

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

**Die Rolle der Zink-Finger-Proteine ZFP36L1 und ZFP36L2
in der chronisch myeloischen Leukämie**

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

vorgelegt von
Julian Phillip Rodin
aus Hamburg

Kiel 2021

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Ingolf Cascorbi, Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie
2. Berichterstatterin: Prof. Dr. Susanne Sebens, Institut für Experimentelle Tumorforschung

Tag der mündlichen Prüfung: 10.05.2022

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 03.02.2022

Gez.: Prof. Dr. Peter Gohlke
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1.	Chronisch myeloische Leukämie	1
1.1.1.	Leukämogenese	1
1.1.2.	Epidemiologie	2
1.1.3.	Klinischer Verlauf	2
1.1.4.	Pathophysiologie	3
1.1.5.	Therapie	4
1.1.6.	Therapie-Resistenz gegenüber Imatinib	5
1.1.6.1.	BCR-ABL abhängige Resistenzmechanismen	6
1.1.6.2.	BCR-ABL unabhängige Resistenzmechanismen	6
1.2.	RNA-bindende-Proteine ZFP36L1 & ZFP36L2	6
1.3.	Zellzyklus & Quieszenz	8
1.4.	Fragestellung	10
2	Material & Methoden	11
2.1.	Material	11
2.1.1.	Zelllinien	15
2.2.	Methoden	16
2.2.1.	Zellkultur	16
2.2.2.	Bestimmung von Zellzahlen	16
2.2.3.	Einfrieren und Auftauen von Zelllinien	16
2.2.4.	Kultivierung der K-562 & LAMA-84 Imatinib-Resistenzmodelle	16
2.2.5.	ZFP36L1/ZFP36L2 Knockout-Zelllinienmodell	17
2.2.6.	Stabile Transfektion	17
2.2.7.	DNA Isolierung	18
2.2.8.	Bisulfit Konversion	18
2.2.9.	Polymerase-Ketten-Reaktion	19
2.2.10.	Agarose-Gelelektrophorese	20
2.2.11.	Pyrosequenzierung	21
2.2.12.	RNA-Isolation	22
2.2.13.	Reverse Transkription	22

2.2.14.	Quantitative Real Time-Polymerase-Ketten-Reaktion.....	22
2.2.15.	Zelllyse, Proteinisolierung & Proteinbestimmung.....	23
2.2.16.	BrdU-Proliferationsassay.....	24
2.2.17.	Real Time-Glo Annexin V and Necrosis Assay.....	25
2.2.18.	Viabilitätsassay.....	25
2.2.19.	Statistische Auswertung.....	26
3	Ergebnisse.....	27
3.1.	Expression und epigenetische Veränderungen von <i>ZFP36L1</i> & <i>ZFP36L2</i> bei der Entstehung der <i>in-vitro</i> -Imatinib-Resistenz.....	28
3.1.1.	Differenzielle Expression von <i>ZFP36L1</i> & <i>ZFP36L2</i>	28
3.1.2.	Hypermethylierung von <i>ZFP36L2</i>	30
3.2.	<i>ZFP36L1</i> / <i>ZFP36L2</i> Knockout-Zelllinienmodell.....	33
3.2.1.	Einfluss der <i>ZFP36L1</i> / <i>ZFP36L2</i> Defizienz auf die Zellviabilität, Zellproliferation und Apoptose.....	33
3.2.2.	Charakterisierung proliferativer & apoptotischer Signalwege.....	35
3.2.3.	Expression ausgewählter Target-Gene beteiligt an der Apoptose in der Defizienz & im Rescue.....	37
4	Diskussion.....	39
4.1.	<i>ZFP36L1</i> und <i>ZFP36L2</i> Dysregulation in der Entwicklung der <i>in vitro</i> Imatinib-Resistenz gegenüber Imatinib.....	40
4.1.1.	Putativer Einfluss der Methylierung auf die Dysregulation.....	40
4.2.	Die K-562 CML Zelllinie in der <i>ZFP36L1</i> und <i>ZFP36L2</i> Defizienz.....	41
4.2.1.	Effekte des Knock-outs auf die Apoptose.....	41
4.2.2.	Alteration ausgewählter Proteinlevel von Proteinen, die an der Apoptose beteiligt sind.....	41
4.2.3.	Expression der Target mRNAs von <i>ZFP36L1</i> und <i>ZFP36L2</i>	43
5	Zusammenfassung.....	44
6	Summary.....	45
7	Literaturverzeichnis.....	46
8	Publikation.....	52
9	Lebenslauf.....	53
10	Danksagung.....	55

Abkürzungsverzeichnis

ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ABCB1	ATP-binding cassette sub-family B member 1
ABCG2	breast cancer resistance protein
ABL1	<i>Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
Akt1	<i>Serine/Threonine Kinase</i>
ALL	akute lymphatische Leukämie
Allo-SCT	allogene Stammzelltransplantation
AML	akute myeloische Leukämie
AP	Akzelerationsphase
ARE	<i>adenine uridine rich elements</i>
Bax	BCL Associated X
BCR	<i>breakpoint cluster region</i>
BCL-2	B-Cell CLL Lymphoma 2
BIRC	Baculoviral Inhibitor Of Apoptosis Repeat Containing Protein
BrdU	Bromodesoxyuridin
BRCP	breast cancer resistance protein
BP	Blasten Phase
CHR	komplette hämatologische Remission
CCyR	komplette zytogenetische Remission
CD20	B-Lymphozyten Antigen
C-IAP	<i>cellular inhibitor of apoptosis protein</i>
CML	chronisch myeloische Leukämie
CMR	komplettes molekulares Ansprechen
CP	chronische Phase
CRISPR	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
CyR	zytogenetische Remission
DKO	Doppel-Knockout
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSZ	Deutschen Sammlung von Zellkulturen und Mikroorganismen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	Desoxyribonukleinsäure Methyltransferase

ELN	European LeukemiaNet
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinase 2
FCS	fötales Kälberserum
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
HIF	Hypoxie induzierte Faktor
IGF-2	<i>insulin like growth factor-2</i>
IM	Imatinib
IRIS	<i>International Randomized Study of Interferon and STI571</i>
mCyR	minore zytogenetische Remission
MDR	<i>multidrug resistance protein</i>
MMR	<i>major molecular response</i>
minCyR	minimale zytogenetische Remission
Myc	Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog
OCT1	<i>organic cation transporter 1</i>
PCyR	partielle zytogenetische Remission
P-gp	<i>permeability glycoprotein 1</i>
P21/CDKN1A	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
qRT-PCR	quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion in Echtzeit
RNA	Ribonukleinsäure
RBP	RNA bindende Proteine
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBST	TRIS-buffered saline with Tween-20
TKI	Tyrosin Kinase Inhibitor
TIS11	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate <i>inducible sequence</i> 11
UKSH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
WB	Western Blot
WHO	World Health Organization
WST	water soluble tetrazolium
ZFP	Zink Finger Protein
ZFP36L1	ZFP36 Ring Finger Protein Like 1
ZFP36L2	Zink36 Ring Finger Protein Like2

1. Einleitung

1.1 Chronisch myeloische Leukämie

Die chronisch myeloische Leukämie (CML) ist eine maligne klonale myeloproliferative Neoplasie des hämatopoetischen Systems. Sie ist eine pathogenetisch homogene Erkrankung, ausgelöst durch eine Fusion der Gene BCR und ABL1. Die CML ist die erste onkologische Erkrankung, in der eine chromosomale Aberration als Auslöser identifiziert werden konnte^{1,2}.

1.1.1 Leukämogenese

Die Entstehung der Leukämie geschieht multifaktoriell. Es gelten endogene und exogene Faktoren als Induktoren belegt. Zu den endogenen Faktoren zählen kongenitale genetische Aberrationen, wie sie beim Down-Syndrom, dem Bloom-Syndrom und der Fanconi-Anämie vorhanden sind³. Zu den exogenen Faktoren zählen ionisierende Strahlung, chemische Noxen und Viruserkrankungen^{4,5,6}.

Die genannten Faktoren schädigen eine hämatopoetische Stammzelle und führen zu einer Stammzelltransformation. Die unterschiedlichen Formen der Leukämien kommen durch die Transformation der spezifischen Stammzelle zustande. Die Stammzelle kann myeloisch oder lymphoid und multi-, oligo-, bi- oder unipotent sein und führt zu der jeweiligen Differenzierungsstörung. Bei der Chronisch-myeloischen Leukämie (CML) wurde die für die CML pathognomonische BCR/ABL-Translokation nicht nur in Zellen der Granulopoese, sondern auch in anderen Zellreihen nachgewiesen. Das spricht dafür, dass die BCR/ABL Translokation, also die Stammzelltransformation, in einer multi- oder pluripotenten Stammzelle stattfindet.

Die onkogen transformierte Stammzelle kann entweder direkt pathologisch an der Hämatopoese als sogenannte „Feeder“- Zelle teilnehmen und zu einer Leukämie führen oder in das zelluläre Ruhestadium der Quieszenz gehen. So kann eine onkogen transformierte Stammzelle erst nach jahrelanger Latenz zu einer „Feeder“-Zelle werden und eine Leukämie induzieren.

1.1.2 Epidemiologie

In Deutschland erkranken jährlich 1.000 bis 1.200 Menschen, bei einer Inzidenz von 1,2 bis 1,5 pro 100.000 Einwohner, an der CML. Am häufigsten tritt die CML im Alter zwischen 55 bis 60 Jahren auf und betrifft zu 60 % Männer. Aufgrund der auf 1,7 % gesunkenen Mortalität steigt die Prävalenz der CML, bei gleichbleibender Inzidenz, an^{7,8}.

1.1.3 Klinischer Verlauf

Die Symptome der CML sind Abgeschlagenheit, Schwäche, Appetitlosigkeit, Gewichtsverlust, Knochenschmerzen und ein Druckgefühl im linken oberen Quadranten des Bauches. Die Bauchschmerzen entstehen aufgrund des Kapseldehnungsschmerzes der Milz, bei einer Milzvergrößerung. Ohne eine Therapie verläuft die CML in drei Stadien. Die Chronische Phase (CP), Akzelerationsphase (AP) und die Blasten Krise (BP). Die Kriterien, die für die jeweiligen Stadien der CML erfüllt sein müssen, werden von der *European LeukemiaNet* (ELN) und *World Health Organization* (WHO) definiert. Die CP in der zu > 97% die Diagnose der CML gestellt wird, verläuft in etwa 50% klinisch inapparent, weshalb die Diagnose nicht selten ein Zufallsbefund nach der Bestimmung eines Blutbildes ist.

Die CML geht durch eine vermehrte Proliferation undifferenzierter Granulozyten (Blasten) von der CP in die AP über⁹. Durch die Vermehrung der Blasten im Knochenmark kommt es zu einer Verdrängung des gesunden Knochenmarks und durch eine Dehnung des Periosts zu Knochenschmerzen. Die Verdrängung des Knochenmarks führt zu einer gestörten Hämatopoese, die eine Anämie und eine damit verbundene Blässe und Schwäche zur Folge hat. Darüber hinaus führt die gestörte Leukozytogenese zu einer erhöhten Infektanfälligkeit. Es kann zu einer starken Leukozytose kommen, welche aufgrund ihrer Dedifferenzierung nicht funktionsfähig sind. Die starke Leukozytose kann ein Leukostasesyndrom verursachen, bei dem es zu der Bildung von leukämischen Thromben kommt, welche einen Milzinfarkt, Myokardinfarkt, Zentralvenenverschluss der Retina oder einen leukämischen Priapismus auslösen können.

Die BP zeichnet sich durch einen Blasten Anteil von > 20% oder > 30% im peripheren Blut oder Knochenmark aus, weshalb das Stadium klinisch der akuten myeloischen Leukämie (AML) und der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) ähnelt. Die Patienten befinden sich in einem stark reduzierten Allgemeinzustand und haben unbehandelt eine infauste Prognose. Die Kriterien, die für das Erreichen der jeweiligen Stadien der CML erfüllt sein müssen, werden von der *European LeukemiaNet* (ELN) und *World Health Organization* (WHO) definiert.

1.1.4 Pathophysiologie

Das *BCR-ABL1* Fusionsgen resultiert aus einer balancierten reziproken Translokation zwischen den Chromosomen 9 und 22, t(9;22) (q34.1;q11.2) in einer hämatopoetischen Zelle. Dabei ist auf dem Philadelphia Chromosom (Chromosom 22q-) das die CML pathophysiologisch auslösende *BCR-ABL1* Fusionsgen lokalisiert¹⁰.

Das *BCR-ABL1* Fusionsgen ist für die CML pathognomonisch und führt zu einer onkogenen Transformation. Es tritt bei etwa 95% in der CML auf, jedoch ist darauf hinzuweisen, dass es auch in anderen Leukämieformen wie der ALL vorkommen kann^{11,12,13}. Auf die *BCR-ABL1* negative CML wird in dieser Arbeit nicht eingegangen, da sie sich pathophysiologisch von der *BCR-ABL1* positiven CML unterscheidet¹².

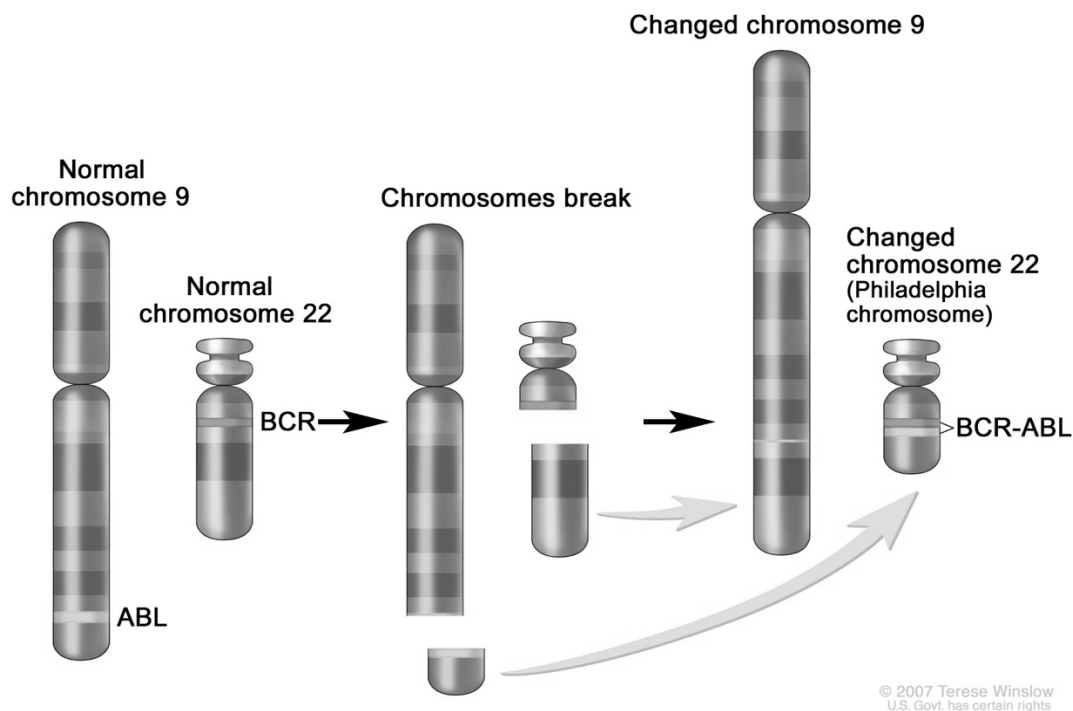


Abbildung 1: Reziproke Translokation die zum Philadelphia Chromosom führt und der pathophysiologischen Folgen. Strangbrüche führen zu einer reziproken Translokation zwischen den Chromosomen 9 und 22. Auf dem Chromosom 22 fusioniert die ABL Tyrosin Kinase mit der Bruchpunktstelle BCR

und führt zum für die CML pathognomonischen *BCR-ABL* Fusionsgen.

Bildquelle: <https://nci-media.cancer.gov/pdq/media/images/533336.jpg>

Die Regulation der ABL1 Tyrosinkinase geht durch die Translokation verloren und es kommt zu ungehemmter Expression des *BCR-ABL1* Fusionsproteins. Physiologisch pendelt die ABL1 Tyrosinkinase zwischen dem Nukleus und dem Zytoplasma. Bei der CML verbleibt

ABL1, aufgrund der Juxtaposition zu BCR, im Zytoplasma und wird durch die Autophosphorylierung von BCR an der N-terminalen Domäne, konstitutiv aktiviert.

Aufgrund des entdeckten Genotyps der Erkrankung konnte durch die Entwicklung des Tyrosin Kinase Inhibitor (TKI) Imatinib (IM) die CML zielgerichtet, effektiv und nebenwirkungsarm, im Sinne der *Targeted Therapy*, behandelt werden^{8,14}.

1.1.5 Therapie

Heutzutage stehen zur Therapie der CML die *small molecule*, Chemotherapie, Immuntherapie und die allogene Stammzelltransplantation (Allo-SCT) als Reserveoption zur Verfügung¹⁵.

2001 wurde der Tyrosin Kinase Inhibitor Imatinib zur Therapie der CML, durch das Erreichen einer kompletten hämatologischen Remission bei 96% der Patienten zugelassen und die zweiarmlige Phase-3-Therapiestudie *International Randomized Study of Interferon and ST1571* (IRIS-Studie) gestartet. An der IRIS-Studie nahmen 1106 Patienten in 16 Nationen teil und erhielten randomisiert eine Therapie mit entweder Interferon alpha und Cytarabin oder Imatinib. Die IRIS-Studie zeigte nach 18 Monaten einen deutlichen Vorteil von Imatinib, weshalb viele Teilnehmer aus dem Interferon alpha und Cytarabin Therapiearm einen cross-over zu der Imatinib Therapie machten und die Studie sich aufgrund des Erfolges der Therapie zu einer Beobachtungsstudie wandelte¹⁶.

Die IRIS-Studie zeigte unter 400mg/Tag Imatinib Therapie ein nebenwirkungsarmes 10 Jahres überleben von 83,3%. In der CP sind Remissionsraten höher als in der AP oder BP. Die BP kann mit der Allo-SCT therapiert werden, aufgrund der hohen Mortalitätsrate ist die Allo-SCT eine Reserveoption. Das Ziel der Therapie unter Imatinib ist eine komplette zytogenetische Remission. Bei unzureichendem ansprechen oder spezifischen Punktmutationen im BCR-ABL Fusionsgen wird die Therapie mit TKI der zweiten (Dasatinib) oder dritten Generation (Nilotinib) durchgeführt.

Nebenwirkungen werden durch die antileukämische Wirkung von Imatinib bedingt. Grad 3 Nebenwirkungen sind eine Neutropenie (17%), die Thrombozytopenie (9%) und erhöhte Leberenzyme (5%). Grad 1-2 Nebenwirkungen sind Flüssigkeitsretention (11-60%), Übelkeit (50-65%), Erbrechen (17-49%), Bauchschmerzen (10-37%), Muskelkrämpfe (25-49%), muskuloskeletale Schmerzen (12-47%), Müdigkeit (8-39%), Hautausschlag (22-40%), Diarrhoe (24-45%) und Kopfschmerzen (10-37%).

Um die bestmögliche Therapie für den Patienten zu gewährleisten und bei unzureichendem Ansprechen die Therapie wechseln zu können ist ein regelmäßiges standardisiertes Monitoring notwendig¹⁷. Dafür erfolgt alle zwei Wochen ein Blutbild, bis eine komplette hämatologische Remission (CHR) erreicht ist.

Die CHR wird wie folgt definiert: Leukozyten $< 10.000/\mu\text{L}$, Thrombozyten $< 450.000/\mu\text{L}$, Basophile $< 5\%$, keine Myelozyten, keine Promyelozyten oder Myeloblasten und keine tastbare Milz in der körperlichen Untersuchung. Nach Erreichen der CHR wird das Blutbild alle drei Monate kontrolliert und nach 3 Monaten erfolgt das zytogenetische und molekulare Monitoring. Die Kontrolle der zytogenetischen Remission erfolgt an mindestens 20 Metaphasenanalysen aus Knochenmarksaspirat und wird durch die Zahl der Philadelphia-Chromosom-positiven (Ph^+) Zellen definiert. Keine Ph^+ Metaphasen = komplette zytogenetische Remission (CCyR), 1-35% Ph^+ Metaphasen = partielle zytogenetische Remission (PCyR), 36-65% Ph^+ Metaphasen = minore zytogenetische Remission (mCyR), 66-95 % Ph^+ Metaphasen = minimale zytogenetische Remission (minCyR), $> 95\%$ Ph^+ Metaphasen = keine zytogenetische Remission (keine CyR).

Das molekulare Monitoring wird anhand der BCR-ABL1 Transkripte in peripherem Blut durch die qRT-PCR bestimmt. Die Einteilung erfolgt in *complete molecular response* (CMR) = BCR-ABL1 Transkript ist nicht messbar und *major molecular response* (MMR) = Quotient von BCR-ABL1-Transkripten zum Kontrollgen $< 0,1\%$.

1.1.6 Therapie-Resistenz gegenüber Imatinib

Etwa 30% der Patienten sind primär resistent gegenüber Imatinib oder entwickeln im Verlauf der Therapie eine sekundäre Resistenz¹⁸. Durch eine lebenslange Einnahme, Non-Compliance der Imatinib Einnahme und eine interindividuell verschiedene Bioverfügbarkeit und Pharmakokinetik können zu niedrige Imatinib Wirkspiegel entstehen, was die Entwicklung von Therapie-Resistenzen begünstigt¹⁸.

In der Imatinib-Resistenz unterscheidet man zwischen der primären Resistenz und der sekundären Resistenz. Als primäre Resistenz wird das nicht Erreichen der hämatologischen oder zytogenetischen Remission nach 6, 12 oder 18 Monaten Imatinib-Therapie bezeichnet. Unter Imatinib-Therapie zeigen 23-49% der Patienten in der CP, 45-70% der Patienten in der AP und 90% der Patienten in der BC eine primäre zytogenetische Resistenz gegenüber Imatinib. Die sekundäre Imatinib-Resistenz bezeichnet eine erworbene Imatinib-Resistenz. Diese setzt voraus, dass eine erreichte Remission unter Imatinib-Therapie verloren ging oder den Progress der CML von der CP in die AP oder BP.

1.1.6.1 BCR-ABL abhängige Resistenzmechanismen

Auf molekularer Ebene sind die Resistenzmechanismen zu 60-80% BCR-ABL1 abhängig und beruhen auf Punktmutationen oder Amplifikationen des BCR-ABL1 Fusionsgens. Die Punktmutationen sind Missense-Mutationen in der Kinasedomäne, die sterisch oder durch konformationelle Veränderungen die Imatinib-Bindung verhindern¹⁹.

Durch Amplifikationen des BCR-ABL1 Fusionsgens wird keine ausreichende Hemmung der BCR-ABL1 Kinase durch Imatinib mehr erreicht²⁰.

1.1.6.2 BCR-ABL unabhängige Resistenzmechanismen

In der BCR-ABL unabhängigen Resistenz kann entweder der TKI Imatinib nicht mehr in ausreichender Konzentration an seine Zielstruktur gelangen oder die TKI Bindung an BCR-ABL wird durch alternative Signalwege irrelevant¹⁹.

Zu einer verminderten Konzentration von Imatinib an dessen Zielstruktur kann es kommen, da Imatinib ein Substrat der Cytochrom P450 Isoenzyme P3A4 und P3A5 ist. Dadurch können interindividuelle Unterschiede in der Pharmakokinetik durch erhöhte Konzentrationen an Cytochrom P450 Isoenzymen oder dessen Induktion, durch Medikamente wie z.B. Rifampicin, zu einem herabgesetzten Imatinib-Plasmaspiegel führen.

Der intrazelluläre Wirkspiegel kann durch eine verminderte Expression von Importern, wie dem *organic cation transporter* (OCT1), oder einer verstärkten Expression von Efflux-Transportern der *ATP-binding cassette* (ABC)- Familie beeinträchtigt werden. ATP-binding cassette sub-family B member 1 (ABCB1) auch *permeability glycoprotein 1* (P-gp) oder *multidrug resistance protein 1* (MDR1) genannt, ist ein ATP abhängiger xenobiotischer Efflux-Transporter, dessen verstärkte Expressierung, genauso wie die von ABCG2 auch breast cancer resistance protein (BRCP) genannt, in der Imatinib-Resistenz eine Rolle spielt^{21,22}.

Posttranskriptionelle Regulatoren der Genexpression, wie z.B. RNA bindende Proteine (RBP) und mikro-RNA Interaktionen sowie Epigenetische Effekte können zu einer Veränderung des Proteoms führen. Dadurch bedingte Signalveränderungen können die Imatinib-Sensitivität der CML-Zellen beeinflussen^{23,24}.

1.2 RNA-bindende-Proteine ZFP36L1 & ZFP36L2

RNAs stehen in einer komplexen dynamischen Interaktion mit RNA-bindenden-Proteinen (RBP). RNA wird durch die RNA-Polymerase an der DNA

transkribiert und kann verschiedene Funktionen haben. Als *messenger* RNA (mRNA), *transfer* RNA (tRNA) oder ribosomale RNA (rRNA) sind sie Bausteine der Genexpression und Proteinbiosynthese. RNAs können die Genexpression als antisense-RNA (asRNA) regulieren und als mikro RNA (miRNA) zelluläre Prozesse wie die Proliferation oder Apoptose beeinflussen. RBP regulieren die 5'-Cap-Struktur von RNAs sowie die Polyadenylierung, das Splicing, die Translation und Degradation. RBP können auch RNA-unabhängig, über DNA-Bindungen und Proteininteraktionen die Genexpression regulieren. Sie kreieren durch ihre Regulationsmechanismen in etwa zwei Drittel der Proteinvariationen²⁵. Obwohl bislang etwa 1500 RBP beschrieben wurden, gilt es als anerkannt, dass AUF1, HUR, KSPR, nucleolin und die 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) inducible sequence 11 (TIS11) Protein-Familie (ZFP36, ZFP36L1 und ZFP36L2) die Hauptregulatoren der physiologischen Hämatopoese sowie hämatoonkologischer Erkrankungen sind²⁵.

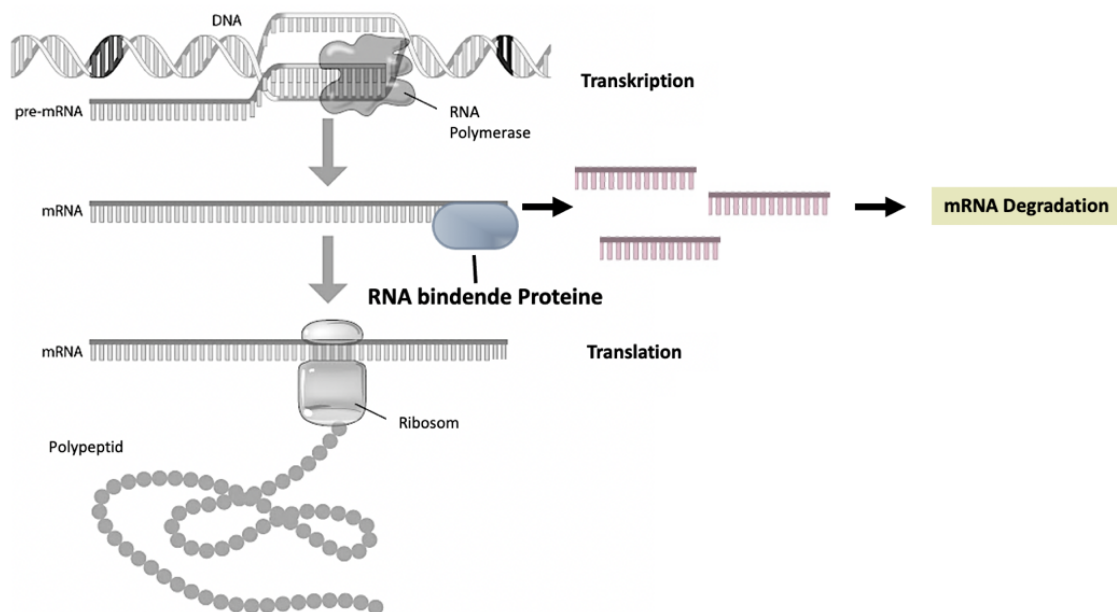


Abbildung 2: Regulation der Genexpression durch RBP. Zu sehen ist das molekulare Dogma der Proteinbiosynthese (DNA→Transkription→mRNA→Translation→Protein). Die RBP ZFP36L1 und ZFP36L2 binden an ARE der mRNA's und initiieren ihre Degradation. Die Proteinbiosynthese wird dadurch posttranskriptional gestoppt. Die Bildquelle ist modifiziert aus: Clancy, S.; Brown, W. Translation: DNA to mRNA to Protein. Nature 2008;1(1):101.

Die Struktur von ZFP36, ZFP36L1 und ZFP36L2 besteht aus Cystein-Histidin-Motiven, welche als Tandem-Zinkfinger motive bezeichnet werden. Ihre physiologische Expression ist gewebespezifisch verschieden, aber insgesamt erniedrigt und erst nach einer Induktion durch z.B. TPA oder durch CD20-Antikörper wie z.B. Rituximab erhöht²⁶.

Die Zink-Finger-Proteine ZFP36L1 und ZFP36L2 sind RBP, welche die Genexpression posttranskriptional regulieren. Sie binden an Adenin und Uridin reichen Regionen (ARE) an

der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) von mRNAs, wodurch über eine Deadenylierung eine Degradation initiiert wird. Damit vermindern sie die Translation der mRNA und tragen zur Regulierung des Proteoms bei². Nachgewiesene mRNAs, die von dieser Degradation betroffen sind, kodieren für Onkoproteine und Wachstumsfaktoren.

Die TIS11-Protein-Familie spielt eine Rolle in der Regulation fundamentaler Prozesse der Zelle, wie der Apoptose, der Immunität, des Metabolismus, der Angiogenese, der Differenzierung und der Pluripotenz²⁷. Die mRNA von *BCL2* ist beispielsweise ein Target von ZFP36L1 in malignen B-Zellen und die Wirkung von ZFP36L1 in diesem Fall pro-apoptotisch²⁴. *ZFP36L2* ist essentiell für die physiologische Hämatopoese und *ZFP36L1* spielt gemeinsam mit *ZFP36L2* eine noch nicht abschließend geklärte Rolle in hämatoonkologischen Erkrankungen^{28,29}.

Obwohl *ZFP36* und *ZFP36L1* ähnliche Bindedomänen wie *ZFP36L2* haben, führte ihr Knockout im Mausmodell zu anderen Phänotypen. *ZFP36L2*-Knockout-Mäuse entwickelten einen Verlust hämatopoetischer Stammzellen und starben infolge einer Anämie und Thrombozytopenie³⁰. Dabei konnte gezeigt werden, dass *ZFP36L2* die Selbsterneuerung von Stammzellen induziert. Außerdem wird *ZFP36L2* in differenzierteren Zellen herunterreguliert³¹.

Der *ZFP36L1*-Knockout führte zu einem bereits embryonisch lethalen Phänotyp. Der Knockout von *ZFP36L1* und *ZFP36L2* zusammen führte im Mausmodell zu der Entwicklung einer T-Zell Leukämie²⁴ 20.07.22 10:52:00 und in sich entwickelnden B-Lymphozyten zum Verlust der Quieszenz während der VDJ-Rekombination³². Der *ZFP36* Knockout wiederum führt zu einem proinflammatorischen Phänotyp und wird in dieser Arbeit nicht behandelt.

1.3 Zellzyklus & Quieszenz

Das zelluläre Stadium, in welchem sich eine Zelle befindet, wird durch ein dynamisches Gleichgewicht aus proliferativen, differenzierenden und apoptotischen Signalen bestimmt. Um proliferieren zu können, sind Zellen bis zum Erreichen des Restriktionspunktes im Zellzyklus von Wachstumsfaktoren abhängig. Außerdem sind Überlebensfaktoren notwendig, um nicht in den endogen programmierten Zelltod der Apoptose einzutreten.

Die Zelle kann während der G₁-Phase aus dem proliferativen Zellzyklus in die G₀-Phase austreten. Die G₀-Phase ist das zelluläre Ruhestadium der Quieszenz, in dem keine

Replikation der DNA stattfindet, aber die Zelle trotzdem metabolisch aktiv sein kann und in der Differenzierungsprozesse ablaufen können.

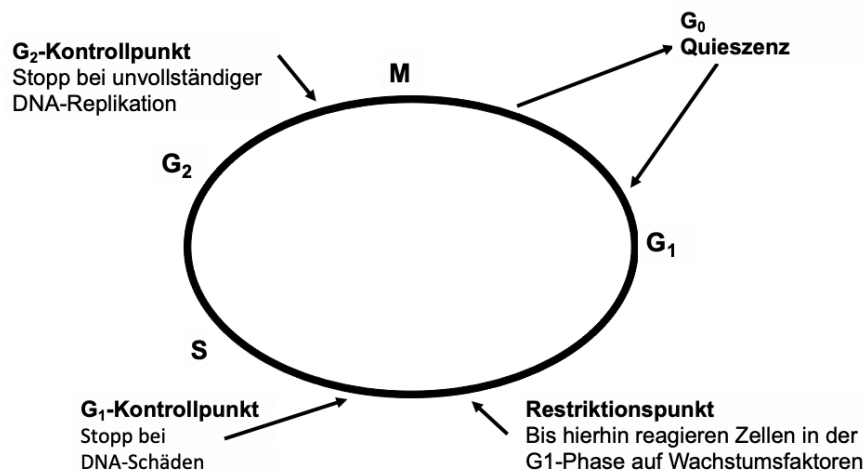


Abbildung 3: Zellzyklus-Phasen & Kontrollpunkte. Die G₁-Phase ist die Wachstumsphase, in der S-Phase findet die Synthese der DNA statt und in der M-Phase findet die Mitose statt. In der G₁-Phase kann die Zelle aus dem Zellzyklus austreten und in die G₀-Phase, das zelluläre Ruhestadium der Quieszenz eintreten. In dem Zustand kann die Zelle lange verharren und nach Stimuli wieder in die G₁-Phase und damit in den proliferativen Zustand eintreten.

Die Bildquelle ist modifiziert aus der Nature Education: <https://www.nature.com/scitable/content/many-of-the-mammalian-cell-cycle-genes-30120/>

Die Regulation der Quieszenz ist sehr komplex. Induziert werden kann die Quieszenz durch eine Hypoxie in der osteoblastischen oder vaskulären Nische des Knochenmarks. Dort sorgen Adhäsionsmoleküle und der Hypoxie induzierte Faktor (HIF-alpha) für den Erhalt der Quieszenz³³. Eine Aktivierung aus der Quieszenz kann zum Beispiel durch freie Radikale initiiert werden.

Das Stadium der Quieszenz kann Zellen einen Überlebensvorteil bieten, da Zellen während der Mitose besonders vulnerabel sind. Darum ist das Stadium der Quieszenz besonders für Stammzellen wichtig, da diese vor Mutationen während der Mitose und einer Instabilität durch zu kurze Telomere bewahrt werden sollen. Tumorstammzellen können sich durch die Quieszenz vor Chemotherapeutika schützen, da diese vor allem sich teilende Zellen schädigen. Physiologisch ist das Stadium der Quieszenz für sich entwickelnde B-Zellen notwendig, um sie während der sensiblen Phase der VDJ-Rekombination zu schützen³².

Zellen können aus dem Stadium der Quieszenz aktiviert werden und wieder in den proliferativen Zellzyklus eintreten. Eine Dysbalance des Gleichgewichts des Zellzyklus ist charakteristisch für onkologische Erkrankungen^{18,34,35}.

1.4 Fragestellung

Die Arbeiten dienen einerseits der Untersuchung der Frage, ob die RNA-bindenden Proteine ZFP36L1 und ZFP36L2 eine Rolle bei der Entstehung einer Imatinib-Resistenz in einem CML-in-vitro-Modell spielen, andererseits sollte die Rolle von ZFP36L1 und ZFP36L2 auf die Regulation onkogener Targetproteine der CML untersucht werden.

Hierzu sollte zunächst die Expressionsänderung von ZFP36L1 und ZFP36L2 auf mRNA- und Proteinebene in Behandlungs-naiven Zellen im Vergleich zu mit 0,5 μM bzw. 2 μM Imatinib chronisch exponierten Zelllinien untersucht werden.

Um zu klären, ob epigenetische Veränderungen zu potentiellen Expressionsänderungen beitragen, sollte in einem zweiten Schritt die Änderung der DNA-Methylierung in den Promotorregionen von ZFP36L1 und ZFP36L2 untersucht werden.

Hierzu wurde zum Vergleich ein *ZFP36L1/ZFP36L2* Knockout-Zelllinienmodell herangezogen und die Zellviabilität, Zellproliferation und Apoptose in Anwesenheit, Knockdown und Rescue bestimmt.

Weiterhin sollten die mRNA- und Proteinlevel ausgewählter proliferativer & apoptotischer Signalwege, die *Targets* von ZFP36L1 und ZFP36L2 sind, gemessen und im Vergleich ermittelt werden.

2. Material & Methoden

2.1 Material

Tabelle 1: Aufzählung der Materialien und Geräte und der Quellen von denen sie bezogen wurden.

	Material & Geräte
Bandelin electronic (Berlin)	Ultraschall-Homogenisator Sonopuls GW70
Binder GmbH (Tuttlingen)	Brutschrank B28
Biometra (Göttingen)	Schüttelplattform WT12
Bio-Rad Laboratories (München)	Mini PROTEAN® Gelkammer
	Mini PROTEAN® Gel Gießstand
	Glasplatten 1,0 mm, 15-well Kamm
	Power Pac™ 300 Power Supply
	Subcell® GT Cell Elektrophoresekammer
	T100™ Thermocycler
CEA GmbH	Röntgenfilme RP NEW 18 x 24
Eppendorf AG (Hamburg)	Kühlzentrifuge 5415 R
	Laborzentrifuge 5810 R
	Mikrozentrifuge 5418
	Mehrkanalpipette 200 µl
	Pipetten (0,5-1000 µl)
	Thermomixer compact
GFL (Burgwedel)	Wasserbad
Greiner Bio-One (Frickenhausen)	Cryo S™ Schraubdeckelgefäße
Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt)	Pipetus-accu
Implen (München)	NanoPhotometer
Intas (Göttingen)	Intas ix20 Imager
Lonza (Köln)	Nucleofector™ 2b
Milipore (Schwalbach)	Polivinyldidifluorid (PVDF)-Membran
	Milli-Q Wasseraufreinigungsanlage
neoLab (Berlin)	Vortex Genie 2
Nerbe plus (Winsen/Luhe)	Microtiter 96-well Platte V-Form
Ohaus (Greifensee, Schweiz)	Navigator™ Laborwaage
Olympus GmbH (Hamburg)	Mikroskop Olympus CK2
Optik Labor Ltd (Lancing, UK)	Zählkammer Fuchs-Rosenthal
Phase (Lübeck)	Semi-Dry Blotter
Schott (Mainz)	Glasgefäße
Tecan (Crailsheim)	Tecan Infinite® M200 pro
Thermo Fisher Scientific (Darmstadt)	HeraSafe™ Zellkulturbank
	HeraCell™ Zellkulturbrutschrank
	MicroAmp® Optical-Well 96 Reaction Plates
	MicroAmp® Optical Adhesive Film
	Nalgene® Kryo-Einfriergerät/ Mr. Frosty
	Nunc™ 96-well-Platten, schwarz, durchsichtiger Boden
	Nunc™ 96-well-Platten, weiß
	Quant Studio™ 7
	Qubit® Fluorometer 2.0
Turner Biosystems (San Diego, USA)	Veritas Luminometer
Qiagen (Hilden)	PyroMark Q48 Autoprep

Sarstedt (Nürnberg)	Verbrauchsmaterialien
---------------------	-----------------------

Tabelle 2: Aufzählung der benutzten Chemikalien und Reagenzien und der Quellen von denen sie bezogen wurden.

	Chemikalien & Reagenzien
Biochrom (Berlin)	Fötale Kälberserum
	Ultra Pure H ₂ O
Bio-Rad Laboratories (München)	BioRad Protein Assay Standard II
Biozym (Hessisch Oldendorf)	dNTPs (25mM each)
Intas Göttingen	HD Green
Merck (Darmstadt)	L-Alanyl-L-Glutamin (200mM)
Milipore (Schwalbach)	Immobilon TM Western Chemiluminescent HRP Substrate
New England Biolabs (Frankfurt am Main)	Restriktionsenzyme XhoI, PstI
Pall Dreiech	Mini Kleenpak TM Syringe Filter 0,2 µM
PanReac AppliChem (Darmstadt)	Acrylamid/Bisacrylamid
PeqLab Biotech (Erlangen)	peqGold TriFast
Roche (Basel, Schweiz)	Cell Proliferation Reagent WST-1 Solution
Santa Cruz (Dallas, USA)	ImmunoCruz Western Blotting Luminol Reagent
Thermo Fisher Scientific (Darmstadt)	10 x PBS
	6 x Loading Dye
	AmpliTaq Gold® 360 MasterMix
	Gene Ruler TM 100 bp/1 kb DNA Ladder
	GIBCO® Opti-MEM
	GIBCO® RPMI-1640 Medium
	Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml)
	Taq Polymerase
	TaqMan® Universal PCR Mater Mix without AmpErase® UNG
Qiagen (Hilden)	PyroMark Q48 Advanced Reagents
	PyroMark Q48 Advanced CpG Reagents
	Magnetic Beads

Der Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib wurde von der Novartis GmbH (Nürnberg) zur Verfügung gestellt.

Tabelle 3: Aufzählung der benutzten Kits und der Quellen von denen sie bezogen wurden.

	Kits
Lonza (Köln)	Amaya® Nucleofector TM Kit V
Merck (Darmstadt)	Calbiochem® BrdU Cell Proliferation Assay
Promega (Mannheim)	Caspase-Glo® 9 Assay
	CytoTox-Glo® Cytotoxicity Assay
	RealTime Glo TM Annexin V Apoptosis and Necrosis Kit
	StemElite TM ID Kit
Qiagen (Hilden)	Plasmid Mini Kit
Thermo Fisher Scientific (Darmstadt)	Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit
Qiagen (Hilden)	EpiTect Bisulfite Kit (48)

Tabelle 4: Primäre und sekundäre Western Blot Antikörper.

Name	Artikelnummer	Herkunft	Verdünnung (%) in Blockierlösung	Quelle
Anti-ZFP36L1/L2	#2119	Kaninchen	1:1000 in 1 % Pufferlösung (BS)	CST (Danvers, USA)
Anti-GAPDH	GT239	Maus	1:2000 in 2 % BS	GeneTex (Irvine, USA)
Anti-mouse (horseradish peroxidase-conjugated second antibody)	NXA931	Schaf	1:1000 in 1 % BS	GE Healthcare (München)
Anti-rabbit (horseradish peroxidase-conjugated second antibody)	#7074	Ziege	1:1000 in 1 % BS	CST (Danvers, USA)
Anti-Akt	#9272	Hase	1:2000 in 2 % BS	CST (Danvers, USA)
Anti-Phospho-Akt	#13038	Hase	1:2000 in 2 % BS	CST (Danvers, USA)
Anti-Erk	#4695	Hase	1:5000 in 4 % BS	CST (Danvers, USA)
Anti-p21	#sc53219	Maus	1:2000 in 2 % BS	Santa Cruz (Dallas, Texas)
Anti-c-Myc	#sc4084	Hase	1:1000 in Saliner Tris-gepufferten Kochsalzlösung (TTBS)	Santa Cruz (Dallas, Texas)
Anti-Caspase3	#sc7148	Hase	1:1000 in 4 % BS	Santa Cruz (Dallas, Texas)
Anti-Cleave Caspase	#9664	Hase	1:1000 in TTBS	CST (Danvers, USA)
Anti-Bax	#14796	Maus	1:1000 in 4 % BS	Santa Cruz (Dallas, Texas)
Anti-BCL-2	#sc-509	Hase	1:1000 in 2 % BS	Santa Cruz (Dallas, Texas)
Anti-BIRC2/c-IAP1	#7065	Hase	1:2000 in 2 % BS	CST (Danvers, USA)
Anti-BIRC3/c-IAP2	#MAB817	Maus	1:2000 in 2 % BS	R&D Systems (Minneapolis, USA)

Tabelle 5: Plasmide der stabilen Transfektion.

Name	Vektor	Quelle
pEGFP-N3	Leervektor	Erhalten von Vicki Wätzig aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie des UKSH
pEGFP-ZFP36L1	pEGFP-N3	
pEGFP-ZFP36L2	pEGFP-N3	

Tabelle 6: Primer der PCR und Pyrosequenzierung.

Name	Genomische Region (hg38)	Genomische Orientierung	Primer Sequenz 5'→3'	Annealing Temperatur (°C)	Amplicon (bp)
Bisulfit Pyrosequenzierung von ZFP36L1					
ZFP36L1_F	Chr.14: 68795468- 68795447	-	TTGGGGAAGTTTTAAGGAGAT	58	263
ZFP36L1_R	Chr.14: 68795710- 68795734	+	ATTTCAAATCCACTAACTTCCCTAC	58	263
ZFP36L1 nested_F	Chr.14: 68795471- 68795449	-	GGGGAAGTTTTAAGGAGATCG	55	270
ZFP36L1 nested_R	Chr.14: 68795700- 68795719	+	ACTTCCCTACCCGACGCTT	55	270
ZFP36L1 S1	Chr.14: 68795482- 68795457	-	TTTAAGGAGATCGTTAGTTTAAGAT	55	270
ZFP36L1 S2	Chr. 14: 68795593- 68795568	-	AACAACAACATGACAACAAGAACCC	55	270
ZFP36L1 S3	Chr. 14: 68795645- 68795626	-	GCTCTGAGGCTGACAAAGG	55	270
Bisulfit Pyrosequenzierung von ZFP36L2					
ZFP36L2_F	Chr.2: 43454767- 43454796	+	TAGTTTTTGTAGATGAGGGTTGTAGGAT	52	369
ZFP36L2_R	Chr.2: 43455136- 43455113	-	AATCCCTAAATAACAAACCTAATTCT	52	369
ZFP36L2 nested_F	Chr.2: 43454789- 43454807	+	GTAGGTGGGGTTGTATAG	48	336
ZFP36L2 nested_R	Chr.2: 43455104- 43455125	-	AAACCTAATTCTTTCCCAAC	48	336
ZFP36L2 S1	Chr.2: 43454828- 43454848	+	TTGTATAGAAGTTGATGGTG	48	336
ZFP36L2 S2	Chr.2: 43454877- 43454900	+	GTTAGTTTAGTATTTTAATAGT	48	336
ZFP36L2 S3	Chr.2: 43454945- 43454962	+	GGGTATGGAGGGGATAT	48	336
ZFP36L2 S4	Chr2: 43455022- 43455043	+	TTTGGTTTAGGGTATTTTTTT	48	336

Tabelle 7: TaqMan-Assays der RT-qPCR.

Genname	Katalognummer
<i>ZFP36L1</i>	Hs00245183_m1
<i>ZFP36L2</i>	Hs00272828_m1
<i>18S</i>	Hs99999901_s1
<i>GAPDH</i>	Hs02786624_g1
<i>c-Myc</i>	Hs00153408_m1
<i>BAX</i>	Hs00180269_m1
<i>BCL-2</i>	Hs01048932_g1
<i>BIRC2</i>	Hs01112284_m1
<i>BIRC3</i>	Hs00985031_g1

Tabelle 8: Benutzte Software & Internetseiten.

Firma	Software/Website
GraphPad (La Jolla, USA)	Prism 8.0
	ImageJ
Tecan (Crailsheim)	i-Control 1.7 Software
Thermo Fisher Scientific (Darmstadt)	QuantStudio™ Real-Time PCR Software
Qiagen (Hilden)	PyroMark Q24 Advanced System
	PyroMark Q24 Autoprep
Serif (Nottingham, Großbritannien)	Affinity Designer

2.1.1. Zelllinien

Grundlage der Untersuchungen war die Verwendung zweier CML-Zelllinien. Die K-562 Zelllinie wurde aus dem Pleuraerguss einer 53-jährigen an der CML erkrankten Frau gewonnen. Die LAMA-84 Zelllinie wurde einer 29-jährigen Frau, welche an der CML erkrankt war, während der Blastenkrise aus peripherem Blut entnommen. Beide Zelllinien wurden von dem Leibniz Institut der Deutschen Sammlung von Zellkulturen und Mikroorganismen (DMSZ, Braunschweig), bezogen.

2.2 Methoden

2.2.1. Zellkultur

Die K-562- und LAMA-84-Zelllinien wurden in RPMI 1640 Medium suspendiert und kultiviert. Das RPMI 1640 Medium besteht aus 10% fötalem Kälberserum und 1 % Penicillin/Streptomycin. Alle drei Tage wurde das Nährmedium bei einer Zelldichte von ca. 80 % erneuert. Dafür wurden die Zellen in Falcon-Röhrchen pipettiert und 5 min bei 200 x g zentrifugiert und das daraus resultierende Zellpellet, abhängig von der Zellzahl in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:10, in frischem Medium resuspendiert und in Zellkulturflaschen überführt. Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂.

2.2.2. Bestimmung von Zellzahlen

Um Zellzahlen für die DNA/RNA Isolation oder den Western Blot zu ermitteln, wurde die Fuchs-Rosenthal-Zählkammer verwendet. Unter einem Olympus CK2-Mikroskop wurden die Zellen gezählt und die benötigte Menge der suspendierten Zellen für 5 min bei 200 x g in einem Falcon-Röhrchen zentrifugiert und das resultierende Zellpellet weiterverwendet.

2.2.3. Einfrieren und Auftauen von Zelllinien

Zum Einfrieren kultivierter Zelllinien wurden Zellpellets in Einfriermedium (bestehend aus 90 % FCS und 10 % DMSO) resuspendiert. Die resuspendierten Zelllinien wurden in Kryoröhrchen in Einfriercontainern bei -80 °C eingefroren. Das Auftauen eingefrorener Zelllinien erfolgte durch das Aufwärmen der Kryoröhrchen in einem Wasserbad bei 37 °C. Die aufgetauten Zelllinien wurden in 7 ml Zellkulturmedium resuspendiert und 8 min bei 200 x g zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 20 ml Zellkulturmedium resuspendiert und in Zellkulturflaschen überführt und bei 37 °C inkubiert.

2.2.4. Kultivierung der K-562 & LAMA-84 Imatinib-Resistenzmodelle

Die Imatinib-Resistenzmodelle wurden mir vom Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie des UKSH zur Verfügung gestellt.

Von den K-562 und LAMA-84 CML-Zelllinien wurden Imatinib-sensitive, 0,5 µM Imatinib- und 2 µM Imatinib-resistente Zellen kultiviert. Um Resistenzen gegen 0,5 µM- und 2 µM-Imatinib zu erreichen, wurden die Zelllinien initial einer 0,1 µM Imatinib-Konzentration exponiert. Nach

zwei Wochen überlebende Zellen wurden schrittweise höheren Imatinib-Konzentrationen ausgesetzt (0,3 µM, 0,5 µM, 1 µM und 2 µM Imatinib). Die Zelllinien wiesen nachweislich keine Mutationen im *BCR-ABL1*-Gen auf. Dies sowie die Identität der Zelllinien wurde in der STR-Analyse mittels GenePrint 10 System (Promega, Madison, USA) am Institut für Humangenetik des UKSH bestätigt. Dabei wurde anhand der *short tandem repeats* der DNA eine genetische Identität erstellt. Durch die genetische Identität konnten die Zellen mit ihrer Ursprungszelle verglichen werden. Dies erfolgte, um die Reproduzierbarkeit und Qualität der Ergebnisse zu überprüfen.

2.2.5. ZFP36L1/ZFP36L2 Knockout-Zelllinienmodell

Das *ZFP36L1/ZFP36L2* Knockout-Zelllinienmodell der K-562 Zelllinie wurde mittels CRISPR/Cas9-Genomediterung (*Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated*) durch Dr. Meike Kähler generiert und für die hier beschriebenen Arbeiten zur Verfügung gestellt. Hierbei wurden die Zinkfingerdomänen von *ZFP36L1* oder *ZFP36L2* deletiert.

2.2.6. Stabile Transfektion

Transfektionen der *ZFP36L1* und *ZFP36L2* Plasmide wurden mit dem Amaxa Cell Line Nucleofector Kit V und dem Nucleofector 2b (Lonza, Köln) durchgeführt. Pro Transfektionsansatz wurden entsprechend der Herstellerangaben 1×10^6 Zellen in Transfektionsmedium (RPMI 1640 + 10% FCS, 1% Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin) mit Nucleofector-Solution und den *ZFP36L1* oder *ZFP36L2* Plasmiden in jeweils eine Küvette pipettiert. Die Küvetten wurden in den Nucleofector 2b gestellt und die Plasmide durch die Elektroporation in die DNA eingebracht. Direkt danach wurden die Küvetten in 500 µl 37°C vorgewärmtes Transfektionsmedium pipettiert und der gesamte Inhalt in 12-well-Platten überführt und bei 37 °C und 5 % CO₂ für 48 h inkubiert. 48 h nach der Transfektion wurde 800 µg/ml Geneticin (G-418) hinzugegeben. Geneticin ist ein Aminoglycosidantibiotikum, das durch die Bindung an Ribosomen und der daraus resultierenden Inhibition der Proteinbiosynthese toxisch ist. Bei einer erfolgreichen Transfektion können die Zellen, durch die Transkription, der auf dem transfizierten Plasmid vorhandenen Sequenz für die Aminoglycosidphosphotransferase, G-418 phosphorylieren und dessen toxische Wirkung inhibieren. Für die Haltung der Klone in der Zellkultur wurde die G-418 Konzentration auf 400 µg/ml halbiert. Die Klone wurden für den späteren Gebrauch mit Einfriermedium bei -80°C eingefroren.

2.2.7. DNA Isolierung

Die DNA-Isolierung der kultivierten Zellen erfolgte mit dem Gentra Puregene Cell Kit (Qiagen). Dazu wurden 2×10^6 Zellen in 300 μl Cell Lysis Solution suspendiert und gevortext, sodass die Zellen lysiert wurden. Um RNase freie DNA zu isolieren, wurde die Suspension mit 1,5 μl RNase A Solution 25 x invertiert und für 5 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben 1 min auf Eis inkubiert. Danach wurde den Proben 100 μl Protein Precipitation Solution hinzugefügt und für 20 s gevortext. Dann 1 min bei 13000 x g zentrifugiert. Es formte sich ein Pellet an Protein Präzipitat. Der daraus entstandene Überstand wurde nun vorsichtig in, mit 300 μl Isopropanol gefüllte, Röhrchen überführt. Dann wurden die Proben 50 x invertiert und bei 13000 x g für 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig verworfen und die Proben auf Löschpapier invertiert. Die Waschung der DNA erfolgte mit 300 μl 70 % Ethanol und anschließend zentrifugieren für 1 min bei 13000 x g. Der Überstand wurde verworfen und die Röhrchen auf saugfähigem Papier invertiert. Danach wurden die Proben für 15 min trocknen gelassen. Nachdem das Ethanol vollständig verdunstet war, wurde den Proben 100 μl DNA Hydration Solution hinzugefügt und für 5 s gevortext und für 1 h bei 65 °C inkubiert. Danach wurden die Proben bei Raumtemperatur inkubiert. Die DNA-Konzentrationen wurde mit dem NanoPhotometer bestimmt und direkt weiterverwendet.

2.2.8. Bisulfit Konversion

Isolierte DNA wurde mit dem EpiTect® Fast DNA Bisulfite Kit Bisulfit konvertiert. Dabei wurden unmethylierte Cytosine zu Uracilen konvertiert. Diese Konversion ermöglichte eine Quantifizierung der Methylierung (siehe 3.10). Dafür wurde 1 μg DNA mit RNase freiem Wasser, Bisulfit Solution und DNA Protect Buffer in 200 μl PCR tubes pipettiert. Die DNA-Konzentration wurde mit dem NanoPhotometer bestimmt und RNase freies Wasser hinzugefügt, sodass der Bisulfit Reaktionsansatz insgesamt 140 μl betrug.

Tabelle 9: Reaktionsansatz der Bisulfit Konversion der DNA.

DNA	1 μg (Maximal 20 μl)
RNase freies Wasser	DNA + RNase freies Wasser = 20 μl
Bisulfit Solution	85 μl
DNA Protect Buffer	35 μl

Der Bisulfit Reaktionsansatz wurde entsprechend der Herstellerangaben in den Thermocycler gestellt. Nach der Bisulfit Konversion wurde die konvertierte DNA aufgereinigt. Dafür wurden die Proben in 1,5 ml Röhrchen überführt. Danach wurde 250 µl Ethanol den Proben hinzugefügt und die Proben gevortext und anzentrifugiert. Die Proben wurden in MinElute® DNA-Säulen pipettiert. Anschließend wurden die DNA-Säulen mit Auffang-Röhrchen 1 min zentrifugiert und der Durchfluss wurde verworfen. Dann erfolgte eine Durchfluss-Zentrifugation mit 500 µl BW Puffer, welcher nach der Zentrifugation verworfen wurde. Nach einer Inkubation der DNA-Säulen mit 500 µl BD Puffer für 15 min bei Raumtemperatur wurden die DNA-Säulen 2 x mit dem BW Puffer und 1 x mit Ethanol gewaschen. Das Herauslösen der Bisulfit konvertierten DNA erfolgte durch die Hinzugabe von 15 µl EB Puffer in die DNA-Säulen, welche in neue Röhrchen gestellt und 1 min inkubiert wurden. Danach wurde die Bisulfit konvertierte DNA durch 1 min Zentrifugieren herausgelöst. Die isolierte Bisulfit konvertierte DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

2.2.9. Polymerase-Ketten-Reaktion

Von isolierter und Bisulfit-konvertierter DNA wurde in der Polymerase-Ketten-Reaktion die Gensequenzen der *ZFP36L1*- und *ZFP36L2*-Promotorregion für alle Zelllinien vervielfältigt. Zur Amplifikation der Genabschnitte wurde ein Vorwärts und ein Rückwärts Primer konstruiert und in den entsprechenden angegebenen Konzentrationen in einen Master Mix auf Eis pipettiert. Die DNA Sequenzen von *ZFP36L1* (NM_004926) und *ZFP36L2* (NM_006887.4) wurden im USCS Genom Browser ermittelt und mit dem Programm PyroMark Assay Design 2.0 designt.

Tabelle 10: Reaktionsansatz der PCR für *ZFP36L1* & *ZFP36L2*.

H2O	37,8 U
Puffer	x 10
MgCl ₂	1,5 mM
dNTPs	0,2 µM
ZFP36L1_Vorwärts Primer oder ZFP36L2_Vorwärts Primer	10 µM
ZFP36L1_Rückwärts Primer oder ZFP36L2_Rückwärts Primer	10µM
Template	2 U
Platinum Taq	0,2 U
Dimethylsulfoxid (DMSO)	0,5 U

In einem Thermocycler wurden die ausgewählten Genabschnitte der DNA durch Temperaturänderungen enzymatisch vervielfältigt. Zu Beginn erfolgte für zwei min bei 94 °C die Denaturierung. Danach wurden die folgenden drei Schritte 30 mal wiederholt: Die Denaturierung 30 s bei 94 °C, die Primer-Bindung (Annealing) 30 s bei 58 °C für *ZFP36L1* und bei 52 °C für *ZFP36L2* und die DNA-Synthese (Elongation) 30 s bei 72 °C.

Nach der ersten PCR wurde gelelektrophoretisch überprüft, ob die Genabschnitte von *ZFP36L1* und *ZFP36L2* erfolgreich amplifiziert wurden. Beim Erfolg der PCR wurde auf der ersten PCR eine *Nested* PCR durchgeführt.

Tabelle 11: Reaktionsansatz der konsekutiven PCR (*Nested* PCR) für *ZFP36L1* & *ZFP36L2*.

H ₂ O	36,3 U
Puffer	x 10
MgCl ₂	1,5 µM
dNTPs	0,2 µM
ZFP36L1_Vorwärts_Nested Primer oder ZFP36L2_Vorwärts_Nested Primer	10 µM
ZFP36L1_Rückwärts_Nested oder ZFP36L2_Rückwärts_Nested	10 µM
Template	4 U
Platinum Taq	0,2 U

Es wurden die gleichen Thermocyclereinstellungen, wie in der zu vorigen PCR, verwendet. Mit Ausnahme der Annealing Temperatur, welche für *ZFP36L1* 55°C und für *ZFP36L2* 48°C betrug. Erneut wurde der Erfolg der PCR gelelektrophoretisch überprüft und das Amplikon bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

2.2.10. Agarose-Gelelektrophorese

Mit der Agarose-Gelelektrophorese wurde nach der PCR überprüft, ob die Genabschnitte von *ZFP36L1* und *ZFP36L2* erfolgreich amplifiziert wurden. Aus diesem Grund wurden 2 % Agarose-Gel hergestellt. Dafür wurde in einem TRIS-Borat-EDTA-Puffer (TBE Puffer) 2 % Agarose durch Erhitzung gelöst und auf ca. 60 °C abgekühlt. Danach wurde 0,001 % HD Green hinzugefügt und das Gel in einer Gelkammer, mit einem Kamm zur Formung der Geltaschen, ausgehärtet. Die Proben wurden mit 6x Ladepuffer in die Geltaschen pipettiert, sowie einem 100 bp Marker als Größenstandard. Bei 120 V wurde das Gel, für 30 min laufen gelassen. Mit dem Intas iX20 Imager (Intas, Göttingen) wurde das DNA interkalierende HD Green visualisiert.

2.2.11. Pyrosequenzierung

Um mögliche Methylierungsunterschiede als potentiellen Grund für Expressionsunterschiede in den Imatinib-Resistenzmodellen zu identifizieren, wurden CpG reiche Abschnitte aus CpG Inseln von *ZFP36L1* und *ZFP36L2* mit auf DNA basierender Bisulfit Pyrosequenzierung untersucht. Die Messung der Methylierung der CpG Abschnitte wurde am PSQ48 (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Dafür wurde die DNA der K-562- und LAMA-84 Imatinib-Resistenzmodelle Bisulfit-konvertiert. Durch die Bisulfit-Konversion (siehe 3.8) wurden unmethylierte Cytosine zu Uracilen deaminiert und als Thyminde amplifiziert. Dabei bleiben methylierte Cytosine (5'-Methylcytosin) unverändert. Durch die Bisulfit-Konversion wurde somit die Methylierungsinformation in einem Sequenzunterschied wiedergegeben (C = Methyliertes Cytosin und T = unmethyliertes Cytosin), was eine Quantifizierung der DNA-Methylierung ermöglicht. Nach der Bisulfit Konversion wurden die Genabschnitte von *ZFP36L1* und *ZFP36L2* in zwei sukzessiven PCRs amplifiziert. Um die gewünschten Genabschnitte zu amplifizieren, wurden für *ZFP36L1* drei Primer und für *ZFP36L2* vier Primer designiert. Der Erfolg jeder PCR wurde gelelektrophoretisch bestätigt. Anschließend wurden die Autoprep Patronen des PSQ48 mit den Proben, dNTPs, Beads, Puffer und Sequenzierprimern, welche die einzelsträngigen PCR Produkte hybridisierten, beladen. Die Basenabfolge wurde während der Synthese des PCR Produkts durch Messung der emittierten Lumineszenz erfasst (*Sequencing by Synthesis*). Dies geschieht dadurch, dass den an Beads gebundenen, PCR Produkten nacheinander eine der vier Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP) Guanin, Cytosin, Adenin oder Thyminde hinzugefügt wurde. Wenn ein dNTP in den komplementären DNA Strang durch eine Polymerase eingebaut wurde, wird ein Pyrophosphation (PPi) beim Einbau abgespalten ($\text{DNA} + \text{dNTP} \rightarrow \text{PPi} + \text{H}^+$). Dieses Pyrophosphation und das Adenosin-5'-Phosphosulfat wurde von der Sulfurylase zu ATP und Sulfat katalysiert ($\text{PPi} + \text{APS} \rightarrow \text{ATP} + \text{SO}_4^{2-}$). Die Luciferase wiederum katalysiert ATP, Sauerstoff und Luciferin zu AMP, Phosphationen, Oxyluciferin, Kohlendioxid und Biolumineszenz ($\text{ATP} + \text{O}_2 + \text{Luciferin} \rightarrow \text{AMP} + \text{PPi} + \text{Oxyluciferin} + \text{CO}_2 + \text{hv}$ (Biolumineszenz)). Die Stärke der erfassten Biolumineszenz korreliert mit der Menge an eingebauten Nukleotiden, wodurch indirekt die Methylierungsstärke gemessen werden konnte. Durch die Apyrase wurden restliche Nukleotide und ATP abgebaut, damit das nächste dNTP hinzugegeben und eine neue Messung erfolgen konnte. Dieser Ablauf wurde vom PSQ48 wiederholt, bis die Sequenz vollständig synthetisiert wurde.

2.2.12. RNA-Isolation

Die RNA-Isolation erfolgte durch das peqGOLD TriFast-Reagenz Kit (Peglab). Hierzu wurden Zellpellets, aus 1×10^6 Zellen bestehend, in 500 μ l Trifast-Reagenz suspendiert, um eine Lyse der Zellen zu erreichen. Nach 5 min wurde 100 μ l Chloroform hinzugegeben, die Proben für 15 s gevortext und 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurden die Proben 5 min bei 12000 x g zentrifugiert, um eine Phasentrennung zu erreichen. Die obere liquide Phase wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt, 250 μ l Isopropanol für die RNA Präzipitation hinzugefügt und die Proben für 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Proben für 10 min bei 1200 x g bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Für die Aufreinigung der RNA wurde den Proben 500 μ l 75 % Ethanol hinzugefügt, die Proben gevortext, 10 min bei 12000 x g bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Waschung mit Ethanol wurde einmal wiederholt und danach das RNA Pellet an der Luft trocknen gelassen. Nach der vollständigen Trocknung wurde das RNA Pellet in 20 μ l RNase freiem Wasser resuspendiert. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch mit dem Nanophotometer gemessen und die Proben bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.2.13. Reverse Transkription

Aus den Zelllinien isolierte RNA wurde zur weiteren quantitativen Analyse zu komplementärer DNA (cDNA) revers transkribiert. Dazu wurde das Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit von Thermo Fisher Scientific verwendet. Das Kit beinhaltet den Maxima Enzyme Mix, welcher aus der Maxima Reverse Transkriptase, dem Thermo Scientific RiboLock RNase Inhibitor und dem 5x Reaction Mix, der den Reaktions Puffer, dNTPs, oligo (dT)₁₈ und random hexamer Primern enthält. 2 μ g RNA wurden mit den Komponenten des Kits zusammen pipettiert. Im Thermocycler wurde der Reaktionsansatz mit folgenden Einstellungen in cDNA umgeschrieben: Die Inkubation für 10 min bei 25 °C, die anschließende Reaktion für 30 min bei 65 °C und die Termination für 5 min bei 85 °C. Wenn die cDNA nicht direkt in der qRT-PCR verwendet wurde, dann wurde sie bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.14. Quantitative Real Time-Polymerase-Ketten-Reaktion

Um RNA-Expressionen zu messen, wurden Quantitative Real Time-Polymerase-Ketten-Reaktionen (RT-qPCR) von in cDNA umgeschriebener RNA durchgeführt. Die RT-qPCR beruht auf der Methode der Polymerase-Kettenreaktion, wobei zusätzlich eine

Fluoreszenz-Analyse integriert ist, die eine Messung der RNA-Expression ermöglicht. Der Verlauf der RT-qPCR wurde während der exponentiellen Phase der Vervielfältigung der DNA durch emittierte Fluoreszenz gemessen. Dafür wurden spezifische TaqMan-Sonden verwendet. TaqMan-Sonden (Gensonden) sind kurze DNA-Abschnitte und enthalten eine Fluorophore und einen Quencher, der das Fluoreszenzsignal des Fluorophors durch strahlungsfreie Dipol-Dipol-Wechselwirkungen unterdrückt. Die Stärke der Wechselwirkung und somit der Unterdrückung des Fluoreszenzsignals ist, nach dem Förster-Resonanzenergietransfer (FRET), von der Entfernung zwischen Donor und Akzeptor abhängig. Durch die Elongation der cDNA durch die Taq Polymerase wird die Entfernung zwischen der Fluorophore und dem Quencher vergrößert. Das hat nach dem FRET zur Folge, dass die Stärke der Wechselwirkung abnimmt, was als messbares Fluoreszenzsignal emittiert wird. Der Reaktionsansatz, bestehend aus 0,5 µl 20 x Gene Expression Assay (0,16 µl 60 x für 18 S), 5 µl 2 x TaqMan Universal Master Mix 2 ohne UNG von Thermo Fisher Scientific, 0,5 µl cDNA und 4 µl H₂O (Für 18 S 4,34 µl), wurde in 96 well-Platten pipettiert versiegelt, gevortext und anzentrifugiert. Es wurden am QuantStudio 7 Triplikate der Proben, sowie Negativ Kontrollen (no template control) gemessen. Die gemessenen Fluoreszenzsignale wurden über die $\Delta\Delta C_t$ -Methode ausgewertet.

2.2.15. Zellyse, Proteinisolierung & Proteinbestimmung

Um mit dem Western Blot Proteinlevel in den untersuchten Zelllinien zu bestimmen, wurden Zellpellets, aus 2×10^6 Zellen bestehend, mit 1 x PBS gewaschen und mit denaturierendem Lysepuffer (20 mM TRIS, pH 7.4; 2 % Natriumdodecylsulfat (SDS) und 1 % Proteaseinhibitor) für 5 min bei 95 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben durch zweimaliges Sonifizieren für 5 s im Ultraschallbereich lysiert. Danach wurden die Proben für 15 min bei 13000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die dadurch erzielte Phasentrennung bildete einen oberen löslichen Teil und einen unteren Teil mit unlöslichen Bestandteilen. Der obere lösliche Teil wurde zur weiteren Verwendung und Proteinbestimmung in Eppendorf-Tubes pipettiert.

Die Messung der Proteinkonzentrationen erfolgte mit der Bradford-Methode mittels Roti-Nanoquant-Reagenz (Carl Roth). Dafür wurden die Proben und 1:30 mit H₂O, sowie 5 µl Standard (0,1 mg/ml) mit 65 µl H₂O verdünnt. In Küvetten wurden jeweils 20 µl Standard oder Probe oder H₂O als Kontrolle und 980 µl 1:5 Dye-Reagent gefüllt. Die Küvetten wurden gevortext und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte die spektrometrische Messung bei 595 nm. Die Proteinkonzentration wurde mit folgender Gleichung berechnet: $\text{Konzentration der Probe} = \frac{\text{Extinktion der Probe} \times \text{Konzentration des Standards}}{\text{Extinktion des Standards}} \times 30$.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte in 12 % Polyacrylamidgelen, welche als Sieb in der gelektrophoretischen Auftrennung fungierten. Hierfür wurde den Proben Sample Buffer hinzugefügt und danach Natriumdodecylsulfat (SDS) versetzt. Um Disulfidbrücken aufzulösen, wurde den Proben als Reduktionsmittel Mercaptoethanol hinzugefügt. Dafür wurde den Proben 10-20 µg Protein in 5 x Probenpuffer (60 mM TRIS pH 6.8, 25 % Glycerol, 2 % SDS, 14,4 mM β-Mercaptoethanol) hinzugegeben und bei 95 °C für 5 min inkubiert und in die Geltaschen geladen. Erst wurden die Gele bei einer elektrischen Spannung von 100 V für 15 min laufen gelassen und danach bei 150 V, bis die Lauffront die Gelkante erreichte. Der Transfer auf die Polivinylidendifluorid-Membranen (Millipore, Schwalbach) erfolgte bei 43 mA für 60 min pro Gel. Nachdem die Membranen mit 4 % Milchpulver, gelöst in TBST (TRIS-buffered saline with Tween-20), blockiert wurden, erfolgte die Inkubation mit den primären Antikörpern. Von den WB wurde mit dem Programm ImageJ die jeweilige Densitometrie ausgewertet und auf das Protein GAPDH normalisiert. Die verwendeten Antikörper wurden in Tabelle 4 aufgelistet.

2.2.16 BrdU-Proliferationsassay

Mit dem BrdU-Proliferations-Assay (Calbiochem, Darmstadt) wurde die Proliferationsrate im *ZFP36L1/ZFP36L2* Knockout-Zelllinienmodell untersucht. Dafür wurde Zellen Bromodesoxyuridin (BrdU), ein synthetisches Nukleosid Analogon von Thymidine, hinzugegeben, um durch dessen Einbau in die DNA die Proliferationsrate bestimmen zu können. Der Nachweis vom BrdU in neu synthetisierte DNA erfolgte durch einen BrdU-Antikörper im Rahmen eines Immunassays. Dies ermöglichte die Quantifizierung des gebundenen BrdU Antikörpers und somit eine Messung der Proliferationsrate. Es wurden 2×10^4 Zellen pro 100 µl Medium in 96-well-Platten ausgesät und mit 20 µl BrdU-Label (1:2000 in Zellkulturmedium verdünnt) für 24 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die 96-well-Platten für 10 min bei 200 x g zentrifugiert und die Überstände wurden verworfen. Anschließend wurden die Zellen 30 min mit Fixative Denaturing Solution fixiert, die Überstände wurden erneut verworfen und die Zellen mit 100 µl Anti-BrdU-Antikörper (1:100 in Antibody Dilution Buffer verdünnt) für eine 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben dreimal mit 1:20 verdünntem Wash Buffer gewaschen und 30 min mit 100µl Peroxidase Goat Anti-Mouse IgG HRP Conjugate inkubiert (1:1000 in Conjugate Diluent und Filtration durch einen 0,2 µm Filter). Danach wurden die Proben vier weitere Male gewaschen, davon drei Waschungen mit dem Wash Buffer und eine mit dH₂O. Über eine Farbreaktion erfolgte der Nachweis des an BrdU gebundenen Antikörpers. Dazu wurden die Zellen mit 100 µl Substrate Solution 15 min im Dunklen inkubiert. Am Ende wurde die Farbreaktion mit

100 µl Stop Solution gestoppt. Eine spektrometrische Quantifizierung wurde bei 450 nm und 540 nm am Tecan-Reader durchgeführt.

2.2.17. Real Time-Glo Annexin V and Necrosis Assay

Durch das *Real Time-Glo Annexin V and Necrosis Assay* (Promega) wurde die Apoptoserate im *ZFP36L1/ZFP36L2* Knockout-Zelllinienmodell bestimmt. In intakten Zellen ist Phosphatidylserin (PS), ein Phospholipid, auf dem inneren Blatt der Zellmembran lokalisiert. Mit Beginn der Apoptose transloziert das PS auf das äußere Blatt der Zellmembran. Das PS bindet dann an Annexin V-LgBit und Annexin V-SmBit, welche komplementäre Untereinheiten der NanoBit Luziferase enthalten, die bei ihrer Fusion ein Lumineszenz-Signal erzeugen. Beim Eintritt in die Nekrose hingegen ist die Zellmembran nicht mehr intakt und es entsteht, durch einen Zellmembran impermeablen DNA-Farbstoff, ein Fluoreszenzsignal. Die durch einen plattenbasierten Multimode-Reader detektierten Lumineszenz- und Fluoreszenzsignale ermöglichten eine Quantifizierung und Differenzierung der Apoptose und Nekrose. Für die Durchführung des Assays wurde ein 2x Detection Reagent bestehend aus Annexin V-NanoBit Substrate, CaCl₂, Necrosis Detection Reagent, Annexin V-SmBit, Annexin V-LgBit entsprechend der Herstellerangaben verdünnt. Es wurden 1×10^4 Zellen/50 µl Medium des *ZFP36L1/ZFP36L2* Knockout-Zelllinienmodells in 96-well-Platten ausgesät und 100 µl vom 2x Detection Reagent dazu pipettiert. Die 96-well-Platten wurden für 72 h bei 37 °C inkubiert und Messungen erfolgten nach 0 h, 24 h, 48 h und 72 h am Tecan Reader bei 485 nm und 525 nm.

2.2.18. Viabilitätsassay

Das WST-1-Viabilitätsassay wurde am *ZFP36L1/ZFP36L2* Knockout-Zelllinienmodell durchgeführt und beruht auf der Umwandlung des Tetrazolium Salzes WST-1 zu Formazan durch mitochondriale Dehydrogenasen. Im Gegensatz zu WST-1 kann Formazan spektrometrisch gemessen werden und dient dadurch als Messwert für die Aktivität der mitochondrialen Atmungskette. Die Aktivität der mitochondrialen Atmungskette wurde deshalb als Maß der Viabilität der Zellen genommen. Dafür wurden jeweils 5×10^4 Zellen in 100 µl Zellkulturmedium in 96 well-Platten ausgesät und 24-48 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurde den Proben 10 µl WST-1 Reagenz hinzugefügt, die Proben geschwenkt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte die spektrometrische Auswertung des zu Formazan umgewandelten WST-1 bei 440 nm und 600 nm am Tecan-Reader durchgeführt.

2.2.19. Statistische Auswertung

Soweit nicht anders beschrieben erfolgte die statische Auswertung in der *Two-Way-Anova* mit nachfolgendem Dunnet's Test. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

3. Ergebnisse

Um Rückschlüsse auf eine mögliche Rolle der Zink Finger Proteine *ZFP36L1* und *ZFP36L2* in der Imatinib-Resistenz von CML-Zellen ziehen zu können, wurden K-562 und LAMA-84 CML-Zelllinien, die eine stabile Resistenz gegenüber 0,5 μM bzw. 2 μM Imatinib entwickelt hatten, hinsichtlich der mRNA-Expression, dem Proteinlevel und der Methylierung von Promotorregionen von *ZFP36L1* und *ZFP36L2* untersucht.

Danach wurde ein *ZFP36L1/ZFP36L2* Knockout-Zelllinienmodell hinsichtlich der Zellviabilität, veränderter Proteinlevel und des Expressionsverhaltens von *Target* mRNAs von *ZFP36L1* und *ZFP36L2* untersucht. Das Expressionsverhalten der *Target* mRNAs wurde dann nach einem *Rescue* der jeweils defizienten Gene erneut gemessen.

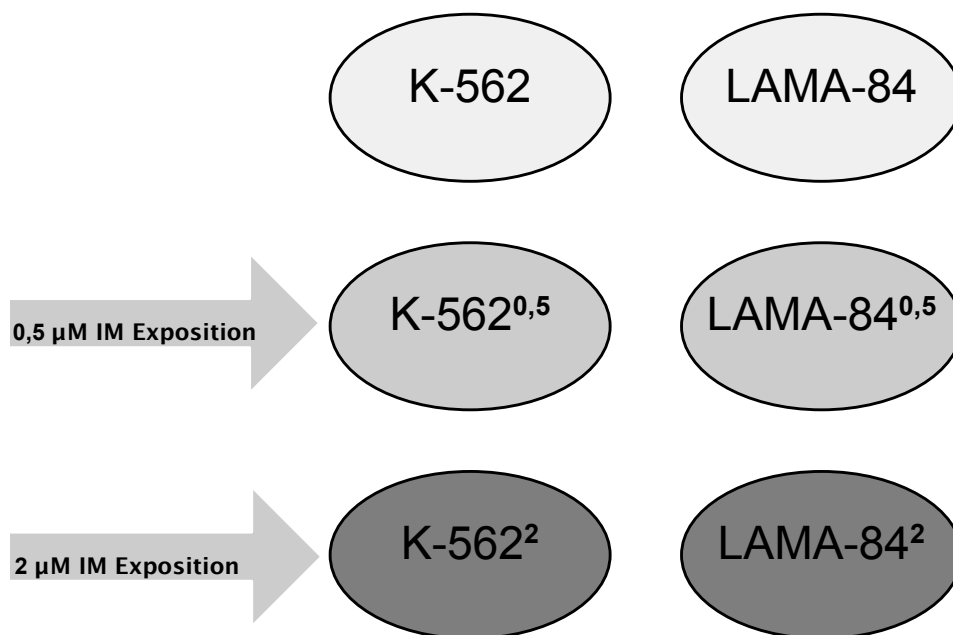


Abbildung 4: K-562 & LAMA-84 Imatinib-Resistenzmodell. K-562: Imatinib-sensitive K-562 Zellen; K-562^{0,5}: 0,5 μM Imatinib-resistente K-562 Zellen; K-562²: 2 μM Imatinib-resistente K-562 Zellen; LAMA-84: Imatinib-sensitive LAMA-84 Zellen; LAMA-84^{0,5}: 0,5 μM Imatinib-resistente LAMA-84 Zellen; LAMA-84²: 2 μM Imatinib-resistente LAMA-84 Zellen.

0,5 μM Imatinib-resistente und 2 μM Imatinib-resistente Zelllinien wurden durch langsam steigende Imatinib Konzentrationen generiert und waren nach Erreichen der Imatinib-Resistenz kontinuierlich 0,5 μM oder 2 μM Imatinib ausgesetzt.

3.1. Expression und epigenetische Veränderung von *ZFP36L1* & *ZFP36L2* bei der Entstehung der *in-vitro*-Imatinib-Resistenz

3.1.1. Differenzielle Expression von *ZFP36L1* & *ZFP36L2*

Zunächst wurde der Frage nachgegangen, ob sich die mRNA-Expression und die Proteinlevel von *ZFP36L1* und *ZFP36L2* bei der Entstehung der Imatinib-Resistenz von K-562- und LAMA-84-Zelllinien verändert.

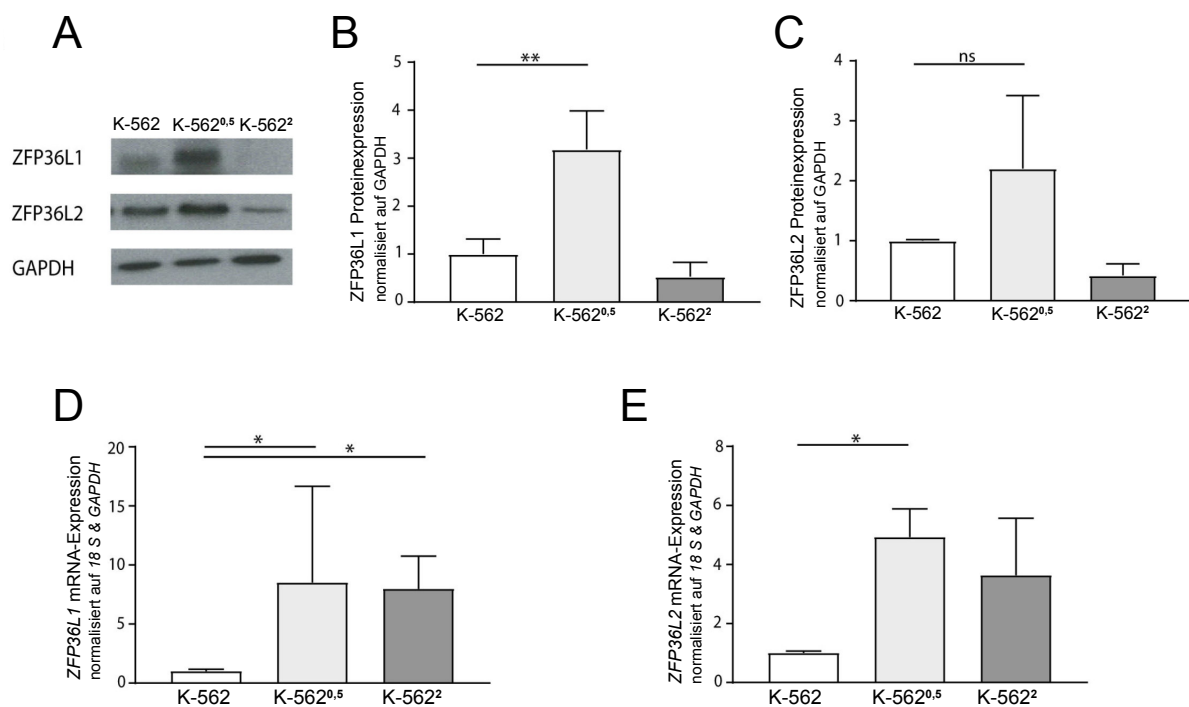


Abbildung 5: *ZFP36L1* & *ZFP36L2* Expression im K-562 Imatinib-Resistenzmodell. (A) Western Blot von *ZFP36L1*, *ZFP36L2* und GAPDH; (B) Densitometrie von *ZFP36L1*; (C) Densitometrie von *ZFP36L2*; (D) *ZFP36L1* mRNA-Expression; (E) *ZFP36L2* mRNA-Expression.

ZFP36L1 wies ein 3-fach erhöhtes ($p=0,003$) Proteinlevel in K-562^{0,5}-Zelllinien im Vergleich zu Imatinib-naiven K-562-Zellen auf. Auch zeigte *ZFP36L2* in den K-562^{0,5} ein erhöhtes Proteinlevel, dieses war im Vergleich zu den Imatinib-naiven K-562-Zellen jedoch nicht signifikant. In den K-562² waren beide Proteine hingegen geringer exprimiert ($p=n.s.$) als in den Imatinib-naiven Zellen (Abbildung 5, B & C). In K-562^{0,5} war die mRNA-Expression von *ZFP36L1* 8-fach erhöht ($p=0,03$) und von *ZFP36L2* 5-fach erhöht ($p=0,04$) (Abbildung 5, D & E). Die *ZFP36L1* mRNA-Expression war in den K-562² 7-fach erhöht ($p=0,04$). Anders als die *ZFP36L2* mRNA-Expression, welche in den K-562² erhöht, aber nicht signifikant war.

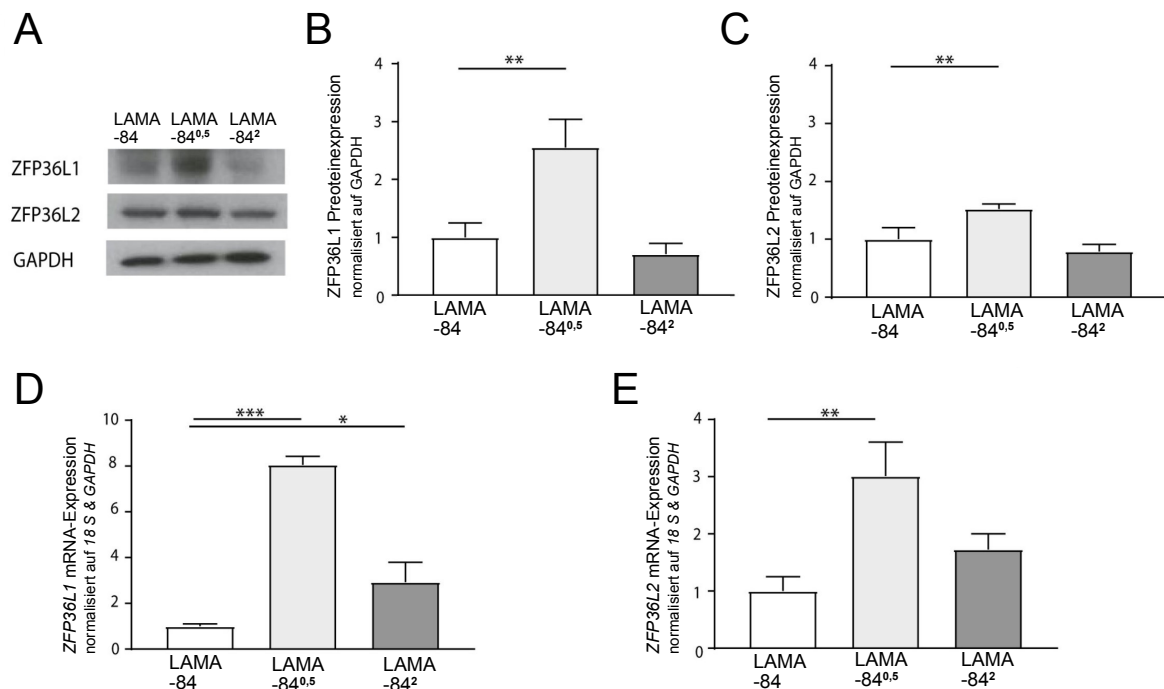


Abbildung 6: ZFP36L1 & ZFP36L2 Expression im LAMA-84 Imatinib-Resistenzmodell. (A) Western Blot von ZFP36L1, ZFP36L2 und GAPDH; (B) Densitometrie von ZFP36L1; (C) Densitometrie von ZFP36L2; (D) ZFP36L1 mRNA-Expression; (E) ZFP36L2 mRNA-Expression.

Ähnliche Expressionskorrelationen ließen sich im LAMA-84 Imatinib-Resistenzmodell beobachten. Das ZFP36L1 und ZFP36L2 Proteinlevel war in den LAMA-84^{0,5} 2,5- und 1,5-fach erhöht (ZFP36L1: $p = 0,002$; ZFP36L2: $p = 0,008$, Abbildung 6, D & E). In den LAMA-84² sank das Proteinlevel von ZFP36L1 und ZFP36L2 hingegen unter die Proteinexpression der Imatinib-naiven LAMA-84. Die mRNA-Expression von ZFP36L1 und ZFP36L2 war in den LAMA-84^{0,5} 8- und 3-fach erhöht (ZFP36L1: $p < 0,001$; ZFP36L2: $p = 0,002$, Abbildung 6, B & C). In den LAMA-84² hingegen war die mRNA-Expression nur von ZFP36L1 1,8-fach erhöht (ZFP36L1: $p = 0,02$, Abbildung 6, D).

In beiden Imatinib-Resistenzmodellen zeigte sich, dass die ZFP36L1 und ZFP36L2 Expression und das Proteinlevel in den 0,5 μ M Imatinib-resistenten Zellen erhöht war und dagegen in den 2 μ M Imatinib-resistenten Zellen verringert war. Zusammenfassend ist zu sagen, dass ZFP36L1 und ZFP36L2 in beiden Imatinib-Resistenzmodellen differenziell exprimiert waren.

3.1.2. Hypermethylierung von *ZFP36L2* in der Imatinib-Resistenz

Um zu untersuchen, ob eine Hypo- oder Hypermethylierung die beschriebene differenzielle Expression von *ZFP36L1* und *ZFP36L2* erklären könnten, wurde mit auf DNA basierender Bisulfit-Pyrosequenzierung die Methylierung *upstream* der *ZFP36L1* und *ZFP36L2* Promotorregionen gemessen.

Es wurden CpG reiche Regionen ausgewählt, da sogenannte CpG Inseln vor Promotorregionen von Onko- oder Tumorsuppressorgenen in malignen Neoplasien häufig Hypo- oder Hypermethyliert sind und Gene dadurch an- oder ausgeschaltet werden können³⁶. Eine Hypermethylierung von CpG Inseln kann zu einer Inaktivierung von Tumorsuppressor-Genen sowie Genen der Zellzyklus-Regulation führen. Dabei wird die Genexpression auf der Ebene der Transkription gestoppt. Dabei spielt es eine Rolle, zu welchem Anteil ein CpG-Dinukleotid methyliert ist. Der Anteil der Methylierung wurde in Prozent angegeben.

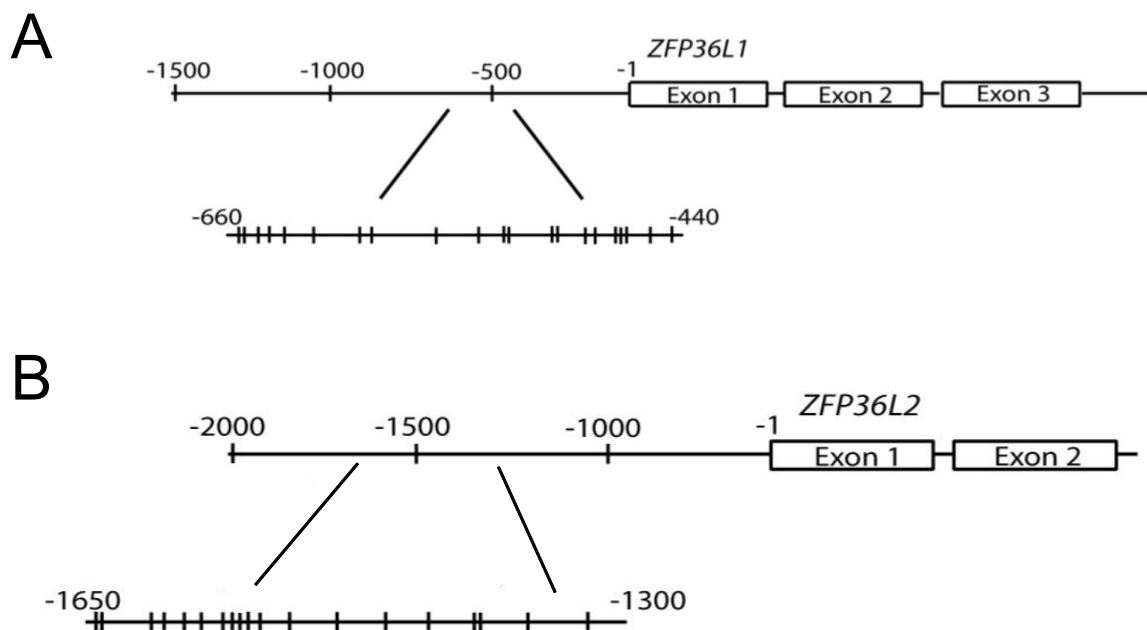


Abbildung 7: *ZFP36L1* & *ZFP36L2* Promotorregion. (A) Darstellung der 21 analysierten CpGs *upstream* der *ZFP36L1* Promotorregion und (B) der 19 CpGs *upstream* der *ZFP36L2* Promotorregion.

Für *ZFP36L1* wurden 21 CpGs zwischen den Basenpaaren -660 bis -440 *upstream* der Promotorregion analysiert und für *ZFP36L2* 19 CpGs zwischen den Basenpaaren -1650 bis -1300 *upstream* der Promotorregion.

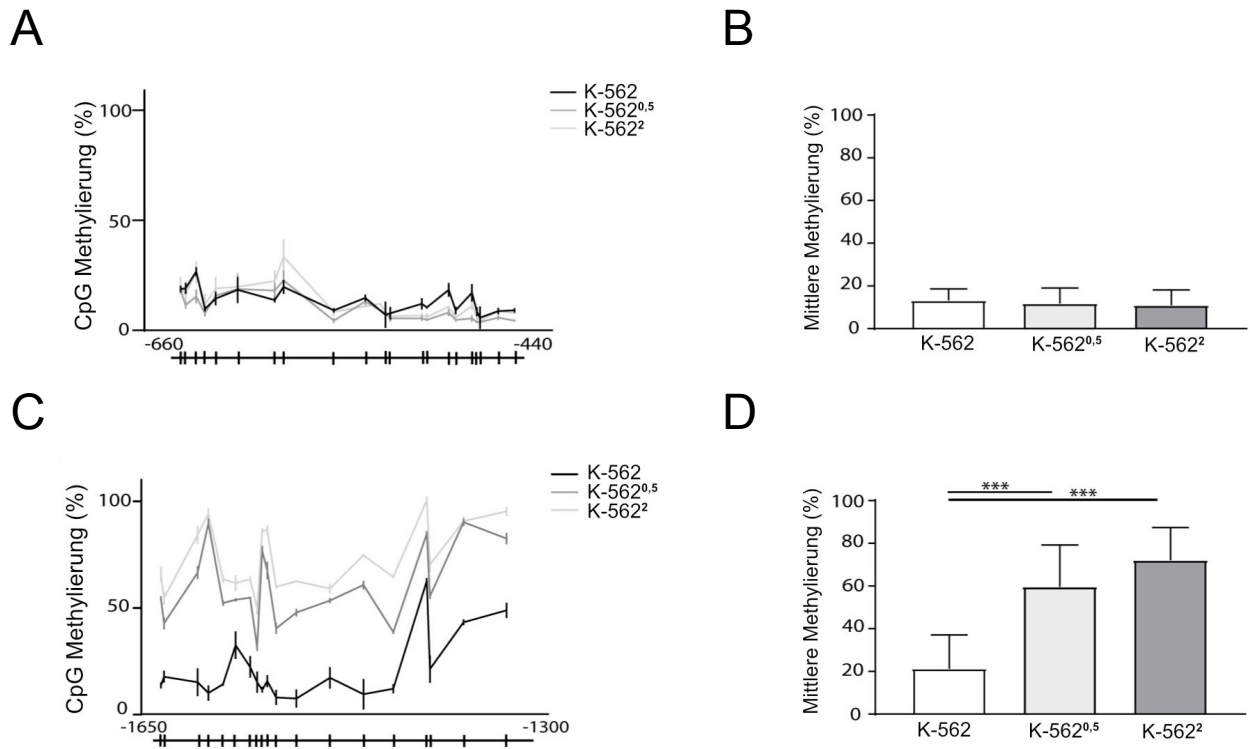


Abbildung 8: Methylierung der *ZFP36L1* & *ZFP36L2* Promotorregionen im K-562 Imatinib-Resistenzmodell. Methylierung der einzelnen CpGs der (A) *ZFP36L1* und (C) *ZFP36L2* Promotorregion. Mittlere Methylierung der CpGs der (B) *ZFP36L1* und (D) *ZFP36L2* Promotorregionen.

Das K-562 Imatinib-Resistenzmodell wies Unterschiede in der Methylierung von *ZFP36L2* auf. Die 19 gemessenen CpGs der *ZFP36L2* Promotorregion waren in den K-562^{0.5} und den K-562² zu 60% und 70% methyliert. Im Gegensatz zu *ZFP36L1*, in dieser Promotorregion, wurden keine Methylierungsunterschiede gemessen.

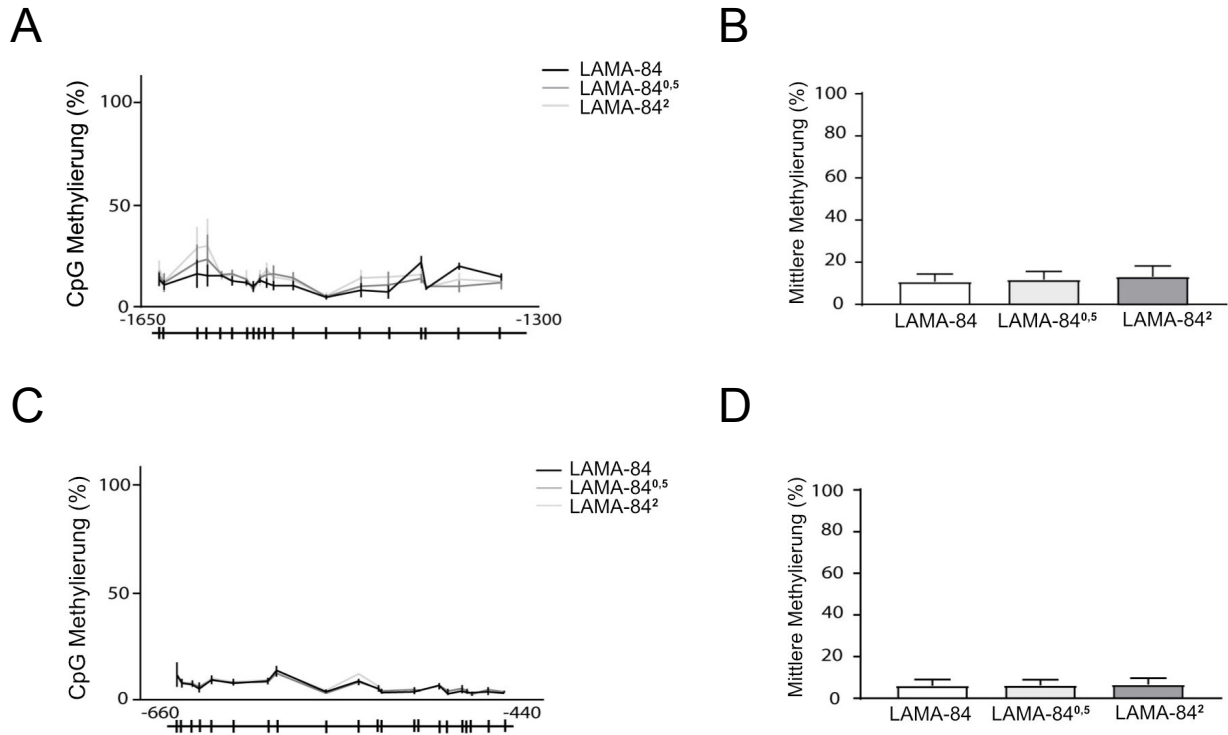


Abbildung 9: Methylierung der *ZFP36L1* & *ZFP36L2* Promotorregionen im LAMA-84 Imatinib-Resistenzmodell. Methylierung der einzelnen CpGs der (A) *ZFP36L1* und (C) *ZFP36L2* Promotorregion. Mittlere Methylierung der CpGs der (B) *ZFP36L1* und (D) *ZFP36L2* Promotorregionen.

Im Gegensatz zum K-562 Imatinib-Resistenzmodell wurden keine Methylierungsunterschiede im LAMA-84 Imatinib-Resistenzmodell gemessen. Die 21 gemessenen CpGs der *ZFP36L1* Promotorregion wiesen keine Methylierungsunterschiede auf und die 19 gemessenen CpGs der *ZFP36L2* Promotorregion wiesen ebenso keine Methylierungsunterschiede auf.

Angeichts der Methylierung konnte nur von *ZFP36L2* und nur im K-562 Imatinib-Resistenzmodell eine starke Hypermethylierung festgestellt werden.

3.2. ZFP36L1/ZFP36L2 Knockout-Zelllinienmodell

Um zu untersuchen, wie die ZFP36L1- und ZFP36L2-Defizienz die K-562 Zelllinie beeinflusst, wurde ein CRISPR/Cas9-genom-editiertes ZFP36L1/ZFP36L2 Knockout-Zelllinienmodell hinsichtlich der Zellfitness, der Proteinlevel und Target mRNA's untersucht und mit dem Wild Typ verglichen.

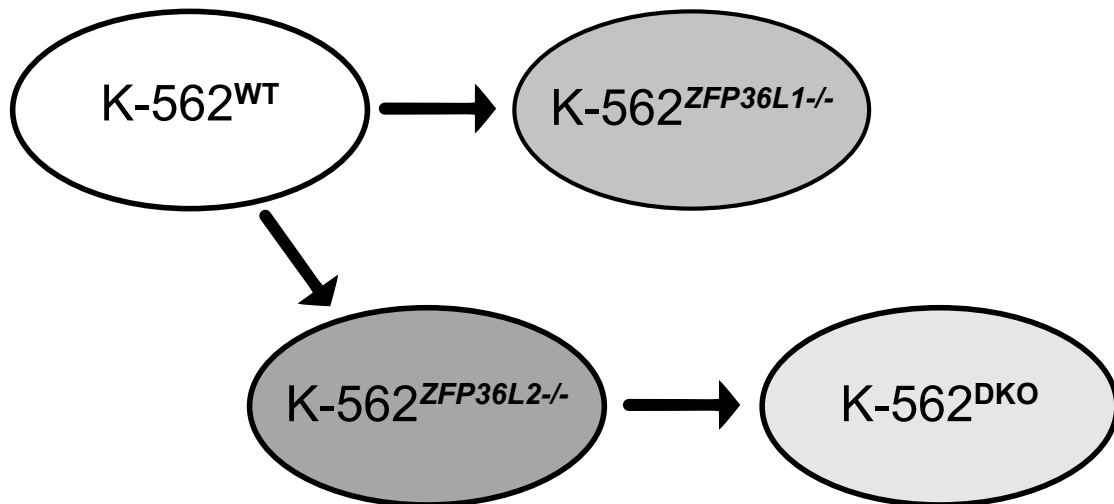


Abbildung 10: K-562 ZFP36L1/ZFP36L2 Knockout-Zelllinienmodell. Schematische Darstellung des ZFP36L1/ZFP36L2 Knockout-Zelllinienmodells. K-562^{WT}: Wild Typ der K-562 CML-Zelllinie; K-562^{ZFP36L1}^{-/-}: ZFP36L1 defiziente K-562 CML-Zelllinie; K-562^{ZFP36L2}^{-/-}: ZFP36L2 defiziente K-562 CML-Zelllinie; K-562^{DKO}: ZFP36L1 und ZFP36L2 defiziente K-562 CML-Zelllinie.

3.2.1. Einfluss der ZFP36L1/ZFP36L2 Defizienz auf die Zellviabilität, Zellproliferation und Apoptose

Zur Bestimmung der Zellviabilität wurde mittels des WST-1-Assays die Aktivität der mitochondrialen Atmungskette gemessen (siehe 2.2.18). Die Zellproliferation wurde im BrdU-Proliferationsassay gemessen. BrdU ist ein Nukleosid Analogon, welcher in neu synthetisierte DNA eingebaut wird. Durch einen BrdU-Antikörper konnte dann in einem Immunassay die Proliferation quantifiziert werden (siehe 2.2.16). Mit dem Real Time-Glo Annexin V and Necrosis Assay wurde die Apoptose gemessen (siehe 2.2.17).

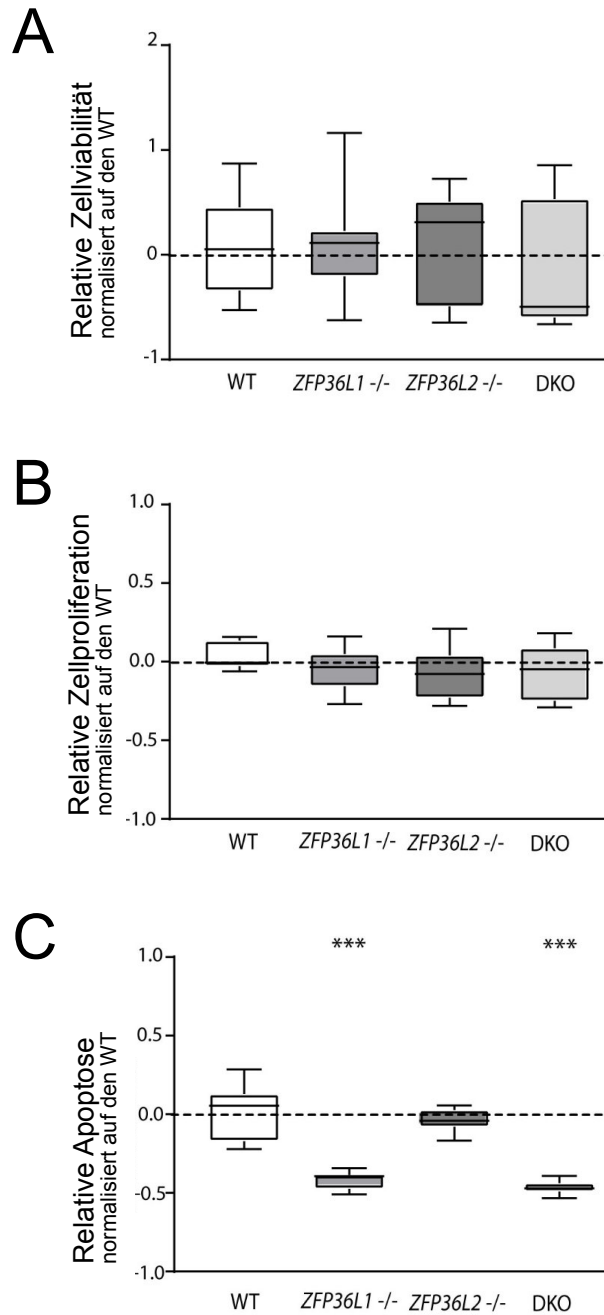


Abbildung 11: Zellfitness im ZFP36L1/ZFP36L2 Knockout-Zelllinienmodell.

(A) Relative Zellviabilität = WST-1 Assay; (B) Relative Zellproliferation = BrdU Assay; (C) Relative Apoptose = RealTime-Glo Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay.

Der K-562^{ZFP36L1-/-} und der K-562^{DKO} gingen beide zu etwa 0,5-Fach verringert in den programmierten Zelltod der Apoptose, im Vergleich zum K-562 Wild Typ (WT).

Die Viabilität und Proliferation waren in den K-562^{ZFP36L1-/-}, den K-562^{ZFP36L2-/-} und dem K-562^{DKO} im Vergleich zum WT nicht signifikant verändert.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass nur eine Veränderung im Verhalten der Apoptose gemessen wurde.

3.2.2. Charakterisierung proliferativer & apoptotischer Signalwege

Um die Rolle von *ZFP36L1/ZFP36L2* auf ausgewählte Signalwege der Proliferation oder der Apoptose zu untersuchen, wurde die Proteinexpression von Akt, Erk, p21 und c-Myc (als Proteine der Proliferation) und BCL-2, BIRC2, BIRC3, BAX und Caspase3 (als Proteine der Apoptose) in *ZFP36L1/ZFP36L2*-Knockout-Zellen und Wildtyp-Zellen mittels Western-Blotting bestimmt.

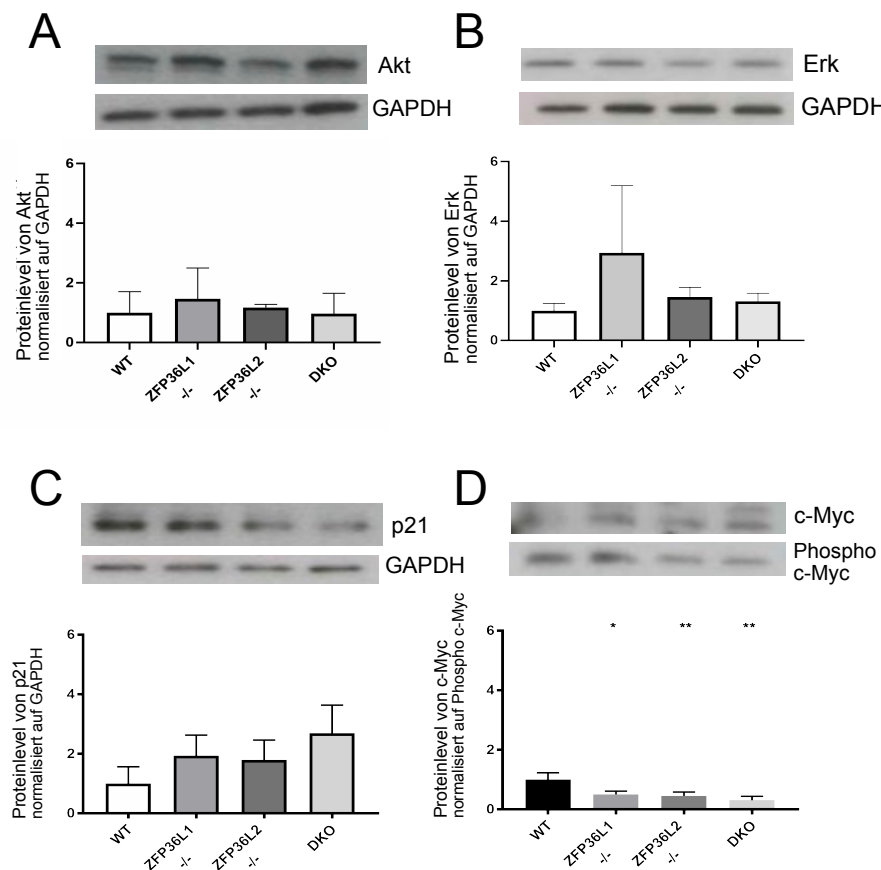


Abbildung 12: Expression von an proliferativen Signalwegen beteiligter Proteine im *ZFP36L1/ZFP36L2* Knockout-Zelllinienmodell. (A) Oben sind die Western Blot von Akt, (B) Erk, (C) p21, (D) c-Myc und darunter die jeweilige Densitometrie. C-Myc wurde anders dargestellt, da es auf Phospho c-Myc anstatt GAPDH normalisiert wurde.

Es wurde eine Reduktion des Proteinlevels um die Hälfte des WT von c-Myc in den K-562^{*ZFP36L1*^{-/-}}, den K-562^{*ZFP36L2*^{-/-}} und im K-562^{DKO} mit einer leicht abnehmenden Tendenz

gemessen. Das Proteinlevel von Erk war im K-562^{ZFP36L1-/-} 3-fach erhöht, aufgrund der großen Standardabweichung aber nicht signifikant. Die Proteinlevel von Akt, Erk und p21 wiesen keine signifikanten Unterschiede auf.

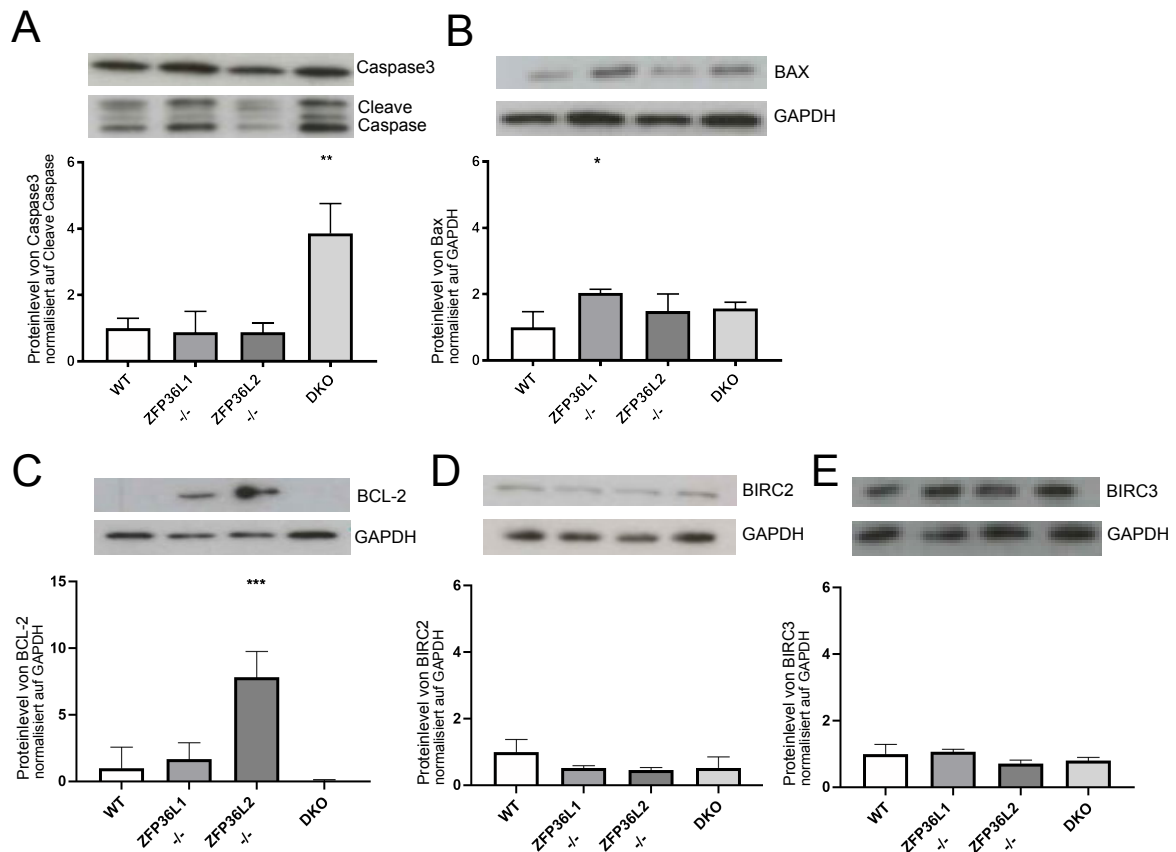


Abbildung 13: Expression von an der Apoptose beteiligten Signalwegen im ZFP36L1/ZFP36L2 Knockout-Zelllinienmodell. Pro-apoptotische Proteine (A) Caspase3 und (B) BAX; Anti-apoptotische Proteine (C) BCL-2, (D) BIRC2 und (E) BIRC3. Oben sind die Western Blot zu sehen und darunter die jeweilige Densitometrie.

Das Proteinlevel der pro-apoptotischen Caspase3 war im K-562^{DKO} 3,9-fach erhöht. Das pro-apoptotische Protein BAX zeigte im K-562^{ZFP36L1-/-} eine 2-fach erhöhte Proteinexpression. Bei den anti-apoptotischen Proteinen war BCL-2 im K-562^{ZFP36L2-/-} 7-fach erhöht. Bei BIRC2 und BIRC3 hingegen wurden keine signifikanten Unterschiede im Proteinlevel gemessen.

Signalwege von Proteinen, die an der Apoptose beteiligt sind, zeigten im ZFP36L1/ZFP36L2 Knockout-Zelllinienmodell veränderte Proteinlevel.

3.2.3 Expression ausgewählter *Target*-Gene beteiligt an der Apoptose in der Defizienz & im Rescue

Aufgrund der verringerten Apoptose im K-562^{ZFP36L1-/-} und im K-562^{DKO}, sowie der Dysregulation von apoptotischen Signalwegen, wurde zunächst eine *in-silico*-Recherche apoptotischer Target mRNA's von *ZFP36L1* und *ZFP36L2* durchgeführt.

Die ausgewählten mRNAs wurden im *ZFP36L1/ZFP36L2* Knockout-Zelllinienmodell auf Expressionsunterschiede untersucht. Anschließend wurden die *ZFP36L1* und *ZFP36L2* defizienten Zellen mit ihrem jeweiligen defizienten Gen mit dem Nucleofector Kit transfiziert, um mit diesem „Rescue“ den Knock-out zu verifizieren. Nach der erfolgreichen Transfektion wurde die mRNA-Expression erneut gemessen und die Expressionen wurden in Abbildung 14 gegenübergestellt.

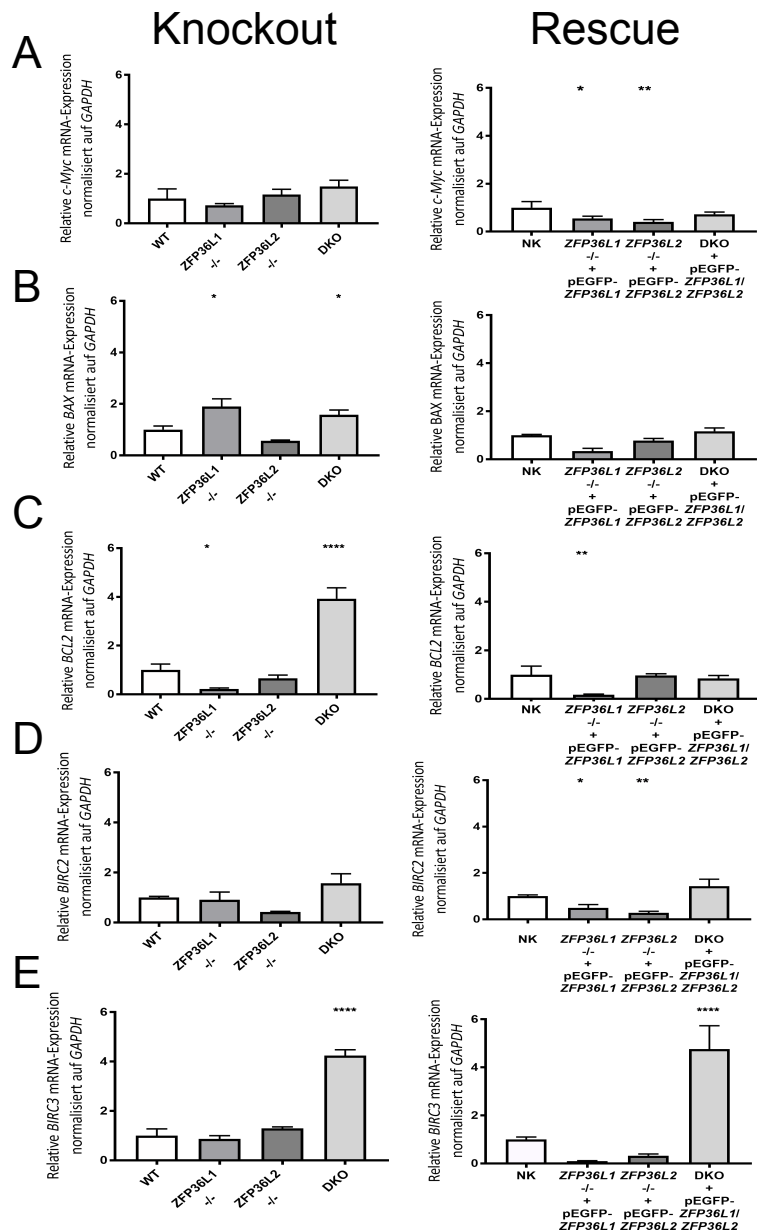


Abbildung 14: ZFP36L1/ZFP36L2 Target-Genexpression im ZFP36L1/ZFP36L2 Knockout & Rescue. (A) mRNA-Expression von c-Myc, (B) BAX, (C) *BC L*-2, (D) *BIRC*2 und (E) *BIRC*3. Auf der linken Seite ist die mRNA-Expression im ZFP36L1/ZFP36L2 Knockout und auf der rechten Seite die mRNA-Expression im *Rescue*.

Die *BAX* mRNA war im K-562^{ZFP36L1-/-} und im K-562^{DKO} etwa 2-fach erhöht. Die verstärkte Expression konnte im *Rescue* nicht mehr gemessen werden. Die Expression der *BCL*-2 mRNA war im K-562^{ZFP36L1-/-} reduziert und im K-562^{DKO} wiederum 4-fach erhöht. Im *Rescue* war die erhöhte *BCL*-2-Expression des K-562^{DKO} nicht mehr zu messen. Die reduzierte *BCL*-2-Expression im K-562^{ZFP36L1-/-} wurde auch im *Rescue* gemessen. Die *BIRC*2 mRNA war im Knockout unverändert, jedoch im ZFP36L1 und ZFP36L2 *Rescue* vermindert exprimiert. Im K-562^{DKO} war die *BIRC*3-Expression 4-fach erhöht und diese verstärkte Expression wurde auch im *Rescue* gemessen.

4. Diskussion

Therapie-Resistenzen gegenüber Imatinib sind eine Limitation der erfolgreichen Behandlung der CML. In etwa einem Drittel der Therapieresistenzen gegenüber dem TKI Imatinib spielen BCR-ABL-unabhängige Mechanismen eine Rolle und gehen mit einer schlechteren Prognose für die Patienten einher, da teilweise auch die TKI der zweiten und dritten Generation nicht ausreichend wirken¹⁹.

Die veränderte Expression und Aktivität von Tumorsuppressorgenen, mikro-RNA-Interaktionen sowie das zelluläre Ruhestadium der Quieszenz werden im Zusammenhang mit der Tyrosinkinase-unabhängigen Resistenz diskutiert. Die molekularen Mechanismen, die hinter der BCR-ABL-unabhängigen Resistenz stecken sind aber nur unzureichend geklärt. Es ist wichtig diese zu verstehen, um dann möglicherweise Therapie-Resistenzen vorhersagen zu können oder in der Lage zu sein, Therapie unterstützende Medikamente zu geben, welche das Ansprechen auf diese Zielgerichtete Tumorthérapie verlängern und Resistenzentwicklungen verhindern könnten^{12,37}.

Aufgrund der nachgewiesenen mikro-RNA-212/ABCG2 Interaktion³⁸, welche zur Entwicklung Imatinib resistenter Zellen beiträgt stand die Hypothese im Raum, dass auch die Zink Finger Proteine *ZFP36L1* und *ZFP36L2* eine Rolle spielen könnten. Ebenso wie die mikro-RNAs regulieren sie die Genexpression posttranskriptional und können Signalwege alterieren und könnten darüber Resistenzen erzeugen^{39,40}. In Knockout Mausmodellen wurde den Zink-Finger-Proteinen eine Rolle in der Hämatopoese und Leukämogenese nachweisen^{25,41,30} sowie dass sie das zelluläre Ruhestadium der Quieszenz induzieren können^{32,42}. Aufgrund ihrer verringerten Expression in soliden Tumoren unterschiedlichen Gewebeursprungs werden sie als Tumorsuppressoren diskutiert⁴³.

In dieser Arbeit wurde daher ein Modellsystem mit dem Ziel aufgebaut, die Rolle der Zink-Finger-Proteine *ZFP36L1* und *ZFP36L2* bei der Entstehung einer BCR-ABL unabhängigen Imatinib-Resistenz zu untersuchen.

4.1 *ZFP36L1* und *ZFP36L2* Dysregulation in der Entwicklung der *in vitro* Imatinib-Resistenz gegenüber Imatinib

Da die Zink Finger Proteine *ZFP36L1* und *ZFP36L2* das Stadium Quieszenz induzieren können, ihre Targetgene für Anti-apoptotische Proteine kodieren und sie essenziell für das Ansprechen auf Chemotherapeutika sein können, könnten sie potenziell auch eine Rolle in der BCR-ABL unabhängigen Resistenzentwicklung spielen.

Obwohl die endogene Expression der Zink Finger Proteine in Tumorzellen niedrig ist, konnte in dieser Arbeit in den K-562 und LAMA-84 Imatinib-Resistenzmodellen eine Dysregulation von *ZFP36L1* und *ZFP36L2* beobachtet werden.

Interessanterweise konnte in den 0,5µM Imatinib-resistenten Zellen eine verstärkte Expression gemessen werden, welche in den 2µM Imatinib-resistenten Zellen wieder sank. Diese Expressionsdynamik könnte auf eine Rolle in der Resistenzentwicklung zurückzuführen sein⁴⁴.

4.1.1 Putativer Einfluss der Methylierung auf die Dysregulation von *ZFP36L1* und *L2*

In den Methylierungsanalysen der Promotorregionen von *ZFP36L1* und *ZFP36L2* wurde untersucht, ob ein veränderter Anteil der Methylierung die Dysregulation der mRNA-Expression und der Proteinlevel in den Imatinib-Resistenzmodellen erklären könnte.

Maligne Zellen weisen pauschalisiert eine generelle Hypomethylierung und eine Hypermethylierung spezifischer Promotoren auf⁴⁵. Die Hypomethylierung kann zur Instabilität der Chromosomen und zu der Aktivierung von Protoonkogenen führen. Eine Hypermethylierung hingegen kann die Transkription wichtiger Tumorsuppressoren ausschalten⁴⁶. So konnte für *ZFP36L1* eine epigenetische Regulation in der Myelofibrose nachgewiesen und eine potentielle Rolle als Tumorsuppressor diskutiert werden⁴⁷.

Es konnte keine direkte Relation zwischen den Expressionsdynamiken von *ZFP36L1* und *ZFP36L2* und dem Anteil der Methylierung in den jeweiligen resistenten Zellen messen.

4.2 Die K-562 CML Zelllinie in der *ZFP36L1* und *ZFP36L2* Defizienz

Um die spezifische Rolle der Zink Finger Proteine *ZFP36L1* und *ZFP36L2* in der CML näher definieren zu können, wurde ein *ZFP36L1/ZFP36L2* Knockout-Zelllinienmodell untersucht. Mit dem Ziel Veränderungen der Zellfitness oder Genexpression zu identifizieren und so Rückschlüsse auf ihre Funktion ziehen zu können.

4.2.1 Effekte des Knock-outs auf die Apoptose

Es konnte eine signifikant verringerte Apoptose im K-562^{*ZFP36L1*^{-/-}} und K-562^{*DKO*} im Vergleich zum WT gemessen werden. Hinsichtlich der Zellproliferation und Zellviabilität gab es keine signifikanten Unterschiede.

Die verringerte Apoptose konnte nur im *ZFP36L1*^{-/-} und im *DKO*, nicht aber im *ZFP36L2*^{-/-} gemessen werden. Da die Apoptose im *DKO* im Vergleich zum *ZFP36L1*^{-/-} nicht stärker verringert ist, kann vermutet werden, dass der *ZFP36L1*^{-/-} die verringerte Apoptose bedingt.

Die verringerte Apoptose in der *ZFP36L1* Defizienz würde die Hypothese von *ZFP36L1* als Tumorsuppressor unterstützen^{4,48}. Aufgrund der Vermutung, dass *ZFP36L1* und *ZFP36L2* in der CML, wie in der VDJ-Rekombination sich entwickelnder B-Zellen, einen Einfluss auf das zelluläre Ruhestadium der Quieszenz haben und dadurch möglicherweise die Resistenzentwicklung begünstigen, wäre in ihrer Defizienz eine erhöhte Proliferationsrate zu erwartet gewesen.

4.2.2 Alteration ausgewählter Proteinlevel von Proteinen, die an der Apoptose beteiligt sind

Um weitere Informationen über den Einfluss der Zink Finger Proteine auf die Proliferation und Apoptose zu erhalten, wurden die Proteinlevel von ausgewählten Proteinen, die an der Proliferation und an der Apoptose beteiligt sind in der *ZFP36L1* und *ZFP36L2* Defizienz gemessen.

Die ausgewählten Proteine Akt, Erk, p21 und c-Myc haben eine bekannte Funktion in der Proliferation, Differenzierung und Zellzyklus Progression. Wir konnten nur von dem Protoonkogen c-Myc eine signifikant verringerte Expression messen.

Anders verhielt es sich bei den ausgewählten Proteinlevel von an der Apoptose beteiligten Proteinen. Namentlich Caspase 3, Bax, BCL-2, BIRC2 (C-IAP1) und BIRC3 (C-IAP2). Es konnte eine signifikant verstärkte Expression von Bax, Caspase 3 und BCL-2 gemessen werden. BCL-2 (B-Cell Lymphoma 2) ist ein anti-apoptotisches Protein aus der BCL-2 Familie. Bax (BCL Associated X) ist ein Protein aus der BCL-2 Familie, welches Caspase 3 aktiviert und darüber Apoptose induziert.

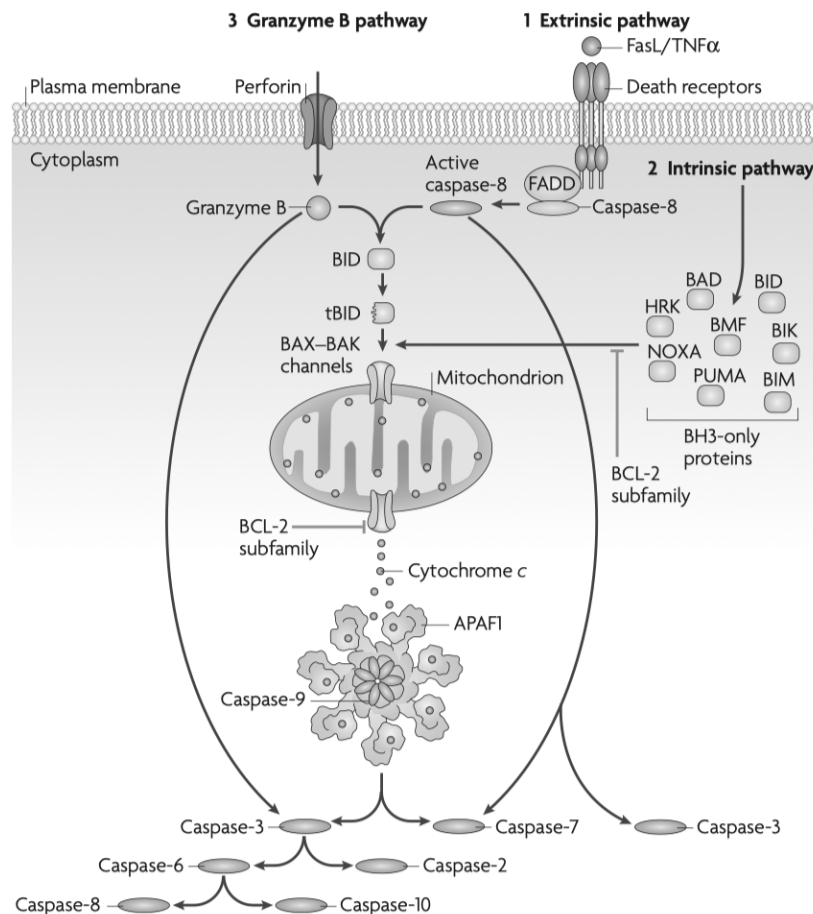


Abbildung 15: Signalkaskaden im programmierten Zelltod der Apoptose. Zu sehen sind die Signalwege der Apoptose, in dem die BCL-2 Subfamilie eine inhibitorisch hat. Bax ist ein pro-apoptotisches Protein und Caspasen führen die Apoptose durch Kondensation und Fragmentation aus. Bildquelle: <https://www.nature.com/scitable/content/apoptosis-controlled-demolition-at-the-cellular-level-14019111/49>.

Die verstärkte Expression von Bax und Caspase 3 im *ZFP36L1*^{-/-} und im DKO stehen im Widerspruch zu, der verringert gemessenen Apoptose sowie das anti-apoptotische Protein BCL-2, welches im *ZFP36L2*^{-/-} verstärkt exprimiert ist.

4.2.3 Expression der Target mRNAs von *ZFP36L1* und *ZFP36L2*

Zusätzlich wurde die mRNA-Expression der oben beschriebenen Proteine mit und ohne knock-out von *ZFP36L1* oder *ZFP36L2* mittels qRT-PCR untersucht. Ein weiterer Schritt war die Frage, ob ein Rescue durch eine Transfektion der jeweiligen defizienten *ZFP36L1* oder *ZFP36L2* in einer veränderten resultieren würde, sofern die Defizienz der Zink Finger Proteine ursächlich wäre und im Rescue mit dem Expressionslevel des Wildtyp konkordant wäre.

Vor allem von *BIRC3* (*C-IAP2*) konnte im Doppel-knock-out eine verstärkte Expression gemessen werden, die im Rescue allerdings nicht konkordant mit dem Wildtyp war. Umgekehrt konnten Lee et al zeigen, dass eine Überexpression von *ZFP36L1* zu einer Reduzierung der *BIRC3* (*C-IAP2*) Expression führt. Gleichzeitig zeigte sich eine höhere Empfindlichkeit des Plattenepithelkarzinoms des Kopfes und des Halses gegenüber einer Chemotherapie mit dem Platinderivat Cisplatin⁴⁰.

Es wäre von Interesse in weiteren Schritten zu untersuchen, wie sich die Zellfitness und die Expression des *ZFP36L1/ZFP36L2* Knockout-Zelllinienmodelles unter Imatinib verändert, da gezeigt werden konnte, dass die Zink Finger Proteine *ZFP36L1* und *ZFP36L2* essentiell für den B-Zell CD-20 Antikörper Rituximab und Chemotherapie induzierten Zelltod sein können und unsere Ergebnisse einen Zusammenhang von *ZFP36L1* und *ZFP36L2* mit apoptotischen Signalwegen der CML-Zellen zeigen^{39,28,50}.

Es konnte gezeigt werden, dass die Zink Finger Proteine *ZFP36L1* und *ZFP36L2* einen starken Einfluss auf die Genexpression haben sowie, dass sich ihre eigene Expression in der Imatinib-Resistenz verändert. Ihre Defizienz führt zu einer verringerten Apoptose und einer langsameren Zellexpansion sowie zu einer veränderten Genexpression von Ziel mRNAs⁵¹.

5. Zusammenfassung

Die Entdeckung des für die chronisch-myeloische Leukämie (CML) ursächlichen BCR/ABL Fusionsgens und die zielgerichtete Behandlung durch Tyrosinkinaseinhibitoren hat die Diagnostik und die Therapie der CML revolutioniert. Therapieresistenzen stellen jedoch eine Limitation dar.

In etwa einem Drittel der Therapieresistenzen gegenüber dem TKI Imatinib spielen BCR-ABL unabhängige Resistenzmechanismen eine Rolle, was mit einer schlechten Therapiemöglichkeit für die Patienten einher geht. Ursachen der BCR/ABL-unabhängigen Resistenzmechanismen können der verstärkte Efflux durch Arzneimitteltransporter, wie ABCG2 sein, Mutationen, epigenetische Veränderungen oder posttranskriptionelle Veränderungen der Genexpression durch mikro-RNAs sein.

Die Zink Finger Proteine *ZFP36L1* & *ZFP36L2* tragen ebenfalls zur posttranskriptionellen Regulation bei, indem sie an ARE am 3'UTR von mRNA's binden und über eine Deadenylierung zu ihrer Degradation führen. Dadurch sind sie sogenannte „gate keeper“ der Translation. Bekannte mRNA-Targets der Zink Finger Proteine kodieren für anti-apoptotische Proteine, weshalb sie als Tumorsuppressoren diskutiert werden. Außerdem sind sie essenzieller Bestandteil der physiologische Hämatopoese und ihr Verlust kann zur Leukämogenese führen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine Dysregulation von *ZFP36L1* und *ZFP36L2* in den K-562 und LAMA-84 Imatinib-Resistenzmodellen. Dabei ist besonders in den 0,5 μ M Imatinib-Resistenten Zellen eine verstärkte Expression zu beobachten, die dann in den 2 μ M Imatinib-Resistenten Zellen herabgesetzt ist. Diese Dysregulation sowie die deutlich veränderte Genexpression könnten eine Rolle der Zink Finger Proteine in der CML beschreiben. Wobei die noch nicht ausreichend geklärt ist. Zudem deuten die Ergebnisse im *ZFP36L1/ZFP36L2* Knockout-Zelllinienmodell auf eine Veränderung apoptotischer Signalwege hin, die in einem Zusammenhang mit *ZFP36L1* und *ZFP36L2* steht.

6. Summary

The discovery of the BCR/ABL fusion-gen as the root cause of chronic myeloid leukaemia (cml), and the targeted treatment of it with a tyrosine kinase inhibitor, Imatinib, has revolutionized the diagnostic, therapy, and prognosis for cml patients. Despite this breakthrough, resistance to treatment is imposing limitations.

About one third of resistance cases against Imatinib are BCR-ABL independent and leave limited therapy options for patients. BCR-ABL independent resistance mechanisms can be caused by increased efflux through drug transporters like ABCG2, mutations, epigenetic or posttranscriptional modifications of gene-expression through micro-RNAs and RNA binding proteins (RBPs).

The zinc finger proteins *ZFP36L1* und *ZFP36L2* participate in posttranscriptional regulation by binding to adenine uridine rich elements (ARE) at the 3' untranslated region (3'UTR) of mRNAs and mediate their degradation by deadenylation. Through this regulation they are thought of as gate keepers of translation. Known target mRNAs of the zinc finger proteins *ZFP36L1* and *ZFP36L2* encode for anti-apoptotic proteins and are thus discussed to function as tumour-suppressor proteins. Furthermore, they are an essential component of physiologic haematopoiesis and the deletion of them can lead to leukemogenesis.

The results of this work show a dysregulation of *ZFP36L1* and *ZFP36L2* in the K-562 and LAMA-84 Imatinib resistance models. Increased expression can be observed in the 0,5 µM Imatinib-resistant cells, which is decreased again in 2 µM Imatinib-resistant-cells. This dysregulation and the significantly changed gene expression might point to a role of *ZFP36L1* and *ZFP36L2* in chronic myeloid leukaemia. Their role has yet to be defined and they cannot solely be given a tumour-suppressing role. Furthermore, the results of the *ZFP36L1/ZFP36L2* knockout cell-line models indicate alterations of apoptotic pathways which stand in context to *ZFP36L1* and *ZFP36L2*.

7. Literaturverzeichnis

1. Jabbour, E. & Kantarjian, H. Chronic myeloid leukemia: 2016 update on diagnosis, therapy, and monitoring. *Am. J. Hematol.* **91**, 252–265 (2016).
2. Mughal, T. I. *et al.* Chronic myeloid leukemia: reminiscences and dreams. *Haematologica* **101**, 541–558 (2016).
3. Mateos, M. K., Barbaric, D., Byatt, S.-A., Sutton, R. & Marshall, G. M. Down syndrome and leukemia: insights into leukemogenesis and translational targets. *Transl. Pediatr.* **4**, 76–92 (2015).
4. Chen, K. Z., Kazi, R., Porter, C. C. & Qu, C.-K. Germline mutations: many roles in leukemogenesis. *Curr. Opin. Hematol.* **27**, 288–293 (2020).
5. Ariyoshi, K. *et al.* Age Dependence of Radiation-Induced Genomic Instability in Mouse Hematopoietic Stem Cells. *Radiat. Res.* (2018) doi:10.1667/RR15113.1.
6. Wang, Y. *et al.* Total body irradiation causes residual bone marrow injury by induction of persistent oxidative stress in murine hematopoietic stem cells. *Free Radic. Biol. Med.* **48**, 348–356 (2010).
7. Rohrbacher, M. & Hasford, J. Epidemiology of chronic myeloid leukaemia (CML). *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* **22**, 295–302 (2009).
8. Hehlmann, R., Hochhaus, A. & Baccarani, M. Chronic myeloid leukaemia. *The Lancet* **370**, 342–350 (2007).
9. Suttorp, M., Millot, F., Sembill, S., Deutsch, H. & Metzler, M. Definition, Epidemiology, Pathophysiology, and Essential Criteria for Diagnosis of Pediatric Chronic Myeloid Leukemia. *Cancers* **13**, 798 (2021).
10. Ohno, R. Treatment of chronic myeloid leukemia with imatinib mesylate. *Int. J. Clin. Oncol.* **11**, 176–183 (2006).

11. Mechanismen der BCR/ABL-unabhängigen Resistenz gegenüber Imatinib und Nilotinib in der chronisch myeloischen Leukämie. 207.
12. Quintás-Cardama, A. & Cortes, J. Molecular biology of bcr-abl1–positive chronic myeloid leukemia. *Blood* **113**, 1619–1630 (2009).
13. Piedimonte, M. *et al.* A rare BCR-ABL1 transcript in Philadelphia-positive acute myeloid leukemia: case report and literature review. *BMC Cancer* **19**, 50 (2019).
14. Kantarjian, H. M. & Talpaz, M. Imatinib mesylate: clinical results in Philadelphia chromosome-positive leukemias. *Semin. Oncol.* **28**, 9–18 (2001).
15. Tóthová, E. *et al.* Imatinib mesylate in Philadelphia chromosome-positive, chronic-phase myeloid leukemia after failure of interferon alpha. *Neoplasma* **52**, 63–67 (2005).
16. Hochhaus, A. *et al.* Six-year follow-up of patients receiving imatinib for the first-line treatment of chronic myeloid leukemia. *Leukemia* **23**, 1054–1061 (2009).
17. Kantarjian, H. *et al.* Hematologic and Cytogenetic Responses to Imatinib Mesylate in Chronic Myelogenous Leukemia.
<http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa011573>
<https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa011573> (2009)
doi:10.1056/NEJMoa011573.
18. Quintás-Cardama, A., Kantarjian, H. M. & Cortes, J. E. Mechanisms of primary and secondary resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Cancer Control J. Moffitt Cancer Cent.* **16**, 122–131 (2009).
19. Milojkovic, D. & Apperley, J. Mechanisms of Resistance to Imatinib and Second-Generation Tyrosine Inhibitors in Chronic Myeloid Leukemia. *Clin. Cancer Res.* **15**, 7519–7527 (2009).

20. Eiring, A. M. & Deininger, M. W. Individualizing kinase-targeted cancer therapy: the paradigm of chronic myeloid leukemia. *Genome Biol.* **15**, (2014).
21. Turrini, E. *et al.* MicroRNA profiling in K-562 cells under imatinib treatment: influence of miR-212 and miR-328 on ABCG2 expression. *Pharmacogenet. Genomics* **22**, 198–205 (2012).
22. Cascorbi, I. Role of pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters in the pharmacokinetics of drugs. *Pharmacol. Ther.* **112**, 457–473 (2006).
23. Mechanisms of Resistance to Imatinib and Second-Generation Tyrosine Inhibitors in Chronic Myeloid Leukemia | Clinical Cancer Research. <https://clincancerres.aacrjournals.org/content/15/24/7519>.
24. Zekavati, A. *et al.* Post-Transcriptional Regulation of BCL2 mRNA by the RNA-Binding Protein ZFP36L1 in Malignant B Cells. *PLOS ONE* **9**, e102625 (2014).
25. Baou, M., Norton, J. D. & Murphy, J. J. AU-rich RNA binding proteins in hematopoiesis and leukemogenesis. *Blood* **118**, 5732–5740 (2011).
26. Baou, M., Jewell, A. & Murphy, J. J. TIS11 Family Proteins and Their Roles in Posttranscriptional Gene Regulation. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* vol. 2009 e634520 <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2009/634520/> (2009).
27. Tan, F. E. & Elowitz, M. B. Brf1 posttranscriptionally regulates pluripotency and differentiation responses downstream of Erk MAP kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, E1740-1748 (2014).
28. Hodson, D. J., Screen, M. & Turner, M. RNA-binding proteins in hematopoiesis and hematological malignancy. *Blood* **133**, 2365–2373 (2019).
29. Planel, S., Salomon, A., Jalinot, P., Feige, J.-J. & Cherradi, N. A novel concept in antiangiogenic and antitumoral therapy: multitarget destabilization of short-lived mRNAs by the zinc finger protein ZFP36L1. *Oncogene* **29**, 5989–6003 (2010).

30. Stumpo, D. J. *et al.* Targeted disruption of Zfp36l2, encoding a CCCH tandem zinc finger RNA-binding protein, results in defective hematopoiesis. *Blood* **114**, 2401–2410 (2009).
31. Zhang, L. *et al.* ZFP36L2 is required for self-renewal of early burst-forming unit erythroid progenitors. *Nature* **499**, 92–96 (2013).
32. Galloway, A. *et al.* RNA-binding proteins ZFP36L1 and ZFP36L2 promote cell quiescence. *Science* **352**, 453–459 (2016).
33. Wang, A. & Zhong, H. Roles of the bone marrow niche in hematopoiesis, leukemogenesis, and chemotherapy resistance in acute myeloid leukemia. *Hematology* **23**, 729–739 (2018).
34. Yeh, A. C. & Ramaswamy, S. Mechanisms of Cancer Cell Dormancy--Another Hallmark of Cancer? *Cancer Res.* **75**, 5014–5022 (2015).
35. Mahon, F. X. *et al.* Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance. *Blood* **96**, 1070–1079 (2000).
36. Esteller, M., Corn, P. G., Baylin, S. B. & Herman, J. G. A Gene Hypermethylation Profile of Human Cancer. *Cancer Res.* **61**, 3225–3229 (2001).
37. Garraway, L. A. & Jänne, P. A. Circumventing cancer drug resistance in the era of personalized medicine. *Cancer Discov.* **2**, 214–226 (2012).
38. Kaehler, M. *et al.* MicroRNA-212/ABCG2-axis contributes to development of imatinib-resistance in leukemic cells. *Oncotarget* **8**, 92018–92031 (2017).
39. Baou, M. *et al.* Involvement of Tis11b, an AU-rich binding protein, in induction of apoptosis by rituximab in B cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* **23**, 986–989 (2009).

40. Lee, S. K. *et al.* Butyrate response factor 1 enhances cisplatin sensitivity in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Int. J. Cancer* **117**, 32–40 (2005).
41. Vignudelli, T. *et al.* ZFP36L1 negatively regulates erythroid differentiation of CD34+ hematopoietic stem cells by interfering with the Stat5b pathway. *Mol. Biol. Cell* **21**, 3340–3351 (2010).
42. Vogel, K. U., Bell, L. S., Galloway, A., Ahlfors, H. & Turner, M. The RNA-Binding Proteins Zfp36l1 and Zfp36l2 Enforce the Thymic β -Selection Checkpoint by Limiting DNA Damage Response Signaling and Cell Cycle Progression. *J. Immunol.* **197**, 2673–2685 (2016).
43. Brennan, S. E. *et al.* The mRNA-Destabilizing Protein Tristetraprolin Is Suppressed in Many Cancers, Altering Tumorigenic Phenotypes and Patient Prognosis. *Cancer Res.* **69**, 5168–5176 (2009).
44. Shaffer, S. M. *et al.* Rare cell variability and drug-induced reprogramming as a mode of cancer drug resistance. *Nature* **546**, 431–435 (2017).
45. Robertson, K. D. DNA methylation and human disease. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 597–610 (2005).
46. Esteller, M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* **21**, 5427–5440 (2002).
47. Martínez-Calle, N. *et al.* Epigenomic profiling of myelofibrosis reveals widespread DNA methylation changes in enhancer elements and ZFP36L1 as a potential tumor suppressor gene that is epigenetically regulated. *Haematologica* **104**, 1572–1579 (2019).
48. Chen, S.-H. *et al.* HDAC1,2 Knock-Out and HDACi Induced Cell Apoptosis in Imatinib-Resistant K562 Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).

49. Taylor, R. C., Cullen, S. P. & Martin, S. J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 231–241 (2008).
50. Hodson, D. J. *et al.* Deletion of the RNA-binding proteins ZFP36L1 and ZFP36L2 leads to perturbed thymic development and T lymphoblastic leukemia. *Nat. Immunol.* **11**, 717–724 (2010).
51. Kaehler, M. *et al.* ZFP36L1 plays an ambiguous role in the regulation of cell expansion and negatively regulates CDKN1A in chronic myeloid leukemia cells. *Exp. Hematol.* **0**, (2021).

8. Publikation

Kaehler M, Dworschak M, Rodin JP, Ruemenapp J, Vater I, Penas EMM, Liu C, Cascorbi I, Nagel I.

Zfp36l1 plays an ambiguous role in the regulation of cell expansion and negatively regulates Cdkn1a in chronic myeloid leukemia cells.

Exp Hematol. 2021 Jun 4:S0301-472X(21)00199-5. doi:

10.1016/j.exphem.2021.05.006. Epub ahead of print. PMID: 34090970.

9. Lebenslauf

Persönliches

Name: Julian Phillip Rodin
Adresse: Karolinenstraße 5, 20357 Hamburg
Staatsangehörigkeit: Deutsch, amerikanisch
Telefon: +49 172 565 15 72
E-Mail: julian.rodin@gmail.com
Geburtsdatum: 01.02.1994 im U.K.E. in Hamburg

Beruf

Seit 01.07.2021 Assistenzarzt der Diagnostischen und Interventionellen Radiologie und Nuklearmedizin des Universitätsklinikums-Hamburg-Eppendorf (UKE), bei Prof. Dr. Adam

Studium

27.05.2021 Abschluss Staatsexamen des Medizinstudiums an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel sowie Erhalt der Approbation zur ärztlichen Tätigkeit

22.08.2018 Erfolgreiche Teilnahme am United States Medical Licensing Examination (USMLE Step 1)

Seit 04.2016 Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

02.2014 – 03.2016 Studium der Humanmedizin an der Rīga Stradiņš University in Lettland – Abschluss des ersten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung

Tätigkeiten während des Studiums

Seit 08.2017	Doktorand am Institut für Klinische und Experimentelle Pharmakologie des UKSH's bei Prof. Dr. Dr. Cascorbi; Thema der Forschungsarbeit: „Die Rolle der Zink Finger Proteine <i>ZFP36L1</i> & <i>ZFP36L2</i> in der chronisch myeloischen Leukämie“
01.05.2018	Erhalt eines kompetitiven Promotionsstipendiums der medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Schulzeit

08.2006 – 06.2012	Katholisches Gymnasium St. Ansgar, Bürgerweide 33, 20535 Hamburg, Abschluss Abitur, Note 1,7
08.2000 – 06.2006	Katholische Grundschule St. Antonius, Alsterdorfer Str. 73/75, 22299 Hamburg

Tätigkeiten während der Schulzeit

2009 - 2012	KSJ-Jugendgruppe (Katholische Studierende Jugend), Begleitung und Betreuung eines Schülerjahrgangs ab der 5. Schulklasse, Vorbereitung und Durchführung von wöchentlichen Gruppenstunden, Vorbereitung und Durchführung von jährlichen Sommerlagern, Supervision und Schulungen durch Pater Adler und durch die Leiterrundenbegleiter
-------------	---

Hobbys	Laufen, Kitesurfen, Tennis & Schach
--------	-------------------------------------

Hamburg, 12. Juli 2021

Julian Phillip Rodin

10. Danksagung

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, meiner Freundin Anna sowie meinem Kommilitonen und guten Freund Alex.