regulation der Expression von anti-apoptotischen Proteinen direkt nachgewiesen werden könnte. Außerdem könnte durch Western Blot- oder Phosphoproteom-Analysen weiterführend untersucht werden, welche Signalwege an diesem Effekt beteiligt sind. Daneben könnte ebenfalls geprüft werden, ob die *ZFP36L1*-Expression ebenfalls durch Methylierung reguliert wird.

Damit können mit den in dieser Arbeit gewonnenen neuen Erkenntnissen über die Entstehung von TKI-Resistenzen neue Therapieansätze generiert werden.

6 Zusammenfassung

Durch die Entdeckung der zielgerichteten Therapie mittels der Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) wurde die chronisch myeloische Leukämie (CML) von einer Neoplasie mit schlechter klinischer Prognose und hoher Mortalität zu der Modellerkrankung einer erfolgreichen gezielten onkologischen Therapie. Dennoch stellen Therapieresistenzen ein Problem bei der Behandlung mit TKIs, wie Imatinib oder Nilotinib, dar. Dabei geraten zunehmend die Mechanismen in den Fokus, die nicht durch Mutationen der BCR/ABL-Kinase zu erklären sind.

Ziel dieser Arbeit war es, Einblicke in BCR/ABL-unabhängige Resistenzmechanismen der Imatinib- und Nilotinib-Resistenz zu erhalten. Dazu wurde ein *in vitro*-Resistenzmodell der CML-Zelllinie K-562 etabliert und umfassend charakterisiert.

Zunächst wurde der Beitrag des Arzneistofftransporters ABCG2 sowie dessen potentielle Regulation durch die microRNA-212 untersucht. Hierbei konnte bestätigt werden, dass die Expression und Funktion von ABCG2 direkt durch microRNA-212 negativ beeinflusst wird. Die Inhibition von microRNA-212 durch anti-miR-212 bedingte dagegen eine erhöhte Imatinib-Sensitivität. Dieses konnte direkt in Zusammenhang mit einer Überexpression von ABCG2 und einer Zunahme des ABCG2-vermittelten Efflux gebracht werden. Diese Ergebnisse unterstützten die Hypothese, dass die miR-212/ABCG2-Achse zur Entwicklung der Imatinib-Resistenz beiträgt. Bei chronischer Exposition scheinen jedoch andere Adaptationsprozesse die Resistenz zu bedingen, da die Inhibition von microRNA-212 nicht zu einer veränderten Viabilität beitrug.

In einem weiteren experimentellen Ansatz konnte durch den *Knockout* der RNA-bindenden Proteine ZFP36L1 und ZFP36L2 durch CRISPR/Cas9-Genomeditierung ein Einfluss vor allem von ZFP36L1 in der Imatinib-Resistenz gezeigt werden. ZFP36L1-defizienten Zellen, sowie auch die Zellen des ZFP36L1/ZFP36L2-Doppel-Knockout wiesen eine verminderte Apoptoserate und Proliferation bei der Imatinib-Resistenzentwicklung auf. Daneben konnte für alle hier untersuchten *Knockout*-Zelllinien zusätzlich eine Veränderung der Zellmorphologie beobachtet werden.

Im dritten Teil dieser Arbeit wurden in einem hypothesenfreien Ansatz transkriptionelle, epigenetische und genetische Veränderungen während der Imatinib- und Nilotinib-Resistenz untersucht. Dabei wurden die Mechanismen der Resistenz bei verschiedenen Imatinib-Konzentrationen charakterisiert. Bei der Entwicklung von 0,5 μ M Imatinib-resistenten Zellen konnte eine Transkriptionsveränderung von 591 Genen beobachtet werden, die auf eine Adaption der Signaltransduktion und Zelladhärenz hindeutet. Im Verlauf der Imatinib-Resistenzentwicklung zu einer Konzentration von 2 μ M Imatinib konnten mit 91 differenziell exprimierten Genen nur geringe transkriptionelle Veränderungen festgestellt werden. Viel mehr deuteten hier genetische Aberrationen auf eine klonale Evolution und einen Verlust der genetischen Heterogenität der Zellen. Zusätzlich dazu konnte in epigenetischen Analysen eine Adaption der Methylierung von 1405 CpGs und 177 Genen in der Imatinib-Resistenz gezeigt werden.

In der hier ebenfalls untersuchten Nilotinib-Resistenz konnten Veränderungen der Expression von DNA-modifizierenden Proteinen beobachtet werden. Der Einfluss der Methylierung war hier mit 425 differenziell methylierten CpGs im Vergleich zu der Imatinib-Resistenz geringer und schien nur distinkte Gene zu betreffen. Im Vergleich beider TKI-Resistenzen wiesen beide TKIs zwar Gemeinsamkeiten in ihren Resistenzmechanismen auf, folgten jedoch weitgehend unterschiedlichen Mechanismen.

Mit diesen Analysen konnten Einblicke in die Mechanismen der BCR/ABL-unabhängigen Resistenz gegenüber zwei Tyrosinkinaseinhibitoren gewonnen werden, die zu einem besseren Verständnis beitragen und potentiell neue therapeutische Ansätze ermöglichen.

7 Summary

Since the development of targeted therapy and the use of tyrosine kinase inhibitors (TKI) in treatment of chronic myeloid leukemia (CML), this neoplasm emerged from poor prognosis and high mortality to a role model of successful targeted therapy in oncology. Nevertheless, therapy resistances are a major problem in treatment with TKIs, i.e. imatinib or nilotinib. Therefore further studies are of interest, focusing on resistance mechanisms occurring independently from modifications of the BCR/ABL-kinase.

The aim of this study was to get insights into BCR/ABL-independent mechanism of imatinib- and nilotinib-resistance. For this, an *in vitro*-resistance model of the CML cell line K-562 was established and analyzed comprehensively.

First, the role of the drug transporter ABCG2 and its potential regulation by the microRNA-212 was investigated. Inhibition of endogenous ABCG2-regulating miR-212 through anti-miR led to an increase of cell viability under imatinib-treatment indicating a direct impact of this miR on imatinib-susceptibility. This could be linked directly to an upregulation of ABCG2-expression and ABCG2-mediated efflux. Overall, this miR-212/ABCG2-axis might directly contribute to the development of imatinib-resistance. However, under chronic conditions, suppression of miR-212 did not lead to change of viability indicating other mechanisms of cell adaption.

Next, using a CRISPR/Cas9-derived knockout model of the RNA-binding proteins ZFP36L1 and ZFP36L2, an influence of especially ZFP36L1 in imatinib-resistance was observed. Cells lacking ZFP36L1, as well as double knockout cells had reduced apoptosis and proliferation rates during the development of imatinib-resistance. Furthermore, morphologic alterations were observed for all analyzed knockout cells.

Third, global transcriptional, epigenetic and genetic adaptations in imatinib- and nilotinib-resistance were analyzed. Here, the mechanisms underlying dose-dependent imatinib-resistance were characterized. During the development of 0.5 μ M imatinib-resistant cells, transcriptional expression changes of 591 genes was observed indicating adaption of signaling transduction and cell adhesion. During the course of imatinib-resistance to a concentration of 2 μ M imatinib, 91 differentially expressed genes pointed to minor

transcriptional adaptations. Instead, genetic aberrations indicated clonal evolution and loss of genetic heterogeneity in the cells. In addition, epigenetic analyses of imatinib-resistance revealed an adaptation of methylation of 1405 CpG associated to 177 differentially expressed genes.

In nilotinib-resistance transcriptional changes of DNA modifying proteins was seen. Differentially methylation of 425 CpG was observed, but seemed minor compared to imatinib resistance and be related to distinct genes. Comparing both TKI-resistances, some similarity in both resistances were observed, however these data indicated differential mechanisms of each TKI.

With these data, insights into the mechanisms underlying BCR/ABL-independent TKI-resistances were obtained. These could be helpful for a better understanding of CML-resistances and development of new therapy regimen.

8 Referenzen

1. Spiers, A.S., *The clinical features of chronic granulocytic leukaemia*. Clinics in haematology, 1977. **6**(1): p. 77-95.
2. Savage, D.G., R.M. Szydlo, and J.M. Goldman, *Clinical features at diagnosis in 430 patients with chronic myeloid leukaemia seen at a referral centre over a 16-year period*. British journal of haematology, 1997. **96**(1): p. 111-6.
3. Sawyers, C.L., *Chronic myeloid leukemia*. N Engl J Med, 1999. **340**(17): p. 1330-40.
4. Kantarjian, H.M., M.J. Keating, M. Talpaz, R.S. Walters, T.L. Smith, A. Cork, K.B. McCredie, and E.J. Freireich, *Chronic myelogenous leukemia in blast crisis. Analysis of 242 patients*. The American journal of medicine, 1987. **83**(3): p. 445-54.
5. Høglund, M., F. Sandin, and B. Simonsson, *Epidemiology of chronic myeloid leukaemia: an update*. Ann Hematol, 2015. **94 Suppl 2**: p. S241-7.
6. Rohrbacher, M. and J. Hasford, *Epidemiology of chronic myeloid leukaemia (CML)*. Best practice & research. Clinical haematology, 2009. **22**(3): p. 295-302.
7. Rowley, J.D., *Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining*. Nature, 1973. **243**(5405): p. 290-3.
8. Nowell, P.C. and D.A. Hungerford, *Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes*. Journal of the National Cancer Institute, 1960. **25**: p. 85-109.
9. Mughal, T.a.G., JM, *Chronic Myeloid Leukaemia*, in eLS. 2003.
10. Maru, Y. and O.N. Witte, *The BCR gene encodes a novel serine/threonine kinase activity within a single exon*. Cell, 1991. **67**(3): p. 459-68.
11. Diekmann, D., S. Brill, M.D. Garrett, N. Totty, J. Hsuan, C. Monfries, C. Hall, L. Lim, and A. Hall, *Bcr encodes a GTPase-activating protein for p21rac*. Nature, 1991. **351**(6325): p. 400-2.
12. Reddy, E.P. and A.K. Aggarwal, *The ins and outs of bcr-abl inhibition*. Genes & cancer, 2012. **3**(5-6): p. 447-54.
13. Quintas-Cardama, A. and J. Cortes, *Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia*. Blood, 2009. **113**(8): p. 1619-30.
14. Cilloni, D. and G. Saglio, *Molecular pathways: BCR-ABL*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(4): p. 930-7.
15. McCubrey, J.A., L.S. Steelman, S.L. Abrams, F.E. Bertrand, D.E. Ludwig, J. Basecke, M. Libra, F. Stivala, M. Milella, A. Tafuri, P. Lunghi, A. Bonati, and A.M. Martelli, *Targeting survival cascades induced by activation of Ras/Raf/MEK/ERK, PI3K/PTEN/Akt/mTOR and Jak/STAT pathways for effective leukemia therapy*. Leukemia, 2008. **22**(4): p. 708-22.
16. Bixby, D. and M. Talpaz, *Seeking the causes and solutions to imatinib-resistance in chronic myeloid leukemia*. Leukemia, 2011. **25**(1): p. 7-22.

17. O'Hare, T., M.S. Zabriskie, A.M. Eiring, and M.W. Deininger, *Pushing the limits of targeted therapy in chronic myeloid leukaemia*. Nature reviews. Cancer, 2012. **12**(8): p. 513-26.
18. Pendergast, A.M., L.A. Quilliam, L.D. Cripe, C.H. Bassing, Z. Dai, N. Li, A. Batzer, K.M. Rabun, C.J. Der, J. Schlessinger, and et al., *BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein*. Cell, 1993. **75**(1): p. 175-85.
19. Heisterkamp, N., K. Stam, J. Groffen, A. de Klein, and G. Grosveld, *Structural organization of the bcr gene and its role in the Ph' translocation*. Nature, 1985. **315**(6022): p. 758-61.
20. Cortez, D., G. Reuther, and A.M. Pendergast, *The Bcr-Abl tyrosine kinase activates mitogenic signaling pathways and stimulates G1-to-S phase transition in hematopoietic cells*. Oncogene, 1997. **15**(19): p. 2333-42.
21. Skorski, T., P. Kanakaraj, M. Nieborowska-Skorska, M.Z. Ratajczak, S.C. Wen, G. Zon, A.M. Gewirtz, B. Perussia, and B. Calabretta, *Phosphatidylinositol-3 kinase activity is regulated by BCR/ABL and is required for the growth of Philadelphia chromosome-positive cells*. Blood, 1995. **86**(2): p. 726-36.
22. Varticovski, L., G.Q. Daley, P. Jackson, D. Baltimore, and L.C. Cantley, *Activation of phosphatidylinositol 3-kinase in cells expressing abl oncogene variants*. Molecular and cellular biology, 1991. **11**(2): p. 1107-13.
23. Melo, J.V. and M.W. Deininger, *Biology of chronic myelogenous leukemia--signaling pathways of initiation and transformation*. Hematology/oncology clinics of North America, 2004. **18**(3): p. 545-68, vii-viii.
24. Sawyers, C.L., W. Callahan, and O.N. Witte, *Dominant negative MYC blocks transformation by ABL oncogenes*. Cell, 1992. **70**(6): p. 901-10.
25. Baccarani, M., M.W. Deininger, G. Rosti, A. Hochhaus, S. Soverini, J.F. Apperley, F. Cervantes, R.E. Clark, J.E. Cortes, F. Guilhot, H. Hjorth-Hansen, T.P. Hughes, H.M. Kantarjian, D.W. Kim, R.A. Larson, J.H. Lipton, F.X. Mahon, G. Martinelli, J. Mayer, M.C. Muller, D. Niederwieser, F. Pane, J.P. Radich, P. Rousselot, G. Saglio, S. Saussele, C. Schiffer, R. Silver, B. Simonsson, J.L. Steegmann, J.M. Goldman, and R. Hehlmann, *European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013*. Blood, 2013. **122**(6): p. 872-84.
26. Hamad, A., Z. Sahli, M. El Sabban, M. Mouteirik, and R. Nasr, *Emerging therapeutic strategies for targeting chronic myeloid leukemia stem cells*. Stem cells international, 2013. **2013**: p. 724360.
27. Hehlmann, R., *How I treat CML blast crisis*. Blood, 2012. **120**(4): p. 737-47.
28. Biggs, J.C., J. Szer, P. Crilley, K. Atkinson, K. Downs, A. Dodds, A.J. Concannon, B. Avalos, P. Tutschka, N. Kapoor, and et al., *Treatment of chronic myeloid leukemia with allogeneic bone marrow transplantation after preparation with BuCy2*. Blood, 1992. **80**(5): p. 1352-7.
29. Kantarjian, H.M., S. O'Brien, J.E. Cortes, J. Shan, F.J. Giles, M.B. Rios, S.H. Faderl, W.G. Wierda, A. Ferrajoli, S. Verstovsek, M.J. Keating, E.J. Freireich, and M. Talpaz,

- Complete cytogenetic and molecular responses to interferon-alpha-based therapy for chronic myelogenous leukemia are associated with excellent long-term prognosis.* Cancer, 2003. **97**(4): p. 1033-41.
30. Druker, B.J., F. Guilhot, S.G. O'Brien, I. Gathmann, H. Kantarjian, N. Gattermann, M.W. Deininger, R.T. Silver, J.M. Goldman, R.M. Stone, F. Cervantes, A. Hochhaus, B.L. Powell, J.L. Gabilove, P. Rousselot, J. Reiffers, J.J. Cornelissen, T. Hughes, H. Agis, T. Fischer, G. Verhoef, J. Shepherd, G. Saglio, A. Gratwohl, J.L. Nielsen, J.P. Radich, B. Simonsson, K. Taylor, M. Bacarani, C. So, L. Letvak, R.A. Larson, and I. Investigators, *Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia.* N Engl J Med, 2006. **355**(23): p. 2408-17.
 31. Heisterkamp, N., J.R. Stephenson, J. Groffen, P.F. Hansen, A. de Klein, C.R. Bartram, and G. Grosveld, *Localization of the c-ab1 oncogene adjacent to a translocation break point in chronic myelocytic leukaemia.* Nature, 1983. **306**(5940): p. 239-42.
 32. Druker, B.J., S. Tamura, E. Buchdunger, S. Ohno, G.M. Segal, S. Fanning, J. Zimmermann, and N.B. Lydon, *Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells.* Nature medicine, 1996. **2**(5): p. 561-6.
 33. O'Brien, S.G., F. Guilhot, R.A. Larson, I. Gathmann, M. Bacarani, F. Cervantes, J.J. Cornelissen, T. Fischer, A. Hochhaus, T. Hughes, K. Lechner, J.L. Nielsen, P. Rousselot, J. Reiffers, G. Saglio, J. Shepherd, B. Simonsson, A. Gratwohl, J.M. Goldman, H. Kantarjian, K. Taylor, G. Verhoef, A.E. Bolton, R. Capdeville, and B.J. Druker, *Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia.* The New England journal of medicine, 2003. **348**(11): p. 994-1004.
 34. Schmidli, H., B. Peng, G.J. Riviere, R. Capdeville, M. Hensley, I. Gathmann, A.E. Bolton, and A. Racine-Poon, *Population pharmacokinetics of imatinib mesylate in patients with chronic-phase chronic myeloid leukaemia: results of a phase III study.* British journal of clinical pharmacology, 2005. **60**(1): p. 35-44.
 35. Hahn, E.A., G.A. Glendenning, M.V. Sorensen, S.A. Hudgens, B.J. Druker, F. Guilhot, R.A. Larson, S.G. O'Brien, D.G. Dobrez, M.L. Hensley, and D. Cella, *Quality of life in patients with newly diagnosed chronic phase chronic myeloid leukemia on imatinib versus interferon alfa plus low-dose cytarabine: results from the IRIS Study.* Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 2003. **21**(11): p. 2138-46.
 36. Mahon, F.X., D. Rea, J. Guilhot, F. Guilhot, F. Huguet, F. Nicolini, L. Legros, A. Charbonnier, A. Guerci, B. Varet, G. Etienne, J. Reiffers, and P. Rousselot, *Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial.* The Lancet. Oncology, 2010. **11**(11): p. 1029-35.
 37. Ross, D.M., S. Branford, J.F. Seymour, A.P. Schwarzer, C. Arthur, P.A. Bartley, C. Slader, C. Field, P. Dang, R.J. Filshie, A.K. Mills, A.P. Grigg, J.V. Melo, and T.P. Hughes, *Patients with chronic myeloid leukemia who maintain a complete molecular response*

- after stopping imatinib treatment have evidence of persistent leukemia by DNA PCR.* Leukemia, 2010. **24**(10): p. 1719-24.
38. Russo, D., G. Martinelli, M. Malagola, C. Skert, S. Soverini, I. Iacobucci, A. De Vivo, N. Testoni, F. Castagnetti, G. Gugliotta, D. Turri, M. Bergamaschi, P. Pregno, E. Pungolino, F. Stagno, M. Breccia, B. Martino, T. Intermesoli, C. Fava, E. Abruzzese, M. Tiribelli, C. Bigazzi, B.M. Cesana, G. Rosti, and M. Baccharani, *Effects and outcome of a policy of intermittent imatinib treatment in elderly patients with chronic myeloid leukemia.* Blood, 2013. **121**(26): p. 5138-44.
39. Nagar, B., W.G. Bornmann, P. Pellicena, T. Schindler, D.R. Veach, W.T. Miller, B. Clarkson, and J. Kuriyan, *Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (STI-571).* Cancer Res, 2002. **62**(15): p. 4236-43.
40. Buchdunger, E., J. Zimmermann, H. Mett, T. Meyer, M. Muller, B.J. Druker, and N.B. Lydon, *Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative.* Cancer research, 1996. **56**(1): p. 100-4.
41. Heinrich, M.C., D.J. Griffith, B.J. Druker, C.L. Wait, K.A. Ott, and A.J. Zigler, *Inhibition of c-kit receptor tyrosine kinase activity by STI 571, a selective tyrosine kinase inhibitor.* Blood, 2000. **96**(3): p. 925-32.
42. Buchdunger, E., J. Zimmermann, H. Mett, T. Meyer, M. Muller, U. Regenass, and N.B. Lydon, *Selective inhibition of the platelet-derived growth factor signal transduction pathway by a protein-tyrosine kinase inhibitor of the 2-phenylaminopyrimidine class.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995. **92**(7): p. 2558-62.
43. Dewar, A.L., A.C. Cambareri, A.C. Zannettino, B.L. Miller, K.V. Doherty, T.P. Hughes, and A.B. Lyons, *Macrophage colony-stimulating factor receptor c-fms is a novel target of imatinib.* Blood, 2005. **105**(8): p. 3127-32.
44. Rosti, G., F. Palandri, F. Castagnetti, M. Breccia, L. Levato, G. Gugliotta, A. Capucci, M. Cedrone, C. Fava, T. Intermesoli, G.R. Cambrin, F. Stagno, M. Tiribelli, M. Amabile, S. Luatti, A. Poerio, S. Soverini, N. Testoni, G. Martinelli, G. Alimena, F. Pane, G. Saglio, and M. Baccharani, *Nilotinib for the frontline treatment of Ph(+) chronic myeloid leukemia.* Blood, 2009. **114**(24): p. 4933-8.
45. Puttini, M., A.M. Coluccia, F. Boschelli, L. Cleris, E. Marchesi, A. Donella-Deana, S. Ahmed, S. Redaelli, R. Piazza, V. Magistrini, F. Andreoni, L. Scapozza, F. Formelli, and C. Gambacorti-Passerini, *In vitro and in vivo activity of SKI-606, a novel Src-Abl inhibitor, against imatinib-resistant Bcr-Abl+ neoplastic cells.* Cancer research, 2006. **66**(23): p. 11314-22.
46. Eiring, A.M. and M.W. Deininger, *Individualizing kinase-targeted cancer therapy: the paradigm of chronic myeloid leukemia.* Genome biology, 2014. **15**(9): p. 461.
47. Haouala, A., N. Widmer, M.A. Duchosal, M. Montemurro, T. Buclin, and L.A. Decosterd, *Drug interactions with the tyrosine kinase inhibitors imatinib, dasatinib, and nilotinib.* Blood, 2011. **117**(8): p. e75-87.

48. Peng, B., P. Lloyd, and H. Schran, *Clinical pharmacokinetics of imatinib*. Clinical pharmacokinetics, 2005. **44**(9): p. 879-94.
49. Li, H. and B.B. Yang, *Friend or foe: the role of microRNA in chemotherapy resistance*. Acta Pharmacol Sin, 2013. **34**(7): p. 870-9.
50. Tauchi, T. and K. Ohyashiki, *Molecular mechanisms of resistance of leukemia to imatinib mesylate*. Leuk Res, 2004. **28 Suppl 1**: p. S39-45.
51. Litzow, M.R., *Imatinib resistance: obstacles and opportunities*. Arch Pathol Lab Med, 2006. **130**(5): p. 669-79.
52. O'Hare, T., C.A. Eide, and M.W. Deininger, *Bcr-Abl kinase domain mutations, drug resistance, and the road to a cure for chronic myeloid leukemia*. Blood, 2007. **110**(7): p. 2242-9.
53. Mahon, F.X., M.W. Deininger, B. Schultheis, J. Chabrol, J. Reiffers, J.M. Goldman, and J.V. Melo, *Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance*. Blood, 2000. **96**(3): p. 1070-9.
54. le Coutre, P., E. Tassi, M. Varella-Garcia, R. Barni, L. Mologni, G. Cabrita, E. Marchesi, R. Supino, and C. Gambacorti-Passerini, *Induction of resistance to the Abelson inhibitor STI571 in human leukemic cells through gene amplification*. Blood, 2000. **95**(5): p. 1758-66.
55. Gorre, M.E., M. Mohammed, K. Ellwood, N. Hsu, R. Paquette, P.N. Rao, and C.L. Sawyers, *Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification*. Science, 2001. **293**(5531): p. 876-80.
56. Leonard, G.D., T. Fojo, and S.E. Bates, *The role of ABC transporters in clinical practice*. Oncologist, 2003. **8**(5): p. 411-24.
57. Cascorbi, I., *Role of pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters in the pharmacokinetics of drugs*. Pharmacology & therapeutics, 2006. **112**(2): p. 457-73.
58. Beretta, G.L., G. Cassinelli, M. Pennati, V. Zuco, and L. Gatti, *Overcoming ABC transporter-mediated multidrug resistance: The dual role of tyrosine kinase inhibitors as multitargeting agents*. Eur J Med Chem, 2017. **142**: p. 271-289.
59. Hegedus, C., C. Ozveg-Laczka, A. Apati, M. Magocsi, K. Nemet, L. Orfi, G. Keri, M. Katona, Z. Takats, A. Varadi, G. Szakacs, and B. Sarkadi, *Interaction of nilotinib, dasatinib and bosutinib with ABCB1 and ABCG2: implications for altered anti-cancer effects and pharmacological properties*. Br J Pharmacol, 2009. **158**(4): p. 1153-64.
60. Anreddy, N., P. Gupta, R.J. Kathawala, A. Patel, J.N. Wurpel, and Z.S. Chen, *Tyrosine kinase inhibitors as reversal agents for ABC transporter mediated drug resistance*. Molecules (Basel, Switzerland), 2014. **19**(9): p. 13848-77.
61. Haimeur, A., G. Conseil, R.G. Deeley, and S.P. Cole, *The MRP-related and BCRP/ABCG2 multidrug resistance proteins: biology, substrate specificity and regulation*. Curr Drug Metab, 2004. **5**(1): p. 21-53.
62. Haenisch, S., A.N. Werk, and I. Cascorbi, *MicroRNAs and their relevance to ABC transporters*. Br J Clin Pharmacol, 2014. **77**(4): p. 587-96.

63. Mo, W. and J.T. Zhang, *Human ABCG2: structure, function, and its role in multidrug resistance*. Int J Biochem Mol Biol, 2012. **3**(1): p. 1-27.
64. Scharenberg, C.W., M.A. Harkey, and B. Torok-Storb, *The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors*. Blood, 2002. **99**(2): p. 507-12.
65. Li, W., H. Zhang, Y.G. Assaraf, K. Zhao, X. Xu, J. Xie, D.H. Yang, and Z.S. Chen, *Overcoming ABC transporter-mediated multidrug resistance: Molecular mechanisms and novel therapeutic drug strategies*. Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy, 2016. **27**: p. 14-29.
66. Mohammad, I.S., W. He, and L. Yin, *Understanding of human ATP binding cassette superfamily and novel multidrug resistance modulators to overcome MDR*. Biomed Pharmacother, 2018. **100**: p. 335-348.
67. You, G., M.E. Morris, and B. Wang, *Drug Transporters: Molecular Characterization and Role in Drug Disposition*. 2014: Wiley.
68. Mao, Q. and J.D. Unadkat, *Role of the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in drug transport--an update*. AAPS J, 2015. **17**(1): p. 65-82.
69. Thomas, J., L. Wang, R.E. Clark, and M. Pirmohamed, *Active transport of imatinib into and out of cells: implications for drug resistance*. Blood, 2004. **104**(12): p. 3739-45.
70. Kosztyu, P., R. Bukvova, P. Dolezel, and P. Mlejnek, *Resistance to daunorubicin, imatinib, or nilotinib depends on expression levels of ABCB1 and ABCG2 in human leukemia cells*. Chem Biol Interact, 2014. **219c**: p. 203-210.
71. Eadie, L.N., T.P. Hughes, and D.L. White, *ABCB1 Overexpression Is a Key Initiator of Resistance to Tyrosine Kinase Inhibitors in CML Cell Lines*. PloS one, 2016. **11**(8): p. e0161470.
72. Eadie, L.N., V.A. Saunders, T.P. Hughes, and D.L. White, *Degree of kinase inhibition achieved in vitro by imatinib and nilotinib is decreased by high levels of ABCB1 but not ABCG2*. Leukemia & lymphoma, 2013. **54**(3): p. 569-78.
73. Yamakawa, Y., A. Hamada, T. Uchida, D. Sato, M. Yuki, M. Hayashi, T. Kawaguchi, and H. Saito, *Distinct interaction of nilotinib and imatinib with P-Glycoprotein in intracellular accumulation and cytotoxicity in CML Cell Line K562 cells*. Biol Pharm Bull, 2014. **37**(8): p. 1330-5.
74. de Lima, L.T., D. Vivona, C.T. Bueno, R.D. Hirata, M.H. Hirata, A.D. Luchessi, F.A. de Castro, F.C.M. de Lourdes, M.A. Zanichelli, C.S. Chiattoni, V.T. Hungria, and E.M. Guerra-Shinohara, *Reduced ABCG2 and increased SLC22A1 mRNA expression are associated with imatinib response in chronic myeloid leukemia*. Med Oncol, 2014. **31**(3): p. 851.
75. Jordanides, N.E., H.G. Jorgensen, T.L. Holyoake, and J.C. Mountford, *Functional ABCG2 is overexpressed on primary CML CD34+ cells and is inhibited by imatinib mesylate*. Blood, 2006. **108**(4): p. 1370-3.
76. Turrini, E., S. Haenisch, S. Laechelt, T. Diewock, O. Bruhn, and I. Cascorbi, *MicroRNA profiling in K-562 cells under imatinib treatment: influence of miR-212 and miR-328 on ABCG2 expression*. Pharmacogenet Genomics, 2012. **22**(3): p. 198-205.

77. Gromicho, M., J. Dinis, M. Magalhaes, A.R. Fernandes, P. Tavares, A. Laires, J. Rueff, and A.S. Rodrigues, *Development of imatinib and dasatinib resistance: dynamics of expression of drug transporters ABCB1, ABCC1, ABCG2, MVP, and SLC22A1*. *Leukemia & lymphoma*, 2011. **52**(10): p. 1980-90.
78. Sharma, S.V. and J. Settleman, *Oncogene addiction: setting the stage for molecularly targeted cancer therapy*. *Genes & development*, 2007. **21**(24): p. 3214-31.
79. Cheung, H.H., T.L. Lee, O.M. Rennert, and W.Y. Chan, *DNA methylation of cancer genome*. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 2009. **87**(4): p. 335-50.
80. Moore, L.D., T. Le, and G. Fan, *DNA methylation and its basic function*. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 2013. **38**(1): p. 23-38.
81. Esteller, M., *Epigenetics in cancer*. *N Engl J Med*, 2008. **358**(11): p. 1148-59.
82. Trimarchi, M.P., M. Mouangsavanh, and T.H. Huang, *Cancer epigenetics: a perspective on the role of DNA methylation in acquired endocrine resistance*. *Chin J Cancer*, 2011. **30**(11): p. 749-56.
83. Ballestar, E. and M. Esteller, *Methyl-CpG-binding proteins in cancer: blaming the DNA methylation messenger*. *Biochem Cell Biol*, 2005. **83**(3): p. 374-84.
84. Bogdanovic, O. and G.J. Veenstra, *DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function*. *Chromosoma*, 2009. **118**(5): p. 549-65.
85. Robertson, K.D., *DNA methylation and human disease*. *Nat Rev Genet*, 2005. **6**(8): p. 597-610.
86. Brenet, F., M. Moh, P. Funk, E. Feierstein, A.J. Viale, N.D. Socci, and J.M. Scandura, *DNA methylation of the first exon is tightly linked to transcriptional silencing*. *PLoS One*, 2011. **6**(1): p. e14524.
87. Jin, B., Y. Li, and K.D. Robertson, *DNA methylation: superior or subordinate in the epigenetic hierarchy?* *Genes & cancer*, 2011. **2**(6): p. 607-17.
88. Medvedeva, Y.A., A.M. Khamis, I.V. Kulakovskiy, W. Ba-Alawi, M.S. Bhuyan, H. Kawaji, T. Lassmann, M. Harbers, A.R. Forrest, and V.B. Bajic, *Effects of cytosine methylation on transcription factor binding sites*. *BMC genomics*, 2014. **15**: p. 119.
89. Machova Polakova, K., J. Koblihova, and T. Stopka, *Role of epigenetics in chronic myeloid leukemia*. *Curr Hematol Malig Rep*, 2013. **8**(1): p. 28-36.
90. Heller, G., T. Topakian, C. Altenberger, S. Cerny-Reiterer, S. Herndlhofer, B. Ziegler, P. Datlinger, K. Byrgazov, C. Bock, C. Mannhalter, G. Hormann, W.R. Sperr, T. Lion, C.C. Zielinski, P. Valent, and S. Zochbauer-Muller, *Next-generation sequencing identifies major DNA methylation changes during progression of Ph+ chronic myeloid leukemia*. *Leukemia*, 2016. **30**(9): p. 1861-8.
91. Krutzfeldt, J., M.N. Poy, and M. Stoffel, *Strategies to determine the biological function of microRNAs*. *Nat Genet*, 2006. **38** **Suppl**: p. S14-9.
92. Kim, V.N., *MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005. **6**(5): p. 376-85.
93. Erson, A.E. and E.M. Petty, *miRNAs and cancer: New research developments and potential clinical applications*. *Cancer Biol Ther*, 2009. **8**(24): p. 2317-22.

94. Wilczynska, A. and M. Bushell, *The complexity of miRNA-mediated repression*. Cell death and differentiation, 2015. **22**(1): p. 22-33.
95. Zheng, T., J. Wang, X. Chen, and L. Liu, *Role of microRNA in anticancer drug resistance*. Int J Cancer, 2010. **126**(1): p. 2-10.
96. Korpál, M. and Y. Kang, *The emerging role of miR-200 family of microRNAs in epithelial-mesenchymal transition and cancer metastasis*. RNA Biol, 2008. **5**(3): p. 115-9.
97. Johnson, S.M., H. Grosshans, J. Shingara, M. Byrom, R. Jarvis, A. Cheng, E. Labourier, K.L. Reinert, D. Brown, and F.J. Slack, *RAS is regulated by the let-7 microRNA family*. Cell, 2005. **120**(5): p. 635-47.
98. O'Donnell, K.A., E.A. Wentzel, K.I. Zeller, C.V. Dang, and J.T. Mendell, *c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression*. Nature, 2005. **435**(7043): p. 839-43.
99. Zhao, H., D. Wang, W. Du, D. Gu, and R. Yang, *MicroRNA and leukemia: tiny molecule, great function*. Crit Rev Oncol Hematol, 2010. **74**(3): p. 149-55.
100. Shibuta, T., E. Honda, H. Shiotsu, Y. Tanaka, S. Vellasamy, M. Shiratsuchi, and T. Umemura, *Imatinib induces demethylation of miR-203 gene: an epigenetic mechanism of anti-tumor effect of imatinib*. Leuk Res, 2013. **37**(10): p. 1278-86.
101. Bruckmueller, H., P. Martin, M. Kaehler, S. Haenisch, M. Ostrowski, M. Drozdziak, W. Siegmund, I. Cascorbi, and S. Oswald, *Clinically relevant multidrug transporters are regulated by microRNAs along the human intestine*. Molecular pharmaceutics, 2017.
102. To, K.K., Z. Zhan, T. Litman, and S.E. Bates, *Regulation of ABCG2 expression at the 3' untranslated region of its mRNA through modulation of transcript stability and protein translation by a putative microRNA in the S1 colon cancer cell line*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(17): p. 5147-61.
103. Yang, T., Z.M. Zheng, X.N. Li, Z.F. Li, Y. Wang, Y.F. Geng, L. Bai, and X.B. Zhang, *MiR-223 modulates multidrug resistance via downregulation of ABCB1 in hepatocellular carcinoma cells*. Exp Biol Med (Maywood), 2013. **238**(9): p. 1024-32.
104. Li, D., Z. Li, J. Xiong, B. Gong, G. Zhang, C. Cao, Z. Jie, Y. Liu, Y. Cao, Y. Yan, H. Xiong, L. Qiu, M. Yang, H. Chen, S. Jiang, X. Yang, and H. Chen, *MicroRNA-212 functions as an epigenetic-silenced tumor suppressor involving in tumor metastasis and invasion of gastric cancer through down-regulating PXN expression*. American journal of cancer research, 2015. **5**(10): p. 2980-97.
105. Dou, C., Y. Wang, C. Li, Z. Liu, Y. Jia, Q. Li, W. Yang, Y. Yao, Q. Liu, and K. Tu, *MicroRNA-212 suppresses tumor growth of human hepatocellular carcinoma by targeting FOXA1*. Oncotarget, 2015. **6**(15): p. 13216-28.
106. Luo, X.J., D.G. Tang, T.L. Gao, Y.L. Zhang, M. Wang, Z.X. Quan, and J. Chen, *MicroRNA-212 Inhibits Osteosarcoma Cells Proliferation and Invasion by Down-Regulation of Sox4*. Cell Physiol Biochem, 2014. **34**: p. 2180-8.
107. Incoronato, M., M. Garofalo, L. Urso, G. Romano, C. Quintavalle, C. Zanca, M. Iaboni, G. Nuovo, C.M. Croce, and G. Condorelli, *miR-212 increases tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand sensitivity in non-small cell lung cancer by targeting the antiapoptotic protein PED*. Cancer Res, 2010. **70**(9): p. 3638-46.

108. Sun, S.M., V. Rockova, L. Bullinger, M.K. Dijkstra, H. Dohner, B. Lowenberg, and M. Jongen-Lavrencic, *The prognostic relevance of miR-212 expression with survival in cytogenetically and molecularly heterogeneous AML*. *Leukemia*, 2013. **27**(1): p. 100-6.
109. Pan, Y.Z., M.E. Morris, and A.M. Yu, *MicroRNA-328 negatively regulates the expression of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in human cancer cells*. *Mol Pharmacol*, 2009. **75**(6): p. 1374-9.
110. Luo, X., S. Yang, C. Zhou, F. Pan, Q. Li, and S. Ma, *MicroRNA-328 enhances cellular motility through posttranscriptional regulation of PTPRJ in human hepatocellular carcinoma*. *Onco Targets Ther*, 2015. **8**: p. 3159-67.
111. Wang, X. and Y. Xia, *microRNA-328 inhibits cervical cancer cell proliferation and tumorigenesis by targeting TCF7L2*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016. **475**(2): p. 169-75.
112. Liu, L., R. Chen, Y. Zhang, W. Fan, F. Xiao, and X. Yan, *Low expression of circulating microRNA-328 is associated with poor prognosis in patients with acute myeloid leukemia*. *Diagn Pathol*, 2015. **10**: p. 109.
113. Eiring, A.M., J.G. Harb, P. Neviani, C. Garton, J.J. Oaks, R. Spizzo, S. Liu, S. Schwind, R. Santhanam, C.J. Hickey, H. Becker, J.C. Chandler, R. Andino, J. Cortes, P. Hokland, C.S. Huettner, R. Bhatia, D.C. Roy, S.A. Liebhaber, M.A. Caligiuri, G. Marcucci, R. Garzon, C.M. Croce, G.A. Calin, and D. Perrotti, *miR-328 functions as an RNA decoy to modulate hnRNP E2 regulation of mRNA translation in leukemic blasts*. *Cell*, 2010. **140**(5): p. 652-65.
114. Baou, M., A. Jewell, and J.J. Murphy, *TIS11 family proteins and their roles in posttranscriptional gene regulation*. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2009. **2009**: p. 634520.
115. Khabar, K.S., *Hallmarks of cancer and AU-rich elements*. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, 2017. **8**(1).
116. Newman, R., J. McHugh, and M. Turner, *RNA binding proteins as regulators of immune cell biology*. *Clinical and experimental immunology*, 2016. **183**(1): p. 37-49.
117. Carrick, D.M. and P.J. Blackshear, *Comparative expression of tristetraprolin (TTP) family member transcripts in normal human tissues and cancer cell lines*. *Archives of biochemistry and biophysics*, 2007. **462**(2): p. 278-85.
118. Cao, H., J.S. Tuttle, and P.J. Blackshear, *Immunological characterization of tristetraprolin as a low abundance, inducible, stable cytosolic protein*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(20): p. 21489-99.
119. Shimada, H., H. Ichikawa, S. Nakamura, R. Katsu, M. Iwasa, I. Kitabayashi, and M. Ohki, *Analysis of genes under the downstream control of the t(8;21) fusion protein AML1-MTG8: overexpression of the TIS11b (ERF-1, cMG1) gene induces myeloid cell proliferation in response to G-CSF*. *Blood*, 2000. **96**(2): p. 655-63.
120. Ino, T., H. Yasui, M. Hirano, and Y. Kurosawa, *Identification of a member of the TIS11 early response gene family at the insertion point of a DNA fragment containing a gene for the T-cell receptor beta chain in an acute T-cell leukemia*. *Oncogene*, 1995. **11**(12): p. 2705-10.

121. Baou, M., A. Jewell, A. Muthurania, R.G. Wickremasinghe, K.L. Yong, R. Carr, P. Marsh, and J.J. Murphy, *Involvement of Tis11b, an AU-rich binding protein, in induction of apoptosis by rituximab in B cell chronic lymphocytic leukemia cells*. Leukemia, 2009. **23**(5): p. 986-9.
122. Decker, C.J. and R. Parker, *P-bodies and stress granules: possible roles in the control of translation and mRNA degradation*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. **4**(9): p. a012286.
123. Ciais, D., N. Cherradi, S. Bailly, E. Grenier, E. Berra, J. Pouyssegur, J. Lamarre, and J.J. Feige, *Destabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the zinc-finger protein TIS11b*. Oncogene, 2004. **23**(53): p. 8673-80.
124. Carballo, E., W.S. Lai, and P.J. Blackshear, *Feedback inhibition of macrophage tumor necrosis factor-alpha production by tristetraprolin*. Science, 1998. **281**(5379): p. 1001-5.
125. Brennan, S.E., Y. Kuwano, N. Alkharouf, P.J. Blackshear, M. Gorospe, and G.M. Wilson, *The mRNA-destabilizing protein tristetraprolin is suppressed in many cancers, altering tumorigenic phenotypes and patient prognosis*. Cancer research, 2009. **69**(12): p. 5168-76.
126. Lee, S.K., S.B. Kim, J.S. Kim, C.H. Moon, M.S. Han, B.J. Lee, D.K. Chung, Y.J. Min, J.H. Park, D.H. Choi, H.R. Cho, S.K. Park, and J.W. Park, *Butyrate response factor 1 enhances cisplatin sensitivity in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines*. International journal of cancer, 2005. **117**(1): p. 32-40.
127. Stumpo, D.J., H.E. Broxmeyer, T. Ward, S. Cooper, G. Hangoc, Y.J. Chung, W.C. Shelley, E.K. Richfield, M.K. Ray, M.C. Yoder, P.D. Aplan, and P.J. Blackshear, *Targeted disruption of Zfp36l2, encoding a CCCH tandem zinc finger RNA-binding protein, results in defective hematopoiesis*. Blood, 2009. **114**(12): p. 2401-10.
128. Vignudelli, T., T. Selmi, A. Martello, S. Parenti, A. Grande, C. Gemelli, T. Zanocco-Marani, and S. Ferrari, *ZFP36L1 negatively regulates erythroid differentiation of CD34+ hematopoietic stem cells by interfering with the Stat5b pathway*. Mol Biol Cell, 2010. **21**(19): p. 3340-51.
129. Galloway, A., A. Saveliev, S. Lukasiak, D.J. Hodson, D. Bolland, K. Balmanno, H. Ahlfors, E. Monzon-Casanova, S.C. Mannurita, L.S. Bell, S. Andrews, M.D. Diaz-Munoz, S.J. Cook, A. Corcoran, and M. Turner, *RNA-binding proteins ZFP36L1 and ZFP36L2 promote cell quiescence*. Science (New York, N.Y.), 2016. **352**(6284): p. 453-9.
130. Fulawka, L., P. Donizy, and A. Halon, *Cancer stem cells--the current status of an old concept: literature review and clinical approaches*. Biol Res, 2014. **47**: p. 66.
131. Yeh, A.C. and S. Ramaswamy, *Mechanisms of Cancer Cell Dormancy--Another Hallmark of Cancer?* Cancer research, 2015. **75**(23): p. 5014-22.
132. Bhatia, R., M. Holtz, N. Niu, R. Gray, D.S. Snyder, C.L. Sawyers, D.A. Arber, M.L. Slovak, and S.J. Forman, *Persistence of malignant hematopoietic progenitors in chronic myelogenous leukemia patients in complete cytogenetic remission following imatinib mesylate treatment*. Blood, 2003. **101**(12): p. 4701-7.

133. Corbin, A.S., A. Agarwal, M. Loriaux, J. Cortes, M.W. Deininger, and B.J. Druker, *Human chronic myeloid leukemia stem cells are insensitive to imatinib despite inhibition of BCR-ABL activity*. The Journal of clinical investigation, 2011. **121**(1): p. 396-409.
134. Hamilton, A., G.V. Helgason, M. Schemionek, B. Zhang, S. Myssina, E.K. Allan, F.E. Nicolini, C. Muller-Tidow, R. Bhatia, V.G. Brunton, S. Koschmieder, and T.L. Holyoake, *Chronic myeloid leukemia stem cells are not dependent on Bcr-Abl kinase activity for their survival*. Blood, 2012. **119**(6): p. 1501-10.
135. Graham, S.M., H.G. Jorgensen, E. Allan, C. Pearson, M.J. Alcorn, L. Richmond, and T.L. Holyoake, *Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro*. Blood, 2002. **99**(1): p. 319-25.
136. Zhu, X., Z. Lin, J. Du, X. Zhou, L. Yang, and G. Liu, *Studies on microRNAs that are correlated with the cancer stem cells in chronic myeloid leukemia*. Mol Cell Biochem, 2010.
137. Schmidt, M., J. Rinke, V. Schafer, S. Schnittger, A. Kohlmann, E. Obstfelder, C. Kunert, J. Ziermann, N. Winkelmann, E. Eigendorff, T. Haferlach, C. Haferlach, A. Hochhaus, and T. Ernst, *Molecular-defined clonal evolution in patients with chronic myeloid leukemia independent of the BCR-ABL status*. Leukemia, 2014. **28**(12): p. 2292-9.
138. Doudna, J.A. and E. Charpentier, *Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9*. Science (New York, N.Y.), 2014. **346**(6213): p. 1258096.
139. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods (San Diego, Calif.), 2001. **25**(4): p. 402-8.
140. Krzywinski, M., J. Schein, I. Birol, J. Connors, R. Gascoyne, D. Horsman, S.J. Jones, and M.A. Marra, *Circos: an information aesthetic for comparative genomics*. Genome research, 2009. **19**(9): p. 1639-45.
141. Kaehler, M., J. Ruenenapp, D. Gonnermann, I. Nagel, O. Bruhn, S. Haenisch, O. Ammerpohl, D. Wesch, I. Cascorbi, and H. Bruckmueller, *MicroRNA-212/ABC2-axis contributes to development of imatinib-resistance in leukemic cells*. Oncotarget, 2017. **8**(54): p. 92018-92031.
142. de Kogel, C.E. and J.H. Schellens, *Imatinib*. Oncologist, 2007. **12**(12): p. 1390-4.
143. Picard, S., K. Titier, G. Etienne, E. Teilhet, D. Ducint, M.A. Bernard, R. Lassalle, G. Marit, J. Reiffers, B. Begaud, N. Moore, M. Molimard, and F.X. Mahon, *Trough imatinib plasma levels are associated with both cytogenetic and molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia*. Blood, 2007. **109**(8): p. 3496-9.
144. Leveque, D. and F. Maloisel, *Clinical pharmacokinetics of imatinib mesylate*. In vivo (Athens, Greece), 2005. **19**(1): p. 77-84.
145. Peng, B., M. Hayes, D. Resta, A. Racine-Poon, B.J. Druker, M. Talpaz, C.L. Sawyers, M. Rosamilia, J. Ford, P. Lloyd, and R. Capdeville, *Pharmacokinetics and*

- pharmacodynamics of imatinib in a phase I trial with chronic myeloid leukemia patients.* Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 2004. **22**(5): p. 935-42.
146. Cortes, J.E., M.J. Egorin, F. Guilhot, M. Molimard, and F.X. Mahon, *Pharmacokinetic/pharmacodynamic correlation and blood-level testing in imatinib therapy for chronic myeloid leukemia.* Leukemia, 2009. **23**(9): p. 1537-44.
147. Wilkinson, G.R., *Drug metabolism and variability among patients in drug response.* The New England journal of medicine, 2005. **352**(21): p. 2211-21.
148. Chung, Y.J., T.M. Kim, D.W. Kim, H. Namkoong, H.K. Kim, S.A. Ha, S. Kim, S.M. Shin, J.H. Kim, Y.J. Lee, H.M. Kang, and J.W. Kim, *Gene expression signatures associated with the resistance to imatinib.* Leukemia, 2006. **20**(9): p. 1542-50.
149. Kim, T.M., S.A. Ha, H.K. Kim, J. Yoo, S. Kim, S.H. Yim, S.H. Jung, D.W. Kim, Y.J. Chung, and J.W. Kim, *Gene expression signatures associated with the in vitro resistance to two tyrosine kinase inhibitors, nilotinib and imatinib.* Blood Cancer J, 2011. **1**(8): p. e32.
150. Nishioka, C., T. Ikezoe, J. Yang, A. Nobumoto, M. Tsuda, and A. Yokoyama, *Downregulation of miR-217 correlates with resistance of Ph(+) leukemia cells to ABL tyrosine kinase inhibitors.* Cancer Sci, 2014. **105**(3): p. 297-307.
151. Clarke, C.J. and T.L. Holyoake, *Preclinical approaches in chronic myeloid leukemia: from cells to systems.* Experimental hematology, 2017. **47**: p. 13-23.
152. Brendel, C., C. Scharenberg, M. Dohse, R.W. Robey, S.E. Bates, S. Shukla, S.V. Ambudkar, Y. Wang, G. Wennemuth, A. Burchert, U. Boudriot, and A. Neubauer, *Imatinib mesylate and nilotinib (AMN107) exhibit high-affinity interaction with ABCG2 on primitive hematopoietic stem cells.* Leukemia, 2007. **21**(6): p. 1267-75.
153. Jelinek, J., V. Gharibyan, M.R. Estecio, K. Kondo, R. He, W. Chung, Y. Lu, N. Zhang, S. Liang, H.M. Kantarjian, J.E. Cortes, and J.P. Issa, *Aberrant DNA methylation is associated with disease progression, resistance to imatinib and shortened survival in chronic myelogenous leukemia.* PLoS One, 2011. **6**(7): p. e22110.
154. Celik, S., D. Akcora, T. Ozkan, N. Varol, S. Aydos, and A. Sunguroglu, *Methylation analysis of the DAPK1 gene in imatinib-resistant chronic myeloid leukemia patients.* Oncol Lett, 2015. **9**(1): p. 399-404.
155. Smirnikhina, S.A., A.V. Lavrov, E.Y. Chelysheva, E.P. Adilgereeva, O.A. Shukhov, A. Turkina, and S.I. Kutsev, *Whole-exome sequencing reveals potential molecular predictors of relapse after discontinuation of the targeted therapy in chronic myeloid leukemia patients.* Leuk Lymphoma, 2016. **57**(7): p. 1669-76.
156. Haenisch, S., S. Laechelt, H. Bruckmueller, A. Werk, A. Noack, O. Bruhn, C. Remmler, and I. Cascorbi, *Down-regulation of ATP-binding cassette C2 protein expression in HepG2 cells after rifampicin treatment is mediated by microRNA-379.* Mol Pharmacol, 2011. **80**(2): p. 314-20.
157. Jin, H.Y., A. Gonzalez-Martin, A.V. Miletic, M. Lai, S. Knight, M. Sabouri-Ghomi, S.R. Head, M.S. Macauley, R.C. Rickert, and C. Xiao, *Transfection of microRNA Mimics Should Be Used with Caution.* Frontiers in Genetics, 2015. **6**.

158. Lu, L., X. Zhang, B. Zhang, and J. Wu, *Synaptic acetylcholinesterase targeted by microRNA-212 functions as a tumor suppressor in non-small cell lung cancer*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2013. **45**(11): p. 2530-40.
159. Pede, V., A. Rombout, J. Vermeire, E. Naessens, P. Mestdagh, N. Robberecht, H. Vanderstraeten, N. Van Roy, J. Vandesompele, F. Speleman, J. Philippe, and B. Verhasselt, *CLL cells respond to B-Cell receptor stimulation with a microRNA/mRNA signature associated with MYC activation and cell cycle progression*. *PLoS One*, 2013. **8**(4): p. e60275.
160. Mehta, A., M. Mann, J.L. Zhao, G.K. Marinov, D. Majumdar, Y. Garcia-Flores, X. Du, E. Erikci, K. Chowdhury, and D. Baltimore, *The microRNA-212/132 cluster regulates B cell development by targeting Sox4*. *The Journal of experimental medicine*, 2015. **212**(10): p. 1679-92.
161. Tavolaro, S., T. Colombo, S. Chiaretti, N. Peragine, V. Fulci, M.R. Ricciardi, M. Messina, S. Bonina, F. Brugnoletti, M. Marinelli, V. Di Maio, F.R. Mauro, I. Del Giudice, G. Macino, R. Foa, and A. Guarini, *Increased chronic lymphocytic leukemia proliferation upon IgM stimulation is sustained by the upregulation of miR-132 and miR-212*. *Genes, chromosomes & cancer*, 2015. **54**(4): p. 222-34.
162. Ma, H., S. Mallampati, Y. Lu, B. Sun, E. Wang, X. Leng, Y. Gong, H. Shen, C.C. Yin, D. Jones, H.M. Amin, M.J. You, P. Zweidler-McKay, Y. Ma, H.M. Kantarjian, R.B. Arlinghaus, A. Glassman, and X. Sun, *The Sox4/Tcf7l1 axis promotes progression of BCR-ABL-positive acute lymphoblastic leukemia*. *Haematologica*, 2014. **99**(10): p. 1591-8.
163. Litman, T., M. Brangi, E. Hudson, P. Fetsch, A. Abati, D.D. Ross, K. Miyake, J.H. Resau, and S.E. Bates, *The multidrug-resistant phenotype associated with overexpression of the new ABC half-transporter, MXR (ABCG2)*. *Journal of cell science*, 2000. **113** (Pt **11**): p. 2011-21.
164. Nakatomi, K., M. Yoshikawa, M. Oka, Y. Ikegami, S. Hayasaka, K. Sano, K. Shiozawa, S. Kawabata, H. Soda, T. Ishikawa, S. Tanabe, and S. Kohno, *Transport of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) by breast cancer resistance protein ABCG2 in human lung cancer cells*. *Biochemical and biophysical research communications*, 2001. **288**(4): p. 827-32.
165. Shang, Y., Z. Zhang, Z. Liu, B. Feng, G. Ren, K. Li, L. Zhou, Y. Sun, M. Li, J. Zhou, Y. An, K. Wu, Y. Nie, and D. Fan, *miR-508-5p regulates multidrug resistance of gastric cancer by targeting ABCB1 and ZNRD1*. *Oncogene*, 2014. **33**(25): p. 3267-76.
166. Xu, Y., S.J. Ohms, Z. Li, Q. Wang, G. Gong, Y. Hu, Z. Mao, M.F. Shannon, and J.Y. Fan, *Changes in the expression of miR-381 and miR-495 are inversely associated with the expression of the MDR1 gene and development of multi-drug resistance*. *PLoS One*, 2013. **8**(11): p. e82062.
167. Eadie, L.N., P. Dang, V.A. Saunders, D.T. Yeung, M.P. Osborn, A.P. Grigg, T.P. Hughes, and D.L. White, *The clinical significance of ABCB1 overexpression in predicting outcome of CML patients undergoing first-line imatinib treatment*. *Leukemia*, 2017. **31**(1): p. 75-82.

168. Bruhn, O., K. Drerup, M. Kaehler, S. Haenisch, C. Roder, and I. Cascorbi, *Length variants of the ABCB1 3' UTR and loss of miRNA binding sites: possible consequences in regulation and pharmacotherapy resistance*. Pharmacogenomics, 2016. **17**(4): p. 327-40.
169. Montor, W.R., A. Salas, and F.H.M. Melo, *Receptor tyrosine kinases and downstream pathways as druggable targets for cancer treatment: the current arsenal of inhibitors*. Mol Cancer, 2018. **17**(1): p. 55.
170. Hodson, D.J., M.L. Janas, A. Galloway, S.E. Bell, S. Andrews, C.M. Li, R. Pannell, C.W. Siebel, H.R. MacDonald, K. De Keersmaecker, A.A. Ferrando, G. Grutz, and M. Turner, *Deletion of the RNA-binding proteins ZFP36L1 and ZFP36L2 leads to perturbed thymic development and T lymphoblastic leukemia*. Nature immunology, 2010. **11**(8): p. 717-24.
171. Iwanaga, E., T. Nanri, H. Mitsuya, and N. Asou, *Mutation in the RNA binding protein TIS11D/ZFP36L2 is associated with the pathogenesis of acute leukemia*. International journal of oncology, 2011. **38**(1): p. 25-31.
172. Bloh, K.M., P.A. Bialk, A. Gopalakrishnapillai, E.A. Kolb, and E.B. Kmiec, *CRISPR/Cas9-Directed Reassignment of the GATA1 Initiation Codon in K562 Cells to Recapitulate AML in Down Syndrome*. Mol Ther Nucleic Acids, 2017. **7**: p. 288-298.
173. Brabetz, O., V. Alla, L. Angenendt, C. Schliemann, W.E. Berdel, M.F. Arteaga, and J.H. Mikesch, *RNA-Guided CRISPR-Cas9 System-Mediated Engineering of Acute Myeloid Leukemia Mutations*. Mol Ther Nucleic Acids, 2017. **6**: p. 243-248.
174. Calabretta, B. and D. Perrotti, *The biology of CML blast crisis*. Blood, 2004. **103**(11): p. 4010-22.
175. Lykke-Andersen, J. and E. Wagner, *Recruitment and activation of mRNA decay enzymes by two ARE-mediated decay activation domains in the proteins TTP and BRF-1*. Genes Dev, 2005. **19**(3): p. 351-61.
176. Franks, T.M. and J. Lykke-Andersen, *TTP and BRF proteins nucleate processing body formation to silence mRNAs with AU-rich elements*. Genes Dev, 2007. **21**(6): p. 719-35.
177. Lai, W.S., E. Carballo, J.M. Thorn, E.A. Kennington, and P.J. Blackshear, *Interactions of CCCH zinc finger proteins with mRNA. Binding of tristetraprolin-related zinc finger proteins to Au-rich elements and destabilization of mRNA*. J Biol Chem, 2000. **275**(23): p. 17827-37.
178. Lai, W.S., E.A. Kennington, and P.J. Blackshear, *Interactions of CCCH zinc finger proteins with mRNA: non-binding tristetraprolin mutants exert an inhibitory effect on degradation of AU-rich element-containing mRNAs*. J Biol Chem, 2002. **277**(11): p. 9606-13.
179. Zekavati, A., A. Nasir, A. Alcaraz, M. Aldrovandi, P. Marsh, J.D. Norton, and J.J. Murphy, *Post-transcriptional regulation of BCL2 mRNA by the RNA-binding protein ZFP36L1 in malignant B cells*. PloS one, 2014. **9**(7): p. e102625.
180. Schiavone, N., P. Rosini, A. Quattrone, M. Donnini, A. Lapucci, L. Citti, A. Bevilacqua, A. Nicolini, and S. Capaccioli, *A conserved AU-rich element in the 3' untranslated*

- region of bcl-2 mRNA is endowed with a destabilizing function that is involved in bcl-2 down-regulation during apoptosis.* FASEB J, 2000. **14**(1): p. 174-84.
181. Kuzelova, K., M. Pluskalova, D. Grebenova, K. Pavlaskova, P. Halada, and Z. Hrkal, *Changes in cell adhesivity and cytoskeleton-related proteins during imatinib-induced apoptosis of leukemic JURL-MK1 cells.* J Cell Biochem, 2010. **111**(6): p. 1413-25.
182. Ovcharenko, A., G. Granot, O.H. Rokah, J. Park, O. Shpilberg, and P. Raanani, *Enhanced adhesion/migration and induction of Pyk2 expression in K562 cells following imatinib exposure.* Leuk Res, 2013. **37**(12): p. 1729-36.
183. Chen, Z., E. Lessey, M.E. Berginski, L. Cao, J. Li, X. Trepatt, M. Itano, S.M. Gomez, M. Kapustina, C. Huang, K. Burrige, G. Truskey, and K. Jacobson, *Gleevec, an Abl family inhibitor, produces a profound change in cell shape and migration.* PLoS One, 2013. **8**(1): p. e52233.
184. Jacquel, A., M. Herrant, L. Legros, N. Belhacene, F. Luciano, G. Pages, P. Hofman, and P. Auberger, *Imatinib induces mitochondria-dependent apoptosis of the Bcr-Abl-positive K562 cell line and its differentiation toward the erythroid lineage.* Faseb J, 2003. **17**(14): p. 2160-2.
185. Kuzelova, K., D. Grebenova, I. Marinov, and Z. Hrkal, *Fast apoptosis and erythroid differentiation induced by imatinib mesylate in JURL-MK1 cells.* J Cell Biochem, 2005. **95**(2): p. 268-80.
186. Sanduja, S., F.F. Blanco, and D.A. Dixon, *The roles of TTP and BRF proteins in regulated mRNA decay.* Wiley interdisciplinary reviews. RNA, 2011. **2**(1): p. 42-57.
187. Suk, F.M., C.C. Chang, R.J. Lin, S.Y. Lin, S.C. Liu, C.F. Jau, and Y.C. Liang, *ZFP36L1 and ZFP36L2 inhibit cell proliferation in a cyclin D-dependent and p53-independent manner.* Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 2742.
188. Nakamura-Ishizu, A., H. Takizawa, and T. Suda, *The analysis, roles and regulation of quiescence in hematopoietic stem cells.* Development, 2014. **141**(24): p. 4656-66.
189. Scholzen, T. and J. Gerdes, *The Ki-67 protein: from the known and the unknown.* J Cell Physiol, 2000. **182**(3): p. 311-22.
190. Benito, R., E. Lumbreras, M. Abaigar, N.C. Gutierrez, M. Delgado, C. Robledo, J.L. Garcia, A.E. Rodriguez-Vicente, M.C. Canizo, and J.M. Rivas, *Imatinib therapy of chronic myeloid leukemia restores the expression levels of key genes for DNA damage and cell-cycle progression.* Pharmacogenetics and genomics, 2012. **22**(5): p. 381-8.
191. Martincorena, I., K.M. Raine, M. Gerstung, K.J. Dawson, K. Haase, P. Van Loo, H. Davies, M.R. Stratton, and P.J. Campbell, *Universal Patterns of Selection in Cancer and Somatic Tissues.* Cell, 2018. **173**(7): p. 1823.
192. Vialle-Castellano, A., B. Gaugler, M. Mohty, D. Isnardon, N. van Baren, and D. Olive, *Abundant expression of fibronectin is a major feature of leukemic dendritic cells differentiated from patients with acute myeloid leukemia.* Leukemia, 2004. **18**(3): p. 426-33.
193. Niemann, C.U., L. Kjeldsen, E. Ralfkiaer, M.K. Jensen, and N. Borregaard, *Serglycin proteoglycan in hematologic malignancies: a marker of acute myeloid leukemia.* Leukemia, 2007. **21**(12): p. 2406-10.

194. Wagner, A.K., N. Kadri, J. Snall, P. Brodin, S. Gilfillan, M. Colonna, G. Bernhardt, P. Hoglund, K. Karre, and B.J. Chambers, *Expression of CD226 is associated to but not required for NK cell education*. Nat Commun, 2017. **8**: p. 15627.
195. Torelli, G.F., N. Peragine, S. Raponi, D. Pagliara, M.S. De Propriis, A. Vitale, A. Bertaina, W. Barberi, L. Moretta, G. Basso, A. Santoni, A. Guarini, F. Locatelli, and R. Foa, *Recognition of adult and pediatric acute lymphoblastic leukemia blasts by natural killer cells*. Haematologica, 2014. **99**(7): p. 1248-54.
196. Weisberg, E., P.W. Manley, S.W. Cowan-Jacob, A. Hochhaus, and J.D. Griffin, *Second generation inhibitors of BCR-ABL for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(5): p. 345-56.
197. Bruennert, D., A. Czibere, I. Bruns, R. Kronenwett, N. Gattermann, R. Haas, and F. Neumann, *Early in vivo changes of the transcriptome in Philadelphia chromosome-positive CD34+ cells from patients with chronic myelogenous leukaemia following imatinib therapy*. Leukemia, 2009. **23**(5): p. 983-5.
198. Kumar, A., J. Bhattacharyya, and B.G. Jaganathan, *Adhesion to stromal cells mediates imatinib resistance in chronic myeloid leukemia through ERK and BMP signaling pathways*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 9535.
199. Sakurama, K., K. Noma, M. Takaoka, Y. Tomono, N. Watanabe, S. Hatakeyama, O. Ohmori, S. Hirota, T. Motoki, Y. Shirakawa, T. Yamatsuji, M. Haisa, J. Matsuoka, N. Tanaka, and Y. Naomoto, *Inhibition of focal adhesion kinase as a potential therapeutic strategy for imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor*. Mol Cancer Ther, 2009. **8**(1): p. 127-34.
200. Hao, H., Y. Naomoto, X. Bao, N. Watanabe, K. Sakurama, K. Noma, T. Motoki, Y. Tomono, T. Fukazawa, Y. Shirakawa, T. Yamatsuji, J. Matsuoka, Z.G. Wang, and M. Takaoka, *Focal adhesion kinase as potential target for cancer therapy (Review)*. Oncol Rep, 2009. **22**(5): p. 973-9.
201. Tan, F., H. Zhu, Y. Tao, N. Yu, Q. Pei, H. Liu, Y. Zhou, H. Xu, X. Song, Y. Li, Z. Zhou, X. He, X. Zhang, and H. Pei, *Neuron navigator 2 overexpression indicates poor prognosis of colorectal cancer and promotes invasion through the SSH1L/cofilin-1 pathway*. Journal of experimental & clinical cancer research : CR, 2015. **34**: p. 117.
202. Shetzline, S.E., R. Rallapalli, K.J. Dowd, S. Zou, Y. Nakata, C.R. Swider, A. Kalota, J.K. Choi, and A.M. Gewirtz, *Neuromedin U: a Myb-regulated autocrine growth factor for human myeloid leukemias*. Blood, 2004. **104**(6): p. 1833-40.
203. Brown, F.C., P. Cifani, E. Drill, J. He, E. Still, S. Zhong, S. Balasubramanian, D. Pavlick, B. Yilmazel, K.M. Knapp, T.A. Alonzo, S. Meshinchi, R.M. Stone, S.M. Kornblau, G. Marcucci, A.S. Gamis, J.C. Byrd, M. Gonen, R.L. Levine, and A. Kentsis, *Genomics of primary chemoresistance and remission induction failure in paediatric and adult acute myeloid leukaemia*. British journal of haematology, 2017. **176**(1): p. 86-91.
204. Neumann, M., S. Vosberg, C. Schlee, S. Heesch, S. Schwartz, N. Gokbuget, D. Hoelzer, A. Graf, S. Krebs, I. Bartram, H. Blum, M. Bruggemann, J. Hecht, S.K. Bohlander, P.A. Greif, and C.D. Baldus, *Mutational spectrum of adult T-ALL*. Oncotarget, 2015. **6**(5): p. 2754-66.

205. Murali, R., R. Chandramohan, I. Moller, S.L. Scholz, M. Berger, K. Huberman, A. Viale, M. Pirun, N.D. Socci, N. Bouvier, S. Bauer, M. Arlt, B. Schilling, T. Schimming, A. Sucker, B. Schwindenhammer, F. Grabellus, M.R. Speicher, J. Schaller, U. Hillen, D. Schadendorf, T. Mentzel, D.T. Cheng, T. Wiesner, and K.G. Griewank, *Targeted massively parallel sequencing of angiosarcomas reveals frequent activation of the mitogen activated protein kinase pathway*. *Oncotarget*, 2015. **6**(34): p. 36041-52.
206. Yao, Z., K. Darowski, N. St-Denis, V. Wong, F. Offensperger, A. Villedieu, S. Amin, R. Maly, H. Aoki, H. Guo, Y. Xu, C. Iorio, M. Kotlyar, A. Emili, I. Jurisica, B.G. Neel, M. Babu, A.C. Gingras, and I. Stagljar, *A Global Analysis of the Receptor Tyrosine Kinase-Protein Phosphatase Interactome*. *Molecular cell*, 2017. **65**(2): p. 347-360.
207. Reuven, N., J. Adler, Z. Porat, T. Polonio-Vallon, T.G. Hofmann, and Y. Shaul, *The Tyrosine Kinase c-Abl Promotes Homeodomain-interacting Protein Kinase 2 (HIPK2) Accumulation and Activation in Response to DNA Damage*. *The Journal of biological chemistry*, 2015. **290**(27): p. 16478-88.
208. Zoubir, M., T. Tursz, C. Menard, L. Zitvogel, and N. Chaput, *Imatinib mesylate (Gleevec): targeted therapy against cancer with immune properties*. *Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets*, 2010. **10**(1): p. 1-7.
209. Zitvogel, L., S. Rusakiewicz, B. Routy, M. Ayyoub, and G. Kroemer, *Immunological off-target effects of imatinib*. *Nature reviews. Clinical oncology*, 2016. **13**(7): p. 431-46.
210. Klein, E., H. Ben-Bassat, H. Neumann, P. Ralph, J. Zeuthen, A. Polliack, and F. Vanky, *Properties of the K562 cell line, derived from a patient with chronic myeloid leukemia*. *Int J Cancer*, 1976. **18**(4): p. 421-31.
211. Dean, A., F. Erard, A.P. Schneider, and A.N. Schechter, *Induction of hemoglobin accumulation in human K562 cells by hemin is reversible*. *Science*, 1981. **212**(4493): p. 459-61.
212. Seigneurin, D., P. Champelovier, G. Mouchiroud, R. Berthier, D. Leroux, M. Prenant, J. McGregor, J. Starck, F. Morle, C. Micouin, and et al., *Human chronic myeloid leukemic cell line with positive Philadelphia chromosome exhibits megakaryocytic and erythroid characteristics*. *Exp Hematol*, 1987. **15**(8): p. 822-32.
213. Forbes, S.A., D. Beare, P. Gunasekaran, K. Leung, N. Bindal, H. Boutselakis, M. Ding, S. Bamford, C. Cole, S. Ward, C.Y. Kok, M. Jia, T. De, J.W. Teague, M.R. Stratton, U. McDermott, and P.J. Campbell, *COSMIC: exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer*. *Nucleic acids research*, 2015. **43**(Database issue): p. D805-11.
214. Meynert, A.M., M. Ansari, D.R. FitzPatrick, and M.S. Taylor, *Variant detection sensitivity and biases in whole genome and exome sequencing*. *BMC bioinformatics*, 2014. **15**: p. 247.
215. O'Dwyer, M.E., M.J. Mauro, G. Kurilik, M. Mori, S. Balleisen, S. Olson, E. Magenis, R. Capdeville, and B.J. Druker, *The impact of clonal evolution on response to imatinib mesylate (STI571) in accelerated phase CML*. *Blood*, 2002. **100**(5): p. 1628-33.
216. Cortes, J. and M.E. O'Dwyer, *Clonal evolution in chronic myelogenous leukemia*. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2004. **18**(3): p. 671-84, x.

217. Yogarajah, M., N. Montgomery, M. Matson, L. Blanchard, C. Frank, S. Gallagher, K. Pepin, L. Vaught, B. Muluneh, M.C. Foster, and J.F. Zeidner, *Clonal evolution of Philadelphia chromosome in acute myeloid leukemia after azacitidine treatment*. *Leuk Lymphoma*, 2018: p. 1-3.
218. Alexandrov, L.B. and M.R. Stratton, *Mutational signatures: the patterns of somatic mutations hidden in cancer genomes*. *Curr Opin Genet Dev*, 2014. **24**: p. 52-60.
219. Adamson, B., A. Smogorzewska, F.D. Sigoillot, R.W. King, and S.J. Elledge, *A genome-wide homologous recombination screen identifies the RNA-binding protein RBMX as a component of the DNA-damage response*. *Nat Cell Biol*, 2012. **14**(3): p. 318-28.
220. Matsunaga, S., H. Takata, A. Morimoto, K. Hayashihara, T. Higashi, K. Akatsuchi, E. Mizusawa, M. Yamakawa, M. Ashida, T.M. Matsunaga, T. Azuma, S. Uchiyama, and K. Fukui, *RBMX: a regulator for maintenance and centromeric protection of sister chromatid cohesion*. *Cell Rep*, 2012. **1**(4): p. 299-308.
221. Vater, I., F. Wagner, M. Kreuz, H. Berger, J.I. Martin-Subero, C. Pott, J.A. Martinez-Climent, W. Klapper, K. Krause, M.J. Dyer, S. Gesk, L. Harder, A. Zamo, M. Dreyling, D. Hasenclever, N. Arnold, and R. Siebert, *GeneChip analyses point to novel pathogenetic mechanisms in mantle cell lymphoma*. *British journal of haematology*, 2009. **144**(3): p. 317-31.
222. Bhat, K.M. and V. Setaluri, *Microtubule-associated proteins as targets in cancer chemotherapy*. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 2007. **13**(10): p. 2849-54.
223. Shaker, M.E., A. Ghani, G.E. Shiha, T.M. Ibrahim, and W.Z. Mehal, *Nilotinib induces apoptosis and autophagic cell death of activated hepatic stellate cells via inhibition of histone deacetylases*. *Biochimica et biophysica acta*, 2013. **1833**(8): p. 1992-2003.
224. Fiskus, W., M. Pranpat, P. Bali, M. Balasis, S. Kumaraswamy, S. Boyapalle, K. Rocha, J. Wu, F. Giles, P.W. Manley, P. Atadja, and K. Bhalla, *Combined effects of novel tyrosine kinase inhibitor AMN107 and histone deacetylase inhibitor LBH589 against Bcr-Abl-expressing human leukemia cells*. *Blood*, 2006. **108**(2): p. 645-52.
225. Rothbart, S.B. and B.D. Strahl, *Interpreting the language of histone and DNA modifications*. *Biochimica et biophysica acta*, 2014. **1839**(8): p. 627-43.
226. Singh, R.K., D. Liang, U.R. Gajjalaiahvari, M.H. Kabbaj, J. Paik, and A. Gunjan, *Excess histone levels mediate cytotoxicity via multiple mechanisms*. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 2010. **9**(20): p. 4236-44.
227. Liang, D., S.L. Burkhart, R.K. Singh, M.H. Kabbaj, and A. Gunjan, *Histone dosage regulates DNA damage sensitivity in a checkpoint-independent manner by the homologous recombination pathway*. *Nucleic acids research*, 2012. **40**(19): p. 9604-20.
228. Konuma, T., C. Kohara, E. Watanabe, M. Mizukami, E. Nagai, S. Tanoue, M. Isobe, K. Jimbo, S. Kato, N. Ohno, S. Takahashi, and A. Tojo, *Monocyte subsets and their phenotypes during treatment with BCR-ABL1 tyrosine kinase inhibitors for Philadelphia chromosome-positive leukemia*. *Hematol Oncol*, 2018. **36**(2): p. 451-456.

229. Bellora, F., A. Dondero, M.V. Corrias, B. Casu, S. Regis, F. Caliendo, A. Moretta, M. Cazzola, C. Elena, L. Vinti, F. Locatelli, C. Bottino, and R. Castriconi, *Imatinib and Nilotinib Off-Target Effects on Human NK Cells, Monocytes, and M2 Macrophages*. *J Immunol*, 2017. **199**(4): p. 1516-1525.
230. Hayashi, Y., H. Nakamae, T. Katayama, T. Nakane, H. Koh, M. Nakamae, A. Hirose, K. Hagihara, Y. Terada, Y. Nakao, and M. Hino, *Different immunoprofiles in patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib, nilotinib or dasatinib*. *Leukemia & lymphoma*, 2012. **53**(6): p. 1084-9.
231. Shimoyama, M., H. Matsuoka, A. Tamekane, M. Ito, N. Iwata, R. Inoue, K. Chihara, A. Furuya, N. Hanai, and T. Matsui, *T-cell-specific expression of kinase-defective Eph-family receptor protein, EphB6 in normal as well as transformed hematopoietic cells*. *Growth factors (Chur, Switzerland)*, 2000. **18**(1): p. 63-78.
232. Alonso, C.L., E.M. Trinidad, B. de Garcillan, M. Ballesteros, M. Castellanos, I. Cotillo, J.J. Munoz, and A.G. Zapata, *Expression profile of Eph receptors and ephrin ligands in healthy human B lymphocytes and chronic lymphocytic leukemia B-cells*. *Leukemia research*, 2009. **33**(3): p. 395-406.
233. Miraki-Moud, F., E. Ghazaly, L. Ariza-McNaughton, K.A. Hodby, A. Clear, F. Anjos-Afonso, K. Liapis, M. Grantham, F. Sohrabi, J. Cavenagh, J.S. Bomalaski, J.G. Gribben, P.W. Szlosarek, D. Bonnet, and D.C. Taussig, *Arginine deprivation using pegylated arginine deiminase has activity against primary acute myeloid leukemia cells in vivo*. *Blood*, 2015. **125**(26): p. 4060-8.
234. Plunkett, W., *Arginine addiction in AML*. *Blood*, 2015. **125**(26): p. 3971-2.
235. Heerboth, S., K. Lapinska, N. Snyder, M. Leary, S. Rollinson, and S. Sarkar, *Use of epigenetic drugs in disease: an overview*. *Genet Epigenet*, 2014. **6**: p. 9-19.
236. Lotsch, J., G. Schneider, D. Reker, M.J. Parnham, P. Schneider, G. Geisslinger, and A. Doehring, *Common non-epigenetic drugs as epigenetic modulators*. *Trends Mol Med*, 2013. **19**(12): p. 742-53.
237. Di Costanzo, A., N. Del Gaudio, A. Migliaccio, and L. Altucci, *Epigenetic drugs against cancer: an evolving landscape*. *Archives of toxicology*, 2014. **88**(9): p. 1651-68.
238. Csoka, A.B. and M. Szyf, *Epigenetic side-effects of common pharmaceuticals: a potential new field in medicine and pharmacology*. *Med Hypotheses*, 2009. **73**(5): p. 770-80.
239. Kubasch, A.S. and U. Platzbecker, *Beyond the Edge of Hypomethylating Agents: Novel Combination Strategies for Older Adults with Advanced MDS and AML*. *Cancers (Basel)*, 2018. **10**(6).
240. Nishioka, C., T. Ikezoe, J. Yang, K. Udaka, and A. Yokoyama, *Imatinib causes epigenetic alterations of PTEN gene via upregulation of DNA methyltransferases and polycomb group proteins*. *Blood Cancer J*, 2011. **1**(12): p. e48.
241. Dunwell, T., L. Hesson, T.A. Rauch, L. Wang, R.E. Clark, A. Dallol, D. Gentle, D. Catchpoole, E.R. Maher, G.P. Pfeifer, and F. Latif, *A genome-wide screen identifies frequently methylated genes in haematological and epithelial cancers*. *Mol Cancer*, 2010. **9**: p. 44.

242. Shen, N., F. Yan, J. Pang, N. Zhao, N. Gangat, L. Wu, A.M. Bode, A. Al-Kali, M.R. Litzow, and S. Liu, *Inactivation of Receptor Tyrosine Kinases Reverts Aberrant DNA Methylation in Acute Myeloid Leukemia*. Clin Cancer Res, 2017. **23**(20): p. 6254-6266.
243. Shaker, M.E., A. Ghani, G.E. Shiha, T.M. Ibrahim, and W.Z. Mehal, *Nilotinib induces apoptosis and autophagic cell death of activated hepatic stellate cells via inhibition of histone deacetylases*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1833**(8): p. 1992-2003.
244. Amabile, G., A. Di Ruscio, F. Muller, R.S. Welner, H. Yang, A.K. Ebralidze, H. Zhang, E. Levantini, L. Qi, G. Martinelli, T. Brummelkamp, M.M. Le Beau, M.E. Figueroa, C. Bock, and D.G. Tenen, *Dissecting the role of aberrant DNA methylation in human leukaemia*. Nature communications, 2015. **6**: p. 7091.

9 Danksagung

Diese Arbeit wäre ohne die Unterstützung von vielen Menschen nicht möglich gewesen. An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Dr. Ingolf Cascorbi für die Möglichkeit bedanken, meine Doktorarbeit an seinem Institut durchzuführen sowie für die Betreuung und Unterstützung in meinem Projekt.

Des Weiteren möchte ich mich sehr herzlich bei Prof. Dr. Manuela Dittmar für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Kooperationspartnern bedanken. Bei Daniela Esser für die statistische Auswertung der Exom-Daten, bei Daniela Wesch und Daniel Gonnermann für die Hilfe bei der Durchflusszytometrie und Oberflächenfärbung und bei Ole Ammerpohl und den TAs des Instituts für Humangenetik für die Durchführung der 850k-Arrays und das *STR-Profiling*. Des Weiteren sei an dieser Stelle Ruwen Böhm gedankt, für die Unterstützung bei so manchem „Programmier-Problem“ und die gemeinsame Erstellung der Circos-Plots.

Mein größter Dank gilt ebenfalls Inga Nagel für die Möglichkeit an dem *ZFP36L1/ZFP36L2*-Projekt zu arbeiten, CRISPR/Cas9 zu etablieren und Methylierungs- und Exom-Analysen durchzuführen. Für die Unterstützung in diesen Projekten, die inspirierenden wissenschaftlichen Diskussionen und die Tatsache, dass du trotz Baby-Pause bei jedem Problem da warst, ob noch im Krankenbett oder mit Joris auf dem Arm.

Des Weiteren möchte ich mich ganz herzlich bei Henrike Bruckmüller für die Unterstützung bei allen wissenschaftlichen Problemen und die wissenschaftliche Diskussion bedanken, für die Motivationspausen und die Mit-Betreuung meiner Arbeit.

Ohne die Unterstützung von euch beiden wäre diese Arbeit so nicht möglich gewesen.

Ganz besonders möchte ich mich bei den TAs, Anna, Britta und vor allem meiner Zellkulturfee Irina bedanken, ohne deren Unterstützung so manche Versuche in dem Zeitrahmen nicht möglich gewesen wären.

Ein herzlicher Dank gilt allen aus dem Institut für Pharmakologie für die Atmosphäre, Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei sämtlichen Fragen und Problemen.

Ein ganz besonderes großes Dankschön geht an meine Eltern für die Unterstützung in allen Lebenslagen, für den festen Glauben an mich und die Unterstützung aus dem „Mutterschiff“. Außerdem gilt mein Dank meinen Freunden, vor allem Caro, für das offene Ohr, die Ablenkung und die nie enden-wollende Geduld!

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Meike Kähler
Akademischer Grad: M.Sc. Biochemie und Molekularbiologie
Adresse: Feldstraße 99, 24105 Kiel
Geburtsdatum/-ort: 08.02.1989/ Kiel
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung und beruflicher Werdegang

seit 02/2014 Wissenschaftliche Angestellte am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein

2011-2014 Studium der Biochemie und Molekularbiologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel mit Abschluss *Master of Science*

Titel der Masterarbeit: *TRAIL-induced caspase-independent programmed cell death: Impact of receptor localization, interacting proteins and proteolytic events*

2008-2011 Studium der Biochemie und Molekularbiologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel mit Abschluss *Bachelor of Science*

Titel der Bachelorarbeit: *Identifizierung putativer Interaktionspartner des hLAMP-2 mittels eines Yeast-2-hybrid-Screens*

1999-2008 Gymnasium Kronshagen
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

1995-1999 Brüder-Grimm-Schule, Kronshagen

11 Publikationsliste

Originalarbeiten

Sachau J, Bruckmueller H, Gierthmühlen J, **Kaehler M**, Haenisch S, Binder A, Caliebe A, Magerl W, Maier C, Treede RD, Tölle T, Cascorbi I, Baron R: SIGMA-1 receptor gene variants affect the somatosensory phenotype in neuropathic pain patients. *J Pain (in revision)*.

Kaehler M, Ruemenapp J, Gonnermann D, Nagel I, Bruhn O, Haenisch S, Ammerpohl O, Wesch D, Cascorbi I, Bruckmueller H: MicroRNA-212/ABCG2-axis contributes to development of imatinib-resistance in leukemic cells. *Oncotarget* 8(54):92018-92031 (2017).

Awortwe C, **Kaehler M**, Rosenkranz B, Cascorbi I, Bruckmueller H. MicroRNA-655-3p regulated Echinacea purpurea mediated activation of ABCG2: *Xenobiotika* 45(3):218-229 (2017).

Bruckmueller H, Martin P, **Kaehler M**, Haenisch S, Ostrowski M, Drozdik M, Siegmund W, Cascorbi I, Oswald S: Clinically relevant multidrug transporters are regulated by microRNAs along the human intestine. *Mol Pharma* 14:2245-53 (2017).

Bruhn O, Drerup K, **Kaehler M**, Haenisch S, Roder C, Cascorbi I: Length variants of the ABCB1 3' UTR and loss of miRNA binding sites: possible consequences in regulation and pharmacotherapy resistance. *Pharmacogenomics* 17(4):327-340 (2016).

Veröffentliche Tagungsbeiträge

Kaehler M, Nagel I, Bruckmueller H, Boehm R, Ammerpohl O, Cascorbi I: Drug resistance in chronic myeloid leukemia – Impact of methylation on gene expression in imatinib and nilotinib resistance. *American Association for Cancer Research Annual Meeting, Chicago 2018*. (Posterpräsentation)

Kaehler M, Ruemenapp J, Boehm R, Gonnermann D, Nagel I, Ammerpohl O, Cascorbi I, Bruckmueller H: Drug resistance in chronic myeloid leukemia – Global changes after imatinib exposure and impact of miR-212/ABCG2-axis during the onset of resistance. *Jährliches Meeting der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie, Göttingen 2018*. (Vortrag)

Kaehler M: Insights into imatinib resistance – miR-212/ABCG2-axis contributes to development of drug resistance in chronic myeloid leukemia. *Kiel Life Science Tagung 2017* (Vortrag).

Kaehler M, Ruemenapp J, Gonnermann D, Nagel I, Ammerpohl O, Cascorbi I, Bruckmueller H: Insights into imatinib resistance – miR-212/ABCG2-axis contributes to development of drug resistance in chronic myeloid leukemia. Kongress der *European Society of Pharmacogenomics and Personalised Medicine*, Catania 2017. (Posterpräsentation)

Kaehler M, Bruckmueller H, Ruemenapp J, Murgas-Penas E, Gonnermann D, Ammerpohl O, Nagel I, Cascorbi I: Insights into drug resistance – comparison of miRNA, mRNA and methylation profiles of imatinib and nilotinib resistant leukemic cells. Jährliches Meeting der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie, Heidelberg 2017. (Posterpräsentation)

Kaehler M, Bruckmueller H, Gonnermann D, Nagel I, Bruhn O, Haenisch S, Ammerpohl O, Wesch D, Cascorbi I: MicroRNA-212/ABCG2-axis contributes to survival of leukemic cells during development of imatinib resistance. Ernst-Klenk-Symposium, Köln 2016. (Posterpräsentation)

Kaehler M, Bruckmueller H, Gonnermann D, Kosicka K, Turrini E, Bruhn O, Cascorbi I: Imatinib & ABCG2 - Impact of microRNA-212-regulation on drug sensitivity and cell survival. Jährliches Meeting der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie, Berlin 2016. (Posterpräsentation)

Kaehler M, Bruckmueller H, Kosicka K, Turrini E, Haenisch S, Bruhn O, Cascorbi I: MicroRNA-212 & ABCG2: potential regulators of imatinib-sensitivity? Kongress der *European Society of Pharmacogenomics and Personalised Medicine*, Budapest 2015. (Posterpräsentation)

Kaehler M: MicroRNA-212 & ABCG2:potential regulators of imatinib-sensitivity? Kiel Life Science Tagung 2015. (Vortrag)

Kaehler M, Turrini E, Bruckmueller H, Haenisch S, Bruhn O, Cascorbi I: miR-212 & ABCG2: potential regulators of imatinib-sensitivity? Arbeitsgruppen-*Retreat*, Chiemsee 2015. (Vortrag)

Kaehler M, Turrini E, Bruckmueller H, Haenisch S, Bruhn O, Cascorbi I: Influence of miR-212 on imatinib-sensitivity of leukemic K562 cells. Jährliches Meeting der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie, Kiel 2015. (Posterpräsentation)

12 Anhang

12.1 Sequenz der BCR/ABL-Kinasedomäne der TKI-resistenten Zellen

10 20 30 40 50 60 70
ABL-Kinasedomäne ATGTTGGAGATCTGCCTGAAGCTGGTGGGCTGCAAAATCCAAGAAGGGGCTGCTCTCCAGCTGTTATCTGGA
K-562
K-562 0,5 µM R1
K-562 0,5 µM R2
K-562 2 µM R1
K-562 2 µM R2
K-562 Nilotinib R1
K-562 Nilotinib R2

110 120 130 140 150 160 170
ABL-Kinasedomäne CATCTGACTTTGAGCCTCAGGGTCTGAGTGAAGCCGCTCGTTGGAACCCAAGGAAAACCTTCTCGCTGGACCCAGI
K-562
K-562 0,5 µM R1
K-562 0,5 µM R2
K-562 2 µM R1
K-562 2 µM R2
K-562 Nilotinib R1
K-562 Nilotinib R2

210 220 230 240 250 260 270
ABL-Kinasedomäne TGCACTGTATGATTTTGTGGCCAGTGGAGATAACACTCTAAGCATAACTAAAGGTGAAAAGCTCCGGGTCTTAGGCT
K-562
K-562 0,5 µM R1
K-562 0,5 µM R2
K-562 2 µM R1
K-562 2 µM R2
K-562 Nilotinib R1
K-562 Nilotinib R2

310 320 330 340 350 360 370
ABL-Kinasedomäne GAAGCCCAAACCAAAAATGGCCAAGGCTGGGTCCAAGCAACTACATCACGCCAGTCAACAGTCTGGAGAAACACTC
K-562
K-562 0,5 µM R1
K-562 0,5 µM R2
K-562 2 µM R1
K-562 2 µM R2
K-562 Nilotinib R1
K-562 Nilotinib R2

410 420 430 440 450 460 470
ABL-Kinasedomäne GCAATGCCGCTGAGTATCTGCTGAGCAGCGGGATCAATGGCAGCTTCTTGGTGCGTGAGAGTGAAGAGCAGTCTGGC
K-562
K-562 0,5 µM R1
K-562 0,5 µM R2
K-562 2 µM R1
K-562 2 µM R2
K-562 Nilotinib R1
K-562 Nilotinib R2

510 520 530 540 550 560 570
ABL-Kinasedomäne CGAAGGGAGGGTGTACCATTACAGGATCAACACTGCTTCTGATGGCAAGCTCTACGTCTCCTCCGAGAGCCGCTTCA
K-562
K-562 0,5 µM R1
K-562 0,5 µM R2
K-562 2 µM R1
K-562 2 µM R2
K-562 Nilotinib R1
K-562 Nilotinib R2

610 620 630 640 650 660 670
ABL-Kinasedomäne CATCATCAACGGTGGCCGACGGGCTCATCACCAGCTCCATTATCCAGCCCCAAAGCGCAACAAGCCCACTGTCTA
K-562
K-562 0,5 µM R1
K-562 0,5 µM R2
K-562 2 µM R1
K-562 2 µM R2
K-562 Nilotinib R1
K-562 Nilotinib R2


```

          710      720      730      740      750      760      770
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...
ABL-Kinasedomäne  AGTGGGAGATGGAACGCACGGACATCACCATGAAGCACAAGCTGGGCGGGGGCCAGTACGGGGAGGTGTACGAGGGC
K-562             AGTGGGAGATGGAACGCACGGACATCACCATGAAGCACAAGCTGGGCGGGGGCCAGTACGGGGAGGTGTACGAGGGC
K-562 0,5 µM R1  AGTGGGAGATGGAACGCACGGACATCACCATGAAGCACAAGCTGGGCGGGGGCCAGTACGGGGAGGTGTACGAGGGC
K-562 0,5 µM R2  AGTGGGAGATGGAACGCACGGACATCACCATGAAGCACAAGCTGGGCGGGGGCCAGTACGGGGAGGTGTACGAGGGC
K-562 2 µM R1     AGTGGGAGATGGAACGCACGGACATCACCATGAAGCACAAGCTGGGCGGGGGCCAGTACGGGGAGGTGTACGAGGGC
K-562 2 µM R2     AGTGGGAGATGGAACGCACGGACATCACCATGAAGCACAAGCTGGGCGGGGGCCAGTACGGGGAGGTGTACGAGGGC
K-562 Nilotinib R1 AGTGGGAGATGGAACGCACGGACATCACCATGAAGCACAAGCTGGGCGGGGGCCAGTACGGGGAGGTGTACGAGGGC
K-562 Nilotinib R2 AGTGGGAGATGGAACGCACGGACATCACCATGAAGCACAAGCTGGGCGGGGGCCAAATACGGGGAGGTGTACGAGGGC

          810      820      830      840      850      860      870
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...
ABL-Kinasedomäne  GGTGGCCGTGAAGACCTTGAAGGAGGACACCATGGAGGTGGAAGAGTTCTTGAAGAAGCTGCAGTCATGAAAGAGA
K-562             GGTGGCCGTGAAGACCTTGAAGGAGGACACCATGGAGGTGGAAGAGTTCTTGAAGAAGCTGCAGTCATGAAAGAGA
K-562 0,5 µM R1  GGTGGCCGTGAAGACCTTGAAGGAGGACACCATGGAGGTGGAAGAGTTCTTGAAGAAGCTGCAGTCATGAAAGAGA
K-562 0,5 µM R2  GGTGGCCGTGAAGACCTTGAAGGAGGACACCATGGAGGTGGAAGAGTTCTTGAAGAAGCTGCAGTCATGAAAGAGA
K-562 2 µM R1     GGTGGCCGTGAAGACCTTGAAGGAGGACACCATGGAGGTGGAAGAGTTCTTGAAGAAGCTGCAGTCATGAAAGAGA
K-562 2 µM R2     GGTGGCCGTGAAGACCTTGAAGGAGGACACCATGGAGGTGGAAGAGTTCTTGAAGAAGCTGCAGTCATGAAAGAGA
K-562 Nilotinib R1 GGTGGCCGTGAAGACCTTGAAGGAGGACACCATGGAGGTGGAAGAGTTCTTGAAGAAGCTGCAGTCATGAAAGAGA
K-562 Nilotinib R2 GGTGGCCGTGAAGACCTTGAAGGAGGACACCATGGAGGTGGAAGAGTTCTTGAAGAAGCTGCAGTCATGAAAGAGA

          910      920      930      940      950      960      970
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...
ABL-Kinasedomäne  CTCCTTGGGGTCTGCACCCGGGAGCCCCGTTCTATATCATCACTGAGTTCATGACCTACGGGAACCTCCTGGACTA
K-562             CTCCTTGGGGTCTGCACCCGGGAGCCCCGTTCTATATCATCACTGAGTTCATGACCTACGGGAACCTCCTGGACTA
K-562 0,5 µM R1  CTCCTTGGGGTCTGCACCCGGGAGCCCCGTTCTATATCATCACTGAGTTCATGACCTACGGGAACCTCCTGGACTA
K-562 0,5 µM R2  CTCCTTGGGGTCTGCACCCGGGAGCCCCGTTCTATATCATCACTGAGTTCATGACCTACGGGAACCTCCTGGACTA
K-562 2 µM R1     CTCCTTGGGGTCTGCACCCGGGAGCCCCGTTCTATATCATCACTGAGTTCATGACCTACGGGAACCTCCTGGACTA
K-562 2 µM R2     CTCCTTGGGGTCTGCACCCGGGAGCCCCGTTCTATATCATCACTGAGTTCATGACCTACGGGAACCTCCTGGACTA
K-562 Nilotinib R1 CTCCTTGGGGTCTGCACCCGGGAGCCCCGTTCTATATCATCACTGAGTTCATGACCTACGGGAACCTCCTGGACTA
K-562 Nilotinib R2 CTCCTTGGGGTCTGCACCCGGGAGCCCCGTTCTATATCATCACTGAGTTCATGACCTACGGGAACCTCCTGGACTA

```

12.2 Sequenzen des *ZFP36L1* & *ZFP36L2-Knockout*

Sequenz des *ZFP36L1-Knockout* (*ZFP36L1 -/-*). Durch den CRISPR/Cas-Genomeditierung wurde der Bereich der Zinkfingerdomänen deletiert. Durch die Deletion der Domänen kam es zu einer Leserahmenverschiebung.

```
>atgaccaccaccctcgtgtctgccaccatcttcgacttgagcgaagttttatgcaagggtacaagatgc
tcaactatagtgtctcccagtgagggggttgctgctggacagaaaggcagtgggcaccctgctgggtggg
ggcttccctcggaggcactcagtcaccctgccagctccaagttccaccagaaccagctcctcagcagcct
caagggtgagccagccccgcctctgagctcgcgagacagccgcttccgagaccgctccttctcgggaagggg
gcgagcggctgctgccaccaccagaagcagccttcatccacaacgctgaagagcgcgcgtgccctggccgggg
cccgggacctctccgctgaccgctccccgcctccagcatagcttttagctttgctggggttccagtgccgct
gccaccgctgctgccaccgggctgctggacagccccagctccatcaccaccaccctattctgagcgcgga
tgacctcctgggctcacctaccctgcccgatggcaccaataacccttttgcttctccagccaggagctgg
caagcctctttgccctagcatggggctgcccgggggtggctccccgaccaccttctctcgggccatg
tccgagtcccctcacatgtttgactctccccccagccctcaggattctctctcggaccaggagggtacct
gagcagctccagcagcagccacagtggtcagactccccgacctggacaactcaagacgcctgcccatct
tcagcagactttccatctcagatgactaa
```

Sequenz des *ZFP36L2-Knockout* (*ZFP36L2 -/-*). Angegeben ist die kodierende Sequenz sowie in grau markiert der Bereich der Zinkfingerdomänen der mittels CRISPR/Cas9-Genomeditierung deletiert wurde. Durch die Deletion der Domänen kam es zu einer Leserahmenverschiebung.

```
>atgtcgaccacacttctgtccgccttctacgatgtcgacttcttgtcaagacagagaaatccctggcca
acctcaacctgaacaacatgctggacaagaaggcgggtggggacgcctgtggccgcgcgccccagctcgggc
ttcgcgcccgggattcctccgacggcactcggccagcaacctgcatgcaactcgcaccaccgcgcccagccc
cggcagctgctgcaccaagtccccgggcccgcgtaacggcagcagctgcccagcgcgcggcggcggcggtc
cgacctcctacggcacccttaaggagccgtcggggggcggcggcacagccctgctcaacaaggagaacaaa
ttccgggaccgctcgttttagcgagaaacggcgatcgcagccagcacctcctgcacctgcagcagcagcagaa
ggggggcggcggctcccagatcaactccacgcttcccgcgggagccgcggcccaagttgcaccacagcctc
agcttctcgggcttcccgtcgggccaacctcagccccgggcccctcagctcgcgcgctgctgctcgacag
ccccagctcgcgcagccgcgcgcgcctcctgctcttcggcctcgtcctgctcctcctccgcctcctcct
gttccctcggcctccgcggcctccacgcctcggggcgcgcccgacatgctgcccctccgcggcggcggcgt
gcgccgcgctctgctgtacggcaccggggggcggcgggacctgctggcggcgggggcccgtgcccggcctg
ctcgtcggcctcgtgcccacaacgccttcgccttcgggtccggagctcagcagcctcatcacgccgctcg
ccatccagaccacaactttgcccgcgtggcggcgcgcgcctactaccgcagtcagcagcagcagcagcag
cagggcctggcgcccccgcgcagccgcccggcgcgcgcagcgcgacctccccgcggggcggcggcacc
tccctcgcgcgcccctcagcttcagctgcccgcgcgcctgtccgactcgcgcggtgctcagcgcgccccca
gccccccggactcgtgtcggaccgcgacagctacctaaagcggctccctgagctccggcagcctcagcggc
tctgagctctccagcctcgacctggcccgcgcgcctgccaatcttcagccgcctctccatctccgacgactg
a
```

Sequenz des *ZFP36L1/ZFP36L2-Knockout* (*ZFP36L1* *-/-*, *ZFP36L2* *-/-*; Dko). Angegeben ist die kodierende Sequenz des *ZFP36L1*. Die Sequenz von *ZFP36L2* im Doppel-*Knockout* entspricht der des *ZFP36L2*-Einzel-*Knockout*. Durch den CRISPR/Cas9-Genomeditierung wurden die Zinkfingerdomänen ohne Verschiebungen des Leserasters deletiert, so dass ein trunkiertes Protein ohne Zinkfinger translatiert wird.

```
>atgaccaccaccctcgtgtctgccaccatcttcgacttgagcgaagttttatgcaagggtacaagatgc  
tcaactatagtgtcccagtgaggggttgctgctggacagaaaggcagtgggcaccctgctgggtggg  
ggcttccctcggaggcactcagtcaccctgccagctccaagttccaccagaaccagctcctcagcagcct  
caagggtagccagccccgctctgagctcgcgagacagccgcttccgagaccgctccttctcggaagggg  
gagagcggctgctgcccaccagaagcagcccgggggcggcgggccccgctgccaattcatccacaacgct  
gaagagcggcctgcccggcgggggccccgggacctctccgctgaccgtccccgcctccagcatagctttag  
ctttgctgggtttcccagtgccgctgccaccgcccgtgccaccgggctgctggacagccccacgtccatca  
ccccacccttattctgagcgcgatgacctcctgggctcacctaccctgccgatggcaccataaacct  
tttgcttctccagccaggagctggcaagcctctttgcccctagcatggggctgcccgggggtggctcccc  
gaccacctcctcttccggcccatgtccgagtcacctcacatgtttgactctccccccagccctcaggatt  
ctctctcggaccaggagggtacctgagcagctccagcagcagccacagtggctcagactccccgaccttg  
gacaactcaagacgctgcccacatcttcagcagactttccatctcagatgactaa
```

12.3 Exemplarische Darstellung der Ergebnisse des STR-Profilings

In den getesteten Zelllinien konnten charakteristische Signale identifiziert werden, die mit der Identität der K-562-Zelllinien übereinstimmen.

K-562-Zellen

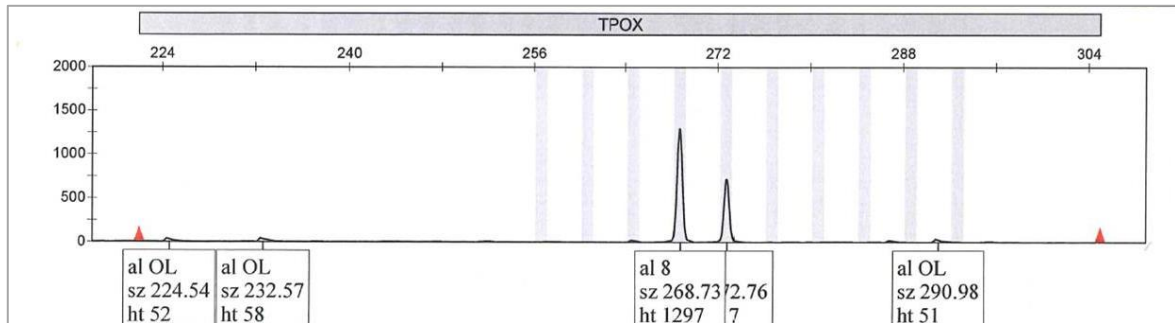


Abbildung 50: *Short tandem repeat*-Analyse zur Erstellung eines genetischen *Fingerprints* der K-562-Zellen. Die Analyse erfolgte im Institut für Humangenetik, UKSH Kiel.

0,5 µM Imatinib-resistente Zellen (1. Resistenzzüchtung)

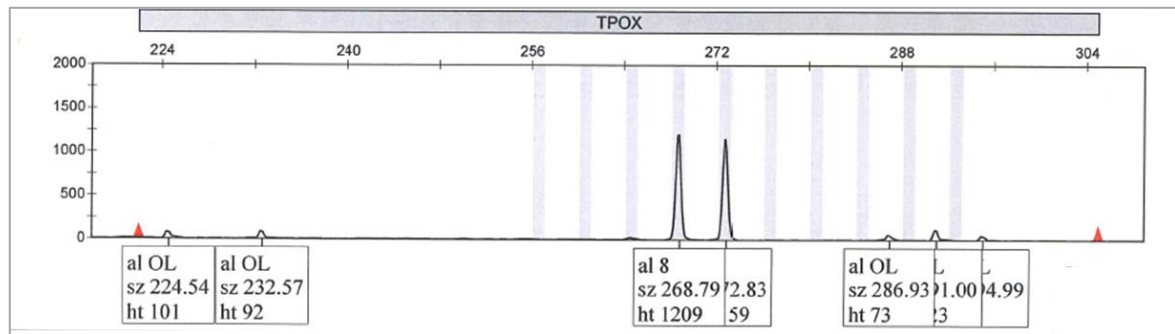


Abbildung 51: *Short tandem repeat*-Analyse zur Erstellung eines genetischen *Fingerprints* der 0,5 µM Imatinib-resistenten K-562-Zellen der 1. Resistenzzüchtung. Die Analyse erfolgte im Institut für Humangenetik, UKSH Kiel.

2 µM Imatinib-resistente Zellen (1. Resistenzzüchtung)

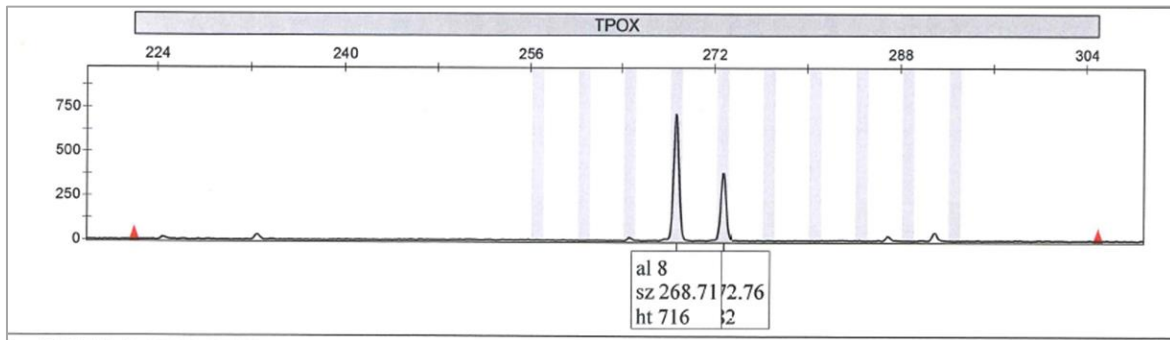


Abbildung 52: Short tandem repeat-Analyse zur Erstellung eines genetischen Fingerprints der 2 µM Imatinib-resistenten K-562-Zellen der 1. Resistenzzüchtung. Die Analyse erfolgte im Institut für Humangenetik, UKSH Kiel.

100 nM Nilotinib-resistente Zellen (1. Resistenzzüchtung)

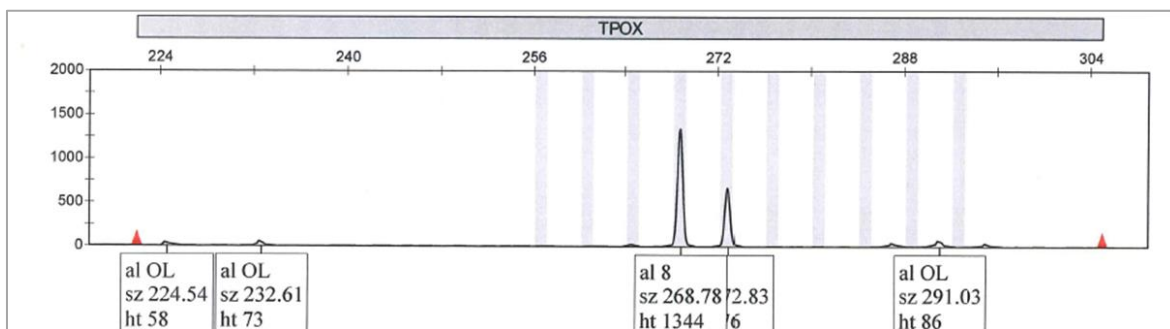


Abbildung 53: Short tandem repeat-Analyse zur Erstellung eines genetischen Fingerprints der 100 nM Nilotinib-resistenten K-562-Zellen der 1. Resistenzzüchtung. Die Analyse erfolgte im Institut für Humangenetik, UKSH Kiel.

12.4 Vollständige STRING – und KEGG-Pathway-Analysen

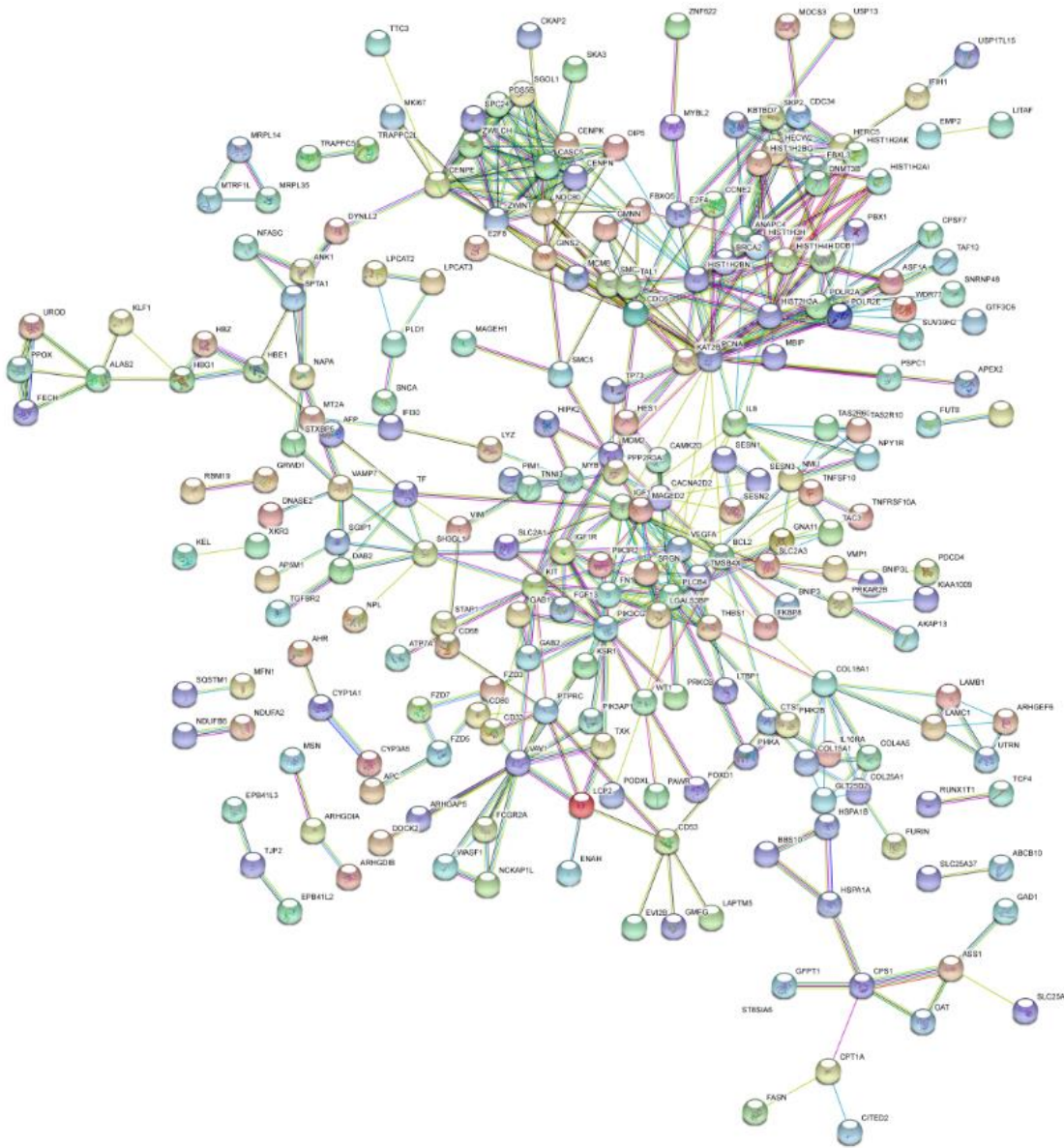


Abbildung 54: STRING-Analyse der differenziell regulierten Gene während der Entstehung der Imatinib-Resistenz aus dem Vergleich von K-562 und K-562^{0,5}. Die Farbe der Linie gibt die Art der Interaktion an: Türkis: Datenbanken; violett: experimentell bestätigte Interaktion; blau: genetische Nachbarschaft; rot: Genfusion, blau: Gen-Kookkurrenz; gelb: *textmining*, schwarz: Co-Expression; hellblau: Proteinhomolog. Dargestellt sind die Knotenpunkte mit einem *interaction score* von 0,7. IM: Imatinib; K-562: unbehandelte, Imatinib-sensitive Zellen; K-562^{0,5}: 0,5 µM Imatinib-resistente Zellen.

Tabelle 20: Differenziell exprimierte Gene der Imatinib-Resistenz (K562 vs. K-562^{0,5}; K-562²). Angegeben sind die Gene, die KEGG-Pathways oder einem STRING-Netzwerk zugeordnet werden konnten (*fold change* ± 2 ; korrigierter p-Wert $p < 0,05$). K-562: unbehandelte, Imatinib-sensitive Zellen; K-562^{0,5}: 0,5 μM Imatinib-resistente Zellen; K-562²: 2 μM Imatinib-resistente Zellen.

Gen/ mRNA	Genname	<i>fold change</i> K-562 vs. K-562 ^{0,5}	<i>fold change</i> K-562 vs. K-562 ²
ASS1	<i>argininosuccinate synthase 1</i>	-4,53	-3,84
BBS10	<i>Bardet-Biedl syndrome 10</i>	2,52	2,30
BCL2	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>	-2,84	-3,63
BRCA	<i>breast cancer 2</i>	3,32	2,24
CD226	<i>CD226 molecule</i>	4,34	6,07
EPB41L3	<i>erythrocytemembrane protein band 4,1-like 3</i>	-4,08	-5,13
FN1	<i>fibronectin 1</i>	-8,59	-11,24
GAD1	<i>glutamate decarboxylase 1</i>	2,83	3,00
HBE1	<i>hemoglobin, epsilon 1</i>	12,91	12,99
HIPK2	<i>homeodomain interacting protein kinase 2</i>	2,46	2,63
HSPA1A	<i>heat shock 70 kDa protein 1A</i>	-4,71	-6,26
HSPA1B	<i>heat shock 70 kDa protein 1B</i>	-4,71	-6,23
IGF1	<i>insulin-like growth factor 1</i>	-2,23	-3,29
KIT	<i>v-kit Hardy-Zuckerman sarcoma viral oncogene</i>	-8,56	-4,32
LAMC1	<i>laminin subunit gamma 1</i>	2,92	2,62
NAV2	<i>neuron navigator 2</i>	-2,84	-2,68
NMU	<i>neuromedin U</i>	-14,4	-23,4
PIK3AP1	<i>phosphoinositide-3-kinase type 2 beta</i>	3,06	2,26
PTPRB	<i>protein tyrosine phosphatase, receptor type B</i>	-4,29	-3,27
PTPRJ	<i>protein tyrosine phosphatase, receptor type J</i>	-2,42	-2,07
RBMS1	<i>RNA binding motif, single stranded interacting protein 1</i>	2,74	2,3
RELN	<i>reelin</i>	16,74	9,93
SPTA1	<i>spectrin alpha, erythrocytic 1</i>	6,28	3,65
SRGN	<i>serglycin</i>	-3,71	-3,94
TJP2	<i>tight junction protein 2</i>	2,57	2,20
WASF1	<i>WAS protein family, member 1</i>	4,41	3,03
WT1	<i>Wilms tumor 1</i>	-2,61	-2,69
ZC3H12C	<i>zinc finger CCH-type containing 12C</i>	-3,18	-3,21

Tabelle 21: Differenziell exprimierte Gene aus dem Vergleich der K-562 und K-562^{0,5}-Zellen, die KEGG-Pathways zugeordnet werden konnten. Angegeben sind die zugeordneten Gene mit einem fold change ± 2 und einem korrigiertem p-Wert $p < 0,05$. K-562: unbehandelte, Imatinib-sensitive Zellen; K-562^{0,5}: 0,5 μ M Imatinib-resistente Zellen.

Gen/mRNA	Genname	fold change K-562 vs. K-562 ^{0,5}
ANAPC4	<i>anaphase promoting complex subunit 4</i>	2,28
ANK1	<i>ankyrin 1</i>	3,33
APC	<i>adenomatous polyposis coli</i>	2,52
ARHGAP5	<i>Rho GTPase activating protein 5</i>	2,24
ARHGEF6	<i>Rac/CDC42 guanine exchange factor 6</i>	-17,79
BCL2	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>	-2,84
BRCA2	<i>breast cancer 2</i>	3,32
CAMK2D	<i>calcium/calmodulin-dependent protein kinase II delta</i>	2,80
CCNE2	<i>cyclin E2</i>	2,42
CFL2	<i>cofilin 2</i>	2,74
COL4A5	<i>collagen, type IV, alpha 5</i>	2,41
CXCL8	<i>chemokine ligand 8</i>	-3,13
DDB1	<i>damage-specific DNA binding protein 1, 127 kDa</i>	2,80
DOCK2	<i>dedicator of cytokinesis 2</i>	-4,58
ENAH	<i>enabled homolog</i>	3,81
EXOC2	<i>exocyst complex component 2</i>	2,20
FCGR2A	<i>Fc fragment of IgG, low affinity IIa, receptor</i>	-2,52
FGF13	<i>flap structure-specific endonuclease 1</i>	-2,09
FN1	<i>fibronectin 1</i>	-8,59
FUT8	<i>fucosyltransferase 8</i>	-2,86
FZD3	<i>frizzled class receptor 3</i>	2,17
FZD5	<i>frizzled class receptor 5</i>	2,28
FZD7	<i>frizzled class receptor 7</i>	2,09
GAB1	<i>GRB2-associated binding protein 1</i>	3,79
GAB2	<i>GRB2-associated protein 2</i>	-3,62
GNA11	<i>guanine nucleotide binding protein, alpha 11</i>	2,60
HIST1H2BG	<i>histone cluster 1, H2bg</i>	2,59
HIST1H2BN	<i>histone cluster 1, H2bn</i>	4,57
HIST1H3A	<i>histone cluster 2, H3a</i>	3,08
HIST1H3H	<i>histone cluster 1, H3h</i>	4,18
HSPA1A	<i>heat shock 70 kDa protein 1A</i>	-4,71
HSPA1B	<i>heat shock 70 kDa protein 1B</i>	-4,71
IFIH1	<i>interferon induced with helicase C domain 1</i>	3,16
IGF1	<i>insulin-like growth factor</i>	-2,23
IGF1R	<i>insulin-like growth factor 1 receptor</i>	2,22
IL10RA	<i>interleukin 10 receptor, alpha</i>	-3,32

<i>IQGAP2</i>	<i>IQ motif containing GTPase activating protein 2</i>	2,34
<i>KAT2B</i>	<i>Lysine acetyltransferase 2B</i>	2,24
<i>KIT</i>	<i>v-kit Hardy-Zuckerman 4 viral oncogene homolog</i>	-8,56
<i>KSR1</i>	<i>kinase suppressor of ras 1</i>	-2,04
<i>LAMB1</i>	<i>laminin, beta 1</i>	2,22
<i>LAMC1</i>	<i>laminin, gamma 1</i>	2,92
<i>MDM2</i>	<i>MDM2 proto-oncogene</i>	2,23
<i>MIR21</i>	<i>microRNA-21</i>	-5,24
<i>MSN</i>	<i>moesin</i>	-2,32
<i>MYB</i>	<i>v-myb avain myeloblastosis viral oncogene homolog</i>	-2,27
<i>NCKAP1L</i>	<i>NCK-associated protein 1-like</i>	-7,28
<i>PBX1</i>	<i>pre-B-cell leukemia homeobox 1</i>	4,49
<i>PCNA</i>	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>	2,28
<i>PDCD4</i>	<i>programmed cell death 4</i>	2,46
<i>PIK3AP1</i>	<i>phosphoinositide-3-kinase adaptor protein 1</i>	2,35
<i>PIK3CG</i>	<i>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate-3-kinase, catalytic subunit gamma</i>	-2,70
<i>PIK3R2</i>	<i>phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 2</i>	2,32
<i>PLCB4</i>	<i>phospholipase C, beta 4</i>	3,03
<i>PLD1</i>	<i>phospholipase D1</i>	-3,45
<i>POLR2A</i>	<i>polymerase (RNA) II polypeptide A, 220 kDa</i>	2,28
<i>POLR2E</i>	<i>polymerase (RNA) II polypeptide E, 25 kDa</i>	2,37
<i>PPP2R3A</i>	<i>protein phosphatase 2, regulatory subunit B, alpha</i>	2,59
<i>PRKCB</i>	<i>protein kinase C, beat</i>	-3,21
<i>PTPRC</i>	<i>protein tyrosine phosphatase, receptor type C</i>	-5,53
<i>RASA2</i>	<i>RAS p21 protein activator 2</i>	2,05
<i>RELN</i>	<i>reelin</i>	16,74
<i>RUNX1T1</i>	<i>runt-related transcription factor 1</i>	4,35
<i>SKP2</i>	<i>S-phase kinase-associated protein 2</i>	2,41
<i>SLC2A1</i>	<i>solute carrier family 2, member 1</i>	2,94
<i>TGFBR2</i>	<i>transforming growth factor, beta receptor II</i>	-3,62
<i>THBS1</i>	<i>thrombospondin 1</i>	2,99
<i>TMSB4X</i>	<i>thymosin beta 4, X-linked</i>	-2,70
<i>TNFAIP3</i>	<i>tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3</i>	-2,30
<i>TNFRSF10A</i>	<i>tumor necrosis factor superfamily, member 10a</i>	-2,71
<i>TNFSF10</i>	<i>tumor necrosis factor superfamily member 10</i>	-2,29
<i>TP73</i>	<i>tumor protein p73</i>	2,80
<i>VAC14</i>	<i>Vac14 homolog</i>	2,59
<i>VAV1</i>	<i>vav1 guanine nucleotide exchange factor</i>	-2,57
<i>VEGFA</i>	<i>vascular endothelial growth factor</i>	-2,49

VIM	vimentin	-3,20
WASF1	WAS protein family, member 1	4,41
WT1	Wilms tumor 1	-2,61

Tabelle 22: Liste der differenziell exprimierten Gene, für die differenziell methylierte CpGs assoziiert werden konnten. Angeben sind die Gene mit einem fold change ± 2 und eine korrigiertem p-Wert $< 0,05$ sowie mindestens acht assoziierten differenziell methylierten CpGs. K-562: unbehandelte, Imatinib-sensitive Zellen; K-562²: 2 μ M Imatinib-resistente Zellen.

Gen/mRNA	Genname	fold change K-562 vs. K-562 ²
ABCA8	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC), member 8	6,73
AHR	aryl hydrocarbon receptor	-11,63
AIG	androgen-induced 1	-2,8
AIM	absent in melanoma 1	3,26
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	-3,63
CFH	complement factor H	-12,25
DHRS3	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 13	-2,83
EPAS1	endothelial PAS domain protein 1	-2,58
EPB41L3	erythrocyte membrane protein band 4.1-like 3	-5,13
FAM83A	family with sequence similarity 83, member A	-2,57
FUT8	fucosyltransferase 8	-2,89
HECW2	HECT, C2 and WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2	-3,67
HIPK2	homeodomain interacting protein kinase 2	2,63
ICAM1	intercellular adhesion molecule 1	-5,69
IKZF3	IKAROS family zinc finger 3	-2,42
KIT	v-kit Hardy-Zuckerman 4 sarcoma viral oncogene	-4,32
LAMC1	laminin, gamma 1	2,62
LTBP1	latent transforming growth factor beta binding protein 1	4,32
MEF2C	myocyte enhancer factor 2C	2,18
MS4A4A	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 4	6,65
NAV2	neuron navigator 2	-2,68
NCK2	NCK adaptor protein 2	2,49
NIN	ninein	3,85
NMU	neuromedin U	-23,4
OSBPL6	oxysterol binding protein-like 6	5,21
PDGFA	platelet-derived growth factor alpha polypeptide	2,29

<i>PTPRB</i>	<i>protein tyrosine phosphatase, receptor type B</i>	-3,27
<i>RBMS1</i>	<i>RNA binding motif, single stranded interacting protein 1</i>	2,30
<i>RELN</i>	<i>reelin</i>	9,93
<i>SGIP1</i>	<i>SH3-domain GRB2-like (endophilin) interacting protein 1</i>	3,53
<i>SH3KBP1</i>	<i>SH3-domain kinase binding protein 1</i>	2,62
<i>SLC24A3</i>	<i>solute carrier family 24 (sodium/potassium/calcium exchanger), member 3</i>	2,16
<i>SORCS1</i>	<i>sortilin-related VPS10 domain containing receptor 1</i>	-2,58
<i>STK39</i>	<i>serine threonine kinase 39</i>	2,46
<i>TBC1D4</i>	<i>TBC1 domain family, member 4</i>	-2,51
<i>TPD52L1</i>	<i>tumor protein D52-like 1</i>	-2,60
<i>TSPAN5</i>	<i>tetraspanin 5</i>	3,77
<i>WT1</i>	<i>Wilms tumor 1</i>	-2,69
<i>ZC3H12C</i>	<i>zinc finger CCCH-type containing 12C</i>	-3,21

Tabelle 23: Differenziell exprimierte Gene aus dem Vergleich K-562 vs. K-562^N, die KEGG-Pathways oder denen differenziell methylierte CpGs zugeordnet werden konnten. Angegeben sind die zugeordneten Gene mit einem fold change ± 2 und einem korrigiertem p-Wert $p < 0,05$. K-562: unbehandelte, Imatinib-sensitive Zellen; K-562^N: 100 nM Nilotinib-resistente Zellen.

Gen/mRNA	Genname	fold change K-562 vs. K-562 ^N
ARID5B	AT rich interactive domain 5B	2,24
CD226	CD226 molecule	4,18
DNM1	dynamamin 1	2,09
EPHB6	EPH receptor B6	2,3
FCGR1A	FC fragment of IgG, high affinity Ia, receptor (CD64)	-2,14
H2AFV	H2A histone family, member V	2,13
HIPK2	homeodomain interacting protein kinase 2	2,25
HIST1H2BF	histone cluster 1, H2bf	2,61
HIST1H2BJ	histone cluster 1, H2bj	2,40
MBNL3	muscleblind-like splicing regulator 3	3,45
MBOAT2	membrane bound O-acyltransferase domain containing 2	5,49
NAV2	neuron navigator 2	-2,62
NMU	neuromedin U	-8,53
PBX1	pre-B-cell leukemia homeobox 1	2,84
PLA2G4A	phospholipase A2, group IVA	-2,35
PTPRB	protein tyrosine phosphatase, receptor type B	-2,94
RB1	retinoblastoma 1	2,29
RBMS1	RNA binding motif, single stranded interacting protein 1	2,56
RELN	reelin	11,89
RXRA	retinoid X receptor, alpha	-2,06
SOS2	son of sevenless homolog 2	2,26
SPARC	secreted protein acidic, cysteine-rich	-2,11
STK39	serine threonine kinase 39	3,72
TP73	tumor protein 73	2,20
ZC3H12C	zinc finger CCH-type containing 12C	-2,81
ZNF227	zinc finger protein 227	2,21

12.5 Medien & Puffer

Anodenpuffer I

1,82 g TRIS
ad 400 ml mit A. bidest
+ 100 ml 100 % Ethanol

Vor dem Gebrauch 1:10 mit A. bidest verdünnt

Elektrophoresepuffer (10x)

30 g TRIS
144 g Glycin
10 % SDS
ad 1 L mit A. bidest

Vor dem Gebrauch 1:10 mit A. bidest verdünnt

LB-Medium (*lysogeny broth*)

10 g Bactotrypton
5 g Bacto yeast extract
10 g NaCl
ad 1 L mit A. bidest, pH 7.0

Sterilisation durch Autoklavieren

Probenpuffer (5x)

50 mM TRIS
35 % Glycerol
10 % SDS
10 % β -Mercaptoethanol
0,5 % Bromphenolblau
ad 50 ml A. bidest

Sammelgelpuffer

24,2 g TRIS
4 % SDS
ad 400 ml mit A. bidest, pH 6.8

TBE-Puffer (10x)

108 g TRIS
55 g Borsäure
45 ml 0,5 M EDTA
ad 1 L mit A. bidest

Vor dem Gebrauch 1:10 mit A. bidest verdünnt

Trenngelpuffer

72,7 g TRIS
4 % SDS
ad 400 ml mit A. bidest pH 8.8

Anodenpuffer II

18,2 g TRIS
ad 400 ml mit A. bidest
+ 100 ml 100 % Ethanol

Kathodenpuffer

1,51 TRIS
2,6 g Aminohexansäure
0,5 ml 10 % SDS
ad 400 ml mit A. bidest
+ 100 ml 100 % Ethanol

Lysepuffer

121 mg TRIS pH 7.4
10 ml 10 % SDS
ad 50 ml mit A. bidest

Sammelgel

1, 5 ml A.bidest
600 μ l Sammelgelpuffer
300 μ l 40 % Acrylamid/Bisacrylamid
36 μ l 10 % APS
2,5 μ l TEMED

Stripping Solution

3,79 g TRIS pH 6.7
100 ml 10 % SDS
7,2 ml β -Mercaptoethanol
ad 500 ml mit A. bidest

Trenngel

6 ml A.bidest
3 ml Sammelgelpuffer
3 ml 40 % Acrylamid/Bisacrylamid
200 μ l 10 % APS
2,5 μ l TEMED

13 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit, abgesehen von der Beratung durch meinen Betreuer, nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist. Diese Arbeit wurde bis jetzt weder ganz noch in Teilen bei der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel oder an anderer Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens eingereicht. Die Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln für gute wissenschaftliche Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft angefertigt worden.

Ein Teil dieser Arbeit zum Beitrag der miR-212/ABCG2-Achse bei der Entstehung der Imatinib-Resistenz wurde 2017 in *Oncotarget* unter dem Titel „miR-212/ABCG2-axis contributes to the development of imatinib-resistance in chronic myeloid leukemia“ publiziert. Kaehler *et al.*, *Oncotarget* (2017) **8**(54): 92018-92031. doi: 10.18632/oncotarget.21272

Kiel, den

.....

Meike Kähler