

Aus dem Zentrum für Innere Medizin, Klinik für Hämatologie, Onkologie und Immunologie

Direktor: Prof. Dr. A. Neubauer

Des Fachbereichs für Medizin der Philipps-Universität Marburg

In Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH

**Untersuchung der Expression des nukleären Onkogens SKI und des
Transkriptionsrepressors GFI bei der akuten myeloischen Leukämie**

INAUGURAL-DISSERTATION

Zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

Dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

Vorgelegt von

Alexandra Nagy, geboren am 16.03.1987 in Berlin

Marburg 2015



Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan:

Referent:

1. Koreferent:

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	3
1.1	Akute myeloische Leukämie	3
1.1.1	Epidemiologie	3
1.1.2	Pathogenese	3
1.1.3	Diagnostik, Klassifikation und Prognose	4
1.1.4	Chemotherapie	5
1.2	Das Onkogen SKI	7
1.2.1	Aufbau des SKI-Proteins	7
1.2.2	Regulation und Interaktion mit nukleären Proteinen	7
1.3	Der Transkriptionsfaktor GFI-1	8
1.3.1	Aufbau von GFI-1	8
1.3.2	Reaktion und Interaktion mit nukleären Proteinen	9
2	Zielsetzung der Arbeit	11
3	Patienten, Material und Methoden	12
3.1	Patienten	12
3.2	Materialien	21
3.2.1	Zelllinien	21
3.2.2	Lösungen und Puffer	21
3.2.3	Chemikalien und Reagenzien	22
3.2.4	Kits	23
3.2.5	Primer	24
3.2.6	Antikörper	24
3.2.7	siRNA	25
3.2.8	Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien	25
3.3	Methoden	26
3.3.1	Ficollgradient-Lymphozytenseparation	26
3.3.2	RNA Isolation	27
3.3.3	Quantifizierung von RNA	28
3.3.4	Reverse Transkription (cDNA Synthese)	28
3.3.5	Polymerase-Chain-Reaction	28
3.3.6	Agarosegel-Elektrophorese	29
3.3.7	Quantitative Real-Time Polymerase-Chain-Reaction (RT-PCR)	30
3.3.8	Zellkultur	31
3.3.9	Bestimmung der Zellzahl	31

3.3.10	Proteinextraktion.....	31
3.3.11	Proteinquantifizierung mittels BCA-Assay	32
3.3.12	Transfektion mit siRNA.....	32
3.3.13	Behandlung der HL60 Zellen mit Valproinsäure	33
3.3.14	Western Blot.....	33
3.4	Statistische Methoden	35
3.4.1	Boxplot.....	35
3.4.2	Kruskal-Wallis Test (H-Test).....	35
3.4.3	Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse.....	36
3.4.4	Rangkorrelation nach Spearman.....	37
4	Ergebnisse	38
4.1	Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der <i>SKI/GFI-1</i> Expression und der Prognose der Patienten.....	38
4.1.1	Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit vom Ausmaß der <i>SKI/GFI-1</i> Genexpression	38
4.1.2	Boxplotanalyse zur Darstellung der AML Risikogruppen in Relation zur relativen <i>SKI</i> und <i>GFI-1</i> Genexpression.....	41
4.1.3	Korrelation der relativen <i>GFI-1</i> und <i>SKI</i> Genexpression.....	43
4.2	<i>GFI-1</i>, <i>PU.1</i> und <i>ICSBP</i> Expression nach <i>SKI</i> Suppression.....	44
4.2.1	<i>SKI</i> Suppression mittels siRNA in U937- Zellen.....	45
4.2.2	<i>SKI</i> Suppression mittels siRNA in HL60- Zellen	47
4.2.3	<i>SKI</i> Suppression durch Valproinsäure in HL60- Zellen	49
5	Diskussion und Ausblick.....	52
5.1	<i>SKI</i> und <i>GFI-1</i> Expression in AML-Patienten – Prognose der AML-Patienten.....	52
5.2	<i>SKI</i>- Suppression – <i>GFI-1</i>, <i>PU.1</i>, <i>ICSBP</i> Expression	53
5.3	Ausblick.....	57
6	Zusammenfassung.....	58
6.1	Summary.....	59
7	Literaturverzeichnis	LXI
8	Abkürzungsverzeichnis.....	LXX
9	Abbildungsverzeichnis	LXXII
10	Tabellenverzeichnis.....	LXXIII
11	Verzeichnis der akademischen Lehrer	LXXIV
12	Danksagung.....	LXXV

1 Einleitung

1.1 Akute myeloische Leukämie

1.1.1 Epidemiologie

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine maligne Neoplasie myeloischer Vorläuferzellen, bei der es zu einer ungehemmten klonalen Proliferation und fehlenden Ausdifferenzierung in reife Blutzellen kommt. Die entstehenden Blasten verdrängen das normale hämatopoetische Zellspektrum und werden ins periphere Blut ausgeschwemmt (Estey und Döhner 2006). Laut Definition der World Health Organization (WHO) liegt eine Leukämie vor, wenn über 20% Blasten im Knochenmark oder peripheren Blut nachgewiesen werden können oder unabhängig von der Blastenzahl einer der folgenden Karyotypen vorliegt: $t(8;21)(q22;q22)$, $inv(16)(p13q22)$, $t(16;16)(p13;q22)$ und $t(15;17)(q22;q12)$ (Vardiman et al. 2009). Die AML gehört mit einer jährlichen Inzidenz von 4,0 auf 100.000 Personen zu den selteneren Erkrankungen. Die Inzidenz nimmt jedoch mit dem Alter zu. Mit einem durchschnittlichen Alter von 69 Jahren bei Erstdiagnose sind vorwiegend ältere Menschen betroffen (Juliussen et al. 2009; Smith et al. 2011). Mit den heutigen Therapiemöglichkeiten beträgt die durchschnittliche Remissionsrate für unter 60-Jährige 72% (> 60-Jährige 50%). Diese Remissionen bleiben bei 30-40% der Patienten 4-5 Jahre bestehen (> 60-Jährige 15%) (Krug et al. 2011).

1.1.2 Pathogenese

Die AML wird durch molekulare Aberrationen kritischer Gene in klonal expandierenden leukämischen Stammzellen begründet. Charakteristisch sind neben zytogenetischen auch verschiedene molekulare Veränderungen, die das Therapieansprechen und die Prognose wesentlich bestimmen (Valk et al. 2004). Von den Mutationen sind Gene, die eine zentrale Funktion in der Myelopoese spielen, betroffen, z.B. RUNX1, CEBP/a oder andere. Dem „*Two Hit Model*“ von Gilliland zufolge (s. Abb. 1) entsteht die Leukämie durch eine Klasse I und eine Klasse II Mutation. Durch die Klasse I Mutation, z.B. in einem Gen für einen Tyrosinkinase-Rezeptor, kommt es zu einer überschießenden Proliferation des malignen Klons. Die Klasse II Mutation bewirkt eine Blockade der Differenzierung und verhindert die Apoptose. Über die Bildung von Fusionsproteinen (z.B. Promyelocytic leukemia protein (PML)/Retinoic acid receptor (RAR)) oder die Mutation von Transkriptionsfaktoren wird die Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen inhibiert (Greenblatt et al. 2014).

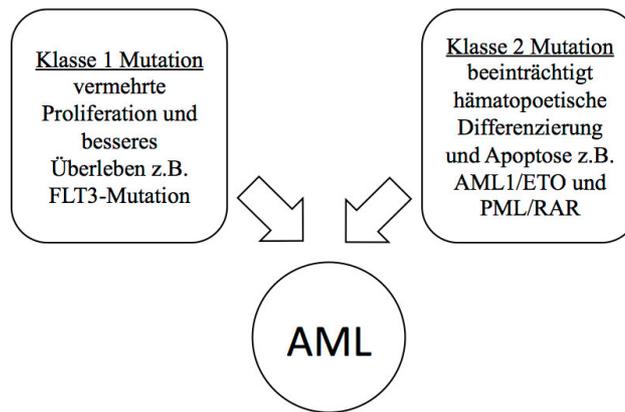


Abbildung 1: Model nach Gilliland.

Durch die Klasse-I-Mutationen kommt es zur ungehemmten Proliferation (Beispiel: FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT3)) Klasse-II-Mutationen führen zu einem Differenzierungsblock (Beispiele: PML/RAR, Acute myeloid Leukemia 1 (AML1)/ Eight-Twenty One Oncoprotein (ETO)). Abbildung modifiziert nach (Kelly et al. 2002).

1.1.3 Diagnostik, Klassifikation und Prognose

AML-Patienten präsentieren sich klinisch mit unspezifischen Symptomen, weshalb bei einem auffälligen Blutbild (Granulozytopenie, Anämie, Thrombozytopenie) hämatoonkologische Erkrankungen differentialdiagnostisch immer in Betracht gezogen werden müssen. Erhärtet sich der Verdacht der Leukämie, wird eine Knochenmarkpunktion (Knochenmarkzytologie/-zytochemie und – biopsie) durchgeführt (Döhner et al. 2010). Die Identifizierung der Subgruppe erfolgt mittels Immunphänotypisierung, Zytogenetik und Molekulardiagnostik. Die Klassifikation der AML dient der Einteilung in Risikogruppen zur Einschätzung der Prognose und als Hilfe zur Therapieentscheidung. Zusätzlich zu den zytogenetischen Veränderungen ist das Alter bei der Erstdiagnose ein wichtiger Prognosefaktor (Krug et al. 2011). Seit 1976 erfolgt die Klassifikation durch die French American British Association (FAB-Association). Die FAB-Einteilung der Leukämien basiert auf zytomorphologischen Kriterien, die oftmals mit bestimmten Karyotypen assoziiert sind (Bennett et al. 1976). Die seit 1995 existierende und zuletzt 2008 aktualisierte WHO-Klassifikation (Vardiman 2010) erweitert die Einteilung durch zytogenetische und molekulare Kriterien, die aufgrund der genetischen Variabilität der AML notwendig sind (Harris et al. 1999; Vardiman et al. 2002). Diese AML-Subgruppen können in Risikogruppen aufgeteilt werden, die eine Prognose über die durchschnittliche Überlebenszeit und Rezidivrate erlauben. Die Hochrisiko-Gruppe ist definiert durch einen komplexen Karyotyp oder Aberrationen der Chromosomen 3, 5 oder 7; wobei ein komplexer Karyotyp, einer AML mit mehr als drei zytogenetischen Aberrationen entspricht (Breems et

al. 2008; Byrd et al. 2002). In dieser Hochrisiko-Gruppe liegt das 3-Jahres-Überleben bei 12% (Patel et al. 2012). Patienten der Intermediärrisiko-Gruppe besitzen häufig einen normalen Karyotyp und weisen ein 3-Jahres-Überleben von 42% auf (Patel et al. 2012). Die beste Prognose mit einer kompletten Remission in 95% der Fälle und einem 2-Jahres-Überleben von 86% haben Patienten mit t(15;17) Translokationen (Niedrigrisiko-Gruppe, Lo-Coco et al. 2013). Patienten mit t(8;21) und inv(16) zeigen mit einer Heilungsrate von 59% ebenfalls eine gute Prognose und werden daher auch zur Niedrigrisiko-Gruppe gezählt. Das Gesamt 3-Jahres-Überleben der Niedrigrisikogruppe liegt bei 64% (Patel et al. 2012). Auch bestimmte Mutationen spielen eine prognostische Rolle. Bei Patienten mit normalen Karyotyp sind häufig FMS-like tyrosine kinase 3 (*FLT3*)-, Mixed-lineage leukemia (*MLL*)-, sowie Nucleophosmin (*NPM1*)- und CCAAT/enhancer binding protein alpha (*CEBPA*)-Gene betroffen. Während Mutationen der *NPM1*- und *CEBPA*-Gene prognostisch günstig sind, sind *FLT3*- und *MLL*-Mutationen mit einer schlechten Prognose assoziiert (Schlenk et al. 2008; Patel et al. 2012).

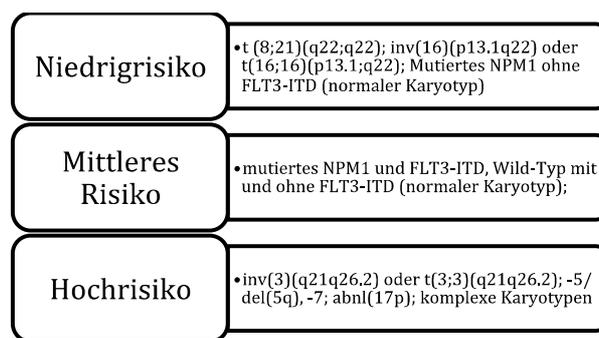


Abbildung 2: Einteilung in die Risikogruppen.

Die Einteilung in die Risikogruppen erfolgt anhand der Zytogenetik (Patel et al. 2012).

1.1.4 Chemotherapie

Klassischerweise erfolgt die Therapie in zwei Phasen. Mit der Induktionstherapie soll zunächst eine komplette Remission erreicht werden (Stone et al. 2004). Hierfür wird üblicherweise ein Anthrazyklin (Idarubicin, Daunorubicin) mit Cytosin-Arabinosid (Ara-C) kombiniert (Tallman et al. 2005). Bei der kompletten Remission werden weniger als 5% Blasten im Knochenmark, keine malignen Blasten, sowie mehr als 1.000 Neutrophile und 100.000 Thrombozyten im peripheren Blut nachgewiesen (Cheson et al. 2004). Bei einer kompletten Remission sind die Chancen einer kurativen Therapie erhöht (Cheson et al. 2004). Die anschließende Postremissionstherapie (Konsolidierungstherapie) dient dem Erhalt der kompletten Remission. Ohne eine Postremissionstherapie ist ein Rezidiv sehr wahrscheinlich. Die

Postremissionstherapie besteht aus einer Hochdosistherapie mit Ara-C, einer intensiven Chemotherapie oder einer autologen oder allogenen Stammzelltransplantation (Tallman et al. 2005; Mayer et al. 1994). Die Wahl der Therapie ist abhängig von der Risikoeinteilung und dem Allgemeinzustand des Patienten (Alter und Komorbidität) (Döhner et al. 2010). Befindet sich der Patient in einem sehr schlechten Allgemeinzustand und fehlen ihm die Reserven, die neutropene Phase einer solchen Chemotherapie durchzustehen, kann eine palliative Therapie („Best supportive Care“) indiziert sein (Estey 2000). Zur Steigerung der Spezifität und Effektivität der AML-Therapie ist die Aufklärung der Pathogenese erforderlich. Auf der Basis der Erkenntnisse zur Pathogenese der Akuten Promyelozyten Leukämie (APL) konnten erhebliche Fortschritte im Therapieregime erzielt werden. Die APL ist ein heute gut therapierbarer Subtyp der AML und durch die t(15;17)(q22;q11.2) Translokation mit Expression des PML/RAR Fusionsprodukt charakterisiert (Kalantry et al. 1997). Das Fusionsprodukt führt zu einer Blockade der durch physiologische Retinsäurekonzentrationen ausgelösten Differenzierung. Mit Hilfe des Vitamin A-Derivat All-Trans-Retinsäure (ATRA) lässt sich die Differenzierung der Promyelozyten induzieren (Pandolfi 2001). Daher wird die APL mit ATRA in Kombination mit einer Chemotherapie (z.B. Anthracyclin oder Arsen) therapiert (Lo-Coco et al. 2013; Sanz et al. 2004). Mit dem aktuell angewandten Therapieregime wird in 95% der APL-Fälle eine komplette Remission und ein 2-Jahres-Überleben von 86% erreicht (Lo-Coco et al. 2013). Ein mögliches, neues Therapeutikum ist der Histon Deacetylase Komplex (HDAC)-Inhibitor, Valproinsäure (VPA). Die veränderte HDAC-Funktion bewirkt eine vermehrte Deacetylierung der Histone und somit die Inhibition der Tumorsuppressoren und der Zelldifferenzierung (Kuendgen et al. 2004). VPA führt zu einer Hyperacetylierung der Histone und induziert die Differenzierung und Apoptose der betroffenen Zellen (Göttlicher et al. 2001). ATRA verstärkt den positiven Effekt von VPA auf die Differenzierung. Die kombinierte Therapie aus VPA/ATRA stellt eine mögliche Alternative, insbesondere für Patienten mit Komorbiditäten, hohem Alter und/ oder schlechtem Allgemeinzustand dar (Ritter et al. 2006; Kuendgen et al. 2004). Bisher zeigte eine VPA/ATRA-Therapie in unterschiedlichen Studien unterschiedliche Erfolge (Kuendgen et al. 2004), was auf das unterschiedliche Therapieansprechen verschiedener Patientengruppen zurückgeführt wird (Bug et al. 2005).

1.2 Das Onkogen SKI

1.2.1 Aufbau des SKI-Proteins

SKI wurde als transformierendes Protein im Sloan-Kettering Virus von Vögeln identifiziert. Eine Überexpression von SKI induziert die Transformation der Fibroblasten von Hühnerembryos (Stavenzer et al. 1981). Das Amino-(N)-terminale Ende besteht aus einer Dachshund-Homology-Domäne (DHD), welche die *SKI*-Genfamilie definiert (Wilson et al. 2004). Die Oberfläche der SKI-DHD unterscheidet sich von der DNA-bindenden Oberfläche anderer Dachshund-Proteine. Daher wird angenommen, dass c-SKI über seine DHD präferentiell an Proteine statt an DNA bindet (Wilson et al. 2004). Ein weiterer Bestandteil des N-terminalen Endes ist die SAND (benannt nach den Proteinen Sp100, AIRE-1, NucP41/75, DEAF-1)-Domäne, die wahrscheinlich ebenfalls der Proteininteraktion dient (Wu et al. 2002). Das Carboxy-(C)-terminale Ende von SKI unterscheidet sich von dem der anderen Mitglieder der *SKI* Genfamilie. Es besteht aus fünf Tandem-Wiederholungen mit je 25 Aminosäuren sowie einer Leucin-Zipper-ähnlichen Struktur. Es wird angenommen, dass dieser Teil von SKI zur Bildung von Homodimeren und Heterodimeren mit seinen engsten Verwandten SKI-related novel Protein (SnoN) genutzt wird (Stavenzer et al. 1981; Bonnon und Atanasoski 2012). SKI kann nur in Anwesenheit seiner zellulären Partner an DNA binden (Bonnon 2012).

1.2.2 Regulation und Interaktion mit nukleären Proteinen

SKI interagiert als Bestandteil verschiedener Signalkaskaden mit multiplen Bindungspartnern und wird in einigen Tumorzellen vermehrt exprimiert (Bonnon 2012). Die AG Neubauer konnte eine Überexpression von SKI in der prognostisch ungünstigen AML-Konstellation -7/del7q nachweisen (Ritter et al. 2006). Die mögliche Ursache für die erhöhte Expression von *SKI* könnte ein Verlust von micro-Ribonukleinsäure-29a (miRNA29a) sein, welche auf dem Chromosom 7q32 lokalisiert ist. Beim Karyotyp -7/del7q ist die miRNA29a Bildung reduziert, während SKI vermehrt synthetisiert wird (Teichler et al. 2011; Ritter et al. 2006). Auch in AML-Patientenproben korreliert die Bildung von SKI und miRNA29a invers. SKI nimmt über verschiedene Bindungspartner Einfluss auf die, für die Myelopoese wichtige, Transkriptionsfaktoren. Die Erkenntnis, dass mit Retinsäure behandelte Mäuse einen ähnlichen Phänotyp aufweisen wie *ski*^{-/-} führte zu der Annahme, dass SKI die RAR α induzierte Transkription supprimiert (Dahl et al 1998). Der nukleäre Hormonrezeptor RAR α induziert die Zelldifferenzierung. In Abwesenheit von Retinsäure rekrutiert RAR α den N-CoR-SMRT-Sin3a-HDAC-Komplex und hemmt gemeinsam mit diesen Korepressoren die Transkription

seiner Zielgene. Physiologische Mengen von Retinsäure führen zur Auflösung des Komplexes und zur Induktion der Differenzierung (Pandolfi 2001). In Forschungsarbeiten der AG Neubauer konnte nachgewiesen werden, dass SKI den RAR α inhibiert und dadurch die Transkription seiner Zielgene inhibiert. Dafür rekrutiert SKI den Nuclear Receptor Co-Repressor (N-CoR) und den Silencing mediator for RAR und Thyroid Receptors (TR) (SMRT), Sin3a und HDAC Komplex (s. Abb 3) (Nomura et al. 1999). N-CoR bindet an die Ligandenbindende Domäne von RAR α und inhibiert so die entsprechende Signalkaskade durch Kompetition (Hörlein et al. 1995). Zudem zeigten AML-Subgruppen mit einer geringeren *SKI* Expression tendenziell einen besseren Therapieerfolg unter ATRA als AML-Subgruppen mit einer stärkeren *SKI* Expression (Teichler et al. 2008). Darüber hinaus bindet und antagonisiert SKI den Transkriptionsfaktor PU.1 (Ueki et al. 2008). Es wird angenommen, dass PU.1 wesentlich an der Entscheidung beteiligt ist, in welche Zelle eine hämatopoetische Stammzelle differenziert. Der Verlust von PU.1 in Mäusen führt zum Verlust von myeloischen Zellen (Vangala et al. 2003). Diese Befunde deuten darauf hin, dass SKI eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der AML spielt.

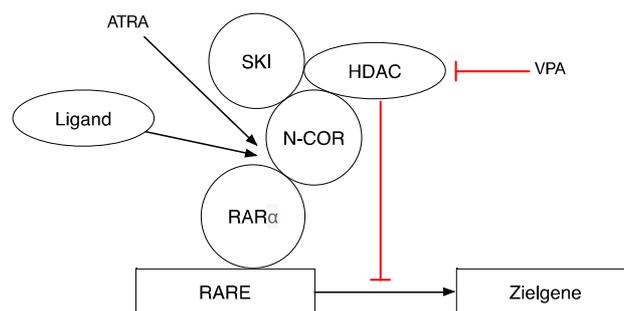


Abbildung 3: Schematische Darstellung der SKI-Interaktion mit RAR α .

SKI rekrutiert den N-CoR, HDAC Komplex und inhibiert den nukleären Rezeptor RAR α . Der Komplex verhindert die Bindung des Liganden an RAR α und damit die Induktion zur Transkription der Zielgene. Rote Linien = Inhibition, schwarze Linien = Induktion.

1.3 Der Transkriptionsfaktor GFI-1

1.3.1 Aufbau von GFI-1

Ein weiterer für die AML bedeutsamer Transkriptionsfaktor ist Growth Factor Independent-1 (GFI-1). Der *GFI-1*-Lokus wurde bei der Suche nach Proto-Onkogenen für ein Interleukin-(IL-2)-2 unabhängiges T-Zelllymphomwachstum entdeckt (Gilks et al. 1993). Dazu wurden doppeltransgene Mäuse (Prim-1/L-myc) mit dem nicht akut transformierenden Molony murine Leukemia Virus (MoMuLV) infiziert. Bei der Identifizierung der Integrationsstellen

des Provirus wurde der *GFI-1*-Lokus gefunden (Schmidt et al. 1996). Bei GFI-1 handelt es sich um einen Transkriptionsrepressor, der im Zellkern lokalisiert ist. Das N-terminale Ende besteht aus 20 Aminosäuren und wird als SNAG-Domäne bezeichnet. Diese kann mit Proteinen interagieren und eine Modifikation der Histone bewirken. Am C-terminalen Ende befinden sich sechs C2H2-Zink-Finger, von denen drei bis fünf sequenzspezifisch DNA binden können (Zweidler-Mckay et al. 1996; Grimes et al. 1996). Der dazwischenliegenden Intermediärdomäne werden Aufgaben im Rahmen der Transkriptionsregulation, des Ribonukleinsäure-(RNA)-Splicing und der Proteinmodifikation zugewiesen (Fiolka et al. 2006).

1.3.2 Reaktion und Interaktion mit nukleären Proteinen

GFI-1 ist an der Entwicklung und Funktion hämatopoetischer Stammzellen, B- und T- Zellen, dendritischen Zellen, sowie Granulozyten, aber auch an der Entwicklung von Innenohr-, Lungen- und Darmzellen beteiligt (Shroyer et al. 2005; Jin et al. 2006). Aufgrund seiner wichtigen Rolle bei der Differenzierung myeloider Zellen führt der Verlust von GFI-1 zu einer ausgeprägten Neutropenie und zur Akkumulation monozytärer Zellen (Zeng et al. 2004). Patienten mit kongenitaler Neutropenie können zudem Mutationen im *GFI-1* Gen aufweisen (Karsunky et al. 2002). GFI-1 interagiert mit multiplen für die Myelopoese wichtigen Transkriptionsfaktoren (Van der Meer et al. 2010). Ein wichtiger Interaktionspartner von GFI-1 ist sein Paralog GFI-1b. Die SNAG und Zink-Finger-Domänen von GFI-1 und GFI-1b weisen 89% Ähnlichkeit auf, während die Intermediärdomäne sich lediglich zu 35% ähneln (Fiolka et al. 2006). Beide Transkriptionsfaktoren haben ähnliche molekulare Effekte, wirken aber in spezifischen Geweben. In *gfi-1* ^{-/-} Mäusen wurde die *gfi-1* Genregion durch die für *gfi-1b* kodierende Sequenz ersetzt. Die hämatopoetischen Phänotypen waren in den Mäusen nahezu nicht beeinträchtigt, die Tiere litten aber u.a. an Hörverlust (Laurent et al. 2009). Zudem können GFI-1 und GFI-1b ihre Synthese gegenseitig regulieren und sind auch zur Autoregulation in der Lage (Huang et al. 2007; Vassen et al. 2005; Montoya-Durango et al. 2008). Weiterhin ist GFI-1 ebenfalls ein direkter Bindungspartner für den Transkriptionsfaktor PU.1 (Dahl et al. 2007, s. Kap. 1.2.2.). PU.1 interagiert wiederum mit dem Interferon consensus sequence-binding protein (ICSBP, auch Interferon regulatory factor 8 (IRF8)), welches die Makrophagendifferenzierung induziert. Eine potenzielle Interaktion zwischen PU.1 und dem ICSBP ist interessant, weil *icsbp* ^{-/-} Mäuse gehäuft chronische myeloische Leukämien (CML) entwickeln und weil in AML- und CML-Patienten die Produktion von ICSBP niedriger ist (Dror et al. 2007). Eine Interaktion zwischen beiden Transkriptionsfaktoren könnte die tumorsupprimie-

rende Aktivität von ICSBP in myeloiden Zellen erklären (Schmidt et al. 2004; Huang et al. 2007; Dror et al. 2007). Außerdem bindet GFI-1 an das ETO. Der Korepressor ETO interagiert z.B. mit Sin3a, N-Cor und dem HDAC-Komplex. Gemeinsam mit AML1 (auch bekannt als runt-related transkription factor 1 (RUNX1)) bildet er das Fusionsprodukt AML1/ETO welches mit der Chromosomentranslokation t(8;21) assoziiert ist. AML1 induziert durch direkte DNA-Bindung die Myelozytendifferenzierung, welche jedoch durch Bildung des Fusionsproduktes inhibiert wird. GFI-1 assoziiert auch mit dem Fusionsprodukt AML1/ETO (McGhee et al. 2003). Zusammenfassend beschreiben diese Erkenntnisse wie GFI-1 mit Hilfe seiner Bindungspartner Einfluss auf die Hämatopoese nimmt, und bestätigen, dass *GFI-1* wie das Onkogen *SKI* ein wichtiger Bestandteil der Pathogenese der AML ist.

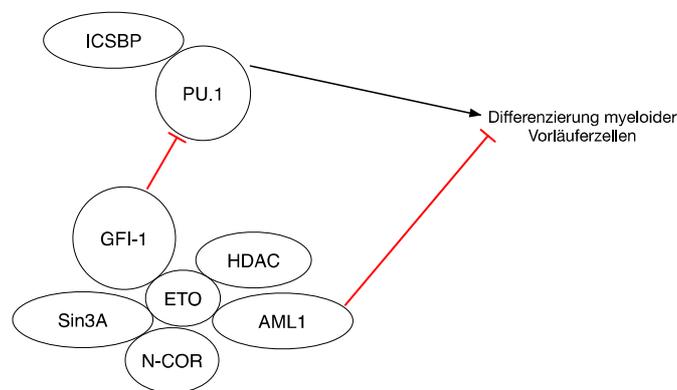


Abbildung 4: Vereinfachte Darstellung von GFI-1 und seinen Interaktionspartnern.

Dargestellt ist die Interaktion mit PU.1 und ETO. GFI-1 antagonisiert PU.1 und inhibiert die Makrophagendifferenzierung, sowie die Differenzierung myeloider Vorläuferzellen (Dahl et al. 2007). Das Fusionsprodukt AML1/ETO führt zum Differenzierungsblock myeloider Vorläuferzellen. GFI-1 interagiert mit AML1/ETO. Weiterhin ist eine Interaktion zwischen ETO und dem HDAC-Komplex, sowie GFI-1 und dem HDAC Komplex beschrieben. Eine Blockade der Differenzierung über den HDAC-Komplex wird angenommen. ETO interagiert mit Sin3a und N-COR (McGhee et al. 2003). Rote Linien = Inhibition, schwarze Linien = Induktion.

2 Zielsetzung der Arbeit

Das steigende Wissen über Onkogene und Transkriptionsfaktoren als Regulatoren der Hämatopoese geht mit einem zunehmenden Verständnis der komplexen Pathogenese der AML einher. Ziel der vorliegenden Arbeit war es die Rolle von SKI und GFI-1 im komplexen Zusammenspiel der Transkriptionsfaktoren bei einer AML zu analysieren. Basierend auf der Annahme, dass SKI und GFI-1 dieselben Zielgene aufweisen (Velu et al. 2008), untersucht diese Arbeit eine mögliche Interaktion des Onkogens SKI als Korepressor für GFI-1.

Dazu sollten zunächst Proben von AML-Patienten bezüglich

- einer potenziellen Korrelation zwischen *SKI/GFI-1* Expression und Überleben der Patienten
- einer potenziellen Korrelation zwischen *SKI/GFI-1* Expression und der Zugehörigkeit zu einer Risikogruppe
- und einer potenziellen Korrelation zwischen der *SKI* und *GFI-1* Expression

untersucht werden. Weiterhin sollten in HL60- und U937 Zellen, deren *SKI* Expression supprimiert wurde, die *GFI-1*, *PU.1* und *ICSBP* Expression analysiert werden, um eine mögliche Interaktion von SKI als Korepressor für GFI-1 zu evaluieren.

3 Patienten, Material und Methoden

3.1 Patienten

Im Rahmen der Dissertation wurden 71 Proben aus Knochenmark oder peripheren Blut von Patienten mit AML der Universitätsklinik Marburg gewonnen. Die Patienten gaben ihr Einverständnis, dass diese Proben für Forschungszwecke verwendet werden dürfen. Zudem verfügt die AG Neubauer über ein Ethikkommissionsvotum zur Nutzung dieser Patientenproben für Forschungszwecke. Die Proben dieser Patienten wurden anhand ihrer Karyotypen und zytogenetischen Eigenschaften in die Risikogruppen Hoch-, Intermediär- und Niedrigrisiko eingeteilt (s. Abb. 2) (Döhner et al. 2010). Aus der Patiententabelle mit anonymisierten Daten (s. Tab. 1) gehen, sofern die Daten vorhanden waren, die Anzahl der Blasten, die Karyotypen, das Geburtsdatum der Patienten, das Datum der Erstdiagnose, sowie das Datum der Probenentnahme, der Verlauf und der Todeszeitpunkt hervor.

Tabelle 1: Patiententabelle. Die Tabelle beinhaltet das Ausmaß der SKI und GFI RNA Expression, die Anzahl der Blasten, die Karyotypen, das Geburtsdatum der Patienten, das Datum der Erstdiagnose, sowie das Datum der Probenentnahme, der Verlauf und der Todeszeitpunkt der 71 Patienten.

*Survival counted from Date of Sample Removal to Date of Death: 01.07.2010

Pseudonym	Risiko	Gfi1 Expr	Ski Expr	Alter	Datum Probenentnahme	Erstdiagnose	Blastenzahl	Karyotyp	Mutation	Material	Leukozyten [G/l]	Thrombozyten [G/l]	Verlauf und Therapie	Überleben in Tagen	lebend=1
															tot=0
2	niedrig	5,54	0,02	74	18.06.2008	2008/06	87%	Translokation t(8;21)		KM	21	4,61	1.- 3. Induktion: Ara C und Daunorubicin; 1.- 3. Konsolidation: Ara C; 2009 Rezidiv; Hydroxycarbamidtherapie; PXD101-Studie Arm B; PXD101 und Idarubicin; 2. Zyklus PXD101-Studie; verstorben	336	0
3	niedrig	2,73	0,03	49	18.08.2008	2008/08	93%	46XY,t(15;17)(q22;q12)[16]46XY[4]		KM	2,66	8,46	1. Zyklus: Ara C und Daunorubicin und Vesanoïd; 2. Zyklus: Ara C und Daunorubicin; CR (Complete Remission); follow-up 20.09.2010	682	1
4	niedrig	1,19	0,06	52	09.03.2009	2009/03	13%	46XY, normaler Karyotyp	NPM1	KM	5,46	58,8	AML 2003 Studie Arm B; 1. Zyklus: Ara C und Daunorubicin; CR; 2. Zyklus: Ara C und Daunorubicin, Konditionierung; Allogene Stammzelltransplantation; follow-up 23.08.2010	479	1
5	niedrig	3,54	0,16	24	27.04.2009	2009/05	13%	46XY, normaler Karyotyp	NPM1	KM	2,9	39	AML 2003 Studie Arm A; 1. und 2. Induktion: Ara C und Daunorubicin; CR; 1. und 2. Konsolidierung: HD (Hochdosis)-Ara C; 3. Konsolidierung: Ara C; follow-up 16.08.2010	430	1
6*	niedrig	3,81	0,14	56	30.05.2006	2006/05	50%	46XY, inv(16;16)(13p;22q)16 von 25 Metaphasen; Trisomie 22(47XY)		KM			AML 2003 Studie Arm B; 1. und 2. Induktion: Ara C und Daunorubicin; 1.- 3. Konsolidierung: Ara C; CR 2009		
7	niedrig	2,35	0,11	52	20.09.2006	2006/09	63%	46XY[6];46XY,inv.(16)(p13q22)[18]		pB	50,7	18,2	AML 2003 Studie Arm A; 1. und 2. Induktion: Ara C und Daunorubicin; 1.- 3. Konsolidierung: HD-Ara C; Rezidiv; Chemo mit IDA-FLAG; Konditionierung; Allogene Stammzelltransplantation; Rezidiv; 1. Zyklus: IDA-FLAG; CR; Ara C, Mitoxantron und Methotrexat; Konditionierung; 2. Allogene Stammzelltransplantation; follow-up 12.08.10	1380	1
8	niedrig	0,97	0,05	63	17.11.2006	2006/11	51%	Inversion 16		pB	51,8	723	1. und 2. Zyklus IDA-FLAG (reduzierte Dosis); 1.- 3. Konsolidierung: Ara C; follow-up 03.08.2010	1322	1

Pseudonym	Risiko	Gfi1 Expr	Ski Expr	Alter	Datum Probenentnahme	Erstdiagnose	Blastenzahl	Karyotyp	Mutation	Material	Leukozyten [G/l]	Thrombozyten [G/l]	Verlauf und Therapie	Überleben in Tagen	lebend=1 tot=0
9	niedrig	0,6	0,61	40	16.04.2007	2007/04	80%	46XX	NPM1	KM	15,6	179	AML 2003 Studie Arm C; 1. und 2. Induktion: Ara C und Daunorubicin; 1. Konsolidierung: MAC (Methotrexat/Actinomycin-D/ Cyclophosphamid), Ara C und Mitoxantron; 2. und 3. Konsolidierung: HD-Ara C; CR; peristierende Remission (2008); follow-up 26.07.2010	1172	1
9a		1,47	0,1				69%			pB					
10	niedrig	1,78	0,08	71	06.07.2007	2007/07	59%		NPM1	KM	1,52	206	SORAML Studie; Ara C und Daunorubicin und Sorafenib; CR 2007; verstorben	239	0
11	niedrig	0,38	0,18	69	21.04.2008	2008/04	72%	46XY, normaler Karyotyp	NPM1	pB	246	45,2	Induktion: Ara C und Daunorubicin; verstorben	0	0
12	niedrig	1,39	0,22	32	19.08.2004	2004/08	65%	t (8;21) (q22; q22) / AML1-ETO positiv (zusätzlich Trisomie 5 in 5 Metaphasen und Verdopplung des aberranten Chromosomensatzes in 4 Metaphasen)		KM			Am 05.05.2010 letzte follow-up Untersuchung nach 5 Jahren	2142	1
12a		2,24	0,09							pB					
13	niedrig	1,34	0,29	91	16.08.2005	2005/08	88%			pB	233	91	Zytoreduktionstherapie; verstorben	13	0
13a		2,45	0,3							KM					
14	niedrig	2,75	0,3	44	07.04.2006	2006/04	68%	46XX, t(15;17)(q22;q21)		pB	35	180	AIDA 2000-Studie; Induktion: ATRA und Idarubicin; 1. Konsolidierung: ATRA und Daunorubicin; 2. Konsolidierung: Mitoxantron; CR 2010; follow-up 13.07.2010	1546	1
14a		1,69	0,25							KM					
15	niedrig	0,19	0,08	61	25.08.2008	2008/08	5%	46XX [11]	NPM1	pB			AML-Studie 2003; 1. und 2. Induktion: Ara C und Daunorubicin; 1. Konsolidierung: HD-Ara C und Mitoxantron; 2. Konsolidierung: Ara C und mAMSA; CR; letzte Vorstellung am 31.05.2010, follow-up 30.08.2010	675	1
16	niedrig	0,35	0,05	46	08.08.2008	2008/08		46XY, normaler Karyotyp	NPM1	pB	150		AML 2003 Studie Arm C; 1. und 2. Induktion: Ara C und Daunorubicin; 1. und 3. Konsolidierung: HD-Ara C und Mitoxantron; 2. Konsolidierung: HD-Ara C und mAMSA; CR 03/2010; follow-up am 21.09.2010	692	1
17	niedrig	0,97	0,2	59	02.06.2008	2008/05	17%	47XX, +4[4];46XX[20]	NPM1	KM	12,4		AML 2003 Studie Arm D; 1. und 2. Induktion: Ara C und Daunorubicin; CR; 1. Konsolidierung: Ara C und Mitoxantron; 2. Konsolidierung: Ara C und mAMSA; verstorben	182	0

Pseudonym	Risiko	Gfi1 Expr	Ski Expr	Alter	Datum Probenentnahme	Erstdiagnose	Blastenzahl	Karyotyp	Mutation	Material	Leukozyten [G/l]	Thrombozyten [G/l]	Verlauf und Therapie	Überleben in Tagen	Lebend=1	
															tot=0	
19	mittleres	5,94	0,21	83	25.11.2005	2005/11	84%	46XY, normaler Karyotyp		KM	82,7		Ara-C; verstorben	20	0	
20	mittleres	2,43	0,37	61	28.12.2005	2005/12	82%	Trisomie 13		KM	21,2		1. und 2. Induktion: Ara C und Daunorubicin; 1.- 3. Konsolidierung: HD-Ara C; verstorben	248	0	
21	mittleres	0,84	0,06	72	17.01.2006	2006/01	70%	46XX		KM		20	AMLSG 06-04 Studie Arm A; 1. und 2. Induktion: Ara C und ATRA; 1. Konsolidierung: Ara C und Mitoxantron; 2. Konsolidierung: Etoposid, Idarubicin und ATRA; Rezidiv; IDA-FLAG; verstorben	568	0	
22	mittleres	1,31	0,22	63	07.02.2006	2004/07	10%	46XY, normaler Karyotyp		KM	54		AML 2003 Studie Arm A; 1. und 2. Induktion: Ara C und Daunorubicin; 1.- 3. Konsolidierung: Ara C; CR; Rezidiv; IDA-FLAG; Konditionierung; Allogene Stammzelltransplantation; follow-up 04.10.10	1605	1	
23*	mittleres	0,44	0,29	76	18.04.2006	2006/04	98%	46XY, normaler Karyotyp		pB	56,5	27	Lost to follow-up			
24	mittleres	4,14	0,52	24	15.05.2006	2006/05	50%	46XY, normaler Karyotyp		KM	1,54	74	AML 2003 Studie; 1. und 2. Induktion: Ara C und Daunorubicin; 1. Konsolidierung: Ara C und Mitoxantron; CR; 2. Konsolidierungen: Ara C und mAMSA; 3. Konsolidierung: HD-Ara C; Rezidiv; IDA-FLAG; Konditionierung; Allogene Stammzelltransplantation; Ara C und VPA ; 1. Zyklus: Ara C; follow-up 13.09.2010	1508	1	
25	mittleres	0,63	0,14	75	26.06.2006	2006/06	18-20%	CMML mit Übergang in sekundäre AML 46XY, normaler Karyotyp		KM	40	1	Hydroxycarbamidtherapie; verstorben	121	0	
26	mittleres	2,62	0,75	57	23.08.2006	2006/05	90%	46XX [25]		KM			1. und 2. Induktion: Ara C und Daunorubicin; 1. und 2. Zyklus: IDA-FLAG; Konditionierung; Allogene Stammzelltransplantation; verstorben	218	0	
27	mittleres	3,34	0,06	55	31.08.2006	2006/08	8%	46XX		KM	14,7	90,8	AML 2003 Studie Arm D; 1. und 2. Induktion: Ara C und Daunorubicin; follow-up Ende Juli	1400	1	
28	mittleres	1,37	0,14	66	26.10.2006	2006/10	4-6%	46XY, normaler Karyotyp		KM	3,39		MDS RAEBII; Konditionierung; Allogene Stammzelltransplantation; follow-up 20.07.2010	1344	1	
29	mittleres	1,16	0,1	63	21.12.2006	2006/12	30%	46, XX (26)		KM	52,2	156	AML 2003 Studie Arm A; 1. und 2. Induktion: Ara C und Daunorubicin; 1.- 3. Konsolidierung: Ara C; CR; follow-up 02.09.2010	1288	1	

Pseudonym	Risiko	Gf1 Expr	Ski Expr	Alter	Datum Probenentnahme	Erstdiagnose	Blastenzahl	Karyotyp	Mutation	Material	Leukozyten [G/l]	Thrombozyten [G/l]	Verlauf und Therapie	Überleben in Tagen	lebens=1	
															tot=0	
30*	mittleres	0,5	0,15	78	17.04.2007	2004/04	50-60%	46XY, normaler Karyotyp		KM	17,5	507	Palliativtherapie mit Hydroxyurea; Rezidiv; Lost to follow-up			
31	mittleres	1,62	0,65	77	02.06.2008	2008/05	65%	46XY, normaler Karyotyp		KM	262		Ara C und Daunorubicin; verstorben	8		0
32	mittleres	2,19	0,97	64	16.03.2007	2007/03		45XY	NPM1, FLT3-LM, LAIP	KM	>20		1. und 2. Induktion: Ara C und Idarubicin; 1. und 2. Konsolidierung: Ara C; Konditionierung; Allogene Stammzelltransplantation; Rezidiv; Ara C und Nexavar; verstorben	443		0
33*	mittleres	0,43	0,61	69	12.04.2007	2007/04	80-90%	46XY, del(7)(q21 q36) [20]		KM	593	105	SORAML Studie; 1. und 2. Induktion: Ara C und Daunorubicin; 1. und 2. Konsolidierung: HD-Ara C; CR; CMML; Rezidiv; Ara C und Idarubicin; Remission/MDS; 4. Zyklus mit Azacitidin, Lost to follow-up			
33a*		pB														
35*	mittleres	3,2	0,15	61	19.06.2007	2007/06	17%	Trisomie 8		KM			AML 2003 Studie Arm D; 1. und 2. Induktion: Ara C und Daunorubicin, Lost to follow-up			
36	mittleres	0,69	0,83	25	14.08.2009	2009/08	82%	46XY, del(6)(q13q23)[3]		KM	4,36	172	SORAML Studie; 1. und 2. Induktion: Ara C und Daunorubicin und Placebo/ Sorafenib; 1.- 4. Konsolidierung: Ara C und Placebo/ Sorafenib; CR; follow-up 07.10.10	321		1
37	mittleres	1,05	5,31	48	11.11.2009	2009/11	90%	46XY, normaler Karyotyp	NPM1	KM	4,02	6,19	SORAML Studie; 1. und 2. Induktion: Ara C und Daunorubicin und Placebo/Sorafenib; 1. und 2. Konsolidierung: Ara C und Placebo/ Sorafenib; follow-up 19.08.10	232		1
38	mittleres	3,29	0,55	67	07.01.2010	2010/01	65%	46XY, normaler Karyotyp		KM	39,5	40,4	1. und 2. Induktion: Ara C und Daunorubicin; 1. Konsolidierung: Ara C; CR; 2. Konsolidierung: HD-Ara C; follow-up 16.06.2010	175		1
39	mittleres	2,53	0,32	61	18.01.2010	2010/01	15%	47XY,+idic(15)(q11)[20]		pB	39,8	823	SORAML Studie; 1. und 2. Induktion: Ara C und Daunorubicin; Ausschluss aus Studie; 1.- 3. Konsolidierung: HD- Ara C; follow-up 19.08.10	164		1
40	mittleres	1,69	0,38	55	12.02.2010	2010/02	0%	47XX,+8[1]/nuc ish(ETOx3,47XX,+8[1])/nuc ish(ETOx3, AML1x2)[4/100]/46XX[29] Trisomie 8		KM	3,9	186	SORAML Studie; 1. und 2. Induktion: Ara C und Daunorubicin und Studienmedikation; CR; 1. und 2. Konsolidierung: Ara C ohne Studienmedikation; follow-up 02.08.2010	139		1
41*	mittleres	3,9	0,35	39	01.04.2010	2010/03	16-25%	46XX [20]	NPM1, FLT3-ITD	KM	18,6	112	Lost to follow-up			

Pseudonym	Risiko	Gfi1 Expr	Ski Expr	Alter	Datum Probenentnahme	Erstdiagnose	Blastenzahl	Karyotyp	Mutation	Material	Leukozyten [G/l]	Thrombozyten [G/l]	Verlauf und Therapie	Überleben in Tagen	lebend=1
															tot=0
42	hoch	7,14	0,4	36	19.02.2008	2008/02	90%	46XX, der(19)ins(19;11), (p13;q23q23)(MLL5+)[20]		pB	113	108	AML 2003 Studie Arm A; 1. und 2. Induktion: Ara C und Daunorubicin; CR; Konditionierung; Allogene Stammzelltransplantation; follow-up 30.08.10	863	1
43	hoch	2,69	0,21	72	15.01.2008	2008/01	50-60%	46-48XY, der(3)t(3;15)(q27;q24),10, der(11)t(11;20)(q22;?),-18,del(18)(q12), der(20)t(11;20),+22[cp19]		KM	0,28	6	1. Induktion: Ara C; verstorben	37	0
44	hoch	2,42	0,67	59	16.07.2008	2008/07	84%	46XY,t(10;11)(p12;q23),der(13)t(13;17)(q34;q12)[18] 52XY,+4,+6,(10;11)(p12;q23), der(13)t(13;17)(q34;q12),+21,+22[2]		KM	82,9	128	AML 2003 Studie Arm D; 1. und 2. Induktion (reduzierte Dosis): Ara C und Daunorubicin; 1. Zyklus: Fludarabin, Ara C und mAmsa; Konditionierung; Allogene Stammzelltransplantation; Rezidiv; MTX intrathekal; Ara C und Dexamethason; 4 Zyklen mit Vidaza; verstorben	370	0
45	hoch	0,42	0,72	46	23.02.2009	2009/02	62%	46XY,t(3;3)(q21;26)[20]		KM	13	131	AML 2003 Studie Arm B; 1. und 2. Induktion: Ara C und Daunorubicin; 1. Zyklus: Fludarabin, Ara C und mAmsa; Konditionierung; Allogene Stammzelltransplantation; Rezidiv; Vidazatherapie; Fludarabin und Ara C Therapie; Konditionierung; 2. Allogene Stammzelltransplantation; Rezidiv; Palliativtherapie mit Hydroxyurea; verstorben	343	0
46	hoch	1,55	0,39	56	30.05.2006	2006/05	20%	46XY, normaler Karyotyp	NPM1, FLT3	KM	48	40	AML 2003 Studie Arm B; 1. und 2. Induktion: Ara C und Daunorubicin; 1. Konsolidierung: HD-Ara C; Konditionierung; Allogene Stammzelltransplantation; follow-up 08/2010	1493	1
47	hoch	3,03	0,08	64	19.07.2006	2006/06	90%	46XX,-5,+mar[17]		KM	21,2		AMLSG 06-04 Studie; 1. Induktion: Ara C, Idarubicin und ATRA; 2. Induktion: Ara C und Idarubicin; 1. Konsolidierung: Ara C und Mitoxantron; Persistenz; 2. Konsolidierung: Etoposid und Idarubicin; Persistenz; 1. Zyklus: Fludarabin, Ara C und mAmsa; Konditionierung; Allogene Stammzelltransplantation, verstorben	409	0
47a		6,39	3,52							pB					

Pseudonym	Risiko	Gfi1 Expr	Ski Expr	Alter	Datum Probenentnahme	Erstdiagnose	Blastenzahl	Karyotyp	Mutation	Material	Leukozyten [G/l]	Thrombozyten [G/l]	Verlauf und Therapie	Überleben in Tagen	lebend=1 tot=0
49	hoch	0,7	0,4	77	29.11.2006	2006/11	80-90%	46XY, normaler Karyotyp	NPM1, FLT3-ITD NPM1	KM	26,9	80	SORAML Studie; 1. Induktion: Ara C und Daunorubicin und Placebo/Sorafenib; 1. und 2. Konsolidierung: Ara C und Placebo/Sorafenib; Rezidiv; 1. Zyklus PXD101; Persistenz, Hydroxyureatherapie verstorben	461	0
50	hoch	2,93	0,14	44	11.10.2007	2007/10	20%	45XY,-7+21[9],46XY[5]		KM	5,27	7,77	AML 2003 Studie Arm B: 1. und 2. Induktion: Ara C und Daunorubicin; Konditionierung; Allogene Stammzelltransplantation; letzte Vorstellung 27.05.10; follow-up 17.08.10	994	1
51	hoch	4,86	0,59	24	14.09.2004	2004/09	30-80%	t(8;21)(q22q22) mit del (7q) Aml1/ETO pos.		pB			AML 2003 Studie Arm A; 1. und 2. Induktion: Ara C und Daunorubicin; CR; 1.- 3. Konsolidierung: Ara C; verstorben	184	0
53 53a	hoch	2,05	0,07	49	20.05.2005	2005/05	90%	46XY, normaler Karyotyp	FLT3	KM pB			1. und 2. Induktion: Ara C und Daunorubicin; 1.- 3. Konsolidierung: Ara C; Rezidiv; IDA-FLAG und Ara C; Konditionierung; Allogene Stammzelltransplantation verstorben	1112	0
54	hoch	1,09	0,06	23	15.09.2005	2005/09	90%	komplexer Karyotyp mit u.a. 5q,7q-9p		KM			AML 2003 Studie; 1. Induktion: Ara C und Daunorubicin; 2. Induktion: HD-Ara C; Konditionierung; Allogene Stammzelltransplantation; Rezidiv; Palliativtherapie: VPA und ATRA; verstorben	108	0
55	hoch	0,78	0,13	41	10.04.2006	2005/06		46XX inv(3)[6],45XX,-5,add(12),frgl.T(5;12) 01/06: 46XX,inv(3)(q21q26)[1],/44, Idem,der(5)t(5;16)(q13,q21),der(12)t(12;15)(p12;q21),-15,-16[11]/46, Idem,t(12;22)(p12;q12)[8].Nuc ish 3q26(EVI prox 2,EVI 1 dist x3)(EVI1 prox sep EVI1 dist x 0)		pB			Ara C und Daunorubicin-refraktär; IDA-FLAG-refraktär; Tipifarnib und Anagrelide abgebrochen (Thrombozytopenie); IDA-FLAG (reduzierte Dosis) und Ara C; Etoposid und Mitoxantron; Konditionierung; Allogene Stammzelltransplantation; Rezidiv; verstorben	338	0
56 56a	hoch	1,01 1,11	0,24 0,19	75	17.07.2006 24.11.2006	2006/07	9%	komplexer Karyotyp,u.a. del.(3p), add(7), del(5q) Monosomie 17,+2-6 mar		KM pB	3,01	13	AMLSG 06-04 Studie; 1. und 2. Induktion: Ara C, Idarubicin und Vesanoid; 1. Konsolidierung: Ara C, Mitoxantron und ATRA; Persistenz; verstorben	168	0
57	hoch	0,69	0,16	60	12.12.2006	2006/12	3%	del 5q, Monosomie 7, add 12, del 17	CBFB	pB	4,51	175	AML 2003 Studie Arm A; 1. und 2. Induktion: Ara C und Daunorubicin; 1. Konsolidierung: HD-Ara C; Konditionierung; Allogene Stammzelltransplantation; verstorben	302	0
58	hoch	1,99	0,25	75	02.09.2004	2004/09	48%	46,XX [33]		pB			verstorben	888	0

Pseudonym	Risiko	Gfi1 Expr	Ski Expr	Alter	Datum Probenentnahme	Erstdiagnose	Blastenzahl	Karyotyp	Mutation	Material	Leukozyten [G/l]	Thrombozyten [G/l]	Verlauf und Therapie	Überleben in Tagen	lebend=1
															tot=0
59	hoch	0,58	0,06	72	14.07.2005	2004/11		46XY, normaler Karyotyp		pB			1. und 2. Induktion: Ara C und Daunorubicin; 1.-3. Konsolidierung: Ara C; Rezidiv; Palliativtherapie mit MTX; verstorben	49	0
61	hoch	0,21	0,25	73	23.06.2008	2008/05		45XY,-7[4]/ 46XY,-7,+mar [19]/47XY,-7,+8,+mar[2]		pB	41	56,4	Hydroxyureatherapie und VPA; verstorben	100	0
62	hoch	0,54	0,24	55	28.11.2008	2008/11	30%	komplexer Karyotyp: 47XY,del(3)(p14),der(4)t(4;5)(q26;?),der(5)t(5;12)(q14;?),der(6;21)(q10;q10),der(6)ins(21;18)[cp13]46XY[3]		KM	2,3	23	AML 2003 Studie Arm D; 1. und 2. Induktion: Ara C und Daunorubicin; Konditionierung; Allogene Stammzelltransplantation; verstorben	147	0
63	hoch	0,32	0,11	59	22.02.2007	2006/12	40%	komplexer Karyotyp		pB	7,79	38,8	AMLVG Studie; 1. Induktion: Thioguanin und Ara C; 2. Induktion: Ara C und Mitoxantron; IDA-FLAG; verstorben	73	0
64*	hoch	0,42	0,15	43	13.03.2007	2006/01	85%	Inv.(3), Monosomie 7		pB	212	364	Induktion: Ara C und Idarubicin; Endoxan; Refraktär; Salvagechemo mit Ara C und Mitoxantron; partielle Remission; Konditionierung; Allogene Stammzelltransplantation; Rezidiv 04/ 2007; Lost to follow-up		
65	hoch	1,27	0,43	60	12.12.2007	2007/08	25%	komplexer Karyotyp		pB	0,73	5	verstorben	5	0
66	hoch	6,19	0,92	46	21.09.2009	2009/09	20%	44XY,-3,dic(5;7)(q12;q11),+8,der(12)t(12;17)(p12;q21),-17(5),44XY,-3dic(5;7)(q12;q11),+8,der(12)t(12;17)(p12;q21),del(16)(q13)der(17)t(16;17)(?;q11)t(5;16)(?;?)t(5;17)(?;q21),-17(9),46XY(6)		KM	5,58	57,1	SORAML Studie; 1. Induktion: Ara C, Daunorubicin und Placebo/ Sorafenib; 2. Induktion: Ara C und Mitoxantron; Persistenz; Fludarabin, Ara C and mAmsa; Konditionierung; Allogene Stammzelltransplantation; follow-up 27.07.2010	283	1
67	hoch	0,9	0,58	75	08.10.2009	2009/07	24%	46XX I(17)(q10)[9]46XX I(17)(q10),del(17)(q11;q23)[11]		pB	26,6	79,1	1.Zyklus Ara C und Daunorubicin; Refraktär, Hydroxyureatherapie;	34	0
68	hoch	0,68	1,23	69	21.04.2010	2010/04	50-70%	45,XY,r(7)(p22q11),der(11)(q13q24),-16 [12]; 46,XY[1];MYH11- und CBFβ-Deletion; 7q31Deletion		KM	40,4	72,7	1. Induktion: Ara C und Daunorubicin; 2. Induktion: Ara C und Daunorubicin; Persistenz; Sorafenibtherapie; follow-up 02.08.2010	71	1
69	hoch	2,27	2,69	75	21.07.2009	2009/02	37%	45XY[20]	N-RAS	KM			Ara C und Idarubicin; Persistenz; Hydroxyureatherapie; verstorben	118	0
69a		0,58	1,37							pB					

Pseudonym	Risiko	Gfi1 Expr	Ski Expr	Alter	Datum Probenentnahme	Erstdiagnose	Blastenzahl	Karyotyp	Mutation	Material	Leukozyten [G/l]	Thrombozyten [G/l]	Verlauf und Therapie	Überleben in Tagen	lebend=1
															tot=0
70	hoch	3,33	1,29	38	24.08.2009	2009/08	45%	46XX[20]	FLT3	KM		83,6	CALGB 10603 (RATIFY) Studie; 1. Induktion: Ara C, Daunorubicin und Placebo; CR; 4 Zyklen mit Ara C und Studienmedikation; follow-up 07/2010	311	1
71	hoch	3,9	0,35	39	01.04.2010	2010/03	16-25%	46XX [20]	NPM1, Flt3-ITD	KM	18,6	112	PKC 412 Studie; 1. Induktion: Ara C und Daunorubicin und Studienmedikation, CR; 1. Konsolidierung mit Ara C und Studienmedikation; Abbruch wegen Nebenwirkungen; follow-up 07/2010	91	1

1-71 anonymisierte Patientendaten. Fehlende Zahlen entsprechen Patienten deren Ski oder Gfi-1 Expression nicht ermittelt werden konnte und daher aus der Tabelle entfernt wurden.

Doppelte Patientenproben (Knochenmark (KM) + peripheres Blut (pB)) sind grau hinterlegt und mit a gekennzeichnet. Die Expression der doppelten Probe wurde nur für die *GFI-1/SKI* Korrelation verwandt.

Mit * gekennzeichnete entsprechen Patientenproben deren Überleben nicht ermittelt werden konnte. Für diese Proben konnte keine Überlebenszeitanalyse durchgeführt werden.

3.2 Materialien

3.2.1 Zelllinien

Alle verwendeten Zelllinien sind nachfolgend aufgeführt. Sie stammen von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) in Braunschweig.

HL 60 humane Promyelozytenzelllinie, APL FAB M3

Kasumi -1 humane Leukämiezelllinie vom AML FAB Typ M2

U937 humane histiozytische Lymphomzelllinie

3.2.2 Lösungen und Puffer

In Tab. 2 wird die Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen beschrieben.

Tabelle 2: Zusammensetzung der verwendeten Lösungen und Puffer.

Lösungen und Puffer	Zusammensetzung
Tris HCL, 1M, pH 6,8	12,11g Tris Base; 50ml dd ₂ O; pH mit 37% HCl auf 6,8 einstellen, mit ddH ₂ O auf 100ml auffüllen.
Tris HCL, 1M, pH 8,8	12,11g Tris Base; 50ml ddH ₂ O; pH mit 37% HCl auf 8,8 einstellen, mit ddH ₂ O auf 100ml auffüllen.
SDS 20%	20g SDS; 90ml ddH ₂ O; Lösen und auf 100ml auffüllen.
APS, 12%	0,12g Ammoniumpersulfat; 1ml ddH ₂ O
Blotpuffer, 1x	6,04g Tris Base; 144g Glycin; 200ml Methanol; mit ddH ₂ O auf 2l auffüllen und lösen.
SDS Laufpuffer, 10x	30,3g Tris Base; 144g Glycin; 10g SDS; mit ddH ₂ O auf 1l aufzufüllen.
TBS Puffer, 10x	60,75g; 87,60g NaCl; 800ml ddH ₂ O; pH mit 37% HCl auf pH 7,5 einstellen, mit ddH ₂ O auf 1l auffüllen.
TBST, 1x, 0,1%	1l 10x TBS, mit H ₂ O auf 1x verdünnt; 1ml Tween-20
TBST, 1x, 0,05%	1l 10x TBS, mit H ₂ O auf 1x verdünnt, 500µl Tween-20
Ripa Puffer	50mM Tris HCl, pH 8; 150mM NaCl; 1% NP-40; 0,5% Sodium Deoxycholate; 0,1% SDS; Protease Inhibitor; Phosphatase Inhibitor

Stripping Puffer	1,25ml 1M Tris HCl, pH 6,8; 150µl 14M Mercaptoethanol; 2 ml 20% SDS; 16,6ml ddH ₂ O
Ponceau- Lösung	200ml ddH ₂ O; 0,25g Ponceau (rot); 12,5ml Essigsäure; mit ddH ₂ O auf 250ml auffüllen.
SDS, 5x, Probenpuffer	12 ml 1M Tris pH 6,8; 16ml Glycerol; 2g SDS; 10mg Bromphenolblau
10x TAE Puffer	0,4M Tris; 0,01M EDTA- Na- Salz; 0,02M Essigsäure; pH auf 8,5 einstellen.
SDS- Trenngel	2,13ml Tris HCl pH 8,8 1M; 1,87ml ddH ₂ O; 1,465ml Acrylamid; 28µl SDS 20%; bei Zugabe der folgenden Reagenzien erfolgt die Polymerisation: 55µl APS 10%; 6µl TEMED
SDS Laufgel	0,625ml Tris HCl pH 6,8 1M; 3,2 ml ddH ₂ O; 0,5ml Acrylamid; 25µl SDS 20%; bei Zugabe der folgenden Reagenzien erfolgt die Polymerisation: 50µl APS 10%; 3,75µl TEMED

3.2.3 Chemikalien und Reagenzien

In Tab. 3 werden die für die Doktorarbeit verwendeten Chemikalien und Reagenzien zusammengefasst.

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und Reagenzien.

Chemikalien und Reagenzien	Firma
6x DNA Loading Dye	Fermentas, St. Leon- Rot
10x Reactionbuffer Y	peqLAB, Erlangen
Acrylamid 40%	Roth, Karlsruhe
Agarose electrophoresis grade	Invitrogen, Karlsruhe
Ammoniumperoxysulfat	Sigma- Aldrich, Steinheim
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
dNTPs 10mM	Invitrogen, Karlsruhe
Ethanol absolut	Sigma- Aldrich, Steinheim
Ethidiumbromid	Promega, Medison, USA
FCS Standard Quality; Lot No: A10109-0977	PAA, Pasching, A
1x PBS	Invitrogen, Karlsruhe
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Thermo Scientific, Rockford, USA
Glycin	Roth, Karlsruhe

Glycerol	Merck, Darmstadt
H ₂ O (RNase frei)	Serumwerk, Bernburg
HCl, c(HCl) = 2 mol/l (2N)	Sigma- Aldrich, Steinheim
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Leupeptin	Sigma- Aldrich, Steinheim
Magermilchpulver	Sigma- Aldrich, Steinheim
2- Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Methanol	Sigma- Aldrich, Steinheim
Page Ruler Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon- Rot
Pepstatin	Sigma, St. Louis, MO, USA
PMSF	Sigma- Aldrich, Steinheim
RPMI 1640 Medium	GIBCO, Darmstadt
peqGold TriFast	peqLAB, Erlangen
SmartPool Genome siRNA	Thermo Scientific, Rockford, USA
SDS ultra pure	Roth, Karlsruhe
SYBR Green	Qiagen, Hilden
Taq DNA Polymerase	peqLAB, Erlangen
Trypanblau	Fluka, Buchs, CH
Tween-20	BIO-RAD, München
TEMED	Roth, Karlsruhe
Western Blocking Reagenz	Roche, Mannheim
Western Blotting detecting Reagenz	Healthcare, Buckinghamshire, UK
Valproinsäure	Sigma- Aldrich, Steinheim

3.2.4 Kits

In Tab. 4 werden die für die Doktorarbeit verwendeten Kits und deren Firmennamen aufgelistet.

Tabelle 4: Verwendete Kits.

Kits	Firma
Amaya Cell Line Nucleofector Kit V	Lonza, Basel, CH
BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Rockford, USA
Quantitect Reverse Transcription Kit	Qiagen, Karlsruhe
RNA Isolationskit, Nucleospin® RNA II	Macherey - Nagel, Düren

3.2.5 Primer

In Tab. 5 und 6 werden die für die Doktorarbeit verwendeten Primer aufgelistet. Alle Primer sind von der Firma Eurofines MWG / Operon, Ebersberg.

Tabelle 5: Verwendete Primer für die PCR und ihre Primersequenzen.

Primername	Primersequenz
β-Actin: act-1	5'- CCT TCC TGG GCA TGG AGT CCT -3'
β-Actin: act-3	5'- AAT CTC ATC TTG TTT TCT GCG -3'

Tabelle 6: Verwendete Primer für die Taqman-PCR und ihre Sequenzen.

Primername	Primersequenz
3-UTR Ski Taq	5'- ACG TTT GCC GAA CTG AAA AG -3'
5-UTR Ski Taq	5'- TCT GCA CCC CGT GAT TCT -3'
Actin Taq for	5'- CAT TGC CGA CAG GAT GCA G-3'
Actin Taq rev	5'- CCG ATC CAC ACG GAG TAC -3'
Gfi-1 Taq for	5'- CAG CAA GGT GTT CTC CAC GC -3'
Gfi-1 Taq rev	5'- CGA AGG TCT TGC CGC ACA TC -3'
Taq GAPDH 1	5'- CTC CTC CAC CTT TGA CGC TG -3'
Taq GAPDH 2	5'- ACC ACC CTG TTG CTG TAG CC -3'
gapdh_f	5'- GAA GGT GAA GGT CGG AGT CAA -3'
gapdh_r	5'- CAG AGT TAA AAG CAG CCC TGG T -3'
h-ICSBP-f-Taq	5'- GTC CCA ACT GGA CAT TTC CG -3'
h-ICSBP-r-Taq	5'- CAT TCA CGC AGC CAG CAG -3'
h-PU.1_f	5'-GAA GGA CAG CAT CTG GTG GGT-3
h-PU.1_r	5'-GCC GTC TTG CCG TAG TTG C-3'

3.2.6 Antikörper

In Tab. 7 und 8 werden die für die Doktorarbeit verwendeten Antikörper und deren Firma aufgelistet.

Tabelle 7: Verwendete primäre Antikörper.

Antikörper	Firma
β-Actin, monoklonaler Antikörper	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ski (H-329) polyklonaler Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Gfi-1 (N-20) polyklonaler Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

Tabelle 8: Verwendete sekundäre Antikörper.

Antikörper	Firma
β-Actin: Goat Anti- Mouse	Dako AIS, DM
Ski: Goat Anti- Rabbit	Dako AIS, DM
Gfi-1: Goat Anti- donkey	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

3.2.7 siRNA

In Tab. 9 werden die für die Doktorarbeit verwendeten siRNA und deren Firma aufgelistet.

Tabelle 9: Verwendete siRNA.

siRNA	Firma
Nonsense siRNA	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
siRNA SKI Pool	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold

3.2.8 Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien

In Tab. 10 werden die für die Doktorarbeit verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien und deren Firma aufgelistet.

Tabelle 10: Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien.

Geräte und Verbrauchsmaterialien	Firma
Amasa Scientific Systems Nucleofector II	Lonza, Basel, CH
Autoklav 5057 EVL	Tuttnauer, Breda, NL
Blottingkammer Transf- Blot SD, semi- dry	BIO RAD, München
Cycler GeneAmp PCR System 9600	Applied Biosystems, Foster City, USA
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen
Entwicklermaschine, Optimax	Protec, Oberstenfeld
Gelkammer Mini PROTEAN Tetra Cell	BIO- RAD, München
PCR- Gradientencycler	Eppendorf, Wesseling- Berzdorf
Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Kühlschrank (4°C)	Liebherr Chiron Behring,
Kühlschrank (-20°C)	Liebherr Chiron Behring
Kühlschrank (-80°C)	Thermo Scientific, Rockford, USA
Mastercycler egradient S realplex	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop Fluovort	Leitz, Wetzlar
Nanodrop 1000 Spectrometer	peqLab, Erlangen
Neubauer- Zählkammer	Plan- Optik, Elsoff
Transilluminator	peqLab, Erlangen
Photometer Multiskan RC	Labsystems, Vienna, USA
Pipetboy accu-jet pro	Brand, Neuhof

Pipetten	Gilson, Middleton, USA
Sterilbank Heraeus HERAsafe	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Sterilbank VFB 1806	clanLAF, Humlebaek, DK
Electrophoresis Power Supply EPS 500/400	Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, S
Electrophoresis Power Supply PP2 79	V.H N Elektrophorese
Vortexer REAX Top	Heidolph, Schwalbach
Wasseraufbereitung arium 611 VF/ UF	Satorius, Göttingen
Wasserbad	Unitherm, Würzburg
Zentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5804	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge SEPATECH Biofuge 15R	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Amersham Hyperfilm™ ECL	Healthcare Buckinghamshire, UK
Extra Thick Blot Paper	BIO- RAD, München
Immun- Blot™ PVDF Membran	BIO- RAD, München
Nitrocellulose Transfer Membran Protean	Whatman, Dassel
Taqman-Platten 96 Well/ Strips	Qiagen, Hilden
Zellkulturflaschen	Greiner bio-one, Frickenhausen

3.3 Methoden

3.3.1 Ficollgradient-Lymphozytenseparation

Die Ficollgradienten-Zellseparation dient der Abtrennung der mononukleären Zellen von den restlichen zellulären und nicht-zellulären Blutbestandteilen. Mit dieser Methode können Lymphozyten, Monozyten und Blasten aus Vollblut oder Knochenmarkaspirat gewonnen werden. Für jede Probe wurden 15ml Ficoll in ein 50ml Plastikröhrchen gegeben. Dann wurde das Vollblut bzw. Knochenmarkaspirat mit der gleichen Menge PBS versetzt. Diese Mischung wurde vorsichtig über das Ficoll geschichtet. Dazu sollte das Röhrchen so schräg wie möglich gehalten werden, sodass es zu keiner Vermischung der Probe mit dem Ficoll kam. Das Plastikröhrchen wurde erschütterungsfrei in die Zentrifuge gestellt. Anschließend wurde das Röhrchen für 20min bei 400G und Raumtemperatur zentrifugiert. Die Zentrifuge wird ungebremst angehalten. Durch die Zentrifugation hatten sich in dem Röhrchen Schichten gebildet. Die unterste Schicht wurde durch Erythrozyten und größere Zellbestandteile gebildet. Die klare Schicht darüber war die Ficoll-Lösung. Darüber lag die Plasmaschicht. Zwischen Plasmaschicht und Ficoll-Lösung befand sich ein weißer Ring aus mononukleären Zellen. Dieser wurde vorsichtig abpipettiert und in ein frisches 50ml Plastikröhrchen gegeben. Das Plastikröhrchen wurde mit 1 x PBS Puffer aufgefüllt. Dann wurde das Röhrchen für 5min bei 300G und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet aufgeschüttelt, erneut mit 1

x PBS Puffer aufgefüllt und 5min bei 300G zentrifugiert. Die Zellen wurden bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert. Für eine längere Aufbewahrung wurden 1×10^7 Zellen in 1ml FCS mit 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und bei -80°C gelagert.

3.3.2 RNA Isolation

RNA Isolation mittels NucleoSpin® RNAII

Zunächst wurden etwa 5×10^6 Zellen für 5min bei 300G und 22°C pelletiert, mit PBS gewaschen und abermals pelletiert. Die RNA-Isolierung erfolgte unter dem Abzug, bei Raumtemperatur und mit Filter-Tip-Pipettenspitzen nach dem Protokoll des Nucleospin RNA-II Kits. Dazu wurde das Zellmaterial in einer Lösung lysiert, die eine hohe Konzentration an chaotropen Salzen beinhaltet. Diese Lösung denaturiert Proteine und inaktiviert damit RNasen. Um eine Kontamination mit DNA zu verhindern, wurde rekombinante-(r)-DNase hinzugegeben. Darauf folgten drei Waschschrte, welche dazu dienten, die Salze und Metabolite von der Membran zu lösen. Am Ende wurde die RNA durch RNase freies Wasser eluiert. Durch die niedrige Ionenkonzentration konnte sich dann die RNA vom Filter lösen. Die RNA wird bei -80°C gelagert.

RNA Isolation mittels peqGOLD TriFast

5×10^6 pelletierte Zellen wurden mit 1ml der peqGOLD TriFast-Lösung versetzt. Dabei handelt es sich um ein chaotropes Salz, welches die Zellen lysiert und die RNasen inaktiviert. Die Proben werden dann 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden je Milliliter peqGOLD TriFast 0,2ml Chloroform hinzugefügt. Die Ansätze wurden kräftig geschüttelt und 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden durch die Zentrifugation, 5min bei 12000G, die Proteine entfernt. Durch den sinkenden pH-Wert konnten sich auch DNA-Bestandteile lösen, welche sich nach der Zentrifugation in der Interphase sammelten. Die oberste wässrige Phase beinhaltet die RNA und wurde in ein frisches 1,5ml Eppendorf Gefäß überführt. Je Milliliter peqGOLD TriFast-Lösung wurden 0,5ml Isopropanol zugegeben und vermischt. Nach einer Inkubation von 10min bei Raumtemperatur wurden die Proben bei 4°C und 12 000G für 10min zentrifugiert. Der Isopropanolüberstand wurde vorsichtig abgenommen und durch 1ml 75%iges Ethanol ersetzt. Die Ansätze wurden erneut gemischt und zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt, dann wurde das Ethanol vorsichtig abpipettiert und das Pellet kurz an der Luft angetrocknet. Zum Abschluss wurde die RNA in 20-30 μl RNase freiem Wasser gelöst. Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

3.3.3 Quantifizierung von RNA

Zur Weiterverarbeitung der RNA (z.B. Reverse Transkription) erfolgte die Bestimmung der RNA- Konzentration. Um die optische Dichte (OD_{260nm}) mit dem Photometer (Nanodrop 1000 Spectrometer) zu messen, wurden 1,5µl der RNA-Lösung auf den Messpunkt pipettiert. Das Gerät errechnet die Konzentration in ng/µl mit der Formel: OD_{280nm} x 40RNA. Der Quotient OD_{260nm}/OD_{280nm} gibt die Reinheit der RNA-Lösung wieder und muss größer als 1,4 sein.

3.3.4 Reverse Transkription (cDNA Synthese)

Die Durchführung dieser Methode erfolgte nach dem Protokoll des Quantitect Reverse Transkription Kits von Qiagen (QuantiTect Reverse Transcription Handbook 2009). Zunächst wurde die genomische-(g)-DNA durch eine Inkubation mit dem 7 x gDNA Wipeout Buffer für 2min bei 42°C eliminiert. Dann wurde ein Master Mix des Quantitect Reverse Transkription Kits angefertigt, welches die Quantiscript Reverse Transkriptase, den RT Buffer 5x und den RT Primer-Mix beinhaltet. Die reverse Transkription erfolgte durch 15min Inkubation bei 42°C und wurde bei 95°C gestoppt. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

3.3.5 Polymerase-Chain-Reaction

Die Polymerase-Chain-Reaction (PCR) dient der Vervielfachung von spezifischen DNA Fragmenten. Die PCR beinhaltet die drei Schritte Denaturierung, Annealing und Elongation. Während der Denaturierung wird die DNA in ihre Einzelstränge aufgespalten. Beim Annealing hybridisieren die Oligonucleotid-Primer an die Stränge. In der Elongation werden die Primer durch Anlagerung von Desoxynukleotiden von der DNA-Polymerase verlängert, wonach wieder eine doppelsträngige DNA vorliegt, die identisch mit der Ausgangs-DNA ist. Aufgrund der spezifischen Primersequenzen amplifiziert die PCR nur den gewünschten Teil der DNA. Zur Kontrolle der Amplifikation diente das Haushaltsgen β-ACTIN. Alle Pipettierschritte wurden auf Eis durchgeführt.

PCR-Ansatz:

- 16,875 μ l ddH₂O
- 1,25 μ l Primer 1
- 1,25 μ l Primer 2
- 2,0 μ l dNTPs (10 mM)
- 2,5 μ l 10 x PCR- Puffer
- 0,125 μ l AmpliTaq Polymerase (5u/ μ l)
- 1 μ l cDNA

Verwendetes Programm für die β - Actin PCR:

<u>Erste Denaturierung:</u>	<u>94°C 3min</u>
22 Zyklen aus:	Denaturierung: 94°C 30sec
	Annealing: 55°C 30sec
	<u>Elongation: 72°C 30sec</u>
Finale Elongation:	72°C 10min
Aufbewahrung:	4°C ∞

3.3.6 Agarosegel-Elektrophorese

Die spezifischen, über die PCR vervielfachten DNA Fragmente können mittels der Agarosegel-Elektrophorese detektiert werden. Dafür wurde 1g Agarose in 100ml Elektrophorese-Puffer (1% Agarosegel) gekocht und 7,5 μ l Ethidiumbromid dazugegeben. Die Lösung wurde in einen Gelschlitten gegeben. Die Taschen für die Proben wurden mit einem Gelkamm geformt. Nach dem Aushärten des Gels wurden 10 μ l des PCR-Produkts mit 2 μ l 6 x DNA-Loading-Dye (zur Bestimmung der Elektrophorese-Lauffront) in die Taschen pipettiert. In die erste Tasche wurden 7,5 μ l des Markers (1kb Gene Ruler) gegeben. Dann wurde eine Spannung von 100V angelegt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel unter UV-Licht analysiert. Die DNA-Fragmente hatten sich nach ihrer Größe aufgetrennt und wurden durch das interkalierte Ethidiumbromid sichtbar. Durch diesen Vergleich mit dem Größenmarker konnte die Größe der DNA-Fragmente bestimmt werden.

3.3.7 Quantitative Real-Time Polymerase-Chain-Reaction (RT-PCR)

Bei einer PCR findet zunächst eine exponentielle Vermehrung der spezifischen DNA statt. Später akkumulieren die Produkte, die Substrate werden verbraucht, PCR-Produkte hybridisieren beim Annealing und die Qualität der Polymerase wird schlechter, wodurch es zu einer suboptimalen Vermehrungsrate kommt. Eine Quantifizierung ist nur während der exponentiellen Phase möglich. Die quantitative RT-PCR misst nicht die Menge der amplifizierten DNA, sondern bestimmt die Zykluszahl, bei der sich das Fluoreszenzsignal erstmals deutlich vom Hintergrund abhebt und errechnet daraus den Ct-Wert (engl. für cycle threshold). Die Messung des Fluoreszenzsignals basiert dabei auf dem Fluorescence resonance energy transfer FRET. Bei den Taqman-Sonden liegen Reporter und Quencher auf demselben Oligonukleotid. Der Reporter wird durch die Polymerase freigesetzt, wobei das Fluoreszenzsignal verstärkt wird, je mehr DNA synthetisiert wird. Die Menge des gebildeten Fragments kann anhand der Höhe des Peaks abgeschätzt werden. Die Fragmente werden bei hohen Temperaturen in zwei Einzelstränge gespalten, wobei der Fluoreszenzstoff SYBR-Green freigesetzt wird. Während dieses Vorgangs kann zudem die Schmelzkurve ermittelt werden. Der Schmelzpunkt ist abhängig von Länge und Basenzusammensetzung der DNA-Fragmente und dient der Beurteilung der Spezifität des PCR-Produkts. Der Schmelzpunkt spezifischer PCR Produkte liegt höher als bei unspezifischen, deswegen ist eine Unterscheidung zum Beispiel bei Kontamination möglich. Die Ergebnisse der PCR werden alle als relative Werte dargestellt. Die relative Quantifizierung der Rohdaten erfolgt mittels der $\Delta\Delta\text{Ct}$ Methode ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$). Dafür werden die ΔCt -Werte eines Referenzgens ermittelt (Kalibrator) und im Verhältnis zum Zielgen dargestellt. Bei der $\Delta\Delta\text{Ct}$ Methode wird dafür der Ct-Wert des Kalibrators vom Ct-Wert des Zielgens abgezogen. Aufgrund dieser vergleichenden Methode handelt sich bei den angegebenen Expressions-Level immer um eine relative Expression.

PCR- Ansatz:

für *SKI*, *GFI-1*, *PU.1*, *ACTIN*, *GAPDH*:

- 12 μl SYBR GREEN
- 0,75 μl Primer 1
- 0,75 μl Primer 2
- 10 μl H₂O
- 1 μl cDNA

für *ICSBP*, *GAPDH*:

- 12 μl SYBR GREEN
- 1,25 μl Primer 1
- 1,25 μl Primer 2
- 9 μl H₂O
- 1 μl cDNA

- PCR Bedingungen:

<u>Erste Denaturierung:</u>	<u>95°C</u>	<u>4min</u>
45 Zyklen:	Denaturierung: 95°C	30 Sek
	Annealing: A	30 Sek
	<u>Elongation: 72°C</u>	<u>30 Sek</u>
Finale Elongation:	72°C	7min
Aufbewahrung:	4°C	∞

Die Annealingtemperatur (A) für *GFI-1* und *GAPDH* liegt bei 61°C, für *ICSBP* bei 60°C für *β-ACTIN*, *PU.1* und *SKI* bei 58°C.

3.3.8 Zellkultur

Die verwendeten Zelllinien wurden in 90% RPMI 1640, 10% FCS, 1% Penicillin/ Streptomycin bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Bei einer maximalen Zellzahl von 1,5- 2,0 x 10⁶ Zellen/ml wurden die Zellen unter sterilen Bedingungen gesplittet.

3.3.9 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10µl der Zellsuspension mit 10µl Trypanblau vermischt und zwischen Deckglas und Neubauer-Zählkammer pipettiert. Das Trypanblau färbt abgestorbene Zellen an. Unter dem Mikroskop wurden die ungefärbten Zellen in allen 16 Quadranten zweier diagonalen Felder gezählt. Die Zahlen wurden addiert und die Summe mit 10000 multipliziert, um die Zellzahl pro Milliliter zu bestimmen.

3.3.10 Proteinextraktion

Zunächst wurden die Zellen mit 1 x PBS Puffer gewaschen und pelletiert. Das Pellet wurde in Ripa-Puffer mit Protease- und Phosphat-Inhibitoren resuspendiert. Der Ripa- Puffer diente der Lyse der Zellen, ohne die Proteine zu zerstören. Danach wurden die Proben 15min auf Eis auf dem Rüttler inkubiert und anschließend 15min bei 4°C und 14 000G zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches 1,5ml Eppendorfgefäß pipettiert und bei -80°C gelagert.

3.3.11 Proteinquantifizierung mittels BCA-Assay

Die Durchführung des Bicinchoninsäure-(BCA)-Assay erfolgte nach dem Protokoll des Thermo Scientific Kits. Es beruht auf dem Prinzip der Biuret-Reaktion. Cu^{2+} Ionen bilden mit Proteinen in alkalischer Lösung einen Komplex in dem die Cu^{2+} Ionen zu Cu^+ Ionen reduziert werden. Diese bilden mit BCA einen violetten Farbkomplex. Dem Protokoll folgend wurde zunächst die Arbeitslösung vorbereitet: Lösungen A und B werden 50:1 gemischt. Danach werden 200 μl der Arbeitslösung in jedes Well der 96-Well-Platte vorgelegt. Anschließend werden je 25 μl pro Standard (neun verdünnte Albumin-Standards) und Probe (in Doppelbestimmungen) in ein Well pipettiert. Die verdünnten Albumin-Standards wurden nach Protokoll vorbereitet und bei -20°C im Kühlschrank gelagert. Nach dem Pipettieren wurde der BCA-Assay für 30min bei 37°C inkubiert. Nach dem Abkühlen der Platte auf Raumtemperatur, wurde die Absorption bei 540nm gemessen.

3.3.12 Transfektion mit siRNA

Die Transfektion mit siRNA erfolgte transient mittels Elektroporation nach dem Amaxa-Protokoll. Bei der Elektroporation wird die Zellmembran durch einen kurzen elektrischen Schock kurz permeabilisiert und die siRNA kann in die Zelle gelangen. Der genaue Mechanismus ist nicht bekannt. Am wahrscheinlichsten erfolgt die Passage mittels Diffusion. Transfiziert wurden siRNA-Oligonukleotide gegen *SKI* in den Konzentrationen 0,25 μg , 1 μg und 3 μg , sowie 3 μg Nonsense-siRNA als Kontrolle. Dem Protokoll folgend wurden 2×10^6 Zellen pelletiert und in 1 x PBS gewaschen. Anschließend wurden pro Ansatz 100 μl Nucleofector-V-Lösung und die siRNA hinzugegeben und in eine Lonza Küvette pipettiert. Die Küvette wurde im Elektroporationsgerät in Position gebracht. Die Zellen wurden mit dem Programm T-009 für HL60 Zellen und V-001 für U937 Zellen elektroporiert. Im Anschluss erhielten die Zellen sofort 500 μl Nährmedium und wurden in das mit 3ml Nährmedium vorbereitete Well gegeben, wo die Zellen für 24h unter oben angegebenen Bedingungen im Inkubator kultiviert werden.

3.3.13 Behandlung der HL60 Zellen mit Valproinsäure

Es wurden 2×10^6 Zellen in 6-Well-Platte pipettiert (Gesamtvolumen 5ml/ Well). Auf jeweils zwei Wells wurden zusätzlich jeweils 1,5mM VPA und 5mM VPA gegeben (s. Abb 5). Diese Zellen wurden dann 48h und 72h inkubiert.

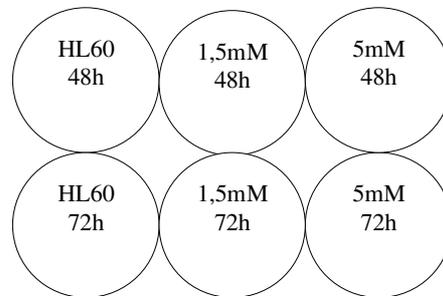


Abbildung 5: VPA Versuch.

Dargestellt sind sechs Wells. In jedes Well wurden 2×10^6 HL60 Zellen pipettiert. Zu jeweils zwei Wells wurden zusätzlich 1,5mM VPA und 5mM VPA hinzugegeben. Die obere Reihe wurde 48h, die untere Reihe 72h inkubiert.

3.3.14 Western Blot

Zunächst wurden das SDS-Trenngel (10%) und das SDS-Sammelgel (4%) gegossen. Dafür wurden die dafür vorgesehenen Glasplatten mit Isopropanol gereinigt und in die entsprechende Halterung eingespannt. Zuerst wurde das Trenngel vorbereitet und zwischen die Glasplatten pipettiert, danach das Sammelgel. In das Sammelgel wurde der Kamm gelegt, sodass Taschen für die Proben entstehen. Für die Proben wurden 50µg des Proteins mit Ripa-Puffer auf eine Gesamtmenge von 12µl verdünnt. Dann wurden 3µl 5 x SDS Probenpuffer auf die Proben gegeben. Die Ansätze wurden 2,5min bei 7.400 G zentrifugiert, 5min bei 95°C inkubiert und dann auf das Gel aufgetragen. Die Proben sollten zunächst bei 50mV bis in das Trenngel einlaufen, dann konnte die Spannung auf 150mV erhöht werden. Die Proteine wurden im elektrischen Feld ihrer Größe nach aufgetrennt. Beim anschließenden Blotten wurden die Proteine elektrophoretisch aus dem Gel auf eine Membran transferiert, wo sie durch hydrophobe und ionische Wechselwirkungen binden. Für SKI wurde eine Nitrocellulose-, für GFI-1 eine Polyvinylidenfluorid-(PVDF)-Membran verwandt. Die Nitrocellulose-Membran wurde erst in destilliertem Wasser und dann im Blot-Puffer getränkt, die PVDF- Membran wurde für 1-2sec mit Methanol befeuchtet, bevor sie im Blot-Puffer getränkt wurde. Das Gel mit den aufgetrennten Proteinen wurde auf diese Membranen gelegt. Beide wurden zwischen zwei Lagen

Filterpapier, die ebenfalls in Blot-Puffer getränkt wurden positioniert. Anschließend wurden die Proteine bei 73mA 1h auf die Membran „geblottet“. Danach wurde die Membran kurz mit Ponceau Rot angefärbt, um einen flächendeckenden Transfer der Proteine auf die Membran zu überprüfen und dann mit Wasser wieder entfärbt. Dann wurden die Membranen geblockt, das heißt die restlichen Proteinbindungsstellen der Membran werden mit einer Blocklösung abgesättigt. Der Blockpuffer für SKI setzte sich aus 10% Roche Blocking Reagenz verdünnt in 0,1% TBST-Puffer zusammen. Der Block-Puffer für GFI-1, sowie für β -ACTIN bestand aus 5% Milchpulver verdünnt in 0,1% TBST-Puffer zusammen. Die Membranen wurden mindestens 3-4h bei Raumtemperatur und maximal über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurden sie kurz in 0,1% TBST-Puffer gewaschen. Dann wurde die Membran mit dem ersten Antikörper (primärer Antikörper) behandelt. Der erste Antikörper für SKI und β -ACTIN wurde in 5% Roche Blockingreagenz mit einer Konzentration von 1:1000 für SKI und 1:5000 für β -ACTIN gelöst. Die Membranen wurden 1½h bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht inkubiert. Der erste Antikörper für GFI-1 wurde in 5% Milchpulver in 0,5% TBST-Puffer gelöst, in einer Konzentration von 1:500. Die Membran wurde 2h bei Raumtemperatur oder ebenfalls bei 4°C über Nacht inkubiert. Danach wurden die Membranen dreimal für 10min in 0,1% TBST-Puffer gewaschen. Dann wurde der zweite Antikörper (sekundärer Antikörper) in den entsprechenden Lösungen wie der erste Antikörper angesetzt. Die Konzentrationen für den zweiten Antikörper waren 1:3000 für SKI, 1:15000 für ACTIN und 1:10000 für GFI-1. Auch danach erfolgte wieder ein Waschschritt von 3 x 10min in 0,1% TBST-Puffer. Die Membranen wurden dann 1min mit der frisch angesetzten (A:B; 1:1) ECL-Lösung inkubiert. Danach wurde ein Film auf die Membran gelegt und in eine lichtundurchlässige Kassette transferiert. Der Film wurde 30-60sec für β -ACTIN, 5-10min für SKI und 15-20min für GFI-1 lichtgeschützt aufgelegt und anschließend entwickelt.

3.4 Statistische Methoden

Zur statistischen Berechnung der relativen Genexpressionen wurden die gewonnenen Ergebnisse in logarithmische Werte transformiert, mit dem Ziel eine symmetrische Verteilung der Werte zu erzeugen, um nicht-parametrisch zu testen. Der allgemeinen Konvention folgend, wurde ein Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ festgelegt. Dieser Wert entspricht der maximalen Irrtumswahrscheinlichkeit die Alternativhypothese zu bestätigen, obwohl in Wahrheit die Nullhypothese gilt. Dieser α -Fehler wird auch als Fehler erster Art bezeichnet (Bortz und Liebert 1998). Die Signifikanzgrenze galt für alle eingesetzten Tests. Die Signifikanz wurde bei allen Tests mittels p-Wert angegeben.

3.4.1 Boxplot

Der Boxplot stellt Lage und Streuung von Werten dar. Im Zentrum des Boxplot liegt ein Rechteck. Das obere Ende des Rechtecks entspricht dem 3. Quartil (75%), das untere Ende dem 1. Quartil (25%). In der Mitte, deutlich durch einen Balken dargestellt, liegt das 50% Quartil oder auch Median genannt. Der Abstand zwischen dem 75% und dem 25% Quartil, also die Höhe des Rechtecks, entspricht dem Interquartilabstand (IQR). Der Median muss nicht in der Mitte des Rechtecks liegen, seine Lage ist abhängig von der Schiefe (engl. skewness) der Verteilung der Werte. Die oberste Markierung (engl. whisker), die mit dem Rechteck durch einen Strich verbunden ist, entspricht dem maximalen Wert, der untere whisker dem minimalen Wert. Mit Hilfe der whisker werden nur Werte dargestellt die sich maximal in einem 1,5-fachen IQR-Abstand von der oberen bzw. der unteren Grenze des Rechtecks befinden. Werte, die außerhalb dieses Bereichs liegen werden als Ausreißer klassifiziert und als Punkte dargestellt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Verteilung der *SKI/GFI-1* Expression in den Gruppen Niedrig-, Intermediär- und Hochrisiko graphisch dargestellt.

3.4.2 Kruskal-Wallis Test (H-Test)

Der Test nach Kruskal und Wallis ist ein nicht-parametrisches Verfahren zum Vergleich der Mittelwerte mehrerer unabhängiger Stichproben und basiert auf Rangplatzsummen. Als Prüfgröße wird der H-wert (daher auch H-Test) berechnet. Dazu wird der Rang für jeden Wert der Stichproben bestimmt und die Rangsummen für die einzelnen Gruppen berechnet. Die Prüfgröße H wird mit der theoretischen Größe aus der χ^2 -Verteilung für einen gewählten Fehler 1.

Art verglichen. Ist die Prüfgröße H größer als der H -Wert aus der χ^2 -Tabelle, wird die Nullhypothese (H_0) verworfen und es besteht ein signifikanter Unterschied (zur χ^2 -Verteilung siehe Kap. 3.4.3.) In der vorliegenden Arbeit wurde der H -Test verwendet, um einen möglichen Unterschied im Ausmaß der *SKI/GFI-1* Expression zwischen den Risikogruppen zu berechnen. Die Nullhypothese besagt, dass es keinen Unterschied zwischen den Gruppen gibt.

3.4.3 Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse

Die Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse dient der Darstellung von Ereignissen in einem bestimmten Zeitraum. Dabei kann es sich beispielsweise um den Eintritt eines Heilungserfolgs nach Therapie, um den Krankheitsbeginn nach Risikoexposition oder um die Zeit bis zum Tod nach Krankheitsbeginn handeln. Patienten, bei denen das Ereignis bis zum ermittelten Zeitpunkt nicht eingetreten ist oder Patienten, welche nicht weiter beobachtet werden konnten oder solche, die aus der Studie ausgetreten sind, können zensiert werden. Diese werden durch einen vertikalen Strich dargestellt. So kann nachvollzogen werden, ab wann ein bestimmter Patient nicht mehr beobachtet werden kann. Für jeden Zeitpunkt an dem ein Ereignis (z.B. der Tod) eintritt, kann für die noch unter Beobachtung stehenden Patienten die Überlebenswahrscheinlichkeit ermittelt werden. Zensierte Patienten haben auf die nachfolgende Überlebenswahrscheinlichkeit keinen Einfluss. Mittels der Kaplan-Meier-Schätzung wird die Wahrscheinlichkeit $P(Y)$ berechnet einen bestimmten Zeitpunkt (k) zu überleben. Für den Vergleich zweier Gruppen werden zunächst die Nullhypothese (kein Unterschied zwischen beiden Gruppen) und die Alternativhypothese (Unterschied zwischen den Gruppen) festgelegt. Die Hypothesen können mittels Log-Rank Test überprüft werden. Der p -Wert stellt dar mit welcher Wahrscheinlichkeit die Werte von der Nullhypothese abweichen. Befindet sich dieser unter dem Signifikanzwert $\alpha = 0,05$, gilt das Testergebnis als statistisch signifikant verschieden und die Nullhypothese muss verworfen werden. Der Test sollte immer zweiseitig durchgeführt werden, da so die Abweichungen in beide Richtungen analysiert werden. Zur weiteren Analyse wird der Log-Rank Test verwendet. Dieser vergleicht die beobachteten und die unter der Nullhypothese erwarteten Sterbehäufigkeiten zu jedem Zeitpunkt. Für den Log-Rank Test wird die Formel $e_j = n_{x_j} * d_j / n_j$ verwendet, wobei d_j / n_j die Wahrscheinlichkeit eines Todesfalls zum Zeitpunkt t_j in einer der beiden Gruppen ist, diese wird mit der Gruppengröße zum entsprechenden Zeitpunkt n_{x_j} multipliziert. Der Wert e_j ergibt die erwartete Anzahl von Todesfällen in einer Gruppe. Der p -Wert errechnet sich dann aus der Teststatistik (dem Log-Rank Test) und der χ^2 -Verteilung (auch Chi^2). Die χ^2 -Verteilung χ^2 ist eine theoretische

sche Verteilung mit bekannten Eigenschaften. Ihre Referenzwerte lassen sich in angefertigten Tabellen finden bzw. werden im Statistikprogramm (z.B. SPSS) verrechnet. Die Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet, um einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der *SKI/GFI-1* Expression und dem Überleben der Patienten zu überprüfen (Arbeitshypothese).

3.4.4 Rangkorrelation nach Spearman

Der Zusammenhang zwischen zwei ordinal skalierten Merkmalen kann mit dem Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman gemessen werden. Er ist ein Maß für die Stärke eines monotonen Zusammenhangs. Bei der Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Spearman wird kein linearer Zusammenhang vorausgesetzt. Zur Berechnung werden die Werte der Merkmale aufsteigend der Größe nach sortiert und mit Rangzahlen versehen. Für jedes Wertepaar wird die Differenz berechnet. Liegt der Korrelationskoeffizient $r_s > 0$, dann liegt ein positiver Zusammenhang vor, bei $r_s < 0$ liegt ein negativer Zusammenhang vor und bei $r_s = 0$ liegt kein Zusammenhang vor. Je dichter r_s an 0 liegt, desto schwächer ist der Zusammenhang. Für die Korrelation gelten das Unabhängigkeitsgesetz und das Unkorreliertheitsgesetz. Das Unabhängigkeitsgesetz besagt, dass wenn zwei Variablen voneinander statistisch unabhängig sind, sie unkorreliert sind. Das Unkorreliertheitsgesetz besagt, dass wenn zwei Variablen unkorreliert sind, sie nicht zwangsläufig unabhängig sind. In der vorliegenden Dissertation sollte mit der Spearman Korrelation ermittelt werden, ob ein Zusammenhang zwischen der *SKI/GFI-1* Expression in den untersuchten Patientenproben besteht. Die Spearman Korrelation wurde gewählt, da es sich um nicht-parametrische Werte handelt. Die Nullhypothese besagt, dass kein Zusammenhang zwischen der *SKI/GFI-1* Expression besteht.

4 Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Expression von *SKI* und *GFI-1* in AML-Patienten mit Hilfe der RT-PCR (s. Kap. 3.3.7) untersucht. Die ermittelten *SKI* und *GFI-1* Expressionswerte der 71 Patientenproben sind in Tabelle 1 (s. Materialien und Methoden) gelistet.

Im Mittel lag die relative *GFI-1* Expression bei 0,3411, mit einem Minimum von -1,66 und einem Maximum von 1,67. Die Streuung der Expressionswerte war mit einer Standardabweichung von 0,88861 für *GFI-1* hoch. Der Mittelwert der *SKI* Expression lag bei -1,390 (Minimum -3,91 und Maximum 1,97) mit einer Standardabweichung von 1,08413.

4.1 Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der *SKI/GFI-1* Expression und der Prognose der Patienten

4.1.1 Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit vom Ausmaß der *SKI/GFI-1* Genexpression

Zur Analyse des Überlebens der AML-Patienten im Zusammenhang mit der *SKI/GFI-1* Expression wurde die Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse (s. Kap. 3.4.3) gewählt. Alle Daten sind der Tabelle 1 im Abschnitt Material und Methoden zu entnehmen. Patientenproben bei denen das Überleben oder der Todeszeitpunkt nicht eruiert waren (lost to follow-up), wurden nicht mit einbezogen und Patienten, welche das festgelegte Datum 01.07.2010 überlebt haben wurden zensiert. Die Patientenproben wurden in zwei Gruppen aufgeteilt: eine Gruppe mit einer hohen *SKI/GFI-1* Expression und eine Gruppe mit einer niedrigen *SKI/GFI-1* Expression. Als Grenze zwischen hoher und niedriger Expression wurde der Median festgelegt. Er betrug für die relative *GFI-1* Expression 0,3853 und für die relative *SKI* Expression -1,4271 (s. Tab. 11).

In Abb. 6 ist das Überleben in Abhängigkeit ihrer Zugehörigkeit zur Gruppe mit niedriger/hoher *SKI* Expression dargestellt. Auf der X-Achse ist das Überleben in Tagen angegeben. Die Y-Achse gibt die Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten in Prozent an. Der schwarze Graph steht für die Patientengruppe, welche wenig *SKI* exprimiert (n= 30), der rote Graph für die Patientengruppe, welche viel *SKI* exprimiert (n=28). Vertikale Striche entsprechen den zensierten Patienten. Auf der rechten Seite der Abbildung befindet sich eine entsprechende Legende.

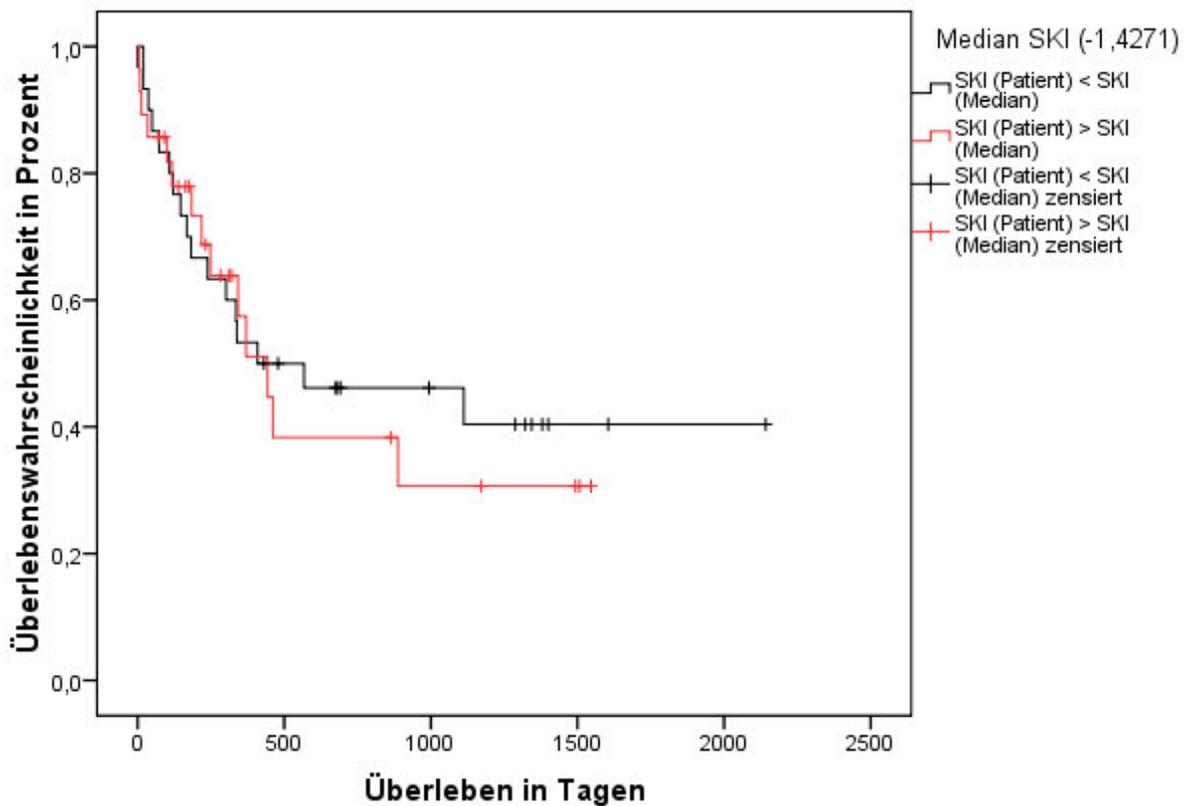


Abbildung 6: Kaplan-Meier Überlebenszeitanalyse der Patienten mit einer hohen bzw. niedrigen relativen SKI (RNA)-Expression (n = 58). Auf der X-Achse ist das Überleben in Tagen und auf der Y-Achse die Überlebenswahrscheinlichkeit angegeben. Schwarzer Graph: Patienten (n=30) mit einer niedrigen SKI Expression ($SKI(\text{Patient}) < SKI(\text{Median})$). Roter Graph: Patienten (n=28) mit einer hohen SKI Expression ($SKI(\text{Patient}) > SKI(\text{Median})$). Vertikale Striche markieren den Zeitpunkt der Zensur (p-Wert= 0,741).

Die Überlebenswahrscheinlichkeit war für 58 AML-Patienten unabhängig vom Ausmaß der *SKI* Expression bis kurz vor dem Tag 500 annähernd gleich. Danach sank die Überlebenswahrscheinlichkeit für die Patienten mit einer geringeren *SKI* Expression deutlich weniger als für die Patienten mit einer hohen *SKI* Expression. Nach dem Tag 1200 blieb die Überlebenswahrscheinlichkeit mit 0,45 bei den Patienten mit niedriger *SKI* Expression konstant. Bei Patienten mit einer hohen *SKI* Expression fiel die Überlebenswahrscheinlichkeit zwischen dem Tag 750 und 1000 auf fast 0,3 ab. In der Gruppe mit einer hohen *SKI* Expression lag das mediane Überleben (median Overall Survival (OS)) bei 443 Tagen und in der Gruppe mit einer geringen *SKI* Expression bei 509 Tagen. Die statistische Analyse ergab einen $\chi^2 = 0,109$ und einen p-Wert = 0,741. Es besteht somit kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (H_0).

In Abb. 7 ist das Überleben der Patienten in Abhängigkeit ihrer Zugehörigkeit zur Gruppe mit niedriger/hocher *GFI-1* Expression dargestellt.

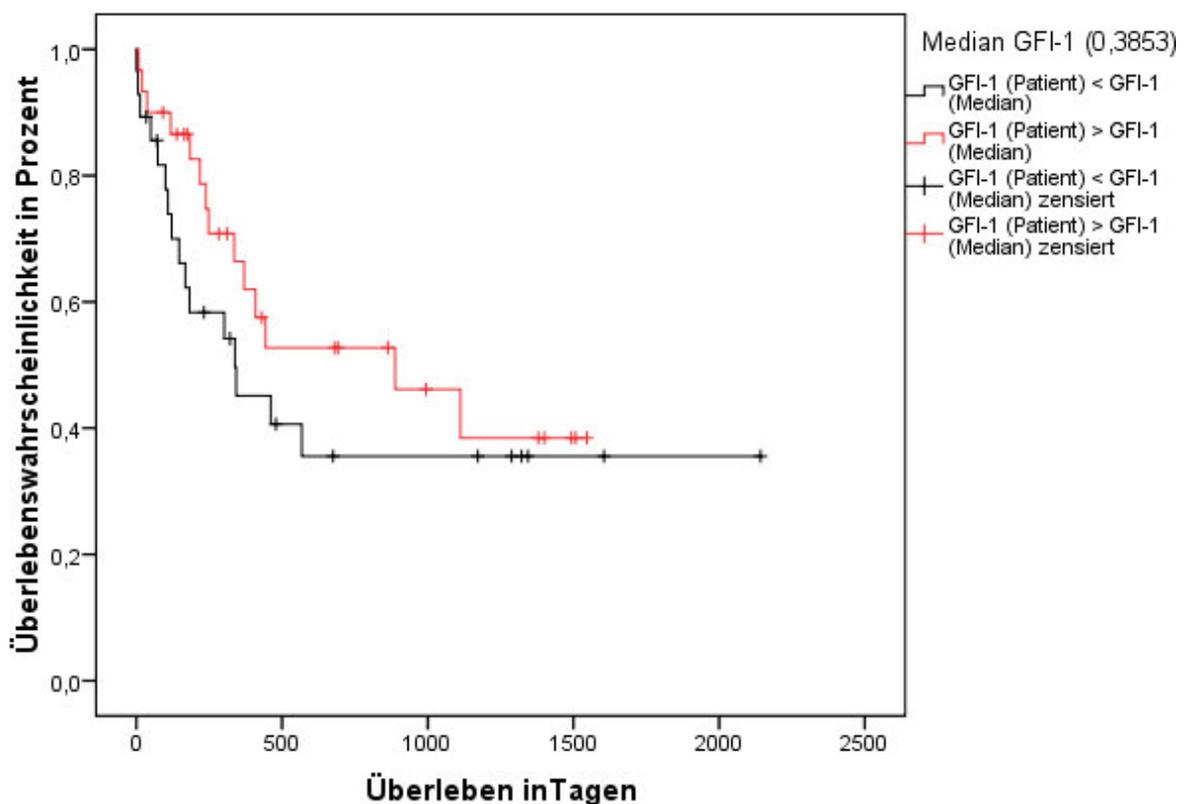


Abbildung 7: Kaplan-Meier Überlebenszeitanalyse der Patienten mit einer hohen bzw. niedrigen relativen *GFI-1* (RNA)-Expression (n= 58).

Auf der X-Achse ist das Überleben in Tagen und auf der Y-Achse die Überlebenswahrscheinlichkeit angegeben. Schwarzer Graph: Patienten (n=28) mit einer niedrigen *GFI-1* Expression ($GFI-1(\text{Patient}) < GFI-1(\text{Median})$). Roter Graph: Patienten (n=30) mit einer hohen *GFI-1* Expression ($GFI-1(\text{Patient}) > GFI-1(\text{Median})$). Vertikale Striche markieren den Zeitpunkt der Zensur (p-Wert= 0,311).

Die Überlebenswahrscheinlichkeit der AML-Patienten mit einer geringen *GFI-1* Expression sank zunächst sehr schnell auf weniger als 0,4 ab und veränderte sich ab den Tag 500 nicht mehr. Die Überlebenswahrscheinlichkeit der AML-Patienten mit einer hohen *GFI-1* Expression sank dagegen weniger schnell, erreichte aber nach dem Tag 1000 ebenfalls einen Wert von 0,4 und blieb dann konstant. Das mediane Überleben (median OS) der Gruppe mit geringer *GFI-1* Expression lag bei 333 Tagen, das der Gruppe mit einer hohen *GFI-1* Expression bei 888 Tagen. Mit einem $\chi^2= 1,024$ und einem p-Wert= 0,311 gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen (H_0).

4.1.2 Boxplotanalyse zur Darstellung der AML Risikogruppen in Relation zur relativen *SKI* und *GFI-1* Genexpression

Von den 71 AML-Patientenproben konnten n=16 der Niedrigrisiko-Gruppe, n=22 Patienten der Intermediärrisiko-Gruppe und n=27 der Hochrisiko-Gruppe zugeordnet werden (Einteilung der Risikogruppen s. Abb. 2; Patientendaten s. Tab. 1). Patientenproben, die vom selben Patienten stammen, wurden nicht in die Analyse einbezogen (n=65). Abb. 8 stellt die relative *SKI* Expression in den Risikogruppen dar.

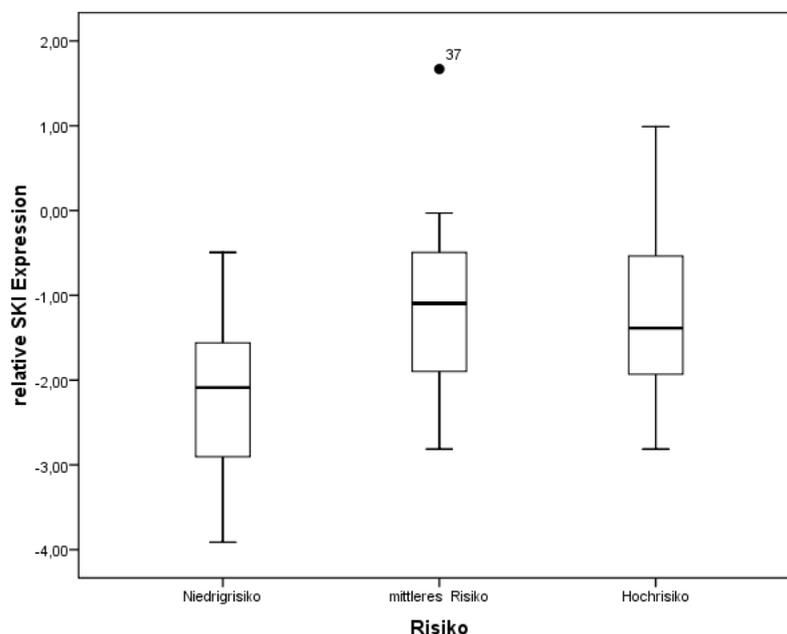


Abbildung 8: Boxplot-Darstellung der relativen *SKI* (RNA)-Expression in den Risikogruppen (n=65). Auf der Y-Achse ist die relative *SKI* Expression dargestellt. Risikogruppen: Niedrigrisiko n=16, mittleres Risiko n=22 und Hochrisiko n=27 (p-Wert= 0,002)

Bei der Betrachtung der Abb. 8 sieht man einen Anstieg der *SKI* Expression in den Risikogruppen. Der höchste Wert lag bei ca. 1,5 und wurde bei einem Patienten der Hochrisiko-Gruppe gemessen, der niedrigste von -3,9 bei einem Patienten der Niedrigrisiko-Gruppe. Der Median war in der Niedrigrisiko-Gruppe am niedrigsten (-2) und mit -1 in der Gruppe mit mittlerem Risiko am höchsten. Der Median der Hochrisiko-Gruppe lag mit ca. -1,5 knapp darunter. In der Intermediärrisiko-Gruppe gab es einen Ausreißer. In der Probe 37 wurde eine relative Expression von 1,75 gemessen.

Um zu überprüfen, ob sich das Ausmaß der *SKI* Expression zwischen den Risikogruppen signifikant unterscheidet, wurde ein Kruskal-Wallis Test (H-Test, s. Kap. 3.4.2.) durchgeführt. Die χ^2 -Verteilung für die *SKI* Expression war mit 12,133 hoch. Es bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den Risikogruppen in Hinblick auf das Ausmaß der *SKI* Expression (p-Wert=0,002). Um zu untersuchen zwischen welchen Gruppen ein signifikanter Unterschied besteht, wurden diese paarweise mittels Kruskal-Wallis Test verglichen. Dieser Vergleich ist in Tab. 12 dargestellt.

Tabelle 11: Paarweiser Vergleich der *SKI* Expression in den Risikogruppen. Verglichen wurden Niedrig- und Hochrisiko, Niedrig- und mittleres Risiko, sowie Hoch- und mittleres Risiko.

Gruppe1-Gruppe2	Teststatistik	Standardfehler	Standardteststatistik	p-Wert
Niedrigrisiko-Hochrisiko	-19,358	6,122	-3,162	0,002
Niedrigrisiko-mittleres Risiko	-19,423	6,484	-2,995	0,003
Hochrisiko-mittleres Risiko	0,064	5,878	0,011	0,991

In der Tab. 12 ist zu sehen, dass zwischen den Gruppen Niedrigrisiko und Hochrisiko (p-Wert = 0,002) und den Gruppen Niedrigrisiko und mittleres Risiko (p-Wert = 0,003) ein signifikanter Unterschied besteht. Zwischen den Gruppen Hochrisiko und mittleres Risiko besteht kein signifikanter Unterschied (p-Wert = 0,991). Abb. 9 stellt die relative *GFI-1* Expression in den Risikogruppen dar.

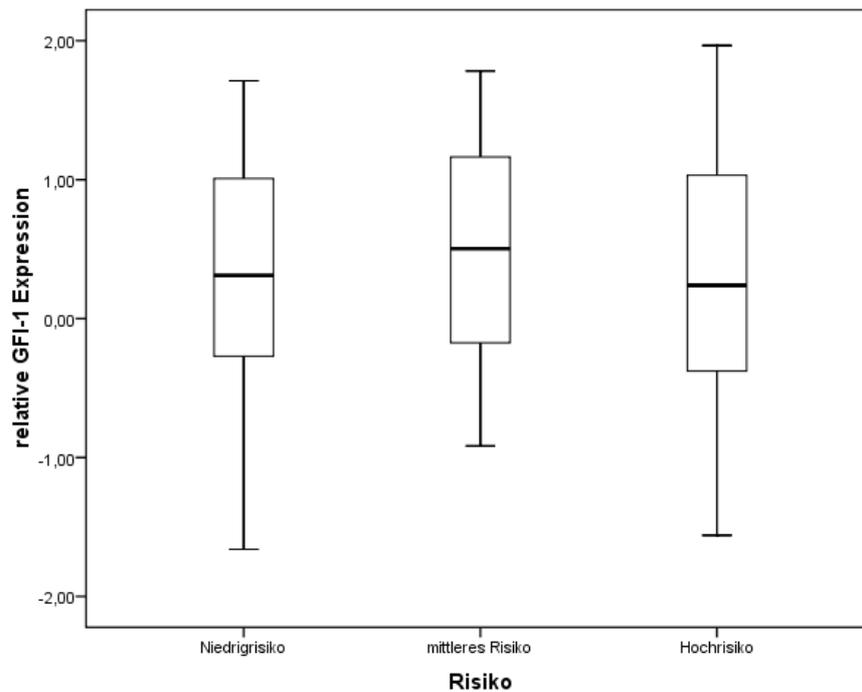


Abbildung 9: Boxplot-Darstellung der relativen *GFI-1* (RNA)-Expression in den Risikogruppen (n=65). Auf der Y-Achse ist die relative *GFI-1* Expression dargestellt. Risikogruppen: Niedrigrisiko n=16, mittleres Risiko= 22 und Hochrisiko n=27 (p-Wert= 0,920).

Die Abbildung zeigt, dass die Verteilung der *GFI-1* Expressionswerte in allen drei Risikogruppen ähnlich war (ähnliche Lage der IQR). Der Median der Niedrigrisiko-Gruppe lag mit 0,3 etwas höher als der Median der Hochrisiko-Gruppe (0,2). Der Median der Intermediärrisiko-Gruppe lag mit 0,5 im Vergleich zum Median der anderen Gruppen am höchsten. Die Spannweite der gemessenen *GFI-1* Werte war in der Niedrigrisiko-Gruppe und der Hochrisiko-Gruppe am größten. Der höchste Wert lag mit 2,0 in der Hochrisiko-Gruppe und der niedrigste mit -1,6 in der Niedrigrisiko-Gruppe. Auch hier wurde ein Kruskal-Wallis Test (H-Test, s. Kap. 3.4.2.) durchgeführt, um zu überprüfen, ob sich das Ausmaß der *GFI-1* Expression zwischen den Risikogruppen signifikant unterscheidet. Nach diesem Test ist ein Unterschied in der *GFI-1* Expression zwischen den Risikogruppen nicht wahrscheinlich ($\chi^2 = 0,167$; p-Wert= 0,920).

4.1.3 Korrelation der relativen *GFI-1* und *SKI* Genexpression

Bereits im Vorfeld der hier vorliegenden Dissertation wurden durch die AG Neubauer AML-Patientenproben auf ihre *GFI-1* Expression untersucht (nicht veröffentlichte Ergebnisse). Dabei wurde die Vermutung aufgestellt, dass die *GFI-1* Expression bei Patienten mit schlechter

Prognose niedriger liegt als bei Patienten mit guter Prognose. Dagegen fand die AG Neubauer eine erhöhte *SKI*-Produktion in AML Patientenproben der Hochrisiko-Gruppen (Ritter et al. 2006). Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde in der vorliegenden Dissertation eine Korrelationsanalyse zwischen der *SKI* und *GFI-1* Expression durchgeführt. Abb. 10 stellt ein Streudiagramm der beiden Parameter dar.

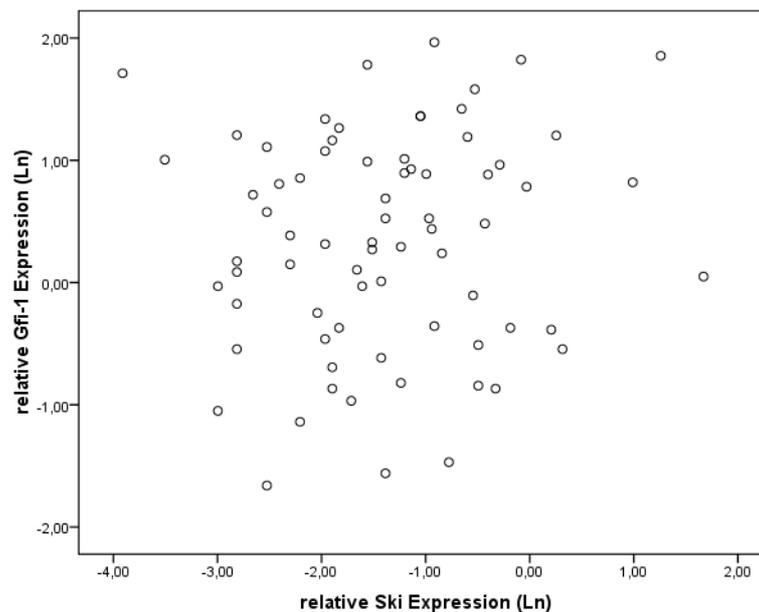


Abbildung 10: Streudiagramm der relativen *SKI* Expression im Bezug zur relativen *GFI-1* Expression. Auf der X-Achse ist die *SKI* Expression und auf der Y-Achse die *GFI-1* Expression dargestellt. Die Punkte entsprechen einzelnen Patientenproben (n=73).

Das Streudiagramm lässt eine fehlende Korrelation zwischen der *GFI-1* und *SKI* Expression in den Patientenproben vermuten, da die Wertpaare zufällig über das ganze Diagramm verteilt liegen. Um diese Vermutung statistisch zu beweisen, wurde die Spearman Korrelation (s. Kap. 3.4.4) angewandt (s. Tab. 14). Die Analyse ergab einen p-Wert von 0,369, sodass eine Korrelation zwischen der *GFI-1* und *SKI* Expression unwahrscheinlich ist.

4.2 *GFI-1*, *PU.1* und *ICSBP* Expression nach *SKI* Suppression

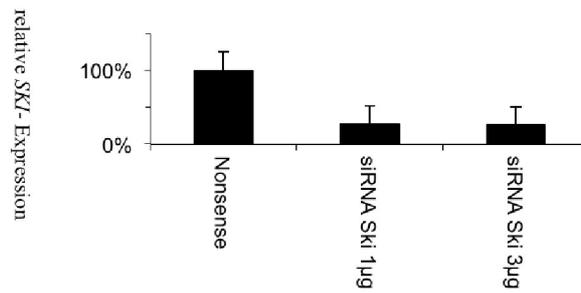
Basierend auf der Annahme, dass *SKI* und *GFI-1* ähnliche Zielgene (z.B. *PU.1*, *ICSBP*) aufweisen (Velu et al. 2008), wurde eine mögliche inverse Korrelation zwischen dem Onkogenprodukt *SKI* und *GFI-1* angenommen. Daher folgten auf die Expressionsanalyse in AML-Patientenproben funktionelle Experimente in der Zellkultur. Ziel dieser Analysen war es, die *SKI* Expression in HL60- und U937-Zellen zu supprimieren und daraufhin die *GFI-1*, *PU.1*

und *ICSBP* Expression zu untersuchen. Die *SKI* Suppression erfolgte durch Transfektion der U937- und HL60-Zellen (s. Kap. 4.2.1 und 4.2.2) mit *SKI* spezifischen siRNA-Oligonukleotiden oder Behandlung der HL60-Zellen mit VPA (s. Kap. 4.2.3).

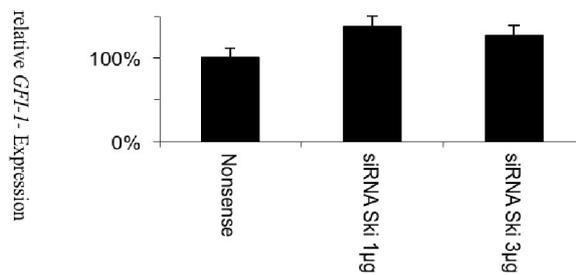
4.2.1 *SKI* Suppression mittels siRNA in U937- Zellen

In diesem Experiment wurde die *SKI* Expression durch Transfektion von siRNA gegen *SKI* supprimiert. Danach wurde die RNA Expression von *SKI*, *GFI-1*, *PU.1* und *ICSBP* untersucht (s. Abb. 11). *ICSBP* wird in HL60-Zellen nicht exprimiert (Ergebnisse hier nicht angezeigt), deshalb wurden für dieses Experiment U937-Zellen verwendet.

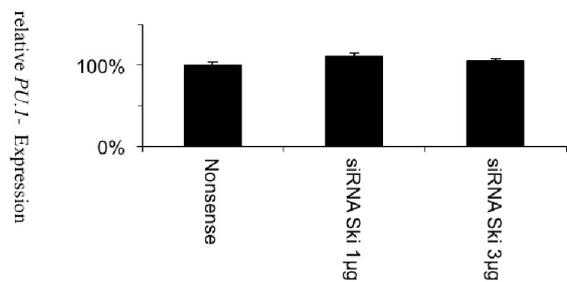
a.) *SKI*



b.) *GFI-1*



c.) *PU.1*



d.) *ICSBP*

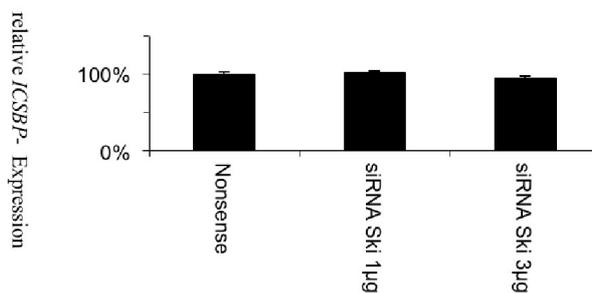


Abbildung 11: Relative RNA-Mengen von a) *SKI*, b.) *GFI-1*, c.) *PU.1* und d.) *ICSBP* in U937- Zellen nach *SKI* Suppression mittels Transfektion von siRNA gegen *SKI*. Das Ausmaß der RNA-Expression wird auf der Y-Achse (in Prozent der Kontrolle, Behandlung der Zellen mit nonsense-RNA (linke Spalte)) dargestellt. Mittlere Spalte: Behandlung mit 1µg *SKI* siRNA, rechte Spalte: Behandlung mit 3µg *SKI* siRNA. Bei den dargestellten Ergebnissen handelt es sich um die Mittelwerte von drei unabhängigen PCR-Versuchen. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung (p-Wert *SKI*: 0,177; p-Wert *GFI-1*: 0,491; p-Wert *ICSBP*: 0,957; p-Wert *PU.1*: 0,957).

Abb. 11a belegt die erfolgreiche Suppression der *SKI* Expression nach Transfektion von *SKI* spezifischer siRNA in U937-Zellen. Bei beiden verwendeten Konzentrationen (1µg und 3µg) wurde die Expression auf 26% *SKI* verringert. Es besteht jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (p-Wert: 0,177). Bei der Betrachtung der *GFI-1* Expression sieht man bei Behandlung der Zellen mit 1µg *SKI* spezifischer siRNA (s. Abb. 11b) einen Anstieg auf 138%, bei einer Erhöhung der siRNA-Konzentration war die Steigerung der Expression etwas weniger deutlich (127%). Die *PU.1* (1µg: 111% 3µg: 104%, s. Abb. 11c) und *ICSBP* (1µg: 101% 3µg: 95%, s. Abb. 11d) Expression blieb in den U937 Zellen unter *SKI* Suppression nahezu unverändert. Auch bei der statistischen Untersuchung der *GFI-1*, *ICSBP* und *PU.1* Expressionen ergibt sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen mit unterschiedlichen Mengen an transfizierter siRNA (p-Wert *GFI-1*: 0,491; p-Wert *ICSBP*: 0,957; p-Wert *PU.1*: 0,957).

4.2.2 *SKI* Suppression mittels siRNA in HL60- Zellen

Für die Suppression der *SKI* Expression in HL60 Zellen wurden die Zellen mit 0,25µg, 1µg und 3µg *SKI* spezifischer siRNA transfiziert. Als Kontrollen wurden HL60-Zellen mit 3µg Nonsense-siRNA transfiziert, um einen Einfluss der Transfektion auf die *SKI/GFI-1* Expression auszuschließen. Die Zellen wurden 24h kultiviert und anschließend auf ihre *SKI*- und *GFI-1* Expression auf Protein- (s. Abb. 12) und Transkriptebene (s. Abb. 13) untersucht. Abb. 12 zeigt einen Western-Blot mit *SKI*, *GFI-1* und β -ACTIN.

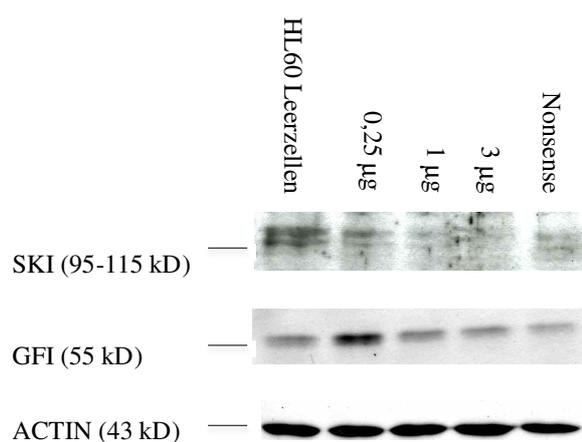


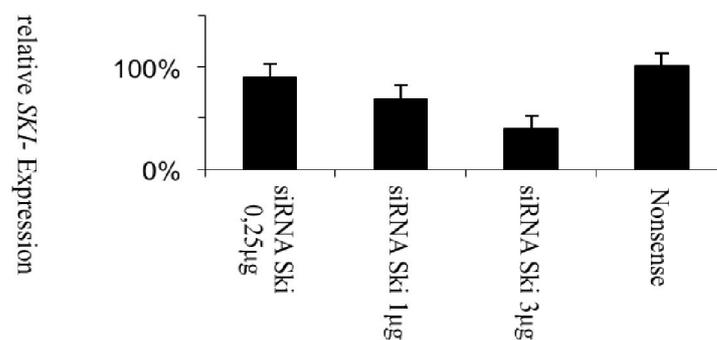
Abbildung 12: SKI, GFI-1 und β -ACTIN Expression in mit *SKI* spezifischer siRNA transfizierten HL60 Zellen (Western-Blot).

Die Zellen wurden mit 0,25µg, 1µg, 3µg *SKI*-spezifischer siRNA inkubiert. Rechts die Proteinproduktion bei Inkubation der Zellen mit Nonsense-siRNA. Ganz links ist die Expression der Proteine in HL 60 Leerzellen dargestellt.

Eine Transfektion mit 0,25µg *SKI* spezifischer siRNA hatte im Vergleich zur Kontrolle (Nonsense) keinen erkennbaren Einfluss auf die *SKI* Synthese. Bei einer Transfektion mit 1µg und 3µg *SKI* spezifischer siRNA wurde die *SKI* Synthese supprimiert (abnehmende Proteinmengen). Die *GFI-1* Synthese war bei einer Transfektion mit 0,25µg *SKI* spezifischer siRNA im Vergleich zur Kontrolle deutlich erhöht. Eine Transfektion der Zellen mit 1µg und 3µg *SKI* spezifischer siRNA ergab dagegen im Vergleich zur Kontrolle keine Veränderung der *GFI-1* Synthese. Das Protein β -ACTIN wurde nach der Transfektion mit *SKI* spezifischer siRNA unverändert produziert. Die Experimente wurden dreimal durchgeführt, um Ihre Reproduzierbarkeit zu überprüfen. Die repräsentativen Ergebnisse sind in dieser Arbeit dargestellt.

In Abb. 13 ist die *SKI* (a.) und *GFI-1* (b.) Expression nach *SKI* Suppression durch Transfektion mit siRNA gegen *SKI* dargestellt.

a.)



b.)

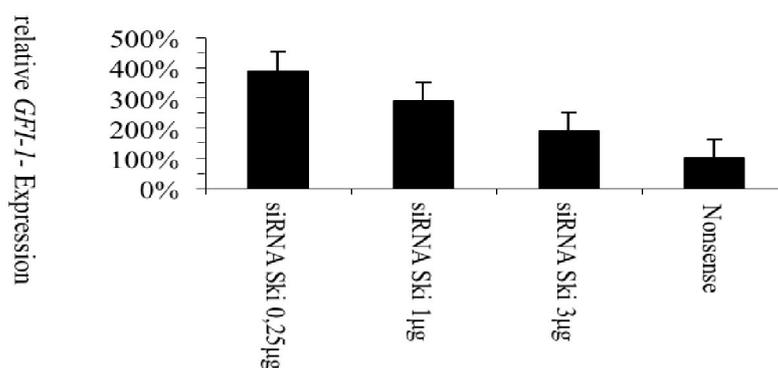


Abbildung 13: Relative RNA-Mengen von a.) *SKI* und b.) *GFI-1* nach Suppression von *SKI* durch Transfektion mit siRNA in HL60 Zellen.

Das Ausmaß der RNA-Expression wird auf der Y-Achse (in Prozent der Kontrolle, Behandlung der Zellen mit Nonsense-RNA (linke Spalte)) dargestellt. Links daneben: Behandlung mit 0,25µg, 1µg und 3µg *SKI* siRNA. Bei den dargestellten Ergebnissen handelt es sich um die Mittelwerte von drei unabhängigen PCR-Versuchen. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung (p-Wert *SKI*: 0,764; p-Wert *GFI-1*: 0,622).

Bei Betrachtung der Abb. 13 scheint die *SKI* Expression stufenweise mit Zunahme der Menge an transfizierter siRNA abzunehmen (0,25µg *SKI* spezifische siRNA 89%; 3µg *SKI* spezifische siRNA 39%). Auch bei der *GFI-1* Expression kommt es mit steigender Menge an transfizierter siRNA zu einem Abfall der *GFI-1* Expression, wobei insgesamt jedoch scheinbar mehr *GFI-1* exprimiert wird als in der Kontrollinkubation. Die höchste Expression mit 389% im Vergleich zur Kontrolle wurde bei einer Inkubation mit 0,25µg *SKI* spezifischer siRNA erzielt. Bei einer Transfektion von 3µg *SKI* spezifischer siRNA betrug die *GFI-1* Expression noch 189%. Eine Kruskal-Wallis Varianzanalyse zwischen den Proben mit unterschiedlicher Konzentration an transfizierter siRNA gegen *SKI*, ergab weder bei der *SKI* noch bei der *GFI-1* Expression einen signifikanten Unterschied (p-Wert *SKI*: 0,764; p-Wert *GFI-1*: 0,622).

4.2.3 *SKI* Suppression durch Valproinsäure in HL60- Zellen

In diesem Experiment wurde die *SKI* Expression durch die Behandlung der HL60- Zellen mit 1,5mM und 5mM VPA supprimiert (s. Kap. 3.13). Nach Zugabe von VPA wurden die Zellen für 48 Stunden und 72 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Expression und Synthese von *SKI* und *GFI-1* analysiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte HL60-Zellen. Die Experimente wurden dreimal durchgeführt, um Ihre Reproduzierbarkeit zu überprüfen. Die repräsentativen Ergebnisse sind in dieser Arbeit dargestellt. In Abb. 14 ist ein Western-Blot (s. Kap. 3.14) abgebildet, der die *SKI*, *GFI-1* und β -ACTIN-Synthese präsentiert.

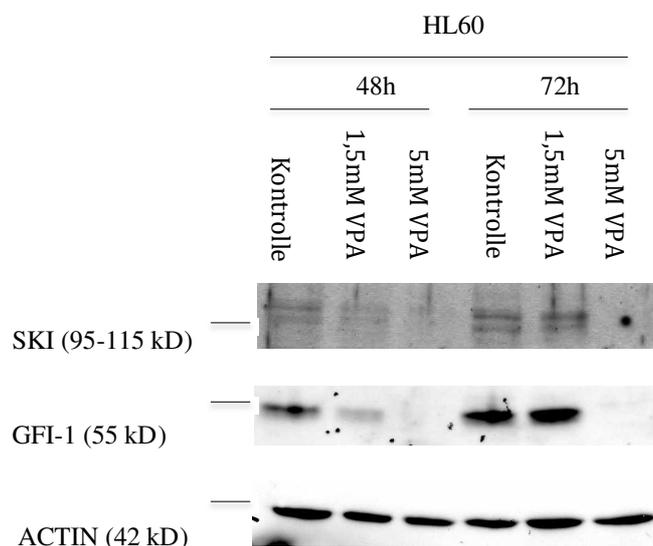
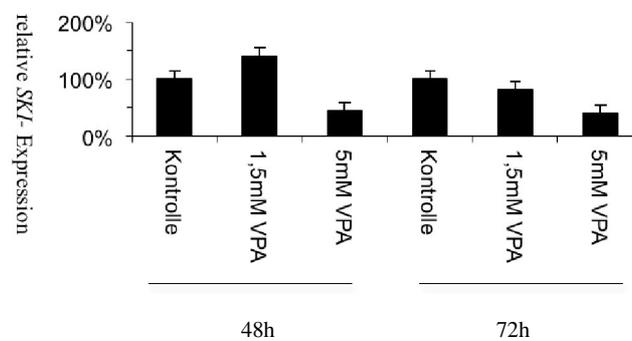


Abbildung 14: *SKI*, *GFI-1* und β -ACTIN Synthese nach VPA Behandlung in HL60-Zellen. HL60-Zellen wurden 48h oder 72h mit 0mM (Kontrolle), 1,5 mM oder 5mM VPA inkubiert.

Bei einer Inkubation mit einer Konzentration von 1,5mM VPA war die SKI-Menge leicht reduziert, dieser Trend setzt sich bei einer Verlängerung der Inkubationszeit auf 72h fort, so dass zu diesem Zeitpunkt kaum noch ein Protein nachweisbar war. Bei einer Erhöhung der VPA-Konzentration auf 5mM VPA war weder nach 48h noch nach 72h SKI im Western-Blot nachweisbar. Nach einer Inkubationszeit von 48h konnten im Vergleich zur Kontrolle geringere GFI-1-Mengen detektiert werden. Nach einer Inkubationszeit von 72h zeigte sich dagegen eine Zunahme des Proteins im Vergleich zur Kontrolle. Bei einer Konzentration von 5mM VPA war GFI-1 weder nach 48h noch nach 72h GFI-1 nachweisbar.

Die mit VPA behandelten HL60-Zellen wurden auch auf ihre RNA-Expression untersucht (s.Abb. 15).

a.)



b.)

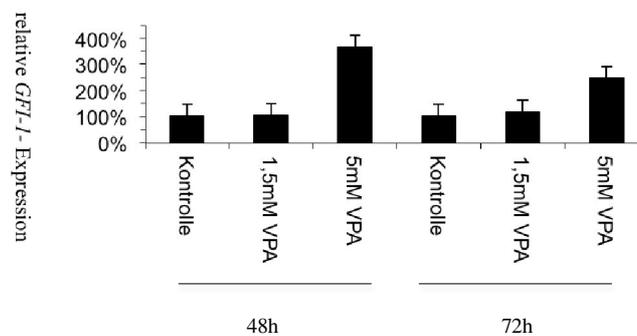


Abbildung 15: Relative RNA-Mengen von SKI- (oben) und GFI-1- (unten) in mit VPA behandelten HL60-Zellen.

HL60-Zellen wurden 48h oder 72h mit 0mM (Kontrolle), 1,5mM oder 5mM VPA inkubiert. Bei den dargestellten PCR-Ergebnissen, handelt es sich um die Mittelwerte von drei unabhängigen Versuchen. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung (p-Wert SKI: 0,485; p-Wert GFI: 0,666)

Nach Inkubation von HL60-Zellen mit 1,5mM VPA stieg der SKI RNA-Gehalt auf 140% der Kontrolle. Dagegen nahm der RNA-Gehalt nach einer Inkubation mit 5mM VPA auf 44% ab

Nach 72h betragen die Werte bei 1,5mM VPA 80% bei 5mM VPA 40%. Die *GFI-1* Expression war bei einer Konzentration von 1,5mM VPA nach 48h (104%) sowie nach 72h (117%) Inkubationszeit nahezu unverändert im Vergleich zur Kontrolle. Bei einer Konzentration von 5mM VPA stieg die gemessene *GFI-1* RNA-Menge nach 48h auf 365% und nach 72h auf 247%. Zwischen den Gruppen mit unterschiedlichen Mengen behandelten Zellen besteht sowohl in Hinblick auf SKI Expression (p-Wert= 0,485), als auch im Hinblick auf die GFI-1 Expression kein statistisch signifikanter Unterschied (p-Wert= 0,666).

5 Diskussion und Ausblick

5.1 *SKI* und *GFI-1* Expression in AML-Patienten – Prognose der AML-Patienten

Die Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse (s.Kap. 4.1) ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied hinsichtlich des Überlebens zwischen Patienten mit hoher *SKI* oder *GFI* Expression und Patienten mit niedriger *SKI* oder *GFI-1* Expression. Ein Vergleich der Graphen in Abb. 6 zeigt jedoch, dass AML-Patienten, deren *SKI* Expression über dem Median lag tendenziell ein kürzeres Überleben aufweisen, als Patienten, deren *SKI* Expression unter dem Median lag. Im Hinblick auf die *GFI-1* Expression scheint es eher umgekehrt. Hier wiesen Patienten mit einer niedrigen *GFI-1* Expression tendenziell ein kürzeres Überleben auf (medianes Überleben 338 Tage) als Patienten, deren *GFI-1* Expression über dem Median lag (medianes Überleben 888 Tage). Wie in der Einleitung beschrieben, wurde bei Patienten mit der Chromosomendeletion $-7/\text{del } 7q$ eine erhöhte *SKI* Expression nachgewiesen (Ritter et al. 2006). Die Chromosomendeletion $-7/\text{del } 7q$ klassifiziert die AML-Patienten als Mitglieder der Hochrisiko-Gruppe und ist mit einer schlechten Prognose assoziiert (Valk et al. 2004) (Fröhling et al. 2006), weshalb angenommen wurde, dass Patienten mit einer erhöhten *SKI* Expression ein schlechteres Überleben zeigen. Dies konnte in der Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. In der Boxplot-Analyse konnte jedoch ein signifikanter Unterschied bei der *SKI* Expression zwischen Patienten der Hochrisiko-Gruppe und Intermediärrisiko-Gruppe im Vergleich zur Niedrigrisiko-Gruppe festgestellt werden (s. Abb. 8 und Tab. 12+13). Die Ergebnisse entsprechen dem aktuellen Kenntnisstand der Literatur (Ritter et al. 2006). Es sollte in Erwägung gezogen werden, dass *SKI* selbst möglicherweise keinen Einfluss auf die Prognose der Patienten haben könnte, sondern einen Marker der zytogenetischen Subgruppe $-7/\text{del } 7q$ darstellt, welcher der Hochrisiko-Gruppe zugehörig ist. Zur Klärung müsste eine multivariate Analyse durchgeführt werden. Die Boxplot-Analyse der *GFI-1* Expression ergab keinen Unterschied zwischen den Risikogruppen. Khandapour et al. fanden ebenso wie wir, keinen Zusammenhang zwischen der *GFI-1* Expression und dem Risiko oder der Prognose der AML-Patienten (Khandanpour et al. 2010). Lediglich für *GFI-1b* wurde eine Überexpression in den AML-Subtypen M6 und M7 ermittelt (Elmaagacil et al. 2006). Diese AML-Subtypen sind mit einem komplexen Karyotyp und damit mit einem schlechten Risiko assoziiert (Oki et al. 2006; Park et al. 2010; Yunis et al. 1984). *GFI-1b* ist ein Paralog von *GFI-1* (Vassen et al. 2005). *GFI-1* und *GFI-1b* regulieren gegenseitig die Expression ihrer Gene und können auch Einfluss auf ihre eigene Expression nehmen. Das komplexe Regulationsmuster wird für die Schwankungen in der Expression verschiedener Zellen verantwortlich gemacht (Anguita et al. 2010; Montoya-

Durango et al. 2008; Huang et al. 2005). Zusammenfassend wird angenommen, dass das Ausmaß der *GFI-1* Expression von den zytogenetischen Eigenschaften und von dem Vorhandensein und der Aktivität seiner molekularen Bindungspartner abhängt (Van der Meer et al. 2010). Ski könnte einer dieser Bindungspartner sein. Um das weiter zu überprüfen, waren auch funktionelle Experimente Bestandteil dieser Arbeit. Die Diskussion dieser Ergebnisse folgt in Kap 5.2.

Eine mögliche Ursache für die fehlende Signifikanz der Ergebnisse der Kaplan-Meier Überlebenszeitanalyse sind die geringen Patientenzahlen. In dieser Arbeit wurden 73 AML Patientenproben untersucht, davon gingen n=58 in die Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse ein. Im Vergleich dazu haben Ritter et al. 201 Patientenproben untersucht (Ritter et al. 2006). Aus dieser geringen Patientenzahl ergibt sich die geringe Teststärke. Die Teststärke (1- β) ist die Wahrscheinlichkeit der Wiederlegung der Nullhypothese, wenn sie tatsächlich falsch ist und die Alternativhypothese zutrifft.

SKI und GFI-1 weisen ähnliche Zielgene auf, so dass eine Interaktion zwischen den beiden Transkriptionsfaktoren zunächst angenommen wurde (Velu et al. 2008). Da bereits gezeigt wurde, dass Patienten der Hochrisiko-Gruppe *SKI* überexprimieren und aufgrund der Überlegung, dass eine verminderte *GFI-1* Expression mit einer schlechten Prognose assoziiert sein könnte, wurde untersucht, ob die *SKI*- und *GFI-1*- Expression in AML-Patientenproben korreliert (s. Abb. 10). In dem Streudiagramm lässt sich eine zufällige Verteilung der Patientenproben erkennen. Auch in der Spearman-Korrelationsanalyse konnte eine Korrelation statistisch ausgeschlossen werden. Nach dem Unkorreliertheitsgesetz sind zwei unkorrelierte Variablen nicht unbedingt unabhängig voneinander, sodass eine mögliche Interaktion durch die Korrelationsanalyse nicht ausgeschlossen werden kann. Folgend wurde eine mögliche Interaktion mittels funktioneller Experimente untersucht.

5.2 *SKI*- Suppression – *GFI-1*, *PU.1*, *ICSBP* Expression

Wie in der Einleitung beschrieben, besitzen SKI und GFI-1 zahlreiche gemeinsame Zielgene und Interaktionspartner, beispielsweise hemmen die Produkte beider Onkogene die PU.1 Aktivität, SKI über eine Interaktion mit dem HDAC3-Komplex, GFI-1 über eine direkte Interaktion (Ueki et al. 2008; Dahl et al. 2007). Um zu überprüfen ob die *SKI* Suppression möglicherweise einen Einfluss auf die *GFI-1*, *PU.1* und *ICSBP* Expression hat, wurden die RNA Expressionslevel der genannten Gene nach *SKI* Suppression durch *SKI* spezifische siRNA in

U937 Zellen untersucht. Sollten *SKI* und *GFI-1* die *PU.1* Aktivität inhibieren, dann könnte angenommen werden, dass die *PU.1* und *ICSBP* Expression nach *SKI* Suppression steigt. Wie dem Ergebnisteil der vorliegenden Arbeit zu entnehmen ist, wiesen die mit siRNA gegen *SKI* transfizierten U937-Zellen eine ähnliche *PU.1* und *ICSBP* Expression auf wie die Kontrollprobe (s. Abb. 11c und d).

Eine mögliche Erklärung für das Ergebnis ist, dass die *GFI-1* Expression nicht ausreichend supprimiert wurde und daher die *PU.1* und *ICSBP* Expression möglicherweise auch noch nach *SKI*- Suppression durch *GFI-1* supprimiert wird. Es scheint eher zu einer erhöhten *GFI-1* Expression nach *SKI* Suppression zu kommen. Sollte tatsächlich mehr *GFI-1* zur Verfügung stehen, könnte der Effekt einer *SKI* Suppression auf die Zielgene von *SKI* durch *GFI-1* kompensiert werden. An dieser Stelle muss besonders betont werden, dass es sich dabei um Vermutungen handelt und es Bedarf der Untersuchung mehrerer gemeinsamer Zielgene von *SKI* und *GFI-1* unter *SKI* Suppression um eine derartige Aussage zu unterstützen. Ferner handelt es sich hier um eine sehr vereinfachte Darstellung der Transkriptionsregulation und es muss hervorgehoben werden, dass die *PU.1* und *ICSBP* Expression auch durch andere Transkriptionsfaktoren, welche in dieser Arbeit nicht untersucht wurden, reguliert werden. Velu et al. haben bereits beschrieben, dass *SKI* als Korepressor für *GFI-1* agiert und dass beide Proteine die Expression gemeinsamer Zielgene supprimieren. Allerdings werden in der Veröffentlichung die Zielgene nicht benannt (Velu et al. 2008).

Desweiteren wurde die *SKI* Expression mittels siRNA gegen *SKI* in HL60 Zellen supprimiert und daraufhin die *GFI-1* Expression in den transfizierten HL60 Zellen untersucht. Da von der ermittelten RNA Expression nicht auf die Proteinexpression geschlossen werden kann, sind diese zwar im folgenden zusammen aufgeführt, aber nicht vergleichend zu betrachten (Bustin, 2005). In Abb. 12 und 13a ist zu sehen, dass sowohl die *SKI* Proteinmenge (Western Blot) als auch die *SKI* (RNA)-Expression (RT-PCR) parallel zur Menge an transfizierter siRNA absank. Bei einer Transfektion von 3µg *SKI* spezifischer siRNA war keine *SKI* Proteinsynthese mehr nachzuweisen. Die *GFI-1* Synthese war nach Transfektion der Zellen mit 0,25µg siRNA gegen *SKI* am höchsten und sank bei 1µg und 3µg siRNA gegen *SKI* wieder ab. Auf Transkriptebeine (s. Abb. 13a) scheint die Expression der Gene auf den ersten Blick invers zu sein, dagegen spricht jedoch, dass die *GFI-1* Expression bei höheren Konzentrationen an siRNA gegen *SKI* ebenfalls abfällt. Bei einer möglichen inversen Korrelation zwischen *SKI* und *GFI-1* wäre jedoch zumindest eine konstante Überexpression oder gar steigende *GFI-1* Expression zu erwarten gewesen. Zum einen könnten diese Abweichungen von den erwarteten

Ergebnissen auf die Transfektionseffektivität der verwendeten HL60 Zellen zurückzuführen sein. Die Effektivität ist dabei von der Proliferation der Zellen abhängig. Da in dieser Versuchsreihe jedoch ausschließlich HL60 Zellen verwendet worden sind, sollte dieser Effekt minimal sein. Zu bedenken ist auch, dass es bei siRNA Experimenten häufig zu off-target Effekten kommt. Persengiev et al. zeigten, dass die Expression von 1000 Genen durch die Transfektion von Sequenz-spezifischer siRNA verändert wurde. Diese Effekte waren auch bei geringeren siRNA Mengen nachweisbar (Persengiev et al. 2004). Ferner wurde gezeigt, dass siRNA über die gleiche Signalkaskade wirkt wie miRNA. Diese ist nur partiell komplementär zu deren Ziel-Sequenz. 6 Basenpaare reichen für eine milde Inhibition, was zur Folge hat, dass eine miRNA bis zu mehrere hundert Zielsequenzen aufweisen kann (Gu et al. 2014). Man kann also davon ausgehen, dass schon bei einer Transfektion von 0,25µg siRNA gegen *SKI* nicht nur *SKI* inhibiert wird. Eine Toxizität der siRNA auf die Zellen kann in diesem Experiment ausgeschlossen werden, da die Synthese des Housekeeping-Proteins ACTIN unverändert ist.

Zur weiteren Untersuchung der Expression von SKI und GFI-1 wurden HL60-Zellen mit VPA behandelt um die SKI Expression zu supprimieren. Beide Transkriptionsfaktoren interagieren mit dem HDAC-Komplex (Nomura et al. 1999; McGhee et al. 2003). Das Medikament VPA, ursprünglich als Antiepileptikum eingesetzt, hemmt HDAC und antagonisiert die SKI Expression (Ritter et al. 2006; Göttlicher et al. 2001). Wie Abb. 14 und Abb. 15a zeigt, scheinen die SKI RNA-, sowie Protein-Level nach Behandlung der Zellen mit VPA abzufallen. Lediglich nach 48h und einer Konzentration von 1,5mM VPA zeigten sich im Vergleich zur Kontrolle auf Transkriptebene leicht erhöhte Werte. Auch die GFI-1 Expression wurde durch die Inkubation mit VPA supprimiert. Auf Proteinebene hielt der Abfall des GFI-1 Levels, der nach 48h detektiert wurde, nur bei der höheren VPA-Konzentration auch 72h an (s. Abb. 12). Auf Transkriptebene konnte konzentrationsabhängig ein Anstieg der *GFI-1* Expression detektiert werden (s. Abb. 15b).

Bei einer möglichen inversen Korrelation wäre ein Anstieg der GFI-1 Expression zu erwarten gewesen. Die Effekte des VPA-Versuchs auf die GFI-1 Expression sind jedoch sehr heterogen. Dies ist möglicherweise Folge der komplexen Effekte von VPA auf die Zellen. VPA führt zur Acetylierung von Histonen und trägt zur Veränderung der Chromatinstruktur bei, kann aber auch auf andere (nicht Histon-) Proteine wirken. Dabei induziert es die Differenzierung und wirkt proapoptotisch (Quintás-Cardama et al. 2011). Auch in diesem Experiment kann, bei normaler Expression des Housekeeping-Proteins ACTIN, eine mögliche Toxizität von VPA auf die Zellen ausgeschlossen werden.

Für alle funktionellen Experimente muss nachdrücklich bemerkt werden, dass die sichtbaren Unterschiede statistisch nicht signifikant sind und somit statistisch kein Unterschied zwischen den einzelnen Zellgruppen in den dargestellten Versuchen nachzuweisen ist. Dies ist vor allem durch die geringe Teststärke zu erklären. Bei 3 Versuchsdurchläufen ist hier nur eine sehr geringe Teststärke vorhanden und damit auch nur eine sehr geringe Wahrscheinlichkeit gegeben, die Nullhypothese (es gibt keinen Unterschied zwischen den Gruppen) zu widerlegen. Ein signifikanter Unterschied wäre durch einen größeren Datensatz oder einen extremen Unterschied zwischen den Datensätzen zu erreichen.

Insgesamt entsteht der Eindruck, dass es bei einer minimalen Suppression von SKI initial zu einer Überexpression von GFI-1 kommt. Neben den eben diskutierten Möglichkeiten für die Heterogenität der Ergebnisse, könnte man zudem ein Feed-Forward-Loop als Ursache für die Beobachtungen spekulieren. Velu et al. zeigten 2008, dass SKI als Korepressor für GFI-1 fungiert (Velu et al. 2008). Weiter wird angenommen, dass SKI direkt durch die miRNA21 supprimiert wird und möglicherweise reguliert GFI-1 die miRNA21 (Velu et al. 2011). Es wurde berichtet, dass es in *gfi*^{-/-} Mäusen zu einer Überexpression von miRNA21 und zu einer vollständigen Suppression von *ski* kommt. Daher vermuten die Autoren einen Feed-Forward-Loop (s. Abb. 17).

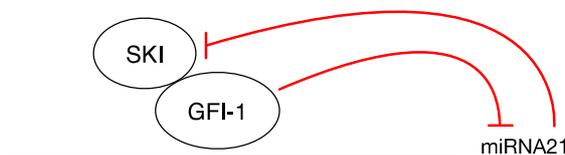


Abbildung 16: Vereinfachte Darstellung eines hypothetischen Feed-Forward Loops.

In der Abbildung stehen rote Linien für Inhibition.

Dem Modell zufolge inhibiert GFI-1 Zielgene (hier z.B. miRNA21), welche die SKI Expression regulieren. SKI könnte wiederum als Korepressor für GFI-1 interagieren (Velu et al. 2008) und beeinflusst so möglicherweise die Expression seiner Zielgene und seine eigene Expression. Wird SKI exprimiert könnte es als Korepressor für GFI-1 Zielgene supprimieren, die seine eigene Expression supprimieren. Wird die SKI Expression komplett supprimiert könnte GFI-1 entsprechende Zielgene nicht supprimieren. Dieser Feed-Forward-Loop wäre dann im Sinne einer Endproduktrepression zu interpretieren. Die unterschiedlichen Expressionslevel von GFI-1 sind mit diesem Model allein nicht zu erklären, es sei denn man ginge davon aus, das eben jene gemeinsame Zielgene ebenfalls die GFI-1 Expression supprimieren

und/oder die Möglichkeit von GFI-1 zur Autoregulation hier noch eine Rolle spielt. Mit Hilfe einer solchen Hypothese ließe sich erklären, warum unterschiedliche SKI Suppressionslevel die GFI-1 Expression unterschiedlich beeinflussen (starke SKI Suppression \Rightarrow GFI-1 Suppression; geringe SKI Suppression \Rightarrow GFI-1 Überexpression). Ob es ein gemeinsames Zielgen gibt, welches die Ski und GFI-1 Expression reguliert ist unklar, die Autoregulation von GFI-1 ist jedoch bekannt (Montoya-Durango et al. 2008). Auch an dieser Stelle sollte nochmal deutlich gemacht werden, dass die Regulation der Transkription sehr komplex ist und davon auszugehen ist, dass noch weitere Interaktionspartner/Transkriptionsfaktoren eine Rolle spielen und dieser hypothetische Feed-Forward-Loop wesentlich komplexer ist und von weiteren Faktoren beeinflusst wird. Sicherlich könnte allein die Komplexität dieser Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Transkriptionsfaktoren schon als Erklärung für die unterschiedlichen GFI-1 Expressionslevel in Betracht kommen.

5.3 Ausblick

Ziel weiterführender Experimente könnte eine weitergehende Untersuchung des Feed-Forward-Loops sein. So könnte z.B. untersucht werden, ob GFI-1 direkt die miRNA21 Expression supprimiert. Zur Analyse der Bindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA kann die Chromatin Immuno Precipitation DNA-Sequencing (ChIP Seq)-Methode Anwendung finden. Auch die Identifizierung von miRNA21 Zielgenen wäre mit dieser Methode möglich, um die SKI Regulation weiter zu verfolgen. Weiter könnte auch die Suppression der miRNA21 Expression oder die seiner Zielgene untersucht werden. Der Knockdown von Zielgenen kann mittels Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)/ CRISPR associated Protein (CAS) erfolgen. Ferner wäre eine weitere Analyse der AML-Patientenproben denkbar. Es könnte zum Beispiel eine multivariate Analyse zur SKI Expression durchgeführt werden, um zu klären ob eine SKI Überexpression lediglich einen Marker der zytogenetischen Subgruppe -7/del7q darstellt oder selbst einen Einfluss auf die Prognose der Patienten haben könnte. Die Kaplan-Meier Überlebenszeitanalyse könnte zudem mit einer Analyse „Zeit bis zur kompletten Remission“ erweitert werden.

6 Zusammenfassung

Die Akute myeloische Leukämie (AML) ist eine seltene maligne Erkrankung des Blutsystems mit überwiegend schlechter Prognose. Die Myelopoese wird durch ein komplexes Zusammenspiel aus Transkriptionsfaktoren reguliert. Das Verständnis dieser Regulation kann zum Verständnis der AML-Entstehung beitragen und eröffnet so neue, spezifische Therapiemöglichkeiten. Sloan Kettering Interfering Protein (SKI) und Growth Factor Inhibitory-1 (GFI-1) sind zwei Onkogene, die eine wesentliche Rolle in der Hämatopoese spielen. SKI und GFI-1 interagieren mit gleichen Interaktionspartnern und besitzen die gleichen Zielgene. Daher sollte in dieser Arbeit eine mögliche Interaktion des Onkogens SKI als Korepressor für GFI-1 untersucht werden.

Dafür wurden 73 AML-Patientenproben auf ihre *SKI* und *GFI-1* Expression mittels RT-PCR untersucht und entsprechend ihrer Karyotypen in Risikogruppen eingeteilt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen ein tendenziell kürzeres Überleben für Patienten mit überdurchschnittlicher *SKI* Expression. Außerdem ergab sich eine signifikant höhere *SKI* Expression in der Hochrisiko-Gruppe im Vergleich zur Niedrigrisiko-Gruppe. AML-Patienten mit unterdurchschnittlicher *GFI-1* Expression wiesen ein tendenziell kürzeres Überleben auf, als Patienten mit überdurchschnittlicher *GFI-1* Expression (keine Signifikanz). Für *GFI-1* konnte zudem kein Zusammenhang zwischen der Risikogruppeneinteilung und dem Ausmaß der RNA-Expression detektiert werden. Eine Spearman Korrelationsanalyse für die *SKI/GFI-1* Expression in AML-Patientenproben wies keine Korrelation auf. Weiter wurde die *SKI* Expression durch Transfektion von U937- und HL60-Zellen mit siRNA gegen *SKI* und durch Behandlung von HL60-Zellen mit VPA supprimiert. Mittels RT-PCR und Western Blot wurden die RNA- und Proteinkonzentrationen von *SKI* und *GFI-1* bestimmt. In U937-Zellen wurde zusätzlich die *PU.1* und Interferon Sequence Binding Protein (*ICSBP*) Expression nach *SKI* Suppression durch Transfektion mit siRNA gegen *SKI* analysiert. Schon bei leichter *SKI* Suppression kam es zu einer *GFI-1* Überexpression. Nach Transfektion mit größeren Mengen siRNA war diese jedoch rückläufig. Die *PU.1* und *ICSBP* Expression war im Vergleich zur Kontrolle unverändert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen den aktuellen Kenntnisstand der Literatur und zeigen eine mögliche Interaktion des Onkogens *SKI* mit dem Transkriptionrepressor *GFI-1* auf. Als Modell kann ein Feed-Forward-Loop angenommen werden. Demnach inhibiert *GFI-1* Zielgene (z.B. miRNA21), welche die *SKI* Expression regulieren. *SKI* wiederum interagiert als Korepressor mit *GFI-1* und hat so möglicherweise Einfluss auf seine eigene Expression. Eine

genauere Untersuchung dieses Feed-Forward-Loops könnte Bestandteil zukünftiger Experimente sein.

6.1 Summary

AML is a rare malignant disease of the hematopoietic cell system that affects the older members of the population. Hematopoiesis is regulated by a complex interaction between the transcription factors, oncogenes, tumorsuppressors and receptors. Further investigation of these pathways in signal transduction have produced results in new insights of pathogenesis and could point to new possibilities of a new and more specific treatment of AML. These findings have resulted in transcription factors being a central issue in the scientific research of hematocology. Two transcription factors are the oncogene *SKI* and the transcription repressor *GFI-1* that represent important regulators of hematopoiesis. *SKI* and *GFI-1* interact with the same interaction partners and have the same target genes. As a result of the interacting genes and target genes being the same, a possible interaction of the oncogene *ski* as corepressor for *GFI-1* is investigated in this work.

First 74 AML patient samples were analyzed for their *SKI* and *GFI-1* expression. The samples were classified in risk groups according to WHO criteria. It was investigated whether there is a connection between the *SKI* and *GFI-1* expression with regard to the survival or the risk classification. The *SKI* and *GFI-1* expression were also tested for correlation in the 74 AML patient samples. The results of the present study show a trend toward a worse survival for patients that express more *SKI* than the average. In addition, there is a higher expression of *SKI* in high and intermediate risk group. These results are confirmed within current literature. Regarding the *GFI-1* expression; AML patients which had a lower *GFI-1* expression than the average, show a shorter survival than patients who express *GFI-1* above average (not significant) and no relationship between the risk group classification and the *GFI-1* expression. There was neither a positive nor a negative correlation of *SKI* and *GFI-1* expression in AML patients.

The second part of the presented work was functional experiments. *SKI* expression was suppressed by transfection of siRNA against *SKI* and treatment of HL60 cells with VPA. The *GFI-1* expression was then investigated by western blot and RT-PCR. Also the PU.1- and ICSBP expression after *SKI* suppression by transfection of U937 cells with siRNA against *SKI* was determined. As expected, *SKI* was successfully suppressed. There was an overexpression of *GFI-1* even at the slightest *SKI* suppression. Especially after transfection with

larger quantities of siRNA, GFI-1 expression was regressed. Compared to the control the PU.1- and ICSBP expression were unchanged.

The results of this study reflect current knowledge as represented in the most recent literature. It can be assumed that there is an interaction of the oncogene SKI with the transcription repressor GFI-1, especially in view of a feed-forward loop. Therefore GFI-1 inhibits target genes (e.g. miRNA 21) that regulate SKI expression. In turn SKI interacts directly as a corepressor with GFI-1 and so may affect its own expression. The importance of the feed-forward loop remains unclear, but a closer examination of this feed-forward loop could be part of future experiment.

7 Literaturverzeichnis

Anguita E, Villegas A, Iborra F, Hernández A (2010) GFI1B controls its own expression binding to multiple sites. *Haematologica* 95: 36-46.

Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C (1976) Proposals for the classification of acute myeloid leukemia. French-America-British (FAB) co-operative group. *Br J Hematol* 33: 451-458.

Bonnon C, Atanasoski S (2012) c-Ski in health and disease. *Cell Tissue Res*, 347: 51-64.

Bortz J, Lienert GA (1998) Kurzgefaßte Statistik für die klinische Forschung. Springer, Heidelberg.

Breems DA, Van Putten WL, De Greef GE, Van Zelder-Bhola SL, Gerssen-Schoorl KB, Mellink CH, Nieuwint A, Jotterand M, Hagemeyer A, Beverloo HB, Löwenberg B (2008) Monosomal karyotype in acute myeloid leukemia: a better indicator of poor prognosis than a complex karyotype. *J Clin Oncol*, 26: 4791-4797.

Bug G, Ritter M, Wassmann B, Schoch C, Heinzl T, Schwarz K, Romanski A, Kramer OH, Kampfmann M (2005) Clinical trial of valproic acid and all-trans retinoic acid in patients with poor-risk acute myeloid leukemia. *Cancer*, 104: 2717-2725.

Bustin SA (2005) Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol*, 29: 23-39.

Byrd JC, Mrózek K, Dodge RK, Carroll AJ, Edwards CG, Arthur DC, Pettenati MJ, Patil SR, Rao KW, Watson MS, Koduru PR, Moore JO, Stone RM, Mayer RJ, Feldman EJ, Davey FR, Schiffer CA, Larson RA, Bloomfield CD (2002) Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B. *Blood*, 100: 4325-4336.

Cheson D, 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 (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: 4642-4649.

Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK, Dombret H, Fenaux P, Grimwade D, Larson RA, Lo-Coco F, Naoe T, Niederwieser D, Ossenkoppele GJ, Sanz MA, Sierra J, Tallman MS, Löwenberg B, Bloomfield CD (2010) Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*, 115: 453-474.

Dahl R, Kieslinger M, Beug H, Hayman MJ (1998) Transforming of hematopoietic cells by the Ski oncoprotein involves repression of retinoic acid receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci*, 95: 11187-11192.

Dahl R, Simon MC (2003) The importance of PU.1 concentration in hematopoietic lineage commitment and maturation. *Blood Cells, Mol Dis*, 31: 229-233.

Dahl R, Iyer SR, Owens KS, Cuylear DD, Simon MC (2007) The transcriptional repressor GFI-1 antagonizes PU.1 activity through protein-protein interaction. *J Biol Chem*, 282: 6473-6483.

Dror N, Rave-Harel N, Burchert A, Azriel A, Tamura T, Taylor P, Neubauer A, Ozato K, Levi BZ (2007) Interferon regulatory factor-8 is indispensable for the expression of promyelocytic leukemia and the formation of nuclear bodies in myeloid cells. *J Biol Chem*, 282: 5633-5640.

Elmaagacil AH, Koldehoff M, Zakrzewski JL, Steckel NK, Ottinger H, Beelen DW (2006) Growth factor-independent 1B gene (GFI1B) is overexpressed in erythropoietic and megakaryocytic malignancies and increases their proliferation rate. *Br J Hematol*, 136: 121-219.

Estey EH (2000) How I treat older patients with AML. *Blood*, 96:1670-1673.

Estey E and Döhner H (2006) Acute myeloid leukemia. *Lancet*, 368: 1894-1907.

Fedorov Y, Anderson EM, Birmingham A, Reynolds A, Karpilow J, Robinson K, Leake D, Marshall WS, Khvorova A (2006) Off-target effects by siRNA can induce toxic phenotype. *RNA*, 12: 1188-1196.

Fiolka K, Hertzano R, Vassen L, Zeng H, Hermesh O, Avraham KB, Dührsen U, Möröy T (2006) Gfi1 and Gfi1b act equivalently in haematopoiesis, but have distinct, non-overlapping functions in inner ear development. *Embo Rep*, 7: 326-333.

Fröhling S, Schlenk RF, Kayser S, Morhardt M, Benner A, Döhner K, Döhner H (2006) Cytogenetics and age are major determinants of outcome in intensively treated acute myeloid

leukemia patients older than 60 years: results from AMLSG trial AML HD98-B. *Blood*, 108:3280-3288.

Göttlicher M, Minucci S, Zhu P, Krämer OH, Schimpf A, Giavara S, Sleeman JP, Lo Coco F, Nervi C, Pelicci PG, Heinzel T (2001) Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J*, 20: 6969-6978.

Gilks CB, Bear SE, Grimes HL, Tschlis PN (1993) Progression of interleukin-2 (IL-2)-dependent rat T cell lymphoma lines to IL-2-independent growth following activation of a gene (Gfi-1) encoding a novel zinc finger protein. *Mol Cell Biol*, 13:1759-1768.

Greenblatt SM, Nimer SD (2014) Chromatin modifiers and the promise of epigenetic therapy in acute leukemia. *Leukemia*, 28: 1396-1406.

Grimes HL, Chan TO, Zweidler-McKay PA, Tong B, Tschlis PN (1996) The Gfi-1 proto-oncoprotein contains a novel transcriptional repressor domain, SNAG, and inhibits G1 arrest induced by interleukin-2 withdrawal. *Mol Cell Biol*, 16: 6263-6272.

Hörlein AJ, Näär AM, Heinzel T, Torchia J, Gloss B, Kurokawa R, Ryan A, Kamei Y, Söderström M, Glass CK, et al. (1995) Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature*, 377: 397-404.

Halsey C, Docherty M, McNeill M, Gilchrist D, Le Brocq M, Gibson B, Graham G (2012) The GATA1s isoform is normally down-regulated during terminal haematopoietic differentiation and over-expression leads to failure to repress MYB, CCND2 and SKI during erythroid differentiation of K562 cells. *J Hematol Oncol*, 5: 45.

Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD. (1999) World health organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the clinical advisory committee - Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol*, 17: 3835-3849.

Huang DY, Kuo YY, Chang ZF (2005) GATA-1 mediates auto-regulation of Gfi-1B transcription in K562 cells. *Nucleic Acids Res*, 16: 5331-5342.

Huang W, Horvath E, Eklund EA (2007) PU.1, interferon regulatory factor (IRF) 2, and the interferon consensus sequence-binding protein (ICSBP/IRF8) cooperate to activate NF1 transcription in differentiating myeloid cells. *J Biol Chem*, 282:6629-6643.

- Jin J, Zeng H, Schmid KW, Toetsch M, Uhlig S, Möröy T (2006) The zinc finger protein Gfi1 acts upstream of TNF to attenuate endotoxin-mediated inflammatory responses in the lung. *Eur J Immunol*, 36: 421-430.
- 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*, 113:4179-4187.
- Kalantry S, Delva L, Gaboli M, Gandini D, Giorgio M, Hawe N, He LZ, Peruzzi D, Rivi R, Tribioli C, Wang ZG, Zhang H, Pandolfi PP (1997) Gene Rearrangements in the Molecular Pathogenesis of Acute Promyelocytic Leukemia. *J Cell Physiol*, 173: 288-296.
- Karsunky H, Zeng H, Schmidt T, Zevnik B, Kluge R, Schmid KW, Dührsen U, Möröy T (2002) Inflammatory reactions and severe neutropenia in mice lacking the transcriptional repressor Gfi1. *Nat Genet*, 30:295-300.
- Kelly LM, Gilliland DG (2002) Genetics of myeloid leukemias. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 3:179-198.
- Khandanpour C, Thiede C, Valk PJ, Sharif-Askari E, Nüchel H, Lohmann D, Horsthemke B, Siffert W, Neubauer A, Grzeschik KH, Bloomfield CD, Marcucci G, Maharry K, Slovak ML, van der Reijden BA, Jansen JH, Schackert HK, Afshar K, Schnittger S, Peeters JK, Kroschinsky F, Ehniger G, Lowenberg B, Dührsen U, Möröy T (2010) A variant allele of Growth Factor Independence 1 (Gfi1) is associated with acute myeloid leukemia. *Blood*, 115: 2462-2472.
- Krug U, Büchner T, Berdel WE, Müller-Tidow C (2011) The treatment of elderly patients with acute myeloid leukemia. *Dtsch Arztebl Int*, 108:863-870.
- Kuendgen A, Strupp C, Aivado M, Bernhardt A, Hildebrandt B, Haas R, Germing U, Gattermann N (2004) Treatment of myelodysplastic syndromes with valproic acid alone or in combination with all-trans retinoic acid. *Blood*, 104: 1266-1269.
- Laurent B, Randrianarison-Huetz V, Kadri Z, Roméo PH, Porteu F, Duménil D (2009) Gfi-1B promoter remains associated with active chromatin marks throughout erythroid differentiation of human primary progenitor cells. *Stem Cells*, 27: 2153-2162.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 25: 402-408.

Lo-Coco F, Avvisati G, Vignetti M, Thiede C, Orlando SM, Iacobelli S, Ferrara F, Fazi P, Cicconi L, Di Bona E, Specchia G, Sica S, Divona M, Levis A, Fiedler W, Cerqui E, Breccia M, Fioritoni G, Salih HR, Cazzola M, Melillo L, Carella AM, Brandts CH, Morra E, von Lilienfeld-Toal M, Hertenstein B, Wattad M, Lübbert M, Hänel M, Schmitz N, Link H, Kropp MG, Rambaldi A, La Nasa G, Luppi M, Ciceri F, Finizio O, Venditti A, Fabbiano F, Döhner K, Sauer M, Ganser A, Amadori S, Mandelli F, Döhner H, Ehninger G, Schlenk RF, Platzbecker U; (2013) Retinoic acid and arsenic trioxide for acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med*, 369: 111-121.

Mayer RJ, Davis RB, Schiffer CA, Berg DT, Powell BL, Schulman P, Omura GA, Moore JO, McIntyre OR, Frei E 3rd (1994) Intensive Postremission Chemotherapy in Adults with Acute myeloid Leukemia. *N Engl J Med*, 331: 896-903.

McGhee L, Bryan J, Elliott L, Grimes HL, Kazanjian A, Davis JN, Meyers S (2003) Gfi-1 attaches to the nuclear matrix, associates with ETO (MTG8) and histone deacetylase proteins, and represses transcription using a TSA-sensitive mechanism. *J Biol Chem*, 278: 1005-1018.

Mendorano JF and Wong ML (2005) Real-time PCR for RNA quantitation. *Bio Techniques*, 39: 75-85.

Montoya-Durango DE, Velu CS, Kazanjian A, Rojas ME, Jay CM, Longmore GD, Grimes HL (2008) Ajuba functions as a histone deacetylase-dependent co-repressor for autoregulation of the growth factor-independence 1 transcription factor. *J Biol Chem*, 283: 32056-32065.

Nomura T, Khan MM, Kaul SC, Dong HD, Wadhwa R, Colmenares C, Kohno I, Ishii S (1999) Ski is a component of the histone deacetylase complex required for transcriptional repression by Mad and thyroid hormone receptor. *Genes Dev*, 13: 412-423.

Oki Y, Kantarjian HM, Zhou X, Cortes J, Faderl S, Verstovsek S, O'Brien S, Koller C, Beran M, Bekele BN, Pierce S, Thomas D, Ravandi F, Wierda WG, Giles F, Ferrajoli A, Jabbour E, Keating MJ, Bueso-Ramos CE, Estey E, Garcia-Manero G (2006) Adult acute megakaryocytic leukemia: an analysis of 37 patients treated at M.D. Anderson Cancer Center. *Blood*, 107: 880-884.

Pandolfi PP (2001) In vivo analysis of the molecular genetics of acute promyelocytic leukemia. *Oncogene*, 20: 5726-5735.

Park S, Picard F, Dreyfus F (2010) Erythroleukemia: a need for a new definition. *Leukemia*, 16: 1399-1401.

Patel JP, Gönen M, Figueroa ME, Fernandez H, Sun Z, Racevskis J, Van Vlierberghe P, Dalgic I, Thomas S, Aminova O, Huberman K, Cheng J, Viale A, Socci ND, Heguy A, Cherry A, Vance G, Higgins RR, Ketterling RP, Gallagher RE, Litzow M, van den Brink MR, Lazarus HM, Rowe JM, Luger S, Ferrando A, Paietta E, Tallman MS, Melnick A, Abdel-Wahab O, Levine RL (2012) Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia *N Engl J Med*, 366: 1079-1089.

Persengiv SP, Zhu X and Green MR (2004) Nonspecific, concentration-dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs). *RNA*, 10:12–18.

Quintás-Cardama A, Santos FPS and Garcia-Manero G (2011) Histone deacetylase inhibitors for the treatment of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 25: 226-235.

Randrianarison-Huetz V, Laurent B, Bardet V, Blobel GC, Huetz F, Duménil D (2010) Gfi-1B controls human erythroid and megakaryocytic differentiation by regulating TGF- β signaling at the bipotent erythro-megakaryocytic progenitor stage. *Blood*, 115: 2784-2795.

Ritter M, Kattmann D, Teichler S, Hartmann O, Samuelsson MK, Burchert A, Bach JP, Kim TD, Berwanger B, Thiede C, Jäger R, Ehninger G, Schäfer H, Ueki N, Hayman MJ, Eilers M, Neubauer A (2006) Inhibition of retinoic acid receptor signaling by Ski in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 20: 437-443.

Sanz MA, Martín G, González M, León A, Rayón C, Rivas C, Colomer D, Amutio E, Capote FJ, Milone GA, De La Serna J, Román J, Barragán E, Bergua J, Escoda L, Parody R, Negri S, Calasanz MJ, Bolufer P (2004) Risk-adapted treatment of acute promyelocytic leukemia with all-trans retinoic acid and anthracycline monotherapy: a multicenter study by the PETHEMA group. *Blood*, 103: 1237-1243.

Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, Fröhling S, Corbacioglu A, Bullinger L, Habdank M, Späth D, Morgan M, Benner A, Schlegelberger B, Heil G, Ganser A, Döhner H (2008) Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 358: 1909-1918.

Schmidt M, Bies J, Tamura T, Ozato K, Wolff L (2004) The interferon regulatory factor ICSBP/IRF-8 in combination with PU.1 up-regulates expression of tumor suppressor p15Ink4b in murine myeloid cells. *Blood*, 103: 4142-4149.

Schmidt, Zörnig M, Beneke R, Möröy T (1996) MoMuLV proviral integrations identified by Sup-F selection in tumours from infected myc/pim bitransgenic mice correlate with activation of the gfi-1 gene. *Nucleic Acids Res*, 24: 2528-2534.

Schmittgen TD and Kenneth JL (2001) Analysis of relative Gene Expression Data Using Real-Time PCR and the $2\Delta\Delta CT$ Method. *Methods*, 25: 402-408.

Shroyer NF, Wallis D, Venken KJ, Bellen HJ, Zoghbi HY (2005) Gfi1 functions downstream of Math1 to control intestinal secretory cell subtype allocation and differentiation. *Genes Dev*, 19: 2412-2417.

Smith A, Howell D, Patmore R, Jack A, Roman E (2011) Incidence of hematological malignancy by subtype: a report from the Hematological Research Network. *Br J Cancer*, 105:1684-1692.

Stavenger E, Gerhard DS, Binari RC, Balazs I (1981) Generation of transforming viruses in cultures of chicken fibroblasts infected with an avian leukosis virus. *J Virol*, 39: 920-934.

Stone RM, 'Donnell MR, Sekeres MA (2004) Acute Myeloid Leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 1: 98-117.

Tallman MS, Gilliland DG, Rowe JM (2005) Drug therapy for acute myeloid leukemia. *Blood*, 106: 1154-1163.

Teichler S, Illmer T, Roemhild J, Ovcharenko D, Stiewe T, Neubauer A (2011) MicroRNA29a regulates the expression of the nuclear oncogene Ski. *Blood*, 118: 1899-1902.

Teichler S, Schlenk RF, Strauch K, Hagner NM, Ritter M, Neubauer A (2008) Expression of the nuclear oncogene Ski in patients with acute myeloid leukemia treated with all-trans retinoic acid. *Hematologica*, 93: 1105-1107.

Ueki N, Zhang L, Hayman MJ (2008) Ski can negatively regulate macrophage differentiation through its interaction with PU.1. *Oncogene*, 27: 300-307.

Ueki N, Zhang L, Hayman MJ (2004) Ski negatively regulates erythroid differentiation through its interaction with GATA1. *Mol Cell Bio*, 24: 10118-10125.

Valk PJM, Verhaak RG, Beijen MA, Erpelinck CA, Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S, Boer JM, Beverloo HB, Moorhouse MJ, van der Spek PJ, Löwenberg B, Delwel R (2004) Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 350: 1617-1628.

Van der Meer LT, Jansen JH, van der Reijden BA (2010) Gfi1 und Gfi1b: key regulators of hematopoiesis. *Leukemia*, 24:1834-1843.

Vangala RK, Heiss-Neumann MS, Rangatia JS, Singh SM, Schoch C, Tenen DG, Hiddemann W, Behre G. (2003) The myeloid master regulator transcription factor PU.1 is inactivated by AML1-ETO in t(8;21) myeloid leukemia. *Blood*, 101: 270-277.

Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD (2002) The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*, 100: 2292-2302.

Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellström-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD (2009) The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*, 114:937-951.

Vardiman JW (2010) The World Health Organization (WHO) classification of tumors of the hematopoietic and lymphoid tissues: An overview with emphasis on the myeloid neoplasms. *Chem Biol Interact*, 184: 16-20.

Vassen L, Fiolka K, Mahlmann S, Möröy T (2005) Direct transcriptional repression of the genes encoding the zinc-finger proteins Gfi1b and Gfi1 by Gfi1b. *Nucleic Acids Res*, 33: 987-998.

Velu CS, B. M. (2008) The Ski oncoprotein regulates Hematopoietic Stem Cell Fitness and functions as a Corepressor for Gfi1. *American Society of Hematology. Online Program and Abstract*, 6-9, 1403.

Velu CS, K. A. (2011) A Microrna Feed-Foward Loop Amplifies GFI1N382S Transcriptional Reprogramming In Severe Congenital Neutropenia. *American Society of Hematology. Poster and Abstracts*, Hall A3/A4 Poster Border II-119.

Wilson JJ, Malakhova M, Zhang R, Joachimiak A, Hegde RS (2004) Crystal Structure of the Dachshund Homology Domain of Human SKI. *Structure*, 12: 785-792.

Wong ML, Mendrano JF, (2005) Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 39: 75-85.

Wu JJ, Krawitz AR, Chai J, Li W, Zhang F, Luo K, Shi Y (2002) Structural mechanism of Smad4 recognition by the nuclear oncoprotein Ski: insights on Ski-mediated repression of TGF- β signaling. *Cell*, 111: 357-367.

Yunis JJ, Brunning RD, Howe RB, Lobell M (1984) High-resolution chromosomes as an independent prognostic indicator in adult acute nonlymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 311: 812-818.

Zeng H, Yücel R, Kosan C, Klein-Hitpass L, Möröy T (2004) Transcription factor Gfi1 regulates self-renewal and engraftment of hematopoietic stem cells. *EMBO J*, 23: 4116-4125.

Zweidler-Mckay PA, Grimes HL, Flubacher MM, Tschlis PN (1996) Gfi-1 encodes a nuclear zinc finger protein that binds DNA and functions as a transcriptional repressor. *Mol Cell Biol*, 16: 4024-4034.

8 Abkürzungsverzeichnis

AML	Aktue myeloische Leukämie
APL	Akute Promyelozyten Leukämie
Ara-C	Cytosin-Arabinosid
ATRA	All-trans Retinsäure
BCA	Bicinchonininsäure
Bp	Basenpaare
CML	Chronisch myeloischen Leukämie
del	Deletion
DHD	Dachshund Domäne
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ETO	Eight-Twenty-One
FAB	French American British
FCS	Fetal Calf Serum
GFI-1	Growth-factor independence 1
HDAC	Histon-Deacetylase-Komplex
ICSBP	Interferon Sequence-Binding Protein
Inv	Inversion
IQR	Interquartilabstand
miRNA	micro-RNA
N-CoR	Nuclear Receptor Co-Repressor
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
RAR	Retinsäure-Rezeptor
RIPA	Radioimmunprecipitation-Assay

RNA	Ribonukleinsäure
SKI	Sloan Kettering Interfering
siRNA	small-interfering RNA
RT-PCR	Real-time Polymerase-Chain-Reaction
VPA	Valproinsäure
WHO	World Health Organization

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Model nach Gilliland.	4
Abbildung 2: Einteilung in die Risikogruppen.	5
Abbildung 3: Schematische Darstellung der SKI-Interaktion mit RAR α	8
Abbildung 4: Vereinfachte Darstellung von GFI-1 und seinen Interaktionspartnern.	10
Abbildung 5: VPA Versuch.	33
Abbildung 6: Kaplan-Meier Überlebenszeitanalyse der Patienten mit einer hohen bzw. niedrigen relativen SKI (RNA)-Expression (n = 58).	39
Abbildung 7: Kaplan-Meier Überlebenszeitanalyse der Patienten mit einer hohen bzw. niedrigen relativen GFI-1 (RNA)-Expression (n= 58).	40
Abbildung 8: Boxplot-Darstellung der relativen SKI (RNA)-Expression in den Risikogruppen (n=65).	41
Abbildung 9: Boxplot-Darstellung der relativen GFI-1 (RNA)-Expression in den Risikogruppen (n=65).	43
Abbildung 10: Streudiagramm der relativen SKI Expression im Bezug zur relativen GFI-1 Expression.	44
Abbildung 11: Relative RNA-Mengen von a) SKI, b.) GFI-1, c.) PU.1 und d.) ICSBP in U937- Zellen nach SKI Suppression mittels Transfektion von siRNA gegen SKI.	46
Abbildung 12: SKI, GFI-1 und β -ACTIN Expression in mit SKI spezifischer siRNA transfizierten HL60 Zellen (Western-Blot).	47
Abbildung 13: Relative RNA-Mengen von a.) SKI und b.) GFI-1 nach Suppression von SKI durch Transfektion mit siRNA in HL60 Zellen.	48
Abbildung 14: SKI, GFI-1 und β -ACTIN Produktion nach VPA Behandlung in HL60-Zellen.	49
Abbildung 15: Relative RNA-Mengen von SKI- (oben) und GFI-1- (unten) in mit VPA behandelten HL60-Zellen.	50
Abbildung 16: Vereinfachte Darstellung eines hypothetischen Feed-Forward Loops.	56

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Patiententabelle.....	13
Tabelle 2: Zusammensetzung der verwendeten Lösungen und Puffer.	21
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und Reagenzien.	22
Tabelle 4: Verwendete Kits.	23
Tabelle 5: Verwendete Primer für die PCR und ihre Primersequenzen.....	24
Tabelle 6: Verwendete Primer für die Taqman-PCR und ihre Sequenzen.....	24
Tabelle 7: Verwendete primäre Antikörper.....	24
Tabelle 8: Verwendete sekundäre Antikörper.....	25
Tabelle 9: Verwendete siRNA.....	25
Tabelle 10: Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	25
Tabelle 11: Paarweiser Vergleich der <i>SKI</i> Expression in den Risikogruppen.....	42

11 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren folgende Damen/Herren in Marburg:

Bartsch, Baum, Becker, Becker, Berger, Bien, Engenhart- Cabillic, Czubayko, Daut, Feuser, Fuchs-Winkelmann, Frangen, Gress, Grzeschik, Hertl, Höffken, Hofmann, Hoyer, Kann, Kircher, Klose, Koolman, Kühne, Moll, Kolb-Niemann, Lohoff, Maier, Maisch, Moosdorf, Mueller, Neubauer, Nimsky, Ocker, Oertel, Opitz, Pagenstecher, Plant, Renz, Richter, Röhm, Ruchholtz, Schäfer, Schmidt, Schofer, Sekundo, Vogelmeier, Wagner, Weihe, Werner, Wulf, Zettl

in Buenos Aires: Allegrí

in Zürich: Federspiel, Melcher

12 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Andreas Neubauer möchte ich für die Möglichkeit danken meine Arbeit in seinen Laboreinrichtungen umzusetzen, sowie für seine geduldige Betreuung und seinen unerschöpfliches Teaching in Klinik und Forschung.

Frau Dr. Sabine Teichler danke ich für die hervorragende Einarbeitung in die experimentelle Wissenschaft und die verlässliche Betreuung.

Frau Lisa- Marie Weiß, sowie Frau Kathleen Stabla danke ich für aufmunternde Gespräche und hilfreiche Tipps, sowie die bunte Gestaltung auch trister Labortage.

Der AG Burchert möchte ich für stete Hilfestellung und Unterstützung danken.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, Geschwistern und Großmutter, sowie meinen Freunden, deren tatkräftige Unterstützung und Aufmunterung zu jeder Zeit, ich sehr zu schätzen weiß.