

# Untersuchungen zum BMP-Signalling in BCR/ABL-positiven Zelllinien

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Ulrike Knobloch

geboren am 02.12.1990 in Leipzig

Gutachter:

1: Prof. Dr. Andreas Hochhaus, Jena

2: Prof. Dr. Ferdinand von Eggeling, Jena

3: Prof. Dr. Stefan Wöfl, Heidelberg

Tag der öffentlichen Verteidigung: 01.11.2016

letzter Tag des 3. Staatsexamens: 05.05.2017

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Verzeichnis der Abkürzungen</b>	<b>5</b>
1.1. Wortabkürzungen . . . . .	5
1.2. Chemische, mathematische und physikalische Abkürzungen . . . . .	8
<b>2. Zusammenfassung</b>	<b>10</b>
<b>3. Einleitung</b>	<b>12</b>
3.1. Chronische myeloische Leukämie . . . . .	12
3.1.1. Einleitung und Epidemiologie . . . . .	12
3.1.2. Klinik und Diagnostik . . . . .	12
3.1.3. Therapieoptionen . . . . .	14
3.2. BMP-Signalling . . . . .	18
3.2.1. BMPs und BMP-Rezeptoren . . . . .	18
3.2.2. Smad-Proteine und Regulation der Genexpression . . . . .	19
3.2.3. Inhibitor-of-DNA-binding-Protein 1 . . . . .	22
3.2.4. Inhibitoren . . . . .	23
3.2.5. Alternative Signalwege . . . . .	24
3.2.6. BMPs und Tumoren . . . . .	25
<b>4. Ziele der Arbeit</b>	<b>27</b>
<b>5. Material und Methoden</b>	<b>29</b>
5.1. Material . . . . .	29
5.1.1. Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien . . . . .	29
5.1.2. Fertiglösungen und Kits . . . . .	30
5.1.3. Chemikalien und Reagenzien . . . . .	31
5.1.4. Antikörper und Primer . . . . .	32
5.1.5. Puffer und Lösungen . . . . .	32
5.1.6. Geräte . . . . .	33
5.1.7. Programme . . . . .	34

5.1.8. Zelllinien . . . . .	34
5.2. Methoden . . . . .	34
5.2.1. Zellkultur . . . . .	34
5.2.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) . . . . .	35
5.2.3. Inkubationsversuche . . . . .	40
5.2.4. Western Blot . . . . .	42
5.2.5. Vitalitätsanalysen . . . . .	44
<b>6. Ergebnisse</b>	<b>47</b>
6.1. Vitalitätsanalysen unter BMP-2 und Dorsomorphin . . . . .	47
6.1.1. Presto Blue Assay . . . . .	47
6.1.2. Durchflusszytometrie . . . . .	49
6.2. Genexpressionsanalysen von BMPs und ihren Rezeptoren . . . . .	60
6.2.1. Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) . . . . .	60
6.2.2. Real-time RT-PCR . . . . .	61
6.2.3. Westernblot zum Nachweis von ActRIIA . . . . .	63
6.3. Westernblotanalysen zu Smad1 und ID1 . . . . .	64
<b>7. Diskussion</b>	<b>72</b>
<b>8. Schlussfolgerungen</b>	<b>88</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>89</b>
<b>A. Anhang</b>	<b>98</b>
A.1. Vitalitätsanalysen . . . . .	98
A.2. Genexpressionsanalysen . . . . .	105
A.3. Westernblotanalysen . . . . .	105
A.4. Danksagung . . . . .	107
A.5. Ehrenwörtliche Erklärung . . . . .	108

---

# 1. Verzeichnis der Abkürzungen

## 1.1. Wortabkürzungen

Abk.	Bezeichnung
ABL	Abelson-Tyrosinkinase
ActRIA	Activin-Rezeptor IA (Alk2)
ActRIB	Activin-Rezeptor IB
ActRIIA	Activin-Rezeptor IIA
ActRIIB	Activin-Rezeptor IIB
A. dest	destilliertes Wasser (Aqua dest.)
Ak	Antikörper
Akt	Proteinkinase B
ALL	Akute lymphatische Leukämie
Alk2	Activin-Rezeptor IA
Alk3	BMP-Rezeptor IA
Alk6	BMP-Rezeptor IB
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
BAMBI	BMP and Activin receptor membrane bound inhibitor
BCR	Breakpoint Cluster Region
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra large
bFGF	fibroblast growth factor
bHLH-Tkf.	basic Helix-loop-Helix Transkriptionsfaktoren
BMP	Knochenmorphogenesefaktor (bone morphogenetic protein)
BMPRIA	BMP-Rezeptor IA (BRIA = Alk3)
BMPRIB	BMP-Rezeptor IB (BRIB = Alk6)
BMPRII	BMP-Rezeptor II (BRII)
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (albumine from bovine serum)

CCyR	komplette zytogenetische Remission (complete cytogenetic remission)
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
KIT	CD117 (Stammzellfaktor-Rezeptor)
CML	Chronische Myeloische Leukämie
CP	Crossing Point
C-Smad	Co-Smad
Ct	Cycle threshold
CTGF	connective tissue growth factor
DSMZ	Dt. Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
DYRK	dual-specificity tyrosine-(y)-phosphorylation regulated kinase
EGF	epidermal growth factor
EPO	Erythropoietin
ERK8	extracellular signal-regulated kinase 8
ESCs	Embryonale Stammzellen (embryonic stem cells)
ET	Essentielle Thrombozythämie
ETS	E26 transformation specific (Transkriptionsfaktor)
FACS	Durchflusszytometrie (fluorescence activated cell sorting)
FCS	fötales Kälberserum (fetal calf serum)
FISH	Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung
FKBP12	FK506 binding protein
FLI1	friend leukemia integration 1 transcription factor
FLT3/ITD	Fms-like tyrosine kinase 3-Interne Tandem Duplikation
FOXO3	Forkhead-Box-Protein O3
HIPK2	homeodomain-interactiong protein kinase 2
HKG	house keeping gene
ID1/2/3	inhibitor-of-DNA-binding Protein 1/2/3
IL-3	Interleukin-3
I-Smad	Inhibitorisches Smad
JNK	c-Jun N-terminale Proteinkinase
kbp	Kilobasenpaare
K-562	Chronische Myeloische Leukämie Zelllinie im Stadium der Blastenkrise
KIT	CD117 (Tyrosinkinase; Stammzellfaktor-Rezeptor)
Lck	lymphocyte-specific protein tyrosine kinase
MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7 (Brustkrebszelllinie)
MELK	maternal embryonic leucine zipper kinase

MMR	hauptsächliche molekulare Antwort (major molecular response)
MNK1	MAPK interacting kinase 1
Mo7e	Akute Megakaryoblasten Leukämie Zelllinie
Mo7ep210	Akute Megakaryoblasten Leukämie Zelllinie mit transfiziertem BCR/ABL-Gen
mRNA	Boten-RNS (messenger RNA)
MYC	Myelocytomatose-Gen
OCT-4	octamer binding transcription factor 4
PAH	pulmonal-arterielle Hypertonie
PAK	protein activated kinases
PAX	paired box (Transkriptionsfaktoren)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PDGFR	platelet-derived growth factor receptor
Ph <sup>+</sup> /Ph <sup>-</sup>	Philadelphia-Chromosom-positiv/ -negativ
PHK	phosphorylase kinase
PMF	Primäre Myelofibrose
PV	Polyzythämia vera
pSmad1	phosphoryliertes Smad1
p38 MAPK	p38 Mitogen-activated protein kinase
qPCR	quantitative PCR
RAS	Proto-Onkogen (Rat sarcoma)
(rh) GM-CSF	(rekombinanter humaner) Granulozyten-Monozyten-Kolonie- stimulie- render Faktor (recombinant human granulocyte macrophage colony sti- mulating factor)
(rh) TGF- $\beta$	(rekombinanter humaner) Transformierender Wachstumsfaktor (re- combinant human transforming growth factor) $\beta$
RNase	Ribonuklease
RPL13A	ribosomales Protein L13A
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
R-Smad	Rezeptor-reguliertes-Smad
Runx1/2/3	Runt-related transcription factor 1/2/3
SBE	Smad-binding element
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
sf	serumfrei
sh	serumhaltig

SHC-Grb2	SHC-Growth factor receptor-bound protein 2
Smad	Sma and Mad related Protein
Smurf1/2	Smad ubiquitination regulatory factor 1/2
(c)Src	Tyrosinkinase (Akronym für cellular and sarcoma)
Tab.	Tabelle
TEL	ETV6 (Onkogen)
TF1	humane Erythämie Zelllinie
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TPT	translational kontrolliertes Tumorprotein (translationally-controlled tumor protein)

## 1.2. Chemische, mathematische und physikalische Abkürzungen

Abk.	Bezeichnung
A	Ampere
AMP	Adenosinmonophosphat
APC	Allophycocyanin
ATP	Adenosintriphosphat
AV	Annexin V
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (complementary DNA)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPBS	Dulbeccos Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (Dulbeccos Phosphate-Buffered Saline)
ds-DNA	doppelsträngige DNS
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde (hour)

---

HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase)
IFN- $\alpha$	Interferon- $\alpha$
mA	Milliampere
Min.	Minute
ml	Milliliter
M-MLV	murines Mäuseleukämievirus
mV	Millivolt
MW	Mittelwert
Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	Tetranatriumpyrophosphat
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	Natriumorthovanadat
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
PI	Propidiumiodid
PS	Phosphatidylserin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
sec	Sekunde
siRNA	small interfering RNA
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung (tris buffered saline)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U/ min	Umdrehungen pro Minute
UV	ultra violett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen (bei Prozentangaben)
XT MES	XT Laufpuffer
XT-SB	XT-Sample Buffer
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ M	Mikromolar

---

## 2. Zusammenfassung

Die chronische myeloische Leukämie (CML) ist eine myeloproliferative Erkrankung der pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen (Hochhaus 2004). Sie ist durch das Philadelphia-Chromosom gekennzeichnet, welches für das Fusionsprotein BCR/ABL kodiert. Knochenmorphogenesefaktoren (BMPs) gehören zur TGF $\beta$ -Superfamilie und sind Regulatoren der Zelldifferenzierung während der Embryonal- und Organentwicklung (Hogan 1996). Es konnte gezeigt werden, dass BMPs in der leukämischen Stammzellnische eine wichtige regulatorische Funktion innehaben (Laperrousaz et al. 2013). BMPs werden sowohl pro- als auch antitumorigene Aktivitäten zugeschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese überprüft, ob BCR/ABL die Sensitivität für BMP-Signale beeinflusst.

Die Zelllinien Mo7e (Akute Megakaryoblasten Leukämie), Mo7ep210 (Mo7e, stabil transfiziert mit dem BCR/ABL-Gen) und K-562 (CML, Blastenkrise) wurden mit RPMI1640 + 20% (Mo7e u. Mo7ep210) bzw. + 10% (K-562) FCS kultiviert. Die Mo7e erhielten außerdem 10 ng/ml GM-CSF. Die Expression relevanter Gene des BMP-Signalweges wurde qualitativ mit Reverse-Transkriptase-PCR und quantitativ mit real-time PCR bestimmt. Inkubationen wurden in Konzentrationen von 50 ng/ml BMP-2 und 10 mM Dorsomorphin bzw. DMSO vorgenommen. Untersuchungen auf Proteinebene wurden mittels Westernblot durchgeführt. Die Proteine aus den Zelllysaten wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Antikörperbindung auf der Blotmembran detektiert. Die Vitalität der Zellkulturen wurde durchflusszytometrisch nach Annexin V/ Propidiumiodid-Färbung vermessen.

BCR/ABL-positive Zelllinien weisen wichtige Komponenten des BMP-Signalweges auf. Allerdings konnte weder auf Expressions-, noch auf Proteinebene Smad1 nachgewiesen werden. Mit Smad1 fehlt das zentrale Protein, das nach Aktivierung durch die membranständigen Rezeptoren essentiell für die intrazelluläre Signalweiterleitung ist. Aus diesem Grunde zeigen sowohl BMPs, als auch der BMP-Inhibitor Dorsomorphin keine

Auswirkungen auf die Vitalität der Zelllinie Mo7ep210 im Gegensatz zur Mutterzelllinie Mo7e. Die Mo7e-Zellen sind sensitiv gegenüber BMP-2 und Dorsomorphin. Unter Zugabe von BMP-2 bleibt ihre Vitalität stabil, während sie unter Dorsomorphin apoptotisch-nekrotisch werden. Die Smad1-Phosphorylierung ist den Mo7e-Zellen nachweisbar.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Gegenwart von BCR/ABL mit dem Ausfall von Smad1 in Verbindung steht. Dies soll durch weitere Untersuchungen zur Struktur des Smad1-Gens, sowie dessen transkriptioneller Regulation aufgeklärt werden. Ebenso sollen die zum Teil deutlichen Expressionsunterschiede anderer BMP-Signalmoleküle (BMP-2, ActRIIA) analysiert werden.

---

## 3. Einleitung

### 3.1. Chronische myeloische Leukämie

#### 3.1.1. Einleitung und Epidemiologie

Die chronische myeloische Leukämie (CML) ist eine myeloproliferative Erkrankung (Hochhaus 2004). Ausgehend von einer pluripotenten hämatopoietischen Stammzelle kommt es zu klonalen Veränderungen in der Blutbildung. Der Klon enthält das Philadelphia-Chromosom, welches durch eine spezifische Translokation (t(9;22)(q34;q11)) entstanden ist. Durch diese Chromosomenaberration wird das Gen der Abelson (ABL)-Tyrosinkinase auf Chromosom neun mit der Breakpoint Cluster Region (BCR) auf Chromosom 22 verbunden. Es entsteht das Fusionsprotein BCR/ABL, welches eine konstitutive Tyrosinkinaseaktivität aufweist und ursächlich für die onkogene Transformation des Klons ist.

Mit etwa 1200 Neuerkrankungen hat die CML eine Inzidenz von 1,5/100000 Einwohner und Jahr in Deutschland (Hochhaus 2013). Wenngleich die CML in allen Altersgruppen vorkommen kann, so gibt es doch einen Gipfel zwischen dem 55. und 60. Lebensjahr. Männer erkranken etwas häufiger als Frauen. Zum Stand Januar 2013 betrug die Mortalität von CML-Patienten 1,5% pro Jahr. Es wird beobachtet, dass die Prävalenz der Erkrankung ansteigt, wobei die Inzidenz konstant bleibt, die Überlebenszeit der Betroffenen sich jedoch dank neuer Therapien mit Tyrosinkinaseinhibitoren (TKIs) erheblich verlängert.

#### 3.1.2. Klinik und Diagnostik

Die Diagnose chronische myeloische Leukämie wird nicht selten zufällig gestellt, da die Erkrankung asymptomatisch verlaufen kann. Die CML wird in drei Krankheitsphasen eingeteilt. Häufig wird die Erkrankung in der chronischen Phase diagnostiziert, welche mehrere Jahre andauern kann. In diesem Zeitraum können Symptome der Anämie und

Splenomegalie (in 50-60%) wegweisend sein (Jabbour und Kantarjian 2014). Im Labor ist eine Leukozytose mit pathologischer Linksverschiebung zu erkennen. Sowohl die eosinophilen und/ oder die basophilen Granulozyten, als auch die Thrombozyten können erhöht sein. Wenn die Patienten Auffälligkeiten bemerken, so sind dies Müdigkeit und Abgeschlagenheit, allgemeines Unwohlsein, Appetitlosigkeit, Gewichtsverlust und Schmerzen im linken Oberbauch (Hochhaus 2013). Wird die CML in diesem Stadium diagnostiziert, so wird unmittelbar mit der Therapie in Form von Tyrosinkinaseinhibitoren begonnen und die Ausprägung der folgenden Stadien kann unterbunden werden. Etwa 80% der unbehandelten Patienten erleben im Anschluss an die chronische Phase die akzelerierte Phase mit einer Verschlechterung der Anämie und Splenomegalie und einer möglichen Organinfiltration (Jabbour und Kantarjian 2014). Auch diese zweite Phase kann sich über mehrere Monate erstrecken, bevor sie in die Blastenkrise übergeht. Diese dritte Phase der CML entspricht einer akuten Leukämie und kann unbehandelt innerhalb weniger Wochen zum Tode führen. Etwa 20% der nicht in der chronischen Phase diagnostizierten und therapierten Patienten treten direkt in die Blastenkrise ein und präsentieren einen fulminanten Verlauf (Jabbour und Kantarjian 2014).

Zur Diagnostik der CML wird neben der Anamneseerhebung und der körperlichen Untersuchung ein Blutbild angefertigt. Darin kommt es zu einer Linksverschiebung mit unverhältnismäßig vielen Progenitor-Zellen der myeloischen Reihe. Es kann eine Eosinophilie und/ oder Basophilie auftreten. Die Thrombozytenzahl kann im Referenzbereich oder darunter liegen. Häufig wird anhand der Erythrozytenzahl und des Hämoglobins der klinische Verdacht einer Anämie bestätigt. Differentialdiagnostisch sollten immer auch reaktive Leukozytosen in Betracht gezogen werden, welche durch Infektionen, rheumatische Erkrankungen oder unerwünschte Medikamentennebenwirkungen entstehen. Auch andere chronische, myeloproliferative Neoplasien, wie die Essentielle Thrombozythämie (ET), die Polycythaemia vera (PV) oder die Primäre Myelofibrose (PMF) sollten ausgeschlossen werden. Nicht zuletzt ist es möglich, dass eine atypische, BCR/ABL-negative CML vorliegt.

Einen besonderen Stellenwert für die Diagnostik und weitere Therapieverlaufskontrolle hat der Nachweis von BCR/ABL-Transkripten aus dem peripheren Blut in der PCR (Polymerase-Kettenreaktion). Das BCR/ABL-Fusionsgen ist das typische zytogenetische Merkmal von CML-Zellen auf dem Philadelphia-Chromosom. Das Philadelphia-Chromosom (22q-) wurde 1960 von Peter Nowell und David Hungerford entdeckt und beschreibt

ein verkürztes Chromosom 22 (Nowell und Hungerford 1960, Chandra et al. 2011). Es wurde nach dem Ort seiner Entdeckung benannt. Das Philadelphia-Chromosom entsteht durch Brüche an den langen Armen der Chromosomen neun und 22 und die Anlagerung der Bruchstücke an das jeweils andere Chromosom. Dieser Prozess wird als reziproke Translokation bezeichnet. Dadurch wird Chromosom neun verlängert (9q+) und Chromosom 22 verkürzt (22q-). Chromosom neun bricht in der Unterbande 9q34.1 im Bereich des ABL-Protoonkogens. Das ABL-Protein wird ubiquitär exprimiert, kommt als Wildtyp nur im Zellkern vor und ist eine Tyrosinkinase ohne Rezeptorfunktion (Hochhaus 2004). Die ABL-Kinase ist an der Regulation des Zellzyklus, der Reaktion auf radioaktive Strahlung und der Informationsweitergabe über die Zellumwelt beteiligt (Hochhaus 2004). Das ABL-Gen wird nahezu vollständig auf das Chromosom 22 transloziert (Hochhaus 2004). Die Bruchstelle in Chromosom 22 liegt innerhalb der Unterbande 22q11.21, welcher das BCR-Gen zugeordnet wird. Welche Funktion das hierdurch kodierte BCR-Protein erfüllt, ist noch nicht vollständig geklärt. BCR-Knockout-Mäuse sind vollständig lebensfähig (Hochhaus 2004). Durch reziproke Translokation kommt es in der Folge zur Anlagerung des abgebrochenen ABL-Gens an das verkürzte BCR-Gen und zur Entstehung des chimären BCR/ABL-Gens. Der BCR-Promotor übernimmt die Transkription des fusionierten Gens, wobei immer mindestens das erste Exon transkribiert wird, welches für die Kinaseaktivität des Proteins verantwortlich ist (Hochhaus 2004).

Auch im Knochenmark können Philadelphia-Chromosomen nachgewiesen werden. Dazu wird eine Metaphasen-Analyse der Zellen aus einem Knochenmarksaspirat vorgenommen. Im Aspirat werden weiterhin die Anteile an Blasten und Promyelozyten bestimmt, sowie das übermäßige Vorkommen von eosinophilen und basophilen Granulozyten untersucht. Bei der Knochenmarksbiopsie wird ebenfalls die Blastenzahl und deren Verteilung bestimmt.

### 3.1.3. Therapieoptionen

Bis vor etwa 14 Jahren war man in der medikamentösen Therapie der CML auf unspezifische Pharmaka wie Busulfan, Hydroxyurea und Interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) angewiesen (Jabbour und Kantarjian 2014). IFN- $\alpha$  führte zwar zur Regression der Erkrankung und zu einem verbesserten Überleben, die in Kauf zu nehmende Toxizität war jedoch sehr hoch. Allogene Stammzelltransplantationen wurden bei denjenigen Patienten vorgenommen, die stabil genug waren und deren Risiken der Morbidität und Mortalität eher gering eingeschätzt wurden.

Einen Meilenstein in der CML-Therapie bedeutete die Markteinführung von Imatinib (STI571) in den USA und in Deutschland im Jahre 2001. Dieser erste Tyrosinkinaseinhibitor (TKI) verbesserte das Zehnjahresüberleben von Patienten von etwa 20% auf 80-90% (Jabbour und Kantarjian 2014). Imatinib ist ein kompetitiver Inhibitor an der ATP-Bindungsstelle der BCR/ABL-Tyrosinkinase. Der TKI blockiert damit selektiv die Aktivierung weiterer Proteine des Signalweges, indem die Übertragung des Phosphatrestes von ATP auf die Substrate der Kinase verhindert wird. Zwar wird auch die physiologische ABL-Kinase durch Imatinib gehemmt, doch in gesunden Zellen existieren ausreichend alternative Signalwege, um Zellvitalität und -funktion zu gewährleisten. CML-Zellen dagegen sind auf die funktionstüchtige BCR/ABL-Kinase angewiesen und werden durch deren Ausfall stark beeinträchtigt. Die Proliferation des malignen Klons wird blockiert. Neben der BCR/ABL-Kinase hemmt Imatinib ebenfalls den platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) und die KIT Tyrosinkinase (Woessner et al. 2011).

In der International Randomized Study of Interferon and STI571 (IRIS) wurden 1106 Patienten eingeschlossen, von denen 553 eine tägliche Dosis von 400 mg Imatinib erhielten, während die Kontrollgruppe mit IFN- $\alpha$  und niedrigen Dosen Cytarabin subkutan therapiert wurde (O'Brien et al. 2003). Nach einem mittleren Follow-up von 19 Monaten waren die Behandlungserfolge der Imatinib-Gruppe signifikant besser als die der Vergleichsgruppe. Die Rate der kompletten zytogenetischen Antwort (CCyR = keine Ph+ Metaphasen von mindestens 20 Zellen (Baccarani et al. 2013)) lag bei 76,2% unter Imatinib respektive 14,5% unter der Kombinationstherapie ( $P < 0,001$ ). Nach 18 Monaten lag die Rate der Patienten, die keine Progression zur akzelerierten Phase oder Blastenkrise erlitten hatten, bei 96,7% in der Imatinib-Gruppe und bei 91,5% in der Kontrollgruppe ( $P < 0,001$ ). Imatinib wurde zudem wesentlich besser vertragen als die Kombination aus IFN- $\alpha$  und Cytarabin.

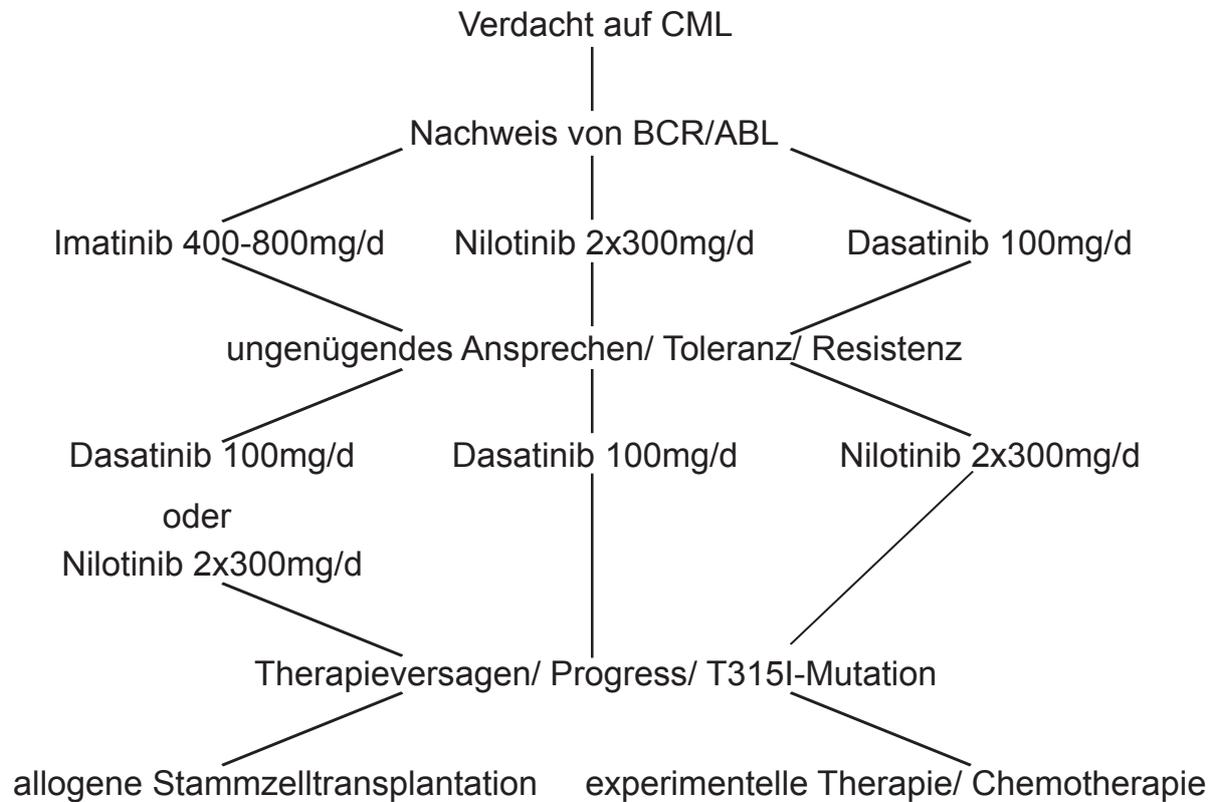
Trotz dieser Erfolge gibt es Patienten, die nicht auf Imatinib ansprechen oder die Therapie nicht tolerieren. Mutationen im BCR/ABL-Gen gehören zu den häufigsten Gründen für eine Imatinibresistenz bei CML-Patienten (Pagnano et al. 2015). Die T315I-Mutation auf der ABL-Domäne des Gens tritt besonders häufig auf und ist mit einem schlechten Outcome assoziiert. Bis heute ist die Mehrheit der verfügbaren Tyrosinkinaseinhibitoren nicht wirksam gegen die T315I-Mutation (Rosso et al. 2015).

Im Jahre 2006 kam Dasatinib auf den Markt, welches um ein Vielfaches potenter ist als Imatinib und außer der BCR/ABL-Kinase auch die Kinasen der Src-Familie hemmt (Jabbour und Kantarjian 2014). Zunächst kam Dasatinib nur als Zweitlinientherapie bei Therapieversagen oder Unverträglichkeit zum Einsatz. 2010 wurde es dann auch für die Erstlinientherapie zugelassen. In der DASISION-Studie wurde die Wirksamkeit von Dasatinib (100 mg/d) im Vergleich zu Imatinib (400 mg/d) untersucht (Kantarjian et al. 2010). 77% der Patienten im Dasatinib-Arm befanden sich nach zwölf Monaten in der kompletten zytogenetischen Remission, während dies nur auf 66% der Patienten in der Imatinib-Gruppe zutraf. Auch im Follow-up nach drei Jahren zeigte sich, dass Dasatinib eine schnellere und bessere Remission zu früheren Zeitpunkten erreichte als Imatinib (Jabbour et al. 2013). Allerdings hat Dasatinib auch unerwünschte Nebenwirkung wie eine Erhöhung des Risikos für Pleuraergüsse (Jabbour und Kantarjian 2014) und für pulmonale arterielle Hypertonie (PAH) (Montani et al. 2012). Die Thrombozytenfunktion kann unter Dasatinib eingeschränkt sein und wenn der Patient zeitgleich unter Antikoagulation steht, steigt auch das hämorrhagische Risiko (Quintás-Cardama et al. 2009).

Nilotinib ist der dritte für die Erstlinientherapie zugelassene TKI und seit 2008 auf dem deutschen Markt erhältlich. Nilotinib ist deutlich wirksamer als Imatinib. In der ENESTnd-Studie wurde die Wirksamkeit zweier Dosen Nilotinib täglich (300 oder 400 mg) verglichen mit Imatinib 400 mg pro Tag (Saglio et al. 2010). Der primäre Endpunkt dieser Studie war das gute molekulare Ansprechen („major molecular response“, MMR) nach zwölf Monaten. Dieses Ziel wurde für beide Dosen Nilotinib mit einer höheren Wahrscheinlichkeit erreicht als mit Imatinib. Es ergaben sich 44% und 43% unter Nilotinib gegenüber 22% in der Imatinib-Gruppe ( $P < 0,001$ ). Besonders kritisch sollte man die Verwendung von Nilotinib bei Diabetikern betrachten, da als Nebenwirkung Hyperglykämien entstehen können (Jabbour und Kantarjian 2014). Eventuell kann es auch zu einer verlängerten Herzkammererregung (QT-Zeit) und zu kardiovaskulären Nebenwirkungen kommen (Quintás-Cardama et al. 2012).

Alle drei genannten Tyrosinkinaseinhibitoren sind in Deutschland für die Erstlinientherapie der CML zugelassen. Die TKIs der zweiten Generation, Dasatinib und Nilotinib, zeigen zeitiger ein besseres Ansprechen, ihre Langzeitwirkung muss allerdings noch untersucht werden. Je nach Patient, dessen Begleiterkrankungen und dem Nebenwirkungsprofil der Medikamente muss die Therapie sorgfältig gewählt werden. Bei Nichtansprechen oder Unverträglichkeit wird der Wirkstoff gewechselt. Allogene Stammzelltransplanta-

tionen und andere Chemotherapien sind dank der neuen Entwicklungen jedoch obsolet geworden.



**Abbildung 3.1.:** Therapiealgorithmus für die Erstlinientherapie der CML in der chronischen Phase angelehnt an <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/chronische-myeloische-leukaemie-cml/@@view/html/index.html>

## 3.2. BMP-Signalling

### 3.2.1. BMPs und BMP-Rezeptoren

Bone morphogenetic proteins (BMPs bzw. Knochenmorphogenesefaktoren) bilden eine Gruppe von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, welche der TGF $\beta$ -Superfamilie angehören. Diese Familie der Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) Wachstumsfaktoren übernimmt viele wesentliche Aufgaben während der Embryonalzeit und späteren Entwicklung des Menschen (Hogan 1996). Auch BMPs spielen eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von Zellen und Geweben. BMPs wurden im Zusammenhang mit der Osteogenese entdeckt (Urist 1965). Die ersten Proteine (BMP-1, -2 und -3) wurden aus demineralisiertem Rinderknochen gewonnen und waren in der Lage, die Bildung von Knorpel- und Knochengewebe zu induzieren, wenn sie in Versuchstiere eingebracht wurden (Wozney et al. 1988). Ihr Name ist irreführend, denn sie sind nicht nur an der Reifung von Knochen, sondern an der Bildung fast aller Gewebe und Organe beteiligt. Nachgewiesen ist ihr Beitrag zur Entwicklung von Nervengewebe, Lungen, Nieren, Haut und Keimdrüsen (Hogan 1996). Dabei spielen BMPs eine entscheidende Rolle bei vielen biologischen Prozessen, wie zum Beispiel der Zellproliferation und -differenzierung, bei der Apoptose und Morphogenese. Das TGF $\beta$ -Signalling hat im Allgemeinen einen negativen Einfluss auf das Zellwachstum. Die Inaktivierung dieser Signalwege kann somit zum Wachstum und zur Kanzerogenese beitragen (Shi und Massagué 2003). BMPs werden zunächst von Stromazellen, Megakaryozyten und Thrombozyten als große Vorläufermoleküle synthetisiert, welche in der Folge prozessiert und proteolytisch gespalten werden (Laperrousaz et al. 2013). Es entstehen Protein-Dimere. Abhängig von ihrer Konzentration und der Art der Zielzelle können BMPs verschiedene, mitunter auch gegensätzliche biologische Prozesse initiieren (Shi und Massagué 2003).

BMPs sind Liganden von transmembranären Rezeptor-Tyrosin-Kinasen. Von diesen Serin-Threonin-Kinasen existieren im menschlichen Genom zwölf Vertreter, die ausnahmslos Teil des TGF $\beta$ -Signallings sind (Manning et al. 2002). Es gibt sieben Typ I und fünf Typ II Rezeptoren. Sechs von diesen zwölf Rezeptoren können BMPs binden (Sieber et al. 2009). Dazu gehören die Typ I Rezeptoren Activin-Rezeptor IA (auch Alk2), BMP-Rezeptor IA (auch BR1A o. Alk3) und BMP-Rezeptor IB (BR1B o. Alk6), sowie die Typ II Rezeptoren BMP-Rezeptor II (BR2), Activin-Rezeptor I (ActRI) und Activin-Rezeptor II (ActRII). Je ein Typ II Rezeptor bildet, induziert durch Ligandenbindung, einen heterodimeren Komplex mit einem Typ I Rezeptor und phosphoryliert diesen.

BMP-2 und -4 haben eine hohe Affinität zur extrazellulären Bindungsdomäne der Typ I Rezeptoren und eine im Vergleich niedrigere Affinität den Rezeptoren vom Typ II gegenüber (Shi und Massagué 2003). Diese beiden BMPs binden zunächst an den Typ I Rezeptor. Der entstandene Ligand-Rezeptor-Komplex hat eine erhöhte Affinität für den Typ II Rezeptor und es kommt zur Heterodimerisierung der Rezeptoren. Der durch Phosphorylierung durch Typ II aktivierte Typ I Rezeptor kann nun seinerseits intrazelluläre Signalproteine wie Smad1 phosphorylieren.

Ein beschriebener Corezeptor des BMP-Signallings ist DRAGON (Samad et al. 2005). Hierbei handelt es sich um ein Glycosylphosphatidylinositol-verankertes Mitglied der repulsive guidance molecule Familie. DRAGON interagiert direkt mit BMP-Rezeptoren vom Typ I und II, wobei es jedoch ausschließlich die BMP-Wirkung verstärkt. Auf das TGF $\beta$ -Signalling hat es keinen Einfluss. DRAGON bindet BMP-2 und -4, jedoch nicht BMP-7 oder TGF $\beta$ -Liganden.

### 3.2.2. Smad-Proteine und Regulation der Genexpression

Wenn durch Bindung der BMP-Liganden die Aktivierung der BMP-Rezeptoren erfolgt ist, wird das Signal intrazellulär auf Smad-Proteine übertragen. Diese sind für die Signalweiterleitung in den Zellkern und die Regulation der Genexpression zuständig. Smad-Proteine gehören zu einer Familie von Proteinen, die den Produkten des *Drosophila* Gens „Mothers against decapentaplegic“ (Mad) und des *Caenorhabditis elegans* Gens „Sma“ ähneln (Liu et al. 1996). Hieraus ergab sich auch der Name Smad. Es sind acht Smad-Proteine bekannt, welche nach ihrer Funktion in drei Gruppen eingeteilt werden können (Shi und Massagué 2003). Zu den rezeptorregulierten Smads (R-Smads) gehören Smad1, 2, 3, 5 und 8. Diese liegen hauptsächlich im Zytoplasma vor und werden direkt durch die Kinasedomäne des BMP-Rezeptors vom Typ I phosphoryliert. Des Weiteren gibt es ein Co-Smad (C-Smad), Smad4, welches zur Translokation der R-Smads in den Zellkern benötigt wird. Die dritte Gruppe bilden Smad6 und 7, die inhibitorischen Smads (I-Smads). Smad6 kann Smad4 binden und somit die Komplexbildung mit dem aktivierten Smad1 verhindern. Smad7 dagegen tritt als kompetitiver Inhibitor am aktivierten Rezeptorkomplex auf (Shi und Massagué 2003).

BMPs haben eine hohe Affinität zur extrazellulären Ligandenbindungsdomäne der Typ I Rezeptoren, hingegen eine niedrige Affinität zu den Typ II Rezeptoren. Durch die Bindung des Liganden an den Rezeptor kommt es intrazellulär zu einer Annä-

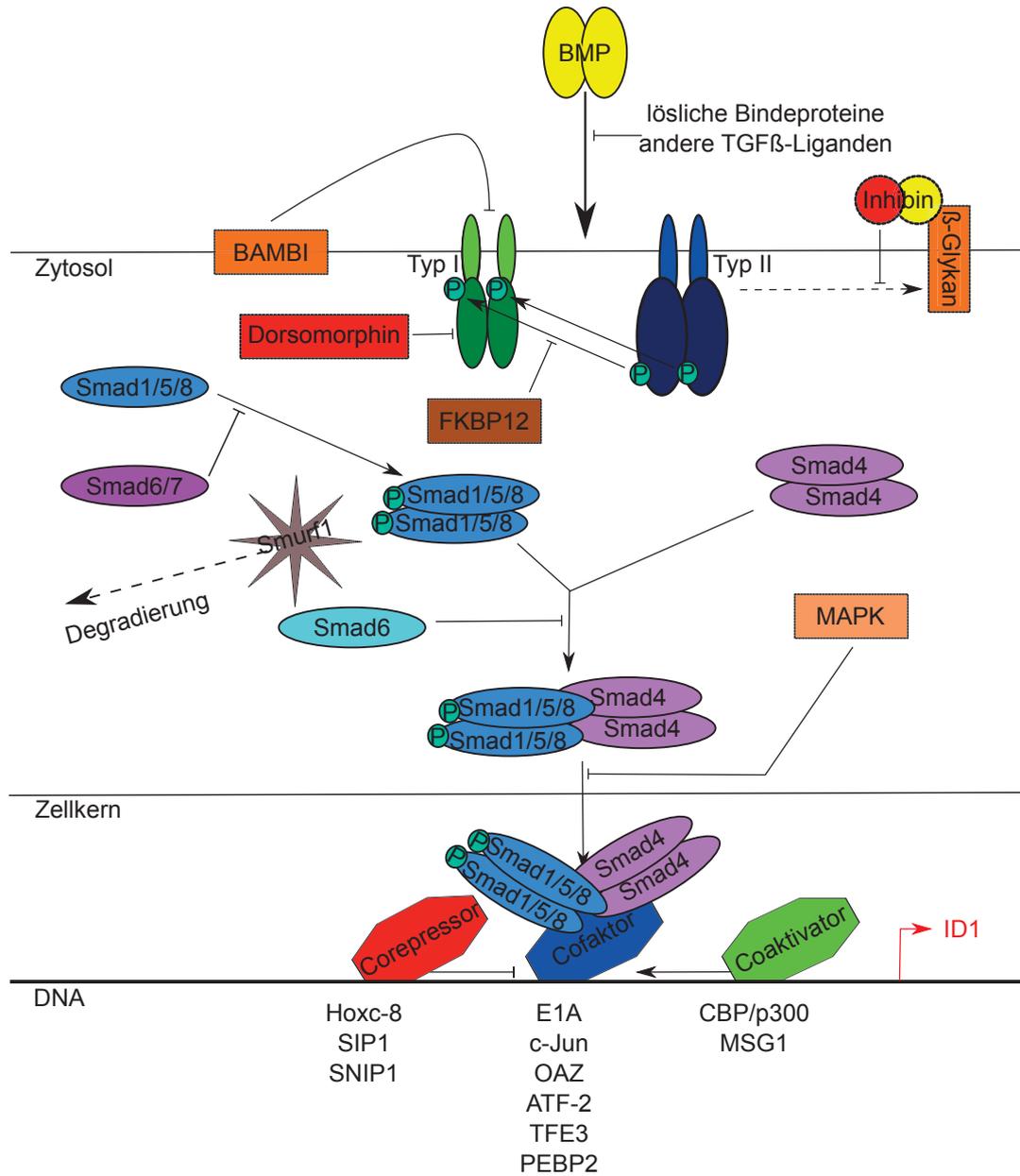


Abbildung 3.2.: Die BMP-Signalkaskade. Schema adaptiert nach Shimasaki et al. 2004.

herung der beiden Rezeptortypen. Die Kinasedomäne des Typ II Rezeptors phosphoryliert den Typ I Rezeptor und dessen Kinase ist nun in der Lage, ein unphosphoryliertes Smad zu aktivieren. Die Rezeptoren bleiben für einige Stunden aktiv und es kommt zyklisch immer wieder zur Phosphorylierung und Dephosphorylierung der R-Smads, so dass der Aktivitätsstatus des Rezeptors regelmäßig erfasst wird und eine Beendigung des Signallings auf die Rezeptorinaktivierung folgen kann (Shi und Massagué 2003). Phosphorylierte, aktivierte R-Smads bilden im Zytosol Homodimere, lagern sich mit Smad4 zu einem Komplex aus zwei R-Smads und zwei Smad4-Proteinen zusammen und können in dieser Konstitution in den Zellkern eintreten. Smad4 und alle R-Smads außer Smad2 können dort sequenzspezifisch an die DNA binden und die Expression von Zielgenen steigern oder supprimieren (Shi und Massagué 2003).

Die Smads 1, 5 und 8, welche direkt vom BMP-Rezeptor Typ I aktiviert werden, binden im Zellkern an DNA-Bindeproteine. Diese wiederum erkennen und binden spezifische Sequenzen in den Promotorregionen von BMP-Zielgenen. Die spezifischen DNA-Abschnitte werden als Smad-binding elements (SBE) bezeichnet und bestehen aus AGAC- oder GTCT-Sequenzen (Mukhopadhyay et al. 2008).

Die Expression von Smads kann durch verschiedene Prozesse reguliert werden, wobei man sich deren Aktivität nicht absolut im Sinne eines „an“ oder „aus“, sondern quantitativ vorzustellen hat (Wrana 2000). Es ist entscheidend, wie viele Smad-Proteine vorhanden und aktiviert sind. Smads werden von Kinasen durch Phosphorylierung aktiviert. Wichtiges Beispiel ist hier die Kinasedomäne des BMP-Rezeptors Typ I. Die Inaktivierung erfolgt durch Phosphatasen, die wesentlich unspezifischer als Kinasen die Proteine dephosphorylieren (Bruce und Sapkota 2012). E3-Ubiquitin-Ligasen sind entscheidend am Abbau von Smads beteiligt. Smurf1 (Smad ubiquitination regulatory factor 1; s. Abb. 3.2) gehört zur Hect-Familie der E3-Ubiquitin-Ligasen und hemmt selektiv Rezeptor-regulierte Smads des BMP-Signallings wie Smad1 und Smad5 (Zhu et al. 1999). Gleichzeitig erhöht Smurf1 die Empfänglichkeit der Zellen für Activin- bzw. TGF $\beta$ -Signale, die über Smad2 vermittelt werden. Smurf2 zählt ebenfalls zur Hect-Familie der E3-Ubiquitin-Ligasen und ist in der Lage, R-Smads zu degradieren. In höheren Konzentrationen senkt die Ligase auch das Smad2-Niveau in den Zellen (Zhang et al. 2001). Die Anwesenheit von Ras-Mutationen kann zu einer Verminderung des Smad-Signallings führen. Ras bewirkt über die Erk-MAP-Kinase eine Phosphorylierung der Smads 2 und 3, wodurch die Smad-abhängige Transkription gehemmt wird (Kretschmar et al. 1999).

Wang und Kollegen haben den Einfluss des Tumornekrosefaktors  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) auf die mRNA-Expression von Smad1 in mesenchymalen Knochenmarksstammzellen (bone marrow mesenchymal stem cells = BMSCs) untersucht. Sie konstatieren, dass niedrige Konzentrationen von TNF- $\alpha$  über eine kurze Zeit eine Steigerung der Smad1-mRNA bewirken und die Knochendifferenzierung vorantreiben. Über einen längeren Zeitraum kehre sich diese Wirkung jedoch um und es komme zu einer Abnahme des Smad1-mRNA-Niveaus. Hohe Konzentrationen von TNF- $\alpha$  inhibieren die Smad1-Expression unabhängig von der Dauer der Einwirkung (Wang et al. 2015).

Die TGF $\beta$ -Signalwege, wie dargestellt in Abbildung 3.2 am Beispiel des BMP-Signallings, regulieren mehrere hundert Gene sowohl positiv als auch negativ (Kang et al. 2003). Dabei ist die Art der Genantwort abhängig vom Zelltyp und Zelltyp-spezifischen Partnerproteinen (Massague 2000). Betrachtet man Smad-Proteine isoliert, so erkennen diese zwar die DNA, binden jedoch nur mit einer sehr geringen Affinität daran (Shi et al. 1998). Sind jedoch sowohl Koaktivatoren als auch Korepressoren der DNA vorhanden, so sind Smads in der Lage, mit diesen zu interagieren. Die Bildung vieler verschiedener Komplexe wird möglich, welche wiederum mit sehr hoher Affinität und Spezifität an ganz bestimmte Gruppen von Genen binden können (Derynck et al. 1998). Die Verfügbarkeit dieser Kofaktoren ist vom Entwicklungsstand der Zelle und den auf sie einwirkenden Umwelteinflüssen abhängig (Kang et al. 2003). Beispiele für Zielgene des BMP-Signallings sind die Inhibitor-of-DNA-binding-Proteine (ID) 1, 2 und 3. ID-Proteine tragen zum Verbleib der Zellen im Zellzyklus und damit zur Proliferation der Zellen bei (Kang et al. 2003).

### 3.2.3. Inhibitor-of-DNA-binding-Protein 1

ID1 ist bekannt als früher Marker von Stammzeleigenschaften einer Zelle. Stammzellen sind undifferenziert und pluripotent, bevor sie sich teilen und ihre Tochterzellen sich zu gesunden gewebebildenden Zellen differenzieren. In Analogie dazu sind auch Tumorzellen undifferenziert. Ein wichtiger Faktor, der Zellen - Stammzellen sowie auch Tumorzellen - in diesem undifferenzierten Zustand bewahren kann, ist ID1 (Benezra et al. 1990).

ID1 ist ein Zielgen des BMP-Signallings, dessen Transkription durch BMPRI-aktivierte Smads (1, 5, 8) im Komplex mit Smad4 reguliert wird. In der Promotorregion des ID1 auf der DNA wurden zwei spezifische Gensequenzen identifiziert, welche für BMP-Signale

empfänglich sind. Dabei handelt es sich um Smad-binding elements (SBE) und GC-reiche Abschnitte (Mukhopadhyay et al. 2008).

ID1 gehört zu den Helix-loop-Helix Proteinen. Diese bilden im Allgemeinen Komplexe mit Helix-loop-Helix Transkriptionsfaktoren und können in dieser Form an DNA-Abschnitte binden. Im Falle des ID1 fehlt die funktionsbestimmende, DNA-bindende Domäne, sodass der Transkriptionsfaktor an seiner Bindung an die DNA gehindert wird und seine Funktion nicht ausführen kann (Benezra et al. 1990); (Sun et al. 1991). Über das Binden von basic Helix-loop-Helix (bHLH) Transkriptionsfaktoren, die sich in der Folge ihrerseits nicht mehr an die DNA anlagern können, erreichen ID-Proteine somit eine Blockade der Transkription.

Die ID-Familie besteht aus vier verschiedenen Proteinen, deren gemeinsame Wirkung die Inhibition biologischer Differenzierung ist. Neben bHLH-Transkriptionsfaktoren hemmen sie außerdem E26 transformation specific (ETS) und paired box (PAX) Transkriptionsfaktoren. Sie werden in vielen verschiedenen Tumorentitäten überexprimiert und sind wichtige Bestandteile onkogener Signalwege, während sie von Tumorsuppressoren gehemmt werden. ID-Proteine sorgen für vermehrte Proliferation, den Erhalt der Selbsterneuerungsfunktion und die Multipotenz der Zellen.

### 3.2.4. Inhibitoren

Die Rezeptoraktivierung und Initiierung des BMP-Sigallings wird sehr streng reguliert. Es gibt vier verschiedene Mechanismen der Inhibition (siehe Abbildung 3.2). Die erste Gruppe bilden lösliche Proteine, die als Ligandenbindungsfallen fungieren. BMPs werden durch Follistatin oder durch Mitglieder der Proteinfamilien Noggin, Chordin/ SOG und DAN/ Cerberus gebunden und an der Erkennung von BMP-Rezeptoren gehindert. Die zweite Gruppe bilden sogenannte „small molecules“. Diese kleinen Moleküle binden an BMP-Rezeptoren und blockieren reversibel (wie im Falle des Dorsomorphin) oder irreversibel (z.B. TGF $\beta$ ) die BMP-Signalweiterleitung ins Zellinnere. Eine Sonderform stellt Heparin dar. Es kann sowohl das lösliche BMP-2 binden, als auch den BMP-Rezeptor blockieren (Kanzaki et al. 2008). Des Weiteren gibt es membranverankerte Proteine, die als Korezeptoren Einfluss auf die Bindung und das Signalling über die BMP-Rezeptoren ausüben. Das für die Komplexbildung von TGF $\beta$ -Liganden bedeutende Betaglykan (zu blockieren durch Inhibin s. Abb. 3.2) kann zwar keine BMPs binden (Shi und Massa-

gué 2003), aber Abreu und Kollegen haben beobachtet, dass connective tissue growth factor (CTGF) die BMP-4-Bindung verhindern kann (Abreu et al. 2002). Auch das Protein BAMBI (BMP and Activin receptor membrane bound inhibitor, auch Nma) ist ein kompetitiver Rezeptorinhibitor. BAMBI konkurriert mit Typ I BMP-Rezeptoren um die Einbindung in den heterodimeren Rezeptorkomplex und verhindert dadurch die Aktivierung des Rezeptors. In *Xenopus* Embryos induzieren BMPs die Expression von BAMBI und kreieren damit einen negativen feedback- Mechanismus, der für das entsprechend notwendige Proteinniveau an BMPs sorgt (Shi und Massagué 2003). Eine vierte Gruppe von Inhibitoren des BMP-Signallings wirkt intrazellulär. Die inhibitorischen Smads verhindern die Phosphorylierung von Smad1, Smad5 und Smad8 (Smad1/5/8) (Shimasaki et al. 2004). Smad6 stoppt außerdem die Komplexbildung aus Smad1 und Smad4. Smad7 konkurriert mit den aktivierten Rezeptoren um die Bindung an R-Smads wie Smad1 (Kavsak et al. 2000), (Suzuki et al. 2002). Des Weiteren verhindert FKBP12 (FK506 binding protein) die Phosphorylierung der Typ I Rezeptoren, während Smurf1 den Abbau von Smad1/5/8 begünstigt (Shimasaki et al. 2004).

### 3.2.5. Alternative Signalwege

Das BMP-Signalling verläuft wie oben beschrieben über die Stufen der Rezeptorbindung und -phosphorylierung, Smad-Aktivierung, Smad-Komplexbildung und Modulation der Transkription. Allerdings gibt es auch nicht-Smad-vermitteltes BMP-Signalling. Hierbei können die Smad-Proteine gänzlich aus dem Prozess der Signalweiterleitung ausgeschlossen werden. Häufig werden jedoch entweder andere Proteine vom BMPRI aktiviert, die dann ihrerseits R-Smads phosphorylieren, oder die Smads interagieren selbst mit anderen Proteinen und dringen nicht selbst bis in den Zellkern vor.

Der aktivierte BMP-Rezeptor Typ I phosphoryliert nicht-Smad-Kinasen wie p38 MAPK (p38 Mitogen-activated protein kinase), JNK (c-Jun N-terminale Kinase) oder ERK (Extracellular-regulated kinase) (Korchynskyi et al. 2004). ERK kann daraufhin Smad1/5 phosphorylieren und es sowohl für die Ubiquitinylierung markieren, als auch die Translokation in den Zellkern und damit die Weiterleitung des BMP-Signales verhindern (Rahman et al. 2015). Die MAP-Kinase wird über Proteine wie den X-linked inhibitor of apoptosis, TGF $\beta$ -aktivierte Kinase und das Tak-binding protein aktiviert (Rahman et al. 2015). Sie kann zusätzlich zu den R-Smads auch Smad4 und die inhibitorischen Smads 6 und 7 phosphorylieren (Rahman et al. 2015). Mitglieder der TGF- $\beta$ -Familie können au-

ßerdem Einfluss auf den Phosphatidyl-inositol-3-Kinase-Akt-mTOR-Signalweg, die kleinen GTPasen Rho, Rac und Cdc42 und den Ras-Erk-MAPK Signalweg (Mu et al. 2012) nehmen. Es wird weiterhin beschrieben, dass die Protein-Phosphatase-IIA von BMP-Rezeptoren reguliert wird, dass Signale über SHC-Grb2 (SHC-Growth factor receptor-bound protein 2) geleitet werden und Interaktionen mit PAK (protein activated kinases) beobachtet wurden (Wrana 2013). Der BMPRII ist von besonderem Interesse, da er die Kinasen LIMK (LIM-Kinase) und JNK (c-Jun N-terminale Kinase) binden und eine direkte Verknüpfung des BMP-Signallings zum Aktinzytoskelett und zum Mikrotubuliumsystem herstellen kann (Miyazono et al. 2010).

### 3.2.6. BMPs und Tumoren

Über die Rolle der BMPs in soliden Tumoren ist in der Literatur bereits einiges bekannt. BMPs spielen während der frühen Embryonalentwicklung eine wichtige Rolle bei der Morphogenese, der Proliferation und der Differenzierung von Zellen und Geweben (Hogan 1996). Führen genomische Veränderungen zur malignen Transformation einer Zelle, so verändert sich die Kontrolle und Regulation dieser Prozesse. Die ungehemmt proliferierenden Zellen verlieren ihre Funktionalität und entdifferenzieren (Clement und Wöfl 2004). Das BMP-Signalling ist im Vergleich zu anderen Signalwegen auf Genebene nur selten von Alterationen betroffen. Smad1, 3, 5 und 6 unterliegen in Tumoren der Brust, des Kolons, der Lungen und des Pankreas keinen nachweisbaren Veränderungen (Clement und Wöfl 2004). Des Weiteren wurden keine BMPRIA- und BMPRII-Mutationen in Brust- und Pankreaskrebszelllinien gefunden. Die Expression von BMPs und ihren Rezeptoren hingegen weicht in Tumorzellen häufig von der Norm ab. BMP-2 wird in Lungen-, Magen- und Hauttumoren verstärkt exprimiert, während es in Brust- und Kolonkarzinomen auch vermindert sein kann. Clement und Kollegen konnten zeigen, dass BMP-2 in der Brustkrebszelllinie MCF-7 die Expression verschiedener Gene reguliert, wobei die besondere Bedeutung von ID1, ID2 und ID3 für die Zellzykluskontrolle, Differenzierung und Apoptose hervorzuheben ist (Clement et al. 2000).

Auch für das Multiple Myelom konnten BMP-Einflüsse nachgewiesen werden. BMP-2 und -4 induzieren den programmierten Zelltod und BMP-4 wirkt außerdem inhibitorisch auf die DNA-Synthese. In Knochenmarkszellen von Patienten mit Akuter Promyeloblasten Leukämie wurde eine sehr starke Expression von BMP-2, -4, -7 und den BMP-Rezeptoren IA, IB, und II festgestellt. Nach der Behandlung mit ATRA (all-trans-

Retinsäure) und entsprechender Chemotherapie sanken diese Marker (Clement et al. 2000).

Zur Wirkung von BMPs auf BCR/ABL-positive Zellen der CML gibt es kaum Erkenntnisse. Laperrousaz und Kollegen haben das BMP-Signalling im Blut von CML-Patienten in der chronischen Phase (CP-CML) untersucht und Veränderungen in allen Ebenen des BMP-Signallings festgestellt (Laperrousaz et al. 2013). Hinsichtlich der Genexpression war das starke Auftreten von BMPRIA- und BMPRII-Transkripten auffällig, sowie die sehr niedrige Expression von Smad1.

Ich formuliere die Hypothese, dass das BMP-Signalling BCR/ABL-positive Zellen beeinflussen und über den entdifferenzierten Zustand hinaus zu einer Differenzierung führen kann. Die Entwicklung der Tyrosinkinaseinhibitoren bedeutete einen Meilenstein in der Therapie der CML, doch es gibt nach wie vor Patienten, denen mit diesen Mitteln nicht geholfen werden kann. Einige Patienten sprechen nicht ausreichend auf die Therapie an, während andere Resistenzen entwickeln oder die Nebenwirkungen nicht vertragen. Populationen leukämischer Stammzellen liegen ruhend, mit herabregulierter Stoffwechsellaktivität im Knochenmark und sind weniger sensitiv für TKIs. Um nicht in Remission zu kommen, ist die langfristige Applikation von TKIs erforderlich (Toofan et al. 2014). Sogenannte „Differenzierungstherapien“ werden schon heute bei der Akuten Promyeloischen Leukämie (APL) eingesetzt (McClellan et al. 2015). McClellan und Kollegen haben mit B-Zell-Vorläufern der Akuten Lymphatischen Leukämie (ALL) gearbeitet. Sie behandelten die Leukämiezellen mit M-CSF (makrophage-colony stimulating factor) und beobachteten die Reprogrammierung der Blasten hin zu Zellen der myeloischen Reihe (MCCs = macrophage-like cells). Wurden diese Zellen in Xenograft-Modelle eingesetzt, so lösten sie keine ALL mehr aus.

Falls es gelingen sollte, mithilfe von BMPs Einfluss auf den Zellstoffwechsel und die Differenzierung von BCR/ABL-positiven Zellen zu funktionstüchtigen Leukozyten zu nehmen, so wäre dies ein vielversprechender neuer Therapieansatz. Ein Beitrag zu dieser Entwicklung soll mit der vorliegenden Arbeit geleistet werden.

---

## 4. Ziele der Arbeit

Die chronische myeloische Leukämie (CML) ist eine myeloproliferative Erkrankung der pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen. Sie enthält das Philadelphia-Chromosom (Ph+), auf welchem sich das Fusionsgen BCR/ABL befindet. Dieses kodiert für eine konstitutiv-aktive Tyrosinkinase und treibt Zellwachstum und -proliferation voran. Knochenmorphogenesefaktoren (BMPs) gehören zur Familie der Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) Wachstums- und Differenzierungsfaktoren. Sie sind Regulatoren der Zelldifferenzierung während der Embryonal- und Organentwicklung und wirken anti-proliferativ. Stattdessen tragen sie zur Differenzierung der Zellen bei. Deshalb soll die Hypothese geprüft werden, ob BCR/ABL-positive Zellen sensitiv für BMPs sind. Es sind verschiedene experimentelle Schritte geplant, um die drei wesentlichen Fragen zu beantworten:

- (1) Können BMPs in BCR/ABL-positiven Zellen regulatorisch wirksam werden?
- (2) Führt die Präsenz des BCR/ABL-Fusionsgens zu einer Veränderung der Expression von BMPs und deren Signalwegkomponenten?
- (3) Ist das BMP-Signalling unter dem Einfluss von BCR/ABL weiterhin uneingeschränkt funktionstüchtig?

Für die Versuche sollen drei Zelllinien verwendet werden. Dies sind Mo7e-Zellen (Akute Megakaryoblasten Leukämie), bei denen es sich um Tumorzellen handelt. Sie enthalten die BCR/ABL-Mutation nicht und werden deshalb als Kontrollzelllinie dienen. Sie werden verglichen mit Mo7ep210-Zellen. Hierbei handelt es sich um dasselbe Zellsystem, welches jedoch mit dem BCR/ABL-Gen transfiziert wurde. Als patientennahes Modell sollen außerdem K-562-Zellen als natürliche BCR/ABL-positive Zelllinie verwendet werden.

Es sollen Vitalitätsassays mit den drei verschiedenen Zelllinien durchgeführt werden. Dabei soll beobachtet werden, wie die unterschiedlichen Zellen auf die Zugabe von BMP-2

bzw. von Dorsomorphin reagieren. Dorsomorphin ist ein reversibler Inhibitor der BMP-Rezeptoren vom Typ I. Es wird erwartet, dass BMP-2 die Vitalität der Zellen positiv beeinflusst und im Vergleich zu den Kontrollen steigert. Dorsomorphin hingegen wird das BMP-Signalling hemmen und sich negativ auf die Vitalität der Zellen auswirken.

Außerdem sollen Genexpressionsanalysen verschiedener Komponenten des BMP-Signallings durchgeführt werden. Es sollen unterschiedliche BMPs und einige BMP-Rezeptoren mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) untersucht werden, um deren Expressionsstatus festzustellen. Es wird analysiert werden, welche Gemeinsamkeiten und Unterschiede sich hinsichtlich der Genexpression zwischen der Kontrollzelllinie Mo7e und den BCR/ABL-positiven Zelllinien feststellen lassen.

Des Weiteren sind Westernblot-Analysen geplant. Es wird vor allem das wichtige intrazelluläre Signalmolekül Smad1 untersucht werden. Dazu werden die Zellen mit verschiedenen BMPs inkubiert, im Anschluss lysiert und die Proteine aufgetrennt. Mittels Antikörperbindung soll Smad1 und seine aktivierte, phosphorylierte Form pSmad1 detektiert werden. Zusätzlich wird die Proteinexpression von ID1 Gegenstand der Untersuchungen sein. ID1 ist ein Zielgen des BMP-Signallings und wird als Marker für einen stammzellähnlichen Zustand von Zellen beschrieben (Benezra et al. 1990).

---

## 5. Material und Methoden

### 5.1. Material

#### 5.1.1. Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien

Filterspitzen (10,100,1000 $\mu$ l)	Star Lab, Hamburg, Deutschland
Filterspitzen (200 $\mu$ l)	Nerbe plus, Winsen/Luhe, Deutschland
Gewebekulturplatte (6/12/96 Well)	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Küvetten (Spekol)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
PCR-96-Wellplatte	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
PCR flat cap stripes	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
PCR Verschlussfolie	nerbe plus, Winsen/Luhe, Deutschland
Pipettenspitzen	Brand, Wertheim, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,5-2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,5 ml, safe-lock)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
serologische Pipetten (5,15,20 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturflaschen (25, 75, 175 $cm^2$ )	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Zentrifugationsröhrchen (15,50 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland

### 5.1.2. Fertiglösungen und Kits

4x XT-Sample Buffer	BioRad, München, Deutschland
5x First Strand Reaktionspuffer	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
10x Coral Load	Quiagen, Hilden, Deutschland
20x Reducing Agent	BioRad, München, Deutschland
100 bp-10 kbp Long Range DNA Ladder	Jena Bioscience, Jena, Deutschland
APC Annexin V	Becton Dickinson Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
BMP-2	Dr. Hortschansky, HKI, Jena, Deutschland
BMP-4	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Bradford-Reagenz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Chemilumineszenz HRP Substrat	Millipore, Darmstadt, Deutschland
Criterion XT Precast Gel (10%, Bis-Tris)	BioRad, München, Deutschland
dNTP-Mix	New England BioLabs, Frankfurt/ Main, Deutschland
Dorsomorphin	BioVision/ BioCat, Heidelberg, Deutschland
DTT	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Isoton II Diluent	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Kaleidoscope-Marker	BioRad, München, Deutschland
LightCycler SYBR-Green Kit	Roche, Mannheim, Deutschland
MagicMarker XP	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
M-MLV reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Presto Blue	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Propidiumjodid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
rh GM-CSF	Immuno Tools, Friesoythe, Deutschland
RNaseOUT	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
RNeasy RNA-Isolationskit	Analytik Jena, Berlin, Deutschland
RPMI 1640	Gibco/ Thermo F. Scientific, Darmstadt, Deutschland
<i>Taq</i> -Polymerase	Jena Bioscience, Jena, Deutschland
XT MES	BioRad, München, Deutschland
XT Trans-Blot turbo PVDF Membran	BioRad, München, Deutschland

### 5.1.3. Chemikalien und Reagenzien

2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Agarose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ampuwa reinst H <sub>2</sub> O	Fresenius kabi, Bad Homburg, Deutschland
Aprotinin	Roche, Mannheim, Deutschland
BSA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Calciumchlorid	Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
EDTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
EGTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ethanol (96 % Vol)	VWR, Dresden, Deutschland
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
FCS	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
HEPES	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Leupeptin	Roche, Mannheim, Deutschland
Natriumchlorid	Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
PefaBloc	Roche, Mannheim, Deutschland
Pepstatin	Roche, Mannheim, Deutschland
Salzsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tris Base	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Tris HCl	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland?
Triton X 100	Ferak, Berlin, Deutschland
TWEEN 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
UltraPure Ethidium Bromide	Thermo F. Scientific, Darmstadt, Deutschland
XT-MES	BioRad, München, Deutschland

### 5.1.4. Antikörper und Primer

Act-RIIA Antikörper	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
$\beta$ -Actin Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
$\beta$ -Actin-HRP Antikörper	Cell Signaling Technology, Leiden, Niederlande
GAPDH-HRP	abcam, Cambridge, UK
goat-anti-mouse-HRP	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
goat-anti-rabbit-HRP	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
ID1 Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
Oligo-dt-Primer	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
phosphoSmad1 Antikörper	Merck/ Millipore, Darmstadt, Deutschland
Smad1 Antikörper	Cell Signaling Technology, Leiden, Niederlande
Random-Primer	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland

### 5.1.5. Puffer und Lösungen

#### Annexin-Bindepuffer

10x Binding Puffer            100 mM HEPES; 1400 mM NaCl; 25 mM CaCl; pH 7,4

#### Gelelektrophorese

50x TAE                            121 g Tris Base; 28,5 ml Essigsäure; 0,5 M EDTA auf 500 ml mit A.dest; pH 8,3

Laufpuffer                        1x TAE aus 50x TAE Stammlösung

#### Western Blot

10x TBS                            24,2 g Tris Base; 80 g NaCl; pH 7,6; auf 1000 ml A.dest; Lagerung bei 4°C

Blocking-Puffer                1x TBS; 0,001% (v/v) Tween20, 4% (w/v) BSA; Lagerung bei 4°C

Laufpuffer                        1x XT-MES auf 500 ml A.dest

Proteinlyse-Puffer              20 mM HEPES; 150 mM NaCl; 10 mM EDTA; 2 mM EGTA; 1% (v/v) TritonX100; 10 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>; 50 mM NaF; 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>; 10  $\mu$ g/ml Aprotinin; 1  $\mu$ M Pepstatin; 10  $\mu$ M Leupeptin; 500  $\mu$ g/ml PefaBloc

Stripping-Puffer                50 mM 2-Mercaptoethanol; 2% (v/v) SDS; 62,5 mM Tris HCl; Lagerung bei RT

TBS-Waschpuffer               1x TBS; 0,1% (v/v) Tween20; Lagerung bei 4°C

### 5.1.6. Geräte

Agagel Maxi (Gelelektrophoresekammer)	Biometra, Göttingen, Deutschland
Brutschrank	INCUB-Line VWR, Darmstadt, Deutschland
Centrifuge 5415 C; 5417 C; 5415 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Coulter Counter ZZ	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
FACS Calibur	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Gelelektrophorese-Apperatur	BioRad, München, Deutschland
HeraCell 240i CO <sub>2</sub> -Inkubator	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
HeraSafe Sterilwerkbank	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
ImageQuant LAS 4000	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
Infinite F200	Tecan, Crailsheim, Deutschland
Infinite M1000 PRO	Tecan, Crailsheim, Deutschland
Inversionsmikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Mastercycler realplex4 epgradientS	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Megafuge 2.0 R	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Mikrowelle	Daewoo, Butzbach, Deutschland
NanoDrop 2000	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
PCR-Arbeitsstation	peqlab, Erlangen, Deutschland
pH-Meter	WTW, Weilheim, Deutschland
Pipetten 2, 10, 100, 200, 1000 $\mu$ l	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
PowerPac Basic Power Supply	BioRad, München, Deutschland
Präzisionswaage	Satorius, Göttingen, Deutschland
Reinstwasseranlage	Merck/ Millipore, Darmstadt, Deutschland
Rotationsschüttler MS2	IKA, Staufen, Deutschland
Schüttler HS 501 digital	IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Schüttelwasserbad 1083	GFL, München, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Trio PCR-Thermoblock	Biometra, Göttingen, Deutschland
Ultrospec III Photometer	Pharmacia, Freiburg/ Breisgau, Deutschland
Ultrospec 4300 Pro	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
UV- Geldocu	Intas UV-Systeme, Göttingen, Deutschland
Waage PE 2000	Mettler-Toledo, Gießen, Deutschland

### 5.1.7. Programme

AxioVision	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland
FlowJo	FlowJo LLC, Ashland, USA
imageJ	Wayne Rasband, Washington, USA
Inkscape	Open Source publiziert unter GPL
L <sup>A</sup> T <sub>E</sub> X	Open Source publiziert unter freier Lizenz

### 5.1.8. Zelllinien

K-562	(Lozzio und Lozzio 1975)
Mo7e	(Avanzi et al. 1988)
Mo7ep210	(Matsuguchi et al. 1994)

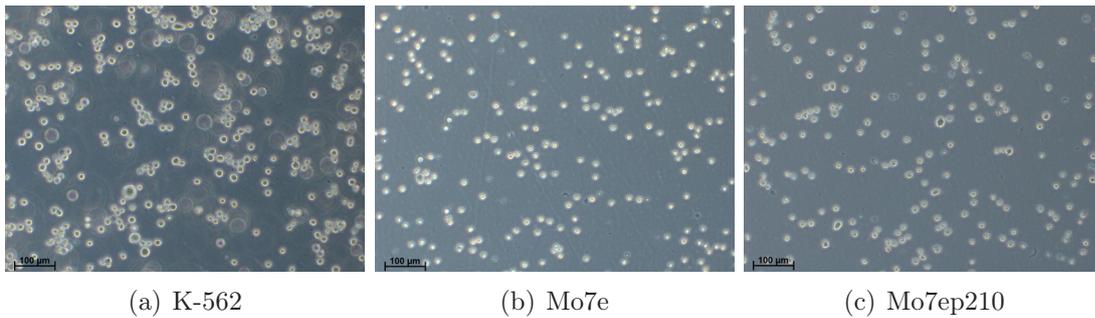
## 5.2. Methoden

### 5.2.1. Zellkultur

Für die Durchführung der Experimente in der vorliegenden Arbeit wurden die drei verschiedenen Laborzelllinien Mo7e, Mo7ep210 und K-562 verwendet. Mo7e-Zellen (DSMZ No. ACC-104) wurden 1987 aus dem peripheren Blut eines sechs Monate alten Säuglings mit Akuter Megakaryoblasten Leukämie gewonnen (Avanzi et al. 1988). Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> mit 10 ng/ml GM-CSF kultiviert. Als Nährmedium diente RPMI1640 mit 20% fetalem Kälberserum (FCS).

Vergleichend dazu wurde die Mutterzelllinie Mo7e mit dem Fusionsgen BCR/ABL-transfiziert, um das Zellsystem Mo7ep210 herzustellen (Matsuguchi et al. 1994). Diese Zellen wurden ebenfalls bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> kultiviert. Auch hier diente RPMI1640 mit 20% fetalem Kälberserum (FCS) als Nährmedium, die transfizierten Zellen benötigten allerdings kein Zytokin. Die Verdopplungszeit lag wie bei den Mo7e-Zellen bei etwa 40 Stunden.

K-562-Zellen (DSMZ No. ACC-10) wurden 1970 aus dem Pleuraerguss einer 53-jährigen Patientin mit chronischer myeloischer Leukämie im Stadium der Blastenkrise gewonnen. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Als Nährmedium diente RPMI1640 mit 10% fetalem Kälberserum (FCS). Die Verdopplungszeit dieser Zelllinie beträgt zwischen 30 und 40 Stunden.



**Abbildung 5.1.:** Zelllinien: (a) K-562 (chronische myeloische Leukämie, Blastenkrise) (b) Mo7e (Akute Megakaryoblasten Leukämie) (c) Mo7ep210 (Mo7e stabil transfiziert mit BCR/ABL-Gen)

## 5.2.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

### RNA-Isolierung und cDNA-Synthese

Die Isolierung der RNA aus den Zelllinien K-562, Mo7e und Mo7ep210 wurde mit Hilfe des RNeasy Kits von Analytik Jena nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Zur Vorbereitung der Zellen wurden diese an der Sterilbank unter Aufnehmen und Abgeben mittels Pipetboy von ihrer Unterlage gelöst. Der gesamte Inhalt der Zellkulturflasche wurde in ein 50 ml-Röhrchen überführt und bei 1000 U/min für fünf Minuten zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Überstände entsorgt und die drei Zellpellets auf Eis gestellt. 450  $\mu$ l Lysepuffer wurden auf jedes Zellpellet gegeben und resuspendiert.

Auf die ersten drei Tubes wurden je ein blauer Filter gesetzt, in welchen die komplette Zellsuspension gegeben wurde. Es folgte eine Zentrifugation bei 12000 U/min für zwei Minuten. Die blauen Filter wurden verworfen und den Zentrifugaten in den Tubes wurden je 400  $\mu$ l 70% Ethanol zugeführt und resuspendiert. Diese Suspension wurde vollständig auf die rosa Membranen auf der zweiten Reihe Reaktionsgefäße gegeben. Es wurde bei 12000 U/min für zwei Minuten zentrifugiert. Da sich die RNA nun auf dem Filter befand, wurden die Zentrifugate in den Tubes entsorgt und die rosa Membranen auf die dritte Reihe neuer Reaktionsgefäße gesetzt. 500  $\mu$ l HS Waschpuffer wurden auf jeden Filter gegeben. Danach wurde für eine Minuten bei 12000 U/min zentrifugiert. Es wurden die Zentrifugate in den Röhrchen verworfen und die Filter auf neue Reaktionsgefäße gesteckt. Dann wurden 700  $\mu$ l LS Waschpuffer auf die Membranen gegeben und für eine Minute bei 12000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurden die Filter auf neue Tubes gesetzt und für zwei Minuten bei 12000 U/min zentrifugiert. Es wurden die Membranen auf die letzte Reihe Tubes gesteckt und die RNA mit 50  $\mu$ l RNase-free-water eluiert.

Dieser Vorgang wurde nach Zentrifugation für eine Minute bei 8000 U/min ein zweites Mal mit 30  $\mu\text{l}$  und nach erneuter Zentrifugation (eine Minute bei 8000 U/min) ein drittes Mal mit 20  $\mu\text{l}$  RNase-free-water durchgeführt. Abschließend wurden die Filter entsorgt und die Reaktionsgefäße geschlossen. Die Lagerung der isolierten RNA erfolgte bei  $-80^{\circ}\text{C}$  im Gefrierschrank oder auf Eis für die Weiterverarbeitung direkt im Anschluss.

Um die gewonnenen RNA-Isolate in cDNA (komplementäre DNA) umzuschreiben, musste zunächst in den drei Proben jeweils der RNA-Gehalt bestimmt werden. Dazu wurde der NanoDrop2000 verwendet. Die photometrische Messung mittels UV-Bestrahlung ermöglichte die Berechnung der RNA-Konzentration in der Probe. Zur Synthese der cDNA wurden je 1  $\mu\text{g}$  RNA der Zelllinien K-562, Mo7e und Mo7ep210 in ein 0,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Das Volumen wurde mit destilliertem Wasser bis auf 8,5  $\mu\text{l}$  aufgefüllt und bei  $65^{\circ}\text{C}$  für fünf Minuten erhitzt. Im Anschluss wurden 11,5  $\mu\text{l}$  cDNA-Synthesemix (Tabelle 5.1) dazu gegeben.

**Tabelle 5.1.:** cDNA-Synthesemix

Menge in $\mu\text{l}$	Inhaltsstoffe
4,0	250 mM Tris-HCl, pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM $\text{MgCl}_2$
2,0	DTT (0,1 M)
1,0	oligo-dT-Primer (329 $\mu\text{M}$ )
1,0	random-Primer (3,0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )
2,0	dNTP-Mix (2,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
0,5	Rnasin (40 U/ $\mu\text{l}$ )
1,0	M-MLV reverse Transkriptase
11,5	Gesamtvolumen

Dann wurde das Gemisch zuerst für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und danach für 60 Minuten bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad erhitzt. Dabei lagerten sich die Primer an die RNA an und die DNA-Polymerase (reverse Transkriptase) konnte die eingesetzten Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs) zu komplementären cDNA-Strängen verbinden. Das Rnasin löste nun die cDNA-Stränge von der RNA. Abschließend musste die reverse Transkriptase inaktiviert werden, indem die drei Proben für acht Minuten bei  $95^{\circ}\text{C}$  im Thermomixer geschüttelt wurden. Die cDNA konnte nun bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren oder direkt im Anschluss weiter verwendet werden.

## Reverse-Transkriptase-PCR und Gelelektrophorese

Die Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) wurde am TRIO-Thermocycler von Biometra durchgeführt. Hier wurde eine qualitative Aussage über den Expressionsstatus der Gene BMP-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, sowie ActRIIA und BMPRII erzeugt. Die Arbeiten wurden an der PCR-Arbeitsstation von peqlab durchgeführt. Für jeden Ansatz wurde zunächst 1  $\mu$ l cDNA mittels Eppendorf-Pipette in ein 0,5 ml-Tube vorgelegt. Im zweiten Schritt wurden 24  $\mu$ l des Mastermixes (Tabelle 5.2) in die Reaktionsgefäße gegeben.

**Tabelle 5.2.:** PCR-Mastermix

Menge in $\mu$ l	Inhaltsstoffe
18,3	H <sub>2</sub> O
2,5	10xPCR-Puffer
1,0	Primer (10 $\mu$ M)
2,0	dNTP-Mix (2,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
0,2	Taq-Polymerase (5Units/ $\mu$ l)
0,5	Rnasin (40 U/ $\mu$ l)
24,0	Gesamtvolumen

Nachdem die Proben auf dem Schüttler gemischt und kurz abzentrifugiert wurden, konnten sie bei folgendem Programm (Tabelle 5.3) - hier am Beispiel für BMP-1 - durch den Thermocycler aufgereinigt werden.

**Tabelle 5.3.:** PCR Ablauf BMP-1

Phase	Dauer	Temperatur	Zyklen
Aktivierung	3 min	95 °C	
Denaturierung	30 sec	95 °C	
Annealing	20 sec	66 °C	○ 34
Elongation	25 sec	72 °C	
Abkühlung	5 min	72 °C	
Ende	unbegrenzt	4 °C	

Für den Nachweis weiterer Gene wurde das Programm hinsichtlich der Zeiten und der Temperaturen leicht verändert. Es erfolgte zunächst die Aktivierung der für die Lagerung stabilisierten Taq-Polymerase bei 95°C. Dabei wurde die doppelsträngige DNA denaturiert. In der Annealingphase bei 66°C konnten sich an die 5'-OH-Enden der Einzelstränge nun die Primer so anlagern, dass ihre freien 3'-OH-Enden in Richtung der

zu amplifizierenden DNA wiesen. Hier wurden während der Elongation bei 72°C die komplementären DNA-Stränge durch die Taq-Polymerase angefügt. Dieser Vorgang der Denaturierung, des Annealings und der Elongation wiederholte sich 34 Mal und es entstanden entsprechend viele (ideal  $2^{34} = 17 * 10^9$ ) DNA-Kopien.

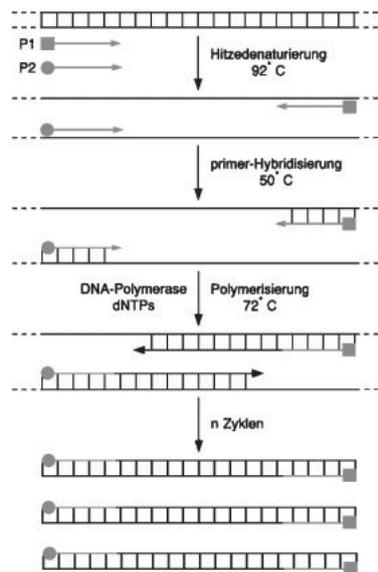
Die Auftrennung der Gensequenzen erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Zur Vorbereitung wurden 1%-Agarosegele hergestellt. Jedem Gel wurde im Verhältnis 1:10.000 Ethidiumbromid beigemischt (1  $\mu$ l/10ml Gel). Dieser rote Farbstoff interkalierte zwischen den Basen der DNA-Sequenzen und sollte bei der Auswertung die Fluoreszenz der DNA erhöhen. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 80 V und einer Stromstärke von maximal 400 mV für etwa 20 Minuten durchgeführt. Im Anschluss wurde das Gel in der UV-Geldocu von Intas bei einer Wellenlänge von 312nm ausgewertet.

### **Real-time RT-PCR**

**Durchführung am Mastercycler** Um die Ergebnisse der qualitativen Reverse-Transkriptase-PCR zu bestätigen und quantitative Aussagen über die Menge an vorhandenen Gensequenzen treffen zu können, wurden zusätzliche real-time RT-PCRs am Mastercycler realplex4 egradientS von Eppendorf vorgenommen. Mithilfe dieser Methode war es möglich, eine relative Quantifizierung durch den Vergleich mit einem „house-keeping gene“ (HKG) zu erreichen.

Grundsätzlich wich der Ablauf der real-time RT-PCR nicht von dem der RT-PCR ab. Den bedeutenden Unterschied stellte die Zugabe des Farbstoffes SYBR-Green nach dem „LightCycler SYBR-Green Kit“ -Protokoll von Roche dar. Dieser Farbstoff interkalierte während des Amplifikationsvorganges unspezifisch in die DNA. Nach jedem Zyklus wurde der Farbstoff von einem Laser angeregt (Wellenlänge etwa 470 nm) und emittierte ein entsprechendes Fluoreszenzsignal (Wellenlänge etwa 570 nm). Die Intensität dieses Signals war direkt proportional zur Menge an vorliegender DNA. Somit konnte in Echtzeit die Vervielfältigung der DNA-Abschnitte verfolgt werden. Erreichte das Fluoreszenzsignal eine Intensität, die sich signifikant von der Hintergrundstrahlung unterschied, so wurde die Nummer dieses Zyklus als Ct-Wert (cycle threshold) für das entsprechende Gen definiert. Der Ct-Wert oder CP-Wert (Crossing Point) beschrieb die Anzahl an PCR-Zyklen, die benötigt wurde, um ein definiertes Fluoreszenzniveau zu erreichen, welches sich signifikant von der Hintergrundfluoreszenz unterschied (Pfaffl 2004). Folglich

sprach ein kleiner CP-Wert für eine große Menge an Ausgangsmaterial und vice versa. Die doppelsträngige DNA wurde bei 95°C denaturiert, die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen gelöst und sie trennte sich in ihre Einzelstränge auf. Während des Annealing bei 62°C lagerten sich die Primer an die DNA-Einzelstränge an. Im nächsten Schritt, der Elongation, wurden die Desoxynukleosidtriphosphate an den Primärstrang angelagert und miteinander verknüpft. Dieser Vorgang wurde 45 Mal wiederholt. Nach jedem Zyklus wurde das SYBR-Green-Fluoreszenzsignal gemessen. Bei 100% Effizienz des Verfahrens müsste sich die Produktmenge folglich mit jedem Zyklus verdoppelt haben. Gleiches galt für das Fluoreszenzsignal.



**Abbildung 5.2.:** Flussschema PCR aus <http://www.spektrum.de/lexika/images/bio/-f7f5426.jpg>

Zunächst wurde das 96 Well-Plattenlayout für den Versuch am Computer erstellt. In den drei Zelllinien K-562, Mo7e und Mo7ep210 sollten die Gene BMP-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, sowie ActRIIA und BMPRIb nachgewiesen werden. Für jedes Gen wurde eine Negativkontrolle in Wasser mitgeführt. Als HKG diente  $\beta$ -Aktin. Auch das Kontrollfragment enthielt  $\beta$ -Aktin in den Konzentrationen  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  und  $10^{-6}$ . Es wurden je  $1\ \mu\text{l}$  cDNA, Wasser,  $\beta$ -Aktin und Kontrollfragmentverdünnung in die entsprechenden Wells vorgelegt. Dazu wurden  $19\ \mu\text{l}$  Mastermix gegeben (Tabelle 5.4). Nun wurde die Platte leicht gevortext und kurz abzentrifugiert bevor die Messung begann.

**Auswertung mit Pfaffl-Analyse** Die Auswertung der Ergebnisse der real-time RT-PCR erfolgte mittels Analyse nach Pfaffl (Pfaffl 2004). Hierbei wurde eine relative

**Tabelle 5.4.:** qPCR-Mastermix

Inhaltsstoffe	H <sub>2</sub> O	Primer	SYBR-Green	Gesamtvolumen
Menge in $\mu\text{l}$	8,0	1,0	10,0	19,0

Quantifizierung der mRNA durch die Bezugnahme auf ein ubiquitär und homogen exprimiertes HKG vorgenommen. Da dieses HKG den selben experimentellen Bedingungen unterlag wie die zu untersuchenden Proben, wurde davon ausgegangen, dass sich Varianzen in den Expressionsergebnissen, die durch Gewebe- und Matrixeffekte, eventuelle Enzymdefekte und ähnliches entstehen konnten, normalisierten. Es wurde  $\beta$ -Aktin als HKG verwendet. Zur Berechnung wurde das effizienz-korrigierte relative Quantifizierungsmodell nach Pfaffl angewandt (Pfaffl 2001).

$$Ratio = \frac{(E_{Zielgen})^{\Delta CP_{ZielgenKontrolle-Behandlung}}}{(E_{Referenzgen})^{\Delta CP_{ReferenzgenKontrolle-Behandlung}}} \quad (5.1)$$

In dieser Formel wird im Zähler die Differenz der Expression des Zielgens zwischen zu untersuchender Zelllinie und Kontrollzelllinie beschrieben, während im Nenner die Differenz des Referenzgenes zwischen beiden Zelllinien definiert wird. Die Expression E als Basis „2“ wurde gewählt, da von einer idealen Effizienz der PCR ausgegangen wurde, bei der sich die DNA-Kopien in jedem Zyklus verdoppelten. Die Ergebnisse dieser Rechnung wurden zur Basis „2“ logarithmiert, um den korrigierten CP-Wert einer jeden Probe zu erhalten.

### 5.2.3. Inkubationsversuche

#### Inkubation mit BMPs

Zum Nachweis der Sensitivität der Zelllinien K-562, Mo7e und Mo7ep210 gegenüber bone morphogenetic proteins wurden Inkubationsversuche mit einigen exemplarischen BMPs durchgeführt. Dazu wurden die Suspensionszellen in 50 ml-Röhrchen überführt und zunächst für fünf Minuten bei 5000 U/min zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die drei Pellets mit je 3 ml serumfreiem RPMI1640-Medium (sf-RPMI1640) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen am Coulter Counter ZZ gezählt. In vier 6-Well-Platten wurden  $1,5 \cdot 10^6$  Zellen pro Well ausgesät. Mit sf-RPMI1640 wurde das Volumen in jedem Well auf insgesamt 4 ml aufgefüllt. Über Nacht wurden die Zellen im

Brutschrank bei 37°C gelagert. Am Folgetag wurden die Inkubationsmische hinzugegeben. Die Zielkonzentrationen lagen bei 50 ng/ml, wobei je 1 ml Inkubationsmix pro Well hinzugefügt wurde. Die Zellen wurden für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen in 15 ml-Röhrchen überführt und für fünf Minuten bei 1000 U/min zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und deren Rest sorgfältig abpipettiert. Dann wurden 50 µl Lysepuffer zugegeben und kräftig mit den Zellen vermischt. Die Proben wurden bei -80°C eingefroren.

Im Folgenden konnten Westernblotanalysen zum Nachweis von Smad1 und dessen aktivierter Form (pSmad1) durchgeführt werden, um zu zeigen, dass die beigefügten BMPs einen Effekt hinsichtlich der Proteinexpression der Zellen erzielen konnten.

Nach einem vergleichbaren Schema verliefen die Inkubationsversuche zum Nachweis von ID1. Den einzigen Unterschied stellte die Inkubationszeit über vier Stunden dar, da die ID1-Effekte erst später nachweisbar waren. Smad1 ist ein zytoplasmatisches Protein, dessen Aktivierung zeitlich eher stattfindet und nachweisbar ist als die Transkription und Translation von ID1.

### **Inkubation mit Dorsomorphin**

Um die Effekte von Dorsomorphin auf die Zellen zu untersuchen, wurden Inkubationsversuche im Vergleich zu BMP-2 durchgeführt. Neben den Kontrollen wurden die drei Zelllinien mit Dimethylsulfoxid (DMSO), BMP-2, Dorsomorphin und der Kombination aus BMP-2 und Dorsomorphin inkubiert. Die Kontrolle mit DMSO war notwendig, da Dorsomorphin in DMSO gelöst vorlag und Störeffekte durch die zytotoxische Wirkung von DMSO ausgeschlossen werden mussten. Es wurden fünf Ansätze pro Zelllinie hergestellt, wobei jede 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche 5\*10<sup>6</sup> Zellen in 4 ml serumfreiem RPMI1640 (sf-RPMI1640) enthielt. Am Folgetag wurden die Inkubationsmische in 2 ml/Flasche auf die Zellen gegeben, sodass jeder Ansatz ein Volumen von 6 ml enthielt. Dabei war die Zielkonzentration für BMP-2 50 ng/ml und für Dorsomorphin und DMSO 10 µM. Die Inkubation erfolgte über vier Stunden im Brutschrank bei 37°C. Im Anschluss wurden die Zellen wie oben beschrieben in 15 ml-Röhrchen überführt, zentrifugiert, mit 80 µl Lysepuffer versetzt und bei -80°C tiefgefroren.

## 5.2.4. Western Blot

### Proteinisolierung und -bestimmung

Zunächst wurden die tiefgefrorenen Proben aus dem  $-80^{\circ}\text{C}$ -Gefrierschrank entnommen und zum Auftauen etwa zehn Minuten bei Raumtemperatur gelagert. Danach wurden die Proteinlysate mit einer Pipette gemischt und in ein 1,5 ml-Reaktionsröhrchen überführt. Nun wurden die Proben für 15 Minuten bei 13.2000 U/min zentrifugiert. Dann wurden die Überstände in neue Tubes gegeben und die Pellets konnten verworfen werden. Im Anschluss wurde die Proteinkonzentration in den Proben photometrisch gemessen.

Hierzu wurde die Messmethode mittels Bradford-Reagenz genutzt. Die Wellenlänge des Spektrometers wurde auf 595 nm eingestellt. Nun wurden alle Kuvetten mit MilliQ-Wasser gefüllt, wobei 500  $\mu\text{l}$  in die Referenzkuvette und je 498  $\mu\text{l}$  in die Probenkuvetten gegeben wurden. Zur Steigerung der Präzision der Werte wurden alle Proben in Doppelansätzen gemessen. In jede der Probenkuvetten wurde nun 2  $\mu\text{l}$  des entsprechenden Proteinlysates hinzugefügt. Abschließend wurden je 500  $\mu\text{l}$  Bradfordreagenz in alle Kuvetten gegeben und die Lysate gut durchmischt. Das Bradfordreagenz enthielt den Farbstoff Coomassie Brilliant Blau und zeigte zunächst eine bräunliche Farbe mit einem Absorptionsmaximum von 465 nm. Nach unspezifischer Bindung an die basischen Seitenketten der Proteine in der Kuvette zeigte sich jedoch ein Farbumschlag nach blau mit einem veränderten Absorptionsmaximum bei 595 nm. Nun wurde das Spektrometer mit Hilfe der Referenzkuvette geeicht, in dem die Funktion „set reference“ betätigt wurde. Im Anschluss konnten alle anderen Proben nacheinander gemessen werden.

### Gelelektrophorese und Blotting

Bevor das Gel beladen wurde, mussten die Beladungsvolumina an Lysat berechnet werden. Hierzu wurde die größte Proteinvolumenangabe als Orientierung genutzt und dementsprechend das Gesamtvolumen bestimmt. Der XT-Sample Buffer (XT-SB) wurde als ein Viertel dieses Gesamtvolumens definiert und der 4xReducing Agent als ein Zwanzigstel. Im ersten Schritt wurde Lysepuffer in die 1,5 ml-Reaktionsröhrchen vorgelegt. In einem zweiten Schritt wurde XT-SB und als drittes die Proteinlysate dazu gefügt. Erst im letzten Schritt wurde der 4xReducing Agent hinzu gegeben und danach wurden die Proben für fünf Minuten bei  $95^{\circ}\text{C}$  aufgeköcht.

Es wurden Midi-Gele (10%Bis-Tris) der Firma BioRad verwendet. Zunächst musste der

weiße Schutzstreifen am Boden des Gels entfernt werden. Das Gel wurde in der Kammer platziert und der Laufpuffer zuerst in der Kammer bis zur Markierung „Fill“ aufgefüllt. Danach wurde der restliche Laufpuffer in den Bereich der Geltaschen gefüllt. Der grüne Kamm wurde langsam senkrecht nach oben entfernt, um die Taschen optimal aufzurichten. Jede Geltasche wurde ein Mal mit Laufpuffer gespült und anschließend beladen. Hierbei wurden in die erste Tasche 8  $\mu$ l Kaleidoskopmarker zur Orientierung bei Tageslicht und in die zweite Tasche ebenfalls 8  $\mu$ l Magic Marker gegeben. Der Magic Marker diente später zur Orientierung bei der Auswertung am LAS-Detektor. Nun konnten je 30  $\mu$ l Probe aufgetragen werden. Bei 145 V und maximal 300 mA Stromstärke wurde das Gel für etwa 75 Minuten der elektrophoretischen Auftrennung unterzogen. Zur Orientierung wurde der Lauf des XT-SB herangezogen.

Dann erfolgte die Übertragung der Proteine vom Elektrophoresegel auf die Blotting Membran. Dazu wurde die Gelkammer aufgebrochen und das Gel auf Trans-Blot Filter übertragen. Luftblasen wurden mittels Rolltube entfernt. Nun konnte die Elektrokassette verschlossen werden und das entsprechende Programm über 30 Minuten mit 25 V und bis zu 1,0 A ablaufen. Im Anschluss wurde die Membran geblockt, um unspezifischen Bindungen des Antikörpers (Ak) vorzubeugen.

Hierzu wurde sie für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer Blocking Puffer Lösung (4%BSA) geschwenkt. Danach erfolgte die Inkubation mit dem primären Ak über Nacht im Kühlraum (4°C). Als primäre Ak wurden Act-R11A von R&D-Systems (MAB 340), pSmad1 von Millipore (ABS52), Smad1 von CellSignaling (#9743S) und ID1 von Santa Cruz (sc-488) verwendet. Als Kontroll-Proteine kamen  $\beta$ -Aktin von Santa Cruz (sc-47778 oder sc-1616) oder GAPDH von abcam (#22255) zum Einsatz. Diese Antikörper wurden in Verdünnungen von 1:100 bis 1:1000 verwendet und in 4% BSA gelöst. Die primären Ak wurden bis zu drei Mal verwendet. Nach der Inkubation wurde die Membran drei Mal für etwa zehn Minuten gewaschen und anschließend mit dem sekundären Ak benetzt. Dabei handelte es sich um goat-anti-rabbit-Antikörper (sc-2030) oder goat-anti-mouse-Antikörper (sc-2031) der Firma Santa Cruz. Diese sekundären Ak lagen in Verdünnungen von 1:1000 bis 1:5000 vor und wirkten für eine Stunde bei Raumtemperatur an der Membran. Nachdem drei zehnmütige Waschschrirte erfolgt waren, wurde die Auswertung vorgenommen.

Am Image Quant LAS 4000 von GE Healthcare wurden mittels UV-Licht die Banden

detektiert. Dazu wurde die Membran unmittelbar vor dem Lichtkontakt kurz, für wenige Minuten, mit Horseradish Peroxidase-Substrat (HRP) inkubiert. Die Meerrettich-Peroxidase war dabei kovalent mit einem Ak verknüpft, welcher seinerseits an den sekundären Ak gebunden hatte. Kam es zur Reduktion von Wasserstoffperoxid zu Wasser, so fand ein Farbumschlag statt, der im LAS detektiert werden konnte. Diese Farbreaktion war direkt proportional zur Menge vorhandener sekundärer Ak und damit zum Aufkommen des gesuchten Proteins.

Insofern die Membran mit einem zweiten Ak inkubiert werden sollte, wurde nun eine Rehybridisierung vorgenommen, andernfalls konnte die Membran entsorgt werden. Zur Rehybridisierung der Membran wurde ein Mercapto-Ethanol-haltiger Stripping Puffer verwendet (Tabelle 5.5).

**Tabelle 5.5.:** Stripping Puffer

<b>Inhaltsstoffe</b>	2-Mercapto-Ethanol (50 mM)	SDS (20%)	Tris-HCL (pH 6,7; 1 M)	Milli-Q-Wasser
<b>Menge</b>	350 $\mu$ l	10 ml	6,25 ml	auffüllen auf 100 ml

Etwa 5 ml dieses Puffers wurden zugegeben und das Gel für 15-20 Minuten bei 50°C im Wasserbad behandelt. Im Anschluss erfolgten drei zehnmütige Waschschrirte bevor die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur mit Blocking Puffer (4% BSA) inkubiert wurde. Es folte die Detektion weiterer Proteine.

### 5.2.5. Vitalitätsanalysen

#### Presto Blue-Assay

Um das Verhältnis von vitalen zu letalen Zellen zu bestimmen, wurden diese zunächst in vier verschiedene 96-Well-Platten ausgesäht. Die Zellen der Zelllinien K-562, Mo7e und Mo7ep210 wurden am Coulter Counter ZZ gezählt und ohne zusätzlichen Zentrifugationsschritt in die Wells überführt. Neben 18 Blanks, die je 90  $\mu$ l sf-RPMI1640 enthielten, befanden sich in jedem Well 15.000 Zellen in 70  $\mu$ l sf-RPMI1640. Während die Inkubationsmische mit Stimulantien der Zelldifferenzierung (BMP-2) oder Inhibitoren des Zellwachstums (Dorsomorphin) hergestellt wurden, erfolgte die Aufbewahrung der Zellen im Brutschrank, um sich absetzen und an das Millieu adaptieren zu können.

Nach mindestens einer Stunde wurden je 20  $\mu\text{l}$  sf-RPMI1640 zu den Kontrollen, sowie 20  $\mu\text{l}$  des jeweiligen Inkubationsmixes zu den Proben gegeben. Es erfolgte die Inkubation im Brutschrank bei 37°C für vier Stunden.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden in jedes Well je 10  $\mu\text{l}$  Presto Blue Reagenz hinzugefügt. Dieses musste für 90 Minuten im Brutschrank auf die Zellen einwirken. Presto Blue Reagenz ist Zellwand-permeabel, blau gefärbt und in Lösung kaum fluoreszierend. Wird es von metabolisch aktiven Zellen aufgenommen und umgesetzt, so entsteht ein rot fluoreszierender Farbstoff. Die Intensität der Fluoreszenz ist hierbei direkt proportional zur Menge stoffwechselaktiver Zellen.

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte am Infinite M1000 PRO Plattenlesegerät von Tecan. Die Proben wurden für 10 Sekunden geschüttelt und danach mit Laserlicht der Wellenlänge 540 nm bestrahlt. Die Emission wurde bei 580 nm detektiert. Die Mittelwerte der Blank-Kontrollen wurden von den Fluoreszenzwerten der Proben subtrahiert. Es wurden die Mittelwerte der Negativkontrollen für jede Zelllinie einzeln bestimmt und auf 100% gesetzt. Die Ergebnisse der inkubierten Proben wurden dazu ins Verhältnis gesetzt.

### **Durchflusszytometrie**

Als weitere Methode zur Bestimmung der Zellvitalität über einen längeren Zeitraum sind durchflusszytometrische Messungen erfolgt. Die zu untersuchenden Zellen wurden mit Annexin V-APC und Propidiumiodid gefärbt und konnten bezüglich ihrer Vitalität verglichen werden.

Annexin V bindet Phosphatidylserin, wenn dieses sich während der frühen Apoptose von der Membraninnenseite an die Zelloberfläche bewegt. Der angekoppelte Farbstoff Allophycocyanin (APC) wurde während der Messung durch einen Laser mit einer Wellenlänge von etwa 633 nm angeregt und emittierte Licht der Wellenlänge 660 nm. Propidiumiodid (PI) kann im Falle von Zellmembrandefekten in das Zytoplasma und den Zellkern eindringen und dort mit der DNA interkalieren. Es wurde als Nekrosemarker verwendet. Das Absorptionsmaximum von PI liegt bei 535 nm und es emittiert das Signal bei einer Wellenlänge von etwa 578 nm. Auf Grund der deutlichen Differenz zwischen den Emissionswerten der beiden verwendeten Farbstoffe wurden keine Kompensationsberechnungen vorgenommen.

Zur Vorbereitung der Zellen auf den Vitalitätsassay wurden je sieben Zellkulturflaschen Mo7e und Mo7ep210 ausgesät. Jeder Ansatz enthielt  $2 \cdot 10^6$  Zellen in 3 ml serumfreiem RPMI-Medium. Zu jeder Flasche Mo7e wurden je  $0,6 \mu\text{l}$  GM-CSF zugegeben, da die Zellen auf dieses Zytokin angewiesen sind und es auch in der Zellkultur in einer Konzentration von 10 ng/ml benötigen.

Am Folgetag wurden zu jedem Ansatz je 3 ml Inkubationsmische hinzugegeben. Diese enthielten neben den Kontrollen und einer Inkubation mit DMSO, BMP-2, Dorsomorphin und BMP-2 und Dorsomorphin in Kombination. Der sechste Ansatz wurde zunächst für eine halbe Stunde ausschließlich mit BMP-2 inkubiert, bevor Dorsomorphin zugegeben wurde. Beim siebten Ansatz erfolgte die Inkubation in umgekehrter Reihenfolge ebenfalls mit einem Abstand von 30 Minuten. Nach ein bis zwei Stunden im Brutschrank wurden die Zellzahlen der verschiedenen Ansätze mittels Coulter Counter ZZ bestimmt. Auch am dritten Tag wurden die Zellzahlen aller Ansätze ermittelt. Am Tag vier wurden die Zellen nach der Zählung in 5 ml-Röhrchen überführt ( $500.000$  bis  $1,5 \cdot 10^6$  Zellen/Röhrchen) und für die Messung am FACS Calibur der Firma Becton Dickinson vorbereitet. Alle Tubes wurden für 5 Minuten bei 400 rcf zentrifugiert. Die Überstände wurden abgekippt und die Zellen mit  $500 \mu\text{l}$  Annexin V-Bindepuffer gewaschen. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (5 Min. bei 400 rcf). Die Überstände wurden entfernt und alle Proben mit  $100 \mu\text{l}$  Färbelösung versehen (Tabelle 5.6).

**Tabelle 5.6.:** Färbelösung für 15 Messungen

<b>Inhaltsstoffe</b>	Annexin V-APC	Propidiumiodid (1 mg/ml)	1 x Annexin V Bindepuffer
<b>Menge</b>	$12 \mu\text{l}$	$3 \mu\text{l}$	$1.500 \mu\text{l}$

Danach mussten die Zellen für 20 Minuten bei  $4^\circ\text{C}$  im Dunkeln inkubiert werden. Es folgte die Verdünnung mit weiteren  $300\text{-}500 \mu\text{l}$  Annexin V Bindepuffer bevor die Messung erfolgte. Es wurden 20.000 Ereignisse pro Probe gemessen.

---

## 6. Ergebnisse

Gegenstand der vorliegenden Promotionsarbeit ist die Hypothese, dass BCR/ABL-positive Zelllinien mittels bone morphogenetic protein-Signalling (BMP-Signalling) zum Wachstum und zur Differenzierung angeregt werden können. BMPs spielen als Differenzierungsfaktoren eine große Rolle in der Embryonalentwicklung (Hogan 1996). Unkontrolliert proliferierende Tumorzellen befinden sich in einer niederen Stufe der Differenzierung - man bezeichnet sie als entdifferenziert (Clement und Wölfl 2004). In mehreren experimentellen Schritten wurde untersucht, ob BMP-Signalwege einen Einfluss auf BCR/ABL-positive Zellen haben, wie sich dieser geltend macht und durch welche Mechanismen die Beobachtungen zu erklären sind. Hierzu wurden die Zelllinien Mo7e (Akute Megakaryoblasten Leukämie), Mo7ep210 (Mo7e stabil transfiziert mit BCR/ABL-Gen) und K-562 (chronische myeloische Leukämie, Blastenkrise) verwendet.

### 6.1. Vitalitätsanalysen unter BMP-2 und Dorsomorphin

#### 6.1.1. Presto Blue Assay

Der Presto Blues Assay ist eine Methode zur Bestimmung der Stoffwechselaktivität von Zellen. Blaues Presto Blue Reagenz wird von stoffwechselaktiven Zellen umgesetzt zu einem rot fluoreszierenden Farbstoff. Die Intensität der Fluoreszenz ist dabei proportional zur Menge stoffwechselaktiver Zellen.

Zu Beginn wurde die Kontrollzelllinie Mo7e auf ihre Sensitivität gegenüber BMP-2 und dem Inhibitor Dorsomorphin getestet. Dorsomorphin inhibiert selektiv die BMP-Rezeptoren vom Typ I (Yu et al. 2007). Durch Bindung an die Rezeptoren Alk2, Alk3 und Alk6 verhindert es die Signalweiterleitung von BMP-2. Es wurden Mo7e-Zellen in serumfreiem Medium ausgesät. Danach erfolgte die Zugabe der Inkubationslösungen für

die fünf verschiedenen Konditionen. Zur Negativkontrolle wurde serumfreies RPMI1640 Medium hinzugegeben. Des Weiteren erfolgte die Inkubation mit DMSO ( $10\ \mu\text{M}$ ), BMP-2 ( $50\ \text{ng/ml}$ ), Dorsomorphin ( $10\ \mu\text{M}$ ) und der Kombination aus BMP-2 und Dorsomorphin in den genannten Konzentrationen. Die Mo7e-Zellen wurden für vier Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach Zugabe des Presto Blue Reagenzes erfolgte ein weiterer Inkubationsschritt über 90 Minuten. Die Ergebnisse der Assays sind in Tabelle 6.1 dargestellt.

**Tabelle 6.1.:** Zellvitalität nach insgesamt fünfeinhalb Stunden in Prozent mit Standardabweichung bezogen auf die Kontrolle.  $n=3$

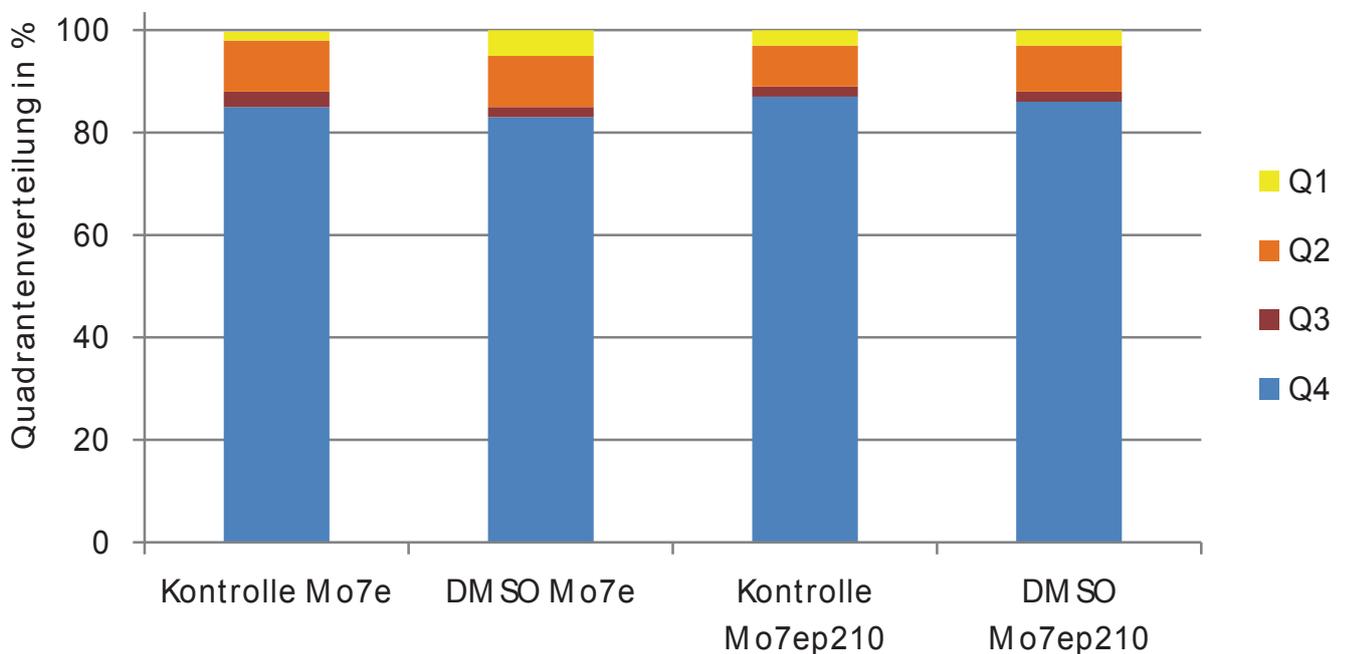
Versuchsbedingung	MW mit SD in %
DMSO	$93 \pm 1$
BMP-2	$99 \pm 10$
Dorsomorphin	$95 \pm 7$
BMP-2+Dorsomorphin	$86 \pm 2$

Die Inkubation mit BMP-2 hatte auf einem sehr hohen Niveau den besten Effekt auf die Zellen. Hier beträgt die mittlere Vitalität  $99 \pm 10\%$ . Unter DMSO, mit einem durchschnittlichen Überleben von  $93 \pm 1\%$ , unterscheiden sich die Zellen nur leicht von den Kontrollen. DMSO hat in der verwendeten Konzentration keinen messbaren schädigenden Effekt auf die Zellen. Betrachtet man die Vitalität der Zellen unter Dorsomorphin, so zeigt sich, dass deren Werte sich nur marginal von den Ergebnissen unter BMP-2 unterscheiden und damit keinen großen Unterschied aufweisen. Mit  $95 \pm 7\%$  liegen sie nah an den Werten der BMP-2-Inkubation. Die Kombination von BMP-2 und Dorsomorphin hat den bedeutendsten Einfluss auf die Mo7e-Zellen. Hier ist die Vitalität um  $14\%$  verringert im Vergleich zur Kontrolle und grenzt sich mit einer geringen Standardabweichung von  $\pm 2$  deutlich von allen anderen Konditionen ab. Auch im Vergleich zur Inkubation mit BMP-2 allein zeigt sich ein Unterschied.

Diese Ergebnisse lassen einen Trend erkennen, nach dem BMP-2 das Überleben der Zellen fördert, während Dorsomorphin einen eher negativen Effekt hat. Es muss jedoch bedacht werden, dass anhand des Presto Blue Assays eine Aussage zur gesamten Zellpopulation gemacht wird. Bestimmungen der Vitalität auf Einzelzellniveau sind mit dieser Methode nicht möglich. Auch Zellen, welche sich schon in einer frühen Phase der Apoptose befinden, sind noch stoffwechselaktiv und können den Farbstoff umsetzen. Aus diesem Grund wurde für die weiteren Versuche eine sensitivere Methode verwendet.

### 6.1.2. Durchflusszytometrie

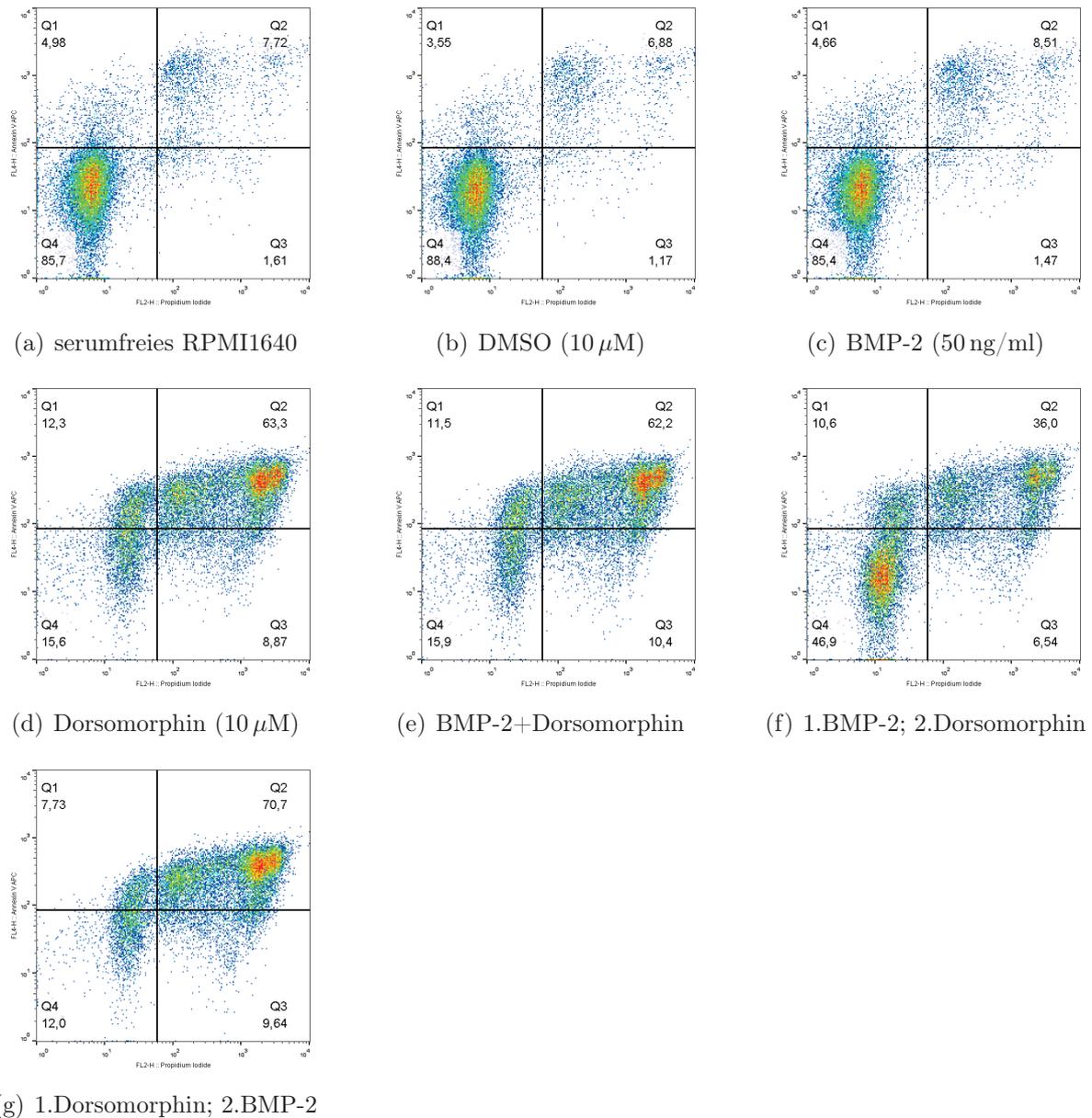
Es wurde zunächst untersucht, ob BMP-2 die Vitalität der Zellen in Abhängigkeit von der Expression des BCR/ABL-Gens steuert. Die Mutterzelllinie Mo7e wurde hier im direkten Vergleich zu der transfizierten Zelllinie Mo7ep210 untersucht. Die Vitalität beider Zelllinien unter Kontrollbedingungen (Inkubation mit serumfreiem (sf) RPMI1640) ist nahezu identisch, wodurch eine wichtige Voraussetzung für den Vergleich der Zellen gegeben ist (Vgl. Abb. 6.1). Zu den Kontrollen wurde serumfreies (sf) RPMI1640 gegeben, da das zugesetzte BMP-2 in diesem Medium gelöst vorlag. Die DMSO-Kontrolle war notwendig, da Dorsomorphin in DMSO gelöst war. Auch unter DMSO bleibt die Vitalität beider Systeme stabil.



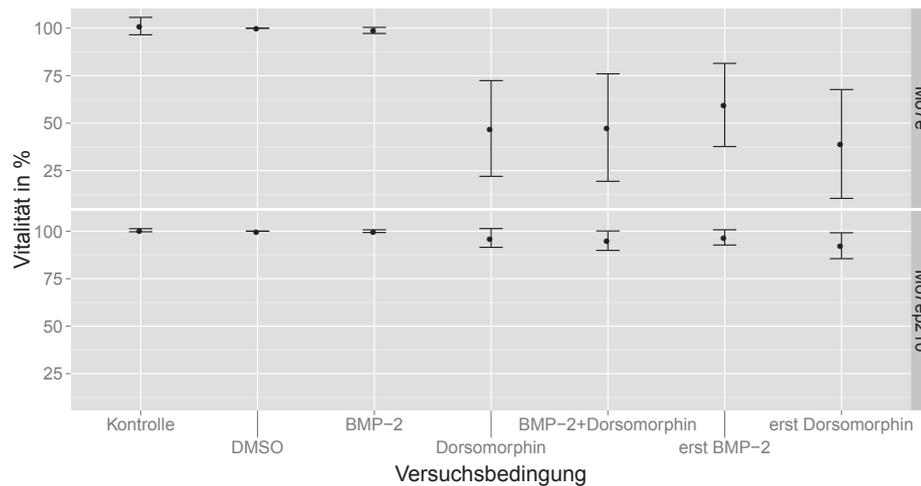
**Abbildung 6.1.:** Verteilung der Zellpopulationen in Prozent für die Kontrolle (sf-RPMI1640) und DMSO-Inkubation in Mo7e und Mo7ep210.  $n=4$ . Die Zellen wurden für 72 h bei 37 °C mit sf-RPMI1640 bzw. DMSO (10  $\mu$ M) inkubiert. Danach erfolgte die durchflusszytometrische Messung der Vitalität. Annexin V-positive Zellen in Quadrant 1 (Q1) gelten als frühapoptotisch. In Quadrant 2 (Q2) detektierte Signale repräsentieren apoptotisch-nekrotische Zellen, welche sowohl Annexin V-, als auch Propidiumiodid (PI)-positiv sind. PI-positive Zellen in Quadrant 3 (Q3) sind nekrotisch. In Quadrant 4 (Q4) werden vitale Zellen detektiert, welche für Annexin V und PI negativ sind.

Beide Zellpopulationen wurden für 72 Stunden mit BMP-2 (50 ng/ml) beziehungsweise dessen Inhibitor Dorsomorphin (10  $\mu$ M) inkubiert und anschließend mittels eines Annexin V/Propidiumiodid-Assays am Durchflusszytometer beurteilt. Das Protein Annexin V (AV) bindet kalziumabhängig Phosphatidylserin (PS), wenn dieses sich während der frühen Apoptose von der Zellinnenseite an die Zelloberfläche verlagert. Phosphatidylserin ist in gesunden Zellen ausschließlich an der zum Zellplasma gewandten Seite der Zellmembran zu finden. Im Zuge des Apoptosevorganges geht jedoch die Membranpolarität verloren und PS tritt auch an der äußeren Zellmembran auf. Durch Kopplung des AV an den Farbstoff Allophycocyanin (APC) kann dieses Phänomen sichtbar gemacht werden. APC absorbiert Licht der Wellenlänge 633 nm. Das Emissionsmaximum liegt bei 660 nm. Wird ein APC-/AV-positives Signal gemessen, so spricht dies für apoptotische Vorgänge an den Zellen. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 6.2 und 6.5 dargestellt.

Dabei sind frühapoptotische Signale jeweils in Quadrant eins (Q1) zu sehen, während die Signale in Quadrant zwei (Q2) für späte Apoptose und Nekrose sprechen. Propidiumiodid (PI) ist im Gegensatz zu Annexin V selbst ein Farbstoff. PI dringt in den Zellkern beschädigter Zellen ein und interkaliert dort mit der DNA. Es absorbiert Licht einer Wellenlänge von 535 nm wenn es sich zwischen die DNA-Helices gelagert hat und sein Emissionsmaximum liegt bei 578 nm. PI-positive Signale befinden sich in den Quadranten zwei (Q2) und drei (Q3). Entscheidend für die Analyse waren die Ergebnisse des vierten Quadranten (Q4). Hier wurden nur ungefärbte Zellen erfasst, welche weder AV- noch PI-positiv und somit vital waren. Für die Mutterzelllinie Mo7e zeigt sich eine deutliche Abhängigkeit der Vitalität vom BMP-Signalling. Das Überleben der Zellen wurde durch die Zugabe von BMP-2 stabilisiert.



**Abbildung 6.2.:** Repräsentative Dotplots für Mo7e. Inkubation (a) mit serumfreiem RPMI1640. (b) mit DMSO ( $10\ \mu\text{M}$ ). (c) mit BMP-2 (50 ng/ml). (d) mit Dorsomorphin ( $10\ \mu\text{M}$ ). (e) mit BMP-2 (50 ng/ml) und Dorsomorphin ( $10\ \mu\text{M}$ ) in Kombination. (f) zunächst allein mit BMP-2 (50 ng/ml); nach 30 Minuten Zugabe von Dorsomorphin ( $10\ \mu\text{M}$ ). (g) zunächst allein mit Dorsomorphin ( $10\ \mu\text{M}$ ); nach 30 Minuten Zugabe von BMP-2 (50 ng/ml). Inkubationen jeweils für 72 h bei  $37\ ^\circ\text{C}$ .



**Abbildung 6.3.:** Annexin V/Propidiumiodid-Assay.  $n=4$ : Inkubation der Mo7e und Mo7ep210 mit serumfreiem RPMI1640 (Kontrolle), DMSO ( $10 \mu\text{M}$ ), BMP-2 (immer  $50 \text{ ng/ml}$ ), Dorsomorphin (immer  $10 \mu\text{M}$ ), BMP-2 und Dorsomorphin, sowie zunächst BMP-2 und nach 30 Minuten Dorsomorphin und zunächst Dorsomorphin und nach 30 Minuten BMP-2. Inkubation für 72 h bei  $37^\circ\text{C}$ . Färbung mit Annexin V-APC ( $0,8\%$  in Bindepuffer) und Propidiumiodid ( $0,2\%$  in Bindepuffer).

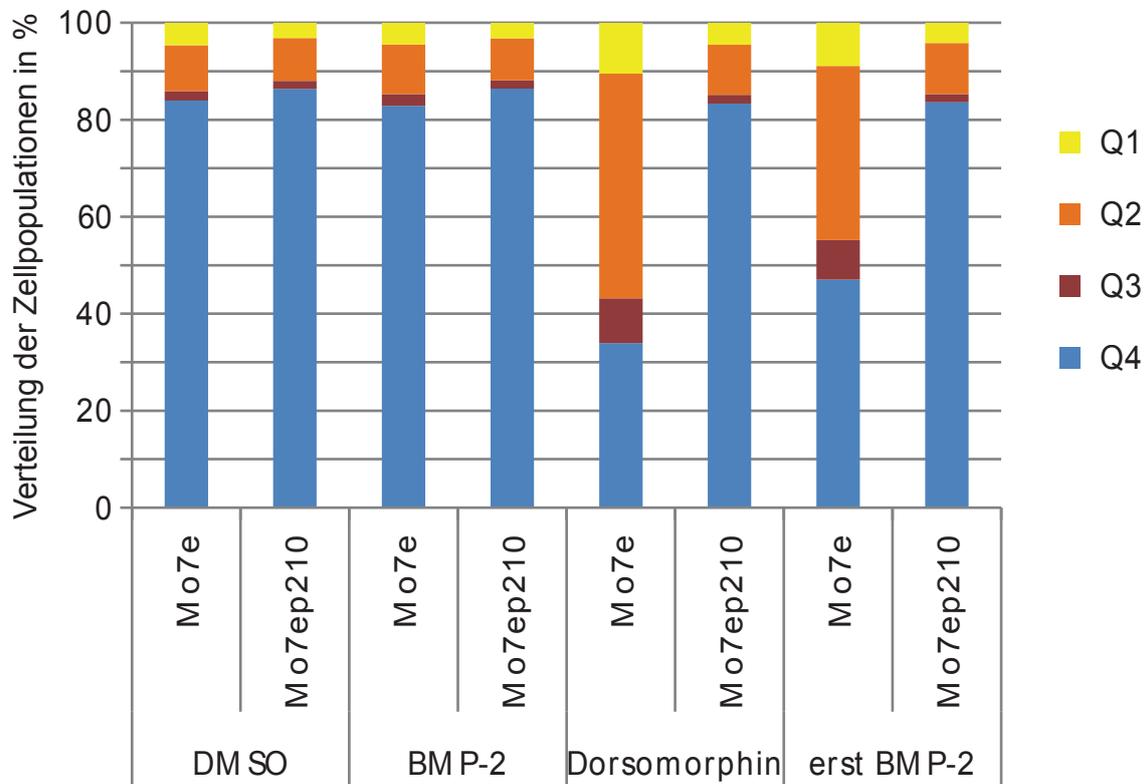
Wie in Abbildung 6.3 zu erkennen, wurde sowohl eine serumfreie Kontrolle, als auch eine DMSO-Kontrolle mitgeführt. Das verwendete Dorsomorphin lag in DMSO gelöst vor und dementsprechend standen vier der fünf Konditionen unter dem Einfluss von DMSO. Aus diesem Grund wurde DMSO als Bezugsgröße für die Darstellung der Ergebnisse in Abbildung 6.3 verwendet. Im Vergleich zur Kontrolle lassen sich hier jedoch keine wesentlichen Unterschiede in der Vitalität der Zellen ausmachen. Es ist davon auszugehen, dass DMSO in der verwendeten Konzentration keine negativen, schädlichen Effekte auf die Mo7e-Zellen hat. Die Kontrollen liegen im Durchschnitt bei  $101\%$  Vitalität, sodass sie sich kaum von der Bezugsgröße DMSO mit  $100\%$  Vitalität unterscheiden. Die Ergebnisse der Inkubation mit BMP-2 bezogen auf DMSO wurden durchschnittlich mit  $99\%$  ermittelt.

Dorsomorphin ist ein selektiver Inhibitor der BMP-Rezeptoren vom Typ I (Yu et al. 2007). Es bindet reversibel an die Rezeptoren Alk2, Alk3 und Alk6 und verhindert dadurch die Signalweiterleitung von BMP-2. Zusätzlich inhibiert Dorsomorphin auch die AMP-activated protein kinase (AMPK). Unter Zugabe von Dorsomorphin sinkt die Vitalität der Mo7e auf bis zu  $15,6\%$  in Versuch zwei (s. Abb. 6.2). Im Durchschnitt beträgt die Zellvitalität unter Dorsomorphin nur  $47\%$  (Vgl. Abb. 6.3).

Inkubiert man die Mo7e mit BMP-2 und Dorsomorphin in Kombination, so lässt sich auch hier die Dominanz des Inhibitors deutlich darstellen. Im Mittel liegt die Vitalität nur bei 48% (Vgl. Abb. 6.3). Bindet Dorsomorphin an einen Typ I Rezeptor, so wird an dieser Stelle die Signalweiterleitung blockiert. BMP-2 kann zwar noch an diesen Rezeptor binden, jedoch wird die Induktion der Signalkaskade verhindert. Wird Dorsomorphin zeitgleich mit BMP-2 zu den Zellen gegeben, so bindet es schneller als BMP-2 an die Rezeptoren und sein inhibitorischer Effekt überwiegt.

Hervorzuheben sind die Resultate der sechsten Kondition, bei welcher BMP-2 30 Minuten vor Dorsomorphin zu den Zellen gegeben wurde. Diese Zeitspanne wurde in der Literatur mehrfach verwendet (Horbelt et al. 2015). 30 Minuten Vorinkubation sind geeignet für die differenzierte Betrachtung der Effekte beider Liganden. Im Diagramm zeigt sich deutlich die höhere Vitalität im Vergleich zu allen anderen Inkubationen mit Dorsomorphin (Vgl. Abb. 6.3). Sie beträgt im Mittel 60%. Im direkten Vergleich erkennt man, dass die Vitalitätswerte der Vorinkubation mit BMP-2 durchschnittlich um 21% höher liegen als die der Vorinkubation mit Dorsomorphin. Wurde Dorsomorphin 30 Minuten vor BMP-2 zu den Mo7e gegeben, so sank die Vitalität auf 39%. Obwohl Dorsomorphin reversibel an die Typ I Rezeptoren bindet und sein Effekt damit zeitlich begrenzt ist, kann die verzögerte Zugabe von BMP-2 keine positiven Effekte mehr erzielen. Werden BMP-Rezeptoren blockiert, so sinkt die Vitalität der Zellen. Hier stellt sich die Frage, welche Rezeptoren in diesem Falle blockiert werden. Dies wird in Abschnitt 6.2 näher dargestellt.

Wie eingangs erwähnt und in Abbildung 6.1 dargestellt, beträgt der Anteil der Zellen, deren Signale im vierten Quadranten detektiert werden in der Kontrolle und unter DMSO jeweils zwischen 80 und 90%. Diese Zellen gelten als vital. Die verbleibenden rund 15% der Zellen sind entweder apoptotisch (Q1) oder schon tot (Q2, Q3). Betrachtet man diese Zellfraktionen der Mo7e unter DMSO, so wurden durchschnittlich etwa 5% in Q1, 9% in Q2 und 2% der Signale in Q3 detektiert. Dieses Verhältnis der apoptotischen, zu apoptotisch-nekrotischen und nekrotischen Zellen bleibt auch unter BMP-2 stabil (Vgl. Abb. 6.4).



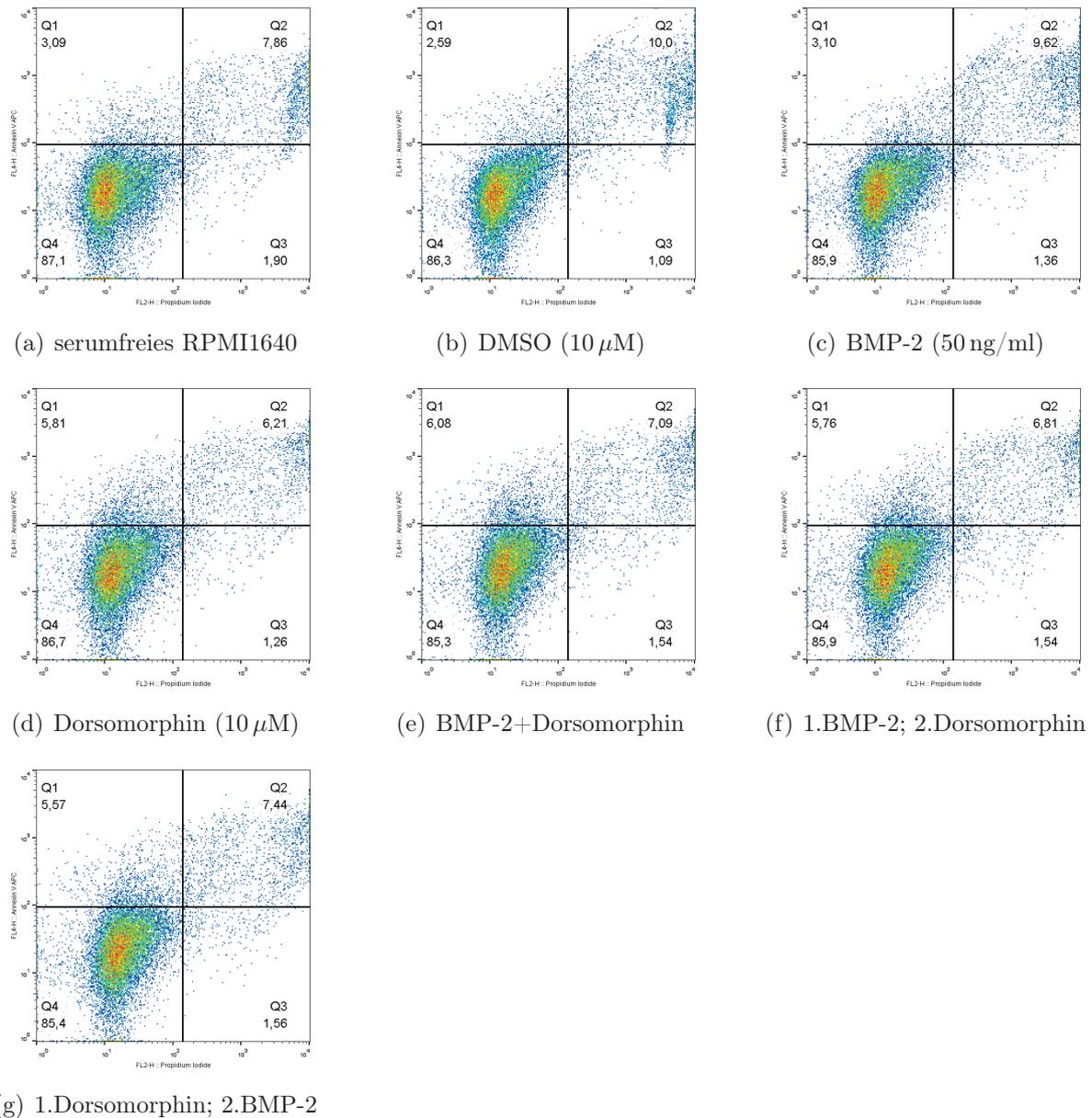
**Abbildung 6.4.:** Verteilung der Zellpopulationen in Prozent für Beispiele in Mo7e und Mo7ep210.  $n=4$ . Die Zellen wurden für 72 h bei 37 °C mit DMSO (10  $\mu$ M), BMP-2 (50 ng/ml), Dorsomorphin (10  $\mu$ M) oder zunächst mit BMP-2 und nach 30 Min. mit Dorsomorphin in den genannten Konzentrationen inkubiert. Danach erfolgte die durchflusszytometrische Messung der Vitalität. Annexin V-positive Zellen in Quadrant 1 (Q1) gelten als frühapoptotisch. In Quadrant 2 (Q2) detektierte Signale repräsentieren apoptotisch-nekrotische Zellen, welche sowohl Annexin V-, als auch Propidiuodid (PI)-positiv sind. PI-positive Zellen in Quadrant 3 (Q3) sind nekrotisch. In Quadrant 4 (Q4) werden vitale Zellen detektiert, welche für Annexin V und PI negativ sind.

Unter Dorsomorphin kommt es zu einer Verschiebung dieser Verhältnisse in den Mo7e-Zellen (Vgl. Abb. 6.4). Der Anteil vitaler Zellen in Q4 nimmt zu Gunsten der Signale in Q2 stark ab. Mit durchschnittlich 42% wird der größte Teil der Zellen unter Dorsomorphin im zweiten Quadranten gemessen und ist AV- und PI-positiv. Auch die Fraktion der in Q1 gemessenen apoptotischen Zellen steigt im Mittel von 4-5% unter DMSO und BMP-2 auf circa 9% unter Dorsomorphin. Die in Q3 erkannten Signale steigen von 2% auf 8%. Derartige Verschiebungen der Verhältnisse sind in den Mo7ep210 nicht zu erkennen (Vgl. Abb. 6.4). Unter der Vorinkubation mit BMP-2 wurde der Anteil vitaler Mo7e-Zellen mit durchschnittlich 44% gemessen. Auch hier ist die Zahl der AV- und PI-positiven, apoptotisch-nekrotischen Zellen (Q2) größer als die der nur einfach gefärbten (33% in Q2 zu jeweils etwa 8% in Q1 und Q3). Die Fraktionen in Q1 und Q3 entsprechen der Größe derer unter Dorsomorphin. Vermutlich liegt es an der langen Inkubationszeit von 72 Stunden, dass kaum rein apoptotische, noch im Sterbeprozess begriffene Zellen, sondern vorrangig schon tote Zellen in der Durchflusszytometrie gemessen wurden.

Die Verhältnisse der vier Quadranten in den Mo7ep210 blieben unter den verschiedenen Inkubationsbedingungen stabil. Das gilt sowohl für den Anteil vitaler Zellen in Q4, der konstant bei 83-86% liegt, als auch für die gefährdeten Zellen. In Q1 wurden durchschnittlich 4% detektiert, in Q2 sind es etwa 10% und in Q3 knapp 2% (Vgl. Abb. 6.4).

Vergleichend zur Mutterzelllinie Mo7e wurden parallel die Mo7ep210 untersucht. In diese Zellen war mittels Transfektion das Fusionsgen BCR/ABL eingebracht worden. Bei der Transkription entsteht das für die CML typische p210BCR/ABL, das Fusionsprotein mit einer Masse von 210 kDa (Hochhaus 2004). Durch die Anwesenheit eines konstitutiv aktiven Promotors wird das BCR/ABL-Gen in diesen Zellen fortwährend exprimiert. Die BCR/ABL-Tyrosinkinase ist dauerhaft vorhanden und immer aktiv. Mo7ep210 benötigen für keine Zytokine wie GM-CSF, IL-3 oder EPO für ihr Wachstum (Berman et al. 2000). Sie scheinen von diesen Faktoren unabhängig zu sein. Dies zeigt sich auch bei den durchgeführten FACS-Analysen. Die verschiedenen Konditionen unterscheiden sich kaum von den Kontrollen (s. Abb. 6.5).

Als Bezugsgröße für die Darstellung in Abbildung 6.3 wurde auch hier die DMSO-Kontrolle gewählt. In Relation dazu beträgt die Vitalität in der Medium-Kontrolle (sf-RPMI1630) im Durchschnitt 101%. Auch mit BMP-2 leben die Zellen zu 100%.



**Abbildung 6.5.:** Repräsentative Dotplots für Mo7ep210. Inkubation (a) mit serumfreiem RPMI1640. (b) mit DMSO ( $10\ \mu\text{M}$ ). (c) mit BMP-2 (50 ng/ml). (d) mit Dorsomorphin ( $10\ \mu\text{M}$ ). (e) mit BMP-2 (50 ng/ml) und Dorsomorphin ( $10\ \mu\text{M}$ ) in Kombination. (f) zunächst allein mit BMP-2 (50 ng/ml); nach 30 Minuten Zugabe von Dorsomorphin ( $10\ \mu\text{M}$ ). (g) zunächst allein mit Dorsomorphin ( $10\ \mu\text{M}$ ); nach 30 Minuten Zugabe von BMP-2 (50 ng/ml). Inkubationen jeweils für 72 h bei  $37\ ^\circ\text{C}$ .

Die Inkubation mit Dorsomorphin allein ergibt im Mittel 96% Vitalität (Vgl. Abb. 6.3). Dieser Unterschied ist nicht zu stark zu bewerten. Ähnlich verhält es sich mit der Kombination aus BMP-2 und Dorsomorphin, worunter die Mo7ep210 immer noch ein Überleben von 95% zeigen. Betrachtet man die Vorinkubation mit BMP-2 und die Vorinkubation mit Dorsomorphin, so beträgt der Unterschied 5%. Im Vergleich zu DMSO haben die Zellen unter Versuchsbedingung sieben (erst Dorsomorphin, nach 30 Min. BMP-2) ein um 8% niedrigeres Überleben. Dies ist die größte nachweisbare Differenz zwischen den Inkubationen der Zelllinie Mo7ep210. Im Unterschied zu den Schwankungen der Mo7e ist dieser Unterschied zu vernachlässigen.

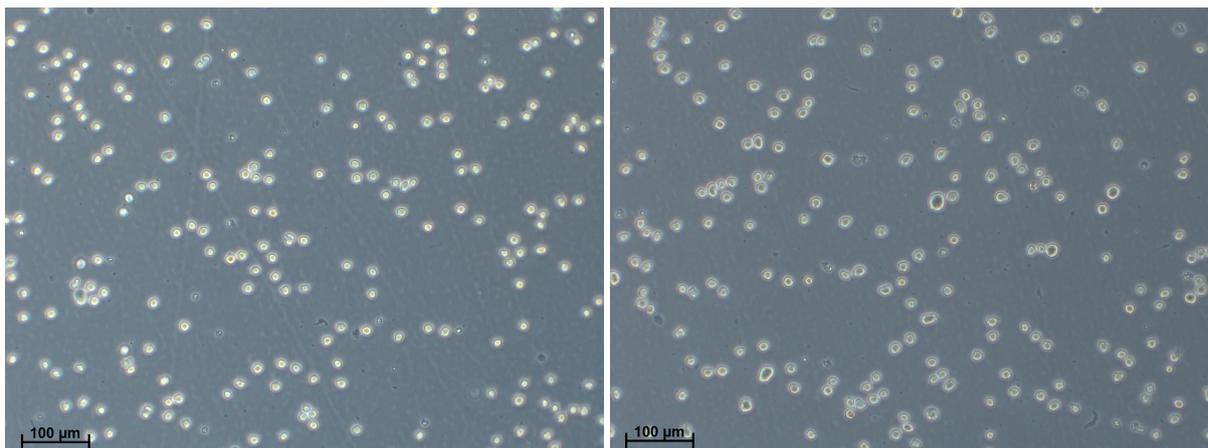
Hieraus wird deutlich, dass BMP-2 weder allein, noch in der Vorinkubation vor Dorsomorphin einen Effekt auf die Mo7ep210 ausübt. Die Zellen sind bezüglich der Vitalität nicht auf diesen Differenzierungsfaktor angewiesen. Die Unabhängigkeit der BCR/ABL-positiven Zelllinie ist deutlich zu erkennen und bildete einen wichtigen Ausgangspunkt für die weiteren Untersuchungen. Es stellte sich die Frage, warum Mo7ep210-Zellen scheinbar unabhängig von BMP-2 zu leben im Stande sind und welche Veränderungen womöglich bezüglich des BMP-Signalling in den Zellen vorliegen. Warum hatte Dorsomorphin keinen vitalitätssenkenden Einfluss auf die Zellen? Warum brauchten sie im Vergleich zu den Mo7e kein BMP-2, um den Effekt des Inhibitors abzumildern?

Die Annahme lag nahe, dass die zu beobachtenden Effekte auf die artifiziell herbeigeführte, dauerhafte Anwesenheit des Fusionsgens zurückzuführen sind. Doch auch in der natürlichen Zelllinie der K-562 ließen sich ähnliche Effekte feststellen. In diesem Zellsystem ist die BCR/ABL-Mutation spontan entstanden und es gilt als Zellmodell mit patientennahen Bedingungen. Die Reaktion sowohl auf BMP-2 als auch auf Dorsomorphin fiel hier sehr gering aus.

Abbildung 6.6 vergleicht die Merkmale der beiden Zelllinien Mo7e und Mo7ep210 unter der Inkubation mit Dorsomorphin. In den Kontrollen erkennt man in beiden Populationen gesunde, runde, eumorphe Zellen mit klar definierten Zellgrenzen, die zumeist vereinzelt im Medium vorliegen. Betrachtet man dahingegen die Mo7e unter dem Einfluss von Dorsomorphin, so lässt sich erkennen, wie beeinträchtigt die Zellen sind. Viele haben ihre natürliche Form verloren (s. Abbildung 6.6 (c) A und A'). Es liegen lediglich noch Zellfragmente vor (B), welche akkumulieren und als „Zelltrümmerhaufen“ im Medium imponieren (B'). Des Weiteren sind die Zellgrenzen einiger Mo7e-Zellen nicht mehr

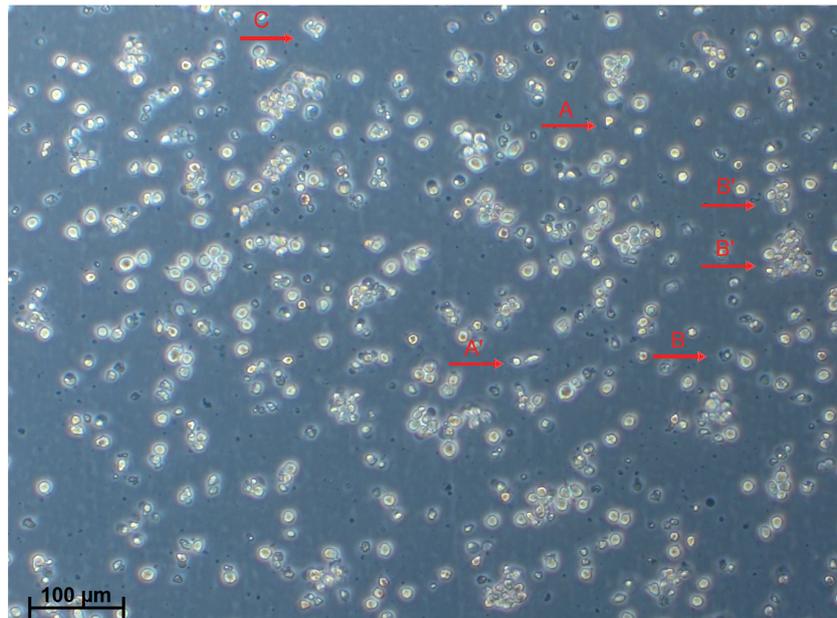
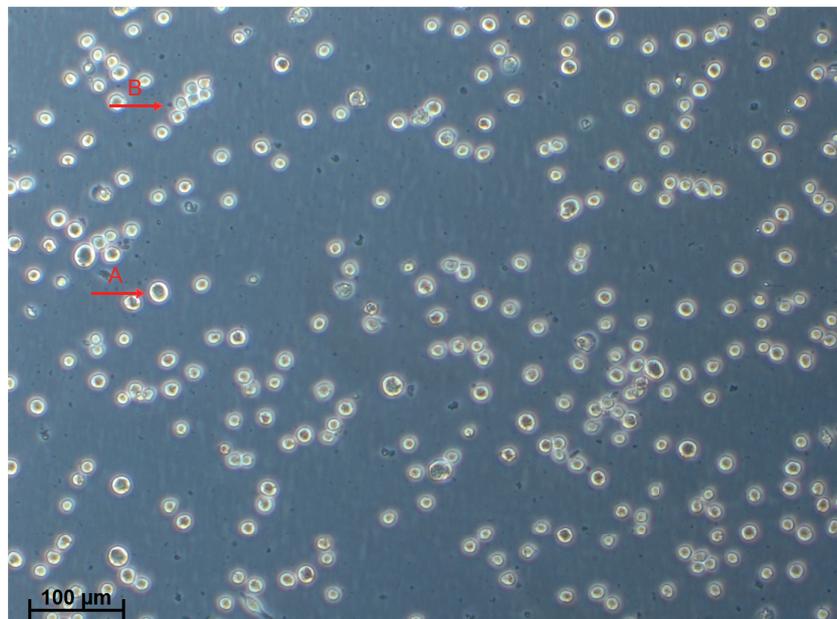
auszumachen (C). Wie oben beschrieben reagieren die Mo7ep210 kaum auf die Zugabe von Dorsomorphin. Die Zellen behalten ihre Größe und Form bei (s. Abbildung 6.6 (d) A). Sie vermehren sich weiterhin und liegen daher entweder einzeln oder in Agglomeraten von Tochterzellen vor (B).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Mutterzelllinie Mo7e sensitiv gegenüber BMP-2 und Dorsomorphin ist, während die transfizierten Mo7ep210 nicht auf diese Faktoren reagieren. BMP-2 allein kann die Vitalität der Mo7e zwar nicht steigern, wird es jedoch als Vorinkubation zu den Zellen gegeben, so hat es einen protektiven Effekt gegenüber Dorsomorphin. Dorsomorphin senkt die Vitalität der Mo7e, sowohl bei alleiniger Gabe, als auch bei der kombinierten Gabe mit BMP-2 zur gleichen Zeit. Lediglich bei einem Vorlauf des BMP-2 von 30 Minuten kann der inhibitorische Einfluss abgeschwächt werden. Die Mo7ep210 sind insensitiv gegenüber den verwendeten Faktoren und zeigen in allen Konditionen eine hohe Vitalität.



(a) Mo7e Kontrolle

(b) Mo7ep210 Kontrolle

(c) Mo7e erst Dorsomorphin ( $10 \mu\text{M}$ )(d) Mo7ep210 erst Dorsomorphin ( $10 \mu\text{M}$ )

**Abbildung 6.6.:** Mo7e im Vergleich zu Mo7ep210 unter ausgewählten Inkubationsbedingungen: (a) Mo7e inkubiert mit serumfreiem RPMI1640 (b) Mo7ep210 inkubiert mit serumfreiem RPMI1640 (c) Mo7e vorinkubiert mit Dorsomorphin ( $10 \mu\text{M}$ ). Nach 30 Minuten Zugabe von BMP-2 ( $50 \text{ ng/ml}$ ). A/A': dysmorphe Zellen. B: Zellfragmente. B': akkumulierte Zellfragmente. C: undefinierte Zellgrenzen. (d) Mo7ep210 vorinkubiert mit Dorsomorphin ( $10 \mu\text{M}$ ). Nach 30 Minuten Zugabe von BMP-2 ( $50 \text{ ng/ml}$ ). A: eumorphe Zellen. B: Zellagglomerat. Fotos nach 48-stündiger Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$ .

---

## 6.2. Genexpressionsanalysen von BMPs und ihren Rezeptoren

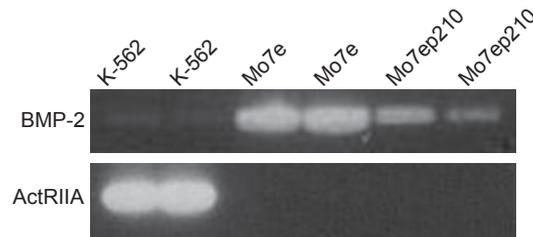
### 6.2.1. Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Den Beobachtungen der Vitalitätsassays nachgehend, wurden Genexpressionsanalysen vorgenommen. Es stellte sich die Frage, warum BMP-2 in den Mo7e eine regulatorische Funktion hat, während es von den Mo7ep210 nicht zum Überleben benötigt wird. Außerdem wurden starke Reaktionen der Mo7e auf Dorsomorphin beobachtet. Dorsomorphin führte in den Mo7e-Zellen zu einem massiven Vitalitätsverlust, während es in der BCR/ABL-positiven Zelllinie kaum Veränderungen bewirkte. Eine Ursache könnte sein, dass wichtige Komponenten des BMP-Signalweges in den Mo7ep210 nicht mehr funktionsfähig sind.

Hierzu wurden die Zelllinien K-562, Mo7e und Mo7ep210 verwendet. Die Zelllinie Mo7ep210 stammt von der Mutterzelllinie Mo7e ab, welche bei allen Experimenten als Kontrolle herangezogen wurde. In die Kerne dieser Mutterzellen war mittels Transfektion das BCR/ABL-Fusionsgen eingebracht worden, sodass die transfizierten Zellen die für eine CML typische konstitutiv aktive Tyrosinkinase enthielten. Aus den drei Zelllinien wurde RNA isoliert, cDNA synthetisiert und mindestens drei Reverse-Transkriptase-PCRs für jedes zu untersuchende BMP und jeden BMP-Rezeptor durchgeführt.

Die Expression von BMP-3, -4, -5, -6 und -7 war in allen drei Zelllinien mittels PCR nicht nachweisbar. Die Gene für die BMP-Rezeptoren BMPR1B und BMPR2 wurden sehr stark exprimiert. Unterschiede in der Genexpression zeigten sich für die Gene BMP-2 und ActRIIA (Activin-Rezeptor IIA). Das BMP-2-Gen war in der Mutterzelllinie Mo7e besonders stark exprimiert, während sich das Signal in den transfizierten Mo7ep210 etwas schwächer darstellte. Das entsprechende Genprodukt war in den K-562 kaum zu detektieren. Diese Feststellung lässt sich gut mit den Beobachtungen aus den FACS-Analysen vereinbaren. Da Mo7e-Zellen auf BMP-2 angewiesen sind, scheint es nur konsequent, dass sie dieses auch selbst herstellen. Durch die Transkription und Translation von BMP-2 können die Zellen zur Steuerung ihrer eigenen Wachstums- und Proliferationsprozesse beitragen. Das BMP-2-Gen wurde von der Kontrollzelllinie Mo7e am stärksten und von den BCR/ABL-positiven Zellen wesentlich schwächer exprimiert oder war gar nicht nachweisbar.

Dazu gegensätzlich verhielt es sich mit der Genexpression des Rezeptors ActRIIA. Dieser wurde von K-562-Zellen sehr stark exprimiert und war in beiden Mo7e-Zelllinien nicht nachweisbar. ActRIIA ist eine Serin-Threonin-Kinase vom Typ II. BMPs sind Liganden dieser Rezeptoren, allerdings ist ihre Affinität zu Typ II Rezeptoren geringer als zu Typ I Rezeptoren. Typ I Rezeptoren wiederum sind Ziele von Dorsomorphin, das durch die Bildung eines reversiblen Ligand-Rezeptor-Komplexes die BMP-Signalkaskade behindern kann.



**Abbildung 6.7.:** Reverse-Transkriptase-PCR: PCR-Produkte von BMP-2 und ActRIIA in den Zelllinien K-562, Mo7e und Mo7ep210

### 6.2.2. Real-time RT-PCR

Die RT-PCR erlaubt eine Endpunktbestimmung der Transkriptmenge, die semi-quantitativ ist. Die Ergebnisse lassen sich untereinander vergleichen und in eine Reihenfolge bringen, aber es gibt keine definierte Bezugsgröße. Um Aussagen über die Quantität der Genexpression treffen zu können, wurden für alle genannten Gene real-time RT-PCRs durchgeführt. In Dreifachbestimmung wurde zunächst RNA isoliert und im Anschluss in cDNA umgeschrieben. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe des effizienz-korrigierten relativen Quantifizierungsmodells nach Pfaffl ausgewertet (Pfaffl 2001).

Dieses Modell beschreibt das Verhältnis des Expressionsunterschiedes von Zielgenen zu Referenzgenen. Dabei steht die Differenz zwischen Kontrolle und Behandlung des Zielgens im Zähler und entsprechend die Differenz zwischen Kontrolle und Behandlung des Referenzgens im Nenner (Vgl. Formel 5.1). Die Zielgene wurden ins Verhältnis gesetzt zu  $\beta$ -Aktin als Referenzgenen. Als Kontrollwerte von Zielgenen und Referenzgenen dienten die Ergebnisse der Mo7e-Zellen. Niedrige Werte in Tabelle 6.2 sprechen für eine geringe Expression des Gens verglichen mit der Expression in Mo7e-Zellen. Hohe Werte dagegen zeigen eine starke Genexpression in K-562 bzw. Mo7ep210 im Vergleich zu Mo7e-Zellen an.

**Tabelle 6.2.:** Logarithmierte Pfaffl-Werte von K-562 und Mo7ep210 bezogen auf Mo7e

	<b>K-562</b>	<b>Mo7ep210</b>
BMP-2	$-11,4 \pm 4$	$-4,5 \pm 3$
BMP-3	$-2,3 \pm 1$	$0,2 \pm 1$
BMP-4	$-4,8 \pm 4$	$0,3 \pm 4$
BMP-5	$-2,9 \pm 2$	$-22,7 \pm 21$
BMP-6	$-2,8 \pm 2$	$0,3 \pm 1$
BMP-7	$-2,8 \pm 2$	$-20,4 \pm 23$
BMPRIIB	$0,8 \pm 30$	$-6,0 \pm 18$
BMPRII	$2,4 \pm 3$	$7,1 \pm 14$
ActRIIA	$6,8 \pm 5$	$2,4 \pm 1$

Hiermit erreichten die K-562 für die Expression des BMP-2-Gens einen durchschnittlichen logarithmierten Pfaffl-Wert von  $-11,4 \pm 4$  (Vgl. Tabelle 6.2) bzw. einen Ct-Wert von 36,9, was für eine sehr schwache Expression spricht (s. Tabelle 6.3). Je höher der Ct-Wert bei der real-time RT-PCR, desto mehr PCR-Zyklen wurden benötigt, um ein Fluoreszenzniveau über dem Schwellenwert zu erreichen. Hierfür wurde das „LightCycler SYBR-Green Kit“ von Roche verwendet. Je mehr PCR-Zyklen für den Nachweis des Gens notwendig waren, desto weniger Ausgangsmaterial war in der Probe. Die niedrige Expression des BMP-2-Gens in den K-562 konnte hier bestätigt werden. Ebenso die BMP-2-Werte für die Mo7ep210, welche mit durchschnittlich 32,3 Zyklen und einem mittleren logarithmischen Pfaffl-Wert von  $-4,5 \pm 3$  eine stärkere Expression des BMP-2 wie in der RT-PCR bestätigten. Die mit großem Abstand zu den K-562 stärkste Expression von BMP-2 konnte in den Mo7e festgestellt werden. Der Ct-Mittelwert lag bei 28,1 Zyklen. Mo7e-Zellen benötigen BMP-2. Daher erscheint es sinnvoll, dass sie BMP-2 selbst bilden. Die beiden anderen Zelllinien Mo7ep210 und K-562 zeigen dagegen sehr niedrige Expressionswerte.

Auch für die Expression des ActRIIA wurden die Ergebnisse der RT-PCR in der real-time RT-PCR bestätigt. Während die Mo7e-Zellen mit durchschnittlich 36,8 Zyklen eine sehr niedrige Expression zeigten, war diese bei den Mo7ep210 mit 34,4 Zyklen und einem logarithmierten Pfaffl-Wert von  $2,4 \pm 1$  deutlich größer. Die höchste Expressionsrate war in den K-562 vorhanden (24,3 Zyklen bzw.  $6,8 \pm 5$  log (Pfaffl)). Für die weiteren sieben in der RT-PCR untersuchten Gene wurden auch mittels real-time RT-PCR keine Unterschiede in der Expression zwischen den drei Zelllinien festgestellt. Dies waren die BMPs 3, 4, 5, -6 und 7 sowie die Rezeptoren BMPRIIB und BMPRII (s. Tab. 6.2).

**Tabelle 6.3.:** Ct-Mittelwerte mit Standardabweichung für BMP-2 und Act-RIIA in den Mo7e, Mo7ep210 und K-562

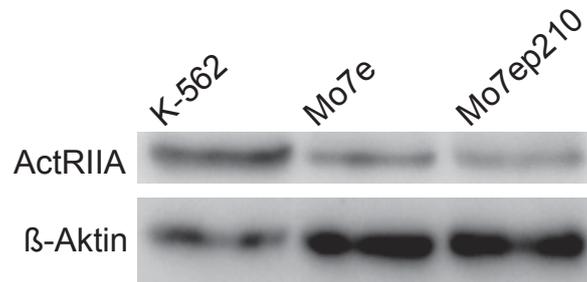
	Mo7e	Mo7ep210	K-562
BMP-2	28,1 ± 3	32,3 ± 2	36,9 ± 2
ActRIIA	36,8 ± 1	34,4 ± 1	24,3 ± 2

### 6.2.3. Westernblot zum Nachweis von ActRIIA

Der erhebliche Unterschied in der Expression von BMP-2 in den drei Zelllinien war durch Vorarbeiten aus der Arbeitsgruppe aufgefallen (Elsner 2013). Hier war ebenfalls die Expression von BMP-2 in den Zelllinien K-562, Mo7e und Mo7ep210 verglichen und festgestellt worden, dass BMP-2 in den K-562 am wenigsten stark exprimiert wurde. Die Expression in den K-562 war sogar 64fach geringer als in den Mo7e. Dass sich die Expression auch bei ActRIIA so stark unterscheiden würde, war nicht bekannt. Um dieser Beobachtung weiter nachzugehen, wurden Proteinlysate der drei Zelllinien angefertigt und mittels Westernblot untersucht. Auch hier (Abb. 6.8) erkennt man die starke Expression in den K-562 auf Proteinebene. Die Banden der Mo7e-Zelllinien sind deutlich schwächer. Um diesen subjektiven Eindruck zu objektivieren, wurden die Banden mit dem Programm Image J vermessen und die Graustufen gegeneinander verrechnet (Vgl. Tab. 6.4). Es wurden die Hintergrundwerte subtrahiert und als Kontrolle diente das Referenzprotein  $\beta$ -Aktin. An Hand dieser Auswertung wird deutlich, dass sich nicht nur die Genexpression, sondern auch die Proteinmenge unterscheiden. Das Gen ActRIIA wird in den K-562 stärker exprimiert als in beiden Mo7e-Zelllinien und führt zu einer höheren Proteinpräsenz. Mo7e und Mo7ep210 unterscheiden sich ebenfalls auf Proteinebene, wobei ActRIIA in den transfizierten Zellen stärker vorhanden ist als in den Mo7e.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse der Reverse-Transkriptase-PCR durch die real-time RT-PCR bestätigt werden konnten. Die Expression von BMP-2 ist in der Mutterzelllinie Mo7e am stärksten und in den BCR/ABL-positiven Zelllinien im Vergleich schwach. Demgegenüber ist die Expression von ActRIIA in den K-562 und Mo7ep210 höher als in der Mutterzelllinie ohne Fusionsgen. Diese Beobachtung wurde im Westernblot weiterführend untersucht und konnte auch dort bestätigt werden. Damit

lässt sich die eingangs gestellte Frage mit ja beantworten. Es kommt unter der Präsenz des Fusionsgens BCR/ABL zu einer Veränderung der Expression von BMPs und BMP-Rezeptoren.



**Abbildung 6.8.:** Westernblot zum Nachweis von Activin Rezeptor IIA mit  $\beta$ -Aktin als HKG in den Zelllinien K-562, Mo7e und Mo7ep210.

**Tabelle 6.4.:** Quantifizierung (Image J) von ActRIIA im Verhältnis zu  $\beta$ -Aktin mit Standardabweichung in den Zelllinien K-562, Mo7e, Mo7ep210

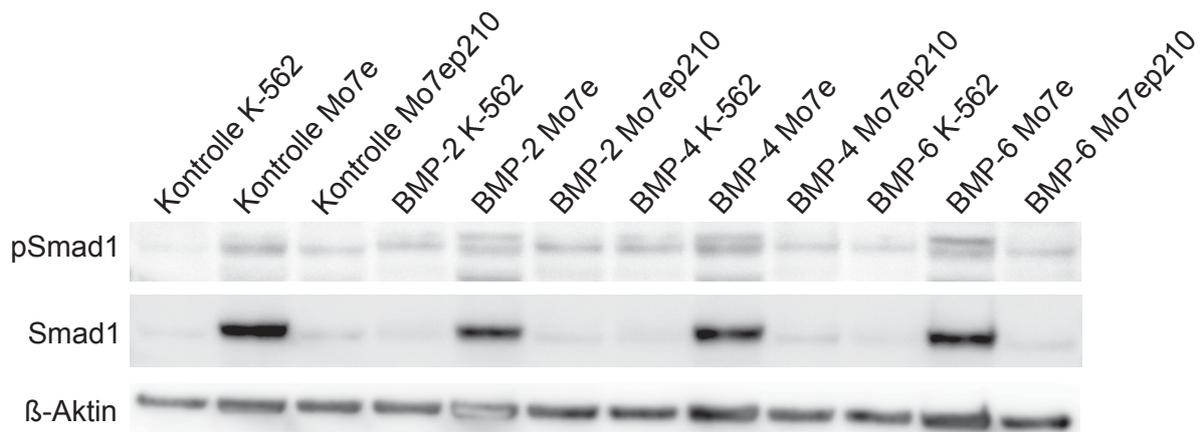
	K-562	Mo7e	Mo7ep210
ActRIIA/ $\beta$ -Aktin	$1,74 \pm 0,8$	$0,51 \pm 0,1$	$0,41 \pm 0,0$

### 6.3. Westernblotanalysen zu Smad1 und ID1

Unter Anwesenheit von BCR/ABL kommt es zu einer Veränderung der Expression von BMPs und BMP-Rezeptoren. Es ergab sich die Frage, ob diese Veränderungen das BMP-Signalling funktionell beeinflussen würden? War das BMP-Signalling unter dem Einfluss des Fusionsgens weiterhin funktionstüchtig?

Um sich der Antwort auf diese Frage zu nähern, wurde das Signalwegsprotein Smad1 untersucht. Smad1 gehört zu einer Familie von Proteinen, die an sehr unterschiedlichen Signalwegen beteiligt sind. Binden BMPs an einen BMP-Rezeptor Typ I, so kommt es zur Heterodimerisierung mit einem BMP-Rezeptor Typ II und die intrazelluläre Signalkaskade wird ausgelöst. Die Kinasedomäne des Typ I Rezeptors aktiviert mittels Phosphorylierung Smad1.

Es wurden Inkubationsversuche der Zelllinien K-562, Mo7e und Mo7ep210 mit den BMPs 2, 4 und 6 durchgeführt. In den Genexpressionsuntersuchungen hatte sich gezeigt, dass BMP-2 sehr stark von den Mo7e-Zellen exprimiert wird. BMP-4 und -6 sind endogene Differenzierungsfaktoren, die im Blut vorhanden sind und dadurch in Kontakt mit Leukozyten kommen können. Erste Untersuchungen aus der Arbeitsgruppe zeigten, dass Smad1 in den Mo7ep210 nicht nachgewiesen werden kann (Elsner 2013). Auch in den K-562 sind die Banden nur sehr schwach auszumachen (Vgl. Abb. 6.9). Im Kontrast dazu lässt sich Smad1 in den Mo7e nachweisen (Vgl. Tabelle 6.5). Es kommt demnach in den BCR/ABL-positiven Zellen zu einer Herabregulierung der Smad1-Expression. Diese Erkenntnis liefert einen Erklärungsansatz dafür, dass die Mo7ep210, wie in den Vitalitätsassays nachgewiesen, nicht auf BMPs reagieren können. Zwar ist Smad1 nicht das einzige zyttoplasmatische Molekül, über welches das BMP-Signalling geleitet werden kann, das BMP-2-Signal ist jedoch sehr stark mit Smad1 verbunden. Smad1 wird durch Phosphorylierung aktiviert. Auch diese ist in den Mo7e nachzuweisen, wobei sie schon in der Kontrollprobe vorliegt und durch die Zugabe von BMPs gesteigert wird (Vgl. Tab. 6.6).



**Abbildung 6.9.:** Westernblot zum Nachweis von Smad1 und pSmad1 unter Inkubation mit BMP-2 (50 ng/ml), BMP-4 (50 ng/ml) und BMP-6 (50 ng/ml) in den Zelllinien K-562, Mo7e und Mo7ep210. Zur Medium-Kontrolle diente sf-RPMI1640.  $\beta$ -Aktin wurde als HKG verwendet.

**Tabelle 6.5.:** Quantifizierung (Image J) von Smad1 im Verhältnis zur Referenz mit Standardabweichungen in den Zelllinien K-562, Mo7e, Mo7ep210. n=4

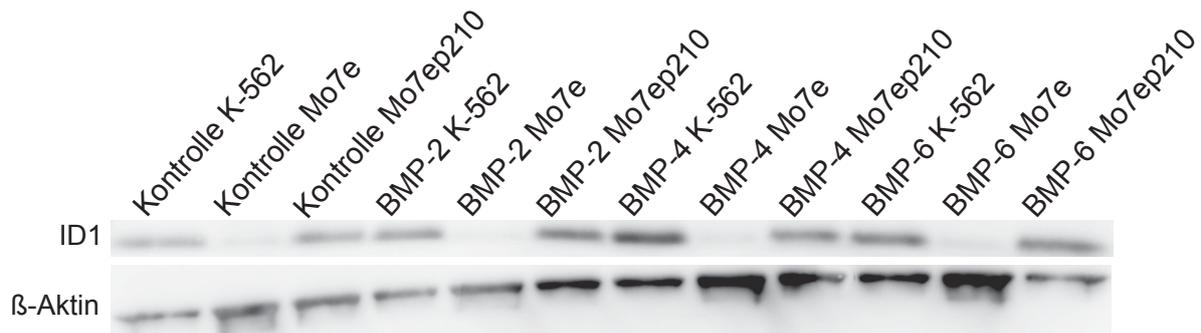
	<b>K-562</b>	<b>Mo7e</b>	<b>Mo7ep210</b>
<b>Smad1/<math>\beta</math>-Aktin</b>			
Kontrolle	0,1 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 1,0	0,2 $\pm$ 0,2
BMP-2	0,1 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,5	0,2 $\pm$ 0,1
BMP-4	0,2 $\pm$ 0,2	0,7 $\pm$ 0,3	0,1 $\pm$ 0,1
BMP-6	0,1 $\pm$ 0,0	1,7 $\pm$ 2,3	0,1 $\pm$ 0,1

**Tabelle 6.6.:** Quantifizierung (Image J) von pSmad1 im Verhältnis zu Smad1 mit Standardabweichungen in Mo7e. n=4

<b>Versuchsbedingung</b>	<b>MW und SD in %</b>
Kontrolle	0,5 $\pm$ 0,2
BMP-2	0,6 $\pm$ 0,4
BMP-4	0,7 $\pm$ 0,5
BMP-6	0,5 $\pm$ 0,3

Neben dem Signalwegprotein Smad1 wurde die Expression eines Zielgens des BMP-Signallings, die des inhibitor-of-DNA-binding-Protein 1 (ID1) untersucht. Es erfolgte die Inkubation der drei verschiedenen Zelllinien mit BMP-2, -4 und -6. ID1 gilt als sehr frühzeitig exprimierter Marker für Stammzeleigenschaften einer Zelle. ID-Proteine tragen zum Verbleib der Zellen im Zellzyklus und damit zur Unterdrückung der Differenzierung bei (Kang et al. 2003). Wie in Abbildung 6.10 zu erkennen, ist kein ID1 in den Mo7e-Zellen nachzuweisen. Dies spricht für die Differenzierung der Zellen über einen stammzellähnlichen Zustand hinaus. Obwohl ID1 ein Zielgen der BMP-Signalkaskade ist, kann hier durch Zugabe von BMPs keine Steigerung der Expression erreicht werden. In den K-562-Zellen und den Mo7ep210 lässt sich im Gegensatz dazu deutlich die Intensität der ID1-Banden erkennen. Hier liegt eine starke Proteinpräsenz vor.

In gesunden Zellen werden die ID-Proteine während der Differenzierung herunter reguliert. Mutiert eine gesunde Zelle zur Krebszelle, so wird die ID-Produktion reaktiviert. Dies kann unter anderem durch den Einfluss von BMPs geschehen. Eine weitere Möglichkeit die Funktionstüchtigkeit des BMP-Signallings in den drei zu untersuchenden Zelllinien festzustellen, ist demnach der Nachweis von ID1.



**Abbildung 6.10.:** Westernblot zum Nachweis von ID1 unter Inkubation mit BMP-2 (50 ng/ml), BMP-4 (50 ng/ml) und BMP-6 (50 ng/ml) in den Zelllinien K-562, Mo7e und Mo7ep210. Zur Medium-Kontrolle diente sf-RPMI1640.  $\beta$ -Aktin wurde als HKG verwendet.

Wie in Abbildung 6.10 zu erkennen, ist ID1 besonders in den K-562 nachweisbar. Auch in den Mo7ep210 ist eine starke Proteinpräsenz festzustellen. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die Aktivierung des ID1 in diesem Fall nicht über einen BMP-Liganden und die nachfolgende Phosphorylierung von Smad1 erfolgt sein kann. Bei den vorausgegangenen Westernblotanalysen von Smad1 und dessen aktivierter Form wurde festgestellt, dass es in den K-562 nur sehr schwach und in den Mo7ep210 fast gar nicht nachweisbar ist. Welcher Signalweg regelt hier die Expression von ID1? Handelt es sich um Smad1-unabhängiges BMP-Signalling? Diese Frage kann mit nein beantwortet werden. Vergleicht man die Intensität der Westernblot Banden aller vier Konditionen, so lässt sich feststellen, dass sich die Proteinpräsenz durch BMPs nicht maßgeblich steigern lässt (Vgl. Abb. 6.10 bzw. Tab. 6.7). Schon in den Kontrollen wird ID1 gebildet. Bei Inkubation mit BMP-2 und BMP-4 ist ein leichter Aufwärtstrend zu bemerken und bei der Inkubation mit BMP-6 bleibt das Proteinniveau im Vergleich zur Kontrolle konstant. Warum bzw. wie kommt es also zum Anstieg des ID1?

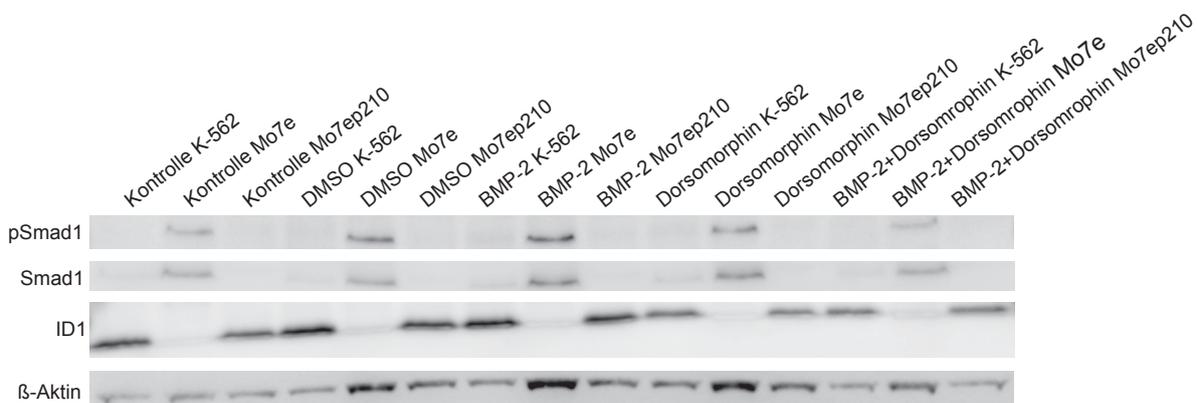
**Tabelle 6.7.:** Quantifizierung (Image J) von ID1 im Verhältnis zum Referenzprotein mit Standardabweichungen in den Zelllinien K-562, Mo7e und Mo7ep210.  $n=3$

	<b>K-562</b>	<b>Mo7e</b>	<b>Mo7ep210</b>
Kontrolle	0,7 $\pm$ 0,3	0,2 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,5
BMP-2	1,8 $\pm$ 1,8	0,4 $\pm$ 0,5	1,1 $\pm$ 0,9
BMP-4	2,1 $\pm$ 2,4	0,4 $\pm$ 0,5	0,6 $\pm$ 0,3
BMP-6	1,3 $\pm$ 0,7	0,3 $\pm$ 0,3	1,1 $\pm$ 0,3

Birkenkamp und Kollegen haben die entscheidende Rolle von ID1 bei der Aufrechterhaltung des leukämischen Phenotypes in K-562-Zellen beschrieben (Birkenkamp et al. 2007). Die BCR/ABL-Mutation sorgt hier über die Inaktivierung des Transkriptionsfaktors FOXO3a für eine übermäßige Expression von ID1. Sowohl K-562 als auch Mo7ep210 können als „entdifferenziert“ gelten. In ihrer Entwicklung von der pluripotenten Stammzelle hin zu einem voll funktionstüchtigen Leukozyten sind sie nicht so weit fortgeschritten wie die Mo7e.

Nach Inkubation mit verschiedenen BMPs, erfolgte nun der Vergleich mit einem Inhibitor des BMP-Signallings - mit Dorsomorphin. Schon in den oben beschriebenen Vitalitätsanalysen hatte sich gezeigt, dass Dorsomorphin das Überleben der Zellen sehr stark verringern kann. Mittels Westernblot sollte nun untersucht werden, wie dieses Phänomen auf Proteinebene zu erklären ist. Welche biologischen Prozesse lagen der Reaktion der Mo7e zu Grunde? Warum benötigten die Mo7e das BMP-2, während die BCR/ABL-positiven Zellen weder auf BMP-2 noch auf Dorsomorphin reagierten?

Es wurden die drei Zelllinien K-562, Mo7e und Mo7ep210 in je fünf verschiedenen Konditionen inkubiert. Neben einer serumfreien Kontrolle wurde mit DMSO (10  $\mu$ M), BMP-2 (50 ng/ml), Dorsomorphin (10  $\mu$ M) und der Kombination aus BMP-2 und Dorsomorphin in den bekannten Konzentrationen inkubiert. Die Inkubationszeit betrug vier Stunden.



**Abbildung 6.11.:** Westernblot zum Nachweis von pSmad1, Smad1 und ID1 unter Inkubation mit BMP-2 (50 ng/ml) und Dorsomorphin (10  $\mu$ M) in den Zelllinien K-562, Mo7e und Mo7ep210. Zur Medium-Kontrolle diente sf-RPMI1640.  $\beta$ -Aktin wurde als HKG verwendet.

**Tabelle 6.8.:** Quantifizierung (Image J) von pSmad1 im Verhältnis zu Smad1 mit Standardabweichungen in Mo7e. n=5

Versuchsbedingung	MW und SD in%
Kontrolle	$0,8 \pm 0,4$
DMSO	$1,0 \pm 0,4$
BMP-2	$0,7 \pm 0,4$
Dorsomorphin	$0,6 \pm 0,3$
BMP-2+Dorsomorphin	$0,6 \pm 0,3$

Wie bei der Inkubation mit BMP-2, -4 und -6 beobachtet, ließ sich Smad1 nur in den Mo7e nachweisen (s. Abb. 6.11). Für die K-562 und die Mo7ep210 lassen sich im Westernblot keine Banden erkennen. Das Experiment wurde drei Mal durchgeführt. In den ersten beiden Versuchen wurde  $\beta$ -Aktin, im dritten Versuch GAPDH als Referenzprotein gewählt. Im Mittel war das Smad1-Level der Mo7e in den Kontrollen und unter BMP-2 am höchsten. Die Auswertung mit Image J ergab für die Kontrolle im Verhältnis zum Referenzprotein einen Mittelwert von  $6,3 \pm 10$  (s. Tab. 6.9).

Neben der starken Proteinpräsenz in der Kontrolle der Mo7e war Smad1 auch unter BMP-2 sehr deutlich nachzuweisen. Hier beträgt der Image-J-Wert  $3,4 \pm 4$ . Unter DMSO-Einfluss liegt der Wert niedriger bei  $1,3 \pm 2$ . In den beiden Dorsomorphin-enthaltenden Ansätzen erreichen die Banden lediglich Stärken von  $1,0 \pm 1$  unter Dorsomorphin und  $1,3 \pm 2$  für BMP-2 und Dorsomorphin in Kombination.

In den Mo7ep210 ergibt die Auswertung von Smad1 mit Image J Werte zwischen  $0,8 \pm 1$  und  $1,6 \pm 3$ . Dies bestätigt, dass in diesen Zellen fast kein Smad1 vorhanden ist (s. Tab. 6.9). In den K-562 wurde ein höherer Wert für Smad1 in den Kontrollen erhoben. Alle anderen in den K-562 ermittelten Werte liegen jedoch in einem sehr niedrigen Bereich zwischen  $0,6 \pm 1$  und  $1,9 \pm 2$ , sodass auch hier von einer Herabregulierung des Smad1 gesprochen werden kann (s. Tab. 6.9).

Smad1 wird bis auf den hohen Kontrollwert in den K-562 nur in den Mo7e gebildet und kann folglich auch nur in diesen Zellen phosphoryliert werden (Vgl. Abb. 6.11). Es zeigt sich nicht, dass die Phosphorylierung unter BMP-2 am stärksten ist, da sich alle Werte der Graustufenanalyse kaum voneinander unterscheiden.

**Tabelle 6.9.:** Quantifizierung (Image J) von Smad1 und ID1 im Verhältnis zur Referenz mit Standardabweichungen in den Zelllinien K-562, Mo7e, Mo7ep210. n=3

	<b>K-562</b>	<b>Mo7e</b>	<b>Mo7ep210</b>
<b>Smad1/Referenz</b>			
Kontrolle	3,5 ± 6	6,3 ± 10	1,4 ± 2
DMSO	0,9 ± 1	1,3 ± 2	1,2 ± 2
BMP-2	1,9 ± 2	3,4 ± 4	1,6 ± 3
Dorsomorphin	0,9 ± 1	1,0 ± 1	0,8 ± 1
BMP-2+Dorsomorphin	0,6 ± 1	1,3 ± 2	1,5 ± 2
<b>ID1/Referenz</b>			
Kontrolle	19,2 ± 28	0,9 ± 1	2,6 ± 1
DMSO	6,1 ± 5	1,2 ± 2	5,2 ± 6
BMP-2	10,6 ± 12	1,3 ± 2	2,0 ± 1
Dorsomorphin	2,1 ± 1	0,3 ± 0	1,7 ± 1
BMP-2+Dorsomorphin	4,2 ± 3	0,7 ± 1	2,7 ± 3

Auch unter dem Einfluss von Dorsomorphin wurde der ID1-Nachweis geführt. Hier zeigt sich ein ähnliches Bild wie bei der Inkubation mit BMP-2, -4 und 6 (s. Abb. 6.10). ID1 ist in den K-562 und Mo7ep210 nachweisbar, in den Mo7e lässt sich keine Proteinbande erkennen (s. Abb. 6.11). Die im Westernblot zu erahnende Dominanz in den K-562 bestätigt sich durch die quantitative Analyse (s. Tab. 6.9). In der Kontrolle erreicht ID1 einen Mittelwert von  $19,2 \pm 28$ . Unter BMP-2 ist die Expression mit  $10,6 \pm 12$  sehr stark. Die Ergebnisse für die Versuchsbedingungen DMSO, Dorsomorphin und BMP-2+Dorsomorphin sind zwar niedriger, aber die Präsenz des Proteins ist deutlich zu bestimmen. In den Mo7ep210 ist das Proteinlevel geringer als in den K-562, aber höher als in den Mo7e. Besonders unter DMSO liegt der Wert mit  $5,2 \pm 6$  sehr hoch (s. Tab. 6.9).

Es bestätigt sich durch diesen Versuch, dass die Bildung von ID1 auch ohne funktions-tüchtige BMP-Signalkaskade induziert werden kann, da Smad1 in den K-562 und den Mo7ep210 kaum nachgewiesen werden kann. Auch Smad-unabhängig sieht man keine BMP-Effekte, da die ID1-Expression sich unter den verschiedenen Versuchsbedingungen kaum unterscheidet. In den K-562 ist ein leichter Rückgang zu verzeichnen, wenn man die Kontrolle und BMP-2 auf der einen Seite mit DMSO und schließlich Dorsomorphin und der Kombination aus BMP-2 und Dorsomorphin auf der anderen Seite vergleicht. Dieser Trend ist eindeutig erkennbar.

Es lässt sich zusammenfassen, dass Smad1 nur in den Mo7e nachweisbar und phosphorylierbar ist. Dabei hat es kaum Einfluss auf die Höhe der Proteinexpression, ob die Zellen zuvor mit BMP-2, -4, -6, oder Dorsomorphin inkubiert wurden. Demgegenüber kommt es in den BCR/ABL-positiven Zelllinien zu einer Herabregulierung des Smad1. Dies erklärt, warum die Mo7ep210 nicht auf BMP-2 reagieren. ID1 hingegen ist ausschließlich in den BCR/ABL-positiven Zellen nachweisbar. Es wird in diesem Fall nicht über das BMP-Signalling induziert, sondern steht direkt unter dem Einfluss des BCR/ABL-Gens (Birkenkamp et al. 2007). ID1 stellt in den BCR/ABL-positiven Zellen einen Marker für stammzellähnliche Eigenschaften dar.

---

## 7. Diskussion

In der vorliegenden Promotionsarbeit wurde die BMP-Signalkaskade in BCR/ABL-positiven Zellen untersucht. Es wurde geprüft, ob BCR/ABL-positive Zellen sensitiv für BMPs sind.

BMPs (bone morphogenetic proteins) gehören zur Familie der TGF- $\beta$  Wachstums- und Differenzierungsfaktoren. Zunächst wurde ihre Bedeutung bei der Entstehung von Knochengewebe beschrieben, wodurch sie auch den Namen Knochenmorphogenesefaktoren erhielten. Neben der Skelettentwicklung sind BMPs jedoch auch am postnatalen Knochenwachstum und den Prozessen der Frakturheilung beteiligt (Rosen 2009). Für die enchondrale Ossifikation werden BMPs genauso benötigt wie für den Erhalt des Knochengengerüsts und dessen ständige Erneuerung. Besonders die wachstumssteigernde Wirkung des BMP-2 wird in der Literatur beschrieben. Sachse und Kollegen haben Titaniumimplantate zur Stabilisierung von Unterschenkelbrüchen mit nicht-glykosyliertem, rekombinantem BMP-2 beschichtet. Dieses bedingte eine signifikante Menge neu gebildeten Gewebes und verbesserte den Heilungsprozess (Sachse et al. 2005). Nicht allein proliferative Effekte, sondern auch die Fähigkeit zur Induktion von Differenzierungsprozessen wurde für BMP-2 beschrieben. So konnten Saito und Kollegen zeigen, dass BMP-2 die Differenzierung von Zahnpulpazellen zu Odontoblasten vorantreibt (Saito et al. 2004).

In menschlichen Myelomzelllinien wurden pro-apoptotische Effekte von BMPs beobachtet (Kawamura et al. 2002). BMP-2 führte hier zum Zellzyklusarrest und zur Induktion des programmierten Zelltodes. Ebenfalls anti-proliferativ wirkte BMP-2 in Medulloblastomzellen, wo es unter anderem durch Induktion der p38 MAPK die Apoptose induzierte (Hallahan et al. 2003).

In Myokardiozyten wiederum reduzierte BMP-2 die Anzahl apoptotischer Zellen (Ebelt et al. 2013). Wurde in Mäusen durch Ischämie ein Myokardinfarkt provoziert, so konnte

durch Zugabe von BMP-2 der Zelltod verhindert werden. Auch in der Chondrozytenzelllinie N1511 konnte BMP-2 durch die Inhibition der Caspasen 3 und 9, sowie den Anstieg der Expression des mitochondrialen Proteins Bcl-xL die Apoptose verhindern (Sugimori et al. 2005). Dieses Überlebenssignal des BMP-2 wurde jedoch von Noggin, einem spezifischen, löslichen BMP-Inhibitor, unterbrochen. Hieran zeigt sich beispielhaft die Komplexität des BMP-Signalnetzwerkes. Nicht nur die Inhibitoren des BMP-Signallings können die BMP-Wirkung verändern. Auch untereinander beeinflussen sich die verschiedenen BMP-Moleküle. Lu und Kollegen beobachteten, wie BMP-4 Hypertrophie und Apoptose in Kardiomyozyten induzierte (Lu et al. 2014). Über die Aktivierung von Akt und die Hemmung der JNK-Aktivierung war BMP-2 in der Lage diesen Prozess zu stoppen.

Neben den komplexen Interaktionen zwischen BMP-Liganden, -Antagonisten und -Rezeptoren muss betont werden, dass die Wirkung von BMPs von ihrer Konzentration, dem vorliegenden Gewebe und dessen Mikroumgebung abhängig ist. Ich habe meine Experimente in der Annahme durchgeführt, dass BMP-2 einen vitalitätserhaltenden bzw. -steigernden Effekt auf die eingesetzten Zelllinien hat. Zunächst wurde die Mutterzelllinie Mo7e (Akute Megakaryoblasten Leukämie) mittels Presto Blue Assay untersucht, um zu eruieren, ob sich eine BMP-2 Wirkung darstellen lässt. Es sollte festgestellt werden, ob die Mo7e-Zellen auf BMP-2 reagieren würden. Danach wurden die Ergebnisse der BCR/ABL-positiven Zellen mit diesen Erkenntnissen verglichen.

Das Presto Blue Reagenz wird von stoffwechselaktiven Zellen zu einem rot fluoreszierenden Farbstoff umgesetzt, dessen Signal gemessen und mit der Menge vitaler, stoffwechselfähiger Zellen korreliert werden kann. Im Vergleich zu anderen Vitalitätsassays ist die Analyse mittels Presto Blue einfach in der Umsetzung und sehr gut auswertbar. Die Mo7e-Zellen wurden mit BMP-2 inkubiert, welches im Vergleich zu den anderen Konditionen eine weitere Steigerung der Vitalität zur Folge hatte - allerdings auf einem sehr hohen Niveau (Vgl. Tab. 6.1). Des Weiteren zeigte sich die Tendenz zur Vitalitätsabnahme unter Dorsomorphin. Es muss jedoch bedacht werden, dass hier die Gesamtheit der Zellpopulation betrachtet wurde und keine Aussagen über das Verhältnis lebender zu toten Zellen auf Einzellzellniveau getroffen werden können. Auch Zellen, die sich schon in einer frühen Phase der Apoptose befinden, sind noch stoffwechselaktiv und können den Farbstoff umsetzen. Für eine bessere Unterscheidung und Quantifizierung der lebenden und toten Zellen wurde mit der Durchflusszytometrie eine sensitivere Methode gewählt.

Mittels Durchflusszytometrie wurden die Mo7e-Zellen mit der transfizierten Tochterzelllinie Mo7ep210 verglichen. Diese Zellen enthalten die stabil transfizierte BCR/ABL-Mutation. Der Fokus wurde auf die Unterscheidung von lebenden zu toten Zellen gelegt. Ziel war es zu erfassen, wie hoch die Vitalität der Zellen nach Inkubation mit BMP-2 sein würde bzw. ob sie sich im Vergleich zur Kontrolle sogar würde steigern lassen. Im Vergleich dazu wurde der Einfluss von Dorsomorphin auf die Zellen untersucht.

Dorsomorphin, auch Compound C genannt, ist ein kleines Molekül, welches reversibel die BMP-Rezeptoren vom Typ I (Alk2, Alk3 und Alk6) hemmt (s. Abb. 7.1). Zunächst wurde es als selektiver Inhibitor der AMPK (AMP-aktivierte Proteinkinase) beschrieben. Mittlerweile sind eine Vielzahl von Kinasen bekannt, die von Dorsomorphin mit demselben oder einem größeren Potential gehemmt werden (Bain et al. 2007). Dazu gehören exemplarisch ERK8, MNK1, PHK, MELK, DYRK Isoformen, HIPK2, Src und Lck (Vogt et al. 2011).

BMP-2 allein vermochte die Vitalität der Mo7e-Zellen im Vergleich zur Kontrolle und zur Inkubation mit DMSO (Dimethylsulfoxid) nicht zu steigern. Dorsomorphin senkte das Überleben der Zellen deutlich herab. Auch unter der gleichzeitigen Gabe von BMP-2 und Dorsomorphin dominierte der Einfluss des Inhibitors und die Vitalität sank auf ein ähnliches Niveau. Wurde BMP-2 jedoch 30 Minuten vor Dorsomorphin zu den Zellen gegeben, so ließ sich die Vitalität steigern. Diese Zeitspanne ist in der Literatur bereits als geeignet beschrieben worden (Horbelt et al. 2015). Durch einen Zeitunterschied von 30 Minuten lassen sich die verschiedenen Einflüssen von BMP-2 und Dorsomorphin auf die Zellen gut differenzieren. Zwar war die Zahl der vitalen Zellen immer noch deutlich niedriger als in den Kontrollen, aber nicht so stark reduziert wie unter gleichzeitiger kombinierter Gabe. Hieran wird die Bedeutung des BMP-Signallings für die Zellen sichtbar. Zwar vermag es die Vitalität im Vergleich zur Kontrolle nicht bedeutend zu steigern, jedoch ist das Beschreiten des Signalweges und die Aktivierung von Zielgenen grundlegend für das Überleben der Zellen.

Warum die Kombination aus BMP-2 und Dorsomorphin die Zellen genauso stark beeinträchtigt wie die alleinige Inkubation mit Dorsomorphin und warum BMP-2 hier kein besseres Ergebnis bewirken kann, ist nicht abschließend zu beantworten. Dorsomorphin ist Ligand für eine große Zahl an Rezeptoren und geht in seinem Wirkspektrum weit über das der BMPs hinaus. Noggin und andere BMP-Inhibitoren sind viel spezifischer

auf diesen Signalweg hin ausgerichtet. Somit zeigt sich durch die Blockade verschiedener für die Zellen lebenswichtiger Signalwege die zytotoxische Wirkung von Dorsomorphin.

Wird Dorsomorphin zuerst zu den Mo7e-Zellen gegeben, so kann sich der negative Effekt am stärksten äußern. Hier ist die Vitalität im Mittel sogar 8% geringer als unter Dorsomorphin allein (Vgl. Abbildung 6.3).

Die BCR/ABL-positive Zelllinie Mo7ep210 war im Vergleich zu ihrer Mutterzelllinie untersucht worden. Hier haben sich in der Durchflusszytometrie interessanterweise keine nennenswerten Unterschiede herausarbeiten lassen. Die transfizierten Zellen scheinen insensitiv gegenüber BMP-2 zu sein. Auch unter Dorsomorphin veränderte sich die Vitalität nur gering. Somit kann ich die erste der eingangs gestellten Fragen verneinen. BCR/ABL-positive Zellen lassen sich durch Aktivierung oder Inhibition des BMP-Signalweges hinsichtlich ihrer Vitalität nicht beeinflussen.

Das BCR/ABL-Fusionsprotein dominiert die intrazelluläre Signalweiterleitung. BMPs haben hier keinen Einfluss auf die Zellvitalität, da das BMP-Signalling nicht relevant für das Überleben der Zellen ist. In Anwesenheit des BCR/ABL-Fusionsgens werden Stoffwechselaktivitäten und Proliferationsvorgänge über andere Signalkaskaden gesteuert. Auch die K-562 Zellen (CML-Zellen in der Blastenkrise) reagierten kaum auf die Zugabe des BMP-2. Hier hat ebenfalls die in diesem Falle natürliche Anwesenheit des BCR/ABL-Gens zur Unabhängigkeit der Zellen vom BMP-Signalling geführt. Dorsomorphin hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die K-562-Zellen.

Als Ursachen für die Unabhängigkeit der BCR/ABL-positiven Zelllinien vom BMP-Signalling lassen sich Änderungen auf Expressionsniveau diskutieren.

Für die Untersuchungen zur Genexpression wurde mit K-562 eine dritte Zelllinie herangezogen. Es konnten deutliche Unterschiede in der Expression von BMPs in den drei verschiedenen Zellsystemen herausgestellt werden. Während die Mutterzelllinie Mo7e BMP-2 sehr stark exprimiert, kam es in den BCR/ABL-positiven Zellen kaum vor. Im Gegensatz dazu war die Präsenz des Activin Rezeptors Typ II A in den K-562-Zellen sehr hoch, dessen Expression in den Mo7e-Zellen nicht nachweisbar war. Es wurden noch weitere Gene untersucht, deren Expression sich zwischen den verschiedenen Zelllinien wenig unterschied. Dazu gehörten die BMPs 3, 4, 5, 6 und 7, sowie weitere BMP-Rezeptoren.

BMPRIIB und BMPRII wurden in der vorliegenden Arbeit untersucht, während die Rezeptoren BMPRIA, ActRIA, ActRIB und ActRIIB Gegenstand einer vorangegangenen Arbeit aus der Gruppe waren (Elsner 2013). BMPRIA war dort in den beiden Mo7e-Zelllinien schwächer nachweisbar als in den K-562-Zellen. Die anderen Rezeptoren unterschieden sich in ihrer Expression nur marginal zwischen den verschiedenen Zelllinien. In der genannten Arbeit waren auch die Smads 2, 4, 5, 6 und 7 auf Genexpressionsebene untersucht worden. Es fiel auf, dass Smad7 in allen drei Zelllinien stärker exprimiert wurde als die anderen Smads, jedoch ließen sich keine Unterschiede zwischen den Zelllinien ausmachen. Auch hinsichtlich der BMP-Zielgene ID1, ID2 und Sky wurden keine Auffälligkeiten festgestellt (Elsner 2013).

BCR/ABL vermindert die Expression von BMPs, namentlich von BMP-2, in den Zellen. Es wird damit die Expression eines wichtigen aktivierenden Liganden herunterreguliert. Des Weiteren wird Smad1, eine intrazelluläre Schlüsselkomponente des BMP-Signalweges, herabreguliert (s. Abb. 7.1). In den Mo7e-Zellen hingegen wurde Smad1 auf Proteinebene nachgewiesen. Mittels Westernblotanalysen konnte die BMP-2-vermittelte Aktivierung von Smad1 gezeigt werden. Phosphoryliertes Smad1 stellt eine wichtige Komponente für die vollständige Funktionstüchtigkeit des BMP-Signallings in den Mo7e-Zellen dar.

Lapperrousaz und Kollegen haben ebenfalls die Expression einiger BMP-Signalwegkomponenten untersucht. Sie verglichen Gene aus Zellen gesunder Spender mit denen in primären CML-Zellen im Stadium der chronischen Phase (CP-CML) (Lapperrousaz et al. 2013). Hier wurden allerdings keine BMP-Liganden analysiert. Bei der Untersuchung der membranständigen Rezeptoren fiel die starke Expression des BMPRIA und des BMPRIIB in den CML-Zellen auf. Die Expression des BMPRII unterschied sich auch hier kaum zwischen den beiden Zellpopulationen. Des Weiteren wurde die Expression des Co-Rezeptors BAMBI untersucht, welche in den gesunden Zellen etwas höher war als in den CML-Zellen. Auch einige Smads wurden von der Gruppe analysiert. Lapperrousaz und Kollegen konnten eine reduzierte Expression von Smad1 in den CML-Zellen feststellen, ebenso wie ich in dieser Arbeit eine Herabregulation der Expression von Smad1 in den BCR/ABL-positiven Zelllinien Mo7ep210 und K-562 zeige (Lapperrousaz et al. 2013). Sie untersuchten weiterhin die Smads 4, 5, 6, 7 und 8. Als exemplarische Zielgene des BMP-Signallings analysierten Lapperrousaz und Kollegen die Expression von ID1, 2 und 3, sowie Runx1, 2 und 3. Bezüglich des ID1 wurde verglichen mit den ge-

sunden Zellen eine verminderte Expression in den Leukämiezellen festgestellt. In meiner Arbeit konnte ich auf Proteinebene eine gegenteilige Beobachtung machen. Ich stellte die vermehrte Proteinexpression von ID1 in den Mo7ep210- und K-562-Zellen im Vergleich zur Mutterzelllinie Mo7e fest (s. Abb. 7.1). Meine Ergebnisse werden durch die Arbeit von Birkenkamp und Kollegen bekräftigt (Birkenkamp et al. 2007). Sie konnten einen direkten Zusammenhang zwischen der Anwesenheit der BCR/ABL-Mutation und der verstärkten Expression von ID1 darstellen (s. unten). Ich diskutiere diese Beobachtung als einen Hinweis auf den Entwicklungsstand der Zellen. ID1 gilt als Marker eines stammzellähnlichen Zustandes der Zellen. Folglich sind die BCR/ABL-positiven Mo7ep210- und K-562-Zellen in ihrer Entwicklung weniger weit fortgeschritten als die Mo7e-Zellen.

Es muss betont werden, dass Laperrousaz und Kollegen ihre Vergleiche zwischen den Zellen gesunder Probanden und CML-Zellen von Patienten ziehen (Laperrousaz et al. 2013). In der vorliegenden Arbeit wurde die Tumorzelllinie Mo7e mit den Mo7ep210-Zellen verglichen. Bei den Mo7ep210-Zellen handelt es sich ebenfalls um eine Tumorzelllinie, welche jedoch mit dem BCR/ABL-Gen transfiziert wurde. Das heißt, dass ich die Erkenntnisse meiner Arbeit direkt auf die An- bzw. Abwesenheit der BCR/ABL-Mutation zurückführen kann, während bei Laperrousaz und Kollegen viele andere Möglichkeiten der Einflussnahme bestehen.

Auf Genebene werden demnach Unterschiede zwischen den Mo7e-Zellen und den BCR/ABL-positiven Zellen festgestellt. Mo7e-Zellen exprimieren BMP-2 und reagieren auch darauf, wie sich in den Vitalitätsassays gezeigt hat. Die Zelllinien Mo7ep210 und K-562 exprimieren dieses Gen nur in sehr geringem Maße. Die K-562-Zellen exprimieren jedoch den Rezeptor ActRIIA sehr stark.

BMPs wirken auto- und parakrin (Miller et al. 2000). Das bedeutet, dass sie auf die sezernierende Zelle selbst und auf deren Nachbarzellen Einfluss nehmen können. Insgesamt wird deren Wirkungsradius als lokal begrenzt angesehen. Die Ergebnisse der Genexpressionanalysen deuten auf eine fehlende Bereitstellung von BMPs hin. Auch wenn BMPs untereinander teilweise sehr ähnliche Funktionen übernehmen, so hat doch jedes einzelne BMP seine spezielle Bedeutung für die Zelle. BMP-2 und -4 erfüllen beispielsweise viele gemeinsame Aufgaben bei der Bildung und Reparatur von Knorpel- und Knochengewebe. BMP-2 kann dabei mit Retinoiden interagieren, BMP-4 hinge-

gen nicht (Xiao et al. 2007). BMP-2, -4 und -6 sind in der Lage, die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Knorpelzellen voranzutreiben, wobei BMP-2 effektiver ist als die anderen beiden (Sekiya et al. 2005). BMP-2 und -4 scheinen weiterhin ähnliche Affinitäten zu den selben Rezeptortypen aufzuweisen. Beide binden bevorzugt an den BMPRIA im Vergleich zu ActRIA (Lavery et al. 2008). Es ist demnach davon auszugehen, dass ein Mangel an BMP-2 spezifische Auswirkungen auf die Zellen hat. Des Weiteren stehen BMPs in ständigem Wechselspiel mit ihren Inhibitoren. Noggin beispielsweise bindet lösliche BMP-Liganden und kann somit den BMP-Mangeleffekt zusätzlich verstärken. Die erhöhte Expression des ActRIIA in den K-562 könnte darauf zurück zu führen sein, dass die Konzentration an vorhandenen BMPs eher gering ist. Die Zellen reagieren auf diesen Ligandenmangel mit einer Hochregulation der Rezeptordichte auf ihrer Oberfläche. ActRIIA ist ein unspezifischer Rezeptor. Er kann alle BMP-Rezeptoren vom Typ I binden und somit zur Signalweiterleitung beitragen. K-562 ist eine natürliche BCR/ABL-positive Zelllinie. Es ist denkbar, dass sie Differenzierungsreize von extrazellulär benötigt. Die Mo7ep210-Zellen haben das BCR/ABL-Fusionsgen hingegen artifiziell erhalten und es dominiert alle Stoffwechselwege, da es konstitutiv aktiv ist.

Nach Durchführung der Genexpressionsanalysen ist festzuhalten, dass die Präsenz des BCR/ABL-Fusionsgens zu einer Veränderung der Expression von BMP-2 und dem BMP-Rezeptor ActRIIA führt. Die Mutterzelllinie Mo7e hat in den Vitalitätsanalysen den Erwartungen entsprechend reagiert. Unter dem Einfluss von BMP-2 wurde die Vitalität auf einem stabilen, sehr hohen Niveau gehalten. Wurde jedoch Dorsomorphin zu den Zellen gegeben, so hemmte es die BMP-Wirkung und es kam zur Apoptose bzw. Nekrose der Zellen. In den Genexpressionanalysen konnte ich feststellen, dass die Mo7e-Zellen BMP-2 brauchen. Sie exprimieren mehr BMP-2, weil sie dessen autokrine Wirkung zum Vitalitätserhalt benötigen. Diese Feststellung bestätigt meine Annahme, dass BMP-2 einen vitalitätserhaltenden Effekt auf die Zellen hat.

In dieses hinsichtlich des BMP-Signallings sehr gut funktionierende System der Zelllinie Mo7e wurde die BCR/ABL-Mutation eingebracht und es entstand die transfizierte Zelllinie Mo7ep210. Diese Zellen zeigen weder eine Reaktion auf BMP-2 noch auf Dorsomorphin. Sie zeigen sich, genauso wie die K-562 Zellen in meiner Arbeit und die primären CML-Zellen in der Publikation von Laperrousaz und Kollegen, insensitiv gegenüber dem BMP-Signalling. Laperrousaz und Kollegen formulieren, dass BMP-2 keinen Effekt auf

das Zellschicksal im Sinne von Leben oder Sterben hat (Laperrousaz et al. 2013). Zum einen exprimieren die BCR/ABL-positiven Zelllinien kaum BMP-2, sodass ihnen dieses selbst als Ligand an den BMP-Rezeptoren fehlt. Zum anderen ist die Expression von Smad1 nicht nachweisbar und somit fehlt den Zellen ein wichtiges intrazelluläres Signalwegelement (s. Abb. 7.1). Es ist möglich, dass aus diesen Gründen in den K-562 die Expression des ActRIIA hochreguliert wird. Die transfizierten Mo7ep210-Zellen allerdings benötigen keine BMPs zum Erhalt ihrer Vitalität und ihr Überleben wird folglich auch nicht durch die Zugabe von Inhibitoren des BMP-Signallings reduziert. Das Zellsystem Mo7ep210 ist sehr gut geeignet, um die Effekte des BCR/ABL-Fusionsgens auf das BMP-Signalling weiter zu untersuchen. Im Vergleich zur Mutterzelllinie Mo7e sind die transfizierten Zellen unabhängig von BMP-2 und Dorsomorphin und verhalten sich hinsichtlich ihrer Vitalität wie K-562-Zellen und primäre CML-Zellen.

Die intrazelluläre BMP-Signalweiterleitung ist zwar von Smad1 und Smad4 geprägt, allerdings gibt es auch Smad-unabhängige Signalwege (Derynck und Zhang 2003). Deshalb war es interessant zu prüfen, ob das BMP-Signalling Smad-unabhängig unter der Präsenz der BCR/ABL-Mutation weiterhin funktionstüchtig ist.

Dazu wurden Westernblot-Analysen von ID1 durchgeführt. ID1 war in den Mo7e-Zellen nicht nachweisbar, jedoch in beiden BCR/ABL-positiven Zelllinien vorhanden. Das Signal zur Transkription von ID1 konnte folglich nicht durch Smad1 vermittelt worden sein. Handelt es sich hier also um Smad-unabhängiges BMP-Signalling? Auch das konnte ausgeschlossen werden, da die Quantifizierung der Proteinlevel mittels Image J keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Inkubationen zeigte. Die Präsenz des ID1 war unabhängig von der An- oder Abwesenheit von BMP-2.

Die Anwesenheit der BCR/ABL-Tyrosinkinase in den Zelllinien Mo7ep210 und K-562 ist ursächlich für die hohe Expression von ID1 (Birkenkamp et al. 2007). Birkenkamp und Kollegen haben die Bedeutung von ID1 für die Aufrechterhaltung des leukämischen Phenotypes beschrieben. In dem Wissen, dass BCR/ABL eine Überaktivierung der Proteinkinase B (Akt) induziert, untersuchten sie deren Einfluss auf den Transkriptionsfaktor FOXO3. FOXO3a (aktiviertes FOXO3) hemmt über die direkte Bindung an den ID1-Promotor die Transkription von ID1. Dadurch wirkt es sich positiv auf die Differenzierung der Zellen aus. FOXO3 wird durch Akt phosphoryliert und damit inaktiviert. In leukämischen, BCR/ABL-positiven Zellen kommt es zu einer starken Aktivierung von

Akt, welche durch die Inaktivierung von FOXO3a zur gesteigerten Expression von ID1 führt (Birkenkamp et al. 2007). ID1 sorgt durch die Hemmung von Transkriptionsfaktoren für die vermehrte Proliferation der Zellen. ID1 erhält die Selbsterneuerungsfunktion der Zellen und unterstützt deren Multipotenz.

Sowohl auf Transkriptions- als auch auf Proteinebene konnten Birkenkamp und Kollegen nachweisen, dass ID1 in K-562-Zellen durch FOXO3a herunter reguliert wird (Birkenkamp et al. 2007). Um die Aktivierung von FOXO3 in den Zellen zu erreichen, setzten sie den Wirkstoff STI571 (Imatinib) ein. Der TKI senkte die Aktivität von Akt, weniger FOXO3a wurde phosphoryliert und der Transkriptionsfaktor konnte seine volle Wirkung entfalten. Die Transkription von ID1 wurde gehemmt, sodass die Differenzierung der Zellen einsetzte.

Tam und Kollegen beschreiben, dass ID1 für viele onkogene Tyrosinkinase ein verbreitetes Ziel darstellt (Tam et al. 2008). Neben BCR/ABL nennen sie TEL/ABL, TEL/PDGF $\beta$ R und FLT3/ITD. Des Weiteren treten hohe Proteinlevel von ID1 häufig durch den Einfluss von Onkoproteinen wie MYC, RAS, Src, Notch oder FLI1 auf, welche die Transkription von ID1 induzieren (Benezra et al. 1990). Außerdem können neben BMPs auch andere Wachstumsfaktoren auf die ID-Proteine einwirken wie beispielsweise EGF (epidermal growth factor), bFGF (fibroblast growth factor) und TGF- $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ). Die Zelllinien Mo7ep210 und K-562 exprimieren ID1. Diese Beobachtung zeigt, dass die Anwesenheit von BCR/ABL zur Rückentwicklung der Zellen hin zu einem weniger differenzierten Zustand führt.

Laperrousaz und Kollegen haben das BMP-Signalling im Blut von CML-Patienten in der chronischen Phase untersucht und Veränderungen auf allen Ebenen des BMP-Signallings festgestellt (Laperrousaz et al. 2013). Hinsichtlich der Genexpression war das starke Auftreten von BMPRIA- und BMPRII-Transkripten auffällig. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde eine starke Expression von BMPRII in den BCR/ABL-positiven Zellen festgestellt. Allerdings unterschied sich diese nicht von der ebenfalls hohen Expression des Rezeptors in der Referenzzelllinie Mo7e, sodass in dieser Arbeit dieser Erkenntnis nicht weiter nachgegangen worden ist. Ich habe mich auf diejenigen Gene konzentriert, welche sich in der Expression zwischen der Kontrolle und den BCR/ABL-positiven Zelllinien unterschieden. Da ich als Kontrollzelllinie den Mo7e-Wildtyp und für die Untersuchung der Unterschiede ebendiese Zelllinie mit dem stabil transfizierten BCR/ABL-Gen ver-

wendete, kann ich alle beobachteten Effekte direkt auf die Anwesenheit des BCR/ABL-Fusionsgens zurückführen. Unterschiede in der Expression zeigten sich bei BMP-2, welches in den Mo7e-Zellen stark und in den BCR/ABL-positiven Zelllinien schwach exprimiert wurde, und beim Activin-Rezeptor IIA. Dieser wurde in den Mo7ep210- und K-562-Zellen vermehrt exprimiert. Die Gruppe um Laperrousaz hat in ihren Genexpressionsanalysen weder BMPs noch Activin-Rezeptoren untersucht. Sie berichten über eine sehr niedrige Expression von Smad1 auf Genebene, welche in Vorversuchen zu dieser Arbeit ebenfalls festgestellt werden konnten (Elsner 2013).

BMPRIIB war laut Laperrousaz zum Zeitpunkt der Diagnosestellung im Vergleich zum Gesunden um mehr als das Zehnfache erhöht und stieg im Verlauf sehr stark an. Die hohe Expression von BMPRIA nahm im Krankheitsverlauf wieder ab. Anhand von Untersuchungen der transfizierten Zelllinie TF1 konnten Laperrousaz und Kollegen zeigen, dass die BCR/ABL-Mutation direkt verantwortlich für die Deregulation der BMP-Rezeptoren vom Typ I ist. Außerdem geschieht diese Modifikation der Expression schon sehr zeitig im Verlauf der Krankheit. Sie konstatieren, dass Veränderungen im BMP-Signalling ein Kennzeichen leukämischer Subpopulationen sind (Laperrousaz et al. 2013).

Betrachte ich mit diesem Wissen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, so weisen diese darauf hin, dass auch das Fehlen von Smad1 in den BCR/ABL-positiven Zellen in direktem Zusammenhang mit der Anwesenheit der Mutation steht (s. Abb. 7.1). Laperrousaz und Kollegen zeigen die verminderte Smad1-Genexpression in CML-Zellen im Vergleich zu Zellen gesunder Spender und ich kann diesen Unterschied auf Proteinebene bestätigen. Smad1 wird in den Mo7e-Zellen gebildet und ist im Westernblot deutlich nachzuweisen. Betrachtet man jedoch die mit BCR/ABL-transfizierten Zellen oder auch die K-562-Zellen, welche die Mutation als natürliche Genmodulation in sich tragen, so zeigen diese nur sehr geringe Smad1-Proteinlevel.

Weiterhin stelle ich eine Kontinuität hinsichtlich des zeitlichen Verlaufes fest. Smad1 ist in der frühen chronischen Phase der CML auf Genebene herunterreguliert (Laperrousaz et al. 2013). In der späten Blastenkrise (K-562-Zellen) zeigt sich auf Proteinebene dieselbe niedrige Expression. Meine Ergebnisse ergänzen die Arbeit von Laperrousaz um die wichtige Erkenntnis, dass sich zu zwei Zeitpunkten der Erkrankung die Abwesenheit eines wesentlichen Signalwegmoleküles des BMP-Signallings feststellen lässt.

Damit lässt sich auch die dritte der eingangs gestellten Fragen beantworten. Das BMP-Signalling ist unter dem Einfluss des BCR/ABL-Fusionsgens nicht mehr vollständig funktionstüchtig. Mit Smad1 fehlt den Zellen ein wichtiges, intrazelluläres Signalmolekül.

Das BMP-Signalling stellt einen komplexen Stoffwechselweg dar. BMP-Liganden können in unterschiedlichen Zellen und Geweben abhängig von deren Funktion, der Konzentration der BMPs, der Einwirkungszeit und eventuellen Ko- oder Störfaktoren verschiedenste Prozesse induzieren (Shi und Massagué 2003).

Dorsomorphin wurde in der vorliegenden Arbeit als exemplarischer Inhibitor des BMP-Signallings eingesetzt. Dorsomorphin steht ein breites Spektrum an Rezeptoren zur Verfügung, an welche es binden und über die es wirken kann. Im Vergleich zu Noggin ist Dorsomorphin wesentlich weniger selektiv.

Über einen Zeitraum von fünf Tagen konnten Gonzalez und Kollegen beobachten, wie Dorsomorphin das Niveau OCT-4-positiver Zellen aufrecht erhalten konnte (Gonzalez et al. 2011). Embryonale Stammzellen (ESCs) haben das Potential, über lange Zeiträume undifferenziert zu wachsen und sich selbst zu reproduzieren. OCT-4 ist währenddessen hoch reguliert und wird erst gesenkt, wenn die Zellen in den Differenzierungsprozess eintreten. Gonzalez und Kollegen berichten, wie Dorsomorphin mittels dreier Mechanismen zur Selbsterneuerung der embryonalen Stammzellen und zu einem Arrest der extraembryonischen Differenzierung führt. Dorsomorphin unterbindet die Phosphorylierung von Smad1, indem es die Signalweiterleitung des Typ I Rezeptors blockiert. Außerdem inhibiert es die Steigerung von BMP-2- und BMP-4-mRNA, welche spontan auftritt, wenn ESCs ohne bFGF (fibroblast growth factor) auf UM Medium (DMEM/F12+1XN2/B27) ausgesät werden. Schließlich hemmt Dorsomorphin auch die Sekretion und die autokrine Wirkung von BMPs. Demnach führt Dorsomorphin zu einem Differenzierungsstopp in den Zellen (Gonzalez et al. 2011).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Vitalität der Zellen unter Dorsomorphin untersucht. Hierbei konnte festgestellt werden, dass die BCR/ABL-positiven Zellen insensitive gegenüber Dorsomorphin sind. Es hatte keinen negativen Effekt auf das Überleben der Mo7ep210. Die Blasten befanden sich in einem vergleichsweise niedrig differenzierten Stadium und vermehrten sich ohne funktionale Weiterentwicklung. Falls Dorsomorphin überhaupt einen Effekt auf die Zellen gehabt haben sollte, so hat es die Proliferati-

on der Zellen vermutlich nur weiter unterstützt. Da in den BCR/ABL-positiven Zellen kein Smad1 vorliegt, müsste Dorsomorphin über andere Wege Einfluss genommen haben.

Die BCR/ABL-negativen Mo7e-Zellen dagegen haben sehr stark auf Dorsomorphin reagiert. Der Inhibitor hat die Bedeutung des BMP-Signallings für die Mo7e-Zellen deutlich gemacht. Unter BMP-2 wiesen die Zellen eine ebenso hohe Vitalität wie in der serumfreien Kontrolle und unter DMSO auf. Unter Dorsomorphin starben die Zellen. Wurden sie jedoch zunächst für 30 Minuten mit BMP-2 vorinkubiert und danach mit Dorsomorphin behandelt, so konnte dieses die Zellen nicht sehr stark beeinträchtigen.

Für zukünftige Experimente wäre es interessant, neben der Vitalität auch den Differenzierungsgrad der Zellen zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit wurde ID1 als Marker für entdifferenzierte Zellen auf Proteinebene betrachtet. ID1 wurde in den Mo7ep210- und den K-562-Zellen sehr stark gebildet. Das Proteinlevel konnte jedoch weder durch BMP-2 noch durch Dorsomorphin entscheidend herauf- oder herabgesetzt werden. Diese Beobachtung ist mit der Präsenz des BCR/ABL-Gens zu erklären. Birkenkamp und Kollegen beschreiben, wie in BCR/ABL-positiven Zellen die Aktivierung von Akt und die Phosphorylierung von FOXO3a zu einer Steigerung der Expression von ID1 führt (Birkenkamp et al. 2007). Durch weiterführende Untersuchungen des Differenzierungsgrades könnte festgestellt werden, ob die Mo7ep210-Zellen lediglich proliferieren, oder ob mittels BMPs eine Differenzierung eingeleitet werden kann. Diese könnte in Anbetracht meiner Ergebnisse nicht über Smad1 vermittelt werden, eventuell aber über alternative Signalwege geschehen. Es könnten neben BMP-2 weitere BMPs eingesetzt werden und auch Smad-unabhängiges Signalling betrachtet werden.

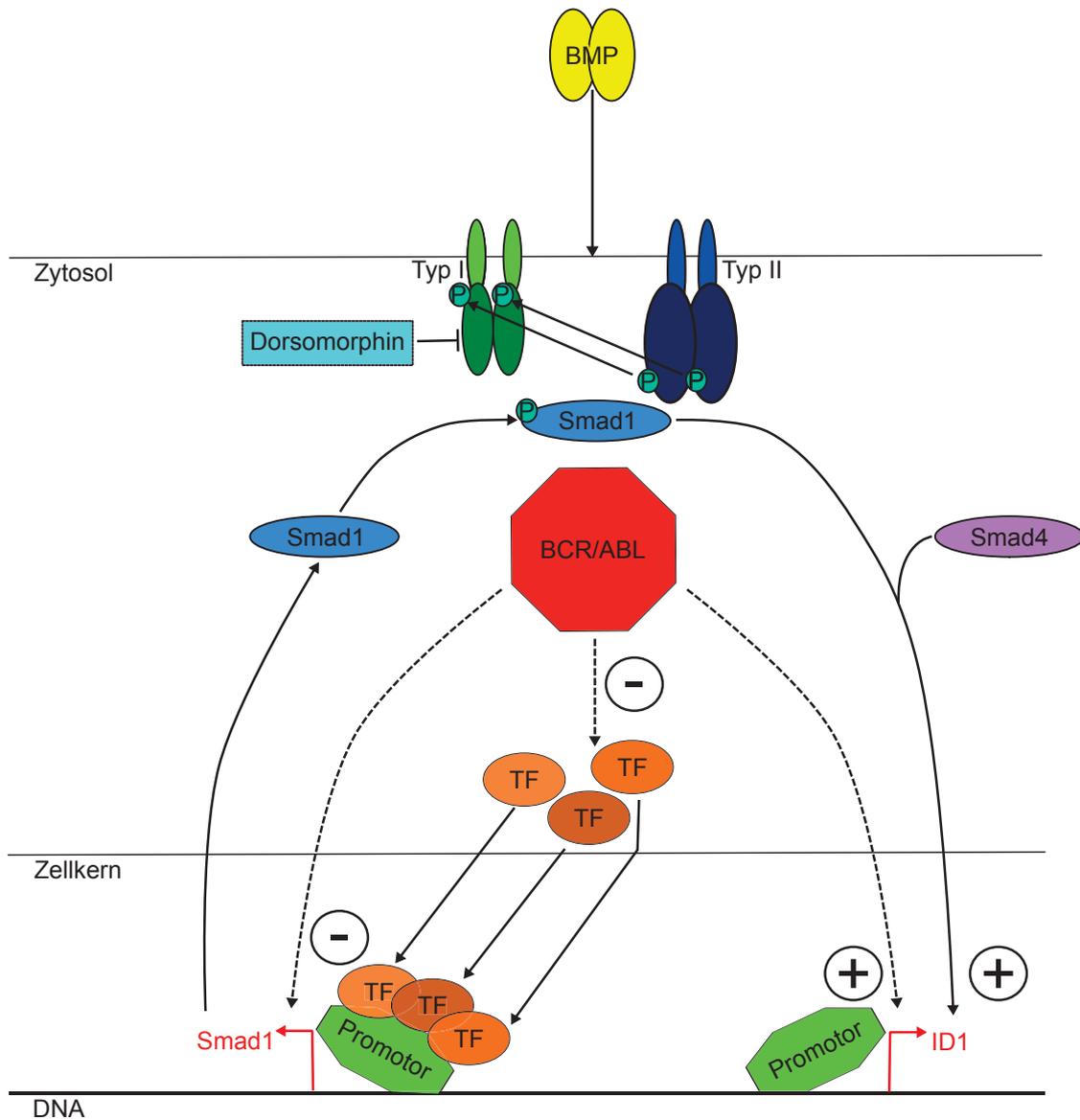
Ich habe in den hier beschriebenen Versuchen keine Hinweise auf Smad-unabhängiges BMP-Signalling gefunden. ID1 wurde in den BCR/ABL-positiven Zellen unabhängig davon, mit welchem BMP die Zellen inkubiert oder ob sie mit Dorsomorphin behandelt wurden, sehr stark exprimiert. Da die konstante, hohe Expression von ID1 mit der Anwesenheit von BCR/ABL erklärt werden kann, sollten zukünftig andere Zielgene des BMP-Signallings untersucht werden. Hierfür würden sich ID2 und ID3 oder auch die Gene Runx1, 2 oder 3 eignen.

Yu und Kollegen haben den Einfluss von Dorsomorphin auf glatte Muskelzellen von Mäusepulmonalarterien untersucht (Yu et al. 2007). Sie haben festgestellt, dass Dorso-

morphin dosisabhängig die BMP-4-induzierte Phosphorylierung von R-Smads gehemmt hat, während die MAPK p38 nicht beeinträchtigt wurde. Im Gegensatz dazu inhibierte Noggin die BMP-4-induzierte Phosphorylierung beider Signalmoleküle. Die Gruppe schlussfolgert aus der Fähigkeit von Dorsomorphin, Smad1/5/8 und p38 MAPK funktionell zu trennen, dass auch BMPs diese Signalmoleküle durch distinkte Mechanismen aktivieren.

Außerdem unterscheidet sich Dorsomorphin dadurch maßgeblich von anderen Inhibitoren des BMP-Signallings, die BMP-Liganden binden. Inhibitoren wie zum Beispiel lösliche Proteine können nicht zwischen Smad-abhängigem und Smad-unabhängigem BMP-Signalling unterscheiden. Sie blockieren beide Wege. Dorsomorphin hingegen hemmt die Smad-Aktivierung ohne die Fähigkeit der BMPs, p38 MAPK zu aktivieren, einzuschränken. Diese Beobachtung legt nahe, dass die p38 MAPK unabhängig von der Smad-Phosphorylierung funktioniert. Es scheint möglich zu sein, dass intrazelluläre Signalmoleküle, welche die Signale von BMP-Rezeptoren auf die MAPK übertragen, nicht auf die Kinasefunktion des Typ I Rezeptors angewiesen sind. Yu und Kollegen hoffen, dass Dorsomorphin bei der Erforschung Smad-unabhängiger BMP-Signalwege nützlich sein und Erkenntnisse zur funktionellen Relevanz dieser Signale bringen könnte (Yu et al. 2007).

Auch die Funktion der BMP-Rezeptoren und denkbarer Alternativen lässt Fragen offen. Die mögliche Existenz nichtkanonischer Formen des TGF- $\beta$ -Signallings sollte in Betracht gezogen werden. Denkbar wären Signalwege über Typ II Rezeptoren ohne die Beteiligung von Typ I Rezeptoren, über Typ I Rezeptoren ohne Smads, oder über R-Smads ohne Smad4 (Shi und Massagué 2003).



**Abbildung 7.1.:** BCR/ABL inhibiert die BMP-Signalkaskade. Die BCR/ABL-Tyrosinkinase im Zytosol nimmt Einfluss auf Regulatoren der Transkription des Smad1-Gens. TF = Transkriptionsfaktoren. Außerdem inhibiert BCR/ABL direkt die Bildung von Smad1. Als Folge ist Smad1 in BCR/ABL-positiven Zellen auf Proteinebene kaum nachweisbar. Die Transkription von ID1 wird durch BCR/ABL positiv beeinflusst.

Entsprechend des Themas „Untersuchungen zum BMP-Signalling in BCR/ABL-positiven Zelllinien“ wurden in der vorliegenden Arbeit Auswirkungen der Anwesenheit der BCR/ABL-Mutation auf das BMP-Signalling betrachtet. Es stellt sich die Frage, warum Smad1 unter der Anwesenheit von BCR/ABL herunter reguliert wird.

Für zukünftige Projekte formuliere ich verschiedene Arbeitsansätze. Zum ersten soll die molekulare Grundlage der Hemmung von Smad1 untersucht werden. Unabhängig von der BCR/ABL-Mutation könnte auch das Smad1-Gen mutiert sein. Diese Frage kann mittels Sequenzierung beantwortet werden. Das Smad1-Gen bzw. verschiedene Genabschnitte könnten somit analysiert werden. Auch regulatorische Elemente der DNA wie die Promotorregion, Enhancer und Silencer sollten sequenziert werden, um Hinweise auf Mutationen zu finden. Ließen sich hier Veränderungen der regulären Genstruktur nachweisen, so würden diese eine Inaktivierung bzw. Nicht-Aktivierung des Gens erklären.

Eine weitere Ursache für die Herabregulierung von Smad1 könnte die Veränderung von Transkriptionsfaktoren sein. Unter der Anwesenheit von BCR/ABL wäre eine Manipulation dieser Proteine möglich. Zur Untersuchung der Interaktion von DNA und Proteinen ist die Methode der Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) geeignet. Es werden alle Bindungsstellen eines Proteins am Genom detektiert, sodass Aussagen zur Funktionalität von Transkriptionsfaktoren für das Smad1-Gen getroffen werden können.

Zum zweiten wäre es interessant, das BMP-Signalling und die Expression von Smad1 unter der Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren (TKIs) zu betrachten. Aktuell werden CML-Patienten entsprechend der Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V. von 2013 mit einem TKI therapiert (Hochhaus 2013). Es gibt jedoch Fälle, in denen Patienten nur ungenügend auf die Behandlung ansprechen, Toleranzen oder gar Resistenzen gegen die Arzneimittel entwickeln. Auch verschiedene Nebenwirkungsprofile der einzelnen Präparate sind bekannt (s. 2.1.3 Therapieoptionen).

Es sollte untersucht werden, ob eine Hemmung der BCR/ABL-Tyrosinkinase zur Reaktivierung des BMP-Signallings führt. Dazu würde ich BCR/ABL-positive Zellen sowohl mit einem TKI, als auch mit der Kombination aus einem TKI und einem BMP inkubieren. BMP-2 wäre dafür beispielsweise gut geeignet. Im Anschluss sollten PCRs für das Smad1-Gen und Westernblots zur Analyse von Smad1 auf Proteinebene durchgeführt werden. Es könnte hiermit die Reaktivierung des BMP-Signallings unter TKI-Therapie

mittels Induktion durch BMP-2 nachgewiesen werden.

Diese Beobachtung könnte zu neuen therapeutischen Möglichkeiten beitragen. Eine Kombinationstherapie aus Tyrosinkinaseinhibitoren mit BMP-2 könnte eine Reduktion der TKI-Konzentration erlauben und damit günstig auf die Nebenwirkungen der Medikamente einwirken. TKIs würden weiterhin die Aktivität der BCR/ABL-Tyrosinkinase hemmen, während BMP-2 die Vitalität der nun nicht mehr unkontrolliert proliferierenden Zellen erhalten und sie in Richtung Differenzierung vorantreiben würde. Zukünftige Untersuchungen zu einer Kombinationstherapie aus Tyrosinkinaseinhibitoren mit BMP-2 sollten demnach angestrebt werden.

Zum dritten stellt sich die Frage, ob die BCR/ABL-Mutation durch das BMP-Signalling beeinflusst werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, wie die Mutation sich auf die BMP-Signalwege und deren Komponenten auswirkt. Diese Interaktion sollte nun auch von der anderen Seite beleuchtet werden. Smad1 könnte zusätzlich zu BCR/ABL in die Mo7ep210-Zellen eingeführt werden. Mittels viraler Vektoren wäre eine Transduktion des Smad1-Gens möglich. Es wäre interessant zu beobachten, welchen Effekt diese Manipulation auf die Zellen hätte. Konstitutiv aktives Smad1 würde zu einer hohen Proteinpräsenz führen. Das BMP-Signalling wäre vermutlich wieder funktionsfähig und die Zellen würden auf BMP-Liganden reagieren. Voraussichtlich wäre die Vitalität der Zellen auf einem hohen Niveau stabil. Wichtig wäre die Feststellung des Differenzierungsgrades der Zellen. Würde die Zugabe von BMP-2 zu einer BCR/ABL- und Smad1-positiven Zelllinie deren Differenzierung induzieren?

---

## 8. Schlussfolgerungen

Die Zelllinie Mo7ep210 ist ein in-vitro-Model, welches sehr gut geeignet ist, die Effekte des BCR/ABL-Fusionsgens auf das BMP-Signalling vergleichend zur Mutterzelllinie Mo7e zu untersuchen. So ist die Vitalität von Mo7e sensitiv für Veränderungen des BMP-Signallings, doch die BCR/ABL-positiven Zellen reagieren weder auf die Aktivierung (BMP-2) noch auf die Hemmung (Dorsomorphin) der BMP-Signalkaskade.

Ursächlich kann die Inaktivierung wesentlicher Komponenten des BMP-Signalwegs sein. Auto- und parakrin wirkende Liganden (BMP-2) und wichtige intrazelluläre Signalmoleküle (Smad1) sind in Mo7ep210 drastisch verringert.

Das BMP-Signalling ist also in Anwesenheit von BCR/ABL nicht möglich.

Das BMP-Zielgen ID1 ist in den BCR/ABL-positiven Zellen überexprimiert. Dies ist unabhängig von BMP-Signalen und wird durch BCR/ABL gesteuert.

Zukünftige Untersuchungen werden zeigen, welche genetischen, epigenetischen oder anderen inhibitorischen Prozesse, die durch BCR/ABL gesteuert werden, für die Inaktivierung des BMP-Signalwegs verantwortlich sind. Darauf aufbauend kann geprüft werden, ob eine Hemmung von BCR/ABL eine Reaktivierung des BMP-Signalwegs zulässt.

---

# Literaturverzeichnis

- Abreu JG, Ketpura NI, Reversade B, De Robertis EM. 2002. Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signalling by BMP and TGF-beta. *Nat Cell Biol*, 4(8):599–604.
- Avanzi GC, Lista P, Giovinzano B, Miniero R, Saglio G, Benetton G, Coda R, Cattoretti G, Pegoraro L. 1988. Selective growth response to IL-3 of a human leukaemic cell line with megakaryoblastic features. *British Journal of Haematology*, 69(3):359–366.
- Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, Hochhaus A, Soverini S, Apperley JF, Cervantes F, Clark RE, Cortes JE, Guilhot F, Hjorth-Hansen H, Hughes TP, Kantarjian HM, Kim DW, Larson RA, Lipton JH, Mahon FX, Martinelli G, Mayer J, Müller MC, Niederwieser D, Pane F, Radich JP, Rousselot P, Saglio G, Saúele S, Schiffer C, Silver R, Simonsson B, Steegmann JL, Goldman JM, Hehlmann R. 2013. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood*, 122(6):872–884.
- Bain J, Plater L, Elliott M, Shpiro N, Hastie CJ, Mclauchlan H, Klevernic I, Arthur JSC, Alessi DR, Cohen P. 2007. The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochemical Journal*, 408(3):297–315.
- Benezra R, Davis RL, Lassar A, Tapscott S, Thayer M, Lockshon D, Weintraub H. 1990. Id: A Negative Regulator of Helix-Loop-Helix DNA Binding Proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 599(1):1–11.
- Berman E, Jhanwar S, McBride M, Strife A, Wisniewski D, Lambek C, Clarkson B. 2000. Characterization of two novel sublines established from a human megakaryoblastic leukemia cell line transfected with p210BCR/ABL. *Leukemia Research*, 24(4):289 – 297.

- Birkenkamp KU, Essafi A, van der Vos KE, da Costa M, Hui RCY, Holstege F, Koenderman L, Lam EWF, Coffey PJ. 2007. FOXO3a Induces Differentiation of Bcr-Abl-transformed Cells through Transcriptional Down-regulation of Id1. *Journal of Biological Chemistry*, 282(4):2211–2220.
- Bruce DL, Sapkota GP. 2012. Phosphatases in SMAD regulation. *FEBS Letters*, 586(14):1897 – 1905.
- Chandra HS, Heisterkamp NC, Hungerford A, Morrisette JJ, Nowell PC, Rowley JD, Testa JR. 2011. Philadelphia Chromosome Symposium: commemoration of the 50th anniversary of the discovery of the Ph chromosome. *Cancer Genetics*, 204(4):171 – 179.
- Clement J, Wöfl S. 2004. Bone morphogenetic proteins and cancer. In: Vukicevic S, Sampath K, Hrsg. *Bone Morphogenetic Proteins: Regeneration of Bone and Beyond. Progress in Inflammation Research*. Birkhäuser Basel, 267–292.
- Clement JH, Marr N, Meissner A, Schwalbe M, Sebald W, Kliche KO, Höffken K, Wöfl S. 2000. Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) induces sequential changes of Id gene expression in the breast cancer cell line MCF-7. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 126(5):271–279.
- Derynck R, Zhang Y, Feng XH. 1998. Transcriptional Activators of TGF-beta Responses: Smads. *Cell*, 95(6):737 – 740.
- Derynck R, Zhang YE. 2003. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*, 425(6958):577–584.
- Ebelt H, Hillebrand I, Arlt S, Zhang Y, Kostin S, Neuhaus H, Müller-Werdan U, Schwarz E, Werdan K, Braun T. 2013. Treatment With Bone Morphogenetic Protein 2 Limits Infarct Size After Myocardial Infarction in Mice. *Shock*, 39(4).
- Elsner M. 2013. Expression von BMP-Signalmolekülen in BCR/ABL-positiven Zelllinien [Bachelorarbeit]. Ernst-Abbe-Fachhochschule Jena.
- Gonzalez R, Lee JW, Snyder EY, Schultz PG. 2011. Dorsomorphin Promotes Human Embryonic Stem Cell Self-Renewal. *Angewandte Chemie International Edition*, 50(15):3439–3441.

- Hallahan AR, Pritchard JI, Chandraratna RAS, Ellenbogen RG, Geyer JR, Overland RP, Strand AD, Tapscott SJ, Olson JM. 2003. BMP-2 mediates retinoid-induced apoptosis in medulloblastoma cells through a paracrine effect. *Nat Med*, 9(8):1033–1038.
- Hochhaus A. 2004. Chronische myeloische Leukämie, Empfehlungen zur Diagnostik und Therapie. Zweite Aufl. Bremen: UNI-MED SCIENCE, 21–23.
- Hochhaus A. 2013. Chronische Myeloische Leukämie (CML) Leitlinie , Empfehlungen der Fachgesellschaft zur Diagnostik und Therapie hämatologischer und onkologischer Erkrankungen. Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V. (DGHO), Berlin.
- Hogan BL. 1996. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes & Development*, 10(13):1580–1594.
- Horbelt D, Boergermann JH, Chaikuad A, Alfano I, Williams E, Lukonin I, Timmel T, Bullock AN, Knaus P. 2015. Small Molecules Dorsomorphin and LDN-193189 Inhibit Myostatin/GDF8 Signaling and Promote Functional Myoblast Differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 290(6):3390–3404.
- Jabbour E, Kantarjian H. 2014. Chronic myeloid leukemia: 2014 update on diagnosis, monitoring, and management. *American Journal of Hematology*, 89(5):547–556.
- Jabbour E, Kantarjian HM, Saglio G, Steegmann JL, Shah NP, Boqué C, Chuah C, Pavlovsky C, Mayer J, Cortes J, Baccarani M, Kim DW, Bradley-Garelik MB, Mohamed H, Wildgust M, Hochhaus A. 2013. Early response with dasatinib or imatinib in chronic myeloid leukemia: 3-year follow-up from a randomized phase 3 trial (DASISION). *Blood*, 123(4):494–500.
- Kang Y, Chen CR, Massagué J. 2003. A Self-Enabling TGF-beta Response Coupled to Stress Signaling: Smad Engages Stress Response Factor ATF3 for Id1 Repression in Epithelial Cells. *Molecular Cell*, 11(4):915 – 926.
- Kantarjian H, Shah NP, Hochhaus A, Cortes J, Shah S, Ayala M, Moiraghi B, Shen Z, Mayer J, Pasquini R, Nakamae H, Huguet F, Boqué C, Chuah C, Bleickardt E, Bradley-Garelik MB, Zhu C, Szatrowski T, Shapiro D, Baccarani M. 2010. Dasatinib versus Imatinib in Newly Diagnosed Chronic-Phase Chronic Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 362(24):2260–2270.

- Kanzaki S, Takahashi T, Kanno T, Ariyoshi W, Shinmyozu K, Tujisawa T, Nishihara T. 2008. Heparin inhibits BMP-2 osteogenic bioactivity by binding to both BMP-2 and BMP receptor. *Journal of Cellular Physiology*, 216(3):844–850.
- Kavsak P, Rasmussen RK, Causing CG, Bonni S, Zhu H, Thomsen GH, Wrana JL. 2000. Smad7 Binds to Smurf2 to Form an E3 Ubiquitin Ligase that Targets the TGF-beta Receptor for Degradation. *Molecular Cell*, 6(6):1365 – 1375.
- Kawamura C, Kizaki M, Ikeda Y. 2002. Bone Morphogenetic Protein (BMP)-2 Induces Apoptosis in Human Myeloma Cells. *Leukemia & Lymphoma*, 43(3):635–639.
- Korchynskiy O, van Bezooijen RL, Löwik CW, ten Dijke P. 2004. Bone morphogenetic protein receptors and their nuclear effectors in bone formation. In: Vukicevic S, Sampath K, Hrsg. *Bone Morphogenetic Proteins: Regeneration of Bone and Beyond. Progress in Inflammation Research*. Birkhäuser Basel, 9–44.
- Kretzschmar M, Doody J, Timokhina I, Massagué J. 1999. A mechanism of repression of TGF-beta/ Smad signaling by oncogenic Ras. *Genes & Development*, 13(7):804–816.
- Laperrousaz B, Jeanpierre S, Sagorny K, Voeltzel T, Ramas S, Kaniewski B, Ffrench M, Salesse S, Nicolini FE, Maguer-Satta V. 2013. Primitive CML cell expansion relies on abnormal levels of BMPs provided by the niche and on BMPRIb overexpression. *Blood*, 122(23):3767–3777.
- Lavery K, Swain P, Falb D, Alaoui-Ismaili MH. 2008. BMP-2/4 and BMP-6/7 Differentially Utilize Cell Surface Receptors to Induce Osteoblastic Differentiation of Human Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 283(30):20948–20958.
- Liu F, Hata A, Baker JC, Doody J, Carcamo J, Harland RM, Massague J. 1996. A human Mad protein acting as a BMP-regulated transcriptional activator. *Nature*, 381(6583):620–623.
- Lozzio C, Lozzio B. 1975. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood*, 45(3):321–334.

- Lu J, Sun B, Huo R, Wang YC, Yang D, Xing Y, Xiao XL, Xie X, Dong DL. 2014. Bone Morphogenetic Protein-2 Antagonizes Bone Morphogenetic Protein-4 Induced Cardiomyocyte Hypertrophy and Apoptosis. *Journal of Cellular Physiology*, 229(10):1503–1510.
- Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. 2002. The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science*, 298(5600):1912–1934.
- Massague J. 2000. How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1(3):169–178.
- Matsuguchi T, Salgia R, Hallek M, Eder M, Druker B, Ernst TJ, Griffin JD. 1994. Shc phosphorylation in myeloid cells is regulated by granulocyte macrophage colony-stimulating factor, interleukin-3, and steel factor and is constitutively increased by p210BCR/ABL. *Journal of Biological Chemistry*, 269(7):5016–5021.
- McClellan JS, Dove C, Gentles AJ, Ryan CE, Majeti R. 2015. Reprogramming of primary human Philadelphia chromosome-positive B cell acute lymphoblastic leukemia cells into nonleukemic macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(13):4074–4079.
- Miller AF, Harvey SAK, Thies RS, Olson MS. 2000. Bone Morphogenetic Protein-9: an autocrine/paracrine cytokine in the liver. *Journal of Biological Chemistry*, 275(24):17937–17945.
- Miyazono K, Kamiya Y, Morikawa M. 2010. Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *Journal of Biochemistry*, 147(1):35–51.
- Montani D, Bergot E, Günther S, Savale L, Bergeron A, Bourdin A, Bouvaist H, Canuet M, Pison C, Macro M, Poubreau P, Girerd B, Natali D, Guignabert C, Perros F, O’Callaghan DS, Jaïs X, Tubert-Bitter P, Zalcman G, Sitbon O, Simonneau G, Humbert M. 2012. Pulmonary Arterial Hypertension in Patients Treated by Dasatinib. *Circulation*, 125(17):2128–2137.
- Mu Y, Gudey S, Landström M. 2012. Non-Smad signaling pathways. *Cell and Tissue Research*, 347(1):11–20.
- Mukhopadhyay P, Webb CL, Warner DA, Greene RM, Pisano MM. 2008. BMP Signaling Dynamics in Embryonic Orofacial Tissue. *Journal of cellular physiology*, 216(3):771–779.

- Nowell PC, Hungerford DA. 1960. Chromosome Studies on Normal and Leukemic Human Leukocytes. *Journal of the American National Cancer Institute*, 25:85–109.
- O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, Gathmann I, Baccarani M, Cervantes F, Cornelissen JJ, Fischer T, Hochhaus A, Hughes T, Lechner K, Nielsen JL, Rousselot P, Reiffers J, Saglio G, Shepherd J, Simonsson B, Gratwohl A, Goldman JM, Kantarjian H, Taylor K, Verhoef G, Bolton AE, Capdeville R, Druker BJ. 2003. Imatinib Compared with Interferon and Low-Dose Cytarabine for Newly Diagnosed Chronic-Phase Chronic Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 348(11):994–1004.
- Pagnano KBB, Bendit I, Boquimpani C, Souza CAD, Miranda ECM, Zalcborg I, Larripa I, Nardinelli L, Silveira RA, Fogliatto L, Spector N, Funke V, Pasquini R, Hungria V, Chiattoni CS, Clementino N, Conchon M, Moiraghi EB, Lopez JL, Pavlovsky C, Pavlovsky MA, Cervera EE, Meillon LA, Simões B, Hamerschlak N, Bozzano AHM, Mayta E, Cortes J, Bengió RM. 2015. BCR-ABL Mutations in Chronic Myeloid Leukemia Treated With Tyrosine Kinase Inhibitors and Impact on Survival. *Cancer Investigation*, 33(9):451–458.
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9):e45.
- Pfaffl MW. 2004. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOSpektrum*, 1(04):92–95.
- Quintás-Cardama A, Kantarjian H, Cortes J. 2012. Nilotinib-Associated Vascular Events. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*, 12(5):337 – 340.
- Quintás-Cardama A, Kantarjian H, Ravandi F, O'Brien S, Thomas D, Vidal-Senmache G, Wierda W, Kornblau S, Cortes J. 2009. Bleeding diathesis in patients with chronic myelogenous leukemia receiving dasatinib therapy. *Cancer*, 115(11):2482–2490.
- Rahman MS, Akhtar N, Jamil HM, Banik RS, Asaduzzaman SM. 2015. TGF-beta/BMP signaling and other molecular events: regulation of osteoblastogenesis and bone formation. *Bone Research*, 3:1–20.
- Rosen V. 2009. BMP2 signaling in bone development and repair. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 20(5-6):475 – 480.

- Rosso V, Bracco E, Pedrola R, Carturan S, Signorino E, Petiti J, Calabrese C, Nicoli P, De Gobbi M, Gaidano V, Gallo D, Ulisciani S, Fava C, Rege-Cambrin G, Frassoni F, Saglio G, Cilloni D. 2015. Detection of BCR-ABL T315I mutation by peptide nucleic acid directed PCR clamping and by peptide nucleic acid FISH. *Biomarker Research*, 3(1):1–5.
- Sachse A, Wagner A, Keller M, Wagner O, Wetzel WD, Layher F, Venbrocks RA, Hortschansky P, Pietraszczyk M, Wiederanders B, Hempel H, Bossert J, Horn J, Schmuck K, Mollenhauer J. 2005. Osteointegration of hydroxyapatite-titanium implants coated with nonglycosylated recombinant human bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) in aged sheep. *Bone*, 37(5):699 – 710.
- Saglio G, Kim DW, Issaragrisil S, le Coutre P, Etienne G, Lobo C, Pasquini R, Clark RE, Hochhaus A, Hughes TP, Gallagher N, Hoenekopp A, Dong M, Haque A, Larson RA, Kantarjian HM. 2010. Nilotinib versus Imatinib for Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 362(24):2251–2259.
- Saito T, Ogawa M, Hata Y, Bessho K. 2004. Acceleration Effect of Human Recombinant Bone Morphogenetic Protein-2 on Differentiation of Human Pulp Cells Into Odontoblasts. *Journal of Endodontics*, 30(4):205 – 208.
- Samad TA, Rebbapragada A, Bell E, Zhang Y, Sidis Y, Jeong SJ, Campagna JA, Perusini S, Fabrizio DA, Schneyer AL, Lin HY, Brivanlou AH, Attisano L, Woolf CJ. 2005. DRAGON, a Bone Morphogenetic Protein Co-receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 280(14):14122–14129.
- Sekiya I, Larson B, Vuoristo J, Reger R, Prockop D. 2005. Comparison of effect of BMP-2, -4, and -6 on in vitro cartilage formation of human adult stem cells from bone marrow stroma. *Cell and Tissue Research*, 320(2):269–276.
- Shi Y, Massagué J. 2003. Mechanisms of TGF-beta Signaling from Cell Membrane to the Nucleus. *Cell*, 113(6):685 – 700.
- Shi Y, Wang YF, Jayaraman L, Yang H, Massagué J, Pavletich NP. 1998. Crystal Structure of a Smad MH1 Domain Bound to DNA: Insights on DNA Binding in TGF-beta Signaling. *Cell*, 94(5):585 – 594.
- Shimasaki S, Moore RK, Otsuka F, Erickson GF. 2004. The Bone Morphogenetic Protein System In Mammalian Reproduction. *Endocrine Reviews*, 25(1):72–101.

- Sieber C, Kopf J, Hiepen C, Knaus P. 2009. Recent advances in BMP receptor signaling. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 20(5-6):343 – 355.
- Sugimori K, Matsui K, Motomura H, Tokoro T, Wang J, Higa S, Kimura T, Kitajima I. 2005. BMP-2 prevents apoptosis of the N1511 chondrocytic cell line through PI3K/Akt-mediated NF-kappaB activation. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 23(6):411–419.
- Sun X, Copeland N, Jenkins N, Baltimore D. 1991. ID proteins ID1 and ID2 selectively inhibit DNA-binding by one class of helix-loop-helix proteins. *Molecular and Cellular Biology*, 11(11):5603–5611.
- Suzuki C, Murakami G, Fukuchi M, Shimanuki T, Shikauchi Y, Imamura T, Miyazono K. 2002. Smurf1 Regulates the Inhibitory Activity of Smad7 by Targeting Smad7 to the Plasma Membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 277(42):39919–39925.
- Tam WF, Gu TL, Chen J, Lee BH, Bullinger L, Fröhling S, Wang A, Monti S, Golub TR, Gilliland DG. 2008. Id1 is a common downstream target of oncogenic tyrosine kinases in leukemic cells. *Blood*, 112(5):1981–1992.
- Toofan P, Irvine D, Hopcroft L, Copland M, Wheadon H. 2014. The role of the bone morphogenetic proteins in leukaemic stem cell persistence. *Biochemical Society Transactions*, 42(4):809–815.
- Urist MR. 1965. Bone: Formation by Autoinduction. *Science*, 150(3698):893–899.
- Vogt J, Traynor R, Sapkota GP. 2011. The specificities of small molecule inhibitors of the TGF-beta and BMP pathways. *Cellular Signalling*, 23(11):1831 – 1842.
- Wang Yw, Xu Dp, Liu Y, Zhang R, Lu L. 2015. The Effect of Tumor Necrosis Factor-alpha at Different Concentrations on Osteogenetic Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Journal of Craniofacial Surgery*, 26(7):2081–2085.
- Woessner DW, Lim CS, Deininger MW. 2011. Development of an Effective Therapy for CML. *Cancer Journal*, 17(6).
- Wozney J, Rosen V, Celeste A, Mitsock L, Whitters M, Kriz R, Hewick R, Wang E. 1988. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science*, 242(4885):1528–1534.
- Wrana JL. 2000. Regulation of Smad Activity. *Cell*, 100(2):189 – 192.

- Wrana JL. 2013. Signaling by the TGF-beta Superfamily. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(10).
- Xiao YT, Xiang LX, Shao JZ. 2007. Bone morphogenetic protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 362(3):550 – 553.
- Yu PB, Hong CC, Sachidanandan C, Babitt JL, Deng DY, Hoyng SA, Lin HY, Bloch KD, Peterson RT. 2007. Dorsomorphin inhibits BMP signals required for embryogenesis and iron metabolism. *Nature chemical biology*, 4(1):33–41.
- Zhang Y, Chang C, Gehling DJ, Hemmati-Brivanlou A, Derynck R. 2001. Regulation of Smad degradation and activity by Smurf2, an E3 ubiquitin ligase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(3):974–979.
- Zhu H, Kavsak P, Abdollah S, Wrana JL, Thomsen GH. 1999. A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation. *Nature*, 400(6745):687–693.

# A. Anhang

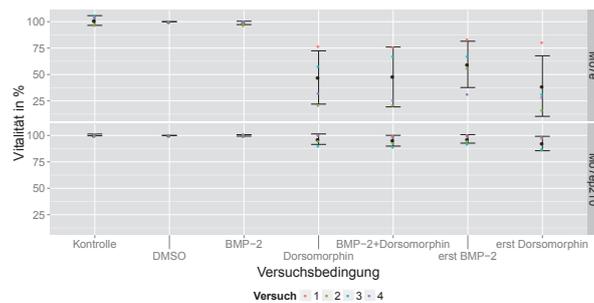
## A.1. Vitalitätsanalysen

Weiterführende Daten zur Durchflusszytometrie ergänzend zu Abbildung 6.3.

**Tabelle A.1.:** Zellvitalität nach 72 Stunden in Prozent mit Standardabweichung bezogen auf DMSO. n=4

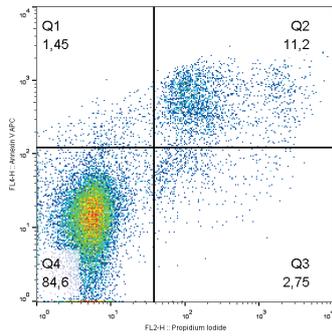
	Mo7e	Mo7ep210
Kontrolle	101 ± 5	101 ± 1
BMP-2	99 ± 2	100 ± 1
Dorsomorphin	47 ± 25	96 ± 5
BMP-2+Dorsomorphin	48 ± 28	95 ± 5
erst BMP-2	60 ± 22	97 ± 4
erst Dorsomorphin	39 ± 29	92 ± 7
DMSO	100 ± 0	100 ± 0

Ergänzende Darstellung zu Abb. 6.3 unter Einbezug der Messwerte der Einzelexperimente.

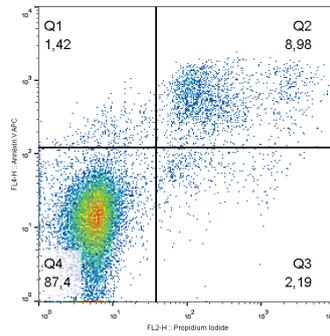


**Abbildung A.1.:** Annexin V/Propidiumiodid-Assay. n=4: Inkubation der Mo7e u. Mo7ep210 mit sf-RPMI1640 (Kontrolle), DMSO (10  $\mu$ M), BMP-2 (immer 50 ng/ml), Dorsomorphin (immer 10  $\mu$ M), BMP-2 u. Dorsomorphin, sowie zunächst BMP-2 u. nach 30 Min. Dorsomorphin u. zunächst Dorsomorphin u. nach 30 Min. BMP-2. Inkubation für 72h bei 37°C. Färbung mit Annexin V-APC (0,8% in Bindepuffer) u. Propidiumiodid (0,2%in Bindepuffer).

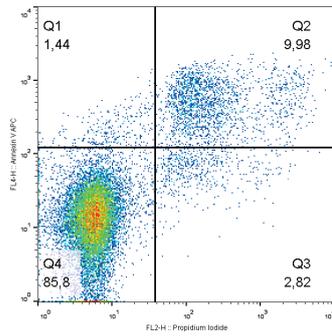
Nicht im Ergebnisteil aufgeführte Dotplots der Mo7e:



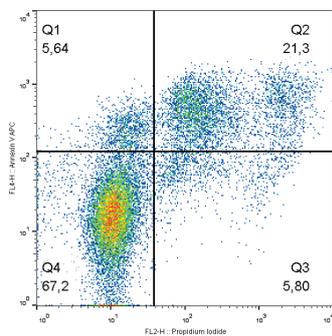
(a) serumfreies RPMI1640



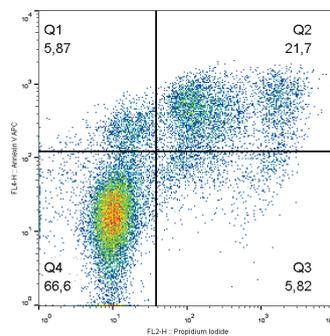
(b) DMSO (10  $\mu$ M)



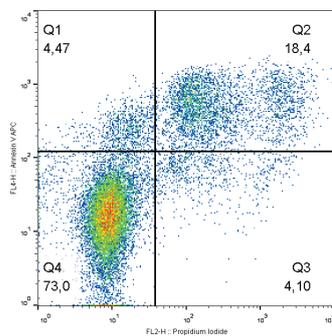
(c) BMP-2 (50 ng/ml)



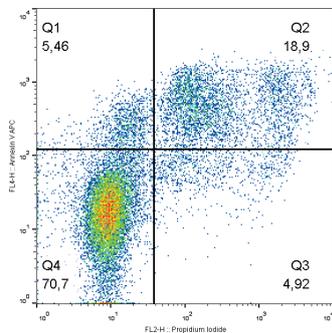
(d) Dorsomorphin (10  $\mu$ M)



(e) BMP-2+Dorsomorphin

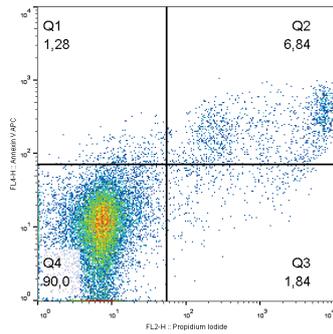


(f) 1.BMP-2; 2.Dorsomorphin

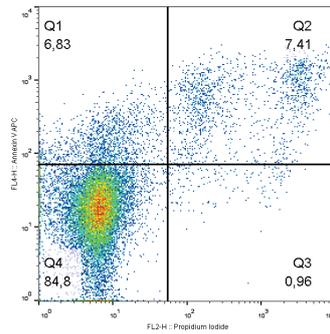
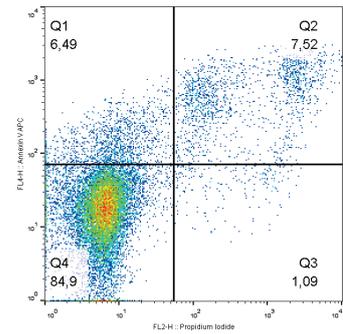


(g) 1.Dorsomorphin; 2.BMP-2

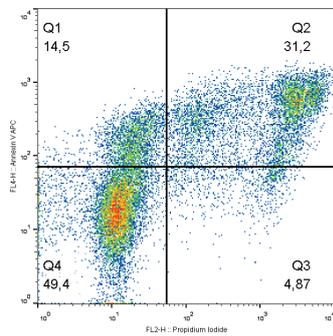
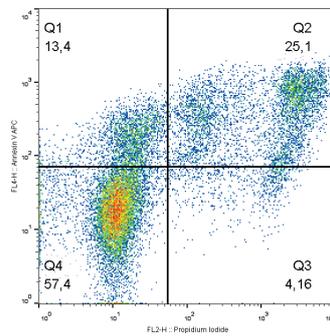
**Abbildung A.2.:** Dotplots für **Mo7e Versuch 1**. Inkubation (a) mit serumfreiem RPMI1640. (b) mit DMSO (10  $\mu$ M). (c) mit BMP-2 (50 ng/ml). (d) mit Dorsomorphin (10  $\mu$ M). (e) mit BMP-2 (50 ng/ml) und Dorsomorphin (10  $\mu$ M) in Kombination. (f) zunächst allein mit BMP-2 (50 ng/ml). Nach 30 Minuten Zugabe von Dorsomorphin (10  $\mu$ M). (g) zunächst allein mit Dorsomorphin (10  $\mu$ M). Nach 30 Minuten Zugabe von BMP-2 (50 ng/ml). Inkubationen jeweils für 72h bei 37°C.



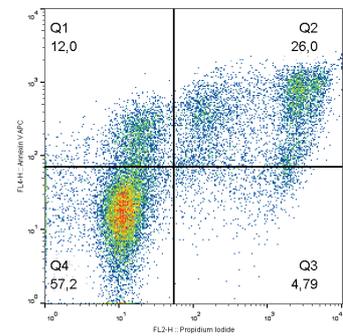
(a) serumfreies RPMI1640

(b) DMSO (10  $\mu$ M)

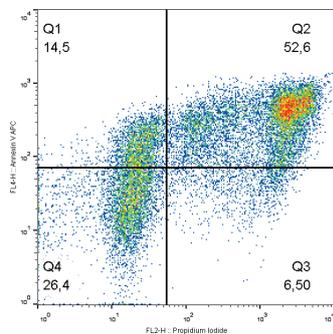
(c) BMP-2 (50 ng/ml)

(d) Dorsomorphin (10  $\mu$ M)

(e) BMP-2+Dorsomorphin

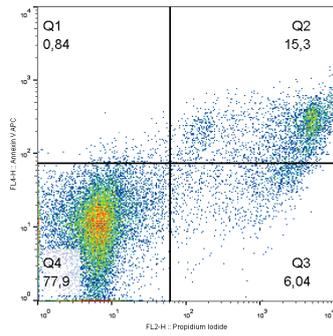


(f) 1.BMP-2; 2.Dorsomorphin

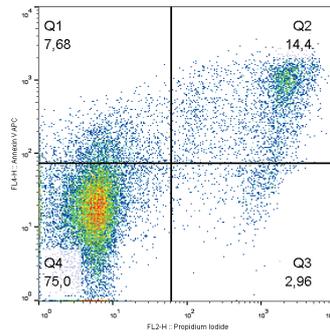
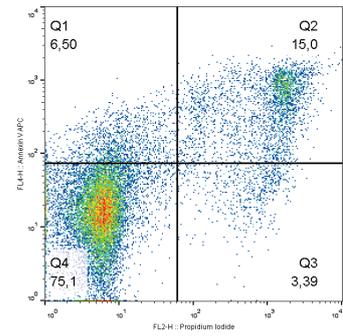


(g) 1.Dorsomorphin; 2.BMP-2

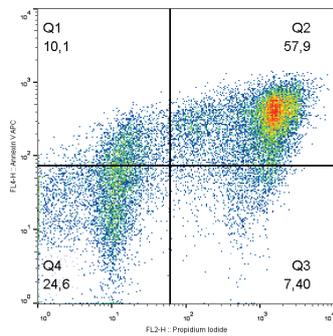
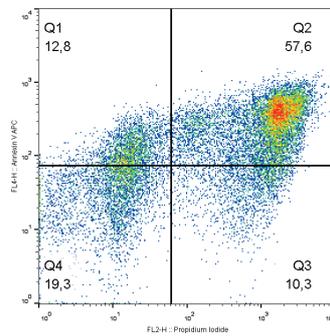
**Abbildung A.3.:** Dotplots für **Mo7e Versuch 3**. Inkubation (a) mit serumfreiem RPMI1640. (b) mit DMSO (10  $\mu$ M). (c) mit BMP-2 (50 ng/ml). (d) mit Dorsomorphin (10  $\mu$ M). (e) mit BMP-2 (50 ng/ml) und Dorsomorphin (10  $\mu$ M) in Kombination. (f) zunächst allein mit BMP-2 (50 ng/ml). Nach 30 Minuten Zugabe von Dorsomorphin (10  $\mu$ M). (g) zunächst allein mit Dorsomorphin (10  $\mu$ M). Nach 30 Minuten Zugabe von BMP-2 (50 ng/ml). Inkubationen jeweils für 72h bei 37°C.



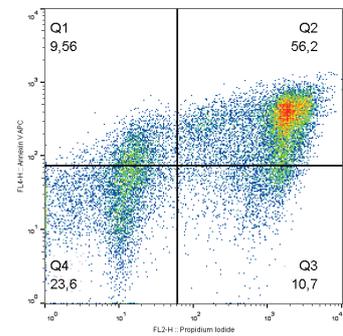
(a) serumfreies RPMI1640

(b) DMSO (10  $\mu$ M)

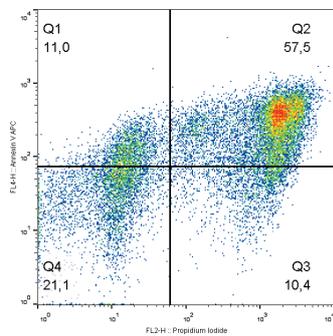
(c) BMP-2 (50 ng/ml)

(d) Dorsomorphin (10  $\mu$ M)

(e) BMP-2+Dorsomorphin



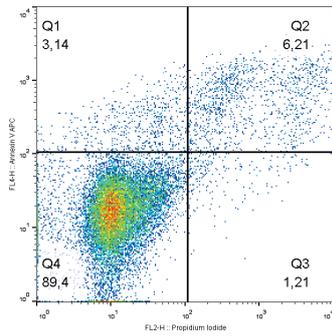
(f) 1.BMP-2; 2.Dorsomorphin



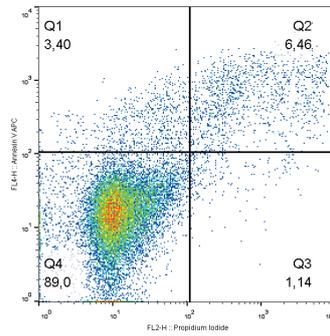
(g) 1.Dorsomorphin; 2.BMP-2

**Abbildung A.4.:** Dotplots für **Mo7e Versuch 4**. Inkubation (a) mit serumfreiem RPMI1640. (b) mit DMSO (10  $\mu$ M). (c) mit BMP-2 (50 ng/ml). (d) mit Dorsomorphin (10  $\mu$ M). (e) mit BMP-2 (50 ng/ml) und Dorsomorphin (10  $\mu$ M) in Kombination. (f) zunächst allein mit BMP-2 (50 ng/ml). Nach 30 Minuten Zugabe von Dorsomorphin (10  $\mu$ M). (g) zunächst allein mit Dorsomorphin (10  $\mu$ M). Nach 30 Minuten Zugabe von BMP-2 (50 ng/ml). Inkubationen jeweils für 72h bei 37°C.

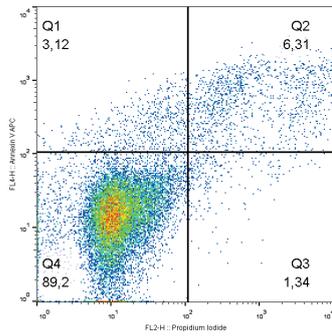
Nicht im Ergebnisteil aufgeführte Dotplots der Mo7ep210:



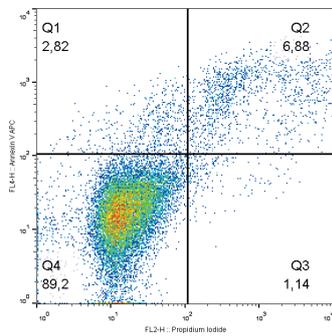
(a) serumfreies RPMI1640



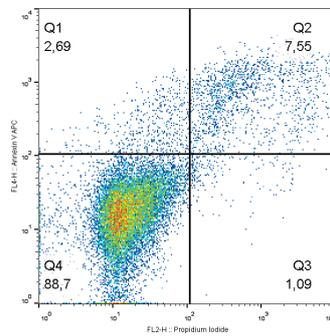
(b) DMSO (10  $\mu$ M)



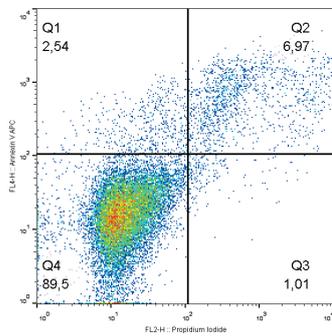
(c) BMP-2 (50 ng/ml)



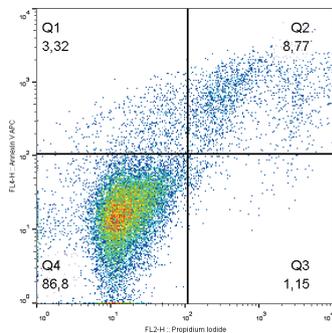
(d) Dorsomorphin (10  $\mu$ M)



(e) BMP-2+Dorsomorphin

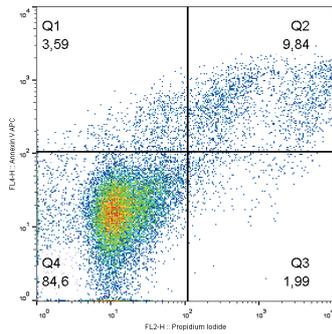


(f) 1.BMP-2; 2.Dorsomorphin

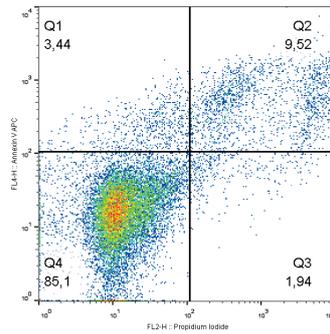
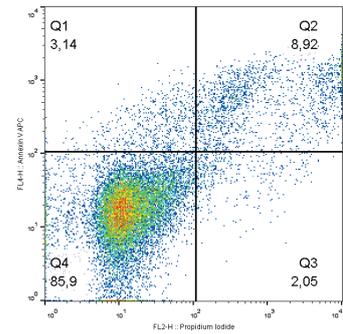


(g) 1.Dorsomorphin; 2.BMP-2

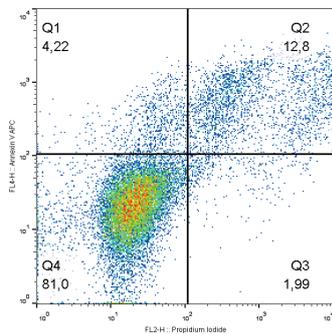
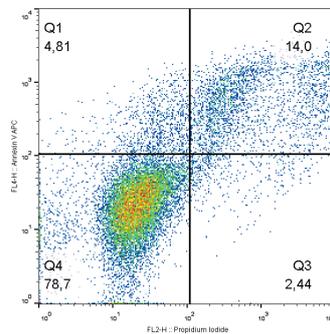
**Abbildung A.5.:** Dotplots für Mo7ep210 Versuch 1. Inkubation (a) mit serumfreiem RPMI1640. (b) mit DMSO (10  $\mu$ M). (c) mit BMP-2 (50 ng/ml). (d) mit Dorsomorphin (10  $\mu$ M). (e) mit BMP-2 (50 ng/ml) und Dorsomorphin (10  $\mu$ M) in Kombination. (f) zunächst allein mit BMP-2 (50 ng/ml). Nach 30 Minuten Zugabe von Dorsomorphin (10  $\mu$ M). (g) zunächst allein mit Dorsomorphin (10  $\mu$ M). Nach 30 Minuten Zugabe von BMP-2 (50 ng/ml). Inkubationen jeweils für 72h bei 37°C.



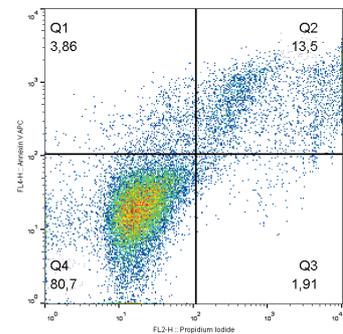
(a) serumfreies RPMI1640

(b) DMSO (10  $\mu$ M)

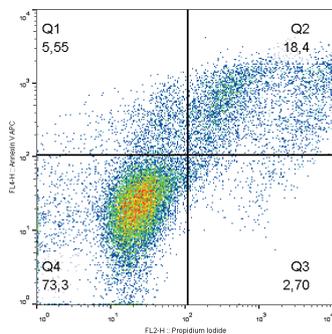
(c) BMP-2 (50 ng/ml)

(d) Dorsomorphin (10  $\mu$ M)

(e) BMP-2+Dorsomorphin

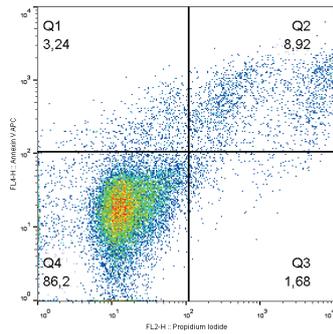


(f) 1.BMP-2; 2.Dorsomorphin

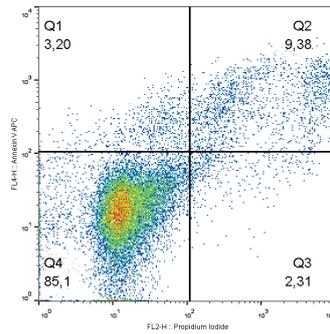
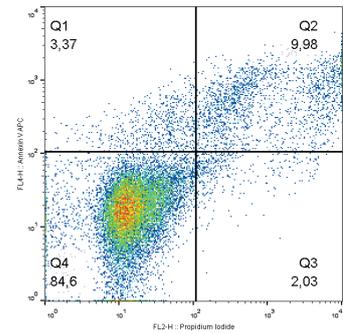


(g) 1.Dorsomorphin; 2.BMP-2

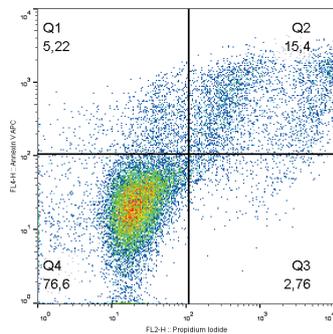
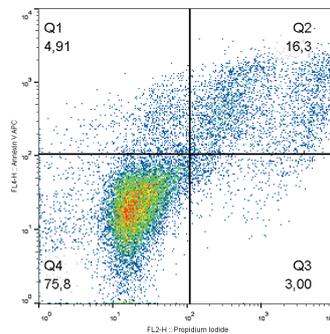
**Abbildung A.6.:** Dotplots für Mo7ep210 Versuch 2. Inkubation (a) mit serumfreiem RPMI1640. (b) mit DMSO (10  $\mu$ M). (c) mit BMP-2 (50 ng/ml). (d) mit Dorsomorphin (10  $\mu$ M). (e) mit BMP-2 (50 ng/ml) und Dorsomorphin (10  $\mu$ M) in Kombination. (f) zunächst allein mit BMP-2 (50 ng/ml). Nach 30 Minuten Zugabe von Dorsomorphin (10  $\mu$ M). (g) zunächst allein mit Dorsomorphin (10  $\mu$ M). Nach 30 Minuten Zugabe von BMP-2 (50 ng/ml). Inkubationen jeweils für 72h bei 37°C.



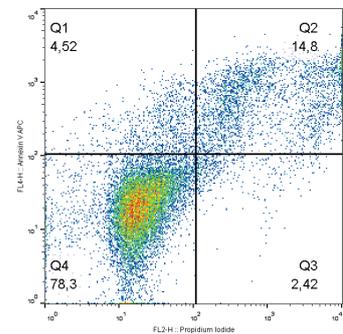
(a) serumfreies RPMI1640

(b) DMSO (10  $\mu$ M)

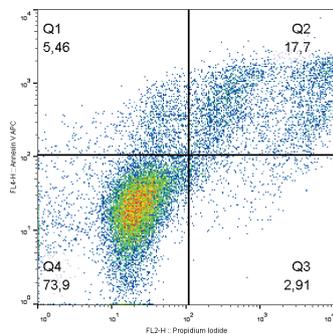
(c) BMP-2 (50 ng/ml)

(d) Dorsomorphin (10  $\mu$ M)

(e) BMP-2+Dorsomorphin



(f) 1.BMP-2; 2.Dorsomorphin



(g) 1.Dorsomorphin; 2.BMP-2

**Abbildung A.7.:** Dotplots für Mo7ep210 Versuch 3. Inkubation (a) mit serumfreiem RPMI1640. (b) mit DMSO (10  $\mu$ M). (c) mit BMP-2 (50 ng/ml). (d) mit Dorsomorphin (10  $\mu$ M). (e) mit BMP-2 (50 ng/ml) und Dorsomorphin (10  $\mu$ M) in Kombination. (f) zunächst allein mit BMP-2 (50 ng/ml). Nach 30 Minuten Zugabe von Dorsomorphin (10  $\mu$ M). (g) zunächst allein mit Dorsomorphin (10  $\mu$ M). Nach 30 Minuten Zugabe von BMP-2 (50 ng/ml). Inkubationen jeweils für 72h bei 37°C.

## A.2. Genexpressionsanalysen

Bezugnehmend auf Tabelle 5.3, in der exemplarisch für alle Gene der PCR-Ablauf für BMP-1 dargestellt ist, einige Ergänzungen. Die Aktivierungs- und Denaturierungsphase, sowie die Abkühlung fanden für jedes Gen entsprechend der Angaben in Tabelle 5.3 statt. Die Annealing- und Elongationsphase wurden teilweise leicht verändert.

Für BMP-2: Annealing 30 sec, 60°C; Elongation 30 sec 72°C

Für BMP-3: Annealing 30 sec, 64°C; Elongation s. BMP-2

Für BMP-4: Annealing 30 sec, 61°C; Elongation s. BMP-2

Für BMP-5: Annealing 30 sec, 56°C; Elongation s. BMP-2

Für BMP-6: Annealing 30 sec, 65,5°C; Elongation s. BMP-2

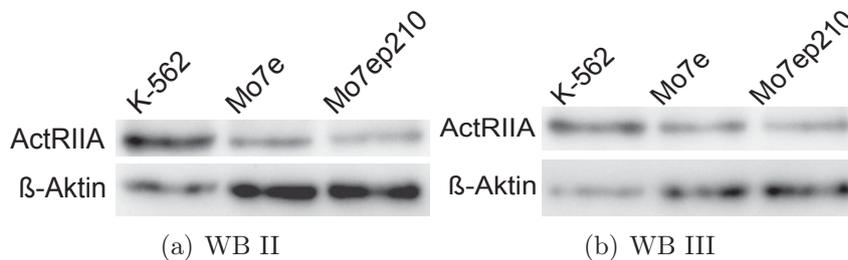
Für BMP-7: Annealing 30 sec, 65°C; Elongation s. BMP-2

Für ActRIIA: Annealing 30 sec, 67°C; Elongation s. BMP-2

Für BMPRRIB: Annealing 30 sec, 58°C; Elongation 25 sec 72°C

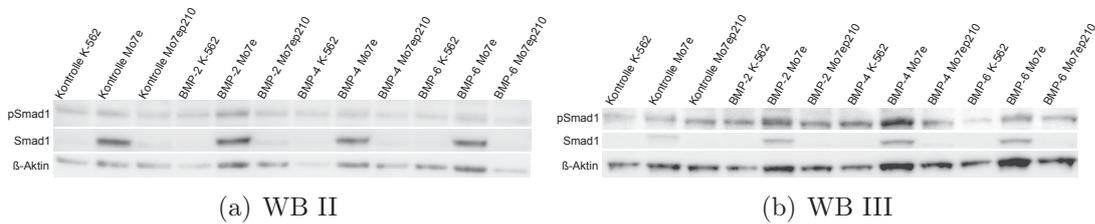
## A.3. Westernblotanalysen

Ergänzungen zum Nachweis von ActRIIA. In Tabelle 6.4 dargestellte Quantifizierung des Proteins wurde auf Grundlage dreier unabhängiger Westernblots berechnet. Der erste Westernblot ist in Abbildung 6.8 zu sehen. Die weiteren beiden Westernblots folgen:



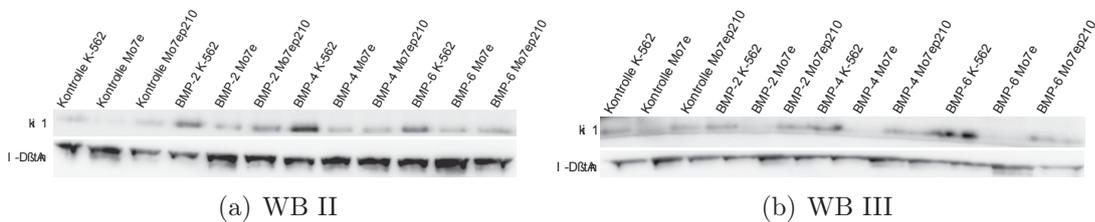
**Abbildung A.8.:** Ergänzende Westernblots zum Nachweis von ActRIIA.

Auch die in Tabelle 6.5 dargestellte Quantifizierung von pSmad1 und Smad1 wurde anhand dreier unabhängiger Westernblots erarbeitet. Der erste dieser Blots ist in Abbildung 6.9 zu sehen. Hier die beiden weiteren Westernblots:



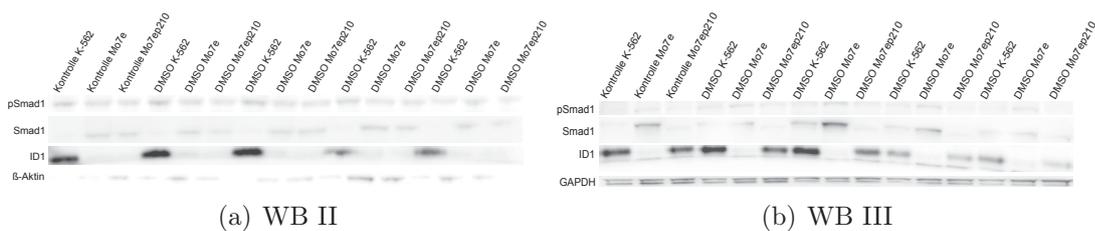
**Abbildung A.9.:** Ergänzende Westernblots zum Nachweis von pSmad1 und Smad1.

Hier die beiden Abbildung 6.10 ergänzenden Westernblots zu den in Tabelle 6.7 dargestellten Quantifizierungsangaben:



**Abbildung A.10.:** Ergänzende Westernblots zum Nachweis von ID1.

Ergänzungen zum Nachweis von pSmad1, Smad1 und ID1 unter Inkuabtion mit BMP-2 und Dorsomorphin. Die in den Tabellen 6.8 und 6.9 dargestellte Quantifizierung der Proteine wurde auf Grundlage dreier unabhängiger Westernblots berechnet. Der erste Westernblot ist in Abbildung 6.11 zu sehen. Die weiteren beiden Westernblots folgen:



**Abbildung A.11.:** Ergänzende Westernblots zum Nachweis von pSmad1, Smad1 und ID1 unter Inkubation mit BMP-2 und Dorsomorphin.

## A.4. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Andreas Hochhaus für die Möglichkeit, meine Promotion in der Abteilung für Hämatologie und Internistische Onkologie der Klinik für Innere Medizin II des Universitätsklinikums Jena verfassen zu dürfen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Joachim Clement für die Bereitstellung des Themas und seine tatkräftige Unterstützung und geduldige Beratung bei der Bearbeitung desselben.

Ich danke Frau Cornelia Jörke für die professionelle Einführung in die Laborarbeit und ihre immerwährende Hilfsbereitschaft.

Herrn Mike Fischer möchte ich für die Anleitung und Betreuung am Durchflusszytometer FACSCalibur, sowie die Unterstützung bei der Auswertung der hiermit gewonnenen Daten danken.

Des Weiteren danke ich Donald E. Knuth, Leslie Lamport und Markus Kohm für  $\text{T}_{\text{E}}\text{X}$ ,  $\text{L}_{\text{A}}\text{T}_{\text{E}}\text{X}$  und KOMA-Script.

Mein Dank gilt den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Labors der Abteilung Hämatologie und Internistische Onkologie und besonders der AG Clement für die freundliche Aufnahme in das Team, die Geduld in der Zusammenarbeit, die hilfreichen Gespräche und Ratschläge und eine sehr intensive Zeit.

Besonders bedanke ich mich auch bei Michael Hermes für seine fachliche und persönliche Unterstützung.

Herzlicher Dank gebührt meinen Eltern Rita und Thomas Knobloch für ihr Vertrauen und ihre Begleitung zu jeder Zeit.

## A.5. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass

- mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
- mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Herr Dr. Joachim Clement, Frau Cornelia Jörke, Frau Christine Gräfe, Herr Mike Fischer, Frau Jelena Mihajlovic
- die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde,
- Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,
- ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, am 05.05.2017

Ulrike Knobloch