

Aus dem José-Carreras-Zentrum für Immun- und Gentherapie  
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

# **Expression des endogenen retroviralen Proteins Np9 in Tumorstammzellen der akuten myeloischen Leukämie (AML)**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät**

Der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2020

vorgelegt von: Theresa Keller

geboren am: 28.10.1993 in Alsfeld

Tag der Promotion: 19. November 2020

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Klaus Roemer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Norbert Graf

Meiner Familie gewidmet

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	III
Abbildungsverzeichnis .....	VIII
Tabellenverzeichnis .....	IX
<b>1. Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>3</b>
<b>2. Einleitung</b> .....	<b>4</b>
<b>2.1 Akute myeloische Leukämie (AML)</b> .....	<b>4</b>
2.1.1 Grundlagen .....	4
2.1.2 Epidemiologie .....	4
2.1.3 Pathophysiologie .....	4
2.1.4 Klassifikation .....	6
2.1.5 Therapie .....	8
<b>2.2 Humane endogene Retroviren (HERV)</b> .....	<b>14</b>
2.2.1 Retroelemente .....	14
2.2.2 Retroviren .....	15
2.2.3 Endogene Retroviren .....	17
2.2.4 Humane endogene Retroviren (HERVs) .....	18
2.2.5 Humanes endogenes Retrovirus K .....	19
<b>2.3 „Nuclear protein of 9 kDa“ (Np9)</b> .....	<b>22</b>
2.3.1 Herkunft .....	22
2.3.2 Vorkommen und klinische Bedeutung von Np9 .....	22
2.3.3 Np9-Interaktion mit PLZF .....	23
2.3.4 Weitere Funktionen von Np9 .....	23
<b>2.4 Zielsetzung</b> .....	<b>24</b>
<b>3. Material</b> .....	<b>26</b>
<b>3.1 Chemikalien, Filter, Membranen</b> .....	<b>26</b>
<b>3.2 Enzyme</b> .....	<b>27</b>
<b>3.3 Größen- und Molekulargewichtsmarker</b> .....	<b>28</b>
3.3.1 Proteingewichtsmarker .....	28
3.3.2 Primärantikörper .....	28
3.3.3 Sekundärantikörper .....	29
<b>3.4 Zelllinien</b> .....	<b>29</b>
<b>3.5 Medium mit zugegebenen Lösungen</b> .....	<b>30</b>
<b>3.6 „Small interfering RNAs“ (siRNAs)</b> .....	<b>30</b>
3.6.1 Np9-siRNA .....	30
3.6.2 Kontroll-siRNA .....	30
<b>3.7 Gele und Puffer für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ...</b>	<b>31</b>
<b>3.8 Stripping Puffer zur Wiederverwendung von Membranen nach ECL-Färbung</b> .....	<b>31</b>
<b>3.9 Computersoftware</b> .....	<b>32</b>

<b>4. Methoden</b> .....	<b>33</b>
<b>4.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen</b> .....	<b>33</b>
4.1.1 Kultivierung der Zelllinien HL-60, KG-1a und Kasumi-1 .....	33
4.1.2 Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zellen .....	33
4.1.3 Transiente Transfektion mit HiPerFect® (Qiagen) .....	34
4.1.4 Klonogener Assay .....	34
4.1.5 Apoptose-Assay: DNA-Färbung mit Propidiumiodid.....	35
4.1.6 Durchflusszytometrie .....	36
<b>4.2 Proteinbiochemische Techniken</b> .....	<b>37</b>
4.2.1 Herstellung von Proteinextrakten und Konzentrationsbestimmung.....	37
4.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	38
<b>5. Ergebnisse</b> .....	<b>42</b>
<b>5.1 Anreicherung von AML-Stammzellen und deren Nachweis mithilfe von Stammzellmarkern <i>in vitro</i></b> .....	<b>42</b>
5.1.1 Die Anreicherung von Zellen mit Tumorstammzellmarkern .....	42
5.1.2 Der Nachweis von angereicherten Tumorstammzellen durch aktive Caspase 3... 44	44
<b>5.2 Np9-Expression im Zusammenhang mit AML-Stammzellen</b> .....	<b>46</b>
5.2.1 Betrachtung des Proteins Np9 unter Proteasomen- und mTOR-Inhibition.....	46
5.2.2 Np9-Protein in AML-Stammzellen im Zusammenhang mit Survivin .....	49
<b>5.3 Die potentielle Funktion von Np9 in AML-Zellen</b> .....	<b>51</b>
5.3.1 <i>Np9</i> -Knockdown mittels siRNA-Transfektion.....	51
5.3.2 Evaluation des <i>np9</i> -Knockdowns mittels Western-Immunoblotting .....	54
<b>5.4 Effekt von Vitamin D auf die Expression von Np9, Survivin und aktiver Caspase 3</b> .....	<b>55</b>
<b>6. Diskussion</b> .....	<b>57</b>
<b>6.1 Stammzellenanreicherung durch mTOR-Inhibitor Rapamycin und Proteasomeninhibitor MG132</b> .....	<b>57</b>
<b>6.2 Endogenes Np9-Protein in AML-Stammzellen</b> .....	<b>58</b>
<b>6.3 Ist Np9 Marker für (pluripotente) Stammzellen?</b> .....	<b>60</b>
<b>6.4 Vitamin D als Regulator von Np9 in Tumorstammzellen</b> .....	<b>61</b>
Literaturverzeichnis .....	63
Danksagung .....	77
Lebenslauf .....	78

## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$	alpha
$\beta$	beta
$\delta$	delta
$\varepsilon$	epsilon
$\gamma$	gamma
(A)SZT	(allogene) Stammzelltransplantation
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{M}$	Mikromolar
(si- / t-)RNA	(„small interfering“, kurze doppelsträngige, inhibitorische / „transfer“, Transfer) „ribonucleic acid“, Ribonukleinsäure
1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	Calcitriol, aktives Vitamin D
AIDS	„acquired immune deficiency syndrome“, erworbenes Immunschwäche-Syndrom
(t)AML	(therapieassoziierte) akute myeloische Leukämie
Amp B	Amphotericin B
APL	akute Promyelozyten Leukämie
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	„aqua destillata“, destilliertes Wasser
AR	Androgenrezeptor
Ara-C	Cytarabin
ATCC	„American Type Culture Collection“, amerikanische Zelllinien-Datenbank
BCR-ABL 1	„breakpoint cluster region c-oncogene 1“, Tyrosinkinase
BSC	„Best Supportive Care“, supportive Behandlungsmaßnahmen
CAP	Kappe
Caspase	Cysteinyl-Aspartat-Proteinase
CBF $\beta$	„core binding factor beta“, Kernbindungsfaktor beta
CBF $\beta$ -MYH11	Fusionstranskript: Translokation t(16;16) oder Inversion 16(p13q22)
CD	„cluster of differentiation“, immunphänotypische Oberflächenmerkmale von Zellen

CEPBA	„CCAAT/Enhancer-Binding Protein Alpha“, CCAAT-Enhancer-bindendes Protein alpha
con.	„control“, Kontrolle
CPX-351	liposomales Daunorubicin/Cytarabin
CR	„complete remission“, komplette Remission
CSC	„cancer stem cell“, Krebsstammzelle
d	„day“, Tag
DEK	DEK Onkogen; Synonym D6S231E
DMSO	Dimethylsulfoxid, organisches Lösungsmittel
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNR	Daunorubicin
DTT	Dithiothreitol
ECC	„embryonal carcinoma cell“, embryonale Krebszelle
ECL	„enhanced chemiluminescence“, verstärkte Chemilumineszenz
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group, Index zur Lebensqualität
EF	Ejektionsfraktion
ELN	European Leukemia Network
env	„envelope protein“, Hüllprotein
ERV	Endogener Retrovirus
ESC	„embryonic stem cell“, embryonale Stammzelle
FAB	„French-American-British“, französisch-amerikanisch-britisch
FACS	„fluorescence activated cell sorter“, Durchflusszytometrie
fg	Femtogramm
FKS/FCS	fetales Kälberserum
FSC	„forward scatter“, vorwärts gestreutes Licht
G-Phase	„gap-“, Zwischenphase
Gag	„group-specific antigen“, Gruppen-spezifisches Antigen
GO	Gemtuzumab Ozogamicin
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HCl	Chlorwasserstoff
HDAC	hochdosiertes Ara-C
HERV	humane endogene Retroviren

HERV-K	humaner endogener Retrovirus K
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HMS	hypomethylierende Substanzen (speziell 5-Azacitidin, Decitabin)
HSC	„hematopoietic stem cell“, hämatopoetische Stammzelle
HSPC	„hematopoetic stem- and progenitor cell“, hämatopoetische Stamm- und Progenitorzelle
HTL	humane T-Zell Leukämie
IAP	„inhibitor of apoptosis“, antiapoptotisches Protein
ICTV	International Committee of Taxonomy of Viruses
IDAC	intermediär dosiertes Ara-C
IN	Integrase
inv-	Inversion
iPSC	„induced pluripotent stem cell“, induziert pluripotente Stammzelle
ITD	interne Tandemduplikation
kDa	Kilodalton
LIC	„leukemia-initiating cell“, Leukämie-initiierende Zelle
LINE	„long interspersed nuclear element“, lange, sich oft wiederholende, im Genom verteilte DNA-Sequenzen
LNx	Ligand von Numb Protein X
LRV	Leserasterverschiebung
LSC	„leukemia stem cell“, leukämische Stammzelle
LTR	„long terminal repeat“, DNA-Wiederholungseinheit
M	Molar
M-Phase	Mitose-Phase
mA	Milliampere
MA	Matrixprotein
MDM2	„Mouse Double Minute 2 homolog“, Protoonkogen
MKL1	„megakaryoblastic leukemia 1“, megakaryoblastische Leukämie 1
MLLT3	„mixed-lineage leukemia translocated to chromosome 3 protein“, gemischt abstammende Leukämie versetzt auf Chromosom 3
MMTV	Maus-Mamma-Tumor-Virus



MPAL	„mixed phenotype acute leukemia“, gemischt phänotypische Leukämie
MRD	„minimal residual disease“, minimale Resterkrankung
mTOR	„mechanistic (alt: „mammalian“) Target of Rapamycin“, Ziel des Rapamycins im Säugetier
Mut	Mutation
MV	myelodysplastische Veränderungen
n	Chromosomensatz
NaCl	Natriumchlorid, Kochsalz
NaOH	Natriumhydroxid
NDAC	niedrig dosiertes Ara-C
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NOS	„not otherwise specified“, ohne genauere Kategorie
Np9	„nuclear protein of 9 kDa“, nukleäres Protein von 9 kDa
NPM1	Nukleophosmin 1 Onkogen
NPM1c	Nucleophosmin 1
NUP214	Nucleoporin 214 kDa, Kernporen-Proteinkomplex
OD	optische Dichte
ORF	„open reading frame“, offener Leserahmen
PA	Polyadenylierungssignal
PBS	„phosphate buffered saline“, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBS	Primerbindungsstelle
pH	„potentia hydrogenii“, Stärke des Wasserstoffs
PI	Propidiumiodid, Fluoreszenzfarbstoff
PLZF	promyeloisch leukämisches Zinkfingerprotein
Pol	Polymerase
Poly(A)-Schwanz	Poly-Adenosin-Schwanz
POX	Peroxidase
PP	Polypurinbereich
PR/Prot	Protease
RARA	„retinoic acid receptor alpha“, Retinsäure-Rezeptor alpha
RBF15	„RNA binding motif protein 15“, RNA-bindendes Motivprotein 15

REDD1/DDIT4	„regulated in development and DNA damage response 1“/„DNA damage-inducible transcript 4“, mTOR-Negativregulator
RNase	Ribonuklease
ROS	„reactive oxygen species“, Sauerstoffradikal
rpm	„revolutions per minute“, Umdrehungen pro Minute
RPMI	„Roswell Park Memorial Institute“, Zellkulturmedium
RT	reverse Transkriptase
RUNX	„RUNT-related transcription factor 1“, RUNT-zugehöriger Transkriptionsfaktor 1
S-Phase	Synthese-Phase
SCC	„side scatter“, seitwärts gestreutes Licht
SDS (-PAGE)	Sodiumdodecylsulfat (-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)
Sec	„second“, Sekunde
SINE	„short interspersed nuclear element“, kurze, sich oft wiederholende, im Genom verteilte DNA-Sequenzen
SU	„surface unit“, Oberflächen-Einheit
t-	Translokation
TAM	transiente abnormale Myelopoese
TEMED	Tetraethylmethyldiamin
TP	transmembranes Protein
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan, Puffer
TXNIP	„thioredoxin-interacting protein“, Thioredoxin-interagierendes Protein
TZF	testikuläres Zinkfinger Protein
unspez.	unspezifische Banden
V	Volt
WHO	„World Health Organization“, Weltgesundheitsorganisation
Wt	Wildtyp

## Abbildungsverzeichnis

<b>ABBILDUNG 1:</b> ALGORITHMEN ZUR ENTSCHEIDUNG DER INITIALEN THERAPIEFORM BEI ERST-DIAGNOSE AML.....	12
<b>ABBILDUNG 2:</b> STAMMBAUM DER MOBILEN DNA-ELEMENTE .....	15
<b>ABBILDUNG 3:</b> SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINES RETROVIRUSPARTIKELS UND DES VIRALEN RNA-GENOMS.....	16
<b>ABBILDUNG 4:</b> PROVIRALE STRUKTUR VON HERV-K(HML-2) UND KEIMBAHN-INTEGRATION WÄHREND DER EVOLUTION DER PRIMATEN .....	20
<b>ABBILDUNG 5:</b> PAGERULER™ .....	28
<b>ABBILDUNG 6:</b> BEISPIEL DOTPLOT FACS-ANALYSE .....	36
<b>ABBILDUNG 7:</b> STAMMZELLANREICHERUNG UNTER RAPAMYCIN (A) BZW. MG132 (B) .....	44
<b>ABBILDUNG 8:</b> APOPTOSE-NACHWEIS MITTELS GESPALTENER CASPASE 3.....	46
<b>ABBILDUNG 9:</b> NP9-PROTEIN UNTER PROTEASOMEN- UND mTOR-INHIBITION .....	48
<b>ABBILDUNG 10:</b> NP9-PROTEIN IN AML-STAMMZELLEN .....	50
<b>DIAGRAMM 1:</b> <i>Np9</i> -KNOCKDOWN MITTELS siRNA-TRANSFEKTION.....	52
<b>ABBILDUNG 11:</b> <i>Np9</i> -KNOCKDOWN MITTELS siRNA-TRANSFEKTION .....	53
<b>ABBILDUNG 12:</b> EVALUATION DES <i>Np9</i> -KNOCKDOWNS.....	54
<b>ABBILDUNG 13:</b> VITAMIN D IM ZUSAMMENHANG MIT NP9, SURVIVIN UND AKTIVER CASPASE 3.....	56

## Tabellenverzeichnis

<b>TABELLE 1:</b> EINTEILUNG DER GENOMISCHEN SUBGRUPPEN DER AML.....	6
<b>TABELLE 2:</b> AML-KLASSIFIKATION DER WHO.....	6
<b>TABELLE 3:</b> CHEMIKALIEN, FILTER, MEMBRANEN.....	26
<b>TABELLE 4:</b> ENZYME.....	27
<b>TABELLE 5:</b> PRIMÄRANTIKÖRPER.....	27
<b>TABELLE 6:</b> SEKUNDÄRANTIKÖRPER.....	29
<b>TABELLE 7:</b> EIGENSCHAFTEN DER ZELLINIEN.....	29
<b>TABELLE 8:</b> MEDIUM UND LÖSUNGEN.....	30
<b>TABELLE 9:</b> TRENN- UND SAMMELGEL-ZUSAMMENSETZUNG FÜR DIE SDS-PAGE.....	31
<b>TABELLE 10:</b> ZUSAMMENSETZUNG DER PUFFER FÜR DIE SDS-PAGE.....	31
<b>TABELLE 11:</b> STRIPPING PUFFER ZUR WIEDERVERWENDUNG VON MEMBRANEN.....	31

## 1. Zusammenfassung

„Nuclear protein of 9 kDa“ (Np9) ist ein Protein mit einem geschätzten Gewicht von neun Kilodalton, welches vor allem im Zellkern vorliegt. Das *np9*-Gen entstand während der Evolution von zwei Typen des humanen endogenen Retrovirus‘ HERV-K(HML-2) als virales „Accessory“-Gen (Zusatzgen). Typ 2 wurde durch Infektion der Keimbahn von Altwelt-Affen (*Catarrhini*) vor circa 30 Millionen Jahren Bestandteil des Genoms. Etwas später entwickelte sich durch den Verlust von 292 Basenpaaren und dem Zugewinn einer Spleißdonor-Stelle (SD2) Typ 1. Die SD2 verleiht dem Virus die Fähigkeit zur Translation des Np9-Proteins. Sie ist einzig bei Gorillas, Schimpansen und den Menschen (*Homininae*) vorhanden. Einige Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass HERV-K(HML-2)-Transkripte einen Marker für embryonale und pluripotente Stammzellen darstellen. Insbesondere auch in Tumor-assoziierten (leukämischen) Stammzellen konnte *np9*-Transkript nachgewiesen werden. Während Transkripte relativ leicht nachweisbar sind, kann Np9-Protein bis zu diesem Zeitpunkt kaum und nur unter Vorbehalt gezeigt werden, so dass es bislang unklar war, ob Np9-Protein überhaupt in Zellen hergestellt wird und welche Funktion es hat.

Um die Expression von Np9-Protein erstmals untersuchen zu können, reicherten wir zunächst Tumorstammzell-ähnliche Zellen in Kulturen der drei AML-Zelllinien HL-60, KG-1a und Kasumi 1 an. Die Elimination von Nicht-Stammzellen aus den Kulturen verifizierten wir durch das Auftreten der aktiven Form der primär apoptotischen Caspase 3. Stammzellen hingegen erwiesen sich als negativ für Caspase 3 jedoch positiv für den Stammzellmarker Survivin. Erstmals gelang uns, ohne weitere Vorbehandlung, der Nachweis von *endogenem* Np9-Protein, vor allem in HL-60 Zellen. In vorherigen Studien war dies nur unter Einsatz eines Proteasomenblockers, wie Epoxyomicin oder MG132 gelungen. Dies wies darauf hin, dass Np9 zwar produziert wird, aber instabil ist und über das 26S-Proteasom abgebaut wird. Außerdem wurde Np9 durch die Rapamycin-vermittelte Hemmung des mTOR-Signalwegs induziert. Entsprechend der Erkenntnis, dass in einigen Studien aktives Vitamin D (1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>), ähnlich wie Rapamycin, als Inhibitor des mTOR-Signalwegs wirken kann, konnten wir in HL-60 Zellen unter Vitamin D eine schwache Induktion der Np9-Expression zeigen, nicht jedoch in die beiden anderen Zelllinien. Konzeptionelle und technische Schwierigkeiten ergaben sich hingegen bei den Untersuchungen mit RNAi-Technologie, mit der wir den Effekt eines *np9*-Knockdowns auf Tumorstammzellen untersuchen wollten. Damals und auch heute noch existiert keine Möglichkeit für einen spezifischen Knockdown von *np9*, da Np9 aus einem polygenischen Transkript translatiert wird. Weiterhin bleibt unklar, ob nach Stammzellenanreicherung alle Zellen einen im Verhältnis geringen Gehalt an Np9 besitzen oder ob eine spezifische Subpopulation vergleichsweise viel Np9 besitzt. Dennoch gelang hier erstmals der Nachweis des *endogenen* Np9-Proteins in Tumorstammzellen, vor allem

aufgrund der extremen und technisch anspruchsvollen Verbesserung des Proteinnachweises mittels des hier etablierten hochempfindlichen Westernblotting Nachweisverfahrens für Np9.

## Abstract

Nuclear protein of 9 kDa (Np9) is a protein with a predicted molecular weight of nine kDa which especially exists in the cell nucleus. The gene of *np9* emerges from two types of human endogenous retrovirus HERV-K(HML-2) as a viral “accessory”-gene. Type 2 initially integrated in genome due to infection of the primate germ line of Old World monkeys (*Catarrhini*) 30 million years ago. Some years later type 1 develops from type 2 through 1) lack of a 292 base pair sequence and 2) generation of a splice donor site (SD2). Due to SD2, which is specifically in gorillas, chimpanzees and humans (*Homininae*), the virus gets the possibility to translate Np9 protein. Some work groups showed that HERV-K(HML-2) transcripts are a marker for embryonic and induced pluripotent stem cells. Especially in tumor-associated (leukemic) stem cells may be evidenced *np9* transcript. Transcripts were really easy detectable, but not Np9 protein at this point except with reservations. Therefore, it was not clear, if Np9 protein is produced in the cells and which function it has at all.

Primarily we enriched cancer stem cell-like cells from the AML cell lines HL-60, KG-1a and Kasumi-1 to analyze the expression of Np9 protein for the first time. To verify the elimination of not-stem cells we used cleaved caspase 3, which is the active and primary apoptotic form. Stem cells are negative for cleaved caspase 3, but positive for the stem cell marker Survivin. For the first time, we provided evidence of endogenous Np9 protein, especially in HL-60, without any pretreatment. Previous studies managed to do this only in use with proteasome inhibitors like Epoxomicin or MG132. Consequently, we gathered that Np9 is produced, but just as an unstable version, which is reduced through the 26S-proteasome. Moreover, Np9 induced the rapamycin-induced inhibition of the mTOR-pathway. Some studies showed that active vitamin d (1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) affects the mTOR-pathway like Rapamycin. Based on this information, we proved a small induction of Np9 expression in vitamin d treated HL-60 cells, but not for the other two cell lines. However, we had conceptual and technical challenges with the RNAi-technology. We used this method to show the effect of *np9* knockdown in tumor stem cells. But at that time and for now, it does not exist any possibility for a specific knockdown just of *np9*, because of *np9* translation from a polygenic transcript. Furthermore, it is still unclear, if all cells contain proportionally a really small content of Np9 or if there is a specific subpopulation, which includes comparatively lots of Np9, after stem cell enrichment.

Nevertheless, we proved endogenous Np9 protein in tumor stem cells for the first time, but mainly due to extreme and technical ambitious improvement of protein detection with established highly sensitive Western blotting for Np9.

## 2. Einleitung

### 2.1 Akute myeloische Leukämie (AML)

#### 2.1.1 Grundlagen

Eine Leukämie ist eine maligne Erkrankung, ausgehend vom hämatopoetischen und lymphatischen System. Charakteristisch für diese Erkrankung ist die Anreicherung unreifer, funktionsunfähiger Vorstufen von Leukozyten, wodurch die gesunde Blutbildung im Knochenmark behindert wird. Die akute Form der myeloischen Leukämie ist gekennzeichnet durch ein schnelles Vorschreiten der genetisch heterogenen Erkrankung mit fatalem Ende in nur kurzer Zeit bei keiner angemessenen Intervention [Kantarjian 2016]. Diese ist zu unterscheiden von der chronisch verlaufenden myeloischen Leukämie.

Die WHO („World Health Organization“) klassifiziert die AML in Subgruppen mithilfe von zyto-, molekulargenetischen und mikroskopischen Kriterien [Arber *et al.* 2016]. Die Therapieform variiert individuell je nach Patienten anhand bestimmter Einflussfaktoren, wie zum Beispiel das Alter, bekannte Risikofaktoren und Grundkonstitution des Patienten sowie die AML-Subgruppe (Abbildung 1). Für die Prognose sind folgende Merkmale von Relevanz: Patientenalter, komplexer Karyotyp, Mutationen, steigende Leukozytenwerte, hämatologische Vorerkrankung und frühere Chemo- bzw. Radiotherapie aufgrund einer anderen malignen Erkrankung [Döhner *et al.* 2017].

#### 2.1.2 Epidemiologie

In den USA erkranken 3,7 Personen pro 100.000 Einwohner pro Jahr an AML [Deschler und Lübbert 2006]. Die akute myeloische Leukämie (AML) ist die häufigste Form akuter Leukämien bei Erwachsenen mit steigender Inzidenz im Alter [Arber *et al.* 2016, Döhner *et al.* 2017, Irish *et al.* 2017, Siegel *et al.* 2018]. In einer Studie aus den USA wird ein Altersmedian von 68 Jahren [Shallis *et al.* 2019], in einem schwedischen Register einer von 72 Jahren angegeben [Juliussen *et al.* 2009].

#### 2.1.3 Pathophysiologie

Ausgangspunkt der AML ist ein Defekt in der Differenzierung hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen (HSPCs, „hematopoetic stem- and progenitor cells“), was wiederum zur Akkumulation unreifer myeloischer Vorläuferzellen im Knochenmark führt. Durch diese Akkumulation wird die gesunde Hämatopoese verdrängt, resultierend in einer Fehlfunktion des Knochenmarks, die sich im klinischen Erscheinungsbild häufig äußert durch [Arber *et al.* 2016]:

- Anämie (Dyspnoe, Leistungsminderung, Müdigkeit)
- Neutropenie (Infektionen, Sepsis)
- Thrombozytopenie (Blutungsneigung, Hämatome, Petechien).



Genauer gesagt, etablieren leukämische Blasten durch Reprogrammierung mesenchymaler Stromazellen ihre eigene protektive Nische und unterdrücken somit entscheidend die normale Hämatopoese [Kim *et al.* 2015]. Blasten sind unreife Zellen, besitzen einen großen Kern und können nicht in funktionelle Monozyten und Granulozyten differenzieren [Bonnet und Dick 1997]. Grundsätzlich weisen leukämische Stammzellen (LSCs, „leukemia stem cells“) drei Hauptfunktionen auf, die sie von humanen Stammzellen (HSC, „human stem cell“) unterscheiden [Valent 2011]:

- Fähigkeit zur Selbsterneuerung
- Fähigkeit zur Erhaltung des malignen Stammzellpools
- Fähigkeit zur Produktion von Subklonen.

Hinzu kommt, dass LSCs durch wiederkehrende Mutationen sowie besondere zytogenetische Eigenschaften entscheidend für das Ansprechen auf Therapien und das Rezidivrisiko sind [Döhner *et al.* 2017]. Charakteristischerweise sind LSCs häufig therapieresistent, da die Chemotherapie vor allem den Teilungsprozess einer Zelle angreift, leukämische Stammzellen sich aber vorzugsweise im Ruhezustand befinden, sich demnach nur selten teilen. Außerdem besitzen sie einen starken Selbstschutzmechanismus [ten Cate *et al.* 2010].

Lange ist davon ausgegangen worden, dass Leukämie-initiiierende Zellen (LICs, „leukemia-initiating cells“) ausschließlich in der CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup> Fraktion (Stammzellpool) vorkommen [Lapidot *et al.* 1994]. Mittlerweile gelingt aber in weiteren Subgruppen, wie beispielweise in den Phänotypen CD34<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup> [Martelli *et al.* 2010, Taussig *et al.* 2010] und CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>+</sup> (Progenitorpool) [Taussig *et al.* 2008, Eppert *et al.* 2011], ebenso der Nachweis von LICs. Außerdem scheint es für bestimmte Mutationen vorherrschende Fraktionen zu geben - so tritt zum Beispiel die AML-Form mit der Mutation in Nucleophosmin 1 (NPM1c) häufiger in der CD34<sup>-</sup> Fraktion auf [Taussig *et al.* 2010].

Die Heterogenität dieser Erkrankung spiegelt sich auch in der Diagnostik wider, indem ganz unterschiedliche zytogenetische Formen auftreten können [Döhner *et al.* 2017]:

- Gentranslokationen, wie numerische Veränderungen (z.B. Trisomie 8, Monosomie)
- Translokationen (z.B. t(8;21), t(15;17))
- Inversion (inv(16)).

Auch können komplexe Veränderungen mit mehreren rekurrent chromosomalen Aberrationen innerhalb eines Klons auftreten [Ahn *et al.* 2018]. Diese Heterogenität zeigt sich nicht nur innerhalb eines Klons, sondern es können genetisch unterschiedliche Subklone zu verschiedenen Teilen und in unterschiedlichen Abschnitten des Krankheitsverlaufs auftreten [Ahn *et al.* 2018, Döhner *et al.* 2017]. Weiterhin zeigen Ahn und Team [2018], dass bei circa 96 Prozent mindestens ein dominanter Hauptklon vorhanden ist, bei circa 80 Prozent können immerhin zwei oder mehr dominante Hauptklone nachgewiesen werden. Die mit Abstand am häufigsten mutierten

Gene sind: FLT3 (39%), NPM1 (33%) und DNMT3A (31%) [Metzeler *et al.* 2016, Ahn *et al.* 2018]. Mithilfe von neun funktionellen Gruppen lassen sich die einzelnen genomischen Subgruppen weiter einordnen [Ahn *et al.* 2018]:

<b>Varianten</b>	<b>Beispiel-Gene</b>
<b>Mutationen von NPM1</b>	
<b>Mutationen in Genen der DNA-Methylierung</b>	DNMT3A, IDH2, TET2, IDH1
<b>Aktivierende Mutationen der Signaltransduktion</b>	FLT3, NRAS, KRAS, KIT, JAK2, JAK3, CBL
<b>Mutationen von myeloischen Transkriptionsfaktoren</b>	CEBPA, GATA2, RUNX1
<b>Mutationen von Spliceosomen</b>	SRSF2, U2AF1, SF3B1
<b>Mutationen von Chromatin-Modifikationen</b>	ASXL1, EZH2, BCOR
<b>Mutationen im Kohesin-Komplex</b>	SMC1A, STAG2, RAD21, SMC3
<b>Mutationen in Tumorsuppressorgenen</b>	TP53, WT1
<b>Fusionen von Transkriptionsfaktor-Genen</b>	MYH11-CBFB, PML-RARA

Tabelle 1: Einteilung der genomischen Subgruppen der AML

Einteilung der unterschiedlichen Mutationen in genomische Subgruppen und beispielhafter (nicht vollständiger) Nennung von Genen. Tabelle selbst erstellt nach Arber *et al.* 2016.

#### 2.1.4 Klassifikation

2016 hat die Weltgesundheitsorganisation (WHO) eine überarbeitete Klassifikation der AML herausgegeben (Tabelle 2) [Arber *et al.* 2016]. Im Gegensatz zu den überwiegend morphologischen Kriterien der FAB-Klassifikation [Cheson *et al.* 1990], kann nun seit 2016 auch anhand von zytogenetischen und molekulargenetischen Merkmalen der jeweilige AML-Subtyp differenziert werden. Mehrere balancierte Translokationen und Inversionen bilden eigene Entitäten: t(8;21), inv(16), t(15;17), t(9;11), t(6;9), inv(3)/t(3;3), t(1;22) [Arber *et al.* 2016]. Hinzukommen zwei molekulargenetisch definierte Entitäten (NPM1 und biallelische Mutationen von CEBPA) sowie eine Subgruppe, die Myelodysplasie-assoziierte zytogenetische Veränderungen mit unballancierten und balancierten Aberrationen umfasst [Arber *et al.* 2016]. Weitere Subgruppen bilden die therapieinduzierte AML, AML im Zusammenhang mit Trisomie 21 und das Vorhandensein eines myeloischen Sarkoms bei AML [Arber *et al.* 2016].

<b>AML mit rekurrenten genetischen Aberrationen</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• AML mit t(8;21)(q22;q22.1); RUNX1-RUNX1T1</li> <li>• AML mit inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); CBFB-MYH11</li> <li>• APL mit t(15;17)(q22;q12); PML-RARA</li> <li>• AML mit t(9;11)(p21.3;q23.3); MLLT3-KMT2A</li> </ul>
---	---

- AML mit t(6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214
- AML mit inv(3)(q21.3q26.2) oder t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM
- AML (megakaryoblastisch) mit t(1;22)(p13.3;q13.3); RBM15-MKL1
- Vorläufige Entität: AML mit BCR-ABL1
- AML mit mutiertem NPM1
- AML mit biallelischen Mutationen von CEBPA
- Vorläufige Entität: AML mit mutiertem RUNX1

AML im Zusammenhang mit myelodysplastischen Syndromen

Therapie-induzierte myeloische Neoplasmen

<p>AML, NOS (“not otherwise specified”)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• AML mit minimaler Differenzierung</li> <li>• AML ohne Maturation</li> <li>• AML mit Maturation</li> <li>• Akute myelomonozytäre Leukämie</li> <li>• Akute monoblastär/monozytär Leukämie</li> <li>• Reine erythroide Leukämie</li> <li>• Erythroleukämie, erythrozytär/myeloid</li> <li>• Akute megakaryoblastische Leukämie</li> <li>• Akute basophile Leukämie</li> <li>• Akute Panmyelose mit Myelofibrose</li> </ul>
---	---

Myeloisches Sarkom

<p>Myeloische Proliferationen im Zusammenhang mit dem Down-Syndrom</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Transiente abnormale Myelopoese (TAM)</li> <li>• Myeloische Leukämie assoziiert mit dem Down-Syndrom</li> </ul>
<p>Akute Leukämien mit unklarer Abstammung</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Akute undifferenzierte Leukämie</li> <li>• Gemischte phänotypische akute Leukämie (MPAL) mit t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1</li> <li>• MPAL mit t(v;11q23.2); KMT2A neu arrangiert MPAL B/myeloisch, NOS</li> <li>• MPAL, T/myeloisch, NOS</li> </ul>

Tabelle 2: AML-Klassifikation der WHO

Einteilung der AML unter anderem nach genetischen Varianten, im Zusammenhang mit Trisomie 21 sowie weitere Formen, die keiner Gruppe direkt zugeteilt werden können. Tabelle selbst erstellt nach Arber *et al.* 2016.

### 2.1.5 Therapie

Die Behandlung der akuten myeloischen Leukämie lässt sich in zwei Phasen einteilen: Induktion und Konsolidierung [Lee *et al.* 2016] (Abbildung 1). Ziel der Induktionstherapie ist es, das Blut von Blasten zu befreien sowie die Anzahl derer im Knochenmark zu reduzieren – eine komplette Remission (CR, „complete remission“) zu erreichen. Ziel der Konsolidierung ist es, diesen Zustand zu halten. Unter einer kompletten Remission wird verstanden:

- Reduktion leukämischer Zellen um zwei bis drei Zehnerpotenzen
- Normalisierung der Blastenzahl im Knochenmark (< 5%) und im Blut (< 1%)
- Regeneration der gesunden Hämatopoese.

Dabei scheint vor allem die Genetik und weniger das Alter die entscheidende Rolle zum Erreichen einer CR durch die Induktionstherapie zu spielen [Schlenk und Döhner 2013]. Da jedoch ältere Patienten (> 75. Lebensjahr und/oder mit erheblichen Komorbiditäten) aufgrund der hohen Toxizität und Frühsterblichkeit [Kahl *et al.* 2016] nur zu etwa zehn Prozent eine Langzeitremission [Kantarjian *et al.* 2006] erreichen, wird der Therapieansatz nicht allein anhand der Subgruppe, sondern auch unter Beachtung des Patientenalters sowie bestehender Komorbiditäten entschieden. Für diese Patientengruppe empfiehlt sich ein palliatives Setting. Ein kuratives Konzept sollte nur dann erwogen werden, wenn prinzipiell auch eine allogene Stammzelltransplantation (ASZT) in Frage käme [Ossenkopp und Löwenberg 2015]. Ansonsten wird mit dem Ziel einer Lebensverlängerung und einer möglichst hohen Lebensqualität eine palliative Chemotherapie mit den beiden hypomethylierenden Substanzen (HMS) 5-Azacidin und Decitabin verwendet [Kantarjian *et al.* 2012, Pleyer *et al.* 2014]. Dennoch steht diese Herangehensweise zur Diskussion, da die Frühsterblichkeit bei palliativer Chemotherapie höher ist als bei intensiv behandelten Patienten [Oran und Weisdorf 2012]. Bei jeder Therapie müssen die möglichen Nebenwirkungen und die zu erwartenden Komplikationen dem angestrebten Nutzen gegenübergestellt werden. Mithilfe eines Scores [Krug *et al.* 2010, Pastore *et al.* 2014] und des genetischen Risikoprofils kann eine individuelle CR-Wahrscheinlichkeit und das Risiko für Frühsterblichkeit eingeordnet werden [Schlenk und Döhner 2013]. Mögliche Faktoren, die Einfluss auf die Entscheidung für ein jeweiliges Therapiekonzept nehmen, sind unter anderem:

- Alter (> 75 Jahre)
- Signifikante Komorbiditäten (z.B. Leber-, Nierenerkrankungen, fortgeschrittene Herzinsuffizienz EF < 30%, diabetisches Spätsyndrom)
- Ungünstige soziale Situation
- Schlechter Allgemeinzustand (Karnofsky-Index 30-40%, ECOG > 2)
- Geringe Heilungschancen, hohes Mortalitätsrisiko unter Induktion.

Fünf-Jahres-Überlebensraten eines schwedischen Registers zeigen folgende Daten: Bei Patienten unter dem 30. Lebensjahr beträgt die Rate 60 Prozent, zwischen dem 45. und 54. Lebensjahr sind

es 43 Prozent, zwischen 55 und 64 Jahren 23 Prozent und alle Patienten über 64 Jahre weisen deutlich niedrigere Raten auf [Juliusson *et al.* 2012].

### Induktionsphase

Dieser Therapieabschnitt erfolgt adaptiert an den zyto- und molekulargenetischen Hintergrund der jeweiligen AML-Form. Hinsichtlich der Prognose ist die Subgruppen-adaptierte Therapie dem unmittelbaren Therapiestart ohne Kenntnis der genetischen Variante überlegen [Bertoli *et al.* 2013]. Für folgende Subgruppen ist ein alternatives Induktionsschema empfehlenswert (Abbildung 1):

1. Patienten mit CD33<sup>+</sup>-Core-Binding-Faktor-AML (CBF-AML) und Patienten mit CD33<sup>+</sup>-NPM1-Mutation bei FLT3<sub>wt</sub> [Hills *et al.* 2014]
2. Patienten mit FLT3-Mutation [Schlenk *et al.* 2019]
3. Patientin mit AML-MRC und Patienten mit therapieassoziiertes AML (tAML) bei FLT3<sub>wt</sub> [Lancet *et al.* 2018]
4. Patienten mit CD33<sup>+</sup>-Intermediär-Risiko-AML bei FLT3<sub>wt</sub> [Hills *et al.* 2014].

Alle Patienten, die keiner dieser Subgruppen zugeordnet werden können oder eine Indikation zum unmittelbaren Therapiebeginn haben, erhalten als Standard eine Hochdosis-Induktionstherapie nach dem sogenannten „3 + 7 – Schema“, welches über viele Jahre den Goldstandard bildete [Cheson *et al.* 1990, Cheson *et al.* 2003, Döhner *et al.* 2017]. Die Therapie erfolgt mittels intravenöser Infusion: Zunächst für drei Tage mit einem Anthrazyklin, häufig Daunorubicin (DNR), anschließend folgen sieben Tage mit Cytarabin (Ara-C) [Döhner *et al.* 2017]. Patienten, die sich bei Diagnosestellung in einem akut lebensbedrohlichen Zustand befinden, beispielsweise mit neutropenem Fieber und oder Zeichen eines Leukostasesyndroms, benötigen unverzüglich eine zytostatische Therapie [Döhner *et al.* 2017]. In diesen Fällen kann aufgrund der lebensbedrohlichen Situation eine genetische Analyse nicht abgewartet werden. Die genaue Zusammensetzung und Dosis der Chemotherapie ist jedoch individuell abhängig vom jeweiligen Alter und Gesundheitszustand des Patienten [Acheampong *et al.* 2018].

### Konsolidierungsphase

Auf die Induktionsphase folgt die Postremissionstherapie, die auf die verbliebenen Leukämiezellen abzielt, um ein mögliches Rezidiv zu verhindern [Serve *et al.* 2013, Guolo *et al.* 2017]. Abhängig von der Subgruppe (z.B. Subgruppe 1, siehe Induktionsphase), dem Gesundheitszustand und der geschätzten Prognose des Patienten werden in dieser Phase weitere Zyklen Ara-C in Hochdosis gegeben. Eine weitere Option bildet die allogene Blutstammzelltransplantation. Diese kommt beispielsweise für Patienten der zweiten Subgruppe (FLT3-ITD-AML) und anschließender Erhaltungstherapie mit Sorafenib [Burchert *et al.* 2018]. Patienten mit intermediärer oder

ungünstiger Prognose, die ein hohes Rezidivrisiko aufweisen, erhalten ebenfalls eine Empfehlung zur ASZT [Cornelissen *et al.* 2012].

Bei Besiedlung des Gehirns und der Wirbelsäule ist die Bestrahlung eine mögliche Alternative [Acheampong *et al.* 2018].

### Nebenwirkungen

Die meisten Chemotherapeutika zielen auf das dauerhafte Wachstum und die schnellteilenden Zellen ab. Damit werden aber nicht nur Krebszellen getötet, sondern auch gesunde, schnellteilende Zellgruppen, wie beispielsweise solche im Knochenmark, außerdem epitheliale intestinale und orale Mucosa-Zellen sowie Haarfollikel [Acheampong *et al.* 2018]. Weitere Nebenwirkungen, die mit der Chemotherapie der AML assoziiert sind, sind unter anderem: Alopezie, Mundsoor, Appetitverlust, Nausea, Erbrechen, Diarrhö oder Obstipation und Panzytopenie, was wiederum zu erhöhter Infektanfälligkeit, Blutungen und Fatigue führen kann [Weber 2015]. Diese Nebeneffekte sind stark abhängig von der Art und Dosis des Chemotherapeutikums sowie der Dauer der Anwendung [Aslam *et al.* 2014].

### Rezidivtherapie

Für den Fall eines Rezidivs gibt es bislang keine Strategien für eine definierte Therapie. Vorwiegend wird Ara-C intermediär oder hochdosiert in die remissionsinduzierte Reinduktionstherapie miteinbezogen. Anschließend erfolgt in der Konsolidierungsphase eine allogene SZT [Döhner *et al.* 2017].

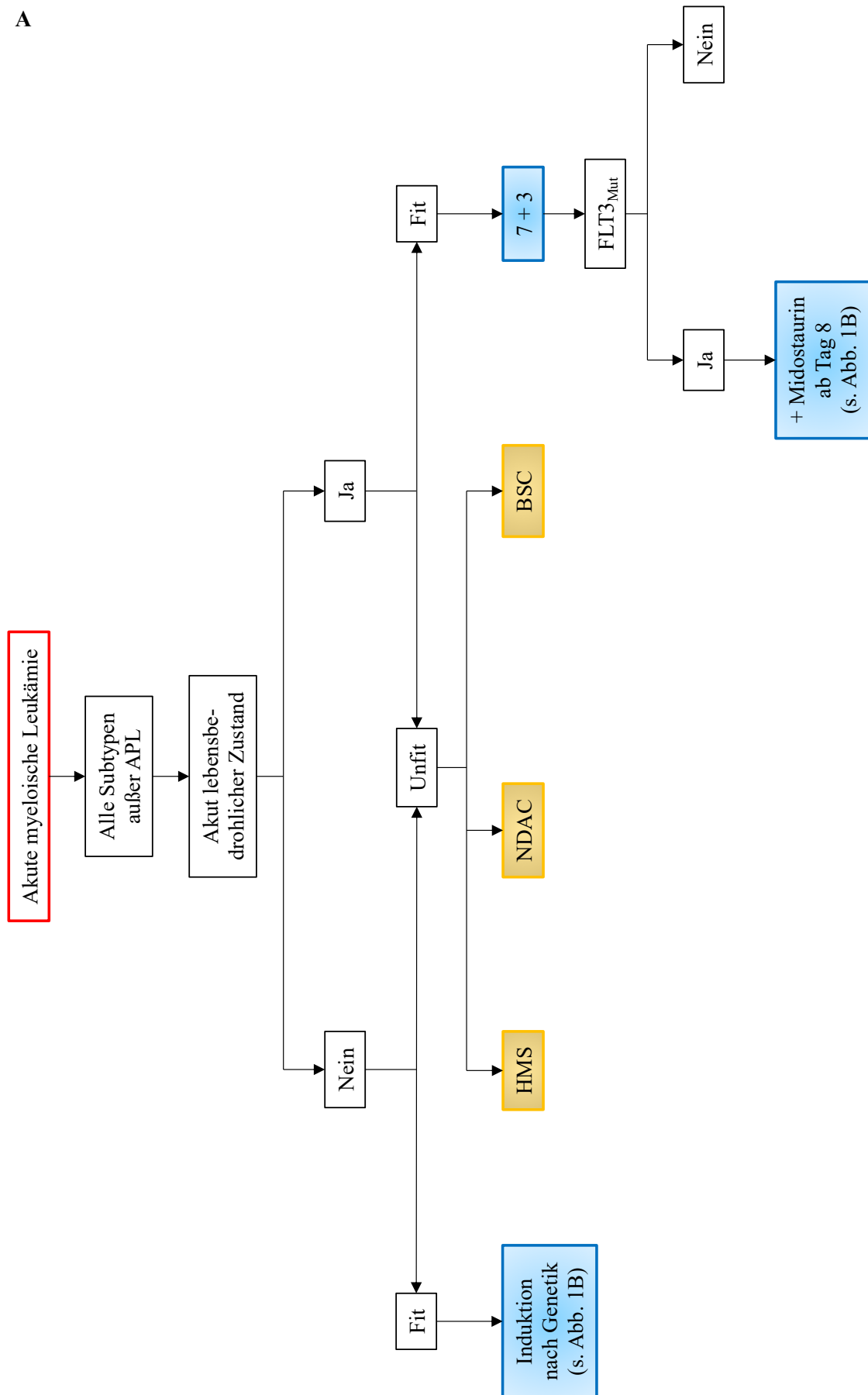
### Neuere Konzepte

Da sich die Stammzellen der AML sowohl anpassungsfähig gegenüber der unterschiedlichen Selektionsdrücke von Chemotherapeutika zeigen als auch Resistenzen gegen diese aufweisen [Crucitti *et al.* 2015, Zhou *et al.* 2017], ist diese Therapieform gekennzeichnet von hoher Toxizität sowie einem erheblichen Risiko für Rezidive [Cooper und Brown 2015].

Neuere Behandlungsansätze versuchen ebendiese Stammzellen anzugreifen, um Rezidive verhindern zu können [Desrichard *et al.* 2016]: Sowohl normale „gesunde Zellen“ im Körper als auch Krebszellen exprimieren Stressproteine, die normalerweise durch das Immunsystem erkannt werden. Dennoch haben es manche Krebszellen geschafft, diese Immunüberwachung mithilfe von verschiedenen Mechanismen, z.B. durch Abstoßen dieser Stressproteine, zu umgehen [Chan *et al.* 2014, Morvan und Lanier 2016]. Genau an diesem Punkt setzt die Immuntherapie an: Sie aktiviert spezifische Immunzellen, die wiederum die Immunüberwachung wieder herstellen und das Immunsystem somit die Fähigkeit zurückerlangt, Krebszellen zu erkennen. Der Hauptvorteil der Immuntherapie ist die Spezifität, bei der gesunde Zellen nicht angegriffen werden und somit die Toxizität geringer ist im Vergleich zu Chemo- und Radiotherapie [Gangadhar und

Vonderheide 2014]. Genauer betrachtet, zielen Immuntherapeutika auf die Inhibition der Krebszellproliferation, auf den Einbezug von Effektorzellen beziehungsweise auf die Induktion der Apoptose zur Elimination von Krebszellen ab [Gotwals *et al.* 2017].

A





**B**

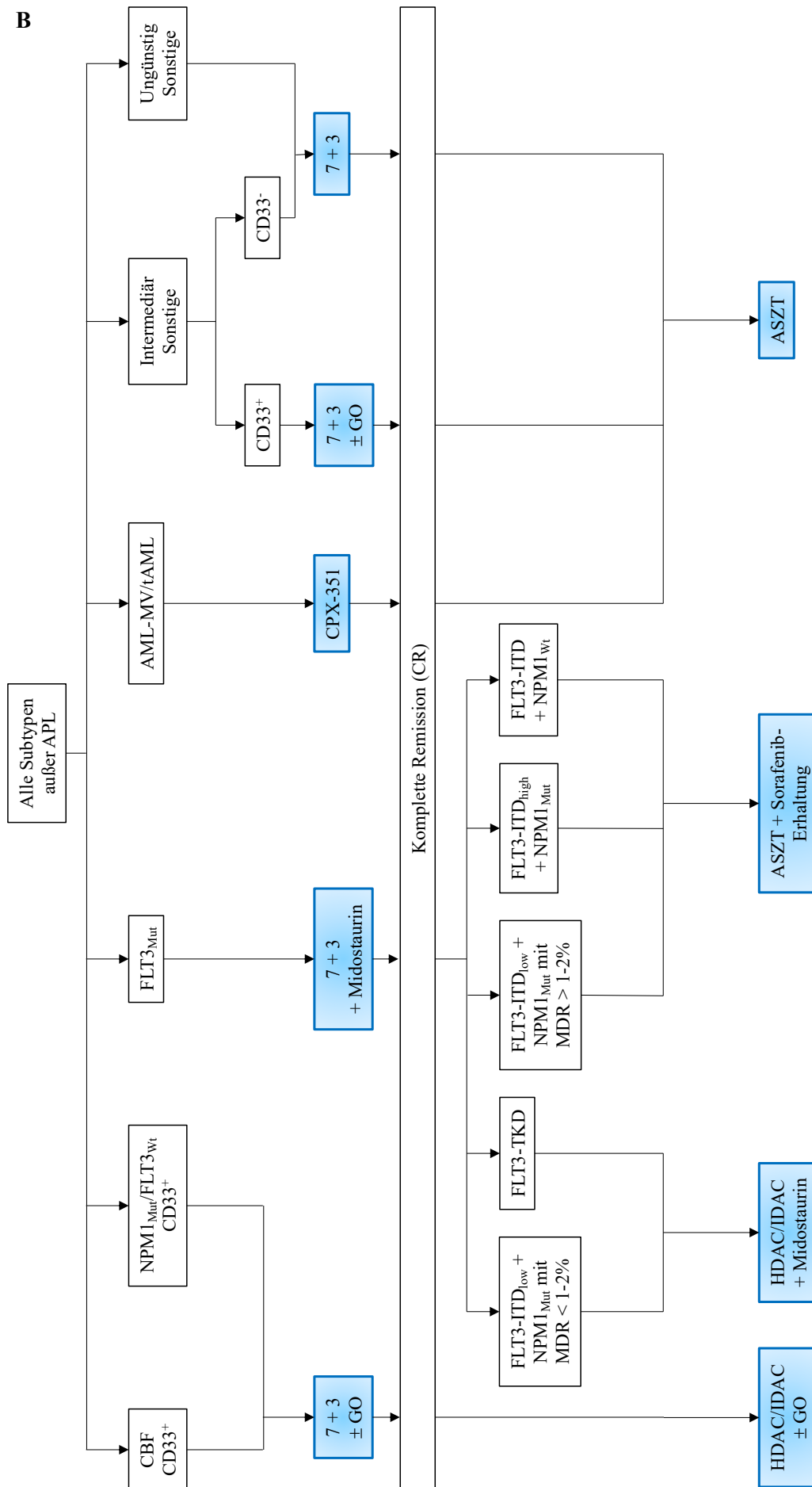


Abbildung 1: Algorithmen zur Entscheidung der initialen Therapieform bei Erstdiagnose AML

Schemata zur Wahl einer initialen Therapieform bei der Erstdiagnose AML (außer APL). Eingeteilt wird nach der jeweiligen genetischen Subgruppe. Die Entscheidung zur jeweiligen Therapieform sollte in Abhängigkeit der gegebenen Risikofaktoren und dem Therapiewunsch des Patienten getroffen werden.

**A.)** Zur genaueren Definition eines akut lebensbedrohlichen Zustands (siehe 2.1.5 Therapie Induktionsphase). Die Einteilung nach „unfit“ und „fit“ erfolgt anhand des Karnofsky-Index/ECOG-Status und Komorbiditäten.

**B.)** Die Einteilung erfolgt nach der jeweiligen genetischen Subgruppe.

AML = akute myeloische Leukämie, APL = akute promyelozytäre Leukämie, ASZT = allogene Stammzelltransplantation, CBF/FLT3/NPM1 = Subgruppen AML (2.1.3 Pathophysiologie), BSC = „Best Supportive Care“, CD = „cluster of differentiation“, CPX-351 = liposomales Daunorubicin/Cytarabin, CR = „complete remission“, GO = Gemtuzumab Ozogamicin, HDAC = hochdosiertes Ara-C, HMS = hypomethylierende Substanzen, IDAC = intermediär dosiertes Ara-C, ITD = interne Tandemduplikation, MRD = „minimal residual disease“, Mut = Mutation, NDAC = niedrig dosiertes Ara-C, tAML = therapieassoziierte AML, Wt = Wildtyp, 7 + 3 = Therapieschema mit Ara-C an 7 Tagen, Daunorubicin an 3 Tagen. ● kurative Therapie, ● palliative Therapie. Abbildungen selbst erstellt und modifiziert nach der aktuellen Leitlinie (Stand 11/2019) <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/akute-myeloische-leukaemie-aml/@@guideline/html/index.html#litID0ENOBG>.

## 2.2 Humane endogene Retroviren (HERV)

### 2.2.1 Retroelemente

Ein großer Teil der menschlichen Desoxyribonukleinsäure (DNA) besitzt keine kodierenden Eigenschaften. Ungefähr 45 Prozent des humanen Genoms entsteht aus transponierbaren, mobilen Elementen [Lander *et al.* 2001]. 90 Prozent dieser transponierbaren, mobilen Elemente bilden die Retroelemente [Deininger und Batzer 2002] (Abbildung 2). Sie umfassen LINEs („long interspersed elements“), SINEs („short interspersed elements“) sowie LTR-Retroposons und werden unterteilt in zwei verschiedene Gruppen, wobei nur eine der beiden LTRs („long terminal repeats“) besitzt.

Retroelemente ohne LTRs, die keine reverse Transkriptase besitzen, werden weiterhin unterschieden in solche ohne Promotor, die Pseudogene und die mit Promotor, die Retrogene. Jene, die eine reverse Transkriptase besitzen, werden als Retroposons benannt [Vogt 1997]. Die non-LTR Elemente bilden mit knapp 34 Prozent einen immensen Anteil des menschlichen Genoms [Lander *et al.* 2001].

Den LTR-besitzenden Elementen sind die Retrotransposons zugehörig, welche als einziges Retroelement direkt über DNA, ohne den Umweg über RNA (Ribonukleinsäure), übertragen werden können. Alle übrigen Retroelemente benötigen zur Replikation ein RNA-Zwischenprodukt (2.2.2 Retroviren). Retroviren besitzen im Gegensatz zu Transposons zusätzlich ein *envelope*-Gen und machen zusammen mit anderen Retrovirus-ähnlichen Elementen circa acht Prozent des humanen Genoms aus [Lander *et al.* 2001].

Obwohl die Wahrscheinlichkeit für eine Transposition bei den allermeisten Retroviren sehr gering ist, da sie meist fest im Genom verankert sind [Medstrand *et al.* 2002], wird geschätzt, dass bei einer von 100 Geburten eine *de novo* Insertion eines solchen Retroelements zu beobachten ist [Deininger und Batzer 2002].

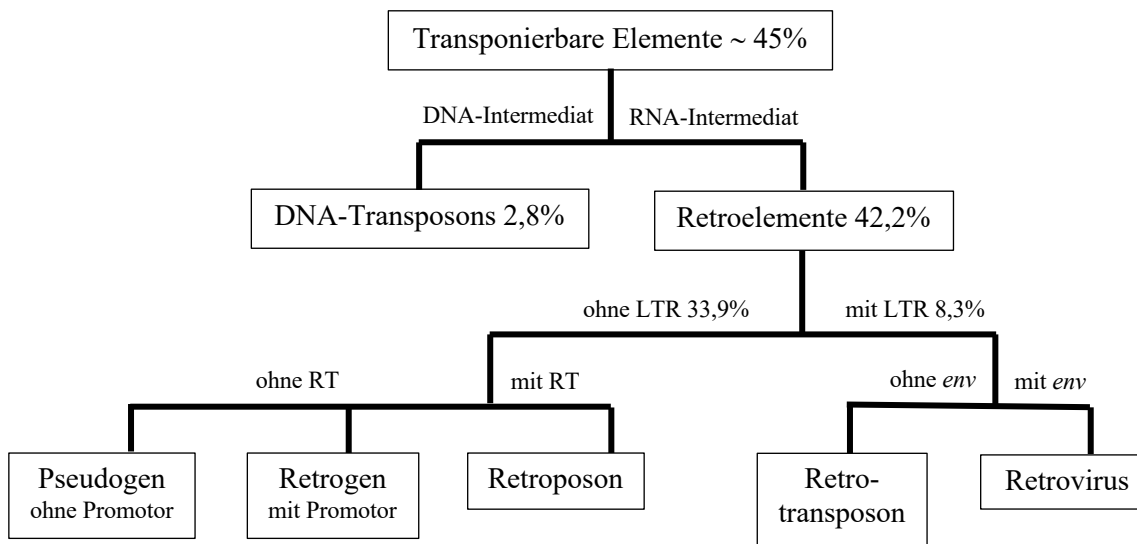


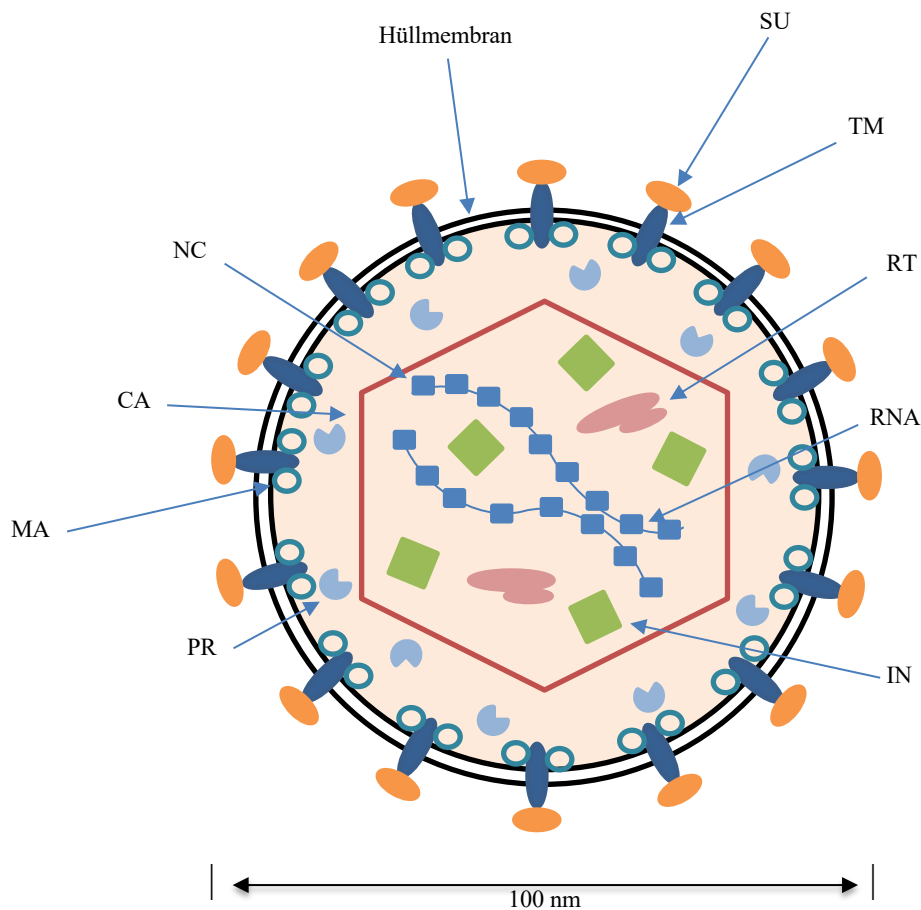
Abbildung 2: Stammbaum der mobilen DNA-Elemente  
 Retroelemente werden über ein RNA-Zwischenprodukt übertragen und werden unterteilt in Elemente mit beziehungsweise ohne LTRs. Retroelemente ohne „Long Terminal Repeats“ (LTR) und ohne reverse Transkriptase (RT) werden weiterhin unterteilt in Pseudogene (ohne Promotor) und Retrogene (mit Promotor). Ist eine RT vorhanden, so werden sie als Retroposons bezeichnet. Virale Retroelemente, die LTRs besitzen, werden unterschieden in Retroposons (ohne *env*-Gen) und Retroviren (mit *env*-Gen). Abbildung selbst erstellt und modifiziert nach Bannert und Kurth 2004.

### 2.2.2 Retroviren

Die Namensentstehung ist auf den Besitz einer reversen Transkriptase und die durch sie durchgeführte Umschreibung von RNA in DNA zurückzuführen: **Reverse Transkriptase Onkoviren**. Nach dem International Committee of Taxonomy of Viruses (ICTV) werden *Retrovirinae* aktuell in zwei Untergruppen mit sieben Genera unterteilt: *Orthoretrovirinae* ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\epsilon$ - und *Lentiretrovirinae*) und *Spumaretrovirinae* (Foamyviren).

Retroviren besitzen eine lineare, nicht-segmentierte und positiv-orientierte Einzelstrang-RNA mit einem Durchmesser von circa 80 nm bis 100 nm, die von einer Proteinhülle („envelope“) umgeben ist. Das extraviral befindliche Glykoprotein (SU-Protein, „surface unit“) bildet das Hauptantigen, über das das Virus an den Rezeptor der Zielzelle bindet. Es ist über Disulfidbrückenbindungen an das in die Hüllmembran eingebundene transmembrane Hüllprotein (TM-Protein) gebunden. Das Virus-Kapsid befindet sich im Inneren des Partikels und enthält zwei identische einzelsträngige (+) RNA-Moleküle ebenso wie die Enzyme Integrase (IN), Protease (PR) sowie reverse Transkriptase (RT).

A.) Retroviruspartikel



B.) Virales RNA-Genom

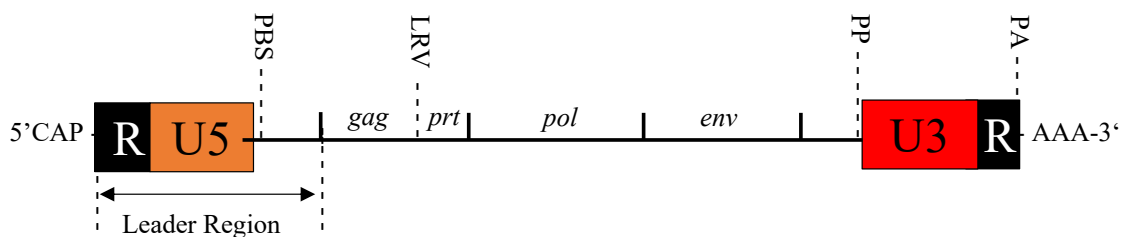


Abbildung 3: Schematische Darstellung eines Retroviruspartikels und des viralen RNA-Genoms  
 A.) Schematischer Querschnitt durch einen Retroviruspartikel. MA = Matrixprotein. Beschriftungen siehe Text.  
 B.) Virales RNA-Genom mit flankierenden Sequenzen. PBS = Primerbindungsstelle, LRV = Leserasterverschiebung, PP = Polypurinbereich, PA = Polyadenylierungssignal. Abbildungen selbst erstellt und modifiziert nach Vogt 1997.

Bei einer Infektion bindet das Virus über ein Glykoprotein der Hülle an den Rezeptor der Zielzelle und verschmilzt mit der Zellmembran. Dadurch gelangt das Kapsid ins Cytoplasma der Zielzelle. Mittels RNA-abhängiger DNA-Polymerase (reverse Transkriptase) wird anschließend das einzelsträngige, virale RNA-Genom durch reverse Transkription in eine doppelsträngige DNA als Zwischenprodukt umgesetzt. Das Provirus, die doppelsträngige DNA, enthält jeweils am 5'-CAP und

am 3'-Ende LTRs. Am 5'-CAP befindet sich eine methylierte Kopfgruppe als Schutz vor enzymatischem Abbau durch Endonukleasen. An das 3'-Ende grenzt ein Poly-Adenosin-Schwanz, der für die Translation in eukaryotischen Zellen benötigt wird. LTRs sind selbstständige Regulationseinheiten, die unter anderem für die Initiation und Termination der Transkription zuständig sind. Zusätzlich zu den LTRs befinden sich drei offene Leserahmen (ORF, „open reading frame“) an den Enden. Diese kodieren für *gag* (gruppenspezifisches Antigen), (*Pol*)ymerase, (*Pro*)tease und Hüllproteine („*env*elope proteins“) [Oja *et al.* 2007, Pérot *et al.* 2012].

Das gruppenspezifische Antigen (*gag*) wird durch virale Proteasen (*prot*) in verschiedene Viruspartikel-aufbauende Proteine gespalten. Die RNA-/DNA-abhängige DNA-Polymerase (*pol*) wird für die reverse Transkription benötigt. Das „envelope“-Protein (*env*) kodiert Glykoproteine, wie zum Beispiel das transmembrane Protein (TP), welche sich auf der Zytoplasmamembran infizierter Zellen befinden. Wie alle anderen Viren sind Retroviren keine Lebewesen, besitzen somit keinen eigenen Stoffwechsel und benötigen für ihre Fortpflanzung einen Wirtsorganismus. In diesem Wirtsgenom wird das Provirus an zufälligen Positionen mithilfe der Integrase integriert. Das Provirus wird zum permanenten Teil der Wirtsgenom-DNA, somit bei jeder Teilung des Wirtsorganismus vermehrt und an die Tochterzellen weitergegeben. Dadurch bleibt der Retrovirus in der Population fixiert.

Retroviren befallen in erster Linie tierische Zellen. Zu den prominentesten beim Menschen bekannten Krankheiten durch Retroviren zählen das HTL-Virus („human T-cell leukemia“) und das HI-Virus (HIV, „human immunodeficiency virus“), welches die erworbene Immunschwäche AIDS („acquired immune deficiency syndrome“) auslöst.

### 2.2.3 Endogene Retroviren

Man unterscheidet zwischen exogenen und endogenen Retroviren. Exogene Retroviren infizieren ihren Wirt mittels Viruspartikel, können demnach auch horizontal, das heißt von Individuum zu Individuum, weitergegeben werden. Endogene Retroviren (ERV) hingegen liegen als Proviren im Wirtsgenom vor, welche von Generation zu Generation, also vertikal, übertragen werden. Erstmals beschreibt dies 1963 J.J. Bittner für das Maus-Mamma-Tumor-Virus (MMTV) [Peters *et al.* 1986].

Üblicherweise infizieren Retroviren somatische Zellen. Dennoch ist es ihnen vor rund 40 Millionen Jahren während der Evolution der Wirbeltiere gelungen in Zellen der Keimbahn einzudringen [Löwer *et al.* 1996, Barbulescu *et al.* 1999]. Seither werden sie wie Mendel'sche Gene weitervererbt [Nelson *et al.* 2003, Subramanian *et al.* 2011]. Die meisten HERVs überleben allerdings nur als Sequenz-Überreste und können deshalb keine exogenen Viren mehr bilden [Hughes und Coffin 2004]. Es wird vermutet, dass es sich um endogene Varianten uralter Keimbahn-Infektionen durch exogene Virusarten handelt [Seifarth *et al.* 2005]. Sie bilden den Grundstein der heutigen HERV-Gruppen im menschlichen Genom.

#### 2.2.4 Humane endogene Retroviren (HERVs)

Das menschliche Genom besteht zu circa acht Prozent der totalen zellulären DNA aus Resten retroviraler Sequenzen [Lander *et al.* 2001, Stoye 2012]. Diese werden humane endogene Retroviren (HERVs) genannt. Sie befinden sich an ungefähr 700.000 unterschiedlichen *Loci*. Der größte Anteil endogener Retroviren ist aufgrund von Mutationen und Deletionen inaktiv [Hughes und Coffin 2004]. Je länger die Integration des Genoms zurückliegt, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Mutationen. Häufig sind nur noch sogenannte „solitary LTRs“ vorhanden, welchen durch homologe Rekombination der flankierenden LTRs die übrigen Sequenzen fehlen [Lander *et al.* 2001]. Bisher sind ungefähr 40 phylogenetisch verschiedene HERV-Gruppierungen aktenkundig [Blomberg *et al.* 2009, Mayer *et al.* 2011, Stoye 2012], wobei die Anzahl der *Loci* für die einzelnen HERV-Gruppen eine weite Spanne zwischen ein paar wenigen bis Tausende aufzeigt.

Die Nomenklatur erfolgt bisher mithilfe des Ein-Buchstaben-Codes nach der Aminosäure der zugehörigen tRNA, welche als Primer für die reverse Transkription fungiert. Da allerdings entfernt verwandte Viren unter Umständen dieselbe tRNA verwenden, ist diese Nomenklatur umstritten. Bei Mäusen, Schafen und auch anderen Säugern wurde beobachtet, dass replikationskompetente endogene Retroviren unter anderem in Assoziation mit einigen Formen von Krebs stehen. Daher ist die Identifikation weiterer HERVs ein spannendes Thema in der Forschung, um eventuell weitere Fortschritte in der menschlichen Krebstherapie zu erzielen.

In fast jedem menschlichen Gewebe treten RNA-Transkripte von HERVs auf [Seifarth *et al.* 2005, Flockerzi *et al.* 2008]. Allerdings stammt der Großteil dieser Transkripte von HERV-*Loci*, die durch zahlreiche Mutationen in den Protein-kodierenden Sequenzen die Fähigkeit verloren haben, Proteine zu exprimieren, demnach replikationsinkompetent sind [Hughes und Coffin 2004]. Dennoch können diese nicht-kodierenden RNAs als regulatorische RNA fungieren.

Ein bekanntes Beispiel für die Funktion retroviraler Sequenzen im menschlichen Genom ist der ERVWE1/ERVW-1 Gen-Locus (HERV-W), welcher Syncytin-1 kodiert [Mallet *et al.* 2004]. Dieses retrovirale *env*-Gen spielt eine entscheidende Rolle bei der zellulären Differenzierung des Synzytiotrophoblasten während der Bildung der menschlichen Plazenta [Mi *et al.* 2000, Dupressoir *et al.* 2012]. Neben der Mitwirkung an der Ausprägung des Wirbeltier-Genoms können für ERVs noch zwei weitere Aufgabenfelder rekrutiert werden: Die Regulation zellulärer Gene durch die Angrenzung an LTRs, sowie die Aktivität von ERV-kodierenden Proteinen [Stoye 2012]. Neben HERV-W [Stauffer *et al.* 2004] sind in der Plazenta noch HERV-H [Johansen *et al.* 1989], HERV-R (ERV-3) [Larsson *et al.* 1994, Andersson *et al.* 1998] sowie HERV-K [Franklin *et al.* 1988, Simpson *et al.* 1996] nachweisbar, welche ein oder mehrere intakte, für Proteine kodierende, ORFs besitzen.

### 2.2.5 Humanes endogenes Retrovirus K

Vor allem die HERV-K Klasse scheint gegenüber anderen HERV-Gattungen, welche durch zahlreiche Mutationen und Deletionen enorm zu Schaden gekommen sind, relativ gut konserviert zu sein. Durch den Erhalt von *Loci* mit ORFs, die für *gag*, *prot*, *pol* und *env* kodieren sowie für einige andere regulatorische Proteine [Oja *et al.* 2007, Pérot *et al.* 2012], bilden sie die biologisch aktivste Gruppe innerhalb der humanen endogenen Retroviren [Tönjes *et al.* 1997].

Die Klassifizierung erfolgt in sechs Gruppen über Sequenzhomologien im *pol*-Gen, HML-1 bis -6. Innerhalb jeder Gruppe besteht eine Sequenzähnlichkeit von circa 85 Prozent, zwischen den Gruppen untereinander sind es in etwa 75 Prozent [Medstrand und Blomberg 1993, Seifarth *et al.* 1998].

Die Gruppe HERV-K(HML-2) ist eine der am besten erforschten Klassen, die ungefähr 30 Proviren sowie geschätzt zwischen 10.000 und 25.000 über das Gesamtgenom verteilte „solitary LTRs“ besitzt [Seifarth *et al.* 1998]. Hinzu kommt, dass einige HERV-*Loci* spezifisch für den Menschen sind [Kitamura *et al.* 1996, Schommer *et al.* 1996, Barbulescu *et al.* 1999, Mayer *et al.* 1999, Tönjes *et al.* 1999, Turner *et al.* 2001, Ruprecht *et al.* 2008].

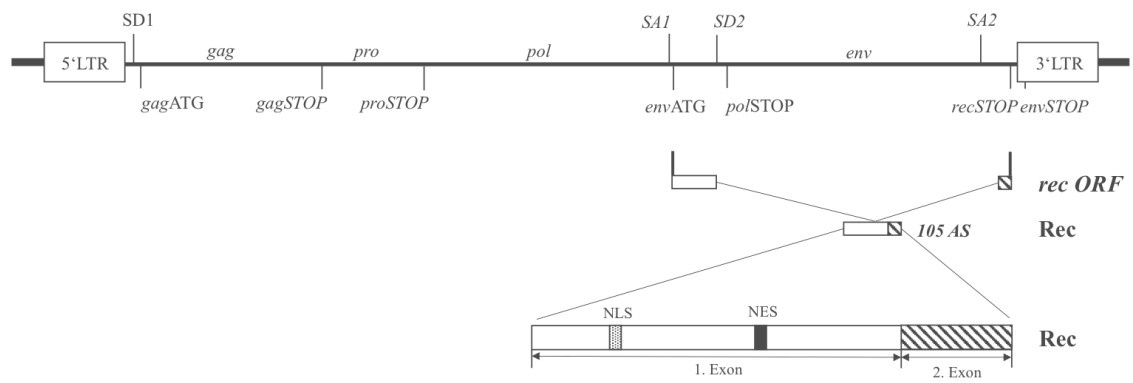
HERV-K(HML-2) lässt sich in zwei Typen unterteilen: Typ 1, welcher durch das Fehlen von 292 Basenpaaren (bp, „base pairs“) über eine provirale *pol-env*-Gengrenze verfügt und Typ 2, welcher ein ORF für das Rec-Protein besitzt [Löwer *et al.* 1995, Armbruster *et al.* 2002]. Von Letzterem kann ein Rec-Protein translatiert werden.

Das Rec-Protein ist ein funktionelles Homolog des HIV Rev [Yang *et al.* 1999], des Humanen T-Zell Leukämie Virus Rex, des Maus-Mamma Tumor Virus Rem und des Jaagsiekte Schaf Retrovirus Rej-Proteins, welches ungespleißte, retrovirale RNA aus dem Nucleus transportiert. Typ 2 infizierte vor circa 30 Millionen Jahren die Keimbahn der Vorfahren der Altwelt-Affen (*Catarrhini*) [Mayer *et al.* 1998].

Im Gegensatz dazu tritt der seit circa 20 Millionen Jahren existierende HERV-K(HML-2) Typ 1 Provirus, mit der fehlenden 292-bp Sequenz und der durch eine zusätzliche Mutation (GA → GT) des Nukleotids 6495 entstandenen neuen Spleißdonorstelle 2 (SD2, „splice donor site“) [Löwer *et al.* 1993], erst im Genom von Orang-Utans, Gorillas, Schimpansen und dem Menschen auf [Heyne *et al.* 2015]. Durch das Fehlen der charakteristischen 292 Basenpaare, welche circa 50 bp auf der *env*-kodierenden Region liegen [Ono *et al.* 1986], die auch die Spleißdonorstelle 1 (SD1) beinhaltet, kann Typ 1 kein Rec-Protein translatieren [Schmitt *et al.* 2015].

Nur mithilfe der entscheidenden SD2 besitzt Typ 1 den offenen Leserahmen für *np9* („nuclear protein of 9 kDa“).

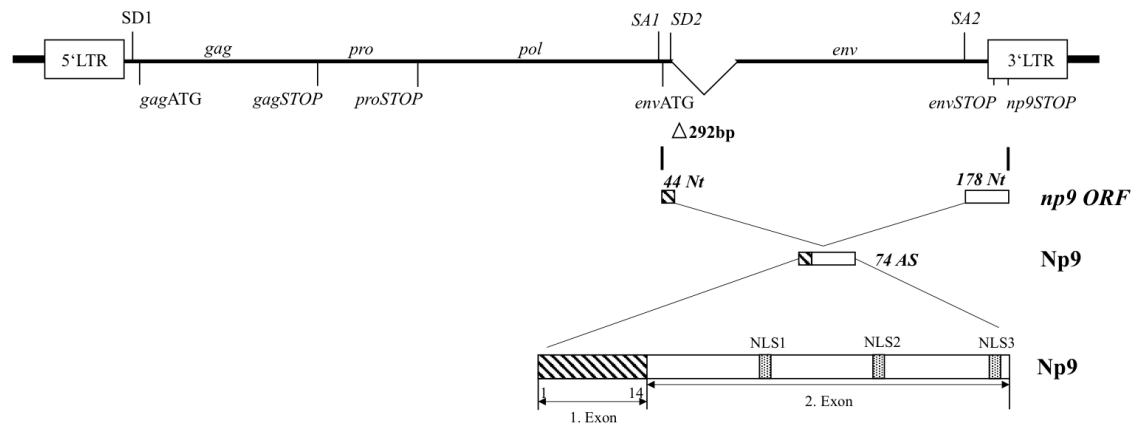
**A**  
 HERV-K(HML-2) Typ 2





**B**

HERV-K(HML-2) Typ 1



**C**

Insertionszeiten der HERV-K(HML-2) Familie

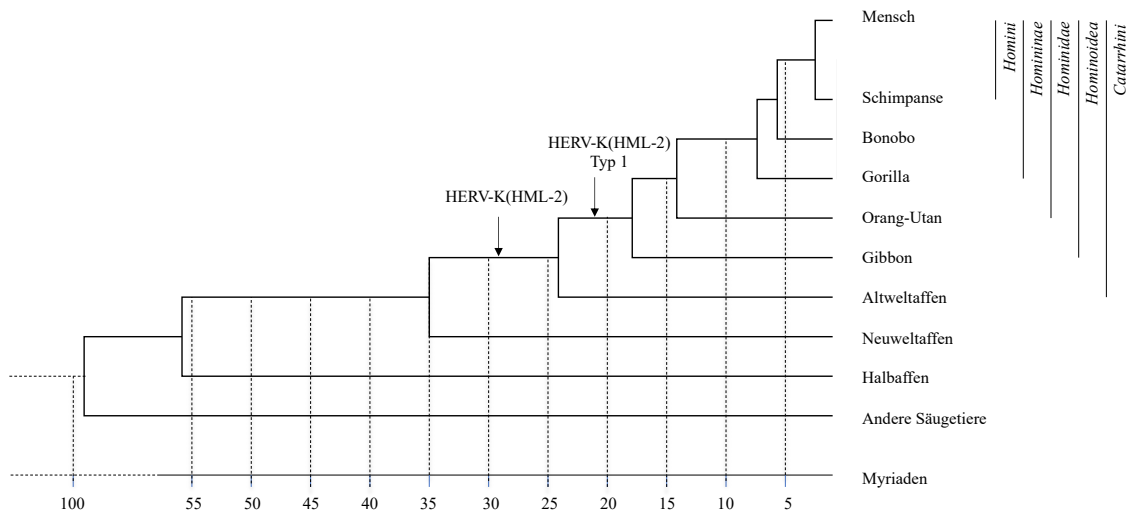


Abbildung 4: Provirale Struktur von HERV-K(HML-2) und Keimbahn-Integration während der Evolution der Primaten

- A.) Genomstruktur des HERV-K(HML-2) Typ 2 Provirus' mit dem offenen Leserahmen für *rec*. Die dicken Linien am Ende der Strukturen stehen stellvertretend für die genomische DNA der Zelle. LTR = „Long-Terminal Repeat“; SD und SA = splice donor und splice acceptor sites; *gag*, *pro*, *pol*, *env* = „group specific antigen, protease, polymerase, envelope protein“ offene Leserahmen; Nt = Nukleotide; AS = Aminosäuren; NLS = nukleares Lokalisations-Signal; NES = nukleares Export-Signal; bp = „base pair“.
- B.) Genomstruktur des HERV-K(HML-2) Typ 1 Provirus' – definiert durch die charakteristische 292-bp Deletion am 5'-Ende des *env*-ORF. Durch eine zusätzliche Mutation wurde eine neue Spleißdonorstelle (SD) generiert. Ergebnis ist eine alternativ gespleißte mRNA mit einem ORF, das das 74 Aminosäurereste lange Protein Np9 kodiert.
- C.) Evolutionäre Beziehungen zwischen den Primaten und ausgewählten Primaten-Spezies. Die Pfeile stellen die Fixierung der HERV-K(HML-2) Typ 1 und 2 Proviren dar. Myr = „million years“.
- Abbildungen selbst erstellt und modifiziert nach Heyne *et al.* 2015.

## 2.3 „Nuclear protein of 9 kDa” (Np9)

### 2.3.1 Herkunft

2002 gelingt es Armbruester *et al.* bei der Untersuchung von Seminomproben neben einem 473 bp-Transkript, welches das *rec*-Transkript definiert, ein weiteres 256-bp großes Transkript in drei von drei Proben darzustellen. Mithilfe von Genbankanalysen zeigt sich eine 100 prozentige Homologie dieses Transkripts mit der HERV-K-*env*-Sequenz des HERV-K101 [Armbruester *et al.* 2002], über die erstmals 1999 berichtet wurde [Barbulescu *et al.* 1999]. Bislang sind sechs HERV-K Typ 1-Sequenzen charakterisiert, welche dem proviralem Typ 1 gleichkommen. Sie besitzen alle den *np9*-ORF sowie die relevante SD2: HERV-K101, -K102, -K103, -K107, -K110 und -K11 [Barbulescu *et al.* 1999, Sugimoto *et al.* 2001].

Nur Gorillas, Schimpansen und der Mensch besitzen das Potential dieses Protein zu bilden [Heyne *et al.* 2015]. Da Gibbons und Orang-Utans zwar bereits die 292-bp Sequenz fehlt, aber die nötige SD2 evolutionär betrachtet „noch“ fehlt, besitzen diese kein *np9*-ORF [Heyne *et al.* 2015].

Zusammengesetzt aus drei Exons kodiert der *np9*-ORF das 74 Aminosäurereste lange Protein Np9. Die aus dem zweiten Exon von *np9* kodierten 15 N-terminalen aa („amino acid residues“) sind identisch mit dem N-*Terminus* des 87 aa langen Rec-Proteins [Löwer *et al.* 1993]. Das dritte Exon beginnt bei Nukleotid 8118 [Löwer *et al.* 1993] und wird in einen charakteristischen, von *rec* verschiedenen, 59 aa großen C-terminalen ORF translatiert [Heyne *et al.* 2015].

Außerdem zeigen Armbruester *et al.* 2004 durch Sequenzanalysen, dass drei putative Kernlokalisations-signale (NLS, „Nuclear Localization Signal“) innerhalb des zweiten Exons zu finden sind und können *np9* durch Fluoreszenz-basierte Zelllokalisationsassays im Kern nachweisen [Armbruester *et al.* 2004]. Genauer gesagt, ist die NLS1-Mutation für die effektive Lokalisation von Np9 im Kern zuständig und NLS3 für die Direktion des Proteins in subnukleäre Kompartimente [Armbruester *et al.* 2004]. Dies erklärt den Zusatz „nuklear“. Der andere Teil des Namens steht im Zusammenhang mit dem Molekulargewicht des Proteins, welches geschätzt bei 8,7 kDa liegt [Armbruester *et al.* 2002].

### 2.3.2 Vorkommen und klinische Bedeutung von Np9

Das HML-2-Transkript und seine Proteine scheinen vor allem in Zusammenhang mit Keimzelltumoren zu stehen, da es bereits im frühen Tumorstadium stark hochreguliert wird [Schmitt *et al.* 2015]. Außerdem können hohe Antikörper-Titer gegen HML-2 gag- und env-Proteine zum Zeitpunkt der Tumordetektion nachgewiesen werden [Ruprecht *et al.* 2008].

2002 haben Armbruester *et al.* die Expression von Np9, Rec und gag in gesunden, transformierten und Tumorgewebszellen untersucht: Das aus dem HERV-K(HML-2) Typ 1 Provirus exprimierte Np9 kann in mehr als 90 Prozent transformierter Zellen nachgewiesen werden, ebenso wie gag. Rec, welches aus Typ 2 gebildet wird, wird hingegen nur in 13 Prozent der transformierten Zellen gesehen, nämlich nur in Teratokarzinom-Zelllinien und in einer einzigen Mammakarzinom-

Zelllinie. In transgenen Mäusen kann die Expression des HERV-K *rec*-Gens in die Entwicklung von Keimzellen eingreifen und ein *Carcinoma in situ* induzieren [Galli *et al.* 2005, Denne *et al.* 2007].

Zu 45 Prozent kann *np9* in Tumorgewebszellen nachgewiesen werden: 52 Prozent in Mammakarzinomen, 37 Prozent in Keimzellkarzinomen und 33 Prozent in leukämischen Lymphozyten, allerdings in keinem der beiden getesteten Ovarialkarzinome [Armbruster *et al.* 2004]. Ein Vergleich von *np9* mit *rec* zeigt, dass beide gleichermaßen in Keimzellkarzinomen vertreten sind, *rec* aber häufiger in Mammakarzinomen als *np9*. Transkripte von *np9* werden exklusiv in Tumorgewebe und transformierten Zellen exprimiert, alle entstanden aus dem Provirus Typ HERV-K101 und -KII [Armbruster *et al.* 2002].

### 2.3.3 Np9-Interaktion mit PLZF

Das Protein Rec, das aus dem COOH-terminalen ORF des HERV-K(HML-2) Typ 2 *env*-Gens entstehenden 305 bp Transkript translatiert werden kann, und das PLZF-Protein („promyelocytic leukaemia zinc finger“) interagieren über die Aminosäuren (AS) 21 bis 47 im Zentrum sowie über die AS 89 bis 105 des C-Terminus des Rec-Proteins miteinander [Denne *et al.* 2007]. Obwohl die Vermutung naheliegt, bindet das Np9-Protein, welches 14 N-terminale AS mit dem Rec-Protein teilt, nicht über den gleichen Bereich wie Rec, sondern über die AS 23 bis 29 mit dem PLZF [Denne *et al.* 2007]. Ebenso kann das Team zeigen, dass die Interaktionen zwischen PLZF und Rec sowie mit Np9 im Zellkern stattfinden [Denne *et al.* 2007].

PLZF wird erstmals als Fusionsprotein in Verbindung mit akuter myeloischer Leukämie kombiniert mit dem „retinoic acid alpha receptor“ (RAR $\alpha$ ) identifiziert [SJ. Chen *et al.* 1993, Z. Chen *et al.* 1993]. Als Tumorsuppressor nimmt es sowohl Einfluss auf die Stammzell-Pluripotenz im hämatopoetischen System [Reid *et al.* 1995] als auch auf Keimzellen [Buaas *et al.* 2004, Costoya *et al.* 2004]. Als transkriptioneller Repressor besitzt es entscheidende Funktionen in Bezug auf die Selbsterneuerung und Erhaltung von spermatogenen Stammzellen [Buaas *et al.* 2004].

Die Tumor-assoziierten Proteine Rec und Np9 wirken als Transkriptionsfaktoren inhibierend auf den Tumorsuppressor und Stammzellregulator PLZF [Denne *et al.* 2007]. Außerdem fungieren beide Proteine als Onkoproteine, indem sie den endogenen *c-myc* Genpromotor in PLZF-exprimierenden Zellen aktivieren [Denne *et al.* 2007]. *Myc* wird gemeinsam mit Notch häufig mit Karzinogenese assoziiert, aber sie spielen auch als kontrollierende Mitspieler im Rahmen von Selbsterneuerung, Pluripotenz und Differenzierung eine Rolle [Singh und Dalton 2009].

### 2.3.4 Weitere Funktionen von Np9

Als weiterer Interaktionspartner von Np9 dient das dem PLZF verwandte testikuläre Zinkfinger (TZF) Protein [Kaufmann *et al.* 2010]. Die jeweiligen miteinander interagierenden Bindungsstellen sind bei Rec die N- und C-terminalen Domänen sowie die C-terminale Domäne

von TZF (AS 375-450) [Kaufmann *et al.* 2010]. Rec kann mithilfe von TZF und dem Androgenrezeptor (AR) einen trimeren Komplex bilden, der der TZF-vermittelten Repression der AR-induzierten Transaktivierung entgegenwirkt [Kaufmann *et al.* 2010].

Gross *et al.* zeigen 2011 das virale Epstein-Barr nukleäre Antigen 2 (EBNA-2) als weiteren Interaktionspartner von Np9 auf. EBNA-2 wird durch Np9 herunterreguliert, wobei dies entweder als Verteidigungsmechanismus der Zelle gegen virale Infektionen oder als Adaption des Virus‘ interpretiert werden könnte [Gross *et al.* 2011].

Die Annahme, dass die Proteine Np9 und Rec in humanen nicht-malignen embryonalen Stammzellen (ESCs, „embryonic stem cells“) und induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSCs, „induced pluripotent stem cells“) eine besondere Funktion spielen und in Zusammenhang mit Pluripotenz stehen könnten, wird 2013 von dem Team um Fuchs aufgegriffen: Die Autoren zeigen, dass die HERV-K Typ 1 Sequenz K101(22q11.21) sowohl in ESCs, iPSCs als auch in ECCs („embryonal carcinoma cells“) exprimiert wird. Weiterhin beobachtet die Gruppe, dass die vom HERV-K(HML-2)-Provirus kodierte Proteine Np9 und Rec vorzugsweise in pluripotenten Stammzellen aktiviert werden. Gleichzeitig wird deren Expression während der Differenzierung „silenced“ (stumm geschaltet), unabhängig von ihrer chromosomalen Lokalisation [Fuchs *et al.* 2013].

Neueste Studien von Chan und Kollegen unterstützen die Vorstellung, dass Np9 eine entscheidende Rolle in der Onkogenese spielt [Chan *et al.* 2019]. Bei Untersuchungen mit NCCIT-Teratokarzinomzellen zeigt sich unter Reduktion von Np9 eine Sensibilisierung der Zellen auf die Therapie mit Bleomycin und Cisplatin [Chan *et al.* 2019]. Bei Np9-Induktion hingegen migrieren NCCIT-Teratokarzinomzellen und zeigen somit eine bessere Wundkontrolle [Chan *et al.* 2019].

## 2.4 Zielsetzung

Humane endogene retrovirale (HERV) DNA macht etwa acht Prozent des menschlichen Genoms aus und ist zum Teil über Jahrtausende unverändert geblieben, was auf eine mögliche wichtige Funktion einiger dieser Sequenzen im Trägerorganismus hindeutet. Eines der konservierten HERV-Gene kodiert für das Protein Np9 („Nuclear protein of 9 kDa“). Der funktionelle *np9*-Leserahmen entstand jedoch erst durch das Auftreten einer neuen Spleißdonorstelle im Genom der Vorfahren der heutigen Gorillas, Schimpansen und der Menschen (*Homininae*), so dass Np9 ausschließlich in diesen Primaten vorkommt. Seine Funktion ist weitgehend unbekannt. Interessanterweise konnten HERV-Transkripte einschließlich derjenigen von *np9* spezifisch in somatischen Stammzellen, embryonalen Stammzellen und induzierten pluripotenten Stammzellen nachgewiesen werden. Es lag also der Verdacht nahe, dass Np9 eine Funktion speziell in Stammzellen von Gorillas, Schimpansen und Menschen haben könnte. Außerdem hatten Vorarbeiten aus

unserer Arbeitsgruppe die Expression von Np9 bereits mit bestimmten Tumortypen des Menschen in Verbindung gebracht. Tumorwachstum wird nach allgemeiner Auffassung jedoch ebenfalls durch Stammzellen, sogenannten „cancer stem cell-like cells“ (CSCs, Krebsstammzell-ähnliche Zellen), reguliert.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb zunächst in Kulturen von Zellen der akuten myeloiden Leukämie (AML) CSC-ähnliche Zellen anzureichern und deren erfolgreiche Anreicherung anhand des biochemischen Nachweises von Stammzellmarkern darzustellen. Nachfolgend sollte untersucht werden, ob parallel mit dem Auftreten von Stammzellmarkern Np9-Protein exprimiert wurde. Der Nachweis von Np9 erwies sich wegen des sehr niedrigen Expressionslevels des Proteins als Herausforderung. Nicht zuletzt sollte getestet werden, ob eine Herunterregulierung von Np9 mittels RNAi-Technologie zu einem spezifischen Phänotyp führte.

### 3. Material

#### 3.1 Chemikalien, Filter, Membranen

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
<b>5-Fluorouracil (5-FU)</b>	Sigma
<b>Aceton</b>	Hedinger
<b>Acrylamid</b>	Roth
<b>Agarose</b>	Biozym
<b>Amersham Hyperfilm ECL™</b>	GE Healthcare
<b>Amersham-Hyperfilm ECL™</b>	GE Healthcare
<b>Ammoniumpersulfat</b>	Merck
<b>Amphotericin B</b>	Sigma
<b>Bisacrylamid</b>	Roth
<b>Bovines Serumalbumin (BSA)</b>	New England Biolabs
<b>Bromphenolblau</b>	Merck
<b>Calciumchlorid</b>	Merck
<b>Dimethylsulfoxid (DMSO)</b>	Merck
<b>Dithiothreitol (DTT)</b>	Roth
<b>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)</b>	Sigma
<b>Enhanced Chemoluminescence Western Blotting Detection System (ECL™)</b>	Pierce
<b>Ethanol</b>	Sigma
<b>Ethylendiamintetraacetat (EDTA)</b>	Merck
<b>Formaldehyd 37%</b>	Sigma
<b>Formamid</b>	Applichem
<b>Fötales Kälberserum (FKS)</b>	PAA Laboratories GmbH
<b>Glycerin</b>	Merck
<b>Glycin</b>	Applichem
<b>Immobilon-Membran</b>	Millipore
<b>Isopropanol</b>	Hedinger
<b>Kaliumchlorid</b>	Merck
<b>Luminata Forte Western HRP Substrate</b>	Millipore
<b>Luminol Enhancer Solution</b>	Thermo Scientific
<b>Magermilchpulver</b>	Töpfer
<b>Magnesiumchlorid</b>	Merck
<b>β-Mercaptoethanol</b>	Merck

<b>Methanol</b>	Roth
<b>MOPS</b>	Sigma
<b>N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED)</b>	Sigma
<b>Natriumacetat</b>	Merck
<b>Natriumchlorid (NaCl)</b>	Roth
<b>Natriumdodecylsulfat (SDS)</b>	Merck
<b>Natriumhydroxid</b>	Merck
<b>Natriumphosphat</b>	Merck
<b>Paraformaldehyd</b>	Merck
<b>Penicillin-Streptomycin</b>	Gibco
<b>Peroxide Solution</b>	Thermo Scientific
<b>Propidiumiodid</b>	Sigma
<b>Protease-Inhibitor-Cocktail</b>	Sigma
<b>Rapamycin</b>	Sigma
<b>RPMI 1640 Medium</b>	PAN Biotech
<b>Trichloressigsäure</b>	Merck
<b>Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)</b>	Appllichem
<b>Westar ETA C</b>	Cyanagen
<b>Westar Supernova</b>	Cyanagen
<b>Zahnfilm Entwickler Konzentrat</b>	Adefo-Chemie
<b>Zellulosefilter Whatman™</b>	Schleicher & Schuell

Tabelle 3: Chemikalien, Filter, Membranen

In dieser Tabelle sind die verwendeten Chemikalien, Filter und Membranen mit ihren jeweiligen Herstellern aufgeführt.

### 3.2 Enzyme

<b>Enzym</b>	<b>Hersteller</b>
<b>RNaseA (aus Rinderpankreas)</b>	Roche
<b>Restriktionsendonukleasen</b>	New England Biolabs, Thermo Fisher Scientific

Tabelle 4: Enzyme

In dieser Tabelle sind zum Einsatz gekommene Enzyme mit ihren jeweiligen Herstellern aufgeführt.

### 3.3 Größen- und Molekulargewichtsmarker

#### 3.3.1 Proteingewichtsmarker

Um das Molekulargewicht der Proteine zu bestimmen, kam ein vorgefärbter Marker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Firma Thermo Fisher Scientific) zum Einsatz. Dieser bestand aus einer Zusammensetzung aus zehn in *E. coli* rekombinant hergestellten und aufgereinigten Proteinen, die eine Größe zwischen zehn und 180 kDa aufwiesen. Zur Größenreferenz dienten ein 70 kDa-Protein, welches an einen orangenen Farbstoff sowie ein zehn kDa-Protein, welches an einen grünen Farbstoff gekoppelt waren. Die übrigen acht der zehn Proteine wurden kovalent an einen blauen Farbstoff gekoppelt.

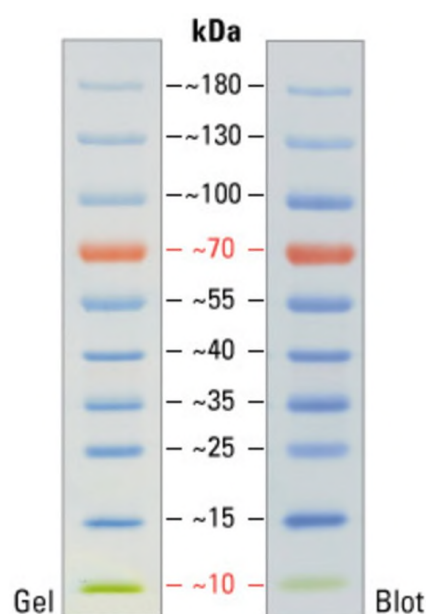


Abbildung 5: PageRuler™

Der PageRuler™ ist eine vorgefärbte Proteinleiter, hier beispielhaft die der Firma Thermo Fisher Scientific. Die Größen der einzelnen Proteine im Marker sind anhand der Abbildung ersichtlich (~180, ~130, ~100, ~70, ~55, ~40, ~35, ~25, ~15, ~10 kDa). kDa = Kilodalton.

#### 3.3.2 Primärantikörper

Bezeichnung	Antikörper	Bezugsquelle
<b>β-Aktin</b>	Monoklonaler Anti-β-Aktin-Antikörper, IgG (Maus)	Sigma
<b>10B1-Np9</b>	Monoklonaler Anti-B10-Np9-Antikörper, IgG (Ratte)	Uniklinikum Homburg (Saar)
<b>22E4-Np9</b>	Monoklonaler Anti-22E4-Np9-Antikörper, IgG (Ratte)	Uniklinikum Homburg (Saar)
<b>Caspase-3 (8G10)</b>	Anti-Caspase-3 monoklonaler-Antikörper, IgG (Maus)	Cell Signaling Technology



<b>Rec</b>	Monoklonaler Anti-Rec Antikörper, IgG (Kaninchen)	Uniklinikum Homburg (Saar)
<b>SP</b>	Monoklonaler Anti-SP Antikörper, IgG (Kaninchen)	Uniklinikum Homburg (Saar)
<b>Survivin</b>	Monoklonaler Anti-Survivin-Antikörper, IgG (Maus)	St. John's Laboratory

Tabelle 5: Primärantikörper

Auflistung der eingesetzten Primärantikörper sowie deren Bezugsquelle. Alle Antikörper sind monoklonal. IgG = Immunglobulin G.

### 3.3.3 Sekundärantikörper

Bezeichnung	Antikörper	Bezugsquelle
<b>Anti-Kaninchen-POX</b>	Peroxidase-gekoppelter anti-Kaninchen Antikörper	Sigma
<b>Anti-Maus-POX</b>	Peroxidase-gekoppelter anti-Maus Antikörper	Sigma
<b>Kaninchen IgG anti-Ratte</b>	Kaninchen-gekoppelter anti-Ratte Antikörper	Sigma

Tabelle 6: Sekundärantikörper

Darstellung der eingesetzten Sekundärantikörper sowie deren Bezugsquelle. POX = Peroxidase, IgG = Immunglobulin G.

### 3.4 Zelllinien

	<b>HL-60</b>	<b>KG-1a</b>	<b>Kasumi-1</b>
<b>ATCC®</b>	CCL-240™	CCL-246.1	CRL-2724
<b>Zelltyp</b>	Humane akute myeloische Leukämie		
<b>Ursprung</b>	1976, peripheres Blut einer 35-jährigen Frau mit AML FAB M2	Knochenmark eines 59-jährigen Mannes	1989, peripheres Blut eines 9-jährigen Jungen mit AML FAB M2
<b>Medium</b>	RPMI 1640 mit 20% FKS, Antibiotikum und Amphotericin B		
<b>Immunologie</b>	CD3 <sup>-</sup> , CD4 <sup>+</sup> , CD13 <sup>+</sup> , CD14 <sup>-</sup> , CD15 <sup>+</sup> , CD19 <sup>-</sup> , CD33 <sup>+</sup> , CD34 <sup>-</sup> , HLA-DR	CD3 <sup>-</sup> , CD4 <sup>-</sup> , CD13 <sup>+</sup> , CD14 <sup>-</sup> , CD15 <sup>+</sup> , CD19 <sup>-</sup> , CD33 <sup>+</sup> , CD34 <sup>+</sup>	CD3 <sup>-</sup> , CD4 <sup>+</sup> , CD13 <sup>+</sup> , CD14 <sup>-</sup> , CD15 <sup>+</sup> , CD19 <sup>-</sup> , CD33 <sup>+</sup> , CD34 <sup>+</sup> , CD38 <sup>+</sup> , CD71 <sup>+</sup> , HLA-DR

Tabelle 7: Eigenschaften der Zelllinien

Gegenüberstellung der Charakteristika der AML-Zelllinien HL-60, KG-1a und Kasumi-1. Unter anderem werden die erste Isolation sowie die immunologischen Eigenschaften aufgeführt.

### 3.5 Medium mit zugegebenen Lösungen

Medium und Lösung	Zusammensetzung	Hersteller
<b>RPMI 1640 Medium</b>	• 500 ml	PAN Biotech
<b>FKS</b>	• Vor Zugabe 30 min Inaktivierung bei 55° • 20% Zugabe zum Medium	PAA Laboratories
<b>Penicillin-Streptomycin</b>	• 5 ml Zugabe zum Medium	Sigma
<b>Amphotericin B</b>	• 500 µl Zugabe zum Medium	Sigma

Tabelle 8: Medium und Lösungen

Zusammensetzung des verwendeten Mediums mit Auflistung der zugegebenen Lösungen und des jeweiligen Herstellers.

### 3.6 „Small interfering RNAs“ (siRNAs)

#### 3.6.1 Np9-siRNA

Sequenzen	np9-1	Sense	CCAUCGGAGAUGCAAAGAATT
		Antisense	UUCUUUGCAUCUCCGAUGGGT
	np9-2	Sense	CAUCGGAGAUGCAAAGAAATT
		Antisense	UUUCUUUGCAUCUCCGAUGGG
	np9-3	Sense	GCAAGAGAGAUCAGAUUGUTT
		Antisense	ACAAUCUGAUCUCUCUUGCTT
	np9-4	Sense	GAAGUAGACAUAGGAGACUTT
		Antisense	AGUCUCCUAUGUCUACUUCTT

Die Np9-siRNA beinhaltet einen siRNA-Cocktail aus vier verschiedenen Sequenzen.

#### 3.6.2 Kontroll-siRNA

Sequenz	Sense	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT
	Antisense	ACGUGACACGUUCGGAGAATT

Alle siRNA-Produkte stammen von der Firma Qiagen.

### 3.7 Gele und Puffer für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

	<b>Trenngel</b>	<b>Sammelgel</b>
Tris-HCl, pH 6,8		125 mM
Tris-HCl, pH 8,8	375 mM	
Acrylamid/Bisacrylamid	12%	4%
SDS	0,1%	0,1%
APS	0,1%	0,1%
TEMED	0,1%	0,25%
<i>Aqua dest.</i>	<i>Ad 5 ml</i>	<i>Ad 2 ml</i>

Tabelle 9: Trenn- und Sammelgel-Zusammensetzung für die SDS-PAGE  
Zusammensetzung des 12%-igen Trenngels und des 4%-igen Sammelgels zur Gelherstellung für die SDS-PAGE.

	<b>1x SDS-Ladepuffer</b>	<b>10x SDS-Laufpuffer</b>	<b>Western-Transferpuffer</b>
Tris-HCl, pH 6,8	62,5 mM	25 mM	25 mM
Glycin		192 mM	192 mM
Glycerin	10%		
SDS	2%	0,1%	
$\beta$ -Mercaptoethanol	5%		
Methanol			20%
Bromphenolblau	0,001%		

Tabelle 10: Zusammensetzung der Puffer für die SDS-PAGE  
Auflistung der Bestandteile des Ladepuffers für den Zellaufschluss, die des SDS-Laufpuffers für die Elektrophorese und die des Western-Transferpuffers für den Proteintransfer.

### 3.8 Stripping Puffer zur Wiederverwendung von Membranen nach ECL-Färbung

	<b>Zusammensetzung</b>	<b>Menge</b>
<b>Stripping Puffer</b>	Tris (pH 6,6)	62,5 mM
	$\beta$ -Mercaptoethanol	100 nM
	SDS	2%

Tabelle 11: Stripping Puffer zur Wiederverwendung von Membranen  
Dargestellt ist die Zusammensetzung des Stripping Puffers. Mit diesem können nach Einsatz des ECL-Detektions-Kits von Thermo Fisher Scientific an die Membran gebundene Primär- und Sekundärantikörper wieder entfernt und die Membran anschließend ein weiteres Mal verwendet werden.

### 3.9 Computersoftware

Diese Arbeit wurde mithilfe des Textverarbeitungsprogramms Word (Microsoft® Office 365-Abonnement für Mac, Version 16.31), dem Präsentationsprogramm Power Point (Microsoft® Office 365-Abonnement für Mac, Version 16.31) sowie dem Literaturverwaltungsprogramm Zotero (Version 5.0.76) erstellt.

## 4. Methoden

### 4.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Eine Zellkultur ist eine Kultivierung und Vermehrung von eukaryotischen Zellen außerhalb eines Organismus', also *in vitro* in einem Nährmedium unter kontrollierten Bedingungen. Abhängig davon, aus welchem Gewebe die Kultur stammt, wachsen die Zellen *in vitro* adhärent beziehungsweise als Suspensionskultur.

Die Kultivierung erfolgte in einem halbsynthetischen Nährmedium (Tabelle 8), welches eine ansatzweise natürliche physiologische Umgebung für die Zellen darstellte. Zu den Bestandteilen dieses gepufferten Mediums gehörten unter anderem Aminosäuren, Salze, Vitamine und Zusätze von Antibiotika (Streptomycin-Penicillin), Amphotericin B und fötalem Kälberserum (20%) (3.5 Medium mit zugegebenen Lösungen).

#### 4.1.1 Kultivierung der Zelllinien HL-60, KG-1a und Kasumi-1

Die Stammhaltung der Zelllinien erfolgte in 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen mit je 20 ml RPMI-Medium. In dem CO<sub>2</sub>-Brutschrank Hera-cell (Heraeus Instruments, Düsseldorf) wurden die Kulturflaschen bei 37°C mit einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von sieben Prozent aufbewahrt.

Je nach Wachstum wurden die Zelllinien zwei Mal pro Woche im Verhältnis zwischen 1:6 und 1:2 gesplittet: Das Splitten der Linie HL-60 erfolgte im Verhältnis 1:4, das der Linie KG-1a im Verhältnis 1:3 und die Kasumi-1 Linie im Verhältnis 1:2.

#### 4.1.2 Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zellen

Für eine Langzeitlagerung können eukaryotische Zellen in flüssigem Stickstoff bei -196°C aufbewahrt werden.

Dafür wurden die Suspensionskulturen (1600 rpm, 6 min) pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit kaltem Kulturmedium gründlich resuspendiert, damit keine Zellaggregate mehr vorhanden waren. Diese könnten ansonsten das Eindringen des Gefrierschutzmittels erschweren. Es folgte das Mischen der Zellsuspension (1 ml) mit dem Gefrierschutzmittel (100 µl steriles DMSO) in einem gekühlten Kryotube. Das Einfrieren selbst erfolgte im Gegensatz zu Bakterienzellen langsam über einen mehrstufigen Prozess. Gestartet wurde mit einer Inkubation der Zellen bei -20°C für circa eine Stunde, danach bei -70°C für 24 Stunden und anschließend in flüssigem Stickstoff zur Lagerung.

In dieser Form können die Zellen für mehrere Jahre verwahrt werden.

Verglichen mit dem Einfrieren, muss das Auftauen eukaryotischer Zellen schnell vorgehen. Auftaut wurde die Zelllinie im Wasserbad bei 37°C und anschließend zehn Milliliter vorgewärmtes Kulturmedium zugegeben. Um das Gefrierschutzmittel DMSO (Dimethylsulfoxid) komplett aus den Zellen zu entfernen, folgte zwei Mal hintereinander ein Waschschrift in der Zentrifuge bei

1290 rpm für fünf Minuten. Schließlich fand die Kultivierung im Brutschrank statt. Dafür wurde das nach dem Abzentrifugieren entstandene Zellpellet in einem Milliliter Kulturmedium resuspendiert, in ein Zellkulturgefäß pipettiert und mit der entsprechenden Menge an Medium ergänzt.

#### 4.1.3 Transiente Transfektion mit HiPerFect® (Qiagen)

Das Prinzip der Transfektion basiert auf einem Gentransfer von fremder DNA in die Wirtszelle ohne Transportvehikel, den sogenannten Vektoren. Unterschieden wird zwischen einer transienten, vorübergehenden und einer stabilen Transfektion, der dauerhaften Plasmid-Einbringung. Die bei der transienten Transfektion eingebrachten Gene sind nur zeitlich begrenzt (transient) aktiv, sodass es während weiterer Zellteilungen zum Verlust derer kommt.

Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen in eine 35 mm Platte (Sechs-Lochplatte) mit einem Milliliter vorgewärmtem Medium ausgesät ( $5 \times 10^5$ ), sodass sie am darauffolgenden Tag zu circa 40 bis 60 Prozent konfluent waren. Am Tag der Transfektion wurde zunächst das oben auf den Zellen schwimmende Medium vorsichtig abpipettiert und jeweils mit einem Milliliter frischem vorgewärmtem Medium erneut aufgefüllt. Zum Ansetzen einer finalen siRNA-Konzentration von 100 nM wurden 20 µl einer 20 µM siRNA-Stammlösung in 500 µl sterilem PBS verdünnt. Nach Zugabe von 30 µl des HiPerFect Transfektionsreagenz‘ zur verdünnten siRNA wurde sorgfältig gevortext. Um eine Komplexbildung zu ermöglichen, folgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für zehn Minuten. Schließlich wurden die Komplexe tröpfchenweise zur Zellsuspension zugegeben und durch Schwenken vermengt. Hiernach inkubierten die Proben für weitere sechs Stunden unter ihren normalen Wachstumsbedingungen im Brutschrank. Im Anschluss wurden jeweils zwei Milliliter des vorgewärmten Kulturmediums hinzugefügt und die Zellen erneut für sechs bis 72 Stunden bis zur Analyse inkubiert.

#### 4.1.4 Klonogener Assay

Mithilfe des klonogenen Assays kann der Einfluss verschiedener Parameter auf das Wachstum einer Zellkultur beurteilt werden. So können Wachstumseigenschaften charakterisiert und die Fähigkeit zur Ausbildung von Kolonien untersucht werden. Dadurch können Aussagen zum Langzeitüberleben, akute Veränderungen von Vitalität und Proliferationsfähigkeit sowie über Apoptoseraten getroffen werden.

Dafür wurden nicht adhärent wachsende Zellen in kleine Zellkulturgefäße ( $10 \text{ cm}^3$ ) ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Behandlung der Zellen mit den zu testenden Substanzen. Allerdings sollte der Zeitraum zwischen Aussaat und Behandlung ein Zeitintervall von 24 Stunden nicht überschreiten, um das klonogene Zellüberleben, das Überleben der Einzelzelle, beurteilen zu können. Nun folgte ein Inkubationszeitraum unter normalen Wachstumsbedingungen im Brutschrank, der je nach Experiment zwischen drei und 16 Tagen andauerte. Innerhalb dieser Inkubationszeit wurde jeweils alle drei Tage das Kulturmedium abzentrifugiert und frisches Medium,

welches die zu testende Substanz enthielt, neu hinzu pipettiert. Zur Kontrolle wurde jeweils unter gleichen Bedingungen eine unbehandelte Kontrollprobe angefertigt, die statt der zu testenden Substanz „neutrales“ DMSO als Zusatz enthielt. Im Anschluss an die Inkubation folgte je nach Fragestellung die Herstellung von Proteinextrakten und deren Konzentrationsbestimmung beziehungsweise eine transiente Transfektion mittels HiPerFect<sup>®</sup>.

Alle Arbeiten mit eukaryotischen Zellen fanden unter einer Sicherheitswerkbank in sterilen Bedingungen statt.

#### 4.1.5 Apoptose-Assay: DNA-Färbung mit Propidiumiodid

Propidiumiodid (PI) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, welcher in die Nukleinsäuren interkaliert sowie den Zellkern anfärbt. Da der Farbstoff nur die perforierte Zellmembran toter Zellen passieren kann und nicht die Intakte vitaler Zellen, wird PI zur Diskriminierung der Zellviabilität in der Durchflusszytometrie angewandt. Angeregt wird PI bei einer Wellenlänge um 490 nm, in diesem Fall durch einen Argonlaser mit 488 nm und erreicht sein Emissionsmaximum bei 617 nm. Mithilfe eines optischen Systems wird das vom Laser ausgesandte monochromatische Licht gemessen. Dargestellt werden die Ergebnisse in einem Verteilungsdiagramm. Dort kann die Anzahl der Zellen in den unterschiedlichen Zellzyklusphasen sowie die der apoptotischen Zellen ermittelt werden. Hintergrund ist, dass PI in die DNA interkaliert und je nach Zellzyklusphase der DNA-Gehalt in der Zelle variiert beziehungsweise bei apoptotischen Zellen eine Fragmentierung vorliegt. Da die DNA-Zerlegung ein erst relativ spätes Ereignis der Apoptose-Induktion darstellt, können mithilfe der PI-Färbung keine frühen Apoptose-Ereignisse erfasst werden.

Der erste Schritt der DNA-Färbung mit PI beinhaltet das vorsichtige Resuspendieren der Zellsuspension in 0,2 ml 0,9-prozentigem NaCl. Zum Fixieren und Verdichten wurde die Zellsuspension zügig und mit Druck durch eine 23 Gauge-Kanüle in 1,8 ml Methanol gepresst und durch Inversion gemixt. Daraufhin wurden diese 20 Minuten bei -70°C inkubiert. Durch das darauffolgende Zentrifugieren für circa 30 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit fiel das Salz aus und das Pellet wurde etwas größer. Der Überstand wurde verworfen. Nach Resuspension des weißlichen Pellets, welches sowohl die fixierten Zellen als auch das ausgefallene Salz enthielt, mit 500 µl PBS bei Raumtemperatur, erfolgte erneut eine Zentrifugation. Durch diesen Schritt trennte sich das ausgefallene Salz von den fixierten Zellen. Damit sich die noch enthaltene RNA nicht mit anfärbte, sondern nur die DNA, folgte ein Resuspendieren des Zellpellets mit 250 µl PBS plus 25 µg RNase A pro Milliliter (1:200). Zuvor erfolgte die Vorbereitung der RNase A aus einem 200-fach gefrorenen Stammansatz in H<sub>2</sub>O (5 mg/ml). Nach einer 15-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde 250 µl PBS mit zugesetztem PI (1:50) hinzugegeben. Dies wurde im Vorfeld aus einem 100-fach konzentrierten gefrorenen Stammansatz in H<sub>2</sub>O (5 mg/ml) vorbereitet. Die Zellen mit zugegebenem PI wurden gevortext und es folgte ein Inkubationszeitraum im

Dunkeln bei vier Grad Celsius für mindestens eine Stunde, aber auch mehrere Tage waren möglich. Anschließend konnten die fixierten und mit PI angefärbten Zellen auf ihren DNA-Gehalt in der Durchflusszytometrie analysiert werden. Da PI lichtempfindlich ist, erfolgte die Aufbewahrung der Zellen bis zur Analyse strikt im Dunkeln.

#### 4.1.6 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie, auch FACS („fluorescence activated cell sorter“) genannt, unterstützt die Analyse einzelner Zellen auf Grundlage von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften. So können diese anhand ihrer Größe, Struktur, Oberflächeneigenschaften und ihrer intrazellulären Zusammensetzung unterschieden werden. Damit die Zellen beim Eintreten in die Messkammer möglichst einzeln vorliegen, werden diese während der Messung durch Überdruck stark beschleunigt und in kleine Tröpfchen unterteilt. Dieser Vorgang wird auch hydrodynamische Fokussierung genannt.

Wenn das Licht auf die Messküvette trifft, werden die Strahlen durch die im Probenstrom enthaltenen Bestandteile gestreut. Dabei sind die nach vorne abgelenkten Strahlen, auch „forward scatter“ (FSC) genannt (Abbildung 6), ein Maß für die relative Größe der gemessenen Zellen und Partikel. Im 90°-Winkel nach seitwärts gestreutes Licht, wird als „side scatter“ (SSC) bezeichnet (Abbildung 6) und misst die Zellgranularität. Die relative Lichtintensität dient somit als Messeinheit der FACS-Analyse.

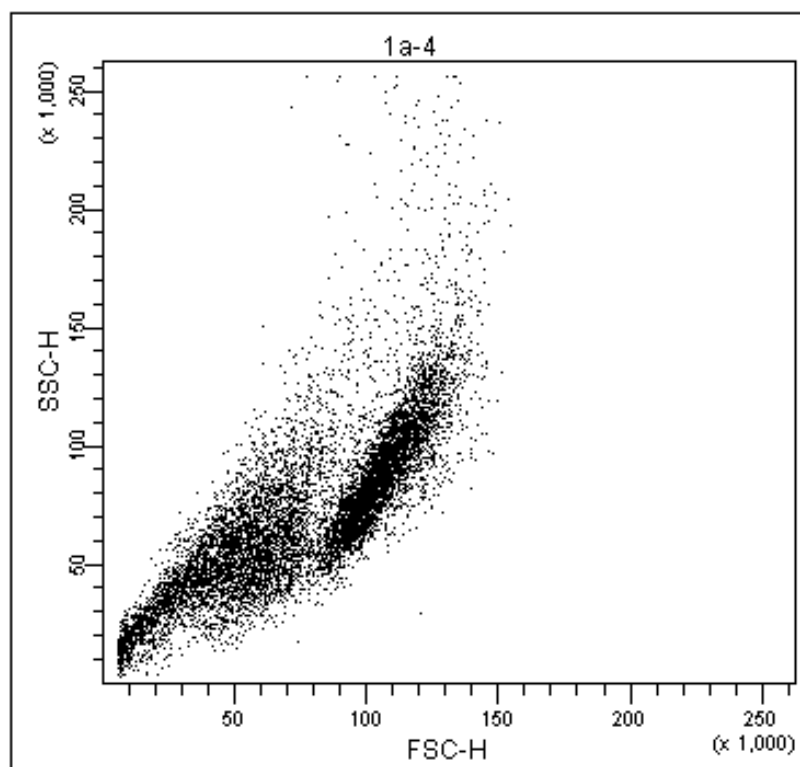


Abbildung 6: Beispiel Dotplot FACS-Analyse

Beispielhafte Darstellung eines Dotplots (aus eigenen Analysen) mit Forwardscatter (FSH) auf der Abszisse und Sidewardscatter (SCC) auf der Ordinate.



Vor der durchflusszytometrischen Analyse fand eine Propidiumiodid-Färbung (PI) statt. Die gefärbten Proben wurden bis zur Analyse im Dunkeln aufbewahrt, da PI lichtempfindlich ist (4.1.5 Apoptose-Assay: DNA-Färbung mit Propidiumiodid). Nacheinander wurden die Proben gemessen und mit der BD FACS Diva Software analysiert. Die Darstellung und Auswertung erfolgte mithilfe eines Histogramms und Dotplots. Jeweils 10.000 Zellen wurden bei einem FSC von 20 und SCC von 450 gemessen.

## 4.2 Proteinbiochemische Techniken

### 4.2.1 Herstellung von Proteinextrakten und Konzentrationsbestimmung

#### Zellaufschluss unter reduzierenden Bedingungen

Ziel dieser Methode ist es, Gesamtzellextrakte unter reduzierenden Bedingungen zu gewinnen. Durch Zugabe des SDS-Ladepuffers wird die Tertiärstruktur der Proteine durch Reduktion von Disulfidbrücken zerstört. Somit werden die Proteine denaturiert und zeigen im Gel ein zum Molekulargewicht proportionales Laufverhalten.

Zunächst wurden die in 25 cm<sup>3</sup> Flaschen nicht adhärent wachsenden Zellen abzentrifugiert, in einem Milliliter PBS aufgenommen und in ein Eppendorf Gefäß überführt. Die Zellen wurden erneut abzentrifugiert (25 sec, 13000 rpm) und der Überstand anschließend verworfen. Für die Zell-Lyse wurde 100°C heißer 1x SDS-Gel-Ladepuffer (Tabelle 10) verwendet. Die zugegebene Menge unterschied sich je nach Größe des Zellpellets zwischen 100 µl und 450 µl. Durch leichtes Resuspendieren des mit dem Ladepuffer versetzten Pellets erfolgte das Lysieren der Zellen. Darauf folgte für zehn Minuten die Inkubation bei 100°C. Die enthaltene chromosomale DNA wurde mithilfe mehrmaliger Passage durch eine 23 Gauge-Kanüle geschert. Das nach der Zentrifugation (5 min, 13000 rpm) entstandene Zellpellet wurde verworfen und die im Überstand enthaltenen Proteine nach Bestimmung der Proteinkonzentration für Studien mit der SDS-PAGE benutzt.

#### Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden jeweils zehn Mikroliter des Proteinextraktes in 500 µl 0,1 M NaOH verdünnt, um anschließend die OD<sub>280nm</sub> im Photometer bestimmen zu können. Mithilfe folgender Formel wurde im Anschluss die Proteinmenge berechnet:

$$\frac{6,4}{OD_{280nm}} = x \mu\text{l, die } 15 \mu\text{g des Proteins enthalten}$$

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mithilfe des Photometers „Ultraspec 3100 pro“ der Firma Amersham Biosciences.

#### 4.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

##### Das Prinzip

Bei der SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) erfolgt die Auftrennung von denaturierten Proteinen nach ihrem Molekulargewicht in einem elektrischen Feld. Damit keine Auftrennung nach Ladung stattfinden kann, ist im Trenngel das anionische Detergens SDS enthalten. Durch dieses kommt es zum Verlust der auf hydrophoben Wechselwirkungen beruhenden Bindungen und somit zum Auflösen der höheren Proteinstrukturen. Es entstehen negativ geladene SDS-Protein-Komplexe in konstantem Gleichgewichtsverhältnis von Ladung zu Masse: 1,4 Gramm SDS pro ein Gramm Protein. Somit wird die Eigenladung der Proteine überdeckt, sie liegen konstant negativ geladen vor und in einer linearen Form. Eine vollständige Denaturierung der Proteine findet durch Reduktion der Disulfidbrückenbindungen in den Polypeptidketten mithilfe von DTT (Dithiothreitol) statt.

Die diskontinuierliche Variante der SDS-PAGE basiert auf dem Einsatz von oberem Sammel- und unterem Trenngel. Dadurch werden die Proteine zunächst im grobporigen Sammelgel auf eine scharfe Bande fokussiert, können fast gleichzeitig ins feinporige Trenngel einwandern und es entsteht anschließend eine gute Auftrennung und hohe Schärfe der Proteinbanden im Trenngel.

##### Gelherstellung

Für die diskontinuierliche Variante werden zwei unterschiedliche Gele benötigt - Trenn- und Sammelgel. Je nach Molekulargewicht der verwendeten Proteine, den gewünschten Auftrennungseigenschaften sowie der Porengröße wurden sie in unterschiedlichen Konzentrationen angefertigt (Tabelle 9).

Zum Starten der Polymerisation wurde den Gelen jeweils direkt vor dem Eingießen in die Glasplatten APS (Ammoniumpersulfat) und anschließend TEMED (Tetraethylmethyldiamin) als Katalysatoren hinzugegeben.

Als Erstes wurde das Trenngel blasenfrei zwischen die zwei zuvor mit *Aqua dest.* gereinigten und präparierten Glasplatten gegossen. Diese bildeten mithilfe eines Abstandhalters einen Spalt von einem Millimeter. Die Abstandhalter wurden jeweils an den Seiten und am unteren Rand mit einer Zone nach außen von 0,5 cm platziert und eingespannt. In die Lücke nach außen wurde einprozentige Agaroselösung zur Abdichtung gefüllt. Anschließend wurde das Trenngel mit destilliertem Wasser übergossen, um es vor dem Radikalfänger Sauerstoff zu schützen. Nach Polymerisation des Trenngels wurde das destillierte Wasser abgeschüttet, die Reste mithilfe von Filterpapier entfernt und das Sammelgel auf das nun feste Trenngel gegossen. Zuletzt wurde ein Kamm blasenfrei in das noch flüssige Sammelgel eingesetzt, welcher die Geltaschen formte.

### Elektrophorese

Zunächst erfolgte die Entfernung des Kamms aus dem polymerisierten Sammelgel sowie die des unteren Abstandhalters. Mithilfe von Klammern wurde das SDS-Gel in der Elektrophoresekammer fixiert und sowohl in die untere als auch in die obere Kammer SDS-Laufpuffer (Tabelle 10) gefüllt, sodass das Gel am oberen und unteren Ende vollständig bedeckt war. Um einen gleichmäßigen Stromfluss zu gewährleisten, wurden eventuell vorhandene Luftblasen am unteren Gelrand beziehungsweise Gelreste in den Geltaschen mit einer Kanüle entfernt. Im Anschluss wurden mittels Hamilton-Pipette die zuvor denaturierten und mit Blaumarker angereicherten Proteinextrakte in die Geltaschen pipettiert. In die letzte Tasche folgte die Zugabe eines Größenstandards (3.3.1 Proteingewichtsmarker, Abbildung 5). Nun erfolgte der Anschluss der Anode am oberen Gelende und der Kathode am unteren Ende, sodass die negativ geladenen Proteine im Gel nach unten liefen. Zu Beginn wurde eine Spannung von 120 Volt angelegt. Sobald die Proben die Grenze zum Trenngel erreicht hatten, wurde auf 240 Volt erhöht. Durch die Verwendung des Blaumarkers ließ sich die Laufrichtung der Proteine einschätzen.

### Western-Immuno-Blot

Ziel des Westernblots ist die Übertragung der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine Trägermembran. Dabei wandern die negativ geladenen Proteine in einem senkrecht zum Polyacrylamidgel gerichteten elektrischen Feld zur Anode. Bei gleicher Ionenstärke binden sich die Proteine über hydrophobe Wechselwirkungen an die Membran.

### Proteintransfer

Verwendet wurde ein Wet-Blot, der durch geringere Probenerwärmung und längere Dauer eine schonende Transferart darstellt. Zu allererst wurde die auf die Gelgröße zurechtgeschnittene Immobilon-Membran in Methanol äquilibriert. Luftblasen-frei wurde diese auf die Gel-Vorderseite gelegt. In Western-Transferpuffer getränkt, folgte nun eines der beiden zuvor ebenso auf die Gelgröße zurechtgeschnittenen Whatman-Papiere Luftblasen-frei oben auf die Membran. Nach Ablösen der Gelhinterseite von der Glasplatte wurde das Gel umgedreht und das zweite in Transferpuffer getränkte Whatman-Papier Luftblasen-frei auf die Gelrückseite aufgetragen. Der Aufbau erfolgte nun nach dem Sandwichverfahren zwischen zwei Kunststoffgittern: Schwarzes Kunststoffgitter, Schaumstoffschwammtuch, Whatman-Papier, Polyacrylamidgel (seitenverkehrt), Immobilon-Membran, Whatman-Papier, Schaumstoffschwammtuch, hellgraues Kunststoffgitter. Mit dem hellgrauen Gitter Richtung Anode zeigend wurde das fertiggestellte „Sandwich“ nun in eine mit Western-Transferpuffer (Tabelle 10) gefüllte Kammer eingesetzt. Bei 380 mA erfolgte nun je nach verwendeten Proteinen für ca. vier bis sechs Stunden der Transfer.

### Proteindetektion

Nach Beendigung des Transfers trocknete die Membran, sodass die Proteinbanden sichtbar wurden. Mithilfe eines Skalpells wurde die Markerspür abgetrennt und je nach aufgetragenen Proteinen die Membran zwischen den Spuren aufgeteilt. Anschließend erfolgte die Befeuchtung der Membran mit Methanol. Der darauffolgende „Waschvorgang“ beinhaltete das vollständige Einlegen der Membran in PBS, welches im zehn Minuten Rhythmus bei Raumtemperatur insgesamt drei Mal erneuert wurde.

Weit mehr Proteine binden an die Membran, als nur die aus dem Polyacrylamidgel. Um bei der später folgenden Nachweisreaktion zu verhindern, dass unspezifische Proteinbindungsstellen von den Nachweisantikörpern besetzt werden, werden diese mittels irrelevanter Proteine abgedeckt (geblockt). Dies dient der Sensitivitätserhöhung des Westernblots.

Zum Blocken wurde die zuvor angesetzte und gekühlte fünfprozentige-Lösung aus Magermilchpulver und PBS für eine Stunde abgedunkelt bei Raumtemperatur verwendet.

Die Antikörpermarkierung, auch Immundetektion genannt, dient dem eigentlichen Nachweis des relevanten Proteins. Diese wurde in zwei Schritten über die sogenannte indirekte Markierung vorgenommen. Dabei bindet zunächst ein antigenspezifischer, unmarkierter Primärantikörper an die Proteine auf der Membran und darauffolgend ein speziesspezifischer, Peroxidase-gekoppelter Sekundärantikörper an den konstanten Teil des Primärantikörpers. Die Detektion erfolgt über den Sekundärantikörper, welcher später mithilfe einer Peroxidase-katalysierten chemischen Reaktion visualisiert werden kann (ECL-Methode).

Hierfür inkubierte die vom Blocken noch feuchte Membran mit der Primärantikörper-Lösung über Nacht bei vier Grad Celsius unter abgedunkelten Bedingungen. Nach erneutem Waschvorgang erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für eine Stunde abgedunkelt bei Raumtemperatur. Danach folgte ein letzter Waschvorgang.

Bei der sich anschließenden „Enhanced Chemoluminescence“-Methode (ECL, Pierce) werden Proteine anhand einer enzymkatalysierten Lichtreaktion detektiert. Dabei kommt es zu einer chemischen Reaktion zwischen Luminol, Peroxidase und  $H_2O_2$ . Durch die an das Protein gekoppelte Peroxidase kommt es zur sofortigen Oxidation des Luminols, wodurch eine Lichtemission entsteht (428 nm). Diese kann mithilfe eines Chemiluminescence-Films erfasst werden.

Zum Einsatz kamen das ECL-Detektions-Kit von Thermo Fisher Scientific, Luminata Forte Western HRP Substrate von Millipore sowie Westar Supernova und Westar Ultra 2.0 von Cyanagen. Diese wurden spezifisch je nach Herstellerangaben zur Detektion verwendet. Die Membran inkubierte mit dem entsprechenden Detektionsreagenz für zwei Minuten und anschließend wurde

durch Auflegen eines Films die Lichtemission detektiert. Darauf folgten die Entwicklung und Fixierung des Films.

#### Entfernen gebundener Antikörper nach ECL-Färbung („Stripping“)

Bei Verwendung des ECL-Detektions-Kits von Thermo Fisher Scientific war eine weitere Nutzung der Immobilon-Membran für eine immunologische Nachweisreaktion nach Entfernung der an die Membran gebundenen Primär- und Sekundärantikörper möglich. Bei den drei anderen Detektionsreagenzien entfällt diese Möglichkeit. Durch Färbung derselben Membran nacheinander mit unterschiedlichen Antikörpern konnte in einigen Versuchsreihen ein direkter Vergleich gezogen werden.

Im Anschluss an die ECL-Färbung wurde die Membran 30 Minuten in circa 50 ml Stripping-Puffer (Tabelle 11) bei 55°C im Wasserbad geschüttelt („gestrippt“). Durch das enthaltene SDS und  $\beta$ -Mercaptoethanol lösten sich die kovalenten Protein-Antikörper-Bindungen. Daraufhin wurde die Membran dreimal für zehn Minuten in PBS gewaschen und anschließend getrocknet. Nun war eine erneute Inkubation mit Antikörpern möglich.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Anreicherung von AML-Stammzellen und deren Nachweis mithilfe von Stammzellmarkern *in vitro*

Als Grundlage aller nachfolgenden Studien dienten die vom José-Carreras-Zentrum bereitgestellten AML-Zelllinien HL-60, KG-1a und Kasumi-1 (für Informationen bezüglich Anzucht und Wachstumsbedingungen siehe 4.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen). Das Ursprungsgewebe der Zelllinie HL-60 (CD34<sup>+</sup>) sind Promyeloblasten. Isoliert wurden diese Zellen 1976 aus dem Blut einer 35-jährigen Patienten mit dem AML-Subtyp FAB M2. Dieser Untergruppe wurde auch die Zelllinie Kasumi-1 (CD34<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup>) zugeordnet, die 1989 bei dem zweiten Rezidiv nach Knochenmarkstransplantation aus dem peripheren Blut eines sieben-jährigen japanischen Patienten isoliert wurde. Kasumi-1 Zellen weisen die chromosomale Translokation t(8;21) auf, durch welche das Fusionsgen RUNX1-RUNX1T1 (AML1-ETO) entsteht. KG-1a Zellen (CD34<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup>) hingegen stellen den undifferenzierten Subklon von KG-1 dar. Sie stammen aus dem Rezidiv eines 59-jährigen Patienten, dessen AML sich aus einer Erythroleukämie entwickelt hatte. Die Anzucht aller drei Zelllinien erfolgte in RPMI-Medium mit 20 Prozent fetalem Kalbsserum (FKS), das alle zwei Tage gewechselt wurde (4.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen).

#### 5.1.1 Die Anreicherung von Zellen mit Tumorstammzellmarkern

Um AML-Zellen mit Stammzell-ähnlichen Eigenschaften im Folgenden näher untersuchen zu können, galt es zu allererst Stammzellen aus allen drei Zelllinien anzureichern. Hierzu bedienten wir uns etablierter Protokolle [Pallis *et al.* 2013]. Die Zellen inkubierten über mehrere Tage (zwischen einem Tag und fünf Tagen) sowohl mit dem Proteasomenblocker MG132 (Abbildung 7 B) als auch mit dem mTOR-Inhibitor Rapamycin (Abbildung 7 A).

Der reversible und zellpermeable Proteasomenblocker MG132 gehört zur Gruppe der Peptidboronate, welcher im Vergleich zu Peptidaldehyden wirksamer sind [Adams *et al.* 1998]. Es wird vermutet, dass Proteasomenblocker in den Zellzyklus eingreifen, indem sie den Ubiquitin-Proteasomen-Signalweg während des Zellzyklus blockieren und somit der Proliferation maligner Zellen entgegenwirken [King *et al.* 1996].

Rapamycin ist ein Makrolid-Antibiotikum, welches ursprünglich aus *Streptomyces hydroscopicus* stammt. Durch Komplexbildung mit dem Protein 12 (Rapamycin-FKBP12-Komplex) inhibiert die Aktivierung der 289 kDa schweren Serin/Threonin-Kinase mTOR („mechanistic target of rapamycin“). Aus der mTOR-Inhibition resultiert die Unterbindung der Phosphorylierung regulatorischer Proteine, die Zellwachstum und Proliferation fördern [Guertin und Sabatini 2005]. Mittels Western-Immunoblotting und einer spezifischen Antikörper-Markierung (4.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, siehe ECL-Färbung) gelang uns der Nachweis der Expression des

Stammzellmarkers Survivin.  $\beta$ -Aktin diente jeweils der Kontrolle gleichmäßig aufgetragener Proteinmengen.

Die Zelllinie HL-60, die bereits im unbehandelten Zustand viel Survivin exprimierte, zeigte unter einer Rapamycin-Konzentration von 50 nM über einen Zeitraum von fünf Tagen einen weiteren leichten Anstieg der Survivin-Expression (Abbildung 7 A). Bei einer Konzentration von 100 nM Rapamycin fiel die Expression von Survivin etwas unterhalb des Levels der Negativkontrolle mit DMSO, stieg aber bei höheren Konzentrationen wieder etwas an (200 nM, 400 nM), schwankte also leicht.

KG-1a Zellen zeigten bei 100 nM Rapamycin eine leichte Zunahme der Survivin-Menge (Abbildung 7 A).

Am deutlichsten reagierten Kasumi-1 Zellen (Abbildung 7 A). Hier ergab sich unter 400 nM Rapamycin über einen Zeitraum von fünf Tagen eine deutliche und kontinuierliche (dosisabhängige) Zunahme der Survivin-Expression. Die starke Induzierbarkeit von Survivin durch Rapamycin ließ vermuten, dass insbesondere diese Zelllinie vermehrt mTOR-regulierte, „silenced“ (stummgeschaltete) Stammzellen besitzt.

Die Behandlung der Kulturen mit dem Proteasomenblocker MG132 führte zu keiner überzeugenden Anreicherung von Survivin-positiven Zellen (Abbildung 7 B).

Insgesamt zeigte sich also, dass die Hemmung des mTOR-Signalwegs durch Rapamycin zu einer Anreicherung von Zellen führt, die den Stammzellmarker Survivin exprimierten. Die Anreicherung zeigte sich insbesondere in Kasumi-1 Kulturen und in geringerem Maße ebenso in den Kulturen von HL-60 und KG-1a (Abbildung 7 A). Bei einer Blockade des 26S-Proteasoms durch MG132 zeigte sich dieser Effekt nicht (Abbildung 7 B). Somit ist eine Anreicherung von Tumorzellen mit Stammzell-ähnlichen Eigenschaften wie der Expression des Stammzellmarkers Survivin, mit dem mTOR-Inhibitor Rapamycin für jede der drei Zelllinien möglich, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß. Allerdings erwies sich eine Rapamycin-Konzentration von 100 nM für eine maximale Anreicherung bei Kasumi-1 Zellen als nicht ausreichend. Entsprechend kamen in den folgenden Studien höhere Konzentrationen von 200 nM und 400 nM zum Einsatz. HL-60 und KG-1a Kulturen enthielten bereits ohne weitere Behandlung zahlreiche Survivin-positive Zellen. Deren Anzahl und oder die Expression von Survivin in den negativen Zellen konnte jedoch durch Rapamycin weiter gesteigert werden.

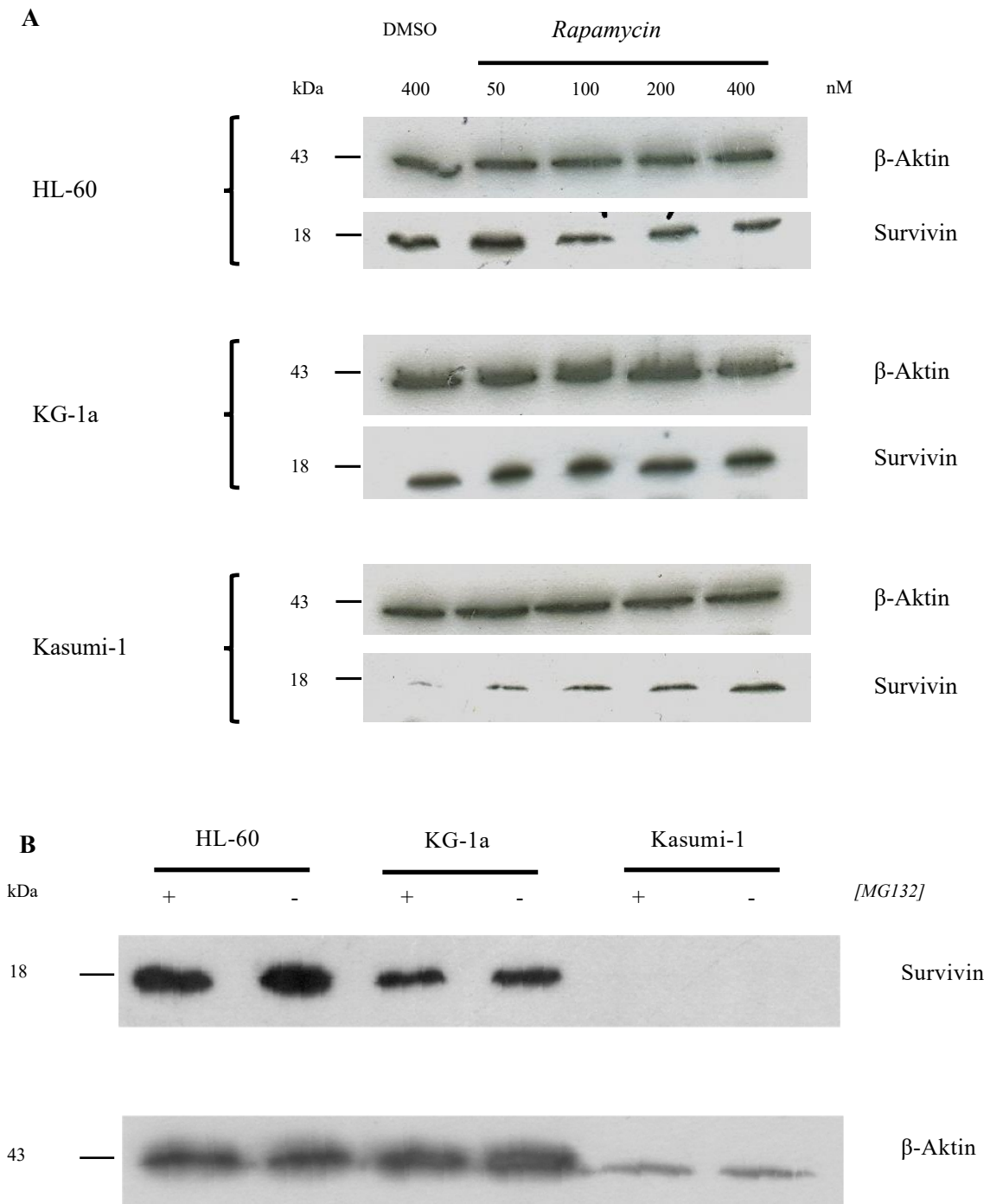


Abbildung 7: Stammzellanreicherung unter Rapamycin (A) bzw. MG132 (B)

Western-Immunoblot auf 15 µg Gesamtproteinextrakt für die Zelllinien HL-60, KG-1a und Kasumi-1, die A.) entweder über fünf Tage mit Rapamycin in unterschiedlichen Konzentrationen (50 nM, 100 nM, 200 nM bzw. 400 nM) oder mit DMSO (Dimethylsulfoxid) als Negativkontrolle behandelt wurden. B.) entweder für 48 Stunden mit MG132 (10 µM, +) oder als Negativkontrolle mit DMSO (-) behandelt wurden. Survivin wurde mit dem anti-Survivin-Antikörper (1:1000) und β-Aktin mit dem anti-β-Aktin-Antikörper (1:2000) detektiert. nM = Nanomolar, kDa = Kilodalton.

### 5.1.2 Der Nachweis von angereicherten Tumorstammzellen durch aktive Caspase 3

Tumorstammzellen sind häufig resistent gegen Apoptose. Sollte also Rapamycin tatsächlich durch Induktion von Apoptose zu einer Anreicherung von Stammzell-ähnlichen, Apoptose-



resistenten Zellen mit Survivin-Expression führen, sollte dies durch eine temporäre Expression von Apoptose-ausführenden Enzymen (Caspasen) in den Kulturen beobachtbar sein. Der Begriff „Caspase“ ist eine Kurzform von **Cysteiny-Aspartat-Proteinasen**, wobei anhand des Vollnamens bereits Rückschlüsse auf die Funktion erahnt werden können. Die Einleitung der Apoptose beginnt durch die Aktivierung einer Enzymkaskade, bei der unter anderem die Caspasen eine Rolle spielen [Kurokawa und Kornbluth 2009]. Aktivierte Initiator-Caspasen bilden den Startpunkt der Enzymkaskade. Diese regen wiederum die Effektor-Caspasen an, denen die Caspase 3 angehört. Im aktiven, gespaltenen Zustand spalten sie proteolytisch zelleigene Substrate und führen letztendlich zum Tod der Zelle [Fischer *et al.* 2003].

Grundsätzlich war bei diesem Blot nicht nur das Zusammenspiel von Survivin und aktiver Caspase 3 unter Rapamycin zu beobachten, sondern es wurden ebenso die Wachstumsbedingungen der drei unterschiedlichen Zelllinien widerspiegelt (Abbildung 8): HL-60 wies eine hohe Proliferationsrate auf, so war bereits im unbehandelten Zustand eine hohe Apoptoserate zu vermerken. Die Linie KG-1a hingegen exprimierte in Abhängigkeit der Rapamycinkonzentration nur schwach zunehmend Caspase 3 unter Behandlung, Kasumi-1 im Vergleich etwas stärker.

Bei gleichzeitiger Betrachtung des Stammzellmarkers zusammen mit gespaltenen Caspase 3 („cleaved caspase 3“) ließ sich deutlich erkennen, dass diese in negativer Korrelation zu einander standen. So konnte bei HL-60 beobachtet werden, dass bei einer geringen Bandenausprägung von Survivin, sich die Banden der gespaltenen Caspase 3 stärker präsentierten, mit Zunahme der Rapamycin-Konzentration jedoch abnahmen (Abbildung 8). Für KG-1a Zellen war eine leichte Zunahme der Bandenausprägung von Caspase 3 in Abhängigkeit der Rapamycin-Konzentration zu vermerken (Abbildung 8). Ebenso verhielten sich Kasumi-1 Zellen, wobei unter 400 nM Rapamycin die Caspase-Bande besonders auffallend war (Abbildung 8).

Zu vermerken ist, dass Survivin nach dieser nur geringen Expositionszeit mit Rapamycin (drei Tage) eine im Verhältnis lange Expositionszeit der Westernblot-Membran benötigte, um sichtbar zu werden.

Die Beobachtungen befanden sich in Einklang mit der Vorstellung, dass Rapamycin Apoptose induzierte und die verbliebenen Zellen Apoptose-resistente, Stammzell-artige Zellen waren. Die Expression der aktiven Caspase 3 in den Zellen zeigte, dass Zellen ohne Stammzellcharakter (Apoptose-sensitiv) scheinbar während des Studienverlaufs durch Apoptose eliminiert wurden. Somit waren Survivin und Caspase 3 negativ korreliert.

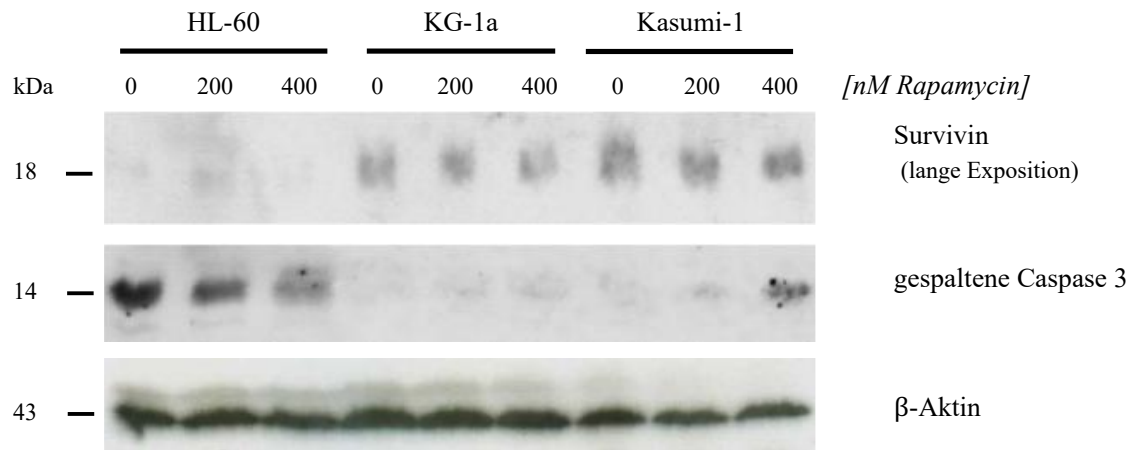


Abbildung 8: Apoptose-Nachweis mittels gespaltener Caspase 3

Western-Immunoblot auf 15 µg Gesamtproteinextrakt für die Zelllinien HL-60, KG-1a und Kasumi-1, die entweder für 72 Stunden mit Rapamycin (200 nM, 400 nM) oder als Negativkontrolle mit DMSO behandelt wurden. Survivin wurde mit dem anti-Survivin-Antikörper (1:1000), gespaltene Caspase 3 mit dem anti-Caspase-3-Antikörper (1:1000) und β-Aktin mit dem anti-β-Aktin-Antikörper (1:2000) detektiert. nM = Nanomolar, kDa = Kilodalton, d = day/Tag.

## 5.2 Np9-Expression im Zusammenhang mit AML-Stammzellen

### 5.2.1 Betrachtung des Proteins Np9 unter Proteasomen- und mTOR-Inhibition

Der Schwerpunkt des nächsten Schrittes lag auf dem Nachweis von Np9. Das Protein kann durch Mutationen im Laufe der Evolution von einem spezifischen Typen der humanen endogenen Retroviren (HERV-K(HML-2) Typ 1) exprimiert werden. Es hat ein geschätztes Molekulargewicht von etwa neun Kilodalton und bewegt sich im Westernblot bei etwa 14 kDa. Allerdings zeigen sich auch immer wieder Subtypen, wie zum Beispiel Np9-α mit einem etwas höheren Molekulargewicht (ca. 15 kDa) und einzelne unspezifische Banden (Abbildung 9 A). Entscheidend ist, dass das HERV-Transkript von *np9* spezifisch in somatischen Stammzellen, embryonalen Stammzellen sowie auch induzierten pluripotenten Stammzellen nachgewiesen wurde [Fuchs *et al.* 2013]. Zudem ist bekannt, dass Np9 mit einigen humanen Tumorarten assoziiert ist, wobei nach heutigem Stand der Wissenschaft Tumorstammzellen die Grundlage für Tumorwachstum bilden. Welche Funktionen Np9, welches nur von Gorillas, Schimpansen und dem Menschen exprimiert wird [Heyne *et al.* 2015], im normalen (nicht pathologischen) Betrieb ausübt, ist bislang noch nicht geklärt. Bisher konnte nur das Transkript von Np9 [Armbruester *et al.* 2004] oder durch künstliche Hemmung des Proteinabbaus unter Einwirken eines Proteasomenblockers, auch das Protein [Heyne *et al.* 2015] nachgewiesen werden. Falls Np9 Protein also tatsächlich, wie vermutet, verstärkt in Stammzellen exprimiert werden sollte [Fuchs *et al.* 2013], wäre eine Np9-Expression nach Anreicherung von Tumorzellen mit Stammzell-artigem Charakter mithilfe von Rapamycin zu erwarten.

Auf diesen Überlegungen basierend, wurden die drei Zelllinien zum einen über 24 Stunden mit dem Proteasomeninhibitor MG132 (10  $\mu$ M) und zum anderen über vier Tage mit dem Stammzellen-anreichernde mTOR-Inhibitor Rapamycin (100 nM) inkubiert (5.1.1 Die Anreicherung von Zellen mit Tumorstammzellmarkern). Anschließend erfolgte jeweils die entsprechende Antikörper-Markierung (4.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) mit den anti-Np9-Antikörpern 22E4 und 10B1 (3.3.2 Primärantikörper), wobei gleichzeitig getestet wurde, welcher der beiden Antikörper für die weiteren Studien zum Einsatz kommen sollte. Zur Kontrolle der gleichmäßig aufgetragenen Proteinextrakte diente jeweils  $\beta$ -Aktin.

Die Teratokarzinom-Zelllinie Tera-1 stammt ursprünglich von einem 47-jährigen kaukasischen Mann, der an einem malignen Embryonaltumor erkrankt war. Für diese Zelllinie war bereits bekannt, dass sie verhältnismäßig stabil *np9*-Transkript enthält [Armbruster *et al.* 2004]. Sie diente daher als Positivkontrolle.

Es gelang uns im Rahmen dieser Untersuchungen nun erstmals, mithilfe unseres hochsensitiven Immunoblot-Nachweisverfahrens in allen drei Zelllinien neben der Np9- $\alpha$ -Variante (15 kDa) auch den „ursprünglichen“ Np9-Typ (14 kDa) gut erkennbar darzustellen und zwar sowohl unter MG132 als auch erstmals ohne Zuhilfenahme von MG132 (Abbildung 9 B).

Nicht nur unter Proteasomen-Inhibition (MG132) sondern auch unter mTOR-Inhibition (Rapamycin) zeigten sich kräftigere Np9-Banden bei unbehandelten HL-60 Zellen. KG-1a Zellen reagierten unterschiedlich auf die beiden Substanzen: Unter MG132-Exposition stellten sich die Np9-Banden kräftiger dar als in der Negativkontrollen, unter Rapamycin hingegen erschien diese Bande in der unbehandelten Zellkultur stärker. Ähnlich präsentierten sich Kasumi-1 Zellen, die ebenfalls unter Rapamycin-Exposition die kräftigere Np9-Bande ausprägten und unter MG132 eine kaum stärkere Bande als in der Negativkontrolle.

Als Positivkontrolle wurde ein Proteinextrakt der Teratokarzinom-Zelllinie Tera-1 eingesetzt (#5 Abbildung 9 B). Sowohl Np9 als auch die Variante Np9- $\alpha$  waren sichtbar (Abbildung 9 B).

Unter Einsatz des anti-Np9-22E4-Antikörpers (1:5) zeigte sich die Np9- $\alpha$ -Variante für jeden Zelltyp in etwa gleich starker Ausprägung, unabhängig davon, ob mit oder ohne MG132. Bei HL-60 erschien die Np9-Bande ohne MG132 (-) stärker, für KG-1a war die Np9-Bande eher unter MG132 (+) kräftiger und bei Kasumi-1 waren beide Banden (+ und -) in etwa gleich stark ausgeprägt (Abbildung 9 B).

In etwa die gleiche Bandenverteilung zeigte sich unter dem anti-Np9-10B1-Antikörper (1:5). Dieser kam zum Vergleichen der beiden Antikörper bei einer weiteren Rapamycin-Anwendung mit viertägiger Exposition (100 nM) zum Einsatz. Erstmals gelang in Rapamycin-selektierten HL-60 Kulturen neben der Np9- $\alpha$ -Variante (15 kDa) der Nachweis einer gut erkennbaren Expression

des „ursprünglichen“ Np9-Typs (14 kDa) und zwar ohne Einwirken von MG132 (Abbildung 9 B).

Ähnlich wie unter Proteasomeninhibition war die Np9- $\alpha$ -Variante stärker exprimiert als das Np9-Protein. Dennoch war Np9 bei allen Kulturen deutlich sichtbar.

Unter Rapamycin präsentierten sich Np9 und dessen Variante bei HL-60 Zellen in ähnlicher Ausprägung wie unter MG132. Ebenso wie HL-60 verhielt sich die KG-1a Kultur. Bei Kasumi-1 Zellen war der Effekt von Rapamycin invers im Vergleich zu den beiden anderen Zelllinien: Np9 sowie Np9- $\alpha$  traten unter der Exposition stärker in Erscheinung (Abbildung 9 B).

Zusammenfassend gelang es bei dieser Studie also erstmals, *endogenes* Np9-Protein ohne Einwirken eines Proteasomenblockers nachzuweisen. Dies war folglich der erste Hinweis, dass das Protein in Zellen im „Normalbetrieb“ überhaupt produziert wird. Besonders bemerkenswert war außerdem, dass das Np9-Protein bei HL-60 und KG-1a Zellen sogar im unbehandelten Zustand, also weder unter Proteasomenblocker- noch unter mTOR-Inkubation, nachweisbar war. Zu beachten ist jedoch, dass der Nachweis nur mit hochsensitiven Nachweisverfahren an der Grenze des technisch Machbaren gelang. Für die weiteren Studien kam der anti-Np9-22E4-Antikörper zum Einsatz.

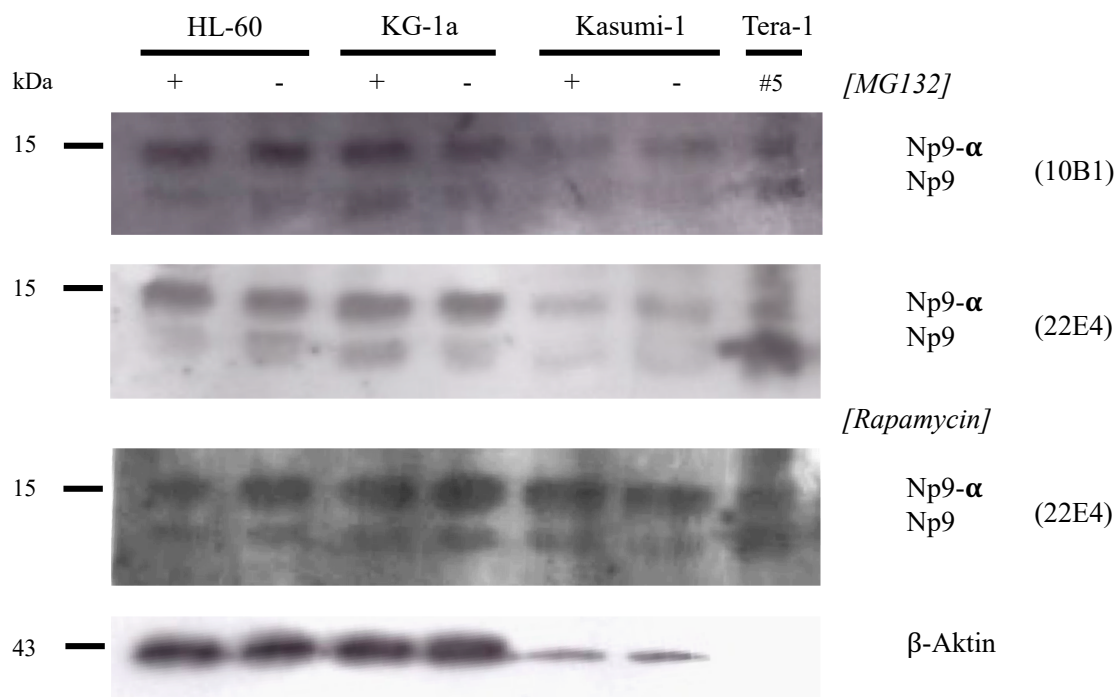


Abbildung 9: Np9-Protein unter Proteasomen- und mTOR-Inhibition

Western-Immunoblot auf 15  $\mu$ g Gesamtproteinextrakt für die Zelllinien HL-60, KG-1a, Kasumi-1 und Tera-1 (#5), die für 24 Stunden mit MG132 (10  $\mu$ M, +) bzw. für vier Tage mit Rapamycin (100 nM, +) oder als Negativkontrolle mit DMSO (-) behandelt wurden.  $\beta$ -Aktin wurde mit dem anti- $\beta$ -Aktin-Antikörper (1:2000) und Np9 mit dem anti-Np9-22E4-Antikörper (1:5) bzw. mit dem anti-Np9-10B1-Antikörper (1:5) detektiert. nM = Nanomolar, kDa = Kilodalton.

### 5.2.2 Np9-Protein in AML-Stammzellen im Zusammenhang mit Survivin

Hintergrund der folgenden Studie war die Frage nach einer korrelativen Expression zwischen dem Protein Np9 und dem Stammzellmarker Survivin. Falls Np9 tatsächlich vorzugsweise in Stammzellen exprimiert werden sollte, sollte eine positive Korrelation zwischen Np9 und Survivin nachweisbar sein.

Wie bereits erwähnt, war es grundsätzlich so, dass Np9 nur sehr schwer nachzuweisen war – mithilfe sehr sensitiver ECL-Reagenzien (Westar ETA C und Westar Supernova-Detektionskit, 3.1 Chemikalien, Filter, Membranen) konnten die Signale sichtbar gemacht werden. In zwei Studienreihen wurden die drei Zelllinien HL-60, KG-1a und Kasumi-1 jeweils für neun beziehungsweise 15 Tage mit Rapamycin inkubiert. Mithilfe des Westar ETA C Detektions-Kits (Sensitivität von  $100 \text{ fg} = 10^{-13} \text{ g}$ ) konnten Np9-Banden schwach dargestellt werden. Erst ab einer Sensitivität von  $1 \text{ fg} = 10^{-15} \text{ g}$  unter Inkubation mit Westar Supernova wurden die Banden nach langer Expositionsdauer gut sichtbar.

Interessant waren die Signale des Np9- $\alpha$ -Subtyps nach 15-tägiger Rapamycin-Behandlung bei Kasumi-1 Zellen (Abbildung 10): In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus 5.1.1 (Die Anreicherung von Zellen mit Tumorstammzellmarkern) war auch in dieser Studie ein zunehmendes Survivin-Signal bei steigender Rapamycin-Konzentration in KG-1a und Kasumi-1 Zellen zu beobachten. Bei HL-60 Zellen war im Gegensatz zu 5.1.1 (Die Anreicherung von Zellen mit Tumorstammzellmarkern) keine Bande unter DMSO auszumachen, nur bei höheren Rapamycin-Konzentrationen zeigten sich die Survivin-Banden.

Besonders bemerkenswert war die Reaktion der Kasumi-1 Zellen (Abbildung 10): In Abhängigkeit der Rapamycin-Konzentration erschienen sowohl die Survivin- als auch die Np9- $\alpha$  Banden kräftiger. Bereits nach neun Tagen Rapamycin-Exposition war Survivin deutlich erkennbar und erreichte ein Maximum nach 15-tägiger Expositionsdauer. Np9-Protein wurde hier offenbar koexprimiert.

Abermals gelang also die Darstellung des *endogenen* Proteins Np9 ohne Blocken der Proteasomen in der Rapamycin-selegierten HL-60 Kultur (Abbildung 10). Im Gegensatz zur Studie 5.2.1 (Betrachtung des Proteins Np9 unter Proteasomen- und mTOR-Inhibition) war nun jedoch Np9 nur unter Rapamycin-Einfluss deutlich zu detektieren. Die stärkste Survivin-Expression in dieser Zelllinie lag bei einer Rapamycin-Konzentration von 200 nM, für Np9 schienen 400 nM optimal zu sein. Np9- $\alpha$  wurde nahezu konstant exprimiert.

Die Zelllinie KG-1a zeigte Survivin und Np9- $\alpha$  im Vergleich zu den anderen beiden Zelllinien in negativer Korrelation zueinander (Abbildung 10): Je höher die Rapamycin-Konzentration desto intensiver waren die Survivin-Signale, während die Np9- $\alpha$ -Banden bei der Negativkontrolle am

kräftigsten ausgeprägt waren und im Verlauf schwächer wurden. Trotz eindeutiger Survivin-Expression war Np9 nur schwach exprimiert.

In der Zusammenschau konnte also erneut Np9 als Protein ohne Einsatz von MG132 nachgewiesen werden, allerdings nur unter einer erheblichen Sensibilisierung der Nachweismethoden (Westar Supernova, Sensibilität 1 fg =  $10^{-15}$  g). Im Vergleich zur vorherigen Studie präsentierte sich Np9 vor allem in Rapamycin-selektierten HL-60 Kulturen, in den anderen beiden Zelllinien war das Protein nur minimal auszumachen. In HL-60 und Kasumi-1 schien Np9 in positiver Korrelation zum Stammzellmarker Survivin aufzutreten. In KG-1a Zellen hingegen zeichnete sich eine negative Korrelation zwischen Survivin und Np9 ab. Insgesamt lässt sich also schließen, dass Np9-Protein in verschiedenen AML-Tumorzelllinien zwar in geringen Mengen exprimiert wird, seine Ko-Expression mit dem Stammzellmarker Survivin aber mit dem Zelltyp variiert. Dies unterstreicht, dass die AML eine genetisch sehr heterogene Erkrankung darstellt. Die molekularen Mechanismen, die der unterschiedlichen Expression zugrunde liegen, sollen in weiteren Untersuchungen analysiert werden.

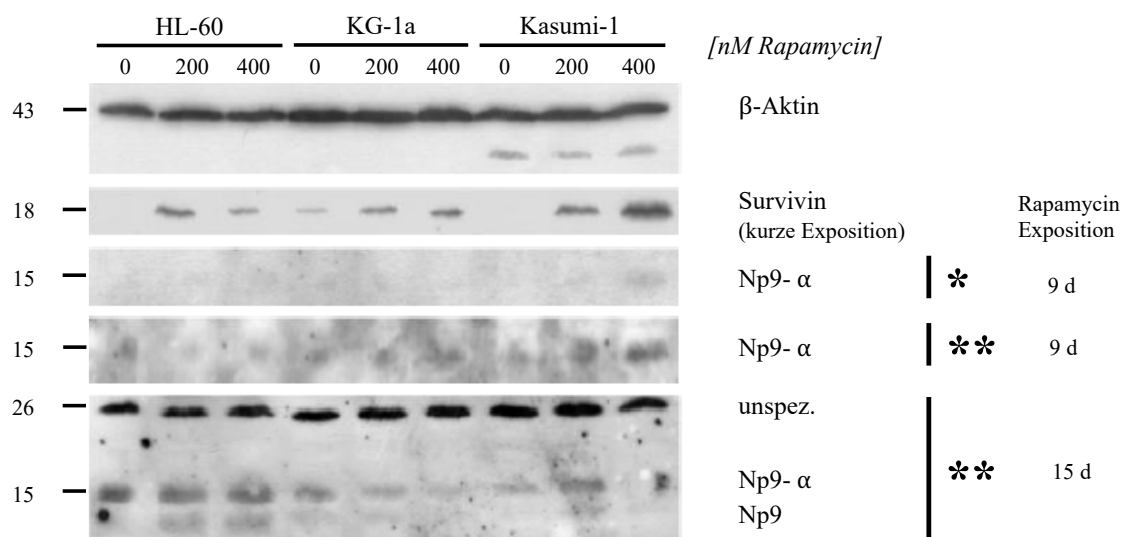


Abbildung 10: Np9-Protein in AML-Stammzellen

Western-Immunoblot auf 15 µg Gesamtproteinextrakt für die Zelllinien HL-60, KG-1a und Kasumi-1, die entweder für neun bzw. 15 Tage mit Rapamycin (200 nM, 400 nM) oder als Negativkontrolle mit DMSO (0) behandelt wurden. β-Aktin wurde mit dem anti-β-Aktin-Antikörper (1:2000), Survivin mit dem anti-Survivin-Antikörper (1:1000) und Np9 mit dem anti-Np9-22E4-Antikörper (1:5) detektiert. nM = Nanomolar, kDa = Kilodalton, d = day/Tag, unspez. = unspezifische Banden, \* Westar ETA C (Sensitivität 100 fg =  $10^{-13}$  g), \*\* Westar Supernova (Sensitivität 1 fg =  $10^{-15}$  g).

### 5.3 Die potentielle Funktion von Np9 in AML-Zellen

#### 5.3.1 *Np9*-Knockdown mittels siRNA-Transfektion

*Np9* wird in Tumorzellen offenbar entweder nur in sehr geringer Menge oder aber in einer kleinen Subpopulation dieser Tumorzellen in größerer Menge exprimiert. Seine Funktion dort ist unbekannt, könnte aber zum Beispiel ebenso wie die Funktion von Survivin in der Gewährung eines Überlebensvorteils unter widrigen Bedingungen (wie z.B. Stress und Chemotherapie) liegen. Dies festzustellen wäre von potentiell großer Bedeutung, weil es *Np9* zu einem möglichen therapeutischen Target machen würde.

Ähnlich wie in vorherigen Studien inkubierten die drei Zelltypen zunächst zur Stammzellanreicherung mit Rapamycin über 13 Tage. Eine zweite Gruppe blieb zur Kontrolle unbehandelt. Am 13. Tag fand eine siRNA-Transfektion (4.1.3 Transiente Transfektion mit HiPerFect<sup>®</sup> (Qiagen)) mit einem Gemisch aus vier verifizierten *Np9*-siRNAs beziehungsweise Kontroll-siRNAs statt [Heyne et al. 2015]. Schließlich wurde die Anzahl der apoptotischen Zellen nach Fixierung der Zellen und Feststellung des DNA-Gehalts mittels PI-Färbung in der Durchflusszytometrie untersucht. Zellen mit einem DNA-Gehalt geringer als 2n (dem zweifachen Chromosomensatz) galten als apoptotisch. Die anderen Zellen in der jeweiligen Kultur befanden sich entweder in der G1-Phase des Zellzyklus‘ und enthielten entsprechend nur einen 2n DNA-Gehalt. Oder aber sie befanden sich in der Mitose-Phase (M) des Zellzyklus‘ mit einem doppelten DNA-Gehalt (4n) beziehungsweise vermehrten ihren DNA-Gehalt soeben in der Synthese-Phase (S) und wiesen dementsprechend einen DNA-Gehalt zwischen 2n und 4n auf. Der prozentuale Anteil an Zellen mit einem bestimmten DNA-Gehalt wurde in einem Zellzyklus-Diagramm dargestellt (Diagramm 1). Der erfolgreiche *np9*-Knockdown wurde im Westernblot nachgewiesen (Abbildung 11).

Prinzipiell waren zwei verschiedene Effekte im prozentual aufgetragenen Diagramm sowie dem Histogramm zu beobachten (Abbildung 11, Diagramm 1): Zum einen konnte der Effekt der Rapamycin-Exposition auf die Zellen beurteilt werden und zum anderen der Effekt der Präsenz beziehungsweise Absenz von *Np9* in Zellen.

Die Behandlung mit Rapamycin führte bei allen Zellen zu einer Verminderung des Zellanteils in der G1/S Phase. Behandelte HL-60 und KG-1a Zellen zeigten darüber hinaus einen erhöhten Peak in der G2/M-Phase im Vergleich zu den Unbehandelten. Für Kasumi-1 Zellen kristallisierte sich bezüglich der G2/M-Phase unabhängig von der Behandlung kein wesentlicher Unterscheid heraus. Hingegen zeigte sich bei allen Zellen nach Exposition mit Rapamycin eine verstärkte sub-2n-Phase (apoptotische Zellen) – dies schien jedoch am meisten ausgeprägt in KG-1a Zellen stattzufinden. Allgemein und in Übereinstimmung mit den Resultaten aus den Caspase 3 Untersuchungen (5.1.2 Der Nachweis von angereicherten Tumorstammzellen durch aktive Caspase 3)

schiene also Rapamycin-selektierte Zellen häufiger einen apoptotischen Zelltod zu erleiden und gleichzeitig weniger DNA-Synthese (Proliferation) durchzuführen. Dies befand sich in Übereinstimmung mit der Vorstellung von der Stammzellenanreicherung, die allgemein Apoptose-resistent und teilungsinaktiv sind.

Im Gegensatz zur Behandlung mit Rapamycin wirkte sich die Herunterregulation von Np9 durch siRNA nur geringfügig auf die Verteilung der Zellzyklusphasen aus. Unter Reduktion von Np9 war vor allem bei HL-60 und KG-1a Zellen ein geringfügiger Trend in Richtung weniger Apoptose zu verzeichnen. In diesem Kontext hätte Np9 also eine schwache pro-apoptotische Wirkung und könnte in AML-Stammzellen überdauern, weil diese – etwa durch die Expression von Survivin – relativ Apoptose-resistent sind.

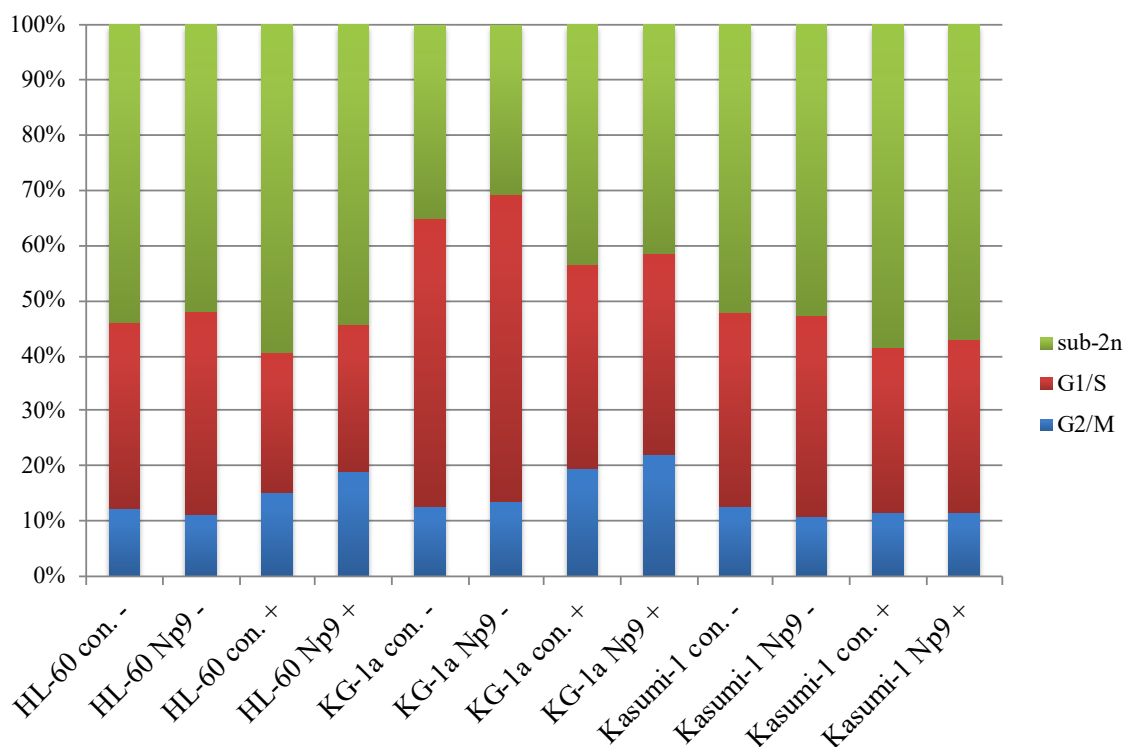


Diagramm 1: Np9-Knockdown mittels siRNA-Transfektion

Tabellarisch prozentuale Auswertung und Auftragung der Ergebnisse der FACS-Analyse. Die Zellen HL-60, KG-1a und Kasumi-1 wurden für 13 Tage Rapamycin exponiert (+) bzw. eine Kontrollgruppe blieb unbehandelt (-). Im Anschluss erfolgte die siRNA-Transfektion mit einem Kontroll- (con.) oder einem Gemisch aus vier Np9-siRNAs (Np9).

Unterschieden werden die drei im Histogramm ausgewerteten Phasen des Zellzyklus: Grundsätzlich befinden sich in der sub-2n-Phase (grün) apoptotische Zellen, d.h. kleinere Zellen mit durch den Zellabbau bedingt mehr Granula. Die Zellen der G1/S-Phase sind im Wachstum und werden auf ihre Richtigkeit überprüft, wobei die S-Phase, in der die Replikation des Erbguts stattfindet, mit dem Peak der G1-Phase verschmilzt. Gleiches passiert der M-Phase, in der die Teilung der Zelle vonstatten geht, die von der G2-Phase verdeckt wird. In der G2-Phase finden Kontrollmechanismen der neusynthetisierten DNA statt.



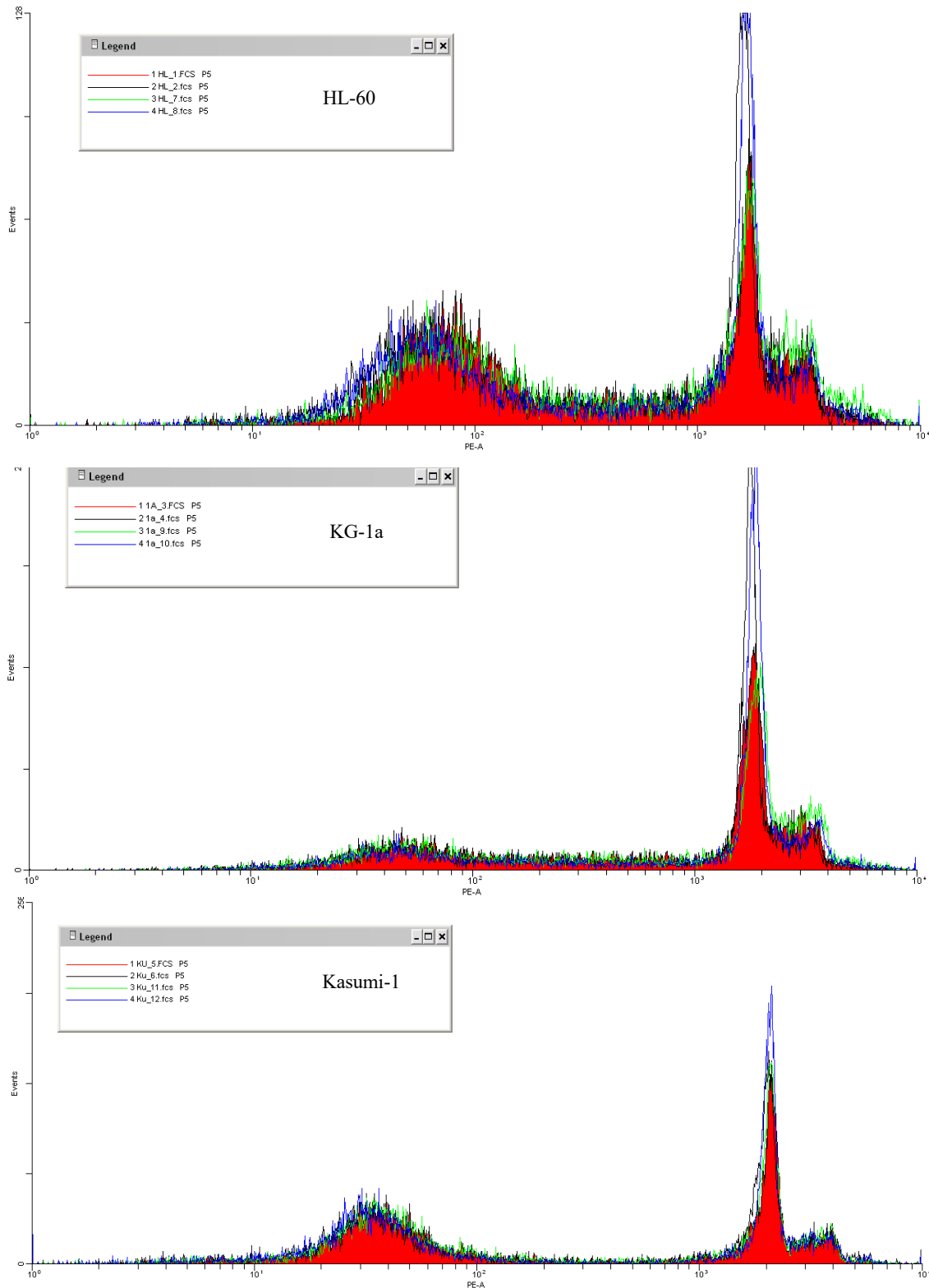


Abbildung 11: *Np9*-Knockdown mittels siRNA-Transfektion

Histogramme nach Durchflusszytometrie (4.1.6 Durchflusszytometrie) für die drei Zellkulturen HL-60, KG-1a und Kasumi-1. Die Anzahl der Ereignisse (Events) auf der Abszisse stehen der Stärke des Fluoreszenzsignals (PE-A) auf der Ordinate in logarithmischer Skalierung gegenüber. Für jede Zelllinie gab es jeweils eine mit Rapamycin (400 nM, +) exponierte Gruppe sowie eine Gruppe, die unbehandelt blieb (-). Diese Gruppen wurden anschließend entweder mit Kontroll-siRNA (con.) oder mit *Np9*-siRNA (*Np9*) transfiziert. Rot = con. +, schwarz = con. -, grün = *Np9* +, blau = *Np9* -.

### 5.3.2 Evaluation des *np9*-Knockdowns mittels Western-Immunoblotting

Zur Evaluation einer erfolgreichen siRNA-Transfektion erfolgte im Anschluss ein Western-Immunoblot der mit Rapamycin (400 nM) behandelten Zellen (HL-60, KG-1a, Kasumi-1) mithilfe von Antikörper-Markierung durch anti- $\beta$ -Aktin-Antikörper (1:2000), anti-Survivin-Antikörper (1:1000) sowie anti-Np9-22E4-Antikörper (1:25). Sollte die Transfektion erfolgreich gewesen sein, sollten unter *np9*-siRNA (*np9*) keine Banden von Np9 sichtbar werden.

Survivin-Banden waren für alle Zellen unabhängig der Transfektion zu vermerken (Abbildung 12). Somit schien eine Stammzellenanreicherung durch den mTOR-Inhibitor Rapamycin erfolgreich gewesen zu sein.

Der Nachweis von Np9 gestaltete sich, wie bereits in den Studien zuvor, schwierig und gelang nur mithilfe des sehr sensitiven Westar Supernova (Nachweisgrenze: 1 fg) und auch nur für HL-60 Zellen (Abbildung 12): Bei der Transfektion der Kontroll-siRNA (C) stellten sich, wenn auch schwach, Banden für Np9 sowie Survivin dar. Wie bei einer erfolgreichen siRNA-Transfektion zu erwarten, fand sich unter *np9*-siRNA (*np9*) eine Verminderung der Np9-Expression. Die *np9*-siRNA war also nachweislich aktiv. Die Expression von Survivin wurde durch den *np9*-Knockdown nicht beeinflusst.

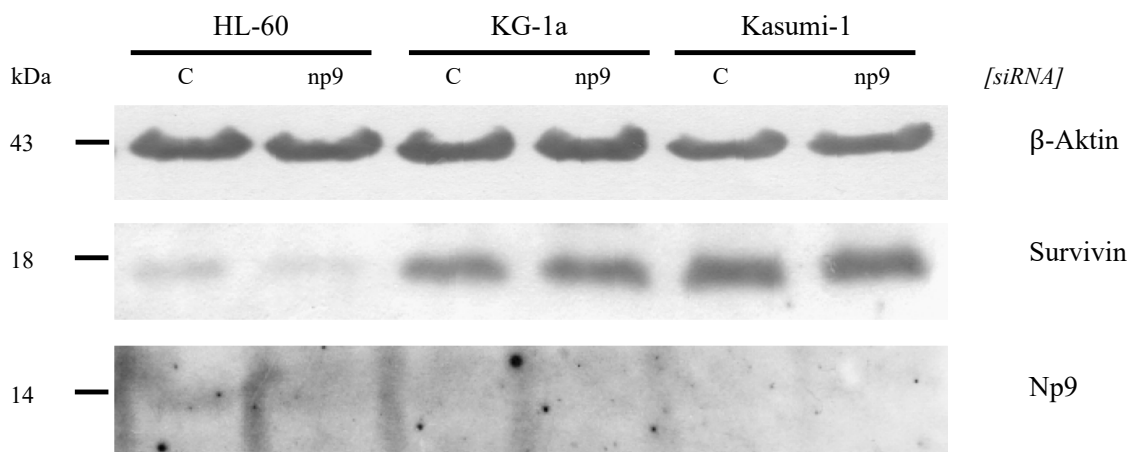


Abbildung 12: Evaluation des *np9*-Knockdowns

Western-Immunoblot auf 15  $\mu$ g Gesamtproteinextrakt für die Zelllinien HL-60, KG-1a und Kasumi-1, die nach 13 Tagen Rapamycin-Exposition (400 nM) entweder mit einem Kontroll- (C) oder einem Gemisch aus vier Np9-siRNAs (*np9*) transfiziert wurden.  $\beta$ -Aktin wurde mit dem anti- $\beta$ -Aktin-Antikörper (1:2000), Survivin mit dem anti-Survivin-Antikörper (1:1000) und Np9 mit dem anti-Np9-22E4-Antikörper (1:25) detektiert. Für die Entwicklung von Np9 wurde das hochsensitive Westar Supernova (Nachweisgrenze: 1 fg) eingesetzt. kDa = Kilodalton.

## 5.4 Effekt von Vitamin D auf die Expression von Np9, Survivin und aktiver Caspase 3

In mehreren Studien gab es Hinweise darauf, dass  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (aktives Vitamin D) das Krebswachstum verlangsamt, indem es beispielsweise die Zellen in der  $G_0/G_1$ -Phase des Zellzyklus stoppt, den apoptotischen Zelltod unter anderem durch Aktivierung der Caspase 3 induziert oder eine Differenzierung der Zellen initiiert [Mallory und Feldman 2009, Bao et al. 2014, Chiang et al. 2016]. Außerdem beeinflusst  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  die Angiogenese, die Zelladhäsion und -Migration und sorgt für eine Reduktion der Invasivität der Tumorzellen.

Im Gegensatz dazu, kommt es nach einer  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Behandlung von HL-60 Leukämiezellen zu einer Differenzierung der AML-Zellen, was mit einem besseren Zellüberleben assoziiert wird [Abe et al. 1981]. Durch die Förderung von anti-apoptotischen und die Suppression von pro-apoptotischen Proteinen entstehen Überlebens-fördernde Effekte [Wang et al. 2009, Gocek et al. 2011].

Da Vitamin D einen besonderen Effekt auf AML-Zellen zu haben scheint, ist dieser Parameter im Kontext von Survivin, Np9 und aktiver Caspase 3 ebenfalls Bestandteil der Studien.

Für neun beziehungsweise 16 Tage inkubierten die drei Zelllinien mit  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (100 nM), um sie anschließend mittels Western-Immunoblotting zu untersuchen. Wie in den vorherigen Studien erfolgte die Antikörper-Markierung mittels ECL-Methode (4.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese).  $\beta$ -Aktin diente zur Überprüfung der in gleicher Menge aufgetragenen Proteinextrakte.

Am deutlichsten war ein Effekt von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  auf Kasumi-1 Zellen zu beobachten (Abbildung 13): In Übereinstimmung mit einer zellulären Differenzierung und dem Verlust von Stammzell-eigenschaften präsentierte sich die Survivin-Bande bereits nach neun Behandlungstagen schwächer. Dieser Effekt war nach 16 Tagen Behandlung noch deutlicher zu erkennen – das Signal verschwand unter  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Zugabe (+) nahezu komplett. In Korrelation dazu wurde die (mittlere) Bande der aktiven pro-apoptotischen Caspase 3 unter  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (+) stärker. Parallel zur Survivin-Bandenausprägung schwächte sich die Np9- $\alpha$ -Variante unter Vitamin D Einfluss ebenfalls ab.

Hingegen erschien die Np9-Bande (nicht Np9- $\alpha$ ) der HL-60 Zellen nach neun Tagen  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Exposition (+) vorübergehend sogar etwas intensiver als die der unbehandelten Zellen (Abbildung 13). Nach 16 Tagen verschwand Np9 jedoch nahezu vollständig. Wie in 5.1.1 (Die Anreicherung von Zellen mit Tumorstammzellmarkern) war Survivin bereits in unbehandelten HL-60 Zellen vorhanden.

Vitamin D schien keinen wesentlichen Effekt auf KG-1a Zellen zu generieren (Abbildung 13).

Insgesamt schien Vitamin D in Übereinstimmung mit allgemeinen Vorstellungen also zu einer Differenzierung der AML Zellen zu führen, die sich in einer Verminderung der Tumorstammzellmarker Survivin und Np9 äußerte. Folgerichtig fand sich Caspase 3 als apoptotischer Marker in Vitamin D behandelten Kulturen leicht erhöht.

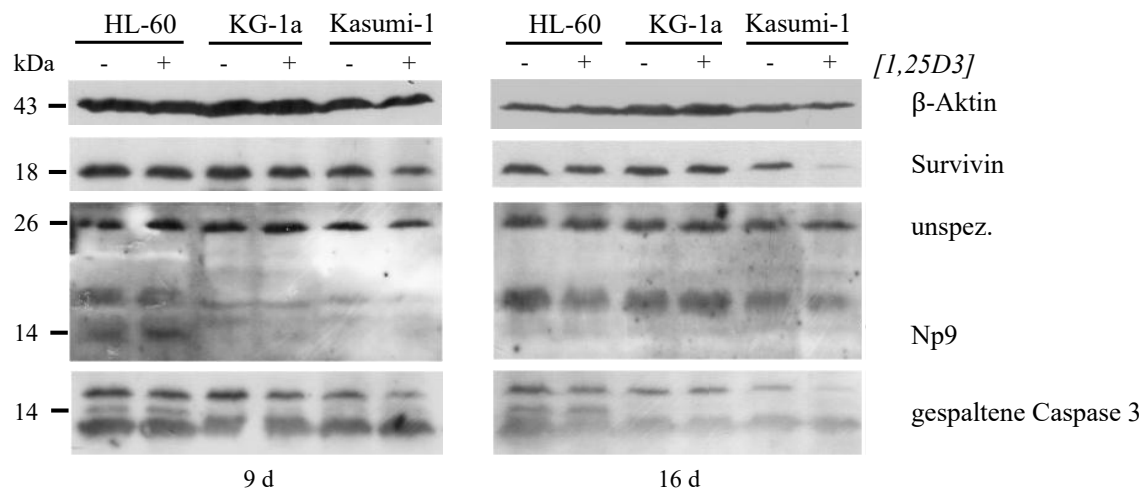


Abbildung 13: Vitamin D im Zusammenhang mit Np9, Survivin und aktiver Caspase 3

Western-Immunoblot auf 15 µg Gesamtproteinextrakt für die Zelllinien HL-60, KG-1a und Kasumi-1, die entweder für neun bzw. 16 Tage mit Vitamin D (1,25D3, 100 nM,+) oder als Negativkontrolle ohne Vitamin-D-Zugabe (-) behandelt wurden. β-Aktin wurde mit dem anti-β-Aktin-Antikörper (1:2000), Survivin mit dem anti-Survivin-Antikörper (1:1000), gespaltene Caspase 3 mit dem anti-Caspase-3-Antikörper (1:1000) und Np9 mit dem Np9-22E4-Antikörper (1:5) detektiert. nM = Nanomolar, kDa = Kilodalton, d = day/Tag, unspez. = unspezifische Banden.

## 6. Diskussion

### 6.1 Stammzellenanreicherung durch mTOR-Inhibitor Rapamycin und Proteasomeninhibitor MG132

Nach aktuellem Stand der Wissenschaft sind vor allem Tumorstammzellen Dreh- und Angelpunkt in der Tumorforschung. Denn sie sind nicht nur Initiator für maligne Entartung und die Ursache für Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika sowie Bestrahlung, sondern besitzen zudem die Fähigkeit zur Selbsterneuerung. Selbst wenn die Behandlung effektiv genug ist, die Tumormasse – die differenzierten „normalen“ Tumorzellen – zu reduzieren, so kommt es letztendlich häufig zum Rezidiv. 1994 gelingt JE Dick erstmals die Identifikation (CD34<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup>) leukämischer Stammzellen (LSCs, „leukemia stem cells“), die später auch Krebsstammzellen (CSCs, „cancer stem cells“) genannt werden [Reya *et al.* 2001].

Survivin, ein antiapoptotisches Protein (IAP, „inhibitor of apoptosis“), das mit schlechtem Outcome sowie Therapieresistenzen assoziiert [Liu *et al.* 2014] und außerdem als mitwirkender Faktor in der Tumorentwicklung und Proliferation gehandelt wird [Ji *et al.* 2013], stellt einen Marker für AML-Stammzellen dar [Zhang *et al.* 2015]. Besonders für KG-1a Zellen (CD34<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup>) ist eine hohe Survivin-Expression bekannt [Zhang *et al.* 2015]. Auch in unseren Studien zeigt diese Linie bereits im unbehandelten Zustand eine deutliche Survivin-Bandenausprägung (Abbildungen 7, 8, 10 und 13). Hingegen unterliegt die Survivin-Expression der Linien HL-60 (CD34<sup>+/+</sup>) und Kasumi-1 (CD34<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup>) im unbehandelten Zustand starken Schwankungen: So präsentieren sich die unbehandelten Zellen gelegentlich mit Survivin-Expression (HL-60: Abbildungen 7, 12 und 13 sowie bei Kasumi-1: Abbildungen 8, 12 und 13) oder ohne (HL-60: Abbildungen 8 und 10 sowie bei Kasumi-1: Abbildungen 7 und 10). Setzt man diese Beobachtungen in Zusammenhang mit der Stammzellenanreicherung, so zeigt sich eine Varianz des Stammzellgehalts abhängig von der Haltungsdauer in der Zellkultur. Werden die Zellen über einen längeren Zeitraum in Kultur gehalten, scheint es bei HL-60 und Kasumi-1 Zellen zu einer Anreicherung von Stammzellen zu kommen.

Rapamycin hemmt die mTOR-Kinase („mechanistic target of rapamycin“), die je nach Aktivitätsstatus die Proteinbiosynthese [Ramanathan und Schreiber 2009] beziehungsweise Autophagie [Rabinowitz und White 2010] reguliert. Undifferenzierte AML-Stammzellen zeigen ein verlängertes Überleben unter mTOR-Inaktivierung [Hoshii *et al.* 2012]. Sogar unter mTOR-Reaktivierung behalten diese Zellen ihr leukämisches Potenzial bei [Hoshii *et al.* 2012]. Bereits vorherige Studien setzen Rapamycin erfolgreich zur Stammzellenanreicherung ein; die Zellen weisen einen geringeren ROS-Gehalt („reactive oxygen species“) auf [Pallis *et al.* 2013].

Dies unterstreicht unsere Ergebnisse, die eine erfolgreiche, mithilfe von Survivin markierte, Stammzellanreicherung Rapamycin-selektierter HL-60-, KG-1a- und Kasumi-1 Zellen nahelegen, welche am erfolgreichsten bei Kasumi-1 Zellen ist (Abbildung 7). Bestätigend zeigt sich bereits in anderen Studien unter mTOR-Inhibition ein Verlust differenzierter, „normaler“ AML-Tumorzellen [Hoshii *et al.* 2012]. Besonders klar darstellbar ist dieser Effekt in der vorliegenden Studie bei Kasumi-1 Zellen. Im direkten Vergleich der Abbildungen 7 und 8 fällt eine ausgeprägte Survivin-Anreicherung bei zunehmender Rapamycin-Konzentration auf, die sich durch eine positive Korrelation der aktiven Caspase 3 bestätigt. Warum aber sollten Kulturen mit einer Anreicherung von Apoptose-resistenten Stammzellen die pro-apoptotische aktive Caspase 3 exprimieren? Dies könnte entweder den Untergang der verbliebenen, nicht-Stammzellen in der Kultur anzeigen oder, falls Caspase 3 tatsächlich in den Stammzellpopulationen anstatt der verbliebenen nicht-Stammzellen vorläge, die Resistenz dieser Populationen gegen Zelltod. Wir konnten in der vorliegenden Studie nicht zwischen diesen Möglichkeiten unterscheiden.

## 6.2 Endogenes Np9-Protein in AML-Stammzellen

Humane endogene Retroviren (HERVs) entstehen im Laufe der Evolution durch Fixierung der die Keimbahn-infizierenden exogenen Retroviren und sind seither mithilfe vertikaler Transmission gemäß den Mendel'schen Regeln Bestandteil des menschlichen Genoms [Boeke und Stoye 1997, Bannert und Kurth 2004, Subramanian *et al.* 2011]. Da HERVs wie alle anderen menschlichen Gene ebenfalls dem negativen Selektionsdruck unterliegen, ist anzunehmen, dass offensichtlich pathogene HERVs nicht länger Teil des menschlichen Genoms bleiben [Ruprecht *et al.* 2008]. Der allergrößte Teil transkribierter HERV-Sequenzen besitzt überhaupt keine vollständigen ORFs, um Proteine kodieren zu können [de Parseval *et al.* 2003]. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass auch RNA-Transkripte solcher defekten Elemente Funktionen übernehmen könnten [Schiavetti *et al.* 2002]. HERV-K(HML-2) ist die „aktivste“ Familie der HERVs vor allem, weil sie nach heutigem Standpunkt die meisten Replikations-kompetenten Elemente besitzt [Bannert und Kurth 2004]. Np9 ist Bestandteil dieser Familie und wird aus dem HERV-K(HML-2) Typ 1 translatiert. Demnach scheint Np9 ein aus einem funktionstüchtigen ORF kodiertes Protein zu sein, welches möglicherweise bestimmte Funktionen im menschlichen Organismus übernimmt, da es dem natürlichen Selektionsdruck bisher standhält und immer noch im menschlichen Genom verankert ist [Heyne *et al.* 2015].

Es wird vermutet, dass Np9 als Onkoprotein durch PLZF-Inhibition fungiert, da es direkt an das tumorsupprimierende, stammzellregulierende, promyeloisch leukämische Zinkfinger Protein (2.3.3 Np9-Interaktion mit PLZF) bindet [Denne *et al.* 2007]. Bisher können beide aus HERV-K(HML-2) exprimierten Proteine in Tumorgewebe nachgewiesen werden [Ruprecht *et al.* 2008]. Außerdem werden sowohl Keimzelltumore als auch Leukämien in Zusammenhang mit

einer Dysregulation von PLZF gebracht [Zelent *et al.* 2001, Galli *et al.* 2005]. Nicht nur in Zusammenhang mit PLZF ist das onkogene Potential von Np9 ein Thema: NCCIT-Teratokarzinomzellen reagieren durch Reduktion von Np9 sensibel auf eine zytostatische Therapie mit Bleomycin und Cisplatin [Chan *et al.* 2019].

Basierend auf diesem Ausgangspunkt ist es das Ziel unserer Studien weitere Eigenschaften und mögliche Funktionen von Np9 zu charakterisieren. Bisher kann Np9-Proteinexpression nur unter Anwesenheit eines Proteasomeninhibitors nachgewiesen werden [Heyne *et al.* 2015]. Es wird vermutet, dass Np9 zum einen nur in geringen Mengen gebildet und zum anderen zügig abgebaut wird, sodass ein Nachweis des Proteins nur nach dessen Anreicherung mittels relativ langer Inkubation mit einem Proteasomeninhibitor gelingt [Heyne *et al.* 2015]. Weiterhin beschreiben Heyne und Team, dass der Abbau des Proteins im Zellkern durch Ubiquitylierung in der Zelle stattfindet [Heyne *et al.* 2015].

Erfreulicherweise gelingt uns in diesen Studien erstmals der Proteinnachweis des *endogenen* Proteins Np9 ohne Einsatz eines Proteasomeninhibitors (Abbildungen 9 und 10). Für alle drei getesteten Zelllinien kann sowohl das *endogene* Protein, bei ca. 14 kDa, als auch die Np9- $\alpha$ -Variante (ca. 15 kDa) dargestellt werden (Abbildung 9). Beachtlich ist außerdem, dass sich Np9 nicht nur in Rapamycin-selektierten Kulturen präsentiert, sondern sogar in unbehandelten MG132- und Rapamycin-Negativkontrollen (Abbildung 9). Dennoch darf nicht unbeachtet bleiben, dass der Nachweis erst nach mehrmaliger Studiendurchführung erfolgreich gelang und nur unter erheblicher Sensibilisierung der Nachweismethoden – unter Einsatz von Westar Supernova (Nachweisgrenze  $1 \text{ fg} = 10^{-15} \text{ g}$ ). Wenn Np9-Protein, wie vermutet, nur in sehr geringen Mengen in Zellen vorliegt [Heyne *et al.* 2015], könnte es auch in jenen Studien unterhalb der Nachweisgrenze gelegen haben und somit nicht detektierbar gewesen sein. Nicht zuletzt könnten für den gelungenen Nachweis in unseren Studien die unterschiedlichen Zelllinien ursächlich sein.

Ausgangspunkt für den Einsatz von Proteasomeninhibitoren in früheren Arbeiten ist die Frage, ob *np9* womöglich ausschließlich als RNA und nicht als stabiles Protein exprimiert wird. Mehrere verschiedene Stressfaktoren werden getestet, jedoch erweist sich lediglich die Inhibition des 26S-Proteasoms durch Epoxomicin oder MG132 als erfolgreich, was für eine sehr kurze Halbwertszeit des Np9-Proteins spricht [Heyne *et al.* 2015]. Warum aber sollte ein Protein von einer Zelle hergestellt und sofort wieder abgebaut werden? Es wäre denkbar, dass Np9 Teil eines Sensors ist, der die Funktion des Proteinabbaus durch das 26S-Proteasom überwacht. Das Proteasom scheint sehr empfindlich gegen bestimmte Umwelttoxine zu sein; seine Fehlfunktion könnte etwa zu neuronaler Degeneration führen [Heyne *et al.* 2015]. In diesem Kontext könnte Np9 als Folge der Proteasom-Fehlfunktion akkumulieren und dann pro-apoptotisch wirken. Neben der Proteasomeninhibition können wir die mTOR-Inhibition durch Rapamycin als einen weiteren die Np9-

Expression induzierenden Stressfaktor identifizieren (Abbildungen 9 und 10), vor allem in Kasumi-1 Zellen.

### 6.3 Ist Np9 Marker für (pluripotente) Stammzellen?

Das HERV-K(HML-2) Provirus liegt nicht nur in somatischen Zellen vor, sondern wird vielmehr in Verbindung mit Keimzelltumoren, Melanomen, embryonalen Stammzelllinien (ECCs) und weiteren Tumoren gebracht [Kleiman *et al.* 2004, Humer *et al.* 2006, Wang-Johanning *et al.* 2007, Ruprecht *et al.* 2008, Wang-Johanning *et al.* 2012]. Ergänzend wird die HERV-K(HML-2) RNA- und Protein-Expression als Marker für embryonale und induziert pluripotente Stammzellen vermutet [Fuchs *et al.* 2013]. Somit besteht die Option, HERV-K(HML-2) Proviren könnten elementare Funktionen übernehmen oder einen Marker für Pluripotenz darstellen, denn Fuchs *et al.* zeigen eine Aktivierung der Np9- und Rec-Expression in pluripotenten Stammzellen und deren Expressionsverlust bei Differenzierung auf, unabhängig ihrer chromosomalen Lokalisation [Fuchs *et al.* 2013]. In diesen Arbeiten wird allerdings nie das Protein selbst, sondern lediglich die RNA nachgewiesen.

Darauf aufbauend untersuchen wir die Expression von Np9-Protein in Tumorstammzell-angereicherten AML-Kulturen. Tatsächlich kann Np9-Protein in HL-60 Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 12). Ein *np9*-Knockdown durch Transfektion mit einem Gemisch aus vier siRNAs bestätigt die Identität der Np9-Signale; außerdem deutet sich eine positive Korrelation zwischen Np9 und dem Stammzellmarker Survivin für HL-60 Zellen an, was sich in Übereinstimmung mit den Beobachtungen von Fuchs und Kollegen befindet [Fuchs *et al.* 2013]. Neuste Untersuchungen mit NCCIT-Teratokarzinomzellen unterstreichen diese Ergebnisse: Sie beschreiben eine Zunahme der Apoptoserate unter *np9*-Knockdown. [Chan *et al.* 2019].

Unsere Resultate zeigen bisweilen einen schwachen pro-apoptotischen Charakter von Np9: Für alle drei Zelllinien zeigt sich unter Vorhandensein von Np9 ein leicht vermehrter Anstieg der sub-2n-Phase und somit eine geringfügig gesteigerte Apoptoserate. Womöglich kann Np9 nur in den Tumorstammzellen exprimiert werden, weil diese außerdem das anti-apoptotische Survivin produzieren. Ob Np9 nun tatsächlich eine leicht pro-apoptotische oder aber eventuell eine anti-apoptotische Wirkung hat, ist in dieser Arbeit nicht endgültig zu klären, denn auch ein Unterschied je nach Zelltyp wäre denkbar. In jedem Fall sind Stammzellen allgemein resistenter gegen (Therapie-induzierte) Apoptose.

Es bleibt jedoch die Frage unbeantwortet, ob die äußerst geringe Menge an Np9 in den Zellkulturen (a) eine geringe Menge in allen Zellen oder (b) eine größere Menge an Np9 in einer kleinen



Subpopulation von Zellen reflektiert. Eine solche Frage könnte bei höher exprimierten Proteinen zum Beispiel durch Immunfärbung der Zellen und nachfolgender FACS-Analyse beantwortet werden. Das in diesen Studien untersuchte Np9-Protein ist jedoch erstens viel zu gering exprimiert um verlässliche Immunfluoreszenz-Signale in der Durchflusszytometrie zu erhalten. Zweitens produzieren beide von uns verwendeten (und überhaupt bis dato erhältliche, brauchbaren) Antikörper neben klaren Np9-Signalen auch immer unspezifische Signale im Westernblot. Dies schließt eine informative FACS-Analyse natürlich weitgehend aus.

#### 6.4 Vitamin D als Regulator von Np9 in Tumorstammzellen

Die hormonelle Form von Vitamin D, 1,25-Dihydroxyvitamin D ( $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ ), ist nicht nur für ihre klassische Funktion als Regulator der Calciumhomöostase und des Knochenmetabolismus bekannt, sondern spielt eine wesentliche Rolle als Tumorsuppressor [Plum und DeLuca 2010]. Ein erster Zusammenhang zwischen Vitamin D und Krebs wird bereits 1981 geknüpft, indem gezeigt wird, dass  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  die Proliferation inhibiert und zu einer Differenzierung der Zellen führt [Abe *et al.* 1981]. Es wird angenommen, dass Vitamin D in malignen entarteten Zellen Apoptose induzieren kann sowie die Angiogenese hemmt und somit einen wesentlichen Beitrag leistet, Malignität zu unterdrücken [Mantell *et al.* 2000]. Außerdem wird Vitamin D im Kontext mit mTOR-Inhibition beschrieben: mTOR als „master regulator“ der Zellfunktion [Zoncu *et al.* 2011] wird durch Stimulierung der Expression des mTOR-Negativregulators DDIT4 („DNA damage-inducible transcript 4“), auch als REDD1 („regulated in development and DNA damage response 1“) bekannt, von Vitamin D reguliert [Lisse *et al.* 2011]. DDIT4 wiederum fördert anti-proliferative Effekte von Vitamin D [Lisse *et al.* 2011]. Die Inhibition von mTOR führt überdies zu einer Induktion der TXNIP-Level („thioredoxin-interacting protein“), was umgekehrt die Förderung des mTOR-Inhibition-Signalwegs initiiert [Jin *et al.* 2011].

Auf der Grundlage dieser Untersuchungen wird in unseren Studien ein möglicher Zusammenhang zwischen Np9, was durch mTOR-Inhibition beeinflussbar ist (5.2 Np9-Expression im Zusammenhang mit AML-Stammzellen) und der Wirkung von Vitamin D untersucht – besonders im Hinblick auf HL-60 Zellen.

Nach neun Tagen Vitamin D Exposition zeigt sich eine kräftigere Np9-Bande bei HL-60 Zellen im Vergleich zur unbehandelten Variante (Abbildung 13). Für die anderen beiden Zelllinien lassen sich keine eindeutigen Np9-Banden erkennen, wenn auch bei KG-1a ein schwaches Signal aufzutreten scheint (Abbildung 13). Unter unseren Studienbedingungen kann nur für HL-60 Zellen eine Induktion der Np9-Expression vermerkt werden. Akute myeloische Leukämien sind

bekanntermaßen genetisch sehr heterogen. Die unterschiedlichen Reaktionen der verschiedenen Zelllinien auf Vitamin D bedürfen also weiterer Studien.

In Kasumi-1 Zellen kann unter Vitamin D eine Reduktion der Expression des Stammzell-Überlebensfaktors Survivin beobachtet werden. Ebenso wird die Np9- $\alpha$ -Variante unterdrückt. Auf diese Weise könnte Vitamin D AML-Tumorstammzellen sensitiver für Apoptose machen. Auch dies bedarf weiterer Untersuchungen.

Es bleiben somit zahlreiche Fragen offen: Welche Rolle spielt Np9- $\alpha$  in diesem Kontext? Wie sind die Zusammenhänge zwischen Np9 und deren  $\alpha$ -Variante? Ist die  $\alpha$ -Form stabiler als Np9 selbst und kann deshalb leichter nachgewiesen werden oder liegt sie in höheren Konzentrationen vor? Erfüllt die  $\alpha$ -Variante möglicherweise sogar komplett andere Aufgaben in der (Stamm-) Zelle?

Np9 besitzt zelluläre Interaktionspartner, wie beispielsweise das testikuläre Zinkfinger (TZF) Protein und das promyeloisch leukämische Zinkfinger (PLZF) Protein, den Androgenrezeptor (AR) und das Ligand von Numb-Protein X (LNX) (Boese *et al.* 2000, Armbruster *et al.* 2004, Denne *et al.* 2007, Kaufmann *et al.* 2010). Welche Bedeutungen haben diese Interaktionen in den Tumorstammzellen der AML? Diese Fragen sollen in weiterführenden Studien aufgegriffen und untersucht werden.

## Literaturverzeichnis

1. Abe E, Miyaura C, Sakagami H, Takeda M, Konno K, Yamazaki T, Yoshiki S, Suda T (1981) Differentiation of mouse myeloid leukemia cells induced by 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:4990–4
2. Acheampong DO, Adokoh CK, Asante DB, Asiamah EA, Barnie PA, Bonsu DOM, Kyei F (2018) Immunotherapy for acute myeloid leukemia (AML): a potent alternative therapy. *Biomed Pharmacother* 97:225–32
3. Adams J, Behnke M, Chen S, Cruickshank AA, Dick, LR, Grenier L, Klunder JM, Ma YT, Plamondon L, Stein RL (1998) Potent and selective inhibitors of the proteasome: dipeptidyl boronic acids. *Bioorg Med Chem Lett* 8:333–8
4. Ahn JS, Kim HJ, Kim YK, Lee SS, Ahn SY, Yang DH, Park HJ, Choi SH, Lee JY, Jung CW, Jang JH, Kim HJ, Moon JH, Sohn SK, Lee YJ, Won JH, Kim SH, Zhang Z, Kim T, Kim DDH (2017) Assessment of a new genomic classification system in acute myeloid leukemia with a normal karyotype. *Oncotarget* 9:4961–8
5. Andersson AC, Svensson AC, Rolny C, Andersson G, Larsson E (1998) Expression of human endogenous retrovirus ERV3 (HERV-R) mRNA in normal and neoplastic tissues. *Int J Oncol* 12:309–13
6. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz, MJ M, Le Beau MM, Bloomfield CD, Cazzola M, Vardiman JW (2016) The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 127:2391–405
7. Armbruester V, Sauter M, Krautkremer E, Meese E, Kleiman A, Best B, Roemer K, Mueller-Lantsch N (2002) A novel gene from the human endogenous retrovirus K expressed in transformed cells. *Clin Cancer Res* 8:1900–7
8. Armbruester V, Sauter M, Roemer K, Best B, Hahn S, Nty A, Schmid A, Philipp S, Mueller A, Mueller-Lantsch N (2004) Np9 protein of human endogenous retrovirus K interacts with ligand of numb protein X. *J Virol* 78:10310–9
9. Aslam MS, Naveed S, Ahmed A, Abbas Z, Gull I, Athar MA (2014) Side effects of chemotherapy in cancer patients and evaluation of patients opinion about starvation based differential chemotherapy. *Journal of Cancer Therapy* 817–22
10. Bannert N, Kurth R (2004) Retroelements and the human genome: new perspectives on an old relation. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:14572–9
11. Bao A, Li Y, Tong Y, Zheng H, Wu W, Wei C (2014) 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and cisplatin synergistically induce apoptosis and cell cycle arrest in gastric cancer cells. *Int J Mol Med* 33:1177–84
12. Barbulescu M, Turner G, Seaman MI, Deinard AS, Kidd KK, Lenz J (1999) Many human endogenous retrovirus K (HERV-K) proviruses are unique to humans. *Curr Biol* 9:861–8

13. Bertoli S, Bérard E, Huguet F, Huynh A, Tavitian S, Vergez F, Dobbelstein S, Dastugue N, Mansat-De Mas V, Delabesse E, Duchayne E, Demur C, Sarry A, Lauwers-Cances V, Laurent G, Attal M, Récher C (2013) Time from diagnosis to intensive chemotherapy initiation does not adversely impact the outcome of patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 121:2618–26
14. Blomberg J, Benachenhou F, Blikstad V, Sperber G, Mayer J (2009) Classification and nomenclature of endogenous retroviral sequences (ERVs): problems and recommendations. *Gene* 448:115–23
15. Boeke JD, Stoye JP (1997) Retrotransposons, Endogenous Retroviruses, and the Evolution of Retroelements. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY)
16. Boese A, Sauter M, Galli U, Best B, Herbst H, Mayer J, Kremmer E, Roemer K, Mueller-Lantsch N (2000) Human endogenous retrovirus protein cORF supports cell transformation and associates with the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *Oncogene* 19:4328–36
17. Bonnet D, Dick JE (1997) Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 3:730–7
18. Buaas FW, Kirsh AL, Sharma M, McLean DJ, Morris, JL, Griswold MD, de Rooij DG, Braun RE (2004) PLZF is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal. *Nat Genet* 36:647–52
19. Burchert A, Bug G, Finke J, Stelljes M, Rollig C, Wäsch R, Bornhäuser M, Berg T, Lang F, Ehninger G, Serve H, Zeiser R, Wagner EM, Kroeger N, Wolschke C, Schleuning M, Elmaagacli A, Götze KS, Schmid C, Jost E, Wolf D, Böhm A, Thiede C, Haferlach T, Bethge W, Harnisch S, Wittenberg M, Rospleszcz S, Neubauer A, Brugger M, Strauch K, Schade-Brittinger C, Metzelder SK (2018) Sorafenib as maintenance therapy post allogeneic stem cell transplantation for FLT3-ITD positive AML: results from the randomized, double-blind, placebo-controlled multicentre sormain trial. *Blood* 132:661
20. Chan CJ, Smyth MJ, Martinet L (2014) Molecular mechanisms of natural killer cell activation in response to cellular stress. *Cell Death Differ* 21:5–14
21. Chan SM, Sapir T, Park SS, Rual JF, Contreras-Galindo R, Reiner O, Markovitz DM (2019) The HERV-K accessory protein Np9 controls viability and migration of teratocarcinoma cells. *PLoS One* 14
22. Chen SJ, Zelent A, Tong JH, Yu HQ, Wang ZY Z, Derré J, Berger R, Waxman S, Chen Z (1993) Rearrangements of the retinoic acid receptor alpha and promyelocytic leukemia zinc finger genes resulting from t(11;17)(q23;q21) in a patient with acute promyelocytic leukemia. *J Clin Invest* 91:2260–7
23. Chen Z, Brand NJ, Chen A, Chen SJ, Tong JH, Wang ZY, Waxman S, Zelent A (1993) Fusion between a novel Krüppel-like zinc finger gene and the retinoic acid receptor-alpha locus due to a variant t(11;17) translocation associated with acute promyelocytic leukaemia. *EMBO J* 12:1161–7

24. Cheson BD, Cassileth PA, Head DR, Schiffer CA, Bennett JM, Bloomfield CD, Brunning R, Gale RP, Grever MR, Keating MJ, et al. (1990) Report of the National Cancer Institute-sponsored workshop on definitions of diagnosis and response in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 8:813–9
25. Cheson, BD, Bennett JM, Kopecky KJ, Büchner T, Willman CL, Estey EH, Schiffer CA, Doehner H, Tallman MS, Lister TA, Lo-Coco F, Willemze R, Biondi A, Hiddemann W, Larson RA, Löwenberg B, Sanz MA, Head DR, Ohno R, Bloomfield CD, International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia (2004) Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol* 21:4642–9
26. Chiang KC, Yeh CN, Pang JH, Hsu JT, Yeh TS, Chen LW, Kuo SF, Hsieh PJ, Pan YC, Takano M, Chen TC, Feng TH, Kittaka A, Juang HH (2016) 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$  Analog, MART-10, Inhibits Neuroendocrine Tumor Cell Growth Through Induction of G $_0$ /G $_1$  Cell-cycle Arrest and Apoptosis. *Anticancer Res* 36:3307–13
27. Cooper SL, Brown PA (2014) Treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Clin North Am* 62:61–73
28. Cornelissen JJ, Gratwohl A, Schlenk RF, Sierra J, Bornhäuser M, Juliusson G, Ráčil Z, Rowe JM, Russell N, Mohty M, Löwenberg B, Socié G, Niederwieser D, Ossenkoppele GJ (2012) The European Leukemia Net AML Working Party consensus statement on allogeneic HSCT for patients with AML in remission: an integrated-risk adapted approach. *9:579–90*
29. Costoya JA, Hobbs, RM, Barna M, Cattoretti G, Manova K, Sukhwani M, Orwig KE, Wolgemuth DJ, Pandolfi PP (2004) Essential role of PLZF in maintenance of spermatogonial stem cells. *Nat Genet* 36:653–9
30. Crucitti L, Crocchiolo R, Toffalori C, Mazzi B, Greco R, Signori A, Sizzano F, Chiesa L, Zino E, Lupo Stanghellini MT, Assanelli A, Carrabba MG, Marktel S, Marcatti M, Bordignon C, Corti C, Bernardi M, Peccatori J, Bonini C, Fleischhauer K, Ciceri F, Vago L (2015) Incidence, risk factors and clinical outcome of leukemia relapses with loss of the mismatched HLA after partially incompatible hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia* 29:1143–52
31. de Parseval N, Lazar V, Casella JF, Benit L, Heidmann T (2003) Survey of human genes of retroviral origin: identification and transcriptome of the genes with coding capacity for complete envelope proteins. *J Virol* 77:10414–22
32. Deininger, PL, Batzer MA (2002) Mammalian retroelements. *Genome Res* 12:1455–65
33. Denne M, Sauter M, Armbruester V, Licht JD, Roemer K, Mueller-Lantsch N (2007) Physical and functional interactions of human endogenous retrovirus proteins Np9 and rec with the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *J Virol*

81:5607–16

34. Deschler B, Lübbert M (2006) Acute myloid leukemia: epidemiology and etiology. *Cancer* 107:2099–107
35. Desrichard A, Snyder A, Chan TA (2016) Cancer Neoantigens and Applications for Immunotherapy. *Clin Cancer Res* 22:807–12
36. Dick JE (1994) Future prospects for animal models created by transplanting human haematopoietic cells into immune-deficient mice. *Res Immunol* 145:380–4
37. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum, FR F, Büchner T, Dombret H, Ebert BL, Fenaux P, Larson RA, Levine RL, Le-Coco F, Naoe T, Niederwieser D, Ossenkoppele GJ, Sanz M, Sierra J, Tallman MS, Tien HF, Wei AH, Löwenberg B, Bloomfield CD (2017) Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* 129:424–47
38. Dupressoir A, Lavialle C, Heidmann T (2012) From ancestral infectious retroviruses to bona fide cellular genes: role of the captured syncytins in placentation. *Placenta* 33:663–71
39. Eppert K, Tekenaka K, Lechman, ER E, Waldron L, Nilsson B, van Galen P, Metzeler KH, Poepl A, Ling V, Beyene J, Cauty AJ, Danska JS, Bohlander SK, Buske C, Minden MD, Golub TR, Jurisica I, Ebert BL, Dick JE (2011) Stem cell gene expression programs influence clinical outcome in human leukemia. *Nat Med* 17:1086–93
40. Fischer U, Jänicke RU, Schulze-Osthoff K (2003) Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ* 10:76–100
41. Flockerzi A, Ruggieri A, Frank O, Sauter M, Maldener E, Kopper B, Wullich B, Seifarth W, Mueller-Lantzsch N, Leib-Mösch C, Meese E, Mayer J (2008) Expression patterns of transcribed human endogenous retrovirus HERV-K(HML-2) loci in human tissues and the need for a HERV Transcriptome Project. *BMC Genomics* 9:354
42. Franklin GC, Chretien S, Hanson IM, Rochefort H, May FE, Westley BR (1988) Expression of human sequences related to those of mouse mammary tumor virus. *J Virol* 62:1203–10
43. Fuchs NV, Loewer S, Daley GQ, Izsvák Z, Löwer J, Löwer R (2013) Human endogenous retrovirus K (HML-2) RNA and protein expression is a marker for human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Retrovirology* 10:115
44. Galli UM, Sauter M, Lecher B, Maurer S, Herbst H, Roemer K, Mueller-Lantzsch N (2005) Human endogenous retrovirus rec interferes with germ cell development in mice and may cause carcinoma in situ, the predecessor lesion of germ cell tumors. *Oncogene* 24:3223–8

45. Gangadhar TC, Vonderheide RH (2014) Mitigating the toxic effects of anticancer immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol* 11:91–9
46. Gocek E, Wang X, Liu X, Liu CG, Studzinski GP (2011) MicroRNA-32 up-regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in human myeloid leukemia cells leads to Bim targeting and inhibition of AraC-induced apoptosis. *Cancer Res* 71:6230–0
47. Gotwals P, Cameron S, Cipolletta D, Cremasco V, Crystal A, Hewes B, Mueller B, Quaratino S, Sabatos-Peyton C, Petruzzelli L, Engelman JA, Dranoff G (2017) Prospects for combining targeted and conventional cancer therapy with immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 17:286–301
48. Gross H, Barth S, Pfuhl T, Willnecker V, Spurk A, Gurtsevitch V, Sauter M, Hu B, Noessner E, Mueller-Lantzsch N, Kremmer E, Grässer FA (2011) The Np9 protein encoded by the human endogenous retrovirus HERV-K(HML-2) negatively regulates gene activation of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 (EBNA2). *Int J Cancer* 129:1105–15
49. Guertin DA, Sabatini DM (2005) An expanding role for mTOR in cancer. *Trends Mol Med* 11:353–61
50. Guolo F, Minetto P, Clavio M, Miglino M, Lemoli RM, Gobbi M (2017) Intensive fludarabine-high dose cytarabine-idarubicin combination as induction therapy with risk-adapted consolidation may improve treatment efficacy in younger Acute Myeloid Leukemia (AML) patients: Rationales, evidences and future perspectives. *Biosci Trends* 11:110–4
51. Heyne K, Kölsch K, Bruand M, Kremmer E, Grässer FA, Mayer J, Roemer K (2015) Np9, a cellular protein of retroviral ancestry restricted to human, chimpanzee and gorilla, binds and regulates ubiquitin ligase MDM2. *Cell Cycle* 14:2619–33
52. Hills RK, Castaigne S, Appelbaum FR, Delaunay J, Petersdorf S, Othus M, Estey EH, Dombret H, Chevret S, Ifrah N, Cahn JY, Récher C, Chilton L, Moorman AV, Burnett AK (2014) Addition of gemtuzumab ozogamicin to induction chemotherapy in adult patients with acute myeloid leukaemia: a meta-analysis of individual patient data from randomised controlled trials. *Lancet Oncol* 15:986–96
53. Hoshii T, Tadokoro Y, Naka K, Ooshio T, Muraguchi T, Sugiyama N, Soga T, Araki K, Yamamura K, Hirao A (2012) mTORC1 is essential for leukemia propagation but not stem cell self-renewal. *J Clin Invest* 122:2114–29
54. Hughes JF, Coffin JM (2004) Human endogenous retrovirus K solo-LTR formation and insertional polymorphisms: implications for human and viral evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:1668–72
55. Humer J, Waltenberger A, Grassauer A, Kurz M, Valencak J, Rapberger R, Hahn S, Löwer R, Wolff K, Bergmann M, Muster T, Mayer B, Pehamberger H (2006) Identification of a melanoma marker derived from melanoma-associated endogenous retroviruses. *Cancer Res* 66:1658–63

56. Irish W, Ryan M, Gache L, Gunnarsson C, Bell T, Shapiro M (2017) Acute myeloid leukemia: a retrospective claims analysis of resource utilization and expenditures for newly diagnosed patients from first-line induction to remission and relapse. *Curr Med Res Opin* 33:519–27
57. Ji Z, Kumar R, Taylor M, Rajadurai A, Marzuka-Alcalá A, Chen YE, Njauw CN, Flaherty K, Jönsson G, Tsao H (2013) Vemurafenib synergizes with nutlin-3 to deplete survivin and suppresses melanoma viability and tumor growth. *Clin Cancer Res* 19:4383–91
58. Jin HO, Seo SK, Kim YS, Woo SH, Lee KH, Yi JY, Lee SJ, Choe TB, Lee JH, An S, Hong SI, Park IC (2011) TXNIP potentiates Redd1-induced mTOR suppression through stabilization of Redd1. *Oncogene* 30:3792–801
59. Johansen T, Holm T, Bjørklid E (1989) Members of the RTVL-H family of human endogenous retrovirus-like elements are expressed in placenta. *Gene* 79:259–67
60. Juliusson G, Antunovic P, Derolf A, Lehmann S, Möllgård L, Stockelberg D, Tidefelt U, Wahlin A, Höglund M (2009) Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry. *Blood* 30:4179–87
61. Juliusson G, Lazarevic V, Hörstedt AS, Hagberg O, Höglund M, Swedish Acute Leukemia Registry Group (2012) Acute myeloid leukemia in the real world: why population-based registries are needed. *Blood* 119:3890–9
62. Kahl C, Krahl R, Becker C, Al-Ali HK, Sayer, HG, Schulze A, Herold M, Hänel M, Scholl S, Hochhaus A, Uharek L, Maschmeyer G, Haehling D, Junghanß C, Peter N, Kämpfe D, Kettner E, Heinicke T, Fischer T, Kreibich U, Wolf HH, Niederwieser D (2016) Long-term follow-up of the AML97 study for patients aged 60 years and above with acute myeloid leukaemia: a study of the East German Haematology and Oncology Study Group (OSHO). *J Cancer Res Clin Oncol* 142:305–15
63. Kantarjian H, O'brien S, Cortes J, Giles F, Faderl S, Jabbour E, Garcia-Manero G, Wierda W, Pierce S, Shan J, Estey E (2006) Results of intensive chemotherapy in 998 patients age 65 years or older with acute myeloid leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome: predictive prognostic models for outcome. *Cancer* 106:1090–8
64. Kantarjian H (2016) Acute myeloid leukemia--major progress over four decades and glimpses into the future. *Am J Hematol* 131–45
65. Kantarjian HM, Thomas XG, Dmoszynska A, Wierzbowska A, Mazur G, Mayer J, Gau J, Chou WC, Buckstein R, Cermak J, Kuo CY, Oriol A, Ravandi F, Faderl S, Delaunay J, Lysák D, Minden M, Arthur C (2012) Multicenter, randomized, open-label, phase III trial of decitabine versus patient choice, with physician advice, of either supportive care or low-dose cytarabine for the treatment of older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 30:2670–7



66. Kaufmann S, Sauter M, Schmitt M, Baumert B, Best B, Boese A, Roemer K, Mueller-Lantzsch N (2010) Human endogenous retrovirus protein Rec interacts with the testicular zinc-finger protein and androgen receptor. *J Gen Virol* 91:1494–502
67. Kim JA, Shim JS, Lee GY, Yim HW, Kim, TM T, Kim M, Leem SH, Lee JW, Min CK, Oh IH (2015) Microenvironmental remodeling as a parameter and prognostic factor of heterogeneous leukemogenesis in acute myelogenous leukemia. *Cancer Res* 75:2222–31
68. King RW, Deshaies RJ, Peters JW, Kirschner MW (1996) How proteolysis drives the cell cycle. *Science* 274:1652–9
69. Kitamura Y, Ayukawa T, Ishikawa T, Kanda T, Yoshiike K (1996) Human endogenous retrovirus K10 encodes a functional integrase. *J Virol* 70:3302–6
70. Kleiman A, Senyuta N, Tryakin A, Sauter M, Karseladze A, Tjulandin S, Gurtsevitch V, Mueller-Lantzsch N (2004) HERV-K(HML-2) GAG/ENV antibodies as indicator for therapy effect in patients with germ cell tumors. *Int J Cancer* 110:459–61
71. Krug U, Röllig C, Koschmieder A, Heinecke A, Sauerland MC, Schaich M, Thiede C, Kramer M, Braess J, Spiekermann K, Haferlach T, Haferlach C, Koschmieder S, Rohde C, Serve H, Wörmann B, Hiddemann W, Ehninger G, Berdel WE, Büchner T, Müller-Tidow C, German Acute Myeloid Leukaemia Co-operative Group, Study Alliance Leukemia Investigators (2010) Complete remission and early death after intensive chemotherapy in patients aged 60 years or older with acute myeloid leukaemia: a web-based application for prediction of outcomes. *Lancet* 376:2000–8
72. Kurokawa M, Kornbluth S (2009) Caspases and kinases in a death grip. *Cell* 138:838–54
73. Lancet JE, Uy GL, Cortes JE, Newell LF, Lin TL, Ritchie EK, Stuart RK, Strickland SA, Hogge D, Solomon SR, Stone RM, Bixby DL, Kolitz JE, Schiller GJ, Wieduwilt MJ, Ryan DH, Hoering A, Banerjee K, Chiarella M, Louie AC, Medeiros BC (2018) CPX-351 (cytarabine and daunorubicin) Liposome for injection versus conventional cytarabine plus daunorubicin in older patients with newly diagnosed secondary acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 36:2684–92
74. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody, MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann Y, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt A, Jones M, Lloyd C, McMurray A, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin JC, Mungall A, Plumb R, Ross M, Shownkeen R, Sims S, Waterston RH, Wilson RK, Hillier LW, McPherson JD, Marra MA, Mardis ER, Fulton LA, Chinwalla AT, Pepin KH, Gish WR,

- Chissoe SL, Wendl MC, Delehaunty KD, Miner TL, Delehaunty A, Kramer JB, Cook LL, Fulton RS, Johnson DL, Minx PJ, Clifton SW, Hawkins T, Branscomb E, Predki P, Richardson P, Wenning S, Slezak T, Doggett N, Cheng JF, Olsen A, Lucas S, Elkin C, Uberbacher E, Frazier M, Gibbs RA, Muzny DM, Scherer SE, Bouck JB, Sodergren EJ, Worley KC, Rives CM, Gorrell JH, Metzker ML, Naylor SL, Kucherlapati RS, Nelson DL, Weinstock GM, Sakaki Y, Fujiyama A, Hattori M, Yada T, Toyoda A, Itoh T, Kawagoe C, Watanabe H, Totoki Y, Taylor T, Weissenbach J, Heilig R, Saurin W, Artiguenave F, Brottier P, Bruls T, Pelletier E, Robert C, Wincker P, Smith DR, Doucette-Stamm L, Rubenfield M, Weinstock K, Lee HM, Dubois J, Rosenthal A, Platzer M, Nyakatura G, Taudien S, Rump A, Yang H, Yu J, Wang J, Huang G, Gu J, Hood L, Rowen L, Madan A, Qin S, Davis RW, Federspiel NA, Abola AP, Proctor MJ, Myers RM, Schmutz J, Dickson M, Grimwood J, Cox DR, Olson MV, Kaul R, Raymond C, Shimizu N, Kawasaki K, Minoshima S, Evans GA, Athanasiou M, Schultz R, Roe BA, Chen F, Pan H, Ramser J, Lehrach H, Reinhardt R, McCombie WR, de la Bastide M, Dedhia N, Blöcker H, Hornischer K, Nordsiek G, Agarwala R, Aravind L, Bailey JA, Bateman A, Batzoglou S, Birney E, Bork P, Brown DG, Burge CB, Cerutti L, Chen HC, Church D, Clamp M, Copley RR, Doerks T, Eddy SR, Eichler EE, Furey TS, Galagan J, Gilbert JG, Harmon C, Hayashizaki Y, Haussler D, Hermjakob H, Hokamp K, Jang W, Johnson LS, Jones TA, Kasif S, Kasprzyk A, Kennedy S, Kent WJ, Kitts P, Koonin EV, Korf I, Kulp D, Lancet D, Lowe TM, McLysaght A, Mikkelsen T, Moran JV, Mulder N, Pollara VJ, Ponting CP, Schuler G, Schultz J, Slater G, Smit AF, Stupka E, Szustakowki J, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Wagner L, Wallis J, Wheeler R, Williams A, Wolf YI, Wolfe KH, Yang SP, Yeh RF, Collins F, Guyer MS, Peterson J, Felsenfeld A, Wetterstrand KA, Patrinos A, Morgan MJ, de Jong P, Catanese JJ, Osoegawa K, Shizuya H, Choi S, Chen, YJ, Szustakowki J, International Human Genome Sequencing Consortium (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409:860–921
75. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE (1994) A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367:645–8
76. Larsson E, Andersson AC, Nilsson BO (1994) Expression of an endogenous retrovirus (ERV3 HERV-R) in human reproductive and embryonic--evidence for a function for envelope gene products. *Ups J Med Sci* 99:113–20
77. Lee MK, Cheong HS, Koh Y, Ahn KS, Yoon SS, Shin HD (2016) Genetic Association of PARP15 Polymorphisms with Clinical Outcome of Acute Myeloid Leukemia in a Korean Population. *Genet Test Mol Biomarkers* 20:696–701
78. Lisse TS, Liu T, Irmeler M, Beckers J, Chen H, Adams JS, Hewison M (2011) Gene targeting by the vitamin D response element binding protein reveals a role for vitamin D in osteoblast mTOR signaling. *FASEB J* 25:937–47
79. Liu S, Qi L, Yu Q, Song Y, Han W, Zu X, Jiang S, Yuan J, Zeng F, Xie Y (2014) Survivin and HLA-I expression predicts survival of patients with clear cell renal cell carcinoma. *Tumour Biol.* 35:8281-8

80. Löwer R, Boller K, Hasenmaier B, Korbmacher C, Mueller-Lantzsch N, Löwer J, Kurth R (1993) Identification of human endogenous retroviruses with complex mRNA expression and particle formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:4480-4
81. Löwer R, Tönjes RR, Korbmacher C, Kurth R, Löwer J (1995) Identification of a Rev-related protein by analysis of spliced transcripts of the human endogenous retroviruses HTDV/HERV-K. *J Virol* 69:141–9
82. Löwer R, Löwer J, Kurth R (1996) The viruses in all of us: characteristics and biological significance of human endogenous retrovirus sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:5177–84
83. Mallet F, Bouton O, Prudhomme S, Cheynet V, Oriol G, Bonnaud B, Lucotte G, Duret L, Mandrand B (2004) The endogenous retroviral locus ERVWE1 is a bona fide gene involved in hominoid placental physiology. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:1731–6
84. Mallory PJ, Feldman D (2009) Inactivation of the human vitamin D receptor by caspase-3. *Endocrinology* 150:679–86
85. Mantell DJ, Owens PE, Bundred NJ, Mawer EB, Canfield AE (2000) 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Circ Res* 87:214–20#
86. Martelli MP, Pettirossi V, Thiede C, Bonifacio E, Mezzasoma F, Cecchini D, Pacini R, Tabarrini A, Ciurnelli R, Gionfriddo I, Manes N, Rossi R, Giunchi L, Oelschlägel U, Brunetti L, Gernei M, Delia M, Specchia G, Liso A, Di Ianni M, Di Raimondo F, Falzetti F, Del Vecchio L, Martelli MF, Falini B (2010) CD34+ cells from AML with mutated NPM1 harbor cytoplasmic mutated nucleophosmin and generate leukemia in immunocompromised mice. *Blood* 116:3907–22
87. Mayer J, Meese E, Mueller-Lantzsch N (1998) Human endogenous retrovirus K homologous sequences and their coding capacity in Old World primates. *J Virol.* 72:1870-5
88. Mayer J, Sauter M, Rácz A, Scherer D, Mueller-Lantzsch N, Meese E (1999) An almost-intact human endogenous retrovirus K on human chromosome 7. *Nat Genet* 21:257–8
89. Mayer J, Blomberg J, Seal RL (2011) A revised nomenclature for transcribed human endogenous retroviral loci. *Mob DNA* 2:7
90. Medstrand P, Blomberg J (1993) Characterization of novel reverse transcriptase encoding human endogenous retroviral sequences similar to type A and type B retroviruses: differential transcription in normal human tissues. *J Virol* 67:6778–87
91. Medstrand P, van de Lagemaat LN, Mager DL (2002) Retroelement distributions in the human genome: variations associated with age and proximity to genes. *Genome Res.* 12:1483-95

92. Metzeler KH, Herold T, Rothenberg-Thurley M, Amler S, Sauerland MC M, Görlich D, Schneider S, Konstandin NP, Dufour A, Bräundl K, Ksienzyk B, Zellmeier E, Hartmann L, Greif PA, Fiegl M, Subklewe M, Bohlander SK, Krug U, Faldum A, Berdel BE, Wörmann B, Büchner T, Hiddemann W, Braess J, Spiekermann K, AMLCG Study Group (2016) Spectrum and prognostic relevance of driver gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood* 128:686–98
93. Mi S, Lee X, Li X, Veldman, GM G, Finnerty H, Racie L, LaVallie E, Tang XY, Edouard P, Howes S, Keith JC Jr, McCoy JM (2000) Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature* 403:785–9
94. Morvan MG, Lanier LL NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks. *Nat Rev Cancer* 16:7–19
95. Nelson PN, Carnegie PR P, Martin J, Davari Ejtehadi H, Hooley P, Roden D, Rowland-Jones S, Warren P, Astley J, Murray PG (2003) Demystified. Human endogenous retroviruses. *Mol Pathol* 56:11–8
96. Oja M, Peltonen J, Blomberg J, Kaski S (2007) Methods for estimating human endogenous retrovirus activities from EST databases. *BMC Bioinformatics* 8:11
97. Ono M, Yasunaga T, Miyata T, Ushikubo H (1986) Nucleotide sequence of human endogenous retrovirus genome related to the mouse mammary tumor virus genome. *J Virol* 60:589–98
98. Oran B, Weisdorf DJ (2012) Survival for older patients with acute myeloid leukemia: a population-based study. *Haematologica* 9:1916–24
99. Ossenkoppele G, Löwenberg B (2015) How I treat the older patient with acute myeloid leukemia. *Blood* 125:767–74
100. Pallis M, Burrows F, Whittall A, Boddy N, Seedhouse C, Russell N (2013) Efficacy of RNA polymerase II inhibitors in targeting dormant leukaemia cells. *BMC Pharmacol Toxicol* 14:32
101. Pastore F, Dufour A, Benthaus T, Metzeler KH, Maharry KS, Schneider S, Ksienzyk B, Mellert G, Zellmeier E, Kakadia PM, Unterhalt M, Feuring-Buske M, Buske C, Braess J, Sauerland MC, Heinecke A, Krug U, Berdel WE, Buechner T, Woermann B, Hiddemann W, Bohlander SK, Marcucci G, Spiekermann K, Bloomfield CD, Hoster E (2014) Combined molecular and clinical prognostic index for relapse and survival in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood* 124:1586–94
102. Pérot P, Mugnier N, Montgiraud C, Gimenez J, Jaillard M, Bonnaud B, Mallet F (2012) Microarray-based sketches of the HERV transcriptome landscape. *PLoS One* 7:40194
103. Peters G, Placzek M, Brookes S, Kozak C, Smith R, Dickson C (1986) Characterization, chromosome assignment, and segregation analysis of endogenous proviral units of mouse mammary tumor virus. *J Virol* 59:535–44

104. Pleyer L, Burgstaller S, Girschikofsky M, Linkesch W, Stauder R, Pfeilstocker M, Schreder M, Tinchon C, Sliwa T, Lang A, Sperr WR, Krippel P, Geissler D, Voskova D, Schlick K, Thaler J, Machherndl-Spandl S, Theiler G, Eckmüller O, Greil R (2014) Azacitidine in 302 patients with WHO-defined acute myeloid leukemia: results from the Austrian Azacitidine Registry of the AGMT-Study Group. *Ann Hematol* 93:1852–38
105. Plum LA, DeLuca HF (2010) Vitamin D, disease and therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 9:941–55
106. Rabinowitz JD, White E (2010) Autophagy and metabolism. *Science* 330:1344–8
107. Ramanathan A, Schreiber SL (2009) Direct control of mitochondrial function by mTOR. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:22229–32
108. Reid A, Gould A, Brand N, Cook M, Strutt P, Li J, Licht J, Waxman S, Krumlauf R, Zelent A (1995) Leukemia translocation gene, PLZF, is expressed with a speckled nuclear pattern in early hematopoietic progenitors. *Blood* 86:4544–52
109. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL (2001) Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414:105–11
110. Ruprecht K, Mayer J, Sauter M, Roemer K, Mueller-Lantzsch N (2008) Endogenous retroviruses and cancer. *Cell Mol Life Sci* 65:2266–82
111. Schiavetti F, Thonnard J, Colau D, Boon T, Coulie PG (2002) A human endogenous retroviral sequence encoding an antigen recognized on melanoma by cytolytic T lymphocytes. *Cancer Res* 62:5510–6
112. Schlenk RF, Döhner H (2013) Genomic applications in the clinic: use in treatment paradigm of acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2013:324–30
113. Schlenk RF, Weber D, Fiedler W, Salih HR, Wulf G, Salwender H, Schroeder T, Kindler T, Lübbert M, Wolf D, Westermann J, Kraemer D, Götze KS, Horst HA, Krauter J, Girschikofsky M, Ringhoffer M, Südhoff T, Held G, Derigs HG, Schroers R, Greil R, Griebhammer M, Lange E, Burchardt A, Martens U, Hertenstein B, Marretta L, Heuser M, Thol F, Gaidzik VI, Herr W, Kryzalka J, Benner A, Döhner K, Ganser A, Paschka P, Döhner H, German-Austrian AML Study Group. (2019) Midostaurin added to chemotherapy and continued single-agent maintenance therapy in acute myeloid leukemia with FLT3-ITD. *Blood* 133:840–51
114. Schmitt K, Heyne K, Roemer K, Meese E, Mayer J (2015) HERV-K(HML-2) rec and np9 transcripts not restricted to disease but present in many normal human tissues. *Mob DNA* 6:4
115. Schommer S, Sauter M, Kräusslich HG, Best B, Mueller-Lantzsch N (1996) Characterization of the human endogenous retrovirus K proteinase. *J Gen Virol*

77:375–9

116. Seifarth W, Baust C, Murr A, Skladny H, Krieg-Schneider F, Blusch J, Werner T, Hehlmann R, Leib-Mösch C (1998) Proviral structure, chromosomal location, and expression of HERV-K-T47D, a novel human endogenous retrovirus derived from T47D particles. *J Virol* 72:8384–91
117. Seifarth W, Frank O, Zeilfelder U, Spiess B, Greenwood AD, Hehlmann R, Leib-Mösch C (2005) Comprehensive analysis of human endogenous retrovirus transcriptional activity in human tissues with a retrovirus-specific microarray. *J Virol* 79:341–52
118. Serve H, Krug U, Wagner R, Sauerland, MC M, Heinecke A, Brunnberg U, Schaich M, Ottmann O, Duyster J, Wandt H, Fischer T, Giagounidis A, Neubauer A, Reichle A, Aulitzky W, Noppeney R, Blau I, Kunzmann V, Stuhlmann R, Krämer A, Kreuzer KA, Brandts C, Steffen B, Thiede C, Müller-Tidow C, Ehninger G, Berdel WE (2013) Sorafenib in combination with intensive chemotherapy in elderly patients with acute myeloid leukemia: results from a randomized, placebo-controlled trial. *J Clin Oncol* 31:3110–8
119. Shallis RM, Wang R, Davidoff A, Ma X, Zeidan AM (2019) Epidemiology of acute myeloid leukemia: Recent progress and enduring challenges. *Blood Rev* 36:70–87
120. Siegel RL, Miller KD, Jemal A (2018) Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin* 68:7–30
121. Simpson GR, Patience C, Löwer R, Tönjes RR, Moore HD, Weiss RA, Boyd MT (1996) Endogenous D-type (HERV-K) related sequences are packaged into retroviral particles in the placenta and possess open reading frames for reverse transcriptase. *Virology* 222:451–6
122. Singh AM, Dalton S (2009) The cell cycle and Myc intersect with mechanisms that regulate pluripotency and reprogramming. *Cell Stem Cell* 5:141–9
123. Stauffer Y, Theiler G, Sperisen P, Lebedev Y, Jongeneel CV (2004) Digital expression profiles of human endogenous retroviral families in normal and cancerous tissues. *Cancer Immun* 4:2
124. Stoye JP (2012) Studies of endogenous retroviruses reveal a continuing evolutionary saga. *Nat Rev Microbiol* 10:395–406
125. Subramanian RP, Wildschutte JH, Russo C, Coffin JM (2011) Identification, characterization, and comparative genomic distribution of the HERV-K (HML-2) group of human endogenous retroviruses. *Retrovirology* 8:90
126. Sugimoto J, Matsuura N, Kinjo Y, Takasu N, Oda T, Jinno Y (2001) Transcriptionally active HERV-K genes: identification, isolation, and chromosomal mapping. *Genomics* 72:137–44

127. Taussig DC, Miraki-Moud F, Anjos-Afonso F, Pearce DH, Allen K, Ridler C, Lillington D, Oakervee H, Cavenagh J, Agrawal SG, Lister TA, Gribben JG, Bonnet D (2008) Anti-CD38 antibody-mediated clearance of human repopulating cells masks the heterogeneity of leukemia-initiating cells. *Blood* 112:568–75
128. Taussig DC, Vargaftig J, Miraki-Moud F, Griessinger E, Sharrock K, Luke T, Lillington D, Oakervee H, Cavenagh J, Agrawal SG, Lister TA, Gribben JG, Bonnet D (2010) Leukemia-initiating cells from some acute myeloid leukemia patients with mutated nucleophosmin reside in the CD34(-) fraction. *Blood* 115:1976–84
129. ten Cate B, de Bruyn M, Wei Y, Bremer E, Helfrich W (2010) Targeted elimination of leukemia stem cells; a new therapeutic approach in hemato-oncology. *Curr Drug Targets* 11:95–110
130. Tönjes RR, Boller K, Limbach C, Lugert R, Kurth R (1997) Characterization of human endogenous retrovirus type K virus-like particles generated from recombinant baculoviruses. *Virology* 233:280–91
131. Tönjes RR, Czauderna F, Kurth R (1999) Genome-wide screening, cloning, chromosomal assignment, and expression of full-length human endogenous retrovirus type K. *J Virol* 73:9187–95
132. Turner G, Barbulescu M, Su M, Jensen-Seaman MI, Kidd KK, Lenz J (2001) Insertional polymorphisms of full-length endogenous retroviruses in humans. *Curr Biol* 11:1531–5
133. Valent P (2011) Targeting of leukemia-initiating cells to develop curative drug therapies: straightforward but nontrivial concept. *Curr Cancer Drug Targets* 11:56–71
134. Vogt PK (1997) *Historical Introduction to the General Properties of Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY)
135. Wang X, Gocek E, Liu CG, Studzinski GP (2009) MicroRNAs181 regulate the expression of p27Kip1 in human myeloid leukemia cells induced to differentiate by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Cell Cycle* 8:736–41
136. Wang-Johanning F, Liu J, Rycaj K, Huang M, Tsai K, Rosen DG, Chen DT, Lu DW, Barnhart KF, Johanning GL (2007) Expression of multiple human endogenous retrovirus surface envelope proteins in ovarian cancer. *Int J Cancer* 120:81–90
137. Wang-Johanning F, Rycaj K, Plummer JB J, Li M, Yin B, Frerich K, Garza JG, Shen J, Lin K, Yan P, Glynn SA, Dorsey TH, Hunt KK, Ambs S, Johanning GL (2012) Immunotherapeutic potential of anti-human endogenous retrovirus-K envelope protein antibodies in targeting breast tumors. *J Natl Cancer Inst* 104:189–210
138. Weber GF (2015) *Drugs that Suppress Proliferation*.

139. Yang J, Bogerd HP, Peng S, Wiegand H, Truant R, Cullen BR (1999) An ancient family of human endogenous retroviruses encodes a functional homolog of the HIV-1 Rev protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:13404–8
140. Zelent A, Guidez F, Melnick A, Waxman S, Licht JD (2001) Translocations of the RARalpha gene in acute promyelocytic leukemia. *Oncogene* 20:7186–203
141. Zhang Y, Chen HX, Zhou SY, Wang, SX S, Zheng K, Xu DD, Liu YT, Wang XY, Wang X, Yan HZ, Zhang L, Liu QY, Chen WQ, Wang YF (2015) Sp1 and c-Myc modulate drug resistance of leukemia stem cells by regulating survivin expression through the ERK-MSK MAPK signaling pathway. *Mol Cancer* 14:56
142. Zhou H, Li Y, Liu B, Shan Y, Li Y, Zhao L, Su Z, Jia L (2017) Downregulation of miR-224 and let-7i contribute to cell survival and chemoresistance in chronic myeloid leukemia cells by regulating ST3GAL IV expression. *Gene* 626:106–18
143. Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM (2011) mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12:21–35



## Danksagung

Vielen herzlichen Dank an Prof. Dr. rer. nat. Klaus Roemer für die Überlassung des interessanten und herausfordernden Themas. Ich danke für die umfangreiche Unterstützung, für die Beantwortung meiner zahlreichen Fragen, für die Aufmunterung in den kniffligen Phasen, für die kritische Durchsicht meiner Arbeit, für das super angenehme Arbeitsklima und die investierte Zeit. Dank der umfangreichen Laborarbeiten und der Ausarbeitung dieser Arbeit habe ich einen ersten Einblick in den Bereich der medizinischen Forschung mit vielen wertvollen Erfahrungen erhalten. Hierfür einen ganz herzlichen Dank!

Allen Mitarbeitern des José-Carreras Zentrums, die mich während meiner Zeit im Labor begleitet haben, danke ich für die sehr gute Zusammenarbeit, die immer währende Hilfsbereitschaft und die angenehme Atmosphäre im Labor.

Im Besonderen bedanke ich mich bei PD Dr. rer. nat. Kristina Heyne für die vielen super netten Gespräche! Ich konnte jede Frage stellen und habe immer wieder Aufmunterung und Unterstützung erhalten. Ich habe jedes einzelne Zusammentreffen sehr genossen!

Die fortwährende Motivation verdanke ich meiner Familie! Vielen lieben Dank für eure Unterstützung, besonders in herausfordernden Phasen und für das entgegengebrachte Verständnis, in Phasen des Zeitdrucks. Wertvoll waren für mich die intensiven Gespräche, die mich immer wieder vorangebracht und mir einen Perspektivenwechsel erlaubt haben. Die Abwechslung zuhause war mir wichtig und hat mir wichtige Zeit zum Abschalten gegeben.

Ich danke meiner Tante Dr. Christina Balsler, die mir bei jeglichen Fragen rund um die Medizin beiseite steht. Meinem Freund Julius Laufenberg danke ich für seine große Geduld und seine vielfältige Unterstützung, für intensive Gespräche und viele Momente des Ausgleichs.

Danke liebe Tatjana Deines-Kräuter, lieber Thomas Laufenberg und liebe Dr. Christina Balsler für die kritische Durchsicht meiner Arbeit.

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.