

Aus der Medizinische Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen

Abteilung Innere Medizin II

(Schwerpunkt: Hämatologie, Onkologie, Klinische Immunologie,  
Rheumatologie)

**Die Rolle von ASPP1 in akuten myeloischen Leukämien –  
Expression und Funktion des mit p53 assoziierten  
Tumorsuppressors**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Kaiser, Max Clemens**

**2020**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler  
1. Berichterstatter: Dr. K. Kampa-Schittenhelm  
2. Berichterstatter: Professor Dr. P. J. Lang

Tag der Disputation: 28.05.2020

# Inhalt

Abbildungsverzeichnis.....	6
Tabellenverzeichnis.....	8
Abkürzungsverzeichnis .....	10
1 Einleitung .....	13
1.1 Die Akute myeloische Leukämie .....	13
1.1.1 Pathophysiologie der AML.....	13
1.1.2 Epidemiologie der AML .....	14
1.1.3 Klassifikation der AML .....	14
1.1.4 Prognostische Faktoren der AML .....	14
1.1.5 Medikamentöse Chemotherapie der AML .....	17
1.1.6 Die Rolle von p53 in der AML .....	18
1.2 Der Tumorsuppressor p53 .....	19
1.2.1 Aktivierung des p53-Netzwerkes .....	19
1.2.2 Funktionen von p53 .....	19
1.2.3 Die Rolle von p53 in malignen Erkrankungen .....	21
1.3 Die Familie der Apoptose stimulierenden Proteine von p53 (ASPP) .....	22
1.3.1 Mitglieder der ASPP-Familie .....	23
1.3.2 Funktionsmechanismen der proapoptotischen Mitglieder der ASPP-Familie ASPP1 und ASPP2 .....	24
1.3.3 Die Rolle der ASPP-Familie in malignen Erkrankungen.....	24
1.4 Problemstellung .....	25
1.5 Ziele der Arbeit .....	25
2 Material und Methoden .....	27
2.1 Material.....	27
2.1.1 Übersicht über eingesetzte Reagenzien, Zelllinien, Gebrauchsgüter, Geräte und Software .....	27

2.1.2	Kollektiv der Patienten und gesunden Probanden .....	33
2.2	Methoden .....	34
2.2.1	Arbeiten mit Zellmaterial .....	34
2.2.2	Molekulargenetische Expressionsanalyse.....	37
2.2.3	Expressionsanalysen auf Proteinebene .....	41
2.2.4	Short-hairpin-RNA-vermittelte Suppression der ASPP1-Transkription..	42
2.2.5	Statistische Auswertung .....	44
3	Ergebnisse .....	45
3.1	ASPP1 Expressionslevel in akuten myeloischen Leukämien .....	45
3.1.1	Signifikant verminderte ASPP1-mRNA-Expression in AML-Zelllinien ...	47
3.1.2	Signifikant verminderte ASPP1-mRNA-Expression in akuten myeloischen Leukämien .....	49
3.1.3	Analyse der ASPP1-Expression verschiedener AML-Subgruppen .....	50
3.2	Funktionelle Evaluation der Therapiesensitivität und des Wachstumsverhaltens akuter myeloischer Leukämien in Abhängigkeit von der ASPP1-Expression.....	62
3.2.1	Etablierung eines Zellmodells mit supprimierter ASPP1-Expression ....	62
3.2.2	Suppression der ASPP1-Expression resultiert in einer gesteigerten Proliferationskapazität im AML-Zellmodell .....	67
3.2.3	Verminderte ASPP1-Expression korreliert mit schlechterem Chemotherapieansprechen im AML-Zellmodell .....	70
3.3	Partielle Restauration der ASPP1-Expression durch Behandlung mit dem DNA-Methyltransferase-Inhibitor Decitabin .....	73
4	Diskussion.....	75
4.1	Verminderte ASPP1-mRNA-Expression in akuten myeloischen Leukämien	76
4.2	Verminderte ASPP1-Expression korreliert mit prognostisch ungünstigen AML- Subgruppen.....	77
4.3	Suppression der ASPP1-Expression resultiert in einer gesteigerten Proliferationskapazität im AML-Zellmodell .....	79

4.4	Verminderte ASPP1-Expression korreliert mit schlechterem Chemotherapieansprechen im AML-Zellmodell .....	80
4.5	Partielle Restauration der ASPP1-Expression durch Behandlung mit dem DNA-Methyltransferase-Inhibitor Decitabin .....	82
4.6	Fazit.....	83
5	Zusammenfassung.....	84
6	Literaturverzeichnis .....	86
	Erklärung zum Eigenanteil .....	92

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Proteinstruktur der Apoptose stimulierenden Proteine von p53 (ASPP) (Sullivan and Lu, 2007) .....	23
Abbildung 2: Signifikant verminderte ASPP1-mRNA-Expression in AML-Zelllinien KASUMI-1, MOLM-14, NB-4, OCI-AML3 im Vergleich zu gesunden Probanden .....	47
Abbildung 3: Signifikant verminderte ASPP1-Expression in AML-Patienten (n = 39) im Vergleich mit gesunden Probanden (n =12).....	49
Abbildung 4: Signifikant verminderte ASPP1-Expression in risikostratifizierten AML-Subgruppen mit intermediärer und ungünstiger Prognose .....	53
Abbildung 5: Signifikant verminderte ASPP1-Expression in der High-Risk-AML-Subgruppe.....	55
Abbildung 6: Signifikant verminderte ASPP1-Expression in AML-Patienten mit fehlendem Ansprechen auf Chemotherapie.....	57
Abbildung 7: Inverse Korrelation der ASPP1-Expression mit der Leukozytenkonzentration bei Diagnosestellung .....	59
Abbildung 8: Keine Unterschiede der ASPP1-Expression zwischen de novo entstandenen und sekundären AML .....	60
Abbildung 9: Fluoreszenzmikroskopaufnahmen (20-fache Vergrößerung) der Lentiviruspartikel produzierenden HEK293T-Zellkultur .....	62
Abbildung 10: Hellfeld- und Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen der transduzierten MOLM-14-Zellen .....	63
Abbildung 11: Durchflusszytometrische Quantifizierung der GFP-positiven Zellfraktion der transduzierten MOLM-14 EV und der MOLM-14 ASPP1 KD Zellen .....	64
Abbildung 12: Suppression der ASPP1-mRNA-Expression der ASPP1-KD-MOLM-14-Zelllinie im Vergleich zur MOLM-14-EV-Zelllinie .....	66
Abbildung 13: Verifikation der supprimierten ASPP1-Proteinexpression der ASPP1-KD-MOLM-14-Zelllinie im Vergleich zur MOLM-14-Kontrollzelllinie.....	66
Abbildung 14: Suppression der ASPP1-Expression resultiert in einer gesteigerten Proliferationskapazität der MOLM-14-Zelllinie .....	67
Abbildung 15: Relative Absorption des XTT-Zellviabilitätsassays der MOLM-14-EV-Zelllinie und MOLM-14-ASPP1-KD-Zelllinie.....	69

Abbildung 16: Verminderte ASPP1-Expression korreliert mit schlechterem Therapieansprechen auf Cytarabin (araC).....	70
Abbildung 17: Verminderte ASPP1-Expression korreliert mit schlechterem Therapieansprechen auf Daunorubicin (Dauno) .....	72
Abbildung 18: Partielle Restauration der ASPP1-Expression in MOLM-14-Zellen und ex vivo kultivierten primären AML-Blasten durch Behandlung mit Decitabin .....	73

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: World Health Organization Klassifikation der Akuten myeloischen Leukämie (Arber et al., 2016).....	16
Tabelle 2: Genetische Risikostratifizierung der AML (Dohner et al., 2017).....	17
Tabelle 3: Zelllinien und Kultivierungsbedingungen .....	34
Tabelle 4: Konzentrationen der Chemotherapeutika .....	35
Tabelle 5: cDNA-Reaktionsansatz .....	38
Tabelle 6: Programmierung des Thermocyclers .....	39
Tabelle 7: Programmierung des Light Cycler 480 .....	40
Tabelle 8: Stammlösung des qRT-PCR-Ansatzes .....	40
Tabelle 9: Zusammensetzung des Lysepuffers.....	41
Tabelle 10: Zusammensetzung des Transferpuffers .....	42
Tabelle 11: Verwendete Antikörper .....	42
Tabelle 12: Transfektionsgemisch für HEK293T-Zellen .....	43
Tabelle 13: Experimentell ermittelte ASPP1-Expression mononukleärer Zellfraktionen gesunder Probanden und AML-Zelllinien .....	45
Tabelle 14: Klinische Parameter und experimentell mittels quantitativer Realtime-PCR ermittelte ASPP1-Expression von AML-Patienten.....	46
Tabelle 15: Übersicht über statistische Kenngrößen der ASPP1-Expression der gesunden Kohorte und der AML-Zelllinien KASUMI-1, MOLM-14, NB-4, OCI-AML3.....	48
Tabelle 16: Übersicht über statistische Kenngrößen der ASPP1-Expression der gesunden Kohorte und der AML-Kohorte .....	50
Tabelle 17: Klinische Charakteristika der AML-Patientenkohorte .....	52
Tabelle 18: Übersicht über statistische Kenngrößen der ASPP1-Expression der gesunden Kohorte und der AML-Risikosubgruppen .....	54
Tabelle 19: Übersicht über statistische Kenngrößen der ASPP1-Expression der gesunden, Low-Risk- und High-Risk-Kohorte .....	56
Tabelle 20: Übersicht über statistische Kenngrößen der ASPP1-Expression der gesunden, Responder- und Non-Responder-Kohorte .....	58
Tabelle 21: Übersicht über statistische Kenngrößen der ASPP1-Expression der de novo entstandenen und sekundären AML-Subgruppen.....	61



Tabelle 22: Verminderte Verdopplungszeit der MOLM-14-ASPP1-KD-Zelllinie im Vergleich zur MOLM-14-EV-Kontrolle .....	68
Tabelle 23: Ermittelte IC <sub>50</sub> -Werte für die Behandlung der MOLM-14-EV- und MOLM-14-ASPP1-KD-Zellen mit Cytarabin und Daunorubicin.....	71

## Abkürzungsverzeichnis

ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
APC	Allophycocyanin
araC	Cytarabin
ARF	<i>alternate reading frame protein</i>
ASPP1/2	Apoptose stimulierendes Protein von p53 1/2
ATM	<i>ataxia teleangiectasia mutated</i>
ATR	<i>ataxia telangiectasia and RAD3-related</i>
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BSA	Rinderalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
CaCl <sub>2</sub>	Kalziumchlorid
CDK1/2	Cyclin-abhängige Kinase 1/2 ( <i>cyclin-dependent kinase 1/2</i> )
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure ( <i>complementary deoxyribonucleic acid</i> )
CI	Konfidenzintervall
cm	Zentimeter
CR	komplette Remission ( <i>complete remission</i> )
DAC	Decitabin
Dauno	Daunorubicin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
dNTP	Desoxynukleotid
EV	Leervektor ( <i>empty vector</i> )
FBS	Fötale Kälberserum ( <i>fetal bovine serum</i> )
FSC	Vorwärtsstreulicht ( <i>forward scatter</i> )
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde

HBSS	Hanks gepufferte Salzlösung ( <i>Hank's buffered salt solution</i> )
iASPP	inhibitorisches Apoptose stimulierendes Protein von p53
IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration
IgG	Immunglobulin G
IL-3	Interleukin 3
IQR	Interquartilsabstand
KD	<i>Knockdown</i>
kDa	Kilodalton
l	Liter
ln	natürlicher Logarithmus
Mdm2	<i>Mouse double minute 2 homolog</i>
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
mM	Milimolar
min	Minuten
ml	Milliliter
µM	Micromolar
µmol	Micromol
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
n	Anzahl
NEAA	nicht-essenzielle Aminosäuren
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
nmol	Nanomol
NR	<i>Non-Responder</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PI	Propiumiodid
PIDD	<i>p53-induced death domain protein 1</i>
PIG-3	<i>p53-inducible gene 3</i>
PUMA	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
qRT-PCR	quantitative Real-Time-Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RPMI	Roswell Park Memorial Institute

RT	Reverse Transkriptase
s	Sekunde
SD	Standardabweichung ( <i>standard deviation</i> )
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese ( <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> )
shRNA	Short-hairpin-Ribonukleinsäure
SSC	Seitwärtsstreulicht ( <i>side scatter</i> )
U	Katal ( <i>unit</i> )
V	Volt
WBC	Leukozytenkonzentration ( <i>white blood cell count</i> )
YAP	<i>YES-associated protein 1</i>

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Akute myeloische Leukämie

### 1.1.1 Pathophysiologie der AML

Bei der akuten myeloischen Leukämie handelt es sich um eine maligne Erkrankung des blutbildenden Knochenmarks, die durch die klonale Expansion undifferenzierter myeloischer Vorläuferzellen, so genannter Blasten, charakterisiert ist (Papaemmanuil et al., 2016).

Mechanismen, die zur Entwicklung der AML führen sind Gegenstand aktueller Forschungen. Es wird davon ausgegangen, dass am Anfang der Leukämogenese genetische Veränderungen im Bereich von Regulatoren des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung einer hämatopoetischen Vorläuferzelle stehen. Beispiele für diese genetischen Veränderungen sind zahlreiche bekannte Fusionsgene, die durch Chromosomenaberrationen entstehen oder Mutationen in bestimmten wachstumsregulierenden Tyrosinkinasen. In der Folge kommt es zum Differenzierungsstopp und der Proliferation dieser entarteten Zellen sowie der damit einhergehenden Infiltration von Blut, Knochenmark und anderen Geweben (Lowenberg et al., 1999). Als gesicherte Risikofaktoren für die Entwicklung einer AML gelten die chronische Exposition gegenüber ionisierender Strahlung und bestimmter Chemikalien wie beispielsweise Benzol. Außerdem kann die Behandlung mit Chemotherapeutika wie Alkylanzien und Topoisomerase-II-Inhibitoren zur Unterform der therapieassoziierten AML führen. Ein erbliches Risiko der AML besteht durch die Assoziation der erhöhten AML-Inzidenzen mit bestimmten hereditären Syndromen, wie z.B. der Trisomie 21 oder der Fanconi-Anämie (Kasper et al., 2015).

Klinisch stehen bei Patienten Befunde der verdrängten Hämatopoese im Vordergrund, wobei nicht selten alle Reihen der Blutbildung betroffen sind. Daraus resultieren Anämie, funktionelle Leukopenie und Thrombozytopenie. Erkrankte Patienten werden deshalb häufig auf Grund unspezifischer Allgemeinsymptome, wie Schwäche, Müdigkeit und Fieber auffällig. Außerdem kann neben einer erhöhten Infektanfälligkeit betroffener Patienten eine Blutungsneigung auf Grund der gestörten Thrombozytenfunktion und Hämostase imponieren (Kasper et al., 2015).

### **1.1.2 Epidemiologie der AML**

Die AML ist mit einem Anteil von 80 % die häufigste Form der akuten Leukämien im Erwachsenenalter. Die Inzidenz wird dabei in Deutschland auf jährlich 3,5 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner geschätzt, wobei Männer häufiger als Frauen betroffen sind (m : w = 1,6 : 1) (Kompetenznetz Leukämien, 2018) [Zugriff: 09.06.2018]). Statistiken zeigen außerdem, dass die AML, mit einem medianen Alter von 67 Jahren bei Erstdiagnose, eine Erkrankung des höheren Alters ist. Trotz großer Fortschritte in der Behandlung der AML, beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate bei Patienten im Schnitt nur 27,4 % (National Cancer Institute, 2018) [Zugriff: 09.06.2018]). Besonders bei Patienten über 60 Jahren, welche auf Grund von Komorbiditäten und Medikamentennebenwirkungen keiner intensiven Chemotherapie unterzogen werden können, bleibt der Behandlungserfolg häufig aus. Dies spiegelt sich in der geringen medianen Überlebenswahrscheinlichkeit dieser Alterskohorte von 5 bis 10 Monaten wider (Dohner et al., 2015).

### **1.1.3 Klassifikation der AML**

Die aktuelle Kategorisierung der Subentitäten der AML erfolgt anhand der WHO-Klassifikation. Diese berücksichtigt morphologische, zytogenetische und molekulargenetische Merkmale der AML-Blasten. Die Definition der AML beinhaltet außerdem das Vorhandensein von mehr als 20 % Blasten im Knochenmark oder Blut. Eine Ausnahme bildet das Vorhandensein AML-spezifischer rekurrenter Chromosomenaberrationen, wodurch sich die Diagnose der AML auch bei weniger als 20 % Blasten stellen lässt (Kasper et al., 2015). Die aktuelle Einteilung der AML nach den Kriterien der World Health Organization ist Tabelle 1 zu entnehmen.

### **1.1.4 Prognostische Faktoren der AML**

Als wichtigste, das Therapieergebnis beeinflussende Prognosefaktoren gelten aktuell zyto- und molekulargenetische Befunde der Blastenpopulation (Kasper et al., 2015). Eine evidenz-basierte prognostische Risikostratifizierung der AML anhand genetischer Merkmale findet durch die „Empfehlungen zur Diagnose und Handhabung der AML des European LeukemiaNet“ statt und ist Tabelle 2 zu entnehmen (Dohner et al., 2017). Zudem beeinflussen klinische Parameter die Prognose der AML und werden deshalb zur prätherapeutischen Risikoevaluation zu Rate gezogen. Als ungünstige Prognosefaktoren gelten unter anderem hohes Alter (> 60 Jahre), hohe

Leukozytenzahl ( $> 100.000 / \mu\text{l}$ ) und hoher Blastenanteil bei Diagnose (Liersch et al., 2014). Des Weiteren zählen auch die MDS- und therapieassoziierte AML auf Grund des verminderten Therapieansprechens als prognostisch ungünstig (Alam et al., 2015, Kayser et al., 2011).

**Tabelle 1: World Health Organization Klassifikation der Akuten myeloischen Leukämie (Arber et al., 2016).** Die Einteilung erfolgt anhand morphologischer, zytogenetischer und molekulargenetischer Merkmale der AML-Blasten

<b>AML mit wiederkehrenden genetischen Veränderungen</b>
AML mit t(8;21)(q22;q22.1); RUNX1-RUNX1T1
AML mit inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); CBFB-MYH11
APL mit t(15;17)(q22;q12); PML-RARA
AML mit t(9;11)(p21.3;q23.3); MLLT3-KMT2A
AML mit t(6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214
AML mit inv(3)(q21.3q26.2) oder t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM
AML (megakaryoblastisch) mit t(1;22)(p13.3;q13.3); RBM15-MKL1
Vorläufige Entität: AML mit BCR-ABL1
AML mit NPM1-Mutation
AML mit biallelischer CEBPA-Mutation
Vorläufige Entität: AML mit RUNX1-Mutation
<b>AML mit Myelodysplasie-assoziierten Veränderungen</b>
<b>Therapie-assoziierte myeloische Neoplasien</b>
<b>AML, nicht anderweitig klassifiziert</b>
AML mit minimaler Differenzierung
AML ohne Ausreifung
AML mit Ausreifung
Akute myelomonozytäre Leukämie
Akute monoblastische/monozytäre Leukämie
Akute Erythrozytenleukämie
Akute Megakaryoblastenleukämie
Akute Basophilenleukämie
Akute Panmyelose mit Myelofibrose
<b>Myelosarkom</b>
<b>Myeloische Down-Syndrom-assoziierte Proliferation</b>
Transient abnorme Myelopoiese (TAM)
Myeloische Down-Syndrom-assoziierte Leukämie



**Tabelle 2: Genetische Risikostratifizierung der AML (Dohner et al., 2017)**

<b>Günstig</b>	t(8;21)(q22;q22.1); RUNX1-RUNX1T1 inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11 NPM1-Mutation ohne FLT3-ITD oder mit FLT3-ITD <sup>low</sup> * Biallelische CEBPA-Mutation
<b>Intermediär</b>	NPM1-Mutation und FLT3-ITD <sup>high</sup> * Wild-Typ NPM1 ohne FLT3-ITD oder mit FLT3-ITD <sup>low</sup> * (ohne genetische Läsionen mit ungünstigem Risiko) t(9;11)(p21.3;q23.3); MLLT3-KMT2A Nicht als günstig oder ungünstig klassifizierte Zytogenetik
<b>Ungünstig</b>	t(6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214 t(v;11q23.3); KMT2A rearrangiert t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1 inv(3)(q21.3q26.2) oder t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2,MECOM(EV11) -5 oder del(5q); -7; -17/abn(17p) Komplexer Karyotyp, Monosomaler Karyotyp Wild-Typ NPM1 und FLT3-ITD <sup>high</sup> * RUNX1-, ASXL1- oder p53-Mutation

\* low, niedriger allelischer Anteil (< 0,5), high, hoher allelischer Anteil (> 0,5)

### 1.1.5 Medikamentöse Chemotherapie der AML

Die medikamentöse Chemotherapie der AML erfolgt in der Regel risikoadaptiert nach Therapieprotokollen im Rahmen von Studien. Die Behandlung beginnt mit einer Induktionschemotherapie, deren Ziel die komplette Remission, d. h. das Vorhandensein von weniger als 5 % blastärer Zellen im Knochenmark, ist. Typische Induktionstherapieregime beinhalten eine Kombination aus dem Antimetabolit Cytarabin und einem Anthrazyklin, beispielsweise Daunorubicin, Idarubicin oder dem Topoisomerase-II-Inhibitor Mitoxantron. Im Anschluss an die Induktionstherapie folgen Konsolidierungs- und gegebenenfalls Erhaltungstherapie, wodurch die Zahl maligner Zellen weiter vermindert werden soll (Kasper et al., 2015). Neben der konventionellen Chemotherapie ist der Einsatz von zielgerichteten Agenzien, wie zum Beispiel Tyrosinkinase-Inhibitoren und monoklonalen Antikörpern, zunehmend etabliert (Kayser and Levis, 2018). Trotz prätherapeutischer Risikostratifizierung und neuer

Behandlungsstrategien bleibt der Anteil unklarer Therapieversager weiterhin hoch, weshalb mehr prognostische Marker für die Vorhersage des Therapieergebnisses erforderlich sind (Dohner et al., 2015). Zusätzlich zur medikamentösen Chemotherapie, besteht für Patienten mit ungünstigem genetischem Risikoprofil oder generellem Rezidivrisiko von über 35-40 % die Möglichkeit der allogenen Stammzelltransplantation, auf die hier nicht im Detail eingegangen wird (Dohner et al., 2017).

### **1.1.6 Die Rolle von p53 in der AML**

Eine zentrale Rolle bei der Prävention von Tumorstadium spielt das Protein TP53. (Lane, 1992). Die Relevanz der p53-Inaktivierung für die Krebsentstehung spiegelt sich in der hohen Mutationsrate des p53-Gens bei unterschiedlichen Tumorentitäten wider. Im Mittel beläuft sich das Vorkommen von p53-Mutationen auf ca. 50 % aller Krebserkrankungen (Bouaoun et al., 2016). Dies gilt auch für bestimmte Unterformen der AML und betrifft vor allem die therapie- und MDS-assoziierten sekundären AML mit komplexem Karyotyp (Haferlach et al., 2008, Joannides and Grimwade, 2010, Rucker et al., 2012). Der Funktionsverlust von p53 bei der AML ist außerdem mit vermindertem Ansprechen der Patienten auf Induktionschemotherapie assoziiert (Rucker et al., 2012).

Bei einem Großteil der akuten myeloischen Leukämien ist die p53-Funktion jedoch erhalten. So beläuft sich der Anteil von p53-Mutationen in de novo entstandenen akuten myeloischen Leukämien ohne komplexen Karyotyp, welche mehr als 90 % der AML umfassen, auf unter 5 % (Grimwade et al., 1998, Haferlach et al., 2008).

Die Erforschung alternativer Mechanismen, die trotz erhaltener p53-Funktion zur Inaktivierung des p53-Signalwegs führen, könnte deshalb Antworten auf bisher nicht verstandene Aspekte der Leukämogenese liefern. Zudem beinhalten diese Mechanismen auch klinische Implikationen – einerseits für die Identifizierung neuer Targets bei der AML-Behandlung, andererseits für das bessere Verständnis bisher unklarer Faktoren, die das Therapieansprechen negativ beeinflussen. Einen möglichen Mechanismus könnte dabei die Fehlregulation der mit p53 interagierenden Apoptose stimulierenden Proteine von p53 (ASPP) darstellen (Schittenhelm et al., 2013).

## **1.2 Der Tumorsuppressor p53**

Wie oben beschrieben nimmt das Protein p53 eine zentrale Rolle bei Suppression von Tumorwachstum ein. Es wird aufgrund seiner beispielhaften tumorsuppressiven Funktion auch als „Wächter des Genoms“ bezeichnet (Lane, 1992). Namensgebend für das Protein war dessen Molekülmasse von 53 kDa auf der SDS-PAGE (DeLeo et al., 1979). Das p53-Protein wurde erstmals 1979 beschrieben und gilt als erster dokumentierter Tumorsuppressor, auch wenn ursprünglich eine gegenteilige Funktion als Onkogen angenommen wurde. In Reaktion auf verschiedene Zellstressoren, wie z.B. DNA-Schäden und Chromosomenbrüche, werden p53-vermittelte Kontrollmechanismen eingeleitet: Beispielsweise können durch Zellzyklusarrest betroffene DNA-Abschnitte repariert werden. Alternativ kann ein programmierter Zelltod (Apoptose) und zelluläre Seneszenz eingeleitet werden, um die Akkumulation von DNA-defekten, maligne entarteten Zellen zu vermeiden (Biegging et al., 2014).

### **1.2.1 Aktivierung des p53-Netzwerkes**

Für die Aufrechterhaltung der Zellhomöostase ist eine Reaktionsbereitschaft der Zelle auf verschiedene Stressfaktoren unabdinglich. Zweifellos spielt p53 dabei eine Schlüsselrolle und entscheidet, in Reaktion auf unterschiedliche Störreize, über das Schicksal der betroffenen Zelle. Im Zentrum der Forschung steht daher unter anderem, welche Ereignisse dafür sorgen, das komplexe Netzwerk um p53 zu aktivieren (Horn and Vousden, 2007). Das am besten erforschte Modell für die p53-Aktivierung ist das durch DNA-Schäden ausgelöste Stresssignal. DNA-Schäden in Form von Doppelstrangbrüchen oder fehlgesteuerten Replikationsprozessen resultieren dabei in einer Stabilisierung von p53 und einer subsequenten Aktivierung des p53-Netzwerkes. Weitere Stresssignale, welche die Aktivierung des komplexen p53-Netzwerkes vermitteln sind außerdem hyperproliferative Signale durch Onkogenaktivierung, Hypoxie, Nährstoffmangel und Telomerverkürzung (Biegging et al., 2014).

### **1.2.2 Funktionen von p53**

Zur Realisierung der tumorsuppressiven Wirkung auf die erwähnten Zellstressoren wird in der Literatur ein nahezu unerschöpfliches Repertoire an zellulären Reaktionsmechanismen von p53 beschrieben (Biegging et al., 2014, Lane, 1992, Fridman and Lowe, 2003, Levine, 1997). In diesem Kapitel soll auf Grund der

Komplexität und Vielschichtigkeit der Datenlage nur auf die für diese Arbeit relevantesten Funktionsmechanismen eingegangen werden.

### **Allgemeine Funktionsmechanismen**

Die am besten charakterisierten tumorsuppressiven Mechanismen werden von p53 durch Transkriptionsregulation von Effektorgenen verwirklicht (el-Deiry, 1998). Hierbei handelt es sich unter anderem um Gene, die den Zellzyklus (p21, Reprimo) und die Apoptose (Bax, PUMA, NOXA, PIDD) regulieren (Ohki et al., 2000, Vogelstein et al., 2000). Mit Hilfe der zentralen DNA-Bindungsdomäne kann das p53-Protein im Zellkern als Transkriptionsfaktor fungieren und erkennt so p53-responsive Promotorsequenzen (Espinosa et al., 2003). Durch Tetramerisierung wird die Bindung im Promotorbereich gewährleistet (Lee et al., 1995). Als Nächstes werden Cofaktoren rekrutiert, die zur Transkriptionsaktivierung der „downstream“-Gene führen (Espinosa et al., 2003).

Zusätzlich zur Transaktivierungsfunktion agiert p53 als Transkriptionsrepressor. Einerseits interferiert es mit der Transkriptionsmaschinerie zahlreicher Gene, andererseits wird durch Veränderung der Chromatinstruktur bestimmter DNA-Abschnitte, die Expression verschiedener wachstumsfördernder Gene gedrosselt (Ho and Benchimol, 2003).

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass zusätzlich zur Transkriptionsregulation von p53 auch transkriptionsunabhängige Mechanismen eine tumorsuppressive Rolle spielen (Speidel, 2010).

### **Zellzyklusarrest**

Ein wichtiges Beispiel für die Transaktivierungsfunktion von p53 ist der reversible Zellzyklusarrest als Reaktion auf DNA-Schaden. Durch den bereits beschriebenen Mechanismus induziert p53 die Transkription des p21-Gens, wodurch die Cyclin-abhängigen Kinasen CDK1 und CDK2 inhibiert werden. Dies wiederum führt zu einem reversiblen Arrest der Zelle in der G<sub>1</sub>-Phase. Die daraus resultierende Blockade des Zellzyklus, kann zur Reparatur der beschädigten DNA-Abschnitte genutzt werden (Shaw, 1996).

## **Apoptose**

Eine zentrale Rolle der p53-vermittelten zellulären Stressantwort spielt die Einleitung des programmierten Zelltods (Apoptose). Durch kontrollierten „Selbstmord“ wird die beschädigte Zelle zum Wohle des Gesamtorganismus ausgesondert (Steller, 1995). Auch die Einleitung der Apoptose ist abhängig von der Funktion des p53-Proteins als Transkriptionsfaktor. Zahlreiche proapoptotische Gene, darunter die Mitglieder der Bcl-2-Familie Bax („*BCL2 associated X*“) und PUMA („*p53 upregulated modulator of apoptosis*“), weisen eine p53-Bindungsstelle in der Promotorsequenz auf und können so p53-abhängig hochreguliert werden. Weitere proapoptotische p53-responsive Zielgene sind unter anderem PIG-3 („*p53-inducible gene 3*“), NOXA und PIDD1 („*p53-induced death domain protein 1*“) (Vogelstein et al., 2000). Die Folge dieser vielfältigen Transaktivierungsprozesse ist die Einleitung der Apoptosekaskade und der subsequente kontrollierte Untergang der entartungsgefährdeten Zelle (Chipuk et al., 2004).

Neben der transkriptionellen Aktivierung proapoptotischer Gene kann die Einleitung der Apoptose alternativ durch transkriptionsunabhängige Mechanismen stattfinden. Dabei spielen direkte Protein-Protein-Interaktionen zwischen p53 und Apoptoseregulatoren eine Rolle. Hierzu zählt die Interaktion mit anti-apoptotischen Bcl2-Proteinen, ebenso wie die Bindung der ASPP-Proteine (Moll et al., 2006, Sullivan and Lu, 2007).

Neben der Blockade des Zellzyklus und der Einleitung von Zelltodprogrammen existieren noch zahlreiche weitere Mechanismen der p53-vermittelten zellulären Stressantwort, darunter metabolische Regulationsmechanismen, Seneszenz- und Autophagieprogramme (Biegging et al., 2014), auf die hier nicht im Detail eingegangen wird.

### **1.2.3 Die Rolle von p53 in malignen Erkrankungen**

Wie oben demonstriert ist das p53-Protein von existenzieller Bedeutung für die Prävention von Tumorwachstum. Es ist leicht nachzuvollziehen, dass der Funktionsverlust von p53 fatale Folgen für die betroffene Zelle hat. Daher verwundert es nicht, dass die Inaktivierung des p53-Signalwegs ein universelles Ereignis bei Tumorerkrankungen darstellt (Vogelstein et al., 2000). Das Auftreten inaktivierender Mutationen im p53-Gen stellt dabei die häufigste strukturelle Aberration bei malignen

Entartungen des menschlichen Organismus dar (Bouaoun et al., 2016, Kandoth et al., 2013).

Am häufigsten von Mutationen betroffen ist die DNA-Bindungsdomäne des p53-Proteins, was dessen zentrale Rolle als Transkriptionsfaktor unterstreicht (Prives and Hall, 1999). Folge der Funktionsstörung ist die erhöhte Anfälligkeit der Zelle für Entartungsprozesse (Vousden and Prives, 2009). Zudem konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass der Verlust der p53-medierte Apoptoseinduktion mit einem verminderten Therapieansprechen verschiedener Tumoren einhergeht (Johnstone et al., 2002, Wallace-Brodeur and Lowe, 1999).

Wie bereits aufgeführt, spiegelt sich die Relevanz der p53-Inaktivierung für die Krebsentstehung in der hohen Mutationsrate des p53-Gens bei unterschiedlichen Tumorentitäten wider, welche sich im Mittel auf ca. 50 % beläuft (Bouaoun et al., 2016). Bei Tumoren mit erhaltener p53-Funktion konnten Vorgänge, die über andere Mechanismen zur Herabregulation des p53-Netzwerks führen, identifiziert werden (Vogelstein et al., 2000, Hainaut and Hollstein, 2000, Bykov and Wiman, 2003).

Aufgrund der Häufigkeit inaktivierender p53-Mutationen bei verschiedenen Tumorerkrankungen überrascht es umso mehr, dass der Anteil der p53-Mutationen bei akuten myeloischen Leukämien vergleichsweise gering ist (siehe Abschnitt 1.1.6) (Haferlach et al., 2008). Die Hypothese ist daher, dass hier alternative Mechanismen zur Inaktivierung des p53-Signalwegs führen. Diese Überlegungen lieferten unter anderem Grundlage für die experimentellen Untersuchungen zu dieser Arbeit.

### **1.3 Die Familie der Apoptose stimulierenden Proteine von p53 (ASPP)**

Um der Frage nach alternativen Mechanismen der Inaktivierung des p53-Signalwegs nachzugehen, wurde die Familie der Apoptose-stimulierenden-Proteine-von-p53, kurz ASPP, in den Fokus unserer Forschungen gerückt.

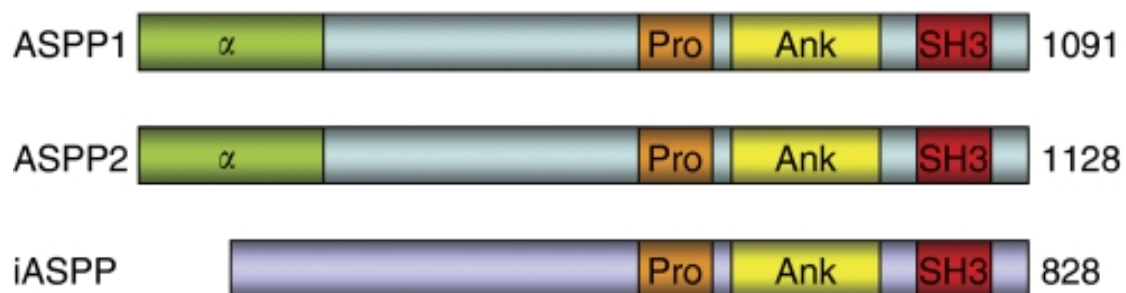
Wie oben aufgeführt, bestehen unterschiedliche Mechanismen der p53-vermittelten Stressantwort. Beispielsweise können einerseits Zelltodprogramme eingeleitet werden, andererseits besteht die Möglichkeit, das Zellüberleben zu sichern, um anschließend beschädigte DNA-Abschnitte zu reparieren (Vogelstein et al., 2000).

Bislang ist nicht ausreichend geklärt, wie durch p53 über das Schicksal der betroffenen Zelle entschieden wird (Kracikova et al., 2013).

Eine wichtige Rolle bei dieser Entscheidung spielen die Apoptose-stimulierenden-Proteine-von-p53 (ASPP) durch Regulation der p53-abhängigen Transkriptionsinduktion proapoptotischer Effektorgene (Samuels-Lev et al., 2001). Die Dysregulation dieser Proteine, könnte eine Antwort auf die Frage liefern, warum es trotz erhaltener p53-Funktion zur partiellen Inaktivierung des Signalwegs kommen kann (Sullivan and Lu, 2007).

### 1.3.1 Mitglieder der ASPP-Familie

Zur Familie der ASPP gehören die proapoptotischen Mitglieder ASPP1 und ASPP2 sowie der antiapoptotische Gegenspieler iASPP. Alle drei Mitglieder weisen Sequenzähnlichkeiten im Bereich der C-Termini auf, welcher aus drei charakteristischen Domänen besteht (Ankyrin-Wiederholungsdomäne, SH3-Domäne, prolinreiche Domäne) (Sullivan and Lu, 2007). In diesem Bereich findet bevorzugt die Interaktion mit Bindungspartnern der ASPP-Mitglieder statt. Zu den wichtigsten Bindungspartnern gehören p53, p63, p73, Bcl-2 und YAP1 („*YES-associated protein-1*“ (Bergamaschi et al., 2004, Gorina and Pavletich, 1996, Naumovski and Cleary, 1996).



**Abbildung 1: Proteinstruktur der Apoptose stimulierenden Proteine von p53 (ASPP) (Sullivan and Lu, 2007).** Die Anzahl der Aminosäuren des jeweiligen Proteins sind rechts dargestellt. Individuelle Strukturelemente sind hervorgehoben: α, alpha-helikale Domäne; Pro, prolinreiche Domäne; Ank, Ankyrin-Wiederholungsdomäne; SH3, SH3-Domäne.

### **1.3.2 Funktionsmechanismen der proapoptotischen Mitglieder der ASPP-Familie ASPP1 und ASPP2**

Die am besten verstandenen proapoptotischen Funktionen nehmen ASPP1 und ASPP2 als Aktivatoren der p53-vermittelte Apoptosekaskade wahr. Durch Interaktion mit p53 wird dessen Bindung an die p53-responsiven Promotoren proapoptotischer Gene, darunter Bax, PUMA und PIG-3, selektiv stimuliert, wodurch p53-abhängige Apoptoseprogramme eingeleitet werden (Samuels-Lev et al., 2001). Zudem konnte außerdem gezeigt werden, dass ASPP1 und ASPP2 die Apoptose auch unabhängig von p53 regulieren können, unter anderem durch Interaktion mit p63 sowie p73 und der damit einhergehenden Stimulation der Transaktivierung proapoptotischer Effektoren (Bergamaschi et al., 2004). Des Weiteren legen in vitro Versuche nahe, dass die Regulation der Apoptose auch durch direkte Interaktion mit Bcl-2 stattfindet (Naumovski and Cleary, 1996). Diese Mechanismen ließen vermuten, dass es sich bei ASPP1 und ASPP2 um funktionelle Tumorsuppressoren handelt (Braithwaite et al., 2006).

### **1.3.3 Die Rolle der ASPP-Familie in malignen Erkrankungen**

In der Tat konnte die Vermutung, dass es sich bei ASPP1 und ASPP2 um Tumorsuppressoren handelt, bezüglich des Familienmitglieds ASPP2 in vivo im Mausmodell bestätigt werden (Kampa et al., 2009a). Dies steht im Einklang mit der häufig beobachteten Herabregulation von ASPP2 in verschiedenen Tumorentitäten mit unauffälligem p53-Status (Samuels-Lev et al., 2001). Interessanterweise konnten Schittenhelm et al. (2013) nachweisen, dass dies auch für akute myeloische Leukämien gilt und sich eine signifikante Assoziation der Herabregulation der ASPP2-Expression mit Therapieversagen auf Induktionstherapie zeigt.

Für die Rolle von ASPP1 als Tumorsuppressor ist die Datenlage im Mausmodell weniger gesichert. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass speziell in hämatopoetischen Stammzellen ASPP1 eine besondere Schutzfunktion nach Zellstress innehat. Die fehlerhafte Funktion von ASPP1 und p53 resultiert konsequenterweise in maligner Entartung des Stammzellklons hin zu Lymphomen und lymphatischen Leukämien (Yamashita et al., 2015). Konkordant hierzu wurde bei akuten lymphatischen Leukämien eine signifikante Reduktion der ASPP1 Expression bereits nachgewiesen (Agirre et al., 2006).



Diese Forschungsergebnisse legen auch für ASPP1 eine klinisch relevante Funktion bei Krebserkrankungen nahe. Untersuchungen, welche Rolle ASPP1 bei akuten myeloischen Leukämien (AML) spielt, liegen bislang nicht vor.

## **1.4 Problemstellung**

Trotz enormer Anstrengungen und Fortschritte in der Behandlung der akuten myeloischen Leukämie, kann nur ein kleiner Anteil der Patienten dauerhaft von der meist tödlich verlaufenden Erkrankung kuriert werden. Insbesondere bleibt eine Komplettremission nach Induktionschemotherapie speziell bei Patienten über 60 Jahren in 40-60 % der Fälle aus und es ist weiterhin unklar, welche Faktoren das Therapieansprechen dabei beeinflussen (Dohner et al., 2015).

Im Gegensatz zu anderen soliden Tumoren spielen inaktivierende Mutationen von p53 oder den p53-Genlocus betreffende chromosomale Aberrationen bei de-novo akuten Leukämien nur eine untergeordnete Rolle (Haferlach et al., 2008).

Daraus resultiert unsere Hypothese, dass bei der AML alternative Prozesse zur Inaktivierung des p53-Signalwegs führen und so einerseits die Leukämogenese triggern und andererseits zur Resistenz der Leukämiezellen gegenüber Chemotherapeutika beitragen. Eine wichtige Rolle, so vermuten wir, spielt dabei die Dysregulation der Apoptose-stimulierenden-Proteine-von-p53 (ASPP).

Im Hinblick auf die von Yamashita et al. (2015) nachgewiesene zentrale Funktion des Familienmitglieds ASPP1 bei der Aufrechterhaltung der genomischen Integrität von hämatopoetischen Stammzellen, untersuchten wir deshalb die Rolle von ASPP1 in akuten myeloischen Leukämien.

## **1.5 Ziele der Arbeit**

Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, die Rolle von ASPP1 in akuten myeloischen Leukämien zu untersuchen. Hierfür wurde zunächst die ASPP1-Expression in akuten myeloischen Leukämien evaluiert. Die ASPP1-Expressionslevel eines AML-Patientenkollektivs wurden dafür im Vergleich zu einem gesunden Donorkollektiv untersucht. Außerdem wurden die ASPP1-Expressionen verschiedener AML-Subgruppen analysiert.

Im Anschluss sollte in funktionellen Analysen durch spezifischen Knock-Down der ASPP1-Transkription im Zellmodell das Wachstumsverhalten und die Therapiesensitivität der Leukämiezellen in Abhängigkeit von der ASPP1-Expression untersucht werden.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob sich die ASPP1-Expression im Zellmodell sowie in primären ex vivo AML-Blasten durch die Behandlung des DNA-Methyltransferase-Inhibitors Decitabin beeinflussen lässt. Ziel war es dabei einerseits therapeutische Möglichkeiten zu untersuchen, mit der sich die ASPP1-Expression wiederherstellen lässt und andererseits indirekte Hinweise, die für eine aberrante Promotormethylierung des ASPP1-Gens als möglichen Mechanismus der ASPP1-Dysregulation sprechen zu erhalten.

Die **Analyse von ASPP1 bei akuten myeloischen Leukämien, hinsichtlich Expression, Assoziation zu Subgruppen und Funktion** soll Aufschluss über mögliche molekulare Mechanismen bei der Leukämogenese und der Therapieresistenz von Leukämiezellen geben und sind Gegenstand dieses Dissertationsvorhabens. Zukünftige Perspektiven bieten sich durch die **Etablierung von ASPP1 als prognostischen Marker** für das Therapieansprechen und durch die mögliche **Restauration der ASPP1-Funktion als Angriffspunkt für neue Therapiestrategien** bei der AML.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Übersicht über eingesetzte Reagenzien, Zelllinien, Gebrauchsgüter, Geräte und Software

##### Reagenzien

Annexin V Binding Buffer (10x)	Becton Dickinson	Fanklin Lakes, USA
APC Annexin V	Becton Dickinson	Fanklin Lakes, USA
Albumin Fraktion V	Roth	Karlsruhe, D.
Alpha-Medium	Biochrom	Berlin, D.
Ampicillin	Life Technologies	Carlsbad, USA
Aprotinin	Roche	Rotkreuz, Schweiz
Biocoll-Trennmedium	Biochrom	Berlin, D.
Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate	BioRad	Hercules, USA
Cytarabin	Cell Pharm	Bad Vilbel, D.
Daunorubicin	Pfizer	New York, USA
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
dNTP-Lösung	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium	Biochrom	Berlin, D.
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Ethanol	Merck	Darmstadt, D.
Fötale Kälberserum	Capricorn Scientific	Ebsdorfergrund, D.
Glycerolphosphat	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Glycin	BioRad	München, D.

LB Broth	Life Technologies	Carlsbad, USA
Leupeptin	Roche	Rotkreuz, Schweiz
Light Cycler 480 Probes Master	Roche	Rotkreuz, Schweiz
Methanol	Merck	Darmstadt, D.
Nicht-essentielle-Aminosäuren-Lösung (100X)	Life Technologies	Carlsbad, USA
Normal Mouse IgG	Santa Cruz Biotechnology	Dallas, USA
Page Ruler Plus	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
PBS	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
PBS (10x)	Life Technologies	Carlsbad, USA
Penicillin/Streptomycin	Biochrom	Berlin, D.
Pepstatin	Roche	Rotkreuz, Schweiz
Perfabloc	Roche	Rotkreuz, Schweiz
Phenazinmethosulfat	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Phosphate Inhibitor Cocktail II	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
PPI	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Primer random	Roche	Rotkreuz, Schweiz
Propidiumiodid	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Protector RNase Inhibitor	Roche	Rotkreuz, Schweiz
Puromycin	Life Technologies	Carlsbad, USA
Recombinant murine Interleukin-3	Genaxxon Bioscience	Ulm, D.
Rinderalbumin	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
RIPA-Puffer	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA

RPMI-Medium 1640 + GlutaMAX-I	Life Technologies	Carlsbad, USA
RNase freies Wasser	Qiagen	Venlo, Niederlande
NaF (0,5 M)	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Natriumpyrophosphat (0,2 M)	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Natriumpyruvat-Lösung	Life Technologies	Carlsbad, USA
Transcriptor Reverse Transkriptase	Roche	Rotkreuz, Schweiz
Transcriptor RT Reaction Buffer (5x)	Roche	Rotkreuz, Schweiz
Tris	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Trypsin-EDTA	Biochrom	Berlin, D.
Tween 20	Roth	Karlsruhe, D.
XT Reducing Agent	BioRad	München, D.
XT Sample Buffer	BioRad	Hercules, USA
XT Tricine Running Buffer	BioRad	Hercules, USA
XTT Sodium Salt	AppliChem	Darmstadt, D.

### **Kits**

PureLink HiPure Plasmid Midiprep Kit	Life Technologies	Carlsbad, USA
RNeasy Plus Mini Kit	Qiagen	Venlo, Niederlande
QIAshredder	Qiagen	Venlo, Niederlande
Trans-Lentiviral shRNA Packaging Kit	GE Dharmacon	Lafayette, USA

### **Glycerolstocks**

ASPP1 human GIPZ shRNA	GE Dharmacon	Lafayette, USA
Empty Vector Control GIPZ shRNA	GE Dharmacon	Lafayette, USA

### **Gebrauchsgüter**

Criterion XT Precast Gel (7% Tris-Acetate)	BioRad	Hercules, USA
Criterion Blotter Filterpapier	BioRad	Hercules, USA
Erlenmeyerkolben 500 ml		
FACS-Röhrchen 5 ml	Corning	New York, USA
Kryoröhrchen 2 ml	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Netzgerät: BioRad PowerPac	BioRad	Hercules, USA
Nitrocellulosemembran 0,2µm	GE Healthcare	Chicago, USA
Zählkammer nach Neubauer	Roth	Karlsruhe, D.
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Corning	New York, USA
Zellkulturflaschen 275 ml	Corning	New York, USA
Zellkulturplatte (6-Well)	Corning	New York, USA

### **Antikörper**

Anti-ASPP1 (Artikel-Nr.: A4355)	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Anti- $\alpha$ -Tubulin (Artikel-Nr.: 3873S)	Cell Signaling	Danvers, USA
Anti-Mouse IgG 800 CW (Artikel-Nr.: 926322110)	LI-COR Biosciences	Lincoln, USA
Anti-Mouse IgG 680 RD (Artikel-Nr.: 92668070)	LI-COR Biosciences	Lincoln, USA

Anti-Goat IgG 800CW (Artikel-Nr.: 92632214)	LI-COR Biosciences	Lincoln, USA
--	--------------------	--------------

### **Primer und Probes**

ASPP1 forward Primer (5'-TCATGAACGGCAATCTGTCT-3')	Eurofins	Luxemburg, Luxemburg
ASPP1 reverse Primer (5'-GATCAACCCTTAAAATTGCAGTC-3')	Eurofins	Luxemburg, Luxemburg
ASPP1 Sonde (Probe #4, Universal Probe Library)	Roche	Rotkreuz, Schweiz
GAPDH forward Primer (5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3')	Eurofins	Luxemburg, Luxemburg
GAPDH reverse Primer (5'-GCCCAATACGCCCAAATCC-3')	Eurofins	Luxemburg, Luxemburg
GAPDH Sonde (Probe #60, Universal Probe Library)	Roche	Rotkreuz, Schweiz

### **Zelllinien**

293T (DSMZ-No.: ACC 635)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
KASUMI-1 (DSMZ-No.: ACC 220)	DSMZ	Braunschweig, D.
MOLM-14 (DSMZ-No.: ACC 777)	DSMZ	Braunschweig, D.
NB-4 (DSMZ-No.: ACC 207)	DSMZ	Braunschweig, D.
OCI-AML3 (DSMZ-No.: ACC 582)	DSMZ	Braunschweig, D.

## Geräte

CO <sub>2</sub> -Brutschrank (HERA cell 240i)	Heraeus	Hanau, D.
Durchflusszytometer FACSCalibur®	Becton Dickinson	Fanklin Lakes, USA
Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Observer Z1)	Carl Zeiss AG	Oberkochen, D.
Gefrierschrank (-80°C)	Sanyo	Osaka, Japan
Infrarot-Imaging-Gerät (LI-COR Odyssey)	LI-COR Biosciences	Lincoln, USA
Inkubationsschüttler (Innova 44)	New Brunswick Scientific	Edison, USA
Light Cycler 480	Roche	Rotkreuz, Schweiz
Sterilwerkbänke (HERA safe)	Heraeus	Hanau, D.
Zentrifuge (Varifuge 3.0RS)	Heraeus	Hanau, D.

## Software

CellQuest Pro™	Becton Dickinson	Fanklin Lakes, USA
Image Studio™	LI-COR Biosciences	Lincoln, USA
LightCycler® 480 Software	Roche	Rotkreuz, Schweiz
GraphPad Prism	GraphPad Software	Fay Avenue, USA
AxioVision	Carl Zeiss AG	Oberkochen, D.



### **2.1.2 Kollektiv der Patienten und gesunden Probanden**

Das für diese Arbeit benötigte Zellmaterial stammte aus Blutentnahmen und Knochenmarksaspiraten von Patienten mit neu diagnostizierter AML oder Erstdiagnose eines AML-Rezidivs. Patientenproben wurden vor Beginn der Therapie in Zusammenarbeit mit der Abteilung Innere Medizin II der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen bereitgestellt und sofort weiterverarbeitet. Als Einschlusskriterium diente das Vorhandensein von mehr als 20% Blasten der verwendeten Probe. Als Kontrollmaterial diente Knochenmarksaspirat von gesunden Knochenmarkspendern. Die Probeentnahme für Forschungszwecke fand unter Einverständniserklärung der Patienten und Probanden statt. Ein Ethikantrag wurde von der Ethikkommission der Universität Tübingen mit der Projektnummer 405/2006BO2 genehmigt.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Arbeiten mit Zellmaterial

#### Isolation der mononukleären Zellfraktion

Die Isolation von mononukleären Zellen aus heparinisiertem peripheren Blut und Knochenmark erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation. Dafür wurden die Proben mit PBS verdünnt, auf 15 ml Biocoll-Trennmedium in ein Zentrifugationsröhrchen geschichtet und für 20 min bei  $2000 \text{ min}^{-1}$  ohne Bremse zentrifugiert. Die dadurch isolierte mononukleäre Zellschicht wurde entnommen und in weiteren Waschsritten, in PBS verdünnt, bei  $1700 \text{ min}^{-1}$  für 5 min zentrifugiert. Die so isolierten mononukleären Zellen standen nun als Zellpellet zur Weiterverarbeitung zur Verfügung.

#### Kultivierung von Zelllinien

Die für die Experimente verwendeten Zelllinien und Kultivierungsbedingungen sind in Tabelle 3 beschrieben. Das RPMI-, Alpha- und DMEM-Medium wurde dafür mit jeweils 1% Penicillin/Streptomycin, Natriumpyruvat und nicht-essentiellen Aminosäuren versetzt.

**Tabelle 3: Zelllinien und Kultivierungsbedingungen**

Zelllinie	Zellart	Kulturmedium
293T	Humane embryonale Nierenzelllinie	DMEM-Vollmedium + 20% FBS
KASUMI-1	Humane AML-Zelllinie CD34 <sup>+</sup> , KIT Mut	RPMI-Vollmedium + 10% FBS
MOLM-14	Humane AML-Zelllinie CD34 <sup>+</sup> , FLT3 Mut, p53wt	RPMI-Vollmedium + 10% FBS
NB-4	Humane AML-Zelllinie (Promyelozytenleukämie)	RPMI-Vollmedium + 10% FBS
OCI-AML3	Humane AML-Zelllinie CD34 <sup>+</sup> , p53wt	Alpha-Medium +20% FBS

Die Zellen wurden unter sterilen Bedingungen in  $75 \text{ cm}^2$  großen Gewebekulturflaschen mit jeweils 15 ml Medium kultiviert und bei  $37 \text{ °C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$  und 100 % Luftfeuchtigkeit

im Inkubator bebrütet. Nicht adhärente Zellen (KASUMI-1, MOLM-14, NB-4, OCI-AML3) wurden jeweils nach 48-72h in  $1 \times 10^7$  Zellen pro Flasche passagiert und mit neuem Medium versorgt. Adhärenzte 293T-Zellen wurden nach Erreichen von 80 % Konfluenz mit Trypsin-EDTA-Lösung vom Flaschenboden gelöst und im Verhältnis 1:5 mit neuem Medium versehen. Alle Arbeiten fanden unter sterilen Bedingungen an einer Laminar-Flow-Werkbank statt.

### Lagerung der Zellproben und Zelllinien

Primäres Zellmaterial von gesunden Probanden und Patienten wurde nach Möglichkeit unmittelbar nach der Isolation für weitere Versuche verwendet. War dies nicht möglich, wurde die isolierte mononukleäre Zellfraktion in 1 ml Einfriermedium bei einer Zelldichte von  $1 \times 10^7$  / ml bei -80 °C konserviert. Mit Zelllinien wurde in einer möglichst frühen Passage in gleicher Weise verfahren. Die Einfriermedien setzten sich aus 50 % Medium, 40 % FBS und 10 % DMSO zusammen. Als Basismedium für Primärmaterial diente DMEM. Für Zelllinien wurde zur Kryokonservierung, jeweils dem Kultivierungsmedium entsprechend, DMEM, Alpha-Medium oder RPMI-Medium verwendet.

### Behandeln von Zelllinien mit Chemotherapeutika

Für die Behandlung wurden die Zelllinien in 6-Well-Platten ausgesät und in jeweils 2 ml Medium mit den in Tabelle 4 angegebenen Konzentrationen Chemotherapie für 48 h kultiviert. Als Negativkontrolle wurde immer ein unbehandeltes Well geführt. Im Anschluss wurde in den Ansätzen durchflusszytometrisch die Therapie-induzierte Apoptose analysiert.

**Tabelle 4: Konzentrationen der Chemotherapeutika**

Zelllinie	Konzentration von Cytarabin [ $\mu\text{mol/l}$ ]				Konzentration von Daunorubicin [ $\text{nmol/l}$ ]			
	0,25	0,5	1,0	2,0	10	25	50	100
MOLM-14 ASPP1 KD/EV	0,25	0,5	1,0	2,0	10	25	50	100

## **Behandeln von Zelllinien und primären Blasten mit Decitabin**

Für die Behandlung von MOLM-14-Zellen und primären Patienten-Blasten wurden  $3 \times 10^7$  Zellen in 10 ml des entsprechenden Wachstumsmediums für 24 h mit 1  $\mu\text{M}$  Decitabin behandelt und anschließend die ASPP1-Expression mittels qRT-PCR ermittelt. Als Kontrolle diente eine unbehandelte Kultur der MOLM-14-Zelllinie und der jeweiligen AML-Patienten.

## **Detektion der Apoptose mittels Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie ermöglicht es einzelne Zellen sowohl qualitativ als auch quantitativ zu analysieren. Durch eine Hochpräzisionsküvette werden Zellen innerhalb einer Trägerlösung vereinzelt und mit Laserdioden bestrahlt. Gleichzeitig wird das entstandene Streulicht durch Photodetektoren registriert. So lässt sich über das Vorwärtsstreulicht (FSC, forward scatter) die Größe, über das Seitwärtsstreulicht (SSC, side scatter) die Granularität der Zelle bestimmen. Zudem bietet die Durchflusszytometrie die Möglichkeit mittels Fluoreszenzfarbstoffen bzw. fluoreszenzmarkierten Antikörpern einzelne Zellstrukturen spezifisch zu färben und so zu analysieren.

Für die Detektion der Apoptose wurden behandelte Zellen pelletiert und für 30 min in Färbelösung, bestehend aus 100  $\mu\text{l}$  Binding Buffer, 2  $\mu\text{l}$  APC Annexin V und 5  $\mu\text{l}$  Propidiumiodid (PI), im Dunkeln inkubiert. Frühapoptotische Zellen werden durch die Bindung von Annexin V an Phosphatidylserin der Zellmembran markiert. Spätapoptotische Zellen können aufgrund der mangelnden Membranintegrität durch die zusätzliche DNA-Interkalierung des PI-Farbstoffes identifiziert werden (Vermees et al., 1995). Mittels Durchflusszytometer wurde die Viabilität der gefärbten Zellen unter Behandlung analysiert. Die  $\text{IC}_{50}$ -Werte der induzierten Apoptose wurden anhand einer mit der Software GraphPad Prism® erstellten Dosis-Wirkungs-Kurve berechnet.

## **Bestimmung der Proliferationskapazität und der Verdopplungszeiten durch lichtmikroskopische Zellzählung**

Zur Bestimmung der Proliferationskapazität der Zelllinien wurden zum Zeitpunkt  $t = 0$   $2,5 \times 10^5$  Zellen in 15 ml Kultivierungsmedium ausgesät. Anschließend wurden die Zellzahlen für 4 Tage in festen 24-Stunden-Intervallen manuell mittels Neubauer Zählkammer unter dem Lichtmikroskop bestimmt. Unter Annahme eines

exponentiellen Wachstums wurde anhand Formel 1 zuerst die Wachstumskonstante  $\lambda$  und im Anschluss mittels Formel 2 die Zellzahlverdopplungszeit  $t_d$  bestimmt.

$$\lambda = \frac{\ln(N_t) - \ln(N_0)}{t - t_0}$$

**Formel 1: Berechnung der Wachstumskonstante  $\lambda$**

$$t_d = \frac{\ln(2)}{\lambda}$$

**Formel 2: Berechnung der Verdopplungszeit  $t_d$**

$t_0$	=	Ausgangszeitpunkt
$t$	=	Beobachtungszeitpunkt
$N_0$	=	Ausgangszellzahl
$N_t$	=	Zellzahl zum Zeitpunkt $t$
$\lambda$	=	Wachstumskonstante
$t_d$	=	Verdopplungszeit

### **Bestimmung der Proliferationskapazität mittels XTT-Assay**

Als weitere Methode zur Untersuchung des Proliferationsverhaltens der Zelllinien diente die Messung der Stoffwechselaktivität mittels 2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid-Salz, kurz XTT. XTT wird hierbei von mitochondrialen Dehydrogenasen stoffwechselaktiver Zellen zu einem wasserlöslichen Formazan-Molekül reduziert. Das orangefarbige Endprodukt erlaubt die direkte Absorptionsmessung. Dabei korreliert die gemessene Absorption mit der Zahl der metabolisch aktiven Zellen (Scudiero et al., 1988). Für die Analyse wurden in einer 96-Well-Platte pro Well 30.000 Zellen in 100  $\mu$ l Wachstumsmedium angesetzt und im Brutschrank inkubiert. Für eine Analyse wurden jeweils 6 Replikate der Zellkultur angesetzt. Als Referenzwert dienten 6 Wells mit reinem Wachstumsmedium. Anschließend wurde zu gegebenen Zeitpunkten (24 h, 48 h, 72 h, 96 h) das Färbereagenz, bestehend aus 50  $\mu$ l XTT-Salz-Lösung (1 mg/ml) und 1  $\mu$ l Phenazinmethosulfat-Lösung (1,25 mM), hinzugefügt. Nach 3,5 stündiger Inkubation im Inkubator bei 37 °C erfolgte die Messung der Extinktionen mittels Photometer bei 490 nm. Normiert wurden die Messungen dabei auf die Absorption des zelllosen Wachstumsmedium.

## **2.2.2 Molekulargenetische Expressionsanalyse**

### **RNA-Isolierung**

Die RNA-Isolierung aus Zellmaterial erfolgte mittels RNeasy Plus Mini Kit nach dem vom Hersteller angegebenen Protokoll. Nachdem ca.  $1 \times 10^7$  Zellen pelletiert und mit

RLT-Puffer verarbeitet wurden, erfolgte zusätzlich zur Herstellervorschrift die Homogenisierung der lysierten Zellbestandteile unter Zuhilfenahme des QIAshredder Kits. Nach erfolgreicher RNA-Extraktion wurde mittels Nanodrop 2000 Spektrophotometer die RNA-Konzentration des Eluats bestimmt. Zudem wurde mit Hilfe des vom Gerät ermittelten Absorptionsverhältnis ( $A_{260}/A_{280}$ ) eine zu hohe Proteinkontamination ausgeschlossen.

### **cDNA-Synthese**

Die cDNA-Synthese erfolgte nach Protokoll des Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit von Roche. Tabelle 5 zeigt die für die Umschreibung der RNA in cDNA notwendigen Reagenzien eines Reaktionsansatzes, die auf Eis gekühlt weiterverarbeitet wurden.

**Tabelle 5: cDNA-Reaktionsansatz**

<b>Reagenz</b>	<b>Volumen</b>	<b>Finale Menge</b>
RNase freies Wasser	48 µl – x µl	
RNA	x µl	4 µg
Random Primer [3,2 µg/µl]	4 µl	12,8 µg
RT Reaktionspuffer (5x)	16 µl	1x
RNase Inhibitor (40 U/µl)	2 µl	80 U
dNTPs (jeweils 10mM)	4 µl	je 40 nmol
RT (20 U/µl)	2 µl	40 U
<b>Finales Volumen</b>	<b>76 µl</b>	

Der Template-Primer-Mix, bestehend aus RNA-Template, Wasser und Random Primer, wurde in einem ersten Schritt für 10 min bei 65 °C im Thermocycler inkubiert und nach einminütigem Abkühlen auf Eis mit dem Mastermix (Reaktionspuffer, RNase Inhibitor, dNTPs und RT) durchmischt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz in den Thermocycler überführt. Das für die Herstellung der cDNA verwendete Temperaturprogramm des Thermocyclers wurde wie in Tabelle 6 dargestellt programmiert. Nach Abschluss der Reaktion konnte die fertig hergestellte cDNA bei -20 °C gelagert werden.

**Tabelle 6: Programmierung des Thermocyclers**

Reaktionsschritt	Dauer [min]	Temperatur [°C]
Anlagerung der Primer	10	25 °C
Synthese der cDNA	30	55 °C
Inaktivierung der RT	5	85 °C
Kühlung	∞	4 °C

### **Quantitative Realtime-PCR**

Die Polymerasekettenreaktion stellt ein enzymabhängiges Verfahren dar, mit dem bestimmte Gen-Sequenzen eines DNA-Abschnittes vervielfältigt werden können. Anhand einer einsträngigen DNA-Matrize, synthetisiert dabei eine hitzestabile DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) einen komplementären DNA-Strang. Der Start der Elongationsreaktion wird dabei durch Oligonukleotid-Primer gewährleistet, welche sich dem Matrizenstrang anlagern. Durch wiederholte Amplifikationszyklen, verdoppelt sich dabei unter optimalen Bedingungen der DNA-Gehalt in jedem Zyklus (Mullis and Faloona, 1987).

Die Realtime-PCR macht sich dieses Prinzip zu Nutze, indem sie mit Hilfe von Fluoreszenz-Reporter-Molekülen die direkte Quantifizierung der akkumulierenden Amplifikationsprodukte erlaubt. Dabei kommen unterschiedliche Methoden der Fluoreszenz-Detektion zur Anwendung (Navarro et al., 2015). Für die Quantifizierung der PCR-Produkte wurde in dieser Arbeit das von Heid et al. beschriebene Verfahren mittels TaqMan-Sonden angewandt. Durch Interaktion der TaqMan-Sonden mit den synthetisierten DNA-Strängen, steigt so das emittierte Fluoreszenzsignal proportional zu den amplifizierten PCR-Produkten (Navarro et al., 2015). Da sich pro Zyklus der DNA-Gehalt des Reaktionsgemisches verdoppelt, ergibt sich ein exponentieller Zuwachs der Fluoreszenzemission. Durch Echtzeit-Detektion der Fluoreszenz lässt sich der so genannte  $C_t$ -Wert bestimmen. Dieser Wert gibt an, ab welchem Amplifikationszyklus sich das Fluoreszenzsignal erstmals vom Hintergrundrauschen abhebt und lässt einen Rückschluss auf die ursprünglich eingesetzte DNA-Menge zu.

Zur Analyse der Expressionslevel von ASPP1 wurde eine relative Quantifizierung angewandt, die auf das Housekeeping-Gen GAPDH normiert wurde, um

Schwankungen innerhalb der eingesetzten cDNA-Mengen auszugleichen. Die quantitative Auswertung der erhobenen  $C_t$ -Werte erfolgt durch die  $\Delta\Delta C_t$ -Methode (Pfaffl, 2004).

Die Realtime-PCR-Reaktionen zur Quantifizierung der ASPP1-Expressionslevel in AML-Patienten und gesunden Probanden wurden mit dem Light Cycler 480 (Roche) durchgeführt. Tabelle 7 liefert einen Überblick über die Programmierung des Lightcyclers. Es wurden dabei 45 Amplifizierungszyklen vorgenommen.

**Tabelle 7: Programmierung des Light Cycler 480**

	Zieltemperatur [°C]	Dauer (hh:mm:ss)	Temperaturanstieg [°C/s]
<b>Pre-Inkubation</b>	95	00:10:00	4,4
<b>Amplifikation</b>	95	00:00:10	4,4
	60	00:00:30	2,2
	72	00:00:01	4,4
<b>Kühlung</b>	40	00:00:30	2,2

Für die Durchführung der quantitativen Realtime-PCR wurden cDNA-Proben jeweils als Triplet in eine 96-Well-Platte aufgetragen. Als Negativkontrolle diente eine Wasserprobe in jeder Reihe. Die Stammlösung der für die Reaktion benötigten Reagenzien ist Tabelle 8 zu entnehmen. Hinzugefügt wurden 5  $\mu$ l der synthetisierten cDNA, wodurch das gesamte Reaktionsvolumen pro Well 20  $\mu$ l betrug.

**Tabelle 8: Stammlösung des qRT-PCR-Ansatzes**

Reagenz	Volumen
Wasser	1,8 $\mu$ l
Forward Primer	1,5 $\mu$ l
Reverse Primer	1,5 $\mu$ l
Probe	0,2 $\mu$ l
LC 480 Master Mix	10 $\mu$ l
<b>Finales Volumen</b>	<b>15 <math>\mu</math>l</b>



Anschließend wurde die Light Cycler 480 Software (Version 1.5.1.62 SP3) verwendet, um die Datensätze wie oben beschrieben auszuwerten. Die relativen ASPP1-Expressionen der untersuchten Proben wurden im Verhältnis zur ASPP1-Expression des gesunden Probanden D8 (Donor 8) gesetzt (D8 ASPP1-Genexpression = 1).

### 2.2.3 Expressionsanalysen auf Proteinebene

#### SDS-Page und Western Blot

Zur Herstellung der Lysate für die Proteinquantifizierung wurden pelletierte Zellen für 15 min in 70 – 100 µl Lysepuffer (Tabelle 9) lysiert und auf Eis alle 5 min gevortext. Die Zusammensetzung des Lysepuffers war dabei wie folgt:

**Tabelle 9: Zusammensetzung des Lysepuffers**

Reagenz	Volumen
Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> (0,2 mol/l)	5 µl
NaF (0,5 mol/l)	10 µl
Aprotinin	1 µl
Glycerolphosphat	50 µl
Leupeptin	1 µl
Pepstatin	1 µl
Perfabloc	1 µl
Phosphatase Inhibitor Cocktail II	10 µl
Protease Inhibitor Cocktail	10 µl
Ripa Puffer	943 µl
<b>Finales Volumen</b>	<b>1000 µl</b>

Nach 15-minütiger Zentrifugation ( $13200 \text{ min}^{-1}$ , 4 °C) konnte das Proteinlysate als Überstand isoliert werden und mittels Bradford-Assay im Photometer quantifiziert werden (Bradford, 1976). Dabei wurde nach Protokoll des Herstellers (Bio Rad Protein Assay) verfahren. Als Eichkurve diente eine Verdünnungsreihe mit Rinderalbumin. Im Anschluss wurden 25 µl Proteinverdünnung (Proteinmenge = 100 µg) mit 10 µl Denaturierungslösung (XT Reducing Agent und XT Sample Buffer im Verhältnis 1 : 5) für 5 min bei 95 °C denaturiert und anschließend auf ein vorgefertigtes Gel in eine Kammer mit XT-Tricine-Laufpuffer geladen. Als Maß für die Proteingröße wurde eine separate Geltasche mit 10 µl Marker (Page Ruler Plus) befüllt. Die Auftrennung der

Proteine nach Größe erfolgte mittels SDS-PAGE für ca. eine Stunde bei 150 V. Der Proteintransfer auf eine Nitrocellulose-Membran fand bei 4 °C in Transferpuffer (Tabelle 10) für 30 min bei 100 V mittels Wet-Blot-System statt.

Daraufhin wurde die Membran für eine Stunde in 10-prozentiger BSA-Lösung geblockt, um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden, und über Nacht bei 4 °C mit dem gegen das zu detektierende Protein spezifischen Primärantikörper (Tabelle 11) inkubiert. Nach mehreren Waschschritten in Waschpuffer (PBS + 0,25% Tween 20) erfolgte die einstündige Inkubation mit dem gegen den Primärantikörper gerichteten, Infrarot-Farbstoff-gekoppelten Sekundärantikörper (Tabelle 11), gefolgt von weiteren Waschschritten. Die angefärbten Proteine konnten nun mittels Infrarot-Imaging-System (Li-COR Odyssey) detektiert und quantifiziert werden.

**Tabelle 10: Zusammensetzung des Transferpuffers**

Substanz	Volumen/Masse
Deionisiertes Wasser	800 ml
Methanol	200 ml
Tris	3 g
Glycin	14,4 g

**Tabelle 11: Verwendete Antikörper**

Antikörper	Verdünnung
Anti-ASPP1 (Sigma)	1 : 500
Anti-ASPP1 (Santa Cruz)	1 : 200
Anti- $\alpha$ -Tubulin	1 : 500
Anti-Mouse IgG (800 CW)	1 : 10.000
Anti-Mouse IgG (680 RD)	1 : 10.000
Anti-Goat IgG (800 CW)	1 : 10.000

#### 2.2.4 Short-hairpin-RNA-vermittelte Suppression der ASPP1-Transkription

Die spezifische Suppression der ASPP1-Transkription in Zelllinien fand durch ein lentiviral vermitteltes shRNA-Verfahren statt. Für die Versuche kam dabei das kommerziell erwerbliche GIPZ-Lentiviral-shRNAmir-System von GE Dharmacon zur Anwendung. Als Ausgangsmaterial diente jeweils ein Glycerolstock Escherichia-coli-

Bakterien, welche den ASPP1-shRNA-Vektor und den leeren Kontrollvektor beherbergten. Die Versuche fanden in mehreren Teilschritten statt:

### **Plasmidpräparation**

Als erstes wurde durch Replikation des E. coli-Stammes das shRNA-Konstrukt-beinhalten Plasmid vermehrt und anschließend isoliert. Für die Vermehrung der Bakterien wurden 10 µl der E. coli-Suspension in 25 ml LB-Medium über Nacht bei 37° C im Inkubationsschüttler kultiviert. Durch Beifügen von 100 µg/ml Ampicillin zum Kultivierungsmedium, konnte gewährleistet werden, dass selektiv nur die Bakterien repliziert wurden, welche den Plasmidvektor und damit das Gen für eine Ampicillinresistenz inkorporierten. Die Isolation der Plasmid-DNA fand mit dem PureLink HiPure Plasmid Midiprep Kit nach Protokoll des Herstellers statt. Anschließend wurde die DNA-Konzentration des Eluats mit dem Nanodrop 2000 Spektrophotometer quantifiziert und eine zu hohe Proteinkontamination ausgeschlossen ( $1,8 \leq A_{260}/A_{280} \leq 2,0$ ).

### **Produktion von Lentiviralen Partikeln**

Für die Produktion lentiviraler Transduktionspartikel wurden HEK293T-Zellen mit dem zuvor isolierten shRNA-Vektor-Plasmid und der Vektorkontrolle transfiziert. Dabei kam das Trans-Lentiviral Packaging Kit (GE Dharmacon) zum Einsatz. Hierfür wurden HEK293T-Zellen zunächst bei ca. 80 % Konfluenz in einer 6-Well-Platte ausgesät und über Nacht unter normalen Wachstumsbedingungen kultiviert. Für die Transfektion wurden die adhärennten Zellen für 6 Stunden in 1 ml DMEM (ohne Zusätze) und 300 µl Transfektionsgemisch (Tabelle 13) inkubiert. Nach weiteren 10 Stunden wurde 1 ml Vollmedium (DMEM, 20 % FBS, jeweils 1 % Penicillin/Streptomycin, Natriumpyruvat und NEAA) zum Transfektionsansatz hinzugefügt.

**Tabelle 12: Transfektionsgemisch für HEK293T-Zellen**

<b>Reagenz</b>	<b>Volumen</b>
Plasmid-Verdünnung (6 µg DNA)	130,7 µl
Trans-Lentiviral Packaging Mix	4,3 µl
CaCl <sub>2</sub>	15 µl
2x HBSS Reagent	150 µl
<b>Finales Volumen</b>	<b>300 µl</b>

Insgesamt 16 h nach Transfektion wurde das Medium durch 2 ml DMEM mit einer reduzierten FBS-Konzentration von 5 % ersetzt. Die nun durch die HEK293T-Zelllinie produzierten und ins umgebende Medium freigesetzten Viruspartikel konnten nach 48 h Inkubation durch Zentrifugation (10 min, 1600 x g, 4 °C) als Überstand vom Zelldebris isoliert werden und bei -80 °C gelagert werden. Als Indikator für die Transfektionseffizienz der HEK293T-Zellen, wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie die Präsenz des Fluoreszenz-Reporter-Proteins TurboGFP kontrolliert.

### **Lentivirale Transduktion von Leukämie-Zelllinien**

Für die Suppression der ASPP1-Transkription wurden MOLM-14-Zellen für 6 Stunden in 1 ml serumfreien Wachstumsmedium und 250 µl Viruspartikelsuspension in einer 6-Well-Platte inkubiert. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz mit leeren Kontrollvektorpartikeln. Im Anschluss wurde der Kultur 1 ml vollwertiges Wachstumsmedium hinzugefügt und die Zellen weitere 48 h im virusenthaltenden Transduktionsmedium kultiviert. Die durch den Vektor gewährleistete Puromycinresistenz erfolgreich transduzierter Zellen wurde im nächsten Schritt ausgenutzt, um vektorpositive Zellen unter Inkubation in puromycinhaltigem Wachstumsmedium zu selektieren. Die eingesetzten Puromycinkonzentrationen wurden im Voraus durch Titration verschiedener Konzentrationen ermittelt. Durch Visualisierung des TurboGFP-Reporters mittels Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie konnte die Effizienz der Transduktion und Selektion laufend überwacht werden.

#### **2.2.5 Statistische Auswertung**

Für die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde die Software GraphPad Prism® verwendet. Als statistische Tests kamen der T-Test für normalverteilte Datensätze sowie der Mann-Whitney-U-Test für nicht normalverteilte Datensätze zur Anwendung. Korrelationen zwischen klinischen Charakteristika und der ASPP1-Expression wurden unter Annahme nicht normalverteilter Datensätze mittels Spearman-Rang-Korrelation auf Signifikanz geprüft.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 ASPP1 Expressionslevel in akuten myeloischen Leukämien

In einem ersten Schritt haben wir die ASPP1-Expression in akuten myeloischen Leukämien untersucht. Dafür wurden mittels quantitativer Realtime-PCR (siehe Abschnitt 2.3) die ASPP1-mRNA-Expressionen von vier kommerziell erwerblichen AML-Zelllinien (Kasumi-1, MOLM-14, NB-4, OCI-AML3) und 39 Patienten mit neu diagnostizierter AML oder Diagnose eines AML-Rezidivs untersucht. Als Referenzwerte wurden die ASPP1-Expressionen für die mononukleäre Zellfraktion von 12 gesunden Probanden bestimmt. Für die Vergleichbarkeit der untersuchten Proben wurden die ermittelten ASPP1-Expressionen mittels  $\Delta\Delta C_T$ -Methode (siehe Abschnitt 2.2.2) im Verhältnis zu dem Housekeeping-Gen GAPDH berechnet und auf das Expressionslevel des gesunden Probanden D8 normiert. Das Expressionslevel von D8 entspricht dabei dem Mittelwert der für die gesunden Probanden gemessenen ASPP1-Expressionen. Tabelle 13 liefert eine Übersicht der mittels quantitativer Realtime-PCR ermittelten ASPP1-mRNA-Expressionen von mononukleären Zellen gesunder Probanden und AML-Zelllinien. Tabelle 14 zeigt die erhobenen klinischen Parameter und die experimentell ermittelte ASPP1-Expression der untersuchten AML-Patienten.

**Tabelle 13: Experimentell ermittelte ASPP1-Expression mononukleärer Zellfraktionen gesunder Probanden und AML-Zelllinien**

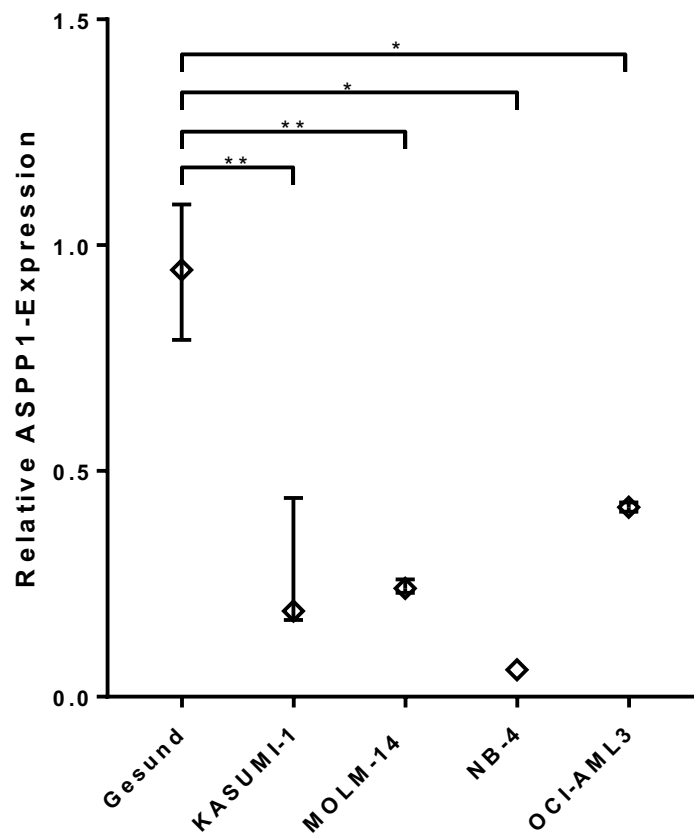
Probanden-ID	ASPP1-Expression	Probanden-ID	ASPP1-Expression	Zelllinie	ASPP1-Expression
D1	1,09	D7	0,74	KASUMI-1	0,19
D2	1,18	D8	1,00	MOLM-14	0,24
D3	2,88	D9	0,94	NB-4	0,06
D4	0,81	D10	0,95	OCI-AML3	0,42
D5	0,60	D11	0,79		
D6	1,08	D12	0,93		

**Tabelle 14: Klinische Parameter und experimentell mittels quantitativer Realtime-PCR ermittelte ASPP1-Expression von AML-Patienten.**

Patienten-ID	Alter (Jahre)	Ätiologie	ELN	WBC [/ $\mu$ l]	Therapieansprechen	ASPP1-Expression
P1	36	de novo	intermediär	207000	NR	0,05
P2	30	de novo	intermediär	24500	NR	0,13
P3	71	sekundär	intermediär	18450	-	0,38
P4	78	sekundär	intermediär	45800	-	0,53
P5	68	de novo	intermediär	165000	NR	0,04
P6	77	de novo	-	25770	-	0,47
P7	70	de novo	günstig	73560	-	0,97
P8	50	de novo	intermediär	11340	NR	0,16
P9	73	sekundär	intermediär	53800	-	0,18
P10	74	de novo	intermediär	103200	-	0,33
P11	89	de novo	intermediär	103200	-	0,35
P12	80	de novo	ungünstig	85000	-	0,26
P13	74	sekundär	ungünstig	11580	-	0,46
P14	79	de novo	ungünstig	38000	-	0,09
P15	58	de novo	intermediär	87940	NR	0,07
P16	78	de novo	günstig	1860	-	1,16
P17	58	sekundär	intermediär	62000	NR	0,21
P18	82	de novo	günstig	181000	-	0,29
P19	83	de novo	intermediär	920	-	0,28
P20	75	de novo	intermediär	149660	-	0,03
P21	49	sekundär	intermediär	6150	R	0,62
P22	52	de novo	günstig	23440	R	0,51
P23	72	de novo	günstig	6800	-	1,40
P24	90	de novo	-	14990	-	0,93
P25	71	sekundär	ungünstig	87140	-	0,45
P26	64	de novo	günstig	61520	NR	0,29
P27	64	de novo	günstig	37080	-	0,52
P28	61	de novo	günstig	5360	-	0,40
P29	64	sekundär	intermediär	74440	NR	0,08
P30	62	de novo	intermediär	14050	-	0,61
P31	65	sekundär	ungünstig	7560	-	0,18
P32	72	sekundär	ungünstig	9200	-	0,44
P33	62	de novo	günstig	8080	NR	0,16
P34	45	de novo	intermediär	72000	NR	0,04
P35	64	de novo	ungünstig	150830	NR	0,13
P36	63	sekundär	intermediär	163090	-	0,14
P37	67	-	intermediär	39000	R	0,50
P38	28	de novo	ungünstig	17880	-	0,59
P39	62	de novo	günstig	104700	R	0,36

\*WBC („white blood cell count“, Leukozytenkonzentration), R (Responder), NR (Non-Responder)

### 3.1.1 Signifikant verminderte ASPP1-mRNA-Expression in AML-Zelllinien



**Abbildung 2: Signifikant verminderte ASPP1-mRNA-Expression in AML-Zelllinien KASUMI-1, MOLM-14, NB-4, OCI-AML3 im Vergleich zu gesunden Probanden.** Die ermittelten medianen ASPP1-Expression der AML-Zelllinien sind als Rauten dargestellt. Der Interquartilsabstand als Maß für die Streuung der Werte ist durch den senkrechten Fehlerbalken repräsentiert. Als Referenz dienen die ermittelten ASPP1-Expressionen von gesunden Probanden (n =12). Die ermittelten p-Werte sind durch Asterisken gekennzeichnet, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ .

Um den Stellenwert der ASPP1-Expression in akuten myeloischen Leukämien zu evaluieren wurden zunächst die experimentell ermittelten ASPP1-Niveaus verschiedener kommerziell erwerblicher AML-Zelllinien in Relation zu den ASPP1-Niveaus von mononukleären Zellen gesunder Probanden gesetzt. In Tabelle 15 sind die wichtigsten statistischen Kenngrößen der mittels qRT-PCR bestimmten ASPP1-mRNA-Expressionslevel der AML-Zelllinien dargestellt. Für alle untersuchten Zelllinien konnte im Vergleich mit mononukleären Zellen gesunder Probanden eine reduzierte mediane ASPP1-mRNA-Expression nachgewiesen werden. Im Vergleich der AML-Zelllinien untereinander war die mediane ASPP1-Expression in der OCI-AML3-Zelllinie am höchsten, gefolgt von der MOLM-14- und KASUMI-1-Zelllinie. Am geringsten war die ermittelte relative ASPP1-Expression in der NB-4-Zelllinie.

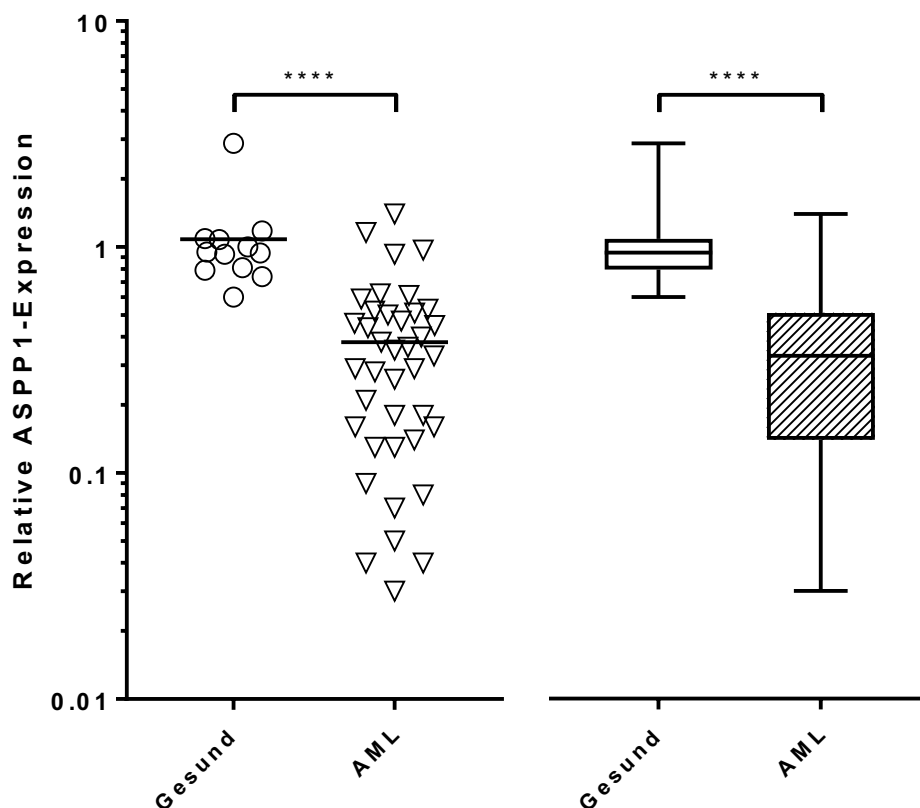
**Tabelle 15: Übersicht über statistische Kenngrößen der ASPP1-Expression der gesunden Kohorte und der AML-Zelllinien KASUMI-1, MOLM-14, NB-4, OCI-AML3.**

	<b>Gesund (n = 12)</b>	<b>KASUMI-1</b>	<b>MOLM-14</b>	<b>NB-4</b>	<b>OCI-AML3</b>
<b>Median</b>	0,95	0,19	0,24	0,06	0,42
<b>Minimum</b>	0,6	0,17	0,23	0,06	0,41
<b>Maximum</b>	2,88	0,44	0,26	0,06	0,43
<b>IQR</b>	0,29	0,27	0,03	0,00	0,02
<b>95%-CI</b>	[0,79; 1,09]	[0,17;0,44]	[0,23;0,26]	[0,06;0,06]	[0,41;0,43]

Abbildung 2 veranschaulicht die ermittelten relativen ASPP1-mRNA-Expressionen der verschiedenen Zelllinien im Vergleich zum gesunden Kollektiv. Mittels Mann-Whitney-U-Test wurden die Verteilungen der ermittelten ASPP1-Expressionsniveaus auf Signifikanz getestet. Es ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen der ASPP1-Expression gesunder Donoren und allen untersuchten AML-Zelllinien. Die ermittelten Niveaus der p-Werte sind anhand der dargestellten Asterisken ebenfalls Abbildung 2 zu entnehmen. Zwischen den einzelnen AML-Zelllinien konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.



### 3.1.2 Signifikant verminderte ASPP1-mRNA-Expression in akuten myeloischen Leukämien



**Abbildung 3: Signifikant verminderte ASPP1-Expression in AML-Patienten (n = 39) im Vergleich zu gesunden Probanden (n = 12).** In der Abbildung links sind die ermittelten ASPP1-Expressionen der Stichproben jeweils als einzelne Werte aufgetragen. Der Median der Stichprobe ist durch die waagrechte Linie gekennzeichnet. In der Abbildung rechts sind die ASPP1-Expressionen als Box-Whisker-Plot dargestellt. Die ermittelten p-Werte sind durch Asterisken gekennzeichnet, \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ .

Als nächstes wurden die ermittelten ex vivo ASPP1-Expressionslevel des AML-Patientenkollektivs analysiert. Dies geschah zunächst durch den Vergleich der ASPP1-Expressionen des Gesamtkollektivs der AML-Patienten (n = 39) mit den Expressionsniveaus der gesunden Kohorte (n = 12).

Die ermittelten ASPP1-Expressionswerte unterliegen in der AML-Kohorte einer erheblichen Streuung mit einem Minimum von 0,03 und einem Maximum von 1,4. Der Interquartilsabstand (IQR), als Maß für die Streuung der Werte, beträgt in der AML-Gruppe 0,37. Auch die ermittelten Expressionsniveaus der gesunden Kohorte variieren untereinander. Mit einer Spannweite von 0,6 bis 2,88 und einem Interquartilsabstand von 0,29 fällt die Streuung jedoch geringer aus. Interessanterweise unterscheidet sich das mediane Expressionslevel der gesunden Probanden mit einem Median von 0,95

deutlich von dem der AML-Patienten (Median = 0,33). Mittels Mann-Whitney-U-Test wurden die Verteilungen der ermittelten ASPP1-Expressionen der gesunden Kohorte (n = 12) und der AML-Kohorte (n = 39) auf Signifikanz getestet. Es ergab sich ein hoch-signifikanter Unterschied zwischen den beiden Stichproben ( $U(12,39) = 34,5$ ;  $p < 0,0001$ ). Somit wurde hier eine signifikante Herabregulation der ASPP1-mRNA-Expression in akuten myeloischen Leukämien nachgewiesen. In Tabelle 16 sind die wichtigsten statistischen Kenngrößen der ermittelten ASPP1-Expressionen beider Stichproben aufgelistet. Abbildung 3 veranschaulicht die ermittelten ASPP1-Expressionniveaus graphisch. Zwischen den ASPP1-Expressionen der unterschiedlichen Probetypen (Knochenmark, n = 7/peripheres Blut, n = 32) der AML-Kohorte ergab sich kein signifikanter Unterschied ( $p = 0,60$ ).

**Tabelle 16: Übersicht über statistische Kenngrößen der ASPP1-Expression der gesunden Kohorte und der AML-Kohorte**

	<b>Gesund (n = 12)</b>	<b>AML (n = 39)</b>
<b>Median</b>	0,95	0,33
<b>Minimum</b>	0,6	0,03
<b>Maximum</b>	2,88	1,4
<b>IQR</b>	0,29	0,37
<b>95%-CI</b>	[0,79; 1,09]	[0,18; 0,46]

### 3.1.3 Analyse der ASPP1-Expression verschiedener AML-Subgruppen

#### Charakterisierung der Patientenkohorte

Aus Abschnitt 3.1.3 wird ersichtlich, dass die ASPP1-Expressionen innerhalb der AML-Kohorte einer erheblichen statistischen Dispersion unterliegen. Aus diesem Grund wurde in einer weiteren Untersuchung die ASPP1-Expression verschiedener AML-Subgruppen analysiert, um genauere Zusammenhänge der Herabregulation von ASPP1 in akuten myeloischen Leukämien aufzuklären. Dafür wurden klinische Parameter erhoben, allen voran das prognostische Risiko der AML-Subentitäten in Bezug auf molekular- bzw. zytogenetische Veränderungen des leukämischen Klons. Die prognostische Risikostratifizierung fand anhand der Empfehlungen des European LeukemiaNet (siehe Abschnitt 1.3.4) in „günstiges Risiko“, „intermediäres Risiko“ und

„ungünstiges Risiko“ statt. Außerdem wurde eine reduzierte Risikoeinteilung vorgenommen, indem die Kohorte mit günstigem Risiko als „Low-Risk“ klassifiziert wurde und der Kohorte „High-Risk“, bestehend aus den Stichproben mit intermediärem und ungünstigem Risiko, gegenübergestellt wurde.

Zusätzlich zur ELN-Risikostratifizierung wurden weitere klinische Parameter erhoben, welche für die Prognose der AML eine Rolle spielen, darunter das Alter der Patienten, die Ätiologie der AML (primär/sekundär), die Leukozytenzahl bei Diagnosestellung (WBC) und das Ansprechen auf die Induktionschemotherapie. Als „Responder“ (R) wurden Patienten definiert, bei denen unter Induktionschemotherapie eine komplette Remission (CR) erzielt wurde. Als „Non-Responder“ (NR) wurden diejenigen Patienten gehandelt, bei denen keine CR erzielt wurde. Tabelle 17 liefert einen Überblick über die erhobenen Patientenparameter. In Tabelle 14 sind die klinischen Charakteristika der einzelnen Patienten im Bezug zur individuellen ASPP1-Expression aufgelistet.

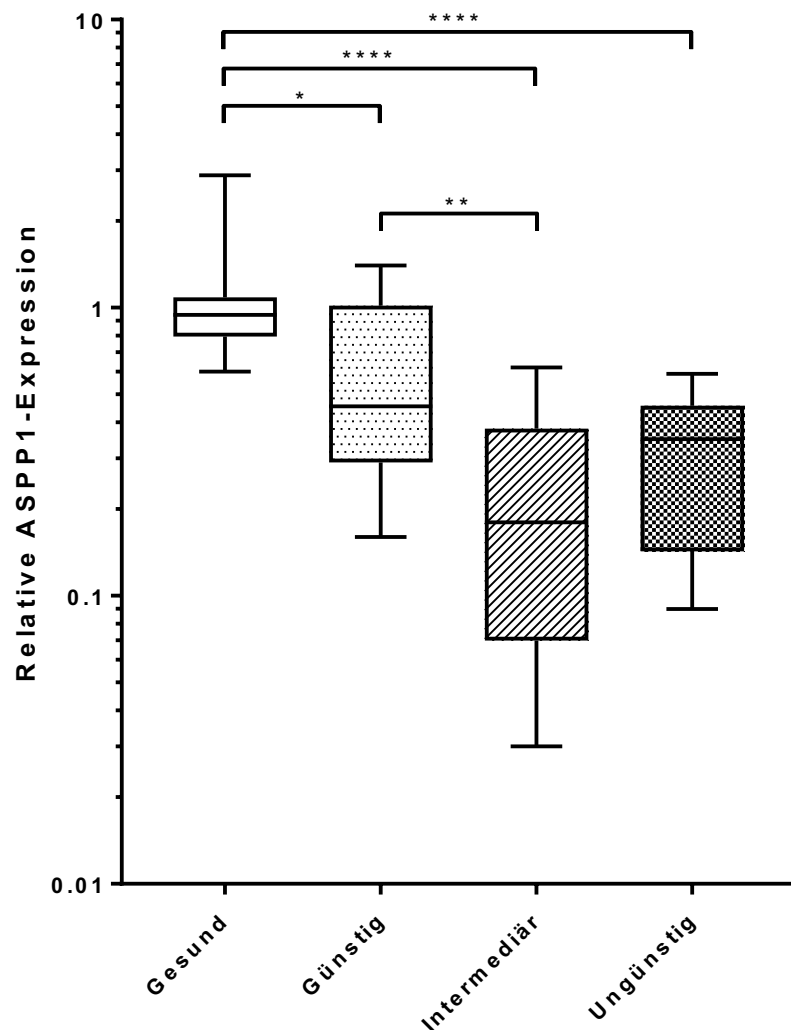
**Tabelle 17: Klinische Charakteristika der AML-Patientenkohorte**

Patientenparameter (n = 39)	
Altersdurchschnitt [Jahre]	66 ± 14 (SD)
durchschnittlicher WBC [Zellen/ $\mu$ l]	60.331 ± 57.130 (SD)

	Anzahl
Ätiologie (n = 38)	
de novo AML	27
sekundär (sAML)	11
ELN-Risikostratifizierung (n = 37)	
günstig	10
intermediär	19
ungünstig	8
Vereinfachte Risikostratifizierung (n = 37)	
Low-Risk-AML	10
High-Risk-AML	27
Therapieansprechen (n = 15)	
Responder	4
Non-Responder	11

## Signifikant verminderte ASPP1-Expression in risikostratifizierten AML-Subgruppen mit intermediärer und ungünstiger Prognose



**Abbildung 4: Signifikant verminderte ASPP1-Expression in risikostratifizierten AML-Subgruppen mit intermediärer und ungünstiger Prognose.** Die Verteilungen der relativen ASPP1-Expressionen der risikostratifizierten AML-Subgruppen (günstig n = 10, intermediär n = 19, ungünstig n = 8) sind als Box-Whisker-Plot dargestellt. Als Referenz dienen die ermittelten ASPP1-Expressionen von gesunden Probanden (n = 12). Die ermittelten p-Werte sind durch Asterisken gekennzeichnet, \* p < 0,05, \*\* p ≤ 0,01, \*\*\*\* p ≤ 0,0001.

Für die detaillierte Untersuchung der ASPP1-Expression bei AML-Patienten wurde diese anhand der ELN-Kriterien in die Risikosubgruppen „günstig“, „intermediär“ und „ungünstig“ aufgeteilt und die Expressionslevels verglichen. Als Referenz dienten die physiologischen ASPP1-Expressionsniveaus der gesunden Kohorte. In Tabelle 18 sind die ermittelten Kenngrößen der ASPP1-Expression der vier Stichproben aufgelistet.

**Tabelle 18: Übersicht über statistische Kenngrößen der ASPP1-Expression der gesunden Kohorte und der AML-Risikosubgruppen**

	<b>Gesund (n = 12)</b>	<b>Günstig (n = 10)</b>	<b>Intermediär (n = 19)</b>	<b>Ungünstig (n = 8)</b>
<b>Median</b>	0,95	0,455	0,18	0,35
<b>Minimum</b>	0,6	0,6	0,16	0,03
<b>Maximum</b>	2,88	1,4	0,62	0,59
<b>IQR</b>	0,29	0,73	0,31	0,32
<b>95%-CI</b>	[0,79; 1,09]	[0,29; 1,16]	[0,07; 0,38]	[0,09; 0,59]

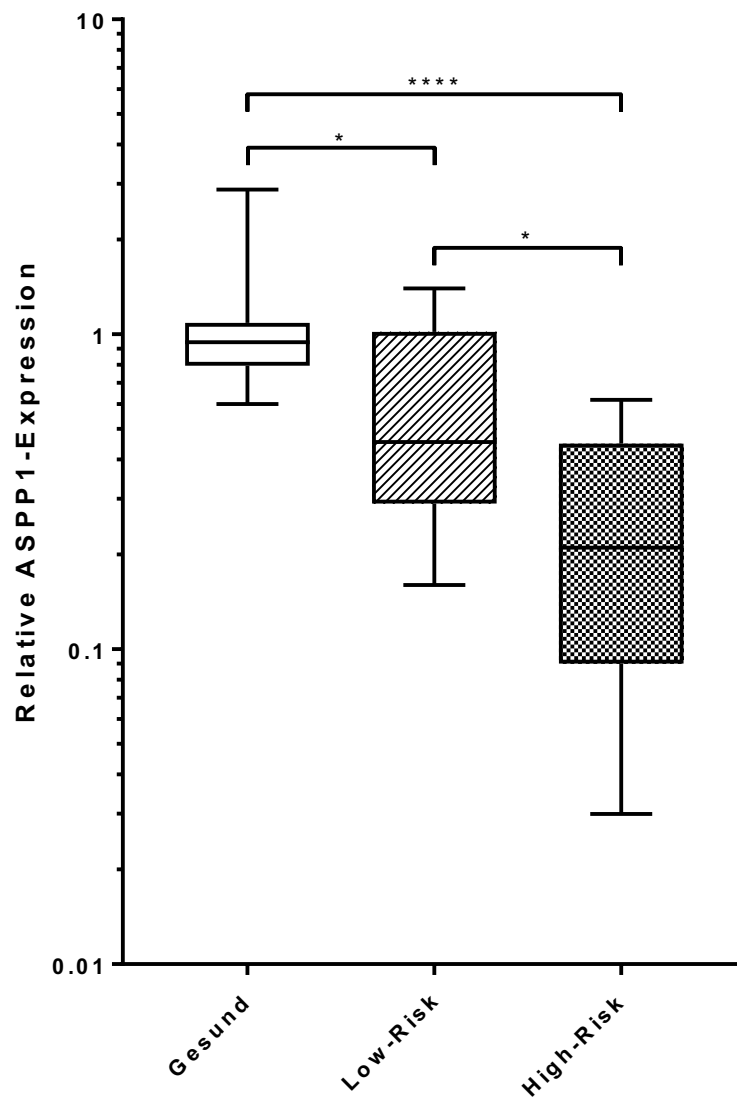
Vergleicht man nun die medianen ASPP1-Expressionslevel der verschiedenen AML-Risikosubgruppen, so ergeben sich neben den statistisch signifikanten Unterschieden der ASPP1-Expression der gesunden Kohorte zum AML-Gesamtkollektiv (siehe Abschnitt 3.1.3) auch erkennbare Unterschiede zwischen den verschiedenen Risikosubgruppen. Auffällig ist dabei, dass die Stichprobe mit günstiger Prognose die höchste mediane ASPP1-Expression unter den AML-Subgruppen aufweist.

Mittels Mann-Whitney-U-Test wurden die verschiedenen Verteilungen der ASPP1-Expressionsniveaus der vier Stichproben auf Signifikanz überprüft. Zwischen den ermittelten ASPP1-Expressionen der gesunden Kohorte und der AML-Patienten mit günstigem molekulargenetischem Risikoprofil ergaben sich signifikante Unterschiede ( $U(12,10) = 28$ ;  $p = 0,0348$ ). Ebenfalls ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den ASPP1-Expressionen gesunder Probanden und AML-Patienten mit intermediärem Risiko ( $U(12,19) = 2$ ;  $p < 0,0001$ ) beziehungsweise AML-Patienten mit ungünstigem Risikoprofil ( $U(12,8) = 0$ ;  $p < 0,0001$ ). Die Signifikanztestung mittels Mann-Whitney-U-Test ergab außerdem signifikante Unterschiede zwischen den ASPP1-Expressionen der AML-Patienten mit günstigem und intermediärem Risiko ( $U(10,19) = 39,5$ ,  $p = 0,0094$ ). In Abbildung 4 sind die ASPP1-Expressionen der risikostratifizierten AML-Subgruppen graphisch als Box-Whisker-Plot visualisiert. Die Ergebnisse der Signifikanztestung lassen sich anhand der durch Asterisken veranschaulichten p-Werte entnehmen.

Zusammenfassend lässt sich also ein Zusammenhang zwischen der ASPP1-Expression und dem prognostischen Risiko feststellen. Dabei weisen Patienten mit

ungünstiger Prognose vergleichsweise niedrigere ASPP1-Expressionen als Patienten mit günstiger Prognose auf.

### Signifikant verminderte ASPP1-Expression in der High-Risk-AML-Subgruppe



**Abbildung 5: Signifikant verminderte ASPP1-Expression in der High-Risk-AML-Subgruppe.** Die Verteilungen der relativen ASPP1-Expressionen der risikostratifizierten AML-Subgruppen (Low-Risk n = 10, High Risk n = 27) sind als Box-Whisker-Plot dargestellt. Als Referenz dienen die ermittelten ASPP1-Expressionen von gesunden Probanden (n = 12). Die ermittelten p-Werte sind durch Asterisken gekennzeichnet, \*  $p < 0,05$ , \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ .

Noch deutlicher lässt sich dies herausarbeiten, indem die günstige AML-Risikosubgruppe gesondert („Low-Risk“) dem Zusammenschluss der intermediären und ungünstigen AML-Risikosubgruppen („High-Risk“) gegenübergestellt wird. Die wichtigsten statistisch ermittelten Parameter der ASPP1-Expression der gesunden Kohorte sowie der Low-Risk- und High-Risk-Kohorte sind Tabelle 19 zu entnehmen.

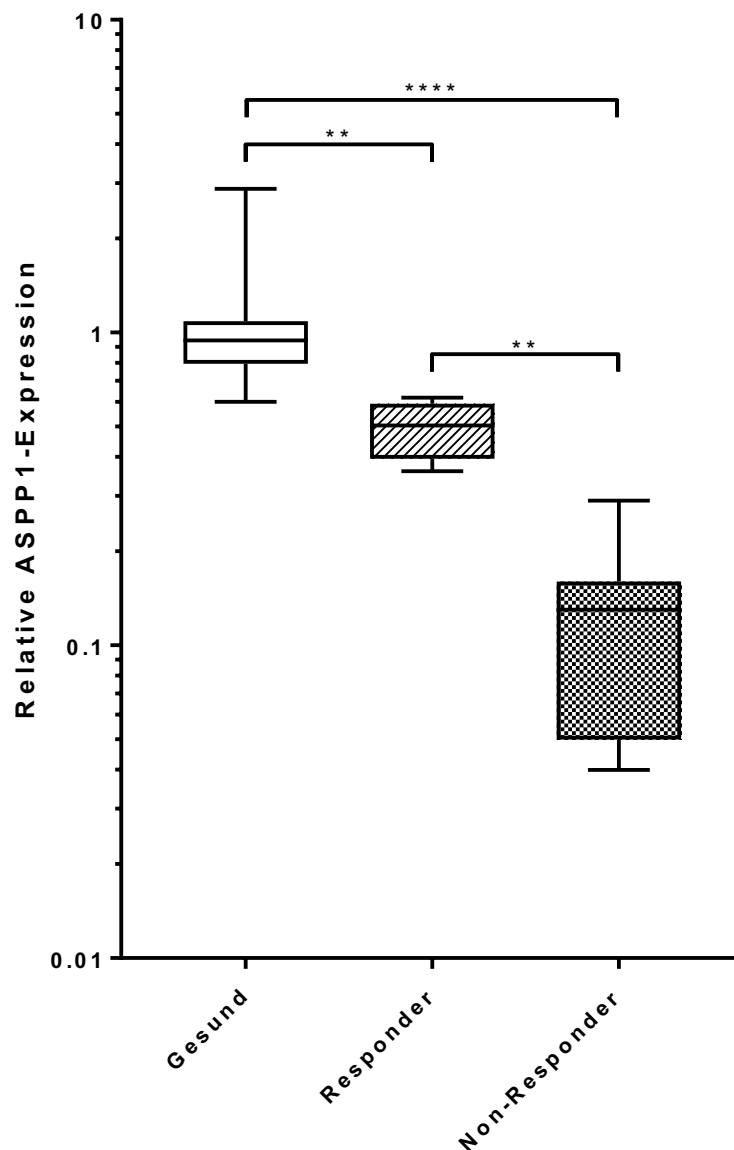
**Tabelle 19: Übersicht über statistische Kenngrößen der ASPP1-Expression der gesunden, Low-Risk- und High-Risk-Kohorte**

	<b>Gesund (n = 12)</b>	<b>Low-Risk (n = 10)</b>	<b>High-Risk (n = 27)</b>
<b>Median</b>	0,95	0,455	0,21
<b>Minimum</b>	0,6	0,6	0,03
<b>Maximum</b>	2,88	1,4	0,62
<b>IQR</b>	0,29	0,73	0,36
<b>95%-CI</b>	[0,79; 1,09]	[0,29; 1,16]	[0,13; 0,44]

Anhand der erhobenen medianen ASPP1-Niveaus der Stichproben lässt sich ein klarer Zusammenhang zwischen der ASPP1-Expression und der Prognose der AML-Subtypen feststellen. So zeigt sich eine graduelle Abnahme der ASPP1-Expression zwischen der gesunden Kohorte, der Low-Risk-Kohorte und der High-Risk-Kohorte. Mittels Mann-Whitney-U-Test wurden die Verteilungen der ASPP1-Expressionslevel der Stichproben auf Signifikanz überprüft. Zwischen den ermittelten ASPP1-Expressionen der gesunden Kohorte und der Low-Risk-AML-Patienten ergaben sich signifikante Unterschiede ( $U(12,10) = 28$ ;  $p = 0,0348$ ). Interessanterweise konnten für die ASPP1-Expressionen der Low-Risk und High-Risk AML-Kohorte ebenfalls signifikante Unterschiede nachgewiesen werden ( $U(10,27) = 63,5$ ,  $p = 0,013$ ). Abbildung 5 veranschaulicht die relativen ASPP1-mRNA-Expressionen der gesunden Probanden, Low-Risk und High-Risk Kohorte als Box-Whisker-Plot. Außerdem sind in Abbildung 5 die ermittelten p-Werte der Signifikanztestung in Form von Asterisken zu entnehmen.



## Signifikant verminderte ASPP1-Expression in AML-Patienten mit fehlendem Ansprechen auf Chemotherapie



**Abbildung 6: Signifikant verminderte ASPP1-Expression in AML-Patienten mit fehlendem Ansprechen auf Chemotherapie.** Die Verteilungen der relativen ASPP1-Expressionen der nach Therapieansprechen stratifizierten AML-Subgruppen (Responder n = 4, Non-Responder n = 11) sind als Box-Whisker-Plot dargestellt. Als Referenz dienen die ermittelten ASPP1-Expressionen von gesunden Probanden (n = 12). Die ermittelten p-Werte sind durch Asterisken gekennzeichnet, \*\* p ≤ 0,01, \*\*\*\* p ≤ 0,0001.

Um zu untersuchen, ob Zusammenhänge zwischen der ASPP1-Expression und dem Therapieansprechen der Patienten auf Induktionschemotherapie bestehen, wurde die AML-Kohorte in zwei Subgruppen aufgeteilt. Die „Responder“-Gruppe setzte sich aus denjenigen Patienten zusammen, die durch die Induktionschemotherapie eine komplette Remission (CR) erreichen konnten (n = 4). Der „Non-Responder“-Gruppe

dahingegen wurden alle Patienten zugeordnet, bei denen keine CR erreicht werden konnte (n = 11). Wie in Abschnitt 1.3.2 beschrieben, kann ein nicht unerheblicher Teil der Patienten auf Grund von Komorbiditäten oder toxischen Nebenwirkungen der Chemotherapie, keiner intensiven Induktionstherapie unterzogen werden. Dies spiegelt sich auch im untersuchten AML-Gesamtkollektiv wieder. Aus der gesamten AML-Kohorte (n = 39) fließen hier deshalb nur 15 Patienten, die eine vollständige Induktionstherapie erhielten, in die Statistik ein. Nach Zuteilung der Patienten zu den entsprechenden Subkohorten, wurden die ASPP1-Expressionslevel der Responder und Non-Responder verglichen. Als Referenzwerte dienten die ermittelten ASPP1-Levels der gesunden Kohorte. Interessanterweise lässt sich auch in diesem Vergleich eine graduelle Abnahme der medianen ASPP1-Expressionen von der gesunden Kohorte, über die Responder-Gruppe zur Non-Responder-Gruppe festhalten (siehe Tabelle 20).

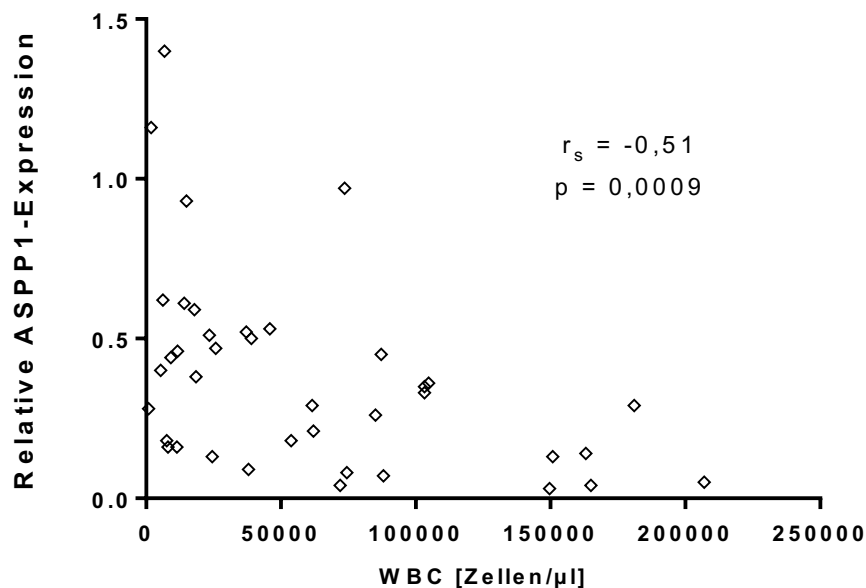
**Tabelle 20: Übersicht über statistische Kenngrößen der ASPP1-Expression der gesunden, Responder- und Non-Responder-Kohorte**

	<b>Gesund (n = 12)</b>	<b>Responder (n = 4)</b>	<b>Non-Responder (n = 11)</b>
<b>Median</b>	0,95	0,505	0,13
<b>Minimum</b>	0,6	0,36	0,04
<b>Maximum</b>	2,88	0,62	0,29
<b>IQR</b>	0,29	0,20	0,11
<b>95%-CI</b>	[0,79; 1,09]	[0,36; 0,62]	[0,04; 0,21]

Mittels Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben wurden die Verteilungen der ASPP1-Expressionen der gesunden Kohorte sowie der Responder- und Non-Responder-Kohorte auf Signifikanz getestet. Zwischen den ermittelten ASPP1-Expressionen der gesunden Kohorte und der AML-Patienten, die auf die Induktionstherapie ansprachen ergaben sich signifikante Unterschiede ( $U(12,4) = 1$ ;  $p = 0,0022$ ). Ebenfalls ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den ASPP1-Expressionen gesunder Probanden und AML-Patienten, die nicht auf die Induktionstherapie ansprachen ( $U(12,11) = 0$ ;  $p < 0,0001$ ). Interessanterweise konnten für die ASPP1-Expressionen der Responder- und Non-Responder-Kohorte innerhalb des AML-Gesamtkollektivs ebenfalls signifikante Unterschiede

nachgewiesen werden ( $U(4,11) = 0$ ,  $p = 0,0015$ ). Abbildung 6 stellt die stufenweise Herabregulation der ASPP1-mRNA-Expressionen graphisch dar und führt die p-Werte der Signifikanztestung auf.

### Inverse Korrelation der ASPP1-Expression mit der Leukozytenkonzentration bei Diagnosestellung

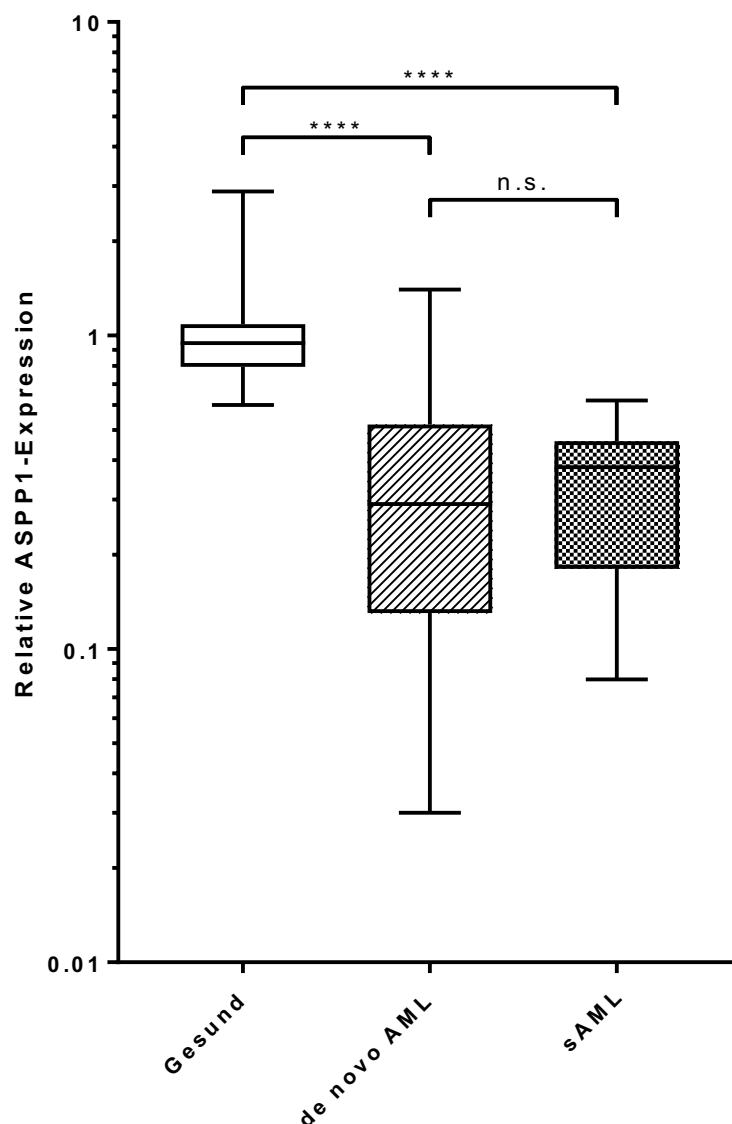


**Abbildung 7: Inverse Korrelation der ASPP1-Expression mit der Leukozytenkonzentration bei Diagnosestellung.** Die Rauten symbolisieren die einzelnen AML-Patienten als Punkte im Koordinatensystem. Die Ordinate gibt dabei die ermittelte relative ASPP1-Expression, die Abszisse die dazugehörige initiale Leukozytenkonzentration der Patienten bei Diagnose an.

Durch die Analyse der ASPP1-Expression der AML-Subgruppen in Bezug auf prognostisches Risiko und Therapieansprechen konnte bereits ein Zusammenhang zwischen der erniedrigten ASPP1-Expression und bestimmten Hoch-Risiko-Subentitäten nachgewiesen werden. Deshalb sollte untersucht werden, ob eine Korrelation zwischen der ASPP1-Expression und weiteren klinischen Risikofaktoren besteht. Hohe Leukozytenkonzentrationen und hohes Alter bei Diagnosestellung gehen, wie in Abschnitt 1.3.4 beschrieben, mit einer schlechten Prognose der Erkrankung einher. Ob ein Zusammenhang zwischen Alter bzw. Leukozytenkonzentration und der ASPP1-Expression besteht, wurde deshalb in einem nächsten Schritt analysiert. Die Spearman-Rang-Korrelation zeigte keinen Zusammenhang zwischen Alter der Patienten und ermittelter ASPP1-Expression ( $r_s = 0,20$ ;  $p = 0,22$ ).

Jedoch konnte für die Variablen Leukozytenkonzentration (WBC) und relative ASPP1-Expression eine statistisch signifikante inverse Korrelation ( $r_s = -0,51$ ;  $p = 0,0009$ ) nachgewiesen werden. Demnach sind die ermittelten ASPP1-Expressionen tendenziell geringer bei Patienten mit hohen initialen Leukozytenkonzentrationen. Abbildung 7 veranschaulicht diesen Zusammenhang graphisch.

### Keine Unterschiede der ASPP1-Expression zwischen de novo entstandener und sekundärer AML



**Abbildung 8: Keine Unterschiede der ASPP1-Expression zwischen de novo entstandener und sekundärer AML.** Die Verteilungen der relativen ASPP1-Expressionen der nach Ätiologie eingeteilten AML-Subgruppen (de novo AML  $n = 27$ , sekundäre AML (sAML)  $n = 11$ ) sind als Box-Whisker-Plot dargestellt. Als Referenz dienen die ermittelten ASPP1-Expressionen von gesunden Probanden ( $n = 12$ ). Die ermittelten p-Werte sind durch Asterisken gekennzeichnet, \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ , n.s. = nicht signifikant.

Als Nächstes wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der primären, de novo entstandenen AML oder sekundären (sAML) Ätiologie der AML und der relativen ASPP1-Expression besteht. Tabelle 21 liefert einen Überblick über die erhobenen statistischen Maße der ASPP1-Expression der Subgruppen.

**Tabelle 21: Übersicht über statistische Kenngrößen der ASPP1-Expression der de novo entstandenen und sekundären AML-Subgruppen**

	<b>Gesund (n = 12)</b>	<b>de novo AML (n = 27)</b>	<b>sAML (n = 11)</b>
<b>Median</b>	0,95	0,29	0,38
<b>Minimum</b>	0,6	0,03	0,08
<b>Maximum</b>	2,88	1,4	0,62
<b>IQR</b>	0,29	0,39	0,28
<b>95%-CI</b>	[0,79; 1,09]	[0,13; 0,51]	[0,14; 0,53]

Mittels Mann-Whitney-U-Test wurden die Verteilungen der ASPP1-Expressionen der zwei Stichproben auf Signifikanz getestet. Es ergaben sich signifikante Unterschiede sowohl zwischen den ASPP1-Expressionen gesunder Probanden und Patienten mit de novo entstandener AML ( $U(12,27) = 33,5$ ;  $p < 0,0001$ ) als auch zwischen der ASPP1-Expression gesunder Probanden und Patienten mit sekundär entstandener AML ( $U(12,11) = 1$ ;  $p < 0,0001$ ). Kein signifikanter Unterschied der ASPP1-Expression konnte zwischen den ASPP1-Expressionen der de novo und sekundär entstandenen AML-Subgruppen nachgewiesen werden ( $U(27,11)$ ,  $p = 0,77$ ). Abbildung 8 veranschaulicht die relativen ASPP1-mRNA-Expressionen der gesunden Probanden, de novo und sekundär entstandenen AML-Subgruppen als Box-Whisker-Plot. Außerdem sind in Abbildung 8 die ermittelten p-Werte der Signifikanztestung in Form von Asterisken zu entnehmen.

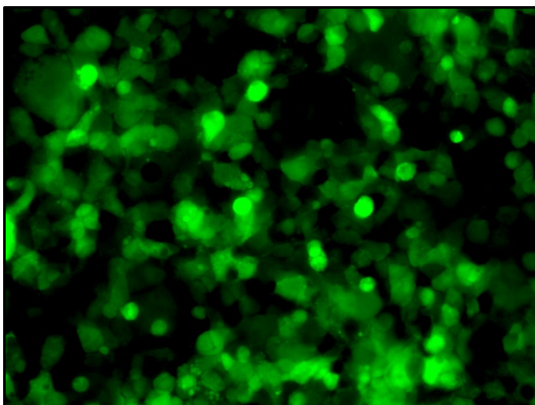
## 3.2 Funktionelle Evaluation der Therapiesensitivität und des Wachstumsverhaltens akuter myeloischer Leukämien in Abhängigkeit von der ASPP1-Expression

### 3.2.1 Etablierung eines Zellmodells mit supprimierter ASPP1-Expression

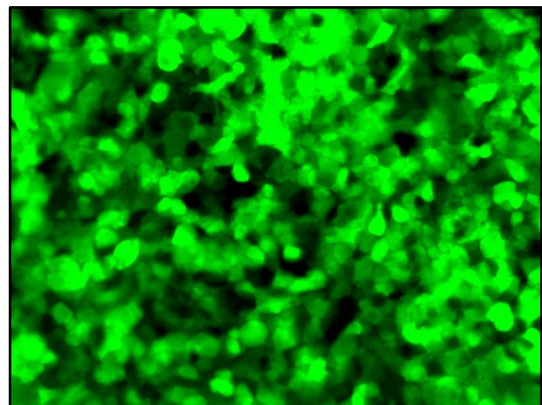
#### Produktion von lentiviralen Transduktionsvektoren

Um die Funktion von ASPP1 in akuten myeloischen Leukämien zu untersuchen, wurde zunächst ein Zellmodell mit Suppression der ASPP1-Expression etabliert. Dafür wurden in einem ersten Schritt mittels HEK293T-Zellen lentivirale Transduktionsvektoren produziert, die entweder das ASPP1-shRNA-Konstrukt oder das „Empty-Vector“-Kontrollplasmid (EV) inkorporierten. Für die Produktion lentiviraler Transduktionspartikel wurden HEK293T-Zellen mit dem zuvor isolierten ASPP1-shRNA-Plasmid und dem „Empty-Vector“-Kontrollplasmid (EV) transfiziert. Als Indikator für die Transfektionseffizienz der HEK293T-Zellen und die dadurch gewährleistete Produktion lentiviraler Transduktionspartikel, wurde 24 h nach Transfektion mittels Fluoreszenzmikroskopie die Präsenz des durch das jeweilige Plasmid kodierten Fluoreszenz-Reporter-Proteins TurboGFP kontrolliert (Abbildung 9).

**A** HEK293T EV (GFP)



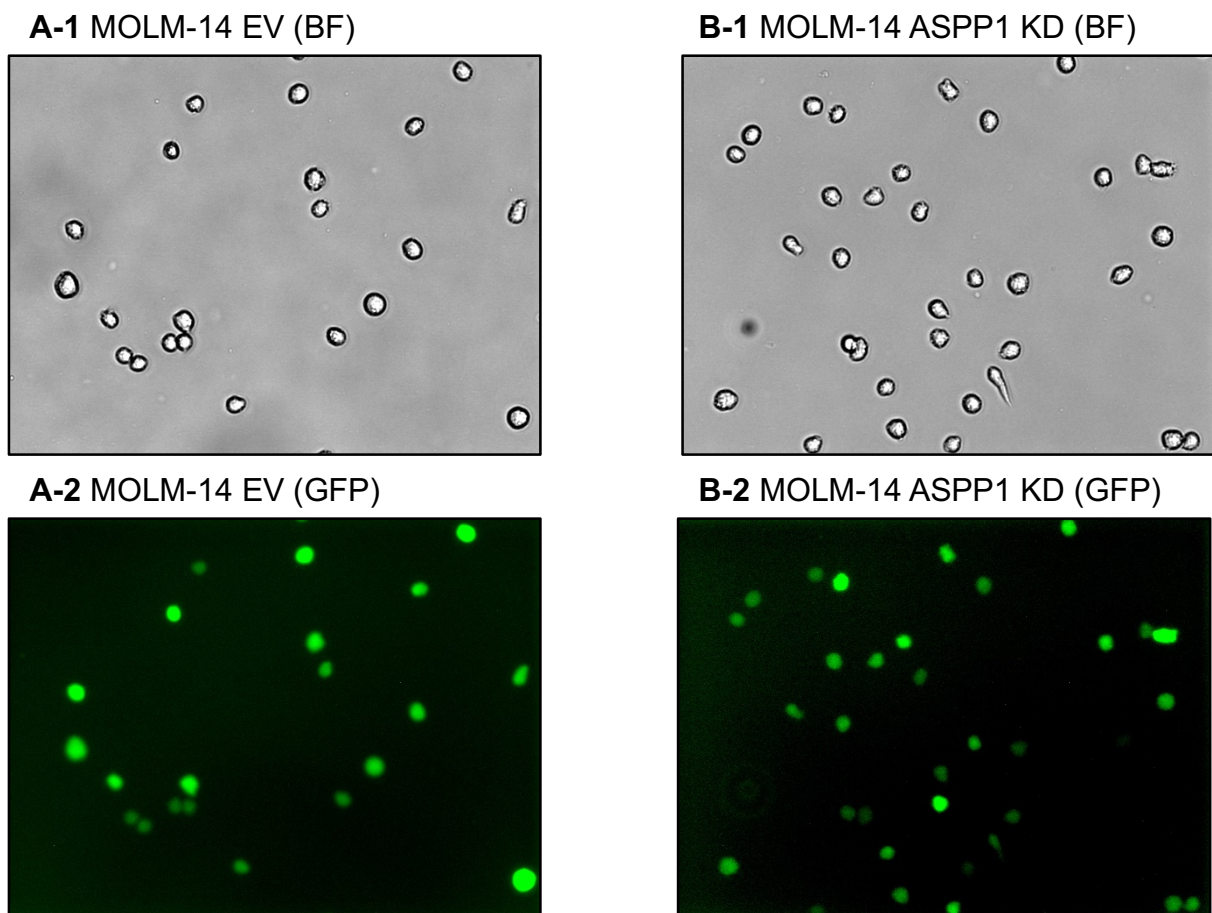
**B** HEK293T ASPP1 KD (GFP)



**Abbildung 9: Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen (20-fache Vergrößerung) der Lentiviruspartikel produzierenden HEK293T-Zellkultur.** Abbildung A stellt die mit dem „empty-vector“-Plasmid transfizierten HEK293T Zellen („HEK293T EV“) dar. Abbildung B zeigt die mit dem ASPP1-shRNA-Konstrukt transfizierten HEK293T-Knock-Down-Zellen („HEK293T ASPP1 KD“). Erfolgreich transfizierte, das Plasmid inkorporierende Zellen lassen sich durch die Expression des Fluoreszenz-Reporter-Proteins GFP (grüne Lichtemission) 24 h nach Transfektionsbeginn identifizieren.

## Transduktion der MOLM-14 Zelllinie mit dem ASPP1-shRNA-Konstrukt

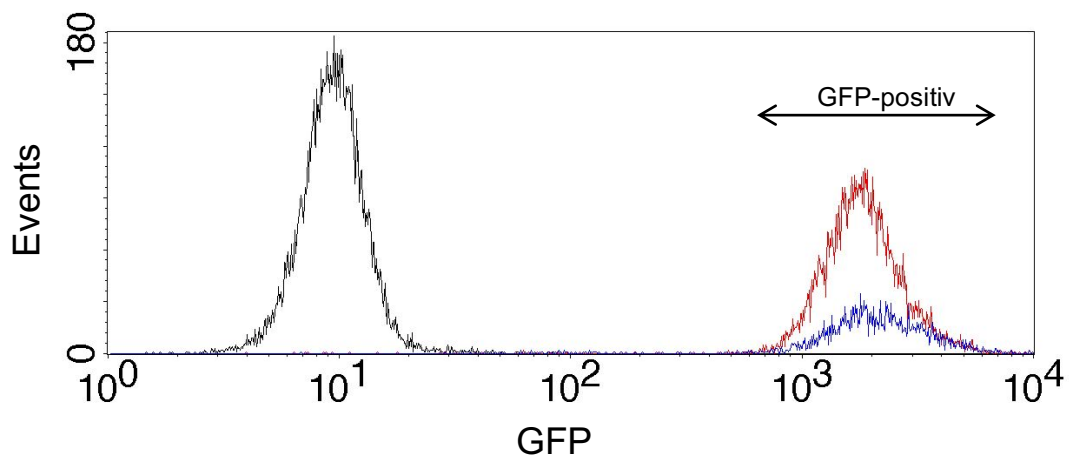
Im Anschluss wurden MOLM-14-Zellen mit dem von HEK293T-Zellen produziertem lentiviralem ASPP1-shRNA-Konstrukt (MOLM-14 ASPP1 KD) und dem inerten „empty-vector“ (MOLM-14 EV) transduziert. Nach abgeschlossener Transduktion wurde die Transduktionseffizienz in den MOLM-14-Zellen durch die Präsenz des Fluoreszenz-Reporter-Proteins TurboGFP überprüft. GFP-positive Zellen wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie (Abbildung 10) und Durchflusszytometrie (Abbildung 11) identifiziert und quantifiziert.



**Abbildung 10: Hellfeld- und Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen der transduzierten MOLM-14-Zellen.** A-1 und B-1 zeigen Hellfeldmikroskopieaufnahmen (20-fache Vergrößerung) der mit dem jeweiligen Vektor transduzierten MOLM-14-Zelllinie nach Selektion mit Puromycin. A-2 und B-2 zeigen die jeweils dazugehörigen Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen der Bildausschnitte.

Anhand der mikroskopischen Aufnahmen kann die erfolgreiche Transduktion der MOLM-14-Zelllinie nachvollzogen werden. Durch den Vergleich der Hellfeld- und Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen lässt sich feststellen, dass nahezu alle Zellen den Fluoreszenzreporter GFP exprimieren, weshalb eine erfolgreiche lentivirale Einschleusung der Plasmide angenommen werden kann.

Mittels Durchflusszytometrie wurden, wie in Abbildung 11 zu sehen, GFP-positive Zellen genau quantifiziert. Der prozentuale Anteil der GFP-positiven Zellfraktion betrug für die MOLM-14-Kontrolle 99,39 %, für die MOLM-14-ASPP1-KD-Zellen 97,22 %. Dadurch lässt sich auch mittels durchflusszytometrischer Quantifizierung eine effiziente Transduktion nachweisen.



**Abbildung 11: Durchflusszytometrische Quantifizierung der GFP-positiven Zellfraktion der transduzierten MOLM-14 EV und der MOLM-14 ASPP1 KD Zellen.** Auf der x-Achse ist die GFP-abhängige Fluoreszenzintensität aufgetragen. Die y-Achse beschreibt die absolute Anzahl der vom Durchflusszytometer detektierten Events. Schwarze Linie = Referenz der GFP-negativen nicht transduzierten MOLM-14-Kontrolle. Rote Linie = MOLM-14 EV. Blaue Linie = MOLM-14 ASPP1 KD. Der Doppelpfeil symbolisiert die als GFP-positiv gewerteten Events.

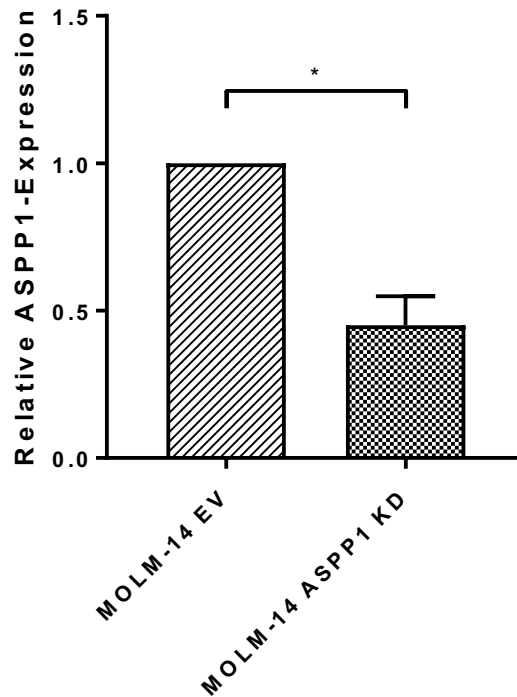


## **Suppression der ASPP1-Expression in MOLM-14-Zellen**

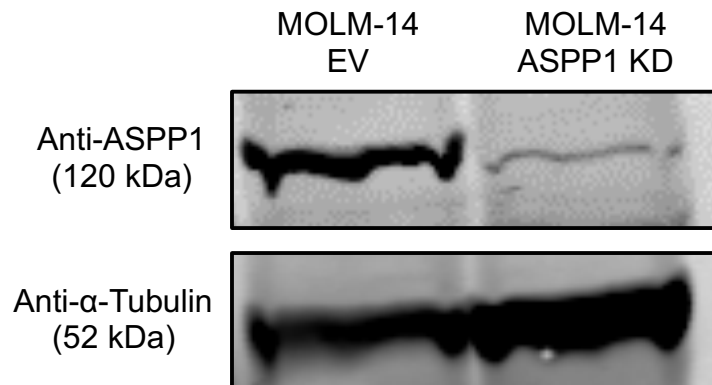
Im Folgenden sollte die suffiziente Suppression der ASPP1-Expression der MOLM-14-ASPP1-KD-Zelllinie im Vergleich zur MOLM-14-EV-Zelllinie nachgewiesen werden. Dies geschah als erstes auf mRNA-Ebene durch die Quantifizierung der relativen ASPP1-mRNA-Expression mittels qRT-PCR. Die ermittelten ASPP1-Expressionen der MOLM-14-ASPP1-shRNA-Zellen wurden mittels  $\Delta\Delta C_t$ -Methode (siehe Abschnitt 2.2.2) im Verhältnis zum Housekeeping-Gen GAPDH berechnet und auf das Expressionslevel der MOLM-14-EV normiert (Relative ASPP1-mRNA-Expression der MOLM-14-EV-Zelllinie = 1). Abbildung 12 veranschaulicht die relative ASPP1-mRNA-Expression der ASPP1-supprimierten MOLM-14-Zellen im Vergleich zur Empty-Vector-Kontrolle.

Das mittlere ASPP1-Expressionsniveau der ASPP1-supprimierten MOLM-14-Zelllinie war im Vergleich zu MOLM-14-EV-Zellen mit einer relativen Expression von 0,45 um mehr als die Hälfte reduziert. Mittels t-Test wurden die ASPP1-Expressionen der ASPP1-supprimierten MOLM-14-Zellen und der MOLM-14-EV-Kontrolle auf Signifikanz geprüft. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der ASPP1-mRNA-Expression in der ASPP1-supprimierten MOLM-14-Zelllinie ( $p = 0,0158$ ).

Als nächstes wurde die Suppression der ASPP1-Expression in ASPP1-KD-MOLM-14-Zellen auf Proteinebene mittels Western Immunoblot untersucht. Als Ladekontrolle diente die Detektion des Proteins  $\alpha$ -Tubulin (52 kDa). In Abbildung 13 sind die detektierten Proteinbanden des ASPP1-Proteins und der Ladekontrolle  $\alpha$ -Tubulin von ASPP1-supprimierten MOLM-14-Zellen im Vergleich zur Kontrolle dargestellt. Es lässt sich eine deutlich reduzierte Detektion des ASPP1-Proteins in den Lysaten der MOLM-14-ASPP1-shRNA-Zellen feststellen, womit die suffiziente Suppression der ASPP1-Expression auch auf Proteinebene verifiziert werden konnte.



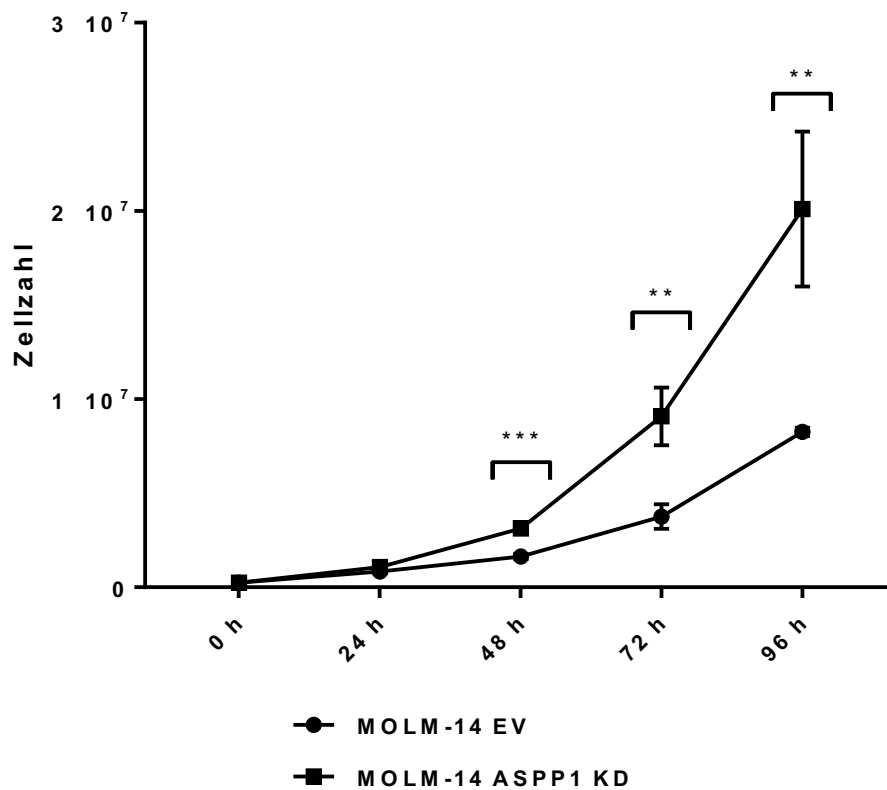
**Abbildung 12: Suppression der ASPP1-mRNA-Expression der ASPP1-KD-MOLM-14-Zelllinie im Vergleich zur MOLM-14-EV-Zelllinie.** Mittels qRT-PCR wurde die relative ASPP1-mRNA-Expression der MOLM-14-ASPP1-KD-Zellen in Bezug auf die Empty-Vector-Zelllinie ermittelt. Als Referenzgen diente GAPDH. Die ermittelten p-Werte sind durch Asterisken gekennzeichnet, \*  $p < 0,05$ .



**Abbildung 13: Verifikation der supprimierten ASPP1-Proteinexpression der ASPP1-KD-MOLM-14-Zelllinie im Vergleich zur MOLM-14-Kontrollzelllinie.** In der Abbildung sind die mittels Antikörperfärbung detektierten Proteinbanden der Proteinlysate der MOLM-14-Kontrollzelllinie (links) und MOLM-14-ASPP1-KD-Zelllinie (rechts) dargestellt. Die Graustufenintensität der Banden korreliert mit der vom spezifischen Primärantikörper gebundenen Proteinmenge. Analysiert wurde die Menge des ASPP1-Proteins im Vergleich zur Ladekontrolle  $\alpha$ -Tubulin.

### 3.2.2 Suppression der ASPP1-Expression resultiert in einer gesteigerten Proliferationskapazität im AML-Zellmodell

#### Proliferationsassay mittels lichtmikroskopischer Zellzählung



**Abbildung 14: Suppression der ASPP1-Expression resultiert in einer gesteigerten Proliferationskapazität der MOLM-14-Zelllinie.** MOLM-14-ASPP1-KD-Zellen und MOLM-14-EV-Zellen wurden nach Aussäen von  $2,5 \times 10^5$  Zellen und Inkubation im Brutschrank für 4 Tage in 24-h-Intervallen mittels Neubauerzählkammer lichtmikroskopisch ausgezählt. Auf der y-Achse sind die Mittelwerte der ermittelten Zellzahlen in Abhängigkeit der Beobachtungszeitpunkte (x-Achse) aufgetragen. Als Maß für die Streuung der Messungen ist die Standardabweichung in Form von Fehlerbalken dargestellt. Die ermittelten p-Werte sind durch Asterisken gekennzeichnet, \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Zunächst sollte das Wachstumsverhalten in Abhängigkeit von der ASPP1-Expression im Zellmodell untersucht werden. Dies fand ebenfalls anhand des ASPP1-Knock-Down-Modells in MOLM-14-Zellen statt.

Im ersten Schritt wurden dafür  $2,5 \times 10^5$  MOLM-14-ASPP1-shRNA- und Kontrollzellen zum Zeitpunkt  $t = 0$  in 15 ml Kultivierungsmedium ausgesät und in festen 24h-Intervallen für 4 Tage mittels Neubauerzählkammer ausgezählt. Die ermittelten repräsentativen Wachstumskurven aus 3 unabhängigen Versuchsansätzen sind in Abbildung 14 dargestellt. ASPP1-supprimierte MOLM-14-Zellen zeigten eine

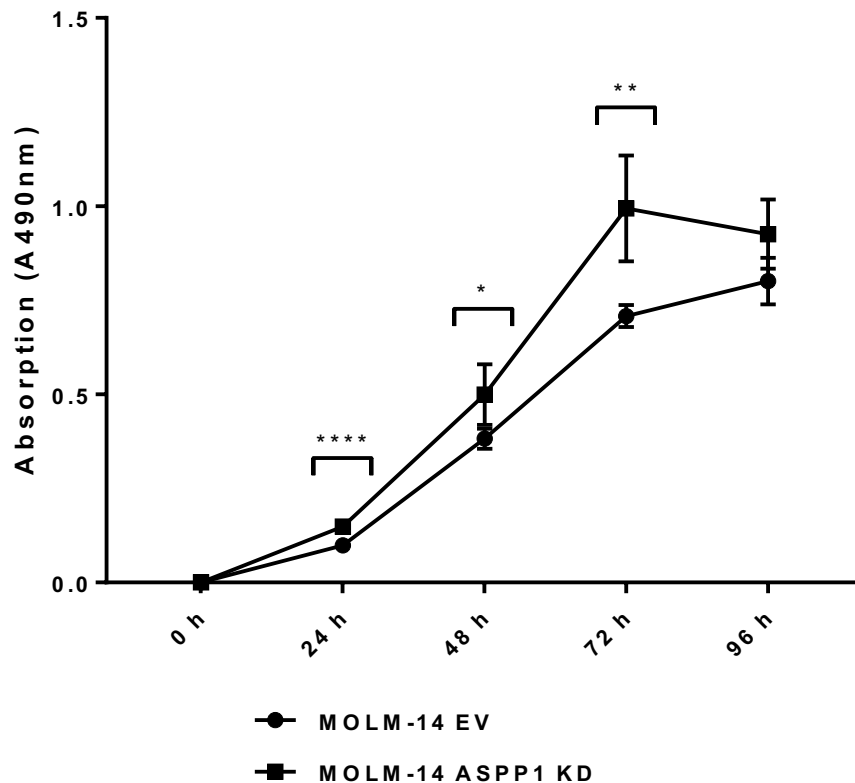
signifikant erhöhte Proliferationskapazität im Vergleich zur EV-Kontrolle. Die Signifikanztestung fand mit Hilfe des t-Tests statt.

Für beide Zelllinien, MOLM-14-ASPP1-KD und MOLM-14-EV wurden außerdem wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben die Verdopplungszeiten  $t_d$  berechnet. Die Verdopplungszeit gibt dabei das Zeitintervall an, das zur Verdopplung der Zellzahl benötigt wird. In Tabelle 22 sind die Wachstumskonstanten  $\lambda$  und die Verdopplungszeiten  $t_d$  für die ASPP1-KD-MOLM-14-Zelllinie im Vergleich zur Kontrolle aufgeführt. Wie erwartet zeigen die MOLM-14-ASPP1-KD-Zellen eine im Vergleich zur Leervektor-Kontrolle eine verminderte Verdopplungszeit.

**Tabelle 22: Verminderte Verdopplungszeit der MOLM-14-ASPP1-KD-Zelllinie im Vergleich zur MOLM-14-EV-Kontrolle**

Zelllinie	Wachstumskonstante $\lambda$ [h <sup>-1</sup> ]	Verdopplungszeit $t_d$ [h]
MOLM-14 EV	0,0364	19,02
MOLM-14 ASPP1 KD	0,0457	15,17

## Proliferationsmessung mittels XTT-Assay



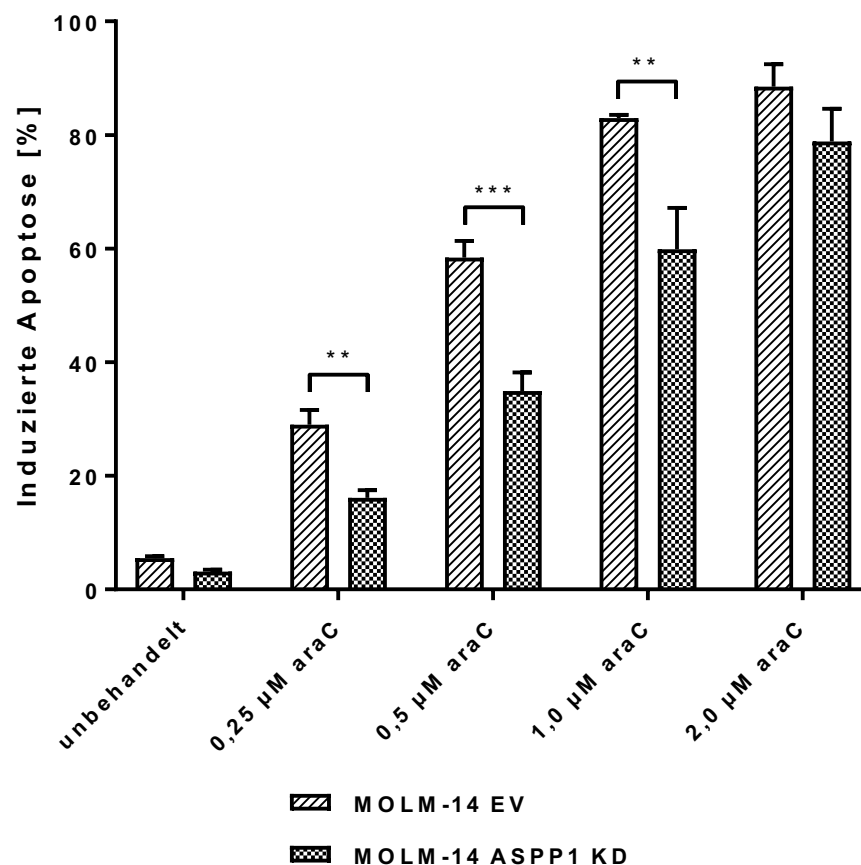
**Abbildung 15: Relative Absorption des XTT-Zellviabilitätsassays der MOLM-14-EV-Zelllinie und MOLM-14-ASPP1-KD-Zelllinie.** Mittels XTT-Assay wurde bei MOLM-14-ASPP1-KD-Zellen und MOLM-14-EV-Zellen in 24-h-Intervallen die Absorption gemessen. Auf der y-Achse sind die Mittelwerte der ermittelten Absorption in Abhängigkeit der Beobachtungszeitpunkte (x-Achse) aufgetragen. Als Maß für die Streuung der Messungen ist die Standardabweichung in Form von Fehlerbalken dargestellt. Die ermittelten p-Werte sind durch Asterisken gekennzeichnet, \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ .

Bestätigt wurden die Ergebnisse der lichtmikroskopischen Zellzahlbestimmung durch die Proliferationsmessung mittels XTT-Assay (Abbildung 15). Auch hier zeigten die ASPP1-KD-Zellen im Vergleich zur Empty-Vector-Kontrolle eine erhöhte Proliferationskapazität. Die Signifikanztestung fand durch einen t-Test statt. Es zeigten sich signifikante Unterschiede der Absorptionswerte nach 24, 48 und 72 h.

### 3.2.3 Verminderte ASPP1-Expression korreliert mit schlechterem Chemotherapieansprechen im AML-Zellmodell

Die Folge einer reduzierten ASPP1-Expression in akuten myeloischen Leukämien auf die Therapiesensitivität gegenüber herkömmlichen Chemotherapeutika sollte anhand des etablierten MOLM-14-Zellmodells untersucht werden. Dafür wurde sowohl die MOLM-14-EV-Zelllinie als auch die ASPP1-supprimierte MOLM-14-ASPP1-KD-Zelllinie jeweils für 48 h mit verschiedenen Konzentrationen der in der Behandlung der AML standardmäßig eingesetzten Chemotherapeutika Cytarabin („araC“) und Daunorubicin („Dauno“) behandelt und anschließend im Durchflusszytometer mittels Annexin-V-/PI-Assay die Induktion der Apoptose in den verschiedenen Zelllinien gemessen.

#### Behandlung mit Cytarabin



**Abbildung 16: Verminderte ASPP1-Expression korreliert mit schlechterem Therapieansprechen auf Cytarabin (araC).** Mittels Annexin-V-/PI-Assay durchflusszytometrisch ermittelter prozentualer Anteil an apoptotischen Zellen nach 48-stündiger Behandlung mit den auf der x-Achse angegebenen Konzentrationen Cytarabin. Die ermittelten p-Werte sind durch Asterisken gekennzeichnet, \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

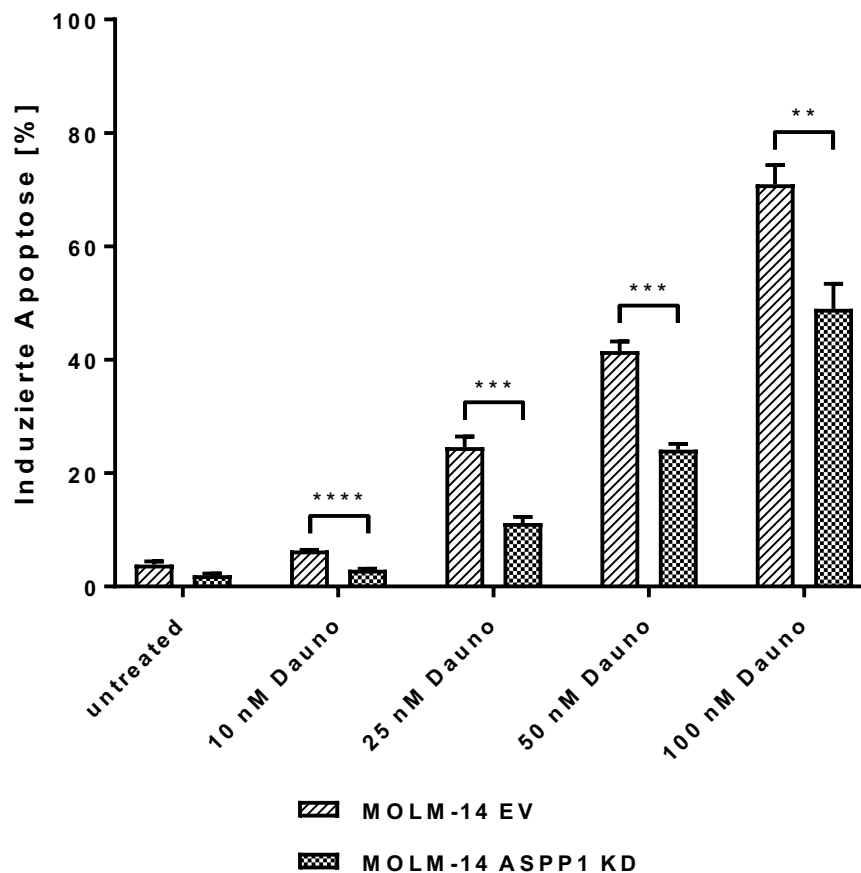
In Abbildung 16 sind die ermittelten prozentualen Anteile apoptotischer Zellen der MOLM-14-ASPP1-KD-Zelllinie im Vergleich zur EV-Kontrolle in Abhängigkeit der eingesetzten araC-Konzentration aufgetragen. Es zeigt sich eine reduzierte Apoptoseinduktion in ASPP1-supprimierten MOLM-14-Zellen. Mittels t-Test wurden die Apoptoseraten der MOLM-14-ASPP1-KD-Zellen und der MOLM-14-Kontrollen verglichen. Zwischen den ASPP1-supprimierten MOLM-14-Zellen und der Kontrolle konnten statistisch signifikante Unterschiede in der Induktion der Apoptose nach Cytarabinbehandlung mit den Konzentrationen 0,25  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$  und 1,0  $\mu\text{M}$  nachgewiesen werden. Die ermittelten p-Werte sind durch Asterisken gekennzeichnet.

Als weitere Vergleichsparameter wurden  $\text{IC}_{50}$ -Werte für ASPP1-supprimierte MOLM-14-Zellen und die EV-Kontrolle berechnet (Tabelle 23). Um die halbmaximale Induktion der Apoptose in ASPP1-supprimierten MOLM-14 im Vergleich zur EV-Kontrolle zu erreichen sind ca. 1,8-fach höhere Konzentrationen von Cytarabin notwendig.

**Tabelle 23: Ermittelte  $\text{IC}_{50}$ -Werte für die Behandlung der MOLM-14-EV- und MOLM-14-ASPP1-KD-Zellen mit Cytarabin und Daunorubicin.**

Zelllinie	$\text{IC}_{50}$ Cytarabin [ $\mu\text{M}$ ]	$\text{IC}_{50}$ Daunorubicin [nM]
MOLM-14 EV	0,397	81,2
MOLM-14 ASPP1 KD	0,713	111,7

## Behandlung mit Daunorubicin

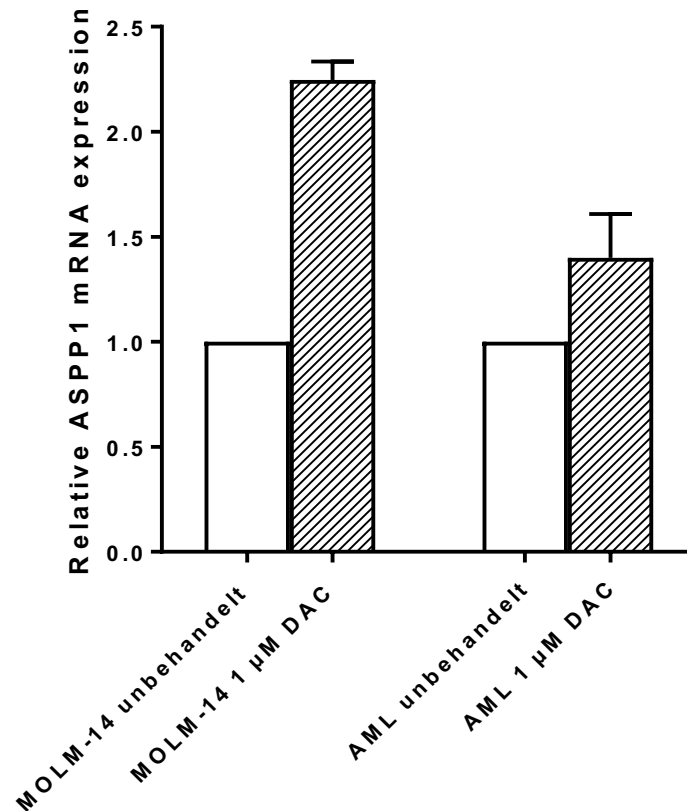


**Abbildung 17: Verminderte ASPP1-Expression korreliert mit schlechterem Therapieansprechen auf Daunorubicin (Dauno).** Mittels Annexin-V-/PI-Assay durchflusszytometrisch ermittelter prozentualer Anteil an apoptotischen Zellen nach 48-stündiger Behandlung mit den auf der x-Achse angegebenen Konzentrationen Daunorubicin. Die ermittelten p-Werte sind durch Asterisken gekennzeichnet, \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ , \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ .

Analog dazu stellt Abbildung 17 die ermittelten prozentualen Anteile apoptotischer Zellen nach 48-stündiger Behandlung der MOLM-14-ASPP1-KD-Zellen im Vergleich zur Leervektor-Kontrolle mit dem Chemotherapeutikum Daunorubicin dar. Auch hier zeigte sich eine signifikant reduzierte Apoptoseinduktion der ASPP1-supprimierten MOLM-14-Zelllinie. Analog zu den Untersuchungen mittels araC fand die Signifikanztestung mittels t-Test statt. P-Werte sind Abbildung 17 in Form von Asterisken zu entnehmen. Für die Behandlung mit Daunorubicin sind die errechneten  $IC_{50}$ -Werte ebenfalls in Tabelle 23 dargestellt. Auch hier ergab sich im Zellmodell eine erhöhte  $IC_{50}$  für die ASPP1-supprimierten MOLM-14-Zellen.



### 3.3 Partielle Restauration der ASPP1-Expression durch Behandlung mit dem DNA-Methyltransferase-Inhibitor Decitabin



**Abbildung 18: Partielle Restauration der ASPP1-Expression in MOLM-14-Zellen und ex vivo kultivierten primären AML-Blasten durch Behandlung mit Decitabin.** Mittels qRT-PCR ermittelte relative ASPP1-mRNA-Expression nach Behandlung mit 1 µM DAC für 24 h in der MOLM-14-Zelllinie und ex vivo kultivierten primären AML-Blasten.

Eine zentrale Rolle bei der epigenetischen Herabregulation von Tumorsuppressorgenen spielen Hypermethylierungen in der Promotorregion dieser Gene (Kulis and Esteller, 2010). Im Folgenden wurde untersucht, ob sich die ASPP1-Expression durch Behandlung mit der hypomethylierenden Substanz 5-Aza-2'-desoxycytidin (Decitabin, DAC) beeinflussen lässt, um so indirekte Hinweise für eine Bedeutung der Promotormethylierung bei der ASPP1-Regulation zu erhalten. Dafür wurden MOLM-14-Zellen und von 4 Patienten extrahierte AML-Blasten für 24 h mit 1 µM DAC kultiviert und im Anschluss die relative ASPP1-Expression mittels qRT-PCR im Vergleich zu der entsprechenden unbehandelten Kontrolle ermittelt. Es zeigte sich ein Anstieg der relativen ASPP1-Expressionen sowohl in der MOLM-14-Zelllinie als auch in ex vivo analysierten Patienten-Blasten nach Behandlung mit Decitabin. Abbildung 18 zeigt die graphische Darstellung der ASPP1-Expressionslevel in MOLM-

14-Zellen und primären AML-Blasten nach Behandlung mit 1  $\mu\text{M}$  DAC für eine Dauer von 24 h.

## 4 Diskussion

In zurückliegenden Arbeiten zur Familie der Apoptose-stimulierenden-Proteine-von-p53 (ASPP) konnte die proapoptotische Funktion von ASPP1 und ASPP2 sowie die antiapoptotische Funktion von iASPP nachgewiesen werden. Diese tumorsuppressive Funktion der proapoptotischen Mitglieder ASPP1 und ASPP2 sowie die onkogene Funktion des antiapoptotischen Gegenspielers iASPP wurde auf die Regulation der p53-abhängigen Apoptoseprogramme zurückgeführt (Sullivan and Lu, 2007).

In Anbetracht der geringen Mutationsrate des p53-Proteins in akuten myeloischen Leukämien im Vergleich zu anderen soliden Tumoren, könnte die Dysregulation der ASPP-Proteine daher einen alternativen Mechanismus darstellen, der zur Inaktivierung des p53-Signalwegs in AML führt, und so einerseits die Leukämogenese triggert und andererseits zur Resistenz leukämischer Blasten gegenüber der zytostatischen Behandlung mit Chemotherapeutika führt (Grimwade et al., 1998, Haferlach et al., 2008). Da speziell ASPP1 eine wichtige Rolle beim Schutz der genomischen Integrität von hämatopoetischen Stammzellen zugeschrieben werden konnte, wurde in dieser Arbeit die Rolle des ASPP1-Proteins in akuten myeloischen Leukämien untersucht (Yamashita et al., 2015).

In der vorliegenden Arbeit konnte eine signifikante Herabregulation der ASPP1-Expression in AML-Patienten im Vergleich zu gesunden Knochenmarksspendern nachgewiesen werden. Interessanterweise wiesen speziell Patienten mit ungünstigem molekulargenetischen Risikoprofil oder schlechtem Chemotherapieansprechen niedrige ASPP1-Expressionen auf. Durch die Behandlung mit der hypomethylierenden Substanz Decitabin konnte sowohl im Zellmodell als auch in kultivierten primären AML-Zellen eine partielle Restauration der ASPP1-Expression erzielt werden, was annehmen lässt, dass eine Hypermethylierung des ASPP1-Genpromotors ursächlich für die Dysregulation der ASPP1-Expression ist. Außerdem wurde in weiteren funktionellen Untersuchungen eine therapierrelevante proapoptotische und antiproliferative Funktion des ASPP1-Proteins im AML-Zellmodell demonstriert. Diese Ergebnisse liefern Hinweise darauf, dass die Dysregulation des ASPP1-Proteins einen potentiellen Mechanismus darstellen könnte, wie sich maligne entartete AML-Blasten trotz erhaltener p53-Funktion der Einleitung p53-abhängiger Apoptoseprogramme nach DNA-Schaden entziehen können.

## **4.1 Verminderte ASPP1-mRNA-Expression in akuten myeloischen Leukämien**

Durch die Untersuchungen der ASPP1-mRNA-Expression in einem AML-Patienten-Kollektiv konnte eine signifikante Herabregulation der ASPP1-Levels in akuten myeloischen Leukämien nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse suggerieren eine mögliche Beteiligung der ASPP1-Dysregulation bei der fehlgesteuerten Apoptoseinduktion des maligne entarteten AML-Klons.

Dies steht im Einklang mit den Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zur Untersuchung des 2. proapoptotischen Mitglieds der ASPP-Familie ASPP2 in akuten Leukämien. Für den Tumorsuppressor ASPP2 wurde ebenfalls eine attenuierte Expression in akuten Leukämien nachgewiesen. Interessanterweise konnte als mögliche Ursache für die verminderte ASPP2-Expression eine Hypermethylierung im Promotorbereich des ASPP2-Gens identifiziert werden (Schittenhelm et al., 2013). Auch in Bezug auf den antiapoptotischen Gegenspieler iASPP wurde eine Hochregulation der mRNA-Expression in AML beobachtet (Zhang et al., 2005). In der Zusammenschau dieser Forschungsergebnisse zur Familie der ASPP-Proteine in AML, lässt sich eine Dysregulation der gesamten Familie der ASPP-Proteine feststellen. Welche Zusammenhänge zwischen den Expressionsleveln der einzelnen ASPP-Mitglieder in akuten Leukämien bestehen, bleibt bislang ungeklärt und ist Gegenstand unserer aktuellen Untersuchungen.

Der Frage, wie sich Tumore trotz erhaltener p53-Funktion, der durch p53 medierte Apoptoseprogramme entziehen, wurde auch anhand von Untersuchungen zu ASPP1 in anderen Tumorentitäten nachgegangen. So konnten Agirre et al. (2006) eine Inaktivierung der ASPP1-Expression in ALL nachweisen. Auch hier wurde ursächlich für die Herabregulation der ASPP1-Expression eine aberrante Promotormethylierung beschrieben.

Des Weiteren konnte in der Vergangenheit eine Herabregulation der ASPP1-Expression in Proben von Brustkrebsgewebe mit p53-Wildtypstatus beobachtet werden (Samuels-Lev et al., 2001). Ähnliches wurde für Proben nicht-kleinzelliger Bronchialkarzinome (NSCLC) festgestellt. Auch hier zeigte sich eine signifikante Herabregulation der ASPP1-Expression im Vergleich zu gesundem Lungengewebe (Li et al., 2012).

Die aufgeführten Beispiele stehen im Einklang mit den hier demonstrierten Ergebnissen zur ASPP1-Expression in AML und lassen eine übergeordnete Rolle der ASPP-Dysregulation in verschiedenen Tumorentitäten annehmen.

#### **4.2 Verminderte ASPP1-Expression korreliert mit prognostisch ungünstigen AML-Subgruppen**

Bei der Betrachtung der Verteilungen der ermittelten ASPP1-Expressionen im AML-Gesamtkollektiv ergab sich eine auffällig weite Streuung der erhobenen Expressionswerte. Dies verwundert nicht, wenn man die molekulargenetisch heterogene Natur der AML-Entität bedenkt. Umso interessanter erscheint es, dass trotz dieser genetischen Heterogenität nahezu alle ASPP1-Expressionen der untersuchten Patienten unter dem ermittelten medianen ASPP1-Level des gesunden Donorkollektivs, welches als Richtwert für physiologische ASPP1-Expressionen diente, lagen. Es lässt sich deshalb annehmen, dass die Herabregulation der ASPP1-mRNA-Expression ein globales Event in AML darstellt.

Die ermittelte Streuweite der ASPP1-Level veranlasste weiterhin dazu, die ASPP1-Expressionen verschiedener AML-Subgruppen gesondert zu untersuchen. Die Analysen ergaben signifikant verringerte ASPP1-Expressionen in AML-Subgruppen mit prognostisch ungünstigem molekulargenetischen Risikoprofil und Patienten, die keine komplette Remission nach der Induktionschemotherapie erzielten. Im Einklang dazu konnte eine inverse Korrelation der ASPP1-Expressionslevel und der bei Diagnose bestehenden Leukozytenkonzentration, welche im Falle hoher initialer Werte einen prognostisch ungünstigen Faktor darstellen, festgehalten werden.

Interessanterweise decken sich diese Beobachtungen mit den Ergebnissen der Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zu ASPP2 in AML. Auch hier konnte gezeigt werden, dass die Expression des Proteinfamilienmitglieds ASPP2 besonders in Hoch-Risiko-Patienten und Patienten, die kein Ansprechen auf die Induktionschemotherapie zeigten, vermindert ist (Schittenhelm et al., 2013). Konkordant dazu, identifizieren Agirre et al. (2006) niedrige ASPP1-Expressionen als unabhängigen, prognostisch ungünstigen Faktor in ALL. Patienten mit reduzierter ASPP1-Expression weisen laut diesen Untersuchungen ein verringertes Gesamtüberleben, ebenso wie ein verringertes krankheitsfreies Überleben auf.

Auch neueste Untersuchungen zur ASPP1-Expression in klarzelligen Nierenkarzinomen konnten eine verminderte ASPP1-Expression mit einem höheren Tumorgrad und einer verminderten Lebenserwartung der Patienten korrelieren (Wang et al., 2017). Passend dazu beobachteten Mak et al. (2011) in malignen Trophoblastentumoren, einer schwangerschaftsassozierten Neoplasie des plazentaren Trophoblasten, eine verminderte ASPP1-Expression, speziell in Tumoren mit aggressivem Wachstum.

Diese Ergebnisse decken sich mit den hier vorgestellten Ergebnissen der ASPP1-Expression in AML-Subgruppen. Die Korrelation verminderter ASPP1-Expressionslevel mit prognostisch ungünstiger AML, welche ein schlechtes Ansprechen auf Induktionschemotherapie zeigen, suggeriert für ASPP1 eine Rolle als prognostischer Marker für das Therapieansprechen in AML. Ungeklärt bleibt dabei welcher exakte Zahlenwert der ASPP1-Expression dabei als Untergrenze dient, um Patienten zu identifizieren, die von einer frühzeitigen Intensivierung des Chemotherapieregimes profitieren könnten. Hierfür sind weitere Untersuchungen in einem größeren Patientenkollektiv notwendig. Zusätzlich wäre der Langzeitverlauf von erkrankten Patienten in Abhängigkeit der ASPP1-Expressionen zu verfolgen, was in diesem Setting auf Grund der fehlenden Verlaufsdaten nicht möglich war.

Neben der Relevanz von ASPP1 als prognostischem Marker, lässt die Beobachtung der verminderten ASPP1-Expression speziell in Hoch-Risiko-AML die Vermutung zu, dass die Inaktivierung der ASPP1-Funktion die Transformation des leukämischen Blasten zu einem noch aggressiveren Klon begünstigt. So könnte die aus der fehlenden ASPP1-Funktion resultierende verminderte Apoptoseinduktion auf DNA-Stress zur Anreicherung weiterer Mutationen und damit zur weiteren Progression des maligne entarteten Klons führen. Mit dieser Hypothese decken sich auch die diskutierten Ergebnisse zu ASPP1 im AML-Zellmodell, in denen gezeigt werden konnte, dass ASPP1-Interferenz in aggressiverem Wachstum und vermindertem Therapieansprechen der AML-Zelllinie resultiert.

Die Analyse der ASPP1-Expressionen von de novo und sekundär entstandenen AML ergaben keine signifikanten Unterschiede. Dies ist insofern von Belang, als bei sekundären AML interessanterweise vermehrt p53-Mutationen beobachtet werden (Christiansen et al., 2001). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der Verlust der ASPP1-Funktion nicht nur bei erhaltener p53-Funktion eine onkogene Rolle spielen

könnte, sondern über p53-unabhängige Mechanismen auch in Tumoren mit mutiertem p53-Status. Li et al. (2012) konnten im Tumorgewebe von NSCLC-Patienten auf ähnliche Weise verringerte ASPP1-Expressionen in Tumoren mit und ohne p53-Mutation feststellen. Jedoch fielen die von ihnen ermittelten ASPP1-Expressionen in p53-Wildtyp-NSCLC geringer aus, was im Kontrast zu den hier untersuchten ASPP1-Expressionen in AML steht. Auch in Untersuchungen von Brustkrebsproben steht die ASPP1-Herabregulation in p53-Wildtyp-Tumoren im Vergleich zu p53-mutierten Tumoren im Vordergrund (Samuels-Lev et al., 2001). Aus diesem Grund schlussfolgerten Li et al. (2012), dass die p53-abhängigen Mechanismen im Vordergrund der fehlerhaft wahrgenommenen ASPP-Funktionen stehen. Ein möglicher Mechanismus, wie die ASPP1-Dysregulation auch in p53-mutierten Tumoren funktionelle Folgen haben könnte, zeigen Bergamaschi et al. (2004) - durch Stimulation der Transaktivierung proapoptotischer Gene durch p63 und p73. Übereinstimmend damit, konnten Kampa et al. (2009b) dem Familienmitglied ASPP2 auch eine p53-unabhängige Funktion zuschreiben.

Mit den in dieser Arbeit vorgenommenen Untersuchungen kann der Frage, ob die ASPP1-Fehlregulation vermehrt in p53-Wildtyp-Tumoren eine Rolle spielt aufgrund des nicht in allen Fällen bekannten p53-Status der Proben nicht näher auf den Grund gegangen werden. Auch ist unsere Datenmenge zu gering, um dies abschließend zu untersuchen. In zukünftigen Studien, müsste dafür in einem größeren Kollektiv zusätzlich zur Ermittlung der ASPP1-Expressionsniveaus auch der p53-Status miterhoben werden, um so mögliche Zusammenhänge zwischen dem Mutationsstatus von p53 und der ASPP1-Expression besser herausarbeiten zu können.

#### **4.3 Suppression der ASPP1-Expression resultiert in einer gesteigerten Proliferationskapazität im AML-Zellmodell**

Die Untersuchungen im ASPP1-Knock-Down-Zellmodell zeigten eine deutliche gesteigerte Proliferationskapazität der ASPP1-supprimierten MOLM-14-Zelllinie. Methodisch konnte dies einerseits durch lichtmikroskopische Zellzählungen und andererseits mittels XTT-Zellviabilitätsassay demonstriert werden. Die repräsentative Absorptionskurve des XTT-Assays weist nach zunächst exponentiellem Anstieg nach ca. 72 h ein Plateau auf. Dies ist am ehesten Ausdruck der durch die maximale

Zelldichte erreichten Kontaktinhibition, was konsequenterweise zum Proliferationsstopp und damit zu keinem weiteren Absorptionszuwachs führt.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen der hier beobachteten proliferationshemmenden Funktion von ASPP1, konnten in den bereits beschriebenen funktionellen Knock-Down-Untersuchungen zu ASPP1 in Nierenkarzinomzellen und HCC-Zelllinien ebenfalls ein gesteigertes Proliferationsverhalten in ASPP1-supprimierten Zelllinien nachgewiesen werden (Wang et al., 2017, Zhao et al., 2010).

Welche Mechanismen ursächlich für die gesteigerte Proliferationskapazität in ASPP1-supprimierten-Zelllinien sind, wurde auch in diesen Untersuchungen nicht abschließend geklärt. Einerseits könnten direkte Interaktionen des ASPP1-Proteins mit anderen den Zellzyklus oder das Zellwachstum beeinflussenden Molekülen verantwortlich sein. Andererseits könnte die gesteigerte Proliferation auch indirekt Folge der durch die ASPP1-Suppression fehlgesteuerten Apoptose sein. So könnte durch die verminderte proapoptotische Aktivität von ASPP1 die weitere Akkumulation von Mutationen begünstigt werden, welche das zelluläre Proliferationsverhalten beeinflussen. Um diese Frage zu klären sind zukünftig weitere funktionelle Untersuchungen notwendig.

#### **4.4 Verminderte ASPP1-Expression korreliert mit schlechterem Chemotherapieansprechen im AML-Zellmodell**

Durch Etablierung eines ASPP1-Knock-Down-Zellmodells konnten die Folgen einer Herabregulation von ASPP1 auf die Behandlung der AML mit Cytarabin und Daunorubicin genauer untersucht werden. Mehrere Studien konnten ein schlechteres Therapieansprechen in AML mit mutiertem p53-Status im Vergleich zu AML mit p53-Wildtyp-Status nachweisen, was eine p53-abhängige Funktion von Cytarabin und Anthrazyklinen wie Daunorubicin nahe legt (Yin et al., 2006, Wattel et al., 1994). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Fehlregulationen in einem nachgeschalteten Bereich der p53-Signalkaskade ebenfalls Folgen auf das Therapieansprechen der AML haben. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass die Hochregulation des antiapoptotischen Bcl-2, einem „downstream“-Effektor der p53-Kaskade, mit einem schlechten Chemotherapieansprechen in AML korreliert (Campos et al., 1993). Analog zu diesem Beispiel lässt sich hypothetisieren, dass die Dysregulation der ASPP-Familie einen Einfluss auf das Therapieansprechen in AML hat. Passend hierzu konnte



von unserer Arbeitsgruppe für ASPP2 bereits eine therapierelevante proapoptotische Funktion *in vitro* nachgewiesen werden (Schittenhelm et al., 2013).

Die bisherige Datenlage zu ASPP1 in malignen soliden und hämatologischen Neoplasien ist dahingegen nicht ausreichend, um funktionelle Aspekte einer supprimierten ASPP1-Expression auf das Chemotherapieansprechen abschließend zu evaluieren. Beispielsweise beschränken sich Agirre et al. (2006) auf Expressionsanalysen und Krankheitsverlaufsuntersuchungen in ihren Studien zu ASPP1 in ALL und schlussfolgern anhand der klinisch ungünstigen Verläufe von ALL mit niedriger ASPP1-Expression auf eine therapierelevante proapoptotische Funktion von ASPP1. Dies wurde jedoch nicht in funktionellen Versuchen bestätigt. Anhand des ASPP1-Knock-Down-Modells in der AML-Zelllinie MOLM-14 sollte hier deshalb untersucht werden, welche Rolle ASPP1 in der Behandlung akuter myeloischer Leukämien spielt.

Die spezifische ASPP1-Suppression im AML-Zellmodell resultierte in einer signifikanten Inhibition der Chemotherapie-induzierten Apoptose. Damit übereinstimmend konnte durch ASPP1-Knock-Down-Versuche in Nierenkarzinomzelllinien mittels RNA-Interferenz eine therapierelevante Funktion von ASPP1 nachgewiesen werden. ASPP1-Knock-Down-Zellen zeigten hierbei eine erhöhte prozentuale Zellviabilität und einen verminderten Anteil apoptotischer Zellen nach Behandlung mit 5-FU im Vergleich zu den Vektor-Kontrollen (Wang et al., 2017). Unterstützt werden diese Ergebnisse außerdem durch Untersuchungen der ASPP1-Funktion in HCC-Zelllinien: Zhao et al. (2010) beobachten in ASPP1-supprimierten HCC-Zelllinien ebenfalls eine verminderte Induktion der Apoptose nach Behandlung mit dem Zytostatikum Cisplatin.

In wie weit sich diese Ergebnisse aus dem Zellmodell auf leukämische Blasten *in vivo* übertragen lassen ist Gegenstand aktueller Untersuchungen. Hierfür benötigt es einerseits weitere Untersuchungen in ASPP1-Knockdown-Versuchen *ex vivo* kultivierter primärer Blasten und andererseits prospektive Studien im größeren Patientenkollektiv, die den Einfluss der ASPP1-Expression in Bezug zum langfristigen Therapieansprechen der AML-Patienten untersuchen.

Die Mechanismen, die in den durchgeführten Untersuchungen zur verminderten Apoptoseinduktion ASPP1-supprimierter Zelllinien führen könnten, wurden schon kurz

nach Entdeckung der ASPP-Proteine aufgeklärt. Der Verlust der ASPP1/2-Funktion führt zur verminderten Transaktivierung p53-responsiver proapoptotischer Gene, wie Bax, PUMA und PIG-3, wodurch die p53-abhängige Apoptosekaskade gehemmt wird (Samuels-Lev et al., 2001, Bergamaschi et al., 2004). Auch Wang et al. (2017) stellen die p53-abhängige proapoptotische Funktion von ASPP1 in den Focus ihrer Untersuchungen und konnten zeigen, dass der durch RNA-Interferenz medierte ASPP1-Knock-Down im Zellmodell zu einer Suppression des proapoptotischen p53-Targets Bax und einer Induktion des antiapoptotischen Gens Bcl-2 führt (Wang et al., 2017).

Da es sich bei der MOLM-14-Zelllinie um ein Modell mit p53-Wildtyp-Status handelt, lässt sich schlussfolgern, dass sich die Ergebnisse der Apoptoseuntersuchungen auch hier zumindest teilweise der p53-abhängigen ASPP1-Funktion zuordnen lassen (Weisberg et al., 2015). Welche Rolle p53-unabhängige Mechanismen bei der therapierelevanten ASPP1-Funktion spielen, muss in zukünftigen funktionellen Untersuchungen mit p53-defekten Modellen eruiert werden.

#### **4.5 Partielle Restauration der ASPP1-Expression durch Behandlung mit dem DNA-Methyltransferase-Inhibitor Decitabin**

Wie oben beschrieben, konnte in Arbeiten zu ASPP1 in ALL und ASPP2 in AML eine aberrante Hypermethylierung im jeweiligen Genpromotor als Mechanismus der ASPP-Dysregulation identifiziert werden (Agirre et al., 2006, Schittenhelm et al., 2013). Dies lässt auch für die beobachtete Herabregulation der ASPP1-Expression in AML ähnliche Mechanismen annehmen. Mit dieser Hypothese übereinstimmend, ließ sich durch die Behandlung mit der hypomethylierenden Substanz Decitabin eine Hochregulation der ASPP1-Expression im Zellmodell und in kultivierten primären Blasten beobachten. Die Zunahme der relativen ASPP1-Expression war in der MOLM-14-Zelllinie ausgeprägter als in primären Patientenmaterial. Hintergründig hierfür könnten die schwierigen Kultivierungsbedingungen von Primärmaterial im Vergleich zu denen der immortalisierten MOLM-14-Zelllinie sein. Das Nativmaterial konnte im Vergleich zu kommerziell erhältlichen Zelllinien schwerer in Kultur gehalten werden. Resultat ist eine eingeschränkte Stoffwechselaktivität der kultivierten primären AML-Zellen und damit einhergehend eine verminderte Transkriptionsaktivierung des ASPP1-Gens durch die Behandlung mit Decitabin.

In zukünftigen Untersuchungen gilt es im Patientenkollektiv die Ausprägung der Promotormethylierung des ASPP1-Gens zu erforschen und mit den ASPP1-Expressionen zu korrelieren, um die Hypothese der Hypermethylierung des Genpromotors als Mechanismus der ASPP1-Herabregulation zu bestätigen. Die Restauration der proapoptotischen ASPP1-Funktion durch Behandlung mit hypomethylierenden Substanzen wie Decitabin, kann darüber hinaus als Angriffspunkt neuer Therapiestrategien dienen. Interessanterweise zeigen bislang unveröffentlichte Daten außerdem eine Hochregulation des proapoptotischen ASPP2, nicht aber des antiapoptotischen iASPP, unter Decitabinbehandlung. So könnte durch gezielte Beeinflussung der ASPP1- und ASPP2-Expression die Effizienz bewährter Chemotherapeutika gesteigert werden.

#### **4.6 Fazit**

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass durch die Analyse von ASPP1, hinsichtlich Expression, Assoziation zu Subgruppen und Funktion in AML aufschlussreiche Daten erhoben werden konnten. Es konnte ein möglicher Mechanismus demonstriert werden, wie sich leukämische Blasten trotz erhaltener p53-Funktion dem programmierten Zelltod entziehen können und so einen selektiven Überlebensvorteil gewinnen – durch Herabregulation der ASPP1-Expression. Außerdem konnte eine therapierelevante proapoptotische Funktion von ASPP1 in AML-Zellmodell untermauert werden, welche auch klinische Implikationen nach sich zieht.

Durch die partielle Restauration der ASPP1-Expression nach Behandlung mit Decitabin zeigt sich eine weitere Rationale zum Einsatz des DNA-Methyltransferase-Inhibitors in der Behandlung der AML. Weitergehende Untersuchungen sind notwendig, um ASPP1 als prognostischen Marker zu etablieren.

## 5 Zusammenfassung

Trotz enormer wissenschaftlicher Fortschritte in der Behandlung der akuten myeloischen Leukämie (AML), kann nur ein kleiner Anteil der Patienten dauerhaft von der meist tödlich verlaufenden Erkrankung kuriert werden. Welche Faktoren das Therapieergebnis dabei beeinflussen ist bislang nicht vollständig aufgeklärt.

Im Gegensatz zu soliden Tumoren spielen inaktivierende Mutationen von p53, einem der zentralen Tumorsuppressoren, bei de-novo AML nur eine untergeordnete Rolle. Die Hypothese dieser Arbeit war daher, dass bei AML alternative Prozesse zur Inaktivierung des p53-Signalwegs führen. Eine mögliche Rolle könnte dabei die Dysregulation der Apoptose-stimulierenden-Proteine-von-p53 (ASPP) spielen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb die Rolle von ASPP1 in akuten myeloischen Leukämien untersucht.

In einem ersten Schritt konnte eine signifikante Herabregulation der mittels quantitativer Real Time PCR gemessenen ASPP1-mRNA-Expression im Vergleich zu gesunden Probanden nachgewiesen werden. Eine Analyse verschiedener AML-Subgruppen ergab darüber hinaus signifikant verringerte ASPP1-Expressionen in prognostisch ungünstigen AML-Subgruppen.

Im nächsten Schritt wurde in einem eigens etablierten ASPP1-Knock-Down-Zellmodell die Folge einer ASPP1-Herabregulation untersucht. Dabei zeigte die ASPP1-defiziente MOLM-14-Zelllinie eine deutlich geringere Apoptose-Induktion gegenüber der Behandlung mit Cytarabin und Daunorubicin sowie eine signifikant erhöhte Proliferationskapazität.

Zuletzt konnte ein Anstieg der ASPP1-Expression im Zellmodell sowie in kultivierten primären AML-Blasten nach Behandlung mit dem DNA-Methyltransferase-Inhibitor Decitabin festgestellt werden.

Zusammenfassend konnte ein möglicher Mechanismus demonstriert werden, wie sich leukämische Blasten trotz erhaltener p53-Funktion durch Herabregulation der ASPP1-Expression dem programmierten Zelltod entziehen können. Zudem konnte die therapierelevante proapoptotische Funktion von ASPP1 im Zellmodell untermauert werden. Die partielle Restauration der ASPP1-Expression nach Behandlung mit Decitabin stellt eine weitere Rationale zum Einsatz des DNA-Methyltransferase-

Inhibitors in der Behandlung der AML dar. Weitergehende Untersuchungen sind notwendig, um ASPP1 als prognostischen Marker für das Therapieansprechen in AML zu etablieren.

## 6 Literaturverzeichnis

AGIRRE, X., ROMAN-GOMEZ, J., JIMENEZ-VELASCO, A., GARATE, L., MONTIEL-DUARTE, C., NAVARRO, G., VAZQUEZ, I., ZALACAIN, M., CALASANZ, M. J., HEINIGER, A., TORRES, A., MINNA, J. D. & PROSPER, F. 2006. ASPP1, a common activator of TP53, is inactivated by aberrant methylation of its promoter in acute lymphoblastic leukemia. *Oncogene*, 25, 1862-70.

ALAM, N., ATENAFU, E. G., KURUVILLA, J., UHM, J., LIPTON, J. H., MESSNER, H. A., KIM, D. H., SEFTEL, M. & GUPTA, V. 2015. Outcomes of patients with therapy-related AML/myelodysplastic syndrome (t-AML/MDS) following hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 50, 1180-6.

BERGAMASCHI, D., SAMUELS, Y., JIN, B., DURAISINGHAM, S., CROOK, T. & LU, X. 2004. ASPP1 and ASPP2: common activators of p53 family members. *Mol Cell Biol*, 24, 1341-50.

BIEGING, K. T., MELLO, S. S. & ATTARDI, L. D. 2014. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat Rev Cancer*, 14, 359-70.

BOUAOUN, L., SONKIN, D., ARDIN, M., HOLLSTEIN, M., BYRNES, G., ZAVADIL, J. & OLIVIER, M. 2016. TP53 Variations in Human Cancers: New Lessons from the IARC TP53 Database and Genomics Data. *Hum Mutat*, 37, 865-76.

BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-54.

BRAITHWAITE, A. W., DEL SAL, G. & LU, X. 2006. Some p53-binding proteins that can function as arbiters of life and death. *Cell Death Differ*, 13, 984-993.

BYKOV, V. J. & WIMAN, K. G. 2003. Novel cancer therapy by reactivation of the p53 apoptosis pathway. *Ann Med*, 35, 458-65.

CAMPOS, L., ROUAULT, J. P., SABIDO, O., ORIOL, P., ROUBI, N., VASSELON, C., ARCHIMBAUD, E., MAGAUD, J. P. & GUYOTAT, D. 1993. High expression of bcl-2 protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy. *Blood*, 81, 3091-6.

CHIPUK, J. E., KUWANA, T., BOUCHIER-HAYES, L., DROIN, N. M., NEWMAYER, D. D., SCHULER, M. & GREEN, D. R. 2004. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science*, 303, 1010-4.

CHRISTIANSEN, D. H., ANDERSEN, M. K. & PEDERSEN-BJERGAARD, J. 2001. Mutations with loss of heterozygosity of p53 are common in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia after exposure to alkylating agents and significantly associated with deletion or loss of 5q, a complex karyotype, and a poor prognosis. *J Clin Oncol*, 19, 1405-13.

- DELEO, A. B., JAY, G., APPELLA, E., DUBOIS, G. C., LAW, L. W. & OLD, L. J. 1979. Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 2420-4.
- DOHNER, H., ESTEY, E., GRIMWADE, D., AMADORI, S., APPELBAUM, F. R., BUCHNER, T., DOMBRET, H., EBERT, B. L., FENAUX, P., LARSON, R. A., LEVINE, R. L., LO-COCO, F., NAOE, T., NIEDERWIESER, D., OSSENKOPPELE, G. J., SANZ, M., SIERRA, J., TALLMAN, M. S., TIEN, H. F., WEI, A. H., LOWENBERG, B. & BLOOMFIELD, C. D. 2017. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*, 129, 424-447.
- DOHNER, H., WEISDORF, D. J. & BLOOMFIELD, C. D. 2015. Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*, 373, 1136-52.
- EL-DEIRY, W. S. 1998. Regulation of p53 downstream genes. *Semin Cancer Biol*, 8, 345-57.
- ESPINOSA, J. M., VERDUN, R. E. & EMERSON, B. M. 2003. p53 functions through stress- and promoter-specific recruitment of transcription initiation components before and after DNA damage. *Mol Cell*, 12, 1015-27.
- FRIDMAN, J. S. & LOWE, S. W. 2003. Control of apoptosis by p53. *Oncogene*, 22, 9030-40.
- GORINA, S. & PAVLETICH, N. P. 1996. Structure of the p53 tumor suppressor bound to the ankyrin and SH3 domains of 53BP2. *Science*, 274, 1001-5.
- GRIMWADE, D., WALKER, H., OLIVER, F., WHEATLEY, K., HARRISON, C., HARRISON, G., REES, J., HANN, I., STEVENS, R., BURNETT, A. & GOLDSTONE, A. 1998. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood*, 92, 2322-33.
- HAFERLACH, C., DICKER, F., HERHOLZ, H., SCHNITTGER, S., KERN, W. & HAFERLACH, T. 2008. Mutations of the TP53 gene in acute myeloid leukemia are strongly associated with a complex aberrant karyotype. *Leukemia*, 22, 1539-41.
- HAINAUT, P. & HOLLSTEIN, M. 2000. p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv Cancer Res*, 77, 81-137.
- HO, J. & BENCHIMOL, S. 2003. Transcriptional repression mediated by the p53 tumour suppressor. *Cell Death Differ*, 10, 404-8.
- HORN, H. F. & VOUSDEN, K. H. 2007. Coping with stress: multiple ways to activate p53. *Oncogene*, 26, 1306-16.
- JOANNIDES, M. & GRIMWADE, D. 2010. Molecular biology of therapy-related leukaemias. *Clin Transl Oncol*, 12, 8-14.
- JOHNSTONE, R. W., RUEFLI, A. A. & LOWE, S. W. 2002. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell*, 108, 153-64.

KAMPA, K. M., ACOBA, J. D., CHEN, D., GAY, J., LEE, H., BEEMER, K., PADIERNOS, E., BOONMARK, N., ZHU, Z., FAN, A. C., BAILEY, A. S., FLEMING, W. H., CORLESS, C., FELSHER, D. W., NAUMOVSKI, L. & LOPEZ, C. D. 2009a. Apoptosis-stimulating protein of p53 (ASPP2) heterozygous mice are tumor-prone and have attenuated cellular damage-response thresholds. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 4390-5.

KAMPA, K. M., BONIN, M. & LOPEZ, C. D. 2009b. New insights into the expanding complexity of the tumor suppressor ASPP2. *Cell Cycle*, 8, 2871-6.

KANDOTH, C., MCLELLAN, M. D., VANDIN, F., YE, K., NIU, B., LU, C., XIE, M., ZHANG, Q., MCMICHAEL, J. F., WYCZALKOWSKI, M. A., LEISERSON, M. D., MILLER, C. A., WELCH, J. S., WALTER, M. J., WENDL, M. C., LEY, T. J., WILSON, R. K., RAPHAEL, B. J. & DING, L. 2013. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature*, 502, 333-9.

KASPER, D., FAUCI, A., HAUSER, S., LONGO, D. & JAMESON, J. 2015. *Harrison's Principles of Internal Medicine*, New York, McGraw-Hill Education.

KAYSER, S., DOHNER, K., KRAUTER, J., KOHNE, C. H., HORST, H. A., HELD, G., VON LILIENFELD-TOAL, M., WILHELM, S., KUNDGEN, A., GOTZE, K., RUMMEL, M., NACHBAUR, D., SCHLEGELBERGER, B., GOHRING, G., SPATH, D., MORLOK, C., ZUCKNICK, M., GANSER, A., DOHNER, H. & SCHLENK, R. F. 2011. The impact of therapy-related acute myeloid leukemia (AML) on outcome in 2853 adult patients with newly diagnosed AML. *Blood*, 117, 2137-45.

KAYSER, S. & LEVIS, M. J. 2018. Advances in targeted therapy for acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*, 180, 484-500.

KOMPETENZNETZ LEUKÄMIEN. 2018. *AML Epidemiologie* [Online]. Available: <https://www.kompetenznetz-leukaemie.de/content/aerzte/aml/epidemiologie> [Accessed 9. Juni 2018].

KRACIKOVA, M., AKIRI, G., GEORGE, A., SACHIDANANDAM, R. & AARONSON, S. A. 2013. A threshold mechanism mediates p53 cell fate decision between growth arrest and apoptosis. *Cell Death Differ*, 20, 576-88.

KULIS, M. & ESTELLER, M. 2010. DNA methylation and cancer. *Adv Genet*, 70, 27-56.

LANE, D. P. 1992. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*, 358, 15-6.

LEE, S., ELENBAAS, B., LEVINE, A. & GRIFFITH, J. 1995. p53 and its 14 kDa C-terminal domain recognize primary DNA damage in the form of insertion/deletion mismatches. *Cell*, 81, 1013-20.

LEVINE, A. J. 1997. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, 88, 323-31.

LI, S., SHI, G., YUAN, H., ZHOU, T., ZHANG, Q., ZHU, H. & WANG, X. 2012. Abnormal expression pattern of the ASPP family of proteins in human non-small cell lung cancer and regulatory functions on apoptosis through p53 by iASPP. *Oncol Rep*, 28, 133-40.



- LIERSCH, R., MULLER-TIDOW, C., BERDEL, W. E. & KRUG, U. 2014. Prognostic factors for acute myeloid leukaemia in adults--biological significance and clinical use. *Br J Haematol*, 165, 17-38.
- LOWENBERG, B., DOWNING, J. R. & BURNETT, A. 1999. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 341, 1051-62.
- MAK, V. C., LEE, L., SIU, M. K., WONG, O. G., LU, X., NGAN, H. Y., WONG, E. S. & CHEUNG, A. N. 2011. Downregulation of ASPP1 in gestational trophoblastic disease: correlation with hypermethylation, apoptotic activity and clinical outcome. *Mod Pathol*, 24, 522-32.
- MOLL, U. M., MARCHENKO, N. & ZHANG, X. K. 2006. p53 and Nur77/TR3 - transcription factors that directly target mitochondria for cell death induction. *Oncogene*, 25, 4725-43.
- MULLIS, K. B. & FALOONA, F. A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, 155, 335-50.
- NATIONAL CANCER INSTITUTE. 2018. *Cancer Stat Facts: Leukemia - Acute Myeloid Leukemia* [Online]. Available: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/amyl.html> [Accessed 9. Juni 2018].
- NAUMOVSKI, L. & CLEARY, M. L. 1996. The p53-binding protein 53BP2 also interacts with Bc12 and impedes cell cycle progression at G2/M. *Mol Cell Biol*, 16, 3884-92.
- NAVARRO, E., SERRANO-HERAS, G., CASTANO, M. J. & SOLERA, J. 2015. Real-time PCR detection chemistry. *Clin Chim Acta*, 439, 231-50.
- OHKI, R., NEMOTO, J., MURASAWA, H., ODA, E., INAZAWA, J., TANAKA, N. & TANIGUCHI, T. 2000. Reprimo, a new candidate mediator of the p53-mediated cell cycle arrest at the G2 phase. *J Biol Chem*, 275, 22627-30.
- PAPAEMMANUIL, E., GERSTUNG, M., BULLINGER, L., GAIDZIK, V. I., PASCHKA, P., ROBERTS, N. D., POTTER, N. E., HEUSER, M., THOL, F., BOLLI, N., GUNDEM, G., VAN LOO, P., MARTINCORENA, I., GANLY, P., MUDIE, L., MCLAREN, S., O'MEARA, S., RAINE, K., JONES, D. R., TEAGUE, J. W., BUTLER, A. P., GREAVES, M. F., GANSER, A., DOHNER, K., SCHLENK, R. F., DOHNER, H. & CAMPBELL, P. J. 2016. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*, 374, 2209-21.
- PFAFFL, M. W. 2004. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum*, 1, 92-94.
- PRIVES, C. & HALL, P. A. 1999. The p53 pathway. *J Pathol*, 187, 112-26.
- RUCKER, F. G., SCHLENK, R. F., BULLINGER, L., KAYSER, S., TELEANU, V., KETT, H., HABDANK, M., KUGLER, C. M., HOLZMANN, K., GAIDZIK, V. I., PASCHKA, P., HELD, G., VON LILIENFELD-TOAL, M., LUBBERT, M., FROHLING, S., ZENZ, T., KRAUTER, J., SCHLEGELBERGER, B., GANSER, A., LICHTER, P., DOHNER, K. & DOHNER, H. 2012. TP53 alterations in acute myeloid leukemia with

complex karyotype correlate with specific copy number alterations, monosomal karyotype, and dismal outcome. *Blood*, 119, 2114-21.

SAMUELS-LEV, Y., O'CONNOR, D. J., BERGAMASCHI, D., TRIGIANTE, G., HSIEH, J. K., ZHONG, S., CAMPARGUE, I., NAUMOVSKI, L., CROOK, T. & LU, X. 2001. ASPP proteins specifically stimulate the apoptotic function of p53. *Mol Cell*, 8, 781-94.

SCHITTENHELM, M. M., ILLING, B., AHMUT, F., RASP, K. H., BLUMENSTOCK, G., DOHNER, K., LOPEZ, C. D. & KAMPA-SCHITTENHELM, K. M. 2013. Attenuated expression of apoptosis stimulating protein of p53-2 (ASPP2) in human acute leukemia is associated with therapy failure. *PLoS One*, 8, e80193.

SCUDIERO, D. A., SHOEMAKER, R. H., PAULL, K. D., MONKS, A., TIERNEY, S., NOFZIGER, T. H., CURRENS, M. J., SENIFF, D. & BOYD, M. R. 1988. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res*, 48, 4827-33.

SHAW, P. H. 1996. The role of p53 in cell cycle regulation. *Pathol Res Pract*, 192, 669-75.

SPEIDEL, D. 2010. Transcription-independent p53 apoptosis: an alternative route to death. *Trends Cell Biol*, 20, 14-24.

STELLER, H. 1995. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science*, 267, 1445-9.

SULLIVAN, A. & LU, X. 2007. ASPP: a new family of oncogenes and tumour suppressor genes. *Br J Cancer*, 96, 196-200.

VERMES, I., HAANEN, C., STEFFENS-NAKKEN, H. & REUTELINGSPERGER, C. 1995. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*, 184, 39-51.

VOGELSTEIN, B., LANE, D. & LEVINE, A. J. 2000. Surfing the p53 network. *Nature*, 408, 307-10.

VOUSDEN, K. H. & PRIVES, C. 2009. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell*, 137, 413-31.

WALLACE-BRODEUR, R. R. & LOWE, S. W. 1999. Clinical implications of p53 mutations. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 55, 64-75.

WANG, X., CHENG, Y., ZHU, Y., LI, H., GE, W., WU, X., ZHAO, K., YUAN, J., LI, Z., JIANG, S., HAN, Z., JIANG, Q., WU, Q., LIU, T., ZHANG, C., YU, M. & HU, Y. 2017. Epigenetic Silencing of ASPP1 confers 5-FU resistance in Clear Cell Renal Cell Carcinoma by preventing p53 activation. *Int J Cancer*.

WATTEL, E., PREUDHOMME, C., HECQUET, B., VANRUMBEKE, M., QUESNEL, B., DERVITE, I., MOREL, P. & FENAUX, P. 1994. p53 mutations are associated with resistance to chemotherapy and short survival in hematologic malignancies. *Blood*, 84, 3148-57.

WEISBERG, E., HALILOVIC, E., COOKE, V. G., NONAMI, A., REN, T., SANDA, T., SIMKIN, I., YUAN, J., ANTONAKOS, B., BARYS, L., ITO, M., STONE, R., GALINSKY, I., COWENS, K., NELSON, E., SATTler, M., JEAY, S., WUERthNER, J. U., MCDONOUGH, S. M., WIESMANN, M. & GRIFFIN, J. D. 2015. Inhibition of Wild-Type p53-Expressing AML by the Novel Small Molecule HDM2 Inhibitor CGM097. *Mol Cancer Ther*, 14, 2249-59.

YAMASHITA, M., NITTA, E. & SUDA, T. 2015. Aspp1 Preserves Hematopoietic Stem Cell Pool Integrity and Prevents Malignant Transformation. *Cell Stem Cell*, 17, 23-34.

YIN, B., KOGAN, S. C., DICKINS, R. A., LOWE, S. W. & LARGAESPADA, D. A. 2006. Trp53 loss during in vitro selection contributes to acquired Ara-C resistance in acute myeloid leukemia. *Exp Hematol*, 34, 631-41.

ZHANG, X., WANG, M., ZHOU, C., CHEN, S. & WANG, J. 2005. The expression of iASPP in acute leukemias. *Leuk Res*, 29, 179-83.

ZHAO, J., WU, G., BU, F., LU, B., LIANG, A., CAO, L., TONG, X., LU, X., WU, M. & GUO, Y. 2010. Epigenetic silence of ankyrin-repeat-containing, SH3-domain-containing, and proline-rich-region-containing protein 1 (ASPP1) and ASPP2 genes promotes tumor growth in hepatitis B virus-positive hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 51, 142-53.

## **Erklärung zum Eigenanteil**

Die Arbeit wurde unter Betreuung von Frau Dr. med. Kerstin Kampa-Schittenhelm durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Dr. med. Kerstin Kampa-Schittenhelm und Herrn PD Dr. med. Marcus Schittenhelm.

Sämtliche Versuche, die statistische Auswertung sowie die Literaturrecherche wurden nach Einarbeitung durch Frau Dr. med. Kerstin Kampa-Schittenhelm von mir eigenständig durchgeführt.

Die Korrektur des Manuskripts fand durch Frau Dr. med. Kerstin Kampa-Schittenhelm und Herrn PD Dr. med. Marcus Schittenhelm statt.

Ich versichere das Manuskript eigenhändig verfasst zu haben und keine weiteren Quellen als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den