

Aus der Abteilung Hämatologie und Onkologie  
(Prof. Dr. med. L. Trümper)  
im Zentrum Innere Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

---

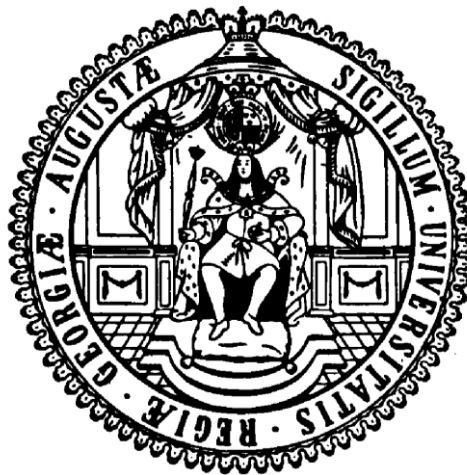
**Zur Resistenzentwicklung von Zellen der  
chronischen myeloischen Leukämie  
gegenüber Tyrosinkinase-Inhibitoren:  
Regulation und Funktion des ABC Transporters A3**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

„Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)“

im Rahmen des Promotionsprogramms Molekulare Medizin  
der Georg-August-Universität Göttingen



vorgelegt von

Timo Hupfeld

aus Rotenburg an der Fulda

Göttingen 2012

*Meinen Eltern*

## **Mitglieder des Betreuungsausschusses**

### **Betreuer:**

Prof. Dr. Dieter Kube  
Abteilung Hämatologie und Onkologie  
Universitätsmedizin Göttingen  
Robert-Koch-Straße 40  
37075 Göttingen

### **Erstes Mitglied des Betreuungsausschusses:**

Prof. Dr. Mikael Simons  
Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin  
Hermann-Rein-Str. 3  
37075 Göttingen

### **Zweites Mitglied des Betreuungsausschusses:**

Prof. Dr. Martin Oppermann  
Institut für Immunologie  
Universitätsmedizin Göttingen  
Humboldtallee 34  
37073 Göttingen

**Datum der Disputation**

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt, und die genutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben habe.

Göttingen, August 2012

Timo Hupfeld

*„Ein zweifelnder Sinn ist die Hälfte der Weisheit“*

*Publius Syrus (»Sententiae«, um 50 v. Chr.)*

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	II
Tabellenverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Chronische myeloische Leukämie.....	1
1.2 Das Konzept der Tumorstammzelle .....	5
1.3 ABC-Transporter und Multi-Drogen-Resistenz.....	7
1.4 Transkriptionsfaktor SALL4 .....	9
1.5 Mikrovesikel .....	10
Zielsetzung der Arbeit .....	12
2 Material und Methoden .....	13
2.1 Material .....	13
2.1.1 Geräte .....	13
2.1.2 EDV .....	15
2.1.3 Verbrauchsmaterialien.....	15
2.1.4 Chemikalien.....	17
2.1.5 Wachstumsfaktoren.....	18
2.1.6 Enzyme .....	18
2.1.7 Größenstandards.....	18
2.1.8 Fertigsysteme (Kits).....	19
2.1.9 Lösungen und Puffer .....	19
2.1.10 Antikörper .....	19
2.1.11 Oligonukleotide.....	20
2.1.12 Inhibitoren.....	21
2.1.13 Radioaktive Substanzen.....	21

2.1.14	Software .....	21
2.1.15	Vektoren und Plasmide.....	22
2.1.16	Plasmidkarten .....	22
2.2	Zellkulturarbeiten .....	25
2.3	Proteinbiochemische Methoden .....	25
2.3.1	Proteinbestimmung mittels BioRad-DC-Protein-Assay .....	25
2.3.2	Western-Blot.....	26
2.3.3	Herstellung der Zell-Lysate .....	26
2.3.4	LDS-Gelelektrophorese .....	26
2.3.5	Nassblot auf Nitrozellulosemembranen .....	27
2.3.6	Immundetektion .....	28
2.4	Mikroskopische Techniken .....	29
2.4.1	Trypanblau-Färbung .....	29
2.4.2	Zytospin-Präparation .....	30
2.4.3	Immunfluoreszenz-Färbung.....	30
2.5	Zellbiologische Methoden.....	31
2.5.1	Kultivierung von Zellen .....	31
2.5.2	Passagieren von Zellen .....	31
2.5.3	Cryokonservierung und Revitalisierung von Zelllinien .....	32
2.5.4	Isolierung von mononukleären Zellen mittels Ficoll .....	32
2.6	Transfektionsverfahren.....	34
2.6.1	Elektroporation .....	34
2.6.2	Lentivirale Transfektion mittels shRNA .....	34
2.6.3	Produktion der lentiviralen Partikel .....	34
2.6.4	Virale Transfektion der Zielzellen.....	36
2.6.5	shRNA-Sequenz zum Knockdown von ABCA3 .....	37
2.6.6	MTT-Viabilitätsassay .....	38
2.6.7	Durchflusszytometrie (FACS) .....	39

2.6.8	Bakterien .....	39
2.6.9	Zelllinien .....	40
2.6.10	Kulturmedien für die Zellkultur.....	41
2.6.11	Hitzeinaktiviertes FCS .....	42
2.6.12	Selektionsmedium .....	42
2.7	Molekularbiologische Methoden.....	43
2.7.1	RNA-Isolierung .....	43
2.7.3	Reverse Transkription (cDNA-Synthese).....	44
2.7.4	Polymerase-Kettenreaktion zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten .....	45
2.7.5	Quantitative Realtime-PCR (Taqman) .....	47
2.7.8	Klonale Plasmidamplifikation mit Hilfe von Qiagen® Produkten.....	49
2.7.9	Mini-Präparation von Plasmid-DNA.....	50
2.7.10	Maxi-Präparation von Plasmid-DNA .....	50
2.7.11	Spaltanalyse von DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen ...	51
2.7.12	Auftrennen der DNA in Agarosegelen .....	53
2.7.13	DNA-Aufreinigung aus Agarosegelen.....	53
2.8	Präparation von Mikrovesikeln .....	55
2.9	Statistische Analysen .....	56
2.9.1	Mehrfaktorielle Varianzanalyse Two-Way ANOVA.....	56
2.9.2	Einfaktorielle Varianzanalyse One-Way-ANOVA.....	56
2.9.3	t-Test .....	56
2.10	Patientenproben und Ethik .....	57
3	Ergebnisse.....	58
3.1	ABCA3 schützt CML-Zellen vor TKI-vermittelter Zytotoxizität .....	58
3.1.1	Lentiviraler Knockdown von ABCA3 mittels shRNA .....	58
3.1.2	ABCA3-Knockdown vermindert Klonogenität .....	60



3.1.3	Knockdown von ABCA3 erhöht Suszeptibilität der CML-Zelllinien gegenüber Tyrosinkinase-Inhibitoren .....	62
3.1.4	Expression von ABCA3 in CML-Zellen .....	64
3.1.5	TKI induzieren die ABCA3-Expression in CML-Zelllinien.....	65
3.1.6	TKI induzieren ABCA3-Expression in primären CD34-positiven Zellen.....	67
3.1.7	Imatinib induziert ABCA3-Expression in untransformierten CD34-positiven Zellen .....	69
3.2	ABCA3-Expression korreliert mit der Expression des Transkriptionsfaktors SALL4 .....	71
3.2.1	Knockdown von SALL4 führt zum Verlust der ABCA3-Expression.....	73
3.2.2	Knockdown von SALL führt zu erhöhter TKI-Suszeptibilität der CML-Zelllinien.....	74
3.3	ABCA3-Überexpression reduziert Imatinib-Suszeptibilität nach SALL4-Knockdown.....	76
3.4	Inhibitoren der ABCA3/SALL4-Kaskade .....	77
3.4.1	Indomethacin führt zu reduzierter ABCA3-Expression in CML-Zellen.....	77
3.4.2	Indomethacin erhöht die TKI-Suszeptibilität .....	79
3.4.3	Rapamycin erhöht die Suszeptibilität von CML-Zelllinien gegenüber TKI-Behandlung.....	80
3.4.4	Rapamycin reduziert die ABCA3-Expression in CML-Zelllinien .....	81
3.5	Reduktion der SALL4-Expression kompensiert den TKI-induzierten Anstieg der ABCA3-Expression.....	83
3.6	Ektoper BCR-ABL-Expression steigert ABCA-Expression.....	85
3.7	Ektoper BCR-ABL-Expression steigert SALL4-Expression.....	86
3.8	BCR-ABL erhöht die Resistenz gegenüber Zytostatika in MO7 und HL60-Zellen.....	88
3.9	CML-Zelllinien sezernieren Mikrovesikel .....	90

3.10	[14C]-Imatinib akkumuliert in Mikrovesikeln von CML-Zelllinien.....	91
3.11	[14C]-Imatinib akkumuliert in Mikrovesikeln von primären CD34-positiven CML-Zellen .....	93
3.12	Mikrovesikel enthalten lysosomale Markerproteine .....	95
4	Diskussion .....	97
4.1	Modellsystem der ruhenden persistierenden leukämischen Progenitorzellen .....	97
4.2	TKI-vermittelte Induktion der Expression von ABCA3 und SALL4 als Resistenzmechanismus in CML-Zellen.....	98
4.3	Stabilisierung des Resistenzmechanismus von TKI- behandelten CML-Stammzellen.....	99
4.4	BCR-ABL-Abhängigkeit der SALL4 und ABCA3-Expression .....	101
4.5	Indomethacin und Rapamycin als Inhibitoren der SALL4/ABCA3-Kaskade .....	101
4.6	Mikrovesikel als TKI-Sekretionsmechanismus .....	103
4.7	Mikrovesikel enthalten lysosomale Markerproteine .....	105
	Literaturverzeichnis .....	106
	Curriculum vitae .....	115
	Publikationen.....	116
	Vorträge und Kongress-Teilnahmen.....	117
	Danksagung .....	118



## Zusammenfassung

Bei der Mehrzahl der Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie (CML) induziert die Inhibition der BCR-ABL-Tyrosinkinaseaktivität durch die spezifischen BCR-ABL-Inhibitoren (TKI) Imatinib, Nilotinib und Dasatinib eine vollständige Remission der Erkrankung. Allerdings kommt es nach dem Absetzen der Therapie oder dem Erwerb einer Resistenz-vermittelnden Mutation des bcr/abl-Gens zu einem Rückfall, ausgehend von einer kleinen Zellfraktion, die während der Primärtherapie persistieren konnte. In Vorarbeiten zu leukämischen Vorläuferzellen mit dem Phänotyp der „Side Population“ (SP) wurde bereits gezeigt, dass CD34-positive Vorläuferzellen der CML eine hohe Expression des intrazellulären ABC-Transporters A3 (ABCA3) an den Membranen der Lysosomen aufwiesen, und dass Imatinib innerhalb der Leukämiezellen zu einem großen Anteil (>75 %) lysosomal kompartimentiert vorlag. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden daher die Expressionsregulation von ABCA3 in Leukämiezellen sowie der Mechanismus des ABCA3-vermittelten zellulären Exports der Tyrosinkinase-Inhibitoren näher untersucht. Mittels ektopter Überexpression sowie shRNA-mediierter Suppression wurde nachgewiesen, dass ABCA3 leukämische Zellen vor dem zytotoxischen Effekt der TKIs Imatinib, Dasatinib und Nilotinib schützte. In den die TKI-Exposition überlebenden Zellen steigerte die TKI-Behandlung die Expression von ABCA3 *in vivo* und *in vitro*, assoziiert mit einer gesteigerten Expression des embryonalen Transkriptionsfaktors SALL4, der an den ABCA3-Promotor bindet. Inhibition von ABCA3 oder SALL4 mittels genetischer Manipulation oder den Substanzen Indomethacin und Rapamycin, allerdings nicht Gamma-Interferon unterbrachen die SALL4-abhängige Regulation von ABCA3 und stellten die Suszeptibilität der leukämischen Zellen gegenüber TKIs wieder her. In weiteren Analysen war dann nachzuweisen, dass Imatinib nach lysosomaler Sequestrierung sowohl als freie Substanz sowie angereichert in Mikrovesikeln vereinbar mit sekretorischen Lysosomen aus den leukämischen Zellen exportiert wurde. Die Ergebnisse dieser Arbeit können zu der Entwicklung von Strategien beitragen, die durch Begleittherapien den Anteil des intrazellulären freien Tyrosinkinase-Inhibitors erhöhen und damit eine Verbesserung der Behandlung von CML-Patienten erreichen können.



# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 – Philadelphia-Chromosom .....	2
Abbildung 2 – Leukämie-Stammzell-Modell .....	6
Abbildung 3 – ABC-Transporter.....	8
Abbildung 4 – Plasmidkarte von pEGFP-N1+ABCA3 .....	22
Abbildung 5 – Multiple cloning site von pEGFP-N1+ABCA3 .....	22
Abbildung 6 – Plasmidkarte von pLKO.1 .....	23
Abbildung 7 – Multiple cloning site von pLKO.1 .....	23
Abbildung 8 – Plasmidkarte von pCMV-dR8.91 .....	23
Abbildung 9 – Plasmidkarte von pMD.G-VSV-G .....	24
Abbildung 10 – Aufbau Bloteinsatz .....	28
Abbildung 11 – Isolierung von mononukleären Zellen mittels Ficoll .....	33
Abbildung 12 – Expression von ABCA3 nach lentiviralem Knockdown .....	59
Abbildung 13 – Klonogenität von CML-Zellen nach ABCA3-Knockdown .....	61
Abbildung 14 – ABCA3-Knockdown erhöht TKI-Suszeptibilität.....	63
Abbildung 15 – ABCA3-Expression in CML-Zellen .....	64
Abbildung 16 – ABCA3-Induktion durch TKI .....	66
Abbildung 17 – ABCA3-Expression in CD34-positiven primären CML- Zellen.....	68
Abbildung 18 – ABCA3-Expression in nicht-transformierten CD34- positiven primären Zellen.....	69
Abbildung 19 – ABCA3-Expression korreliert mit SALL4-Expression .....	71
Abbildung 20 – Expression von SALL4 nach lentiviralem Knockdown .....	73
Abbildung 21 – SALL4-Knockdown erhöht TKI Suszeptibilität.....	74
Abbildung 22 – ABCA3-Überexpression reduziert Imatinib-Suszeptibilität..	76
Abbildung 23 – Indomethacin reduziert Expression von ABCA3 und SALL4.....	78
Abbildung 24 – Indomethacin erhöht die TKI-Suszeptibilität.....	79
Abbildung 25 – Rapamycin erhöht die TKI-Suszeptibilität .....	80
Abbildung 26 – Rapamycin reduziert Expression von ABCA3 und SALL4...	81
Abbildung 27 – SALL4-Knockdown kompensiert TKI-induzierte ABCA3- Expression.....	83

<b>Abbildung 28 – ABCA3-Expression nach BCR-ABL-Überexpression .....</b>	<b>85</b>
<b>Abbildung 29 – SALL4-Expression nach BCR-ABL-Überexpression .....</b>	<b>86</b>
<b>Abbildung 30 – BCR-ABL erhöht Resistenz gegenüber Zytostatika.....</b>	<b>88</b>
<b>Abbildung 31 – EM-Aufnahmen von Mikrovesikeln in K562-Zellen .....</b>	<b>90</b>
<b>Abbildung 32 – [14C]-Imatinib in Mikrovesikeln von CML-Zelllinien.....</b>	<b>92</b>
<b>Abbildung 33 – [14C]-Imatinib in Mikrovesikeln von primären CML-Zellen ..</b>	<b>94</b>
<b>Abbildung 34 – Lysosomale Markerproteine in Mikrovesikeln.....</b>	<b>95</b>

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1 – Übersicht der verwendeten Primärantikörper .....</b>	<b>19</b>
<b>Tabelle 2 – Übersicht der verwendeten Sekundärantikörper .....</b>	<b>20</b>
<b>Tabelle 3 – Übersicht der verwendeten Oligonukleotide .....</b>	<b>20</b>
<b>Tabelle 4 – Übersicht der verwendeten Inhibitoren.....</b>	<b>21</b>
<b>Tabelle 5 – Übersicht der verwendeten Vektoren und Plasmide.....</b>	<b>22</b>
<b>Tabelle 6 – Übersicht der verwendeten Proteinbestimmungs-Reagenzien...</b>	<b>25</b>
<b>Tabelle 7 – Plasmidmix .....</b>	<b>35</b>
<b>Tabelle 8 – Transfektionsansatz.....</b>	<b>35</b>
<b>Tabelle 9 – shRNA-Sequenzen und Zielgene der lentiviralen Plasmide .....</b>	<b>37</b>
<b>Tabelle 10 – MTT-Reagenzien-Zusammensetzung .....</b>	<b>38</b>
<b>Tabelle 11 – Übersicht der verwendeten Bakterienstämme .....</b>	<b>39</b>
<b>Tabelle 12 – Übersicht der verwendeten eukaryotischen Zelllinien .....</b>	<b>40</b>
<b>Tabelle 13 – Übersicht der verwendeten Zellkulturmedien.....</b>	<b>41</b>
<b>Tabelle 14 – Mastermix für die reverse Transkription.....</b>	<b>45</b>
<b>Tabelle 15 – PCR-Programm im Thermocycler.....</b>	<b>45</b>
<b>Tabelle 16 – Mastermix für PCR .....</b>	<b>46</b>
<b>Tabelle 17 – Einstellungen Thermocycler für ABCA3-PCR .....</b>	<b>47</b>
<b>Tabelle 18 – Mastermix für Real-Time quantitative PCR .....</b>	<b>48</b>
<b>Tabelle 19 – Einstellungen Taqman-Cycler.....</b>	<b>48</b>
<b>Tabelle 20 – Reaktionsansatz Spaltanalyse .....</b>	<b>52</b>
<b>Tabelle 21 – Trennbereiche von Agarosegelen .....</b>	<b>53</b>



## Abkürzungsverzeichnis

ABC	ATP-bindende Kasette (engl.: ATP-binding-cassette)
AML	Akute myeloische Leukämie
ATP	Adenosintriphosphat
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin (engl.: bovine serum albumine)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (engl.: complementary desoxyribonucleic acid)
CML	Chronische myeloische Leukämie
CSF	engl.: colony stimulating factor
CT	engl.: cycles at threshold
DA	Dasatinib
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: desoxyribonucleic acid)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
ECL	engl.: enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	engl.: Enzyme-linked immuno sorbent assay
EGFP	Grün fluoreszierendes Protein (engl.: enhanced green fluorescent protein)
EtOH	Ethanol
FACS	Durchflusszytometrie (engl. : fluorescence activated cell sorting)
FKS	Fetales Kälberserum (engl.: fetal calf serum)
x g	x-fache Erdbeschleunigung ( $g = 9,81 \text{ m/s}^2$ )

Gln	L-Glutamin
G418	Geneticin (Antibiotikum)
h	engl. hour (Stunde)
HRP	engl.: horseradish peroxidase
IL-3	Interleukin-3
IM	Imatinib
kb	Kilobase(n)
kDa	Kilodalton
konz.	konzentriert
Lamp	engl.: lysosomal-associated membrane protein
LB	engl.: lysogeny broth
LDS	lithium-dodecyl-sulfat
M	Molar
m	Meter
MACS	engl.: magnetic cell separation
MCSF	engl.: macrophage colony stimulating factor
MDR	engl.: multi drug resistance
MRP	engl.: multi resistance protein
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5- iphenyltetrazolinumbromide
NP-40	Ethylphenylpolyethylenglycol
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl.: phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction)
Pen/Strep	Penicillin-Streptomycin
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: ribonucleic acid)
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: rounds per minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium 1640
RT	Raumtemperatur

RT	Reverse Transkriptase
RTQ	Real time Quantitative
SCF	Stammzellfaktor (engl.: stem cell factor)
shRNA	short hairpin RNA
siRNA	short interfering RNA
SP	engl.: "side population"
Taq	Thermophilus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
TritonX-100	Octylphenoxypolyethoxyethanol
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan-Monolaureat



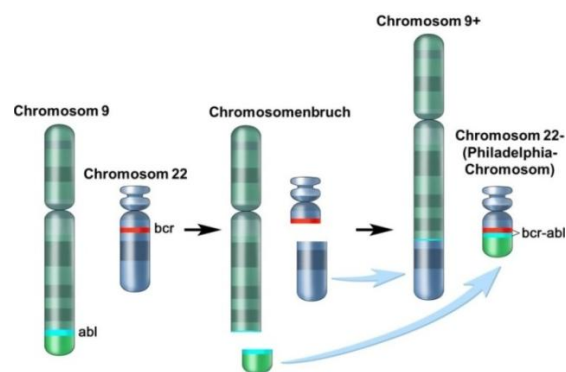
# 1 Einleitung

## 1.1 Chronische myeloische Leukämie

Die chronische myeloische Leukämie (CML) ist eine bösartige Erkrankung des blutbildenden Systems. Dabei werden von den maligne transformierten hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark stark vermehrt weiße Blutkörperchen (Leukozyten) gebildet, die sich im peripheren Blut anreichern. Die Erkrankung wurde erstmals von Virchow und Bennett im Jahre 1845 beschrieben und führte zur Bezeichnung Leukämie (gr. λευχαιμία, „weißes Blut“) (Virchow & Bennet, 1845). Das mittlere Alter des Auftretens einer CML liegt zwischen 47 – 56 Jahren, sie kann allerdings in allen Altersgruppen auftreten. Männer sind im Verhältnis 3:2 häufiger betroffen als Frauen. Die Häufigkeit des Auftretens einer CML liegt in Mitteleuropa bei 2 Fällen pro 100.000 Einwohner pro Jahr. Sie wird wahrscheinlich durch eine erworbene somatische Mutation einer einzelnen hämatopoetischen Stammzelle ausgelöst. Erbliche oder infektiöse Prädispositionen sind nicht bekannt. Allerdings kann eine Exposition mit radioaktiver Strahlung zu einer Erhöhung der Inzidenz von Leukämien, darunter auch CML, führen. Die typischen Symptome beim Auftreten der CML sind Müdigkeit, Erbrechen und Gewichtsverlust. Bei ca. 40 % der Patienten verläuft die Erkrankung dagegen symptomlos und zeigt nur ein anomales Blutbild. Die CML verläuft in drei Krankheitsphasen, der chronischen Phase, der Akzelerationsphase und der Blastenkrise. Während der chronischen Phase der CML behalten die myeloischen Zellen ihre normale Differenzierungskapazität weitgehend bei. In der Akzelerationsphase verringert sich die normale Differenzierung und es kommt zu Leukozytose, Basophilie, Thrombozytopenie, Fieber, extramedullärer Erkrankung, Gewichtsverlust und Knochenschmerzen. Bei der Blastenkrise verlieren die myeloischen Zellen ihre normale Differenzierung, sodass es zum Auftreten von myeloischen Blasten im Blut oder Knochenmark in Anteilen von > 20 % der kernhaltigen Zellen kommt. Die Mehrzahl der CML-Fälle wird während der chronischen Phase diagnostiziert. Die chronische Phase hat auch unbehandelt eine mediane Dauer von mehreren Jahren. Während dieser Phase ist der Krankheitsverlauf relativ stabil, symptomarm und therapeutisch gut kontrollierbar.

Die chronische Phase kann entweder über eine Akzelerationsphase allmählich oder krisenhaft direkt in die Blastenkrise übergehen.

Die Diagnose der CML wird durch den Nachweis des Philadelphia-Chromosoms erbracht, das bei ca. 95 % der Patienten vorkommt. Bei den restlichen Patienten treten verschiedene Varianten von komplexen Translokationen auf. Das Philadelphia-Chromosom ist eine chromosomale Anomalie, die erstmals im Jahre 1960 als Verkürzung des Chromosoms 22 beschrieben wurde (Nowell & Hungerford, 1960). Die Translokation findet zwischen den Chromosomen 9 und 22 statt und wird daher auch als  $t(9;22)(q34;q11)$  bezeichnet (Rowley, 1973). Dabei kommt es zur Bildung des BCR-ABL-Fusionsproteins, das aus dem Proto-Onkogen *c-abl* (Chromosom 9) und dem *bcr* Gen (Chromosom 22) entsteht (Bartram et al., 1983). Das *c-abl* Gen codiert für die Tyrosinkinase ABL1 (*Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1*) (Abelson & Rabstein, 1970) während die eigentliche Funktion des *bcr* (*breakpoint cluster region*) Gens (Groffen et al., 1984) noch unbekannt ist. Durch die Translokation wird das erste Exon von *c-abl* durch die 5'-Sequenz von *bcr* ersetzt und es entsteht das verschmolzene *bcr/abl*-Transkript. Dabei kommt es zur Anlagerung des größten Teils von *abl* mit 5'-Sequenzen von *bcr* auf dem Chromosom 22. Der *bcr*-Promotor bleibt dabei intakt und erlaubt die Expression des chimeren Gens. Das *bcr-abl*-Fusionsgen wird in eine neue mRNA transkribiert (Canaani et al., 1984; Shtivelman et al., 1985) und in ein Protein mit einem Molekulargewicht von 210 kDa ( $P210^{bcr-abl}$ ) translatiert (Ben-Neriah et al., 1986).



**Abbildung 1 – Philadelphia-Chromosom.** Die Translokation findet zwischen Chromosom 9 und 22 statt  $t(9;22)(q34;q11)$ . Durch die Translokation wird das erste Exon des *c-abl* auf Chromosom 9 durch die 5'-Sequenz des *bcr* auf Chromosom 22 ersetzt. Der *bcr*-Promotor bleibt dabei intakt und erlaubt die Expression des chimeren Gens. Das *bcr-abl*-Fusionsgen wird in eine neue mRNA transkribiert und in ein Protein mit einem Molekulargewicht von 210 kDa ( $P210^{bcr-abl}$ ) translatiert. (Modifiziert nach T. Winslow, U.S. Govt.)

Das BCR/ABL Fusionsprotein ist im Gegensatz zu ABL überwiegend zytoplasmatisch lokalisiert und hat eine erhöhte Tyrosinkinase-Aktivität (Konopka et al., 1984), die unmittelbar mit der pathogenetischen Rolle von BCR/ABL in Verbindung steht (Faderl et al., 1999). Die zentrale Rolle von BCR/ABL, die zur unkontrollierten Proliferation führt, wurde *in vitro* und *in vivo* durch Transplantations- bzw. Transfektionsexperimente in murinen Modellsystemen belegt (Daley et al., 1990; Heisterkamp et al., 1990). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass durch gezielte Inhibition der Expression oder Aktivität von BCR/ABL in CML-Zelllinien durch spezifische Antisense-Oligonukleotide, Ribozyme oder Tyrosinkinase-Inhibitoren der leukämische Phänotyp zurückgebildet wurde (Gewirtz, 1992; Lange et al., 1993). ABL-Proteine sind Non-Rezeptor-Tyrosinkinasen und spielen eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion und der Regulation des Zellwachstums. Das N-terminale Segment von ABL enthält zwei homologe Domänen (SH2 und SH3), die die Tyrosinkinase-Funktion von ABL regulieren. Der C-terminale Teil von ABL enthält eine DNA-bindende Domäne und eine Bindungsstelle für Aktin. Die Zellwachstum-hemmende Eigenschaft des normalen ABL-Proteins erfordert die Tyrosinkinase-Aktivität, die Lokalisation im Kern und eine intakte SH2-Domäne (Sawyers, 1993). Die Struktur von BCR/ABL ermöglicht multiple Proteininteraktionen, über die verschiedene Signalwege aktiviert werden. Dadurch wird BCR/ABL mit verschiedenen Schlüsselmolekülen verbunden, die zu leukämischem Zellwachstum und Apoptose-Hemmung führen (Sattler & Salgia, 1998). Dabei führt die Aktivierung des JAK-STAT-Signalwegs zur Wachstumsunabhängigkeit von BCR/ABL positiven Zelllinien (Hehlmann et al., 2007). Außerdem beeinflusst BCR/ABL über die Phosphorylierung von Paxillin (Salgia et al., 1995) und anderen Kinasen das Zytoskelett, was zu einer gestörten Adhäsion der unreifen hämatopoetischen CML-Progenitorzellen an das Knochenmark führt. Außerdem hängt die Aktivierung von anti-apoptotischen Mechanismen von der Tyrosinkinase-Aktivität von BCR/ABL und Adapterproteinbindung ab. Zusammenfassend führt BCR/ABL zur gesteigerten Proliferation, gestörten Adhäsion und reduzierten Apoptose in den transformierten Zellen.

Die Entdeckung der konstitutiv aktivierten ABL-Tyrosinkinase als Ursache für die Erkrankung führte zur Entwicklung eines spezifischen Inhibitors (Imatinib), der die Tyrosinkinase-Aktivität unterbindet und somit selektiv die Vermehrung von

BCR/ABL positiven Zellen verhindern kann (Druker, Talpaz, et al., 2001). Imatinib ist ein 2-Phenylaminopyrimidinderivat und bindet kompetitiv die ATP-Bindungsstelle der BCR/ABL-Tyrosinkinase, wodurch die Tyrosin-Phosphorylierung von Proteinen der BCR-ABL-Signaltransduktionskaskade gehemmt wird. Imatinib zeigt eine hohe Spezifität für ABL und die PDGF-Rezeptoren  $\alpha$  und  $\beta$  sowie deren Derivate und für den Stammzellfaktorrezeptor *c-kit*, der in BCR-ABL positiven Zellen selektiv einen Wachstumsarrest verursacht und Apoptose induziert (Druker et al., 1996). Durch die Behandlung mit Imatinib können sowohl in der chronischen Phase als auch in fortgeschrittenen Phasen hämatologische und zytogenetische Remissionen erreicht werden (Druker, Sawyers, et al., 2001).

Nach initialem gutem hämatologischen Ansprechen der CML-Patienten auf Imatinib treten selten in der chronischen Phase aber häufig in den fortgeschrittenen Erkrankungsstadien sekundäre Resistenzen gegenüber der Imatinib-Therapie auf (Hochhaus et al., 2001). *In vitro* Untersuchungen deuten auf verschiedene Möglichkeiten der Resistenzentwicklung BCR-ABL-positiver Zellen gegenüber Imatinib hin (Mahon et al., 2000). Als mögliche Resistenzmechanismen wurden die Überexpression des BCR-ABL-Proteins, genomische Amplifikation von *bcr-abl*, gesteigerte Expression des P-Glykoproteins mit Induktion einer Multi-Drug-Resistenz (MDR), eine Mutation der Tyrosinkinase-Domäne und gesteigerte Wirkspiegel des sauren  $\alpha$ 1-Glykoproteins mit der Folge einer gesteigerten Bindung von Imatinib beobachtet. Die klonale Selektion von Blasten mit Vervielfachung des *bcr-abl*-Gens oder mit Punktmutationen, die eine Konformationsänderung der ATP-Bindungsstelle auslösen, wurde bei Patienten mit sekundärer Imatinib-Resistenz beschrieben. Die Entwicklung einer Resistenz kann also auf einer BCR-ABL-Reaktivierung oder BCR-ABL-unabhängigen Mechanismen beruhen (Hehlmann et al., 2011).

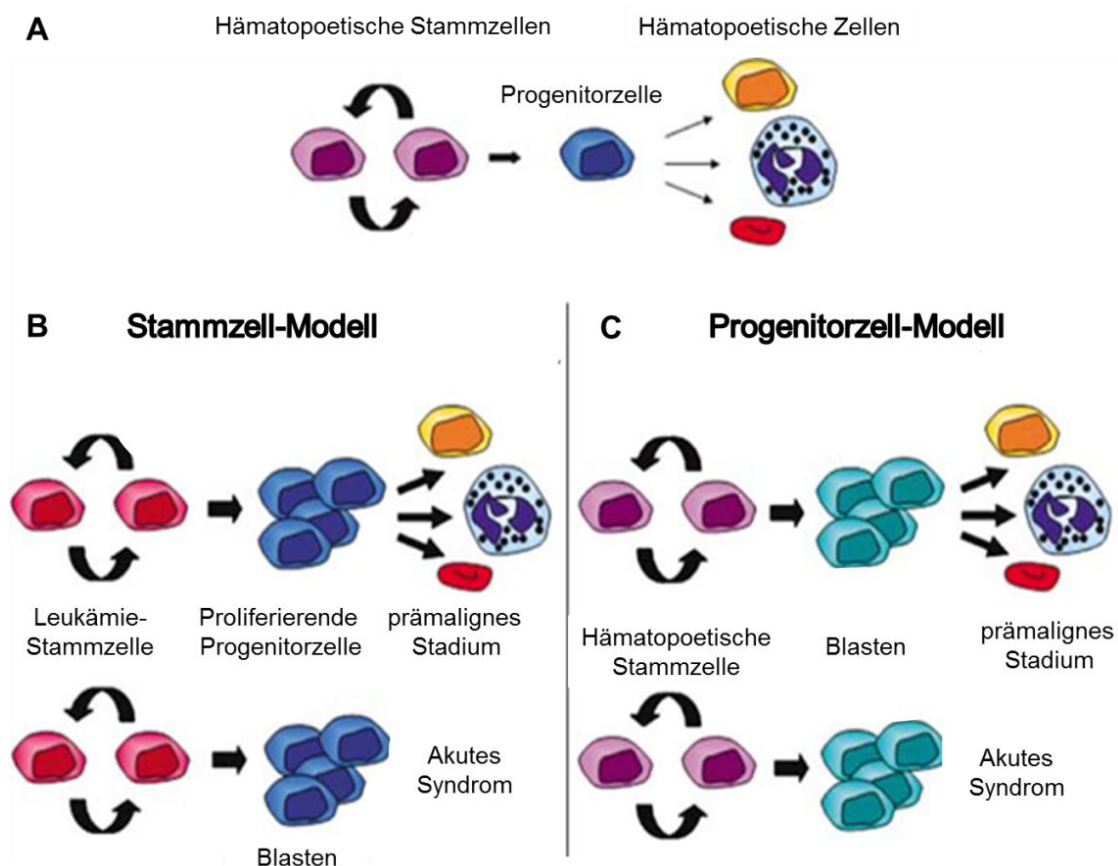


### 1.2 Das Konzept der Tumorstammzelle

Das charakteristische Merkmal von Stammzellen ist ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Ausdifferenzierung in verschiedene Zelltypen. Dabei unterscheidet man pluripotente embryonale Stammzellen, die sich zu Zelltypen aller drei Keimblätter entwickeln können und multipotente adulte Stammzellen, die nur Organ- bzw. Gewebe-spezifische Zelltypen bilden. Die Existenz von hämatopoetischen Stammzellen wurde erstmals im Jahre 1961 nachgewiesen, als syngene Knochenmarkszellen in letal bestrahlte Mäuse injiziert wurden. Zehn Tage nach der Injektion waren in den Milzen der Mäuse Kolonien extramedullärer Hämatopoese nachzuweisen, deren Anzahl proportional zur injizierten Zellzahl war. (Till & Mc, 1961). Nach Entdeckung der hämatopoetischen Stammzellen konnte man sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zeigen, dass ein geringer Anteil von verschiedenen Tumorzellen ebenfalls die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und somit Stammzellcharakter besitzen. So konnte zunächst für murine Lymphomzellen gezeigt werden, dass ca. 1 - 4 % dieser Zellen nach Injektion in Mäuse zu Kolonien in der Milz führten (Bruce & Van Der Gaag, 1963; Park et al., 1971). Kurz darauf wurde die Fähigkeit zur Proliferation in einem geringen Anteil von Zellen aus soliden Lungen-, Ovarien- und Hirntumoren in Methylcellulose nachgewiesen (Hamburger & Salmon, 1977). Einige Jahre später wurde dieses klonogene Potential ebenso für humane Zellen der akuten myeloischen Leukämie (AML) gezeigt, indem ein kleiner Teil von isolierten Blasten in Methylcellulose ebenfalls Kolonien bilden konnten (Griffin & Lowenberg, 1986; Sabbath & Griffin, 1985). Diese Ergebnisse führten zur Hypothese, dass die Gesamtheit der Tumorzellen aus einem geringen Anteil sogenannter Tumorstammzellen hervorgeht. Für die beiden unterschiedlichen Formen von Leukämien CML und AML sowie das Myeloproliferative Syndrom (MPS) konnte mittels X-Chromosom-Inaktivierung gezeigt werden, dass diese Erkrankungen klonalen Ursprungs sind. Außerdem deuteten die Ergebnisse darauf hin, dass bei der AML bzw. CML eine frühe Progenitor- oder Stammzelle verantwortlich für die Entstehung der beiden Leukämieformen (Fialkow et al., 1967). Diese Beobachtungen führten zu der Frage, auf welcher Stufe der hämatopoetischen Differenzierung es zur malignen Transformation kommt. Im Jahre 1997 konnte erstmals nach Xenotransplantationen in schwer-immundefizienten (SCID) Mäusen und „*Non-Obese Diabetic*“ (NOD)/SCID-Mäusen gezeigt werden, dass normale humane

Stammzellen sowie AML- und CML-Zellen, die aus Patienten isoliert wurden, in den Mäusen proliferieren und mittel FACS-Analyse detektiert werden konnten (Bonnet & Dick, 1997).

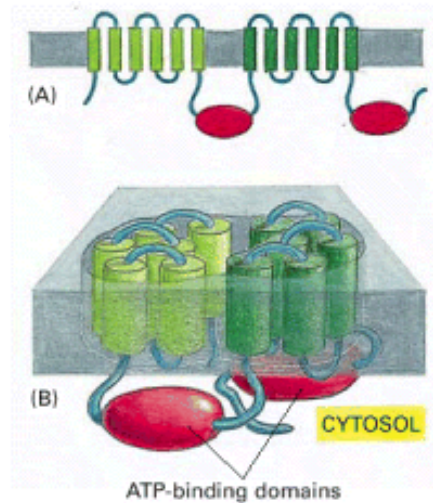
Die Hypothese der Tumorstammzelle vereint zwei voneinander getrennte, aber verwandte Konzepte. Das erste Konzept betrifft den zellulären Ursprung von Tumoren und beschreibt, dass ein Tumor als klonales Ereignis der Transformation in einer adulten Stammzelle („*cell of origin*“) auftritt. Das zweite Konzept der Hypothese ist, dass innerhalb etablierter Tumoren eine hierarchische Struktur der Zellen besteht, innerhalb derer der Tumor aus Zellen mit Stammzeleigenschaften („*cancer stem cell*“) wächst bzw. nach Therapie wieder regeneriert.



**Abbildung 2 – Leukämie-Stammzell-Modell. A: Normale Differenzierung.** Hämatopoetische Stammzellen reifen zu Progenitorzellen heran und differenzieren schließlich zu normalen hämatopoetischen Zelltypen. **B: Stammzell-Modell.** Leukämische Stammzellen reifen zu proliferierenden Progenitorzellen heran, die sich entweder zu hämatopoetischen Zelltypen oder zu Blasten entwickeln, und somit zur akuten Erkrankung führen. **C: Progenitorzell-Modell.** Hämatopoetische Stammzellen erwerben die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und entwickeln sich zu Blasten, die sich entweder zu hämatopoetischen Zelltypen entwickeln oder unkontrolliert proliferieren. (Lelievre et al., 2006)

### 1.3 ABC-Transporter und Multi-Drogen-Resistenz

Im Jahre 2001 wurde in den malignen Zellen von Patienten mit AML eine Subpopulation von Zellen entdeckt, die besondere Transportkapazitäten besaßen, und den malignen Klon regenerieren konnten (Hirschmann-Jax et al., 2005; Wulf et al., 2001). Dieser Befund wurde auch in Tumorstammzellen von soliden Tumorerkrankungen bestätigt, und führte zum Konzept der „*Side Population*“ (SP) von Tumorstammzellen in multiplen Neoplasien (Hirschmann-Jax et al., 2004). Eines der Hauptmerkmale von Tumorstammzellen ist die Fähigkeit zum Transport von Chemotherapeutika aus der Zelle heraus und die damit verbundene Resistenz gegenüber Zytostatika. Dabei wird die Resistenz meistens von ABC-Transportern vermittelt (*ATP binding cassette transporter*), die zu den Membranproteinen gehören und in ihrer Struktur eine ATP-bindende Kasette tragen (Bradley et al., 1988; Gros et al., 1986). ABC-Transporter können spezifische Substrate aktiv über Zellmembranen transportieren. Durch die Bindung und Hydrolyse von ATP an der ABC-Einheit wird Energie gewonnen, die den Transport von Substraten auch entgegen eines Konzentrationsgradienten ermöglicht. Substrate der ABC-Transporter sind Lipide, Peptide, Aminosäuren, Kohlenhydrate, Vitamine, Ionen, Glucoronid- und Glutathio-Konjugate, sowie Xenobiotika (Dean et al., 2001). Aufgrund ihrer Substratspezifität wurden die bisher bekannten ABC-Transporter in 7 Untergruppen eingeteilt (von ABCA bis ABCG) und erfüllen ihrem jeweiligen Substrat entsprechend die unterschiedlichsten physiologischen Funktionen. Dabei sind ABC-Transporter hauptsächlich wichtige Regulatoren der Permeabilität in nahezu jedem Epithel (z.B. Leber, Gastrointestinal-Trakt, Blut-Hirn-Schranke, Blut-Hoden-Schranke, Plazenta und Nieren), und sind außerdem an der Antigenpräsentation im Immunsystem sowie an der Lipidhomöostase von Zellen beteiligt (z.B. im Gehirn, im peripheren Nervensystem und in der Lunge) (Vasiliou et al., 2009).



**Abbildung 3 – ABC-Transporter.** Die Struktur des ABC-Transporters besteht aus einer transmembranen Domäne (TMD, grün), die aus  $\alpha$ -Helices aufgebaut und in der Doppelmembran verankert ist und zum anderen aus einer Nukleotid-Bindedomäne für ATP (NBD, rot), die sich im Zytosol befindet. Die NBD wird auch als ATP-bindende Kassetten-Domäne bezeichnet und besteht aus einer hoch-konservierten Sequenz. Die N-terminale TMD und die C-terminale NBD sind zu einer einzelnen Polypeptidkette verschmolzen (TMD-NBD-TMD-NBD). (Modifiziert nach Alberts et al. 2002)

Die ABC-Transporter gehören zu den primär aktiven Transportern und sind außerdem membranständige ATPasen. Die Superfamilie der ABC-Transporter gehört zu den größten bekannten Proteinfamilien und beim Menschen führen einige Polymorphismen und Mutationen der ABC-Transporter-Gene zu verschiedenen Erkrankungen z.B. Zystische Fibrose, Adrenoleukodystrophie, Morbus Stargardt, Tangier-Krankheit sowie bestimmte Immundefekte (Shulenin et al., 2004).

Die Behandlung der CML-typischen BCR-ABL-Translokation mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib führte in einer Studie bei den meisten CML-Patienten zu einer auch längerfristigen hämatologischen und molekularen Remission (Druker et al., 2006). Nilotinib und Dasatinib zeigten in ersten Studien ebenfalls sehr gute Erfolge bei der CML-Behandlung und konnten im Vergleich zu Imatinib sogar zu einer Verbesserung der Therapie im Sinne eines früheren Erreichens der molekularen Remission führen (Kantarjian et al., 2010; Saglio et al., 2010). Nach dem Absetzen der Therapie oder bei unregelmäßiger Medikamenteneinnahme kommt es allerdings bei einem Großteil der Patienten zu einem Wiederauftreten der Erkrankung (Cortes et al., 2004; Mahon et al., 2010).

Bei Patienten, die einen Rückfall während der Imatinib-Therapie erleiden, sind häufig erworbene Mutationen in der ATP-Bindungsstelle von BCR-ABL die Ursache für das Versagen der Therapie. Die Erkrankung tritt dabei durch Proliferation der unter Imatinib-Therapie persistierenden BCR-ABL-positiven Progenitorzellen erneut auf (Chu et al., 2005; Gorre et al., 2001). Die BCR-ABL-positiven Progenitorzellen können selbst unter Therapie im Knochenmark von CML-Patienten in Remission mehrere Jahre lang persistieren (Bhatia et al., 2003). Die leukämischen Stammzellen befinden sich während dieser Zeit in einem Ruhestadium, behalten aber ihre Fähigkeit zur Klonogenität bei und benötigen keine BCR-ABL-Aktivität zum Überleben (S. M. Graham et al., 2002; Holyoake et al., 1999). Nach dem heutigen Stand der Forschung ist die Therapie mit Tyrosinkinase-Inhibitoren zwar ausreichend, um die CML unter Kontrolle zu behalten, allerdings kann dadurch nicht der leukämische Klon, welcher während der Therapie persistiert, eradiziert werden (Chu et al., 2011).

Bisherige Untersuchungen haben gezeigt, dass in den leukämischen Progenitorzellen von Patienten mit CML eine Untergruppe mit dem Phänotyp der *Side Population* existiert, und somit über besondere Transportkapazitäten verfügt, welche ihnen eine Resistenz gegenüber den Tyrosinkinase-Inhibitoren ermöglicht. Es konnte nachgewiesen werden, dass in Zellen der *Side Population* von AML- bzw. CML-Patienten vor allem der intrazelluläre ABC-Transporter A3 (ABCA3) verstärkt exprimiert wird (Chapuy et al., 2008; Wulf et al., 2001). Die verstärkte Expression von ABCA3 führte zu einer erhöhten Resistenz der CML-Zellen gegenüber den zytotoxischen Effekten von Imatinib, assoziiert mit einer subzellulären Sequestration von Imatinib in den leukämischen Zellen (Chapuy et al., 2009)

### **1.4 Transkriptionsfaktor SALL4**

SALL4 (*Sal-like protein 4*) gehört zur Klasse der Zinkfinger-Proteine und besitzt als solches eine Zinkfinger-Domäne, die ein koordinativ gebundenes Zink-Ion enthält. Dadurch faltet sich die Polypeptidkette zu einer spiralförmigen Struktur (sog. Zinkfinger), die spezifisch mit DNA und RNA interagieren kann (Thiel & Lietz, 2004). SALL4 ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor von embryonalen Stammzellen

und reguliert dabei Stammzeleigenschaften zur Selbsterneuerung und Pluripotenz, wobei er mit den embryonalen Stammzell-Transkriptionsfaktoren Nanog und Oct4 interagiert (Ma et al., 2006; Yang et al., 2008). Die Expression von SALL4 konnte bereits in hämatopoetischen Stammzellen, in leukämischen Zellen von AML-Patienten und in CML-Zellen der Blastenkrise bzw. Akzelerationsphase nachgewiesen werden (Lu et al., 2011). SALL4 spielt außerdem eine Rolle bei der Regulation der ABCA3-Expression, da SALL4 über homologe Sequenzen an den ABCA3-Promotor binden und damit die Transkription regulieren kann. Außerdem konnte gezeigt werden, dass SALL4 bei Zellen von AML-Patienten mit hoher Resistenz gegenüber Chemotherapeutika wesentlich höher exprimiert ist, als bei Zellen von AML-Patienten mit einem guten Ansprechen auf die Therapie (Jeong et al., 2011).

### 1.5 Mikrovesikel

Mikrovesikel sind kleine Membran-umhüllte Vesikel, die von einer Vielzahl von Zellen gebildet werden, und u.a. im Blut vorkommen (Piccin et al., 2007). Die Funktion der Mikrovesikel hängt von den unterschiedlichen Zelltypen ab, von denen sie ursprünglich abstammen. Sie enthalten vor allem bioaktive Moleküle, Nukleinsäuren und Proteine (Cocucci et al., 2009). Tumorzellen scheiden vor allem Mikrovesikel ab, die Mikro-RNA oder mRNA enthalten (Mytar et al., 2008). Die Mikrovesikel besitzen dabei einen Durchmesser von 200 nm bis > 1 µm und sind damit viel größer als Exosomen, die nur bis zu 100 nm erreichen. Mikrovesikel werden zunächst durch eine Ausstülpung der Zytoplasmamembran gebildet und durch Abschnürung von der Zytoplasmamembran getrennt. Dieser Prozess findet u.a. auch in Tumorzellen statt (Muralidharan-Chari et al., 2010). Dabei korreliert die Menge der abgeschiedenen Mikrovesikel mit der Invasivität der Tumorzellen *in vitro* und *in vivo* (Ginestra et al., 1999). Die Funktion der Mikrovesikel in Tumoren besteht hauptsächlich im Transport von löslichen Proteinen (Iero et al., 2008), Nukleinsäuren (Skog et al., 2008), funktionalen transmembranen Proteinen (Del Conde et al., 2005), Chemokin-Rezeptoren (Mack et al., 2000) und Metalloproteasen zur Angiogenese von Tumoren (Taraboletti et al., 2002). Eine weitere wichtige Eigenschaft der Mikrovesikel bei der Verbesserung des Tumorwachstums ist die Ausschleusung von Medikamenten

aus den Tumorzellen. Dabei akkumuliert die chemotherapeutische Substanz zunächst in der Zelle und wird anschließend durch abgeschiedene Mikrovesikel aus der Zelle geschleust, ein Prozess, der auch als Medikamenten-Efflux bezeichnet wird und zur therapeutischen Multidrogen-Resistenz führen kann (Shedden et al., 2003). So konnte bereits gezeigt werden, dass bei Ovarialkarzinom-Zellen, die mit Cisplatin behandelt wurden, zunächst das Medikament in den Lysosomen akkumulierte und danach durch Mikrovesikel aus den Tumorzellen geschleust wurde. Die Cisplatin-resistenten Tumorzellen enthielten dabei 2,6-fach mehr Cisplatin, als die Mikrovesikel der Cisplatin-sensitiven Zellen. (Safaei et al., 2005). In den Vorarbeiten zu dieser Arbeit konnte ebenso für CML-Zellen gezeigt werden, dass [14C]-markiertes Imatinib in den Lysosomen akkumulierte und nach 48 h größtenteils extrazellulär nachzuweisen war (Chapuy et al., 2009). Somit führte dies zu der Fragestellung, ob in den Mikrovesikeln, die von CML-Zellen gebildet werden, ebenfalls Imatinib nachzuweisen ist, und ob dieser Efflux einen potentiellen Schutzmechanismus bei der Resistenz der CML-Zellen gegenüber den zytotoxischen Effekten der Tyrosinkinase-Inhibitoren darstellen könnte.

## Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Resistenzmechanismus von CML-Zellen gegenüber den Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) Imatinib, Nilotinib bzw. Dasatinib und der Einfluss des daran beteiligten lysosomalen ABC-Transporters A3 (ABCA3) auf die subzelluläre Sequestration und Sekretion der TKI untersucht werden. Außerdem sollte in den Experimenten aufgeklärt werden, welchen Einfluss die TKI-Effekte auf die Regulation der Expression von ABCA3 haben und welche zusätzlichen Faktoren bei den regulatorischen Prozessen eine entscheidende Rolle spielen. Es sollte dabei untersucht werden, welche Transkriptionsfaktoren bei der ABCA3-Transkription mitwirken und mit welchen geeigneten Methoden man diesen Mechanismus unterbrechen kann. Zudem sollte ein stabiler Knockdown von ABCA3 in den CML-Zellen erreicht und Substanzen ausgetestet werden, die als mögliche Kandidaten für die Inhibition der ABCA3-Signalkaskade in Frage kommen. Außerdem sollte die Expression von ABCA3 in Zellen von Patienten unterschiedlicher CML-Stadien überprüft werden und herausgefunden werden, ob das Onkogen BCR-ABL an der ABCA3-Regulation möglicherweise beteiligt ist. Unter Verwendung von radioaktiv-markiertem [14C]-Imatinib sollte der Mechanismus der Sekretion im Hinblick auf die Beteiligung von Mikrovesikeln bzw. Exosomen zum TKI-Export aus den CML-Zellen untersucht werden. Die Ergebnisse und Erkenntnisse über die TKI-Resistenz sollten zu einem besseren Verständnis der TKI-Therapie führen und mittels Elimination persistierender leukämischer Stammzellen zu neuen möglichen Behandlungsansätzen bei der Therapie von CML-Patienten beitragen.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Absaugsystem EcoVac

Analysenwaage

Casy Cell Counter ®

CO<sub>2</sub>-Inkubator HERA Cell

CSC-Kamera, Intelligent Dark Box II

Dampfsterilisator Varioklav ®

Einschweißgerät

Eismaschine

*Elektrophorese-Apparaturen:*

- Electrophoresis Power Supply (EV202)

- Electrophoresis Power Supply (EPS 500/400)

- für LDS/SDS-Gele, XCell Surelock™

- für Agarosegele

Elektroporator EasyjecT

ELISA, Model 680

FACScan

*Gefrierschränke:*

-80 °C, -150 °C

-20 °C

Heizblock

Heizofen

Horizontalrotierer, Rotamax 120

Magnetrührer IKA-COMBIMAG RCT

Mikroliter Spritze

*Mikroskope:*

- Axiovert 100

Schütt Labortechnik

Sartorius, Göttingen

Schärfe System, Reutlingen

Heraeus, Osterode

FujiFilm, Düsseldorf

H.u.P. Labortechnik,

Oberschleißheim

Perkin Elmer, Rodgau-

Jügesheim

ZIEGRA, Isernhagen

Invitrogen, Karlsruhe

Pharmacia Fine Chemicals,  
Schweden

Invitrogen, Karlsruhe

Invitrogen, Karlsruhe

EquiBio, MA, USA

BioRad, München

Becton Dickinson, Heidelberg

SANYO, Wiesloch

Liebherr, Biberach

Liebisch, Bielefeld

Heraeus, Osterode

Heidolph, Bremen

Janke &

Hamilton, Schweiz

Zeiss, Oberkochen

- Fluoreszenzmikroskop, Leica DM IL	Leitz, Oberkochen
- LABOVERT FS	Leitz, Oberkochen
- Standard 25	Zeiss, Oberkochen
Mikrowellenherd	AEG Micromat, Stockholm
Neubauer-Zählkammer, 0,0025 mm <sup>2</sup>	Brand Gläser, Wertheim
Nukleofektor TM II	Amaya AG, Köln
<i>Pipetten:</i>	
- Einfach-Pipetten, 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
- Mehrkanal-Pipetten, 50 µl, 300 µl	Thermo Labsystems, Egelsbach
- Multipette, Combitips	Eppendorf, Hamburg
- Multipipette Accu-jet® pro	Brand, Wertheim
Photometer, 8,5 mm Lichtstrahlhöhe	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter, pH211	HANNA Instruments, Kehl am Rhein
Rotationsmischer 5432; 3300	Eppendorf, Hamburg
<i>Rotoren:</i>	
- VTI65.1	BECKMANN, München
- TL-100.3	BECKMANN, München
Skalpell	AESULAP, Tuttlingen
Sterilbank HERA safe	Heraeus, Osterode
Szintillationszähler, Typ 1450 MicroBeta	PerkinElmer, Rodgau-
Trilux	Jügesheim
Taqman-Reader 7500 HAT (ABI PRISM)	Applied Biosystems
Tecan SLT Spectra	Tecan Deutschland GmbH
Thermocycler T3000	Biometra, Göttingen
Trockenschrank	Memmert, Schwabach
Vortex Genie 2	Scientific Industries
Wasserbad (250 V, 0,5 AMP-T)	Köttermann, Hännigse
Wipptisch, SSL4 (Stuart)	Barloworld Scientific, Staffordshire, UK
<i>Zentrifugen:</i>	
- Biofuge pico	Heraeus, Osterode
- Multifuge 3, Ausschwingmotor	Heraeus, Osterode

- |                                     |                    |
|-------------------------------------|--------------------|
| - Tischzentrifuge Centrifuge 5415 D | Eppendorf, Hamburg |
| - Tabletop Ultrazentrifuge TL-100   | Beckmann, München  |
| - Ultrazentrifuge L80               | Beckmann, München  |
| - Zytospin-Zentrifuge               | Shandon, Frankfurt |

### 2.1.2 EDV

Adobe Photoshop 7	Adobe Systems Inc.
AxioVision	Zeis, Oberkochen
Cell Quest Version 3.3	Becton Dickinson
ImageReader LAS 1000 Pro V 2.1	FujiFilm, Düsseldorf
MAC OS 9	Apple Macintosh, USA
Microplate Manager 2.6	BioRad, München
Office XP	Microsoft, Redmond, USA
SDS 2.1	Applied Biosystems, USA
WIN MDI 2.9	Freeware, Joe Trotter
Windows XP	Microsoft, Redmond, USA

### 2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Ampuwa ®	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Deckgläschen, rund, Ø 1 cm	Menzel Gläser, Braunschweig
Eindrückstopfen	Sarstedt, Braunschweig
Einfrierboxen	Nalgene, Herford, UK
<i>Einmalkanülen:</i>	
- BD Microlance 0,45 x 13 mm; 26 G1/2	Becton Dickinson,
- mit Lanzettenschliff, 2 x 70 mm	Heidelberg
	EHRHARDT Söhne GmbH, Geislingen
<i>Einmalspritzen:</i>	
- Omnifix ® 10 ml, Schraubverschluss	B. Braun, Melsungen
- Omnifix ® 1 ml/40 i.U. Insulinspritze	B. Braun, Melsungen
Elektroporationsküvetten, 4 mm	Biozym, Hamburg
Gewebekulturflaschen, 25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> ,	Sarstedt, Braunschweig

175 cm<sup>2</sup>

*Gewebekulturschalen:*

- Ø 35 mm

greiner bio-one, Nürtingen

- Ø 10 cm

Sarstedt, Braunschweig

- Ø 15 cm

greiner bio-one, Nürtingen

*Multi-Well-Platten:*

- 6-Well-Platte

greiner bio-one, Nürtingen

- 24-Well-Platte

Becton Dickinson,

- 96-Well-Platte (Rund-, Flachboden)

Heidelberg

- 386-Well-Platte

Sarstedt, Braunschweig

Nitrozellulosemembran, HybondTM-c  
extra, 0,2 µM

Abgene, Hamburg

Amersham-Buchler,

Braunschweig

Objektträger, 76 x 26 mm, Mattrand  
Parafilm ®

Knittel Gläser, Braunschweig

American National CanTM,

Chicago

*Pipetten:*

- Pasteurpipetten, 230 mm

Brand, Wertheim

- Serologische Pipetten, 5 ml, 10 ml, 25 ml

Sarstedt, Braunschweig

- Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl

Sarstedt, Braunschweig

- Reaktionsgefäße, 0,5 ml, 2 ml

Eppendorf, Hamburg

*Röhrchen:*

- Für Casy® 18 ml Röhrchen

Sarstedt, Braunschweig

- Für FACS-Analysen 5 ml Röhrchen

Sarstedt, Braunschweig

- Polystyrol-Rundbodenröhrchen 5 ml

Becton Dickinson,

- Polycarbonat-Zentrifugenröhrchen, 2 ml

Heidelberg

- Kryoröhrchen, 1,8 ml

Beckmann, München

- Sterile Plastikröhrchen, 15 ml, 50 ml

Nalgene, Herford, UK

Serologische Pipetten, 5 ml, 10 ml, 25 ml

Sarstedt, Braunschweig

Sterilfilter

Sarstedt, Braunschweig

Sarstedt, Braunschweig

Szintillationsflüssigkeit

PerkinElmer, Rodgau-

Jügesheim

Zellschaber; 25 mm

Sarstedt, Braunschweig

Zellsieb; 70 µm

Becton Dickinson,  
Heidelberg

#### 2.1.4 Chemikalien

Agar

Sigma, Deisenhofen

Bromphenolblau

BioRad, München

Calciumchlorid (CaCl<sub>2</sub>)

Merck, Darmstadt

Dimethylsulfoxid (DMSO)

Merck, Darmstadt

Dinatriumhydrogenphosphat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)

Merck, Darmstadt

Dithiothreitol (DTT, 0,1 M)

Invitrogen, Karlsruhe

dNTP Mix (2,5 mM)

Invitrogen, Karlsruhe

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)

Sigma, Deisenhofen

FACSFlow™

Becton Dickinson, Heidelberg

Glycin

Roth, Karlsruhe

Imidazol

Merck, Darmstadt

Isopropanol

J.T.Baker, Griesheim

LB Broth Base

Invitrogen, Karlsruhe

Lade-Puffer (6 x)

peqlab, Erlangen

LysoTracker® Red DND-99, 1 mM

Molecular Probes, Oregon,  
USA

Magermilchpulver

BioRad, München

Methanol

J.T.Baker, Griesheim

MgCl<sub>2</sub>

Invitrogen, Karlsruhe

β-Mercaptoethanol

Merck, Darmstadt

4-Nitrophenyl N-acetyl-β-D-Glucosaminide  
(β-Hexosaminidase-Substrat)

Sigma, Deisenhofen

NuPAGE® Antioxidant

Invitrogen, Karlsruhe

NuPAGE® LDS Sample Buffer (4 x)

Invitrogen, Karlsruhe

NuPAGE® SDS Running Buffer

Invitrogen, Karlsruhe

NuPAGE® Transfer Buffer

Invitrogen, Karlsruhe

NuPAGE® 4-12% Bis-Tris Gel

Invitrogen, Karlsruhe

RNase-Free DNase Set

QIAGEN, Hilden

RNase Out™ (5.000 U, 40 U/µl)

Invitrogen, Karlsruhe

Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

Merck, Darmstadt

TritonX-100	Merck, Darmstadt
Trizma® Acetat	Sigma, Deisenhofen
Trypan-Blau (0,4 %)	Sigma, Deisenhofen
Trypsin/EDTA (0.05 %)	Invitrogen, Karlsruhe
Tween® 20, SigmaUltra	Sigma, Deisenhofen
Universal Agarose	peqlab, Erlangen

### 2.1.5 Wachstumsfaktoren

CSF (Colony stimulating factor)	R&D Systems, USA
SCF (Stem cell factor)	R&D Systems, USA
IL-3 (Interleukin-3)	R&D Systems, USA
MCSF (Macrophage colony stimulating factor)	R&D Systems, USA

### 2.1.6 Enzyme

<i>Taq</i> DNA-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
SuperScript II™ Reverse Transcriptase	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
RNase-Free DNaseI	Qiagen, Hilden, Deutschland
T4-DNA-Ligase	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
<i>Afl</i> I	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
<i>EcoRV</i>	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
<i>EcoRI</i>	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland

### 2.1.7 Größenstandards

100 bp DNA Ladder	Genecraft, Lüdinghausen, Deutschland
1 kb DNA Ladder	Genecraft, Lüdinghausen, Deutschland
Novex® Sharp Protein Ladder	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

### 2.1.8 Fertigsysteme (Kits)

RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAprep Miniprep Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
LSAB <sup>®</sup> + HRP Kit	Dako, Hamburg, Deutschland
GeneScript <sup>™</sup> RT Kit	Genecraft, Lüdinghausen, Deutschland
TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

### 2.1.9 Lösungen und Puffer

Alle Lösungen und Puffer wurden mit bidestilliertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) angesetzt. Falls die Anwendung eine Sterilität der verwendeten Lösungen bzw. Puffer erforderte, wurden diese nach dem Ansetzen für 20 min bei 121 °C autoklaviert und/oder steril filtriert. Die Prozentangaben beziehen sich auf das Verhältnis Gewicht pro Volumen.

### 2.1.10 Antikörper

Antikörper-Bezeichnung (Antigen)	Spezies	Verdünnung		Herkunft/Referenz
		WB	IF	
<b>ABCA3</b> (Anti-ABCA3)	Kaninchen	1:250	1:50	Yamano et al., 2001
<b>SALL4</b> (Anti-SALL4)	Maus	1:250	1:50	Abcam, Cambridge, UK
<b>LAMP-1</b> (Anti-H4A3)	Schaf	1:500	1:50	Hybridoma Bank, Iowa, USA
<b>LAMP-2</b> (Anti-LAMP-2)	Kaninchen	1:500		Sigma Aldrich
<b>β-Aktin</b> (Anti-β-Aktin)	Maus	1:1000		Sigma Aldrich
<b>GAPDH</b> (Anti-GAPDH)	Maus	1500		Sigma Aldrich

Tabelle 1 – Übersicht der verwendeten Primärantikörper

Konjugat	Spezies	Verdünnung		Herkunft/Referenz
		WB	IF	
HRP-Konjugat	Ziege Anti-Maus	1:2000		Santa Cruz, CA, USA
HRP-Konjugat	Esel Anti-Kaninchen	1:2000		Santa Cruz, CA, USA
HRP-Konjugat	Esel Anti-Schaf	1:2000		Santa Cruz, CA, USA
Cy2 (Carbocyanin)- Konjugat	Ziege Anti-Kaninchen		1:500	Dianova, Hamburg, Deutschland
Cy3 (Indocarbocyanin)- Konjugat	Ziege Anti-Maus		1:500	Dianova, Hamburg, Deutschland

Tabelle 2 – Übersicht der verwendeten Sekundärantikörper

### 2.1.11 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide, die für PCR-Reaktionen und zur DNA-Sequenzierung verwendet wurden, wurden als 0,1 nmol/µl Stocklösungen von IBA, Göttingen bezogen, mit sterilem ddH<sub>2</sub>O auf 10 µM eingestellt und bei - 20 °C gelagert.

Kombination	Produktgröße	Sequenz (5' → 3')
<b>ABCA3 fw.</b> <b>ABCA3 rev.</b>	730 bp	AGA CCA CCT ACT TCT CTA GC TCT GCA TGG TAC TCC ATG AT
<b>β-Aktin fw.</b> <b>β-Aktin rev.</b>	488 bp	CTA ATC CAC ATC TGC TGG AAG GTG G ACC TTC AAC ACC CCA GCC ATG TAC G
<b>SALL4 fw.</b> <b>SALL4 rev.</b>	508 bp	ATG TCG AGG CGC AAG CAG GCG AAA AGC TTA TGT CCT GGG GGG TGG GTG GCA
<b>ABCA3 fw. RTQ</b> <b>ABCA3 rev. RTQ</b>	139 bp	TTC TTC ACC TAC ATC CCC TAG CCT TTC GCC TCA AAT TTC CC
<b>SALL4 fw. RTQ</b> <b>SALL4 rev. RTQ</b>	68 bp	TGC AGC AGT TGG TGG AGA AC TCG GTG GCA AAT GAG ACA TTC
<b>β-Aktin fw. RTQ</b> <b>β-Aktin rev. RTQ</b>	<b>96 bp</b>	CAC ACT GTG GCC CAT CT TGA GGA TCT TCA TGA GGT AGT CAG

Tabelle 3 – Übersicht der verwendeten Oligonukleotide



### 2.1.12 Inhibitoren

Substanz	Stocklösung	Molekulargewicht	Firma
Imatinib	10 mM	589.7 g/mol	<b>Novartis, Basel</b>
Nilotinib	10 mM	529.5 g/mol	<b>Novartis, Basel</b>
Dasatinib	10 mM	488 g/mol	<b>Bristol-Myers Squibb</b>
Rapamycin	1 mM	914.2 g/mol	<b>Sigma Aldrich</b>
Indomethacin	<b>1 mM</b>	<b>357.8 g/mol</b>	<b>Sigma Aldrich</b>

Tabelle 4 – Übersicht der verwendeten Inhibitoren

### 2.1.13 Radioaktive Substanzen

[14C]-Imatinib (4,99 kBq/mg)

Novartis, Basel

### 2.1.14 Software

Bei der elektronischen Datenverarbeitung wurden die Programme des Office 2007-Pakets von Microsoft sowie ACDSee 9.0 von ACD Systems verwendet. Die statistische Auswertung der Daten wurde mit GraphPad Prism 4.0 von GraphPad Software durchgeführt. Als Bibliographie-Programm wurde EndNote X5 von Thomson Research Soft eingesetzt.

### 2.1.15 Vektoren und Plasmide

Name	Bezugsquelle
pEGFP-N1+ABCA3	Cheong et al. 2006
pLKO.1-puro	Open Biosystems, Lafayette, USA
pLKO.1-GFP	Addgene, Boston, USA
pMD.G-VSV-G	Addgene, Boston, USA
pCMV-dR8.91	Addgene, Boston, USA
pCDNA3+bcr/abl	Addgene, Boston, USA

Tabelle 5 – Übersicht der verwendeten Vektoren und Plasmide

### 2.1.16 Plasmidkarten

#### pEGFP-N1+ABCA3

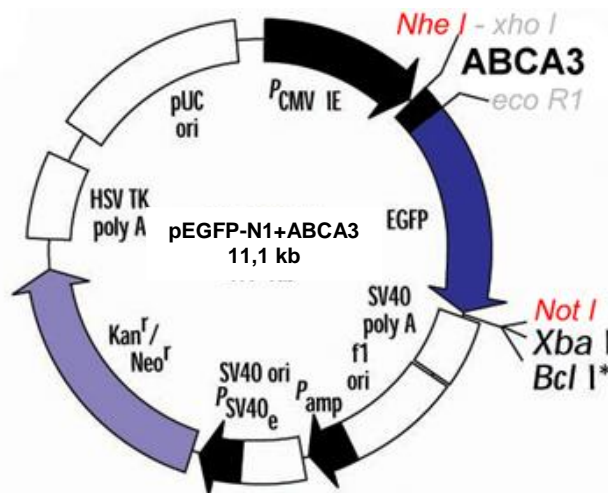


Abbildung 4 – Plasmidkarte von pEGFP-N1+ABCA3  
(Modifiziert nach Cheong et al. 2006)

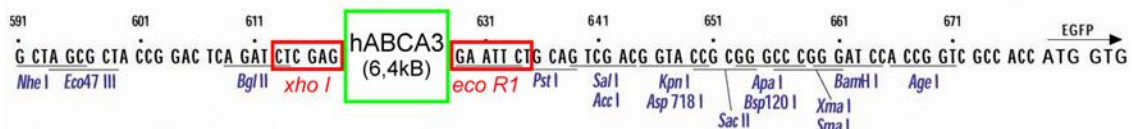
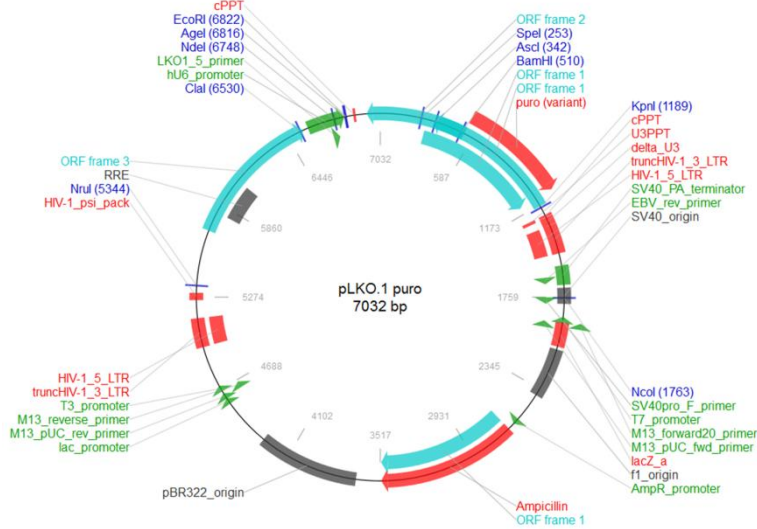


Abbildung 5 – Multiple cloning site von pEGFP-N1+ABCA3  
(Modifiziert nach Cheong et al. 2006)

pLKO.1-puro



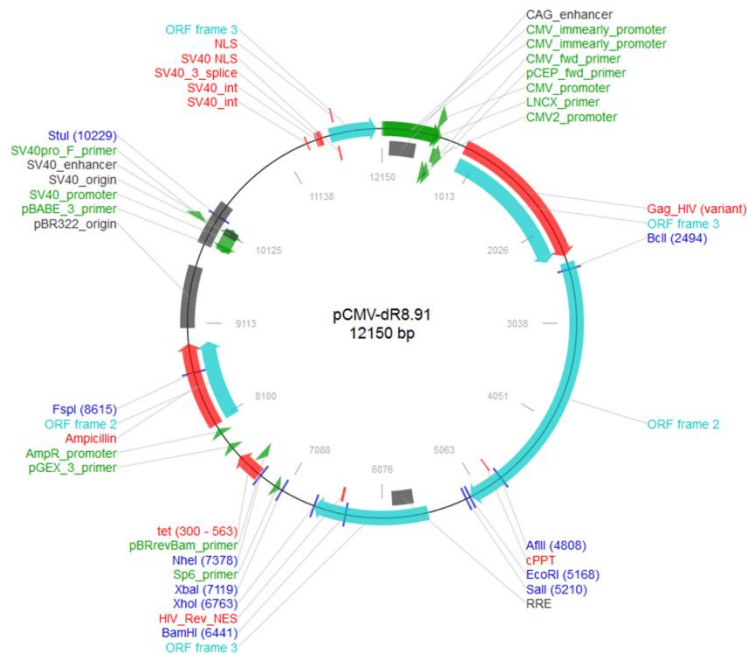
**Abbildung 6 – Plasmidkarte von pLKO.1**  
(Modifiziert nach J. Greiner, Addgene 2007)

```

6715  CAGTTTAA  ATTATGTTT AAAATGGACT ATCATATGCT TACCGTAACT TGAAAGTATT TCGATTTCTT GGCTTTATAT ATCTTGTGGA AAGGACGAAA
      GTCAAAATT TAATACAAA TTTTACCTGA TAGTATACGA ATGGCATTGA ACTTTCATAA AGCTAAAGAA CCGAAATATA TAGAACACCT TTCCTGCTTT
      AgeI
      ----- EcoRI
6816  CACCGGTGAATT CTCGACCT CGAGACAAAT GGCAGTATTC ATCCACAATTTT AAAAGAAA AGGGGGGATT GGGGGGTACA GTGCAGGGA AAGAATAGTA
      GTGGCCACTAA GAGCTGGA GCTCTGTTA CCGTCATAAG TAGGTGTTAAAA TTTTCTTT TCCCCCTAA CCCCCCATGT CACGTCCCTT TTCTTATCAT
6915  GACATAATAG CAACAGACAT ACAAACTAAA GAATTACAAA AACA
      CTGTATTATC GTTGTCTGTA TGTTTGATT CTTAATGTTT TTGT
    
```

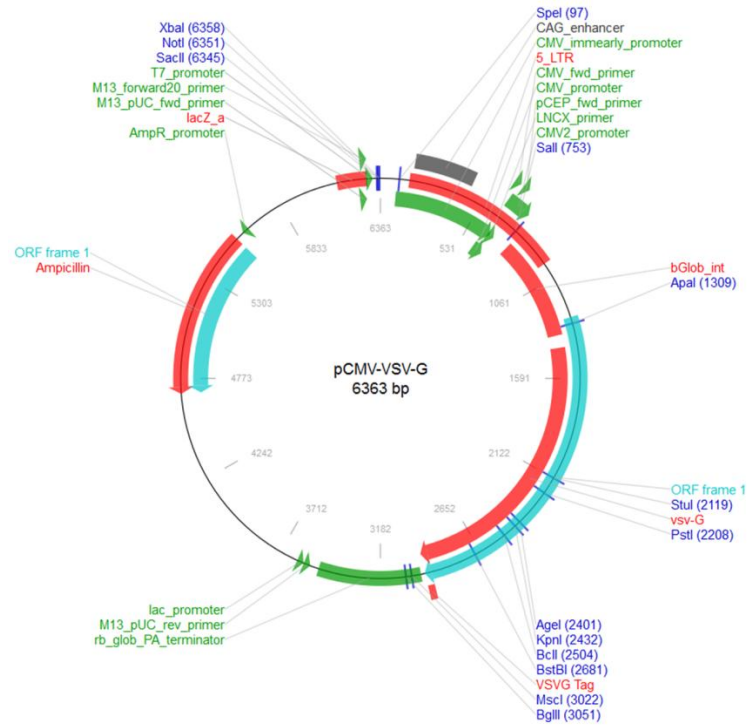
**Abbildung 7 – Multiple cloning site von pLKO.1**  
(Modifiziert nach J. Greiner, Addgene 2007)

pCMV-dR8.91



**Abbildung 8 – Plasmidkarte von pCMV-dR8.91**  
(Modifiziert nach J. Greiner, Addgene 2007)

**pMD.G-VSV-G**



**Abbildung 9 – Plasmidkarte von pMD.G-VSV-G**  
(Modifiziert nach J. Greiner, Addgene 2007)

## 2.2 Zellkulturarbeiten

Alle Arbeiten in der Zellkultur, die steril durchgeführt werden mussten, wurden unter einer Sicherheitswerkbank in Laboren der entsprechenden Sicherheitsstufe, z.B. S1 oder S2, verrichtet, um mögliche Kontaminationen zu vermeiden. Dabei wurden ausschließlich sterile oder autoklavierte Verbrauchsmaterialien nach Maßgabe der Hersteller verwendet. Sterilitätskontrollen erfolgten kontinuierlich, eine Routinekontrolle auf Kontamination mit Mykoplasmen wurde alle 3 Monate durchgeführt. Kontaminierte Kulturen wurden umgehend entsorgt. Außerdem wurden die verwendeten Medien nach der Zugabe von Antibiotika oder fetalem Kälberserum (FKS) steril filtriert. Die Kultivierung aller Zelllinien erfolgte in 10 cm-Kulturschalen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Inkubator.

## 2.3 Proteinbiochemische Methoden

### 2.3.1 Proteinbestimmung mittels BioRad-DC-Protein-Assay

Die Proteinbestimmung wurde mit unterschiedlichen Reagenzien durchgeführt (BioRad Laboratories, München) und gemäß Herstellerangaben (**Tabelle 6**) in unbeschichteten 96-Well-Platten durchgeführt. Für die Eichgerade wurden 0; 0,5; 1; 1,5; 2 µg Protein des BSA-Standards in die 96-Well-Platte als Duplikate pipettiert. Die zu bestimmenden Proben wurden zu je 5 µl auf die Wells verteilt und anschließend mit PBS auf je 20 µl aufgefüllt. Anschließend wurde zu allen Proben 25 µl Reagenz A' und 200 µl Reagenz B pipettiert. Nach einer Inkubation der 96-Well-Platte für 15 min bei RT wurde die Absorption im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen, und der Proteingehalt der Proben mittels BSA-Eichgeraden bestimmt.

<b>Reagenz A</b>	alkalische Kupfer-Tartrat-Lösung
<b>Reagenz B</b>	Folin-Reagenz-Verdünnung
<b>Reagenz S</b>	Surfactant-Lösung
<b>Reagenz A'</b>	1 ml Reagenz A + 20 µl Reagenz S

**Tabelle 6 – Übersicht der verwendeten Proteinbestimmungs-Reagenzien.**

### 2.3.2 Western-Blot

#### 2.3.3 Herstellung der Zell-Lysate

Zur Herstellung der Zell-Lysate wurden ca.  $1 \times 10^6$  Zellen für 10 min bei 500 g zentrifugiert und das Zellpellet anschließend in 100  $\mu$ l RIPA-Lysepuffer aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde für 30 min auf Eis geschüttelt und anschließend für 15 min zentrifugiert (13.000 g, 4 °C). Der Überstand wurde zur weiteren Verarbeitung abgenommen und in ein neues Eppendorf-Cup gefüllt.

**RIPA-Lysepuffer:** 50 mM TRIS Puffer pH 8,0  
150 mM NaCl  
1 % Tween 20  
0,5 % DOC  
0,1 % SDS  
1 % PMSF

#### 2.3.4 LDS-Gelelektrophorese

**Elektrophorese-Puffer** 50 ml NuPage® LDS Running Buffer  
950 ml ddH<sub>2</sub>O

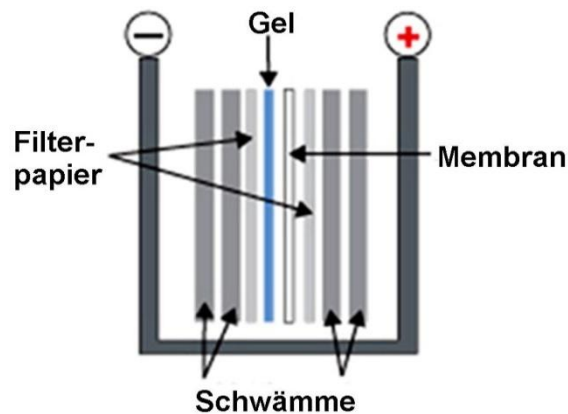
Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe wurden von der Firma Invitrogen gefertigte 4 - 12 % Bis-Tris-LDS-Gele verwendet. Dazu wurden die Proben zunächst auf Eis aufgetaut und 35  $\mu$ g Protein mit 5  $\mu$ l NuPage®-LDS *Sample Buffer* (4 x) in einem 1,5 ml-Eppendorf-Cup pipettiert und mit ddH<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 20  $\mu$ l eingestellt. Danach wurden die Proben kurz auf dem Vortexer gemischt und für 1 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Zur Denaturierung wurden die Proben für 10 min bei 70 °C auf einem Heizblock

inkubiert. In der Zwischenzeit wurde die Elektrophorese-Apparatur (XCell Surelock™, Invitrogen) zusammengebaut und die Gele darin mit einer Klammer fixiert. Die Elektrophorese-Kammer wurde dann mit Laufpuffer aufgefüllt und in die Mitte der Kammer 500 µl NuPAGE® *Antioxidant* gegeben. Nach 10-minütiger Denaturierung der Proben wurden je 18 µl mit einer Mikroliter-Spritze (Hamilton) vorsichtig in die Taschen des LDS-Gels pipettiert. Um Luftblasen in den Taschen zu vermeiden, wurde diese zuvor mit Laufpuffer gespült. Neben den Proben wurden immer 6 µl Molekulargewichtsstandard (*All Blue prestained*, BioRad) mitgeführt. Die Auftrennung der Proteine im Gel wurde bei 200 V für 45 min durchgeführt.

### 2.3.5 Nassblot auf Nitrozellulosemembranen

<b>Transferpuffer</b>	20 % Methanol
	5 % NuPage® Transfer-Puffer
	75 % ddH <sub>2</sub> O

Zum Proteintransfer auf eine Nitrocellulose-Membran (Towbin et al. 1992) wurde für jedes LDS-Gel eine Nitrozellulose-Membran, sowie zwei Whatman-Filterpapiere auf die entsprechende Gel-Größe zurechtgeschnitten und kurz vor dem Gebrauch zusammen mit den „Blotting-Pads“ in Transferpuffer äquilibriert. Nach der Elektrophorese wurde das Gel aus seiner Platte entfernt. Zum Proteintransfer wurden die einzelnen Bestandteile luftblasenfrei in den Bloteinsatz, wie vom Hersteller angegeben, geschichtet.



**Abbildung 10 – Aufbau Bloteinsatz.** Von der Anode (-) zur Kathode (+) werden zwei Lagen Blot-Schwämme, zwei Lagen Whatman-Filterpapiere, das Gel, die Nitrozellulose-Membran, zwei Lagen Whatman-Filterpapiere und zwei Lagen Blot-Schwämme geschichtet. Zum Blotten von zwei Gelen benötigt man den Bloteinsatz doppelt. (Modifiziert nach [www.bme.gatech.edu](http://www.bme.gatech.edu))

Der Bloteinsatz wurde in die Elektrophoresekammer eingesetzt und die Mitte des Bloteinsatzes mit Transferpuffer aufgefüllt. Um ein zu starkes Erwärmen der Elektrophoresekammer zu vermeiden, wurde der Rest der Kammer mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt. Der Transfer wurde für 1 h bei konstanter Spannung von 30 V durchgeführt.

### 2.3.6 Immundetektion

**Blockierungslösung:** 5 g Magermilchpulver  
0,1 % Tween® 20  
100 ml PBS

Alle Inkubationen und Waschschrte erfolgten auf einem Wipptisch. Nach dem Proteintransfer wurde die Nitrozellulose-Membran einmal mit PBS-Tween gespült, um Reste von Methanol zu entfernen. Anschließend wurden die freien Proteinbindungsstellen auf der Membran über Nacht bei 4 °C mit Blockierungslösung abgesättigt. Alternativ konnte das Blocken auch 2 h bei RT erfolgen. Anschließend wurde die Membran dreimal kurz mit PBS-Tween gewaschen. Der Primärantikörper wurde den Herstellerangaben entsprechend in PBS-Tween verdünnt und für 4 h bei Raumtemperatur mit der Membran auf einem



Wipptisch inkubiert. Um einer Austrocknung durch Transpiration vorzubeugen wurde das Gefäß abgedeckt. Nach dieser Inkubation wurde die Membran dreimal für 5 min mit PBS-Tween gewaschen und der HRP-konjugierte Sekundärantikörper, 1:2000 in PBS-Tween verdünnt und für 1 h bei Raumtemperatur mit der Membran inkubiert. Im Anschluss wurde dreimal für 5 min mit PBS-Tween gewaschen. Vor der Detektion mit dem Chemilumineszenz-System wurde die Membran einmal in PBS geschwenkt, um störende Effekte durch das Detergenz zu vermeiden.

Das zur Detektion verwendete Chemilumineszenz-kit von Amersham (ECL-System) besteht aus den Reagenzien 1 und 2, von denen gleiche Volumina miteinander vermischt und für 1 min auf die Membran gegeben wurden. Im Anschluss wurde die Membran mit etwas ECL-Flüssigkeit in eine transparente Folie eingelegt, das Signal mit einer CSC-Kamera detektiert und als elektronisches Bild gespeichert. Die Expositionszeiten (5 s bis 10 min) richteten sich nach der Stärke der Signale.

## 2.4 Mikroskopische Techniken

### 2.4.1 Trypanblau-Färbung

Zur Bestimmung der Anzahl von vitalen Zellen innerhalb einer Zellsuspension wurde ein Aliquot von 10 µl dieser Suspension zu 90 µl Trypanblau (Sigma) in eine 96-Well-Platte gegeben. Davon wurden 10 µl der so gefärbten Lösung in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und unter dem Mikroskop betrachtet. Die vitalen Zellen erschienen hell, während die toten Zellen dunkelblau gefärbt waren. Somit konnte man die Anzahl der vitalen Zellen bestimmen und eine Aussage über den Zustand der Zellkultur machen. Anschließend wurden unter dem Mikroskop die Zellen in 4 Großquadranten der Neubauer-Zählkammer (Brand Gläser) gezählt. Die Berechnung der Zellzahl erfolgte nach folgender Formel:

Zellzahl = (Mittelwert der 4 Großquadrate)  $\times 10^4$   $\times$  Verdünnungsfaktor  $\times$  Volumen der Zellsuspension [ml]

### 2.4.2 Zytospin-Präparation

Für die Präparation von Zytospins wurden pro Ansatz ca.  $5 \times 10^4$  Zellen in 100  $\mu$ l PBS aufgenommen. Die Objektträger (76 x 26 mm, Knittel Gläser) wurden zusammen mit den zugehörigen Filtern und Plastikeinsätzen in eine Metallklemme eingespannt. Danach wurde diese Metallklemme in einer Zytospin-Zentrifuge (Shandon) platziert. Je 100  $\mu$ l der Zellsuspension wurden in den Trichter des Plastikeinsatzes gefüllt und für 10 min bei 800 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden die Objektträger aus den Metallklemmen entfernt. Die Objektträger wurden dann mindestens für 2 h bei RT getrocknet. Danach konnten die Objektträger mittels Nagellack versiegelt werden und direkt mikroskopisch untersucht, oder zur Aufbewahrung mit Aluminiumfolie umwickelt bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

### 2.4.3 Immunfluoreszenz-Färbung

Zur Fixierung wurden die getrockneten Zytospins mit Aceton ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) für 10 min in Glasständern inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger für 10 min bei RT getrocknet und die fixierten Zellpellets mit einem Gummierstift (Dako, Dänemark) großzügig umrandet.

Im nächsten Schritt wurden die Objektträger für 15 min in Tris-Puffer (0,5 M Tris-Acetat, pH 6,4) inkubiert und anschließend mit ddH<sub>2</sub>O gespült. Zur Antikörperinkubation wurde der Primär-Antikörper mit Tris-Puffer entsprechend verdünnt (**Tabelle 1**) und die Zytospins damit für 30 min inkubiert. Danach erfolgten zwei Wachschriffe in Tris-Puffer für je 5 min. Nach dem Waschen erfolgte eine 30 minütige Inkubation mit dem oder den Sekundärantikörper(n) bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  (**Tabelle 2**). Bevor die Zellen dann in Fluoromount® eingebettet wurden, erfolgte ein weiteres Waschen mit PBS und einmalig mit ddH<sub>2</sub>O. Nach dem Trocknen über Nacht standen die Objektträger schließlich zur mikroskopischen Auswertung durch ein konfokales Laser-Scan-Mikroskop (Medizinische Mikrobiologie, Göttingen) zur Verfügung.

## **2.5 Zellbiologische Methoden**

### **2.5.1 Kultivierung von Zellen**

Alle Arbeiten, die in der Zellkultur steril durchgeführt werden mussten, wurden unter einer Sicherheitswerkbank verrichtet, um mögliche Kontaminationen zu vermeiden. Dabei wurden ausschließlich sterile oder autoklavierte Verbrauchsmaterialien verwendet. Außerdem wurden die Medien und Lösungen für die Zellkultur vor der Verwendung im Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt. Die Kultivierung aller Zelllinien erfolgte in Zellkulturflaschen der Größe 75 cm<sup>2</sup> als Erhaltungskultur und 175 cm<sup>2</sup> für nachfolgende Experimente bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Inkubator. Zellen mit Selektionsmedium wurden 3 Passagen vor experimenteller Verwendung ohne Selektionsmedium inkubiert.

### **2.5.2 Passagieren von Zellen**

Alle Zelllinien wurden je nach Wachstumsgeschwindigkeit zwei- bis dreimal pro Woche passagiert. Dazu wurden zunächst die jeweiligen Medien und Lösungen auf 37 °C vorgewärmt. Für die Passage der Suspensionszelllinien wurde die Zellsuspension in einem Verhältnis von 1:3 bis 1:5 mit frischem Medium versorgt. Für die Passage der adhärennten Zelllinien wurde zunächst der Zellkulturüberstand von den Zellen abgenommen. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, um die im Zellkulturüberstand befindlichen Proteinaseinhibitoren zu entfernen, die zu einer Inaktivierung des Trypsins führen würden. Nachdem das PBS abgenommen wurde, wurden die Zellen mit 2 ml vorgewärmter 0,05 % Trypsin/EDTA-Lösung überschichtet und zum Ablösen der Zellen für 5 min im Inkubator aufbewahrt. Nachdem sich die Zellen abgelöst hatten, wurde die Zellsuspension mit 5 ml des entsprechenden Mediums vermischt, um die Aktivität des Trypsins abzustoppen. Das Animpfen der mit entsprechendem Medium vorbereiteten Kulturflaschen erfolgte durch Zugabe von 1 ml der Zellsuspension zum Medium. Das Wachstum der Zellkulturen wurde jeden Tag beobachtet und dabei auf Kontaminationen überprüft.

### **2.5.3 Cryokonservierung und Revitalisierung von Zelllinien**

Um mögliche Verzögerungen der Zellkulturarbeiten durch kontaminierte oder abgestorbene Zellen zu vermeiden, wurden in regelmäßigen Abständen Zellreserven aller verwendeten Zelllinien tiefgefroren. Diese konnten somit bei Bedarf ohne großen Zeitverlust revitalisiert und in Kultur gebracht werden.

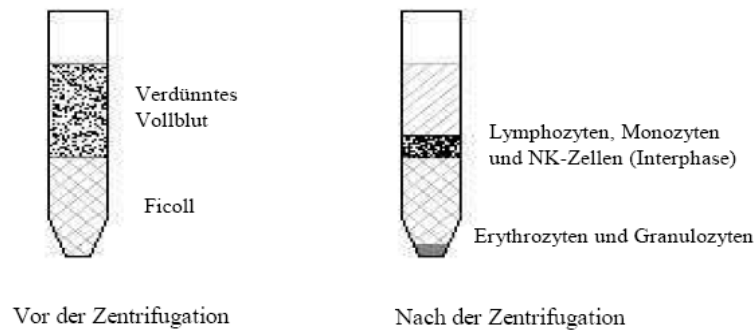
Zur Vorbereitung der Proben für die Cryokonservierung wurden zunächst 2 ml-Cryoröhrchen mit je 100 µl DMSO gefüllt. Bei der Passage der Zellen wurden pro Cryoröhrchen 900 µl FCS zum Suspendieren der Zellen verwendet. Die Zellsuspension wurde anschließend in die vorbereiteten Cryoröhrchen mit dem DMSO gefüllt und in einem Einfriercontainer, sofort bei -80 °C tiefgefroren. Der Einfriercontainer ermöglicht durch Isopropanol als Isolierflüssigkeit eine schrittweise Absenkung der Temperatur um 1 °C pro Minute. Am nächsten Tag wurden die Cryoröhrchen, ohne dabei aufzutauen, bis zur Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zum Revitalisieren der Zellen wurden die entsprechenden Cryoröhrchen aus dem Stickstofftank entnommen und unter der Sterilbank vorsichtig aufgetaut. Anschließend wurde der Inhalt der Cryoröhrchen in die vorbereiteten Kulturflaschen mit 10 ml Medium gegeben. Vor einer Selektion durch Antibiotika wurden die Zellen mindestens bis zur nächsten Passage zum Anwachsen in diesem Medium belassen.

### **2.5.4 Isolierung von mononukleären Zellen mittels Ficoll**

Die Aufreinigung von mononukleären Zellen (Lymphozyten & Monozyten) aus peripherem Blut oder Knochenmarksaspirat erfolgte mittels Ficoll-Gradienten durch isopyknische Dichtezentrifugation. Dabei kommt es zur Auftrennung von mononukleären Zellen, Erythrozyten, Granulozyten und toten Zellen. Dazu wurden 12,5 ml Ficoll-Lösung und 12,5 ml PBS in jeweils einem 50 ml Plastikröhrchen vorgelegt. Das periphere Blut wurde im PBS resuspendiert und vorsichtig auf die Ficoll-Lösung geschichtet, so dass sich zwei Phasen bildeten (siehe Abbildung 12). Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 35 min bei 400 x g ohne Bremse. Die entstandene Interphase enthielt die mononukleären Zellen und wurde mit einer serologischen Pipette abgenommen und in ein neues 50 ml

Plastikröhrchen überführt. Anschließend wurde die Zellsuspension mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und zum Waschen nochmals für 15 min bei 400 x g zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt, bevor die Zellen entweder für weitere Versuche eingesetzt oder cryokonserviert werden konnten.



**Abbildung 11 – Isolation von mononukleären Zellen mittels Ficoll.** Mit PBS verdünntes Blut wurde auf die Ficoll-Lösung überschichtet. Nach 35 min Zentrifugation bei 400 g finden sich die mononukleären Zellen in einer weißen Bande zwischen den Erythrozyten/Granulozyten (am Boden) und dem Plasma. (Modifiziert nach Breidenbach und Beevers, 1967)

## 2.6 Transfektionsverfahren

### 2.6.1 Elektroporation

Um eine ektope Expression von ABCA3 in den verwendeten Zelllinien zu erreichen, wurde eine Transfektion mittels Elektroporation durchgeführt. Bei dieser Transfektionsmethode werden Zellmembranen permeabel gemacht und somit die Aufnahme von DNA (v.a. Plasmid-DNA) in die zu transfizierenden Zellen ermöglicht. Zunächst wurden die Elektroporationsküvetten (4 mm, Biozym) auf Eis vorgekühlt und OptiMEM-Medium auf 37 °C vorgewärmt. Die Zellsuspension der zu transfizierenden Zellen wurde auf  $5 \times 10^6$  Zellen in 200  $\mu$ l OptiMEM eingestellt. Pro Elektroporationsansatz wurden zudem 300  $\mu$ l OptiMEM in einem Well einer 24-Well-Platte vorgelegt. Der Elektroporator (EasyjectT) wurde auf eine Spannung von 300 V, eine Kapazität von 150  $\mu$ F, einen Widerstand von 1540  $\Omega$  und eine Elektroporationsdauer von 231 ms eingestellt. Zur Elektroporation wurden 40  $\mu$ g Plasmid-DNA des pEGFP-N1+ABCA3-Vektors in einer Elektroporationsküvette vorgelegt, anschließend 200  $\mu$ l Zellsuspension zugegeben und die Elektroporation gestartet. Danach wurden die elektroporierten Zellen für 3 Stunden in dem vorgelegten OptiMEM-Medium inkubiert, bevor 500  $\mu$ l des sonst für die Kultivierung benutzten Mediums zugegeben wurden.

### 2.6.2 Lentivirale Transfektion mittels shRNA

Um einen stabilen Knockdown von ABCA3 bzw. SALL4 in den verwendeten Zelllinien und primären Zellen zu erreichen, wurde eine lentivirale Transfektion mittels shRNA (*short hairpin RNA*) durchgeführt.

### 2.6.3 Produktion der lentiviralen Partikel

Für die Produktion der lentiviralen Partikel wurden zunächst HEK293T-Zellen, mit einer Dichte von  $2,2 \times 10^5$  Zellen pro ml, in einem Volumen von 2,5 ml pro Well in 6-Well-Platten ausplattiert. Als Medium wurde DMEM mit 10 % FCS ohne Zusatz von Antibiotika verwendet. Nach Kultivierung für 24 h im Inkubator (37 °C, 5 %

CO<sub>2</sub>) erfolgte die eigentliche Transfektion, sofern eine Konfluenz der Zellen von 50 – 70 % erreicht war. Hierzu wurde pro Well ein Mix aus drei Plasmiden mit folgenden DNA-Mengen hergestellt:

Bezeichnung	Menge
pCMV-ΔR8.91	500 ng
pMD.G-VSV-G	50 ng
pLKO.1-GFP	500 ng
OPTI-MEM (Invitrogen)	zum Gesamtvolumen 30 µl

**Tabelle 7 – Plasmidmix**

Als Transfektionsreagenz wurde FuGene 6 (Roche) verwendet, welches die Plasmide mittels Liposomen-vermittelter Transfektion (Lipofektion) in die HEK293T-Zellen einbringt. Der Transfektionsansatz wurde pro Well wie folgt vorbereitet:

Bezeichnung	Menge
FuGene 6 (Roche)	4 µl
OPTI-MEM (Invitrogen)	zum Gesamtvolumen 16 µl

**Tabelle 8 – Transfektionsansatz**

Das FuGene 6 Reagenz wurde dabei tropfenweise zum OPTI-MEM hinzugegeben und durch leichtes Schwenken vermischt. Nach einer Inkubation von 5 min bei RT, wurde der vorbereitete Plasmidmix tropfenweise zum Transfektionsansatz gegeben und ebenfalls durch leichtes Schwenken vermischt. Nach einer erneuten Inkubationszeit von 20 - 30 min bei RT wurde der Transfektionsmix tropfenweise und gleichmäßig auf die HEK293T-Zellen gegeben. Da die HEK293T Zellen sehr anfällig für Störfaktoren sind erfolgte die Transfektion äußerst vorsichtig und zügig. Anschließend wurden die Zellen für 16 h im Brutschrank inkubiert (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Am dritten Tag wurde das Transfektionsmedium gegen je 2,5 ml DMEM mit 10 % FCS, 1 % Pen/Strep und 1 % Kälberserumalbumin (BSA) ausgetauscht und

die Zellen für 24 h zurück in den Inkubator gestellt. Durch den Zusatz von BSA kann die Ausbeute an viralen Partikeln im Überstand etwa verdoppelt werden. 40 Stunden nach der Transfektion konnte am 4. Tag zum ersten Mal der virale Überstand mit den darin enthaltenen viralen Partikeln gewonnen werden. Die HEK293T-Zellen wurden danach erneut mit 2,5 ml frischem DMEM Medium überschichtet. Zur Abtrennung von überschüssigen HEK293T-Zellen wurden die viralen Überstände 5 min bei 1250 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in E-Cups überführt und sofort verwendet oder für spätere Verwendung bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  weggefroren. Diese Prozedur wurde ebenso am darauffolgenden Tag durchgeführt und die HEK293T-Zellen anschließend verworfen.

### **2.6.4 Virale Transfektion der Zielzellen**

Der virale Überstand wurde im Verhältnis 1:1 mit dem jeweiligen Zellmedium vermischt und auf die Wells einer 24-Well-Platte mit einem Volumen von 1 ml pro Well verteilt. Zur verbesserten Bindung von Viruspartikeln an die Zielzellen wurde Polybrene mit einer Endkonzentration von  $10\text{ }\mu\text{g/ml}$  hinzugegeben. Anschließend folgte die Zugabe der Zielzellen mit einer Dichte von  $5 \cdot 10^5$  Zellen pro Well. Die virale Infektion der Zielzellen wurde mittels „*Spin Occulation*“ bei 2500 rpm für 2,5 h durchgeführt. Daraufhin wurden die Zellen vom Boden eines jeden Wells durch leichtes Auf- und Abpipettieren gelöst. Nach 6 Stunden Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen mit frischem Medium versetzt, regulär in Kultur genommen und 15 Stunden im Inkubator aufbewahrt. Am Folgetag konnte dann eine erneute Transfektion erfolgen. Hierzu wurden die Zellen abzentrifugiert, der Überstand verworfen und erneut mit einer Dichte von  $5 \cdot 10^5$  Zellen pro ml auf einer 24 Well Platte mit Medium, viralem Überstand (1:1) und Polybrene ( $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ ) eingesetzt. Nach der Transfektion wurden die Zellen, bis zu ihrer Verwendung, täglich abzentrifugiert und mit frischem Medium versorgt.



### 2.6.5 shRNA-Sequenz zum Knockdown von ABCA3

Bei den verwendeten Plasmiden für die lentivirale Transfektion handelte es sich um die Vektoren pLKO.1, pMDG-VSV-G sowie pCMVdR8.91 (*The RNAi Consortium TRC* <http://www.broadinstitute.org/rnai/trc>). Die lentiviralen Plasmide mit den jeweiligen shRNA-Sequenzen wurden als Bakterien-Glycerolstocks von Thermo Scientific, Open Biosystems geliefert und anschließend präpariert.

Zum Knockdown von ABCA3 wurde die folgende verifizierte shRNA-Sequenz des TRC Klons ID TRCN0000059339 in den pLKO.1-Vektor kloniert und für die Transfektion verwendet. Der Effizienz des Knockdowns wurde anhand von Western blots und Real-Time-PCR überprüft.

TRC clone ID (Bezeichnung)	Zielgen	shRNA-Sequenz (5' – 3')
TRCN0000059338 (shABCA3.38)	ABCA3	CCGG(GCTTGAAGATTCAGTCGGAAA)CTCGAG (TTTCCGACTGAATCTTCAAGC)TTTTTG
TRCN0000059339 (shABCA3.39)	ABCA3	CCGG(GCCCAGCTCATTGGGAAATTT)CTCGAG (AAATTTCCCAATGAGCTGGGCTTTTTG
TRCN0000021874 (shSALL4.74)	SALL4	CCGG(CCGACCTATGTCAAGGTTGAA)CTCGAG (TTCAACCTTGACATAGGTCGGTTTTT)
TRCN0000021875 (shSALL4.75)	SALL4	CCGG(GCAACATATTCGGATGCACAT)CTCGAG (ATGTGCATCCGAATATGTTGCTTTTT)

**Tabelle 9 – shRNA-Sequenzen und Zielgene der lentiviralen Plasmide**

### 2.6.6 MTT-Viabilitätsassay

Für die Viabilitätsbestimmung der verwendeten Zellen nach der Behandlung mit den unterschiedlichen Inhibitoren oder nach dem Knockdown von ABCA3 bzw. SALL4 wurden verschiedene MTT-Viabilitätstests durchgeführt (Denizot & Lang, 1986). Dafür wurden am Versuchstag  $5 \times 10^4$  Zellen pro Ansatz als Triplikate in einer 96-Well-Platte mit rundem Boden in 200  $\mu$ l Kulturmedium bzw. den entsprechenden Inhibitor-Konzentrationen inkubiert.

Es wurden die folgenden Inhibitoren, sowie Kombinationen daraus, verwendet: Imatinib, Dasatinib, Nilotinib, Indomethacin und Rapamycin (siehe Tabelle 4).

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden zu der Zellsuspension in der 96-Well-Platte 10  $\mu$ l MTT-Reagenz 1 (siehe Tabelle 10) pro Well pipettiert und die Zellen für 4 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze zentrifugiert (15 min, 2000 g) und der Überstand vorsichtig mit einer Mehrkanalpipette abgenommen. Das durch die Spaltung des Tetrazolinumringes durch Dehydrogenasen entstandene violette Formazan wurde mit einer sauren Isopropanol-Lösung (MTT-Reagenz 2) gelöst. Es wurden 200  $\mu$ l MTT-Reagenz 2 in jedes Well gegeben und bis zur vollständigen Auflösung der blauen Kristalle resuspendiert. Die Absorption des umgesetzten Farbstoffes wurde bei einer Wellenlänge von 540 nm und einem Referenzfilter von 655 nm im ELISA-Reader bestimmt.

<b>MTT-Reagenz 1</b> (10 ml)	0,05 g ad 10 ml	Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide PBS
<b>MTT-Reagenz 2</b> (100 ml)	33 ml 5 ml 62 ml	DMSO Ameisensäure Isopropanol

**Tabelle 10 – MTT-Reagenzien-Zusammensetzung**

### 2.6.7 Durchflusszytometrie (FACS)

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können sowohl Proteine, wie z.B. ABC-Transporter auf der Oberfläche mit Fluorochrom-markierten Antikörpern als auch ektop exprimierte Proteine innerhalb der Zelle mit GFP-Tag in Einzelzellen gemessen werden. Letzteres diente als Transfektionskontrolle der ektopen Expression innerhalb der Modellzelllinien. Für die FACS-Analysen wurden mindestens 10000 Zellen in FACS-Röhrchen überführt und bei 400 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in je 100 ml PBS aufgenommen. Als Kontrolle dienten untransfizierte Zellen und GFP-transfizierte Kontrollen.

Die Proben wurden auf dem FACScan gemessen und mit dem Programm CellQuest und WinMDI analysiert.

### 2.6.8 Bakterien

Für die Amplifikation von Plasmiden wurden folgende E. coli-Stämme verwendet:

Bakterienstamm	Wachstumsbedingungen	Firma
XL-1 blue, subcloning grade	37 °C	Stratagene
XL10-GOLD Ultracompetent Cells	37 °C	Stratagene
One Shot TOP10F <sup>+</sup> Chemically Competent	37 °C	Invitrogen

Tabelle 11 – Übersicht der verwendeten Bakterienstämme

Die transformierten Bakterien wurden bei 37 °C im Brutschrank auf LB-Agar-Platten kultiviert. Zur Herstellung des LB-Agars wurden 25 g LB Broth Base (Invitrogen) und 15 g Agar (Sigma) in 1 l ddH<sub>2</sub>O gelöst und anschließend autoklaviert. Nach dem Abkühlen des LB-Agars auf unter 50 °C wurde zur Selektion der Transformanten Carbenicillin (Roth) in einer Endkonzentration von 100 mg/l hinzugefügt.

Anschließend wurde der noch flüssige LB-Agar in 10 cm-Petrischalen gegossen und nach dem Aushärten bis zur Verwendung im Kühlraum bei 4 °C gelagert.

### 2.6.9 Zelllinien

Es wurden folgende eukaryotische Zelllinien verwendet:

Zelllinie	Charakteristika	Herkunft	Referenz
<b>HEK293T</b>	Humane Nierenzelllinie zur Lentivirus-Produktion (adhärent)	Cheong et al. 2006	<b>(Cheong et al., 2006; F. L. Graham et al., 1977)</b>
<b>HEK293-ABCA3/eGFP</b>	Humane Nierenzelllinie mit stabiler ABCA3-Expression (adhärent)	Cheong et al. 2006	<b>(Cheong et al., 2006)</b>
<b>HEK293A</b>	Humane Nierenzelllinie zur Produktion des Adenovirus Ad5F35 (adhärent)	Clontech, USA	<b>(Aiello et al., 1979; F. L. Graham et al., 1977)</b>
<b>HL-60</b>	Zelllinie einer akuten myeloischen Leukämie (nicht-adhärent)	DSMZ, Braunschweig	<b>(Gallagher et al., 1979)</b>
<b>BV-173</b>	Humane CML-Zelllinie in lymphatischer Blastenkrise (nicht-adhärent)	DSMZ, Braunschweig	<b>(Pegoraro et al., 1983)</b>
<b>K-562</b>	Humane CML-Zelllinie in Blastenkrise (nicht-adhärent)	DSMZ, Braunschweig	<b>(Lozzio &amp; Lozzio, 1975)</b>
<b>LAMA-84</b>	Humane CML-Zelllinie in Blastenkrise (nicht-adhärent)	DSMZ, Braunschweig	<b>(Seigneurin et al., 1987)</b>
<b>OP9</b>	Murine Stromazellen (adhärent)	DSMZ, Braunschweig	<b>(Nakano et al., 1994)</b>
<b>MO7</b>	Megakaryoblastische Zelllinie (nicht-adhärent)	DSMZ, Braunschweig	<b>(Avanzi et al., 1988)</b>

**Tabelle 12 – Übersicht der verwendeten eukaryotischen Zelllinien**

**2.6.10 Kulturmedien für die Zellkultur**

Zelllinie		Medium	Firma
HEK293T		DMEM, 1 % Gln, 1 % Pen/Strep, 10 % FCS	Invitrogen, Karlsruhe
HEK293+ABCA3/eGFP		DMEM, 1 % L-Gln, 1 % Pen/Strep, 10 % FCS + 800 µg/ml G-418	Invitrogen, Karlsruhe
HEK293T		DMEM, 1 % Gln, 1 % Pen/Strep, 10 % FCS	Invitrogen, Karlsruhe
OP9		Alpha-MEM, 1 % Gln, 1 % Pen/Strep, 20 % FCS 0,15 % Natriumbicarbonat	Invitrogen, Karlsruhe
BV-173	Wildtyp	RPMI-1640, 1 % Gln, 1 % Pen/Strep, 20 % FCS	Invitrogen, Karlsruhe
	shABCA3, shSALL4	+ 2 µg/ml Puromycin	
K-562	Wildtyp	RPMI-1640, 1 % Gln, 1 % Pen/Strep, 10 % FCS	Invitrogen, Karlsruhe
	shABCA3, shSALL4	+ 4 µg/ml Puromycin	
LAMA-84	Wildtyp	RPMI-1640, 1 % Gln, 1 % Pen/Strep, 20 % FCS	Invitrogen, Karlsruhe
	shABCA3, shSALL4	+ 4 µg/ml Puromycin	
MO7	Wildtyp	RPMI-1640, 1 % Gln, 1 % Pen/Strep, 20 % FCS, 1 % GM-CSF	Invitrogen, Karlsruhe
	+BCR-ABL	+ 400 µg/ml G-418	
HL60	Wildtyp	RPMI-1640, 1 % Gln, 1 % Pen/Strep, 10 % FCS	Invitrogen, Karlsruhe
	+BCR-ABL	+ 400 µg/ml G-418	
Medium zur Elektroporation		OptiMEM (ohne Zusätze)	Invitrogen, Karlsruhe
Medium zur lentiviralen Transfektion		DMEM, 1 % Gln, 0,1 % Pen/Strep, 10 % FCS, 1 % BSA	Invitrogen, Karlsruhe

Tabelle 13 – Übersicht der verwendeten Zellkulturmedien

### **2.6.11 Hitzeinaktiviertes FCS**

Das verwendete FCS (Sigma Aldrich) für die Zellkultur wurde zunächst für 30 min bei 56 °C im Wasserbad hitzeinaktiviert und anschließend steril filtriert.

### **2.6.12 Selektionsmedium**

Medien für stabil-transfizierte Zellen (vgl. Tabelle 13) enthielten zur Selektion von positiven Transfektanten zusätzlich G-418 oder Puromycin in den angegebenen Konzentrationen. Vor Verwendung der Zellen für experimentelle Zwecke wurden die Zellen für drei Passagen ohne Selektionsantibiotika inkubiert.

## 2.7 Molekularbiologische Methoden

### 2.7.1 RNA-Isolierung

Um die Expression eines bestimmten Gens in Zellen oder Geweben untersuchen zu können, wurde eine Isolierung von RNA durchgeführt. Dazu wurde das "RNeasy Mini Kit" (Fa. QIAGEN) verwendet.

Zunächst wurde die Zellsuspension aus der Kulturflasche entnommen, die Zellzahl bestimmt und anschließend auf ca.  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Danach wurde 1 ml dieser Zellsuspension in ein steriles Eppendorfgefäß überführt und für 5 min bei 300 g zentrifugiert; der Überstand wurde verworfen. Für die Lyse der Zellen wurde das Pellet zunächst mit 350 µl "RLT-Puffer" und 1 %  $\beta$ -Mercaptoethanol vermischt und gelöst. Zur Homogenisierung wurde das Lysats auf eine QIAshredder-Säule gegeben und für 2 min bei 10.000 g zentrifugiert. Anschließend folgte die Zugabe von 350 µl 70 %-Ethanol zu dem Ansatz, der daraufhin gut vermischt wurde. Danach wurde der Ansatz auf eine "RNeasy Spin-Säule" aufgetragen und zur Bindung der RNA an die Säule für 30 s bei 8.000 g zentrifugiert; der Durchfluss wurde verworfen. Es folgt die Zugabe von 350 µl "RW1-Puffer" auf die Säule und eine weitere Zentrifugation für 30 s bei 8.000 g, um die Säule zu waschen; der Durchfluss wurde verworfen.

Um mögliche Kontaminationen bei der RT-PCR durch genomische DNA zu vermeiden, wurde ein DNase-Verdau durchgeführt. Dabei wurde eine Lösung aus 70 µl "RDD-Puffer" und 10 µl des Enzyms "DNaseI" auf die Säule aufgetragen. Danach erfolgte eine Inkubation für 20 min bei RT. Anschließend wurde die Säule erneut mit 350 µl „RW1-Puffer“ gewaschen, um die DNase zu entfernen.

Der nächste Waschschrift wurde mit 500 µl "RPE-Puffer" durch Zentrifugation von 15 s bei 8.000 g durchgeführt; der Durchfluss wurde verworfen. Es folgte ein weiterer Waschschrift mit 500 µl "RPE-Puffer" und einer Zentrifugation von 2 min bei 10.000 g zum Trocknen der Membran; der Durchfluss wurde verworfen. Für die Elution wurde die Säule in ein anderes steriles und RNase-freies Eppendorfgefäß überführt und die Membran mit 30 µl sterilem ddH<sub>2</sub>O überschichtet. Die Elution erfolgte durch Zentrifugation bei 8.000 g für 1 min.

Anschließend wurde die Konzentration der RNA photometrisch bestimmt. Die RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei – 20 °C gelagert.

### **2.7.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die Konzentration von DNA oder RNA-Lösungen wurde im Nanodrop (Thermo Scientific) durch die photometrische Messung der Absorptionen bei 230 nm, 260 nm und 280 nm bestimmt. Dabei wurden die Quotienten  $OD_{260/280}$  und  $OD_{260/230}$  ermittelt, um die Reinheit der Nukleinsäuren zu überprüfen. Eine  $OD_{260}$  von 1,0 entspricht ca. 50 mg/ml doppelsträngiger und 40 mg/ml einzelsträngiger DNA bzw. RNA. Die Reinheit wurde aus dem Verhältnis von  $OD_{260}$  (Absorption der Nukleinsäurebasen) zu  $OD_{280}$  (Absorption der Dipeptidbindung) berechnet, wobei der Quotient zwischen 1,8 und 2 liegen sollte. Die Nukleinsäure-Lösungen wurden immer unverdünnt und direkt nach der Präparation im Nanodrop gemessen; ddH<sub>2</sub>O diente dabei als Leerwert.

### **2.7.3 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)**

Nach der RNA-Isolierung wurde die Methode der reversen Transkription angewendet, um die darin enthaltene mRNA in cDNA umzuschreiben. Dazu wurde das System SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) verwendet. Dabei wurde die RNA entweder direkt nach der RNA-Isolierung oder nach dem Auftauen auf Eis eingesetzt. Je nach Konzentration der RNA in den einzelnen Proben wurde entsprechend die Menge an RNA-Lösung vorgelegt und mit ddH<sub>2</sub>O auf 12 µl Volumen aufgefüllt. Die Menge der eingesetzten RNA sollte bei 1 µg RNA liegen. Zu der vorbereiteten RNA-Lösung wurden außerdem noch 1 µl dNTPs sowie 1 µl Random Primers gegeben, bevor die Ansätze zur Denaturierung der RNA für 5 min bei 65 °C im Thermocycler inkubiert wurden. Anschließend wurden die Ansätze auf Eis schnell heruntergekühlt und jeweils 5 µl pro Ansatz des vorbereiteten Mastermixes hinzugegeben. Der Mastermix setzte sich dabei wie folgt zusammen:



<b>Mastermix (1-facher Ansatz)</b>	
<b>5 x First-Strand-Buffer</b>	4 µl
<b>DTT (0,1 M)</b>	2 µl
<b>RT SuperScript II (200 U/µl)</b>	1 µl
<b>RNase Out-Inhibitor (40 U/µl)</b>	1 µl

**Tabelle 14 – Mastermix für die reverse Transkription**

Anschließend wurden die Ansätze zurück in den Thermocycler gegeben und das Programm für die Reverse Transkription gestartet. Dieses Programm beinhaltete folgende Schritte:

<b>Thermocycler-Programm</b>	
<b>50 min</b>	42 °C
<b>15 min</b>	72 °C
<b>Pause</b>	4 °C

**Tabelle 15 – PCR-Programm im Thermocycler**

Nach Ablauf des Thermocycler-Programms wurden die Ansätze herausgenommen und bis zur weiteren Verwendung in PCR- bzw. Real-Time-PCR-Reaktionen bei 4 °C für kurzzeitige bzw. -20 °C für langfristige Lagerung aufbewahrt.

#### **2.7.4 Polymerase-Kettenreaktion zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten**

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine molekularbiologische Methode, mit der kleinste Mengen definierter Nukleinsäureabschnitte, die von bekannten Sequenzen flankiert werden, enzymatisch amplifiziert werden können. Dabei werden zwei synthetische Oligonukleotide (sense- und antisense-Primer) verwendet, die zu einem der beiden DNA-Stränge komplementär sind, und außerhalb der Zielsequenz im flankierenden DNA-Bereich hybridisieren.

Man verwendet dazu einen sense-Primer in 3' → 5'-Richtung und einen anti-sense-Primer in 5' → 3'-Richtung, welche freie 3'OH-Enden liefern, an denen die DNA-Polymerase einzelne Nukleotide kovalent anfügen kann. Die DNA-Polymerase ist ein Enzym aus der Gruppe der Transferasen, die mit einer

Einzelstrang-DNA als Vorlage aus Desoxyribonukleotiden einen komplementären neuen DNA-Einzelstrang in 5' → 3'-Richtung synthetisiert. Als Startpunkt für die Synthese des komplementären Stranges dienen dabei die doppelsträngigen Hybridisierungsstellen des Primers. Die Amplifikation wird erreicht durch vielfach wiederholte Zyklen, die aus Denaturierung der DNA, Hybridisierung der Oligomere (*Annealing*) und Synthese des komplementären Stranges (*Elongation*) bestehen. Dabei wird der Sequenzabschnitt zwischen den flankierenden Oligonukleotiden exponentiell amplifiziert. Bei Verwendung der thermostabilen DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (sog. Taq-Polymerase), kann der Zyklus oft wiederholt werden, ohne dass nach jeder DNA-Denaturierung neues Enzym hinzugegeben werden muss.

Als Negativkontrolle wurde jeweils ein Ansatz ohne DNA mit entsprechend mehr ddH<sub>2</sub>O verwendet.

Die PCR-Reaktion wurde in einem Thermocycler durchgeführt. Dabei wurde ein PCR-Programm ausgewählt, das eine Beheizung der Reaktionsgefäßdeckel ermöglichte. Somit konnten Konzentrationsschwankungen der Proben während der Reaktion durch aufsteigendes Kondenswasser vermieden werden.

Das PCR-Programm des Thermocyclers beinhaltet dabei folgende Schritte:

<b>Mastermix (1-facher Ansatz)</b>	
<b>10 x PCR-Puffer</b>	<b>5 µl</b>
<b>MgCl<sub>2</sub> (50 mM)</b>	<b>2 µl</b>
<b>dNTPs (10 mM)</b>	<b>1 µl</b>
<b>forward Primer (10 µM)</b>	<b>1 µl</b>
<b>reverse Primer (10 µM)</b>	<b>1 µl</b>
<b>Taq-Polymerase (5 U/µl)</b>	<b>1 µl</b>
<b>+ 2 µl cDNA</b>	
<b>+ 37 µl ddH<sub>2</sub>O</b>	

**Tabelle 16 – Mastermix für PCR**

Thermocycler-Programm		
3 min	94 °C	
45 s	94 °C	35 Zyklen
30 s	55 °C	
90 s	72 °C	
10 min	72 °C	
Pause	4 °C	

Tabelle 17 – Einstellungen Thermocycler für ABCA3-PCR

### 2.7.5 Quantitative Realtime-PCR (Taqman)

Die quantitative Genexpressionsanalyse erfolgte mittels SYBR<sup>®</sup> Green (QIAGEN) in einer Taqman Realtime-PCR-Reaktion.

Die Quantifizierung wurde mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen während eines PCR-Zyklus durchgeführt. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der amplifizierten PCR-Produkte zu. Die Quantifizierung der PCR-Produkte wurde unter Nutzung des SYBR<sup>®</sup> Green (QIAGEN) durchgeführt. Dieser Fluoreszenzfarbstoff lagert sich in die DNA ein (interkaliert) bzw. bindet an doppelsträngige DNA. Somit ist die Messung der DNA-Amplifikation in Echtzeit möglich. Zur Überprüfung ob es sich bei der doppelsträngigen DNA um ein amplifiziertes Produkt handelt, bedient man sich der Schmelzkurvenanalyse. Dazu wird die amplifizierte DNA wieder aufgeschmolzen, indem die Temperatur langsam kontinuierlich erhöht wird (50°C -> 95°C). Bei einer für das Fragment spezifischen Schmelztemperatur wird der Doppelstrang wieder ein einzelsträngiges Molekül. Dabei wird der Fluoreszenzfarbstoff SYBR<sup>®</sup> Green freigesetzt und es wird eine Fluoreszenzabnahme registriert.

Für die Quantifizierung wurde das „house keeping“ Gen  $\beta$ -Aktin für jede Probe mitgemessen. Als Eichgerade wurde für ABCA3 eine Verdünnungsreihe ( $10^{-2}$  bis  $10^{-9}$ ) vom ABCA3-Plasmid (pEGFP-N1+ABCA3) und für  $\beta$ -Aktin von cDNA der Zelllinie HL-60 hergestellt, die als Standardkurven zur quantitativen Bestimmung der in den Proben gemessenen Gen-Transkripte dienen sollte. Jede Probe wurde als Duplikat gegen das „Gene of Interest“ (ABCA3) und gegen das „house keeping“ Gen ( $\beta$ -Aktin) aufgetragen. Als Negativkontrolle wurde ddH<sub>2</sub>O für beide Gene mitgeführt. Für die jeweiligen Ansätze von ABCA3 und Aktin wurde je ein

Mastermix (vgl. **Tabelle 18** – Mastermix für Real-Time quantitative PCR) mit den spezifischen Primern angesetzt. Vom jeweiligen Mastermix wurden 10 µl in eine 384-Well-Platte mit 0,5 µl der jeweiligen cDNA-Probe pipettiert und die Platte mit einer Folie überzogen. Die Platte wurde kurz anzentrifugiert und in den Taqman-Cycler gestellt.

Mastermix (einfacher Ansatz)	
SYBR® Green	5 µl
<i>forward</i> Primer (10 µM)	0,3 µl
<i>reverse</i> Primer (10 µM)	0,3 µl
dd <sub>2</sub> O	3,4 µl
+ 1 µl cDNA	

**Tabelle 18 – Mastermix für Real-Time quantitative PCR**

Thermocycler			
<b>Stage 1</b>	2 min	50 °C	
<b>Stage 2</b>	10 min	95 °C	
<b>Stage 3</b>	15 s	95 °C	40 Zyklen
	45 s	58 °C	
	1 min	72 °C	
<b>Stage 4</b>	15 s	95 °C	
	15 s	60 °C	
	15 s	95 °C	

**Tabelle 19 – Einstellungen Taqman-Cycler**

Die Analyse erfolgte mittels der SDS 2.1 Software (ABI). Hiermit lässt sich die Zykluszahl (CT-Wert = *threshold value* = „Schwellenwert“) bestimmen, bei der sich das Fluoreszenzsignal gerade deutlich vom Reaktionshintergrund abhebt. Führt man parallel zur eigentlichen Messung die gleiche Reaktion mit bekannten cDNA-Matrizenmengen (z.B. mit „*house keeping*“ Gen) durch, erhält man eine Standardkurve mit CT-Werten, die einen Rückschluss auf die Produktmengen zulassen. Für die quantitative Analyse wurde dabei die  $\Delta$ CT-Methode genutzt:

$$\text{Relative Menge} = 2^{-[(C_{T, \text{ABCA3-Probe}} - C_{T, \text{Aktin-Probe}}) - (C_{T, \text{ABCA3-Kalibrator}} - C_{T, \text{Aktin-Kalibrator}})]}$$

### **2.7.6 Transformation kompetenter *E. coli* mit Plasmid-DNA**

Für die Transformation wurden 100 µl kompetente Bakterien (vgl. Tabelle 5) auf Eis aufgetaut und mit 1 µg Plasmid-DNA für 30 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend einem Hitzeschock für 30 s im Wasserbad bei 42 °C ausgesetzt und danach für weitere 2 min auf Eis inkubiert. Dann wurden die Bakterien mit 500 µl SOC-Medium (Raumtemperatur) für 1 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Zur Selektion der positiven Transformanten wurden 100 µl dieser Bakteriensuspension auf Carbenicillin-haltige LB-Agar-Platten ausgestrichen. Diese Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Am Folgetag konnten mit einer sterilen Pipettenspitze einzelne Kolonien der ausgewachsenen positiven Transformanten von der Platte gepickt und in 5 ml Carbenicillin-haltigem LB-Medium für weitere 24 h kultiviert werden. Diese Vorkultur diente zum Anlegen einer größeren Hauptkultur mit ca. 200 ml Volumen für die Maxi-Plasmidpräparation.

### **2.7.7 Anlegen einer *E. coli*-Glycerinkultur**

Vorkulturen, die eine OD<sub>600</sub> von mehr als 1,0 in LB-Medium zeigten, wurden 15 % Glycerin zugesetzt und bei – 80° C aufbewahrt. Aus der Glycerinkultur kann direkt eine Kultur zur Präparation von Plasmid-DNA angeimpft werden

### **2.7.8 Klonale Plasmidamplifikation mit Hilfe von Qiagen® Produkten**

(Qiagen® Handbook, 8/2003)

Die Plasmidamplifikation wurde nach Vorschrift des Herstellers unter Verwendung der mitgelieferten Puffer P1, P2, P3, N3, PE, PB, QBT, QC und QT durchgeführt.

### **2.7.9 Mini-Präparation von Plasmid-DNA**

Zur Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterien im Rahmen der Subklonierungen zur Herstellung viraler Vektoren (vgl. Abschnitt 2.1.15) wurde das „Plasmid Mini-Kit“ (QIAGEN) verwendet.

Nach der Transformation und der anschließenden Kultivierung der Bakterienkulturen in Antibiotika-haltigem LB-Medium wurden die Kulturen zunächst in ein 15 ml-Zentrifugationsröhrchen überführt und für 10 min bei 8.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 150 µl Puffer P1 resuspendiert. Die Suspension wurde in ein 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Zur Lyse der Bakterien wurden 250 µl Puffer P2 zugegeben, mehrmals vorsichtig invertiert, bevor dann die alkalische Lyse durch das Zugeben des Puffers P3 und mehrmaliges vorsichtiges Invertieren gestoppt wurde.

Genomische DNA und Detritus bildeten einen flockigen Bestandteil der Suspension, der für 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert wurde. Der Überstand enthält die amplifizierte Plasmid-DNA. Diese wurde in eine Qiapräp-Säule gegeben, für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Zum Waschen wurden 750 µl PE Puffer auf die Säule gegeben, für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und die Säule erneut für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert.

Zur Elution der DNA wurde die Qiapräp-Säule auf ein neues 1,5 ml-Eppendorf-Cup gesetzt. Es wurden 30-50 µl 70 °C-warmes ddH<sub>2</sub>O in die Säule gegeben und nach 1 min Inkubation erfolgte eine abschließende Zentrifugation für 1 min bei 13.000 rpm.

Die quantitative Messung der eluierten DNA erfolgte photometrisch, wie in Abschnitt 2.7.2 beschrieben.

### **2.7.10 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA**

Die Vorkultur aus Abschnitt 2.7.6 wurde in 200 ml LB-Medium mit 100 mg/ml Carbenicillin über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Bakteriensuspension für 15 min bei 6.000 g und 4 °C pelletiert und das Pellet in 10 ml eiskaltem Puffer P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 10 ml Puffer

P2 wurde das Gemisch fünfmal invertiert und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 10 ml Puffer P3 zugegeben, das Gemisch fünfmal invertiert, auf eine unten verschlossene QIAfilter Maxi Cartridge gegeben und darin für 10 min inkubiert. In dieser Zeit wurden ein QIAGEN-tip 500 auf ein 50 ml-Falconröhrchen gesetzt und mit 10 ml QBT-Puffer inkubiert. Nach Abschluss der Inkubation wurde die Plasmid-DNA aus der QIAfilter Maxi Cartridge mit einem Kolben durch den Filter in das QIAGEN-tip 500 gepresst. Die Suspension wurde durch den Filter des QIAGEN-tip 500 laufen gelassen, so dass die Plasmid DNA an den Filter binden konnte. Nach anschließendem zweimaligem Waschen mit je 30 ml QC-Puffer wurde das QIAGEN-tip 500 auf ein neues 50 ml-Falcon-Röhrchen gesetzt und die DNA mit 15 ml QF-Puffer aus dem Filter eluiert. Der so gewonnenen Plasmid-DNA wurden 10,5 ml Isopropanol hinzugefügt und das Gemisch anschließend bei 15.000 g und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Das dadurch entstandene Pellet wurde nach Entfernung des Überstandes mit 5 ml 70% Ethanol gewaschen und erneut bei 15.000 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Nach sicherer Entfernung von Ethanol-Resten und Lufttrocknen des Pellets (nicht länger als 5 – 10 min bei RT) und konnte die pelletierte Plasmid-DNA abschließend in mindestens 100 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst, in ein 1,5 ml-Eppendorf Cup überführt und bei -20°C weggefroren werden. Zur Messung der DNA-Konzentration wurde die oben beschriebene Photometrische Methode benutzt.

### **2.7.11 Spaltanalyse von DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen**

Für die Spaltanalyse von DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen wurde das von New England Biolabs vertriebene System, bestehend aus Enzymen und einem 10-fach konzentrierten Puffer, benutzt. Die Aktivität der Restriktionsendonukleasen wird in Units (U) angegeben. Dabei entspricht eine Unit der Menge an Enzym, die für die vollständige Verdauung von 1 µg λ-DNA in einer Stunde benötigt wird. Um sicherzustellen, dass der Verdau quantitativ abläuft, wurden die Enzymmengen und die Inkubationszeit verdoppelt. Der Ansatz für die Spaltanalyse bestand aus folgenden Komponenten:

Menge	Substanz
0,5 µg	DNA
2 µl	zu dem Enzym passender 10-fach Puffer
1 U	Restriktionsendonukleasen
ad 20 µl	ddH <sub>2</sub> O.

**Tabelle 20 – Reaktionsansatz Spaltanalyse**

Der Ansatz wurde 2 h bei 37 °C inkubiert, anschließend ein Aliquot zur Analyse in einem Agarosegel elektrophoretisch getrennt.



### 2.7.12 Auftrennen der DNA in Agarosegelen

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe wurden Agarosegele verwendet. Die für die Gele benutzte Konzentration an Agarose richtete sich nach der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente und ist in folgender Tabelle aufgeführt:

Agarosekonzentration (%)	Trennbereich (kb)
0,6	20 – 1
0,9	7 – 0,5
1,2	6 – 0,4
1,5	4 – 0,2
2,0	3 – 0,1

**Tabelle 21 – Trennbereiche von Agarosegelen**

**Probenpuffer (LP IV)** 0,25 % (w/v) Bromphenolblau  
40 % (w/v) Saccharose in TBE

Die erforderliche Agarose-Menge wurde in 300 ml TBE aufgeköcht (Mikrowelle) und nach Abkühlen auf ca. 50 °C mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration 0,5 µg/ml). Die Agarose wurde in eine Gelform gegossen und bei RT abgekühlt. Das erstarrte Gel wurde in die Elektrophoresekammer überführt, die Proben wurden mit 6-fachem Probenpuffer auf 1-fach konzentrierten Probenpuffer eingestellt und in die vorgeformten Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde mit einer Spannung von 80 V durchgeführt. Durch das in die DNA interkalierende Ethidiumbromid werden die DNA-Fragmente unter UV-Licht als Banden sichtbar und das Gel konnte auf dem UV-Transilluminator analysiert werden. Zur Dokumentation wurde das Agarosegel auf dem UV-Transilluminator mit einem Videosystem aufgenommen und ein Ausdruck des Bildes erstellt.

### 2.7.13 DNA-Aufreinigung aus Agarosegelen

Die Aufreinigung von DNA aus einem Agarosegel erfolgte nach dem „QIAEX II Agarose Gel Extraction Protocol“ der Firma QIAGEN.

Unter UV-Beleuchtung wurde die gewünschte Bande mit der enthaltenen DNA aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein 1,5 ml-Eppendorf Cup gegeben.

Dem Gel wurde das dreifache Volumen vom Puffer QX1 und das doppelte Volumen ddH<sub>2</sub>O zugegeben. Das Gemisch wurde durch 30 s langes Vortexen resuspendiert und anschließend für 12 min im Wasserbad bei 50 °C inkubiert. Während dieser Inkubation wurde das Gemisch alle 2 min kurz gevortext. Hierbei musste beachtet werden, dass das Gemisch seine gelbe Farbe beibehielt, was den benötigten pH  $\leq$  7,5 anzeigte. Bei einer Verfärbung in Orange oder Violett, was einen pH-Wert  $>$  7,5 anzeigte, wurden 10  $\mu$ l 3 M Natrium-Acetat, pH 5 zugegeben, bis sich eine gelbe Farbe einstellte. Nach Abschluss der Inkubation im Wasserbad wurde die Probe bei 13.000 rpm in der Tischzentrifuge (Eppendorf) für 30 s zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet anschließend einmal mit 500  $\mu$ l vom Puffer QX1 und zweimal mit 500  $\mu$ l vom Puffer PE gewaschen. Nach einer abschließenden Zentrifugation bei 13.000 rpm wurde das Pellet für 15 min an der Luft getrocknet, bis ein trockenes weiße Pellet im Eppendorf-Cup zeigte. Um die DNA aus dem getrockneten Salz zu lösen, wurde das Salz in 20  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O resuspendiert und für 5 min im Wasserbad bei 50 °C inkubiert. Die homogene Lösung wurde dann bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand mit der enthaltenen DNA abgenommen und in ein frisches Eppendorf-Cup gegeben. Um die Ausbeute zu maximieren wurde dieser Schritt ein zweites Mal wiederholt. Abschließend erfolgte die photometrische Quantifizierung der eluierten DNA.

## 2.8 Präparation von Mikrovesikeln

Um die vesikuläre Sekretion des Tyrosinkinase-Inhibitors Imatinib untersuchen zu können, wurden Experimente zur Isolierung und Präparation von Mikrovesikeln aus dem Überstand der jeweils untersuchten Zellen durchgeführt.

Dazu wurden die Zellen zunächst mit einer Zellzahl von  $5 \times 10^7$  Zellen in 30 ml des jeweiligen Kulturmediums inkubiert. Die Zusammensetzung des Mediums erfolgte entsprechend den Kulturbedingungen der jeweiligen Zellen (s. Tab. 8), allerdings wurde dazu ausschließlich Medium mit Vesikel-freiem FCS verwendet, um die Ergebnisse unabhängig vom natürlichen Vesikelanteil im FCS beurteilen zu können. Das Vesikel-freie FCS wurde über Nacht bei 100.000 U/min zentrifugiert und der Überstand nach Sterilfiltration für das Ansetzen des Kulturmediums verwendet.

Die Zellen wurden für die Produktion der Mikrovesikel in allen Versuchen für 48 h inkubiert. Je nach Versuchsansatz wurden unterschiedliche Inhibitoren hinzugefügt, um Veränderungen in der Mikrovesikel-Bildung beobachten zu können.

Am Ende der Inkubation wurden zunächst die Zellen aus den Kulturflaschen entnommen und durch Zentrifugation vom Überstand getrennt (5 min, 1.000 g). Die Zellpellets wurden bei - 20 °C weggefroren und bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Der Überstand wurde für die Abtrennung von Zelldebris erneut für 20 min bei 3.000 g zentrifugiert; das Pellet wurde verworfen. Der Überstand wurde nun mittels Ultrazentrifugation (45 min, 10.000 g) erneut zentrifugiert, um die Mikrovesikel zu pelletieren. Das Mikrovesikel-Pellet wurde mit 1 ml PBS gründlich aus den Zentrifugenröhrchen gewaschen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Um die Mikrovesikel zu waschen, wurde die Suspension zentrifugiert (1 h, 13.000 g). Anschließend wurde das Pellet für die weitere Verwendung im Western blot in NP40-Lysepuffer aufgenommen; der Überstand wurde verworfen.

Für den Nachweis der Mikrovesikel und zur Untersuchung ihrer Zusammensetzung wurden die Proteine aus den Mikrovesikellysaten im Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen vesikuläre bzw. lysosomale Markerproteine detektiert.

## **2.9 Statistische Analysen**

### **2.9.1 Mehrfaktorielle Varianzanalyse Two-Way ANOVA**

Die mehrfaktorielle Varianzanalyse Two-Way ANOVA (engl. *analysis of variances*) erlaubt die statistische Analyse der Auswirkungen zweier voneinander unabhängigen Variablen in verschiedenen Abstufungen auf das Ergebnis eines Experiments. Sie fand u.a. Verwendung bei der statistischen Überprüfung der Viabilitätsassays an Zellen mit und ohne ABCA3 nach der Inkubation mit verschiedenen Dosen eines Zytostatikums. Es konnte hierbei der Effekt der ABCA3-Expression (1. Variable) und des Zytostatikums (2. Variable) geprüft werden. Zur Berechnung wurde die Software Graph Pad Prism®, Version 4.0 der Firma MacKiev verwendet.

### **2.9.2 Einfaktorielle Varianzanalyse One-Way-ANOVA**

Die einfaktorielle Varianzanalyse One-Way ANOVA (engl. *analysis of variances*) erlaubt die statistische Analyse der Auswirkungen einer unabhängigen Variablen in verschiedenen Abstufungen auf das Ergebnis eines Experiments. Sie fand u.a. Verwendung bei der statistischen Überprüfung der ABCA3-Expression an primären CML-Zellen unterschiedlicher Patientengruppen. Es konnte hierbei der Effekt des unterschiedlichen CML-Stadiums auf die ABCA3-Expression geprüft werden. Zur Berechnung wurde die Software Graph Pad Prism®, Version 4.0 der Firma MacKiev verwendet.

### **2.9.3 t-Test**

Der t-Test ist eine Gruppe von Hypothesentests mit t-verteilter Testprüfgröße. Man unterscheidet dabei zwischen dem Einstichproben-t-Test und dem Zweistichproben-t-Test. Bei dem Einstichproben-t-Test wird anhand des Mittelwertes einer Stichprobe geprüft, ob der Mittelwert einer Grundgesamtheit sich signifikant von einem vorgegebenen Sollwert unterscheidet. Dabei wird vorausgesetzt, dass die Daten der Stichprobe einer normalverteilten Grundgesamtheit entstammen. Bei dem Zweistichproben-t-Test wird anhand der Mittelwerte zweier Stichproben überprüft, ob die Mittelwerte zweier

Grundgesamtheiten voneinander verschieden sind. Der t-Test für zwei voneinander unabhängige Stichproben (engl. *unpaired*) prüft, ob die Mittelwertunterschiede zwischen zweier Grundgesamtheiten mit der gleichen unbekanntem Standardabweichung voneinander verschieden sind. Der t-Test wurde u.a. bei der Expressionsanalyse verwendet, um entscheiden zu können, ob die gemessenen Werte signifikant unterschiedlich bzw. größer oder kleiner als die Kontrollen sind.

### **2.10 Patientenproben und Ethik**

Für die Untersuchungen an primären Zellen wurden Zellproben von an CML erkrankten Patienten verwendet. Die Zellproben stellten archiviertes Material, das zu diagnostischen Zwecken entnommen und die andernfalls verworfen worden wären. Die Patienten waren im Klinikum Göttingen nach Therapieprotokollen einheitlich behandelt worden. Die Studie war der Ethik-Kommission der Universitätsmedizin Göttingen vorgelegt und keine Einwände erhoben worden.

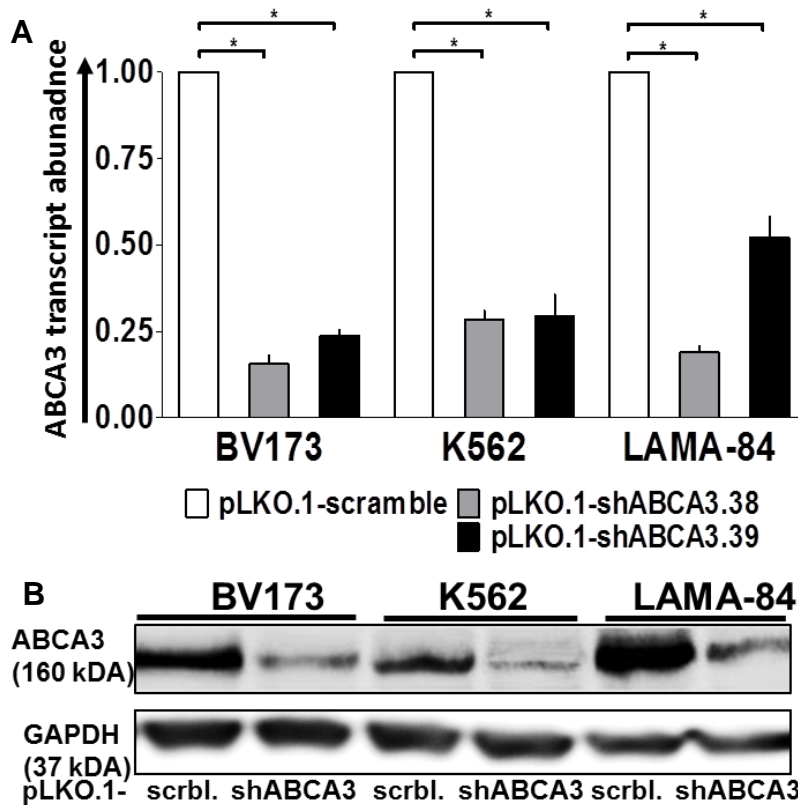
## 3 Ergebnisse

### 3.1 ABCA3 schützt CML-Zellen vor TKI-vermittelter Zytotoxizität

In den Vorarbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass der lysosomale Transporter ABCA3 in myeloischen Leukämien endogen hoch exprimiert vorkommt. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass der Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib in den CML-Stammzellen intrazellulär sequestriert wird, was die Suszeptibilität der leukämischen Zellen gegenüber den zytotoxischen Effekten von Imatinib beeinflusst hat (Chapuy et al., 2008; Chapuy et al., 2009). Die Ergebnisse der Vorarbeiten führten uns zu der Fragestellung, in welchem Ausmaß die ABCA3-Expression eine Rolle bei der Resistenz von CML-Zellen gegenüber der Therapie mit Tyrosinkinase-Inhibitoren spielt und wie man die Erkenntnisse über die Resistenz zugunsten einer besseren Behandlung der CML nutzen kann.

#### 3.1.1 Lentiviraler Knockdown von ABCA3 mittels shRNA

Um die Bedeutung von ABCA3 in CML-Zellen besser untersuchen zu können, verwendeten wir die Methode des shRNA-vermittelten lentiviralen Knockdowns von ABCA3. Auf diese Weise konnten wir die ABCA3-Expression in den BCR-ABL-positiven CML-Zelllinien BV173, K562 und LAMA-84 nach lentiviraler Transfektion reduzieren und potentielle Effekte an diesen Zelllinien direkt untersuchen. Aufgrund der schweren Transfizierbarkeit von Suspensionszelllinien mittels siRNA durch Elektroporation oder Nukleofektion wurde das lentivirale Transfektionssystem pLKO.1 (Open Biosystems) etabliert. Somit wurde ein stabiler Knockdown von ABCA3 bei allen verwendeten Zelllinien sowie primären Zellen erzielt, und durch den Selektionsmarker Puromycin homogene ABCA3-Knockdown Zelllinien erreicht. Die Transfektion wurde zur Kontrolle parallel mit zwei unterschiedlichen ABCA3-shRNA-Konstrukten (pLKO.1-shABCA3.38 und pLKO.1-shABCA3.39) sowie einer Negativkontrolle (pLKO.1-scramble) durchgeführt (vgl. **Tabelle 9**). Zur Überprüfung des erfolgreichen Knockdowns wurde die ABCA3-Expression anschließend mittels quantitativer Real-Time-PCR und SDS-PAGE bzw. Western blot bestimmt.



**Abbildung 12 – Expression von ABCA3 nach lentiviralem Knockdown. (A)** Die ABCA3-Expression der Zelllinien mit ABCA3-Knockdown wurde zunächst auf die Expression von  $\beta$ -Aktin normalisiert und auf die Expression der jeweiligen Transfektionskontrolle (pLKO.1-scramble) bezogen. Alle Zelllinien zeigten bei beiden shRNA-Konstrukten eine starke Reduktion der ABCA3-Expression. \* signifikant ( $p < 0,05$  t-Test, unpaired, two-tailed). **(B)** Das ABCA3-Protein wurde mittels Anti-hABCA3-Antikörper (Kaninchen, 1:2000) (Inangaki et al. 2005) detektiert. Als Ladekontrolle diente die Detektion von Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) mittels Anti-GAPDH-Antikörper (Maus, 1:500) (Santa Cruz).

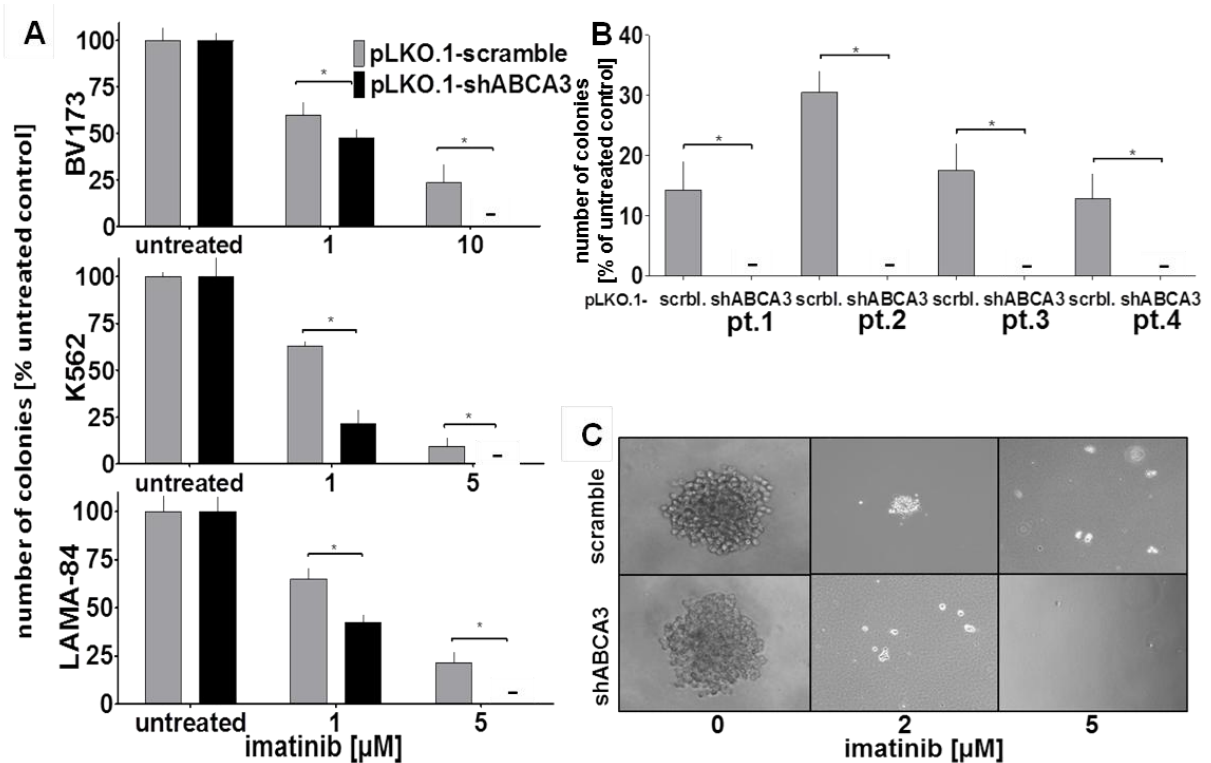
Alle drei Zelllinien zeigten nach der lentiviralen Transfektion bei beiden shRNA-Konstrukten eine starke Reduktion der ABCA3-Expression. Die verbleibende ABCA3-Expression lag zwischen 20 und 30 % (pLKO.1-shABCA3.38) bzw. zwischen 25 und 50 % (pLKO.1-shABCA3.39). Da der Knockdown von ABCA3 mit pLKO.1-shABCA3.38 bei allen Zelllinien am effizientesten war, wurden die so transfizierten Zellen für weitere Experimente verwendet. Außerdem wurde die Expression nach dem Knockdown von ABCA3 auf Proteinebene mittels Western Blot überprüft. Die Immundetektion der Proteine aus Lysaten der Zelllinien mit ABCA3-Knockdown bzw. der Kontrollzelllinien wurden in einer SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und geblottet. Auch hier zeigte sich in allen Zelllinien eine starke Reduktion von ABCA3 auf Proteinebene.

### **3.1.2 ABCA3-Knockdown vermindert Klonogenität**

Die Inhibition der BCR-ABL-Tyrosinkinase durch spezifische Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) ist die wichtigste Komponente bei der erfolgreichen Therapie für die Mehrzahl der CML-Patienten. Nach dem Absetzen der Medikamente oder bei Auftreten von resistenzvermittelnden Mutationen kommt es zur klonalen Proliferation, ausgehend von einer kleinen Zellfraktion, die im Knochenmark der CML-Patienten unter der Primärtherapie persistieren und somit zum Fortschreiten der Erkrankung führen kann. Das Auftreten eines Rezidivs ist das Hauptproblem bei der Behandlung von Tumorerkrankungen und erfordert im Falle der CML eine lebenslange Therapie mit Tyrosinkinase-Inhibitoren, um einen Rückfall der Erkrankung zu verhindern.

Um die klonale Proliferationsfähigkeit (Klonogenität) der CML-Zellen zu untersuchen, wurden daher Proliferationsassays mit den CML-Zelllinien bzw. primären Zellen von CML-Patienten mit ABCA3-Knockdown im Vergleich zu Zellen mit normaler ABCA3-Expression während der Behandlung mit verschiedenen Tyrosinkinase-Inhibitoren (Imatinib, Nilotinib und Dasatinib) durchgeführt. Nach dem lentiviralen Knockdown von ABCA3 wurden die Zelllinien BV173, K562 und LAMA-84 in Kulturschalen mit Methylcellulose-Medium ausgesät und bei unterschiedlichen Imatinib-Konzentrationen (1 – 10  $\mu$ M) inkubiert. Nach 14 Tagen wurde das Wachstum der Kolonien bestimmt. Das Kolonienwachstum wurde ebenso bei primären CD34+ Zellen von CML-Patienten überprüft, in denen ABCA3 ebenfalls durch lentiviralen Knockdown reduziert wurde. In allen Ansätzen wurde die jeweilige Transfektionskontrolle (pLKO.1-scramble) zum Vergleich parallel mitgeführt.





**Abbildung 13 – Klonogenität von CML-Zellen nach ABCA3-Knockdown. (A und B) Die 3 CML-Zelllinien und primäre CD34-positive Zellen von 4 CML-Patienten mit ABCA3-Knockdown (pLKO.1-shABCA3) bzw. Transfektionskontrollen (pLKO.1-scramble) wurden in Methylcellulose für 14 d unter Imatinib-Behandlung (1 – 10 μM) inkubiert. Anschließend wurden die Kolonien ausgezählt und auf die Kolonienzahl der unbehandelten Kontrollen bezogen. \* signifikant ( $p < 0,05$ ) (A) Two-Way ANOVA mit Bonferroni Post-Test. (B) t-Test, unpaired, two-tailed. (C) Lichtmikroskopische Aufnahme der Kolonien von K562-Zellen nach ABCA3-Knockdown bzw. Transfektionskontrolle unter Imatinib-Behandlung**

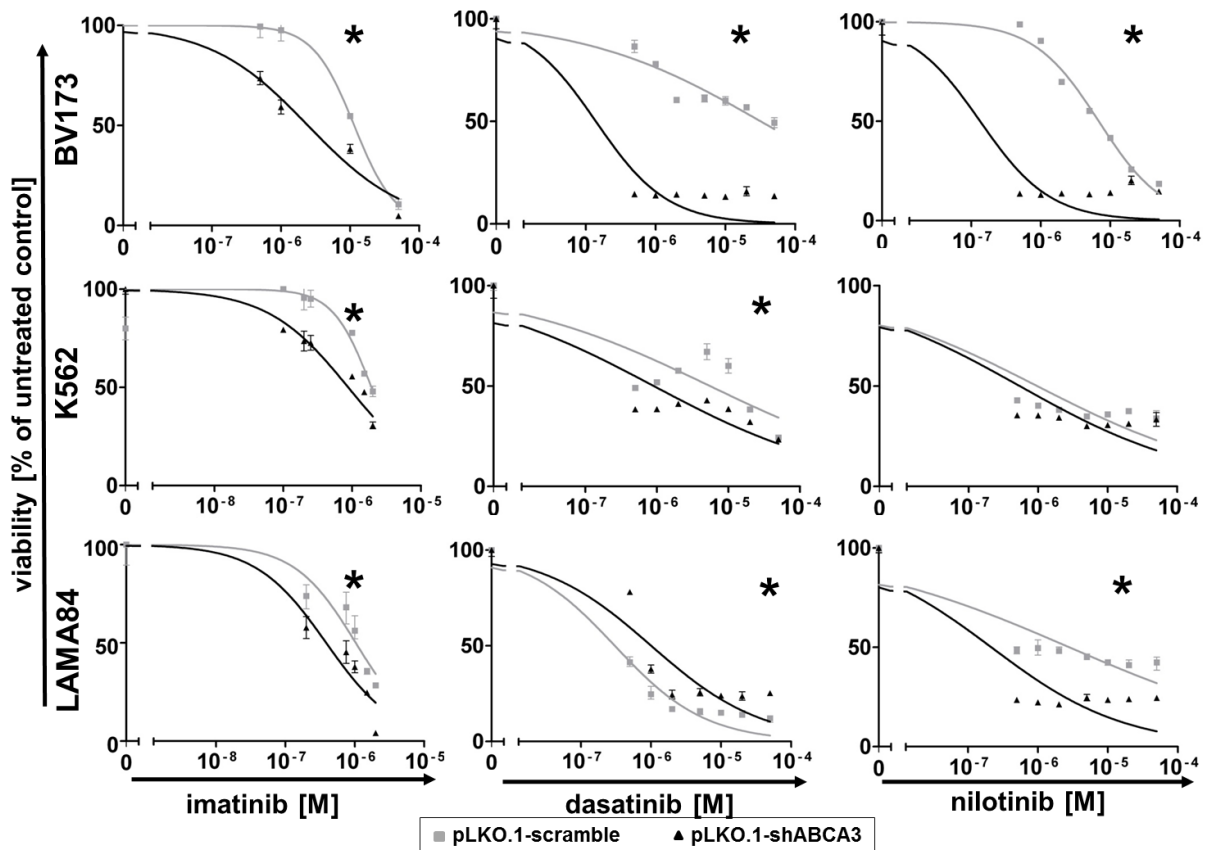
Die Klonogenität der CML-Zelllinien mit ABCA3-Knockdown war bei ansteigender Imatinib-Konzentration signifikant reduziert, im Vergleich zur jeweiligen Transfektionskontrolle (**Abbildung 13A**). Ab einer Imatinib-Konzentration von 5 bzw. 10 μM konnte bei den Zelllinien mit ABCA3-Knockdown kein Kolonienwachstum mehr nachgewiesen werden, im Gegensatz zu den jeweiligen Transfektionskontrollen. Bei den primären CD34+ Zellen von 4 CML-Patienten mit ABCA3-Knockdown zeigte sich schon ab einer Imatinib-Konzentration von 2 μM im Vergleich zur Transfektionskontrolle kein Kolonienwachstum mehr (**Abbildung 13B**).

Die spontane klonogene Koloniebildung der unbehandelten Zellen mit ABCA3-Knockdown unterschied sich in allen Ansätzen nicht signifikant im Vergleich zur Transfektionskontrolle. Außerdem zeigte sich auch kein signifikanter Unterschied

in der Wachstumsrate der CML-Zellen mit ABCA3-Knockdown im Vergleich zur Kontrolle (Daten nicht gezeigt). Somit kann ein Verlust der Proliferationsfähigkeit und Klonogenität durch die alleinige Reduktion der ABCA3-Expression ausgeschlossen werden. Der Knockdown von ABCA3 vermindert also die Klonogenität durch eine höhere Suszeptibilität der Zellen gegenüber den zytotoxischen Effekten von Imatinib.

### **3.1.3 Knockdown von ABCA3 erhöht Suszeptibilität der CML-Zelllinien gegenüber Tyrosinkinase-Inhibitoren**

Der Knockdown von ABCA3 führte in den Untersuchungen zur Klonogenität zu einer erhöhten Suszeptibilität der CML-Zelllinien gegenüber den zytotoxischen Effekten von Imatinib. Um den Einfluss des ABCA3-Knockdowns genauer untersuchen zu können, wurden zusätzlich zu Imatinib die beiden Tyrosinkinase-Inhibitoren Nilotinib und Dasatinib verwendet, um die Viabilität der Zelllinien in Suspensionskultur untersuchen zu können. Die Zelllinien BV173, K562 und LAMA-84 mit ABCA3-Knockdown wurden für 24 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen der Tyrosinkinase-Inhibitoren Imatinib, Nilotinib und Dasatinib inkubiert. Anschließend wurde die Viabilität mittels MTT-Viabilitätsassay bestimmt und die Mittelwerte der Daten auf die unbehandelten Transfektionskontrollen bezogen. Dabei zeigte sich, dass die Viabilität der Zelllinien mit ABCA3 Knockdown im Vergleich zur Transfektionskontrolle mit steigender Konzentration der verwendeten Tyrosinkinase-Inhibitoren signifikant reduziert war.

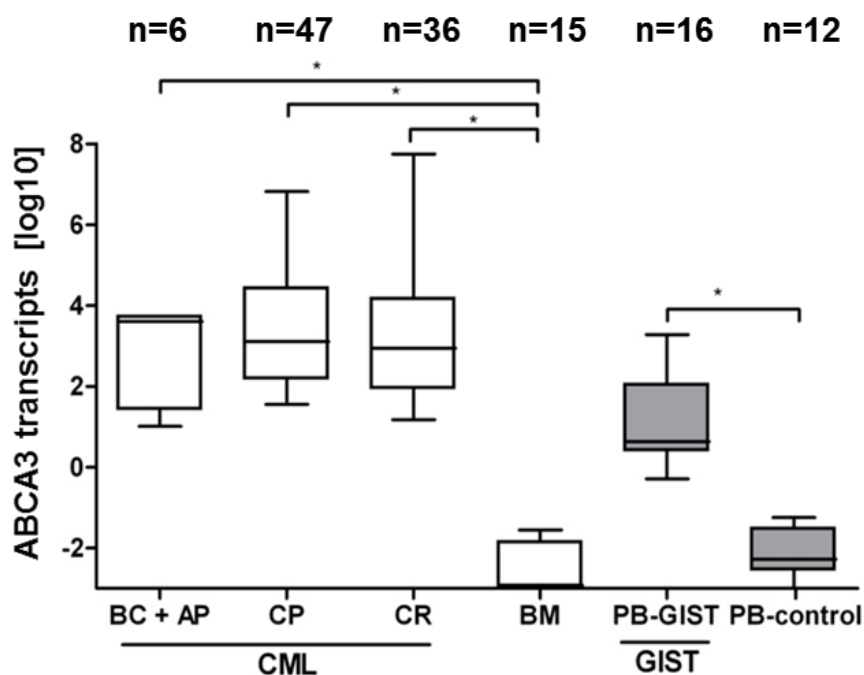


**Abbildung 14 – ABCA3-Knockdown erhöht TKI-Suszeptibilität.** Die Viabilität der Zelllinien mit ABCA3-Knockdown (pLKO.1-shABCA3) wurde im MTT-Test mit der Viabilität der jeweiligen Transfektionskontrollen (pLKO.1-scramble) verglichen. Die Zelllinien wurden bei unterschiedlichen Konzentrationen der verschiedenen Tyrosinkinase-Inhibitoren Imatinib, Dasatinib und Nilotinib (0,5 - 10  $\mu$ M) für 24 h inkubiert. \* signifikant ( $p < 0,05$  Two-Way ANOVA mit Bonferroni Post-Test).

Es zeigte sich bei den meisten CML-Zelllinien mit ABCA3-Knockdown eine deutlich verminderte Viabilität unter TKI-Behandlung gegenüber den jeweiligen Transfektionskontrollen. Dabei nahm der Wert für die mittlere effektive Konzentration ( $EC_{50}$ ) teilweise um mehr als eine Zehnerpotenz ab. Vor allem die Zelllinie BV173 zeigte eine stark erhöhte Suszeptibilität gegenüber den zytotoxischen Effekten der verschiedenen TKI. Somit konnte gezeigt werden, dass ABCA3 in den CML-Zelllinien eine essentielle Funktion bei der Resistenz gegenüber der TKI-Behandlung besitzt und es nach dem Knockdown dieses ABC-Transporters zu einer stark erhöhten TKI-Suszeptibilität der Zelllinien kommt. Dieser Zusammenhang konnte bereits mittels Klonogenitätstest für die Zellen in Methylcellulose gezeigt und durch diesen MTT-Viabilitätsassay in der Suspensionskultur bestätigt werden.

### 3.1.4 Expression von ABCA3 in CML-Zellen

Der Effekt von ABCA3 auf die TKI-Suszeptibilität führte uns zu der Untersuchung der Expressionslevel im klinischen Umfeld. Um die Expression des ABC-Transporters A3 (ABCA3) in primären Zellen der verschiedenen CML-Stadien untersuchen zu können, und um herauszufinden, welchen Einfluss die Imatinib-Therapie auf die ABCA3-Expression hat, wurden periphere Blutproben von 89 Patienten mit CML in unterschiedlichen Stadien und 15 Knochenmarkblutproben von gesunden Probanden als Kontrollgruppe gesammelt. Zusätzlich wurden periphere Blutproben von 16 Patienten mit Gastrointestinalen Stromatumoren (GIST), die Imatinib im Rahmen ihrer Therapie als Adjuvans erhalten haben, sowie 12 periphere Blutproben von gesunden Probanden als Kontrollgruppe gesammelt. Aus diesen Proben wurde die RNA isoliert, anschließend in cDNA transkribiert und mittels Taqman Real-Time-PCR die Expression von ABCA3 quantitativ analysiert.



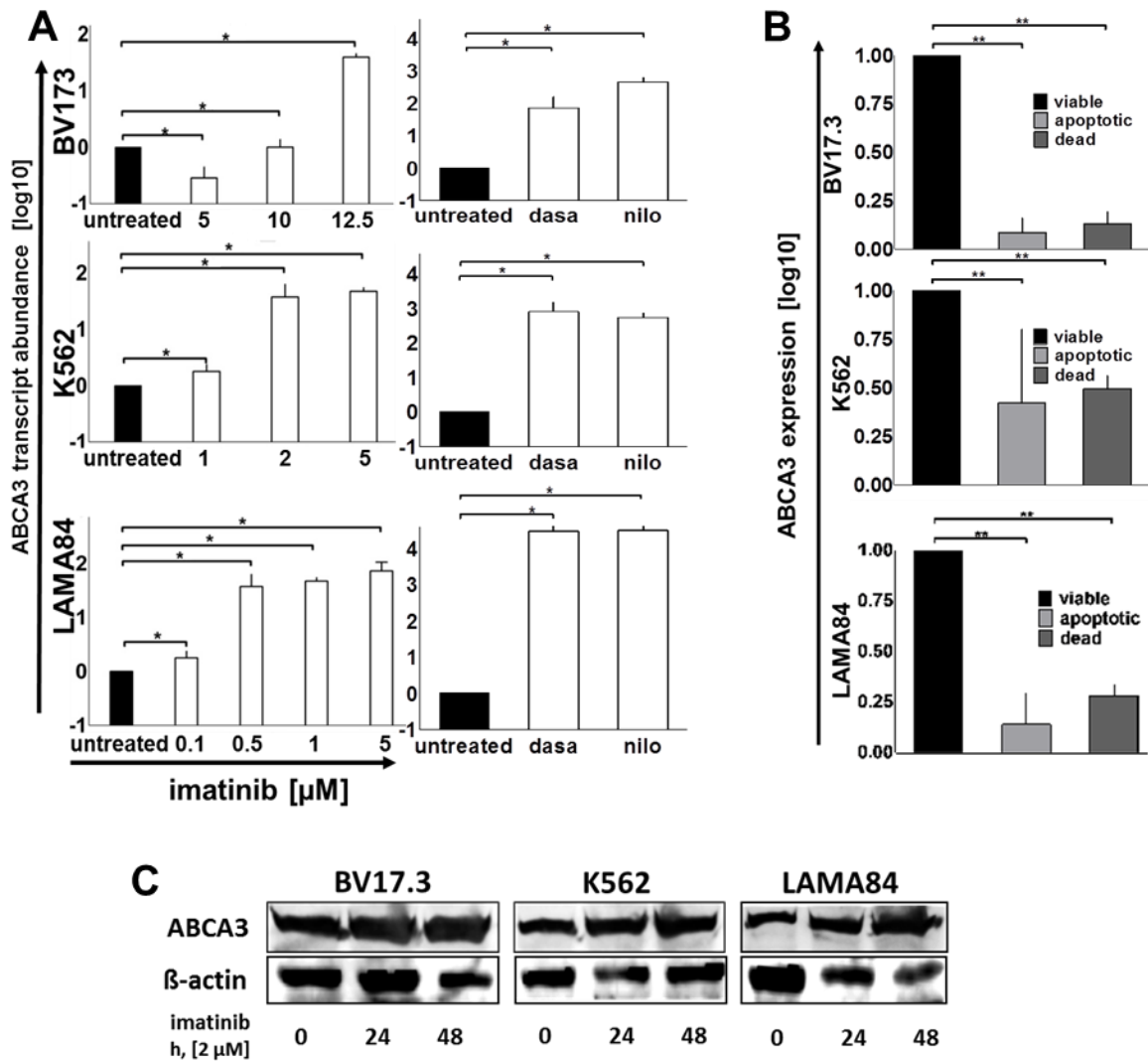
**Abbildung 15 – ABCA3-Expression in CML-Zellen und GIST-Zellen.** Die Menge von ABCA3-Transkripten in peripheren Blutproben von CML-Patienten in unterschiedlichen Stadien (BC-Blastenkrise, AP-Akzelerationsphase, CP-Chronische Phase, CR-hämatologisch vollständige Remission unter Imatinib-Therapie) wurde mit Knochenmarkblutproben von gesunden Probanden (BM) verglichen. Außerdem wurde die ABCA3-Transkriptmenge in peripheren Blutproben von GIST-Patienten, die Imatinib im Rahmen ihrer Therapie als Adjuvans erhalten haben (PB-GIST) mit peripheren Blutproben von gesunden Probanden verglichen. Die Menge von ABCA3-Transkripten wurde auf die Menge von  $\beta$ -Aktin-Transkripten normalisiert und auf die basale ABCA3-Transkription in der Leukämie-Zelllinie HL60 (=1) bezogen. \* signifikant ( $p < 0,05$  One-Way-ANOVA mit Kruskal-Wallis-Test und Dunn's Post-Test).

Im Vergleich zeigte sich eine deutlich erhöhte ABCA3-Expression in den peripheren Blutproben aller CML-Patienten (BC, AP, CP und CR) gegenüber der Kontrollgruppe (BM). Außerdem konnte auch in den Blutproben der GIST-Patienten, die Imatinib als Adjuvans im Rahmen ihrer Therapie erhalten haben (GIST-PB), eine erhöhte ABCA3-Expression gegenüber der Kontrollgruppe (PB-control) nachgewiesen werden. Es konnte zudem gezeigt werden, dass es eine sehr große Varianz der ABCA3-Expression innerhalb der unterschiedlichen Patientengruppen gibt. Die erhöhte ABCA3-Expression in den Proben der CML-Patienten in hämatologischer vollständiger Remission unter Imatinib-Erhaltungstherapie (CR) und in den Proben der GIST-Patienten führte uns zu der Fragestellung, ob es einen Zusammenhang zwischen Imatinib-Therapie und ABCA3-Expression gibt.

### **3.1.5 TKI induzieren die ABCA3-Expression in CML-Zelllinien**

Aufgrund des Nachweises der hohen ABCA3-Expression in den Blutproben der CML-Patienten mit hämatologischer vollständiger Remission unter Imatinib-Therapie, wurde eine Behandlung der CML-Zelllinien BV173, K562 und LAMA-84 mit den verwendeten Tyrosinkinase-Inhibitoren durchgeführt. Dazu wurden die Zellen jeweils mit unterschiedlichen physiologischen Konzentrationen von Imatinib, Dasatinib und Nilotinib inkubiert und anschließend für die RNA-Isolierung, cDNA-Synthese und quantitative Real-Time-PCR mittels Taqman-Analyse verwendet. Die Menge der Transkripte in den TKI-behandelten Zellen wurde dabei jeweils auf die unbehandelten Kontrollen bezogen. Anschließend wurde die Transkriptmenge statistisch ausgewertet und graphisch dargestellt.

Um sicherzustellen, dass die gemessene ABCA3-Expression von viablen Zellen stammt, und kein Nebeneffekt von Apoptose durch die TKI-Behandlung ist, wurden außerdem mittels FACS und Annexin-, bzw. PI-Färbung apoptotische und nekrotische Zellen sortiert und auf die Expression von ABCA3 untersucht. Dabei zeigte sich, dass die ABCA3-Expression hauptsächlich von viablen Zellen ausging.

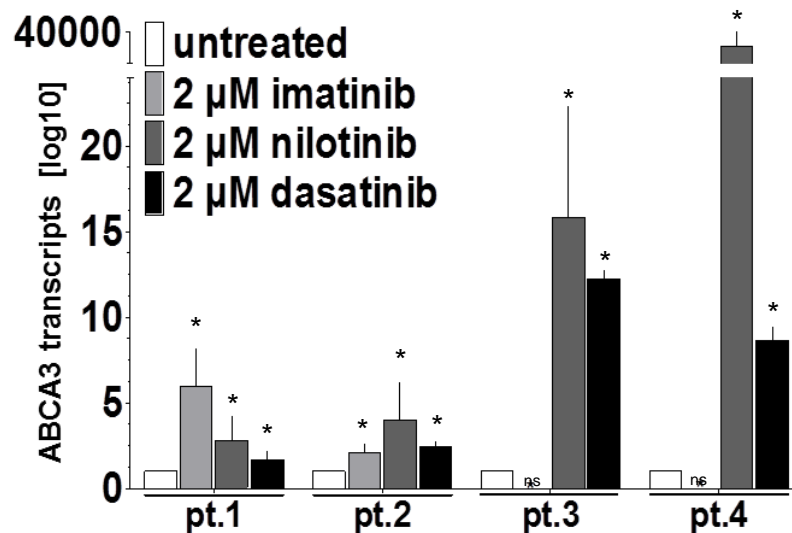


**Abbildung 16 – ABCA3-Induktion durch TKI. (A)** Die CML-Zelllinien wurden mit Imatinib (0 – 10 µM), Dasatinib und Nilotinib (2 µM) für 24 bzw. 48 h inkubiert und anschließend die ABCA3-Expression gemessen. **(B)** Zellen wurden mit Annexin V und PI gefärbt und mittels FACS sortiert. ABCA3-Expression von apoptotischen und toten Zellen wurde im Vergleich zu viablen Zellen gemessen. Die Transkriptmenge von ABCA3 wurde auf die Transkriptmenge von β-Aktin normalisiert und auf die ABCA3-Expression in den jeweiligen unbehandelten Proben (=1) bezogen. \* signifikant ( $p < 0,05$  t-Test unpaired, two-tailed). **(C)** Western Blot zum Nachweis des Anstiegs der ABCA3-Expression auf Proteinebene. Das ABCA3-Protein wurde mittels Anti-hABCA3-Antikörper (Kaninchen, 1:2000) (Inangaki et al. 2005) detektiert. Als Ladekontrolle diente die Detektion von β-Aktin mittels Anti-β-Aktin-Antikörper (Maus, 1:500) (Santa Cruz).

Es zeigte sich bei allen verwendeten CML-Zelllinien im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine konzentrationsabhängige Steigerung der ABCA3-Expression nach Inkubation mit den Tyrosinkinase-Inhibitoren Imatinib, Dasatinib und Nilotinib. Dieser Anstieg wurde nicht von Nebeneffekten durch Apoptose verursacht, da der Anteil von ABCA3-Transkripten in apoptotischen oder toten Zellen im Vergleich zu den viablen Kontrollen nur sehr gering war. Auch auf Proteinebene konnte man nach der Inkubation der Zelllinien mit Imatinib nach 24 bzw. 48 h mittels Western Blot eine Zunahme von ABCA3 detektieren. Die eingesetzte Menge von Imatinib während der Inkubation der Zelllinien lag bei 2  $\mu\text{M}$ , was in etwa der  $\text{EC}_{50}$  der Zelllinien entspricht.

### **3.1.6 TKI induzieren ABCA3-Expression in primären CD34-positiven Zellen**

Die TKI-vermittelte Induktion der ABCA3-Expression in den untersuchten CML-Zelllinien führte zu der Fragestellung, ob es ebenso in primären Zellen von CML-Patienten zu einer Steigerung der ABCA3-Expression durch die Behandlung mit Tyrosinkinase-Inhibitoren kommt. Aus den Vorarbeiten ging bereits hervor, dass ABCA3 hauptsächlich in den hämatopoetischen CD34-positiven Stammzellen des Knochenmarks exprimiert wurde. Daher wurden zunächst BCR-ABL-tragende CD34-positive Zellen aus Knochenmarkproben von 4 Patienten mit unbehandelter CML isoliert und anschließend als Co-Kultur auf murinen mesenchymalen OP9-Feederzellen ausgesät, die notwendige Wachstumsfaktoren und Zytokine produzieren. Die Zellen wurden für 48 h mit den Tyrosinkinase-Inhibitoren Imatinib, Nilotinib und Dasatinib in einer Konzentration von 2  $\mu\text{M}$  für 48 h behandelt. Anschließend wurde die Expression von ABCA3 in den so behandelten Zellen mittels quantitativer Taqman Real-Time-PCR untersucht. Als Referenz diente dabei jeweils die ABCA3-Transkriptmenge in den unbehandelten Zellen.



**Abbildung 17 – ABCA3-Expression in CD34-positiven primären CML-Zellen.** Aufgereinigte CD34-positive Zellen aus dem Knochenmark von 4 Patienten mit unbehandelter CML wurden auf murinen mesenchymalen OP9 Feeder-Zellen ausgesät und 48 h mit 2 µM Imatinib, Nilotinib und Dasatinib behandelt. Anschließend wurde die ABCA3-Expression durch die Messung der ABCA3-Transkripte mittels Taqman Real-Time-PCR bestimmt. Die Transkriptmenge von ABCA3 wurde auf die Transkriptmenge von  $\beta$ -Aktin normalisiert und auf die unbehandelte Kontrollen (= 1) bezogen. Die Expression von ABCA3 konnte wie in den CML-Zelllinien durch TKI-Behandlung gesteigert werden. \* signifikant ( $p = < 0,05$  t-Test unpaired, two-tailed). ns nicht signifikant.

Nach der TKI-Behandlung der CD34-positiven Zellen zeigte sich bei 2 CML-Patienten eine deutliche Steigerung der ABCA3-Expression durch Imatinib, während die Behandlung mit Nilotinib und Dasatinib in 4 CML-Patienten zu einem signifikanten Expressionsanstieg führte. Zudem wurde die Heterogenität der unterschiedlichen ABCA3-Transkriptionslevel zwischen den einzelnen CML-Patienten deutlich. Während die ABCA3-Expression nach der Behandlung mit Nilotinib und Dasatinib in den CD34-positiven Zellen der Patienten #3 und #4 am höchsten lag, zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression nach Imatinib-Behandlung lediglich in den Patienten #1 und #2, wobei der Anstieg nach Dasatinib- bzw. Nilotinib-Behandlung dagegen eher moderat ausfiel.

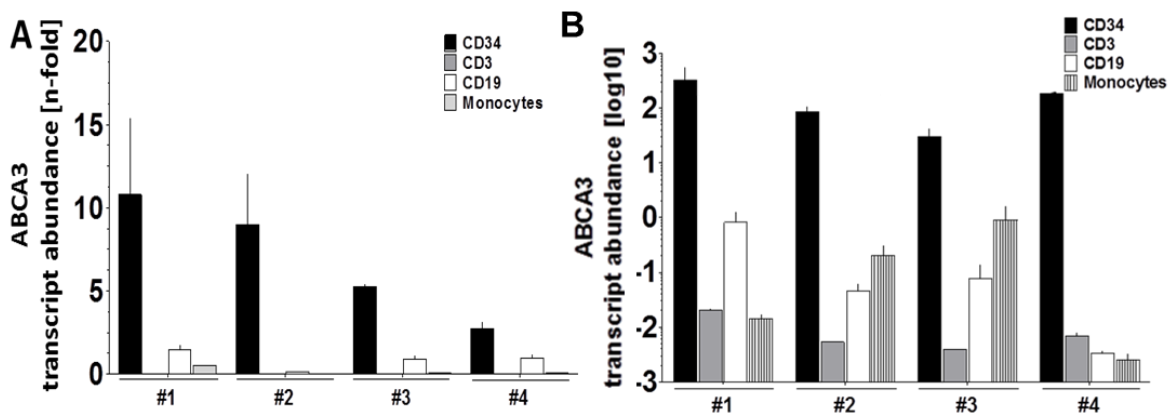
Diese Ergebnisse zeigten einen deutlichen Zusammenhang der TKI-Therapie mit der Expression von ABCA3. Durch die TKI-Behandlung der CD34-positiven Zellen, die BCR-ABL tragen, kam es in allen Patienten zu einem Anstieg der ABCA3-Expression. Um herauszufinden, ob dieser Effekt auf die ABCA3-Expression von BCR-ABL abhängig ist, untersuchten wir im nächsten Schritt die Auswirkungen der



TKI-Behandlung auf CD34-positive Zellen von gesunden Probanden, die nicht malign transformiert, waren und somit kein BCR-ABL trugen.

### 3.1.7 Imatinib induziert ABCA3-Expression in untransformierten CD34-positiven Zellen

Die Ergebnisse zur Induktion der ABCA3-Expression durch verschiedene TKI in primären CD34-positiven CML-Stammzellen führten uns zu der Fragestellung, ob es einen möglichen Zusammenhang zwischen ABCA3-Expression und BCR-ABL gibt. Um diesen Zusammenhang untersuchen zu können, verwendeten wir zunächst sortierte Zellen aus dem Knochenmark von gesunden Probanden ohne erkennbaren Hinweis einer Bluterkrankung. Dazu wurden die Knochenmarkszellen mittels FACS-Sortierung nach Markierung mit spezifischen FACS-Antikörpern in hämatopoetische Stammzellen (CD34), B-Lymphozyten (CD19), T-Lymphozyten (CD3) und Monozyten aufgetrennt.



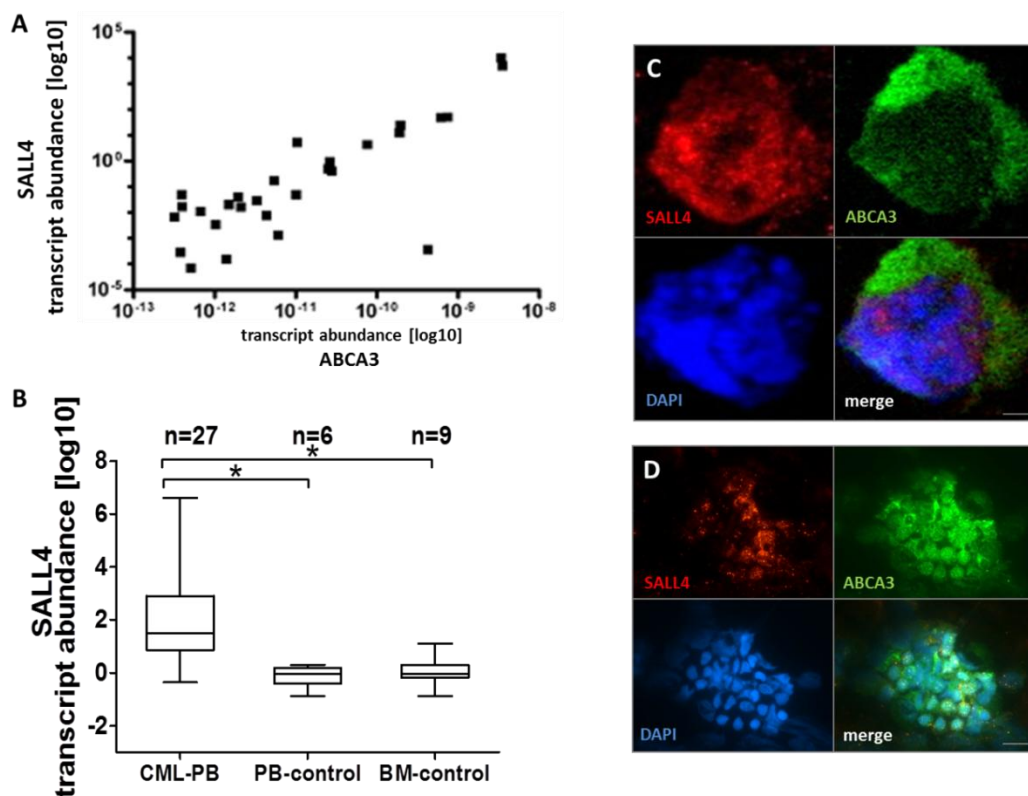
**Abbildung 18 – ABCA3-Expression in nicht-transformierten CD34-positiven primären Zellen.** Transkriptmengen von ABCA3 wurden mittels quantitativer Taqman Real-Time-PCR in FACS-sortierten Subpopulationen von hämatopoetischen Knochenmarkszellen gesunder Spender ohne Hinweise auf Bluterkrankungen bestimmt. (A) ABCA3-Transkriptmenge in unbehandelten Zellpopulationen. Die ABCA3-Transkripte wurden auf die  $\beta$ -Aktin-Transkripte normalisiert und als relative Transkriptmengen auf die leukämische Zelllinie HL60 bezogen. (B) ABCA3-Transkriptmenge in Imatinib-behandelten Zellpopulationen (2  $\mu$ M, 48 h). Die ABCA3-Transkripte wurden auf die  $\beta$ -Aktin-Transkripte normalisiert und auf die unbehandelten Kontrollen bezogen.

In der unbehandelten Situation war die ABCA3-Transkriptmenge der hämatopoetischen CD34-positiven Stammzellen am höchsten, während in den CD19-positiven B-Lymphozyten nur geringe ABCA3-Transkriptmengen

nachgewiesen wurden. Nach der Behandlung mit 2  $\mu$ M Imatinib für 48 h in Co-Kultur mit OP9-Feederzellen zeigte sich eine weitere Steigerung der ABCA3-Expression in den CD34-positiven Zellen, während die Transkription in den anderen Zellpopulationen nahezu unverändert blieb, oder sogar abnahm. Es zeigte sich somit auch in BCR-ABL-negativen hämatopoetischen Stammzellen eine Induktion der ABCA3-Expression durch den Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib. Dieser Effekt wurde in einem Stromazell-Mikromilieu beobachtet, in dem murine OP9-Feederzellen verwendet wurden, um eine ausreichende Versorgung mit den notwendigen Wachstumsfaktoren und Zytokinen für die CD34-positiven Zellen zu gewährleisten und somit eine Nachahmung des Knochenmark-Milieus unter Kulturbedingungen zu erzielen. Diese Ergebnisse deuteten auf einen zumindest teilweise von BCR-ABL unabhängigen Prozess bei der TKI-vermittelten Induktion der ABCA3-Expression hin. Allerdings konnte in späteren Versuchen nachgewiesen, dass nicht nur die Behandlung mit TKI, sondern auch die BCR-ABL-Expression einen positiven Einfluss auf die Expression von ABCA3 und den Transkriptionsfaktor SALL4 hat. Dadurch treffen zwei sich gegenseitig verstärkende Effekte aufeinander und verbessern somit die Detoxifizierung in den Zellen durch diesen Transporter.

### 3.2 ABCA3-Expression korreliert mit der Expression des Transkriptionsfaktors SALL4

Es konnte bereits gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor SALL4 in AML-Zellen konstitutiv exprimiert vorkommt und SALL4 außerdem über eine mögliche Bindungssequenz im ABCA3-Promotor verfügt, und somit die Expression von ABCA3 regulieren kann (Jeong et al., 2011; Ma et al., 2006). Um diesen Zusammenhang auch für CML-Zellen untersuchen zu können, wurden im nächsten Schritt primäre Zellen aus Knochenmark bzw. peripheren Blut von unbehandelten CML-Patienten auf die Expression von ABCA3 bzw. SALL4 mittels quantitativer Real-Time-PCR untersucht. Die Daten wurden anschließend auf  $\beta$ -Aktin normalisiert und die jeweilige ABCA3-Transkriptmenge auf die korrespondierende SALL4-Transkriptmenge bezogen. Die Daten wurden in einer Grafik zusammengefasst (**Abbildung 19A**).



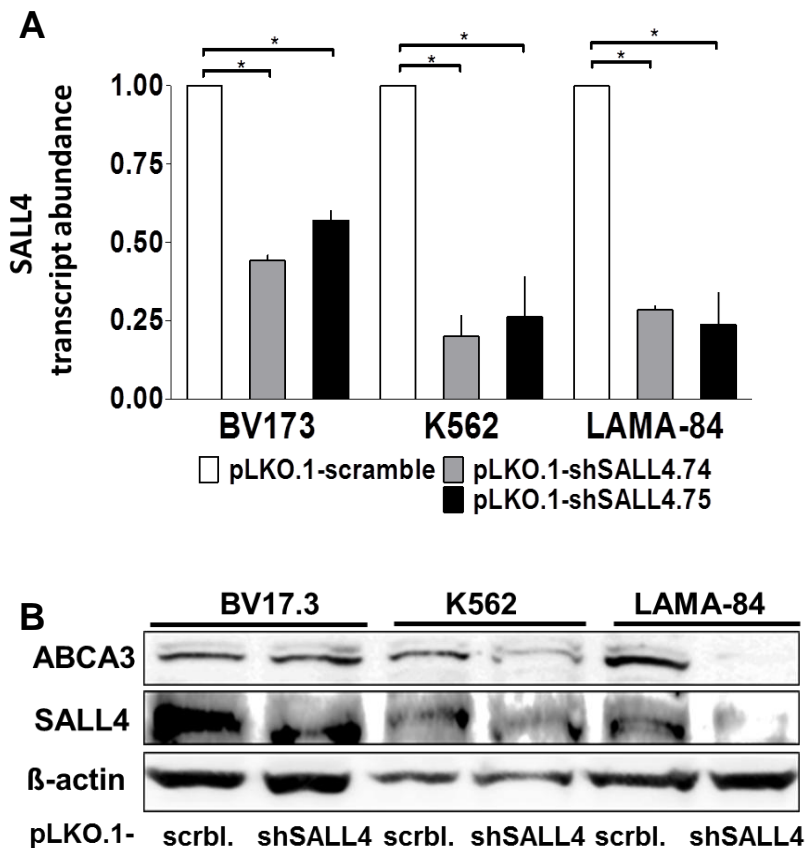
**Abbildung 19 – ABCA3-Expression korreliert mit SALL4-Expression. (A)** Die Transkriptmenge von ABCA3 und SALL4 wurde jeweils in einer Grafik zusammengefasst und zeigt eine positive Korrelation der Expression von ABCA3 und SALL4 (Korrelationskoeffizient = 0.9222; Pearson Correlation, two-tailed,  $p < 0.0001$ ). **(B)** SALL4-Expression in peripherem Blut von 27 CML-Patienten im Vergleich zur SALL4-Expression in Normalproben (peripheres Blut und Knochenmark). \* signifikant ( $p < 0,05$  One-Way ANOVA, Kruskal-Wallis-Test, Dunn's Post-test). **(C)** Immunfluoreszenz von SALL4 und ABCA3 in K562-Zellen (100-fach) (vgl. Tabelle 1) und **(D)** in Knochenmarkszellen von unbehandelten CML-Patienten (40-fach).

Außerdem wurde mittels quantitativer Real-Time-PCR die Expression von SALL4 in peripherem Blut und Knochenmarkblut von 27 CML-Patienten unter Imatinib-Therapie gemessen. Dabei zeigte sich, dass die SALL4-Transkriptmenge in dieser Kohorte signifikant erhöht ist, im Vergleich zu den Proben der gesunden Probanden (**Abbildung 19B**). Zudem wurden SALL4 und ABCA3 in K562-Zellen bzw. in Knochenmarkblutproben von unbehandelten Patienten mit aktiver CML (**Abbildung 19C und D**) auf Proteinebene durch Immunfluoreszenz-Färbung nachgewiesen. Es zeigte sich in den Zellen eine hohe Expression beider Proteine, was in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Real-Time-PCR-Messung steht. Zur Kontrolle, ob der verwendete SALL4-Antikörper auch spezifisch für das Protein ist, wurden immunhistochemische Untersuchungen an embryonalen Stammzellen des Weißbüschelaffens (*Callithrix jacchus*) durchgeführt, wo SALL4 ebenfalls hochexprimiert vorkommt. Dabei zeigte sich eine hohe Spezifität des verwendeten Antikörpers für das SALL4-Protein (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend stellte sich bei den Experimenten zur Analyse der Expression von ABCA3 und SALL4 eine deutliche positive Korrelation beider Proteine und damit verbunden ein möglicher Zusammenhang von SALL4 bei der Transkriptionsregulation von ABCA3 heraus. Daher stimmen die Daten mit den bisherigen Untersuchungen überein, dass SALL4 eine mögliche Bindungsstelle im ABCA3-Promotor besitzt, und dadurch auf transkriptionaler Ebene die Expression von ABCA3 reguliert. Außerdem konnte somit gezeigt werden, dass die Expression von SALL4 ebenfalls in CML-Patienten erhöht ist. Diese Daten unterstützen die Theorie, dass SALL4 als Transkriptionsfaktor ein möglicher aktivierender Regulator bei der Expression von ABCA3 in CML-Zellen ist.

### 3.2.1 Knockdown von SALL4 führt zum Verlust der ABCA3-Expression

Um die Funktionalität von SALL4 als Transkriptionsfaktor bei der Regulation der ABCA3-Expression genauer analysieren zu können, wurde die SALL4-Expression in den verwendeten CML-Zelllinien mittels lentiviralen Knockdowns reduziert. Die Expression von SALL4 und ABCA3 in den CML-Zelllinien BV173, K562 und LAMA-84 wurde nach lentiviralem Knockdown von SALL4 durch zwei verschiedene shRNA-Konstrukte (pLKO.1-shSALL4.74 und pLKO.1-shSALL4.75) mittels quantitativer Real-Time-PCR bestimmt. Als Negativkontrolle wurde auch hier wie bei den ABCA3-Knockdown-Zelllinien das pLKO.1-scramble verwendet. Durch den Selektionsmarker Puromycin war es uns möglich, einen stabilen Knockdown von SALL4 in den verwendeten Zelllinien zu erreichen und somit die Zellen für nachfolgende Experimente zu verwenden.

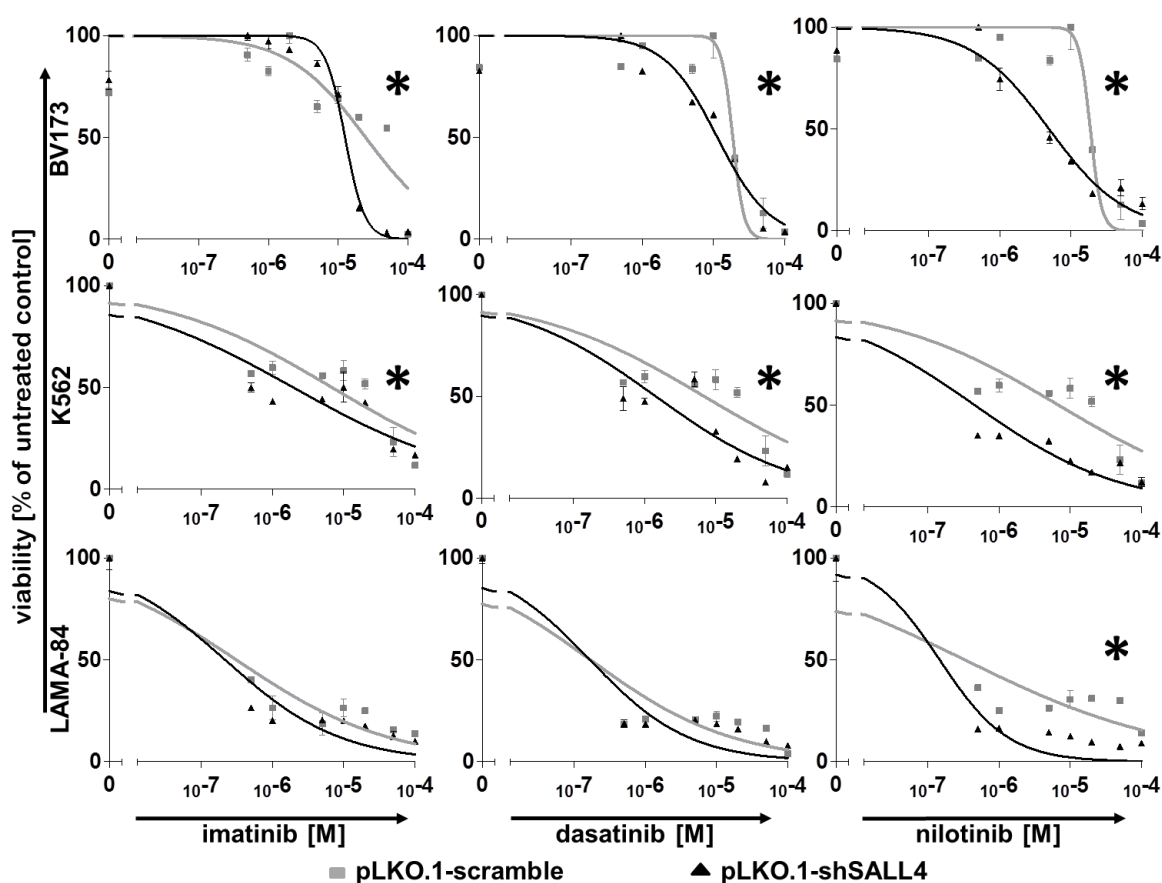


**Abbildung 20 – Expression von SALL4 nach lentiviralem Knockdown. (A)** Die SALL4-Expression der Zelllinien mit SALL4-Knockdown wurde auf die Expression der jeweiligen Transfektionskontrolle (pLKO.1-scramble) bezogen. Alle Zelllinien zeigten bei beiden shRNA-Konstrukten eine starke Reduktion der SALL4-Expression. \* signifikant ( $p < 0,05$  t-Test, unpaired, two-tailed). **(B)** Das SALL4-Protein wurde mittels Anti-SALL4-Antikörper (Maus, 1:2000) (Abcam) detektiert. Als Ladekontrolle diente die Detektion von  $\beta$ -Aktin mittels Anti- $\beta$ -Aktin-Antikörper (Maus, 1:500) (Santa Cruz). ABCA3 wurde wie beschrieben detektiert.

Die Reduktion der SALL4-Expression durch lentiviralen Knockdown führte zu einer signifikanten Abnahme der ABCA3-Expression, was durch Western Blot auf Proteinebene bestätigt werden konnte (Abbildung 20B). Diese reduzierte ABCA3-Expression nach dem Knockdown von SALL4 zeigte einen weiteren Hinweis für den Transkriptionsfaktor SALL4 als positiven Regulator bei der Transkription von ABCA3.

### 3.2.2 Knockdown von SALL führt zu erhöhter TKI-Suszeptibilität der CML-Zelllinien

Nach dem erfolgreichen Knockdown von SALL4 wurde der Effekt auf die Viabilität und TKI-Suszeptibilität der verwendeten CML-Zelllinien untersucht. Dazu wurden die Zellen mit den verschiedenen TKI behandelt und mittels MTT-Viabilitätsassay die Wirkung des Knockdowns in Kombination mit der TKI-Behandlung untersucht.

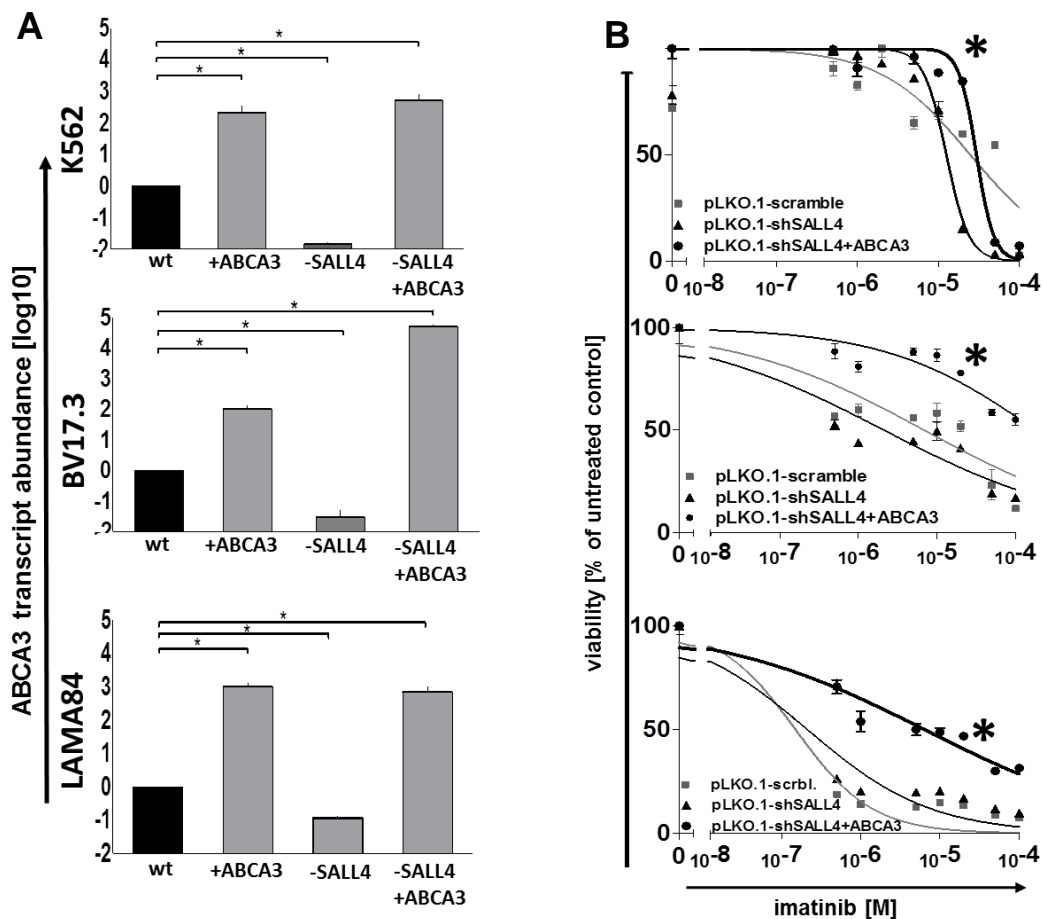


**Abbildung 21 – SALL4-Knockdown erhöht TKI Suszeptibilität.** Die Viabilität der Zelllinien mit SALL4-Knockdown (pLKO.1-shSALL4) wurde im MTT-Test mit der Viabilität der jeweiligen Transfektionskontrollen verglichen (pLKO.1-scramble). Die Zelllinien wurden bei unterschiedlichen Konzentrationen von Imatinib, Dasatinib und Nilotinib (0,5 - 10  $\mu$ M) für 24 h inkubiert. \* signifikant ( $p < 0,05$  Two-Way ANOVA mit Bonferroni Post-Test).

Die Viabilität der CML-Zelllinien nach Behandlung mit den verschiedenen TKI zeigte in den meisten Fällen einen signifikanten Unterschied zwischen den SALL4-Knockdown-Zelllinien und der jeweiligen Kontrollzelllinie. Dabei sank die  $EC_{50}$  der behandelten Zelllinien z.B. bei der Behandlung mit Nilotinib um eine Zehnerpotenz. Eine ähnliche Abnahme der  $EC_{50}$  zeigte sich bereits nach dem Knockdown von ABCA3, wo allerdings die Effekte noch deutlich stärker ausgefallen waren. Dies könnte u.a. darauf zurückzuführen sein, dass an der Regulation der Expression von ABCA3 auch noch andere Proteine beteiligt sind und der Resistenzmechanismus durch den Knockdown von SALL4 nicht vollständig unterbrochen wurde.

### 3.3 ABCA3-Überexpression reduziert Imatinib-Suszeptibilität nach SALL4-Knockdown

Zur Überprüfung der Rolle von ABCA3 bei der TKI-Suszeptibilität der Zellen nach dem Knockdown von SALL4 wurde mittels Elektroporation eine ektote Expression von ABCA3 in den CML-Zelllinien erreicht. Dadurch konnte der Effekt der erhöhten TKI-Suszeptibilität nach dem SALL4-Knockdown wieder aufgehoben werden, und es zeigte sich sogar eine erhöhte Resistenz der Zelllinien gegenüber den zytotoxischen Effekten von Imatinib.



**Abbildung 22 – ABCA3-Überexpression reduziert Imatinib-Suszeptibilität.** (A) Nach der ektopen Überexpression von ABCA3 wurde die Expression in den transfizierten Zellen mittels quantitativer Real-Time-PCR überprüft. \* signifikant ( $p < 0,05$  t-Test, unpaired, two-tailed). (B) Die Zelllinien mit SALL4-Knockdown und ektoper Überexpression von ABCA3 wurden ebenfalls im MTT überprüft. Dabei wurden die gleichen Konzentrationen der TKI verwendet. Die EC<sub>50</sub>-Werte lagen bei den SALL4-Knockdown-Zellen mit ektoper ABCA3-Überexpression teilweise eine Zehnerpotenz über der Transfektionskontrolle, womit die ursprüngliche erhöhte Suszeptibilität der Zelllinien wieder aufgehoben und sogar eine verbesserte Resistenz erreicht werden konnte. \* signifikant ( $p < 0,05$  Two-Way-ANOVA, Bonferroni Post-Test).

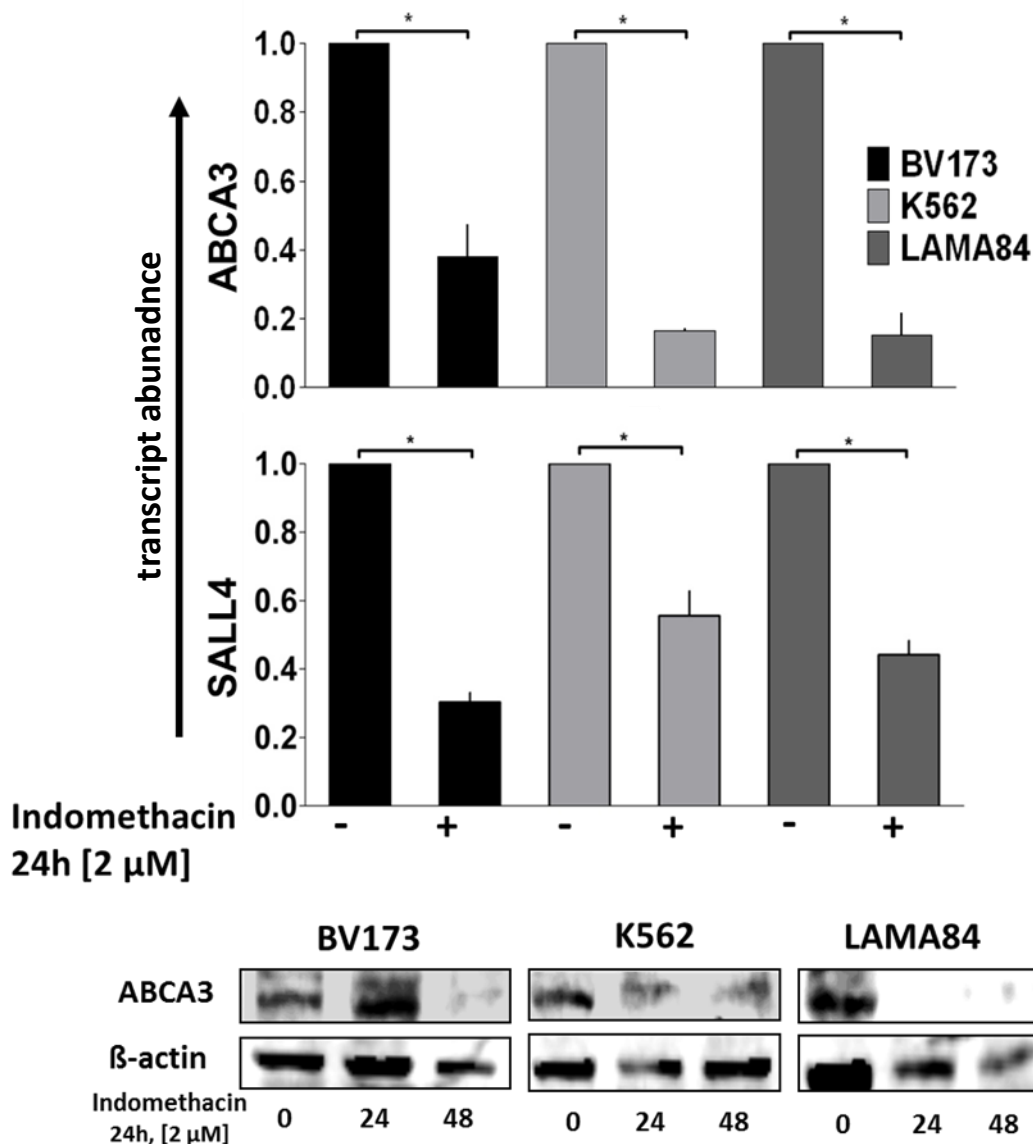


### **3.4 Inhibitoren der ABCA3/SALL4-Kaskade**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Inhibitor-Substanzen verwendet, um deren Auswirkungen auf die TKI-Resistenz bzw. Expressionsmuster der ABCA3/SALL4-Kaskade in den untersuchten CML-Zellen zu analysieren. Von den untersuchten Inhibitoren zeigten sich allerdings nur bei Indomethacin und Rapamycin nennenswerte Effekte. Bei Indomethacin handelt es sich um ein Analgetikum aus der Gruppe der nicht-steroidalen Antirheumatika und um einen nicht-selektiver Inhibitor der Cyclooxygenasen (COX-1 und COX-2). Es konnte bereits gezeigt werden, dass Indomethacin die ABCA3-Expression inhibiert (Song et al., 2008). Rapamycin ist ein Immunsuppressivum und Inhibitor von mTOR (engl. *mammalian target of rapamycin*) sowie ein Induktor der Autophagie. Rapamycin findet aufgrund seiner anti-proliferativen Effekte bereits Anwendung in der Tumorbehandlung. Rapamycin stellte sich ebenfalls bereits als ein Inhibitor der ABCA3-Expression heraus (Efferth et al., 2006). Beide Substanzen führten in Kombination mit den verwendeten TKI zu einer reduzierten Resistenz der behandelten CML-Zellen und darüber hinaus zu einer niedrigeren Expression von SALL4 bzw. ABCA3.

#### **3.4.1 Indomethacin führt zu reduzierter ABCA3-Expression in CML-Zellen**

Zur Untersuchung der Auswirkungen einer Behandlung von CML-Zellen mit dem COX-Inhibitor Indomethacin, wurden die Zellen zunächst mit einer nicht-toxischen Dosis von Indomethacin behandelt. Nach einer 48-stündigen Inkubation der Zelllinien BV173, K562 und LAMA-84 mit 2  $\mu$ M Indomethacin wurde die Expression von ABCA3 und SALL4 mittels quantitativer Real-Time-PCR analysiert. Anschließend wurde zudem die Expression von ABCA3 mittels Western Blots auf Proteinebene untersucht, um die Ergebnisse der mRNA-Expression zu validieren. Dabei wurden die Zellen für 24 bzw. 48 Stunden inkubiert, um einen potentiellen zeitlichen Zusammenhang der Indomethacin-Wirkung erfassen zu können.

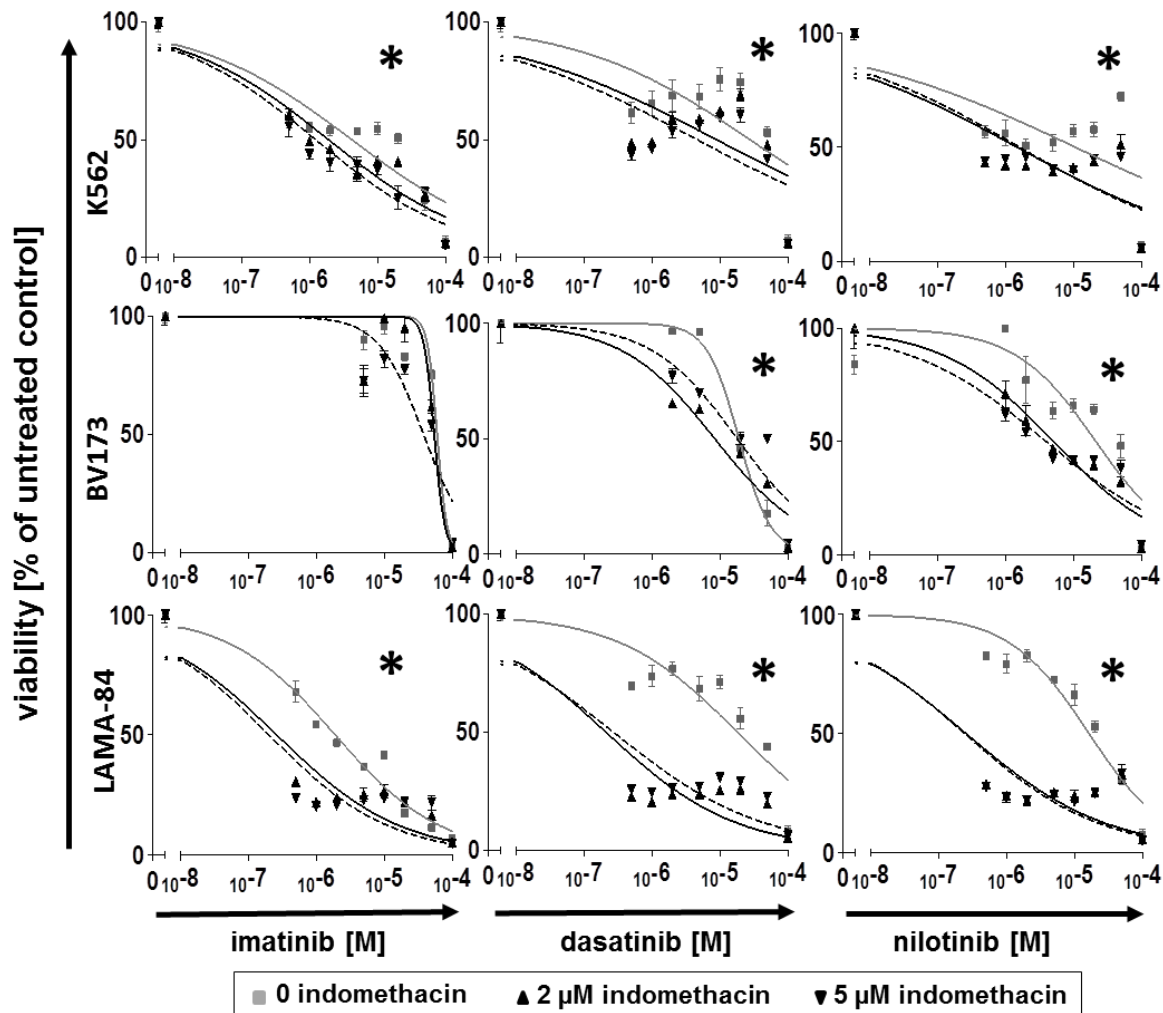


**Abbildung 23 – Indomethacin reduziert Expression von ABCA3 und SALL4.** (A) Nach der Behandlung mit 2 μM Indomethacin zeigte sich bei allen CML-Zelllinien eine starke Reduktion der ABCA3- bzw. SALL4-Expression im Vergleich zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle. \* signifikant ( $p < 0,05$  t-Test, unpaired, two-tailed). (B) Auch auf Proteinebene konnte die reduzierte Expression von ABCA3 bei allen Zelllinien nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich außerdem eine zeitliche Abhängigkeit der Reduktion von ABCA3 durch eine verlängerte Wirkdauer von Indomethacin nach 48 h gegenüber 24 h.

Die Indomethacin-Behandlung führte zu einer Reduktion der ABCA3-Expression in den untersuchten CML-Zelllinien. Außerdem konnte eine reduzierte SALL4-Expression nachgewiesen werden, die ursächlich für die verringerte ABCA3-Expression sein könnte. In Übereinstimmung mit den anderen Ergebnissen zu SALL4, zeigte sich hier, dass die ABCA3-Expression von der SALL4-Expression abhängig ist.

### 3.4.2 Indomethacin erhöht die TKI-Suszeptibilität

Anschließend wurde die Viabilität der mit Indomethacin vorbehandelten Zelllinien gegenüber den zytotoxischen Effekten der Tyrosinkinase-Inhibitoren Imatinib, Dasatinib und Nilotinib mittels MTT-Viabilitätsassays untersucht.

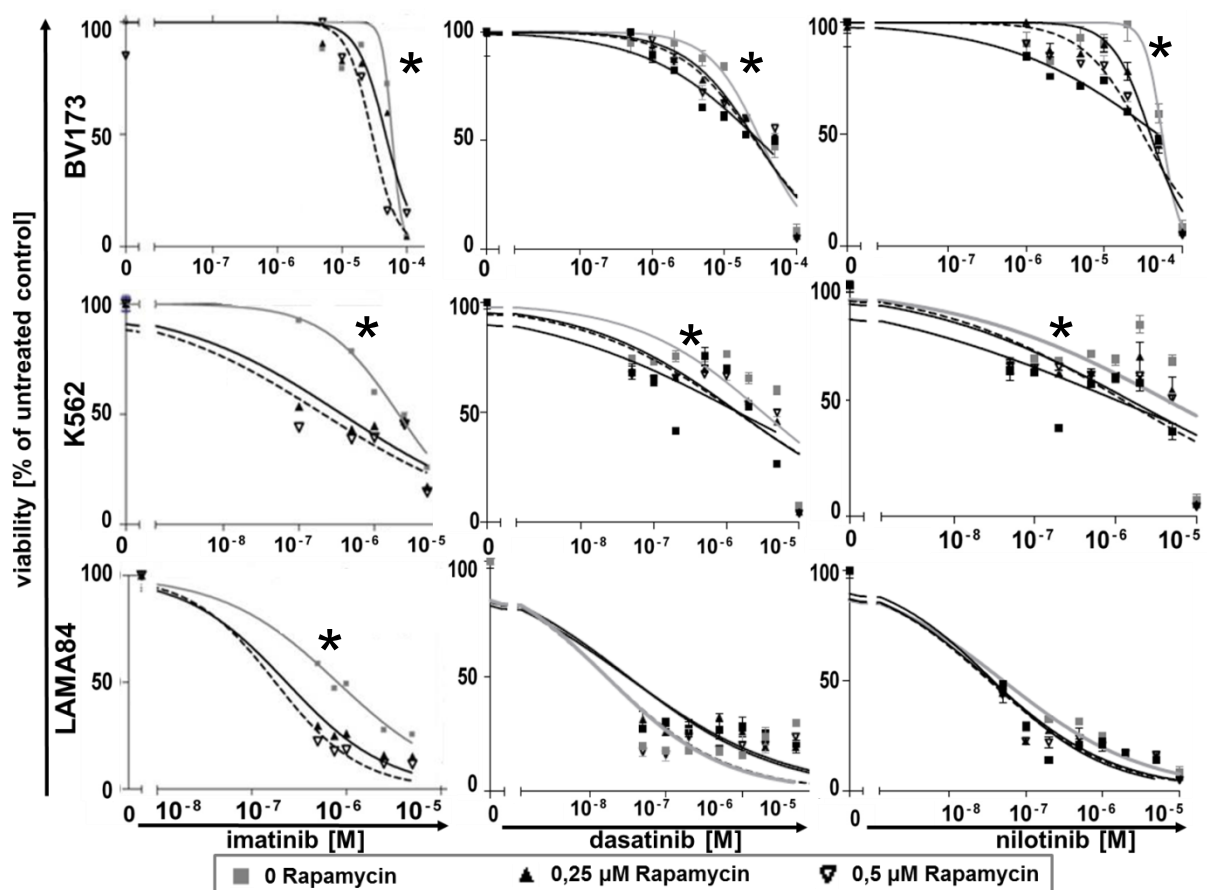


**Abbildung 24 – Indomethacin erhöht die TKI-Suszeptibilität.** Die Viabilität der Zelllinien, die mit Indomethacin behandelt waren, wurde im MTT-Test mit der Viabilität der jeweiligen unbehandelten Kontrollen verglichen. Die Zelllinien wurden zunächst für 24 h bei unterschiedlichen Konzentrationen von Indomethacin (0 – 5 µM) inkubiert und anschließend zusätzlich für 48 h mit Imatinib, Dasatinib und Nilotinib (0,5 - 10 µM) behandelt. \* signifikant ( $p < 0,05$ , Two-Way ANOVA mit Bonferroni Post-Test).

Alle Zelllinien zeigten durch die Vorbehandlung mit Indomethacin im Vergleich zur Kontrolle eine deutlich erhöhte Suszeptibilität gegenüber den zytotoxischen TKI-Effekten. Die verbesserte TKI-Wirkung zeigte sich u.a. auch aufgrund der verringerten ABCA3 bzw. SALL4-Expression, wie wir es bereits zuvor mittels Real-Time-PCR bzw. Western Blot zeigen konnten. Somit konnte durch die Kombination aus TKI und Indomethacin eine stärkere Wirkung erzielt werden.

### 3.4.3 Rapamycin erhöht die Suszeptibilität von CML-Zelllinien gegenüber TKI-Behandlung

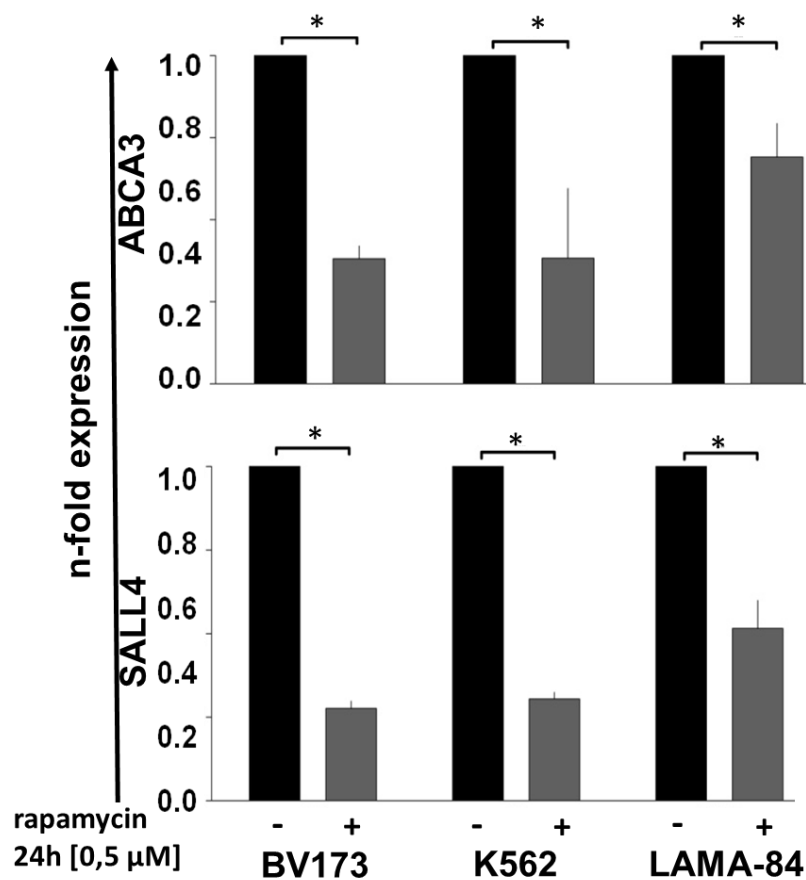
Im Rahmen unserer Untersuchungen bezüglich geeigneter Inhibitoren als mögliche Kandidaten zur Verbesserung der TKI-Wirkung sind wir auf den mTOR-Inhibitor Rapamycin gestoßen. Zunächst überprüften wir die Auswirkungen einer Kombination von Rapamycin mit den TKI Imatinib, Dasatinib bzw. Nilotinib auf die Viabilität der Zelllinien mittels MTT-Viabilitätsassay. Dabei zeigte sich, dass Rapamycin die Suszeptibilität der Zelllinien gegenüber den zytotoxischen Effekten der TKI erhöht und somit zu einer verbesserten TKI-Behandlung beitragen kann.



**Abbildung 25 – Rapamycin erhöht die TKI-Suszeptibilität.** Die Viabilität der Zelllinien, die mit Rapamycin behandelt waren, wurde im MTT-Test mit der Viabilität der jeweiligen unbehandelten Kontrollen verglichen. Die Zelllinien wurden zunächst für 24 h bei unterschiedlichen Konzentrationen von Rapamycin (0 – 0,5  $\mu$ M) inkubiert und anschließend zusätzlich für 48 h mit Imatinib, Dasatinib und Nilotinib (0,5 - 10  $\mu$ M) behandelt. \* signifikant ( $p < 0,05$ . Two-Way ANOVA mit Bonferroni Post-Test).

### 3.4.4 Rapamycin reduziert die ABCA3-Expression in CML-Zelllinien

Die Ergebnisse des MTT-Viabilitätsassays führten uns zu der Fragestellung, ob Rapamycin ebenso wie Indomethacin auch an der Regulation der Expression von ABCA3 und/oder SALL4 beteiligt ist. Daher untersuchten wir die Expression beider Gene in den CML-Zelllinien, die vorher für 48 mit 0,5  $\mu$ M Rapamycin inkubiert wurden. Die quantitative Analyse wurde mittels Taqman Real-Time-PCR durchgeführt und als Referenzwert diente jeweils die ABCA3- bzw. SALL4-Expression der unbehandelten Kontrolle.

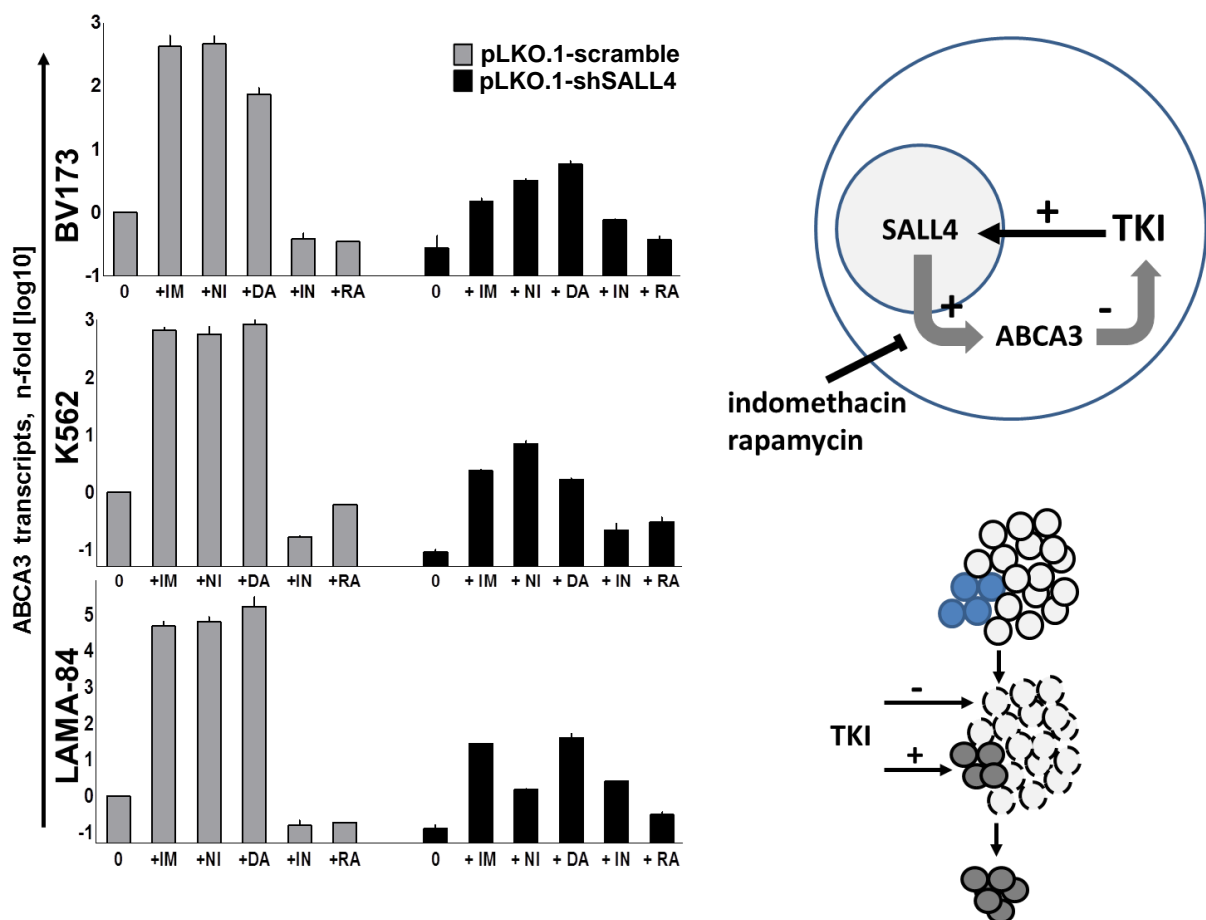


**Abbildung 26 – Rapamycin reduziert Expression von ABCA3 und SALL4. (A)** Nach der Behandlung mit 0,5  $\mu$ M Rapamycin zeigte sich bei allen CML-Zelllinien eine starke Reduktion der ABCA3- bzw. SALL4-Expression im Vergleich zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle. \* signifikant ( $p < 0,05$  t-Test, unpaired, two-tailed).

Es zeigte sich in den Rapamycin-behandelten CML-Zelllinien eine starke Reduktion der ABCA3- und SALL4-Expression. Dabei konnte die Expression von ABCA3 in den BV173- und K562-Zellen mittels Rapamycin um bis zu 60 % reduziert werden, während in den LAMA84-Zellen nur eine Reduktion um ca. 30 % erreicht werden konnte. Ein ähnliches Bild zeigte sich auch bei der Expression von SALL4, wo die Reduktion in den BV173- und K562-Zellen bei ca. 70 % lag, während sie in LAMA-84 um ca. 50 % reduziert werden konnte.

### 3.5 Reduktion der SALL4-Expression kompensiert den TKI-induzierten Anstieg der ABCA3-Expression

Die CML-Zelllinien BV173, K562 und LAMA-84 mit SALL4-Knockdown (pLKO.1-shSALL4) bzw. die jeweiligen Transfektionskontrollen (pLKO.1-scramble) wurden für 24 h mit 2  $\mu$ M TKI (IM-Imatinib, NI-Nilotinib, DA-Dasatinib) oder Inhibitoren (IN-Indomethacin, RA-Rapamycin) behandelt. Anschließend wurde die Transkriptmenge von ABCA3 in den so behandelten Zellen mittels quantitativer Real-Time-PCR bestimmt und auf die unbehandelten Zellen bezogen (**Abbildung 27**).



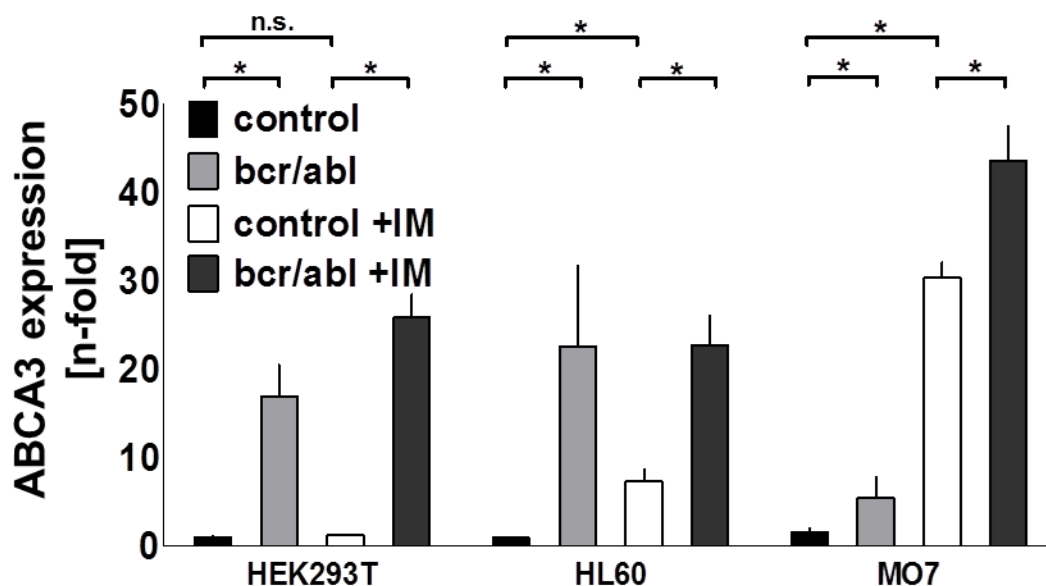
**Abbildung 27 – SALL4-Knockdown kompensiert TKI-induzierte ABCA3-Expression.** Die CML-Zelllinien BV173, K562 und LAMA-84 mit SALL4-Knockdown (pLKO.1-shSALL4) bzw. die jeweiligen Transfektionskontrollen (pLKO.1-scramble) wurden für 24 h mit 2  $\mu$ M TKI (IM-Imatinib, NI-Nilotinib, DA-Dasatinib) oder Inhibitoren (IN-Indomethacin, RA-Rapamycin) behandelt. Anschließend wurde die Transkriptmenge von ABCA3 in den so behandelten Zellen mittels quantitativer Real-Time-PCR bestimmt und auf die unbehandelten Zellen bezogen. Die schematische Grafik zeigt den Zusammenhang von ABCA3- und SALL4-Expression und die Induktion durch TKI bzw. Inhibition durch Indomethacin und Rapamycin.

Im Vergleich zum starken Anstieg der ABCA3-Expression nach TKI-Behandlung in den Kontrollzelllinien zeigte sich bei den Zelllinien mit SALL4-Knockdown ein deutlich verringerter Anstieg. Die beiden Inhibitoren Indomethacin und Rapamycin führten nur in den Kontrollzelllinien zu einer signifikanten Abnahme der ABCA3-Expression, da die Expression von ABCA3 in den Zelllinien mit SALL4-Knockdown bereits stark reduziert war und durch diese Inhibitoren nicht mehr weiter gesenkt werden konnte (**Abbildung 27**).



### 3.6 Ektope BCR-ABL-Expression steigert ABCA-Expression

Nachdem in den Proben der CML-Patienten und in den CML-Zelllinien eine hohe endogene Expression von ABCA3 nachzuweisen war, führte dies zu der Überlegung, ob das CML-typische BCR-ABL an der Regulation der Transkription von ABCA3 beteiligt sein könnte. Während in den Proben der CML-Patienten und den CML-Zelllinien das BCR-ABL aufgrund des Philadelphia-Chromosoms generell vorhanden war, wurden nun die Zelllinien HEK293T, HL-60 und MO-7 verwendet, in denen das BCR-ABL durch eine stabile Transfektion ekto exprimiert wurde. Die so transfizierten Zellen sowie die untransfizierten Kontrollen wurden dann jeweils mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib inkubiert. Anschließend wurden die Zelllinien für RNA-Isolierung, cDNA-Synthese und quantitative Real-Time-PCR mittels Taqman-Analyse vorbereitet.

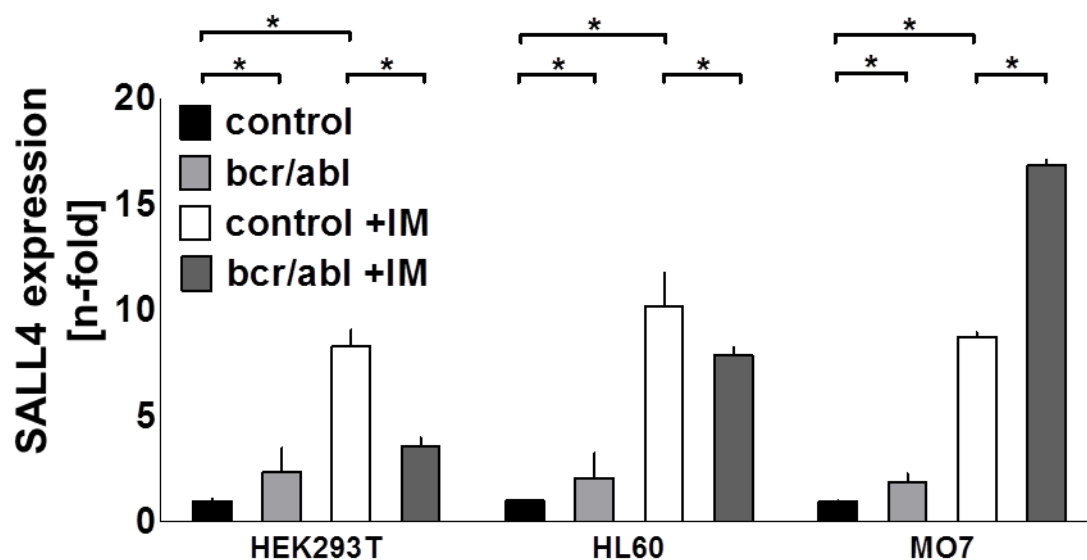


**Abbildung 28 – ABCA3-Expression nach BCR-ABL-Überexpression.** Die cDNAs der Zelllinien HEK293T, HL60 und MO7 wurden mittels Taqman-Analyse auf die Expression von ABCA3 überprüft. Als Kontrolle dienten dabei jeweils die untransfizierten und unbehandelten Zelllinien mit einem normierten Expressionswert von 1. Alle Zelllinien zeigten nach der ektopten Expression von BCR-ABL einen starken Anstieg der ABCA3-Expression in den unbehandelten wie auch den Imatinib-behandelten Proben. Der mittlere Anstieg der ABCA3-Expression lag dabei zwischen 6-fach und 22-fach (unbehandelt) bzw. zwischen 21-fach und 40-fach (Imatinib-behandelt). \* signifikant ( $p < 0,05$  t-Test, unpaired, two tailed).

Interessanterweise zeigte sich in allen Zelllinien nach der ektopen Expression von BCR-ABL eine erhöhte ABCA3-Expression, die teilweise durch Inkubation der Zelllinien mit Imatinib noch weiter gesteigert werden konnte. Außerdem führte die Inkubation mit Imatinib auch in den untransfizierten Zelllinien zu einem Anstieg der ABCA3-Expression. Demnach gibt es einen Zusammenhang zwischen BCR-ABL und der Transkription von ABCA3, und zwar sowohl in Imatinib-behandelten als auch in unbehandelten Zelllinien.

### 3.7 Ektote BCR-ABL-Expression steigert SALL4-Expression

Im direkten Anschluss an die Messung der ABCA3-Expression in den Zelllinien mit ektoper BCR-ABL-Expression wurde außerdem die SALL4-Expression bestimmt. Wenn es einen Zusammenhang zwischen BCR-ABL und der ABCA3-Expression gibt, sollte dies auch für die Expression von SALL4 nachzuweisen sein, da es sich dabei um einen Transkriptionsfaktor von ABCA3 handelt. Für die quantitative Taqman-Analyse wurden dieselben cDNAs, wie aus der Messung für die ABCA3-Expression verwendet.

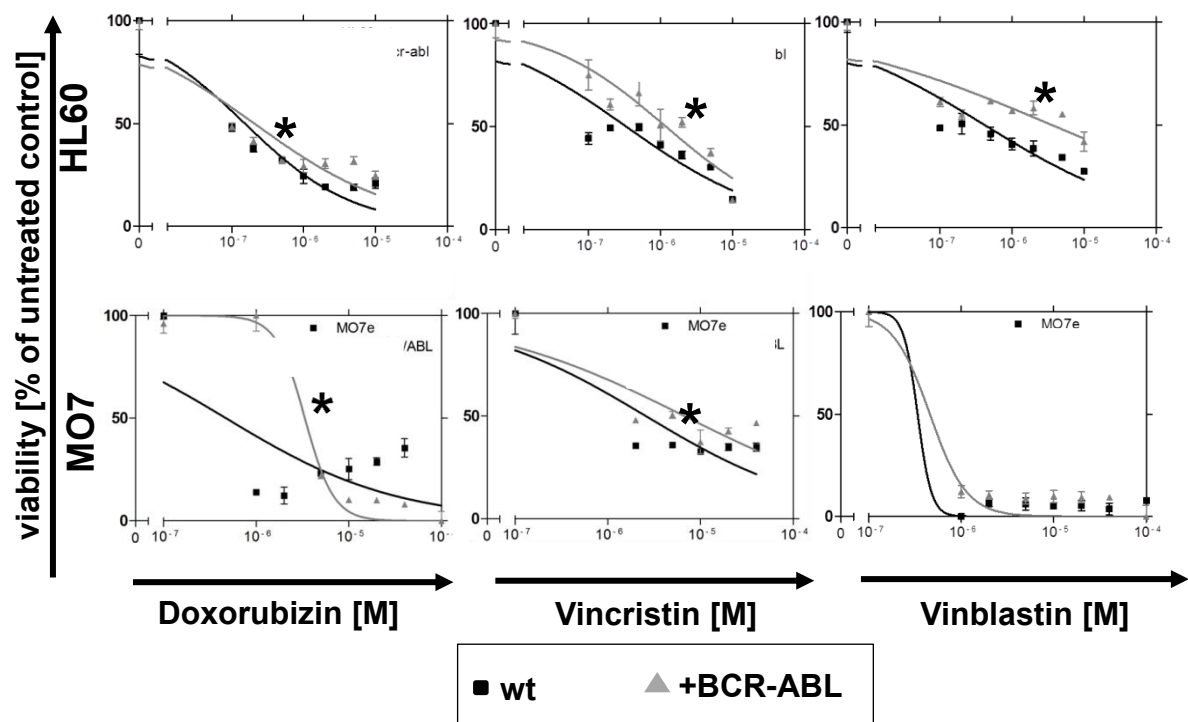


**Abbildung 29 – SALL4-Expression nach BCR-ABL-Überexpression.** Die cDNAs der Zelllinien HEK293T, HL60 und MO7 wurden mittels Taqman-Analyse auf die Expression von SALL4 überprüft. Als Kontrolle dienten dabei jeweils die untransfizierten und unbehandelten Zelllinien mit einem normierten Expressionswert von 1. Alle Zelllinien zeigten nach der ektopen Überexpression von BCR-ABL einen starken Anstieg der SALL4-Expression in den unbehandelten wie auch den Imatinib-behandelten Proben. Der mittlere Anstieg der SALL4-Expression lag dabei zwischen 3-fach und 4-fach (unbehandelt) bzw. zwischen 8-fach und 18-fach (Imatinib-behandelt). \* signifikant ( $p < 0,05$ , t-Test, unpaired, two tailed).

Tatsächlich zeigte sich auch in Bezug auf die Expression von SALL4 ein ähnlicher Effekt der ektopen BCR-ABL-Expression wie bei der Expression von ABCA3. Auch in diesem Fall konnte die Expression von SALL4 nach der Expression von BCR-ABL in allen Zelllinien signifikant gesteigert werden. Der mittlere Anstieg der SALL4-Expression lag dabei zwischen 3-fach und 4-fach in den unbehandelten Zelllinien bzw. zwischen 8-fach und 18-fach in den Imatinib-behandelten Zelllinien. Ebenso führte die Behandlung der Zelllinien mit Imatinib zu einer weiteren Steigerung der SALL4-Expression. Welcher Mechanismus dazu führt, dass BCR-ABL die Transkription von SALL4 bzw. ABCA3 reguliert, konnte bisher noch nicht geklärt werden. Es gibt jedoch bereits Daten, dass BCR-ABL einen positiven Einfluss auf den JAK/STAT-Signalweg hat und direkt an der Phosphorylierung von STAT3 beteiligt ist, und dass es außerdem zur Resistenzentwicklung von CML-Zellen im Knochenmark gegenüber TKI beitragen kann (Bewry et al., 2008; Coppo et al., 2006). Eine Aktivierung von STAT3 durch BCR-ABL könnte zudem zu einer erhöhten SALL4-Expression führen, da STAT3 ein Transkriptionsfaktor von SALL4 ist, wie bereits gezeigt werden konnte (Bard et al., 2009).

### 3.8 BCR-ABL erhöht die Resistenz gegenüber Zytostatika in MO7 und HL60-Zellen

Aufgrund der Ergebnisse zur Steigerung der ABCA3-Expression durch ektopye Expression von BCR-ABL, wurden die AML-Zelllinien MO7 und HL60 anschließend mittels MTT-Viabilitätsassay untersucht. Wie es bereits für AML-Zellen gezeigt werden konnte, exprimieren auch diese Zellen den ABC-Transporter, der auch dort einen positiven Einfluss auf die Resistenzentwicklung gegenüber den Effekten verschiedener Zytostatika vermittelt. Daher könnte die, durch BCR-ABL erreichte höhere Expression von ABCA3, auch in diesem Fall die untersuchten Zelllinien vor den zytotoxischen Effekten dieser Medikamente schützen. Im MTT wurden daher die untransfizierten und BCR-ABL exprimierenden Zellen von MO7 und HL60 mit den Zytostatika Doxorubizin, Vinblastin und Vincristin behandelt. Anschließend wurde die Viabilität der Zelllinien miteinander verglichen und anschließend die Unterschiede zwischen den untransfizierten und BCR-ABL-exprimierenden Zellen untersucht.

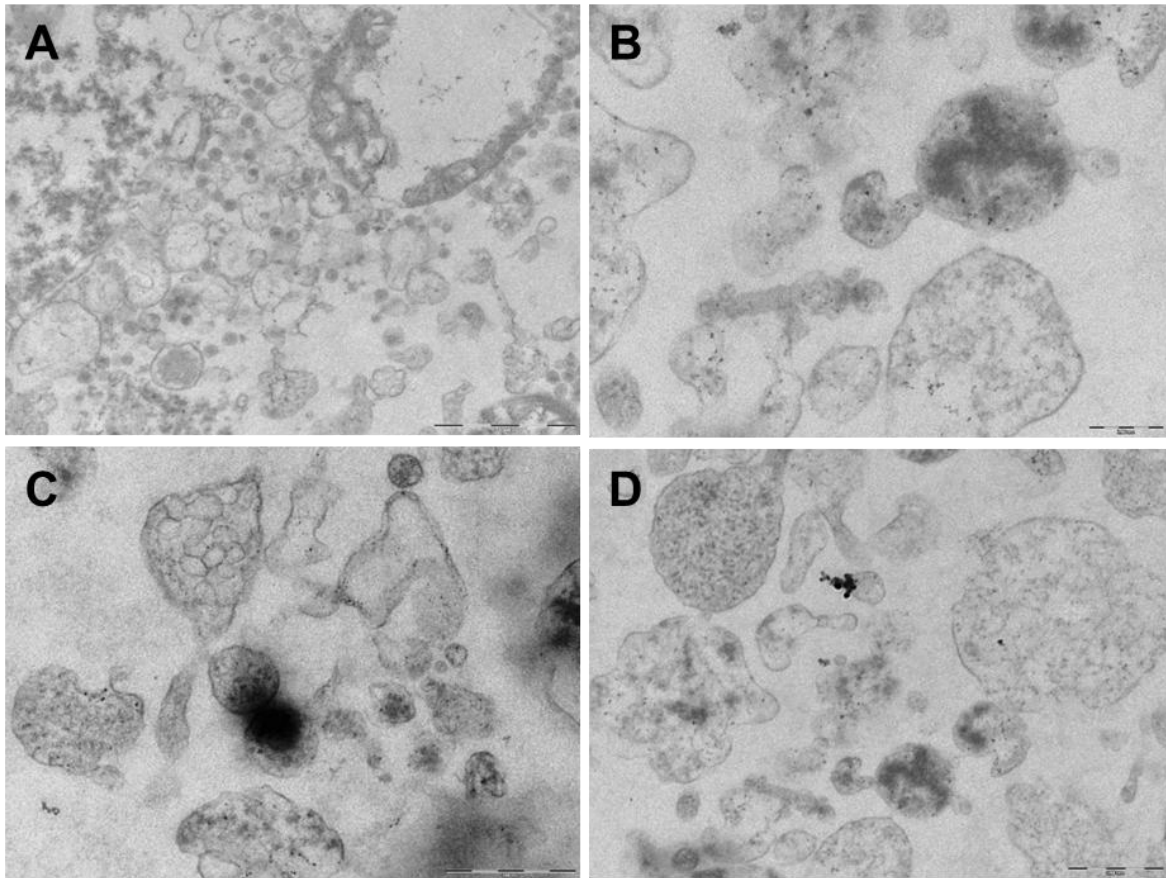


**Abbildung 30 – BCR-ABL erhöht Resistenz gegenüber Zytostatika.** Die Viabilität der Zelllinien MO7 und HL60 mit ektopyer BCR-ABL-Expression (+BCR-ABL) wurde im MTT-Test mit der Viabilität der jeweiligen untransfizierten Kontrollen (wt) verglichen. Die Zelllinien wurden bei unterschiedlichen Konzentrationen von Doxorubizin, Vincristin und Vinblastin (0,5 - 10  $\mu$ M) für 24 h inkubiert. \*  $p < 0,05$ . Two-Way ANOVA, Bonferroni Post-Test.

Tatsächlich zeigte sich im MTT-Viabilitätsassay eine deutliche Änderung der Viabilität der untersuchten Zelllinien nach ektopter BCR-ABL-Expression. Bei den beiden Zelllinien MO7 und HL60 kam es durch BCR-ABL zu einer Verschiebung der  $EC_{50}$ , die teilweise 5 – 10  $\mu$ M über den Werten der ursprünglichen  $EC_{50}$  lagen. Somit hatte die ektope BCR-ABL-Expression und die damit verbundene höhere ABCA3-Expression einen signifikanten Einfluss auf die Resistenz der beiden AML-Zelllinien. Außerdem konnte dadurch gezeigt werden, dass BCR-ABL nicht nur auf genetischer Ebene an der Regulation von ABCA3 beteiligt ist, sondern auch, dass dieser Resistenzmechanismus auch in Zellen funktional ist, wo BCR-ABL unter natürlichen Bedingungen nicht vorhanden ist.

### 3.9 CML-Zelllinien sezernieren Mikrovesikel

Wie bereits in den Vorversuchen zu dieser Arbeit gezeigt werden konnte, wurde radioaktiv-markiertes [14C]-Imatinib zunächst in den Lysosomen von behandelten CML-Zelllinien sequestriert nachgewiesen, während es nach 48 h hauptsächlich extrazellulär nachzuweisen war (Chapuy et al., 2009). Um die Sekretion von Imatinib aus den CML-Zellen genauer untersuchen zu können, wurde die Zelllinie K562 zunächst für 48 h in Vesikel-freiem Medium inkubiert und anschließend die Mikrovesikel aus dem Zellkulturüberstand präpariert. Das Mikrovesikel-Pellet wurde daraufhin für die Untersuchung mittels Elektronenmikroskopie vorbereitet und danach die Aufnahmen der Präparate am Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie (Göttingen) durchgeführt.

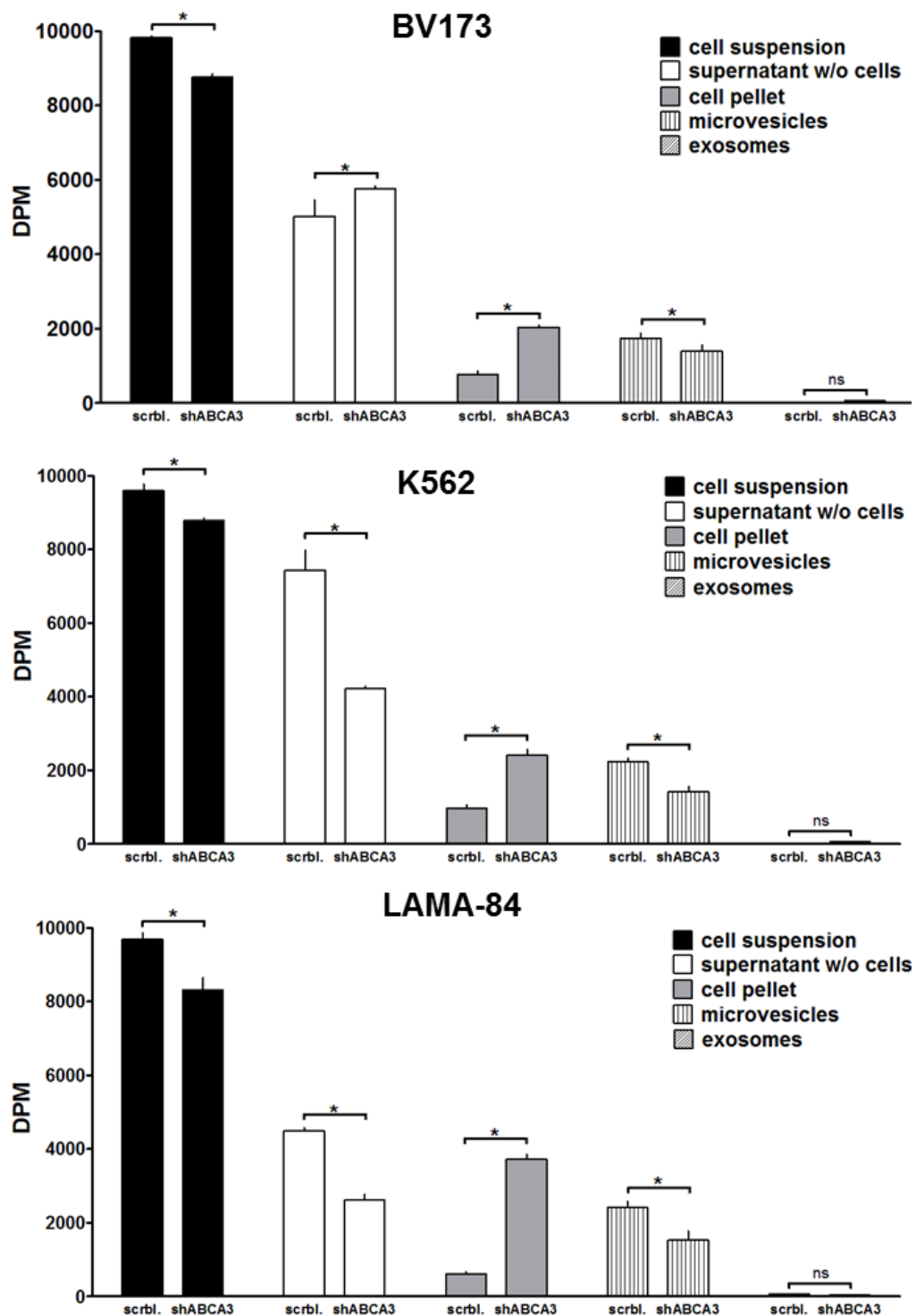


**Abbildung 31 – EM-Aufnahmen von Mikrovesikeln in K562-Zellen.** Mikrovesikel von K562-Zellen wurden nach 48 h aus dem Zellkulturüberstand präpariert, fixiert und am Elektronenmikroskop Phillips CM120 (MPI für biophysikalische Chemie, Göttingen) aufgenommen. **(A-D)** EM-Aufnahmen von Mikrovesikeln ( $d = 200 - 1000$  nm) in versch. Vergrößerungen.

Die Elektronenmikroskopie-Aufnahmen der Mikrovesikel-Präparate aus dem Zellkulturüberstand der K562-Zellen, zeigten deutlich erkennbare, runde vesikuläre Strukturen. Die aufgenommenen Mikrovesikel hatten einen Durchmesser von 200 – 1.000 nm und waren somit deutlich von den kleineren Exosomen, die nur einen Durchmesser von bis zu max. 100 nm hatten, unterscheidbar. Somit konnte gezeigt werden, dass CML-Zellen Mikrovesikel sekretieren, die potentielle Vehikel beim Efflux von Tyrosinkinase-Inhibitoren zur Detoxifizierung der Zellen sind.

### **3.10 [14C]-Imatinib akkumuliert in Mikrovesikeln von CML-Zelllinien**

Um den Mechanismus der Sequestrierung bzw. Sekretion des Tyrosinkinase-Inhibitors Imatinib genauer untersuchen zu können, wurden die CML-Zelllinien BV173, K562 und LAMA-84 mit ABCA3-Knockdown (shABCA3) bzw. ohne Knockdown (scrbl.) zunächst mit 2,14  $\mu\text{M}$  (3,7 kBq) radioaktiv-markiertem [14C]-Imatinib für 6 h in Vesikel-freiem RPMI-Medium inkubiert, anschließend gewaschen und mit frischem Vesikel-freiem RPMI-Medium erneut inkubiert. Nach 48 h wurde die Zellsuspension entnommen und es folgte die Isolierung und Präparation von den Mikrovesikeln aus dem Überstand der jeweils zu untersuchenden CML-Zelllinie. Vor bzw. nach den verschiedenen Präparationsschritten wurden jeweils kleinere Mengen der Proben entnommen und diese für die Messung der Radioaktivität (DPM = Zerfall pro Minute) in 24-Well-Platten im „Wallac Scintillation Counter“ vorbereitet. Dabei wurden folgende Proben der einzelnen Präparationsschritte untersucht: 1. Zellsuspension, 2. Zellkulturüberstand, 3. Zellpellet, 4. Mikrovesikel-Pellet, 5. Exosomen-Pellet. Die Proben wurden im 24-Well mit Szintillationsflüssigkeit bedeckt und die Zerfallsrate für 30 s gemessen und aus den einzelnen Messwerte die Mittelwerte für die statistische Auswertung bestimmt.



**Abbildung 32 – [14C]-Imatinib in Mikrovesikeln von CML-Zelllinien.** Das radioaktiv markierte [14C]-Imatinib wurde in den einzelnen Fraktionen der Mikrovesikel-Präparation von Zellen mit ABCA3-Knockdown (shABCA3) und mit unveränderter ABCA3-Expression (scrbl.) gemessen. Die einzelnen Proben wurden während der einzelnen Aufreinigungsschritte der Mikrovesikelpräparation nach 48 h entnommen und anschließend im Scintillation Counter gemessen. Dabei zeigte sich der größte Anteil des [14C]-Imatinibs in der Zellsuspension bzw. im Zellpellet und im Überstand, aber im Vergleich zur Exosomenpräparation konnte deutlich mehr [14C]-Imatinib in den Mikrovesikeln gemessen werden. \* signifikant. ( $p < 0,05$ , t-Test, unpaired, two tailed). ns nicht signifikant. DPM = Zerfall pro Minute.

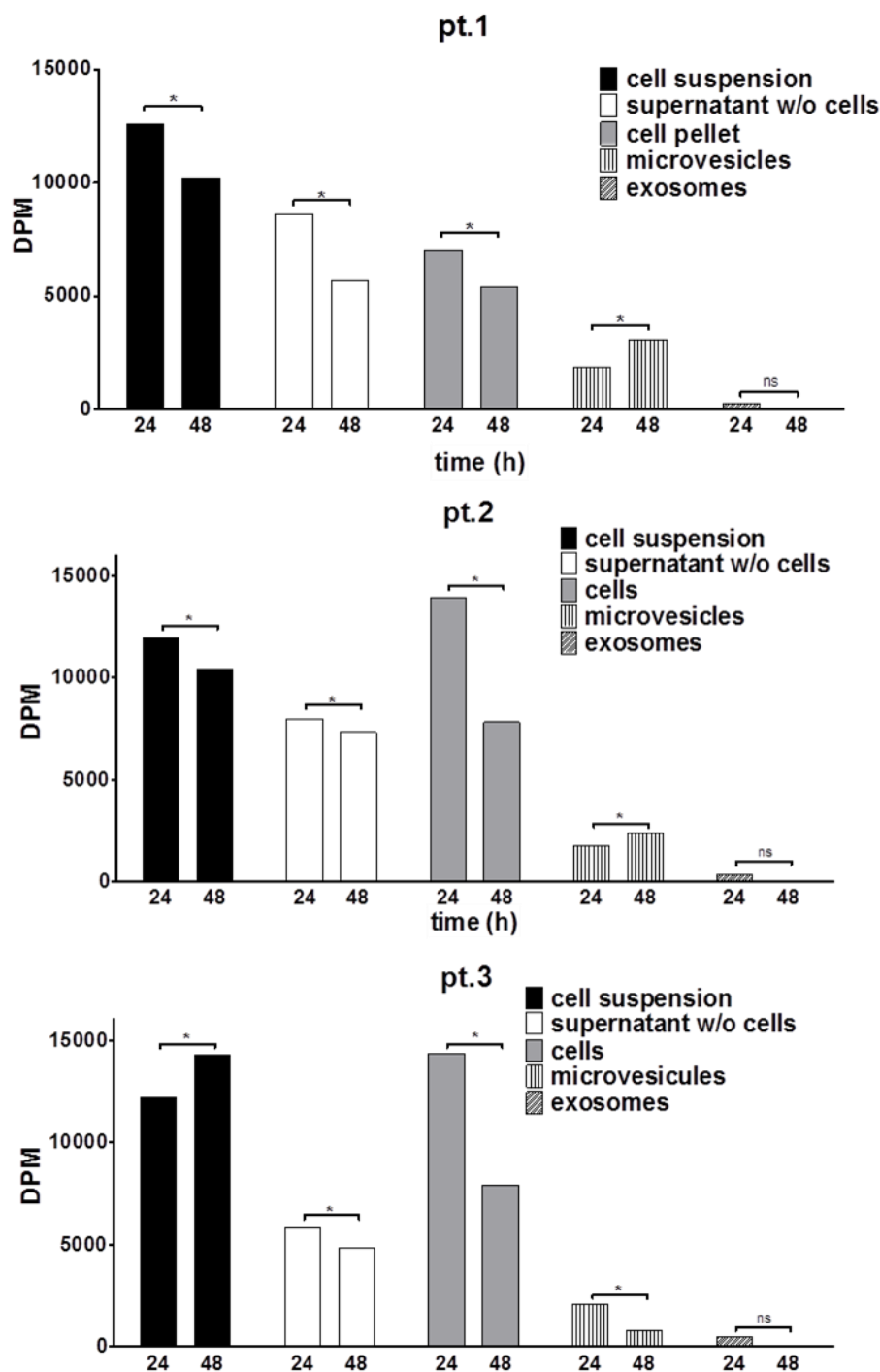


Die Messung des [14C]-Imatinibs in den CML-Zelllinien ergab, dass jeweils der größte Anteil der Radioaktivität in der Zellsuspension (ca. 8.000 – 10.000 DPM) bzw. im Zellpellet (ca. 500 – 4.000 DPM) und im Überstand (ca. 2.000 – 8.000 DPM) vorhanden war. Allerdings konnte auch ein relativ hoher Anteil (ca. 1.500 – 2.500 DPM) in den Mikrovesikeln gemessen werden, der im Vergleich zum Anteil in den Exosomen, wo kaum Radioaktivität nachgewiesen werden konnte (ca. 50 DPM), deutlich höher lag. Außerdem konnte gezeigt werden, dass der Anteil der Radioaktivität in den Zellen mit ABCA3-Knockdown deutlich höher lag, als in den Zellen mit unveränderter ABCA3-Expression. Dementsprechend konnte in den Mikrovesikeln der Zellen mit ABCA3-Knockdown und im zugehörigen zellfreien Überstand eine deutlich geringere Radioaktivität nachgewiesen werden. Daher kann man davon ausgehen, dass der ABCA3-Knockdown einen Einfluss auf den Efflux von [14C]-Imatinib aus den Zellen heraus hatte, und somit weniger Radioaktivität mittels Mikrovesikel herausgeschleust wurde.

### **3.11 [14C]-Imatinib akkumuliert in Mikrovesikeln von primären CD34-positiven CML-Zellen**

Um die Sequestrierung bzw. Sekretion des Tyrosinkinase-Inhibitors Imatinib in primären CD34-positiven CML-Zellen genauer untersuchen zu können, wurden zunächst mittels MACS-Sortierung aufgereinigte CD34-positive Zellen von 3 verschiedenen CML-Patienten auf OP9-Feederzellen mit 2,14  $\mu\text{M}$  (3,7 kBq) radioaktiv-markiertem [14C]-Imatinib für 6 h in Vesikel-freiem alphaMEM-Medium inkubiert, anschließend gewaschen und erneut mit frischem Vesikel-freiem alpha-MEM-Medium inkubiert. Nach 24 bzw. 48 h wurde die Zellsuspension entnommen und es folgte die Präparation der Mikrovesikel aus dem Überstand der CML-Zellen. Vor bzw. nach den verschiedenen Präparationsschritten wurden jeweils kleinere Mengen der Proben entnommen und diese für die Messung der Radioaktivität (DPM = Zerfall pro Minute) in 24-Well-Platten im „Wallac Scintillation Counter“ vorbereitet. Dabei wurden folgende Proben der einzelnen Präparationsschritte untersucht: 1. Zellsuspension, 2. Zellkulturüberstand, 3. Zellpellet, 4. Mikrovesikel-Pellet, 5. Exosomen-Pellet. Die Proben wurden im 24-Well mit Szintillationsflüssigkeit bedeckt und die Zerfallsrate für 30 s gemessen

und aus den einzelnen Messwerte die Mittelwerte für die statistische Auswertung bestimmt.

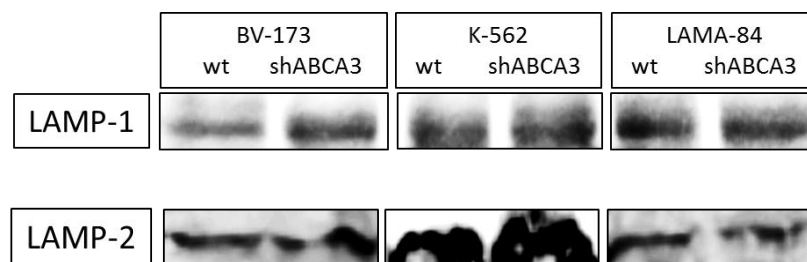


**Abbildung 33 – [14C]-Imatinib in Mikrovesikeln von primären CML-Zellen.** Das radioaktiv markierte [14C]-Imatinib wurde in den einzelnen Fraktionen der Mikrovesikel-Präparation nachgewiesen. Die einzelnen Proben wurden nach 24 bzw. 48 h entnommen und anschließend im Scintillation Counter gemessen. Dabei zeigte sich der größte Anteil des [14C]-Imatinibs in der Zellsuspension bzw. in den Zellen und im Überstand, aber im Vergleich zur Exosomenpräparation konnte deutlich mehr [14C]-Imatinib in den Mikrovesikeln gemessen werden. \* signifikant. ( $p < 0,05$ , t-Test, unpaired, two tailed). ns nicht signifikant. DPM = Zerfall pro Minute.

Die Messung der Radioaktivität des [14C]-Imatinibs hat ergeben, dass die größte Radioaktivität vor allem in der Zellsuspension (ca. 10.000 – 15.000 DPM) bzw. in den CML-Zellen (5.000 – 15.000 DPM) und im Überstand (ca. 5.000 – 10.000 DPM) vorhanden war. Allerdings wurde auch ein relativ hoher Anteil in den Mikrovesikeln gemessen, der im Vergleich zu den Exosomen, wo fast keine Radioaktivität nachgewiesen werden konnte, deutlich höher lag. Außerdem konnte gezeigt werden, dass der Anteil der Radioaktivität in den Zellen zwischen 24 h und 48 h deutlich abnahm, während in den Mikrovesikeln eine deutliche Zunahme der Radioaktivität verzeichnet werden konnte. Daher kann man davon ausgehen, dass über einen längeren Zeitraum mehr [14C]-Imatinib aus den Zellen mittels Mikrovesikeln herausgeschleust wurde.

### 3.12 Mikrovesikel enthalten lysosomale Markerproteine

Nachdem die Zellen für 48 h in Vesikel-freiem Medium inkubiert wurden, wurden die Mikrovesikel aus den Zellkulturüberständen isoliert und anschließend für die weitere Verwendung im Western blot lysiert. Danach wurden die Mikrovesikel in ihrer Proteingesamtmenge mittels Western Blot auf die beiden charakteristischen lysosomalen Markerproteine LAMP-1 und LAMP-2 untersucht.



**Abbildung 34 – Lysosomale Markerproteine in Mikrovesikeln.** Die lysosomalen Markerproteine LAMP-1 und LAMP-2 wurden mittels Western blot in Mikrovesikeln von Wildtyp- und ABCA3-Knockdown-Zelllinien detektiert. Für den Western Blot wurde jeweils die Proteinmenge der gesamten Mikrovesikel-Präparation eingesetzt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der Proteinmenge der sekretierten Mikrovesikel im Vergleich der untersuchten Zelllinien BV173, K562 und LAMA-84.

Es zeigte sich sowohl in den untransfizierten Wildtyp-Zelllinien, als auch in den Zelllinien mit shABCA3-Knockdown jeweils eine starke Bande für LAMP-1 und LAMP-2. Somit konnte zum einen davon ausgegangen werden, dass die Mikrovesikel teilweise ursprünglich von lysosomalen Vesikeln abstammen, und zum anderen, dass der Knockdown von ABCA3 keinen Einfluss auf die Menge der sekretierten Mikrovesikel hatte.

## 4 Diskussion

Bei der chronischen myeloischen Leukämie handelt es sich um eine maligne Transformation der hämatopoetischen Stammzellen, die zwar durch die Entwicklung spezifischer Inhibitoren der BCR-ABL-Tyrosinkinase behandelbar wurde (Bhatia et al., 2003; Chu et al., 2005). CML-Patienten müssen in der Therapie durch die Tyrosinkinase-Inhibitoren Imatinib, Nilotinib und Dasatinib diese Medikamente dauerhaft und regelmäßig einnehmen, um einen möglichen Rückfall zu verhindern. Nach dem Absetzen der Therapie oder dem Erwerb von Mutationen im *bcr/abl*-Gen kommt es bei einem Teil der Patienten zu einem Rezidiv der CML-Erkrankung und unter Umständen zu einer Resistenz gegenüber den Tyrosinkinase-Inhibitoren, was eine weitere Behandlung der CML zusätzlich erschwert (Mahon et al., 2010). Der Rückfall der Patienten wird durch leukämische Zellen verursacht, die unter der Therapie im Knochenmark persistieren und von den Tyrosinkinase-Inhibitoren nicht vollständig beseitigt werden können (S. M. Graham et al., 2002; Holyoake et al., 1999).

### 4.1 Modellsystem der ruhenden persistierenden leukämischen Progenitorzellen

Die persistierenden leukämischen Zellen besitzen eine Vielzahl von Zellbiologischen Eigenschaften, die eine Resistenz gegenüber der Therapie mit Tyrosinkinase-Inhibitoren vermitteln. Die aktuellen Modelle der leukämischen Progenitorzellen deuten auf einen Ruhezustand hin, der die Zellen vor der Behandlung mit TKI schützt, wobei es dennoch unter bestimmten Umständen zu einer proliferativen Aktivierung und Differenzierung dieser Zellen kommt, und sie somit wieder gegenüber TKI sensitiv werden (Horn et al., 2008; Roeder et al., 2006). Zum einen sind diese Zellen unabhängig von der Aktivität der BCR-ABL-Tyrosinkinase, weshalb sie durch TKI nicht zerstört werden können und zum anderen besitzen sie die Möglichkeit, jederzeit nach Absetzen der Therapie oder den Erwerb von Mutationen erneut zu proliferieren.

## **4.2 TKI-vermittelte Induktion der Expression von ABCA3 und SALL4 als Resistenzmechanismus in CML-Zellen**

Aus den Vorarbeiten ging bereits hervor, dass der ABC-Transporter ABCA3 in leukämischen Zellen von AML- und CML-Patienten hochexprimiert vorkommt und, dass es eine große Variabilität der Expressionslevel zwischen den verschiedenen Patienten gibt (Chapuy et al., 2008; Chapuy et al., 2009; Efferth et al., 2006; Steinbach et al., 2006).

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass eine Behandlung der CML-Zelllinien BV173, K562 und LAMA-84 sowie von primären CD34-positiven CML-Zellen zu einer Steigerung der Expression des Resistenz-vermittelnden ABC-Transporters A3 und des Transkriptionsfaktors SALL4 führt (vgl. **3.1.5; 3.1.6; 3.2**). Diese TKI-vermittelte Induktion der ABCA3-Expression konnten wir auch für nicht maligne transformierte CD34-positive Zellen von gesunden Probanden zeigen (vgl. **3.1.7**). Die Bedeutung von ABCA3 bei der TKI-Resistenz von CML-Zellen wurde in unseren Untersuchungen besonders deutlich, nachdem wir einen stabilen Knockdown mittels lentiviraler shRNA in den CML-Zellen erreicht hatten (vgl. **3.1.1**). Die reduzierte ABCA3-Expression führte zu einer signifikant erhöhten TKI-Suszeptibilität gemessen anhand der Viabilität sowie der Klonogenität der transfizierten Zellen (vgl. **3.1.2, 3.1.3**). Dies konnten wir sowohl für die verwendeten CML-Zelllinien, als auch für primäre Zellen von CML-Patienten zeigen.

Bei der Untersuchung möglicher Regulatoren von ABCA3 sind wir auf den Transkriptionsfaktor SALL4 gestoßen, der ursprünglich als ein Regulator bei der Selbsterneuerung und Erhaltung von embryonalen Stammzellen beschrieben, und dann auch in leukämischen Blasten von AML und CML exprimiert gefunden wurde (Lu et al., 2011; Yang et al., 2008). Dabei war die Expression von SALL4 mit einer erhöhten Proliferationsfähigkeit und reduzierter Apoptoserate der leukämischen Zellen verbunden. Außerdem wurde bereits eine Resistenz gegenüber Chemotherapeutika durch erhöhte Expression von SALL4 in AML-Blasten nachgewiesen (Jeong et al., 2011; Yang et al., 2008). SALL4 reguliert die Expression von ABCA3 auf transkriptionaler Ebene, indem es an den ABCA3-Promotor bindet und somit den intra-leukämischen Anteil von leukämischen Side Population-Zellen Modifiziert (Jeong et al., 2011).

In unseren Untersuchungen korrelierten die Expressionsniveaus von ABCA3 und SALL4 positiv (vgl. 3.2). Nachdem wir SALL4 mittels lentiviralen Knockdowns reduziert hatten, zeigte sich in den so transfizierten CML-Zelllinien zum einen eine signifikante Reduktion der ABCA3-Expression (vgl. 3.2.1) und zum anderen ein vergleichbarer Effekt bei der TKI-Suszeptibilität wie nach dem Knockdown von ABCA3 (vgl. 3.2.2). Das Ergebnis der reduzierten ABCA3-Expression nach SALL4-Knockdown bestätigte den bereits nachgewiesenen Zusammenhang von SALL4 als Transkriptionsfaktor von ABCA3. Es zeigte sich außerdem in unseren Experimenten, dass durch die TKI-vermittelte Induktion der SALL4/ABCA3-Kaskade sowie durch Überexpression von ABCA3 die CML-Zellen vor den zytotoxischen Effekten dieser Medikamente geschützt werden können (vgl. 3.3)..

Die Identifizierung von SALL4 als regulierenden Transkriptionsfaktor von ABCA3 bei der TKI-Resistenz persistierender leukämischer Zellen sowie die Erkenntnis der TKI-vermittelten Stabilisierung der Stammzeleigenschaften von leukämischen Progenitorzellen könnte zu einem besseren Verständnis der Pathologie und einer Verbesserung der klinischen Behandlung von CML-Patienten beitragen.

### **4.3 Stabilisierung des Resistenzmechanismus von TKI-behandelten CML-Stammzellen**

Die aktuellen Modelle der „ruhenden“ CML-Stammzellen stimmen sowohl mit der klinischen Beobachtung eines zweiphasigen Rückgangs beim Nachweis von BCR-ABL-Transkripten überein, wie auch mit dem rapiden Wiederauftreten der Erkrankung durch erneute Proliferation der leukämischen Zellen nach Absetzen oder Unterbrechung der Imatinib-Behandlung (Roeder et al., 2006). Die in dieser Arbeit gezeigten Daten deuten auf eine Stabilisierung des Resistenzmechanismus der TKI-behandelten CML-Stammzellen in ihrem Ruhezustand hin, was dazu führt, dass der Übergang in das TKI-sensitive Stadium während der Therapie verzögert wird. Dieser TKI-vermittelte Mechanismus könnte die Resistenz der persistierenden Leukämie-initiiierenden Zellen erklären und gibt Aufschluss darüber, warum es unter kontinuierlicher TKI-Behandlung zunächst zu einer initial raschen Abnahme der TKI-sensitiven Zellen, jedoch danach zu einer vergleichsweise langsamen und unvollständigen Eliminierung von Progenitorzellen

kommt. Der hier vorgestellte Zusammenhang von ABCA3 und SALL4 bei der Resistenzentwicklung gegenüber den zytotoxischen Effekten von TKI könnte somit durch eine gezielte Unterbrechung des ABCA3/SALL4-Signalwegs zu einer signifikant verkürzten zweiten Phase der CML-Behandlung führen.

Während der Untersuchungen des Zusammenhangs von SALL4- und ABCA3-Expression konnten wir außerdem beobachten, dass es auch nach lentiviralem Knockdown von SALL4 in den verwendeten CML-Zelllinien noch zu einer gesteigerten ABCA3-Expression unter TKI-Behandlung gekommen ist (vgl. **3.5**). Dieser Anstieg erfolgte jedoch vergleichsweise gering, im Gegensatz zu CML-Zellen ohne SALL4-Knockdown. Die verringerte Induktion von ABCA3 durch TKI-Behandlung könnte an der, aufgrund des SALL4-Knockdowns stark verringerten ABCA3-Expression liegen. Da SALL4 in diesen Zelllinien nur noch wenig exprimiert wird, findet auch keine wesentliche Aktivierung der ABCA3-Expression mehr statt. Die SALL4/ABCA3-Kaskade ist somit gestört. Es könnten aber auch noch weitere Transkriptionsregulatoren außer SALL4 bei der TKI-vermittelten Steigerung der ABCA3-Expression eine Rolle spielen, sodass der Resistenzmechanismus durch den Knockdown von SALL4 nicht vollständig unterbrochen wurde.

Tatsächlich gibt es im Promotor von ABCA3 eine Reihe von spezifischen Sequenzen möglicher Transkriptionsfaktoren, die für die Regulation der ABCA3-Expression verantwortlich sind, wie es durch Analyse der ABCA3-Promotorsequenz bereits gezeigt werden konnte (Besnard et al., 2007; Jeong et al., 2011). Daher kann man davon ausgehen, dass SALL4 und noch weitere Transkriptionsfaktoren (z.B. FoxO3) bei den ABCA3-vermittelten und anderen TKI-vermittelten Resistenzmechanismen miteinander verknüpft sind (Fernandez de Mattos et al., 2004). In dieser Arbeit wurde die Untersuchung auf ABCA3 als ABC-Transporter der Leukämie-Stammzellen fokussiert, da es bei den anderen putativen ABC-Transportern (z.B. ABCG2 und ABCB1), die an der TKI-Resistenz beteiligt sein könnten (Burger et al., 2004; Davies et al., 2009; Dohse et al., 2010; Hiwase et al., 2010; Houghton et al., 2004; Nakanishi et al., 2006), zu keinen relevanten Änderungen in der Expression gekommen ist. Im Rahmen dieser Arbeit konnte außerdem gezeigt werden, dass die regulatorischen Mechanismen der ABCA3-Expression zumindest nicht unmittelbar mit der Funktion des BCR-ABL-



Proteins verbunden sind, da der TKI-induzierte Anstieg der ABCA3-Expression sowohl in BCR-ABL-positiven leukämischen Zellen, als auch in Zellen des peripheren Bluts von GIST-Patienten *in vivo* (vgl. **Abbildung 15**) und auch in nicht-transformierten CD34-positiven hämatopoetischen Stammzellen *in vitro* gezeigt werden konnte (vgl. **3.1.7**). Daher kann davon ausgegangen werden, dass die in dieser Arbeit verwendeten TKI auch noch andere Kinasen steuern, die wiederum an der regulatorischen Aktivierung von SALL4 und/oder ABCA3 beteiligt sind.

#### **4.4 BCR-ABL-Abhängigkeit der SALL4 und ABCA3-Expression**

Der SALL4/ABCA3-Signalweg ist hauptsächlich in CD34-positiven Progenitorzellen aktiv, was für einen BCR-ABL unabhängigen TKI-Resistenzmechanismus der CML-Stammzellen sprechen würde, wofür es bereits experimentelle und klinische Untersuchungen gegeben hat (Corbin et al., 2011; Hamilton et al., 2012). In dieser Arbeit konnten wir aber erstmals auch zeigen, dass eine ektopische Expression von BCR-ABL in den AML-Zelllinien HL60 und MO7, die unter natürlichen Umständen kein BCR-ABL besitzen, eine vermehrte Expression von ABCA3 und SALL4 (vgl. **3.6** und **3.7**) bewirkt. Außerdem kam es infolgedessen zu einer erhöhten Resistenz dieser Zelllinien gegenüber den Zytostatika Doxorubizin, Vinblastin und Vincristin (vgl. **3.8**). Somit ist ein Zusammenhang von BCR-ABL und der SALL4-ABCA3-Kaskade zu vermuten, der vermutlich aufgrund des Zusammenhangs von BCR/ABL mit dem JAK/STAT-Signalweg besteht und im nächsten Abschnitt genauer beschrieben wird.

#### **4.5 Indomethacin und Rapamycin als Inhibitoren der SALL4/ABCA3-Kaskade**

Eine pharmakologische Störung der SALL4/ABCA3-Kaskade, wie es im Rahmen dieser Arbeit bereits *in vitro* gezeigt werden konnte, könnte auch im klinischen Bereich zu einer Verbesserung der CML-Therapie durch Erhöhung der Suszeptibilität leukämischer Zellen gegenüber den zytotoxischen TKI-Effekten führen. Als eine mögliche pharmakologische Substanz zur Inhibition des

SALL4/ABCA3-Signalwegs hat sich Indomethacin, ein Analgetikum aus der Gruppe der nichtsteroidalen Antirheumatika und nicht-selektiver Inhibitor der Cyclooxygenasen (COX-1 und COX-2), erwiesen. Indomethacin zeigte in unseren Untersuchungen, dass es die ABCA3-Expression auf transkriptionaler Ebene unterdrückt (vgl. **3.4.1**) und dementsprechend einen ähnlich positiven Effekt auf die TKI-Suszeptibilität der CML-Zellen hatte, wie der Knockdown von ABCA3 oder SALL4 (vgl. **3.4.2**). In einer Studie zeigte Indomethacin bereits, dass es durch die Inhibition von Komponenten des STAT/Bcl-X(L) Signalwegs zu anti-proliferativen und pro-apoptischen Effekten geführt hat (Zhang & Fu, 2006). Zudem gibt es bereits Daten, die darauf hindeuten, dass die Expression von SALL4 über den Signaltransduktor und Aktivator der Transkription 3 (STAT3) reguliert wird (Bard et al., 2009). Der Transkriptionsfaktor STAT3 wiederum ist in CML-Zellen ein Target-Protein der BCR-ABL-Tyrosinkinase und wird von dieser Kinase durch Phosphorylierung aktiviert (Coppo et al., 2006). Somit könnte durch den zusätzlichen Einsatz von Indomethacin bei der CML-Therapie mit TKI eine Unterbrechung des STAT-Signalwegs erreicht werden, der unter anderem durch BCR-ABL aktiviert wird und somit die SALL4/ABCA3-Kaskade unterbrochen werden. Ein vergleichbarer Effekt zeigte sich außerdem für Rapamycin. Rapamycin ist ein Immunsuppressivum und Inhibitor von mTOR (engl. *mammalian target of rapamycin*) sowie ein Induktor der Autophagie. Rapamycin findet aufgrund seiner anti-proliferativen Effekte bereits Anwendung in der Tumorbehandlung. Es stellte sich ebenfalls bereits als ein Inhibitor der ABCA3-Expression heraus. Durch die Inhibition von mTOR wird die Phosphorylierung von STAT3 gehemmt, was infolgedessen zu einer verringerten Expression von SALL4 und damit verbunden zu einer Reduktion der ABCA3-Expression führt (Efferth et al., 2006). In unseren Experimenten zeigte sich für Rapamycin ein ähnlich positiver Effekt auf die TKI-Suszeptibilität wie bei Indomethacin (vgl. **3.4.3**). Außerdem konnte ebenso gezeigt werden, dass es auch zu einer verringerten Expression von ABCA3 sowie SALL4 durch die Behandlung von CML-Zellen mit Rapamycin gekommen ist.

Zusammenfassend ergibt sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit folgendes Modell der Rolle von ABCA3 und SALL4 in der Therapieresistenz gegenüber TKI bei der CML:

Bei einer kleinen Untergruppe von CML-Zellen führt die Therapie mit Tyrosinkinase-Inhibitoren zu einem starken Anstieg der SALL4-Expression, was als Konsequenz eine Hochregulation der ABCA3-Expression zur Folge hat. Das dadurch erhöhte ABCA3-Expressionslevel erleichtert damit die Detoxifizierung der Tyrosinkinase-Inhibitoren in den CML-Zellen. Somit werden die leukämischen Stammzellen vor den zytotoxischen Effekten der TKI geschützt. Während die Mehrheit der klonalen CML-Zellen im Zuge der Therapie eliminiert wird, schützt die Aktivierung des SALL4/ABCA3-Signalweges durch TKI die CML-Stammzellen. Der SALL4/ABCA3-Signalweg kann durch Inhibitoren (z.B. Indomethacin und Rapamycin) unterbrochen und somit die Stabilisierung der CML-Stammzellen aufgehoben werden (siehe Schema, **Abbildung 27**).

### **4.6 Mikrovesikel als TKI-Sekretionsmechanismus**

In den Vorarbeiten zu dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass radioaktiv-markiertes [14C]-Imatinib zunächst in den Lysosomen von CML-Zellen akkumulierte und im weiteren Verlauf extrazellulär nachzuweisen war (Chapuy et al., 2009). Dies führte uns zu der Fragestellung, welcher Mechanismus für die Sekretion von TKI verantwortlich ist, und ob es im Hinblick auf Mikrovesikel einen möglichen Weg der Detoxifizierung gibt. Tatsächlich konnten wir mittels Elektronenmikroskopie-Aufnahmen von Mikrovesikel-Präparationen aus K-562-Zellen nachweisen, dass Mikrovesikel von CML-Zellen abgeschieden werden und, dass diese sich mit einem Durchmesser von 200 – 1000 nm von den deutlich kleineren Exosomen unterscheiden (vgl. **3.9**). Bisher wurden bereits umfangreiche Untersuchungen zur Bedeutung von Exosomen bei der Therapie von B-Zell-Lymphomen durchgeführt (Aung et al., 2011). In diesen Untersuchungen war ein Zusammenhang von ABCA3-Expression und Exosomenproduktion nachgewiesen worden. Wenngleich auch in dieser Arbeit Exosomen im Überstand von CML-Zellen nachzuweisen waren, war der Anteil des vesikulär gebundenen Imatinibs in den Exosomen deutlich niedriger als in den

Mikrovesikeln und spielte für die TKI-Detoxifizierung der CML-Zellen keine nennenswerte Rolle. Der Nachweis von Mikrovesikeln könnte jedoch ein möglicher Mechanismus zum Efflux von TKI in CML-Zellen sein.

Die Verwendung von [14C]-Imatinib ermöglichte es uns, den Mechanismus der Sequestration und Sekretion genauer zu untersuchen. Dabei stellte sich heraus, dass es nach der lysosomalen Sequestration zu einer Sekretion von [14C]-Imatinib durch Mikrovesikel gekommen ist (vgl. **3.10**), und der Anteil der sekretierten Mikrovesikel im Zeitraum zwischen 24 und 48 h deutlich zugenommen hatte. Diese Daten stimmen mit einer Studie aus dem Jahre 2005 überein, in der es bereits gezeigt werden konnte, dass es zu einer lysosomalen Akkumulation von Cisplatin in Ovarialkarzinom-Zellen kommt und das Medikament anschließend ebenfalls extrazellulär in Mikrovesikeln nachgewiesen werden konnte (Safaei et al., 2005).

#### **4.7 Mikrovesikel enthalten lysosomale Markerproteine**

Nachdem der Nachweis von Mikrovesikeln als Transportvehikel zum Efflux von radioaktiv-markiertem [14C]-Imatinib aus den CML-Zellen erbracht worden war, wurde die Zusammensetzung der Mikrovesikel auf Proteinebene mittels Western Blot untersucht. Dabei zeigte sich für alle untersuchten CML-Zelllinien, dass die Mikrovesikel lysosomale Markerproteine enthielten. Es konnten dabei die beiden Proteine LAMP1 und LAMP2 (engl. *Lysosomal-associated membrane protein, LAMP*) mittels Western Blot nachgewiesen werden, die auf einen lysosomalen Ursprung der Mikrovesikel hindeuten. Diese Ergebnisse sind vereinbar mit einer Ausscheidung des Imatinibs aus den CML-Zellen kompartimentiert in Lysosomen oder Lysosomen-verwandten Organellen. Für diese Form der sezernierten Mikrovesikel lysosomalen Ursprungs war der Begriff der sekretorischen Lysosomen (engl. *secretory lysosomes*) geprägt worden (Blott & Griffiths, 2002; Griffiths, 2002). Als Perspektive dieser Arbeit bleibt zu untersuchen, ob durch eine gezielte Beeinflussung dieses lysosomalen Sekretionswegs die intrazelluläre, im Zytoplasma wirksame Konzentration von TKI erhöht werden kann, und damit eine vermehrte zytotoxische Aktivität der TKI erreicht werden kann.

## Literaturverzeichnis

Abelson, H. T., & Rabstein, L. S. (1970). Influence of prednisolone on Moloney leukemogenic virus in BALB-c mice. *Cancer Res*, 30(8), 2208-2212.

Aiello, L., Guilfoyle, R., Huebner, K., & Weinmann, R. (1979). Adenovirus 5 DNA sequences present and RNA sequences transcribed in transformed human embryo kidney cells (HEK-Ad-5 or 293). *Virology*, 94(2), 460-469.

Aung, T., Chapuy, B., Vogel, D., Wenzel, D., Oppermann, M., Lahmann, M., Weinhage, T., Menck, K., Hupfeld, T., Koch, R., Trumper, L., & Wulf, G. G. (2011). Exosomal evasion of humoral immunotherapy in aggressive B-cell lymphoma modulated by ATP-binding cassette transporter A3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(37), 15336-15341.

Avanzi, G. C., Lista, P., Giovinazzo, B., Miniero, R., Saglio, G., Benetton, G., Coda, R., Cattoretti, G., & Pegoraro, L. (1988). Selective growth response to IL-3 of a human leukaemic cell line with megakaryoblastic features. *Br J Haematol*, 69(3), 359-366.

Bard, J. D., Gelebart, P., Amin, H. M., Young, L. C., Ma, Y., & Lai, R. (2009). Signal transducer and activator of transcription 3 is a transcriptional factor regulating the gene expression of SALL4. *FASEB J*, 23(5), 1405-1414.

Bartram, C. R., de Klein, A., Hagemeijer, A., van Agthoven, T., van Kessel, A. G., Bootsma, D., Grosveld, G., Ferguson-Smith, M. A., Davies, T., Stone, M., Heisterkamp, N., Stephenson, J. R., & Groffen, J. (1983). Translocation of c-abl oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature*, 306(5940), 277-280.

Ben-Neriah, Y., Daley, G. Q., Mes-Masson, A. M., Witte, O. N., & Baltimore, D. (1986). The chronic myelogenous leukemia-specific P210 protein is the product of the bcr/abl hybrid gene. *Science*, 233(4760), 212-214.

Besnard, V., Xu, Y., & Whitsett, J. A. (2007). Sterol response element binding protein and thyroid transcription factor-1 (Nkx2.1) regulate Abca3 gene expression. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 293(6), L1395-1405.

Bewry, N. N., Nair, R. R., Emmons, M. F., Boulware, D., Pinilla-Ibarz, J., & Hazlehurst, L. A. (2008). Stat3 contributes to resistance toward BCR-ABL inhibitors in a bone marrow microenvironment model of drug resistance. *Mol Cancer Ther*, 7(10), 3169-3175.

Bhatia, R., Holtz, M., Niu, N., Gray, R., Snyder, D. S., Sawyers, C. L., Arber, D. A., Slovak, M. L., & Forman, S. J. (2003). Persistence of malignant hematopoietic progenitors in chronic myelogenous leukemia patients in complete cytogenetic remission following imatinib mesylate treatment. *Blood*, 101(12), 4701-4707.

Blott, E. J., & Griffiths, G. M. (2002). Secretory lysosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3(2), 122-131.

Bonnet, D., & Dick, J. E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*, 3(7), 730-737.

Bradley, G., Juranka, P. F., & Ling, V. (1988). Mechanism of multidrug resistance. *Biochim Biophys Acta*, 948(1), 87-128.

Bruce, W. R., & Van Der Gaag, H. (1963). A Quantitative Assay for the Number of Murine Lymphoma Cells Capable of Proliferation in Vivo. *Nature*, 199, 79-80.

Burger, H., van Tol, H., Boersma, A. W., Brok, M., Wiemer, E. A., Stoter, G., & Nooter, K. (2004). Imatinib mesylate (STI571) is a substrate for the breast cancer resistance protein (BCRP)/ABCG2 drug pump. *Blood*, 104(9), 2940-2942.

Canaani, E., Gale, R. P., Steiner-Saltz, D., Berrebi, A., Aghai, E., & Januszewicz, E. (1984). Altered transcription of an oncogene in chronic myeloid leukaemia. *Lancet*, 1(8377), 593-595.

Chapuy, B., Koch, R., Radunski, U., Corsham, S., Cheong, N., Inagaki, N., Ban, N., Wenzel, D., Reinhardt, D., Zapf, A., Schweyer, S., Kosari, F., Klapper, W., Truemper, L., & Wulf, G. G. (2008). Intracellular ABC transporter A3 confers multidrug resistance in leukemia cells by lysosomal drug sequestration. *Leukemia*, 22(8), 1576-1586.

Chapuy, B., Panse, M., Radunski, U., Koch, R., Wenzel, D., Inagaki, N., Haase, D., Truemper, L., & Wulf, G. G. (2009). ABC transporter A3 facilitates lysosomal sequestration of imatinib and modulates susceptibility of chronic myeloid leukemia cell lines to this drug. *Haematologica*, 94(11), 1528-1536.

Cheong, N., Madesh, M., Gonzales, L. W., Zhao, M., Yu, K., Ballard, P. L., & Shuman, H. (2006). Functional and trafficking defects in ATP binding cassette A3 mutants associated with respiratory distress syndrome. *J Biol Chem*, 281(14), 9791-9800.

Chu, S., McDonald, T., Lin, A., Chakraborty, S., Huang, Q., Snyder, D. S., & Bhatia, R. (2011). Persistence of leukemia stem cells in chronic myelogenous leukemia patients in prolonged remission with imatinib treatment. *Blood*, 118(20), 5565-5572.

Chu, S., Xu, H., Shah, N. P., Snyder, D. S., Forman, S. J., Sawyers, C. L., & Bhatia, R. (2005). Detection of BCR-ABL kinase mutations in CD34+ cells from chronic myelogenous leukemia patients in complete cytogenetic remission on imatinib mesylate treatment. *Blood*, 105(5), 2093-2098.

Cocucci, E., Racchetti, G., & Meldolesi, J. (2009). Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol*, 19(2), 43-51.

Coppo, P., Flamant, S., De Mas, V., Jarrier, P., Guillier, M., Bonnet, M. L., Lacout, C., Guilhot, F., Vainchenker, W., & Turhan, A. G. (2006). BCR-ABL activates STAT3 via JAK and MEK pathways in human cells. *Br J Haematol*, 134(2), 171-179.

Corbin, A. S., Agarwal, A., Loriaux, M., Cortes, J., Deininger, M. W., & Druker, B. J. (2011). Human chronic myeloid leukemia stem cells are insensitive to imatinib despite inhibition of BCR-ABL activity. *J Clin Invest*, *121*(1), 396-409.

Cortes, J., O'Brien, S., & Kantarjian, H. (2004). Discontinuation of imatinib therapy after achieving a molecular response. *Blood*, *104*(7), 2204-2205.

Daley, G. Q., Van Etten, R. A., & Baltimore, D. (1990). Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science*, *247*(4944), 824-830.

Davies, A., Jordanides, N. E., Giannoudis, A., Lucas, C. M., Hatzieremia, S., Harris, R. J., Jorgensen, H. G., Holyoake, T. L., Pirmohamed, M., Clark, R. E., & Mountford, J. C. (2009). Nilotinib concentration in cell lines and primary CD34(+) chronic myeloid leukemia cells is not mediated by active uptake or efflux by major drug transporters. *Leukemia*, *23*(11), 1999-2006.

Dean, M., Hamon, Y., & Chimini, G. (2001). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res*, *42*(7), 1007-1017.

Del Conde, I., Shrimpton, C. N., Thiagarajan, P., & Lopez, J. A. (2005). Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood*, *106*(5), 1604-1611.

Denizot, F., & Lang, R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods*, *89*(2), 271-277.

Dohse, M., Scharenberg, C., Shukla, S., Robey, R. W., Volkmann, T., Deeken, J. F., Brendel, C., Ambudkar, S. V., Neubauer, A., & Bates, S. E. (2010). Comparison of ATP-binding cassette transporter interactions with the tyrosine kinase inhibitors imatinib, nilotinib, and dasatinib. *Drug Metab Dispos*, *38*(8), 1371-1380.

Druker, B. J., Guilhot, F., O'Brien, S. G., Gathmann, I., Kantarjian, H., Gattermann, N., Deininger, M. W., Silver, R. T., Goldman, J. M., Stone, R. M., Cervantes, F., Hochhaus, A., Powell, B. L., Gabilove, J. L., Rousselot, P., Reiffers, J., Cornelissen, J. J., Hughes, T., Agis, H., Fischer, T., Verhoef, G., Shepherd, J., Saglio, G., Gratwohl, A., Nielsen, J. L., Radich, J. P., Simonsson, B., Taylor, K., Baccarani, M., So, C., Letvak, L., & Larson, R. A. (2006). Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*, *355*(23), 2408-2417.

Druker, B. J., Sawyers, C. L., Kantarjian, H., Resta, D. J., Reese, S. F., Ford, J. M., Capdeville, R., & Talpaz, M. (2001). Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med*, *344*(14), 1038-1042.

Druker, B. J., Talpaz, M., Resta, D. J., Peng, B., Buchdunger, E., Ford, J. M., Lydon, N. B., Kantarjian, H., Capdeville, R., Ohno-Jones, S., & Sawyers, C. L. (2001). Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*, *344*(14), 1031-1037.



Druker, B. J., Tamura, S., Buchdunger, E., Ohno, S., Segal, G. M., Fanning, S., Zimmermann, J., & Lydon, N. B. (1996). Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med*, 2(5), 561-566.

Efferth, T., Gillet, J. P., Sauerbrey, A., Zintl, F., Bertholet, V., de Longueville, F., Remacle, J., & Steinbach, D. (2006). Expression profiling of ATP-binding cassette transporters in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Mol Cancer Ther*, 5(8), 1986-1994.

Faderl, S., Talpaz, M., Estrov, Z., O'Brien, S., Kurzrock, R., & Kantarjian, H. M. (1999). The biology of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 341(3), 164-172.

Fernandez de Mattos, S., Essafi, A., Soeiro, I., Pietersen, A. M., Birkenkamp, K. U., Edwards, C. S., Martino, A., Nelson, B. H., Francis, J. M., Jones, M. C., Brosens, J. J., Coffey, P. J., & Lam, E. W. (2004). FoxO3a and BCR-ABL regulate cyclin D2 transcription through a STAT5/BCL6-dependent mechanism. *Mol Cell Biol*, 24(22), 10058-10071.

Fialkow, P. J., Gartler, S. M., & Yoshida, A. (1967). Clonal origin of chronic myelocytic leukemia in man. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 58(4), 1468-1471.

Gallagher, R., Collins, S., Trujillo, J., McCredie, K., Ahearn, M., Tsai, S., Metzgar, R., Aulakh, G., Ting, R., Ruscetti, F., & Gallo, R. (1979). Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 54(3), 713-733.

Gewirtz, A. M. (1992). Therapeutic applications of antisense DNA in the treatment of human leukemia. *Ann N Y Acad Sci*, 660, 178-187.

Ginestra, A., Miceli, D., Dolo, V., Romano, F. M., & Vittorelli, M. L. (1999). Membrane vesicles in ovarian cancer fluids: a new potential marker. *Anticancer Res*, 19(4C), 3439-3445.

Gorre, M. E., Mohammed, M., Ellwood, K., Hsu, N., Paquette, R., Rao, P. N., & Sawyers, C. L. (2001). Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science*, 293(5531), 876-880.

Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., & Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, 36(1), 59-74.

Graham, S. M., Jorgensen, H. G., Allan, E., Pearson, C., Alcorn, M. J., Richmond, L., & Holyoake, T. L. (2002). Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro. *Blood*, 99(1), 319-325.

Griffin, J. D., & Lowenberg, B. (1986). Clonogenic cells in acute myeloblastic leukemia. *Blood*, 68(6), 1185-1195.

Griffiths, G. (2002). What's special about secretory lysosomes? *Semin Cell Dev Biol*, 13(4), 279-284.

- Groffen, J., Stephenson, J. R., Heisterkamp, N., de Klein, A., Bartram, C. R., & Grosveld, G. (1984). Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell*, *36*(1), 93-99.
- Gros, P., Ben Neriah, Y. B., Croop, J. M., & Housman, D. E. (1986). Isolation and expression of a complementary DNA that confers multidrug resistance. *Nature*, *323*(6090), 728-731.
- Hamburger, A. W., & Salmon, S. E. (1977). Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science*, *197*(4302), 461-463.
- Hamilton, A., Helgason, G. V., Schemionek, M., Zhang, B., Myssina, S., Allan, E. K., Nicolini, F. E., Muller-Tidow, C., Bhatia, R., Brunton, V. G., Koschmieder, S., & Holyoake, T. L. (2012). Chronic myeloid leukemia stem cells are not dependent on Bcr-Abl kinase activity for their survival. *Blood*, *119*(6), 1501-1510.
- Hehlmann, R., Hochhaus, A., & Baccarani, M. (2007). Chronic myeloid leukaemia. *Lancet*, *370*(9584), 342-350.
- Hehlmann, R., Jung-Munkwitz, S., & Saussele, S. (2011). Treatment of chronic myeloid leukemia when imatinib fails. *Expert Opin Pharmacother*, *12*(2), 269-283.
- Heisterkamp, N., Jenster, G., ten Hoeve, J., Zovich, D., Pattengale, P. K., & Groffen, J. (1990). Acute leukaemia in bcr/abl transgenic mice. *Nature*, *344*(6263), 251-253.
- Hirschmann-Jax, C., Foster, A. E., Wulf, G. G., Goodell, M. A., & Brenner, M. K. (2005). A distinct "side population" of cells in human tumor cells: implications for tumor biology and therapy. *Cell Cycle*, *4*(2), 203-205.
- Hirschmann-Jax, C., Foster, A. E., Wulf, G. G., Nuchtern, J. G., Jax, T. W., Gobel, U., Goodell, M. A., & Brenner, M. K. (2004). A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(39), 14228-14233.
- Hiwase, D. K., White, D. L., Powell, J. A., Saunders, V. A., Zrim, S. A., Frede, A. K., Guthridge, M. A., Lopez, A. F., D'Andrea, R. J., To, L. B., Melo, J. V., Kumar, S., & Hughes, T. P. (2010). Blocking cytokine signaling along with intense Bcr-Abl kinase inhibition induces apoptosis in primary CML progenitors. *Leukemia*, *24*(4), 771-778.
- Hochhaus, A., Kreil, S., Corbin, A., La Rosee, P., Lahaye, T., Berger, U., Cross, N. C., Linkesch, W., Druker, B. J., Hehlmann, R., Gambacorti-Passerini, C., Corneo, G., & D'Incalci, M. (2001). Roots of clinical resistance to STI-571 cancer therapy. *Science*, *293*(5538), 2163.
- Holyoake, T., Jiang, X., Eaves, C., & Eaves, A. (1999). Isolation of a highly quiescent subpopulation of primitive leukemic cells in chronic myeloid leukemia. *Blood*, *94*(6), 2056-2064.
- Horn, M., Loeffler, M., & Roeder, I. (2008). Mathematical modeling of genesis and treatment of chronic myeloid leukemia. *Cells Tissues Organs*, *188*(1-2), 236-247.

Houghton, P. J., Germain, G. S., Harwood, F. C., Schuetz, J. D., Stewart, C. F., Buchdunger, E., & Traxler, P. (2004). Imatinib mesylate is a potent inhibitor of the ABCG2 (BCRP) transporter and reverses resistance to topotecan and SN-38 in vitro. *Cancer Res*, *64*(7), 2333-2337.

Iero, M., Valenti, R., Huber, V., Filipazzi, P., Parmiani, G., Fais, S., & Rivoltini, L. (2008). Tumour-released exosomes and their implications in cancer immunity. *Cell Death Differ*, *15*(1), 80-88.

Jeong, H. W., Cui, W., Yang, Y., Lu, J., He, J., Li, A., Song, D., Guo, Y., Liu, B. H., & Chai, L. (2011). SALL4, a stem cell factor, affects the side population by regulation of the ATP-binding cassette drug transport genes. *PLoS One*, *6*(4), e18372.

Kantarjian, H., Shah, N. P., Hochhaus, A., Cortes, J., Shah, S., Ayala, M., Moiraghi, B., Shen, Z., Mayer, J., Pasquini, R., Nakamae, H., Huguet, F., Boque, C., Chuah, C., Bleickardt, E., Bradley-Garelik, M. B., Zhu, C., Szatrowski, T., Shapiro, D., & Baccarani, M. (2010). Dasatinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*, *362*(24), 2260-2270.

Konopka, J. B., Watanabe, S. M., & Witte, O. N. (1984). An alteration of the human c-abl protein in K562 leukemia cells unmasks associated tyrosine kinase activity. *Cell*, *37*(3), 1035-1042.

Lange, W., Cantin, E. M., Finke, J., & Dolken, G. (1993). In vitro and in vivo effects of synthetic ribozymes targeted against BCR/ABL mRNA. *Leukemia*, *7*(11), 1786-1794.

Lelievre, H., Ferrand, A., Mozziconacci, M. J., Birnbaum, D., & Delaval, B. (2006). Myeloproliferative disorders: premalignant, stem cell, G1 diseases? *Leukemia*, *20*(9), 1475-1480.

Lozzio, C. B., & Lozzio, B. B. (1975). Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood*, *45*(3), 321-334.

Lu, J., Ma, Y., Kong, N., Alipio, Z., Gao, C., Krause, D. S., Silberstein, L. E., & Chai, L. (2011). Dissecting the role of SALL4, a newly identified stem cell factor, in chronic myelogenous leukemia. *Leukemia*, *25*(7), 1211-1213.

Ma, Y., Cui, W., Yang, J., Qu, J., Di, C., Amin, H. M., Lai, R., Ritz, J., Krause, D. S., & Chai, L. (2006). SALL4, a novel oncogene, is constitutively expressed in human acute myeloid leukemia (AML) and induces AML in transgenic mice. *Blood*, *108*(8), 2726-2735.

Mack, M., Kleinschmidt, A., Bruhl, H., Klier, C., Nelson, P. J., Cihak, J., Plachy, J., Stangassinger, M., Erfle, V., & Schlondorff, D. (2000). Transfer of the chemokine receptor CCR5 between cells by membrane-derived microparticles: a mechanism for cellular human immunodeficiency virus 1 infection. *Nat Med*, *6*(7), 769-775.

Mahon, F. X., Deininger, M. W., Schultheis, B., Chabrol, J., Reiffers, J., Goldman, J. M., & Melo, J. V. (2000). Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance. *Blood*, *96*(3), 1070-1079.

- Mahon, F. X., Rea, D., Guilhot, J., Guilhot, F., Huguet, F., Nicolini, F., Legros, L., Charbonnier, A., Guerci, A., Varet, B., Etienne, G., Reiffers, J., & Rouselot, P. (2010). Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. *Lancet Oncol*, *11*(11), 1029-1035.
- Muralidharan-Chari, V., Clancy, J. W., Sedgwick, A., & D'Souza-Schorey, C. (2010). Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *J Cell Sci*, *123*(Pt 10), 1603-1611.
- Mytar, B., Baj-Krzyworzeka, M., Majka, M., Stankiewicz, D., & Zembala, M. (2008). Human monocytes both enhance and inhibit the growth of human pancreatic cancer in SCID mice. *Anticancer Res*, *28*(1A), 187-192.
- Nakanishi, T., Shiozawa, K., Hassel, B. A., & Ross, D. D. (2006). Complex interaction of BCRP/ABCG2 and imatinib in BCR-ABL-expressing cells: BCRP-mediated resistance to imatinib is attenuated by imatinib-induced reduction of BCRP expression. *Blood*, *108*(2), 678-684.
- Nakano, T., Kodama, H., & Honjo, T. (1994). Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. *Science*, *265*(5175), 1098-1101.
- Nowell, P. C., & Hungerford, D. A. (1960). Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J Natl Cancer Inst*, *25*, 85-109.
- Park, C. H., Bergsagel, D. E., & McCulloch, E. A. (1971). Mouse myeloma tumor stem cells: a primary cell culture assay. *J Natl Cancer Inst*, *46*(2), 411-422.
- Pegoraro, L., Matera, L., Ritz, J., Levis, A., Palumbo, A., & Biagini, G. (1983). Establishment of a Ph1-positive human cell line (BV173). *J Natl Cancer Inst*, *70*(3), 447-453.
- Piccin, A., Murphy, W. G., & Smith, O. P. (2007). Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev*, *21*(3), 157-171.
- Roeder, I., Horn, M., Glauche, I., Hochhaus, A., Mueller, M. C., & Loeffler, M. (2006). Dynamic modeling of imatinib-treated chronic myeloid leukemia: functional insights and clinical implications. *Nat Med*, *12*(10), 1181-1184.
- Rowley, J. D. (1973). A New Consistent Chromosomal Abnormality in Chronic Myelogenous Leukaemia identified by Quinacrine Fluorescence and Giemsa Staining. *Nature*, *243*(5405), 290-293.
- Sabbath, K. D., & Griffin, J. D. (1985). Clonogenic cells in acute myeloblastic leukaemia. *Scand J Haematol*, *35*(3), 251-256.
- Safaei, R., Larson, B. J., Cheng, T. C., Gibson, M. A., Otani, S., Naerdemann, W., & Howell, S. B. (2005). Abnormal lysosomal trafficking and enhanced exosomal export of cisplatin in drug-resistant human ovarian carcinoma cells. *Mol Cancer Ther*, *4*(10), 1595-1604.

Saglio, G., Kim, D. W., Issaragrisil, S., le Coutre, P., Etienne, G., Lobo, C., Pasquini, R., Clark, R. E., Hochhaus, A., Hughes, T. P., Gallagher, N., Hoenekopp, A., Dong, M., Haque, A., Larson, R. A., & Kantarjian, H. M. (2010). Nilotinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 362(24), 2251-2259.

Salgia, R., Uemura, N., Okuda, K., Li, J. L., Pisick, E., Sattler, M., de Jong, R., Druker, B., Heisterkamp, N., Chen, L. B., & et al. (1995). CRKL links p210BCR/ABL with paxillin in chronic myelogenous leukemia cells. *J Biol Chem*, 270(49), 29145-29150.

Sattler, M., & Salgia, R. (1998). Role of the adapter protein CRKL in signal transduction of normal hematopoietic and BCR/ABL-transformed cells. *Leukemia*, 12(5), 637-644.

Sawyers, C. L. (1993). Molecular consequences of the BCR-ABL translocation in chronic myelogenous leukemia. *Leuk Lymphoma*, 11 Suppl 2, 101-103.

Seigneurin, D., Champelovier, P., Mouchiroud, G., Berthier, R., Leroux, D., Prenant, M., McGregor, J., Starck, J., Morle, F., Micouin, C., & et al. (1987). Human chronic myeloid leukemic cell line with positive Philadelphia chromosome exhibits megakaryocytic and erythroid characteristics. *Exp Hematol*, 15(8), 822-832.

Shedden, K., Xie, X. T., Chandaroy, P., Chang, Y. T., & Rosania, G. R. (2003). Expulsion of small molecules in vesicles shed by cancer cells: association with gene expression and chemosensitivity profiles. *Cancer Res*, 63(15), 4331-4337.

Shtivelman, E., Lifshitz, B., Gale, R. P., & Canaani, E. (1985). Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia. *Nature*, 315(6020), 550-554.

Shulenin, S., Noguee, L. M., Annilo, T., Wert, S. E., Whitsett, J. A., & Dean, M. (2004). ABCA3 gene mutations in newborns with fatal surfactant deficiency. *N Engl J Med*, 350(13), 1296-1303.

Skog, J., Wurdinger, T., van Rijn, S., Meijer, D. H., Gainche, L., Sena-Esteves, M., Curry, W. T., Jr., Carter, B. S., Krichevsky, A. M., & Breakefield, X. O. (2008). Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol*, 10(12), 1470-1476.

Song, J. H., Kim, S. H., Kim, H. J., Hwang, S. Y., & Kim, T. S. (2008). Alleviation of the drug-resistant phenotype in idarubicin and cytosine arabinoside double-resistant acute myeloid leukemia cells by indomethacin. *Int J Oncol*, 32(4), 931-936.

Steinbach, D., Gillet, J. P., Sauerbrey, A., Gruhn, B., Dawczynski, K., Bertholet, V., de Longueville, F., Zintl, F., Remacle, J., & Efferth, T. (2006). ABCA3 as a possible cause of drug resistance in childhood acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res*, 12(14 Pt 1), 4357-4363.

Taraboletti, G., D'Ascenzo, S., Borsotti, P., Giavazzi, R., Pavan, A., & Dolo, V. (2002). Shedding of the matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP

as membrane vesicle-associated components by endothelial cells. *Am J Pathol*, 160(2), 673-680.

Thiel, G., & Lietz, M. (2004). Regulator neuronaler Gene: Zinkfingerprotein REST. *Biologie in unserer Zeit*, 34(2), 96-101.

Till, J. E., & Mc, C. E. (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res*, 14, 213-222.

Vasiliou, V., Vasiliou, K., & Nebert, D. W. (2009). Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Hum Genomics*, 3(3), 281-290.

Wulf, G. G., Wang, R. Y., Kuehnle, I., Weidner, D., Marini, F., Brenner, M. K., Andreeff, M., & Goodell, M. A. (2001). A leukemic stem cell with intrinsic drug efflux capacity in acute myeloid leukemia. *Blood*, 98(4), 1166-1173.

Yang, J., Chai, L., Fowles, T. C., Alipio, Z., Xu, D., Fink, L. M., Ward, D. C., & Ma, Y. (2008). Genome-wide analysis reveals Sall4 to be a major regulator of pluripotency in murine-embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(50), 19756-19761.

Zhang, G., & Fu, Y. (2006). Antiproliferative effect of indomethacin on CML cells is related to the suppression of STATs/Bcl-XL signal pathway. *Ann Hematol*, 85(7), 443-449.

# Curriculum vitae

## PERSÖNLICHE DATEN

Name	Timo Hupfeld
Geburtsdatum	10.02.1981
Geburtsort	Rotenburg an der Fulda

## PROMOTION

06/2009 – 08/2012	Naturwissenschaftliche Doktorarbeit im Promotionsprogramm Molekulare Medizin - Abteilung Hämatologie und Onkologie - Universitätsmedizin Göttingen: „Bedeutung der subzellulären Sequestration und Sekretion von Tyrosinkinase-Inhibitoren für die Resistenz leukämischer Zellen bei der CML“
-------------------	--

## HOCHSCHULSTUDIUM

04/2008	Hochschulabschluss als Diplom-Biologe
05/2007 – 02/2008	Diplomarbeit am Deutschen Primatenzentrum in der Arbeitsgruppe Stammzellbiologie: „Expression und Charakterisierung des follicelstimulierenden Hormons und FSH-Rezeptors vom Weißbüschelaffen ( <i>Callithrix jacchus</i> ) <i>in vitro</i> “
02/2007	Biologie-Diplomprüfung • Hauptfach: Mikrobiologie • Nebenfächer: Botanik und Physik
10/2003	Biologie-Vordiplom Studienschwerpunkte im Hauptstudium: • Allgemeine und medizinische Mikrobiologie • Physik, Chemie und Botanik
10/2001 – 04/2007	Diplom-Studium der Biologie an der Georg-August-Universität Göttingen

## Publikationen

**Tyrosinekinase inhibition facilitates cooperation of transcription factor SALL4 and ABC transporter A3 towards intrinsic CML progenitor cell drug resistance.**

Hupfeld, T., Chapuy, B., Schrader, V., Koch, R., Haase, D., Truemper, L., & Wulf, G. G. (2012). (In Begutachtung).

**Molecular cloning and functional characterization of endogenous recombinant common marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) follicle-stimulating hormone.**

Muller, T., Hupfeld, T., Roessler, J., Simoni, M., Gromoll, J., & Behr, R. (2011). J Med Primatol, 40(2), 111-119.

**Exosomal evasion of humoral immunotherapy in aggressive B-cell lymphoma modulated by ATP-binding cassette transporter A3.**

Aung, T., Chapuy, B., Vogel, D., Wenzel, D., Oppermann, M., Lahmann, M., Weinhage, T., Menck, K., Hupfeld, T., Koch, R., Trumper, L., & Wulf, G. G. (2011). Proc Natl Acad Sci U S A, 108(37), 15336-15341.



## Vorträge und Kongress-Teilnahmen

### **Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie (DGHO) 2012.**

Stuttgart, 19. Oktober – 23. Oktober 2012

#### **Vortrag:**

Hupfeld, T., Schrader, V., Chapuy, B., Trumper, L., & Wulf, G. G. (2012). BCR-ABL dependent activation of SALL4/ABCA3 - TKI detoxification in leukemic cells. (In Vorbereitung)

### **Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie (DGHO) 2011.**

Basel, 30. September – 4. Oktober 2011

#### **Vortrag:**

Hupfeld, T., Schrader, V., Chapuy, B., Trumper, L., & Wulf, G. G. (2011). Tyrosinekinase-inhibition modulates ABC transporter A3 mediated susceptibility mechanisms in CML cells involving transcription factor SALL4. *Onkologie*, 34, 30-30.

### **Göttinger Transporttage 2011.**

Göttingen, 22. – 23. Oktober 2011

#### **Vortrag:**

Hupfeld, T., Schrader, V., Chapuy, B., Trumper, L., & Wulf, G. G. (2011). „Influence of tyrosine kinase inhibitors on the expression of the ABC transporter A3 and the transcription factor SALL4 in CML cells“

### **Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie (DGHO) 2010.**

Berlin, 1. – 5. Oktober 2010

#### **Vortrag:**

Hupfeld, T., Chapuy, B., Schrader, V., Truemper, L., & Wulf, G. G. (2010). Impact of imatinib on expression and function of intracellular ABC transporter A3 in chronic myeloid leukemia cells and susceptibility to this drug. *Onkologie*, 33, 196-19

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich hiermit für die hilfreiche Unterstützung bei Prof. Gerald Wulf bedanken, der mir in den letzten drei Jahren mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat. Seine Ideen und sein Engagement haben diese Arbeit entscheidend geprägt. Vielen Dank, dass Du mir diese Arbeit ermöglicht hast!

Außerdem möchte ich mich besonders bei Verena Pape bedanken, die mit ihrer Arbeit und zuverlässige Unterstützung entscheidend zu dieser Arbeit beigetragen hat. Zudem danke ich noch meinen jetzigen und ehemaligen Kollegen und Kolleginnen aus unserem Labor: Doris Krause, Nina Diering, Sabrina Becker, Raphael Koch und Daniel Vogel für die hilfreiche Unterstützung sowie die angenehme Arbeitsatmosphäre und anregenden Diskussionen.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Prof. Dieter Kube, Prof. Martin Oppermann und Prof. Mikael Simons. Ihre Diskussionsbereitschaft und Ihr Interesse an meinem Thema sowie Ihre Unterstützung als Thesis Committee haben mir bei dieser Arbeit sehr geholfen.

Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Krebshilfe teilweise finanziell, sowie von der Firma Novartis durch die kostenlose Bereitstellung der beiden Tyrosinkinase-Inhibitoren Imatinib und Nilotinib unterstützt.