

Aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie  
(Direktor: Prof. Dr. Dr. Ingolf Cascorbi)  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Epigenetische Veränderungen in der  
Entwicklung von Chemoresistenzen in der  
Chronisch Myeloischen Leukämie**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
Johanna Rümenapp  
aus Göttingen

Kiel 2020



**1. Berichtstatter:** Prof. Dr. Dr. Ingolf Cascorbi, Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie

**2. Berichtstatter/in:** Prof. Dr. Anna Trauzold, Institut für Experimentelle Tumorforschung

Tag der mündlichen Prüfung: 26.10.2021

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 26.08.2021

gez.: Prof. Dr. Dr. Ingolf Cascorbi  
(Prüfungsvorsitzende/r der mündlichen Prüfung)

## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere hiermit an Eides Statt, dass meine Dissertation, abgesehen von Ratschlägen meiner Betreuerin und meiner sonstigen akademischen Lehrer, nach Form und Inhalt meine eigene Arbeit ist, dass ich keine anderen als die in der Arbeit aufgeführten Quellen und Hilfsmittel benutzt habe, und dass meine Arbeit bisher keiner anderen akademischen Stelle als Dissertation vorgelegen hat, weder ganz noch in Teilen.

---

Datum, Unterschrift Doktorandin

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Chronisch myeloische Leukämie.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Epidemiologie.....	1
1.1.2 Pathophysiologie.....	1
1.1.3 Klinik .....	2
1.1.4 Therapie.....	3
1.1.5 Resistenzen in der Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren .....	4
1.1.6 DNA-Methylierung.....	7
<b>1.2 Zielsetzung der Studie.....</b>	<b>8</b>
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>10</b>
<b>2.1 Material .....</b>	<b>10</b>
2.1.1 Geräte und Material.....	10
2.1.2 Chemikalien und Reagenzien.....	11
2.1.3 Kits.....	13
2.1.4 Primersequenzen .....	13
2.1.5 TaqMan-Assays .....	16
2.1.6 Antikörper.....	16
2.1.7 Zelllinie.....	16
<b>2.2 Methoden.....</b>	<b>17</b>
2.2.1 Zellkultur .....	17
2.2.2 Bestimmung der Zellzahl und Mikroskopie .....	17
2.2.3 Einfrieren und Auftauen der Zellen .....	17
2.2.4 Resistenzzüchtung mit Imatinib und Nilotinib.....	17
<b>2.3 Analyse der Genexpression .....</b>	<b>18</b>
2.3.1 RNA-Isolation .....	18
2.3.2 Reverse Transkription der mRNA.....	18
2.3.3 Analyse der mRNA Expression .....	18
<b>2.4 Analyse der Proteinexpression.....</b>	<b>20</b>
2.4.1 Zellyse zur Proteingewinnung.....	20
2.4.2 Western Blot.....	20

<b>2.5</b>	<b>Analyse der DNA-Methylierung.....</b>	<b>21</b>
2.5.1	DNA Isolation .....	21
2.5.2	Bisulfit-Konversion.....	21
2.5.3	PCR .....	22
2.5.4	Agarose-Gelelektrophorese.....	23
2.5.5	Pyrosequenzierung .....	23
2.5.6	Statistische Auswertung Software .....	26
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>27</b>
<b>3.1</b>	<b>Resistenzmodell.....</b>	<b>27</b>
<b>3.2</b>	<b>Methodenetablierung.....</b>	<b>27</b>
<b>3.3</b>	<b>Veränderungen der Expression und Methylierung der vier Kandidatengene in der Imatinib- und Nilotinib-Resistenz.....</b>	<b>30</b>
3.3.1	Veränderungen der Expression und Methylierung von <i>ABCB1</i> in der Imatinib-Resistenz.....	30
3.3.2	Veränderungen der Expression und Methylierung von <i>ABCB1</i> in der Nilotinib-Resistenz.....	32
3.3.3	Veränderungen der Expression und Methylierung von <i>ABCG2</i> in der Imatinib-Resistenz.....	34
3.3.4	Veränderungen der Expression und Methylierung von <i>ABCG2</i> in der Nilotinib-Resistenz.....	37
3.3.5	Veränderungen der Expression und Methylierung von <i>ZFP36L2</i> in der Imatinib-Resistenz .....	40
3.3.6	Veränderungen der Expression und Methylierung von <i>ZFP36L2</i> in der Nilotinib-Resistenz .....	43
3.3.7	Veränderungen der Expression und Methylierung der <i>miR-212</i> in der Imatinib-Resistenz.....	46
3.3.8	Veränderungen der Expression und Methylierung der <i>miR-212</i> in der Nilotinib-Resistenz.....	48
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>51</b>
<b>4.1</b>	<b>Diskussion der Durchführung am <i>in vitro</i> Zellmodell .....</b>	<b>51</b>
<b>4.2</b>	<b>Kritische Betrachtung der Analyse der Proteinexpression .....</b>	<b>52</b>
<b>4.3</b>	<b>Auswahl der CpGs .....</b>	<b>54</b>
<b>4.4</b>	<b>Interpretation der Expressions- und Methylierungsanalysen.....</b>	<b>55</b>
4.4.1	Expression und Methylierung von <i>ABCB1</i> in der Imatinib-/Nilotinib-Resistenz.....	56

4.4.2	Expression und Methylierung von <i>ABCG2</i> in der Imatinib-/Nilotinib-Resistenz.....	57
4.4.3	Expression und Methylierung von <i>ZFP36L2</i> in der Imatinib-/ Nilotinib-Resistenz.....	59
4.4.4	Expression und Methylierung der <i>miR-212</i> in der Imatinib-/ Nilotinib-Resistenz.....	62
<b>4.5</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>64</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>66</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>69</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>78</b>
7.1	Medien und Puffer.....	78
7.2	Sequenzen der Promotorregionen der Gene .....	79
<b>8</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>83</b>
<b>9</b>	<b>Publikationsliste.....</b>	<b>84</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Entstehung des Philadelphia Chromosoms auf molekularer Ebene .....	2
Abbildung 2: Die historische Entwicklung von Therapien gegen CML.....	4
Abbildung 3: Ablauf der Pyrosequenzierung.....	24
Abbildung 4: Lage der analysierten CpGs. ....	25
Abbildung 5: Schematische Darstellung des <i>in vitro</i> Resistenzmodells der CML-Zelllinie K-562. ....	27
Abbildung 6: Arbeitsablauf der Methylierungsanalyse. ....	28
Abbildung 7: Pyrogramm der Pyrosequenzierung. ....	29
Abbildung 8: Vergleich der PCR ohne <i>nested</i> -Design mit der <i>nested</i> -PCR.....	29
Abbildung 9: Etablierung der PCR für die methylierte und unmethylierte DNA-Kontrolle.....	30
Abbildung 10: Analyse der mRNA- und Proteinexpression, sowie der Methylierung von <i>ABCB1</i> in der Imatinib-Resistenz.....	31
Abbildung 11: Analyse der m-RNA und Proteinexpression, sowie der Methylierung von <i>ABCB1</i> in der Nilotinib-Resistenz.....	33
Abbildung 12: Analyse der mRNA- und Proteinexpression, sowie der Methylierung von <i>ABCG2</i> in der Imatinib-Resistenz. ....	36
Abbildung 13: Analyse der mRNA- und Proteinexpression, sowie der Methylierung von <i>ABCG2</i> in der Nilotinib-Resistenz. ....	39
Abbildung 14: Analyse der mRNA- und Proteinexpression, sowie der Methylierung von <i>ZFP36L2</i> in der Imatinib-Resistenz.....	42
Abbildung 15: Analyse der mRNA- und Proteinexpression, sowie der Methylierung von <i>ZFP36L2</i> in der Nilotinib-Resistenz.....	45
Abbildung 16: Analyse der mRNA-Expression der <i>miR-212</i> in der Imatinib-Resistenz.....	47
Abbildung 17: Methylierungsanalyse der <i>miR-212</i> in der Imatinib Resistenz. ....	48
Abbildung 18: Analyse der mRNA-Expression und Methylierung der <i>miR-212</i> in der Nilotinib Resistenz. ....	49
Abbildung 19: Zusammenhang von Methylierung, mRNA-Expression und Proteinexpression. ....	51
Abbildung 20: Potenziell verminderte Affinität von C-Myc an seine Bindungsregion in	

der Promotorsequenz durch Hypermethylierung. ....	61
Abbildung 21: Potenziell verminderte Affinität von CTCF an seine Bindungsstelle in der Promotorregion durch Hypermethylierung. ....	63

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: PCR-Primer mit der jeweils optimierten Annealing-Temperatur.....	14
Tabelle 2: Sequenzierprimer für das Pyrosequenzieren.....	15
Tabelle 3: Auflistung der für die Genexpressionsanalyse verwendeten TaqMan- Assays.....	16
Tabelle 4: Verwendete primäre und sekundäre Antikörper.....	16
Tabelle 5: DNA-Sequenzen der Zielregionen der Pyrosequenzierung. ....	25

# 1 Einleitung

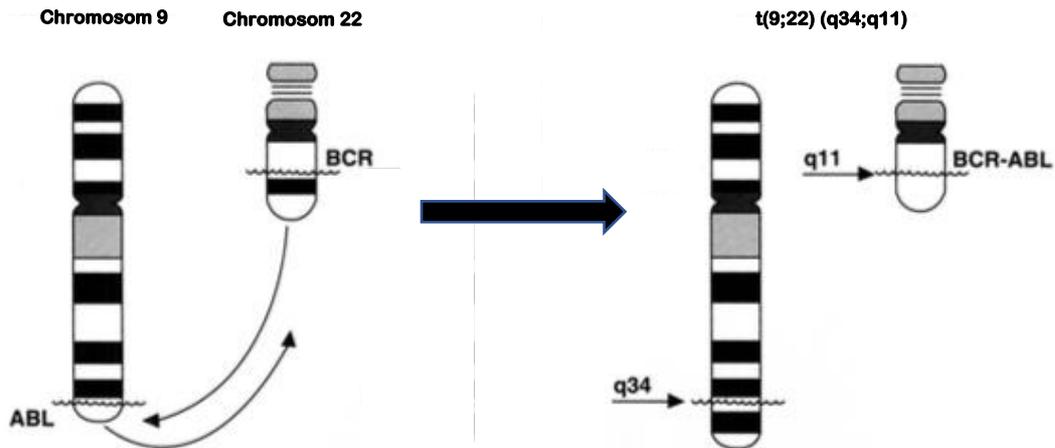
## 1.1 Chronisch myeloische Leukämie

### 1.1.1 Epidemiologie

Die chronisch myeloische Leukämie (CML) ist eine seltene maligne Erkrankung des Blutes, welche durch eine ungehemmte Zellteilung einer pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle charakterisiert ist. Pro Jahr beträgt die Inzidenz der CML etwa 1-2 Menschen auf 100 000. Das mittlere Alter bei Diagnosestellung liegt zwischen 57 und 65 Jahren, wobei Männer 1,2 - 1,7 mal häufiger betroffen sind als Frauen (Hehlmann et al. 2007; Höglund et al. 2015). Als einziger erwiesener Risikofaktor für die CML ist die Exposition mit ionisierender Strahlung bekannt (Heyssel et al. 1960).

### 1.1.2 Pathophysiologie

Bei 95% aller CML-Patienten lässt sich in den myeloischen Zellen das Philadelphia Chromosom nachweisen (Frazer et al. 2007). Dieses wurde erstmals 1960 von Peter C. Nowell und David A. Hungerford beschrieben und nach seinem Entdeckungsort benannt (Nowell & Hungerford 1960). Dabei handelt es sich um ein verkürztes Chromosom 22, welches durch eine reziproke Translokation zwischen den langen Armen der Chromosomen 9 und 22  $t(9;22)(q34;q11)$  entsteht (Rowley 1973). Dabei fusioniert das ABL-Gen, benannt nach H.T. Abelson auf Chromosom 9, welches eine Kinasedomäne enthält, mit der *Breakpoint cluster region* (BCR) auf Chromosom 22 (Druker et al. 2001; Groffen et al. 1984). Die Expression der ABL-Tyrosinkinase ist unter physiologischen Bedingungen streng reguliert. Durch die Fusion mit dem BCR-Gen geht diese Kontrolle verloren und die Tyrosinkinase wird konstitutionell aktiviert (Cilloni & Saglio 2012). Das BCR/ABL-Fusionsprotein interagiert mit verschiedenen anderen Effektor-Proteinen, wie dem Kinaseregulatorprotein CRKL (*CT10 relator of kinase*) und dem *Growth factor receptor-bound protein 2* (GRB-2). Dadurch kommt es zur Aktivierung verschiedener mitogener Signalwege wie unter anderem dem Ras-MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) Signalweg. Dies führt zu einer gesteigerten Zellproliferation und Transkriptionsaktivität bei verminderter Apoptoserate (Deininger et al. 2000; Melo & Barnes 2007; Frazer et al. 2007).



**Abbildung 1: Die Entstehung des Philadelphia Chromosoms auf molekularer Ebene.** Modifiziert nach Kantarjian (Kantarjian et al. 1993).

### 1.1.3 Klinik

Klinisch werden drei Krankheitsphasen unterschieden. Die erste ist die chronische Phase, welche im Durchschnitt etwa drei bis fünf Jahre andauert. Zu diesem Zeitpunkt können die klonal proliferierenden Zellen noch ausreifen, jedoch ist schon eine Linksverschiebung im Blut erkennbar. Die Diagnosestellung erfolgt in ca. 50 % der Fälle als Zufallsbefund, da die Patienten meist asymptomatisch sind oder über diffuse Beschwerden, wie Müdigkeit, Gewichtsverlust, Unwohlsein oder Schmerzen im linken Oberbauch klagen (Melo & Barnes 2007; Frazer et al. 2007).

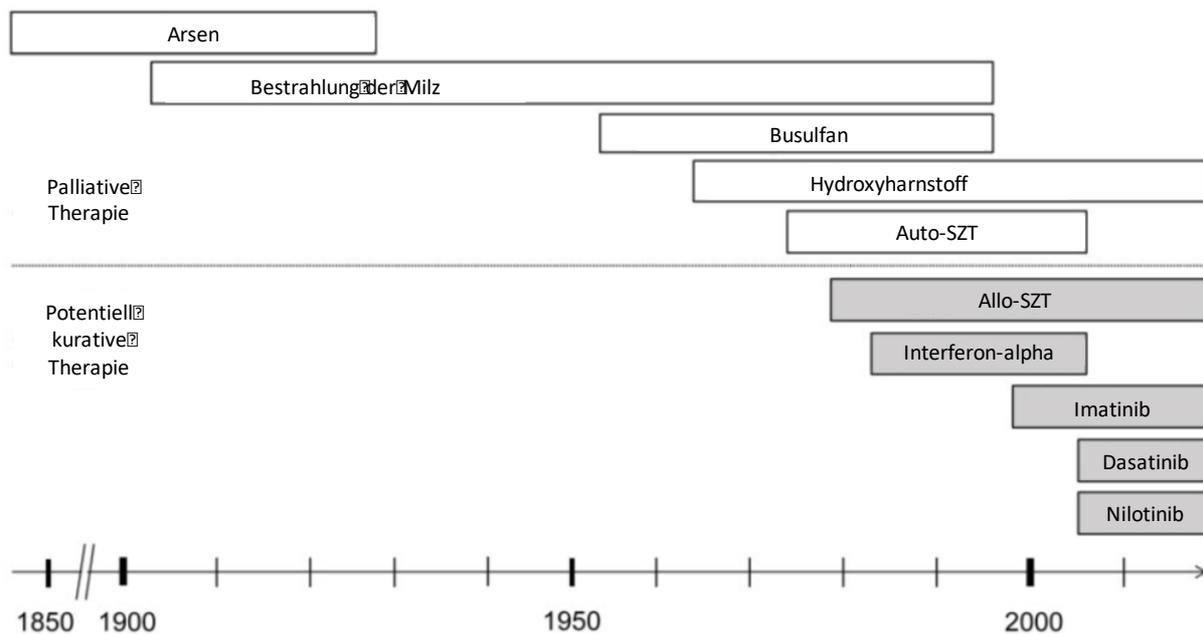
Bei Progression spricht man von der Akzelerationsphase. Die Krebszellen verdrängen zunehmend die gesunden Zellen im Knochenmark und es lässt sich eine erhöhte Blutungsneigung, sowie eine gesteigerte Infektanfälligkeit der Patienten beobachten. Außerdem fallen die Patienten vermehrt durch Splenomegalie und Anämie auf. Auf molekularer Ebene lassen sich in dieser, meist mehrere Monate andauernden Phase neben dem Philadelphia Chromosom noch andere genetische Aberrationen, wie ein zusätzliches Philadelphia Chromosom, ein Isochrom 17q, Trisomie 8 oder ein Verlust von *myc* und *p53* nachweisen (Frazer et al. 2007).

Die terminale Erkrankungsphase ist die Blastenkrise. In diesem Endstadium werden massenhaft unreife, nicht funktionstüchtige Zellen in das Blut ausgeschwemmt. Unbehandelt führt der Blastenschub innerhalb weniger Wochen zum Tod (Kantarjian et al. 1987).

#### 1.1.4 Therapie

Nach der initialen Entdeckung der CML 1845, zeitgleich durch Hughes Bennett und Rudolf Virchow, wurden Therapieversuche mit Arsen, Radiotherapie und dem Alkylans Busulfan unternommen (Geary 2000). 1972 gelang es schließlich erstmals das Blutbild eines Patienten unter Therapie mit Hydroxyharnstoff kurzfristig zu normalisieren (Kantarjian et al. 1993). Mit der allogenen Stammzelltransplantation gelang Mitte der 1970er Jahre erstmals eine *restitutio ad integrum* (Woessner et al. 2011). Aufgrund begrenzter Spenderzahl und hoher Mortalität bei der Stammzelltransplantation galt es jedoch weiter, die medikamentöse Therapie zu optimieren (Biggs et al. 1992). In den 90er Jahren konnte mit Interferon- $\alpha$  erstmals auf medikamentösem Weg bei ca. 33 % der Patienten eine zytogenetische Remission erreicht werden (Kantarjian et al. 2003). In weiteren Studien wurde die Kombination von Interferon- $\alpha$  mit dem Zytostatikum Cytarabin als Standard-Therapie empfohlen, welche jedoch das Fortschreiten der Erkrankung bis zur Blastenkrise nicht verhindern konnte (Guilhot et al. 2012).

Ende des 20. Jahrhunderts wurde der erste selektive Tyrosinkinaseinhibitor (TKI) in Form des 2-Phenylaminopyrimidin-Derivates Imatinib gefunden. TKIs binden kompetitiv und selektiv an der ATP-Bindungsstelle spezifischer Tyrosinkinasen und verhindern dadurch die Übertragung eines Phosphatrestes auf das Substrat (Buchdunger et al. 1996). Damit fällt ein wesentlicher Proliferationsstimulus der Tumorzelle weg, was zu einer gesteigerten Apoptoserate führt (Gambacorti-Passerini 1997). Imatinib bindet spezifisch an die Kinasen-Domäne von BCR-ABL. 2003 veröffentlichten Stephen G. O'Brien *et al.* erste Ergebnisse der *International Randomized Study of Interferon and STI571* (IRIS), welche die eindeutige Überlegenheit des TKI Imatinib gegenüber der herkömmlichen Therapie der CML mit Interferon- $\alpha$  und Cytarabin zeigten (O'Brien et al. 2003). Aufgrund von primären und sekundären Resistenzen gegen Imatinib wurden weitere Generationen der TKI entwickelt, zu denen unter anderen Nilotinib und Dasatinib zählen. Heute werden die TKIs als Goldstandard in der Therapie der CML eingesetzt (Baccarani et al. 2013).



**Abbildung 2: Die historische Entwicklung von Therapien gegen CML.** Modifiziert nach Pavlu *et al.* (Pavlu *et al.* 2011). Mit der allogenen Stammzelltransplantation (Allo-SZT) war Ende des 20. Jahrhunderts der erste kurative Therapieansatz geschaffen, welcher bis heute neben dem Goldstandard Imatinib, Nilotinib oder Dasatinib eine Therapiealternative bietet. Auto-SZT: Autologe Stammzelltransplantation.

### 1.1.5 Resistenzen in der Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren

Trotz des immens verbesserten Überlebens von Patienten mit CML durch die TKIs, stellen Resistenzen gegen diese zielgerichteten Therapeutika eine große Einschränkung in der Anwendung dar. Etwa ein Drittel der mit Imatinib therapierten CML-Patienten benötigen im Verlauf aufgrund von Resistenzen eine alternative Therapie (Bixby & Talpaz 2010; Hochhaus *et al.* 2017).

Resistenzen können sowohl primär (schon vor Therapiebeginn vorhanden), als auch sekundär (entstehen während der Therapie) auftreten. Des Weiteren unterscheidet man zwischen BCR/ABL-abhängigen und –unabhängigen Resistenzmechanismen.

Bei den BCR/ABL-abhängigen Resistenzfaktoren handelt es sich um Veränderungen, die direkt mit der Tyrosinkinase in Verbindung stehen, oder einen unmittelbaren Einfluss auf diese nehmen. Beispielsweise seien hier *BCR/ABL*-Amplifikationen oder –Mutationen genannt, welche die Raumstruktur der BCR/ABL-Tyrosinkinase so verändern, dass die TKIs nicht mehr binden können (Schindler *et al.* 2000).

Die BCR/ABL-unabhängigen Resistenzmechanismen beruhen hingegen auf verschiedenen Faktoren, welche in keinem direkten Zusammenhang mit der Tyrosinkinase stehen. Auslöser für solche Resistenzen können eine verminderte

Konzentration des TKI im Intrazellularraum durch verminderten Import oder gesteigerten Export des Wirkstoffs aus der Zelle sein. Auch zelluläre Ruhestadien oder genetische wie auch epigenetische Veränderungen anderer Gene können die Wirkung der TKI BCR/ABL-unabhängig vermindern. Im Folgenden werden einige Faktoren, die im Rahmen der BCR/ABL-unabhängigen Resistenzgenese diskutiert werden, näher betrachtet.

#### **1.1.5.1 Rolle der Effluxtransporter ABCB1 und ABCG2**

Die *ATP-binding cassette transporters* (ABC-Transporter) bilden eine Untergruppe der Effluxtransporter. Sie nutzen durch ATP-Hydrolyse freigesetzte Energie, um spezifische Substrate über die Membran aus der Zelle herauszubewegen (Higgins 1992; Dean et al. 2001). Zu dieser Untergruppe der Effluxtransporter zählen unter anderen auch ABCB1 (P-Glykoprotein) und ABCG2 (BCRP, *breast cancer related protein*). Sie sind sowohl an physiologischen, als auch an malignen Prozessen im Organismus beteiligt.

Unter anderem tragen sie zur Entgiftung der Leber, der Nieren, sowie des Gastrointestinaltraktes bei. Außerdem kontrollieren sie den Transfer von Substanzen über die Blut-Hirn-, Blut-Plazenta- und Blut-Hoden-Schranke (Leonard 2003). Neben körpereigenen Substanzen, wie Cholesterin in den Gallenkanälen oder der Tubulusmembran, transportieren die Effluxtransporter auch Arzneistoffe, wie Beta-Blocker, Antibiotika und vor allem Zytostatika (Cascorbi 2006). Daher spielen sie auch eine wichtige Rolle in der Multimedikamentenresistenz bei Krebserkrankungen (Higgins 1992).

Mehrere Indizien sprechen für eine Beteiligung von ABCB1 und ABCG2 in der Resistenzentwicklung gegen TKI in der Therapie der CML: Zum einen kann man bei CML-Patienten eine erhöhte Konzentration der beiden Effluxtransporter ABCB1 und ABCG2 in den CML-Stammzellen beobachten (Jordanides 2006; Thomas 2004). Zum anderen sind die TKIs, die in der CML Anwendung finden, mit Ausnahme von Bosutinib, Substrate sowohl von ABCB1 (Hamada et al. 2003; Hegedus et al. 2002), als auch von ABCG2 (Burger et al. 2004; Houghton et al. 2004).

### **1.1.5.2 Epigenetik**

Unter Epigenetik werden jene Mechanismen zusammengefasst, welche Einfluss auf die Genaktivität nehmen und nicht auf Veränderungen der Sequenz der Desoxyribonukleinsäuren (wie beispielsweise durch Mutation) beruhen (Holliday & Pugh 1975). Hierzu zählen Veränderungen in der Methylierung der DNA, Chromatin- und Histon-Modifikationen, sowie veränderte Expressionsprofile nicht-kodierender RNAs (Egger et al. 2004).

Epigenetische Modifikationen können während des gesamten Lebens erworben werden (Fraga et al. 2005) und sind zugleich auch potentiell reversibel (Supic et al. 2013). Epigenetik spielt eine entscheidende Rolle in verschiedenen biologischen Vorgängen, wie in der embryonalen Entwicklung, bei der Inaktivierung des X-Chromosoms und bei der genetischen Prägung (Gibney & Nolan 2010; Tsai & Baylin 2011). Kommt es allerdings zu einer Fehlregulierung der epigenetischen Faktoren, so kann dies zu einer veränderten Genexpression führen, wodurch verschiedene Krankheiten, unter anderem Krebs, entstehen können (Egger et al. 2004).

### **1.1.5.3 Posttranskriptionelle Genregulation durch MicroRNAs**

MicroRNAs (miRs) sind kurze, nichtcodierende Ribonukleinsäuren, welche aus 21 bis 22 Nukleotiden aufgebaut sind. Sie nehmen eine wichtige Rolle in der posttranskriptionellen Genregulation ein. Insbesondere können sie die Expression ihrer Zielgene negativ beeinflussen. In diesem Fall spricht man von *Gen-silencing* (He & Hannon 2004; Lai 2003).

In den 1990er Jahren wurde mit *lin-4* die erste microRNA entdeckt. An ihr wurde erstmals die Funktion und der zugrunde liegende Mechanismus des *Gen-silencing* erforscht (Chalfie et al. 1981; Ambros & Horvitz 1984; Ambros & Horvitz 1987; Wightman et al. 1991; Lee et al. 1993). Die microRNA binden direkt an die *3'-untranslated-region* (UTR) ihrer spezifischen Ziel-mRNA und bewirken dadurch deren vermehrten Abbau oder eine Hemmung der Translation. Bis heute wurden hunderte weitere microRNAs entdeckt, welche ähnliche Regulationsmechanismen wie *lin-4* besitzen.

In den letzten Jahren ist in mehreren Studien gezeigt worden, dass einige microRNAs in verschiedenen Krebserkrankungen anhand ihrer Funktion in eine onkogene oder tumorsuppressive Kategorie eingeteilt werden können (Zheng et al. 2010; H. Li & Yang

2013). Auch die miR-212 nimmt Einfluss auf den Verlauf verschiedener Krebserkrankungen. So konnte ihre onkogene Wirkung beispielsweise beim kleinzelligen Bronchialkarzinom (Y. Li et al. 2012) und beim Pankreaskarzinom (Ma et al. 2014) gezeigt werden, während sie beim Magenkarzinom (D. Li et al. 2015) und beim kolorektalen Karzinom (Meng et al. 2013) die Rolle eines Tumorsuppressors einnimmt. Für die akute myeloische Leukämie (AML) wurde miR-212 sogar als unabhängiger positiv-prognostischer Marker beschrieben (Sun et al. 2012). Interessanter Weise entdeckten Turrini *et al.* eine inverse Korrelation zwischen der miR-212 und dem Effluxtransporter ABCG2 und zeigten, dass die miR-212 an die 3' UTR von ABCG2 binden kann (Turrini et al. 2012).

#### **1.1.5.4 Quiescence in der Arzneistoffresistenz**

Bei der Entstehung von Arzneistoffresistenzen kann ein Zustand der Zell-Inaktivität (*Quiescence*) beobachtet werden. Die Zellen verweilen in einem Ruhezustand, der sie vor der Wirkung von Chemotherapeutika schützt (Alarcón & Jensen 2011). Dieser Ruhezustand wird durch eine Stabilisierung der G0-G1-Phase des Zellzyklus erreicht. Zu dieser Stabilisierung kann unter anderem das *Zinc finger protein 36 ring finger protein-like 2* (ZFP36L2) beitragen, indem es Cyclin D1 und Cyclin D3 herunterreguliert, welche für den Übergang von der G1- in die S-Phase von essentieller Bedeutung sind (Galloway et al. 2016).

ZFP36L2 ist eines von vier Mitgliedern der Familie der *RNA binding proteins* (RBPs) und besitzt einen Tandem-CCCH-Zinkfinger. Diese Zinkfingerdomäne ist aus zwei Zinkfingern aufgebaut, jeweils bestehend aus drei Cysteinen und einem Histidin, welche eine tetraedisch aufgebaute koordinative Bindung mit dem zentralen Zinkion eingehen. Mit der Zinkfingerdomäne können die RBPs an AU-reiche Regionen (AREs) in der 3' UTR ihrer Ziel-mRNAs binden. Durch Deadenylierung bewirken sie die Destabilisierung der mRNA und letztendlich deren Abbau (Brooks & Blackshear 2013).

#### **1.1.6 DNA-Methylierung**

Die Methylierung der DNA ist ein schon seit langem bekannter und gut erforschter epigenetischer Mechanismus. Mittels DNA-Methyltransferasen (DNMTs) können über eine kovalente Bindung Methylgruppen an die C<sup>5</sup>- Atome von Cytosin-Basen transferiert werden (Holliday & Pugh 1975; Riggs 1975). Dabei werden insbesondere

Cytosine, auf welche direkt ein Guanin folgt (Cytosin-Phosphat-Guanin, CpG) methyliert. Die meisten dieser CpGs sind im Genom eines gesunden Menschen methyliert (Bird 2002). Bei vielen Tumorerkrankungen hingegen konnte eine globale Hypomethylierung der DNA festgestellt werden, welche mit einer genomischen Instabilität in Zusammenhang gebracht wird, die die Entstehung von Mutationen fördert (Esteller 2008; Feinberg & Vogelstein 1983; Goetz et al. 1985).

In den Promotorregionen von ungefähr 40 % der menschlichen Gene liegen sogenannte *CpG-islands* (Larsen et al. 1992). Dabei handelt es sich um Regionen mit einer Größe von meist mehr als 500 Basenpaaren und einem CpG Gehalt über 55 %. Diese CpG-reichen Regionen sind, anders als die CpGs des restlichen Genoms, zum größten Teil unmethyliert (Esteller 2008).

Veränderte *de novo*-Methylierung dieser *CpG-islands* können vermehrt in der frühen Karzinogenese nachgewiesen werden und können zu veränderten Genexpressionen führen (Jones & Baylin 2002). Dabei können sowohl die Hypomethylierung von Onkogenen mit einer gesteigerten Onkogenexpression, als auch die Hypermethylierung von Tumorsuppressorgenen mit einer verringerten Gentranskription, in Verbindung mit Krankheitsprogress gebracht werden (Trimarchi et al. 2011; Liu et al. 2016).

Es wird im Allgemeinen angenommen, dass die Methylierung der DNA negativ mit der Genexpression korreliert (Stein et al. 1982). Allerdings gilt es weitere Faktoren, wie beispielsweise die Bindung von Transkriptionsfaktoren, zu berücksichtigen, welche durch Methylierung beeinflusst werden können. Durch diesen Mechanismus ist auch ein positiver Zusammenhang von Methylierung und Transkriptionsrate zu erklären (Medvedeva et al. 2014).

## **1.2 Zielsetzung der Studie**

Die Einführung der TKIs hat die Prognose von CML-Patienten wesentlich verbessert. Jedoch limitieren bei ca. einem Drittel der Patienten primäre und sekundäre Resistenzen den Therapieerfolg und es muss auf andere Therapieoptionen ausgewichen werden. Die vorliegende Arbeit soll zum besseren Verständnis der Entstehung und Regulierung von BCR/ABL-unabhängigen Resistenzmechanismen beitragen.

Es wurden vier Gene ausgewählt, welchen eine Rolle in der Entstehung der Pharmakotherapieresistenz zugeschrieben wird: *ABCG2*, *ABCB1*, *ZFP36L2* und *miR-212*. Um Unterschiede zwischen den nativen und resistenten Zellen zu detektieren, erfolgte für diese Zielgene eine mRNA- und Proteinexpressionsanalyse sowohl in der Imatinib-, sowie auch in der Nilotinib-Resistenz.

Zeigt sich eine Dynamik in der Expression der Zielgene, so stellt sich die Frage, wodurch diese Veränderungen in der Resistenzentwicklung reguliert werden. Aus diesem Grund wurde zusätzlich zu der Expression auch die Methylierung der Promotorregionen der Zielgene in der Imatinib- und Nilotinib-Resistenzentwicklung analysiert.

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob epigenetische Modulationen, insbesondere Methylierungsveränderungen der DNA, in Korrelation mit Expressionsveränderungen der Zielgene stehen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte und Material

<b>Firma</b>	<b>Geräte/ Material</b>
Binder GmbH (Tuttlingen, Deutschland)	Brutschrank B28
Bio-Rad Laboratories (München, Deutschland)	Glasplatten 1,0 mm, 15-well Kamm Mini PROTEAN® Gelkammer Mini PROTEAN® System Gelgießstand Power Pac™ 300 Power Supply Subcell® GT Cell Elektrophoresekammer Sub-Cell® Model 192 T100™ Thermocycler
CEA GmbH (Hamburg, Deutschland)	Röntgenfilme CEA RP NEW 18 x 24
Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)	Centrifuge 5415 R Pipetten (0,5-1000 µl), Combitips (0,1- 2,5 ml) Thermomixer compact
GFL (Burgwedel)	Wasserbad
Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland)	Cryo S™ Schraubdeckelgefäße
Implen (München, Deutschland)	NanoPhotometer 1676
Kodak (Stuttgart, Deutschland)	Kodak Image Station 440 CF
Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)	GeneAmp PCR System 9700
Millipore (Schwalbach, Deutschland)	Polyvinylidendifluorid-Membranen
neoLab (Berlin, Deutschland)	Vortex Genie 2
Olympus GmbH (Hamburg, Deutschland)	Mikroskop Olympus CK2
Optik Labor Ltd (Lancing, UK)	Zählkammer Fuchs-Rosenthal
Qiagen (Hilden, Deutschland)	PSQ HS 96 MD PyroMark Q96 Vacuum Work Station
Schott (Mainz, Deutschland)	Glasgefäße
Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)	Heraeus Multifuge 3 S-R HeraSafe™ Zellkulturbank HeraCell™ Zellkulturbrutschrank MicroAmp® Optical Adhesive Film MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plates Nalgene® Cryo-Einfrierkontainer QuantStudio™ 7

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

### **2.1.2 Chemikalien und Reagenzien**

Alle für diese Arbeit verwendeten Chemikalien, stammen, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma-Aldrich (München, Deutschland) oder Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland). Die TKIs Imatinib und Nilotinib wurden freundlicherweise von Novartis GmbH (Nürnberg, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

<b>Firma</b>	<b>Chemikalien und Reagenzien</b>
Biochrom (Berlin, Deutschland)	Fötales Kälberserum
Biozym Scientific (Hessisch Oldendorf, Deutschland)	dNTPs
Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)	Roti-Nanoquant-Reagenz Tris-EDTA-Puffer
Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)	TaqMan Universal PCR Master Mix with AmoErase UNG
QIAGEN (Erlangen, Deutschland)	peqGOLD TriFast
Millipore (Schwalbach, Deutschland)	Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate
Qiagen (Hilden, Deutschland)	Annealing-Puffer (20 mM Tris Acetat, 2 mM Magnesium Acetat) Bindungspuffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 2 M NaCl, 1 ml/l Tween 20) Streptavidin Sepharose Beads dNTPs EpiTect® Control DNA, konvertiert, methyliert/ unmethyliert PyroMark Enzyme Mixture PyroMark Substrate Mixture
Santa Cruz (Dallas, USA)	ImmunoCruz Western Blotting Luminol Reagent
Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland)	BlueJuice™ Gel Loading Buffer Ethidiumbromid GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder GIBCO® RPMI-1640 Medium MgCl <sub>2</sub> 10x PBS Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml) Platinum™ Taq Polymerase Puffer (500 mM KCl, 200 mM Tris-HCl; pH 8.4)

### 2.1.3 Kits

Firma	Kit
Qiagen (Hilden, Deutschland)	EpiTect® Bisulfit Kits Gentra Puregene Cell Kit
Roche (Basel, Schweiz)	First Strand cDNA Synthesis Kit
Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland)	TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit

### 2.1.4 Primersequenzen

Die Primer wurden mit der Pyromark Assay Design 2.0 Software (Quiagen, Hilden) designt und bei Sigma-Aldrich (München) hergestellt. Die Primer für die PCR wurden in einer Konzentration von 100 µM angesetzt und für die weitere Verwendung in der PCR 1:10 und für die Pyrosequenzierung 1:5 verdünnt.

**Tabelle 1: PCR-Primer mit der jeweils optimierten *Annealing*-Temperatur.** Die *nested*-Rückwärtsprimer sind biotinyliert (btn).

Name des Primers	Primer Sequenz (5'→ 3')	Annealing-Temperatur	Position (GHCh37/hg19)
ABCB1_forward	GGATAGTGTGAAGTTTTTTGGTAAG	50°C	chr7 - Strang 87229942 - 87229966
ABCB1_reverse	AACACTACAAAACTTTCCTATAC		chr7 - Strang 87229651 - 87229674
ABCB1_forward_nested	TGGGGTTAGATTTAGATTTAGGAGT	56°C	chr7 - Strang 8722990 - 87229926
ABCB1_reverse_nested (btn)	CAACATCTCCACCAAAAACAAAATTAATAAAT		chr7 - Strang 87229685 - 87229714
ABCG2_forward	TGGGATTTAAATAAAAGATTTAATGGT	50°C	chr4 + Strang 89152518 - 89152544
ABCG2_reverse	ACCTTTACATTAACCTAACTCTTTAT		chr4 + Strang 89152878 - 89152905
ABCG2_forward_nested	AATAAAAGATTTAATGGTTTTAGTT	48°C	chr4 + Strang 89152527 - 89152551
ABCG2_reverse_nested (btn)	ACATTAACCTAACTCTTTATT		chr4 + Strang 89152877 - 89152899
ZFP36L2_forward	TAGTTTTTGTTAGATGAGGGTTGTAGGAT	52°C	chr2 + Strang 43454767 - 43454795
ZFP36L2_reverse	AATCCCTAAATAACAAACCTAATTCT		chr2 + Strang 43455113 - 43455138
ZFP36L2_forward_nested	GTAGGTGGGGTTGTATAG	48°C	chr2 + Strang 43454818 - 43454835
ZFP36L2_reverse_nested (btn)	AAACCTAATTCTTTCCCAAC		chr2 + Strang 43455094 - 43455112
miR212_forward	GGGGTTTTGAGTTATTTTTTAGGAAA	53°C	chr17 - Strang 1954125 - 1954152
miR212_reverse	ATATCCCAAAAAAACAACCTT		chr17 - Strang 1953799 - 1953818
miR212_forward_nested	AAGTGAGGAGAAGGTGTT	52°C	chr17 - Strang 1954066 - 1954146
miR212_reverse_nested (btn)	CCCCCATCCTAAAAAACAACCTC		chr17 - Strang 1953862 - 1953886

**Tabelle 2: Sequenzierprimer für das Pyrosequenzieren.** Zusätzlich zu Sequenz und Lage des Primers sind die Positionen der analysierten CpGs angegeben.

Name des Primers	Primer Sequenz (5'→ 3')	Position (GRCh37/hg19)	Position der analysierten CpGs
ABCB1_sequencing1	GTAGTGGTATTGGATTATG	chr7 87229848 - 87229900	chr7:87229856 chr7:87229851 chr7:87229849 chr7:87229840 chr7:87229838 chr7:87229836
ABCB1_sequencing2	GGGATTTGTTTTTGGAGT	chr7 87229784 - 87229842	chr7:87229810 chr7:87229808 chr7:87229804 chr7:87229784 chr7:87229780 chr7:87229778 chr7:87229775
ABCB1_sequencing3	GGAATAGGGAGGGAGA	chr7 87229747 - 87229783	chr7:87229752 chr7:87229744 chr7:87229741 chr7:87229725 chr7:87229723
ABCG2_sequencing1	AAATAAAGATTTAATGGTTTTAG	chr4 89152526 - 89152549	chr4:89152554
ABCG2_sequencing2	AGGGGGAAAGTTATATG	chr4 89152596 - 89152612	chr4:89152647 chr4:89152649
ABCG2_sequencing3	GGATTATGATATAATTTGAAAAGGA	chr4 89152837 - 89152861	chr4:89152864
ZFP36L2_sequencing1	TTGTATAGAAGTTGATGGTG	chr2 43454828 - 43454847	chr2:43454850 chr2:43454852 chr2:43454876 chr2:43454885
ZFP36L2_sequencing2	GTTAGTTTAGTATTTTAATAGT	chr2 43454877 - 43454898	chr2:43454902 chr2:43454914 chr2:43454925 chr2:43454929 chr2:43454934 chr2:43454940
ZFP36L2_sequencing3	GGGTAAGGAGGGGATAT	chr2 43454945 - 43454961	chr2:43454972 chr2:43454991 chr2:43455012
ZFP36L2_sequencing4	TTTGGTTTAGGGTATTTTTTT	chr2 43455022 - 43455042	chr2:43455046 chr2:43455048 chr2:43455088 chr2:43455097 chr2:43455103
miR212_sequencing1	AAGTGAGGAGAAGGTGTT	chr17 1954066 - 1954146	chr17:1954106 chr17:1954094 chr17:1954092 chr17:1954067 chr17:1954067 chr17:1954065
miR212_sequencing2	TTTTTTTAGGTAGGTT	chr17 1953830 - 1953983	chr17:1953933 chr17:1953926 chr17:1953919 chr17:1953917 chr17:1953914 chr17:1953908 chr17:1953868

## 2.1.5 TaqMan-Assays

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

**Tabelle 3: Auflistung der für die Genexpressionsanalyse verwendeten TaqMan-Assays.**

Genname	Katalognummer
ABCB1	Hs00184500_m1
ABCG2	Hs01053790_m1
Hsa-miR-212-3p	000515
U6 snRNA	001973
ZFP36L2	Hs00272828_m1
18S	Hs99999901_s1

## 2.1.6 Antikörper

**Tabelle 4: Verwendete primäre und sekundäre Antikörper.** Die Blockierlösung besteht aus dem jeweiligen Prozentsatz an Milchpulver.

Name	Klon	Herkunft	Verdünnung (%) in Blockierlösung	Firma
Anti-ABCB1	D-11	Maus	1:1000 in 1 %	Santa Cruz (Dallas, USA)
Anti-ABCG2	BXP-21	Maus	1:1000 in 1%	Abcam (Cambridge, UK)
Anti-BRF1/2	#2119	Kaninchen	1:1000 in 1%	CST (Danvers, USA)
Anti-GAPDH	GT239	Maus	1:2000 in 2%	GeneTex (Irvine, USA)
Anti-mouse NXA931 ( <i>horseradish peroxidase-conjugated second antibody</i> )	NXA931	Schaf	1:1000 in 1%	GE Healthcare (München)
Anti-rabbit ( <i>horseradish peroxidase-conjugated second antibody</i> )	7074	Ziege	1:1000 in 1%	CST (Danvers, USA)

## 2.1.7 Zelllinie

Es wurde die CML-Zelllinie K-562 verwendet. Diese Zelllinie entstand ursprünglich 1970 durch Kultivierung von Ph<sup>+</sup> CML-Zellen, welche aus dem Pleurapunktat einer 53-jährigen CML-Patientin in der Blastenkrise isoliert wurden (C. B. Lozzio & B. B. Lozzio 1975). Die Zelllinie wurde von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (ACC-10; DSMZ, Braunschweig) bezogen.

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Zellkultur**

Die K-562 Zellen wurden unter Standard Zellkulturbedingungen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt) mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) (Biochrom, Berlin) und 1 % Penicillin/ Streptomycin (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt) kultiviert.

Nach Erreichen der gewünschten Zelldichte wurden die Zellen in Falcon-Röhrchen überführt und 5 min bei 200 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in frischem Kulturmedium in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:10, entsprechend der Zelldichte resuspendiert und in neue Zellkulturflaschen überführt.

### **2.2.2 Bestimmung der Zellzahl und Mikroskopie**

Um die Zelldichte zu bestimmen und eine bestimmte Zellzahl für die Experimente verwenden zu können, wurde die Zellsuspension mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer unter dem Olympus CK2-Mikroskop gezählt.

### **2.2.3 Einfrieren und Auftauen der Zellen**

Zum Einfrieren kultivierter Zellen wurden diese, wie in 2.2.1 beschrieben herunterzentrifugiert, das Pellet mit mindestens  $2 \times 10^6$  Zellen in 8 ml Einfriermedium (90 % FCS, 10 % DMSO) resuspendiert und in ein Cryo-Röhrchen überführt. Um ein kontinuierliches Einfrieren zu garantieren, wurden die Röhrchen über Nacht in einem Einfriercontainer auf -80 °C heruntergekühlt und anschließend bei dieser Temperatur gelagert.

Um Zellen aufzutauen, wurden die Cryo-Röhrchen mit der Zellsuspension bei 37 °C in einem Wasserbad aufgewärmt, in 7 ml vorgewärmtes Zellmedium aufgenommen und in Falcon-Röhrchen überführt. In diesen wurde die Zellsuspension 8 min bei 200 x g zentrifugiert und das Zellpellet nach Entfernung des Überstandes in 20 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in eine Zellkulturflasche überführt und wie in 2.2.1 beschrieben im Brutschrank inkubiert.

### **2.2.4 Resistenzzüchtung mit Imatinib und Nilotinib**

Die K-562 Zellen wurden gegen Imatinib oder Nilotinib resistent gezüchtet. Diese Resistenzzüchtungen wurden zweimal durchgeführt um biologische Replikate zu

erzeugen. In der Imatinib-Resistenzzüchtung wurde zunächst eine Konzentration von 0,1  $\mu\text{M}$  Imatinib auf die nativen K562 Zellen gegeben. Nach Wiederherstellung der zellulären Proliferationsrate in den mit Imatinib behandelten Kulturen, wurde die Imatinib-Konzentration schrittweise bis auf 2  $\mu\text{M}$  erhöht (0,1; 0,3; 0,5; 2  $\mu\text{M}$ ). In der Nilotinib-Resistenz erfolgte die Resistenzzüchtung der K-562 Zellen gegen 100 nM Nilotinib.

## **2.3 Analyse der Genexpression**

### **2.3.1 RNA-Isolation**

Die RNA-Isolation aus den Zellpellets mit  $2 \times 10^6$  Zellen erfolgte mit peqGOLD TriFast (PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen). Das Verfahren wurde nach Herstellerangaben unter Verwendung von 500  $\mu\text{l}$  TriFast-Reagenz durchgeführt. Zunächst wurden die Zellbestandteile durch Hinzugabe von Phenol-Chloroform in einer zweiphasigen Emulsion entsprechend ihrer Löslichkeit aufgetrennt. Die RNA-Präzipitation erfolgt durch Hinzugabe von Isopropanol. Im letzten Schritt wurde die RNA in 70 % Ethanol gewaschen und in Wasser resuspendiert. Die Konzentration der in Wasser gelösten RNA wurde mit dem NanoPhotometer bei 260 nm ermittelt. Anschließend wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

### **2.3.2 Reverse Transkription der mRNA**

Um die Genexpression mittels qRT-PCR messen zu können, ist es notwendig die mRNA der einzelnen Proben mittels reverser Transkription in cDNA umzuschreiben. Hierfür wurde das Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) nach Herstellerangaben verwendet. Es wurden jeweils 500 ng der, wie in 2.3.1. beschrieben, gewonnenen RNA eingesetzt und unter Verwendung von Random Hexamer Primern mittels einer Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die Transkription wurde 10 min bei  $25\text{ }^\circ\text{C}$ , 60 min bei  $50\text{ }^\circ\text{C}$  und 5 min bei  $85\text{ }^\circ\text{C}$  durchgeführt. Die anschließende Lagerung der cDNA erfolgte bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ .

### **2.3.3 Analyse der mRNA Expression**

Die quantitative Real Time PCR dient der Messung der RNA-Expression eines Gens. Die Quantifizierung erfolgt mittels Fluoreszenz-Messungen, die während eines Amplifikationszyklus in Echtzeit erfasst werden. Die Expression der mRNA / microRNA

wird mit der eines *housekeeping genes*, welches eine ubiquitäre Expression in allen Proben aufweist, ins Verhältnis gesetzt, um so Vergleiche der mRNA/microRNA-Expression zwischen den verschiedenen Proben zu erlauben.

Zuerst wird die Doppelstrang-DNA bei 95 °C in ihre beiden Einzelstränge aufgespalten. Bei der folgenden Abkühlung auf 60 °C binden sowohl genspezifische Primer, als auch eine Sonde, die an ihrem 5' Ende einen fluoreszierenden *Reporter* und an ihrem 3' Ende einen *Quencher* trägt. Letzterer unterdrückt durch Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) das Fluoreszenzsignal des *Reporters* am anderen Ende der Sonde. Spaltet nun die Polymerase während der Elongationsphase den *Reporter* ab, so bricht der FRET aufgrund der vergrößerten Distanz zwischen *Reporter* und *Quencher* ab, sodass es zu einem Fluoreszenzsignal kommt, welches detektiert werden kann. Die Signalstärke steigt also proportional mit der Anzahl der Amplifikationszyklen an.

Die Ct-Werte (*cycle threshold*), welche angeben, ab dem wievielten Zyklus sich das Fluoreszenzsignal signifikant vom Hintergrund abhebt, wurden gemäß der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode in Relation zueinander gesetzt (Livak & Schmittgen 2001). Dazu wurde zunächst der Ct-Wert der endogenen Kontrollen (*Housekeeper*) vom Ct-Wert der anderen Proben abgezogen.

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{Zielgen}} - \text{Ct}_{\text{Housekeeper}}$$

In einem zweiten Schritt wurde dann von dem errechneten  $\Delta\text{Ct}$ -Wert der mit Tyrosinkinaseinhibitor behandelten Proben, der CT-Wert der nativen Probe abgezogen.

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{mit TKI behandelte Probe}} - \Delta\text{Ct}_{\text{Kontrollprobe}}$$

Die relativen Expressionsunterschiede zwischen den verschiedenen Proben wurden abschließend über  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  ermittelt.

## 2.4 Analyse der Proteinexpression

### 2.4.1 Zellyse zur Proteingewinnung

Als erstes wurden  $2 \times 10^6$  Zellen in 50  $\mu$ l denaturierendem Lyse-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden die Proben auf 95 °C erhitzt und die Zellen mit Ultraschall lysiert. Durch Zentrifugation für 15 min bei 15000 x g und 4 °C setzen sich die nicht-lysierten Zellbestandteile als Pellet ab, während die Zellproteine mit dem Überstand isoliert werden können.

Zur photometrischen Bestimmung der Proteinmenge im Lysat wird eine Proteinlösung mit definierter Konzentration für eine Kalibrierungsreihe benötigt. Zu diesem Zweck wurden BSA-Lösungen mit den Konzentrationen 0,1 mg/ml und 0,2 mg/ml verwendet. Von den Proben wurde eine Verdünnung von 1:30 mit Wasser angesetzt. Nach Hinzugabe von Dye-Reagent zu den Proben, den Standards, sowie zu der Negativkontrolle (Wasser), wurde die jeweilige Absorption nach 10 min Inkubationszeit bei 595 nm gemessen.

Die Proteinkonzentration wurde abschließend anhand folgender Formel bestimmt.

$$K(\text{mg/ml}) = ((\text{Absorption}_{\text{Probe}} \times \text{Konzentration}_{\text{Standard}}) / \text{Absorption}_{\text{Standard}}) \times 30$$

Die Proteine wurden bei -80 °C eingefroren.

### 2.4.2 Western Blot

Zur Vorbereitung der Western Blots wurden 10-20  $\mu$ g Protein mit 5 x Probenpuffer (60mM TRIS pH 6.8, 25 % Glycerol, 2 % SDS, 14,4 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) verdünnt, 5 min bei 95 °C erhitzt und auf 10 oder 12 % SDS-Polyacrylamid-Gelen (für die Zusammensetzung und die verwendeten Puffer siehe 7.1) aufgetrennt.

Im Anschluss wurden die Gele 60 min lang bei 43 mA auf Polyvinylidendifluorid-Membranen (Millipore, Schwalbach) geblottet. Diese wurden daraufhin mit 4 % Milchpulver, gelöst in TBST (*TRIS-buffered saline with Tween-20*), blockiert. Es erfolgte die Inkubation mit den primären Antikörpern über Nacht bei 4 °C (Tabelle 4). Anschließend wurden die Membranen nach zwei Waschsritten mit TBST mit dem sekundären Antikörper für 1 h inkubiert. Es erfolgten drei weitere Waschschrte mit TBST, bevor die Membranen mittels des *enhanced*

*chemiluminescence* (ECL) Systems und Hyperfilmen (CEA GmbH; Millipore) entwickelt wurden.

Um die gebundenen Antikörper von den geblotteten Proteinen zu lösen, erfolgte ein Stripping mittels 2 % SDS, 62,5 mM TRIS und 100 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol für 30 min bei 50 °C. Im Anschluss wurden die Membranen mit Anti-GAPDH inkubiert. Dazu wurden die Membranen mit TBST gewaschen und mit Milchpulver blockiert, bevor die Inkubation mit den primären und sekundären Antikörpern wie oben beschrieben erfolgte.

## **2.5 Analyse der DNA-Methylierung**

Die Methylierungsanalyse der Promotorregion der Zielgene erfolgte mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung. Bei der Behandlung der DNA mit Bisulfit werden durch die Bisulfit-Reaktion unmethylierte Cytosine zu Uracilen konvertiert, während methylierte Cytosine nicht mit Bisulfit reagieren. Bei einer anschließenden Amplifikation der DNA mittels PCR wird Uracil komplementär mit Adenin gepaart, während die verbliebenen Cytosine (unmethyliert) mit Guanin gepaart werden. Abschließend wird eine DNA-Sequenzierung der bisulfitkonvertierten DNA durchgeführt, welche folglich Rückschlüsse auf den Methylierungsstatus der Ursprungs-DNA erlaubt.

### **2.5.1 DNA Isolation**

Die DNA wurde mit dem Genra Puregene Cell Kit (Qiagen) isoliert. Dazu wurden  $1 \times 10^6$  Zellen eingesetzt und mit einem anionischen Detergenz lysiert. Mit einer RNase wurde die in dem Lysat vorhandene RNA verdaut und in einem weiteren Schritt die Proteine aus der Probe präzipitiert. Abschließend wurde die DNA zweimal in Alkohol gewaschen und entsprechend der Herstellerangaben in 1mM EDTA und 10 mM Tris-Cl gelöst. Die Konzentration der isolierten DNA wurde photometrisch am NanoDrop bei 260 und 280 nm gemessen. Die Lagerung der DNA erfolgte bei 4 °C.

### **2.5.2 Bisulfit-Konversion**

1  $\mu$ g isolierte DNA wurde in die Bisulfit-Konversion eingesetzt, welche mit dem Epiect Bisulfite Kit von Qiagen durchgeführt wurde. Dabei wurde nach Herstellerprotokoll verfahren.

Durch die Bisulfit-Reaktion werden unmethylierte Cytosine der DNA zu Uracil konvertiert, während methylierte Cytosine nicht umgeschrieben werden können. So wird die DNA bei der Bisulfit-Konversion in eine Sequenz umgeschrieben, welche Aufschluss über den Methylierungsstatus der ursprünglichen DNA gibt. Die bisulfitkonvertierte DNA wurde bei 4 °C aufbewahrt.

### 2.5.3 PCR

Die Primer für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) auf der bisulfitkonvertierten DNA wurden mit der Pyromark Assay Design 2.0 Software (Quiagen, Hilden) designt und sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Die PCR-Ansätze enthielten je 0,2 µM Vorwärts- und Rückwärtsprimer, 0,8 mM dNTPs (0,2 mM pro dNTP), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, den Puffer (200 mM Tris HCl (pH 8.4), 500 mM KCl), 2 µl bisulfitkonvertierte DNA, sowie 2 U einer *Hot Start* Polymerase (Platinum Taq Polymerase, Invitrogen). Dieses Enzym ist bei Raumtemperatur von Antikörpern blockiert, welche sich zu Beginn der Amplifikation durch Erhitzen des PCR Ansatzes lösen und somit die Aktivität der Polymerase freigeben. Bei den PCR-Ansätzen für *ABCG2* und *ZFP36L2* wurden jeweils 0,5 µl DMSO (5 %) hinzugegeben. Bei jeder PCR wurde eine Negativkontrolle ohne DNA durchgeführt, um eine Kontamination des Mastermixes auszuschließen, sowie eine vollständig methylierte, konvertierte Kontrolle (Institut für Humangenetik, UKSH Kiel) und eine unmethylierte, konvertierte Kontrolle (EpiTect® Control DNA, konvertiert unmethyliert).

Die PCR-Amplifikation wurde bei folgenden Bedingungen durchgeführt: Initiale Denaturierung bei 94 °C für 2 min, gefolgt von 35 Zyklen bestehend aus einer Denaturierung bei 94 °C für 30 s, einem *Annealing*-Schritt mit einer für die jeweiligen Primerkombination spezifischen Temperatur (siehe Tabelle 1) für 30 s und einer Elongation bei 72 °C für 1 min. Danach wurde die Amplifikation durch Herunterkühlen auf 4 °C beendet.

Um eine ausreichende Menge an PCR-Produkt zu erhalten, wurde eine *nested-PCR* durchgeführt, in welche 4 µl des PCR Produktes eingesetzt wurden. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 1 aufgeführt. Ansonsten glich der Master Mix für die *nested-PCR* dem der ersten PCR.

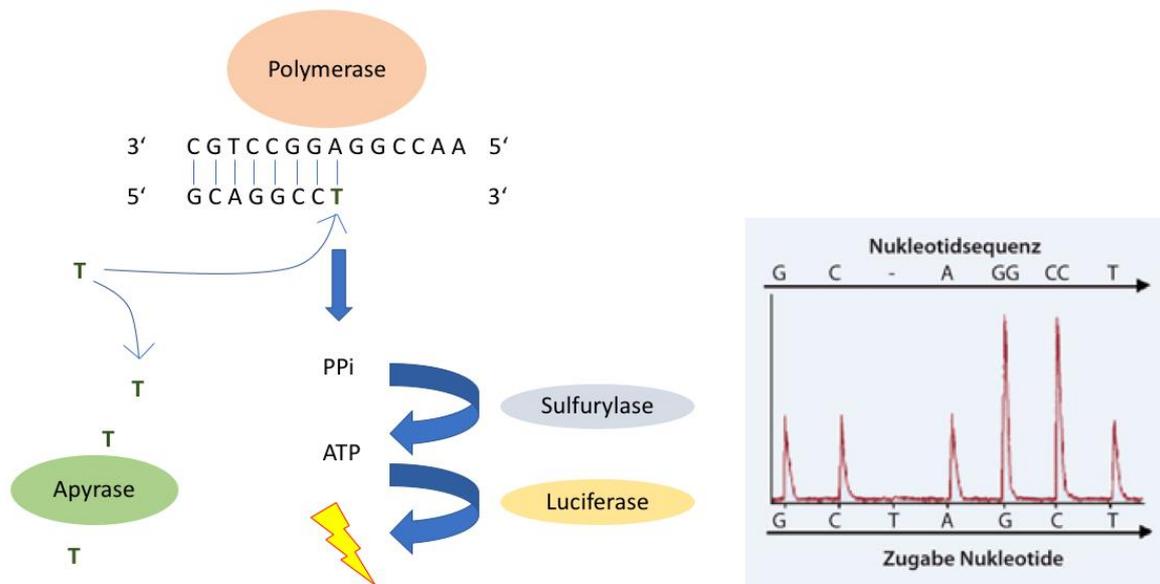
#### **2.5.4 Agarose-Gelelektrophorese**

Nachdem die bisulfitkonvertierte DNA in zwei Schritten amplifiziert wurde, wurden jeweils 5 µl der *nested*-PCR Produkte mit 2 µl Ladepuffer versetzt und zusammen mit einem DNA-Größenmarker (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder) auf ein 2 % Agarose-Gel (200 ml 1x Tris-Borat-EDTA-Puffer, 4 g Agarose), welches 0,1 % Ethidiumbromid enthielt, aufgetragen. Nach einer Laufzeit von 40 min bei 120 V konnten die mit dem fluoreszierenden Ethidiumbromid markierten DNA-Banden auf einer Geldokumentationsstation mit UV-Licht sichtbar gemacht und anhand des DNA-Größenmarkers identifiziert werden.

#### **2.5.5 Pyrosequenzierung**

Um die Methylierung ausgewählter CpGs in der Promotorregion der Gene zu untersuchen, wurde die bisulfitkonvertierte DNA mittels Pyrosequenzierung dekodiert. Bei dieser Methode wird die amplifizierte DNA zunächst denaturiert, die biotinylierten Einzelstränge isoliert und mit einem spezifischen Sequenzierungsprimer hybridisiert (Tabelle 2). Anschließend wird unter Anwesenheit einer DNA Polymerase das erste Desoxyribonukleotid (dNTP) hinzugefügt. Wenn das dNTP komplementär zur nächsten Base auf dem, an den Sequenzierprimer gebundenen Einzelstrang ist, so wird der Einbau des dNTPs unter Freisetzung eines Pyrophosphates (PPi) von der Polymerase katalysiert. Eine ATP-Sulfurylase konvertiert nun in Anwesenheit von Adenosin-5'-Phosphosulfat (APS) das PPi zu ATP. Dieses ATP ermöglicht im nächsten Schritt die Luciferase vermittelte Umwandlung von Luciferin zu Oxyluciferin, wodurch ein Lichtsignal erzeugt wird. Dieses Lichtsignal ist proportional zu der Anzahl der eingebauten dNTPs und wird mit einer eingebauten Kamera gemessen und als Peak im Pyrogramm aufgezeichnet. Eine Apyrase ist dafür verantwortlich, die nicht eingebauten Nukleotide abzubauen, bevor das nächste dNTP hinzugegeben wird (Abb. 3).

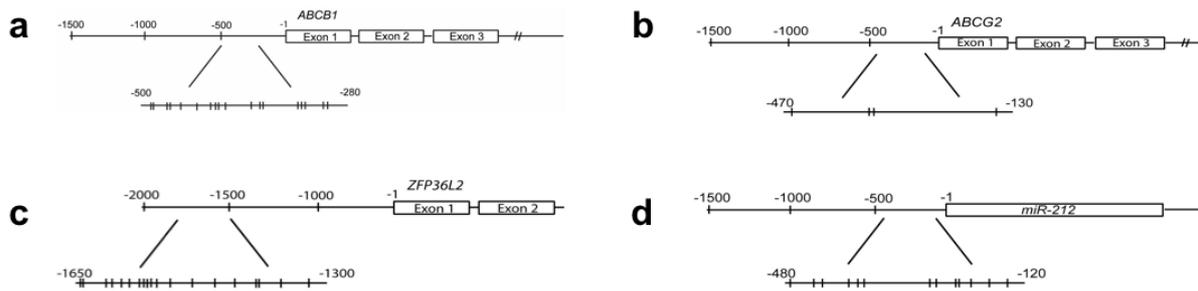
So kann im Pyrogramm die Sequenz des bisulfitkonvertierten Amplifikationsproduktes entschlüsselt und Rückschlüsse auf den Methylierungsstatus der ursprünglichen DNA gezogen werden.



**Abbildung 3: Ablauf der Pyrosequenzierung.** Die Desoxyribonucleotide (dNTPs) binden unter Abspaltung eines Pyrophosphats (PPi) komplementär an den DNA-Einzelstrang. Das PPi konvertiert mit Adenosin-5-Phosphosulfat (APS) zu ATP, welches die Umwandlung von Luciferin zu Oxyluciferin ermöglicht, wodurch ein Lichtsignal erzeugt wird. Dieses wird detektiert und generiert ein Peak im Pyrogramm. Die Apyrase baut die nicht verbrauchten dNTPs ab, bevor der Ablauf sich wiederholt. (Modifiziert nach England (England & Pettersson 2005).

Es wurde zunächst eine PCR Platte vorbereitet, welche in jedem Well 5 µl PCR-Produkt, 37 µl Bindungspuffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 2 M NaCl, 1 ml/l Tween 20), 30 µl Wasser, sowie 3 µl Streptavidin-Sepharose Beads zur Bindung der PCR-Fragmente enthielt. Die so vorbereitete Platte wurde für 15 - 20 min geschüttelt. Eine zweite Platte wurde mit jeweils 1 µl Sequenzierprimer und 11 µl *Annealing* Puffer präpariert.

Anschließend wurden die an die Sepharose Beads gebundenen DNA-Fragmente aus der ersten Platte mithilfe eines Vakuum Systems aspiriert und nacheinander in 70 % Ethanol, in 0,2 M NaOH und in 100 nM Tris-Acetat-Waschpuffer gewaschen, bevor sie in die Wells mit den spezifischen Sequenzierprimern überführt wurden. Nach zweiminütigem Erhitzen auf 80 °C wurde die Platte in den Pyrosequenzierer eingesetzt. Die für die Elongation notwendigen Nucleotide Adenin, Thymin, Cytosin und Guanin wurden 1:2 mit Tris EDTA Puffer verdünnt und zusammen mit Enzym und Substrat in den Pipettierapparat des Pyrosequenzierers (PSQ HS 96 MD) eingesetzt. Abbildung 4 zeigt die Lage der untersuchten CpGs im Promotor der Zielgene. Die Sequenzen dieser untersuchten Regionen sind in Tabelle 5 aufgeführt.



**Abbildung 4: Lage der analysierten CpGs.** Schematische Darstellung der Lage mit Bezug auf den Abstand (in Basen) bis zum Ablesestart des Gens.

**Tabelle 5: DNA-Sequenzen der Zielregionen der Pyrosequenzierung.** Die analysierten CpGs sind fett gedruckt und grau hinterlegt. bp: Basenpaare.

Zielgen	Analysierte Sequenz
<i>ABCB1</i>	TTGCC <b>CGG</b> AG <b>CGCG</b> CACAGCC <b>CGCGCG</b> GTGCGGGACCTGCTCTCTGAGCC <b>CGCGGGCG</b> GTGGGTGGGAGGAAGCAT <b>CGTCCGCGGCG</b> ACTGGAACCGGGA GGGAGAAT <b>CG</b> CACTGG <b>CGGCG</b> GGCAAAGTCCAGA <b>ACGCG</b> CTGCCAGACCCC CAACTCTGCCTTCGTGGAGATGCTG (177 bp)
<i>ABCG2</i>	TCAG <b>CG</b> TGGGATCCTCTTCTGGCATTCTAGCAAGGGGCTAGAAGAAGGGGG AAAGTTACATGTCAGAGAGATATTTTTGTATCTTTCTCTTTGTGC <b>CGCG</b> GAATT CTGATGACAGCATCTCCAACACAAACAGCAACTTTATTTTCGAAATGGAAGGAT AAAAACCAATTCTAGCAAATGGCTTTGCTCTGTGCGTAAACTTCCTGTGCTTTT TTAACCCTGATGTA <b>ACTGAGGGTCTCCTCTCACAGGCCCTGCCTTCTAGCACA</b> CACAAAAACAACCAAGCAGGACTATGACATAATTTGAAAAGGAAG <b>CGA</b> ATTA AACCAAAACAAGAGTTAGGTTTCAATGC (350 bp)
<i>miR-212</i>	GG <b>CG</b> CCCCAGGAGA <b>CGCG</b> CCCCCTCCTCTCCCTCCCTG <b>CGGCGCG</b> GTGACT CAGCCTCGCTGCCCGGGCCGGCTGAGCGGGGGTGCAGGCCGAGAGACGGAC GCCACCCCCGCTTCCC <b>CGGCCCTCCTGGGACCCCCGCCCGCATGGCGTC</b> GGGCGCCCCTTCCC <b>GGCAGGTCCCGTCCAGCGGGTCCCGCGGCGCCACG</b> GCTTCC <b>CG</b> CCTCTGCGAGCGGAGCTGTCTCCTCTCAGGACCGGGGG (247 bp)
<i>ZFP36L2</i>	GG <b>CGCG</b> CCACCCTCTGTTTTCCCTCACT <b>CGCCAGCCCCGC</b> ACCCCCAACAGCT T <b>CG</b> CTGGAAAAT <b>CG</b> CTTTGCCAG <b>CGGGCGCCCGCCTTCTG</b> TCCGGGTACG GAGGGGACACTCCCATCTAG <b>CGCCAGTGAGGCTAAAGCCG</b> CTGACAGCCCC ACTAGGA <b>ACG</b> ATCTGGAGTCTGGTCTAGGGCACTTCTCCCT <b>CGCG</b> TTTCATAC AGGTTGCCACAAAAGCTTGGGCCTGAAGCT <b>CGA</b> AGGCC <b>CGGACCCG</b> CTGG GGAA (265 bp)

## 2.5.6 Statistische Auswertung Software

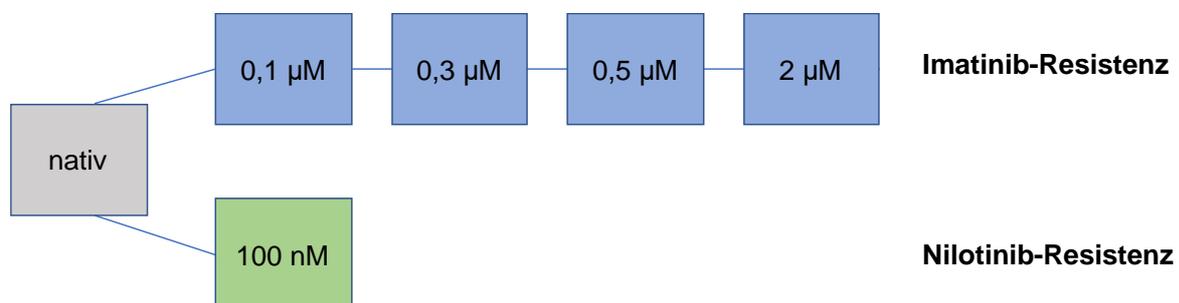
<b>Firma/ Verwendung</b>	<b>Software/ Website</b>
Densitometrie der Western Blots	ImageJ
Graphpad (Jolla, USA)	Prism 7.0
Primer Design	<a href="http://Ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/">Ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/</a>
Qiagen	Pyromark Assay Design Software 2.0
Thermo Fisher Scientific (Darmstadt)	QuantStudio™ Real-Time PCR Software
ENCODE, Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen	UCSC

### 3 Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit soll zu einem besseren Verständnis der Regulierungsmechanismen in der Resistenzentstehung in der Imatinib- und Nilotinib-Therapie beitragen. Ziel war es, epigenetische Veränderungen in Zusammenhang mit Expressionsveränderungen der vier Zielgene *ABCG2*, *ABCB1*, *ZFP36L2* und *miR-212* in der TKI-Resistenz zu untersuchen.

#### 3.1 Resistenzmodell

Um die Resistenzentwicklung gegen TKI *in vitro* nachvollziehen zu können, wurden K-562 CML-Zellen gegen die TKIs Imatinib und Nilotinib resistent gezüchtet. Mit Imatinib erfolgte die Resistenzzüchtung gegen Konzentrationen von 0,1  $\mu\text{M}$  bis 2  $\mu\text{M}$  (0,1; 0,3; 0,5; 2  $\mu\text{M}$ ). Die Nilotinib-Resistenzzüchtung erfolgte bis zu einer Konzentration von 100 nM. Mittels Sanger-Sequenzierung wurden Mutationen in der BCR/ABL-Kinasedomäne ausgeschlossen, um sicher zu stellen, dass die hier vorliegenden Resistenzen auf BCR/ABL-unabhängigen Mechanismen beruhen.



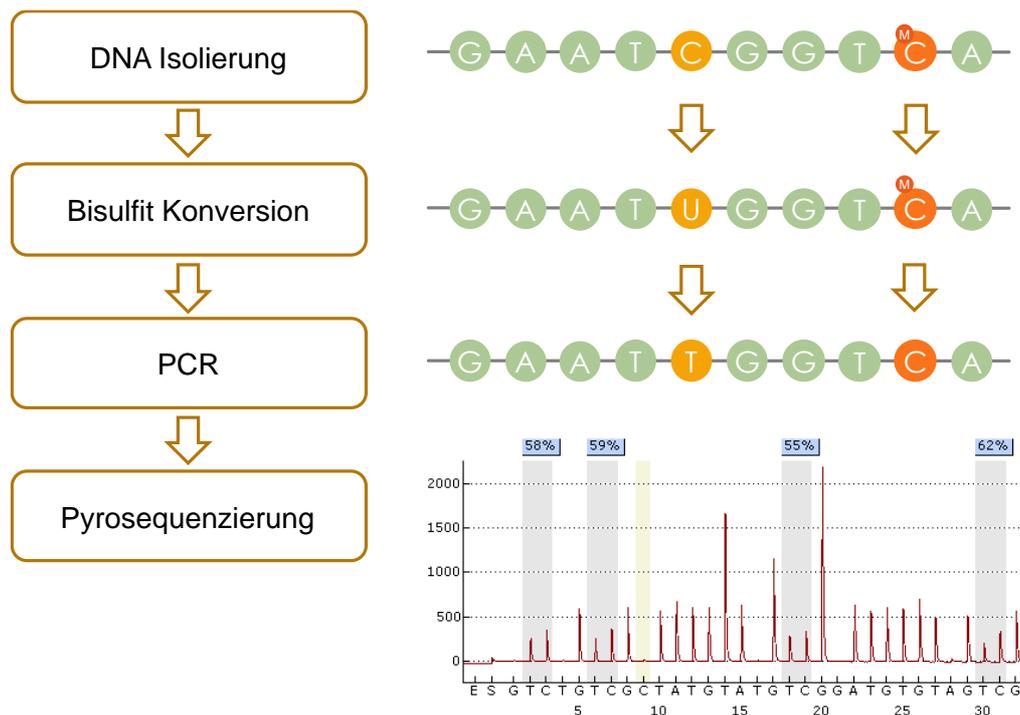
**Abbildung 5: Schematische Darstellung des *in vitro* Resistenzmodells der CML-Zelllinie K-562.** Die nativen Zellen wurden gegen 0,1  $\mu\text{M}$ , 0,3  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$  und 2  $\mu\text{M}$  Imatinib resistent gezüchtet. Zusätzlich erfolgte die Resistenzzüchtung gegen 100 nM Nilotinib.

Die Analysen erfolgten jeweils an zwei biologischen Replikaten (im Folgenden als Resistenz 1 und Resistenz 2 bezeichnet), sowie an mindestens drei technischen Replikaten.

#### 3.2 Methodenetablierung

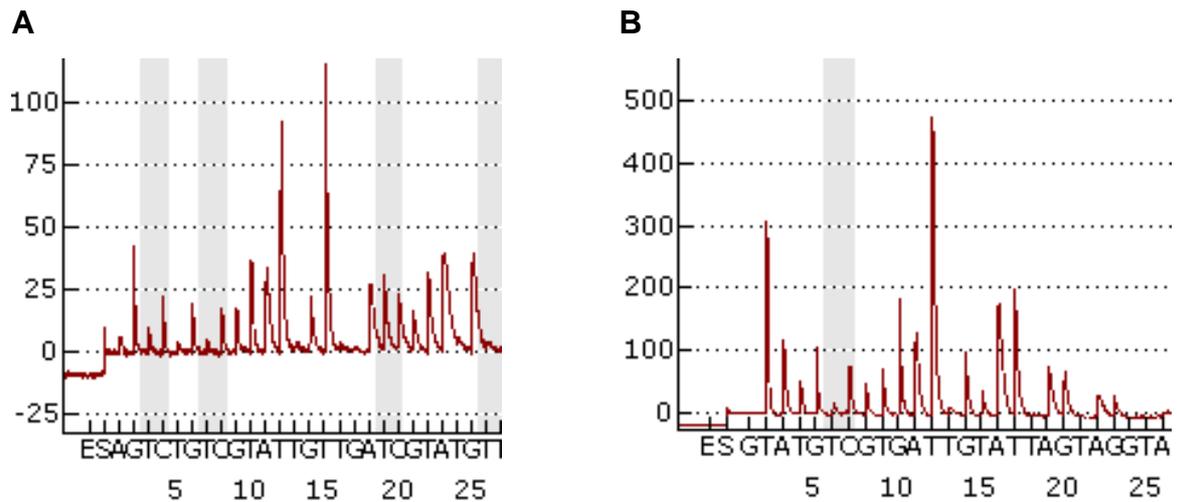
Um die Methylierung der DNA analysieren zu können, wurde für diese Arbeit die Methode der Bisulfit-Pyrosequenzierung etabliert. Die Bisulfit-Konversion der DNA

bewirkt die Umschreibung von unmethylierten Cytosinen in Uracil, wohingegen methylierte Cytosine nicht konvertiert werden. Die nach Amplifikation der konvertierten DNA-Abschnitte durchgeführte Pyrosequenzierung entschlüsselt die Sequenz der bisulfitkonvertierten DNA unter Abgleich mit der ursprünglichen DNA-Sequenz. Diese Methodik erlaubt es, Rückschlüsse auf den Grad der Methylierung der Ursprungs-DNA zu ziehen.

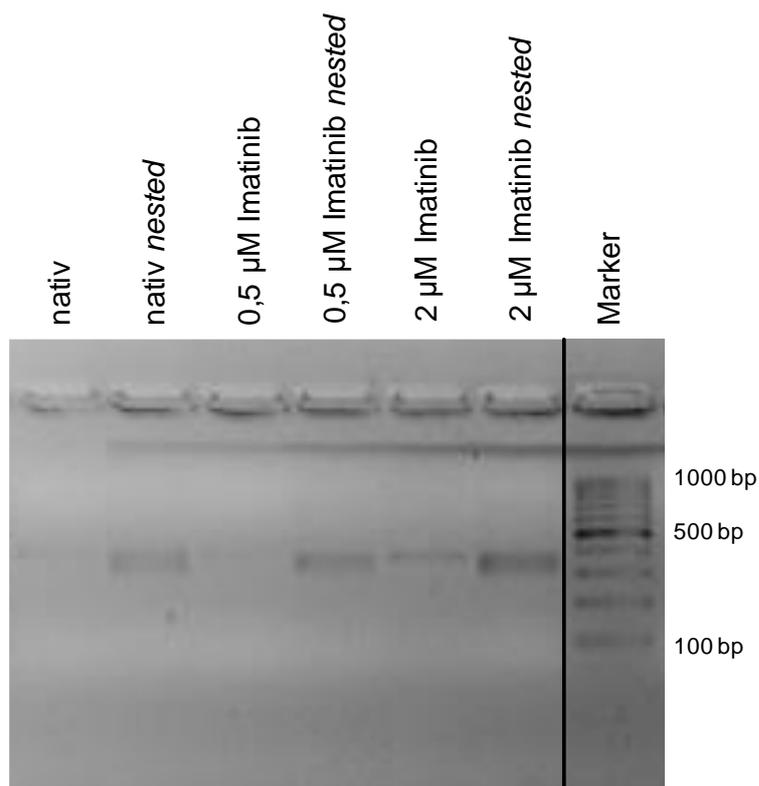


**Abbildung 6: Arbeitsablauf der Methylierungsanalyse.** Zuerst wurde die DNA isoliert. Anschließend wurde die Bisulfit-Konversion durchgeführt, wodurch unmethylierte Cytosine der ursprünglichen Sequenz in Uracil konvertiert werden, während methylierte (M) Cytosine nicht mit Bisulfit reagieren. Die bisulfitkonvertierte DNA wurde mittels PCR amplifiziert und schließlich durch Pyrosequenzierung dekodiert (beispielhaftes Pyrogramm). Modifiziert nach England (England & Pettersson 2005).

Bei der Etablierung der Methode sind einige technische Probleme aufgetreten. Zunächst waren die Ausschläge im Pyrogramm zu gering um ausgewertet werden zu können (Abb. 7 A). Zur Lösung des Problems wurde eine *nested*-PCR durchgeführt um mehr Amplifikationsprodukt in die Pyrosequenzierung einsetzen zu können (Abb. 8). Diese Technik führte zu höheren Ausschlägen im Pyrogramm (Abb. 7 B), sodass die DNA-Sequenz nun eindeutig dekodiert werden konnte.



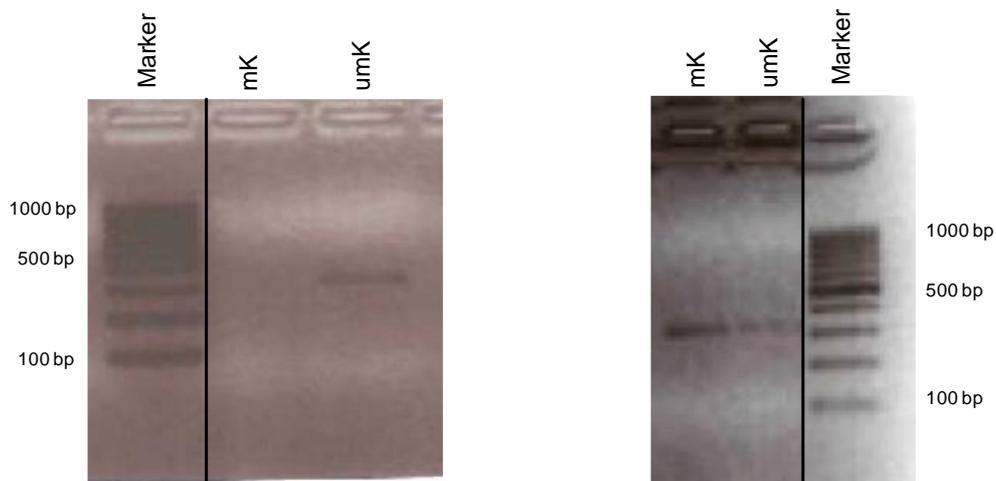
**Abbildung 7: Pyrogramm der Pyrosequenzierung.** (A) Pyrogramm einer Pyrosequenzierung mit Produkt einer PCR ohne *nested*-Design. (B) Pyrogramm einer Pyrosequenzierung mit *nested*-PCR-Produkt.



**Abbildung 8: Vergleich der PCR ohne *nested*-Design mit der *nested*-PCR.** Beispielhaft gezeigt an der Gelelektrophorese des PCR-Produktes für *ZFP36L2* in der Imatinib-Resistenz. Das PCR-Produkt der *nested*-PCR wurde jeweils neben dem Produkt der PCR ohne *nested*-Design aufgetragen. bp: Basenpaare.

Des Weiteren stellte sich die Etablierung der PCR für die voll methylierte DNA-Kontrolle als schwierig heraus. Mit den Primern für *ABCB1*, *ABCG2*, *ZFP36L2*

und für die *miR-212* konnte mit der konvertierten, methylierten EpiTect Kontroll-DNA (Qiagen) kein PCR-Produkt erzielt werden, während die unmethylierte Kontrolle amplifiziert werden konnte (Abb. 9 A). Nachdem technische Fehler ausgeschlossen wurden, erfolgte zum Vergleich die Amplifikation einer methylierten/ unmethylierten, konvertierten Kontrolle, welche freundlicherweise vom Institut der Humangenetik (UKSH, Kiel) zur Verfügung gestellt wurde (Abb. 9 B). Aufgrund des unzureichenden PCR-Produktes der methylierten Kontrolle von EpiTect, wurde diese durch die methylierte Kontrolle aus der Humangenetik Kiel ersetzt.



**Abbildung 9: Etablierung der PCR für die methylierte und unmethylierte DNA-Kontrolle.** (A) Gelelektrophorese des PCR-Produktes der methylierten und unmethylierten EpiTect Kontroll-DNA. (B) Gelelektrophorese des PCR-Produktes der methylierten und unmethylierten Kontrolle, welche freundlicherweise von der Humangenetik Kiel (UKSH) bereitgestellt wurden. Die PCR erfolgte in (A) und (B) mit Primern für *ABCB1*. mK: methylierte Kontrolle; umK: unmethylierte Kontrolle; bp: Basenpaare.

### 3.3 Veränderungen der Expression und Methylierung der vier Kandidatengene in der Imatinib- und Nilotinib-Resistenz

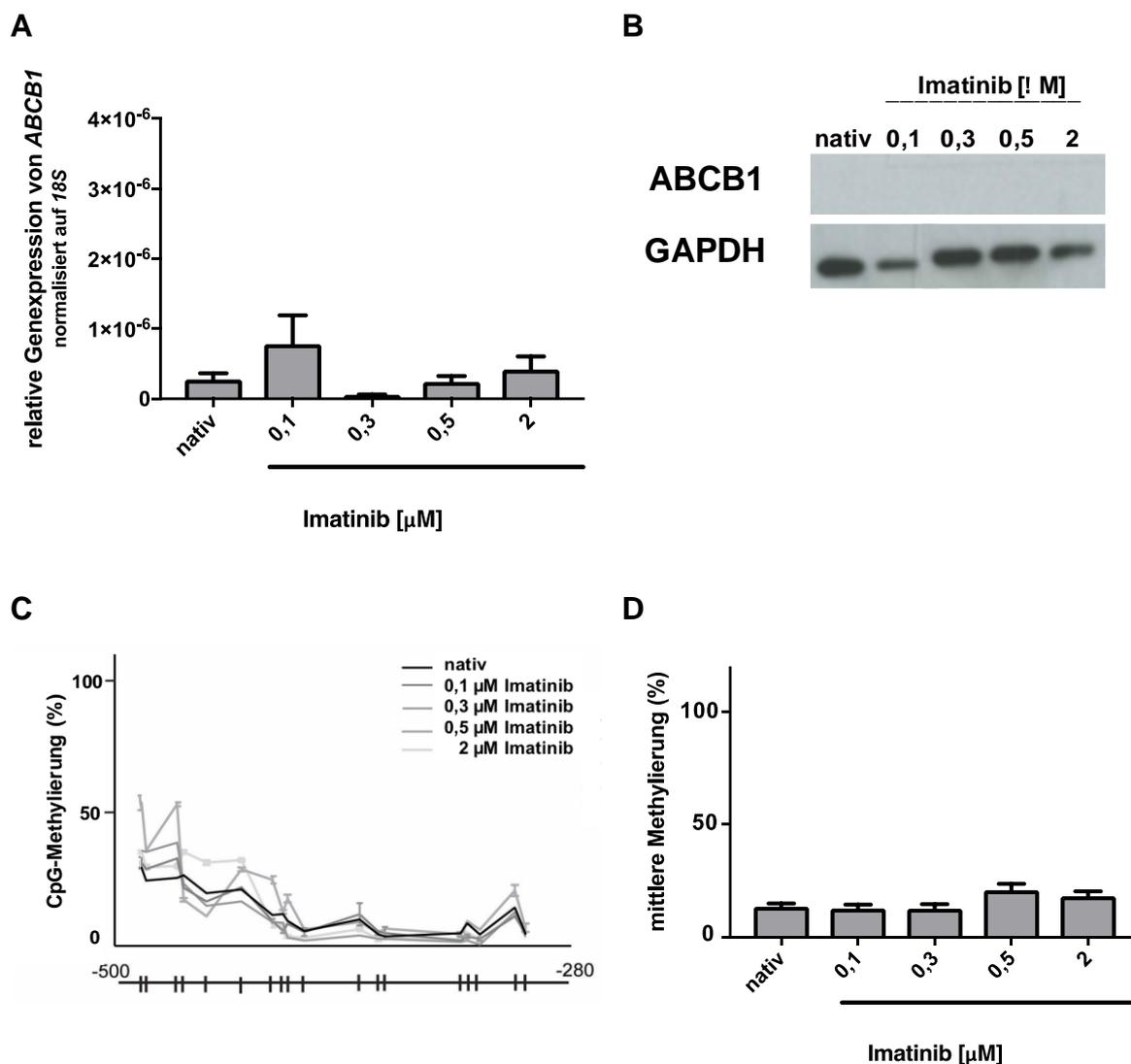
Im Folgenden werden die Ergebnisse der mRNA- und Proteinexpressionsanalysen, sowie der Methylierungsanalysen der Promotorregionen, gegliedert nach den vier Kandidatengenen vorgestellt.

#### 3.3.1 Veränderungen der Expression und Methylierung von *ABCB1* in der Imatinib-Resistenz

*ABCB1* kann Arzneistoffe aktiv aus der Zelle heraustransportieren. Hierdurch kann das membranständige Glykoprotein zur TKI-Resistenz in der CML beitragen. Um die Regulierung von *ABCB1* in der TKI-Resistenz besser zu verstehen, wurde in dieser

Arbeit eine *ABCB1*-Expressions- und Methylierungsanalyse in der Imatinib-, sowie in der Nilotinib-Resistenz durchgeführt.

Zunächst wurde die *ABCB1*-Expression in den nativen, sowie in den Imatinib-resistenten Zellen (0,1; 0,3; 0,5; 2  $\mu\text{M}$ ) mittels qRT-PCR und Western Blots analysiert.



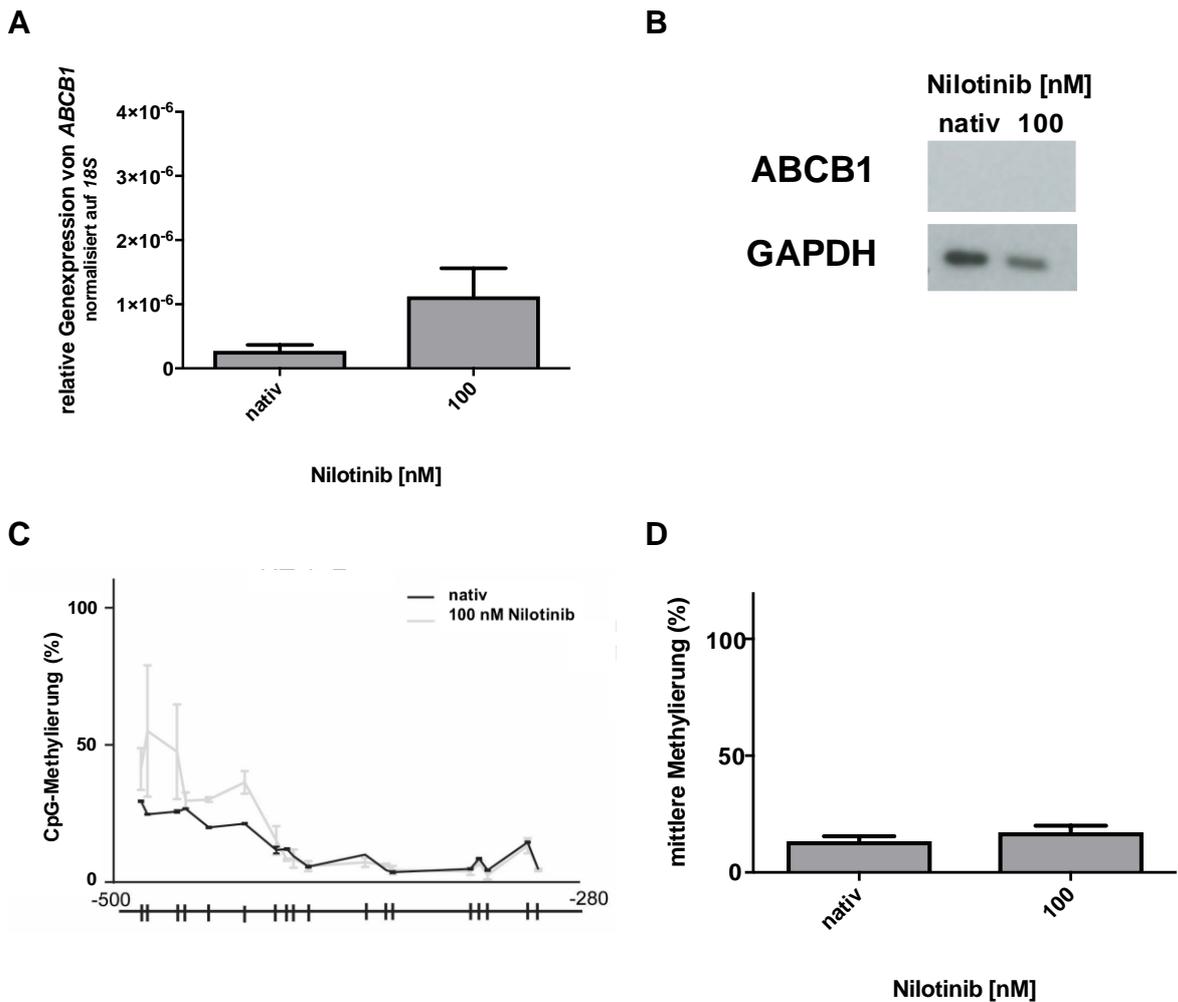
**Abbildung 10: Analyse der mRNA- und Proteinexpression, sowie der Methylierung von *ABCB1* in der Imatinib-Resistenz.** (A) mRNA-Expression von *ABCB1* der nativen und Imatinib resistenten Zellen (0,1; 0,3; 0,5; 2  $\mu\text{M}$ ), normalisiert auf 18S. (B) Western Blot der nativen und resistenten Zellen für *ABCB1* und den *Housekeeper* GAPDH. (C) Methylierung der 18 CpGs in der Promotorregion, -500 bis -280 Basenpaare vor dem Startcodon. (D) Mittlere Methylierung der 18 untersuchten CpGs aus der Promotorregion der nativen und Imatinib-resistenten Zellen. Die statistische Analyse erfolgte mittels *One-way* ANOVA. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD. SD: Standardabweichung; n = 6.

Die mRNA- und Proteinexpression von *ABCB1* war in den nativen K-562 Zellen sehr gering und blieb in den Imatinib-resistenten Zellen auf einem unverändert niedrigen

Niveau. (Abb. 10 A, B). Mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung wurde außerdem die Methylierung von 18 CpGs in der *ABCB1*-Promotorregion gemessen, welche -500 bis -280 Basenpaare vor Beginn des Ablesestarts des ersten Exons von *ABCB1* lagen. Hierbei zeigten sich ebenfalls keine Veränderungen zwischen nativen und Imatinib-resistenten Zellen (Abb. 10 C, D). Die Promotorregion war sowohl in den nativen, als auch in den resistenten Zellen hypomethyliert (nativ: 13 %; 0,1  $\mu$ M: 13 %; 0,3  $\mu$ M: 13 %; 0,5  $\mu$ M: 21 %; 2  $\mu$ M: 18 %). Da die Ergebnisse der *ABCB1*-Expressions- und Methylierungsanalysen für die biologischen Replikate sehr ähnlich ausfielen, werden Resistenz 1 und 2 in Abb. 10 und Abb. 11 zusammengefasst dargestellt.

### **3.3.2 Veränderungen der Expression und Methylierung von *ABCB1* in der Nilotinib-Resistenz**

Als nächstes wurde die *ABCB1*-Expression in der Nilotinib-Resistenz untersucht. Dazu wurde die mRNA- und Proteinexpression in nativen und 100 nM Nilotinib-resistenten Zellen gemessen. Außerdem wurde die Methylierung im *ABCB1*-Promotorbereich analysiert, um Veränderungen des Methylierungsstatus zwischen nativen und Nilotinib-resistenten Zellen festzustellen.



**Abbildung 11: Analyse der m-RNA und Proteinexpression, sowie der Methylierung von *ABCB1* in der Nilotinib-Resistenz.** (A) mRNA-Expression von *ABCB1* der nativen und 100 nM Nilotinib-resistenten Zellen, normalisiert auf *18S*. (B) Western Blot der nativen und Nilotinib-resistenten Zellen für *ABCB1* und *Housekeeper* *GAPDH*. (C) Methylierung der 18 CpGs in der Promotorregion, -500 bis -280 Basenpaare vor dem Startcodon. (D) Mittlere Methylierung der 18 untersuchten CpGs aus der Promotorregion für native und Nilotinib-resistente Zellen. Die statistische Analyse erfolgte mittels T-Test. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD. SD: Standardabweichung; n = 6.

Weder in der Expression (Abb. 11 A, B), noch in der Methylierung (Abb. 11 C, D) ließen sich signifikante Unterschiede zwischen den nativen und den Nilotinib-resistenten Zellen erkennen. Wie auch in der Imatinib-Resistenz war die Promotorregion von *ABCB1* in nativen und resistenten Zellen hypomethyliert (nativ: 13 %; 100 nM: 17 %). Die Ergebnisse der Expressions- und Methylierungsanalysen deuten darauf hin, dass *ABCB1* in diesem Zellmodell, sowohl in der Imatinib-, als auch in der Nilotinib-Resistenz, nur eine untergeordnete Rolle spielt.

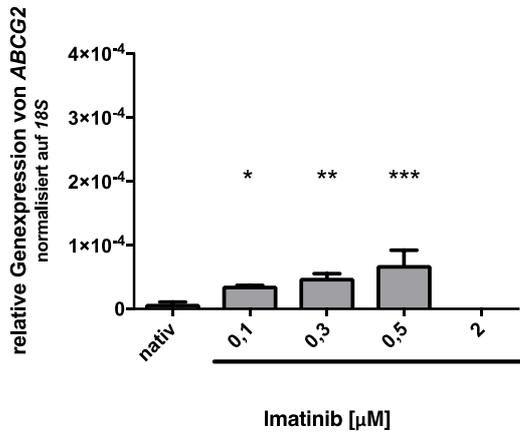
### **3.3.3 Veränderungen der Expression und Methylierung von *ABCG2* in der Imatinib-Resistenz**

*ABCG2* gehört, wie auch *ABCB1* zu den Effluxtransportern und wird als Ursache der *Multi Drug Resistance* (MDR) bei verschiedenen Tumorerkrankungen, wie auch in der CML diskutiert.

Um mögliche Veränderungen von *ABCG2* in der Imatinib-Resistenz zu erfassen, wurde die Expression des Transporters auf mRNA- und Proteinebene in den K-562 Zellen untersucht. Ebenso wurde eine Bisulfit-Pyrosequenzierung zur Analyse der DNA-Methylierung in der Promotorregion (-470 bis -130 Basenpaare vor dem Ablesestart) durchgeführt. Die folgende Abbildung zeigt die Ergebnisse der Analysen in den biologischen Replikaten der Imatinib-Resistenz.

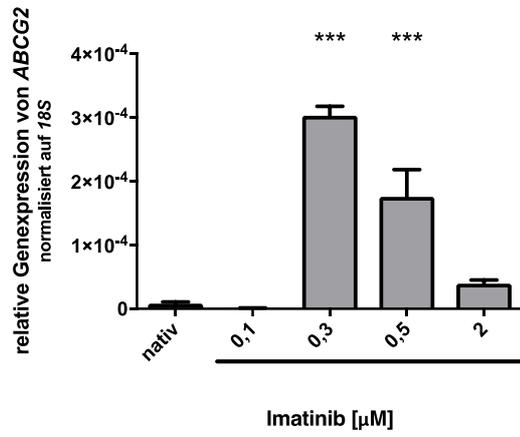
### Resistenz 1

**A**

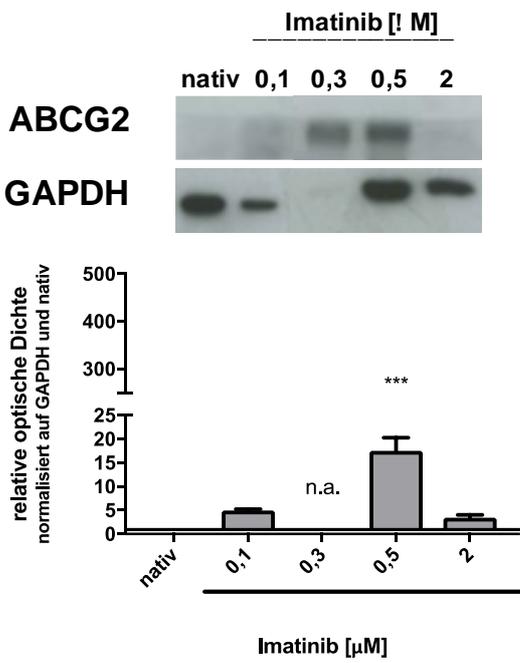


### Resistenz 2

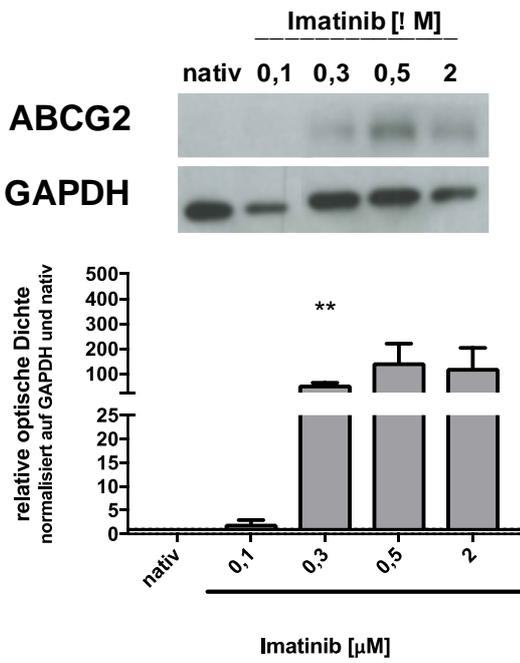
**B**

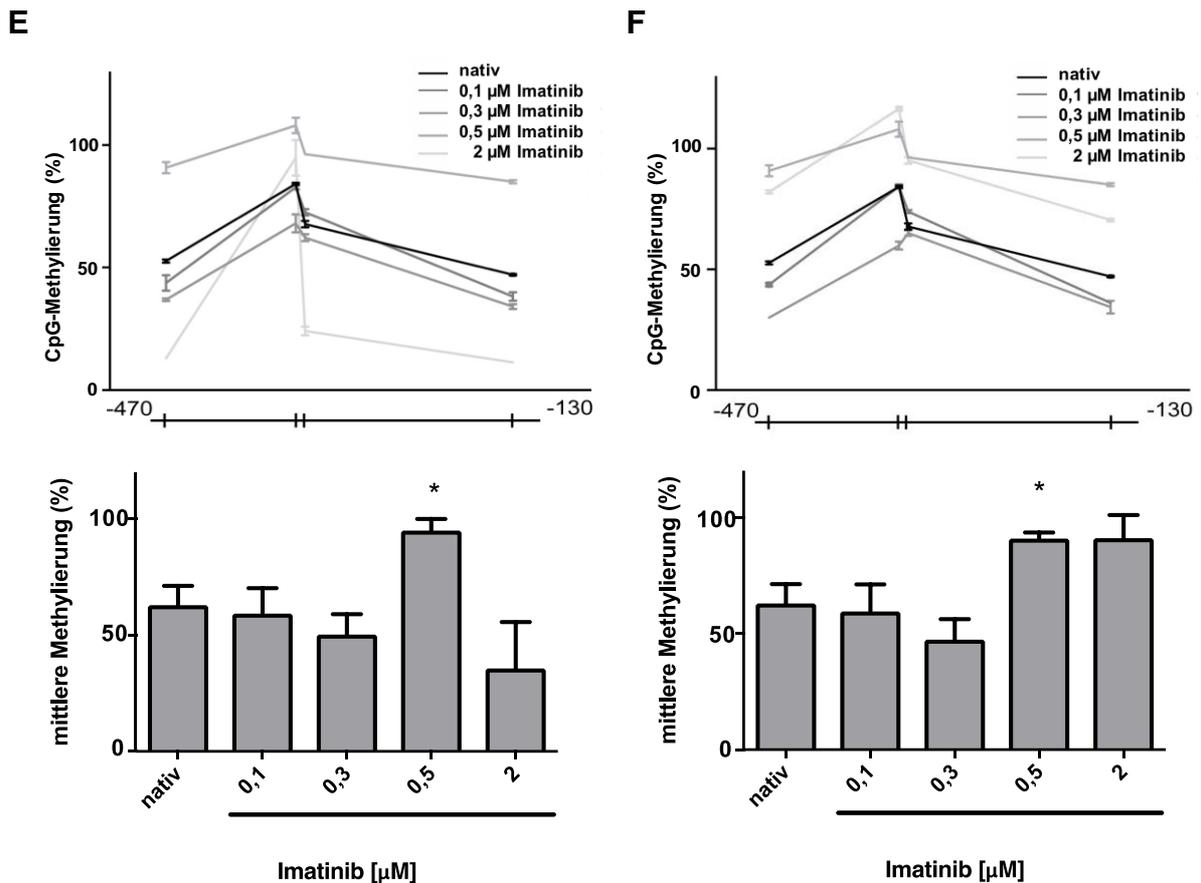


**C**



**D**





**Abbildung 12: Analyse der mRNA- und Proteinexpression, sowie der Methylierung von ABCG2 in der Imatinib-Resistenz.** (A) Relative mRNA-Expression von ABCG2 der nativen und Imatinib-resistenten Zellen (0,1; 0,3; 0,5; 2 μM) in Resistenz 1. (B) Relative mRNA-Expression von ABCG2 der nativen und Imatinib-resistenten Zellen in Resistenz 2. (C) Western Blot der nativen und Imatinib-resistenten Zellen in Resistenz 1 mit densitometrischer Auswertung. (D) Western Blot mit densitometrischer Auswertung für Resistenz 2. (E) In Resistenz 1 gemessene Methylierung der 4 CpGs in der Promotorregion, -470 bis -130 Basenpaare vor dem Startcodon, sowie mittlere Methylierung der analysierten Sequenz. (F) Methylierung der 4 untersuchten CpGs in Resistenz 2 und mittlere Methylierung der analysierten Sequenz. Die statistische Analyse erfolgte mittels *One-way* ANOVA und anschließendem Dunnett's Test. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD. SD: Standardabweichung; n.a. = nicht auswertbar; \*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0,001; n = 3.

In den biologischen Replikaten der Imatinib-Resistenz war in den nativen Zellen nur eine geringe mRNA-Expression des Efflux-Transporters ABCG2 nachweisbar (Abb. 12 A, B). In Resistenz 1 erfolgte eine signifikante Hochregulation der ABCG2-Expression bei Konzentrationen von 0,1 μM Imatinib ( $p = 0,0216$ ) und blieb auch bei höheren Konzentrationen Imatinib auf einem hohen Expressionsniveau (0,3 μM:  $p = 0,0018$ ; 0,5 μM:  $p < 0,0001$ ). Bei 0,5 μM Imatinib erreichte die ABCG2-mRNA-Expression in Resistenz 1 ihr Maximum mit einem *Fold change* von 8,3 in Bezug auf nativ (Abb. 12 A). In Resistenz 2 ließ sich ebenfalls ein Anstieg der Genexpression feststellen, jedoch erst bei Zellen, die gegen 0,3 μM und 0,5 μM

Imatinib resistent waren (0,3  $\mu\text{M}$ :  $p < 0,0001$ ; 0,5  $\mu\text{M}$ :  $p < 0,0001$ ; Abb. 12 B). Die maximale *ABCG2*-mRNA-Expression wurde in Resistenz 2 in den 0,3  $\mu\text{M}$  Imatinib-resistenten Zellen gemessen, mit einem *Fold change* von 36,7 in Bezug auf native Zellen. In beiden biologischen Replikaten nahm die mRNA-Expression von *ABCG2* in den 2  $\mu\text{M}$  Imatinib-resistenten Zellen ab und unterschied sich nicht signifikant von dem *ABCG2*-Expressionsniveau der nativen Zellen.

Auf Proteinebene zeigte sich in Resistenz 1 eine Hochregulierung von *ABCG2* in den 0,5  $\mu\text{M}$  Imatinib-resistenten Zellen ( $p = 0,0007$ ), während die Daten für die 0,3  $\mu\text{M}$  Imatinib-resistenten Zellen aufgrund von starken Schwankungen im *Housekeeper* nicht auswertbar waren (Abb. 12 C). In Resistenz 2 war eine vermehrte *ABCG2*-Expression schon ab einer Konzentration von 0,3  $\mu\text{M}$  nachweisbar ( $p = 0,008$ ; Abb. 12 D). Somit ließ sich, sowohl für die mRNA-, als auch die Proteinexpression von *ABCG2* ein Maximum bei mittleren Konzentrationen Imatinib (0,3 – 0,5  $\mu\text{M}$ ) nachweisen.

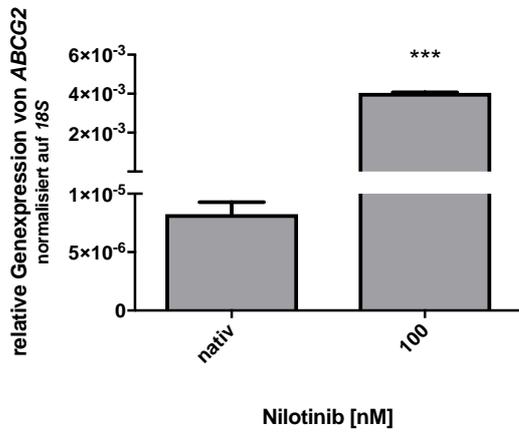
In der *ABCG2*-Promotorregion der nativen Zellen ließ sich eine mittlere Methylierung von 63 % messen. Während die Methylierung sich bei geringen Imatinib-Konzentrationen nicht von der Methylierung der nativen Zellen unterschied, ließ sich in den 0,5  $\mu\text{M}$  Imatinib-resistenten Zellen sowohl in Resistenz 1, als auch in Resistenz 2 eine Hypermethylierung feststellen (Resistenz 1: (95 %;  $p = 0,016$ ); Resistenz 2: (91 %;  $p = 0,018$ ); Abb. 12 E, F). Bei höheren Konzentrationen Imatinib (2  $\mu\text{M}$ ) nahm die mittlere Methylierung in Resistenz 1 wieder ab (36 %), während sie in Resistenz 2 auf einem hohen Niveau (91 %) verblieb, sich jedoch nicht signifikant von den nativen Zellen unterschied ( $p = 0,072$ ).

#### **3.3.4 Veränderungen der Expression und Methylierung von *ABCG2* in der Nilotinib-Resistenz**

Um die Rolle von *ABCG2* in der Nilotinib-Resistenz zu evaluieren, wurde die mRNA-, sowie die Proteinexpression in nativen und 100 nM Nilotinib-resistenten Zellen analysiert. Außerdem wurde die Methylierung in der Promotorregion mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung untersucht.

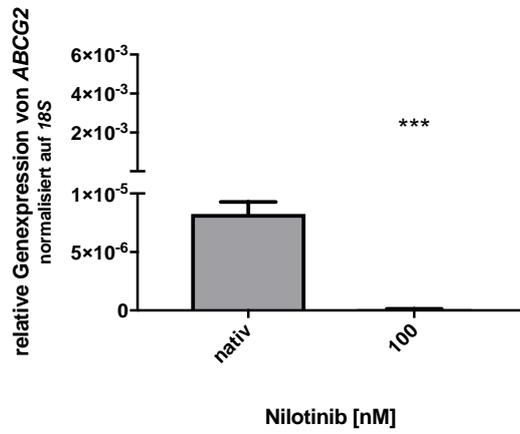
### Resistenz 1

A

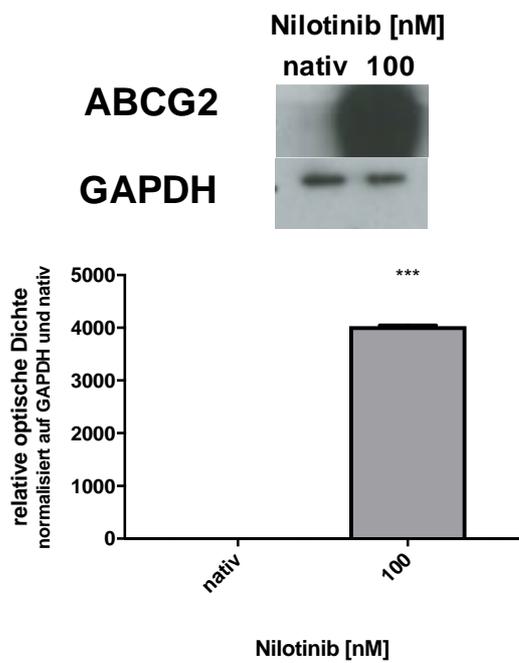


### Resistenz 2

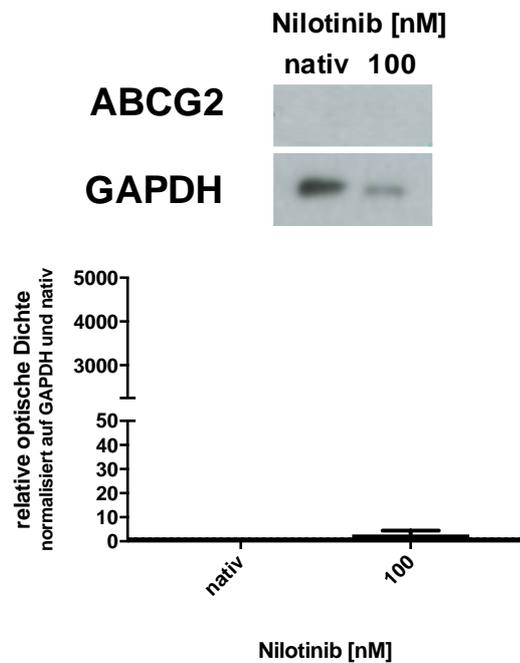
B

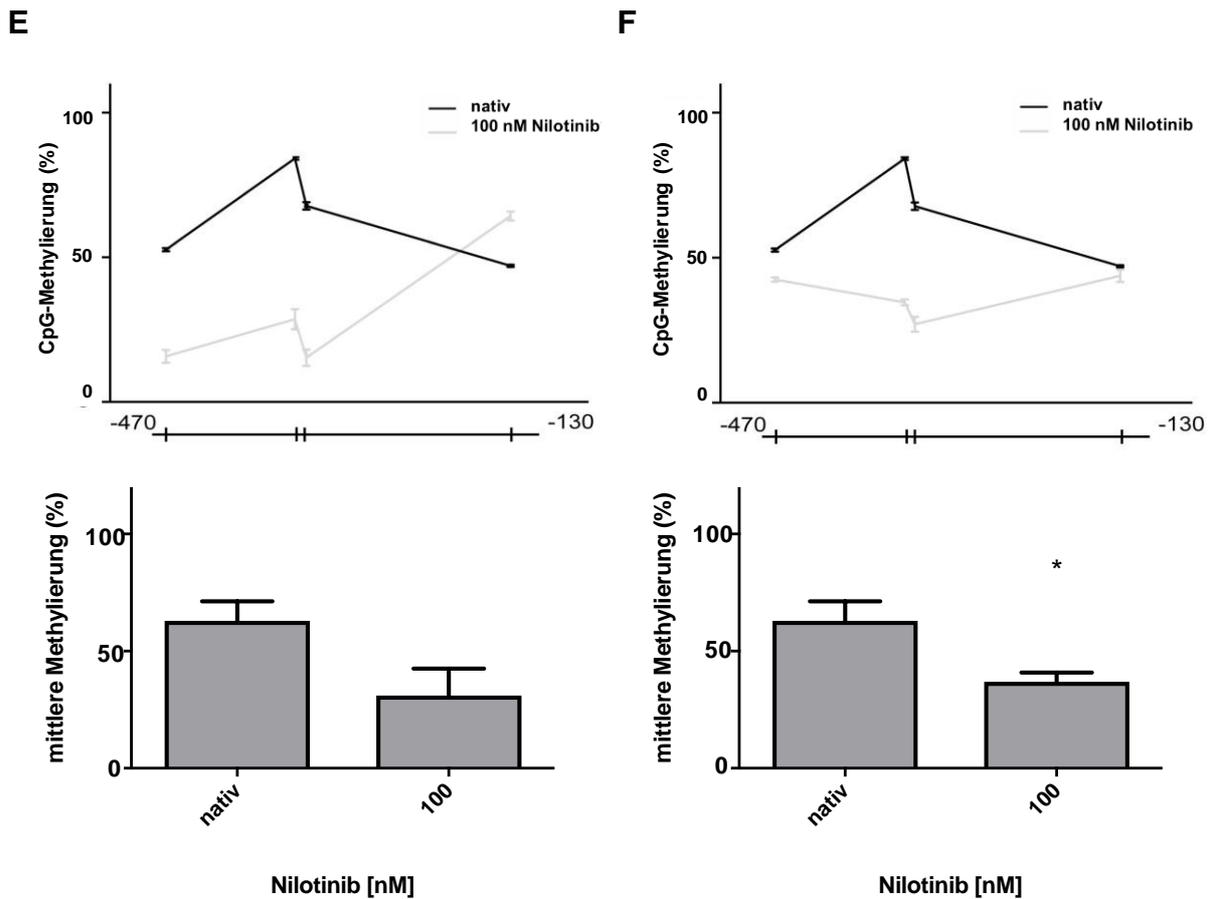


C



D





**Abbildung 13: Analyse der mRNA- und Proteinexpression, sowie der Methylierung von ABCG2 in der Nilotinib-Resistenz.** (A) Relative mRNA-Expression von ABCG2 der nativen und Nilotinib-resistenten Zellen in Resistenz 1. (B) Relative mRNA-Expression von ABCG2 der nativen und Nilotinib-resistenten Zellen in Resistenz 2. (C) Western Blot der nativen und resistenten Zellen in Resistenz 1 mit densitometrischer Auswertung. (D) Western Blot mit densitometrischer Auswertung für Resistenz 2. (E) In Resistenz 1 gemessene Methylierung der 4 CpGs in der Promotorregion (-470 bis -130 Basenpaare vor dem Startcodons), sowie die mittlere Methylierung der analysierten Sequenz. (F) Methylierung der 4 untersuchten CpGs, sowie mittlere Methylierung der analysierten Sequenz in Resistenz 2. Die statistische Analyse erfolgte mittels T-Test. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD. SD: Standardabweichung; \* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ;  $n = 3$ .

Die ABCG2-Analysen zeigten große Expressionsunterschiede zwischen den biologischen Replikaten. So konnte in Resistenz 1 ein deutlicher Anstieg der relativen mRNA-Expression in den Nilotinib-resistenten Zellen mit einem *Fold change* von 490 ( $p < 0,0001$ ; Abb. 13 A), in Resistenz 2 hingegen eine Abnahme der Expression mit einem *Fold change* von -65,1 in Bezug auf nativ ( $p = 0,001$ ) beobachtet werden (Abb. 13 B).

Im Western Blot der Resistenz 1 wurde in den Nilotinib-resistenten Zellen ein signifikanter Anstieg der ABCG2-Proteinexpression gemessen (*Fold change*: 4021;

$p < 0,0001$ ; Abb. 13 C). Für Resistenz 2 ließen sich im Western Blot, bei sehr schwachen Banden für beide Proben, keine Unterschiede zwischen den nativen und resistenten Zellen erkennen (Abb. 13 D).

Des Weiteren wurden Methylierungsanalysen des *ABCG2*-Promotors durchgeführt. Die Methylierung in der Promotorregion von *ABCG2* nahm in der Nilotinib-Resistenz ab. Diese Hypomethylierung im Vergleich zu den nativen Zellen war allerdings nur in Resistenz 2 signifikant (nativ: 62 %; 100 nM: 37 %;  $p = 0,03$ ; Abb. 13 F). In Resistenz 1 ließ sich für drei von vier CpGs ebenfalls eine Hypomethylierung in der Nilotinib-Resistenz zeigen. Aufgrund der Hypermethylierung des vierten CpGs (chr4: 89152864) war die mittlere Methylierung in den resistenten Zellen jedoch nicht signifikant reduziert (nativ: 63 %; 100 nM: 31 %;  $p = 0,07$ ; Abb. 13 E).

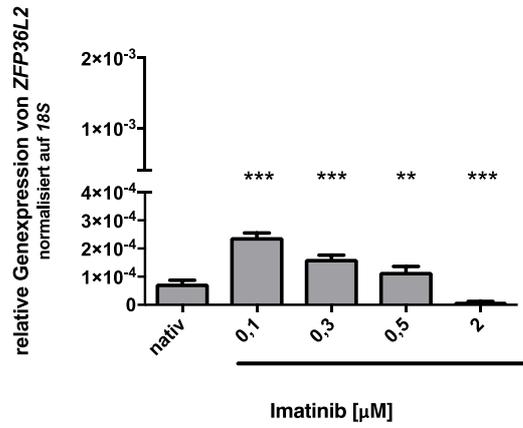
### **3.3.5 Veränderungen der Expression und Methylierung von *ZFP36L2* in der Imatinib-Resistenz**

*ZFP36L2* sorgt im Zellzyklus für eine Ruhephase (*Quiescence, Dormancy*), die für den korrekten Ablauf der Kontrollvorgänge am Übergang von der G1- in die S-Phase von essentieller Bedeutung ist. Auch in Tumorzellen können solche Ruhezustände beobachtet werden. Die dadurch verminderte Zellproliferation kann maligne Zellen vor der Wirkung von Chemotherapeutika schützen und damit zur Medikamentenresistenz beitragen.

Um die Gen- und Proteinexpression von *ZFP36L2* in den K-562 CML-Zellen in der Imatinib-Resistenz zu untersuchen, wurden qRT-PCR und Western Blots durchgeführt. Die Methylierungsanalyse von 18 in der Promotorregion von *ZFP36L2* lokalisierten CpGs (-1650 bis 1300 Basenpaare vor Ablesestart) erfolgte mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung.

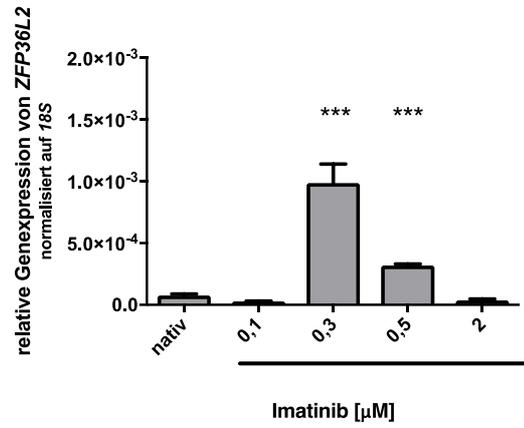
### Resistenz 1

A

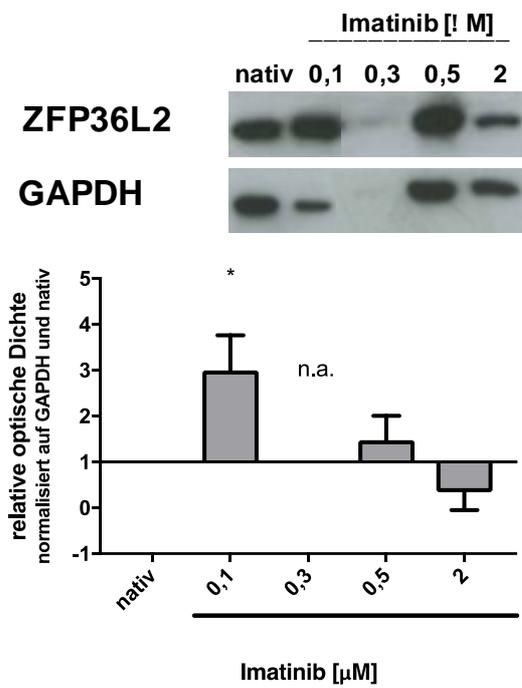


### Resistenz 2

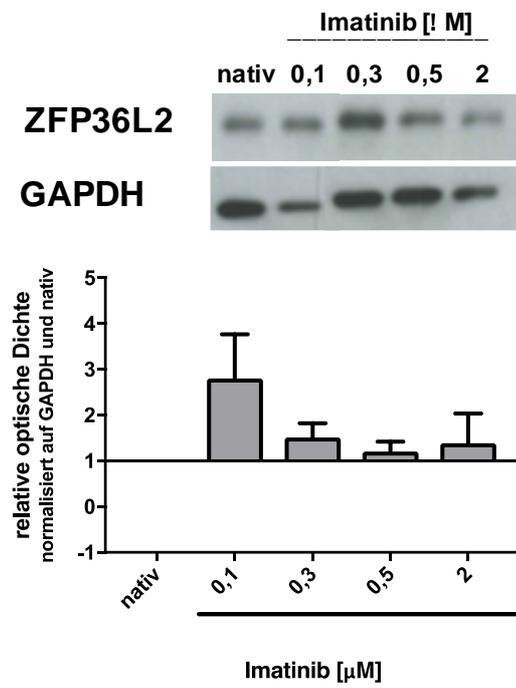
B



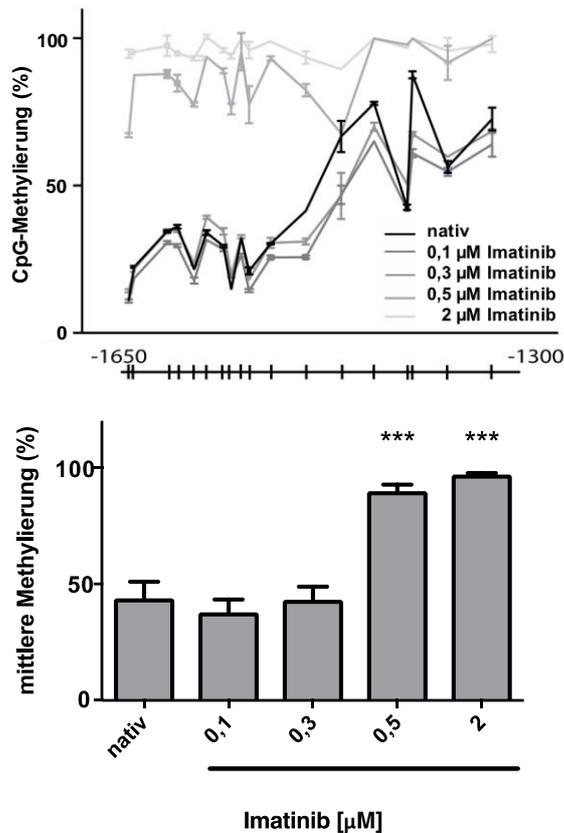
C



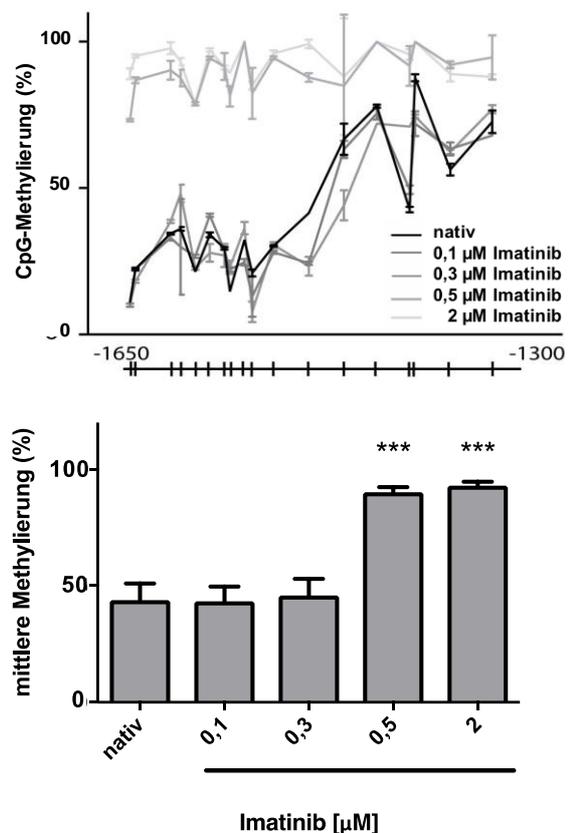
D



E



F



**Abbildung 14: Analyse der mRNA- und Proteinexpression, sowie der Methylierung von *ZFP36L2* in der Imatinib-Resistenz.** (A) Relative mRNA-Expression von *ZFP36L2* der nativen und Imatinib-resistenten Zellen (0,1; 0,3; 0,5; 2 μM) in Resistenz 1. (B) Relative mRNA-Expression von *ZFP36L2* der nativen und Imatinib-resistenten Zellen in Resistenz 2. (C) Western Blot der nativen und resistenten Zellen in Resistenz 1 mit densitometrischer Auswertung. (D) Western Blot mit densitometrischer Auswertung für Resistenz 2. (E) In Resistenz 1 gemessene Methylierung der 18 CpGs in der Promotorregion (-1650 bis -1300 Basenpaare vor dem Startcodon), sowie mittlere Methylierung der analysierten Sequenz. (F) Methylierung der 18 untersuchten CpGs in Resistenz 2 und mittlere Methylierung der analysierten Sequenz. Die statistische Analyse erfolgte mittels *One-way* ANOVA und anschließend Dunnet's Test. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD. SD: Standardabweichung; n.a. = nicht auswertbar; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ;  $n = 3$ .

Die mRNA-Expression von *ZFP36L2* war in Resistenz 1 in den 0,1 μM Imatinib-resistenten Zellen mit einem *Fold change* von 3,1 (Bezug auf nativ) hochreguliert ( $p < 0,0001$ ). Auch jene Zellen, welche gegen 0,3 μM und 0,5 μM Imatinib resistent waren, zeigten eine vermehrte Genexpression von *ZFP36L2* (0,3 μM:  $p < 0,0001$ ; 0,5 μM:  $p = 0,0028$ ; Abb. 14 A). In Resistenz 2 konnte diese Hochregulation der *ZFP36L2*-Expression in den Zellen, welche gegen geringe Konzentrationen (0,1 μM Imatinib) resistent waren, nicht beobachtet werden und war erst bei Konzentrationen von 0,3 und 0,5 μM Imatinib zu sehen (0,3 μM:  $p < 0,0001$ ; 0,5 μM:  $p < 0,0001$ ; Abb. 14 B). Die höchste mRNA-Expression ließ sich in

Resistenz 2 in den 0,3  $\mu$ M Imatinib-resistenten Zellen feststellen. Im Vergleich zu den nativen Zellen war die *ZFP36L2*-Expression hier um das 13-fache gesteigert. Zwischen den 0,5  $\mu$ M und den 2  $\mu$ M Imatinib-resistenten Zellen ließen sich in beiden biologischen Replikaten ebenfalls Veränderungen der Expression nachweisen (Resistenz 1:  $p < 0,0001$ ; Resistenz 2:  $p < 0,0001$ ; Abb. 14 A, B). In Resistenz 1 sank die Expression von *ZFP36L2* noch unter das Expressionsniveau der nativen Zellen (*Fold change* = 0,5;  $p < 0,0001$ ; Abb. 14 A), während sie sich in Resistenz 2 nicht signifikant von der mRNA-Expression der nativen Zellen unterschied (Abb. 14 B).

Auf Proteinebene zeigte sich in Resistenz 1 ein Anstieg der Expression von ZFP36L2 nur in den 0,1  $\mu$ M Imatinib-resistenten Zellen ( $p = 0,038$ ; Abb. 14 C), wogegen in Resistenz 2 keine Unterschiede in der ZFP36L2-Expression nachgewiesen werden konnten (Abb. 14 D).

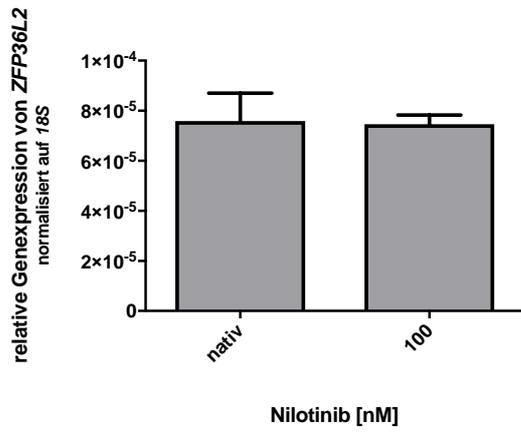
Als nächstes wurde die Methylierung von *ZFP36L2* untersucht. Dabei zeigten sich keine Veränderungen in der Methylierung der nativen Zellen und der Zellen, welche gegen geringe Konzentrationen Imatinib (0,1 - 0,3  $\mu$ M) resistent gezüchtet wurden (Abb. 14 E, F). Die mittlere Methylierung der *ZFP36L2*-Promotorregion in den nativen Zellen lag bei 44 %. Bei höheren Konzentrationen Imatinib (0,5; 2  $\mu$ M) ließ sich in beiden biologischen Replikaten eine Hypermethylierung des *ZFP36L2*-Promotors feststellen (Resistenz 1: (0,5  $\mu$ M: 90 %,  $p < 0,0001$ ; 2  $\mu$ M: 97 %,  $p < 0,0001$ ); Resistenz 2: (0,5  $\mu$ M: 90 %,  $p < 0,0001$ ; 2  $\mu$ M: 93%,  $p < 0,0001$ )). Dieses erhöhte Methylierungsniveau in den höheren Resistenzstufen (0,5; 2  $\mu$ M) ließ sich für alle 18 analysierten CpGs nachweisen (Abb. 14 E, F).

### **3.3.6 Veränderungen der Expression und Methylierung von *ZFP36L2* in der Nilotinib-Resistenz**

Um *ZFP36L2* in der Nilotinib-Resistenz zu untersuchen, wurde eine mRNA-Expressionsanalyse, sowie eine Analyse der Proteinexpression und der Methylierung nativer und Nilotinib-resistenter Zellen durchgeführt. Die Methylierungsanalyse wurde für 18 CpGs in der Promotorregion von *ZFP36L2* durchgeführt.

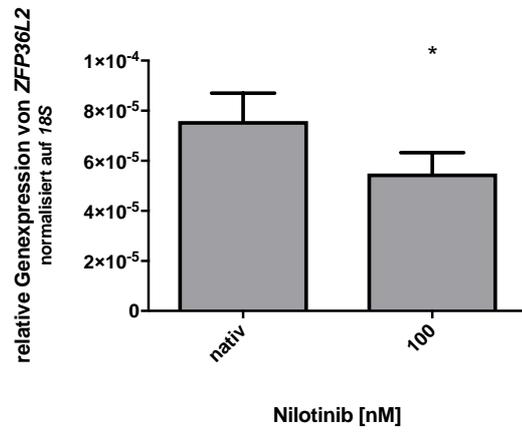
### Resistenz 1

A

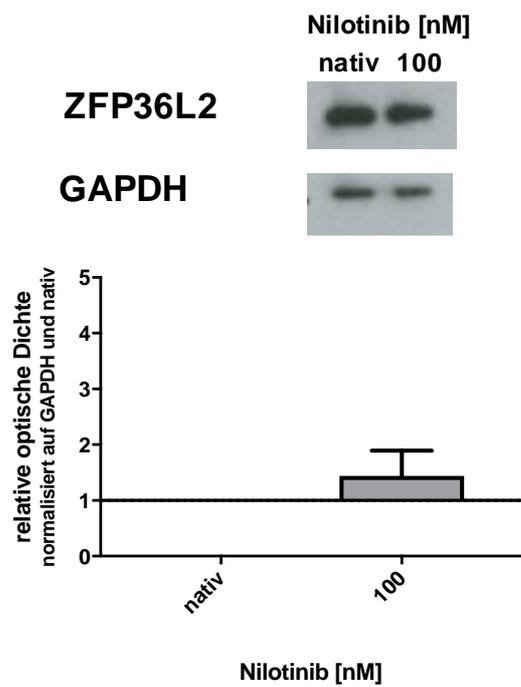


### Resistenz 2

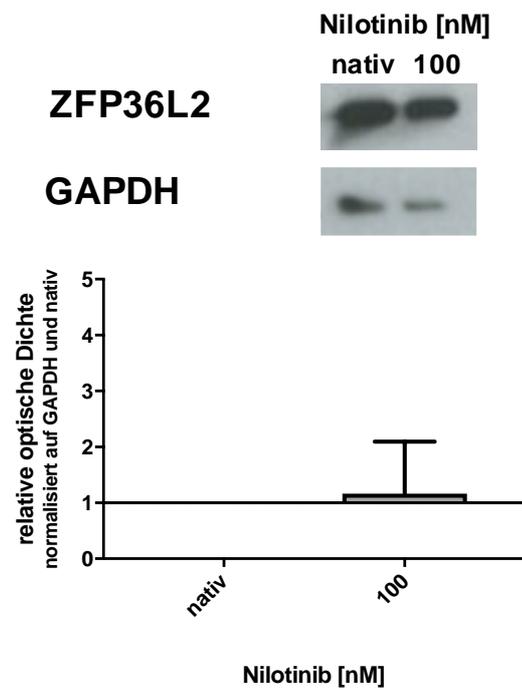
B

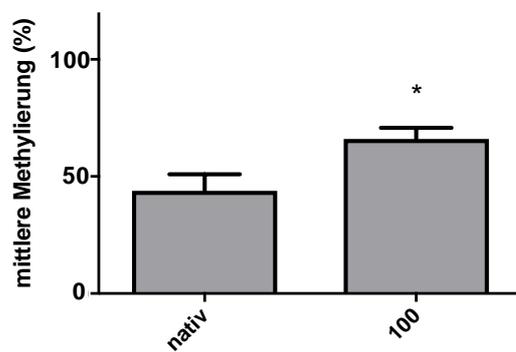
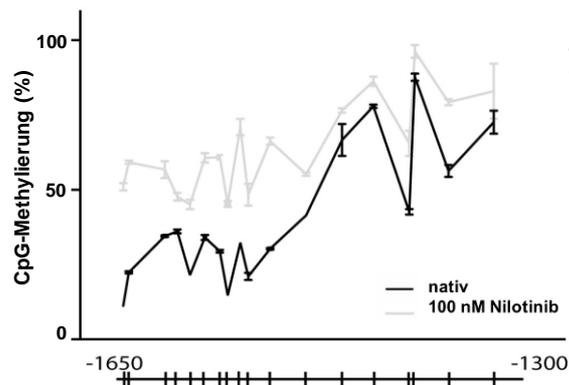


C

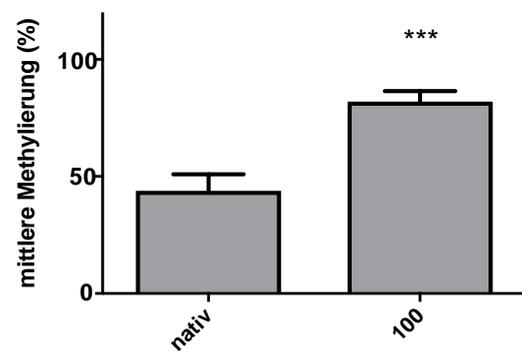
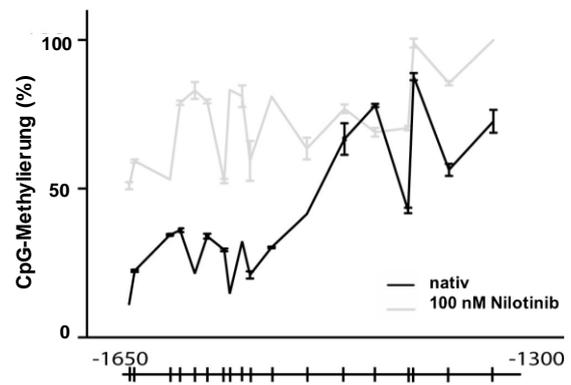


D



**E**

Nilotinib [nM]

**F**

Nilotinib [nM]

**Abbildung 15: Analyse der mRNA- und Proteinexpression, sowie der Methylierung von ZFP36L2 in der Nilotinib-Resistenz.** (A) Relative mRNA-Expression von ZFP36L2 der nativen und Nilotinib-resistenten Zellen (100 nM) in Resistenz 1. (B) Relative mRNA-Expression von ZFP36L2 der nativen und Nilotinib-resistenten Zellen in Resistenz 2. (C) Western Blot der nativen und resistenten Zellen in Resistenz 1 mit densitometrischer Auswertung. (D) Western Blot mit densitometrischer Auswertung für Resistenz 2. (E) In Resistenz 1 gemessene Methylierung der 18 CpGs in der Promotorregion (-1650 bis -1300 Basenpaare vor dem Startcodon), sowie die mittlere Methylierung der analysierten Sequenz. (F) Methylierung der 18 untersuchten CpGs sowie die mittlere Methylierung der analysierten Sequenz in Resistenz 2. Die statistische Analyse erfolgte mittels T-Test. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD. SD: Standardabweichung; \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ;  $n = 3$ .

Bei der Analyse der biologischen Replikate der Nilotinib-Resistenz zeigten sich Unterschiede in der ZFP36L2-Genexpression. In Resistenz 1 ließ sich keine veränderte mRNA-Expression in den Nilotinib-resistenten Zellen nachweisen (Abb. 15 A), während in Resistenz 2 eine Verringerung der ZFP36L2-Expression in den resistenten Zellen festzustellen war (*Fold change* = -1,4;  $p = 0,0249$ ). Dieser Unterschied konnte in den Analysen der ZFP36L2-Expression auf Proteinebene nicht beobachtet werden, da in den biologischen Replikaten keine Unterschiede zwischen den unbehandelten und den Nilotinib-resistenten Zellen zu erkennen waren (Abb. 15 C, D).

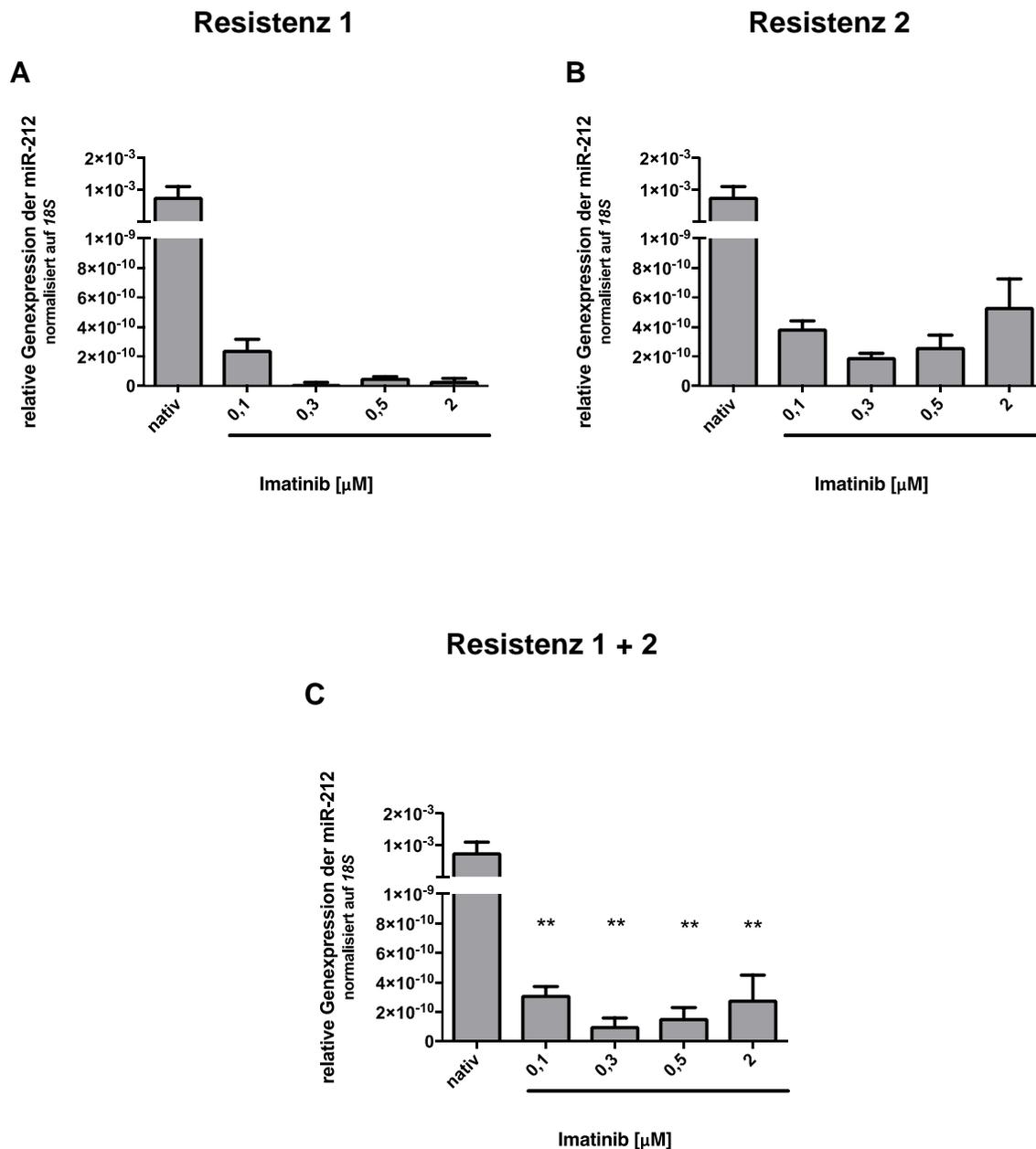
Des Weiteren wurde die Methylierung von *ZFP36L2* in der Nilotinib-Resistenz untersucht. Dabei zeigte sich in Resistenz 1 eine signifikante Hypermethylierung der Nilotinib-resistenten Zellen ( $p = 0,0162$ ; Abb. 15 E) mit einer Steigerung der mittleren Methylierung von 44 % in den nativen Zellen auf 66 % in den Nilotinib-resistenten Zellen. Auch in der zweiten Resistenzzüchtung ließ sich diese vermehrte Methylierung der 18 CpGs nachweisen ( $p = 0,0002$ ; Abb. 15 F). Hier war eine Steigerung der mittleren Methylierung auf 82 % nachweisbar.

### **3.3.7 Veränderungen der Expression und Methylierung der *miR-212* in der Imatinib-Resistenz**

Als nächstes wurde die Genexpression der *miR-212* in der Imatinib-Resistenz untersucht. Die *miR-212* kann den Abbau der *ABCG2*-mRNA bewirken und dadurch die Expression des Effluxtransporters regulieren. Doch die Regulierung der *miR-212* selbst ist bislang ungeklärt.

Die *miR-212*-Expressionsanalyse wurde mit nativen und Imatinib-resistenten (0,1; 0,3; 0,5; 2  $\mu\text{M}$ ) K-562 Zellen durchgeführt. Zusätzlich wurde der Methylierungsstatus von 13 CpGs in der Promotorregion der *miR-212* (-480 bis -120 Basenpaare vor dem ersten Exon) mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung erhoben.

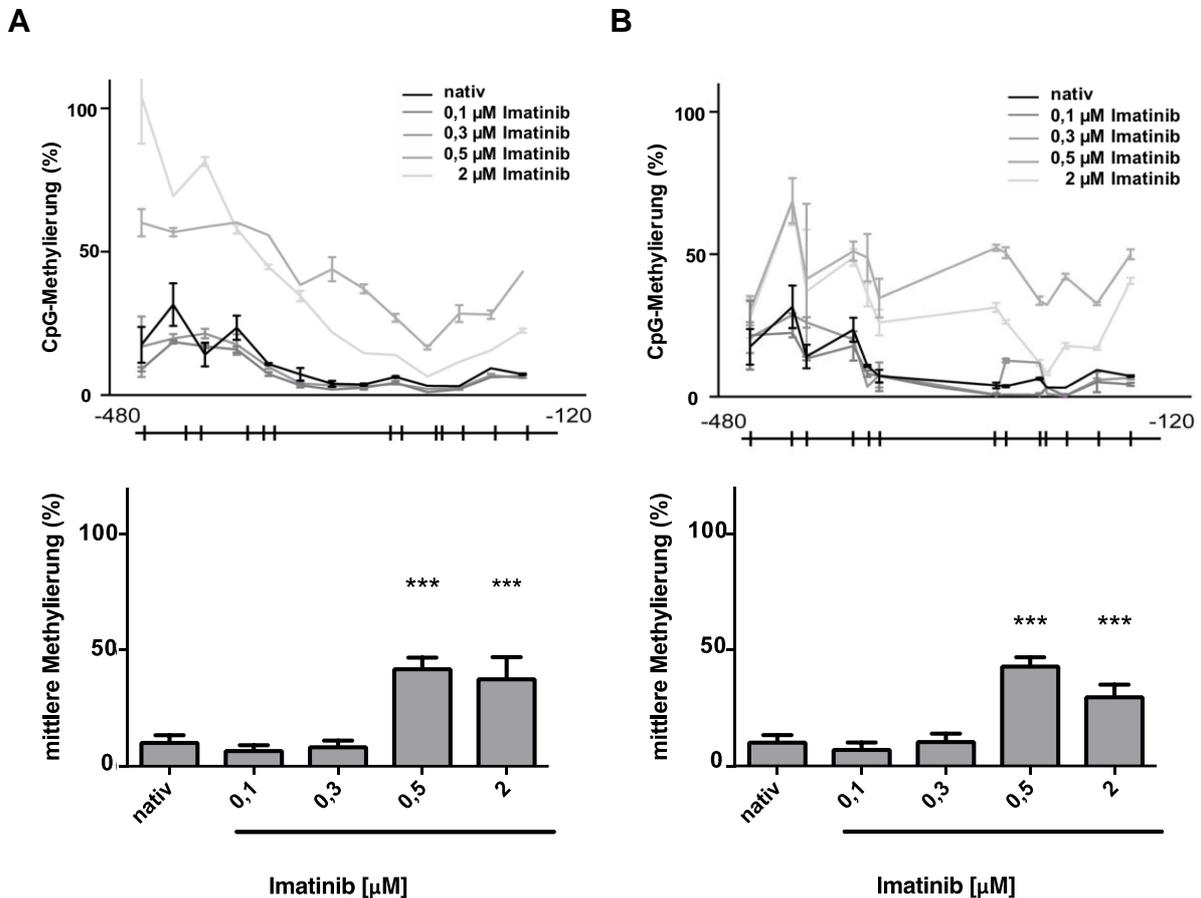
Bei den Analysen der biologischen Replikate der Imatinib-Resistenz wiesen native und Imatinib-resistente Zellen keine signifikanten Unterschiede in der *miR-212*-Expression auf (Abb. 16 A, B). Wertet man die Daten der biologischen Replikate jedoch zusammen aus, so lässt sich eine signifikant verminderte *miR-212*-Expression in den Imatinib-resistenten Zellen (0,1 bis 2  $\mu\text{M}$ ) im Vergleich zu der Expression in den nativen Zellen feststellen (0,1  $\mu\text{M}$ :  $p = 0,0054$ ; 0,2  $\mu\text{M}$ ; 0,3  $\mu\text{M}$ :  $p = 0,0054$ ; 0,5  $\mu\text{M}$ :  $p = 0,0054$ ; 2  $\mu\text{M}$ :  $p = 0,0054$ ). Die geringste *miR-212*-Expression ließ sich mit einem *Fold change* von -7327688,3 in Bezug auf nativ, in den 0,3  $\mu\text{M}$  Imatinib-resistenten Zellen feststellen.



**Abbildung 16: Analyse der mRNA-Expression der *miR-212* in der Imatinib-Resistenz.** (A) mRNA-Expression der nativen und Imatinib-resistenten Zellen (0,1; 0,3; 0,5; 2  $\mu\text{M}$ ) in Resistenz 1 (n = 3). (B) mRNA-Expression der *miR-212* in nativen und Imatinib-resistenten Zellen in Resistenz 2 (n = 3). (C) mRNA-Expressionsanalyse der biologischen Replikate zusammengefasst (Resistenz 1 + 2; n = 6). Die statistische Analyse erfolgte mittels *One-way ANOVA* und anschließendem Dunnet's Test. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD. SD: Standardabweichung. \*\*p < 0.01; n = 3.

Desweiteren ließ sich mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung in beiden biologischen Replikaten eine Hypermethylierung der Promotorregion der *miR-212*, in den 0,5  $\mu\text{M}$  und 2  $\mu\text{M}$  Imatinib-resistenten Zellen nachweisen (Resistenz 1: (0,5  $\mu\text{M}$ : p < 0,0001; 2  $\mu\text{M}$ : p = 0,0003); Resistenz 2: (0,5  $\mu\text{M}$ : p < 0,0001; 2  $\mu\text{M}$ : p < 0,0001); Abb. 17 A, B).

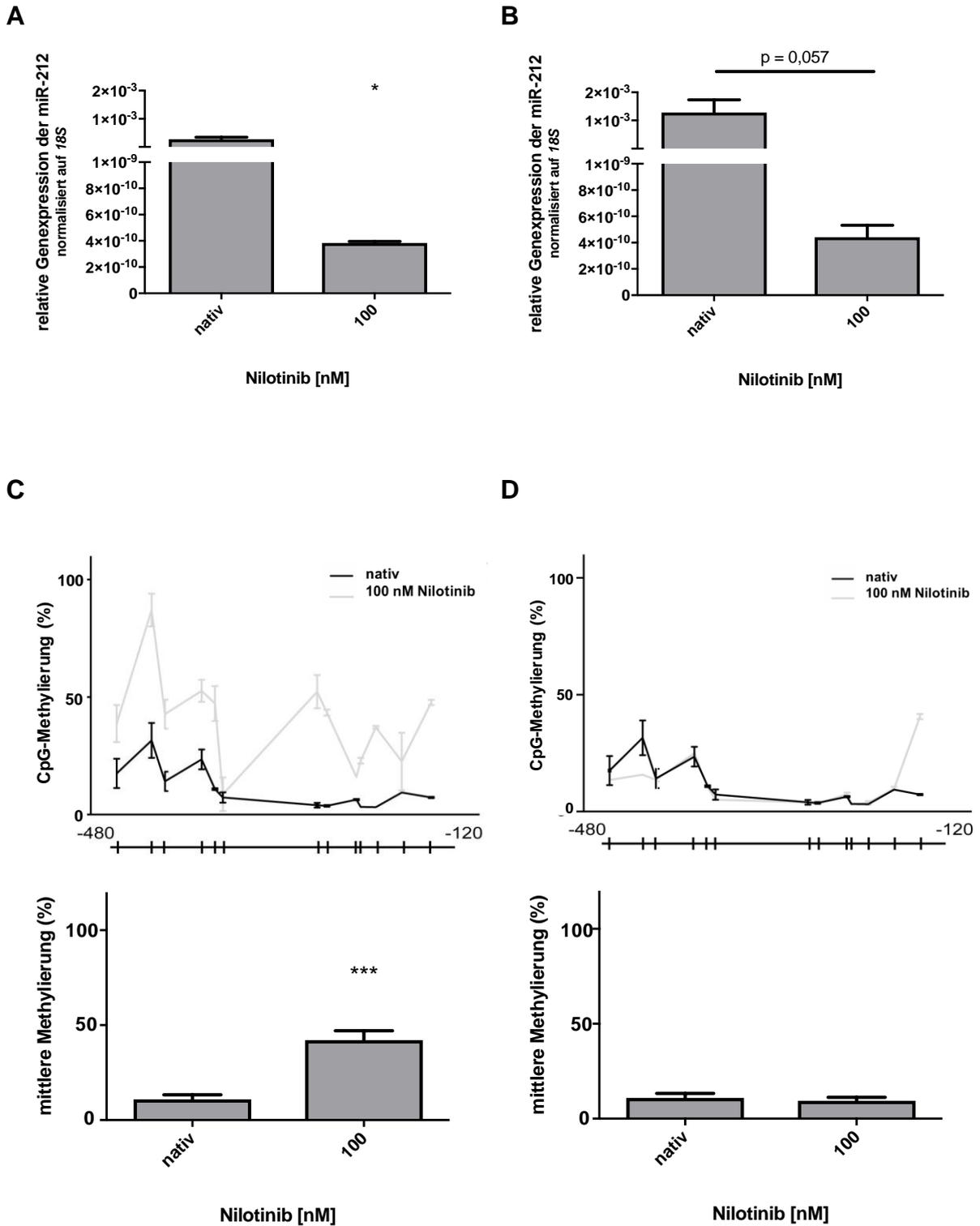
Ausgehend von einer mittleren Methylierung von 11 % in den nativen Zellen erreichte die Methylierung in den 0,5  $\mu\text{M}$  Imatinib-resistenten Zellen ihr Maximum mit 43 % in Resistenz 1 und 44 % in Resistenz 2.



**Abbildung 17: Methylierungsanalyse der *miR-212* in der Imatinib Resistenz.** (A) In Resistenz 1 gemessene Methylierung der 13 CpGs in der Promotorregion (-480 bis -120 Basenpaare vor dem Startcodon) für native und Imatinib-resistente Zellen (0,1; 0,3; 0,5; 2  $\mu\text{M}$ ), sowie mittlere Methylierung der analysierten Sequenz. (B) Methylierung der 13 untersuchten CpGs in Resistenz 2 und mittlere Methylierung der analysierten Sequenz. Die statistische Analyse erfolgte mittels *One-way ANOVA* und anschließendem *Dunnet's Test*. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD. SD: Standardabweichung; \*\*\* $p < 0,001$ ;  $n = 3$ .

### 3.3.8 Veränderungen der Expression und Methylierung der *miR-212* in der Nilotinib-Resistenz

Die *miR-212*-Expression wurde in den 100 nM Nilotinib-resistenten Zellen im Vergleich zu nativen Zellen untersucht. Die Methylierung der 13 CpGs in der *miR-212*-Promotorregion wurde mit Bisulfit-Pyrosequenzierung durchgeführt.



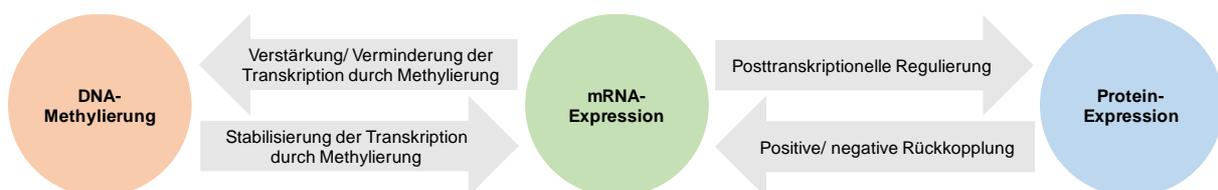
**Abbildung 18: Analyse der mRNA-Expression und Methylierung der *miR-212* in der Nilotinib Resistenz.** (A) Relative Genexpression der *miR-212* der nativen und Nilotinib-resistenten Zellen in Resistenz 1. (B) Relative Genexpression der *miR-212* der nativen und Nilotinib-resistenten Zellen in Resistenz 2. (C) In Resistenz 1 gemessene Methylierung der 13 CpGs in der Promotorregion, -480 bis -120 Basenpaare vor dem Startcodon. Mittlere Methylierung der analysierten Sequenz. (D) Methylierung der 13 untersuchten CpGs in Resistenz 2. Mittlere Methylierung der analysierten Sequenz. Die statistische Analyse erfolgte mittels T-Test. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD. SD: Standardabweichung; \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ;  $n = 3$ .

Die Genexpressionsanalyse der *miR-212* zeigte in der ersten Nilotinib-Resistenz eine, im Vergleich zu nativ, um mehr als 2000000-fach verminderte Expression in den resistenten Zellen (*Fold change* = -2020741,2;  $p = 0,033$ ; Abb. 18 A). In Resistenz 2 war eine vergleichbare Expressionsminderung in den Nilotinib-resistenten Zellen zu erkennen (*Fold change* = -1759870,9;  $p = 0,057$ ; Abb. 18 B).

Bei vergleichbaren Veränderungen in der Expression in den biologischen Replikaten in der Nilotinib-Resistenz, zeigte die Methylierungsanalyse unterschiedliche Ergebnisse für Resistenz 1 und Resistenz 2. In Resistenz 1 war die analysierte Promotorregion in den Nilotinib-resistenten Zellen hypermethyliert gegenüber den nativen Zellen ( $p < 0,0001$ ). Die nativen Zellen wiesen eine mittlere Methylierung von 11 % auf, während die Methylierung der 100 nM Nilotinib-resistenten Zellen auf 44 % gesteigert war (Abb. 18 C). In Resistenz 2 hingegen war die Methylierung der nativen und Nilotinib-resistenten Zellen nicht verändert (Abb. 18 D).

## 4 Diskussion

Die Einführung der TKI revolutionierte die Behandlung der CML und die Prognose der Patienten hat sich durch diese zielgerichtete Therapie enorm verbessert (O'Brien et al. 2003). Das Ansprechen der Patienten auf die Medikamente kann jedoch durch verschiedene Resistenzmechanismen vermindert, oder sogar komplett aufgehoben werden (Bixby & Talpaz 2010). Neben BCR/ABL-abhängigen Faktoren existieren eine Vielzahl BCR/ABL-unabhängiger Faktoren, die zur Resistenz gegen TKIs führen können. Zu diesen BCR/ABL-unabhängigen Resistenzfaktoren zählen unter anderem die für diese Arbeit ausgewählten Gene: *ABCG2*, *ABCB1*, *ZFP36L2* und die *miR-212*. Die Auswahl dieser vier Zielgene beruht auf, in der Fachliteratur beschriebene Zusammenhänge mit der Arzneistoffresistenz und ist weiterhin durch die Funktion der assoziierten Proteine begründet. Jedoch kann davon ausgegangen werden, dass bei weitem mehr Gene zur Arzneistoffresistenz in der CML beitragen und es sei betont, dass es sich hier nur um eine Auswahl besonders interessanter Kandidaten handelt. Obwohl bereits viele Resistenzmechanismen beschrieben sind, bleibt die Frage nach der Regulierung dieser Mechanismen bislang offen. Sowohl genetische, transkriptionelle, als auch epigenetische Veränderungen könnten potentiell die Genexpression in der TKI-Resistenz steuern. In dieser Arbeit soll ein möglicher Zusammenhang von epigenetischen Veränderungen, insbesondere der Promotormethylierung, mit der mRNA- und Proteinexpression der Kandidatengene untersucht werden (Abb. 19).



**Abbildung 19: Zusammenhang von Methylierung, mRNA-Expression und Proteinexpression.** Basierend auf der Analyse der Methylierung, mRNA-, und Proteinexpression soll der Zusammenhang der drei Variablen untersucht werden.

### 4.1 Diskussion der Durchführung am *in vitro* Zellmodell

Um die Resistenzmechanismen in der CML besser zu verstehen, wurde ein *in vitro* Resistenzmodell mit der CML-Zelllinie K-562 etabliert. Die Messungen erfolgten in jeweils drei technischen Replikaten. Um die Evidenz zu erhöhen, erfolgte die

Resistenzzüchtung mit Imatinib und Nilotinib zusätzlich in biologischen Replikaten, d.h. jeweils zweimal. Dadurch ist es möglich, Resistenzmechanismen, welche rekurrent auftreten, von jenen zu unterscheiden, die zwischen den biologischen Replikaten variieren. Um die hier gewonnenen Erkenntnisse zu bestätigen und eventuell weitere Resistenzmechanismen aufzudecken, wäre es sinnvoll die Anzahl der biologischen Replikate weiter zu erhöhen.

Für das Imatinib-Resistenzmodell wurden die Konzentrationen 0,1, 0,3, 0,5 und 2  $\mu\text{M}$  Imatinib gewählt. Diese Konzentrationen sollen die Varianz, denen der Medikamenten-Plasmaspiegel *in vivo* unterliegt, widerspiegeln (Picard et al. 2007). In der Imatinib-Therapie des CML-Patienten wird eine Plasmakonzentration von 1  $\mu\text{g/ml}$  (1,7  $\mu\text{M}$ ) angestrebt. Die Konzentration kann jedoch in manchen Kompartimenten, welche für den TKI schwer erreichbar sind, wie zum Beispiel im Knochenmark, deutlich geringer sein (Levêque & Maloisel 2005). Die Pharmakokinetik von Imatinib kann zusätzlich durch Leber- oder Nierenerkrankung, sowie auch durch Medikamenteninteraktionen beeinflusst werden (Peng et al. 2005).

Nilotinib besitzt eine höhere Affinität zu BCR/ABL und tötet CML-Zellen, welche das Fusionsprotein exprimieren mit einer mehr als 20-fach höheren Potenz als Imatinib ab (Weisberg et al. 2006; Baccarani et al. 2013; Jabbour & Kantarjian 2016). Dementsprechend wurde für Nilotinib mit 100 nM eine entsprechend niedrigere Konzentration für die Resistenzzüchtung gewählt.

Das Resistenzmodell *in vitro* ermöglicht eine hoch standardisierte Resistenzzüchtung der Zellen. Zahlreiche Einflussfaktoren, welche *in vivo* die Wirkung der Medikamente beeinflussen, werden so umgangen. Dies bietet die Möglichkeit die Resistenzentwicklung schematisch zu analysieren und zu verstehen. Eine direkte Übertragung auf die Situation *in vivo* ist jedoch nicht möglich.

## **4.2 Kritische Betrachtung der Analyse der Proteinexpression**

Diese Arbeit basiert auf der Analyse der mRNA-Expression, der Protein-Expression und der DNA-Methylierung verschiedener Gene. Während sich die gewählten Methoden für die Analyse der mRNA-Expression und DNA-Methylierung durch geringe Standardabweichungen und valide Ergebnisse auszeichneten, so waren in der Proteinanalyse einige Auffälligkeiten zu verzeichnen.

Als *Housekeeper* für die Western Blots wurde GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) gewählt. GAPDH ist ein Enzym der Glykolyse, von welchem ein ubiquitäres Auftreten in allen Zellen des menschlichen Organismus angenommen wird. Diese Eigenschaft qualifiziert GAPDH als *Housekeeper*. In den durchgeführten Western Blots konnte jedoch eine deutliche Varianz in der Bandenstärke von GAPDH für die unterschiedlichen Proben beobachtet werden.

Es gibt verschiedene potenzielle Fehlerquellen, die zu Abweichungen in der Intensität der GAPDH-Banden führen können. Beispielsweise können Fehler in der Proteinbestimmung zur Aufbringung von unterschiedlichen Proteinmengen führen. Auch bei der Auftragung auf das Gel kann durch Pipettierungenauigkeiten eine abweichende Bandenintensität bei gleich eingestellten Proteinkonzentrationen hervorgerufen werden.

Grundsätzlich sollte auch in Betracht gezogen werden, dass GAPDH eventuell tatsächlich differentiell exprimiert wird, wodurch die Auswertung der Western Blots für die Zielgene erheblich verfälscht worden wäre. Es ist bekannt, dass der Stoffwechsel in der Kanzerogenese solider Tumoren von oxidativen Prozessen zunehmend auf glykolytischen Metabolismus umgestellt wird (Unwin et al. 2003). In diesem Rahmen ist eine Hochregulierung glykolytischer Enzyme, wie GAPDH zu erwarten. Beispielsweise konnten Ferguson *et al.* Unterschiede in der GAPDH-Expression in gesunden Nierenzellen und Zellen eines Nierentumors feststellen (Ferguson et al. 2005).

Es gibt verschiedene *Housekeeper*, die hier zur Anwendung hätten kommen können. Für das K-562 Zellmodell wurde für diese Arbeit im Vorfeld Beta-Aktin als Alternative für GAPDH erwogen. Im Vergleich zeigte Beta-Aktin jedoch eine weitaus größere Varianz in der Proteinexpression in den nativen und TKI-resistenten K-562 Zellen, sodass die Wahl auf GAPDH fiel. Um den *Housekeeper* als mögliche Fehlerquelle auszuschließen, würde die Normalisierung auf Gesamtprotein eine weitere Option darstellen.

Insgesamt war die Auswertung der Western Blots mit GAPDH als *Housekeeper* jedoch bis auf wenige Ausnahmen möglich.

### 4.3 Auswahl der CpGs

Es stehen eine Vielzahl von Methoden zur quantitativen Messung der DNA-Methylierung zur Verfügung, einschließlich Array-basierter, Antikörper-basierter und Sequenzierungs-basierter Ansätze. Die Bisulfit-Pyrosequenzierung zählt zu den Goldstandards in der Methylierungsanalyse und wurde in dieser Arbeit angewendet (Crary-Dooley et al. 2017; BLUEPRINT consortium 2016).

Da bei der Pyrosequenzierung pro Durchlauf jeweils nur etwa 75 Basen sequenziert werden können, wurden pro Gen bis zu vier Sequenzierprimer designt um einen möglichst großen Abschnitt der CpG-*islands* in den Promotorregionen zu erfassen. Dennoch musste eine Auswahl an CpGs in der Promotorregion getroffen werden, deren Methylierung gemessen werden sollte. Dementsprechend ist die Aussagekraft über die Methylierung jeweils der gesamten Promotorregion der Gene nur begrenzt. Ziel war es, CpGs für die Methylierungsanalyse auszuwählen, welche mit hoher Wahrscheinlichkeit differentiell methyliert sind und somit am ehesten eine regulatorische Funktion innehaben könnten.

Als eine Basis der Auswahl der CpGs dienten bislang nicht-publizierte Daten von Dr. Meike Kähler (Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie, UKSH Kiel) eines 850 k-Array, mit welchem die genomweite Methylierung von nativen und Imatinib-/Nilotinib-resistenten Zellen gemessen wurde. Für *ABCG2* fanden sich in diesem Array vier CpGs und für *ZFP36L2* sechs CpGs mit differentieller Methylierung zwischen nativen und TKI-resistenten Zellen. Diese differentiell methylierten CpGs wurden beim Primerdesign berücksichtigt. Die zuvor beobachteten Methylierungsveränderungen ließen sich in der vorliegenden Arbeit mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung bestätigen.

Die Auswahl der CpGs für die Methylierungsanalyse von *ABCB1* erfolgte angelehnt an eine Studie von Oberstadt *et al* (Oberstadt et al. 2013). Diese Arbeitsgruppe fand eine Hypermethylierung im Promotor von *ABCB1* in der Medikamentenresistenz beim multiformen Glioblastom. Die differentielle Methylierung in der analysierten Region ließ sich in der vorliegenden Arbeit in der Imatinib- und Nilotinib-Resistenz bei CML nicht feststellen.

Die kodierende Sequenz der *miR-212*, sowie auch der davorliegende Promotor sind CpG-reiche Regionen der DNA. In Magenkarzinom-Zellen wurde bereits die Methylierung der *miR-212* beim Magenkarzinom untersucht. Xu *et al.* fanden eine

Hypermethylierung der *miR-212*-Promotorregion in den Karzinomzellen im Zusammenhang mit einer verminderten *miR-212*-Expression (L. Xu et al. 2010). Die Sequenzierprimer wurden so gewählt, dass ein Großteil, der durch Xu *et al.* auf Methylierung untersuchten CpGs in die Analyse eingeschlossen werden konnten. Die vorliegende Arbeit konnte auch in der Imatinib- und Nilotinib-Resistenz eine differenzielle Methylierung dieser CpGs zeigen.

#### **4.4 Interpretation der Expressions- und Methylierungsanalysen**

Der Zusammenhang von Methylierung und Genexpression gerät immer mehr in den Fokus aktueller Forschung. Es wird allgemein angenommen, dass die Methylierung der DNA negativ mit der Genexpression korreliert (Razin & Riggs 1980; Stein et al. 1982; Razin & Szyf 1984). Bei Methylierungsveränderungen in der Promotorregion eines Gens gilt es jedoch zu berücksichtigen, dass diese Region starken Regulationsprozessen unterworfen ist. Die Bindung von Transkriptionsfaktoren kann durch Hypermethylierung erschwert sein, wodurch auch ambivalente Effekte der DNA-Methylierung auf die Genexpression erklärt werden können (Medvedeva et al. 2014).

Es ist jedoch nicht immer klar, ob Abweichungen in der Methylierung die Ursache oder Konsequenz von transkriptionellen Veränderungen sind (Jones 2012).

Desweiteren konnten bereits für verschiedene Medikamente, wie beispielsweise den Vasodilatator Hydralazin, oder den Folsäure-Antagonisten Methotrexat, epigenetische Veränderungen im gesamten Genom, sowie auch für einzelne Gene nachgewiesen werden (Heerboth et al. 2014; Csoka & Szyf 2009). Für die TKI ist ein Einfluss auf die Methylierung noch weitestgehend ungeklärt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Imatinib-resistente CML-Patienten gegenüber Imatinib-sensitiven Patienten eine Hypermethylierung des gesamten Genoms aufwiesen (Eiring & Deininger 2014). In der Therapie mit Nilotinib konnte hingegen eine globale Hypomethylierung nachgewiesen werden (Shen et al. 2017). Shen *et al.* konnten außerdem zeigen, dass die Expression der DNA-Methyltransferasen DNMT1, DNMT3a und DNMT3b in Anwesenheit von Nilotinib vermindert ist.

#### 4.4.1 Expression und Methylierung von *ABCB1* in der Imatinib-/Nilotinib-Resistenz

*ABCB1* (P-gp) kann Therapeutika aktiv aus der Zelle heraustransportieren und so zur Medikamentenresistenz beitragen. Eine Relevanz des Effluxtransporters in der Therapieresistenz in der CML wurde bereits in verschiedenen Zelllinien, sowie auch in CML Patienten beschrieben (Eadie et al. 2016; Yamakawa et al. 2014; Eadie et al. 2017). In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch nur eine marginale Expression von *ABCB1* in den hier verwendeten K-562 Zellen nachgewiesen werden. Auch unter Behandlung mit Imatinib konnte keine Steigerung der *ABCB1*-Expression beobachtet werden. Dies lässt darauf schließen, dass in diesem Zellmodell andere BCR/ABL-unabhängige Resistenzmechanismen den Wirkverlust von Imatinib bewirken. Offen bleibt, ob *ABCB1* eventuell erst bei höheren Konzentrationen Imatinib (> 2  $\mu\text{M}$ ) hochreguliert wird, wie es in anderen Studien gezeigt werden konnte (Eadie et al. 2016; Eadie et al. 2017).

Eine veränderte Methylierung der Promotorregion von *ABCB1* wurde bereits für verschiedenen Erkrankungen (u.a. bei Akuter myeloischer Leukämie (AML), beim Blasenkarzinom und beim Mammakarzinom) dokumentiert (Genovese et al. 2017). In der AML wurde die Hypermethylierung des *ABCB1*-Promotors sogar als notwendiger Faktor für die *ABCB1*-vermittelte Arzneistoffresistenz in der AML postuliert (Nakayama et al. 1998).

In der hier untersuchten K-562-CML-Zelllinie zeigten sich in der Promotorregion von *ABCB1* keine Methylierungsunterschiede zwischen nativen und Imatinib-resistenten Zellen. Aufgrund der fehlenden Dynamik in Methylierung und Expression scheint es schwierig auf eine Korrelation zwischen Promotormethylierung und Gentranskription zu schließen.

In der Nilotinib-Resistenz verhielt sich die *ABCB1*-Expression ähnlich wie in der Imatinib-Resistenz. Zu der sehr geringen mRNA-Expression in den nativen Zellen zeigte sich in den resistenten Zellen keine Veränderung. Auch auf Proteinebene war der Transporter sehr gering exprimiert und zeigte keine Dynamik in der Resistenzentwicklung. Die *ABCB1*-Methylierung zwischen nativen und Nilotinib-resistenten Zellen wies keine Unterschiede auf. Äquivalent zur

Imatinib-Resistenz ist auch hier keine dynamische Wechselwirkung zwischen Promotor-Methylierung und *ABCB1*-Expression zu beobachten. Die Methylierung der *ABCB1*-Promotorregion scheint bei den hier angewendeten Arzneistoffkonzentrationen keinen direkten Einfluss auf die Expression des Effluxtransporters zu nehmen. Vielmehr deuten hier vorgenommenen Messungen auf mRNA- und Proteinebene darauf hin, dass *ABCB1* in K562-Zellen generell supprimiert und für die Resistenzentwicklung in diesem Zellmodell nur von untergeordneter Bedeutung ist. Diese Suppression des ABC-Transporters könnte unter anderem durch den Einfluss von microRNA gesteuert werden. Beispielsweise ließ sich für das Hepatozelluläre Karzinom bei Überexpression der miR-122 eine damit einhergehende Supprimierung des *ABCB1*-Expressionsniveaus beobachten (Y. Xu et al. 2011). Auch die miR-137, miR-200c und die miR-138 sollen die *ABCB1*-Expression hemmen können (Katayama et al. 2014).

#### **4.4.2 Expression und Methylierung von *ABCG2* in der Imatinib-/Nilotinib-Resistenz**

*ABCG2* (BCRP) ist ein weiterer Effluxtransporter der ABC-Familie, der durch aktiven Transport die Konzentration von Arzneistoffen in der Zelle reduzieren kann. In der vorliegenden Arbeit konnte ein Anstieg der *ABCG2*-Expression in der Imatinib-Resistenz in der CML beobachtet werden. Dieses Ergebnis bestätigt die Beobachtungen von Turrini *et al.*, welche ebenfalls eine vermehrte Expression des Effluxtransporters in resistenten Zellen beobachten konnten (Turrini et al. 2012).

Die mRNA-Expressionsanalyse des Effluxtransporters *ABCG2* zeigte in der ersten Resistenzzüchtung eine Überexpression in den 0,1 – 0,5  $\mu\text{M}$  Imatinib-resistenten Zellen. In der Resistenzzüchtung 2 ließ sich die vermehrte *ABCG2*-Expression für mittlere Konzentrationen (0,3 – 0,5  $\mu\text{M}$ ) Imatinib bestätigen. Auf Proteinebene zeigte sich eine Überexpression des Effluxtransporters in den 0,5  $\mu\text{M}$  Imatinib-resistenten Zellen. Somit lässt sich vermuten, dass *ABCG2* an der Resistenzentwicklung bei geringen bis mittleren Imatinib-Konzentrationen beteiligt ist, während bei höheren Konzentrationen andere, *ABCG2*-unabhängige Faktoren die Resistenz der K-562 Zellen bedingen. Beispielsweise könnten sich bei hohen Imatinib-Konzentrationen (>2  $\mu\text{M}$ ) andere Transporter der ABC-Familie, wie *ABCB1* vermehrt am Imatinib-Efflux beteiligen (Shang et al. 2014; Y. Xu et al. 2013; Gromicho et al. 2011).

Während die Expression von *ABCG2* sich zwischen nativen Zellen und Zellen, die niedrigen Imatinib-Konzentrationen (0,1; 0,3  $\mu\text{M}$ ) ausgesetzt waren, am stärksten unterschieden, veränderte sich die Methylierung in der Promotorregion von *ABCG2* erst zwischen mittleren (0,1 und 0,3  $\mu\text{M}$ ) und hohen Imatinib-Konzentrationen (0,5 und 2  $\mu\text{M}$ ). Daraus ist zu folgern, dass die Hochregulierung der *ABCG2*-Expression vermutlich unabhängig von der Promotormethylierung erfolgt. Auch in anderen Tumorentitäten, wie dem multiformen Glioblastom (Oberstadt et al. 2013), dem Mamma-Karzinom (Spitzwieser et al. 2016) und dem multiplen Myelom (Turner et al. 2006) konnte kein oder nur ein gering ausgeprägter Zusammenhang von Methylierung und *ABCG2*-Expression gefunden werden.

*ABCG2* scheint in dem hier verwendeten Zellmodell also durch andere Faktoren reguliert zu werden. Denkbar wäre ein Einfluss der miR-212, deren Expressionsabnahme in Zusammenhang mit einer gesteigerten *ABCG2*-Expression und einer verminderten Imatinib-Sensitivität beschrieben ist (Kaehler et al. 2017). Auch die miR-328 kann an die 3'-UTR von *ABCG2* binden und kommt als Regulator der *ABCG2*-Expression in Frage (Turrini et al. 2012; Pan et al. 2009).

Die Expression von *ABCG2* in der Nilotinib-Resistenzzüchtung war konträr in den biologischen Replikaten. In der Resistenzzüchtung 1 zeigte sich eine deutlich gesteigerte Genexpression in den Nilotinib-resistenten Zellen, während die Expression in der Resistenzzüchtung 2 signifikant sank. Im Western Blot für Resistenz 1 konnte dieser Expressionsgradient zwischen nativen und resistenten Zellen auch auf Proteinebene beobachtet werden. Western Blot und Densitometrie für Resistenz 2 zeigten hingegen keinen Unterschied der *ABCG2*-Protein-Expression.

Hier scheinen in den beiden biologischen Replikaten unterschiedliche Resistenzmechanismen zum Tragen zu kommen. Die deutlich vermehrte *ABCG2*-Expression in den resistenten Zellen in Resistenz 1 legt die Vermutung nahe, dass der Nilotinib-Efflux mittels *ABCG2* hier erheblich zu der Resistenzentstehung beiträgt (Brendel et al. 2007). In Resistenz 2 hingegen scheint *ABCG2* keine große Rolle für die Nilotinib-Resistenzentwicklung zu spielen. Diese Unterschiede der *ABCG2*-Expression zwischen den biologischen Replikaten konnten auch in genomweiten Expressionsanalysen gesehen werden (Dissertation Meike Kähler).

Möglicherweise sind die Zellen in Resistenz 2 aufgrund von anderen Resistenzmechanismen nicht auf die Überexpression von *ABCG2* angewiesen. Für diese These sprechen die Ergebnisse einer Exom-Sequenzierung, welche eine *NRas*-Mutation in Resistenz 2 detektieren konnte (unpublizierte Daten). *NRas* gehört zu der Familie der *Ras*-Gene (*rat-sarkoma*), welche für ein Protein mit GTPase-Aktivität codieren. Beim Austausch von GTP zu GDP wird der Ras/Raf/MAPK-Signalweg in Gang gesetzt, welcher das Zellwachstum fördert. Punktmutationen in den *Ras*-Genen können zum Verlust der GTPase-Aktivität führen, wodurch das Protein dauerhaft aktiviert bleibt und so die Zellteilung fördert. Daher werden die *Ras*-Gene zu den Protoonkogenen gezählt. Da der Ras/Raf/MAPK-Signalweg auch durch BCR-ABL aktiviert wird, könnte eine *gain-of-function* Mutation im *Ras*-Gen zur Nilotinib-Resistenz in Resistenz 2 beitragen (Hobbs et al. 2016).

Die Expression von *ABCG2* in der Nilotinib-Resistenz scheint, ähnlich wie in der Imatinib-Resistenz, nicht mit der Methylierung zu korrelieren. In beiden biologischen Replikaten ist die Promotormethylierung in den Nilotinib-resistenten Zellen vermindert. Da diese Hypomethylierung in Resistenz 1 mit verstärkter und in Resistenz 2 mit verminderter Expression einhergeht, scheinen die Expressionsveränderungen auf anderen regulatorischen Mechanismen als der Promotormethylierung zu beruhen. Äquivalent zur Regulation von *ABCG2* in der Imatinib-Resistenz kommen auch hier insbesondere die miR-212 und miR-328 in Betracht.

#### **4.4.3 Expression und Methylierung von *ZFP36L2* in der Imatinib-/ Nilotinib-Resistenz**

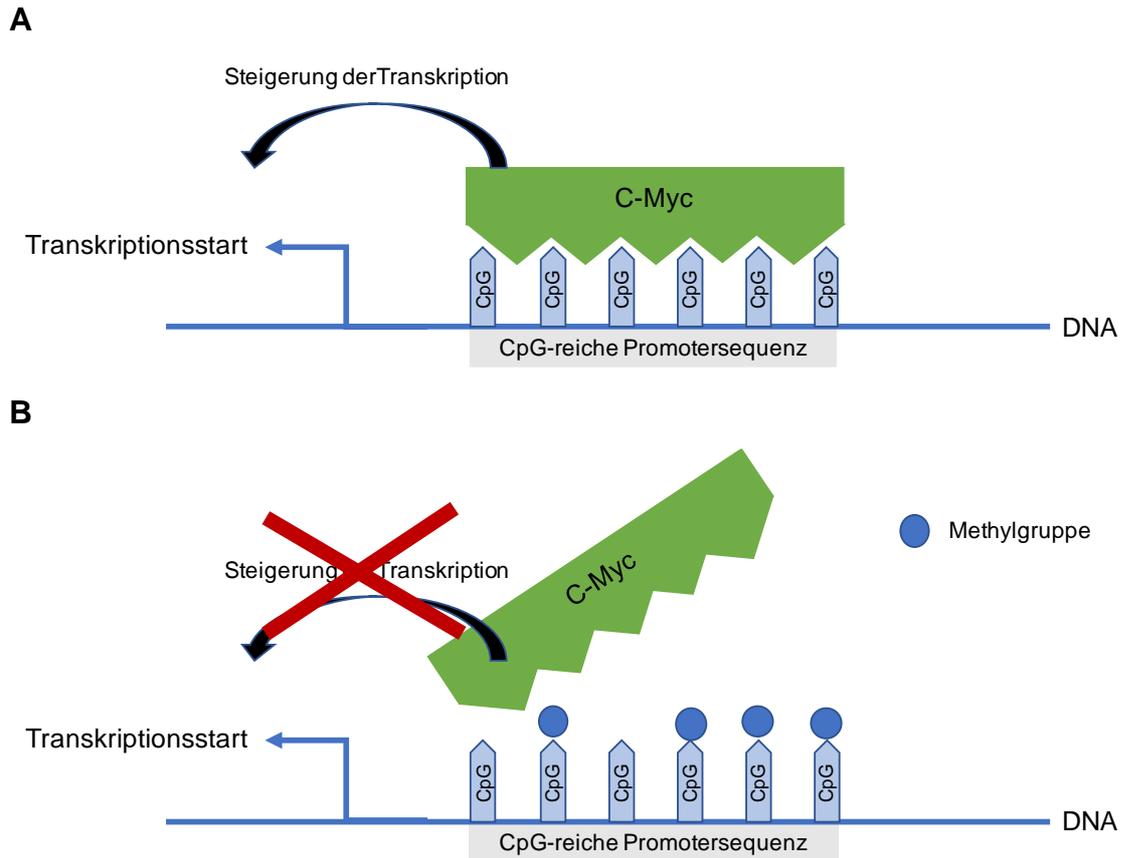
*ZFP36L2* zählt zu der Gruppe der RNA-binding proteins (RBP), welche den Abbau von mRNA, sowie eine Hemmung derer Translation bewirken kann. Einige dieser mit *ZFP36L2* assoziierten mRNAs kodieren für anti-apoptotische Proteine (Khabar 2017; Baou et al. 2011). Daher wird *ZFP36L2* die Rolle eines Tumorsuppressorgens zugesprochen (Hodson et al. 2010; Iwanaga et al. 2011). Außerdem konnte gezeigt werden, dass *ZFP36L2* die Zellproliferation inhibieren kann (Suk et al. 2018), wodurch sich Tumorzellen der Wirkung von Chemotherapeutika entziehen können (Alarcón &

Jensen 2011). *ZFP36L2* kann damit also auch zur Entstehung von Medikamentenresistenzen beitragen.

In dem hier verwendeten K-562-Zellmodell war in den nativen Zellen nur eine niedrige *ZFP36L2*-Expression zu verzeichnen. Interessanterweise ließ sich in Zellen, welche einer geringen bis mittleren Konzentration (0,1; 0,3; 0,5  $\mu\text{M}$ ) Imatinib ausgesetzt waren, eine Überexpression von *ZFP36L2* auf mRNA-Ebene feststellen. Bei einer Imatinib-Konzentration von 2  $\mu\text{M}$  war die *ZFP36L2*-Expression vermindert. Während in Resistenz 2 keine signifikanten Unterschiede in der Proteinexpression gesehen werden konnten, war die Proteinexpression in Resistenz 1 ebenfalls bei geringen Konzentrationen Imatinib (0,1  $\mu\text{M}$ ) erhöht. *ZFP36L2* könnte also, ähnlich wie ABCG2, insbesondere bei geringen Konzentrationen des TKI zur Resistenzentstehung beizutragen.

Die Methylierungsanalyse von *ZFP36L2* zeigt einen sehr deutlichen Anstieg der Methylierung bei hohen Imatinib-Konzentration (0,5 und 2  $\mu\text{M}$ ). Mittels der ENCODE Datenbank des UCSC Genom Browsers ließ sich in der analysierten Promotorregion unter anderem die Bindungsstelle von C-Myc lokalisieren.

C-Myc ist ein Protoonkogen, welches für einen aktivierenden Transkriptionsfaktor kodiert. Zahlreiche Gene unterliegen nach aktuellem Forschungsstand einer Regulierung durch C-Myc. Eine Aktivierung des Protoonkogens kann in verschiedenen Tumorentitäten gefunden werden (Amati et al. 2001). Außerdem ist bekannt, dass die Bindung von C-Myc als Transkriptionsfaktor von epigenetischen Faktoren, wie der DNA-Methylierung abhängig ist (Chen et al. 2007). Bei einer Zunahme der Methylierung in den Zellen, welche mit hohen Imatinib-Konzentrationen behandelt wurden (0,5; 2  $\mu\text{M}$ ), kann eine geringere Affinität von C-Myc an seine Bindungsstelle angenommen und eine daraus resultierende Abnahme der *ZFP36L2*-Expression erklärt werden (Abb. 22).



**Abbildung 20: Potenziell verminderte Affinität von C-Myc an seine Bindungsregion in der Promotorsequenz durch Hypermethylierung.** (A) C-Myc bindet in der Promotorregion eines Gens und bewirkt die Aktivierung der Transkription. (B) Bei Hypermethylierung der Bindungssequenz von C-Myc wird dessen Bindung erschwert. Dadurch entfällt der aktivierende Einfluss auf die Gentranskription und es kommt zu einer verminderten Genexpression.

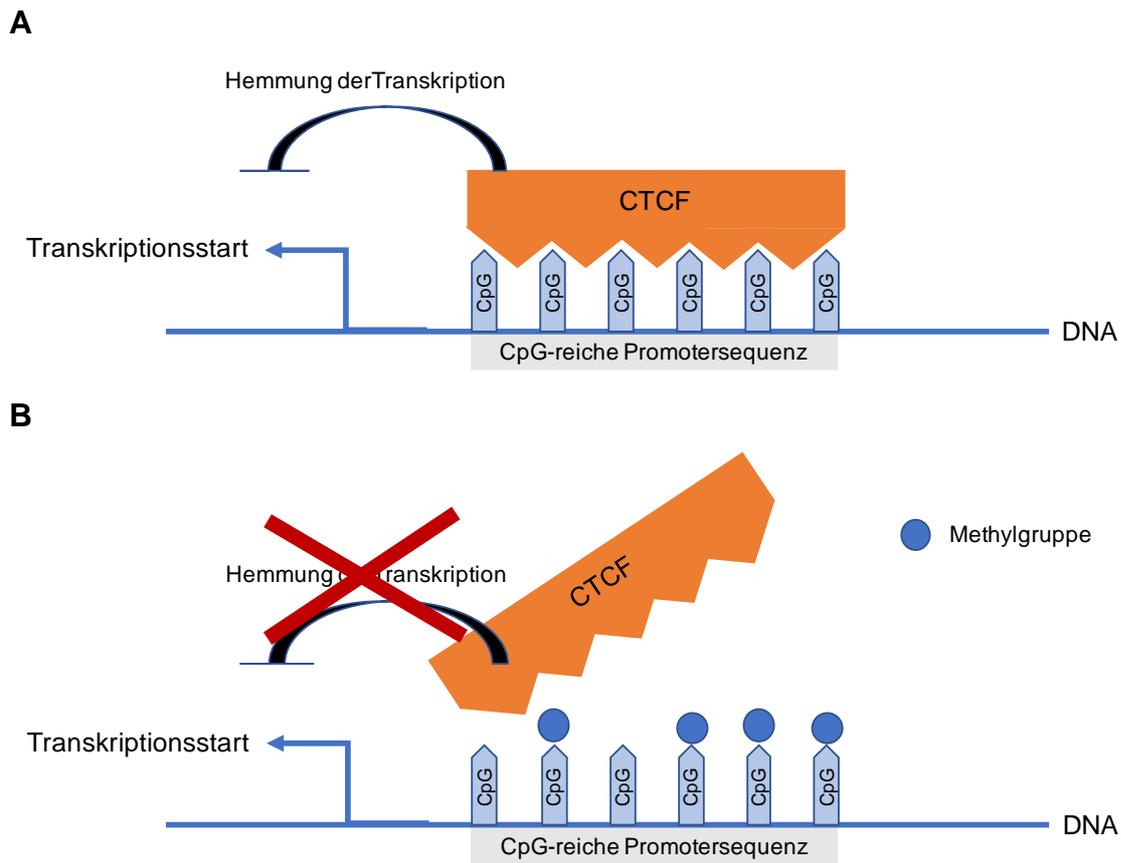
In der Nilotinib-Resistenz ist eine leicht verminderte *ZFP36L2* mRNA-Expression in den Nilotinib-resistenten gegenüber den nativen Zellen nachweisbar (insbesondere in Resistenz 2). Die Proteinexpression weist in beiden biologischen Replikaten keine Unterschiede zwischen den nativen und 100 nM Nilotinib-resistenten Zellen auf. Dementsprechend scheint *ZFP36L2* in der Nilotinib-Resistenz einen eher nur geringen Beitrag zur Resistenzentstehung zu leisten.

Ähnlich wie in der Imatinib-Resistenz ist auch in der Nilotinib-Resistenz eine Hypermethylierung der resistenten Zellen mit einer Expressionsabnahme assoziiert. Auch hier könnte eine verminderte Affinität von C-Myc an die hypermethylierte DNA-Sequenz als Erklärung für die verminderte *ZFP36L2*-Expression in den Nilotinib-resistenten Zellen dienen.

#### 4.4.4 Expression und Methylierung der *miR-212* in der Imatinib-/Nilotinib-Resistenz

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die *miR-212* an die 3'-UTR von *ABCG2* bindet und die Expression des Effluxtransporters vermindern kann (Turrini et al. 2012; Kaehler et al. 2017). Diese inverse Korrelation findet sich in den hier erhobenen Daten wieder. Während in den Proben mit geringer Imatinib-Konzentration (0,1; 0,3  $\mu\text{M}$ ) eine verminderte *miR-212*-Expression mit einer gesteigerten *ABCG2*-Expression einherging, so ließ sich in den Zellen, welche gegen hohe Konzentrationen Imatinib (2  $\mu\text{M}$ ) resistent gezüchtet wurden, ein erneuter Anstieg der *miR-212*-Expression, verbunden mit einer deutlichen *ABCG2*-Expressionsabnahme beobachten.

Die *miR-212* zeigte in der Methylierungsanalyse eine deutliche Hypermethylierung in den Zellen, welche mit hohen Imatinib-Konzentrationen (0,5 und 2  $\mu\text{M}$ ) behandelt wurden. Mittels der ENCODE Datenbank des UCSC Genom Browsers ließ sich in der analysierten Promotorregion der *miR-212* eine Bindungsstelle des CCCTC-Bindungsfaktor (CTCF) lokalisieren. CTCF ist ein multifunktionelles Protein, welches eine Masterrolle in der Kontrolle der Genexpression einnimmt. Als Transkriptionsfaktor kann es als Repressor für verschiedene Gene fungieren (Kim et al. 2015). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine gesteigerte Methylierung die DNA-Bindungsaffinität von CTCF schwächen kann (Renda et al. 2007). Die veränderte Methylierung der 13 CpGs in der Promotorregion könnte hier potenziell Einfluss auf die Bindung von CTCF an die Promotorregion nehmen. Durch die verminderte Affinität des Repressors an die Promotorsequenz der *miR-212* könnte der Anstieg der *miR-212*-Expression bei hohen Imatinib-Konzentrationen erklärt werden (Abb. 23).



**Abbildung 21: Potenziell verminderte Affinität von CTCF an seine Bindungsstelle in der Promotorregion durch Hypermethylierung.** (A) CTCF bindet in der Promotorregion eines Gens und bewirkt die Aktivierung der Transkription. (B) Bei Hypermethylierung der Bindungssequenz von CTCF wird die Bindung desselben erschwert. Dadurch entfällt die Hemmung auf die Gentranskription und es kommt zu einer gesteigerten Genexpression.

Sicherlich sind bei der Regulation der Expression der *miR-212* neben der DNA-Methylierung weitere Signalwege von Bedeutung. Beispielsweise kann auch eine Aktivierung von ERK 1/2 (*extracellular-signal related kinases*) zu einer gesteigerten Produktion der *miR-212* führen (Remenyi et al. 2010). Interessanter Weise konnten Nambu *et al.* in Imatinib-resistenten K-562 Zellen eine Aktivierung von ERK 1/2 feststellen (Nambu et al. 2009). ERK 1 und ERK 2 sind Protein-Serin/Threonin-Kinasen, die in der Ras-Raf-MEK-ERK Signalkaskade mitwirken. Diese Kaskade ist von Bedeutung für die Regulation einer Vielzahl von Prozessen in der Zelle, wie unter anderem für den Zellzyklus, Apoptose, Zellproliferation und Transkription (Roskoski 2012).

Auch in der Nilotinib-Resistenz war eine differentielle Expression der *miR-212* nachweisbar. In den Nilotinib-resistenten Zellen der Resistenz 1 war die *miR-212*

geringer exprimiert als in den unbehandelten Zellen. In Resistenz 2 war diese Expressionsabnahme ebenfalls deutlich zu erkennen, allerdings war die Veränderung in Bezug auf die Expression in den nativen Zellen aufgrund hoher Standardabweichungen nicht signifikant. Vergleicht man die Expressionsdaten der *miR-212* mit denen von *ABCG2*, so fällt auf, dass die Expression auch in den Nilotinib-resistenten Zellen negativ miteinander korreliert. Während die *miR-212* in den 100 nM Nilotinib-resistenten Zellen vermindert exprimiert wird, so ist die Expression des ABC-Transporters gesteigert. Die direkte Bindung der *miR-212* an die 3'UTR von *ABCG2* konnte bereits nachgewiesen werden (Turrini et al. 2012) und erklärt diese inverse Korrelation von der *miR-212* und *ABCG2* in der Nilotinib-Resistenz.

Die Expressionsabnahme der *miR-212* in den Nilotinib-resistenten Zellen ging mit einer Hypermethylierung in Resistenz 1 einher. In Resistenz 2 zeigte sich keine differentielle Methylierung in den nativen und resistenten Zellen bei einer *miR-212*-Expressionsabnahme. Diese Unstetigkeit zwischen den biologischen Replikaten macht eine Regulierung der *miR-212*-Expression in der Nilotinib-Resistenz unwahrscheinlich. Möglicherweise nehmen hier andere epigenetische Faktoren Einfluss auf die Expression der *miR-212*. Beispielsweise gibt es Hinweise auf eine größere Bedeutsamkeit von Histon-Modifikationen in der Nilotinib-Therapie. So konnten Shaker et al. feststellen, dass die Nilotinib-induzierte Apoptose von hepatischen Sternzellen durch Inhibition der Histon Deacetylasen vermittelt wird (Shaker et al. 2013). Desweiteren konnte eine verbesserte Wirkung von Nilotinib in K-562 Zellen beobachtet werden, wenn der TKI in Kombination mit einem Histon Deacetylase Inhibitor verwendet wurde (Fiskus et al. 2006).

#### **4.5 Ausblick**

In dieser Arbeit wurde die mRNA- und Protein-Expression von *ABCB1*, *ABCG2*, *ZFP36L2* und der *miR-212* in der TKI-Resistenz gemessen, um die Rolle der vier Kandidatengene in der Imatinib- und Nilotinib-Resistenz zu evaluieren. Darüber hinaus wurde die Methylierung in der Promotorregion der Gene analysiert. Die Ergebnisse der Expressions und Methylierungs-Analysen wurden gegenübergestellt, um potenziell regulatorische Einflüsse zwischen den beiden Faktoren zu erkennen. Um die Kausalität von Zusammenhängen der Genexpression und Promotormethylierung zu beweisen, sind jedoch weiterführende Analysen notwendig.

Um eine Kausalität zwischen Promotormethylierung und Genexpression für die analysierten Gene zu prüfen, wäre eine erneute Expressionsanalyse in komplett unmethylierten K-562 Zellen sinnvoll. Durch die Behandlung der Zellen mit 5-Azacytidine könnte eine Demethylierung der DNA erreicht werden (Stresemann & Lyko 2008). Ein Vergleich der mRNA- und Proteinexpressionsanalyse in unbehandelten K-562 Zellen mit den unmethylierten Zellen könnte neue Erkenntnisse zur potenziell epigenetischen Regulation der Kandidatengene bringen.

In einer weiteren Studie sollten die in der vorliegenden Arbeit postulierten Regulationsmechanismen für die *miR-212* und *ZFP36L2* überprüft werden. Zu diesem Zweck könnte man die Bindung der beschriebenen Transkriptionsfaktoren C-Myc bzw. CTCF mittels Chromatin-Immunpräzipitationsanalyse (ChIP) überprüfen. Auch hier wäre es von Interesse, die Analysen an unbehandelten, und mit 5-Azacytidine vorbehandelten Zellen durchzuführen, um den Einfluss der DNA-Methylierung auf die Bindungsaffinität der Transkriptionsfaktoren zu bestätigen.

Sämtliche in dieser Arbeit durchgeführte Analysen wurden am *in vitro*-TKI- Resistenzmodell mit der CML-Zelllinie K-562 durchgeführt. Zwischen den zwei biologischen Replikaten wurden signifikante Unterschiede in der Methylierung und Expression, insbesondere in der Nilotinib-Resistenz festgestellt. Eine Erhöhung der Anzahl biologischer Replikate könnte mehr Klarheit darüber schaffen, wie variabel die Zusammenhänge von Methylierung und Genexpression in Bezug auf dasselbe Gen tatsächlich sind.

Um die Bedeutung der, in dieser Arbeit am *in vitro*-Resistenzmodell gewonnenen Erkenntnisse zu evaluieren, wäre außerdem eine Wiederholung der durchgeführten Expressions- und Methylierungsanalysen mit Primärmaterial von CML-Patienten sinnvoll.

## 5 Zusammenfassung

Mit Einführung der Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) hat sich die Prognose der chronisch myeloischen Leukämie (CML) um ein Vielfaches verbessert. Dennoch führen BCR/ABL-abhängige und –unabhängige Resistenzen gegen diese zielgerichtete onkologische Therapie immer wieder zu vermindertem Ansprechen, bis hin zum Therapieversagen.

Ziel dieser Arbeit war es, die Regulation der Effluxtransporter ABCB1 und ABCG2, des RNA-bindenden Proteins ZFP36L2 und der microRNA-212, welche potenziell zur TKI-Resistenzentstehung beitragen können, in der Imatinib- und Nilotinib-Resistenz nachzuvollziehen und insbesondere die DNA-Methylierung als wichtigen epigenetischen Einfluss zu untersuchen. Dazu wurden Expressions- und Methylierungsanalysen an einem *in vitro*-Resistenzmodell der CML-Zelllinie K-562 mit je drei technischen und zwei biologischen Replikaten durchgeführt.

Die Analysen zur Imatinib-Resistenz zeigten eine differentielle Expression von *ABCG2*, *ZFP36L2* und der *miR-212* und lassen eine Beteiligung dieser Gene an der Resistenzentwicklung vermuten. Dabei weisen *ABCG2* und *ZFP36L2* insbesondere bei geringen bis mittleren Imatinib-Konzentrationen eine höhere Expression auf. Dies könnte darauf schließen lassen, dass diese beiden Gene bei Konzentrationen < 2 µM zur Resistenzentstehung beitragen und bei höheren Konzentrationen andere Resistenzfaktoren zum Tragen kommen. Die Expression der *miR-212* zeigte eine inverse Korrelation mit der Expression von *ABCG2*. Da *ABCG2* ein bestätigtes Zielgen der miR-212 ist, unterstreichen diese Ergebnisse den regulatorischen Einfluss der miR-212 auf den Effluxtransporter.

In der Nilotinib-Resistenz lässt sich ein deutlicher Expressionsanstieg von *ABCG2* feststellen, der mit einer verminderten Expression der *miR-212* einherging. *ZFP36L2* war in den Nilotinib-resistenten Zellen leicht vermindert und scheint hier wenn, dann nur von untergeordneter Bedeutung für die Nilotinib-Resistenzentstehung zu sein. *ABCB1* zeigte sowohl in den nativen, als auch in den Imatinib- und Nilotinib-resistenten Zellen eine nur marginale Expression und scheint bei den hier verwendeten Medikamentenkonzentrationen weder zur Imatinib- noch zur Nilotinib-Resistenzentwicklung beizutragen.

Während die Expression der Kandidatengene in der Imatinib-Resistenz in den biologischen Replikaten sehr ähnlich ausfiel, so unterschied sich insbesondere die Expression von *ABCG2* in der Nilotinib-Resistenz deutlich zwischen erster und zweiter Resistenzzüchtung. Es ist zu erwägen, dass unter anderem die RAS-Mutation, welche in Resistenz 2 nachgewiesen werden konnte, eine Hochregulierung des Effluxtransporters hier überflüssig macht.

Die Methylierungsanalyse in der Imatinib-Resistenz zeigte Ähnlichkeiten zwischen den Promotorregionen von drei der vier Gene. Die untersuchten DNA-Abschnitte zu *ABCG2*, *ZFP36L2* und der *miR-212* wiesen allesamt eine vermehrte Methylierung auf, in den Zellen, welche gegen höhere Konzentrationen Imatinib ( $\geq 0,5 \mu\text{M}$ ) resistent waren.

In der Nilotinib-Resistenz waren die Promotorregionen von *ABCG2*, *ZFP36L2* und der *miR-212* in den resistenten Zellen teils hyper- und teils hypomethyliert. Es ließ sich, anders als in der Imatinib-Resistenz, kein einheitliches Muster feststellen. Für *ABCB1* ließen sich keine Unterschiede zwischen nativen und Imatinib-/ Nilotinib-resistenten Zellen nachweisen.

Versucht man einen Zusammenhang zwischen der Expression der einzelnen Gene und der Methylierung der zugehörigen Promotorregion zu finden, so lässt sich keine grundsätzliche Regel finden, die die Korrelation der beiden Parameter für alle hier untersuchten Gene erklären könnte. Die grundsätzliche Annahme, dass eine Promotor-Hypermethylierung zu einer verminderten Genexpression führt, lässt sich auf die hier erhobenen Daten nicht anwenden. Vielmehr scheint es so, als ob weitere Faktoren, wie unter anderem die Bindung von Transkriptionsfaktoren in den betroffenen CpG-reichen Regionen von größerer Bedeutung für den Effekt auf die Transkription der Gene sein könnte. Zudem kann der Einfluss der DNA-Methylierung selbstverständlich nicht isoliert betrachtet werden, da er auch durch andere Signalkaskaden und epigenetische Faktoren, wie beispielsweise Histon-Modifikationen, überlagert oder aufgehoben werden könnte.

Die Ergebnisse dieser Arbeit tragen zu einem besseren Verständnis der Mechanismen der TKI-Resistenz in der Therapie der CML bei. Für die Gene *ABCG2*, *ZFP36L2* und die *miR-212* konnte insbesondere in der Imatinib-Resistenz ein potenzieller Zusammenhang zwischen Methylierung und Genexpression gezeigt werden. Sollte es

in Folgestudien gelingen, eine Kausalität dieser Zusammenhänge zu bestätigen, so könnten auf Grundlage dieser Analysen neue Ansätze entwickelt werden um der TKI-Resistenz in der CML entgegen zu wirken.

## 6 Literaturverzeichnis

- Alarcón, T. & Jensen, H.J., 2011. Quiescence: a mechanism for escaping the effects of drug on cell populations. *Journal of the Royal Society, Interface*, 8(54), pp.99–106.
- Amati, B. et al., 2001. Function of the c-Myc oncoprotein in chromatin remodeling and transcription. *Biochimica et biophysica acta*, 1471(3), pp.M135–45.
- Ambros, V. & Horvitz, H.R., 1984. Heterochronic mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science (New York, N.Y.)*, 226(4673), pp.409–416.
- Ambros, V. & Horvitz, H.R., 1987. The *lin-14* locus of *Caenorhabditis elegans* controls the time of expression of specific postembryonic developmental events. *Genes & development*, 1(4), pp.398–414.
- Baccarani, M. et al., 2013. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood*, 122(6), pp.872–884.
- Baou, M., Norton, J.D. & Murphy, J.J., 2011. AU-rich RNA binding proteins in hematopoiesis and leukemogenesis. *Blood*, 118(22), pp.5732–5740.
- Biggs, J.C. et al., 1992. Treatment of chronic myeloid leukemia with allogeneic bone marrow transplantation after preparation with BuCy2. *Blood*, 80(5), pp.1352–1357.
- Bird, A., 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & development*, 16(1), pp.6–21.
- Bixby, D. & Talpaz, M., 2010. Seeking the causes and solutions to imatinib-resistance in chronic myeloid leukemia. *Leukemia*, 25(1), pp.7–22.
- BLUEPRINT consortium, 2016. Quantitative comparison of DNA methylation assays for biomarker development and clinical applications. *Nature biotechnology*, 34(7), pp.726–737.
- Brendel, C. et al., 2007. Imatinib mesylate and nilotinib (AMN107) exhibit high-affinity interaction with ABCG2 on primitive hematopoietic stem cells. *Leukemia*, 21(6), pp.1267–1275.
- Brooks, S.A. & Blackshear, P.J., 2013. Tristetraprolin (TTP): interactions with mRNA and proteins, and current thoughts on mechanisms of action. *Biochimica et biophysica acta*, 1829(6-7), pp.666–679.
- Buchdunger, E. et al., 1996. Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer Research*, 56(1), pp.100–104.
- Burger, H. et al., 2004. Imatinib mesylate (STI571) is a substrate for the breast cancer resistance protein (BCRP)/ABCG2 drug pump. *Blood*, 104(9), pp.2940–2942.

- Cascorbi, I., 2006. Role of pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters in the pharmacokinetics of drugs. *Pharmacology & therapeutics*, 112(2), pp.457–473.
- Chalfie, M., Horvitz, H.R. & Sulston, J.E., 1981. Mutations that lead to reiterations in the cell lineages of *C. elegans*. *Cell*, 24(1), pp.59–69.
- Chen, Y. et al., 2007. Integration of genome and chromatin structure with gene expression profiles to predict c-MYC recognition site binding and function. *PLoS computational biology*, 3(4), p.e63.
- Cilloni, D. & Saglio, G., 2012. Molecular Pathways: BCR-ABL. *Clinical Cancer Research*, 18(4), pp.930–937.
- Crary-Dooley, F.K. et al., 2017. A comparison of existing global DNA methylation assays to low-coverage whole-genome bisulfite sequencing for epidemiological studies. *Epigenetics*, 12(3), pp.206–214.
- Csoka, A.B. & Szyf, M., 2009. Epigenetic side-effects of common pharmaceuticals: A potential new field in medicine and pharmacology. *Medical Hypotheses*, 73(5), pp.770–780.
- Dean, M., Rzhetsky, A. & Allikmets, R., 2001. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome research*, 11(7), pp.1156–1166.
- Deininger, M.W., Goldman, J.M. & Melo, J.V., 2000. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*, 96(10), pp.3343–3356.
- Druker, B.J. et al., 2001. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *The New England journal of medicine*, 344(14), pp.1031–1037.
- Eadie, L.N. et al., 2017. The clinical significance of ABCB1 overexpression in predicting outcome of CML patients undergoing first-line imatinib treatment. *Leukemia*, 31(1), pp.75–82.
- Eadie, L.N., Hughes, T.P. & White, D.L., 2016. ABCB1 Overexpression Is a Key Initiator of Resistance to Tyrosine Kinase Inhibitors in CML Cell Lines C. J. Eaves, ed. *PLoS ONE*, 11(8), pp.e0161470–18.
- Egger, G. et al., 2004. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*, 429(6990), pp.457–463.
- Eiring, A.M. & Deininger, M.W., 2014. Individualizing kinase-targeted cancer therapy: the paradigm of chronic myeloid leukemia. *Genome biology*, 15(9), pp.461–11.
- England, R. & Pettersson, M., 2005. Pyro Q-CpG™: quantitative analysis of methylation in multiple CpG sites by Pyrosequencing®. *Nature Methods*.
- Esteller, M., 2008. Epigenetics in cancer. *The New England journal of medicine*, 358(11), pp.1148–1159.

- Feinberg, A.P. & Vogelstein, B., 1983. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*, 301(5895), pp.89–92.
- Ferguson, R.E. et al., 2005. Housekeeping proteins: a preliminary study illustrating some limitations as useful references in protein expression studies. *Proteomics*, 5(2), pp.566–571.
- Fiskus, W. et al., 2006. Combined effects of novel tyrosine kinase inhibitor AMN107 and histone deacetylase inhibitor LBH589 against Bcr-Abl-expressing human leukemia cells. *Blood*, 108(2), pp.645–652.
- Fraga, M.F. et al., 2005. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(30), pp.10604–10609.
- Frazer, R., Irvine, A.E. & McMullin, M.F., 2007. Chronic Myeloid Leukaemia in The 21st Century. *The Ulster medical journal*, 76(1), pp.8–17.
- Galloway, A. et al., 2016. RNA-binding proteins ZFP36L1 and ZFP36L2 promote cell quiescence. *Science (New York, N.Y.)*, 352(6284), pp.453–459.
- Gambacorti-Passerini, C.E.A., 1997. Inhibition of the ABL Kinase Activity Blocks the Proliferation of BCR/ABL+ Leukemic Cells and Induces Apoptosis. pp.1–15.
- Geary, C.G., 2000. The story of chronic myeloid leukaemia. *British journal of haematology*, 110(1), pp.2–11.
- Genovese, I. et al., 2017. Not only P-glycoprotein: Amplification of the ABCB1-containing chromosome region 7q21 confers multidrug resistance upon cancer cells by coordinated overexpression of an assortment of resistance-related proteins. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, 32, pp.23–46.
- Gibney, E.R. & Nolan, C.M., 2010. Epigenetics and gene expression. *Heredity*, 105(1), pp.4–13.
- Goelz, S.E. et al., 1985. Hypomethylation of DNA from benign and malignant human colon neoplasms. *Science (New York, N.Y.)*, 228(4696), pp.187–190.
- Groffen, J. et al., 1984. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell*, 36(1), pp.93–99.
- Gromicho, M. et al., 2011. Development of imatinib and dasatinib resistance: dynamics of expression of drug transporters ABCB1, ABCC1, ABCG2, MVP, and SLC22A1. *Leukemia & lymphoma*, 52(10), pp.1980–1990.
- Guilhot, J. et al., 2012. Definitions, methodological and statistical issues for phase 3 clinical trials in chronic myeloid leukemia: a proposal by the European LeukemiaNet. In *Blood*. pp. 5963–5971.
- Hamad, A. et al., 2013. Emerging therapeutic strategies for targeting chronic myeloid leukemia stem cells. *Stem cells international*, 2013, p.724360.

- Hamada, A. et al., 2003. Interaction of imatinib mesilate with human P-glycoprotein. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 307(2), pp.824–828.
- He, L. & Hannon, G.J., 2004. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature reviews. Genetics*, 5(7), pp.522–531.
- Heerboth, S. et al., 2014. Use of epigenetic drugs in disease: an overview. *Genetics & epigenetics*, 6, pp.9–19.
- Hegedus, T. et al., 2002. Interaction of tyrosine kinase inhibitors with the human multidrug transporter proteins, MDR1 and MRP1. *Biochimica et biophysica acta*, 1587(2-3), pp.318–325.
- Hehlmann, R., Hochhaus, A. & Baccarani, M., 2007. Chronic myeloid leukaemia. *The Lancet*, 370(9584), pp.342–350.
- Heyssel, R. et al., 1960. Leukemia in Hiroshima atomic bomb survivors. *Blood*, 15, pp.313–331.
- Higgins, C.F., 1992. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annual review of cell biology*, 8(1), pp.67–113.
- Hobbs, G.A., Der, C.J. & Rossman, K.L., 2016. RAS isoforms and mutations in cancer at a glance. *Journal of cell science*, 129(7), pp.1287–1292.
- Hochhaus, A. et al., 2017. Long-Term Outcomes of Imatinib Treatment for Chronic Myeloid Leukemia. *The New England journal of medicine*, 376(10), pp.917–927.
- Hodson, D.J. et al., 2010. Deletion of the RNA-binding proteins ZFP36L1 and ZFP36L2 leads to perturbed thymic development and T lymphoblastic leukemia. *Nature Immunology*, 11(8), pp.717–724.
- Holliday, R. & Pugh, J.E., 1975. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science (New York, N. Y.)*, 187(4173), pp.226–232.
- Houghton, P.J. et al., 2004. Imatinib mesylate is a potent inhibitor of the ABCG2 (BCRP) transporter and reverses resistance to topotecan and SN-38 in vitro. *Cancer Research*, 64(7), pp.2333–2337.
- Höglund, M., Sandin, F. & Simonsson, B., 2015. Epidemiology of chronic myeloid leukaemia: an update. *Annals of hematology*, 94 Suppl 2, pp.S241–7.
- Iwanaga, E. et al., 2011. Mutation in the RNA binding protein TIS11D/ZFP36L2 is associated with the pathogenesis of acute leukemia. *International journal of oncology*, 38(1), pp.25–31.
- Jabbour, E. & Kantarjian, H., 2016. Chronic myeloid leukemia: 2016 update on diagnosis, therapy, and monitoring. *American Journal of Hematology*, 91(2), pp.252–265.
- Jones, P.A., 2012. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies

- and beyond. *Nature reviews. Genetics*, 13(7), pp.484–492.
- Jones, P.A. & Baylin, S.B., 2002. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature reviews. Genetics*, 3(6), pp.415–428.
- Jordanides, N.E., 2006. Functional ABCG2 is overexpressed on primary CML CD34+ cells and is inhibited by imatinib mesylate. *Blood*, 108(4), pp.1370–1373.
- Kaehler, M. et al., 2017. MicroRNA-212/ABCG2-axis contributes to development of imatinib-resistance in leukemic cells. *Oncotarget*, 8(54), pp.92018–92031.
- Kantarjian, H.M. et al., 1987. Chronic myelogenous leukemia in blast crisis. Analysis of 242 patients. *The American journal of medicine*, 83(3), pp.445–454.
- Kantarjian, H.M. et al., 1993. Chronic myelogenous leukemia: a concise update. *Blood*, 82(3), pp.691–703.
- Kantarjian, H.M. et al., 2003. Complete cytogenetic and molecular responses to interferon-alpha-based therapy for chronic myelogenous leukemia are associated with excellent long-term prognosis. *Cancer*, 97(4), pp.1033–1041.
- Katayama, K., Noguchi, K. & Sugimoto, Y., 2014. Regulations of P-Glycoprotein/ABCB1/MDR1 in Human Cancer Cells. *New Journal of Science*, 2014(2), pp.1–10.
- Khabar, K.S.A., 2017. Hallmarks of cancer and AU-rich elements. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, 8(1).
- Kim, S., Yu, N.-K. & Kaang, B.-K., 2015. CTCF as a multifunctional protein in genome regulation and gene expression. *Experimental & molecular medicine*, 47(6), pp.e166–e166.
- Lai, E.C., 2003. microRNAs: runts of the genome assert themselves. *Current biology : CB*, 13(23), pp.R925–36.
- Larsen, F. et al., 1992. CpG islands as gene markers in the human genome. *Genomics*, 13(4), pp.1095–1107.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L. & Ambros, V., 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5), pp.843–854.
- Leonard, 2003. The Role of ABC Transporters in Clinical Practice. pp.1–14.
- Levêque, D. & Maloisel, F., 2005. Clinical pharmacokinetics of imatinib mesylate. *In vivo (Athens, Greece)*, 19(1), pp.77–84.
- Li, D. et al., 2015. MicroRNA-212 functions as an epigenetic-silenced tumor suppressor involving in tumor metastasis and invasion of gastric cancer through down-regulating PDX1 expression. *American journal of cancer research*, 5(10), pp.2980–2997.

- Li, H. & Yang, B.B., 2013. Friend or foe: the role of microRNA in chemotherapy resistance. *Nature Publishing Group*, 34(7), pp.870–879.
- Li, Y. et al., 2012. MicroRNA-212 displays tumor-promoting properties in non-small cell lung cancer cells and targets the hedgehog pathway receptor PTCH1. *Molecular biology of the cell*, 23(8), pp.1423–1434.
- Liu, F. et al., 2016. Beyond transcription factors: how oncogenic signalling reshapes the epigenetic landscape. *Nature reviews. Cancer*, 16(6), pp.359–372.
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), pp.402–408.
- Lozzio, C.B. & Lozzio, B.B., 1975. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood*, 45(3), pp.321–334.
- Ma, C. et al., 2014. miR-212 promotes pancreatic cancer cell growth and invasion by targeting the hedgehog signaling pathway receptor patched-1. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, 33(1), p.54.
- Medvedeva, Y.A. et al., 2014. Effects of cytosine methylation on transcription factor binding sites. *BMC genomics*, 15(1), pp.1–12.
- Melo, J.V. & Barnes, D.J., 2007. Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer. *Nature reviews. Cancer*, 7(6), pp.441–453.
- Meng, X. et al., 2013. Genetic and epigenetic down-regulation of microRNA-212 promotes colorectal tumor metastasis via dysregulation of MnSOD. *Gastroenterology*, 145(2), pp.426–36.e1–6.
- Nakayama, M. et al., 1998. Hypomethylation status of CpG sites at the promoter region and overexpression of the human MDR1 gene in acute myeloid leukemias. *Blood*, 92(11), pp.4296–4307.
- Nambu, T. et al., 2009. Contribution of BCR/ABL-independent activation of ERK1/2 to acquired imatinib resistance in K562 chronic myeloid leukemia cells. *Cancer Science*, 101(1), pp.137–142.
- Nowell, P.C. & Hungerford, D.A., 1960. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *Journal of the National Cancer Institute*, 25, pp.85–109.
- O'Brien, S.G. et al., 2003. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *The New England journal of medicine*, 348(11), pp.994–1004.
- Oberstadt, M.C. et al., 2013. Epigenetic modulation of the drug resistance genes MGMT, ABCB1 and ABCG2 in glioblastoma multiforme. *BMC cancer*, 13(1), p.617.
- Pan, Y.-Z., Morris, M.E. & Yu, A.-M., 2009. MicroRNA-328 negatively regulates the

- expression of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in human cancer cells. *Molecular Pharmacology*, 75(6), pp.1374–1379.
- Pavlu, J. et al., 2011. Three decades of transplantation for chronic myeloid leukemia: what have we learned? *Blood*, 117(3), pp.755–763.
- Peng, B., Lloyd, P. & Schran, H., 2005. Clinical pharmacokinetics of imatinib. *Clinical pharmacokinetics*, 44(9), pp.879–894.
- Picard, S. et al., 2007. Trough imatinib plasma levels are associated with both cytogenetic and molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia. *Blood*, 109(8), pp.3496–3499.
- Razin, A. & Riggs, A.D., 1980. DNA methylation and gene function. *Science (New York, N. Y.)*, 210(4470), pp.604–610.
- Razin, A. & Szyf, M., 1984. DNA methylation patterns. Formation and function. *Biochimica et biophysica acta*, 782(4), pp.331–342.
- Remenyi, J. et al., 2010. Regulation of the miR-212/132 locus by MSK1 and CREB in response to neurotrophins. *Biochemical Journal*, 428(2), pp.281–291.
- Renda, M. et al., 2007. Critical DNA binding interactions of the insulator protein CTCF: a small number of zinc fingers mediate strong binding, and a single finger-DNA interaction controls binding at imprinted loci. *Journal of Biological Chemistry*, 282(46), pp.33336–33345.
- Riggs, A.D., 1975. X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenetics and cell genetics*, 14(1), pp.9–25.
- Roskoski, R., Jr., 2012. ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation. *Pharmacological Research*, 66(2), pp.105–143.
- Rowley, J.D., 1973. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*, 243(5405), pp.290–293.
- Schindler, T. et al., 2000. Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science (New York, N. Y.)*, 289(5486), pp.1938–1942.
- Shaker, M.E. et al., 2013. Nilotinib induces apoptosis and autophagic cell death of activated hepatic stellate cells via inhibition of histone deacetylases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1833(8), pp.1992–2003.
- Shang, Y. et al., 2014. miR-508-5p regulates multidrug resistance of gastric cancer by targeting ABCB1 and ZNRD1. *Oncogene*, 33(25), pp.3267–3276.
- Shen, N. et al., 2017. Inactivation of Receptor Tyrosine Kinases Reverts Aberrant DNA Methylation in Acute Myeloid Leukemia. *Clinical Cancer Research*, 23(20), pp.6254–6266.
- Spitzwieser, M. et al., 2016. Promoter methylation patterns of ABCB1, ABCC1 and

- ABCG2 in human cancer cell lines, multidrug-resistant cell models and tumor, tumor-adjacent and tumor-distant tissues from breast cancer patients. *Oncotarget*, 7(45), pp.73347–73369.
- Stein, R., Razin, A. & Cedar, H., 1982. In vitro methylation of the hamster adenine phosphoribosyltransferase gene inhibits its expression in mouse L cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(11), pp.3418–3422.
- Stresemann, C. & Lyko, F., 2008. Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. *International Journal of Cancer*, 123(1), pp.8–13.
- Suk, F.-M. et al., 2018. ZFP36L1 and ZFP36L2 inhibit cell proliferation in a cyclin D-dependent and p53-independent manner. *Scientific reports*, 8(1), p.2742.
- Sun, S.M. et al., 2012. The prognostic relevance of miR-212 expression with survival in cytogenetically and molecularly heterogeneous AML. 27(1), pp.100–106.
- Supic, G., Jagodic, M. & Magic, Z., 2013. Epigenetics: a new link between nutrition and cancer. *Nutrition and cancer*, 65(6), pp.781–792.
- Thomas, J., 2004. Active transport of imatinib into and out of cells: implications for drug resistance. *Blood*, 104(12), pp.3739–3745.
- Trimarchi, M.P., Mouangsavanh, M. & Huang, T.H.-M., 2011. Cancer epigenetics: a perspective on the role of DNA methylation in acquired endocrine resistance. *Chinese journal of cancer*, 30(11), pp.749–756.
- Tsai, H.-C. & Baylin, S.B., 2011. Cancer epigenetics: linking basic biology to clinical medicine. *Nature Publishing Group*, 21(3), pp.502–517.
- Turner, J.G. et al., 2006. ABCG2 expression, function, and promoter methylation in human multiple myeloma. *Blood*, 108(12), pp.3881–3889.
- Turrini, E. et al., 2012. MicroRNA profiling in K-562 cells under imatinib treatment. *Pharmacogenetics and Genomics*, 22(3), pp.198–205.
- Unwin, R.D. et al., 2003. Proteomic changes in renal cancer and co-ordinate demonstration of both the glycolytic and mitochondrial aspects of the Warburg effect. *Proteomics*, 3(8), pp.1620–1632.
- Weisberg, E. et al., 2006. AMN107 (nilotinib): a novel and selective inhibitor of BCR-ABL. *British Journal of Cancer*, 94(12), pp.1765–1769.
- Wightman, B. et al., 1991. Negative regulatory sequences in the lin-14 3'-untranslated region are necessary to generate a temporal switch during *Caenorhabditis elegans* development. *Genes & development*, 5(10), pp.1813–1824.
- Woessner, D.W., Lim, C.S. & Deininger, M.W., 2011. Development of an effective therapy for chronic myelogenous leukemia. *Cancer journal (Sudbury, Mass.)*,

17(6), pp.477–486.

Xu, L. et al., 2010. Down-regulation of miR-212 expression by DNA hypermethylation in human gastric cancer cells. *Medical Oncology*, 28(S1), pp.189–196.

Xu, Y. et al., 2013. 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*, 8(11), p.e82062.

Xu, Y. et al., 2011. MicroRNA-122 sensitizes HCC cancer cells to adriamycin and vincristine through modulating expression of MDR and inducing cell cycle arrest. *Cancer letters*, 310(2), pp.160–169.

Yamakawa, Y. et al., 2014. Distinct interaction of nilotinib and imatinib with P-Glycoprotein in intracellular accumulation and cytotoxicity in CML Cell Line K562 cells. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 37(8), pp.1330–1335.

Zheng, T. et al., 2010. Role of microRNA in anticancer drug resistance. *International Journal of Cancer*, 126(1), pp.2–10.

## 7 Anhang

### 7.1 Medien und 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

#### **Probenpuffer (5x)**

50 mM TRIS  
35 % Glycerol  
10 % SDS  
10 %  $\beta$ -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  $\mu$ l Sammelgelpuffer  
300  $\mu$ l 40 % Acrylamid/Bisacrylamid  
36  $\mu$ l 10 % APS  
2,5  $\mu$ l TEMED

#### **Stripping Solution**

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

#### **Trenngel**

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

## 7.2 Sequenzen der Promotorregionen der Gene

### **ABCB1**

Chr7: 87229474 - 87230373; -Strang (GRCh37/hg19)

```
ACATTCCTCCTGGAAATTCAACCTGTTTCGCAGTTTCTCGAGGAATCAGCATTCAAGTCAATC
CGGGCCGGGAGCAGTCATCTGTGGTGAGGCTGATTGGCTGGGCAGGAACAGCGCCGGG
GCGTGGGCTGAGCACAGCCGCTTCGCTCTCTTTGCCACAGGAAGCCTGAGCTCATTGAG
TAGCGGCTCTTCCAAGCTCAAAGAAGCAGAGGCCGCTGTTTCGTTTCCTTTAGGTCTTTCCA
CTAAAGTCGGAGTATCTTCTTCCAAAATTTACAGTCTTGGTGGCCGTTCCAAGGAGCGCGA
GGTAGGGGCACGCAAAGCTGGGAGCTACTATGGGACAGTTCCCAAGTGTCAAGGCTTTCAG
ATTTCTGAACCTTGGTCTTCACGGGAGAAGGGCTTCTTGAGGCGTGGATAGTGTGAAGTC
CTCTGGCAAGTCCATGGGGACCAAGTGGGGTTAGATCTAGACTCAGGAGCTCCTGGAGCA
GCGCCCAAACCGTAGTGGCACTGGACCATGTTGCCCGGAGCGCGCACAGCCCAGCGCGGT
GCGGGGACCTGCTCTCTGAGCCCGCGGGCGGTGGGTGGGAGGAAGCATCGTCCGCGGC
GACTGGAACCGGGAGGGAGAATCGCACTGGCGGGCGGGCAAAGTCCAGAACGCGCTGCC
AGACCCCAACTCTGCCTTCGTGGAGATGCTGGAGACCCCGCGCACAGGAAAGCCCCTG
CAGTGCCCATCGCGGCCAGAGCAGCTGGGGCATCAACGGCGGGCGCTCCCTCTTACTGC
TCTCTGGCTTCGACGGGGGACTAGAGGTTAGTCTCACCTCCAGCGCGCCTGAGGCTCATG
CATTTGGCTAATGAGCTGCGGTTTCTCTTCAGGTTCGGAATGGATCTTGAAGGGGACCGCA
ATGGA
```

Konvertierte Sequenz:

```
ATATTTTTTTTTGGAAATTAATTTGTTTCGTAGTTTTTCGAGGAATTAGTATTTAGTTAATTCG
GGTCGGGAGTAGTTATTTGTGGTGAGGTTGATTGGTTGGGTAGGAATAGCGTCGGGGCGT
GGTTGAGTATAGTCGTTTCGTTTTTTTTGTTATAGGAAGTTTGAGTTTATTCGAGTAGCGG
TTTTTTAAGTTTAAAGAAGTAGAGGTCGTTGTTTCGTTTTTTTTAGGTTTTTTTATAAAGTCG
GAGTATTTTTTTTTAAAATTTTACGTTTTGGTGGTCGTTTTAAGGAGCGCGAGGTAGGGGTA
CGTAAAGTTGGGAGTTATTATGGGATAGTTTTAAGTGTTAGGTTTTTAGATTTTTTGAATTT
GGTTTTTACGGGAGAAGGGTTTTTTGAGGCGTGGATAGTGTGAAGTTTTTTGGTAAGTTTAT
GGGGATTAAGTGGGGTTAGATTTAGATTTAGGAGTTTTTTGGAGTAGCGTTTAAATCGTAGT
GGTATTGGATTATGTTGTTTCGGAGCGCGTATAGTTCGCGCGGTGCGGGGATTTGTTTTTTG
AGTTCGCGGGCGGTGGGTGGGAGGAAGTATCGTTCGCGGCGATTGGAATCGGGAGGGA
GAATCGTATTGGCGGCGGGTAAAGTTTAGAACGCGTTGTTAGATTTTTAATTTTGTTCGTT
GGAGATGTTGGAGATTTTCGCGTATAGGAAAGTTTTTGTAGTGTATCGCGGTTAGAGTAG
TTGGGGTATTAACGGCGGGCGTTTTTTTTTATTGTTTTTTGGTTTCGACGGGGGATTAGAG
GTTAGTTTTATTTTTAGCGCGTTTGGGTTTATGTATTTGGTTAATGAGTTGCGGTTTTTTTT
TAGGTCGGAATGGATTTTGAAGGGGATCGTAATGGA
```

## ABCG2

Chr4: 89152000 - 89153000; +Strang (GRCh37/hg19)

CAGCAAGATCTCCAGGTGATACATATGCAAGTTAGTGTATGAGAAGTACCAATTTAAGTGA  
CACATTTGTTAAAGCACATATCAAAAAAGAATCAAGATTTTCTACGAAGTATGAAGATTGGA  
AAAAACAAAAACAAACAACCTCACCTCAGTTATGATGTGTGACGCTGGAAGCAAAGCAGCCC  
AAATCTCAGTGCAGAGACAGTGGTAATACGAAGAAGATTTCTACACTTAGGAGTTTTCTTA  
GACAGACTTCAACCAGGACCCACGCCTACTAAACAGACGAGTATCAGTCCAGGAACCTTCC  
TTCCTGCCTGCTCTTGGGGCAGGAGAAAGAATGAGAGAGGAACTTGGCAGCCCCCAAAG  
TAGATCCTGCAGCTACCAGGGAACATTGAGGCTTCCGAGTAACTAGCCTCGAGGAAAT  
GTCCCGAGTGAATTAACAGCTCTCCTATCTCCTTGGGTTCTTTTTCTCCACTACTAGCT  
GATTATGAACCACATTTCTTCTCGATCACTGGGATTCAAACAAAAGACCTAATGGTTCCAG  
TCAGCGTGGGATCCTCTTCTGGCATTCTAGCAAGGGGCTAGAAGAAGGGGGAAAGTTAC  
ATGCTCAGAGAGATATTTTGTATCTTCTCTTTGTGCGCGGAATTCTGATGACAGCATCTC  
CAACACAAACAGCAACTTTATTTTCGAAATGGAAGGATAAAAAACCAATTCTAGCAAATGGCT  
TTGCTCTGTGCGTAAACTTCTGTGCTTTTTTAACCCTGATGTAAGTGGGCTCCTCTCA  
CAGGCCCTGCCTTCTAGCACACAAAAAACAACCAAGCAGGACTATGACATAATTTGAA  
AAGGAAGCGAATTAACCAAAAACAAAGAGTTAGGTTTCAATGCAAAGGCCACCAGAAATC  
TAAAGAGGACCGAGAAGCTGTATACTTGGAGCATGCTATACTTTTCATGTTATTCTTTCCTA  
AACCAAAAGTAAAATAGGAAG

### Konvertierte Sequenz:

TAGTAAGATTTTTAGGTGATATATATGTAAGTTAGTGTATGAGAAGTATTAATTTAAGTGATA  
TATTTGTTAAAGTATATATTAAAAAAGAATTAAGATTTTTTACGAAGTATGAAGATTGGAAAA  
AATAAAAATAAATAATTTATTTTAGTTATGATGTGTGACGTTGGAAGTAAAGTAGTTAAATT  
TTAGTGTAGAGATAGTGGTAATACGAAGAAGATTTTTATATTTAGGAGTTTTTTTTAGATAGAT  
TTTAATTAGGATTTACGTTTATTAATAGACGAGTATTAGTTTAGGAATTTTTTTTTTTGTTTG  
TTTTTGGGGTAGGAGAAAGAATGAGAGAGGAAATTTGGTAGTTTTTAAAGTAGATTTTGTAG  
TTATTAGGGAATATTGAGGTTTTTTCGAGTAAATTAGTTTCGAGGAAATGTTTCGAGTGAAT  
TAATAGTTTTTTATTTTTTTGGGTTTTTTTTTTTTTATTATTAGTTGATTATGAATTATTTTT  
TTTTTCGATTATTGGGATTTAATAAAAGATTTAATGGTTTTAGTTAGCGTGGGATTTTTTTTT  
GGTATTTTTAGTAAGGGGTTAGAAGAAGGGGAAAGTTATATGTTAGAGAGATATTTTGTAA  
TTTTTTTTTTGTGTCGCGGAATTTGATGATAGTATTTTTAATATAAATAGTAATTTATTTTC  
GAAATGGAAGGATAAAAATTAATTTAGTAAATGGTTTTGTTTTGTGCGTAAATTTTTGTGT  
TTTTTAATTTGATGTAATTGAGGGTTTTTTTTTATAGTTTTTTTTTAGTATATATAAAAA  
AATAATTAAGTAGGATTATGATATAATTTGAAAAGGAAGCGAATTAATTAATAAAGAGTT  
AGGTTTTAATGTAAAGGTTTATTAGAAATTTAAAGAGGATCGAGAAGTTGTATATTTGGAGT  
ATGTTATATTTTTTATGTTATTTTTTTTTAAATTAAGTAAAATAGGAAG

**ZFP36L2**

Chr2: 43454549 - 43455500; +Strang (GRCh37/hg19)

GCGGGGGAGCTGACTCTGAGGACAGGAGGAAAGGCCGGGAGAGCCGTGCGGGCTTGAA  
GGCGACTTAGCGCCACCTTTCCGTCTGCTGGTCGGGCGGCCTTCCCCAGCCCTCTGGG  
GCTGGGGGTGCAGCTGCCTGCCGAGGCTCCCCGCCGGCACAGCCTGGGCCTGTTGCG  
TCCTCCCAGCCTCTTCCCTCCCCGGCAGTGGGGGCGCCGCGCCCAGCCTTTGCTCGATG  
AGGGCTGCAGGATCCGGCTGAGACCAACCCGCGGCGCAGGTGGGGCTGCACAGACGCT  
GATGGTGGGCGCGCCACCCTCTGTTTTCCCTCACTCGCCAGCCCCGACCCCAACAGCTT  
GCGCTGGAAAATGCGCTTTGCCAGCGGGCGCCCCGCCTTCGTCCGGGTACGGAGGGGAC  
ACTCCCATCTAGCGCCCAGTGAGGCTAAAGCCGCTGACAGCCCCACTAGGAACGATCTGG  
AGTCTGGTCTAGGGCACTTCTCCCTCCGCGTTCATACAGGTTGCCACAAAAAGCTTGGGC  
CTGAAGCTCGAAGGCCCCGGACCCGCTGGGGAAAGAACTAGGCCTGCCACTCAGGGATT  
CGAGTCCCTGGAGTGTATCCTGCATTTCCCACTACTGTACTCCCCTCATGGCCCAGGGAG  
CCAGAGTCCAGGGTAAGGATCAGGAATGCTGGGCTGGAGTTCAGGTCCTGCCCCAGAGA  
AATCATGTGGTCTTAGGCAAATCACATCATCTCTTTGGTACTTGGGTTTCCTTGTTAAACGA  
AGATAATATTCTTGCTTTATTCATCTCTCACCTTTGGCAAGGTGCAAATGATATCTGTGAAG  
GTGTTTAAAAGACAAGCAAGAACTAAACCATCTTTATGTATTAACCAAATTGACAAAAGCG  
TAAGGGTGGAGAAAGCCTGGCTTCTGAACTGTGGCCAGATGGACAGAGAGCCACAGA

**Konvertierte Sequenz:**

GCGGGGGAGTTGATTTTGAGGATAGGAGGAAAGGTCGGGAGAGTCGTGCGGGTTTGAAG  
GCGATTTAGCGTTATTTTTTCGTTTGTTGGTCGGGTCGGTTTTTTTTAGTTTTTGGGGTTG  
GGGGTGTAGTTGTTTGTGCGAGGTTTTTCGTTCCGGTATAGTTTGGGTTTGTGCGTTTTTTA  
GTTTTTTTTTTTTTCGGTAGTGGGGCGTCGCGTTTAGTTTTGTTGATGAGGGTTGTAGG  
ATTCGGTTGAGATTAATTCGCGGCGTAGGTGGGGTTGTATAGACGTTGATGGTGGGCGCG  
TTATTTTTGTTTTTTTTATTCGTTAGTTTCGATTTTAAATAGTTTTCGTTGGAAAATGCGTT  
TTGTTAGCGGGCGTTTCGTTTTTCGTTCCGGTACGGAGGGGATATTTTTATTTAGCGTTTAGT  
GAGGTTAAAGTCGTTGATAGTTTTATTAGGAACGATTTGGAGTTTGGTTTAGGGTATTTTTT  
TTTTCGCGTTTATATAGGTTGTTATAAAAAGTTTGGGTTTGAAGTTCGAAGTTTCGGATTC  
GTTGGGGAAAGAATTAGGTTTGTATTTAGGGATTCGAGTTTTTGGAGTGTATTTTGTATTT  
TTTATTATTGATTTTTTTTTATGGTTTAGGGAGTTAGAGTTTAGGGTAAGGATTAGGAATGTT  
GGGTTGGAGTTTAGGTTTTGTTTTAGAGAAATTATGTGGTTTTAGGTAAATTATATTTTTT  
TTGGTATTTGGGTTTTTTTTGTTAAACGAAGATAATTTTTGTTTTATTTATTTTTATTTTTGG  
TAAGGTGTAATGATATTTGTGAAGGTGTTTAAAAGATAAGTAAGAATTAATTTTTATG  
TATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATG  
ATGGATAGAGAGTTATAGA

## miR-212

Chr17: 1953675 - 1955104; -Strang (GRCh37/hg19)

```
CCTCGGGTCTCCAGCTCCTGGGTGGTACCTGAATCCCCGCTGGGCCTTCCCTCCCAGGC
CCAGGTTCTCCGCTAAAGACTCCTGGGCTACTTTGGGCTCCCCTACTCTTCTTCCCAG
CCCCGACGCCACAGCCCTCGTGCGCCCCAGGCCCCACGGGAGTCCAGCTTCTCTC
CTGCCACCCTGCAGGACGAGAGGGTGGCGACACCGCAGTGGCCTTGCGGGGTGTGAC
GGCAGAAACGTCAGGTCCAGGAACTGAGGAGGGGGAAGGGGCTGCCACGTGAAGACCC
CCAGGAGCCGCGGGGCTCCGGAAGGAGAGCGTGAATAAGCTCGAAGGGCCCGCCGCGC
CCCTCCGCGCCGCTCCCCGGCCCCAGGCCCGCGGTTCCGGAAGTTAACCCCTTGTCTG
GCTGGGCAGGGGCGCGGCTCCCCCTACCCCGCCGCGCTTCCGCGCCCCCTCTCCCC
TCCCGGTCGCCTCGGTCCCCACCCCCGCCTCGCCACTATAAATAGCCCCCTTTTCCATTT
CCTAAATTCCCAGCTGACGTGCGCAGCGCGTCAAGTGTAGGAGCCGCGGCCGCATGAA
TGAGCCGCCGCACGAGTACTACGCGCGCTATAAAAGCCGCGCGCCGCGCCAGGCTGCG
GGAGGGCAGCCGGGAGTGGCGACGCGGCCCGCCAGGTAAGCGGGACGGACCAGCCGC
GGAGGGACAGATGTGCGGACACGGACGGGAGGACGAGGAGGGGACGGGCAGGCGGCG
GGTGGGGCGGCCCTCCGGGGTGGGGATGGGGGCGGACGGGGGGCACCGGGGTCCCC
TCGCGGCTGCGGAGCCGGGGCCAGAGACGACACGAGCCCGCGCAGCACCTGCCGGCGC
CCGATGGACACGCAGTACTTCCGAGGAGCATCGAGTGGAGGACCGACCTCGGAGACCC
CCCCCGGCTTTTCTGGGGCTCCTGCGCCATTCTCCAGGAAAGTGAGGCGAAGGTGCT
GGCGCCCCAGGAGACGCGCCCCCTCCTCCTCCCTCCCTGCGGCGGTGACTCAGCCCTCG
CTCCCCGGCCGGCTGAGCGGGGTGACAGGCGAGAGACGGACGCCACCCCGCTTCC
CCGGCCCTCCTGGGACCCCCGCCCCGCATGGCGTCCGGGCGCCCTTCCCGGAGGTCC
CGTCCAGCGGGTCCCGCGGCGCCACGGCTTCCCGCCTTGCAGCGGAGCTGTCTCT
CAGGACCGGGGGGCGGGGCTCCAGGTCCCGCCCCGCCCCACGCCCCCGCCGGA
AGTGCCCCCTCTGGGACATCTTTGACGTACGGCCCTCTGACGTACGGGGCCGCGTGCC
TGGTCGCGAGCGCCGGGCGGGGACGGGCGGGAGACGCAGGGGAGGCGGAGCAGCAGA
GCCCCAGCCGGGGCAGCCGGGGCGAC
```

### Konvertierte Sequenz:

```
TTTCGGGTTTTAGTTTTGGGTGGTATTTGAATTTTCGTTGGGTTTTTTTTTTAGGTTTAG
GTTTTTTCGTTAAAGATTTTTGGGTATTTTGGGTTTTTTTATTTTTTTTTTTTCGGTTTTCGA
CGTTATAGTTTTCGTTGCGTTTTAGGTTTTACGGGAGTTTAGTTTTTTTTTTTTGTTATTTTG
TAGGACGAGAGGGTGGCGATATCGTAGTGGTTTTGCGGGTGTGACGGTAGAAACGTTAG
GTTTAGGAATTGAGGAGGGGGAAGGGGTTGTTACGTGAAGATTTTAGGAGTCGCGGGGT
TTCGGAAGGAGAGCGTGAATAAGTTTGAAGGGTTCGTCGCGTTTTTTTCGCGTCTTTTTTC
GGTTTTAGGTTTCGCGTTTTTCGGAAGTTAATTTTTGTGCGTTGGGTAGGGGCGCGGTTTT
TTTTATTTTCGTCGTCGTTTTTCGCGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCGGTCGTTTCGGTTTTTATTTTC
GTTTCGTTATTATAAATAGTTTTTTTTTTTTATTTTTAAATTTTTTCGTTGACGTCCGTAGCGG
TTAGTGTGTAGGAGTCGCGGTTCGATGAATGAGTCGTCGTACGAGTATTACGCGCGTTTTAT
AAAAGTCGTCGCGTCGGTTAGGTTGCGGGAGGCGATCGGGTAGTGGCGACGCGGTTTCGT
TAGGTAAGCGGGACGGATTAGTCGCGGAGGGATAGATGTGCGGATACGGACGGGAGGAC
GAGGAGGGGACGGGTAGGCGGCGGGTGGGGCGGTTTTTTTCGGGGTGGGGATGGGGGC
GGACGGGGGGTATCGGGGTTTTTTTCGCGGTTGCGGAGTCGGGGTTAGAGACGATACGAG
TTCGCGTAGTATTTGTCGGCGTTCGATGGATACGTAGTTATTTTCGAGGAGTATCGAGTGG
AGGATCGATTTTCGAGATTTTTTTTTCGGTTTTTTTTGGGGTTTTTTCGTTATTTTTTAGGAAA
GTGAGGCGAAGGTGTTGGCGTTTTAGGAGACGCGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGCGGCGCG
GTGATTTAGTTTCGTTGTTTCGGGTTCGGTTGAGCGGGGTGTAGGCGAGAGACGGACGTTT
ATTTTCGTTTTTTTCGGTTTTTTTTGGGATTTTCGTTTCGATAGGCGTCGGGCGTTTTTTTTTCG
TAGGTTTTCGTTAGCGGGTTTTCGCGGCGTTTACGTTTTTTCGTTTTTTCGAGCGGAGTTGT
TTTTTAGGATCGGGGGGGCGGGGTTTTTAGGTTTCGTTTCGTTTTTACGTTTTTCGTCGGA
AGTGTTTTTTTTTGGGATATTTTTGACGTTACGGTTTTTTGACGTTAGGGGTCGCGTGTGG
TCGCGAGCGTCGGGCGGGGTAGGGCGGGAGACGTAGGGGAGGCGGAGTAGTAGAGTTT
TTAGTCGGGGTAGTCGGGGCGAT
```

## 8 Danksagung

Ich möchte mich bei all jenen Personen und Institutionen bedanken, die meine Dissertation in der hier vorliegenden Form möglich gemacht haben.

Zunächst gilt ein großer Dank meinem Doktorvater Prof. Dr. Dr. Ingolf Cascorbi, für die Möglichkeit, meine Dissertation am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie durchzuführen, sowie für seine Betreuung und Zeit.

Des Weiteren möchte ich mich bei Dr. Meike Kähler für die herzliche und hochkompetente Betreuung bedanken. Für die Einarbeitung im Labor, sowie für das Heranführen an das wissenschaftliche Arbeiten und deine tolle Unterstützung und Beratung, auch am Wochenende oder in deinem Urlaub bin ich dir sehr dankbar.

Daneben danke ich Dr. Henrike Bruckmüller und Dr. Inga Nagel die ebenfalls immer ein offenes Ohr und gute Ratschläge für mich hatten. Auch bei den TAs Anna, Britta und Irina möchte ich mich für die Unterstützung und das geduldige Einarbeiten bedanken.

Außerdem bedanke ich mich bei der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, welche mich mit einem Promotionsstipendium unterstützt und mir damit Zeit und Raum gegeben hat, mich voll und ganz auf meine Dissertation konzentrieren zu können.

Abschließend möchte ich meinen Eltern und meinem Bruder danken. Dafür, dass ihr immer hinter mir steht und an mich glaubt. Und meinem Freund Lennart, der es auch an Tagen der Frustration geschafft hat mich wieder zum Lachen zu bringen.

## 9 Publikationsliste

### Originalarbeiten

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).

### Veröffentlichte Tagungsbeiträge

**Ruemenapp J**, Kaehler M, Bruckmueller H, Nagel I, Ammerpohl O, Cascorbi I (2017): Alteration of DNA-methylation in tyrosine kinase inhibitor resistant CML K-562 cells, 4th ESPT Congress, Catania. (Posterpräsentation)

Kaehler M, **Ruemenapp J**, Gonnermann D, Nagel I, Ammerpohl O, Cascorbi I, Bruckmueller H (2017): Insights into imatinib resistance – miR-212/ABCG2-axis contributes to development of drug resistance in chronic myeloid leukemia. 4<sup>th</sup> ESPT Congress, Catania. (Posterpräsentation)

Kaehler M, Bruckmueller H, **Ruemenapp J**, Murgas-Penas E, Gonnermann D, Ammerpohl O, Nagel I, Cascorbi I (2017): Insights into drug resistance – comparison of miRNA, mRNA and methylation profiles of imatinib and nilotinib resistant leukemic cells. 83rd Annual Meeting of the German Society for Experimental and Clinical-Pharmacology and Toxicology (DGPT), Heidelberg. (Posterpräsentation). *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 390, Suppl. 1, pp. S66-S66.

Kaehler M, **Ruemenapp J**, Boehm R, Gonnermann D, Nagel I, Ammerpohl O, Cascorbi I, Bruckmueller H (2018): Drug resistance in chronic myeloid leukemia – Global changes after imatinib exposure and impact of miR-212/ABCG2-axis during the onset of resistance. 84th Annual Meeting of the German Society for Experimental and Clinical-Pharmacology and Toxicology (DGPT), Göttingen (Vortrag). *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 391, Suppl. 1, pp. S5-S6.

Kaehler M, **Ruemenapp J**, Gonnermann D, Nagel I, Bruhn O, Haenisch S, Ammerpohl O, Wesch D, Cascorbi I, Bruckmuller H. (2018). Mechanism of imatinib-resistance - microRNA-212/ABCG2-axis contributes to development of imatinib-resistance in leukemic cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 123 Suppl. 1, pp. 7-7