

**Die Rolle von
Chemokinrezeptor CXCR4 und
Connective Tissue Growth Factor
innerhalb der Tumor-Stroma-Interaktion
in der akuten myeloischen Leukämie**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

vorgelegt von
Saskia Veronika Pante
geb. am 12. September 1984 in Wuppertal

Mainz, den 31. März 2014

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Mai 2014

D77 Mainzer Dissertation

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
1 Einleitung	1
1.1 Die akute myeloische Leukämie	1
1.2 Die Tumor-Stroma-Interaktion als therapeutischer Angriffspunkt	2
1.2.1 Die Nische im Knochenmark	2
1.2.2 Der Chemokinrezeptor CXCR4 und sein Ligand CXCL12	4
1.2.3 Der Connective Tissue Growth Factor (CTGF)	6
1.2.3.1 Die CCN-Proteinfamilie	6
1.2.3.2 CTGF in physiologischen und nicht-malignen Prozessen	8
1.2.3.3 CTGF in der Karzinogenese	9
1.2.3.4 Der Hippo-Signalweg	13
2 Zielsetzung	17
3 Material und Methoden	19
3.1 Material	19
3.1.1 Chemikalien	19
3.1.2 Puffer, Lösungen, Gele	19
3.1.3 Enzyme	21
3.1.4 Zytostatika und blockierende Antikörper	21
3.1.5 Antikörper	22
3.1.6 Größenstandards	22
3.1.7 Bakterien und Vektoren	23
3.1.8 Fertigungssysteme	24
3.1.9 Nährmedium und Agarplatten	24
3.1.10 Zellkulturmaterialien und Zusätze	24
3.1.11 Zelllinien und primäres Material	25
3.1.12 Plastikware	27

3.1.13	Geräte und Zubehör	28
3.1.14	Datenbanken und Software	29
3.2	Methoden	29
3.2.1	Zellbiologische Methoden	29
3.2.1.1	Kultivierung und Passagieren von Zellen	29
3.2.1.2	Zählen von Zellen	30
3.2.1.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen	30
3.2.1.4	Aussaat und Trennung der Kokultur	31
3.2.1.5	Einsatz der Durchflusszytometrie	34
3.2.1.6	Verwendung des Transwell-Systems	37
3.2.1.7	Untersuchung der Proliferationsrate	37
3.2.1.8	Kultivierung von Zellen auf Fibronectin	38
3.2.1.9	Generierung einer stabil genetisch veränderten Zelllinie mit Hilfe lentiviraler Transduktion	38
3.2.1.10	Isolation von RNA aus eukaryotischen Zellen	40
3.2.2	Proteinbiochemische Methoden	40
3.2.2.1	Isolation von Proteinen aus Zelllysaten und Mediumüberständen	40
3.2.2.2	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	40
3.2.2.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	41
3.2.2.4	Proteintransfer auf Nitrocellulosemembran und Detektion von Proteinen (Western Blot)	41
3.2.2.5	Entfernen von Antikörperkomplexen von der Membran	42
3.2.3	Molekularbiologische Methoden	42
3.2.3.1	Klonierung des TAZ-Gens in den pLenti7.3/V5-DEST™ Gateway®-Vektor	42
3.2.3.2	Quantitative Real-time PCR (qPCR)	44
3.2.3.3	Agarose-Gelelektrophorese	48
3.2.4	Arbeit mit Mäusen	48
3.2.4.1	Xenotransplantation und Injektion des Antikörpers	48
3.2.4.2	Präparation und Organentnahme	49
3.2.4.3	Lysieren von Erythrozyten	49
3.2.5	Statistik	49
4	Ergebnisse	51
4.1	Hemmung von CXCR4 durch den Antikörper BMS-936564/MDX-1338 im Zellmodell	51
4.1.1	Expression von CXCR4	51

4.1.2	Funktionelle Untersuchung von BMS-936564/MDX-1338 . . .	52
4.1.2.1	Blockade des CXCR4-Rezeptors	52
4.1.2.2	Blockade des Calcium-Flux und der Migration . . .	52
4.1.3	Therapeutische Eignung von BMS-936564/MDX-1338	53
4.1.3.1	Einfluss auf Apoptose und Differenzierung	53
4.1.3.2	Einfluss auf Stroma-vermittelte Resistenz	55
4.2	Regulation und Targeting von CTGF im Zell- und Mausmodell . . .	57
4.2.1	Regulation von CTGF	57
4.2.1.1	Transkriptionsanalyse kokultivierter Zellen mit Hilfe eines qPCR Arrays	57
4.2.1.2	Validierung der CTGF-Regulation	58
4.2.1.3	Weitere Untersuchung zur Regulation von CTGF in Molm-14-Zellen	60
4.2.1.4	Einfluss des Hippo-Signalwegs	61
4.2.2	Targeting von CTGF	66
4.2.2.1	Hemmung von CTGF durch shRNA-Knockdown .	66
4.2.2.2	Hemmung von CTGF durch den Antikörper FG-3019	71
5	Diskussion	75
5.1	BMS-936564/MDX-1338: Die Wirksamkeit des CXCR4-Antikörpers in AML-Zellen	75
5.2	CTGF - ein neues Zielprotein für die AML-Therapie?	79
5.2.1	Validierung der Daten des qPCR Arrays	79
5.2.2	Die Beteiligung des Hippo-Signalweges an CTGF-Expression und Resistenzverhalten	83
5.2.3	Funktionelle Relevanz der CTGF-Regulation	87
6	Zusammenfassung	93
	Anhang	95
A	Ergebnisse qPCR Array Molm-14	95
B	Primer	102
C	Plasmidkarten	103
D	Abkürzungsverzeichnis	109
E	Herstellerverzeichnis	112
	Literaturverzeichnis	115
	Danksagung	136

Einleitung

1.1 Die akute myeloische Leukämie

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine heterogene Erkrankung der hämatopoetischen Stamm- oder Vorläuferzellen, die durch unkontrollierte Proliferation und ein stark eingeschränktes Differenzierungspotential charakterisiert ist (Estey und Döhner (2006), s. Abb. 1.1). Es kommt zu einem dominierenden Wachstum der entarteten Blasten im Knochenmark mit Ausschwemmung der Zellen ins Blut und zu einer Verdrängung der normalen Hämatopoese. Im Vergleich zu chronischen Leukämien verläuft die akute Leukämie dabei schneller und aggressiver. Durch eine Kombination aus Morphologie, Zytochemie, Immunphänotypisierung und Molekulargenetik der entarteten Zellen lässt sich die AML differentialdiagnostisch von der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) abgrenzen und weiter subklassifizieren (Estey und Döhner 2006).

Die Ursachen der AML sind weitgehend unbekannt. Belastung durch ionisierende Strahlung, Benzol sowie cytotoxische Chemotherapie zählen zu den Risikofaktoren. Außerdem wirken genetische Prädispositionen wie die Trisomie 21 (Down-Syndrom) und Erkrankungen am myelodysplastischen Syndrom oder an Polycythemia Vera begünstigend (Kojima et al. 1990, Finazzi et al. 2005, Weinberg et al. 2009). Das mediane Erkrankungsalter der AML liegt bei 70 Jahren (Estey und Döhner 2006). Die AML ist eine eher seltene Erkrankung. Die Prävalenz liegt für jüngere Patienten bei ca. 3 Erkrankungen/100 000 Personen und steigt bei Patienten ab 65 Jahren auf ca. 18 Erkrankungen/100 000 Personen an. Die Prognose der AML ist vor allem von Alter und Zytogenetik der Patienten abhängig. Obwohl der Großteil der Patienten auf die Therapie anspricht und 70-80 % der jüngeren sowie 40-65 % der älteren Patienten eine komplette Remission erreichen, erleiden vor allem ältere Patienten einen Rückfall. Das 5-Jahres-Überleben liegt in der Gruppe der älteren Patienten bei 10 % (Burnett et al. 2011).

Bereits seit 30 Jahren ist die Kombinationschemotherapie aus einem Anthracyclin und Cytarabin (AraC), die unspezifisch proliferierende Zellen angreift, der Goldstandard. Neue Ergebnisse aus der Forschung führen stetig zu einem verbesserten Verständnis der Krankheit und ermöglichen, dass immer häufiger Wirkstoffe einge-

setzt werden können, die gezielt mutierte Proteine angreifen. Ein Beispiel dafür ist die FMS-like Tyrosinkinase 3 (FLT3). Ca. 30 % der AML-Patienten besitzen eine FLT3-Interne Tandem Mutation (ITD), die mit einer konstitutiven Aktivierung des Enzyms und einer schlechten Prognose verbunden ist (Mizuki et al. 2000, Kottaridis et al. 2001). FLT3-Inhibitoren sind bereits klinisch im Einsatz und konnten bei Patienten mit FLT3-ITD Erfolge verzeichnen (Stone et al. 2005).

Die AML ist eine Erkrankung mit großer Heterogenität und komplexer Struktur. Es wird vermutet, dass die Tumormasse aus verschiedenen Subklonen besteht, die jeweils unterschiedliche Mutationen aufweisen (Jan und Majeti 2012). Die alleinige Eliminierung einer bestimmten Subklonmasse kann dazu führen, dass andere Klone die Therapie überdauern und es zu einem Rezidiv kommt. Daher ist man stetig auf der Suche nach neuen Behandlungsansätzen. Seit einiger Zeit ist bekannt, dass innerhalb der Tumormasse leukämische Stammzellen (LSC) existieren, die den Tumor speisen und die, wie auch die hämatopoetischen Stammzellen (HSC), in der Nische des Knochenmarks geschützt werden (Lapidot et al. (1994), Bonnet und Dick (1997), Hope et al. (2004), s. Abb. 1.1). Dieses Wissen macht man sich in neuen Therapieverfahren zu Nutze.

1.2 Die Tumor-Stroma-Interaktion als therapeutischer Angriffspunkt

1.2.1 Die Nische im Knochenmark

Das Knochenmark besteht aus einer Vielzahl von zellulären Komponenten, löslichen Faktoren und Proteinen der extrazellulären Matrix (ECM), die für die HSC eine spezielle Umgebung, ein sogenanntes *Microenvironment*, bilden. Die HSCs sind innerhalb des Knochenmarks in zwei verschiedenen Nischen lokalisiert. Die endosteale Nische in der Nähe des Knochens beherbergt die sich langsam teilenden (long-term) HSCs. Diese Zellen gehen eher symmetrische Teilungen ein und dienen damit als eine Art Vorrat für die Hämatopoese (Zhang et al. 2003). Im Gegensatz dazu befinden sich in der vaskulären Nische schnell teilende (short-term) HSCs, deren differenzierte Abkömmlinge durch den Kontakt zum Gefäßendothel leicht ins Blut entlassen werden können (Kopp et al. 2005). Zellen, die mit HSCs in der Nische interagieren werden auch zusammenfassend als Stromazellen bezeichnet.

Studien lassen vermuten, dass in der hämatopoetischen Nische ein hypoxisches Milieu herrscht. Niedrige O_2 -Konzentration und der dadurch aktivierte Hypoxia inducible factor 1-alpha (HIF1- α) sind wesentlich an der Aufrechterhaltung und Funktion von HSCs beteiligt (Cipolleschi et al. 1993, Takubo et al. 2010). Auch im Kontext der AML scheint die Hypoxie eine wichtige Rolle zu spielen. Chen et al. (2012) ge-

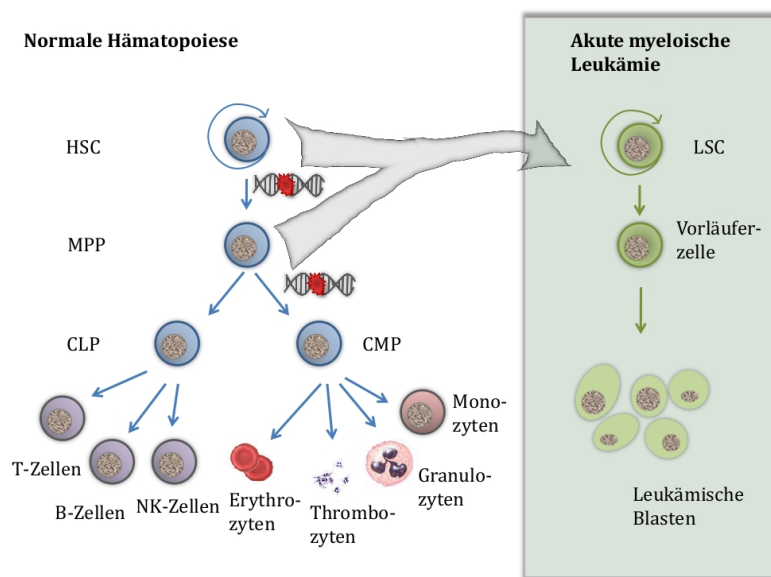


Abbildung 1.1: Hierarchisches Model der normalen Blutbildung und der akuten myeloischen Leukämie. Die hämatopoetische Stammzelle (HSC) verfügt über Selbsterneuerungseigenschaften und besitzt einen pluripotenten Charakter. Aus ihr entstehen multipotente Progenitorzellen (MPP), die wiederum determinierte Vorläuferzellen der myeloischen (common myeloid progenitor, CMP) oder lymphatischen (common lymphoid progenitor, CLP) Reihe bilden. Aus diesen entwickeln sich die differenzierten Zellen des Blutsystems. Entstehen Mutationen in frühen, noch nicht differenzierten Vorläufern, können diese zur Ausbildung einer akuten myeloischen Leukämie führen. Diese wird von einer leukämischen Stammzelle (LSC) gespeist, die ähnliche Eigenschaften besitzt wie die HSC (Bonnet und Dick 1997). Abbildung modifiziert nach Internet: *Stanford School of Medicine, Majeti Lab, Overview (2014)*

nerierten extrameduläres Knochenmark in NOD/SCID/IL-2R γ^{null} (NSG)-Mäusen und zeigten, dass der HIF1- α -Knockdown in diesen Knochenmarkszellen zu einem beeinträchtigten Anwachsen von leukämischen Zellen führte.

Die hämatopoetische Nische versorgt die HSC mit Signalen, die ihr Überleben und ihre Selbsterneuerungseigenschaft stimulieren (Zhang et al. 2003). Außerdem verursacht der Kontakt zu den Zellen der Nische den Eintritt der HSC in das Ruhestadium G₀ des Zellzyklus. Dieser Zustand wird auch als Quieszenz bezeichnet (Arai et al. 2004). Leukämische Zellen interagieren mit Zellen der hämatopoetischen Nische auf ähnliche Weise und vieles deutet daraufhin, dass dies einen wichtigen Beitrag zur Therapieresistenz leistet (Ishikawa et al. 2007). Auch in *in vitro*-Versuchen konnte der schützende Effekt von Stromazellen gegenüber der Therapie nachgewiesen werden. AML-Zellen weisen in Kokultur mit Stroma eine signifikant reduzierte Apoptose auf (Konopleva et al. 2002, Zeng et al. 2009). Im Patienten können LSCs in der protektiven Nische die initiale Therapie überdauern und nach zunächst erfolgreicher Remission ein Rezidiv herbeiführen. Daher versuchen aktuelle Forschungsarbeiten Proteine, die in die Tumor-Stroma-Interaktion involviert sind, therapeutisch

anzugreifen. Ein Beispiel dafür ist das Adhäsionsprotein CD44, das in der hämatopoetischen Nische Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte vermittelt (Avigdor et al. 2004). Jin et al. (2006) verabreichten Mäusen, denen humane AML-Zellen transplantiert worden waren, gegen CD44 gerichtete Antikörper. Dies bewirkte eine erhebliche und selektive Reduktion des Anwachsens leukämischer Zellen im Knochenmark und einen Verlust des Stammzellcharakters innerhalb der AML-Population. Gesunde hämatopoetische Stammzellen blieben von der Therapie verschont. Die Forscher vermuteten, dass eine veränderte Expression von CD44 und die Aktivierung von anderen Signalwegen ein Grund für die hohe und selektive Sensibilität der LSCs gegenüber der anti-CD44-Therapie sein könnte. Ähnlich haben sich auch Very late antigen-4, die Rezeptor-Tyrosinkinase AXL und der Interleukin-3 Rezeptor als vielversprechende Angriffsmöglichkeiten in der Tumor-Stroma-Beziehung herausgestellt (Matsunaga et al. 2003, Jin et al. 2009, Ben-Batalla et al. 2013). Saito et al. (2010) verglichen HSCs und LSCs in Expressionsanalysen und Transplantationsstudien, um weitere spezifische Therapieziele in AML-Zellen zu identifizieren. Sie postulierten, dass Antikörper gegen CD23 und CD25 in der Therapie der AML besonders effektiv sein könnten, da LSCs diese Proteine auf ihrer Oberfläche, unbeeinflusst von der Chemotherapie, stabil exprimieren und die Proteine auch auf quieszenten LSCs innerhalb der Nische zu finden sind. Gesunde HSCs exprimieren weder CD23 noch CD25 und die Fähigkeit zu proliferieren und differenzierte Zellen zu bilden war in Transplantationsversuchen unabhängig von CD23 und CD25.

Im Folgenden soll auf zwei Proteine eingegangen werden, die in dieser Arbeit behandelt wurden und innerhalb der Tumor-Stroma-Interaktion in der AML von wesentlicher Bedeutung sind.

1.2.2 Der Chemokinrezeptor CXCR4 und sein Ligand CXCL12

Vor fast 20 Jahren entdeckten Feng et al. (1996) den CXC-Motiv Chemokinrezeptor Typ 4 (CXCR4, auch CD184) als einen Kofaktor für das Andocken und Eindringen des Human Immunodeficiency (HI)-Virus in die menschlichen T-Zellen. Nur kurze Zeit später stellte sich die Bedeutsamkeit von CXCR4 für die Chemotaxis von hämatopoetischen Zellen heraus (Aiuti et al. 1997).

CXCR4 ist ein Transmembranprotein aus der Familie der G-Protein-gekoppelten Oberflächenrezeptoren. Bisher ist mit Chemokin 12 (CXCL12, auch Stromal-derived factor 1, SDF1) nur ein Ligand bekannt, der CXCR4 bindet und daraufhin die Dissoziation der G-Proteine auslöst (Bleul et al. 1996). Dies resultiert in der cytosolischen Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern und aktiviert verschiedene Signalwege, welche Chemotaxis, Proliferation und Überleben der Zellen beeinflussen können.

Die spezifische und monogame Wechselwirkung zwischen CXCR4 und CXCL12 wird im gleichen Phänotyp von CXCR4- und CXCL12-*Knockout*-Mäusen deutlich. Die Tiere weisen starke Defekte in der Vaskularisierung und der Entwicklung von Organen wie Gehirn und Herz auf. HSCs zeigen eine fehlerhafte Migration in Richtung Knochenmark und Myelo- wie Lymphopoese sind beeinträchtigt. Aufgrund dieser weitreichenden Fehlbildungen sind *Knockout*-Mäuse nicht überlebensfähig und sterben bereits im Embryonalstadium (Ma et al. 1998, Tachibana et al. 1998). Die Tatsache, dass verschiedene Organe von dem *Knockout* von CXCR4- oder CXCL12 während der Embryogenese betroffen sind, unterstreicht die Signifikanz der CXCR4-gesteuerten Signalwege. Neben der Expression in neuronalen Zellen und Endothel (Hesselgesser et al. 1997, Gupta et al. 1998) findet man CXCR4 hauptsächlich auf der Oberfläche von hämatopoetischen Zellen (Lee et al. 1999). Hier wurde der Rezeptor im Zusammenhang mit der transendothelialen Migration in Richtung steigender CXCL12-Konzentration beschrieben (Springer 1994, Campbell et al. 1998), ein Prozess, der als *Homing* bezeichnet wird. Stromazellen des Knochenmarks stellen die größte Quelle der CXCL12-Produktion im Erwachsenen dar und sind für die Retention, das Überleben und die Quieszenz von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen in dieser Nische verantwortlich (Aiuti et al. 1997, Lataillade et al. 2002, Rettig et al. 2011).

Eine hohe Expression von CXCR4 wurde in vielen verschiedenen soliden Tumoren gefunden und ist mit einer ungünstigen Prognose und einem hohen Metastasierungspotential verbunden (Müller et al. 2001, Hartmann et al. 2005, Gao et al. 2014). Auch leukämische Zellen besitzen funktionelle CXCR4-Rezeptoren, deren Überexpression mit einem erhöhten Rückfallrisiko und einem schlechten Gesamtüberleben korreliert (Spoo et al. 2007). Studien konnten zeigen, dass CXCR4-Rezeptoren für das *Homing*, die Retention und das Überleben von AML-Zellen in der Nische des Knochenmarks eine wichtige Rolle spielen. Dies macht das Protein zu einem attraktiven Therapieziel. Jedoch darf der Effekt auf gesunde hämatopoetische Zellen nicht außer Acht gelassen werden, da in diesen Zellen CXCR4 ebenfalls essenzielle Aufgaben besitzt (Aiuti et al. 1997, Lataillade et al. 2002, Rettig et al. 2011). Daher sind Studien bezüglich der Blockierung von CXCR4 in der AML auch darauf bedacht, die Effekte auf die gesunde Hämatopoese zu untersuchen.

Der Einfluss von CXCR4 auf das *Homing* von AML-Zellen wurde in einer Arbeit von Tavor et al. (2004) deutlich. Die Forscher inkubierten AML-Zellen mit einem anti-CXCR4-Antikörper, bevor die Zellen in NSG-Mäuse transplantiert wurden. Die Vorbehandlung mit dem Antikörper verursachte eine nahezu vollständige Hemmung des Anwachsens der Zellen in Knochenmark und Milz. Auch die Injektion des Antikörpers zwei Tage nach der Transplantation führte zu einer signifikant reduzierten Zahl von AML-Zellen in hämatopoetischen Organen. Allerdings reduzierte diese Be-

handlung auch die Zahl von gesunden transplantierten Zellen. Eine spätere Injektion des Antikörpers drei Wochen nach der Transplantation beeinflusste weiterhin das Anwachsen und die Proliferation der leukämischen Zellen. Die normalen hämatopoetischen Zellen waren von der Inhibition jedoch nicht mehr betroffen. Daraus schlossen Tavor et al. (2004), dass maligne Zellen sensitiver auf die CXCR4-Hemmung reagieren. Gesunde hämatopoetische Vorläuferzellen seien vor allem in der anfänglichen Phase des Anwachsens von CXCR4 abhängig, das längerfristige Überleben sei eher weniger von der Blockade betroffen. Zudem wurde von den Forschern beobachtet, dass AML-Zellen nach Behandlung mit anti-CXCR4-Antikörpern oder -Inhibitoren die Expression von Differenzierungsmarkern aufwiesen sowie morphologische Charakteristika differenzierter Zellen zeigten. Die Arbeit von Zeng et al. (2009) machte deutlich, dass CXCR4 wesentlich zu der Retention leukämischer Zellen im Knochenmark beiträgt. In leukämischen Mausmodellen verursachte die Verabreichung eines CXCR4-Inhibitors die Mobilisierung der leukämischen Zellen ins Blut. Bei Transplantation von leukämischen Zellen mit FLT3-ITD führte die zusätzliche Behandlung mit einem gegen FLT3 gerichteten Inhibitor zu einer starken Reduktion zirkulierender leukämischer Zellen und zu einem verlängerten Überleben der Tiere. *In vitro* konnten durch diese Kombinationstherapie Überlebenssignalwege in leukämischen Zellen komplett blockiert werden. Diese Ergebnisse zeigen das Potential aus der Kombination von CXCR4-Blockade und spezifischer, gegen Tumorzellen gerichteter Therapie, maligne Zellen zu mobilisieren und anzugreifen. Eine Zusammenfassung über die durch eine CXCR4-Blockade ausgelösten Reaktionen ist in Abb. 1.2 zu finden.

Die Schlüsselrolle von CXCR4 im Zusammenhang mit der Stroma-induzierten Therapieresistenz in der AML erklärt die Forschung an weiteren gegen CXCR4 gerichteten Wirkstoffen. Resistenzen gegen Inhibitoren sowie gegen Antikörper sind in der Literatur beschrieben (Labrosse et al. 1998, Reslan et al. 2009). Daher ist es nötig, auf eine möglichst breite Auswahl an CXCR4-blockierenden Wirkstoffen zurückgreifen zu können. Der neuartige, humane anti-CXCR4-Antikörper BMS-936564/MDX-1338 wurde in dieser Arbeit hinsichtlich seines Potentials zur Auslösung von Apoptose und Differenzierung in AML-Zellen untersucht.

1.2.3 Der Connective Tissue Growth Factor (CTGF)

1.2.3.1 Die CCN-Proteinfamilie

Die ECM ist eine dynamische Struktur, die einen wichtigen Beitrag zu physiologischen wie pathologischen Prozessen leistet. Sie bietet eine Art Gerüst, um Zellen innerhalb eines Gewebes zu orientieren und zu stabilisieren. Darüber hinaus wirkt die ECM auf zelluläre Prozesse, indem sie die Verfügbarkeit von Faktoren reguliert oder durch direkte Interaktion mit Oberflächenrezeptoren Einfluss auf Proliferation,

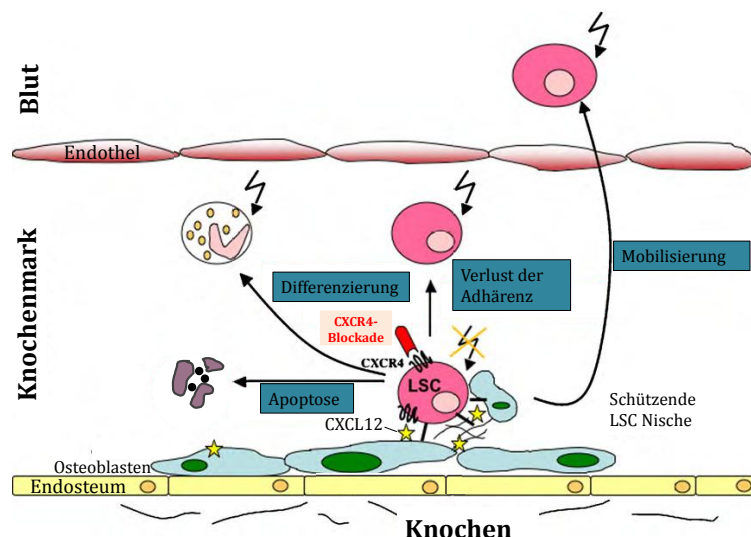


Abbildung 1.2: Sensibilisierung der leukämischen Stammzelle (LSC) durch Blockade von CXCR4. Durch Kontakt mit Zellen der Nische des Knochenmarks erhält die LSC CXCL12-gesteuerte Signale, die zu Therapieresistenz führen können. Die Hemmung von CXCR4 durch Antikörper oder Inhibitoren verursacht die Ablösung der Zellen aus der Nische. Der fehlende Kontakt im Zusammenhang mit der CXCR4-Blockade kann Apoptose und Differenzierung in den leukämischen Zellen auslösen. Die Mobilisierung der Zellen ins Blut steigert außerdem ihre therapeutische Angreifbarkeit (Tavor et al. 2004, Zeng et al. 2009). Abbildung modifiziert nach Tavor und Petit (2010).

Überleben oder Differenzierung der Zellen nimmt (Jun und Lau 2011).

In den 90er Jahren entdeckte man die CCN-Familie, die aus sechs homologen, sezernierten Proteinen besteht (Perbal 2004). Sie stellen wichtige Mediatoren im Zusammenhang mit Adhäsion und Modulation der ECM dar und regulieren ein breites Spektrum an Signalwegen. Das Akronym CCN entstand durch die Zusammenlegung der Namen der drei ersten Mitglieder: Cysteine-rich angiogenic inducer 61 (Cyr61, CCN1), Connective Tissue Growth Factor (CTGF, CCN2) und Nephroblastoma overexpressed (NOV, CCN3). Außerdem zählen zu der CCN-Familie drei Proteine, die durch den Wingless/Int-1 (Wnt)-Signalweg induziert werden (Wnt-inducible signalling pathway protein, WISP 1-3, auch CCN4-6). Die Proteinsequenz der CCN-Mitglieder ist zu 40-60 % identisch (Zuo et al. 2010). Außerdem besitzen bis auf CCN5 alle CCN-Mitglieder die gleiche, baukastenähnliche Struktur (Jun und Lau 2011). Amino-terminal befindet sich ein Signalpeptid, das die Proteine für die Sezernierung markiert. Darauf folgen vier konservierte Domänen, die Homologien zu verschiedenen Faktoren besitzen. Dadurch wird die Interaktion mit einer Vielzahl von Bindungspartnern ermöglicht. Außerdem besitzen die CCN-Proteine eine zentralgelegene Hinge-Region, die die Spaltung der Proteine durch Proteasen und dadurch die posttranslationale Modifikation erlaubt (s. Abb. 1.3). Die CCN-Familienmitglieder



Abbildung 1.3: Die Dömanen der CNN-Proteine. Die Mitglieder der CCN-Familie besitzen bis auf CCN5 alle die gleiche Struktur. Diese besteht aus vier Modulen: Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP), von Willebrand factor C (VWC), Thrombospondin type 1 repeat (TSR) und eine c-terminalen Domäne mit Cystein-Knot-Motiv. Amino-terminal besitzen die Proteine ein sekretorisches Peptid (SP). Mittig zwischen den vier Domönen befindet sich eine Protease-sensitive Hinge-Region, durch die das Protein posttranslational modifiziert werden kann (Jun und Lau 2011).

binden an Proteine der ECM sowie an Wachstumsfaktoren und Zellmembranproteine und nehmen dadurch Einfluss auf eine Vielzahl von zellulären Prozessen wie Adhäsion, Migration, Proliferation, Apoptose und Differenzierung. An vielen pathologischen Situationen wie Fibrose, kardiovaskulären Erkrankungen, und Krebs sind CCN-Proteine beteiligt und dysreguliert. Das Wirkungsspektrum der Mitglieder der CCN-Familie ist zum Teil überlappend. Jedoch besitzen die einzelnen CCN-Proteine je nach zellulärem Kontext sowie möglicherweise aufgrund von Unterschieden in Affinität und Tertiärstruktur sowie posttranskriptionalen und postrationalen Modifikationen auch spezifische Funktionen (Jun und Lau 2011). Im Folgenden sollen CTGF-gesteuerte Signalwege sowie Aufgabe und Regulation des Proteins in physiologischen und karzinogenen Prozessen näher charakterisiert werden.

1.2.3.2 CTGF in physiologischen und nicht-malignen Prozessen

CTGF ist ein 38kD-großes Protein, das in einer Vielzahl von Geweben exprimiert wird. Den höchsten Anteil von CTGF-mRNA im erwachsenen Menschen fand man in Milz, Ovar, Gastrointestinaltrakt, Prostata, Herz und Hoden (Kim et al. 1997). Dabei sind hauptsächlich Endothel-, Muskel- und Knorpelzellen für die CTGF-Produktion verantwortlich (Yang et al. 2005). In der Entwicklung konnte man CTGF vor allem in Chondrozyten und vaskulären Geweben nachweisen. CTGF-*Knockout*-Mäuse zeigen einen post-natal letalen Phänotyp, der vor allem durch eine Deformierung des Skeletts aufgrund defekter Chondrozytenproliferation und -differenzierung sowie einer veränderten Zusammensetzung der ECM charakterisiert ist (Ivkovic et al. 2003).

Die Expression von CTGF kann durch verschiedene Signale ausgelöst werden. So ist bekannt, dass CTGF durch Faktoren wie Transforming Growth Factor β (TGF β) und Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) exprimiert wird (Hishikawa et al. 1999, Suzuma et al. 2000). Außerdem können mechanische Kräfte oder hypoxische Bedingungen die CTGF-Transkription induzieren (Higgins et al. 2004, Chaqour und Goppelt-Strube 2006). Bisher ist kein Rezeptor bekannt, der ähnlich spezifisch wie die CXCR4-CXCL12-Bindung (s.o.) mit CTGF interagiert. Allerdings zeigen einige Arbeiten, dass CTGF verschiedene Zellmembranproteine bindet und dadurch

Signalwege im Zellinneren steuert. Vor allem Integrine scheinen relevante Bindungspartner für CTGF zu sein. Bisher sind fünf Integrine bekannt, mit denen CTGF interagiert, woraufhin in den meisten Fällen Zelladhäsion ausgelöst wird (Chen und Lau 2009). Monozyten des peripheren Bluts haften über Integrine auf ihrer Zelloberfläche im Bereich von arteriosklerotischen Gefäßverletzungen durch die dort herrschende hohe CTGF-Expression (Schober et al. 2002). Weitere Bindungspartner von CTGF sind Low density lipoprotein receptor-related proteins (LRP) und Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG), die jedoch eher als Korezeptoren dienen, um die Signale anderer Rezeptoren zu modifizieren (Jun und Lau 2011). Des Weiteren ist bekannt, dass CTGF mit anderen löslichen Faktoren und deren Rezeptoren interagiert und dadurch deren Wirkung auf beispielsweise Angiogenese, Proliferation oder Differenzierung moduliert (Inoki et al. 2002, Abreu et al. 2002, Maeda et al. 2009). CTGF wechselwirkt zudem mit Proteinen der ECM und vermittelt den Kontakt zwischen Zellen und diesen Proteinen. Der CTGF-*Knockout* in Chondrozyten führte zu einer reduzierten Bindung an das ECM-Molekül Fibronectin. Außerdem war die Produktion von Bestandteilen der ECM in diesen Zellen beeinträchtigt (Nishida et al. 2007). CTGF kann diverse intrazelluläre Signalwege beeinflussen. Der *Knockout* von CTGF in Fibroblasten resultierte ebenfalls in einem verschlechterten Anhaften auf Fibronectin. Außerdem wurde eine verminderte Phosphorylierung von Focale adhesion kinase (FAK) und Extracellular-signal regulated kinase (ERK) beobachtet (Chen et al. 2004). Auch der FAK/Phosphoinositid-3 Kinase (Pi3K)/AKT-Signalweg scheint durch CTGF gesteuert zu werden, denn in CTGF^{-/-}-Fibroblasten war die Aktivierung dieser Signalkaskade durch TGFβ beeinträchtigt (Shi-wen et al. 2006). Eine Übersicht zu den Bindungspartnern von CTGF und den ausgelösten Signalwegen ist in Abb. 1.4 zu finden.

CTGF ist in vielen fibrotischen Erkrankungen überexprimiert (Jun und Lau 2011). Im Mausmodell konnte die synergistische Wirkung von CTGF mit TGFβ, das für seine Schlüsselrolle in der Pathogenese der Fibrose bekannt ist, gezeigt werden (Mori et al. 1999, Leask et al. 2009). Aufgrund der weitreichenden Funktionen von TGFβ, wird vermutet, dass die Behandlung der Fibrose mit einem Antikörper gegen TGFβ zu starken Nebenwirkungen führen kann (Blom et al. 2002). CTGF allerdings ist ein vielversprechendes Zielprotein in der Fibrosetherapie. Der Einsatz des human anti-CTGF Antikörpers FG-3019 (FibroGen, Inc.) war im Tiermodell wirksam und zeigte in Studien bei Patienten mit fibrotischer Nierenerkrankung erste Erfolge (Adler et al. 2010, Lipson et al. 2012).

1.2.3.3 CTGF in der Karzinogenese

Die Rolle von CTGF in der Tumorgenese wird kontrovers diskutiert. Es gibt keine einheitliche Korrelation zwischen CTGF-Expression und Prognose in den verschiedenen Tumorentitäten. Die meisten Studien zeigen jedoch, dass CTGF förderliche

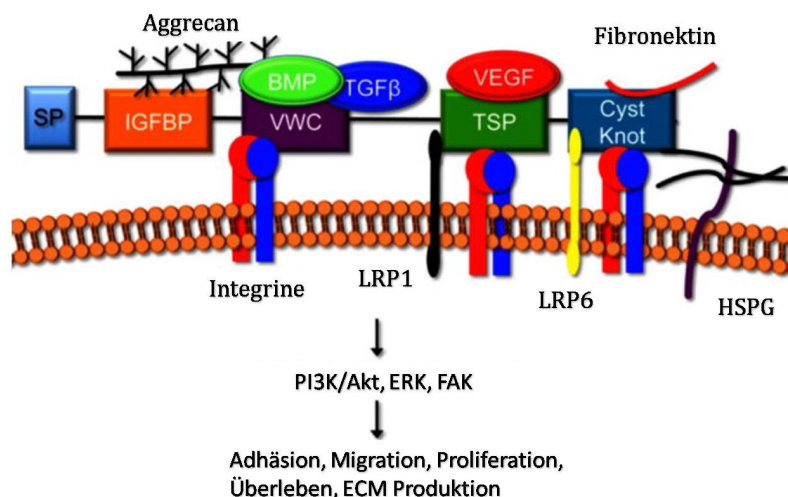


Abbildung 1.4: Interaktionspartner von CTGF und niedergeschaltete Signalwege
 Connective Tissue Growth Factor (CTGF) wechselwirkt über seine vier Domänen (s. Abb. 1.3) mit Proteinen der extrazellulären Matrix (ECM) und löslichen Faktoren wie Transforming Growth Factor β (TGF β), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) oder Bone Morphogenetic Protein (BMP). Außerdem bindet er auf der Zelloberfläche an Integrine, Low density lipoprotein receptor-related proteins (LRP), und Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG). Daraufhin können Signalwege angeschaltet werden, an denen Extracellular-signal regulated kinase (ERK), AKT, Focal adhesion kinase (FAK) und Phosphoinositid-3 Kinase (PI3K) beteiligt sind (Leask und Abraham 2006, Hall-Glenn und Lyons 2011). Abbildung modifiziert nach Hall-Glenn und Lyons (2011)

Auswirkungen auf das Tumorstadium besitzt. So korreliert bei Magenkarzinom und Gliom eine hohe CTGF-Expression mit einer ungünstigen Prognose (Xie et al. 2004, Liu et al. 2008). Bei Brustkrebspatienten detektierten Xie et al. (2001) in 55% der Proben eine Überexpression von CTGF, die mit einem fortgeschrittenen Krankheitsstatus korrelierte. Dies deutet darauf hin, dass CTGF vor allem für späte Ereignisse während der Tumorentstehung, wie die Metastasierung, relevant sein könnte. In Zellkulturexperimenten konnten Wang et al. (2009) und Lai et al. (2011) zeigen, dass die CTGF-Expression in Brustkrebszellen mit Therapieresistenz verbunden ist. Die Hochregulation der anti-apoptischen Proteine B-cell lymphoma-extra large (Bcl-xL) und Cellular inhibitor of apoptosis protein 1 (cIAP1) war an dieser Resistenz maßgeblich beteiligt. Der *Knockdown* dieser Proteine sensibilisierte die Krebszellen gegenüber der Therapie (Wang et al. 2009).

Auch im Melanom korreliert die CTGF-Expression mit Krankheitsstatus und Metastasierungsgrad. Finger et al. (2013) detektierten die höchste CTGF-Expression in Patientenproben mit einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium. In normalem Hautgewebe war CTGF nicht nachweisbar. Die Forscher stellten fest, dass die im Tumorgewebe herrschende Hypoxie wesentlich zu der verstärkten CTGF-Expression beiträgt. Außerdem untersuchten die Forscher die Funktion von CTGF in *Knockdown*-Experimenten. *In vitro* führte der CTGF-*Knockdown* in Melanomzellen zu re-

duzierter Proliferation und Migration. Diese genetisch veränderten Zellen verursachten im Tiermodell eine deutlich geringere Metastasierung im Vergleich zur parentalen Kontrolle. Die Forscher verwendeten außerdem den anti-CTGF-Antikörper FG-3019, um CTGF *in vivo* anzugreifen. Auch dies war mit einer reduzierten Metastasierung der malignen Zellen verbunden.

In Pankreaskarzinomproben konnte im Vergleich mit gesundem Gewebe eine ca. 50-fach erhöhte Expression von CTGF nachgewiesen werden. Diese war sowohl in den malignen Zellen als auch in umgebenden Fibroblasten zu finden (Wenger et al. 1999, Hartel et al. 2004). Dornhöfer et al. (2006) untersuchten die Auswirkung der CTGF-Expression im Pankreaskarzinom *in vitro* und *in vivo*. In dieser Arbeit wurde beobachtet, dass CTGF das kontaktunabhängige Wachstum, ein wichtiges Charakteristikum von Krebszellen, fördert. Die Behandlung mit FG-3019 konnte diesen Effekt unterdrücken. Des Weiteren transplantierten die Forscher Mäusen humane Pankreaskarzinomzellen, die unterschiedliche Mengen an CTGF produzierten. Sie beobachteten, dass eine hohe CTGF-Expression das Tumorwachstum signifikant verstärkte. Untersuchungen der Tumore zeigten, dass CTGF in den Zellen Proliferation auslöste und die Apoptose unterdrückte. Die Verabreichung von FG-3019 führte im Tierversuch zu einem signifikant reduzierten Tumorwachstum. Dies war auf eine erhöhte Apoptose der Tumorzellen zurückzuführen. Außerdem wurde eine eingeschränkte Lymphknotenmetastasierung dokumentiert. Nebenwirkungen der Therapie wurden dabei nicht beobachtet. Da FG-3019 humanes wie murines CTGF bindet, konnten Dornhöfer et al. (2006) nicht eindeutig klären, ob der Effekt von FG-3019 *in vivo* teilweise nicht auch auf die Hemmung des vom Stroma-produzierten CTGF zurückzuführen ist. Eine weitere Studie zeigte, dass FG-3019 die Wirkung des Chemotherapeutikums Gemcitabin verstärken kann und die Kombinationstherapie im Tierversuch zu einem verlängerten Überleben führt (Neesse et al. 2013). Als einen möglichen zugrundeliegenden Mechanismus führten die Forscher die verminderte Expression des X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) Proteins in mit FG-3019-behandelten Tumoren an. Im Vergleich zu den Ergebnissen von Dornhöfer et al. (2006) konnte FG-3019 in dieser Arbeit nur in Kombination mit Gemcitabin Tumorwachstum und Überleben signifikant beeinflussen. Des Weiteren beobachteten Neesse et al. (2013), dass FG-3019 die Stromazellen und die Gefäßstruktur des Tumors nicht beeinflusste und die Apoptose hauptsächlich in den malignen Zellen zu detektieren war. Daraus schlossen die Forscher, dass FG-3019 spezifisch auf die Krebszellen wirkt, ohne das *Micronenvironment* des Tumors anzugreifen.

In peripheren Leukozyten konnte CTGF nicht detektiert werden (Kim et al. 1997). Vorwerk et al. (2000) untersuchten die Expression in Patienten, die an ALL oder chronischer myeloischer Leukämie (CML) erkrankt waren und konnten in 60,7 % bzw. 3,5 % der Proben CTGF nachweisen. Einige Untersuchungen in der ALL geben

bereits wertvolle Hinweise auf die prognostische Funktion von CTGF in der Leukämie. Sala-Torra et al. (2007) analysierten die CTGF-Expression in einer Kohorte von 79 erwachsenen Patienten mit ALL und detektierten eine signifikant erhöhte CTGF-Expression in B-ALL-Patienten verglichen mit gesunden Proben. Man fand heraus, dass eine hohe CTGF-Expression mit einer schlechten Prognose verbunden war. Eine hohe Expression korrelierte mit einer ungünstigen Zytogenetik und dem Vorhandensein von CD34⁺-Blasten. Eine weitere Studie untersuchte in Microarrayanalysen unterschiedlich regulierte Gene in B-ALL-Proben verglichen mit gesunden CD34⁺-Zellen. Die Forscher fanden, dass vor allem Proteine, die in die Tumor-Stroma-Interaktion involviert sind, verändert reguliert wurden. CTGF war in ALL-Zellen ca. 20-fach erhöht und zählte damit zu den am stärksten regulierten Genen (Tsfai et al. 2012). Funktionelle Untersuchungen zu CTGF in der ALL führten Lu et al. (2013) durch. Der CTGF-*Knockdown* sensibilisierte ALL-Zelllinien gegenüber der Chemotherapie *in vitro*. Im Tierversuch resultierte die Blockierung von CTGF durch FG-3019 in Kombination mit Chemotherapie verglichen zu der gemeinsamen Behandlung aus Chemotherapie und Kontroll-Antikörper (AK) zu einem signifikant verlängerten Überleben. Abermals hatte die Monotherapie mit FG-3019 keinen Effekt auf die Tumorprogression (Lu et al. 2013).

Expressionsdaten über CTGF in der AML sind bisher nur in einer Studie veröffentlicht worden. Dort konnte in 26 Patientenproben eine leicht erhöhte Expression von CTGF verglichen mit gesundem Knochenmark dokumentiert werden (Sala-Torra et al. 2007). Der Einfluss von CTGF auf Krankheitsverlauf und Therapieresistenz ist noch nicht untersucht. Eine Studie analysierte die Regulation von CTGF in der Tumorumgebung der ALL und AML (Battula et al. 2013). CTGF ist in mesenchymalen Stromazellen (MSCs) des Knochenmarks stark exprimiert. Der *Knockdown* von CTGF in diesen Zellen führte zu einer verringerten Proliferation und zu einer erhöhten Differenzierungsneigung in Richtung Adipozyten. Die Forscher generierten extramedulläres Knochenmark aus MSCs in NSG-Mäusen und beobachteten ein deutlich verstärktes Anwachsen von transplantierten AML- und ALL-Zellen, wenn die MSCs eine geringere CTGF-Expression aufwiesen. Die Forscher vermuteten, dass die erhöhte Expression der Lockstoffe CXCL12 und Leptin in CTGF-*Knockdown* MSCs für das verstärkte Anwachsen verantwortlich war. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass eine verringerte CTGF-Expression im *Micronevironment* supportiv auf den Tumor wirken kann. Dies sollte bei einer gegen CTGF gerichteten Therapie bedacht werden (Battula et al. 2013).

Konträr zu den oben geschilderten Prognosedaten stehen Befunde, die zeigen, dass in einigen Tumorentitäten eine *niedrige* CTGF-Expression mit einer schlechten Prognose zusammenhängt. Bei Darmkrebspatienten war eine niedrige CTGF-Expression mit einer höheren Rezidivrate verbunden. Hier war die CTGF-Expression vor allem

im tumorumgebenden Epithel zu detektieren. Im Tiermodell wirkte die Verabreichung von rekombinantem CTGF lebensverlängernd (Lin et al. 2011). Außerdem fand man, dass Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom eine niedrigere CTGF-Expression aufwiesen, als gesunde Proben. In Lungenkrebszellen wirkte die Überexpression von CTGF hemmend auf die Zellproliferation. Dies war mit einer Induktion von p53 und einer verminderten Aktivierung von Akt und ERK verbunden (Chien et al. 2006). In Chondrosarkomen ist eine hohe CTGF-Expression mit einem verlängerten Überleben assoziiert (Shakunaga et al. 2000).

CTGF ist in vielen Tumoren überexprimiert und mit einer ungünstigen Prognose verbunden. Der blockierende anti-CTGF-Antikörper FG-3019 zeigt vielversprechende Ergebnisse bei der Behandlung von Pankreaskarzinom, metastasierendem Melanom und ALL. In dieser Arbeit wurde erstmals die Funktion von CTGF in der AML im Zusammenhang mit der Stroma-induzierten Therapieresistenz untersucht. Dafür wurde die Auswirkung einer eingeschränkten CTGF-Wirkung durch shRNA-gesteuerten *Knockdown* in Zellkulturversuchen sowie Verabreichung des blockierenden anti-CTGF Antikörpers FG-3019 im AML-Mausmodell analysiert. Des Weiteren wurde der Einfluss des Hippo-Signalwegs auf die CTGF-Regulation untersucht. Dieser Signalweg soll im Folgenden vorgestellt werden.

1.2.3.4 Der Hippo-Signalweg

Um das Wachstum eines Organs zu regulieren bedarf es einer genauen Kontrolle von Proliferation und Apoptose. Der hochkonservierte Hippo-Signalweg nimmt großen Einfluss auf die Regulation der Organgröße in der Embryogenese wie im Erwachsenenalter und eine Fehlsteuerung ist oftmals mit malignen Prozessen verbunden (Pan 2010). Mitte der 90er Jahre wurde mit der Warts (Wts)-Kinase das erste Mitglied des Signalwegs in *Drosophila* entdeckt. Mutationen in diesem Protein führten zu einem unkontrollierten, tumorähnlichen Gewebewachstum (Justice et al. 1995).

In den letzten Jahren wurden weitere Mitglieder des Hippo-Signalwegs in *Drosophila* identifiziert und Homologe in humanen Geweben gefunden. Den Kofaktoren Yes-associated protein (YAP) und Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif (TAZ, auch bekannt als WW domain-containing transcription regulator protein 1, WWTR1) kommt im Hippo-Signalweg die Schlüsselrolle zu (s. Abb. 1.5). YAP und TAZ interagieren mit Transkriptionsfaktoren, zu denen hauptsächlich Proteine der TEA domain family member (TEAD)-Familie zählen. So steuern sie die Transkription von verschiedenen Genen und fördern Proliferation sowie Organwachstum, aber auch Epithel-mesenchymale Transition und Migration (Zhao et al. 2007, Lei et al. 2008). Zu den Genen, die von YAP und TAZ reguliert werden, zählen auch die CCN-Familienmitglieder CTGF und Cyr61 (Zhao et al. 2008, Zhang et al. 2009, Lai et al. 2011, Zhang et al. 2011).

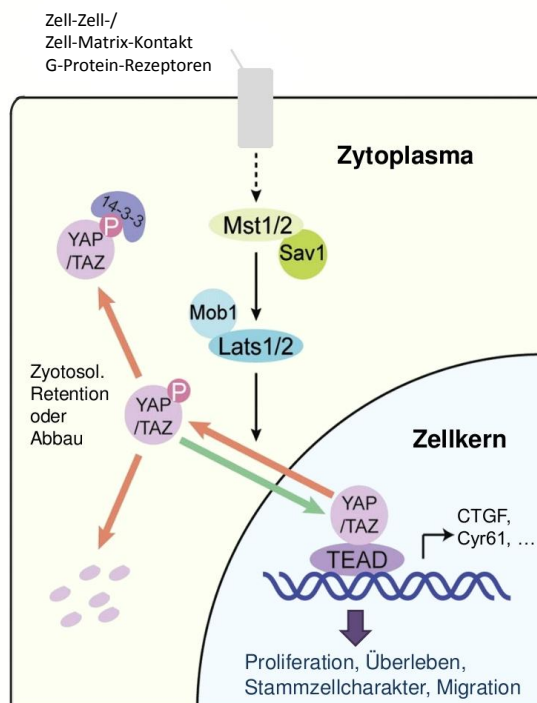


Abbildung 1.5: Der Hippo-Signalweg. Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte sowie G-Protein-Rezeptoren steuern die Aktivität des Hippo-Signalwegs. Yes-associated protein (YAP) und Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif (TAZ) agieren dabei als zentrale Kofaktoren für die von TEA domain family member (TEAD)-Proteinen gesteuerte Transkription. Die Aktivität von YAP und TAZ wird durch die Kinase Large tumor suppressor 1/2 (Lats1/2) und deren Kofaktor Mob kinase activator 1 (Mob1) reguliert, deren Funktion wiederum von der Mammalian STE20-like protein kinase 1/2 (Mst1/2) und deren Kofaktor Salvador homolog 1 (Sav1) abhängt. Die Phosphorylierung von YAP und TAZ führt zu der zytoplasmatischen Retention und kann den Abbau der Proteine induzieren. YAP und TAZ fördern die Transkription verschiedener Gene, zu denen auch Connective Tissue Growth Factor (CTGF) und Cysteine-rich inducer 61 (Cyr61) zählen. Zelluläre Prozesse wie Proliferation und Überleben werden durch den Hippo-Signalweg reguliert. Abbildung modifiziert nach Zhao et al. (2011)

Die Aktivität von YAP/TAZ wird durch die Kinasen Large tumor suppressor 1/2 (Lats1/2) und Mammalian STE20-like protein kinase 1/2 (MST1/2), die die Eigenschaften von Tumorsuppressorgenen besitzen (St et al. 1999, Song et al. 2010), kontrolliert. Die Phosphorylierung von YAP/TAZ durch Lats1/2 sorgt für die Retention der Proteine im Zytoplasma und kann deren Abbau initiieren (Pan 2010). Trotz gemeinsamer Regulation von YAP/TAZ durch den Hippo-Signalweg, unterstützen viele Studien die Annahme, dass die beiden Faktoren unterschiedliche Reaktionen in Zellen auslösen und einander nicht kompensieren können. Zum einen weisen YAP- und TAZ-*Knockout*-Mäuse unterschiedliche Phänotypen auf, zum anderen konnte in mehreren Untersuchungen der *Knockdown* eines der Proteine nicht durch die Funktion des anderen ausgeglichen werden (Zhao et al. 2008). Im Menschen sind neben

den genannten Hauptkomponenten mittlerweile mehr als 35 Proteine bekannt, die in den Hippo-Signalweg eingreifen (Harvey et al. 2013).

Durch Interaktion der Zellen mit der nahen Umgebung kann *in vitro* die Proliferation gestoppt werden, sobald die Zellen ein konfluentes Stadium erreichen (Eagle und Levine 1967). Zu diesem Vorgang, der sich Kontaktinhibition nennt und im Organismus die Organgröße reguliert, trägt der Hippo-Signalweg wesentlich bei (Zhao et al. 2007, Ota und Sasaki 2008). In epithelialen Zellen können Zell-Zell-Kontakte wie *Tight junctions*, *Adherend junctions* oder Cadherine die YAP/TAZ-Aktivität steuern. Außerdem können G-Protein-Rezeptoren den Hippo-Signalweg beeinflussen (Harvey et al. 2013). Die Arbeiten der Gruppe von Stefano Piccolo zeigten eindrucksvoll, dass Zellen YAP/TAZ in Abhängigkeit von mechanischen Stimuli, die durch eine veränderte Beschaffenheit der ECM übermittelt werden, regulieren (Dupont et al. 2011). Ein harter Untergrund sowie genug Platz, um sich auszubreiten, führte in Brustepithelzellen zu der Aktivierung von YAP/TAZ und zur Proliferation der Zellen. Eine weiche ECM, sowie wenig Möglichkeit adhärenzte Kontakte zu bilden, inhibierte dagegen YAP/TAZ und induzierte Apoptose.

Seit einiger Zeit rückt der Hippo-Signalweg mehr und mehr in der Fokus der Krebsforscher. In vielen soliden Tumoren wurde eine Fehlregulation des Hippo-Signalwegs beobachtet und korrelierte oftmals mit einer schlechten Prognose (Zhao et al. 2008). In Zellkulturversuchen konnte eine hohe YAP/TAZ-Expression in Brustkrebszellen einen wesentlichen Beitrag zur Therapierestistenz leisten (Overholtzer et al. 2006, Lai et al. 2011) und in Lungenkrebszellen war eine reduzierte YAP/TAZ-Aktivität *in vivo* mit einer eingeschränkten Metastasierung des Tumors verbunden (Lau et al. 2014). Bisher sind im malignen Gewebe kaum Mutationen bei Mitgliedern des Hippo-Signalwegs identifiziert worden. Stattdessen wurde in Tumoren eine verstärkte nukleäre Lokalisation von YAP/TAZ beobachtet. Statt intrinsischen tumorfördernden Mutationen geht man eher davon aus, dass in malignen Prozessen andere Signalwege die Hippo-Proteine fehlsteuern. Vom Wnt-Signalweg ist bekannt, dass er häufig in Tumoren mutiert ist und neue Studien zeigen, dass YAP/TAZ in den Wnt-Signalweg involviert sind (Azzolin et al. 2012, Rosenbluh et al. 2012). Dies könnte zu Fehlregulationen des Hippo-Signalwegs beitragen. Außerdem gibt es Hinweise, dass die Expression der Hippo-Kinase Lats1/2 durch veränderte epigenetische Prozesse in Tumoren fehlgesteuert sein kann (Takahashi et al. 2005).

YAP/TAZ fördern die Pluripotenz von embryonalen Stammzellen und besitzen eine wichtige Funktion in der Erhaltung der Stammzellen verschiedener Organe im Erwachsenenalter (Ramos und Camargo 2012). Die Entdeckung von Krebsstammzellen in verschiedenen Tumoren (Lapidot et al. 1994, Al-Hajj et al. 2003, Singh et al. 2004) warf die Frage auf, ob auch in malignen Prozessen der Hippo-Signalweg die Stamm-

zelleigenschaft fördert. Auch hier brachte die Gruppe von Stefano Piccolo wichtige neue Erkenntnisse. Die Forscher verglichen Expressionsanalysen von insgesamt 993 Brustkrebsproben verschiedener Stadien und entdeckten, dass eine hohe YAP/TAZ-Aktivität mit einem schlechten Differenzierungsgrad und aggressiven Phänotyp der Tumore korrelierte. Außerdem kontrollierte TAZ in den Brustkrebszellen Stammzelleigenschaften wie die Fähigkeit zur Selbsterneuerung. Der TAZ-*Knockdown* führte in diesen Zellen zu reduzierter Koloniebildung *in vitro*, zu einem schlechten Anwachsen der Zellen im Tierversuch und zu einem Verlust von Stammzellmarkern. Die Überexpression von TAZ dagegen förderte die Selbsterneuerungseigenschaft und die Bildung niedrigdifferenzierter Tumore *in vivo* (Cordenonsi et al. 2011).

Zahlreiche Studien belegen die Relevanz des Hippo-Signalwegs in der Karzinogenese. Die Rolle des Hippo-Signalwegs in der Leukämie ist bisher noch nicht detailliert untersucht. Bekannt ist, dass in Mäusen die Mst1-Defizienz die Wahrscheinlichkeit steigert nach Exposition gegenüber Mutagenen an ALL zu erkranken (O’Neill et al. 2005). Außerdem ist in Patienten mit ALL die Herunterregulation von Lats2 mit einer schlechten Prognose assoziiert (Jimenez-Velasco et al. 2005). Aufgrund der kontaktabhängigen Regulation des Hippo-Signalwegs schien es bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit interessant, die Aktivität von TAZ in AML-Zellen nach Wachstum auf Stroma zu untersuchen und den Einfluss auf CTGF-Expression und Resistenzverhalten zu analysieren.

Der weitere Aufbau ist wie folgt gegliedert: Kapitel 2 beschreibt prägnant die Zielsetzung dieser Arbeit. Nach der Dokumentation der verwendeten Materialien und Methoden in Kapitel 3 werden die Ergebnisse in Kapitel 4 vorgestellt und anschließend in Kapitel 5 diskutiert. Kapitel 6 liefert die Zusammenfassung der Arbeit.

Zielsetzung

Dank intensiver Forschung können Mechanismen, die für Entstehung und Verlauf der AML relevant sind, immer detaillierter nachvollzogen werden. Dieses Wissen trägt dazu bei, neue und optimierte Therapien zu entwickeln, die die Prognose der Patienten in den letzten Jahren deutlich verbessern konnten. Dennoch kommt es nach wie vor bei einem Großteil der Patienten nach zunächst erfolgreicher Behandlung zu einem Rückfall. Neue Forschungsergebnisse lassen vermuten, dass der Tumor von einer LSC gespeist wird, die ähnlich wie die gesunde HSC in der Nische des Knochenmarks mit Stromazellen interagiert (Lapidot et al. 1994, Bonnet und Dick 1997, Hope et al. 2004). Man geht davon aus, dass die LSC durch diesen Kontakt von konventionellen Zytostatika geschützt wird, dadurch die erste Therapie überdauert und zu einem späteren Zeitpunkt zu einem erneuten Ausbruch der Krankheit beiträgt (Ishikawa et al. 2007). Neue Studien befassen sich daher mit einer zielgerichteten Therapie gegen Resistenz-vermittelnde Interaktionspartner zwischen LSC und Stroma.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bedeutung von CXCR4 und CTGF innerhalb der Tumor-Stroma-Interaktion untersucht. Dafür wurde BMS-936564/MDX-1338, ein neuwertiger gegen CXCR4 gerichteter Antikörper hinsichtlich seines Potentials, Apoptose und Differenzierung in AML-Zelllinien und Patientenproben auszulösen, untersucht. Der Fokus lag hierbei auf der Auswirkung der CXCR4-Blockierung auf Stroma-vermittelte Resistenzmechanismen in Kokulturversuchen. Bekannt ist, dass CXCR4 dazu beiträgt, leukämische Zellen in die Nische des Knochenmarks zu leiten und dort zu schützen (Zeng et al. 2009). Die Bedeutung von CTGF in der Pathogenese der AML ist hingegen noch nicht beschrieben. Die Auswertung eines im Vorfeld durchgeführten qPCR Arrays ergab, dass CTGF in AML-Zellen nach Wachstum auf Stroma hochreguliert wird. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher die CTGF-Regulation in AML-Zellen nach Kontakt zu Stromazellen näher untersucht und im Anschluss daran die funktionelle Bedeutung für das Überleben der AML-Zellen analysiert werden. Hierfür sollten shRNA-vermittelte *Knockdown*-Versuche durchgeführt sowie im AML-Mausmodell CTGF mit Hilfe des anti-CTGF Antikörpers FG-3019 angegriffen werden. Da der Hippo-Signalweg einen bekannten *upstream*-Mechanismus von CTGF darstellt, sollte zusätzlich dessen Einfluss auf CTGF-Regulation und Resistenzmechanismen untersucht werden.

Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen AppliChem, BioRad, Invitrogen, Merck, Roth und Sigma bezogen.

3.1.2 Puffer, Lösungen, Gele

Die Puffer wurden, falls nicht anders beschrieben, in A. dest. (B. Braun) angesetzt.

Agarosegel (1 %)	1 g Agarose 100 ml TAE-Puffer 50 µl Ethidiumbromidlösung
Dehybridisierungslösung	62,5 mM Tris-HCl (pH 6,7) 2 % (w/v) SDS 100 mM β-Mercaptoethanol
Erylysepuffer	155 mM NH ₄ Cl 10 mM KHCO ₃ 0,1 mM EDTA
Ethidiumbromidlösung	10 mg/ml Ethidiumbromid
HFS-Puffer	0,07 mM Propidiumiodid 3,88 mM Natriumcitrat 0,1 % (v/v) Triton X-100
NP40-Puffer	50 mM Hepes pH 7.4 250 mM NaCl 5 mM EDTA 0,1 % (v/v) NP40

PBS/Tween	PBS 0,1 % (v/v) Tween-20
Ponceau Rot-Färbelösung	2 % (w/v) Ponceau Rot 3 % (v/v) Trichloressigsäure
Proteaseinhibitor Complete™ (25x)	1 Tablette (Roche) in 2 ml H ₂ O
SDS-PAGE Blockierungslösung	5 % (w/v) Milchpulver in PBS/Tween 2 % (w/v) Milchpulver in PBS/Tween
SDS-PAGE Laufpuffer	25 mM Tris 250 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS
SDS-PAGE Probenpuffer (2x)	125 mM Tris-HCl (pH 6,8) 40 % (v/v) Glycerol 4 % (w/v) SDS 10 % (v/v) β-Mercaptoethanol 0,2 % (w/v) Bromphenolblau
SDS-PAGE Transferpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol 0,1 % (w/v) SDS
Puffer für Sortierung mittels Durchflusszytometrie	PBS 2 mM EDTA 0,5 % (w/v) BSA
TAE-Puffer	50 mM Tris (pH 8,5) 1 mM EDTA 40 mM Acetat
Zelllysispuffer	NP40-Puffer Proteaseinhibitor Complete™ (1x) 250 mM NaF 0,1 mM Okadeinsäure 250 mM Na ₃ VO ₄

SDS-PAGE

	Sammelgel (5 %)	Trenngel (10 %)
Acrylamid/Bis	0,83 ml	3,3 ml
1 M Tris-HCl (pH 6,8)	0,63 ml	-
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	-	2,5 ml
H ₂ O	3,4 ml	4,0 ml
SDS (10 %)	50 µl	100 µl
APS (10 %)	50 µl	100 µl
TEMED	5 µl	4 µl

3.1.3 Enzyme

EcoRV	New England Biolabs
MluI	New England Biolabs
Taq-Polymerase	Qiagen

3.1.4 Zytostatika und blockierende Antikörper

Cytarabin (AraC)	Apotheke	Universitätsklinikum Mainz
------------------	----------	-------------------------------

Name	Zielprotein	Herkunft	Klasse	Firma
BMS-936564/MDX-1338	humanes CXCR4	Maus humanisiert	IgG4	Bristol-Myers Squibb
Kontroll-Antikörper	Diphtheria Toxin	Maus humanisiert	IgG4	Bristol-Myers Squibb
sekundärer Antikörper	humanes IgG, Fc spezifisch	Ziege	-	Jackson
FG-3019	humanes und murines CTGF	Maus	-	Fibrogen, Inc.

3.1.5 Antikörper

Antigen	Herkunftsorganismus	Verdünnung	Bezugsquelle
β -Actin	Maus	1:1000	Sigma-Aldrich
CTGF (L-20)	Ziege	1:100	Santa Cruz
FLT3 (C-20)	Kaninchen	1:500	Santa Cruz
GAPDH	Kaninchen	1:500	Cell Signaling
TAZ (human)	Kaninchen	1:500	Cell Signaling
TAZ (murin+human)	Maus	1:1000	BD

Tabelle 3.1: Charakterisierung der primären Antikörper. Die Antikörper wurden in PBS/Tween mit 5 % BSA (w/v) und 3 mM Natrium-Azid verdünnt.

Antikörper	Konjugat	Herkunftsorganismus	Verdünnung	Bezugsquelle
anti-Maus	Meerrettich-Peroxidase	Ziege	1:2000	Santa Cruz
anti-Ziege	Meerrettich-Peroxidase	Affe	1:2000	Santa Cruz
anti-Kaninchen	Meerrettich-Peroxidase	Ziege	1:10000	KPL

Tabelle 3.2: Charakterisierung der sekundären Antikörper. Die Verdünnung wurde in 2 %-iger Milch angesetzt.

Antikörper	Konjugat	Bezugsquelle
anti-CD45	APC	BD
anti-CD11b	Biotin	eBioscience
anti-CXCR4	PE	eBioscience
Streptavidin	APC-Cy7	Biolegend

Tabelle 3.3: Charakterisierung der für die Durchflusszytometrie benötigten Antikörper.

3.1.6 Größenstandards

Protein-Größenstandard

PageRuler™ Prestained Protein Ladder

Thermo Scientific

DNA-Größenstandard

O'Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus

Thermo Scientific

3.1.7 Bakterien und Vektoren

Bakterien

Subcloning Efficiency™ DH5α™ Invitrogen
Competent Cells

Vektoren

Bezeichnung	Beschreibung	Bezugsquelle/Referenz
psPAX2	Hilfsplasmid für Transfektion kodiert für gag-pol; Ampicilin- Resistenz	Didier Trono (Ecole polytechnique fédérale de Lausanne, Schweiz)
pMD2.G	Hilfsplasmid für Transfektion kodiert für VSV-G; Ampicilin- Resistenz	Didier Trono (Ecole polytechnique fédérale de Lausanne, Schweiz)
pLKO.1-puro	Lentiviraler Expressions- vektor, kodiert für shRNA; Ampicilin- und Puromycin- Resistenz	Sigma Aldrich
3XFlag.pCMV5- TOPO TAZ WT	Expressionsvektor, kodiert für humanes TAZ	Jeff Wrana (Lunenfeld- Tanenbaum Research Institute, USA) bezogen über www.addgene.org
pDONR™ 221	Gateway® Donor Vektor	Invitrogen
pLenti7.3/V5- DEST™	Gateway® Destination Vek- tor, Lentiviraler Expressions- vektor, enthält GFP-Gen	Invitrogen

3.1.8 Fertigsysteme

Annexin V-PE Apoptosis detection Kit I	BD Pharmingen
HiSpeed Plasmid Maxi Kit	Qiagen
High Pure RNA Isolation Kit	Roche
LightCycler [®] 480 SYBR Green I Master	Roche
Plasmid Mini Kit	Qiagen
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Scientific
RNeasy [™] Mini Kit	Qiagen
RT ² First Strand Kit	SABiosciences
RT ² ProfilerRT [™] PCR Array System	SABiosciences
RT ² SYBR [®] Green qPCR Master Mix	SABiosciences

3.1.9 Nährmedium und Agarplatten

LB-Medium	10 g/l Bacterial Peptone 5 g/l Hefe-Extrakt 10 g/l NaCl
LB-Agar	LB-Medium 15 g/l Agar

3.1.10 Zellkulturmaterialien und Zusätze

β-Meracaptoethanol	Sigma Aldrich
Ampicilin	Roth
(Stammlösung 100 mg/ml in H ₂ O)	
DMEM (+4 mM L-Glutamin)	Gibco
DMSO	Sigma-Aldrich
D-PBS	Gibco
Einfriermedium	FCS 10 % (v/v) DMSO
FCS	PAA
Hitzeinaktiviert bei 56° C	
Hepes	Roth
Horse Serum	Gibco
Hydrocortison	Sigma Aldrich
IMDM	Invitrogen
L-Asparagin	Sigma Aldrich
L-Glutamin (200 mM)	Gibco

Natriumpyruvat (100 mM)	Gibco
Non-essential amino acids	Gibco
Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml; 10000 µg/ml)	Gibco
Puromycin (Stammlösung 1 mg/ml in H ₂ O)	Sigma
RPMI 1640 Medium	Gibco
Trypsin/EDTA (0,05 %/0,02 %)	PAA

Additiva

1 % D-PBS
 1 % Natriumpyruvat
 1 % L-Glutamin
 1 % β-Meracptoethanol
 0,6 % Non-essential amino acids
 0,2 % L-Asparagin
 1 % Hepes
 steril filtrieren

3.1.11 Zelllinien und primäres Material

Zelllinie	Ursprung	Organismus	Bemerkungen	Wachstums- medium	Bezugs- quelle
293FT	embryonische Nierenzellen	H. sapiens	Verpackungs- zelllinie, enthält DNA des Adenovirus 5 und des SV40 large t-Antigens	DMEM + 10%FCS + 1% Natriumpyruvat + 1% Penicil- lin/ Streptomy- cin	Invitrogen
----- (Graham et al. 1977, DuBridge et al. 1987)					
AFT024	Stromazellen aus der fetalen Leber	M. musculus	besitzen tem- peratursensi- tive Variante des SV40 large t-Antigens, un- terstützen das Wachstum von hämatopoeti- schen Stamm- zellen	Monokultur: DMEM + 10% FCS + 50 µM β- Meracptoethanol Kokultur: zu- sätzlich + 10% Horse Serum + 0,1 µM Hydrocortison	ATCC

(Moore et al. 1997, Nolta et al. 2002)					
HL-60	Akute promyelozytäre Leukämie	H. sapiens	exprimieren onkogenes Myc, Zellen lassen sich leicht differenzieren	RPMI 1640 + 10%FCS + 1% L-Glutamin + 1% Penicillin/ Streptomycin	ATCC
(Gallagher et al. 1979, Birnie 1988)					
Molm-14	Akute myeloische Leukämie	H. sapiens	FLT3-ITD+, MLL-AF9-Translokation	RPMI 1640 + 10%FCS + 1% L-Glutamin + 1% Penicillin/ Streptomycin	ATCC
(Matsuo et al. 1997, Quentmeier et al. 2003)					
MS5	Stromazellen aus dem Knochenmark	M. musculus	unterstützen das Wachstum von hämatopoetischen Stammzellen	DMEM + 10%FCS + 1% L-Glutamin + 1% Natriumpyruvat + 1% Penicillin/ Streptomycin	DSMZ
(Itoh et al. 1989, Kanai et al. 2000)					
MS5-GFP	exprimieren stabil GFP, hergestellt in der Diplomarbeit der Autorin				
MV4-11	Akute monocytaire Leukämie	H. sapiens	FLT3-ITD+, MLL-AF4-Translokation	RPMI 1640 + 10%FCS + 1% L-Glutamin + 1% Penicillin/ Streptomycin	ATCC
(Quentmeier et al. 2003, Drexler et al. 2003)					
Oci-AML3	Akute myeloische Leukämie	H. sapiens	NPM-Mutation	RPMI 1640 + 10%FCS + 1% L-Glutamin + 1% Penicillin/ Streptomycin	DSMZ

(Quentmeier et al. 2005)					
U937	Diffuses histio- zytäres Lym- phom	H. sapiens	Zellen exprimie- ren monocytäre Oberflächen- marker, besitzen nicht die typi- schen lymphati- schen Marker	RPMI 1640 + 10%FCS + 1% L-Glutamin + 1% Penicil- lin/ Streptomy- cin	ATCC
(Sundström und Nilsson 1976, Moscicki et al. 1983)					

Primäres Material

Monocytäre Zellen aus Knochenmark
oder peripherem Blut von Patiententem mit
AML

Medium

IMDM
+ 20 % FCS
+ 5 % Additiva
+ 1 % Penicillin/ Streptomycin

3.1.12 Plastikware

6 well-Platten	BD
12 well-Platten	Greiner Bio One
12 well Transwell-System	Corning
Porendurchmesser 3 µm und 5 µm	
24 well-Platten	Greiner Bio One
96 well-Platten	Greiner Bio One
FrameStar [®] 96 PCR Plate for LC 480	Gene On
Durchflusszytometrie-Röhrchen 5 ml	BD
EDTA-Röhrchen	Sarstedt
Einfrierröhrchen	Nunc, „Cryo Tube Vials“
Einfrierbehälter	Nalgene [®] , Mr. Frosty [™] Cryo 1° C Freezing Container
Heparinspritzen	B. Braun „Omnican F“
Kulturflaschen	Nunc
Messküvetten	Ratio Lab
Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Greiner Bio One
Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml	Eppendorf

Serologische Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	Greiner Bio One
Sterile Filter 100 µm	Partec, „CellTrics®“
Zentrifugen-Röhrchen 25 ml und 50 ml	Greiner Bio One

3.1.13 Geräte und Zubehör

Autoklav	Systec
Bestrahlungsanlage	Buchler „CDCK 4905“
Brutschrank (eukaryotische Kultur)	Binder „CB150“
Brutschrank (prokaryotische Kultur)	Heraeus „Typ 6200“
Chemilumineszenzimager	Intas
Durchflusszytometer	BD „FACS Canto“
Durchflusszytometer und Zellsortierer	BD „FACS Aria“
Dreidimensionaler Taumelrollmischer	Keison
Elektrophorese-System	Biorad
„Mini-Protean 3“	
Geldokumentationssystem	Vilber Lourmat „Transilluminator IP-CEFO1-SO“
Kamera	Olympus „IXX2-SLP“
Magnetrührer	Heidolph „MR3001“
Membranen	GE Healthcare „Hybond™-ECL Nitrocellulose“
Mikroskop	Olympus „CHT“
Mikrowelle	Sharp
Netzteil	Biorad, „Power Pac 200“
PCR-Gerät	Biorad „iCycler Thermo Cycler“
pH-Meter	Hanna-Instruments „pH211“
Pipetten	Eppendorf, Gilson
Proteintransfersystem	Integra Biosciences „Pipetboy accu“
RT-PCR Cycler	Biorad „Mini Trans-Blot Cell“
Spektrophotometer	Roche „Light Cycler 480“
	GE Healthcare „GeneQuant Pro“
	Thermo Scientific „NanoDrop 1000“
	Thermo Scientific „HeraSafe KS18“
Sterilbank	Air Liquid, „Espace 151 Liquide“
Stickstofftank	Eppendorf „Thermomixer compact“
Thermomixer	Neolab
Vortexer	
Wasserbad	Memmert „WB 14“
Schüttelwasserbad	P-D Industriegesellschaft mbH „Typ WB10“

Waagen	Sarorius U4100, ISO 9001
Neubauerzählkammer	Neolab
Zentrifugen	Heraeus „Multifuge 3s“, „Biofuge Fresco“ Roth, „Micro Centrifuge“

3.1.14 Datenbanken und Software

Datenbanken

Addgene www.addgene.org
Ensemble www.ensemble.org
PubMed www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed

Software

FACS Diva	Becton-Dickinson
FlowJo	Tree Star Inc.
GraphPad Prism	Graphpad Software, Inc.
LightCycler [®] 480 Software	Roche
Microsoft Office	Microsoft
Primer 3 (http://primer3.ut.ee)	Whitehead Institute for Biomedical Research, Massachusetts, USA

3.2 Methoden

Einige Abschnitte des Methodenteils wurden leicht verändert aus der Diplomarbeit der Autorin übernommen (Untersuchung Stroma-induzierter Resistenzmechanismen in der akuten myeloischen Leukämie, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau, September 2010).

3.2.1 Zellbiologische Methoden

3.2.1.1 Kultivierung und Passagieren von Zellen

Die Kultivierung von Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37° C und 5 % CO₂. AFT024-Zellen wurden bei 33° C und 5 % CO₂ kultiviert, da deren Expression einer temperatursensitiven Variante des Simian Vacuolating Virus 40 large tumor (SV40 large t) -Antigens eine Proliferation bei 37° C verhindert (Frederiksen et al.

1988, Moore et al. 1997). Regelmäßig wurden die Zellen auf Wachstum und Aussehen überprüft und mit frischem Kulturmedium versorgt. Leukämiezellen wurden in einer Dichte von ca. $0,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml gehalten und ca. $0,5 \cdot 10^6$ adhärenente Zellen wurden je 10 cm Schale ausgesät. Dreimal pro Woche wurden die Zellen im Verhältnis 1:5-1:10 ausgedünnt, indem bei Suspensionszellen altes Medium abgesaugt und neues hinzugefügt wurde. Adhärenente Zellen wurden mittels Trypsin vom Boden gelöst und ein Teil der Zellen in einer neuen Schale ausgesät. Für die Versuche unter hypoxischen Bedingungen wurden Zellen in einem gesonderten Brutschrank bei 4 % O_2 kultiviert. Für die Arbeit mit leukämischen Blasten von Patienten, die an einer AML erkrankt waren, wurde zunächst eine Einverständniserklärung der Patienten eingeholt. Die Zellen wurden nach dem Auftauen über Nacht in Medium kultiviert und anschließend für Versuche verwendet. Die Arbeit mit Zellen wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

3.2.1.2 Zählen von Zellen

Um die Zellzahl zu ermitteln, wurden Zellen pelletiert und in PBS resuspendiert. Aus dieser Suspension wurden Zellen im Verhältnis 1:2 mit Trypan Blau gefärbt, daraus 20 μ l auf eine Neubauerkammer gegeben und die Zellzahl innerhalb der Quadranten unter dem Mikroskop gezählt. Es wurden immer mindestens 100 Zellen gezählt. Blau gefärbte Zellen wurden nicht mitgezählt, da bei diesen der Farbstoff aufgrund einer defekten Zellmembran ins Zellinnere gelangen konnte und diese Zellen somit nicht mehr als vital gewertet wurden. Unter Einbezug der durchgeführten Verdünnung wurde die Zellzahl in der Suspension innerhalb des Zentrifugationsröhrchens wie folgt ermittelt:

$$\frac{\text{Zellzahl in gezählten Quadranten}}{\text{Zahl der gezählten Quadranten}} \times 2 \text{ (Verdünnungsfaktor)} \times \\ 10000 \text{ (Kammerfaktor)} = \text{Zellzahl/ml in der Suspension}$$

3.2.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Für die langfristige Lagerung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Pelletierte Zellen wurden in Einfriermedium aufgenommen und in Einfrierröhrchen gegeben. Dabei lag die Zellzahl bei $0,5 - 1 \cdot 10^6$ (adhärenente Zellen) bzw. bei $5 - 10 \cdot 10^6$ (Suspensionszellen) je Einfrierröhrchen. Die Einfrierröhrchen wurden in einen vorgekühlten Einfrierbehälter gestellt und bei -80°C einen Tag gelagert, bis sie anschließend in den Stickstofftank überführt wurden. Der Einfrierbehälter enthält Isopropanol, welches das langsame und gleichmäßige Einfrieren der Zellen ermöglicht. Das DMSO im Einfriermedium verhindert die Bildung von Eiskristallen während des Einfriervorgangs.

Das Auftauen der Zellen erfolgte in einem 37° C warmen Wasserbad. Kurz bevor der Auftauvorgang komplett abgeschlossen war, wurden die Zellen in frisches Kulturmedium überführt, bei 1400 rpm für 5 min zentrifugiert und in eine Kulturflasche gegeben. Nach 24 h erfolgte ein Wechsel des Mediums, um verbliebenes DMSO zu entfernen.

3.2.1.4 Aussaat und Trennung der Kokultur

Um die Tumor-Stroma-Interaktion in der Nische des Knochenmarks zu imitieren, wurden AML-Zellen mit Stromazellen in einer Kulturschale gemeinsam kultiviert. Für alle Kokulturen galt, dass die Kokultur im Medium der Stromazellen angesetzt wurde und die Zellen in Monokultur in ihrem jeweiligen Medium kultiviert wurden.

Behandlung mit Chemotherapeutika und Antikörpern

Für die Aussaat der Kokultur wurden zunächst 96 well-Platten über Nacht mit 0,1 %-iger Gelatine (Millipore) beschichtet, um ein ausreichend langes Anhaften der Stromazellen an den Untergrund zu gewährleisten. MS5-GPF-Zellen wurden durch eine Cäsium¹³⁷-Quelle mit 11 Gy bestrahlt, um eine Proliferation dieser Zellen während der Kokultur zu verhindern und in einer Dichte von 18 000 Zellen je well ausgesät. Die AML-Zellen wurden, ca. 4 h nach Aussaat des Stromas hinzugefügt (30 000/well bei AML-Zelllinien, 100 000/well bei primären Blasten). Die Behandlung mit Antikörper/Zytostatika erfolgte je nach Versuch 24 h oder 6 d nach Aussaat der Kokultur. Bei einer Kokulturdauer von 6 d wurde zweimal ein halber Mediumwechsel durchgeführt, bevor die Zellen behandelt wurden. Am Tag der Behandlung wurden AML-Zellen in Monokultur ausgesät und ebenfalls mit Antikörper/Zytostatika inkubiert.

Für die Experimente mit BMS-936564/MDX-1338 wurde 24 h nach Aussaat der Kokultur 60 nM des CXCR4-Antikörpers mit 360 nM des sekundären Antikörpers 50 min bei Raumtemperatur vorinkubiert und dann zu den Zellen gegeben. 3 h später wurden die Zellen mit 2 µM Ara-C behandelt. Nach 24 h wurde die Apoptose gemessen.

Für den Apoptose-Nachweis in Kokulturen mit CTGF- oder TAZ-*Knockdown* wurden MV4-11-Zellen nach 24-stündiger und Molm-14-Zellen nach 6-tägiger Kokulturdauer mit 2 µM Ara-C behandelt. Die Apoptosemessung erfolgte nach 48 h (MV4-11) oder 72 h (Molm-14).

Bei der Ernte der Kokultur für die Apoptosemessung wurde das Medium mit den enthaltenen schwimmenden Zellen zunächst abgenommen und das Stroma mit PBS abgespült. Diese Zellen wurden der Fraktion 'Kokultur Suspension' zugeordnet. Die

auf dem Stroma adhärenen Zellen wurden zusammen mit den MS5-GFP-Zellen trypsiniert und der ‘adhärenen Fraktion’ zugeteilt. So konnte untersucht werden, inwiefern ein starker und direkter Kontakt zum Stroma einen Einfluss auf den Schutz der Leukämiezellen vor Apoptose hat (s. Abb. 3.1). Anschließend wurden die beiden Fraktionen der Kokultur sowie die Monokultur mit CD45-Antikörper ($2 \mu\text{l}/1 \cdot 10^6$ Zellen) gefärbt, der als hämatopoetischer Marker eine Trennung der Stroma- von den Leukämiezellen zuließ.

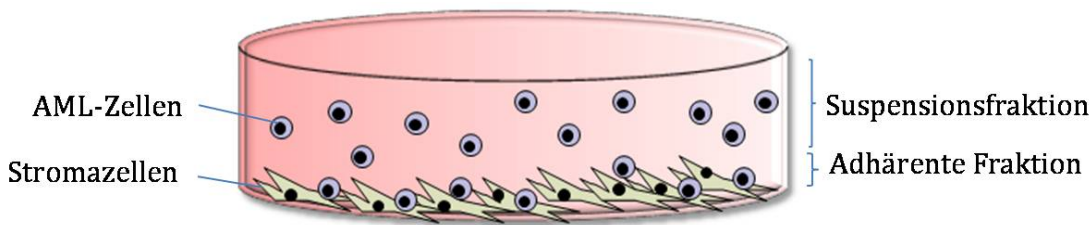


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Kokultur von Stroma- mit Leukämiezellen. Für die Aussaat einer Kokultur wurden zunächst Stromazellen ausplattiert. Nachdem diese adhären geworden waren, wurden die Leukämiezellen hinzugefügt. Die Kokultur wurde 24 h bis 6 d lang erhalten. Untersucht wurde der Einfluss der Kokultur auf Genregulation und Therapieresistenz in den AML-Zellen. Dabei wurden die schwimmenden und locker anhaftenden (Suspensionsfraktion) von den fest an den Stromazellen bindenden AML-Zellen (adhärenente Fraktion) separat untersucht. Die Trennung der Kokultur erfolgte am Durchflusszytometer mittels Oberflächenmarkierung.

Untersuchung der Genexpression

Zum einen wurde die RNA-Expression, zum anderen die Regulation von Proteinen in kokultivierten Zellen analysiert.

Für den Nachweis der RNA-Regulation wurden MS5-Zellen mit einer Dichte von $0,6 \cdot 10^6$ und AFT024-Zellen mit einer Dichte von $0,9 \cdot 10^6$ in 10 cm-Schalen ausgesät. Nach ca. 4 h wurden $2 \cdot 10^6$ Leukämie-Zellen in 10 ml Medium hinzugefügt. Die Zellen wurden 24 h oder 72 h kokultiviert. Anschließend wurden das Medium und die enthaltenen Zellen abgenommen, die MS5-Zellen und locker anhaftende Leukämiezellen mit PBS leicht abgespült. Diese Zellen wurden als Suspensionsfraktion untersucht. Die übrigen adhärenen Zellen wurden trypsiniert, mit CD45-Antikörper ($2 \mu\text{l}/1 \times 10^6$ Zellen) gefärbt und in Sortierungs-Puffer aufgenommen ($1 \text{ ml}/10 \cdot 10^6$ Zellen). Um größere Zellaggregate zu entfernen, wurden die Zellen gefiltert (Porengröße $100 \mu\text{m}$) und anschließend am Durchflusszytometer FACS Aria (BD) nach CD45-positiven und -negativen Zellen sortiert. Die Reinheit lag dabei bei ca. 95 % in beiden Fraktionen (s. Abb. 3.2).

Um eine veränderte Proteinexpression von TAZ in der Kokultur zu untersuchen, wurden MS5-Zellen mit 11 Gy bestrahlt, in einer Dichte von $1 \cdot 10^6$ /je 10 cm-Schale

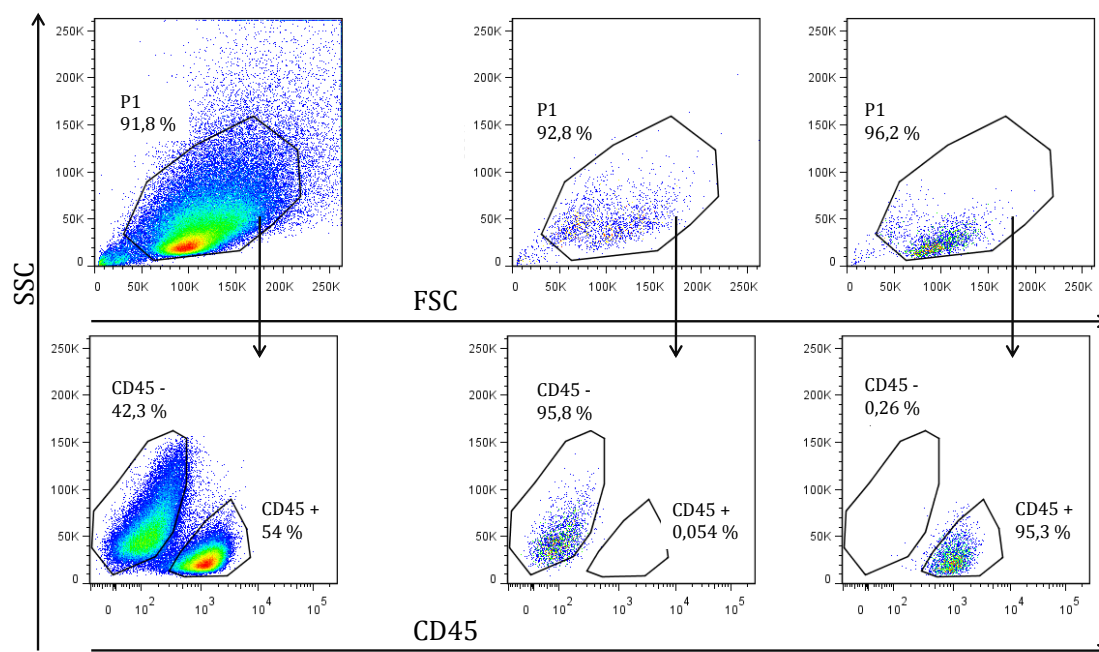


Abbildung 3.2: Trennung der Kokultur mit Hilfe der Durchflusszytometrie Nach Ernte und Färbung der adhärennten Zellen mit CD45 wurden die Zellen am Durchflusszytometer sortiert. Die Abbildung zeigt die Zellen in ihrer Lage im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht (FSC und SSC, oben) sowie die Anteile CD45-positiver und -negativer Zellen (unten). Vor der Sortierung (links) lassen sich die positiven Leukämiezellen von den negativen Stromazellen deutlich unterscheiden. Nach der Sortierung lag die Reinheit in CD45-negativer (mitte) und -positiver (rechts) Fraktion bei jeweils ca. 95%.

ausgesät und für 6 d mit Molm-14-Zellen kokultiviert. In dieser Zeit wurde zweimal das Medium erneuert. Anschließend wurden die Zellen am Durchflusszytometer sortiert. Außerdem wurden Versuche durchgeführt, bei denen die Zellen nur durch Abspülen voneinander getrennt wurden.

Weiterhin wurde die CTGF-Expression im Medium-Überstand analysiert. Hierfür wurden 25 000 MS5-Zellen in 12 well-Schalen ausgesät und mit 100 000 Molm-14 Zellen in 500 µl Medium für 24-72 h kokultiviert. Der Mediumüberstand wurde anschließend bei 1400 rpm für 5 min zentrifugiert, um die Zellen zu entfernen. Der nun entstandene Überstand wurde für die Gelelektrophorese verwendet.

3.2.1.5 Einsatz der Durchflusszytometrie

Nachweis der Expression von Oberflächenmarkern

Für die Überprüfung der CXCR4-Expression in HL-60 und U-937-Zellen sowie primären Blasten von drei verschiedenen Patienten mit AML wurden die Zellen mit einem gegen CXCR4 gerichteten Antikörper (2 $\mu\text{l}/1 \cdot 10^6$ Zellen) für 45 min bei 4° C gefärbt und die Signalintensität mittels Durchflusszytometrie überprüft. Als Vergleich dienten ungefärbte Zellen. Um die spezifische Bindung von BMS-936564/MDX-1338 an CXCR4 zu überprüfen, wurde ein Teil der Zellen zuvor für 4 h mit 50 nM BMS-936564/MDX-1338 inkubiert, wodurch die Bindung des FACS-Antikörpers blockiert werden sollte.

Für den Nachweis der CD11b-Expression in U-937-Zellen nach Behandlung mit BMS-936564/MDX-1338 wurden die Zellen gleichzeitig mit CD11b-Biotin (eBioscience) und Streptavidin-APC-Cy7 (Biolegend) gefärbt (jeweils 2 $\mu\text{l}/1 \cdot 10^6$ Zellen).

Nach jeder Oberflächenfärbung wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend in frischem PBS aufgenommen (200 $\mu\text{l}/1 \cdot 10^5$ Zellen).

Messung des Calcium-Flux

Die Bindung von CXCL12 an CXCR4 erhöht die intrazelluläre Calcium-Konzentration durch Freisetzung von Calcium aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER). Um die Beeinflussung des Calcium-Stroms durch BMS-936564/MDX zu untersuchen wurden HL-60-Zellen für 24 h mit 60 nM des CXCR4-Antikörpers behandelt. Anschließend wurden die Zellen in FACS-Röhrchen überführt und in PBS mit 5 μM eFluor Calcium Sensor Dye eFluor[®] 514 (eBioscience) für 30 min bei 37° C im Dunkeln inkubiert. Der Farbstoff ist Membran-permeabel und fluoresziert verstärkt nach Calcium-Bindung. Nach Inkubation mit dem Calcium-Sensor wurden die Zellen gewaschen und direkt vor der Messung am Durchflusszytometer mit 6,25 nM CXCL12 (Peprotech) stimuliert.

Apoptose- und Zellzyklusmessung mittels HFS-Puffer

Mit Hilfe von HFS-Puffer wurde in U937-Zellen nach Behandlung mit BMS-936564/MDX-1338 die Apoptose gemessen. Dafür wurden die Zellen für 6 d mit 50 nM BMS-936564/MDX-1338 inkubiert. Da auch ein Einfluss auf die Differenzierung untersucht werden sollte, wurden die Zellen außerdem mit 1 μM All-trans Retinolsäure (ATRA) behandelt, das nachgewiesen eine Differenzierung induziert (Koschmieder et al. 2007, Chen et al. 2009). Für die Apoptosemessung wurden 200 000 Zellen in 200 μl HFS-Puffer resuspendiert. Dieser enthält Propidiumiodid (PI) und Triton X-100, das als Detergenz die Membran permeabel macht. Dadurch gelangt PI auch in vitale Zellen und bindet die DNA. Im Durchflusszytometer kann

der DNA-Gehalt der Zellen aufgrund der Stärke der PI-Färbung gemessen werden. Man erhält eine Grafik, die den DNA-Gehalt aller Zellen widerspiegelt. Zellen, die sich im subG1-Stadium befinden, enthalten fragmentierte DNA und werden als apoptotisch betrachtet (s. Abb. 3.3). Parallel zur Apoptosemessung wurden Fotos

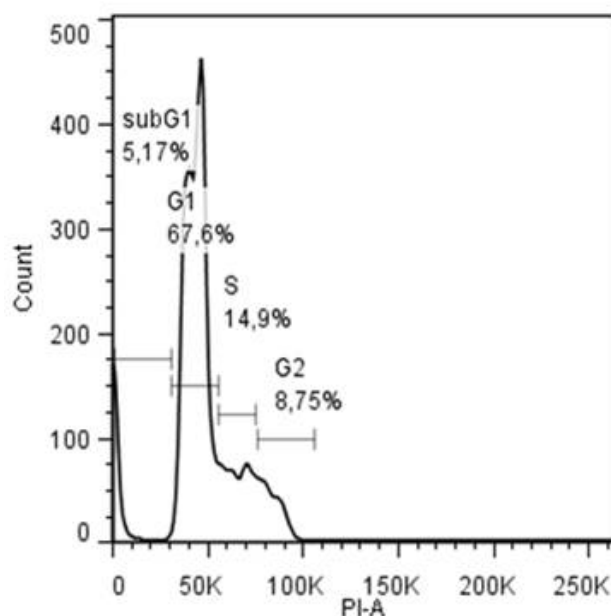


Abbildung 3.3: Messung der Zellzyklusstadien und apoptotischer Zellen anhand Propidiumiodidfärbung. Molm-14-Zellen wurden in HFS-Puffer aufgenommen. Dieser enthält Propidiumiodid, das an freie DNA bindet. Im Durchflusszytometer lassen sich die verschiedenen Zellzyklusstadien anhand des DNA-Gehalts unterscheiden. Im subG1-Stadium befindet sich der Anteil apoptotischer Zellen. Die Höhe der S-Phase spiegelt die mitotische Aktivität der Zellen wieder.

von den behandelten U-937-Zellen gemacht, um die Aggregation der Zellen zu dokumentieren.

Neben der Apoptose können mit HFS-Puffer auch die mitotische Aktivität der Zellen und die Zellzyklusstadien untersucht werden. Dies wurde angewendet, um den Einfluss des CTGF- und des TAZ-*Knockdowns* auf die Proliferation zu untersuchen.

Apoptosemessung mittels Annexin V und 7AAD

Der Nachweis apoptotischer AML-Zellen nach der Kokultur auf Stromazellen verlangt eine Färbung mit dem hämatopoetischen Marker CD45, um die AML-Zellen von den Stromazellen im Durchflusszytometer sauber zu trennen. Da der HFS-Puffer nicht mit einer Antikörper-Färbung kombiniert werden kann, wurde für die Apoptosemessung von kokultivierten AML-Zellen Annexin V und 7AAD (Apop-

tosis Detection Kit, BD) verwendet. Annexin V bindet Phosphatidylserin, das bei früh-apoptotischen Zellen von der Innenseite an die Außenseite der Zellmembran wechselt und somit für Annexin V zugänglich wird (Vermees et al. 1995). 7AAD bindet unspezifisch DNA von Zellen, deren Membran als Folge der Apoptose permeabel geworden ist. Für die Apoptosemessung wurden die Zellen im Anschluss an die CD45-Färbung gleichzeitig mit Annexin V und 7AAD (jeweils $1 \mu\text{l}/1 \cdot 10^5$ Zellen) gefärbt, in Annexin V-Bindungs Puffer resuspendiert ($100 \mu\text{l}/1 \cdot 10^5$ Zellen), 10 min im Dunkeln inkubiert und anschließend gemessen. Im Durchflusszytometer ließen sich die CD45-positiven AML-Zellen von den GFP-positiven Stromazellen deutlich trennen. Annexin V-positive/7AAD-negative sowie Annexin V-positive/7AAD-positive Zellen wurden als apoptotische Zellen gewertet (s. Abb. 3.4).

Für jede Messung am Durchflusszytometer wurden 10 000 Zellen aufgenommen.

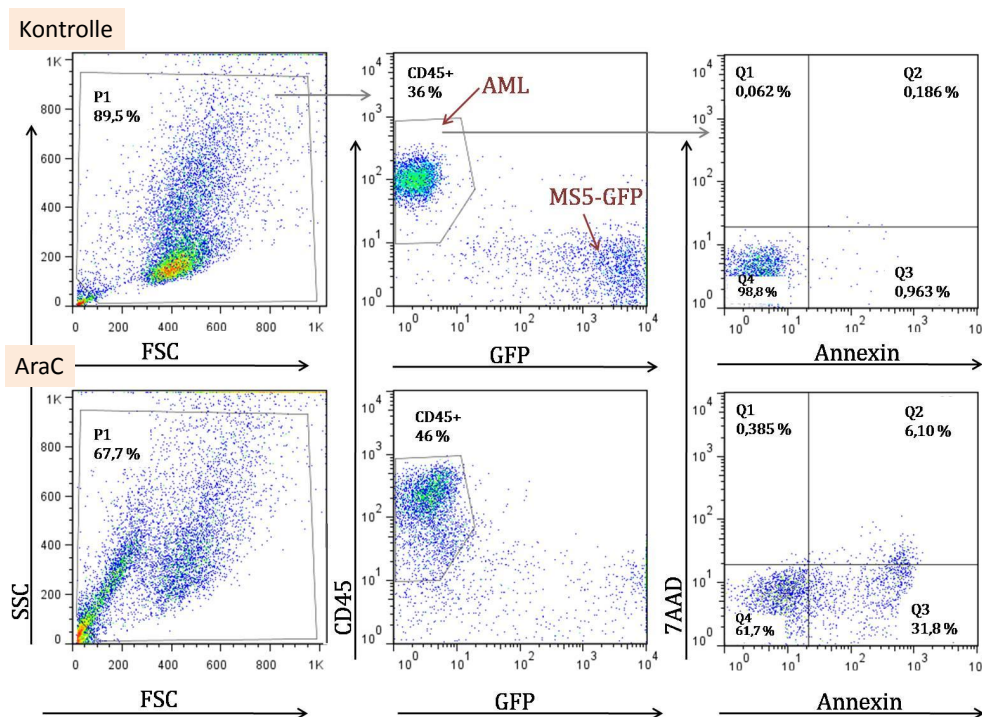


Abbildung 3.4: Messung apoptotischer Zellen in der Kokultur anhand Färbung mit Annexin V und 7AAD Leukämische Zellen wurden mit MS5-GFP-Zellen kokultiviert und nach der Ernte mit CD45, Annexin V und 7AAD gefärbt. Dargestellt ist die Lage der Zellen im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht (FSC, SSC, links). Die Färbung mit CD45 sowie die GFP-Expression der MS5-Zellen ermöglichte eine deutliche Separierung der Leukämiezellen (mitte), deren Apoptose anhand Bindung von Annexin V und 7AAD gemessen wurde (rechts). Für die Auswertung wurden Zellen, die sich in den Quadranten Q2 und Q3 befanden, verwendet. Mit AraC-behandelte Zellen (unten) zeigen im Vergleich zur Kontrolle (oben) ein sichtbar stärkeres Signal in der Annexin V - und 7AAD-Messung.

3.2.1.6 Verwendung des Transwell-Systems

Messung der Zellmigration

Um den Einfluss von BMS-936564/MDX-1338 auf die Migration von HL-60-Zellen zu überprüfen, wurde ein Transwell-System (Corning) mit einem Porendurchmesser von 5 μm verwendet (s. Abb. 3.5 links). 100 000 Zellen wurden zunächst in 200 μl Medium mit 60 nM BMS-936564/MDX-1338 für 3 h inkubiert und anschließend in den oberen Einsatz überführt. Im unteren Bereich befand sich 1 ml Medium, das ausreichte, um einen Kontakt mit dem Einsatz zu gewährleisten. Um die Chemotaxis zu untersuchen, wurde das Medium im unteren Bereich mit 10 nM CXCL12 versetzt. Nach 15 h wurden die Zellen gezählt, die aus dem Einsatz in den unteren Bereich migriert waren.

Unterbindung des direkten Kontakts in der Kokultur

Mit Hilfe des Transwell-Systems wurde außerdem untersucht, ob ein direkter Kontakt zum Stroma unumgänglich für die CTGF-Regulation in Molm-14-Zellen ist (s. Abb. 3.5 rechts). Hierfür wurden, 25 000 MS5-Zellen im unteren well in 1 ml Medium ausgesät und 50 000 AML-Zellen in 200 μl Medium in den oberen Einsatz überführt. Dieser Einsatz hatte einen Porendurchmesser von 3 μm und war somit kaum durchlässig für die Leukämiezellen. Nach 72 h wurden die Molm-14-Zellen aus dem oberen well entnommen und für die RNA-Extraktion verwendet.

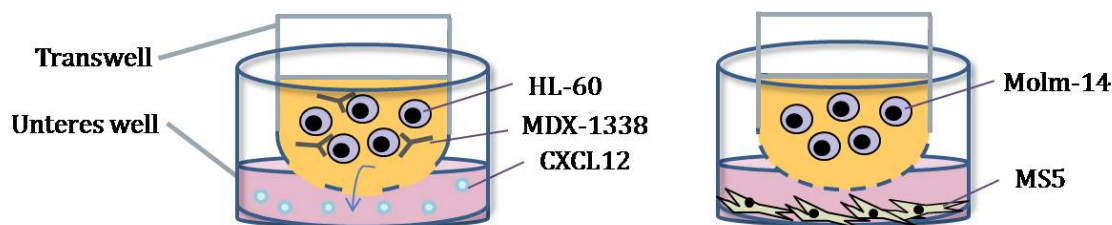


Abbildung 3.5: Einsatz des Transwell-Systems (Corning). Dargestellt ist die Untersuchung der eingeschränkten Zellmigration durch BMS-936564/MDX-1338 (links) und die Unterbindung des direkten Kontakts in der Kokultur (rechts). Unterschiede im Porendurchmesser ermöglichten zum einen eine aktive Migration der Zellen (links) und verhinderten zum anderen den Kontakt der AML-Zellen zum Stroma (rechts).

3.2.1.7 Untersuchung der Proliferationsrate

Um den Einfluss des CTGF- und des TAZ-*Knockdowns* auf die Zellteilung zu ermitteln, wurden Molm-14-, Oci-AML3- und MV4-11-Zellen in 6 well-Platten in einer Konzentration von $0,4 \cdot 10^6$ Zellen/3ml ausgesät. Nach 72 h wurden die Zellen im well gut durchmischt und die Zellzahl bestimmt.

3.2.1.8 Kultivierung von Zellen auf Fibronektin

Neben dem Einfluss von Stromazellen wurde auch die Wirkung von Fibronektin auf die Therapieresistenz von Leukämiezellen untersucht. Hierfür wurden 6 well-Platten für 2 h mit 40 µg/ml Fibronektin (Biochrom) beschichtet. Anschließend wurden $0,9 \cdot 10^6$ Molm-14 Zellen in 4 ml Medium ausgesät. Nach 48 h wurde die Hälfte des Mediums erneuert, wobei das Medium vorsichtig von oben abgenommen wurde. Danach erfolgte die Behandlung der Zellen mit 2 µM AraC. 72 h später wurde das komplette Medium abgenommen und die auf dem Fibronektin adhärenen Zellen mit Trypsin vom Boden gelöst. Diese Zellen wurden im Anschluss für die Apoptosemessung verwendet.

3.2.1.9 Generierung einer stabil genetisch veränderten Zelllinie mit Hilfe lentiviraler Transduktion (Zufferey et al. 1997, 1998)

Um die Auswirkung der reduzierten Transkription eines Gens auf das Resistenzverhalten oder die Proliferation zu untersuchen wurden Leukämiezellen mit small hairpin RNA (shRNA) stabil genetisch verändert. Dieses System nutzt den von Fire et al. (1998) entdeckten, natürlich in Zellen vorkommenden Mechanismus der RNA Interferenz (RNAi). Demnach aktiviert doppelsträngige RNA einen Prozess, der die Translation einer spezifischen messenger RNA (mRNA) verhindert.

Plasmide, die für die shRNA und für virale Proteine kodieren, gelangen über lentivirale Transduktion in die Zellen. Mit Hilfe der viralen Enzyme wird die für die shRNA kodierende Sequenz stabil in das Zellgenom integriert und anschließend transkribiert. Die shRNA enthält zwei zueinander komplementäre Bereiche, die von einer kurzen Sequenz unterbrochen werden. Nach der Transkription binden die komplementären Bereiche einander und der mittlere Bereich formt einen *Loop*, wodurch die *hairpin*-Struktur entsteht. Der zentrale Bestandteil der RNAi ist der RNA-induzierte Silencing-Komplex (RISC). Nachdem die shRNA transkribiert und prozessiert wurde bindet sie diesen Komplex, woraufhin einer der komplementären Stränge abgebaut wird. Der andere Strang hybridisiert mit der komplementären Sequenz der Ziel-mRNA, die daraufhin gespalten oder deren Translation gehemmt wird (Ameres et al. 2007). Auf diese Weise kann die Auswirkung der verminderten Produktion eines bestimmten Proteins untersucht werden (Stewart et al. 2003).

pLKO.1-puro-Vektoren mit shRNA-Sequenzen gerichtet gegen CTGF oder TAZ wurden als Glycerol Stock erworben, der Bakterien mit den entsprechenden Vektoren enthielt (Mission shRNA, Sigma Aldrich). 5 µl des Bakterien Stocks wurden in 1 ml LB Medium 30 min bei 30° C geschüttelt. Anschließend wurden aus dieser Vorkultur 50 µl auf eine Agarplatte ausgestrichen, die 50 µg/ml Ampicillin enthielt, um die das Plasmid enthaltenen Bakterien zu selektionieren. Nach Inkubation

über Nacht bei 30° C, wurden einzelne Klone von der Platte isoliert und in 15 ml LB-Medium überführt. Nach 7 h wurde die Bakterienkultur in 200 ml LB-Medium umgefüllt. Das LB-Medium enthielt ebenfalls Ampicillin. Am nächsten Tag folgte die Isolation der Plasmide laut Protokoll (Plasmid Maxi Kit, Qiagen).

Für die Transduktion der AML-Zellen mit der shRNA wurden zunächst Viren mit Hilfe von 293FT-Zellen produziert. 293FT-Zellen sind Derivate von 293-Zellen (Dunbridge et al. 1987), eine humane embryonische Nieren-Zelllinie, die mit DNA des Adenovirus Typ 5 immortalisiert wurde und eine hohe Transfektionseffizienz besitzt (Graham et al. 1977). 293FT-Zellen besitzen zusätzlich das SV40 large t-Antigen, das die Verwendung von SV40-*Origin of Replication* und somit die episomale Replikation eines Plasmids ermöglicht.

Außerdem werden für die Transduktion die retroviralen Hilfsplasmide psPAX2 und pMD2.G benötigt. Das Verpackungsplasmid psPAX2 besitzt das gag-pol Gen, das für Proteine des Kapsids (gag) und für die viralen Enzyme Protease, Reverse Transkriptase und Integrase (pol) kodiert. Das Hüllplasmid pMD2.G kodiert für das Glykoprotein des Vesicular stomatitis virus (VSV), welches das Andocken des Virus an die Wirtszelle ermöglicht.

Transfektion von 293FT-Zellen

Zunächst wurden $1 \cdot 10^6$ 293FT-Zellen in 10 cm-Schalen ausgesät. Am folgenden Tag wurden pro Ansatz 18 μ l des Transfektionsreagenz TransIT[®] (Mirus) mit 270 μ l Zellkulturmedium in Reaktionsgefäße gegeben, gut durchmischt und für 5 min inkubiert. In dieser Zeit wurden 1,8 μ g psPAX2, 300 ng pMD2.G und 3 μ g Expressionsplasmid mit 20 μ l Medium gemischt und zu dem verdünnten TransIT dazugegeben. Diese Mischung wurde für 25 min inkubiert, anschließend in 6 ml Zellkulturmedium gelöst und zu den 293FT-Zellen gegeben. Ca. 18 h später wurde das Medium der Zellen durch 4 ml neues Medium ersetzt. Am nächsten Morgen folgte die Virusernte, indem das Medium abgenommen, zentrifugiert und der Überstand für die Transduktion verwendet oder bei -80° C eingefroren wurde.

Transduktion von Leukämiezellen

Für die Transduktion wurden $0,5 \cdot 10^6$ AML-Zellen in 0,5 ml Medium in 12 well-Schalen ausgesät und 0,5 ml Virusüberstand hinzugegeben. Außerdem wurde 8 μ g/ml Polybrene hinzugefügt, um die Transduktionseffizienz zu erhöhen. Die Zellen wurden für 1 h bei 1000 rpm zentrifugiert und anschließend in den Brutschrank gestellt. Ca. 8 h später wurde je well 1 ml Medium hinzugegeben. Am folgenden Tag wurden das Medium der Zellen gewechselt und 1,5 μ g/ml Puromycin (Sigma Aldrich) hinzugefügt, das als Selektionsmarker diente. Nachdem die Selektion abgeschlossen war, wurden die Zellen für Versuche verwendet. Dies war bei *Knockdown*

mit shCTGF nach 8-14 Tagen möglich, bei der Verwendung der shRNA gegen TAZ dauerte es 3 Wochen, bis die Zellen für Versuche eingesetzt werden konnten.

Auf gleiche Weise wurden Molm-14-Zellen mit pLenti7.3/V5-DEST transduziert (s. Kapitel 3.2.3.1 Klonierung des TAZ-Gens in den pLenti7.3/V5-DEST™ Gateway®-Vektor). Hier erfolgte die Selektion positiver Zellen anhand der Sortierung nach GFP.

3.2.1.10 Isolation von RNA aus eukaryotischen Zellen

Die Gewinnung von RNA aus Zelllinien erfolgte nach Protokoll (High Pure RNA Isolation Kit, Roche und RNeasy™ Mini Kit, Qiagen). Nach der Isolation wurde die Konzentration der RNA mit einem Spektrophotometer (NanoDrop 1000, Thermo Scientific) bestimmt. Die RNA wurde bei -80° C gelagert.

3.2.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.2.1 Isolation von Proteinen aus Zelllysaten und Mediumüberständen

Für die Isolation von intrazellulären oder membranständigen Proteinen wurden die Zellen geerntet und je nach Versuch am Durchflusszytometer sortiert. Anschließend wurde das Zellpellet in NP40-Lysepuffer resuspendiert und auf Eis für 30 min inkubiert, wobei die Zellen alle 5 min gevortext wurden. Es galt, dass $20 \cdot 10^6$ Zellen mit 70 µl Lysepuffer versetzt wurden. Anschließend wurden die Zellen für 30 min bei 13 000 rpm und 4° C zentrifugiert und der Überstand, der die Proteine enthielt, in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Um sezernierte Proteine zu untersuchen, wurde kein Lysepuffer verwendet, sondern direkt die Proteinkonzentration im Mediumüberstand bestimmt (s. Kapitel 3.2.1.4 Untersuchung der Genexpression).

3.2.2.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Um von verschiedenen Proben gleiche Proteinmengen auf ein SDS-Gel auftragen zu können, wurde die Proteinkonzentration nach Bradford (1976) ermittelt. Zuvor wurde eine Eichkurve durch Absorptionsmessungen von bovinem Serumalbumin (BSA) erstellt. Anhand unterschiedlicher, bekannter BSA-Konzentrationen konnten Referenzwerte ermittelt werden. Anschließend ließ sich die Proteinkonzentration in den Proben, basierend auf dieser Eichkurve, berechnen. Dafür wurden je Probe 800µl A.dest., 200 µl Bradford-Konzentrat (Bio-Rad Protein Assay, BioRad) und 2 µl Proteingemisch in eine Messküvette gegeben. Nach 10-minütiger Inkubation erfolgte die Absorptionsmessung der Proben bei 595 nm mit Hilfe eines Spektrophotometers. Der im Bradford-Konzentrat enthaltene Farbstoff Coomassie-Brilliantblau G250 bindet

unspezifisch an Proteine, wodurch eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm zu 595 nm stattfindet. Dadurch lässt sich die Proteinkonzentration in den Proben ermitteln.

3.2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der Natrium Dodecyl Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli et al. (1970) werden Proteine auf ein Gel aufgetragen und innerhalb eines elektrischen Feldes entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt. Für die Elektrophorese wurde ein 10 %-iges SDS-Gel gegossen, das von einem 4 %-igen Sammelgel überschichtet wurde. Das Sammelgel hat die Aufgabe, die Proteine der verschiedenen Proben auf einer gemeinsamen Höhe zu sammeln, bevor sie sich im Trenngel separieren. Durch den Prozentgehalt des Trenngels lässt sich der Vernetzungsgrad variieren. Das ermöglicht je nach Größe der zu detektierenden Proteine einen unterschiedlichen Auftrennungsbereich.

Nach der Polymerisation des Gels wurde es in ein Proteintransfersystem eingespannt, das mit SDS-Laufpuffer befüllt wurde. Je Probe wurden 90 µg Protein (150 µg bei Mediumüberständen) mit 15 µl Ladepuffer versetzt. Die Proben wurden anschließend 5 min bei 97° C auf dem Heizblock erhitzt und zusammen mit 10 µl Marker, der als Referenz für das Molekulargewicht dient, auf das Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Das anionische Detergenz SDS führt zusammen mit der Erhitzung und dem im Ladepuffer enthaltenden β -Mercaptoethanol zur Denaturierung der Proteine. Außerdem bindet das SDS die Proteine und erzielt eine negative Nettoladung, wodurch die Proteine zur positiven Anode wandern. Die Elektrophorese wurde bei 120 V durchgeführt, bis die gewünschte Auftrennung der Proteine erreicht war.

3.2.2.4 Proteintransfer auf Nitrocellulosemembran und Detektion von Proteinen (Western Blot)

Nach der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese lassen sich die Proteine, wie von Towbin et al. (1979) beschrieben, auf eine Nitrocellulosemembran transferieren, auf der spezifische Proteine mit entsprechenden Antikörpern sichtbar gemacht werden können. Dafür wurde das Gel nach Beendigung des Auftrennungsvorgangs aus der Trennungsvorrichtung entnommen und das Sammelgel abgetrennt. Das Trenngel wurde innerhalb einer Gitterkassette auf eine Nitrocellulosemembran gelegt, die auf beiden Seiten luftblasenfrei von je zwei Whatman Filterpapieren und einem Schwamm umgeben war. Die Filterpapiere wurden ebenso wie die Nitrocellulosemembran vor dem Transfer für 5 min in Transferpuffer äquilibriert. Die Gitterkassette wurde in ein Transfermodul gesetzt, das mit Transferpuffer befüllt wurde. Der Transfer erfolgte in vertikaler Richtung bei 20 V und 4° C über Nacht. Anschließend

wurde die Membran aus der Transferapparatur entnommen und konnte zur Immundetektion verwendet werden.

Vor der Immundetektion wurde zunächst der Proteintransfer auf die Membran mittels Ponceau Rot-Färbung kontrolliert. Diese diente bei den Mediumüberstandproben auch als Beladungskontrolle. Anschließend wurde die Membran für mindestens 2 h mit 5 %-iger Milchlösung behandelt, um unspezifische Bindungen von Antikörpern an die Membran zu verhindern, und über Nacht bei 4° C mit dem Primärantikörper inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für je 10 min in 2 %-iger Milch gewaschen. Alle Wasch- und Inkubationsschritte erfolgten unter ständiger Bewegung auf einem Schüttler. Je nach Herkunft des Primärantikörpers wurde die Membran anschließend mit dem entsprechenden mit Meerrettich-Peroxidase konjugierten Sekundärantikörper für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Meerrettich-Peroxidase katalysiert in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid die Oxidation des Substrates Luminol zu einem aktivierten Zwischenprodukt, das bei Rückkehr in seinen Ausgangszustand Licht emittiert. Diese Lichtemission kann von einem Chemilumineszenzimager (Intas) dargestellt werden. In dieser Arbeit wurde das ECL-System (GE Healthcare) als Chemilumineszenz-Substratlösung eingesetzt. Nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgten drei Waschschrte mit PBS-T und anschließend die Detektion des Proteins mittels ECL. Die Membran wurde mit den Reagenzien 1:1 benetzt und nach kurzer Inkubation die Chemilumineszenz detektiert. Die richtige Bande wurde durch Bezug auf den Marker und die bekannte Größe des Proteins ermittelt. Falls kein weiterer Nachweis von Proteinen folgte, wurde die Membran in Folie luftdicht verpackt und bei 4° C gelagert. Alle Western Blot-Versuche wurden mindestens zweimal durchgeführt.

3.2.2.5 Entfernen von Antikörperkomplexen von der Membran

Für das Ablösen der gebundenen Antikörperkomplexe wurde die Membran für 30 min bei 50° C im Schüttelwasserbad in Dehybridisierungslösung inkubiert. Es folgten drei Waschschrte von je 10 min in PBS-T. Anschließend konnte die Membran erneut wie oben beschrieben einer Immundetektion unterzogen werden.

3.2.3 Molekularbiologische Methoden

3.2.3.1 Klonierung des TAZ-Gens in den pLenti7.3/V5-DEST™ Gateway®-Vektor

Das Gateway®-System basiert auf dem lytischen und lysogenen Lebenszyklus der Bakteriophage Lamda. Diese nutzt einen Rekombinationsmechanismus, um einerseits ihr Genom in das der infizierten Zellen zu integrieren (lysogener Zyklus) oder andererseits daraus auszuschneiden, was mit einer Bildung und Freisetzung neuer

Bakteriophagen verbunden ist (lytischer Zyklus). Diese Rekombinationselemente besitzen auch die Vektoren des Gateway[®]-Systems. Dies ermöglicht die einfache und spezifische Klonierung eines Gens aus einem Donorvektor in verschiedene Zielvektoren (Hartley et al. 2000). Die Klonierungsschritte sind in Abb. 3.6 zusammengefasst.

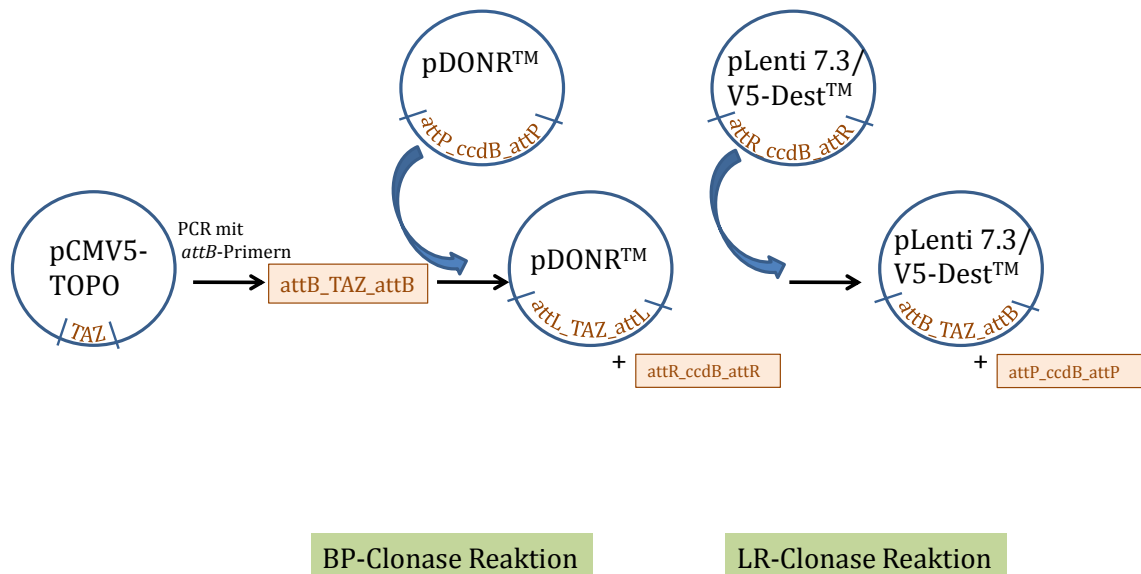


Abbildung 3.6: Klonierung des TAZ-Gens in pLenti7.3/V5-DEST[™] mit Hilfe des Gateway[®]-Systems. Das TAZ-Gen wird durch attB-Sequenzen enthaltene Primer amplifiziert. Anschließend lässt sich das Gen durch Rekombinationsreaktionen zwischen spezifischen att-Sequenzen in einen Donor-Vektor und von dort in einen Zielvektor umklonieren.

Für die Klonierung des DNA-Segments in den pDONR[™] 221 Vektor wurden Primer erstellt, die das Zielgen im Plasmid 3XFlag.pCMV5-TOPO TAZ WT flankieren und zusätzlich die für die Rekombination nötigen attB-Sequenzen beinhalten. Anschließend wurde das Gen per PCR vervielfältigt (s. Tab. 3.9). Die Reaktion wurde auf ein Agarose-Gel aufgetragen und das attB-PCR Produkt mittels des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) aus dem Gel eluiert. Die Rekombination des Produkts mit pDONR[™] 221 wurde mit Hilfe des BP-Clonase[®] Enzym Mixes (Invitrogen) laut Protokoll durchgeführt. Für die Transformation in DH5 α (Invitrogen) wurden 50 μ l Bakterien zu 2 μ l Clonase-Reaktion gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend folgte die Aufnahme der DNA mittels Hitzeschock durch eine Inkubation für 20 s bei 42° C gefolgt von einer erneuten Inkubation auf Eis für 2 min. Dann wurden 950 μ l vorgewärmtes SOC-Medium hinzugegeben und die Bakterien bei 30° C und 225 rpm für 1 h inkubiert. Die transformierten Bakterien wurden auf eine Agarplatte ausgestrichen und bei 30° C über Nacht wachsen lassen. Aus isolierten Klonen wurde die Plasmid-DNA nach Qiagen (Plasmid Mini Kit) gewonnen. Nach Überprüfung der erfolgreichen Klonierung mittels Verdau des Vektors mit MluI

5 μ l	PCR-Puffer			
10 μ l	Q-Solution			
1 μ l	dNTPs (10mM)	Zyklen	Dauer	Temperatur
1 μ l	Primer forward (10pmol/ μ l)	1	5 min	94° C
1 μ l	Primer reverse (10pmol/ μ l)	35	30 s	94° C
			30 s	60° C
			5 min	72° C
0,25 μ l	Taq Polymerase	1	5 min	72° C
2 μ l (\approx 132 ng)	pCMV-TOPO TAZ WT	∞	4° C	
A.dest. ad 48 μ l				

Tabelle 3.9: Ansatz und Programm für die PCR zur Amplifikation des TAZ-attB-Produkts aus pCMV-TOPO TAZ WT

(s. Tab. 3.10) und anschließender Sequenzierung (Starseq, Mainz) wurde das Zielgen aus dem pDONRTM 221 unter Verwendung des Gateway[®] LR Clonase[®] Enzyme Mixes (Invitrogen) in den pLenti7.3/V5-DESTTM Vektor kloniert. Nach erfolgreicher Transformation, Isolation, Testverdau mit EcoRV und Sequenzierung konnte dieser Vektor (pLenti7.3 TAZ) für die lentivirale Transduktion eingesetzt werden.

5 μ l	DNA
2 μ l	Puffer
2 μ l	BSA (1mg/ml)
1 μ l	Enzym
A.dest. ad 20 μ l	
Verdau für 2 h bei 37° C	

Tabelle 3.10: Ansatz für den Plasmid-Verdau

3.2.3.2 Quantitative Real-time PCR (qPCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl.: PCR) wurde zuerst von Mullis et al. (1986) beschrieben und ermöglicht die schnelle und sensitive Amplifizierung von DNA-Abschnitten. Um eventuelle Unterschiede im Transkriptionsprofil der Zellen in der Kokultur verglichen zur Monokultur zu untersuchen, wurde die RNA-Expression mit Hilfe der quantitativen Real-time PCR (qPCR) analysiert (Heid et al. 1996). Die qPCR ermöglicht eine Quantifizierung der in den Proben enthaltenen RNA. Die RNA wird zunächst durch die Reverse Transkriptase (RT) in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Anschließend erfolgt die Amplifizierung der cDNA analog zur PCR, wobei sich mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes, welcher mit je-

dem neuen Zyklus in die amplifizierte DNA integriert wird, Rückschlüsse auf die anfängliche Menge an RNA in der Probe ziehen lassen. In der vorliegenden Arbeit wurde SYBR Green als Farbstoff verwendet. Dieses Reagenz bindet doppelsträngige DNA und fluoresziert im Anschluss daran (s. Abb. 3.7). Der Anstieg der Fluoreszenz verläuft zunächst linear. Es folgt eine exponentielle Phase, die zum Ende in eine Plateau-Phase übergeht (Wong und Medrano 2005). In der frühen exponentiellen Phase übersteigt die Fluoreszenz erstmals signifikant die Hintergrundfluoreszenz. Den Zyklus, bei dem dies geschieht, bezeichnet man als *cycle threshold* (C_t)-Wert oder als *crossing point* (CP) (s. Abb. 3.8). Der C_t -oder CP-Wert ist von wesentlicher Bedeutung für die Auswertung der PCR (s.u.).

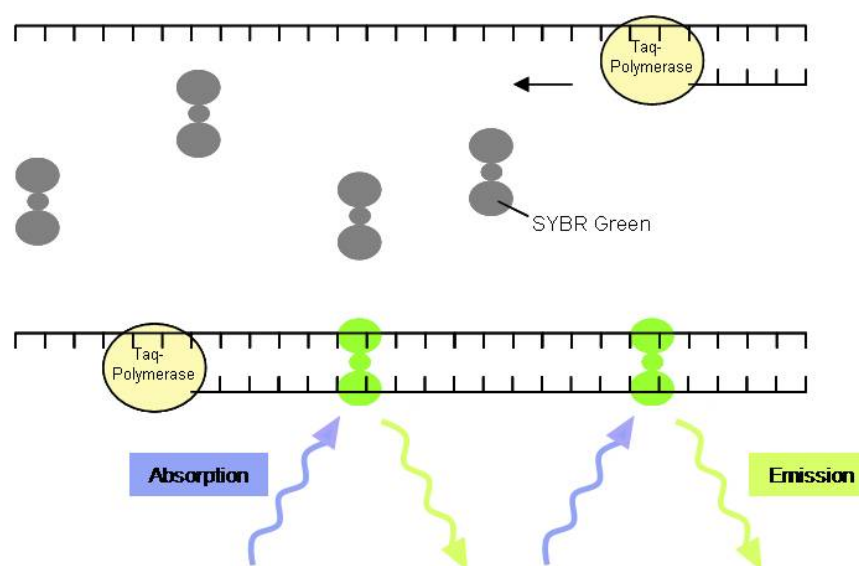


Abbildung 3.7: Detektion von doppelsträngiger DNA mittels SYBR Green. Die Taq-Polymerase synthetisiert während der Polymerase-Ketten-Reaktion einen zur Matrize komplementären Strang. An diese doppelsträngige DNA bindet der Farbstoff SYBR Green. Als Folge absorbiert der Fluoreszenzfarbstoff blaues und emittiert grünes Licht.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst ein qPCR-Array (RT²ProfilerRT™ PCR Array System, SABiosciences) verwendet, mit dem bereits in der Diplomarbeit der Autorin Triplikate angefertigt wurden. Diese wurden nun auf 5-fach Werte ausgeweitet. Der Array untersucht die Expression von Adhäsions-Molekülen und Proteinen der ECM. Für die Transkriptionsanalysen wurden die Kokulturen mit Hilfe der Zellsortierung getrennt und die RNA extrahiert. Für den Array wurde je Platte insgesamt 500 ng RNA eingesetzt. Diese wurde zunächst nach Protokoll durch die RT in cDNA umgeschrieben (RT² First Strand Kit, SABiosciences). Anschließend wurde die qPCR vorbereitet, indem die cDNA zusammen mit einem PCR Master Mix (RT² SYBR® Green qPCR Master Mix, SABiosciences) laut Hersteller gemischt und auf

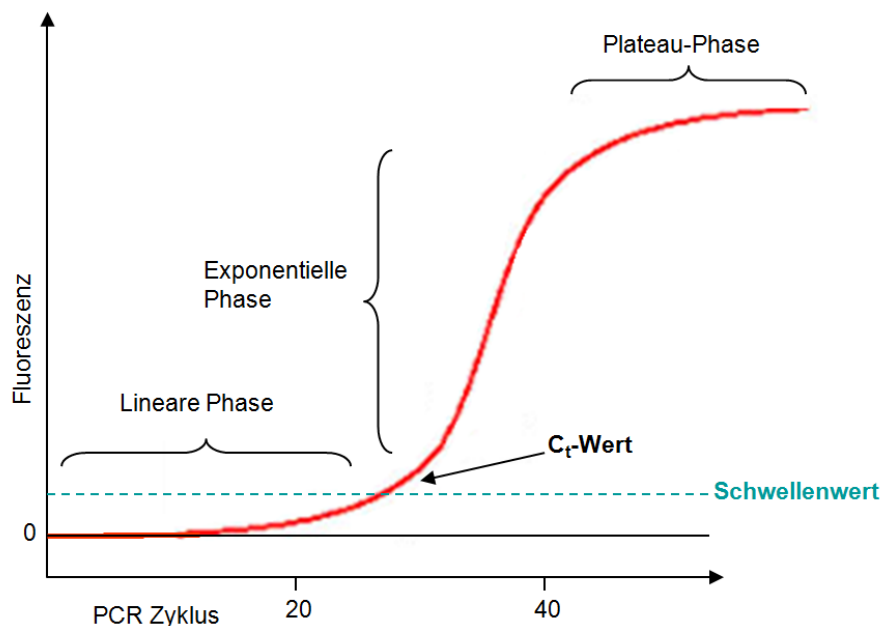


Abbildung 3.8: Ermittlung des C_t -Werts bei der qPCR. Die von dem Farbstoff SYBR Green ausgehende Fluoreszenz steigt anfänglich linear und geht anschließend in eine exponentielle Phase über, bevor sie in einer Plateau-Phase endet. Den Zyklus, bei dem die Hintergrundfluoreszenz erstmalig überschritten wird, bezeichnet man als *cycle threshold* (C_t)-Wert oder als *crossing point* (CP) (Wong und Medrano 2005).

die Platte pipettiert wurde. Der PCR Master Mix enthält die Taq Polymerase und den Farbstoff SYBR Green.

Im Anschluss an den qPCR-Array wurde die Regulation von bestimmten Genen innerhalb einzelner qPCR Reaktionen analysiert. Für diese einzelnen qPCR-Reaktionen wurde die RNA mit dem RevertAid cDNA Kit (Thermo Scientific) umgeschrieben und die Ansätze laut Tabelle 3.11 zusammenpipettiert. Hierfür wurde das LightCycler[®] 480 SYBR Green I Master (Roche) verwendet.

1µl	Primer forward (10pmol/µl)
1µl	Primer reverse (10pmol/µl)
10 µl	SYBR Green
A. dest. ad 15 µl	

Tabelle 3.11: Ansatz einzelner qPCR-Reaktionen

Es wurden jeweils 15 μ l Mastermix in ein well gegeben und 5 μ l cDNA hinzugefügt. Vor der Messung wurden die Platten bei 1000 rpm für 1 min zentrifugiert. Die qPCR wurde mit einem Light Cycler 480 der Firma Roche durchgeführt und ausgewertet. Das jeweilige Programm ist der Tabelle 3.12 zu entnehmen.

Zyklen	Dauer	Temperatur	Zyklen	Dauer	Temperatur
1	10 min	95° C	1	5 min	95° C
45	15 s	95° C	45	10 s	95° C
	1 min	60° C		10 s	60° C
Schmelzkurve	95° C			10 s	72° C
			Schmelzkurve	97° C	

Tabelle 3.12: Programm für die qPCR des Arrays (links) und für einzelne qPCR-Reaktionen (rechts). Die qPCR startete mit einer Aktivierung der Taq-Polymerase bei 95° C. Anschließend folgten 45 Zyklen, bei denen die DNA amplifiziert und nach jedem Zyklus die Fluoreszenz gemessen wurde. Am Ende wurde eine Schmelzkurve durchgeführt, bei der die Temperatur langsam auf 95° C oder 97° C anstieg. Mit Hilfe der Schmelzkurve ließ sich später die Spezifität der Produkte überprüfen.

Die Berechnung der C_t -Werte wurde mit Hilfe der Software des Light Cyclers (2nd Derivative Maximum-Methode) durchgeführt. Bei Werten, die keinen eindeutigen Peak in der Schmelzkurvenanalyse aufwiesen, wurde das Gen als *nicht messbar* betrachtet. Bei Messung des *Knockdowns* eines Gens wurden Proben ohne eindeutigen Peak einem C_t -Wert von 40 (entspricht dem Wert einer nicht nicht-messbaren Probe) zugeordnet. Bei allen anderen Messungen wurden nur Reaktionen mit einer eindeutigen Schmelzkurve für die Auswertung verwendet.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine relative Quantifizierung mit Hilfe der $\Delta\Delta C_t$ -Methode durchgeführt (Winer et al. 1999, Livak und Schmittgen 2001). Dafür wurden die C_t -Werte der getesteten Gene (genes of interests, GOI) jeweils in Relation gesetzt zu dem Mittelwert der C_t -Werte von Haushaltsgenen (house keeping genes, HKG), die als Referenz dienen.

$$\Delta C_t = C_t^{GOI} - C_t^{HKG}$$

Als Haushaltsgene wurden für den Array der Mittelwert von β 2-Mikroglobulin und Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase 1 (HPRT) sowie für einzelne qPCR-Reaktionen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) oder HPRT gewählt. Anschließend wurde der $\Delta\Delta C_t$ -Wert berechnet, der die Testgruppe (Kokultur) mit der Kontrollgruppe (Monokultur) in Verbindung setzt:

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t (\text{Testgruppe}) - \Delta C_t (\text{Kontrollgruppe})$$

Die Veränderung der Transkription für jedes Gen in der Testgruppe verglichen zur Kontrollgruppe ließ sich wie folgt auswerten:

$$n = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Werte für $n > 1$ zeigten eine n -fache Hochregulation, Werten < 1 eine Herunterregulation in der Kokultur.

3.2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe eines Agarose-Gels lässt sich DNA ihrer Größe nach auftrennen. Dazu wurde die Agarose in TAE-Puffer durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst, mit Ethidiumbromid versetzt und in eine Elektrophorese-Apparatur gegossen. Nach der Polymerisation des Gels wurden die mit Ladepuffer versetzten Proben zusammen mit einem Größenstandard aufgetragen und eine Spannung von 100 V angelegt, wodurch sich die DNA aufgrund ihrer negativen Ladung in Richtung Anode auftrennte. Als Laufpuffer wurde TAE-Puffer verwendet. Das Ethidiumbromid interkaliert mit der DNA und emittiert Licht nach Bestrahlung mit UV-Licht, wodurch das Sichtbarwerden der DNA durch ein Geldokumentationssystem (Vilber Lourmat) ermöglicht wird.

3.2.4 Arbeit mit Mäusen

Für die vorliegende Arbeit wurde ein Mausmodell benötigt, das die Transplantation von humanen Zellen toleriert. Der Non-obese diabetic (NOD)-severe combined immunodeficiency (SCID)-Stamm wird in diesem Zusammenhang oft verwendet. Diese Mäuse sind stark immundefizient, da sie aufgrund gestörter V(D)J-Rekombination keine funktionellen B- und T-Zellen besitzen (Shultz et al. 1995). Durch die zusätzliche Mutation des Interleukin-2-Rezeptor γ (IL-2R γ) wurde ein noch weiter permissiver Stamm erzeugt, der außerdem eine funktionelle Inkompetenz von Natürlichen Killer (NK)-Zellen aufweist. Dieses Xenotransplantationsmodell ermöglicht ein sehr gutes Anwachsen von humanen Zellen (Ito et al. 2002) und ist in der Arbeitsgruppe etabliert. Die in dieser Arbeit verwendeten NOD/SCID/IL-2R γ ^{null} (NSG)-Mäuse wurden aus der eigenen Zucht bezogen. Die in Deutschland gültigen Bestimmungen zur Durchführung von Tierversuchen wurden dabei eingehalten (AktENZEICHEN des Tierversuchsantrags: 22 177-07/G08-1-018).

3.2.4.1 Xenotransplantation und Injektion des Antikörpers

Für die Versuche wurden 8-12 Wochen alte Mäuse eingesetzt. Einen Tag vor der Transplantation wurden die Mäuse durch eine Cäsium¹³⁷-Quelle mit 1,5 Gy sublethal

bestrahlt. Für die Transplantation wurden MV4-11-Zellen in PBS aufgenommen und $1 \cdot 10^6$ Zellen in einem Volumen von 200 μl in die Schwanzvene injiziert. An Tag 10 (d10) wurden die Mäuse in 2 Gruppen aufgeteilt. Eine Gruppe erhielt 25 mg/kg FG-3019 und die andere Gruppe einen Kontroll-AK. Bei jeder Maus wurde dafür zuvor das Gewicht bestimmt. Die Applikation erfolgte intraperitoneal in die Flanke. Es folgten fünf weitere Injektionen des Antikörpers an d12, d14, d17, d19 und d21.

3.2.4.2 Präparation und Organentnahme

Sobald die Mäuse Krankheitssymptome zeigten, die vor allem durch Hinterbeinlähmung, aber auch durch struppiges Fell und Lethargie gekennzeichnet waren, wurden die Tieren mit Forane (Abbott, Wiesbaden) sediert und Blut im Kopfbereich in einem Dreieck zwischen Auge und Ohr entnommen. Die Tiere wurden anschließend per Genickbruch getötet. Es folgte die Bestimmung des Gewichts sowie die Präparation der Milz und des Knochenmarks. Die Milz wurde gewogen, mit Hilfe eines Filters, homogenisiert, und für die CD45-Färbung vorbereitet. Das Knochenmark wurde aus Ober- und Unterschenkelknochen durch Verwendung einer Kanüle herausgewaschen und ebenfalls für die CD45-Färbung verwendet.

3.2.4.3 Lysieren von Erythrozyten

Der Einsatz von Blut- sowie Gewebeproben für FACS-Analysen verlangt die vorherige Lyse der in der Probe enthaltenden Erythrozyten. Hierfür wurden $1 \cdot 10^6$ Zellen in 2 ml Erylysepuffer resuspendiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Der hypotone Erylysepuffer führt zu einem Platzen der Erythrozyten. Die Wirkung des Puffers lässt sich am Verlust der roten Färbung erkennen. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und mit einem gegen humanes CD45 gerichteten Antikörper gefärbt.

3.2.5 Statistik

Die statistischen Analysen wurden mit GraphPad Prism 4 durchgeführt. Dabei wurde ein unpaariger zwei-seitiger t-Test für *in vitro*-Versuche sowie ein Log-Rank-Test für Überlebensanalysen innerhalb der *in vivo*-Versuche angewendet. p-Werte kleiner als 0,05 (*) beziehungsweise kleiner als 0,01 (**) und 0,001 (***) wurden als statistisch signifikant angesehen. Die Ergebnisse sind als Mittelwert mit Standardabweichung (standard deviation, SD) angegeben.

Ergebnisse

4.1 Hemmung von CXCR4 durch den Antikörper BMS-936564/MDX-1338 im Zellmodell

In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktionalität des blockierenden, humanen anti-CXCR4 Antikörpers BMS-936564/MDX-1338 (Bristol-Myers Squibb) im Hinblick auf dessen Einfluss auf das Überleben und die Differenzierung von AML-Zellen getestet. Aufgrund der wichtigen Rolle von CXCR4 innerhalb der Interaktion der Tumorzellen mit den Stromazellen des Knochenmarks (Zeng et al. 2009) lag ein besonderes Interesse in der Untersuchung der CXCR4-Blockade in der Kokultur und der Auswirkung auf die Stroma-induzierte Resistenz.

4.1.1 Expression von CXCR4

Bevor die Auswirkung der CXCR4-Blockade analysiert werden konnte, wurde die Expression des Rezeptors in den verwendeten Zelllinien und primären Blasten ermittelt (s. Abb. 4.1). Dies zeigte, dass die Zelllinien im Vergleich zu den Patientenproben eine höhere CXCR4-Expression aufweisen. U937-Zellen besitzen mit einer Mean Fluorescence Intensity (MFI) von 106,94 die stärkste CXCR4-Expression aller untersuchten Zellen.

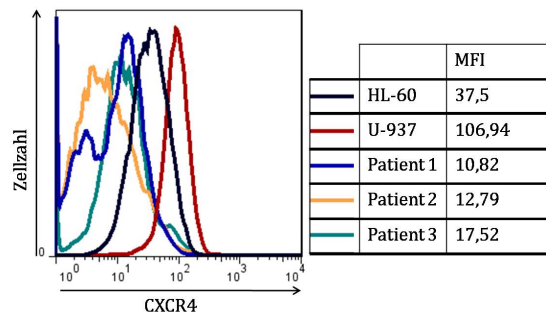


Abbildung 4.1: Histogramm über die Expression von CXCR4 in AML-Zelllinien und primären Blasten. Die Zellen wurden mit einem Fluorochromgekoppelten CXCR4-Antikörper gefärbt und das Signal am Durchflusszytometer gemessen. Dargestellt ist die Mean Fluorescence Intensity (MFI) unter Abzug der Hintergrundfluoreszenz ungefärbter Zellen. n=1

4.1.2 Funktionelle Untersuchung von BMS-936564/MDX-1338

Um zu garantieren, dass der Antikörper BMS-936564/MDX-1338 tatsächlich an CXCR4 bindet und auch nachgeschaltete Signalwege blockiert, wurde zunächst die Blockade des Rezeptors und anschließend die Blockade des Calcium-Flux und der Migration untersucht.

4.1.2.1 Blockade des CXCR4-Rezeptors

Die Behandlung der AML-Zellen mit BMS-936564/MDX-1338 und anschließende Färbung mit dem Fluorochrom-gekoppelten CXCR4-Antikörper führte zu einem stark abgeschwächten Signal im Durchflusszytometer im Vergleich zu Zellen, die mit einem Kontroll-AK behandelt wurden (s. Abb. 4.2). Auch die Inkubation mit dem Kontroll-AK verursachte in allen untersuchten Zellen eine unspezifische Blockierung des CXCR4-FACS-Antikörpers, diese war jedoch meist schwach ausgeprägt. Nur die Zellen des Patienten 1 wiesen bei Behandlung mit dem Kontroll-AK eine um knapp 70 % reduzierte Bindung des FACS-Antikörpers auf. Dennoch verursachte BMS-936564/MDX-1338 eine deutlich stärkere Blockierung.

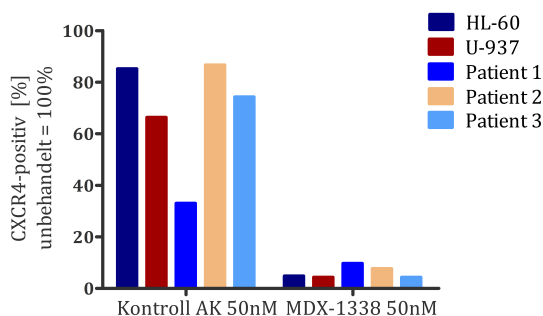


Abbildung 4.2: Blockade des CXCR4-Rezeptors durch BMS-936564/MDX-1338. Nach Inkubation mit 50 nM BMS-936564/MDX-1338 oder dem Kontroll-Antikörper (AK) für 4 h wurden die Zellen mit einem Fluorochrom-gekoppelten CXCR4-Antikörper inkubiert und dessen Signal am Durchflusszytometer ermittelt. Dargestellt ist der Anteil CXCR4-positiver Zellen im Bezug auf die jeweils unbehandelte Kontrolle, deren Messwert auf 100% gesetzt wurde. n=1

4.1.2.2 Blockade des Calcium-Flux und der Migration

Die Bindung von CXCL12 an CXCR4 verursacht die Öffnung von Calcium-Kanälen und ist wichtig für die Chemotaxis (Teicher und Fricker 2010). Die Blockade von CXCR4 mit BMS-936564/MDX-1338 bewirkte eine um 55 % reduzierte Migration von HL-60-Zellen durch die Poren eines Transwell-Systems in Richtung des unteren wells, das mit CXCL12 versetzt worden war. Weiterhin wurde ein um 20 %-reduzierter Calcium-Flux beobachtet, der mittels eines Calcium-Sensors am Durchflusszytometer gemessen wurde (s. Abb. 4.3).

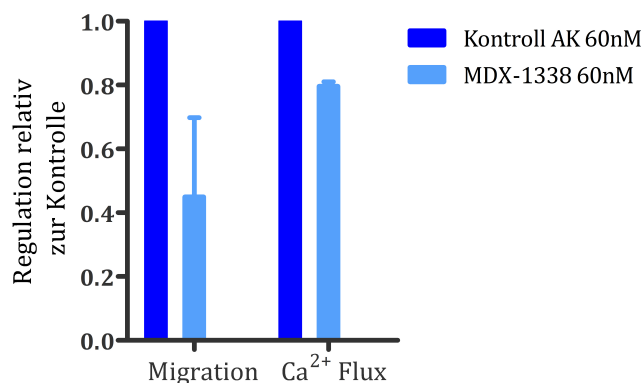


Abbildung 4.3: Blockade der Migration und des Calcium Flux durch BMS-936564/MDX-1338 in HL-60-Zellen. Für die Untersuchung der Migration wurden HL-60-Zellen für 3 h mit 60 nM BMS-936564/MDX-1338 oder dem Kontroll-Antikörper (AK) inkubiert und anschließend in das obere well eines Transwell-Systems überführt. Das untere well wurde mit 10 nM CXCL12 versetzt. Nach 15 h wurden diejenigen Zellen gezählt, die in das untere well migriert waren. Um den Calcium-Flux zu analysieren, wurden HL-60-Zellen für 24 h mit 60 nM BMS-936564/MDX-1338 behandelt und anschließend mit einem Calcium Sensor inkubiert, dessen Calcium-Bindung im Durchflusszytometer gemessen werden kann. Dafür wurden die Zellen mit 6,25 nM CXCL12 stimuliert. n=2

4.1.3 Therapeutische Eignung von BMS-936564/MDX-1338

Um den Einsatz von BMS-936564/MDX-1338 als Medikament zur Therapie der AML zu rechtfertigen, muss sich der Antikörper zunächst als erfolgreich in *in vitro* sowie *in vivo* Versuchen erweisen. In dieser Arbeit wurde BMS-936564/MDX-1338 in Zellkulturversuchen eingesetzt, um die Auswirkung auf Apoptose, Differenzierung, sowie Stroma-vermittelte Resistenz zu untersuchen. Dafür wurden die Zelllinien HL-60 und U-937 sowie Patientenzellen verwendet. Für die Behandlung von primären Blasten und HL-60-Zellen mit BMS-936564/MDX-1338 wurde zusätzlich ein kreuzvernetzender, sekundärer Antikörper verwendet, der an den F_C-Teil eines humanen Antikörpers bindet. Versuche hatten gezeigt, dass der Einsatz dieses sekundären Antikörpers in einigen Zellen benötigt wird, um eine (höhere) Apoptose auszulösen (Michelle R. Kuhne, persönliche Kommunikation, 2011 und Kuhne et al. (2013)).

4.1.3.1 Einfluss auf Apoptose und Differenzierung

Bei der Behandlung von U-937-Zellen mit BMS-936564/MDX-1338 wurde bereits bei einer niedrigen Konzentration von 5 nM eine starke Aggregatbildung der Zellen beobachtet (s. Abb. 4.4, rechts). Die Zellen zeigten nach einer Inkubation mit 50 nM BMS-936564/MDX-1338 nach 6 d eine signifikant höhere Apoptose im Vergleich zu der Behandlung mit dem Kontroll-AK (**), und zu der Behandlung mit ATRA

(**), welches in einigen AML-Zellen primär zu einer Ausreifung führt. Außerdem induzierte BMS-936564/MDX-1338 eine Differenzierung der Zellen, die anhand des Markers CD11b gemessen werden konnte (s. Abb. 4.4, links).

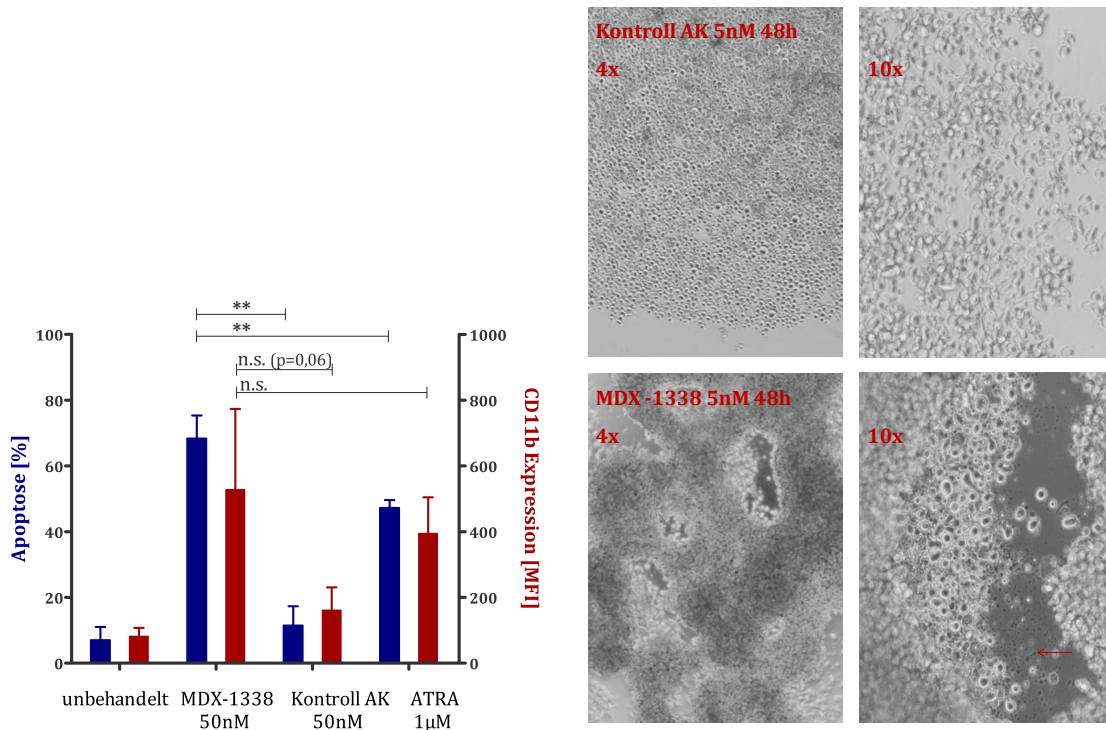


Abbildung 4.4: Aggregation, Apoptose und Differenzierung in U-937-Zellen nach Behandlung mit BMS-936564/MDX-1338. U-937-Zellen wurden für 6 d mit 50 nM BMS-936564/MDX-1338 oder Kontroll-AK oder mit 1 µM All-trans-Retinolsäure (ATRA) behandelt und die Apoptose anhand der subG1-Messung sowie die Differenzierung anhand der CD11b-Expression im Durchflusszytometer ermittelt (links). Mikroskopisch konnte nach Behandlung mit BMS-936564/MDX-1338 die Aggregation der Zellen und Zelltrümmer apoptotischer Zellen beobachtet werden (rechts, roter Pfeil). n=3

Auch bei primären Blasten konnte eine erhöhte Apoptose durch die Behandlung mit BMS-936564/MDX-1338 erreicht werden. Dies war allerdings nur möglich, wenn zusätzlich der sekundäre Antikörper eingesetzt wurde (s. Abb. 4.5). Die Kombination beider Antikörper zusammen mit dem Standardchemotherapeutikum AraC erzielte in zwei von drei Patientenzellen eine signifikant höhere Apoptose (** und *) als die Monotherapie mit AraC. In Patient 3 erreichte auch die Kombination aus BMS-936564/MDX-1338 und sekundärem Antikörper ohne AraC eine signifikant gesteigerte Apoptose im Vergleich zur AraC-Monotherapie (*). In Zellen des Patienten 1 hatte auch die Behandlung mit Kontroll-AK, sekundärem Antikörper und AraC einen signifikanten Einfluss auf den Zelltod (*). Die teils unspezifische Bindung des Kontroll-AKs bei diesem Patienten könnte ein Grund dafür sein (s. Abb. 4.2). Die

Behandlung der Zellen von Patient 2 führte zu keinen statistisch signifikanten Unterschieden, jedoch ließ sich auch hier ein tendenziell verbessertes Ansprechen bei einer Kombination aus BMS-936564/MDX-1338, sekundärem Antikörper und AraC verzeichnen.

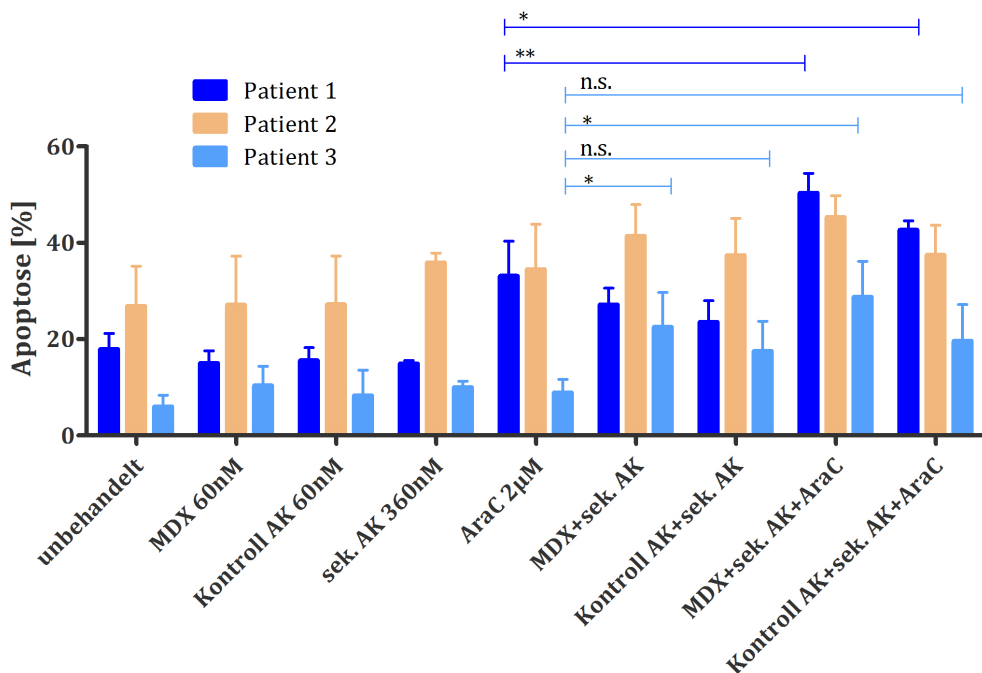


Abbildung 4.5: Apoptoseinduktion nach Behandlung primärer Blasten mit BMS-936564/MDX-1338, sekundärem Antikörper und AraC. Blasten aus Patienten, die an AML erkrankt waren, wurden für 24 h mit einer Kombination aus 60 nM BMS-936564/MDX-1338 (MDX) oder Kontroll Antikörper (Kontroll AK), 360 nM sekundären Antikörper (sek. AK) und 2 µM AraC behandelt. Anschließend wurde die Apoptose anhand Annexin V/7AAD-Färbung bestimmt. n=3

4.1.3.2 Einfluss auf Stroma-vermittelte Resistenz

Um die Bedeutung der CXCR4-Inhibition innerhalb der Tumor-Stroma-Interaktion zu untersuchen, wurden HL-60 Zellen in Kokultur für 24 h mit BMS-936564/MDX-1338 behandelt (s. Abb. 4.6). Abermals führte die Verwendung des sekundären Antikörpers zu einem besseren Ansprechen der Zellen auf die Therapie. Die alleinige Behandlung mit BMS-936564/MDX-1338 induzierte eine Apoptose von 10 % in HL-60-Zellen. Dieser Effekt konnte jedoch durch den Schutz der Stromazellen in der Kokultur aufgehoben werden. Der Einsatz des sekundären Antikörpers führte zu einem Verlust dieses schützenden Effekts und verursachte weiterhin eine signifikant *höhere* Apoptose in Suspensionszellen der Kokultur im Vergleich zu Zellen in Monokultur (*). Zusätzlich ergab die Kombination aus BMS-936564/MDX-1338, sekun-

därem Antikörper, mit oder ohne AraC eine signifikant höhere Apoptose in kokultivierten Zellen verglichen mit der AraC-Monotherapie (***) und (**). Die Wirkung von BMS-936564/MDX-1338 unterschied sich hochsignifikant von der des Kontroll-AKs. Hier konnte keine Aufhebung des Stroma-vermittelten Schutzes vor Apoptose nachgewiesen werden. Stattdessen war hier, teilweise statistisch signifikant, teilweise tendenziell, eine geringere Apoptose in kokultivierten Zellen zu verzeichnen.

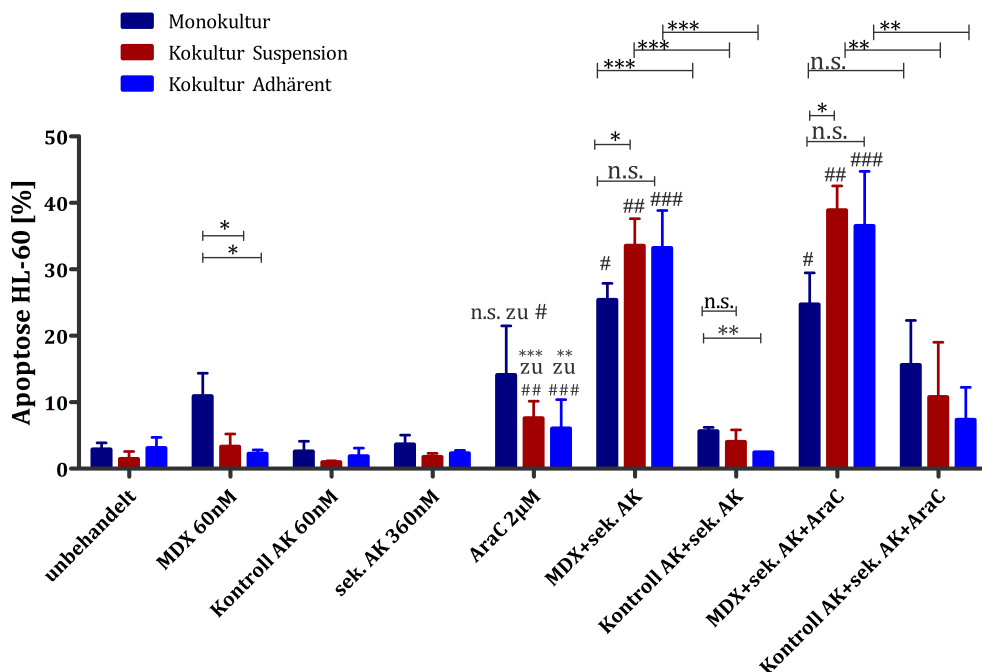


Abbildung 4.6: Aufhebung Stroma-induzierter Resistenz nach Behandlung von kokultivierten HL-60-Zellen mit BMS-936564/MDX-1338 und sekundärem Antikörper. HL-60-Zellen wurden für 24 h mit MS5-Zellen kokultiviert und anschließend mit 60 nM BMS-936564/MDX-1338 oder Kontroll-Antikörper (AK), 360 nM sekundärem Antikörper und 2 µM AraC für 24 h behandelt. Die Apoptose wurde anhand einer Annexin V/7AAD-Färbung bestimmt. n=3

Zusammenfassend konnten die Ergebnisse zeigen, dass BMS-936564/MDX-1338 humanes CXCR4 bindet und dadurch auch nachgeschaltete Signalwege von CXCR4 blockiert werden. In Zellkulturversuchen mit AML-Zelllinien und primären Blasten induzierte BMS-936564/MDX-1338 Apoptose und in U-937-Zellen außerdem die Expression des Differenzierungsmarkers CD11b. In HL-60 konnte eine Aufhebung der Stroma-vermittelten Resistenz beobachtet werden. Um eine Wirkung erzielen zu können, musste teilweise zusätzlich zu BMS-936564/MDX-1338 ein kreuzvernetzender, sekundärer Antikörper eingesetzt werden.

4.2 Regulation und Targeting von CTGF im Zell- und Mausmodell

4.2.1 Regulation von CTGF

4.2.1.1 Transkriptionsanalyse kokultivierter Zellen mit Hilfe eines qPCR Arrays

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der MS5-Zellen auf die Genregulation in Molm-14-Zellen untersucht, um neue relevante Proteine innerhalb der Tumor-Stroma-Interaktion zu identifizieren. Hierfür wurden Molm-14-Zellen für 72 h mit MS5-Zellen kokultiviert, anschließend sortiert und die cDNA für einen qPCR Array verwendet, der die Transkription von 84 Adhäsions-Proteinen und Proteinen der ECM untersuchte. Dieser Versuch wurde bereits für die Diplomarbeit der Autorin dreimal durchgeführt und in der vorliegenden Arbeit auf 5-fach Werte ausgeweitet. Die Mittelwerte der Transkriptionsregulation in kokultivierten Molm-14-Zellen sind in Abb. 4.7 dargestellt.

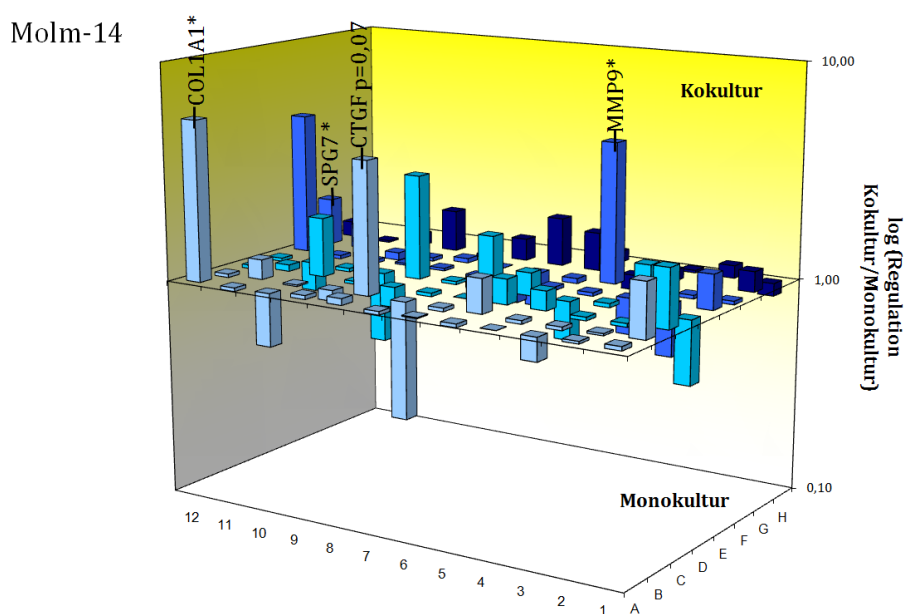


Abbildung 4.7: Untersuchung der Transkriptionsregulation in der Kokultur mit Hilfe eines Real-time qPCR-Arrays. Gezeigt ist die n-fache Regulation jedes Gens nach 72 h Kokultur von Molm14- mit MS5-Zellen. Ergebnisse <1 geben eine Herunter-, Werte >1 eine Hochregulation wieder. Gene, die (nahezu) statistisch signifikant reguliert wurden, sind beschriftet (s. Text). Die kompletten Ergebnisse der Arrays sind im Anhang A zu finden. n=5

Der qPCR Array ergab, dass viele Gene des Arrays weder in Monokultur noch in Kokultur nachweisbar waren (C_t -Wert ≥ 35 , $n=37$). Viele Gene waren außerdem zu meist nicht oder nur schwach reguliert (Regulation $< 1,1$ und $> 0,8$, $n=48$). Für vier Gene ließ sich jedoch eine teils signifikante Regulation (*) aufzeigen. Der Kontakt zu Stroma induzierte eine Hochregulation von Kollagen Typ I $\alpha 1$ (COL1A1, 5,53x), Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP9, 4,44x) und Spastic paraplegia 7 (SPG7, 1,65x). CTGF war nahezu signifikant 4,06-fach hochreguliert ($p=0,07$). Alle Namen der untersuchten Gene sowie deren Regulation sind im Anhang A zu finden.

In kokultivierten MS5-Zellen wurde ebenfalls die Genregulation untersucht. Auch hier waren einige Gene hoch- oder herunterreguliert (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse wurden in der vorliegenden Arbeit allerdings nicht weiter bearbeitet.

4.2.1.2 Validierung der CTGF-Regulation

Nachdem die Regulation von CTGF mit Hilfe des qPCR Arrays identifiziert wurde, sollten einzelne qPCR-Reaktionen mit eigenen Primern dies verifizieren. Außerdem sollte die Regulation in weiteren Zelllinien und auf Proteinebene untersucht werden.

Die Hochregulation von CTGF in Molm-14-Zellen nach 72-stündigem Kontakt zu MS5-Zellen konnte bestätigt werden. Außerdem wurde in zwei weiteren AML-Zelllinien (MV4-11 und Oci-AML3) ebenfalls eine induzierte CTGF-Expression nachgewiesen (s. Abb. 4.8a).

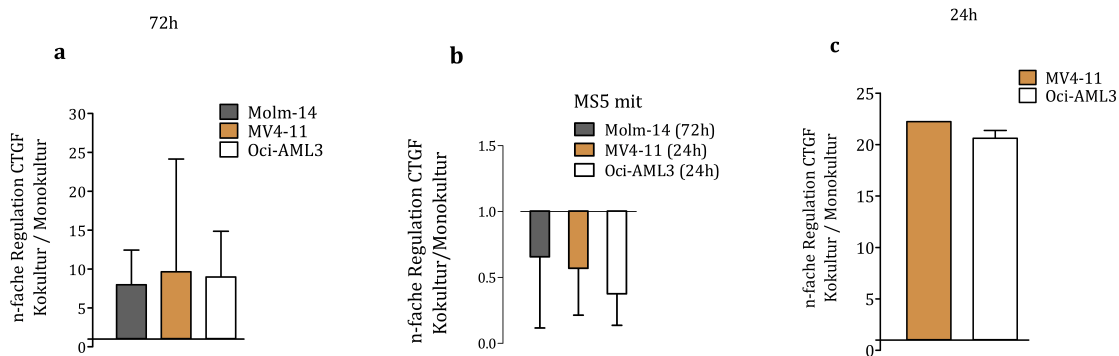


Abbildung 4.8: Regulation von CTGF in kokultivierten AML-Zelllinien und MS5-Zellen. Molm-14-, MV4-11- und Oci-AML3-Zellen wurden für 24 h oder 72 h mit MS5-Zellen kokultiviert, anschließend sortiert und die cDNA für die Untersuchung der CTGF-Regulation mittels qPCR verwendet. (a) zeigt die Regulation in den AML-Zelllinien nach 72 h, (c) nach 24 h. In (b) ist die Regulation von CTGF in MS5-Zellen dargestellt. Die Quantifizierung erfolgte relativ zu der Expression des Haushaltsgenes GAPDH (a,c) und HPRT (b). Dargestellt sind Triplikate (a,b) bzw. Duplikate für Oci-AML3 und ein Einfachwert für MV4-11 (c).

Die gemittelte n-fache Regulation von CTGF war innerhalb der drei Zelllinien recht ähnlich. In Molm-14 lag sie bei 7,8, in Oci-AML3 bei 8,9 und in MV4-11 bei 9,6. Allerdings konnte in MV4-11-Zellen nur in zwei von drei Versuchen eine Hochregulation von CTGF nachgewiesen werden, die zudem stark unterschiedlich war. Im dritten Versuch war CTGF in kokultivierten MV4-11-Zellen herunterreguliert, wodurch sich insgesamt eine starke Schwankung der Werte ergab.

Um die CTGF-Regulation auf Protein-Ebene zu untersuchen, wurden Western Blot-Versuche durchgeführt. In Zelllysaten konnte CTGF nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Da CTGF in das extrazelluläre Medium sezerniert wird, wurde im nächsten Schritt versucht, CTGF in Mediumüberständen der Kokultur zu detektieren. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.9 zu sehen.

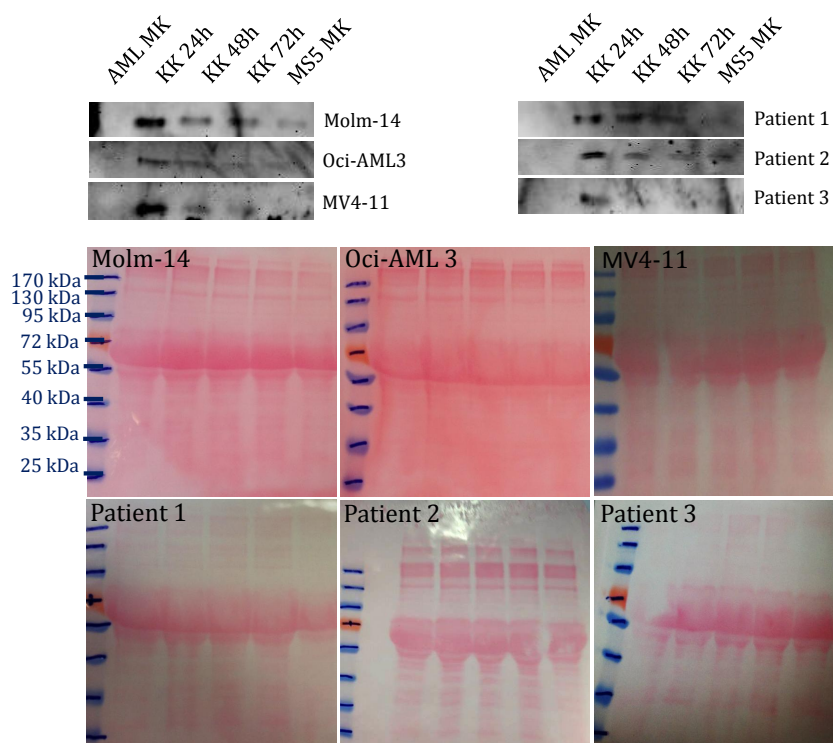


Abbildung 4.9: Nachweis von CTGF im Mediumüberstand der Kokultur.

Die dargestellten AML-Zelllinien und primäre Blasten von drei Patienten wurden für 24-72 h mit MS5-Zellen kokultiviert (KK) oder für 72 h in Monokultur gehalten (MK) und der Mediumüberstand zur Immundetektion von CTGF verwendet. Die Ponceau-Rot-Färbung der Membran diente als Beladungskontrolle. CTGF wurde auf einer Höhe von 38 kD detektiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von insgesamt zweien.

CTGF konnte in Mediumüberständen aus Kokulturen mit AML-Zelllinien sowie mit Blasten von drei verschiedenen Patienten nachgewiesen werden. Dabei war CTGF in allen getesteten Zellen nach 24 h am stärksten hochreguliert. Zu späteren Zeitpunk-

ten (48 h und 72 h) war die Expression deutlich abgeschwächt oder kaum noch zu detektieren. AML-Zellen, die in Monokultur gehalten wurden, zeigten keine nachweisbare CTGF-Expression. In MS5-Zellen ließ sich keine, oder nur eine schwache CTGF-Expression detektieren.

Da der CTGF-Antikörper nicht spezifisch gegen humanes CTGF gerichtet ist, ließ sich bei diesem Versuch nicht ausschließen, dass die verstärkte Detektion von CTGF in der Kokultur einer Hochregulation des Proteins in den Stromazellen zuzuschreiben war. Daher wurde die CTGF-Regulation auf RNA-Ebene auch in MS5-Zellen überprüft, nachdem diese für 24 h oder 72 h Kontakt zu AML-Zellen hatten (s. Abb. 4.8b). Dies ergab, dass CTGF in MS5-Zellen nicht hoch-, sondern eher herunterreguliert wird. Damit konnte gezeigt werden, dass der verstärkte Nachweis von CTGF in Mediumüberständen der Kokultur mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Hochregulation des Proteins in den AML-Zelllinien zurückzuführen war. Die Verwendung eines humanen Antikörpers könnte diesen Versuch weiter optimieren und die CTGF-Regulation noch sicherer den AML-Zellen zuweisen.

Nachdem auf Proteinebene die stärkste CTGF-Hochregulation nach 24 h beobachtet wurde, sollte dies auch auf Transkriptionsebene bestätigt werden. Tatsächlich zeigten qPCR Experimente eine nahezu doppelt so hohe Regulation des Gens nach 24 h im Vergleich zu 72 h. Die Hochregulation von CTGF nach 24 h belief sich in Oci-AML3-Zellen auf 20,6 und in MV4-11-Zellen auf 22,2 (s. Abb. 4.8c). Allerdings konnte in MV4-11-Zellen nach 24-stündiger Kokultur nur in einem Versuch CTGF detektiert werden. In zwei weiteren Versuchen war dies weder in Zellen der Monokultur noch in Zellen der Kokultur möglich.

4.2.1.3 Weitere Untersuchung zur Regulation von CTGF in Molm-14-Zellen

Zunächst wurde die CTGF-Regulation in der Suspensionsfraktion nach Kokultur mit MS5-Zellen für 72 h untersucht. Diese Fraktion hat zum Zeitpunkt der Ernte keinen direkten Kontakt zu den Stromazellen, der Wechsel zwischen Suspension und Adhärenz ist aber vermutlich fließend und reversibel. Die Suspensionsfraktion zeigte in diesem Modell wie die adhärente Fraktion eine starke CTGF-Hochregulation (6,5x). Eine komplette Trennung der Molm-14-Zellen zu den MS5-Zellen durch ein Transwell-System, welches jeglichen direkten Kontakt verhindert, unterband allerdings die Hochregulation von CTGF (s. Abb. 4.10a).

Anschließend wurde eine Veränderung in der Art des Kontaktes vorgenommen. So konnte gezeigt werden, dass CTGF auch nach Haftung an eine andere Stromazelllinie (AFT024) 26,8-fach sowie nach adhärentem Kontakt zu Fibronectin 2,6-fach hochreguliert wurde (s. Abb. 4.10b). Weiterhin wurden die Bedingungen der häma-

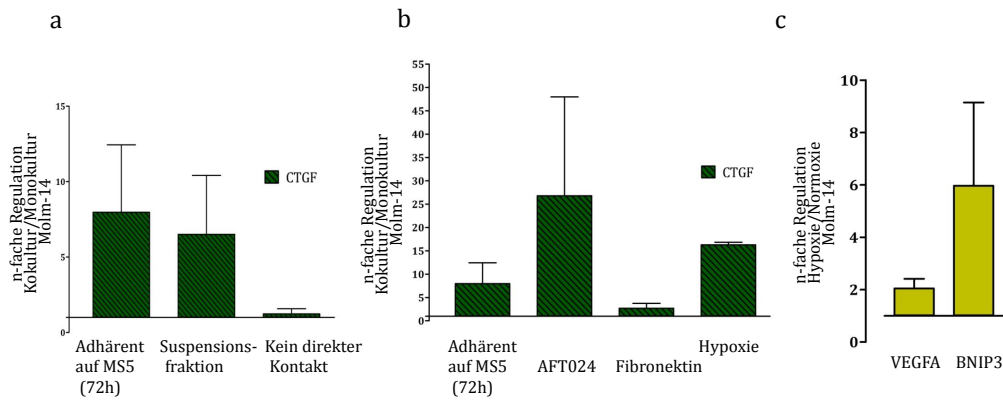


Abbildung 4.10: Nähere Untersuchung der CTGF-Regulation in Molm-14-Zellen. Gemessen wurde die CTGF-Regulation in Zellen, die zum Zeitpunkt der Ernte keinen Kontakt zu den MS5-Zellen hatten (Suspensionsfraktion), oder durch eine Membran komplett von diesen getrennt kultiviert wurden (a, n=3). Weiterhin wurde die Regulation nach Adhärenz der Molm-14-Zellen auf AFT024-Zellen und auf Fibronectin (72 h) überprüft (b, n=3). Außerdem wurde die Regulation in adhärenenten Molm-14-Zellen untersucht, die unter hypoxischen Bedingungen (4 % O₂) kultiviert wurden (b, n=2). Zum Vergleich ist jeweils die bereits gezeigte CTGF-Regulation in auf MS5-Zellen adhärenenten Molm14-Zellen (72 h) unter Normoxie dargestellt. Um das sauerstoffarme Milieu nachzuweisen, wurde nach der Kultur unter hypoxischen Bedingungen (72 h) in Molm-14-Zellen die Transkription Hypoxie-induzierter Gene untersucht (c, n=3)

topoetischen Nische imitiert und untersucht, ob CTGF auch im hypoxischen Milieu reguliert wird. Die Hochregulation von CTGF lag unter hypoxischen Bedingungen bei 16,2 und war damit stärker als in Normoxie (7,8). Das hypoxische Milieu wurde durch den Nachweis der Hochregulation von den Hypoxie-induzierten Genen Vascular endothelial growth factor (VEGF) und BCL2 adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3 (BNIP3) (Shweiki et al. 1992, Guo et al. 2001) kontrolliert (s. Abb. 4.10c).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse die Hochregulation von CTGF in Molm-14-Zellen nach Kontakt zu Stroma. Dies wurde mit Hilfe eines qPCR Arrays identifiziert und in einzelnen Reaktion mit verschiedenen kokultivierten AML-Zellen auf Transkriptions- und Translationsebene bestätigt. Weiterhin wurde festgestellt, dass die CTGF-Hochregulation unabhängig von der Stroma-Zelllinie ist, direkten Kontakt benötigt und auch unter hypoxischen Bedingungen, wie sie im Knochenmark herrschen, stattfindet.

4.2.1.4 Einfluss des Hippo-Signalwegs

Um einen detaillierteren Einblick in die Regulation von CTGF zu bekommen, wurde nach Signalwegen gesucht, die die Expression von CTGF induzieren. Da CTGF den direkten Kontakt zu Stromazellen benötigt um hochreguliert zu werden, erschien es sinnvoll, den Hippo-Signalweg als übergeschalteten Mechanismus in Betracht zu

ziehen. Für diesen Signalweg konnte eindrucksvoll gezeigt werden, dass seine Aktivierung in den Zellen in Abhängigkeit zu der Beschaffenheit des Untergrundes steht, auf denen die Zellen wachsen (Dupont et al. 2011). Außerdem ist bekannt, dass er CTGF reguliert (Lai et al. 2011).

Die Aktivität von TAZ, einer der zentralen Transkriptions-Kofaktoren des Signalwegs, wird gesteuert, indem das Protein phosphoryliert und anschließend abgebaut wird. Daher wurde zunächst die Stabilisierung von TAZ in kokultivierten Molm-14-Zellen untersucht. Zum einen wurde ein gegen humanes Protein gerichteter Antikörper in Lysaten von Molm-14-Zellen verwendet, die nach 6 d Kokultur mit MS5-Zellen durch Abnahme der schwimmenden Zellen, Abspülen des Stromas durch PBS oder Trypsinieren der Zellen geerntet wurden. Da die letzte Fraktion auch die MS5-Zellen enthielt, der Antikörper aber nur humanes Protein detektiert, wurde hier die doppelte Menge an Protein für das SDS-Gel verwendet (s. Abb. 4.11a) – und damit angenommen, dass das Molm-14-zu-MS5-Verhältnis bei etwa 1:1 liegt. TAZ konnte nur in dieser Fraktion und damit nur in stark am Stroma haftenden Molm-14-Zellen nachgewiesen werden. Aufgrund der höheren Beladung des Gels mit dieser

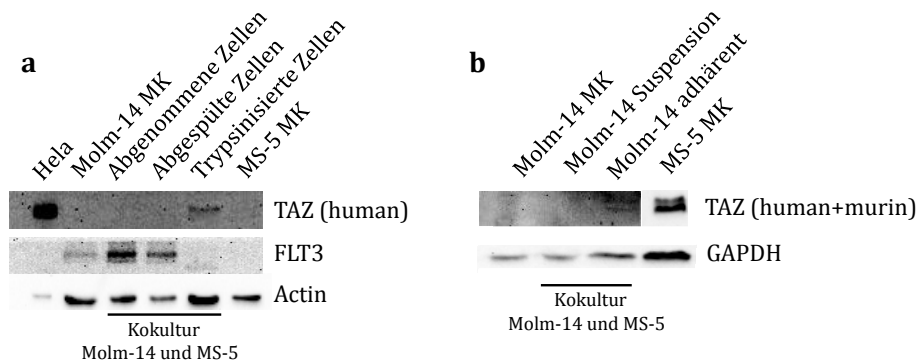


Abbildung 4.11: Nachweis der TAZ-Stabilisierung in adhärenenten Molm-14-Zellen. Proteinlysate von Molm-14-Zellen wurden nach 6-tägiger Kokultur für Western Blot Versuche verwendet, um die Expression von TAZ zu überprüfen. Als Vergleich dienten Zellen in Monokultur (MK). Das Lysat von HeLa-Zellen wurde als Positivkontrolle genutzt. Die Unterscheidung der humanen Molm-14-Zellen von den murinen Stromazellen erfolgte durch die Verwendung eines humanspezifischen TAZ-Antikörpers (a) oder mit Hilfe der Zellsortierung am Durchflusszytometer (b). Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von insgesamt zweien.

trypsinieren Fraktion, war auch das Signal des Haushaltgens Actin stärker. Dieser Antikörper ist nicht human-spezifisch. Um auszuschließen, dass in der trypsinieren Fraktion mehr Molm-14-Zellen waren im Vergleich zur Monokultur und darin das stärkere TAZ-Signal begründet war, wurde zusätzlich der humanspezifische Antikörper FLT3 als Beladungskontrolle eingesetzt. Dies ergab, dass keine stärkere Beladung mit humanem Protein in der trypsinieren Fraktion der Kokultur im Vergleich zur Monokultur vorlag. Stattdessen war FLT3 in der trypsinieren Fraktion verglichen

mit der Monokultur kaum nachweisbar. Scheinbar sind nur wenige Molm-14-Zellen in der trypsinisierten Fraktion vorhanden, die jedoch eine starke TAZ-Stabilisierung aufweisen.

In einem weiteren Versuch wurden die adhärennten, sortierten Zellen der Kokultur für die Immundetektion verwendet. Hierbei wurde ein gegen murines und humanes Protein gerichteter Antikörper verwendet. Auch hier ließ sich TAZ nur in adhärennten Zellen und nicht in locker anhaftenden Zellen (Suspensionsfraktion) oder in der Monokultur der Molm-14-Zellen detektieren (s. Abb. 4.11b). Verglichen mit der Verwendung des humanen Antikörpers konnte TAZ hier auch in den murinen MS5-Zellen nachgewiesen werden. Dies belegt zudem die Spezifität des ersten TAZ-Antikörpers gegen humanes Protein. Zusammenfassend zeigen beide Western Blot-Versuche eine Stabilisierung des TAZ-Proteins in der adhärennten Fraktion kokultivierter Molm-14-Zellen.

Da der Hippo-Signalweg außer CTGF auch die Transkription von Cyr61 induziert (Lai et al. 2011), wurde die RNA-Expression von Cyr61 in kokultivierten AML-Zelllinien überprüft (s. Abb. 4.12). Dies zeigte, dass Cyr61 nach Kontakt zu

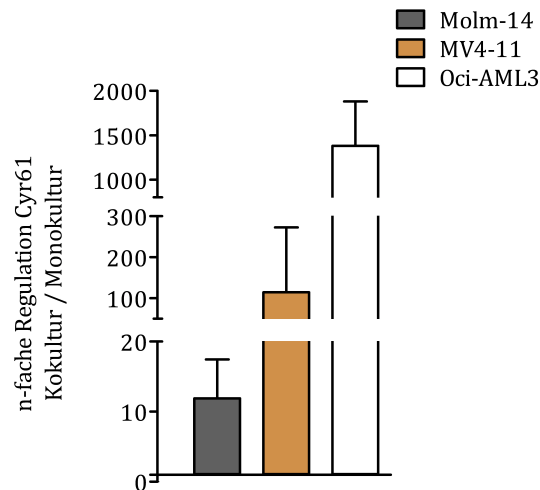


Abbildung 4.12: Regulation von Cyr61 in kokultivierten AML-Zelllinien. Die dargestellten Zelllinien wurden für 72 h mit MS5-Zellen kokultiviert und anschließend am Durchflusszytometer von diesen getrennt. cDNA-Proben der Zellen wurden für die qPCR verwendet und die Regulation von Cyr61 relativ zu der Expression des Haushaltgens GAPDH dargestellt. n=3

Stroma (72 h) in teilweise außergewöhnlich starkem Maße hochreguliert wird. In Molm-14-Zellen belief sich die Hochregulation auf einen Faktor von 11,9, in MV4-11-Zellen auf 114,3 und in Oci-AML3-Zellen war Cyr61 1381-fach hochreguliert.

Neben der Regulation durch Adhärenz ist außerdem bekannt, dass der Hippo-Signalweg einer Kontakt-Inhibition unterliegt (Zhao et al. 2007). Sobald ein Zellverband eine gewisse Größe besitzt, sorgt dieser Signalweg für einen Wachstumsstopp. Diese dichteabhängige Regulation des Signalwegs konnte auch in Kokulturen mit Molm-14- und MS5-Zellen gezeigt werden. Die Aussaat der Molm-14-Zellen in niedrigerer Zellzahl ($0,5 \cdot 10^6/10$ ml) führte zu einer verstärkten Induktion von CTGF und Cyr61 um jeweils den Faktor 5,5 und 3 (s. Abb. 4.13).

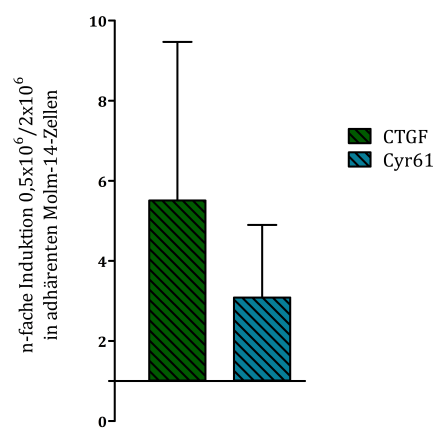


Abbildung 4.13: Dichteabhängige Regulation von CTGF und Cyr61. Molm-14-Zellen wurden für 72 h mit MS5-Zellen kokultiviert. Dabei wurden die Molm-14-Zellen in einer Konzentration von 2 oder $0,5 \cdot 10^6/10$ ml ausgesät. Die Zellen wurden am Durchflusszytometer getrennt und die cDNA für den Regulationsnachweis mittels qPCR verwendet. Die Ergebnisse sind relativ zu der Expression des Haushaltgens GAPDH dargestellt. $n=3$

In folgenden Versuchen sollte die Verbindung zwischen dem Hippo-Signalweg und der CTGF/Cyr61-Regulation weiter untersucht werden, indem TAZ durch Plasmid-basierte Überexpression hochkonzentriert vorhanden war oder mittels shRNA-gesteuerten *Knockdown* herunterreguliert wurde.

Die Überexpression von TAZ nach Transduktion von Molm-14-Zellen mit dem Vektor pLenti7.3 TAZ führte zu einem 1800-fach gesteigerten Vorhandensein der TAZ-RNA. Auch auf Proteinebene war die Überexpression deutlich detektierbar (s. Abb. 4.14a,b). Zwei unabhängige Experimente zeigten, dass diese Überexpression zu keiner signifikant erhöhten Regulation von CTGF und Cyr61 in kokultivierten Molm-14-Zellen führte. Tendenziell kam es eher zu einer niedrigeren Expression beider Gene (s. Abb. 4.14c).

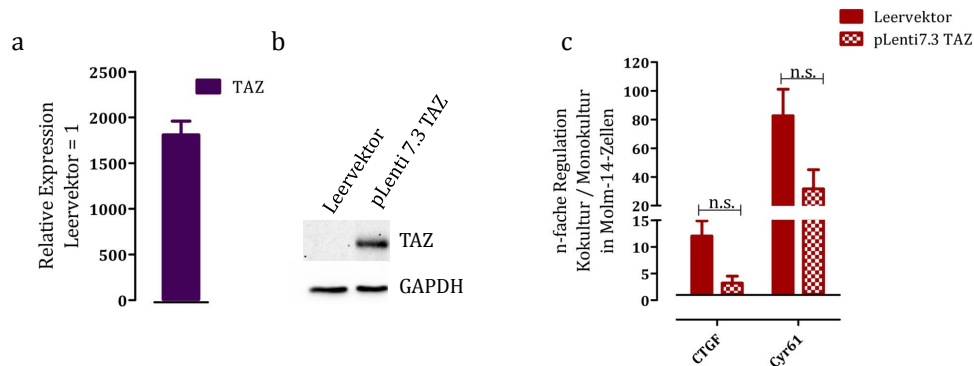


Abbildung 4.14: Überexpression von TAZ und Regulation von CTGF und Cyr61 in Molm-14 pLenti7.3 TAZ-Zellen. Der Nachweis der Überexpression erfolgte auf RNA-Ebene mittels qPCR. Dargestellt ist die Expression von TAZ relativ zum Haushaltsgen GAPDH (a). Auf Proteinebene wurde TAZ mittels Western Blot nachgewiesen (b). Molm-14-Zellen, die den Leervektor oder pLenti7.3 TAZ exprimierten, wurden mit MS5-Zellen kokultiviert und nach 72 h am Durchflusszytometer getrennt. Die Regulation von CTGF und Cyr61 in Molm-14-Zellen relativ zu GAPDH wurde mittels qPCR ermittelt (c). n=2

Die Herunterregulation von TAZ wurde mit Hilfe des shRNA-induzierten *Knockdowns* des Gens durchgeführt. Zusätzlich zu dem Nachweis der reduzierten Transkription von TAZ (s. Abb. 4.15a) wurden die Zellen genauer charakterisiert, indem Zellzyklusmessungen und Zellzählassays durchgeführt wurden, um die Zellteilungsrate zu untersuchen. Dies ergab, dass der *Knockdown* von TAZ in Molm-14-Zellen die Proliferation reduzierte. Nach 72 h Wachstum war die Teilung um den Faktor 0,4 niedriger als in der Kontrolle. Zellzyklusmessungen ergaben, dass der Anteil der Zellen in der S-Phase ebenfalls um den Faktor 0,4 reduziert war (s. Abb. 4.15b,c). Kokulturrexperimente zeigten, dass die verminderte Expression von TAZ mit einer si-

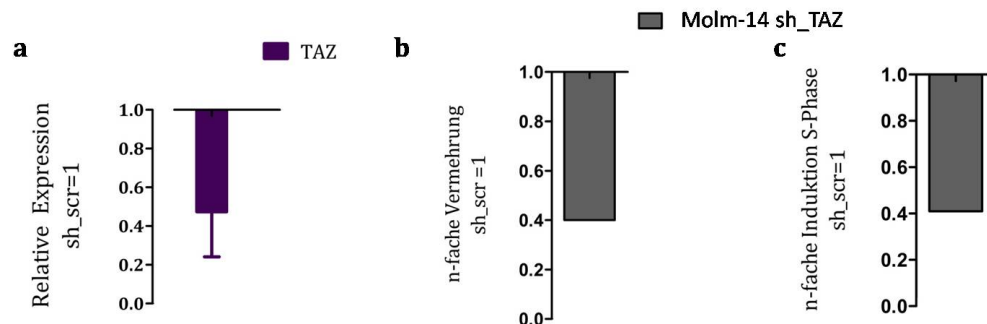


Abbildung 4.15: Untersuchung der Zellteilung in Molm-14-Zellen nach stabilem shRNA-Knockdown von TAZ. Dargestellt ist der Nachweis der reduzierten TAZ-Expression mittels qPCR (a, n=3). Außerdem wurde die Proliferation durch Ermittlung der Zellzahl nach 72 h Wachstum (b, n=1) und Messung des Anteils von Zellen in der S-Phase des Zellzyklus untersucht. Hierfür wurden Zellen mit DNA-bindendem Propidiumiodid gefärbt und im Durchflusszytometer die Zellzyklusphasen dargestellt. (c, n=1).

gnifikant eingeschränkten Hochregulation von CTGF in Molm-14-Zellen einherging. Cyr61 war hingegen nicht verändert reguliert (s. Abb. 4.16).

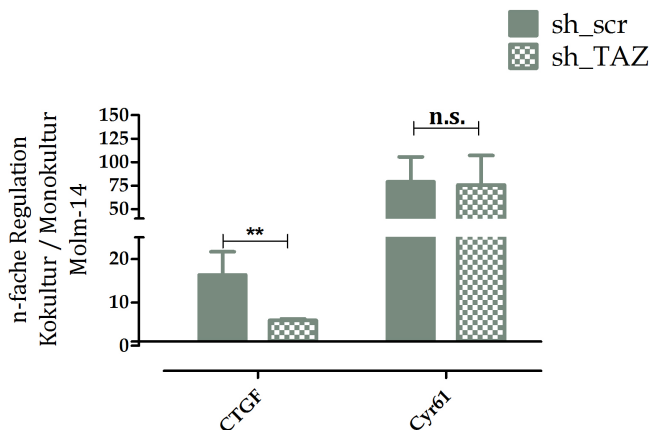


Abbildung 4.16: Regulation von CTGF und Cyr61 in kokultivierten Molm-14-Zellen nach TAZ-Knockdown. Nach 72 h Kokultur der Molm14-Zellen mit MS5-Zellen wurden die Zellen am Durchflusszytometer getrennt und die Regulation der CTGF und Cyr61-mRNA mittels qPCR in den Molm14-Zellen untersucht. n=3

Weiterhin wurde das Resistenzverhalten in Molm14 shTAZ-Zellen untersucht. Die Herunterregulation von TAZ führte zu einer Reduktion des Stroma-vermittelten Schutzes vor Chemotherapie. Während in der Kontrolle die kokultivierten, adhären-ten Zellen im Vergleich zur Monokultur um 59 % vor AraC geschützt war, waren adhären-te Molm-14 shTAZ-Zellen nur zu 38 % resistent gegenüber der Apoptose (s. Abb. 4.17). Die reduzierte Apoptose in kokultivierten Molm-14 shTAZ-Zellen war außerdem im Vergleich zu dem Schutz der kokultivierten Kontrollzellen nicht signifikant.

4.2.2 Targeting von CTGF

Um die Auswirkung der eingeschränkten Aktivierung von CTGF-regulierten Si-gnalwegen zu untersuchen, wurde die Funktion des Proteins durch einen shRNA-gesteuerten *Knockdown in vitro* und durch einen gegen CTGF gerichteten Antikör-per *in vivo* gezielt angegriffen.

4.2.2.1 Hemmung von CTGF durch shRNA-Knockdown

Die Auswirkung des CTGF-Knockdowns mittels shRNA wurde in den AML-Zelllinien Molm-14, Oci-AML3 und MV4-11 untersucht, in denen bereits eine Hoch-regulation von CTGF nach Kokultur mit MS5-Zellen nachgewiesen werden konnte (s. Abb. 4.8). In allen drei Zelllinien führte die Expression der shRNA zu einer

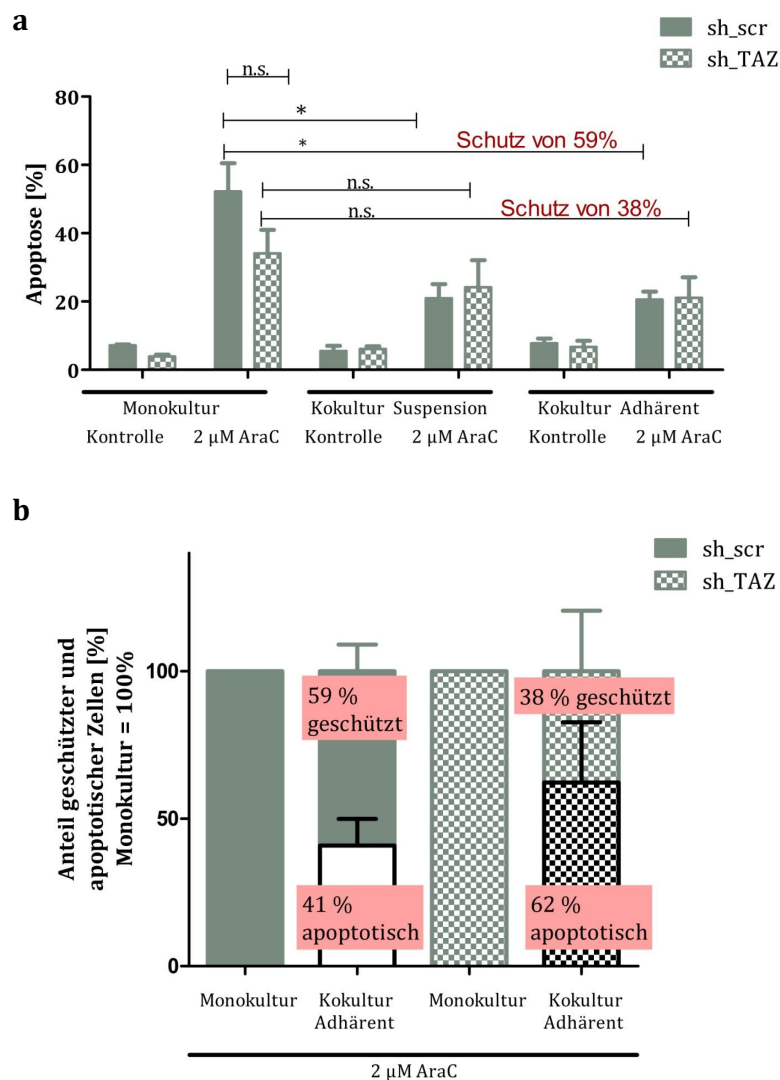


Abbildung 4.17: Stroma-vermittelte Therapieresistenz in Molm-14-Zellen nach TAZ-Knockdown. Molm-14-Zellen, die stabil mit einer shRNA gegen TAZ transduziert worden waren, wurden für 6 d auf MS5-Zellen kultiviert. Anschließend wurde die Mono- und Kokultur für 72 h mit 2 µM AraC behandelt. Die Apoptose wurde am Durchflusszytometer anhand Annexin V/7AAD-Färbung bestimmt. (a) zeigt die Apoptose der jeweiligen Fraktion in Prozent und (b) die Anteile der apoptotischen und geschützten Zellen in der adhärenen Fraktion der Kokultur bezogen auf die Monokultur nach Behandlung mit AraC. n=3

Reduktion der CTGF-RNA (s. Abb. 4.18a). Auch hier wurden wie bei der Herunterregulation von TAZ die Zellen weiter charakterisiert, indem die Proliferation mittels Zellzählassays und Zellzyklusmessungen untersucht wurde (s. Abb. 4.18b,c). Dies ergab, dass die reduzierte Expression von CTGF in Molm-14-Zellen eine verstärkte Proliferation um den Faktor 2 zur Folge hatte. Besonders deutlich zeigten dies Zellzyklusmessungen. Hier ließ sich in CTGF-*Knockdown*-Zellen ein erhöhter Anteil von Zellen in der S-Phase ausmachen (s. Abb. 4.18d). In den beiden anderen Zelllinien hatte der *Knockdown* kaum eine Auswirkung auf die Zellteilung.

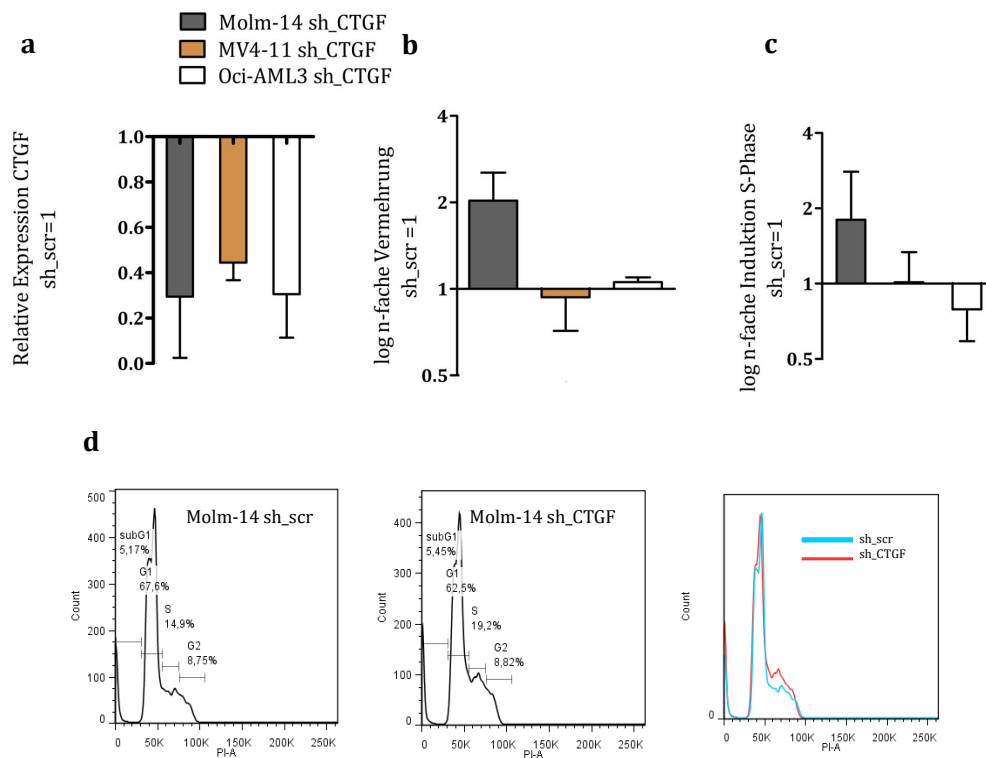


Abbildung 4.18: Nachweis und Charakterisierung des *Knockdowns* von CTGF in AML-Zelllinien CTGF wurde mittels shRNA in den dargestellten Zelllinien herunterreguliert. Dies wurde anhand von qPCR-Experimenten nachgewiesen (a). Anschließend wurden die Zellen anhand ihrer Zellteilungsaktivität charakterisiert. Dafür wurde die Zellzahl nach 72 h Wachstum bestimmt (b) und die Anteile der Zellzyklusstadien durch Anfärben mit Propidiumiodid untersucht (c,d). n=3

Im Folgenden wurde der Einfluss der reduzierten CTGF-Expression auf die Sensibilität der AML-Zelllinien gegenüber der Chemotherapie in Mono- und Kokultur untersucht. In Molm-14-Zellen konnte eine deutliche Resistenz gegenüber AraC nachgewiesen werden, sobald die Zellen mit Stroma kokultiviert wurden (s. Abb. 4.19a). Allerdings war dieser Schutz sowohl in der Suspensionsfraktion als auch in

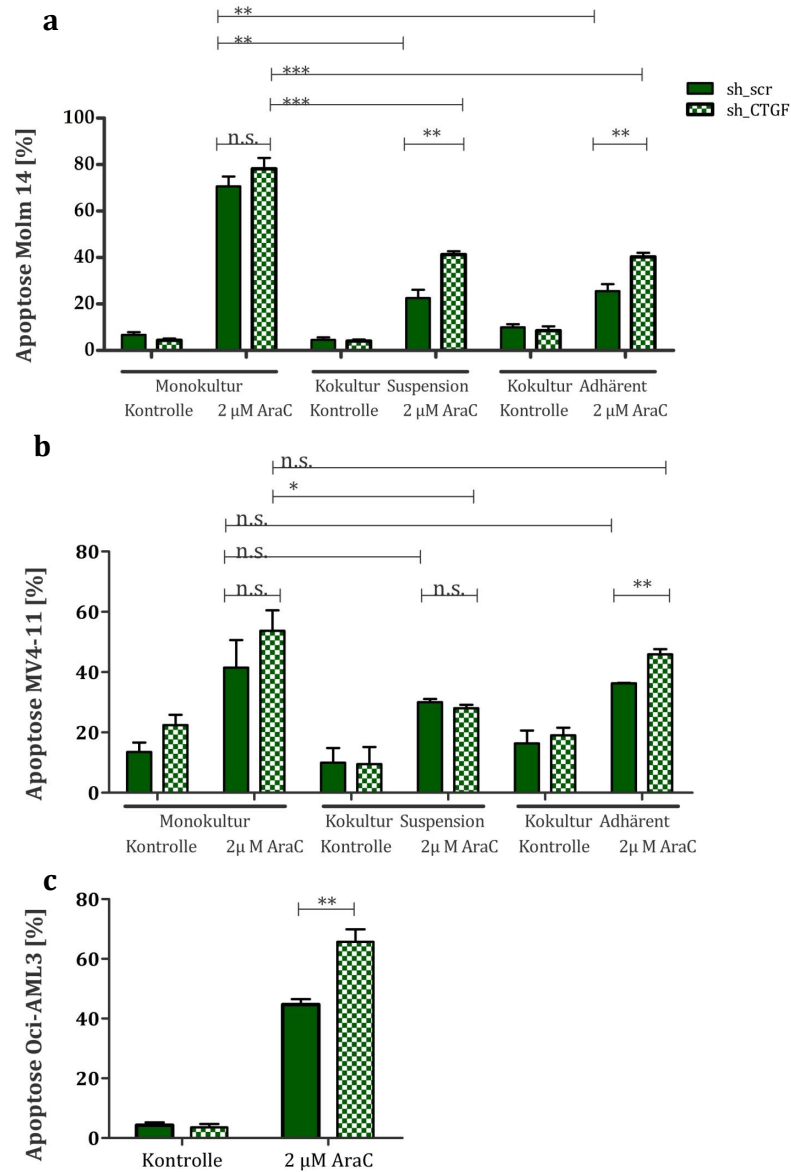


Abbildung 4.19: Ansprechen auf Chemotherapie in AML-Zelllinien nach CTGF-Knockdown in Mono- und Kokultur. Die Zelllinien wurden stabil mit einer gegen CTGF gerichteten shRNA transduziert. Molm-14-Zellen wurden für 6 d mit MS5-Zellen kokultiviert und anschließend die Mono- und Kokultur für 72 h mit 2 μ M AraC behandelt (a, n=5). MV4-11-Zellen wurden für 24 h mit MS5-Zellen kultiviert und im Anschluss die Mono- und die Kokultur für 48 h behandelt (b, n=3). In Oci-AML3-Zellen wurde die Apoptose in Monokultur nach 48 h Behandlung gemessen (c, n=4). Die Apoptose wurden in allen Versuchen nach Anfärben der Zellen mit Annexin V und 7AAD am Durchflusszytometer bestimmt.

den adhärenen Zellen nach CTGF-*Knockdown* signifikant (**) reduziert. MV4-11-Zellen wurden aufgrund des starken CTGF-Signals nach 24 h Kokultur (s. Abb. 4.9) nicht wie Molm-14-Zellen für 6 d sondern nur für 24 h mit MS5-Zellen kokultiviert und anschließend behandelt. In diesen Zellen war der Stroma-vermittelte Schutz nicht ganz so stark ausgeprägt wie in den Molm-14-Zellen. Jedoch zeigte sich auch hier, dass adhärenen MV4-11-Zellen signifikant (**) weniger resistent sind, wenn sie eine reduzierte CTGF-Expression aufweisen (s. Abb. 4.19b). In Oci-AML3-Zellen ließ sich bereits in der Monokultur ein Überlebensnachteil nach CTGF-*Knockdown* feststellen. Die *Knockdown*-Zellen zeigten ein signifikant (**) erhöhtes Ansprechen auf AraC (s. Abb. 4.19c).

Um die verminderte Resistenz in adhärenen Molm-14-Zellen detaillierter zu untersuchen, wurde die Möglichkeit adhärenen Kontakte auszubilden auf ein Protein reduziert. Dafür wurde Fibronectin ausgewählt, da von diesem bekannt ist, dass es AML-Zellen einen Schutz gegenüber Chemotherapie vermittelt (Matsunaga et al. 2003). Dieser schützende Effekt konnte auch in diesem Versuch bestätigt werden (s. Abb. 4.20). Übereinstimmend mit unseren Vordaten, verursachte ein CTGF-*Knockdown* auch in diesem Rahmen einen signifikanten (**) Verlust der Resistenz gegenüber AraC in adhärenen Molm-14-Zellen.

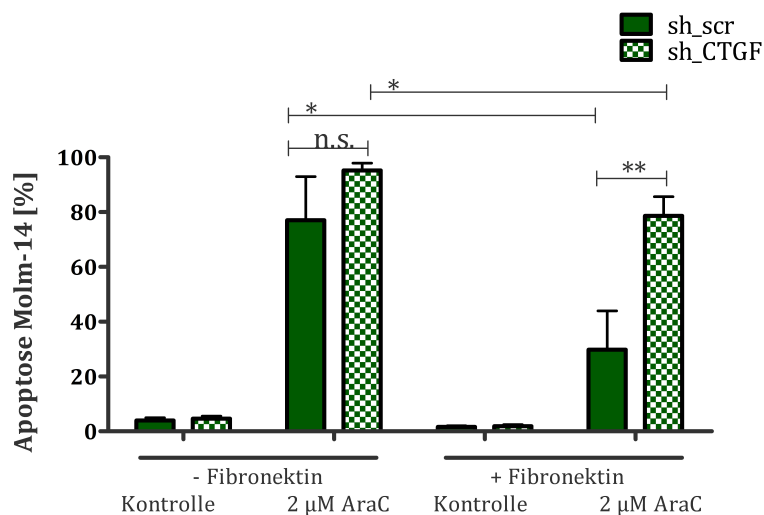


Abbildung 4.20: Einfluss des CTGF-*Knockdowns* in Molm-14-Zellen auf die Fibronectin-vermittelte Chemotherapieresistenz. Molm-14-Zellen wurden für 48 h auf Fibronectin kultiviert und anschließend mit 2 µM AraC behandelt. Die Apoptose wurde mittels Annexin V/7AAD-Färbung bestimmt. Für die Messung der Zellen, deren well mit Fibronectin beschichtet wurde, wurden nur die auf dem Fibronectin adhärenen Zellen verwendet. n=3

4.2.2.2 Hemmung von CTGF durch den Antikörper FG-3019

FG-3019 ist ein blockierender, gegen CTGF gerichteter Antikörper der Firma Fibrogen. Um auszuschließen, dass FG-3019 in AML-Zelllinien toxische, unspezifische Effekte hervorruft, wurden Molm-14-Zellen mit 100 µg/ml FG-3019 für 9 d behandelt und die Apoptose am Durchflusszytometer bestimmt. Dies ergab, dass weder FG-3019 noch der Kontroll-AK signifikante Auswirkungen auf das Überleben der Zellen hatten (s. Abb. 4.21). Bereits in CTGF-*Knockdown*-Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Herunterregulation von CTGF *per se* in Monokultur keinen Einfluss auf das Überleben von Molm-14-Zellen hat (s. Abb. 4.19).

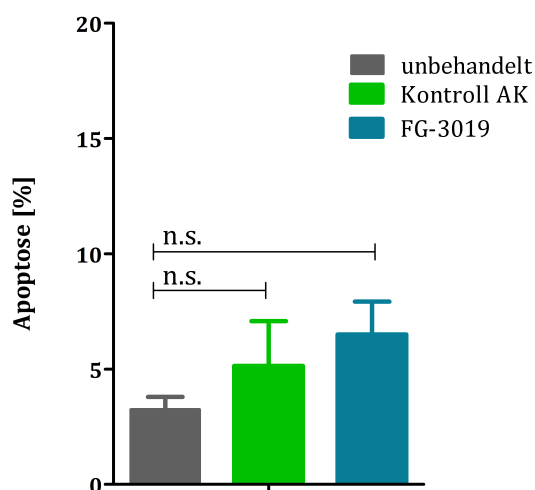


Abbildung 4.21: Behandlung von Molm-14-Zellen mit FG-3019 in Monokultur. Molm-14-Zellen wurden für 9 d mit 100 µg/ml FG-3019 oder Kontroll-Antikörper (AK) inkubiert. In dieser Zeit wurde zweimal Dreiviertel des Mediums erneuert und entsprechend neuer Antikörper hinzugefügt. Nach 9 d Behandlung folgte die Anfärbung mit Annexin V und 7AAD und die Apoptosemessung am Durchflusszytometer. n=3

Mit Hilfe von *in vivo*-Experimenten sollte der Krankheitsverlauf der AML besser adaptiert und eine genauere Aussage darüber getroffen werden, ob CTGF in der Pathogenese der AML eine wichtige Rolle spielt. Dies wurde untersucht, indem NSG-Mäuse mit $1 \cdot 10^6$ MV4-11-Zellen transplantiert wurden und ab dem zehnten Tag nach der Transplantation über 2 Wochen hinweg 25mg/kg FG-3019 oder ein Kontroll-AK intraperitoneal injiziert wurde (s. Abb. 4.22a). Die Therapie mit FG-3019 ergab, dass das mittlere Überleben der Mäuse von 20,5 auf 25 Tage verlängert werden konnte (s. Abb. 4.22b). Die Mäuse zeigten zum Zeitpunkt der Sektion einen Gewichtsverlust um 20 % in beiden Gruppen (s. Abb. 4.22c). Weiterhin wurde in vielen Mäusen eine Splenomegalie festgestellt. Diese war in beiden Gruppen nicht signifikant verschieden, zeigte jedoch in der FG-3019-Gruppe eine etwas stärkere

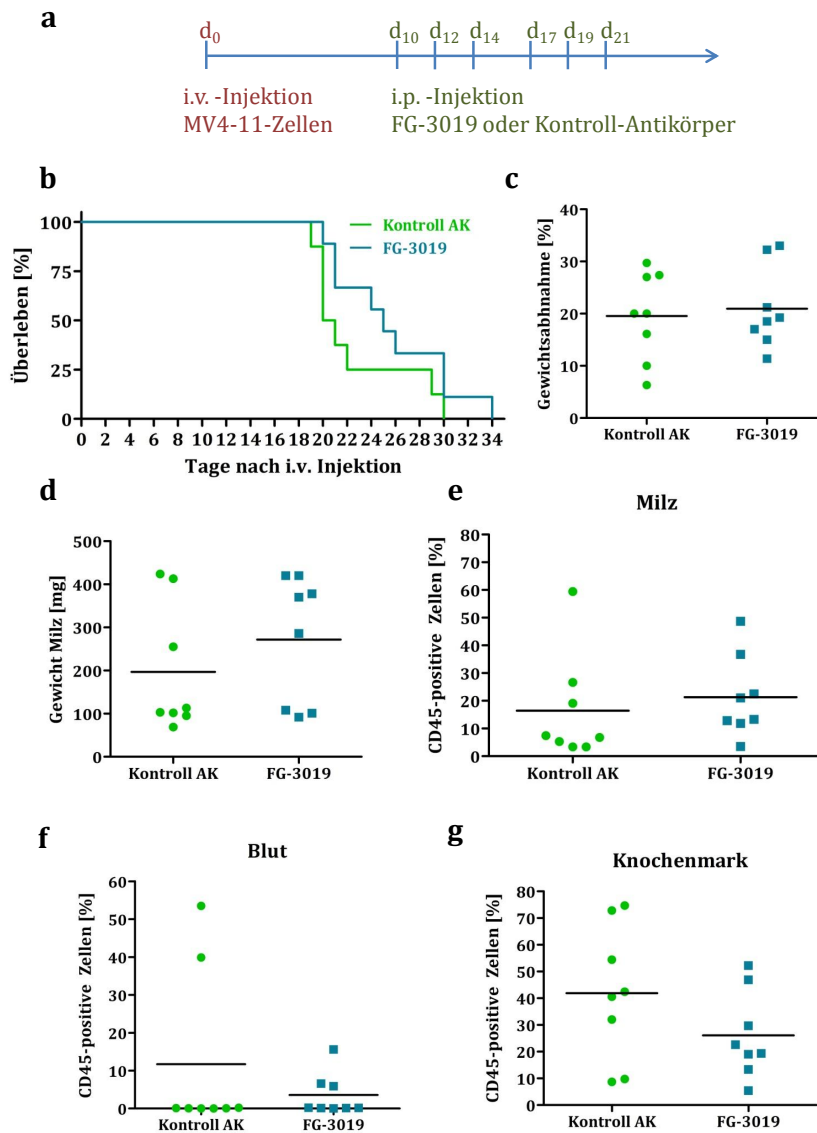


Abbildung 4.22: Ergebnisse nach Behandlung von NOD/SCID/IL-2R γ^{null} -Mäusen mit FG-3019 nach Transplantation mit $1 \cdot 10^6$ MV4-11-Zellen. Die Injektion der Zellen erfolgte intravenös (i.v.) und die Behandlung mit FG-3019 (25mg/kg) intraperitoneal (i.p.). Dargestellt sind die kombinierten Ergebnisse von zwei unabhängigen Transplantationsversuchen. Der Nachweis der MV4-11 Zellen in Blut, Knochenmark und Milz erfolgte mit einem human-spezifischen CD45-Antikörper am Durchflusszytometer. Für keines der Ergebnisse konnte ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Behandlung mit Kontroll-Antikörper (AK) oder FG-3019 festgestellt werden.

Ausprägung (s. Abb. 4.22d). Infiltrationen der leukämischen Zellen in Milz, Knochenmark und Blut (s. Abb. 4.22e,f,g) ließen auf das Anwachsen der leukämischen Zellen in den Tieren und die Erkrankung an einer Leukämie zurückschließen. Im Blut konnten erst zu späten Erkrankungszeitpunkten leukämische Zellen festgestellt werden. Die Infiltrationen unterschieden sich nicht signifikant in beiden Gruppen. Tendenziell war der Nachweis der MV4-11-Zellen in Knochenmark und Blut in der FG-3019-Gruppe etwas vermindert.

Nachdem *in vitro*-Versuche die Abhängigkeit von AML-Zelllinien von CTGF zum Teil im Kontext der Stroma-vermittelten Resistenz gezeigt hatten, konnten *in vivo*-Experimente die lebensverlängernde Eigenschaft eines anti-CTGF-Antikörpers im Rahmen einer AML-Erkrankung aufzeigen. Dies verdeutlicht, dass CTGF während der Pathogenese der AML eine wichtige Rolle einnimmt.

Diskussion

Die Interaktion zwischen malignen Zellen und dem sie umgebenden Stroma ist für die Progression des Tumors von entscheidender Bedeutung. Seit einigen Jahren sind daher nicht nur die Tumorzellen selbst sondern auch das supportiv wirkende Stroma Gegenstand intensiver Forschung.

In dieser Arbeit wurden zwei Proteine hinsichtlich ihres Einflusses auf die Stroma-induzierte Resistenz in der AML untersucht. Der Chemokinrezeptor CXCR4 wird auf der Zelloberfläche exprimiert und verursacht nach Bindung des von mesenchymalen Stromazellen produzierten CXCL12 die Migration von hämatopoetischen Zellen in die Nische des Knochenmarks. Außerdem ist die CXCR4-CXCL12-Interaktion essenziell für das Überleben und die Quieszenz von HSCs innerhalb der Nische (Lataillade et al. 2002). In AML-Zellen aktiviert CXCR4 ähnliche Signalwege und trägt wesentlich zu der Therapieresistenz bei (Tavor et al. 2004, Zeng et al. 2009). CTGF hingegen wird in das extrazelluläre Medium sezerniert und wirkt dort modifizierend gegenüber Signalkaskaden und der Beschaffenheit der ECM. Zunächst vor allem von fibrotischen Erkrankungen bekannt, steht CTGF seit einiger Zeit in enger Verbindung mit der Tumorgenese (Dhar und Ray 2010). Beiden Proteinen ist gemein, dass ihre Expression innerhalb der Tumor-Stroma-Beziehung in der AML von entscheidender Bedeutung ist. Dies soll im Zusammenhang mit den Ergebnissen dieser Arbeit im Folgenden genauer erörtert werden.

5.1 BMS-936564/MDX-1338: Die Wirksamkeit des CXCR4-Antikörpers in AML-Zellen

Um ein Zielprotein therapeutisch zu hemmen, hat sich der Einsatz von *small molecule inhibitors* sowie von monoklonalen Antikörpern bewährt. In dieser Arbeit wurde BMS-936564/MDX-1338, ein humaner, monoklonaler anti-CXCR4 Antikörper hinsichtlich seines Potentials Apoptose und Differenzierung in AML-Zelllinien und primären Blasten auszulösen getestet. Dabei wurden die AML-Zelllinien Molm-14, HL-60 und U-937 sowie primäres Material von drei an AML-erkrankten Patienten eingesetzt.

Die Behandlung von Molm-14-Zellen mit BMS-936564/MDX-1338 führte zur Blo-

ckade von CXCR4 (s. Abb. 4.2). Auch nachgeschaltete Signalwege wurden gehemmt, da ein reduzierter Calcium-Flux und eine eingeschränkte Migration in diesen Zellen nachgewiesen werden konnte (s. Abb. 4.3). Diese Versuche bestätigten die bereits von Kuhne et al. (2013) gezeigte Spezifität und Funktionalität des Antikörpers. Kuhne et al. (2013) konnten ähnlich wie die vorliegende Arbeit zeigen, dass BMS-936564/MDX-1338 in Zelllinien und primären Blasten von verschiedenen malignen hämatopoetischen Erkrankungen Apoptose induzierte. Neue Erkenntnisse brachte die vorliegende Arbeit dahingehend, dass in der Zelllinie U-937 durch BMS-936564/MDX-1338 neben der Apoptose auch die Differenzierung der Zellen ausgelöst wurde (s. Abb. 4.4). Andere Studien unterstützen diese Beobachtung. So konnte die Induktion von Differenzierungsmarkern auch nach Behandlung von U-937-Zellen mit dem gegen CXCR4 gerichteten *small molecule inhibitor* AMD3100 oder mit dem murinen, ebenfalls blockierenden CXCR4-Antikörper 12G5 beobachtet werden (Tavor et al. 2008). Möglich ist, dass das gute Ansprechen der U-937-Zellen gegenüber der CXCR4-Inhibition auf die hohe CXCR4-Expression in diesen Zellen zurückzuführen ist, die von Tavor et al. (2004) festgestellt und in dieser Arbeit bestätigt wurde (s. Abb. 4.1).

Die Differenzierung von leukämischen Zellen stellt ein wichtiges Therapieziel dar. In der akuten promyelozytären Leukämie (APL) besitzen die malignen Zellen aufgrund einer Chromosomentranslokation einen Differenzierungsblock, der durch die Therapie mit ATRA aufgehoben werden kann. Dadurch ist die Prognose in dieser Leukämieform sehr gut. 80-90 % der Patienten erreichen eine komplette Remission (Warrell Jr et al. 1991, Degos et al. 1995). Die Verabreichung von ATRA bei der AML zeigt meist keine Erfolge (Estey et al. 1999, Schlenk et al. 2009, Nazha et al. 2013). Daher ist es von großem Interesse, neue Angriffsmöglichkeiten zu finden, die die Differenzierung induzieren. In dieser Arbeit konnte auch durch ATRA in U-937-Zellen eine Differenzierung ausgelöst werden, allerdings verursachte BMS-936564/MDX-1338 eine stärkere Expression des Differenzierungsmarkers CD11b. Ein kombinierter Einsatz der beiden Wirkstoffe als Therapie wäre denkbar. Wichtig wäre zu untersuchen, ob auch in weiteren AML-Zelllinien sowie in primären Zellen durch BMS-936564/MDX-1338 eine Differenzierung ausgelöst wird. Kuhne et al. (2013) konnten zeigen, dass BMS-936564/MDX-1338 in Xenotransplantationsversuchen das Wachstum von malignen hämatopoetischen Zellen hemmt. Auch hier wäre es interessant zu wissen, ob dies durch die Ausreifung der Tumorzellen geschieht.

Die in der vorliegenden Arbeit getesteten primären Blasten sowie HL-60-Zellen benötigten einen sekundären, kreuzvernetzenden Antikörper, damit BMS-936564/MDX-1338 Apoptose auslösen konnte. In zwei von drei Patientenproben konnte durch die Kombinationstherapie aus BMS-936564/MDX-1338, sekundärem Antikörper und AraC eine signifikant gesteigerte Apoptose verglichen mit der AraC-Monotherapie

erreicht werden (s. Abb. 4.5). Auch in der Arbeit von Kuhne et al. (2013) benötigten einige Zellen diesen zusätzlichen Antikörper, damit Apoptose induziert werden konnte. Die Forscher vermuteten, dass die Vernetzung von CXCR4-Molekülen auf der Zellmembran die Voraussetzung für apoptotische Signalwege ist. Zellen, die nur wenige, weit voneinander entfernte CXCR4-Moleküle exprimieren, benötigen einen sekundären Antikörper, der wie eine Brücke die Kreuzvernetzung erleichtert. Die Expressionsdaten der in dieser Arbeit verwendeten Zellen bestätigen diese Hypothese. HL-60-Zellen und die primären Blasten weisen verglichen mit U-937-Zellen eine schwächere CXCR4-Oberflächenexpression auf (s. Abb. 4.1) und benötigten den sekundären Antikörper, damit BMS-936564/MDX-1338 wirksam sein konnte. Tavor et al. (2004) zeigten in ihrer Arbeit allerdings, dass CXCR4 auch intrazellulär vorhanden sein kann. Die von den Forschern getesteten AML-Zelllinien und primären Blasten wiesen eine heterogene CXCR4-Oberflächenexpression auf, besaßen jedoch alle hohe Mengen an intrazellulärem CXCR4. Allerdings förderte der CXCR4-Ligand CXCL12 nur in Zellen mit vorhandener CXCR4-Oberflächenexpression das Überleben und die Proliferation. Kollet et al. (2002) fanden heraus, dass CD34⁺-Zellen intrazelluläres CXCR4 als Reaktion auf bestimmte Cytokine auf ihrer Oberfläche exprimieren können. Möglich ist daher, dass die Oberflächenexpression von CXCR4 auch in den in dieser Arbeit verwendeten Zellen variiert. Wichtig wäre eine Messung der Expression zu verschiedenen Zeitpunkten sowie eine Bestimmung des intrazellulären CXCR4-Spiegels, um eine genauere Aussage über die Expression und das damit eventuell verbundene Ansprechen auf einen hemmenden Antikörper tätigen zu können. Zusätzlich können neben der verschiedenen starken Expression Konformationsänderungen von CXCR4 für das unterschiedliche Ansprechen auf BMS-936564/MDX-1338 verantwortlich sein. So fanden Baribaud et al. (2001) heraus, dass 12G5 nur eine Subpopulation von CXCR4-Molekülen auf leukämischen Zellen erkennt.

Auch bei Behandlung von Lymphomzellen konnte die Signifikanz eines sekundären, kreuzvernetzenden Antikörpers demonstriert werden. Shan et al. (1998) zeigten, dass die Kreuzvernetzung von CD20-Antikörpern die Proliferation hemmt und Apoptose induziert. Hofmeister et al. (2000) untersuchten die apoptotischen Signalwege weiter und beobachteten, dass nach Kreuzvernetzung der CD20-Moleküle Tyrosinkinasen der Src-Familie und Caspasen aktiviert werden. Auch hier vermuteten die Forscher, dass nicht die Dimerisierung von Oberflächenmolekülen durch die zwei Bindungsstellen der primären Antikörper, sondern erst das weitere Vernetzen solcher Rezeptor-Antikörper-Komplexe apoptotische Signalwege auslöst oder diese potenziert.

In der vorliegenden Arbeit führte die Behandlung von kokultivierten HL-60-Zellen mit BMS-936564/MDX-1338 und kreuzvernetzendem Antikörper zu starker Apoptose in HL-60-Zellen (s. Abb. 4.6). Diese mag wie bereits oben erwähnt durch Signalwege ausgelöst werden, die erst nach Kreuzvernetzung der CXCR4-Moleküle ak-

tiviert werden. Weiterhin verursachte die Kombinationstherapie eine Aufhebung der Stroma-vermittelten Resistenz. HL-60-Zellen starben sogar signifikant mehr, wenn sie in Kokultur behandelt wurden. Eine mögliche Erklärung dafür könnte die Abhängigkeit von CXCR4-gesteuerten Signalwegen sein, die die Zellen erst nach Kontakt zu Stroma erlangen. In diesem Fall müsste allerdings auch die Monotherapie mit BMS-936564/MDX-1338 zu einer erhöhten Apoptose in kokultivierten Zellen führen. Dies wurde jedoch nicht beobachtet. Eine wahrscheinlichere Erklärung für die gesteigerte Apoptose in der Kokultur wäre die Hochregulation von CXCR4-Molekülen in kokultivierten HL-60-Zellen, wodurch sie empfänglicher für apoptotische Signalwege würden, die durch die Kreuzvernetzung der CXCR4-Proteine ausgelöst wird. In Prostatakarzinomzellen und ALL-Zellen konnte bereits ein Zusammenhang zwischen der Bindung von CXCL12 und der Hochregulation von CXCR4 hergestellt werden (Möhle et al. 1999, Koshiha et al. 2000). Da MS5-Zellen CXCL12 sezernieren (Bleul et al. 1996), wäre es möglich, dass durch den Kontakt zu Stroma auch HL-60-Zellen CXCR4 verstärkt exprimieren. In einem einzelnen Experiment innerhalb der vorliegenden Arbeit konnte allerdings keine veränderte CXCR4-Expression in HL-60-Zellen nach 24 h Kokultur nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Warum kokultivierte HL-60-Zellen sensibler gegenüber BMS-936564/MDX-1338 und sekundärem Antikörper reagieren, ließ sich in dieser Arbeit nicht ausreichend ergründen. Ein derartiger Effekt ist bisher nicht in der Literatur beschrieben worden. Die Untersuchung der in kokultivierten HL-60-Zellen induzierten Signalwege könnte einen Hinweis liefern, warum sie sensibler gegenüber der Apoptoseinduktion durch die kreuzvernetzten CXCR4-Moleküle reagieren.

Der Einfluss der CXCR4-Inhibition auf die Stroma-induzierte Resistenz konnte auch bei anderen Wirkstoffen beobachtet werden. Die Behandlung von leukämischen Zellen mit einem gegen CXCR4 gerichteten Peptid hob die Stroma-induzierte Resistenz zum größten Teil auf (Zeng et al. 2006). In einer späteren Studie konnte dieser Effekt mit dem CXCR4-Inhibitor AMD3465, ein Derivat des bereits erwähnten AMD3100 (Hatse et al. 2005), bestätigt werden (Zeng et al. 2009). Zudem verursachte AMD3465 *in vitro* sowie *in vivo* in AML-Zellen eine erhöhte Sensibilität gegenüber Chemotherapie und in FLT3-mutierten Zellen ein erhöhtes Ansprechen gegenüber dem FLT3-Inhibitor Sorafenib.

Small molecule inhibitors gegen CXCR4 sind bereits klinisch im Einsatz und haben ihre Wirksamkeit bei der Behandlung der AML durch die Sensibilisierung der Zellen gegenüber der Chemotherapie bewiesen (Uy et al. 2012). In dieser Arbeit wurde ein neuwertiger gegen CXCR4 gerichteter Antikörper hinsichtlich seiner tumorhemmenden Eigenschaften untersucht und dabei *in vitro* ein positiver Effekt auf Apoptose, Differenzierung sowie Aufhebung der Stroma-induzierten Resistenz festgestellt. Antikörper besitzen gegenüber *small molecule inhibitors* eine hohe Spe-

zifität und können weiterhin zur Auslösung von Immunantworten wie der *antibody dependent cellular cytotoxicity* (ADCC) und der *complement dependent cytotoxicity* (CDC) führen und somit den körpereigenen Abwehrmechanismus in Gang setzen (Imai und Takaoka 2006). BMS-936564/MDX-1338 gehört allerdings zu der Antikörperklasse IgG4, die keinen Einfluss auf ADCC und CDC besitzt (Brüggemann et al. 1987). Stattdessen mag *in vivo* die Kreuzvernetzung sowie die Phagozytose opsonisierter Zellen durch FC γ R1-Rezeptoren auf Antigen-präsentierenden Zellen eine Rolle spielen (Kuhne et al. 2013). Außerdem könnte der Einfluss auf die Ausdifferenzierung der malignen Zellen zur Remission beitragen.

Aufgrund der Relevanz von CXCR4 in der Tumorgenese der AML ist die Untersuchung der therapeutischen Hemmung des Proteins von großem Belang. BMS-936564/MDX-1338 zeigte vielversprechende Ergebnisse im Zell- und Mausmodell. Zurzeit läuft die Rekrutierung von Patienten mit refraktärer AML oder ausgewählten B-Zell Tumoren für den Einsatz von BMS-936564/MDX-1338 in einer Phase 1 Studie (Internet: *ClinicalTrials.gov*, MDX-1338 2014). Diese und folgende Studien werden weitere Hinweise über die Erfolgsaussichten von BMS-936564/MDX-1338 in der AML-Therapie liefern.

5.2 CTGF - ein neues Zielprotein für die AML-Therapie?

5.2.1 Validierung der Daten des qPCR Arrays

Um die Genregulation in größerem Ausmaß zu untersuchen, hat sich der Einsatz von RNA-Screens bewährt. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Stromazellen auf die Genexpression in Molm-14-Zellen nach 72-stündiger Kokultur analysiert. Dafür wurde ein qPCR Array verwendet, der die Expression von Proteinen überprüft, die für Adhäsion und Interaktion mit der ECM relevant sind. Hierbei wurde eine 4-fach erhöhte Transkription von CTGF in kokultivierten Molm-14-Zellen festgestellt (s. Abb. 4.7). Diese Hochregulation der CTGF-RNA nach Kontakt zu Stroma konnte in Molm-14-Zellen sowie in zwei weiteren AML-Zelllinien (Oci-AML3 und MV4-11) in einzelnen qPCR-Reaktionen bestätigt werden (s. Abb. 4.8a,c). Western Blot-Versuche unterstützten diese Ergebnisse: In Mediumüberständen aus Kokulturen mit den drei Zelllinien sowie mit drei primären Proben wurde eine erhöhte Proteinkonzentration von CTGF detektiert (s. Abb. 4.9). In Zelllysaten konnte CTGF nicht nachgewiesen werden. Dies bestätigt, dass CTGF ins extrazelluläre Medium sezerniert wird (Jun und Lau 2011).

Eine ähnliche Untersuchung führten Baiba Vilne und Kollegen durch¹. Die Forscher kokultivierten HSCs mit Stromazellen und detektierten eine starke Hochregulation von CTGF sowohl in den HSCs als auch im Stroma. Die größten Expressionsänderungen wurden dabei nach kurzer Kokulturdauer bemerkt. Auch in der vorliegenden Arbeit war die Hochregulation von CTGF in allen verwendeten AML-Zellen nach 24 h Kokultur am höchsten (s. Abb. 4.8c und 4.9). Im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit detektierten Baiba Vilne und Kollegen die CTGF-Regulation in Kokulturen mit HSCs. Dies könnte einen Hinweis dafür liefern, dass die Regulation von CTGF auch unter physiologischen Bedingungen in der hämatopoetischen Nische von Relevanz ist und leukämische Zellen diese Interaktion imitieren. In der vorliegenden Arbeit wurden die Bedingungen der Nische nachgeahmt, indem Molm-14-Zellen unter hypoxischen Bedingungen (4 % O₂) kokultiviert wurden. Auch hier konnte eine CTGF-Hochregulation nachgewiesen werden. Verglichen zu der Regulation unter normoxischen Bedingungen war diese fast doppelt so stark (s. Abb. 4.10b). Hypoxie ist ein bekannter Regulationsmechanismus von CTGF (Finger et al. 2013), daher könnte der Kontakt zu Stroma und die Hypoxie *in vivo* synergistisch die CTGF-Expression beeinflussen.

Die Daten von Baiba Vilne und Kollegen zeigten, dass CTGF auch in den kokultivierten Stromazellen hochreguliert wurde. Der *Knockdown* von CTGF in den Stromazellen beeinflusste die Proliferation und Genexpression in den HSCs. Außerdem war die CTGF-Expression in den HSCs reduziert. Dies weist darauf hin, dass das vom Stroma produzierte CTGF in der Nische parakrin auf die hämatopoetischen Zellen wirken kann. Die Arbeit von Michael Andreeff und Kollegen untersuchte die CTGF-Expression in Stromazellen nach Kontakt zu AML-Zellen *in vivo*². Auch hier induzierten die leukämischen Zellen eine Hochregulation von CTGF im Stroma. Die Genregulation in den malignen Zellen wurde allerdings nicht beschrieben. Auch in verschiedenen soliden Tumoren wurde eine hohe CTGF-Expression sowohl in den malignen Zellen als auch in den Zellen des *Microenvironments* gemessen. Beides ist für die Tumorprogression von Relevanz (Hartel et al. 2004, Dornhöfer et al. 2006, Wang et al. 2009, Yang et al. 2005). In der vorliegenden Arbeit konnte keine CTGF-Regulation in kokultivierten Stromazellen gemessen werden (s. Abb. 4.8b). Möglicherweise ist dies auch von der Verwendung der Stromazelllinie abhängig. Baiba Vilne und Kollegen verwendeten für ihre Untersuchungen UG26-1B6-Zellen. Die vorliegende Arbeit untersuchte die CTGF-Regulation in Zellkulturversuchen, welche

¹Posterbeitrag auf der ASH Konferenz Dezember 2013, #3688 Connective Tissue Growth Factor (Ctgf/Ccn2) Is a Novel Extrinsic Niche-Derived Regulator Of Hematopoietic Stem Cells, Abstract: <https://ash.confex.com/ash/2013/webprogram/Paper59240.html>, Stand 17.02.2014

²Posterbeitrag auf der ASH Konferenz Dezember 2013, #3685 Proteomic, Gene Expression, and Micro-RNA Analysis Of Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells In Acute Myeloid Leukemia Identifies Pro-Inflammatory, Pro-Survival Signatures In Vitro and In Vivo, Abstract: <https://ash.confex.com/ash/2013/webprogram/Paper65255.html>, Stand 17.02.2014

die Situation im Organismus nur annäherungsweise darstellen können. Für genauere Aussagen müsste ergänzend zu den Ergebnissen von Michael Andreeff und Kollegen die CTGF-Expression *in vivo* im AML-Mausmodell untersucht werden.

Der qPCR Array ergab außerdem, dass die Matrix-Metalloprotease MMP9 in kokultivierten Molm-14-Zellen signifikant hochreguliert wurde. Seit längerer Zeit ist bekannt, dass MMPs durch die Modellierung der ECM in das invasive Verhalten von Tumoren involviert sind (Liotta et al. 1980). In vielen Tumoren sind MMPs fehlreguliert. In AML-Blasten konnte, verglichen mit gesunden CD34⁺-Zellen, eine erhöhte Expression von MMP2 und MMP9 dokumentiert werden (Janowska-Wieczorek et al. 1999, Travaglino et al. 2008). Die in der vorliegenden Arbeit gemessene Hochregulation von MMP9 in kokultivierten Molm-14-Zellen konnte in einzelnen qPCR-Reaktionen nicht bestätigt werden. Dies könnte darauf beruhen, dass die Primer des Arrays eine Isoform von MMP9 detektieren, die von den eigenen Primern nicht abgedeckt wird. Die Herunterregulation von MMP9 mit Hilfe shRNA-induziertem *Knockdown* hatte zudem keinen signifikanten Effekt auf die Stroma-induzierte Resistenz in Molm-14-Zellen (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise spielen MMPs eher bei der Migration der AML-Zellen eine Rolle. Daher konnte dieser Versuchsaufbau die Relevanz von MMP9 in der AML eventuell nicht korrekt wiedergeben. Stattdessen könnten Migrationsassays durchgeführt werden oder der Metastasierungsgrad von MMP9-*Knockdown*-Zellen im AML-Mausmodell untersucht werden.

In verschiedenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass CTGF die Expression von MMP9 induziert (Nishida et al. 2011, Finger et al. 2013). Möglich wäre daher, dass die erhöhte CTGF-Expression in kokultivierten Molm-14-Zellen autokrin auf die Zellen wirkt und die Expression von MMP9 induziert. *In vivo* könnte dies die Migration und Metastasierung der Zellen fördern. Ein weiteres Protein, das in kokultivierten Molm-14-Zellen signifikant hochreguliert wurde, war Kollagen Typ I α 1 (COL1A1). Da CTGF die Produktion von ECM-Matrix-Proteinen beeinflusst (Nishida et al. 2007), könnte die Hochregulation von COL1A1 in kokultivierten Molm-14-Zellen ebenfalls ein *downstream*-Effekt der CTGF-Expression sein. Um eine genauere Aussage darüber zu machen, ob die erhöhte MMP9- und COL1A1-Expression tatsächlich auf CTGF-induzierte Signalwege zurückzuführen ist, müsste deren Expression in Kokulturrexperimenten mit Molm-14-Zellen mit CTGF-*Knockdown* untersucht werden.

Weiterhin war die Metalloprotease SPG7, die nicht wie MMP9 im extrazellulären Raum, sondern in der mitochondrialen Membran lokalisiert ist, 1,65-fach (*) hochreguliert. SPG7 erhielt seinen Namen, da Mutationen in diesem Gen zu der neurodegenerativen Erkrankung spastischer Paraplegie führen können (Casari et al. 1998). SPG7 ist bisher nicht als prognostischer Marker beschrieben oder im Zusammen-

hang mit Stroma-vermittelter Resistenz in der Karzinogenese dokumentiert worden und ist daher ebenfalls ein interessanter Kandidat für künftige Forschungsarbeiten.

Weitere Untersuchungen ergaben, dass CTGF nur hochreguliert wird, wenn Molm-14-Zellen direkten Kontakt zum Stroma besitzen. Die Kultivierung im Transwell-System induzierte keine CTGF-Hochregulation in den AML-Zellen (s. Abb. 4.10a). Dies deutet darauf hin, dass die CTGF-Expression nicht durch lösliche Faktoren, sondern nur durch Zell-Zell-Kontakt induziert wird. Weiterhin wäre denkbar, dass der Kontakt zum Stroma zunächst eher einem dynamischen Prozess ähnelt, bei dem die Zellen nur lockeren Kontakt zum Stroma aufbauen und sich dann wieder davon lösen. Dieser Kontakt könnte anhaltende Expressionsänderungen in den Molm-14-Zellen auslösen. Dies würde erklären, warum auch Zellen der Suspensionsfraktion, die zum Zeitpunkt der Ernte keinen direkten Kontakt zum Stroma besitzen, CTGF verstärkt exprimieren.

CTGF konnte durch Kontakt zu den Stromazelllinien MS5 und AFT024 sowie durch Adhärenz auf Fibronectin induziert werden (s. Abb. 4.10b). Dies spricht für einen allgemeinen Mechanismus, bei dem die Wechselwirkung mit einem Untergrund sowie die Möglichkeit, adhärente Kontakte auszubilden, CTGF reguliert. Fraglich ist, ob allein die Adhärenz auf einer Fläche und die damit verbundenen Veränderungen des Zytoskeletts Einfluss auf die CTGF-Expression besitzen. Für den Hippo-Signalweg, der einen möglichen *upstream*-Mechanismus der CTGF-Regulation darstellt (s. Kapitel 5.2.2 Die Beteiligung des Hippo-Signalwegs an CTGF-Expression und Resistenzverhalten), konnte gezeigt werden, dass das Actin-Zytoskelett direkten Einfluss auf die Aktivierung von YAP/TAZ nimmt (Halder et al. 2012). Andererseits wäre es denkbar, dass spezifische Zell-Zell-Kontakte Signalkaskaden aktivieren und die CTGF-Expression regulieren. Die Tatsache, dass der Kontakt zu Fibronectin die CTGF-Expression auslöst, spricht dafür, dass Fibronectin an dieser Interaktion beteiligt ist. Verschiedene Studien zeigen, dass CTGF das Anhaften von Zellen auf Fibronectin vermittelt (Chen et al. 2004, Hoshijima et al. 2006). Der Kontakt zu Fibronectin könnte ähnlich einem *feed-forward*-Mechanismus die weitere Produktion von CTGF beeinflussen, welche wiederum das bessere Anhaften von Zellen an Fibronectin ermöglicht. Fibronectin allein konnte allerdings im Vergleich zu den Stromazelllinien nur eine leichte CTGF-Expression induzieren. Dies wiederum könnte ein Hinweis dafür sein, dass noch weitere, von den Stromazellen exprimierte Proteine die CTGF-Transkription steuern. Inwiefern Fibronectin an der CTGF-Regulation in AML-Zellen beteiligt ist, könnte durch Fibronectin-*Knockdown*-Stromazellen weiter untersucht werden.

5.2.2 Die Beteiligung des Hippo-Signalweges an CTGF-Expression und Resistenzverhalten

Mit Hilfe vieler Studien ist der Hippo-Signalweg in *Drosophila* und humanem Gewebe in physiologischen wie in malignen Prozessen mittlerweile gut charakterisiert. Die Funktion innerhalb der normalen Hämatopoese ist bisher nur in wenigen Arbeiten untersucht. Jonas Larsson³ und Lina Jansson⁴ konnten mit ihren Ergebnissen erste wichtige Hinweise über die Rolle des Hippo-Signalwegs im hämatopoetischen System liefern. Neurofibromatosis 2 (Nf2) ist ein bekannter upstream-Regulator des Hippo-Signalwegs (Hamaratoglu et al. 2006) und scheint in die Regulation der HSCs innerhalb der Nische einzugreifen. Larsson et al. (2008) konnten zeigen, dass Nf2-defiziente Mäuse eine verstärkte Anzahl von HSCs und eine gesteigerte Mobilisierung der Zellen ins periphere Blut aufweisen. Expressionsstudien untersuchten die Funktion von YAP und TAZ in der normalen Hämatopoese. Die Überexpression von YAP im hämatopoetischen System hatte keinen Einfluss auf die Funktion der HSC und die Hämatopoese *in vivo* (Jansson und Larsson 2012). Die Untersuchung von Mäusen mit hetero- oder homozygoter TAZ-Defizienz ergab, dass keine Defekte in der reifen Hämatopoese beobachtet wurden. Die embryonale Hämatopoese homozygoter Mäuse scheint teilweise beeinträchtigt, wobei dies noch weiterer Untersuchungen bedarf (unveröffentlichte Daten, persönliche Kommunikation mit Lina Jansson und Jonas Larsson). Auch wenn diese ersten Daten die Relevanz von YAP und TAZ in der normalen Hämatopoese einschränken, mag in malignen hämatologischen Prozessen der Hippo-Signalweg von wichtiger Bedeutung sein. Die Beteiligung des Hippo-Signalwegs an der Pathogenese der AML ist bisher noch nicht beschrieben worden. Bekannt ist nur, dass Mst1/2-*Knockout*-Mäuse eine erhöhte Wahrscheinlichkeit besitzen, an T-Zell ALL zu erkranken (O'Neill et al. 2005).

Die Tatsache, dass CTGF in Molm-14-Zellen nach Kokultivierung mit Stroma – und dabei nur nach direkter Zell-Zell-Interaktion – hochreguliert wurde, ließ auf die Beteiligung des Hippo-Signalwegs schließen, da dieser Zielgene wie CTGF in Abhängigkeit vom Kontakt zum Untergrund reguliert (Dupont et al. 2011). Weitere Versuche unterstützten die Überlegung, dass der Hippo-Signalweg an der Regulation von CTGF in AML-Zellen beteiligt sein könnte. So wurde in Western Blot-Versuchen die Stabilisierung von TAZ in kokultivierten Molm-14-Zellen detektiert. Hier konnte TAZ allerdings nur in stark adhärennten Molm-14-Zellen nachgewiesen werden (s. Abb. 4.11). TAZ scheint nur kurze Zeit stabil zu sein und nach Verlust des adhärennten Kontakts zum Stroma abgebaut zu werden. Die CTGF-RNA hingegen war auch in Suspensionszellen nachzuweisen (s.o.). Daher ist es möglich, dass eine kurze Stabilisierung von TAZ zu einem langanhaltenden Signal in den Zellen führt.

³Institut für Molekulare Medizin und Gentherapie, Universität Lund, Schweden

⁴Institut für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Universität Stanford, USA, ehemals Institut für Molekulare Medizin und Gentherapie, Universität Lund, Schweden

Neben CTGF ist Cyr61 ein bekanntes von dem Hippo-Signalweg gesteuertes Gen (Lai et al. 2011, Zhang et al. 2011). qPCR-Versuche zeigten, dass Cyr61 wie CTGF in kokultivierten AML-Zelllinien hochreguliert wird. Diese Hochregulation war zudem deutlich stärker als die von CTGF (s. Abb. 4.12). Die Regulation von Cyr61 ist ebenfalls in vielen soliden Tumoren untersucht worden. Es konnte gezeigt werden, dass Cyr61 wie CTGF in vielen Karzinomen überexprimiert wird und dies mit Therapieresistenz, einem aggressiven Phänotyp und einer schlechten Prognose assoziiert ist (Gery et al. 2005, Goodwin et al. 2010, Lai et al. 2011, Haque et al. 2011). Allerdings gibt es auch hier Tumorentitäten, bei denen Cyr61 die Eigenschaften eines Tumorsuppressors besitzt (Tong et al. 2001, Chien et al. 2004). Die Rolle von Cyr61 in der Leukämie ist bisher nicht dokumentiert. Aufgrund der hohen Regulation von Cyr61 in AML-Zellen nach Kontakt zu Stroma wäre es in einem nächsten Schritt interessant, die Bedeutung des Proteins für das Überleben der malignen Zellen zu untersuchen. Wie bereits bei CTGF durchgeführt (s. Kapitel 5.2.3 Funktionelle Relevanz der CTGF-Regulation) könnte auch bei diesem Protein durch shRNA-induzierten *Knockdown* die Expression des Gens in AML-Zellen reduziert und die Auswirkungen auf Therapieresistenz analysiert werden. Die Transplantation von AML-Zellen mit *Cyr61-Knockdown* in NSG-Mäuse könnte den Einfluss der Cyr61-Expression auf die Tumorprogression und das Überleben *in vivo* untersuchen. Parallel dazu könnte ein blockierender anti-Cyr61 Antikörper wie Ym1B im Tiermodell eingesetzt werden. Ym1B wirkte in Zellkulturversuchen mit Brustkrebszellen hemmend auf Signalwege, die mit der Migration der Zellen verbunden sind (Jim Leu et al. 2013). Denkbar wäre auch eine kombinierte Therapie mit FG-3019 und einem blockierenden Cyr61-Antikörper.

Einen weiteren Hinweis auf die Beteiligung des Hippo-Signalwegs an der CTGF-Regulation lieferten Versuche, die zeigten, dass CTGF und Cyr61 in Abhängigkeit von der Zelldichte der kokultivierten Molm-14-Zellen exprimiert werden. Die Expression war jeweils ca. 5-fach und 3-fach erhöht, wenn die Zellen in einer 4-fach niedrigeren Konzentration ausgesät wurden (s. Abb. 4.13). Um das Organwachstum zu limitieren, wird der Hippo-Signalweg über Zell-Zell-Kontakte reguliert (Zhao et al. 2007). Möglich wäre daher, dass eine niedrigere Zelldichte dazu beiträgt, dass die Molm-14-Zellen mehr Kontakt zum Stroma aufbauen können, was eine stärkere YAP/TAZ-Aktivierung mit höherer CTGF/Cyr61-Expression nach sich zöge. Eine höhere Zellzahl würde im Gegenzug eine stärkere Konkurrenz um den Platz an den Stromazellen mit sich bringen und in einer schwächeren YAP/TAZ-Aktivierung und niedrigerer CTGF/Cyr61-Expression resultieren. Die Kultivierung von Molm-14-Zellen in unterschiedlicher Dichte ohne Stromazellen induzierte keine Veränderungen in der CTGF/Cyr61-Expression (Daten nicht gezeigt). Dies weist darauf hin, dass in leukämischen Zellen YAP und TAZ nicht wie in anderen Organen durch den

Kontakt zu Nachbar-Zellen beeinflusst werden. Stattdessen werden YAP und TAZ scheinbar ausschließlich durch den adhärenen Kontakt zu Stromazellen reguliert. Man kann daher nicht direkt von einer Regulation durch Kontakt-Inhibition sprechen, wie es in anderen Organen beschrieben wird. Eine Kontakt-*Aktivierung* nach Adhärenz auf Stroma (oder Fibronectin) würde die hier dargestellten Daten besser zusammenfassen. Denkbar wäre ein Szenario, in dem nach Transformation einer unreifen hämatopoetischen in eine maligne Zelle, diese durch Kontakt zu den Zellen der Nische im Knochenmark CTGF hochreguliert und Überlebensvorteile erlangt (s. Kapitel 5.2.3). Dies könnte zur unkontrollierten Vermehrung der Zellen führen. Sobald aufgrund der steigenden Zellzahl ein ausreichender Kontakt zum supportiven Stroma nicht mehr gewährleistet ist, könnte die daraus resultierende reduzierte CTGF-Expression wiederum Signale einleiten, welche die Ausschwemmung der Zellen in die Peripherie fördern, was mit dem Befall anderer Organe verbunden wäre. Um dies näher zu untersuchen, könnte in Proben von AML-Patienten gemessen werden, ob die CTGF-Expression in malignen Zellen des Knochenmarks höher ist als in malignen Zellen des peripheren Bluts. Des Weiteren könnte analysiert werden, ob CTGF die Expression von CXCR4 beeinflusst. Eine reduzierte CXCR4-Expression könnte mit einem verminderten Anhaften an die Zellen der Nische und dadurch mit einer erhöhten Bereitschaft zum Verlassen des Knochenmarks verbunden sein.

Den deutlichsten Hinweis auf eine TAZ-abhängige CTGF-Expression brachten Versuche, in denen TAZ in Molm-14-Zellen durch eine shRNA herunterreguliert wurde. Dies führte zu einer signifikant reduzierten Hochregulation von CTGF in kokultivierten Molm-14-Zellen (s. Abb. 4.16). Die Cyr61-Expression war allerdings nicht von dem TAZ-*Knockdown* betroffen. Möglich wäre, dass YAP die Cyr61-Transkription reguliert und so das reduzierte Vorhandensein von TAZ keine Auswirkungen auf die Cyr61-Expression besäße. Der TAZ-*Knockdown* führte weiterhin zu einer verminderten Proliferation der Molm-14-Zellen (s. Abb. 4.15), welche dadurch erst drei Wochen nach der Transduktion für Versuche eingesetzt werden konnten. Auch andere Studien beschreiben eine verlangsamte Zellteilung, nachdem TAZ herunterreguliert wurde (Chan et al. 2008, Zhou et al. 2011). Die Molm-14shTAZ-Zellen besaßen weiterhin eine verminderte, wenn auch nicht signifikante Sensibilität gegenüber AraC (s. Abb. 4.17). Da AraC nur Zellzyklus-abhängig wirkt, ist dies wahrscheinlich auf die reduzierte Zellteilungsrate zurückzuführen. Im Anschluss durchgeführte Kokulturversuche zeigten, dass der TAZ-*Knockdown* in Molm-14-Zellen den Stroma-vermittelten Schutz gegenüber der Chemotherapie reduzierte (s. Abb. 4.17). Die adhärenente Fraktion der Kontrollzellen war nach AraC-Behandlung zu 59 % vor der Apoptose geschützt, wohingegen nach TAZ-*Knockdown* nur 38 % der Zellen resistent gegenüber der Therapie waren. Dieser Versuch zeigt, dass TAZ bei der AML in die Stroma-vermittelte Therapieresistenz involviert zu sein scheint. Möglicherweise ist der reduzierte Schutz der TAZ-*Knockdown*-Zellen auf die reduzierte

Expression von CTGF zurückzuführen, welches als *downstream*-Mediator von TAZ protektive Signalwege in Gang setzen könnte (s. Kapitel 5.2.3). Denkbar wäre auch, dass durch TAZ weitere Gene beeinflusst werden, die an der Stroma-vermittelten Resistenz beteiligt und durch den TAZ-*Knockdown* betroffen sind. Im Kolonkarzinom konnte AXL als Zielgen von TAZ identifiziert werden (Yuen et al. 2013). Die Rezeptor-Tyrosinkinase AXL wurde als wichtiger Mediator in der AML-Stroma-Interaktion beschrieben (Ben-Batalla et al. 2013). Weiterhin ist bekannt, dass TAZ die Transkription von Survivin (auch Baculoviral IAP repeat containing 5, BIRC5), ein anti-apoptotisches Protein, reguliert (Zhang et al. 2009). Survivin ist in leukämischen Stamm- und Vorläuferzellen von AML-Patienten hoch exprimiert und mit einer schlechten Prognose verbunden (Carter et al. 2012). Da diese Daten zeigen, dass AXL wie Survivin AML-Zellen Überlebensvorteile vermitteln, wäre es interessant, deren Regulation durch TAZ im Zusammenhang mit der Stroma-vermittelten Resistenz näher zu untersuchen.

Die Überexpression von TAZ führte zu keiner verstärkten CTGF- oder Cyr61-Expression (s. Abb. 4.14c). Dies könnte darauf beruhen, dass TAZ als Kofaktor auf die Transkription wirkt. TAZ selbst besitzt keine DNA-Bindungsdomäne, sondern nimmt vor allem mit Hilfe der TEAD-Transkriptionsfaktoren Einfluss auf die Genexpression (Zhang et al. 2009, Lai et al. 2011). Möglich wäre daher, dass eine niedrige TEAD-Konzentration die Auswirkung der TAZ-Überexpression limitiert. Falls qPCR-Experimente eine niedrige TEAD-Expression bestätigen, könnte versucht werden, TEAD ebenfalls überzuexprimieren. Da TEAD 3 und 4 am stärksten durch TAZ aktiviert werden, wäre eines dieser Proteine für den Versuch am geeignetsten. Die Folgen einer TAZ-Überexpression sind in verschiedenen Studien charakterisiert worden und machen das maligne Potential des Onkogens deutlich. So führte die TAZ-Überexpression in Lungenepithel zu starker Proliferation und Kontakt-unabhängigem Wachstum. In Brustepithel förderte es Migration und Invasion der Zellen (Chan et al. 2008, Zhou et al. 2011). In Brustkrebszellen war die Überexpression einer konstitutiv aktiven Variante von TAZ mit einer erhöhten Selbsterneuerungskapazität und einer Vergrößerung der Krebsstammzellpopulation verbunden. Außerdem konnte eine verstärkte Transkription der Zielgene CTGF und Survivin detektiert werden (Cordenonsi et al. 2011). Falls TEAD die TAZ-Funktion in AML-Zellen limitiert, so scheint dies in Brustkrebszellen also nicht zuzutreffen. Die TAZ-Überexpression führte in den vorliegenden Versuchen tendenziell eher zu einer niedrigeren CTGF- und Cyr61-Expression. Da die TAZ-mRNA ca. 1800-fach erhöht (s. Abb. 4.14a) und TAZ damit sehr stark überexprimiert war, wäre eine denkbare Erklärung, dass TAZ im Sinne eines negativen-feedback-Mechanismus über unbekannte Signalwege Einfluss auf die CTGF und Cyr61-Expression nimmt. Möglicherweise wäre eine Reduktion des Virustiters sinnvoll, um die Überexpression zu vermindern und Rückkopplungsmechanismen einzudämmen.

Das hämatopoetische System ist im Gegensatz zu allen anderen Organen ein flüssiges Gewebe. Verglichen mit epithelialen Zellen wird das Wachstum dieser Zellen *in vitro* nicht durch Kontakt-Inhibition eingeschränkt. Dies mag ein Grund dafür sein, dass bisher nur wenige Untersuchungen über die Bedeutung des durch Zell-Zell-Kontakt regulierten Hippo-Signalwegs für die Hämatopoese durchgeführt wurden. Dennoch wird die HSC wie die LSC in der hämatopoetischen Nische durch Zell-Zell-Kontakt zu Stromazellen reguliert und könnte in dieser Situation auch vom Hippo-Signalweg beeinflusst werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit geben einige erste Hinweise auf die Beteiligung des Hippo-Signalwegs an der CTGF-Expression in kokultivierten AML-Zellen. Für eine sichere Aussage bedarf es jedoch weiterer, ausführlicherer Untersuchungen.

5.2.3 Funktionelle Relevanz der CTGF-Regulation

Um die Bedeutung von CTGF innerhalb der Stroma-vermittelten Resistenz zu untersuchen, wurde die CTGF-Expression in den drei AML-Zelllinien Molm-14, Oci-AML3 und MV4-11 durch shRNA-vermittelten *Knockdown* herunterreguliert. Dies führte in Molm-14-Zellen zu einer 2-fach erhöhten Proliferation, in Oci-AML3- und MV4-11-Zellen hatte der *Knockdown* keinen Einfluss auf die Zellteilung (s. Abb. 4.18). Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den Daten der Literatur, in denen CTGF als Wachstumsfaktor beschrieben wird und der *Knockdown* in verschiedenen Krebszellen eine Reduktion der Proliferation verursachte (Croci et al. 2004, Finger et al. 2013, Lu et al. 2013). Bisher wurde der *Knockdown* in AML-Zellen noch nicht untersucht. Möglich wäre, dass CTGF, abhängig vom jeweiligen Zelltyp, unterschiedliche Auswirkungen auf die Proliferation besitzt. Weiterhin könnte die erhöhte Zellteilung in Molm-14-Zellen auf einen Rückkopplungsmechanismus in den Zellen zurückzuführen sein. Dabei könnte die reduzierte CTGF-Expression Signalwege in Gang setzen, die die Proliferation stimulieren. Um dies detaillierter zu untersuchen, wäre es zum einen wichtig, die Auswirkungen des *Knockdowns* auf die Proliferation über einen längeren Zeitraum zu dokumentieren. Zum anderen ließe die Verwendung eines Doxycyclin-gesteuerten induzierbaren Vektorsystems die genauere Untersuchung des CTGF-*Knockdowns* zu. Auch für die Dokumentation der Proliferation nach TAZ-*Knockdown* scheint dieses System sehr sinnvoll. Hierbei hat die Selektion der transduzierten Zellen bereits stattgefunden, wenn die Expression der shRNA durch die Gabe von Doxycyclin induziert wird und die Auswirkung des *Knockdowns* kann direkt untersucht werden. In dieser Arbeit wurde kein induzierbares Vektorsystem eingesetzt. Die transduzierten Zelllinien konnten daher erst nach Abschluss der Selektion für Proliferationsuntersuchungen und Kokulturversuche verwendet werden. Dies war bei CTGF-*Knockdown* eine Woche, bei TAZ-*Knockdown* drei Wochen nach Transduktion möglich. Durch diese Verzögerung kann es sein, dass frühe Effekte des *Knockdowns* auf Signalwege nicht bemerkt werden konnten.

Der Einfluss von CTGF auf die Stroma-vermittelte Resistenz wurde in Kokulturerfahrungen deutlich. Der CTGF-*Knockdown* verursachte in Molm-14-Zellen nach Kultivierung auf Stroma eine signifikante Verminderung des Schutzes gegenüber der Chemotherapie im Vergleich zu den Kontrollzellen. Dies konnte sowohl in der Suspensionsfraktion als auch in der adhärenen Fraktion der Kokultur gemessen werden (s. Abb. 4.19a). Auch die Therapieresistenz, die durch Kontakt zu Fibronectin vermittelt wird, war in diesen Zellen signifikant reduziert (s. Abb. 4.20). In der hämatopoetischen Nische vermittelt der Kontakt zu Stroma Quieszenz, die in LSCs zu Therapieresistenz führt (Ishikawa et al. 2007). Interessant wäre es, in einem nächsten Schritt zu untersuchen, ob CTGF in Molm-14-Zellen an Quieszenzmechanismen beteiligt ist. Um dies zu analysieren, könnten kokultivierte Molm-14-Zellen mit CTGF-*Knockdown* durch Pyronin Y und Hoechst 33342 gefärbt werden. Diese Färbung basiert auf der Feststellung, dass Zellen in der G₀-Phase des Zellzyklus eine niedrigere Genexpression und daher weniger RNA aufweisen. Durch die Bindung von Pyronin Y an RNA und Hoechst 33342 an DNA kann das RNA-DNA-Verhältnis im Durchflusszytometer gemessen und proliferierende von ruhenden Zellen unterschieden werden (Shapiro 1981, Gothot et al. 1997). Denkbar wäre, dass der Kontakt zu Stroma (oder auch allein zu Fibronectin) in Molm-14-Zellen eine Verlangsamung des Zellzyklus verursacht und dies mit einer reduzierten Sensibilität gegenüber AraC verbunden ist. Die erhöhte Proliferation nach CTGF-*Knockdown* könnte der Stroma-induzierte Quieszenz teilweise entgegenwirken und der erhöhten Sensibilität gegenüber AraC in der Kokultur zu Grunde liegen. Widersprüchlich dazu steht die Beobachtung, dass die erhöhte Proliferation in Monokultur keinen Einfluss auf die Empfindlichkeit gegenüber AraC nimmt (s. Abb. 4.19a). Scheinbar sind in kokultivierten Molm-14-Zellen weitere Stroma-abhängige Signalwege an der erhöhten Chemosensibilität nach dem *Knockdown* beteiligt.

Des Weiteren wäre es sinnvoll, die Folge einer CTGF-Überexpression in AML-Zellen zu untersuchen. In Brustkrebszellen führt die CTGF-Überexpression zu einer erhöhten Migration der Zellen (Chen et al. 2007), in Rhabdomyosarkomzellen hingegen war die Behandlung mit rekombinantem CTGF mit einer verstärkten Differenzierung verbunden (Crocì et al. 2004). Dies spiegelt die Zelltyp-abhängige Funktion von CTGF wider. Bisher sind die Auswirkungen einer induzierten CTGF-Überexpression in leukämischen Zellen nicht beschrieben. Ergänzend zu den *Knockdown*-Ergebnissen dieser Arbeit könnte der Einfluss einer erhöhten CTGF-Konzentration auf Proliferation, Überleben und Therapieresistenz analysiert werden.

Auch in in MV4-11-Zellen konnte die Therapieresistenz in der adhärenen Fraktion der Kokultur nach CTGF-*Knockdown* teilweise aufgehoben werden (s. Abb. 4.19b). Allerdings war in MV4-11-Zellen der Stroma-vermittelte Schutz insgesamt nicht so

deutlich ausgeprägt wie in Molm-14-Zellen. In weiteren Versuchen könnte eine andere Stromazelllinie (wie AFT024) verwendet werden, die gegenüber MV4-11-Zellen möglicherweise supportiver wirkt.

Im Gegensatz zu Molm-14- und MV4-11-Zellen hatte der CTGF-*Knockdown* in Oci-AML3-Zellen bereits in Monokultur einen signifikanten Effekt auf die Apoptose nach Behandlung mit AraC (s. Abb. 4.19c). Auch in ALL-Zellen wurde eine erhöhte Chemosensitivität nach CTGF-*Knockdown* beobachtet (Lu et al. 2013). Dies zeigt, dass CTGF auch in autokrin-induzierte Signalwege, die unabhängig vom Kontakt zum Stroma stattfinden, involviert ist. Molm-14- und MV4-11-Zellen besitzen eine aktivierende Mutation in der Tyrosinkinase FLT3, die bei AML-Patienten mit einer schlechten Prognose und Therapieresistenz verbunden ist (Kottaridis et al. 2001). Diese Mutation ist in Oci-AML3-Zellen nicht vorhanden. Molm-14- und MV4-11-Zellen sind daher möglicherweise in Monokultur größtenteils unabhängig von CTGF und daher in einem gewissen Rahmen resistent gegenüber Apoptose-Signalen, die durch den Verlust von CTGF ausgelöst werden. Erst in der Kokultur ist CTGF an Resistenzmechanismen beteiligt und der *Knockdown* des Gens führt zu einer partiellen Aufhebung der protektiven Signale.

Um die Funktion von CTGF im Mausmodell zu untersuchen, wurde der blockierende anti-CTGF Antikörper FG-3019 eingesetzt. In anderen malignen Erkrankungen, in denen CTGF überexprimiert ist und dies mit einem aggressiven Tumorwachstum korreliert, konnten im Tierversuch durch die Behandlung mit diesem Antikörper bereits Erfolge verzeichnet werden. Die Metastasierung der malignen Zellen war eingeschränkt, Apoptose wurde ausgelöst und das Überleben der Versuchstiere verlängert. Zudem wurden synergistische Effekte zu der verabreichten Chemotherapie beobachtet (Dornhöfer et al. 2006, Finger et al. 2013, Neesse et al. 2013, Lu et al. 2013). Die Behandlung von Molm-14-Zellen mit FG-3019 *in vitro* hatte keinen Einfluss auf die Apoptose (s. Abb. 4.21). Dies steht in Einklang mit den Daten der shRNA-Versuche, bei denen der *Knockdown* von CTGF *per se* keine Auswirkung auf die Apoptose zeigte (s. Abb. 4.19a). Die Auswirkung der Behandlung mit FG-3019 auf Chemotherapieresistenz, Proliferation oder Differenzierung der AML-Zellen wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht. In *in vitro*-Studien mit ALL-Zellen und Pankreaskarzinom-Zellen besaß FG-3019 – im Gegensatz zu den parallel durchgeführten CTGF-*Knockdown*-Experimenten – keinen Einfluss auf die Proliferation oder die Sensitivität gegenüber Chemotherapie (Dornhöfer et al. 2006, Lu et al. 2013). Möglicherweise lassen sich die Effekte des *Knockdowns* und des Antikörpers in ihrer Gesamtheit nicht miteinander vergleichen, da beide an unterschiedlichen Stellen in die CTGF-Funktion eingreifen. Die shRNA wirkt bereits nach der Transkription, wohingegen der Antikörper erst extrazellulär an das fertige Protein bindet. Falls CTGF auch intrazellulär wirken sollte, könnte dies durch den

Antikörper nicht beeinflusst werden. Außerdem könnten verschiedene posttranslationale Modifikationen dazu führen, dass der Antikörper nicht mehr bindet und dies seine Wirkung einschränken.

In dieser Arbeit wurde bestätigt, dass FG-3019 einen hemmenden Einfluss auf die Tumorprogression besitzt. Im AML-Mausmodell konnte durch die Behandlung mit FG-3019 das mittlere Überleben der Tiere von 20,5 auf 25 Tage verlängert werden (s. Abb. 4.22b). Zum Zeitpunkt der Sektion zeigten die Mäuse der Kontrollgruppe und der FG-3019-Gruppe keine Unterschiede in der Infiltration der Milz, des Bluts oder des Knochenmarks; auch das Gewicht der Milz war nicht signifikant verändert (s. Abb. 4.22d-g). FG-3019 beeinflusste also nicht den bevorzugten Ausbreitungsort der malignen Zellen. In zwei der vier veröffentlichten Studien über die Behandlung von Tumorerkrankungen mit FG-3019 im Mausmodell zeigte der Antikörper nur Wirkung in Kombination mit Chemotherapie (Lu et al. 2013, Neesse et al. 2013). Daher wäre es sinnvoll zu untersuchen, ob auch im AML-Modell die Kombinationstherapie zu einer weiteren und signifikanten Verlängerung des Überlebens beitragen kann.

FG-3019 ist kein human-spezifischer Antikörper, weshalb in Mausversuchen nicht auszuschließen ist, dass die Wirkung des Antikörpers zum Teil auch von der Hemmung des vom Stroma produzierten CTGF abhängt, wie auch Dornhöfer et al. (2006) zu bedenken geben. Im AML-Mausmodell wurde die tumorhemmende Wirkung des vom Stroma produzierten CTGF beschrieben, die den Nutzen einer anti-CTGF-Therapie einschränken würde (Battula et al. 2013). Da allerdings in den malignen Zellen unterschiedlichster Tumore CTGF stark überexprimiert wird und dies mit einer schlechten Prognose assoziiert ist, ist es wahrscheinlich, dass der therapeutische Nutzen einer gegen CTGF gerichteten Behandlung überwiegt. Erste Erfolge konnten in einer Phase I-Studie bei fortgeschrittenem Pankreaskarzinom verzeichnet werden. Die Kombination aus Chemotherapie und FG-3019 wurde gut vertragen und vorläufige Ergebnisse deuteten auf ein verlängertes Überleben der Patienten in Abhängigkeit von steigender FG-3019-Gabe hin⁵.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass CTGF in der AML eine wichtige Funktion innerhalb der Therapieresistenz und der Tumorprogression einnimmt. Die Daten lassen vermuten, dass CTGF durch adhärenenten Kontakt zu Stroma in AML-Zellen hochreguliert wird und dies zu Therapieresistenz führt. Außerdem scheint TAZ, ein zentraler Transkriptions-Kofaktor des Hippo-Signalwegs, wesentlich an der CTGF-Regulation beteiligt zu sein (s. Abb. 5.1).

⁵Posterbeitrag auf dem Gastrointestinal Cancers Symposium 2013, #213 FG-3019, a human monoclonal antibody to CTGF, with gemcitabine/erlotinib in patients with locally advanced or metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma, Studiennummer: NCT01181245, Abstract: <http://meetinglibrary.asco.org/content/106279-133>, Stand 20.2.2013

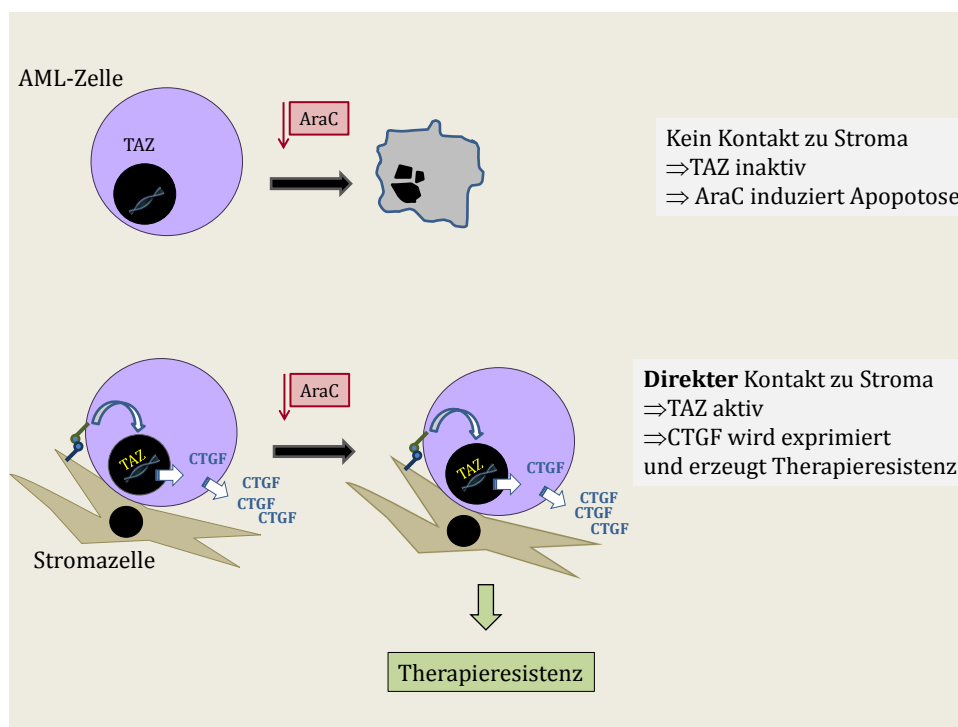


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung der CTGF-Regulation in AML-Zellen. Die Daten der vorliegenden Arbeit lassen vermuten, dass CTGF nach direktem Kontakt zu Stromazellen in AML-Zellen hochreguliert wird und dies Signalwege in Gang setzt, die zu Therapieresistenz führen. TAZ, ein zentraler Transkriptions-Kofaktor des Hippo-Signalwegs, scheint durch den Kontakt aktiviert zu werden und die CTGF-Transkription zu initiieren.

Nachgeschaltete Signalwege von CTGF wurden in dieser Arbeit nicht detailliert untersucht. In ALL-Zellen wurde beschrieben, dass der CTGF-*Knockdown* mit der Deaktivierung von Proteinen des AKT/mTOR-Signalwegs und erhöhter Expression des Zellzyklusregulators p27 verbunden war (Lu et al. 2013). In Pankreaskarzinomzellen verursachte FG-3019 hingegen die Herunterregulation von p27. Zusätzlich waren Proteine, die an Überlebenssignalwegen beteiligt sind, in ihrer Expression reduziert (Neesse et al. 2013). Diese und weitere Proteine könnten auch in AML-Zellen nach CTGF-*Knockdown* oder Behandlung mit FG-3019 untersucht werden, um wichtige Hinweise bezüglich der Überlebenssignalwege und der Resistenzmechanismen in diesen Zellen zu bekommen. Bekannt ist weiterhin, dass CTGF an Integrine bindet und so intrazelluläre Signalwege steuert (Chen et al. 2001, 2007, Tan et al. 2009). In MS5-Zellen wurde nach Kontakt zu Stroma im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Hochregulation verschiedener Integrine beobachtet (Daten nicht gezeigt). Diese Regulation müsste in weiteren Versuchen zunächst verifiziert werden, bevor ein Zusammenhang mit CTGF-Expression und Resistenzmechanismen untersucht werden könnte. Denkbar wäre, dass der Kontakt zum Stroma in AML-Zellen CTGF hochreguliert, dieses wiederum an Integrine der Stromazellen

bindet und neben der Hochregulation der Integrine, im Sinne eines positiven Feedbacks, Signalwege induziert, die wiederum protektiv auf die AML-Zellen wirken. Diese spekulativen Überlegungen könnten die Basis zukünftiger Forschungsarbeiten sein.

Zusammenfassung

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine heterogene Erkrankung der hämatopoetischen Vorläuferzelle, die durch unkontrollierte Vermehrung und ein reduziertes Differenzierungsverhalten gekennzeichnet ist. Aufgrund von Therapieresistenzen und häufig vorkommenden Rückfällen ist die AML mit einer schlechten Langzeitprognose verbunden. Neue Studienergebnisse zeigen, dass leukämische Zellen einer hierarchischen Ordnung unterliegen, an deren Spitze die leukämische Stammzelle (LSC) steht, welche den Tumor speist und ähnliche Charakteristika besitzt wie die hämatopoetische Stammzelle (HSC). Die LSC nutzt den Kontakt zu Zellen der hämatopoetischen Nische des Knochenmarks, um die erste Therapie zu überdauern und Resistenzen zu erwerben. Neue Therapieansätze versuchen diese Interaktion zwischen leukämischen Zellen und supportiv wirkenden Stromazellen anzugreifen.

In dieser Arbeit sollte die Bedeutung des CXC-Motiv Chemokinrezeptors Typ 4 (CXCR4) und des Connective Tissue Growth Factors (CTGF) innerhalb der AML-Stroma-Interaktion untersucht werden. CXCR4, der *in vivo* dafür sorgt, dass AML-Zellen in der Nische gehalten und geschützt werden, wurde durch den neuwertigen CXCR4-spezifischen Antikörper BMS-936564/MDX-1338 in AML-Zelllinien und Patientenzellen in Zellkulturversuchen blockiert. Dies induzierte Apoptose sowie Differenzierung und führte in Kokulturversuchen zu einer Aufhebung des Stromavermittelten Schutzes gegenüber der Chemotherapie. Für diese Effekte musste teilweise ein sekundärer Antikörper verwendet werden, der die CXCR4-Moleküle miteinander kreuzvernetzt. Die Auswertung eines quantitativen Real time PCR (qPCR)-Arrays ergab, dass CTGF in der AML-Zelllinie Molm-14 nach Kontakt zu Stromazellen hochreguliert wird. Diese Hochregulation konnte in insgesamt drei AML-Zelllinien sowie in drei Patientenproben in qPCR- und Western Blot-Versuchen bestätigt werden. Weitere Untersuchungen zeigten, dass diese Hochregulation unabhängig von der Stromazelllinie ist, den direkten Kontakt zum Stroma benötigt und auch unter hypoxischen Bedingungen, wie sie innerhalb des Knochenmarks vorherrschen, stattfindet. Der durch Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Kontakt gesteuerte Hippo-Signalweg konnte aus folgenden Gründen als möglicher *upstream*-Regulationsmechanismus identifiziert werden: (i) Dessen zentraler Transkriptionskofaktor TAZ wird in kokultivierten Molm-14-Zellen stabilisiert, (ii) der shRNA-gesteuerte *Knockdown* von TAZ führt zu einer reduzierten CTGF-Hochregulation,

(iii) CTGF wird in Abhängigkeit von der Zelldichte reguliert, (iv) Cysteine-rich angiogenic inducer 61 (Cyr61), ein weiteres Zielgen von TAZ, wird in kokultivierten AML-Zellen ebenfalls verstärkt exprimiert. Der *Knockdown* von CTGF führte *in vitro* zu einer partiellen Aufhebung der Stroma-vermittelten Resistenz und die Blockierung von CTGF durch den Antikörper FG-3019 wirkte im AML-Mausmodell lebensverlängernd.

Die Rolle von CTGF in der AML ist bisher nicht untersucht. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass CTGF ein interessantes Therapieziel in der AML darstellt. Es bedarf weiterer Untersuchungen, um die Bedeutung von CTGF in der Tumor-Stroma-Interaktion näher zu charakterisieren und nachgeschaltete Signalwege zu identifizieren.

Anhang

A

Ergebnisse qPCR Array Molm-14

Protein		Regulation		
Symbol	Beschreibung	Position	Molm14	p-Wert
ADAMTS1	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 1	A01	1,04	0,780319
ADAMTS13	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 13	A02	1,03	0,825508
ADAMTS8	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 8	A03	0,78	0,226420
CD44	CD44	A04	1,00	0,489915
CDH1	E-cadherin (epithelial)	A05	0,96	0,922225
CNTN1	Contactin 1	A06	0,99	0,983006
COL11A1	Collagen, type XI, alpha 1	A07	0,96	0,922225
COL12A1	Collagen, type XII, alpha 1	A08	1,07	0,668466
COL14A1	Collagen, type XIV, alpha 1	A09	1,04	0,783202
COL15A1	Collagen, type XV, alpha 1	A10	0,59	0,246666
COL16A1	Collagen, type XVI, alpha 1	A11	0,96	0,922225
COL1A1	Collagen, type I, alpha 1	A12	5,53	0,014565
COL4A2	Collagen, type IV, alpha 2	B01	1,77	0,417436
COL5A1	Collagen, type V, alpha 1	B02	0,98	0,988471
COL6A1	Collagen, type VI, alpha 1	B03	0,96	0,922225
COL6A2	Collagen, type VI, alpha 2	B04	0,96	0,922225
COL7A1	Collagen, type VII, alpha 1	B05	1,44	0,225759
COL8A1	Collagen, type VIII, alpha 1	B06	0,96	0,922225
VCAN	Versican	B07	0,29	0,150773
CTGF	Connective tissue growth factor	B08	4,06	0,076762
CTNNA1	Catenin (cadherin-associated protein), alpha 1, 102kDa	B09	0,89	0,284580
CTNNB1	Catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa	B10	0,98	0,306835
CTNND1	Catenin (cadherin-associated protein), delta 1	B11	1,23	0,991204
CTNND2	Catenin (cadherin-associated protein), delta 2	B12	0,96	0,922225

Protein		Regulation	
Symbol	Beschreibung	Position	Molm14 p-Wert
ECM1	Extracellular matrix protein 1	C01	1,85 0,248756
FN1	Fibronectin 1	C02	0,96 0,922225
HAS1	Hyaluronan synthase 1	C03	0,96 0,922225
ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1	C04	1,23 0,591982
ITGA1	Integrin, alpha 1	C05	1,30 0,509639
ITGA2	Integrin, alpha 2 (CD49B, alpha 2 subunit of VLA-2 receptor)	C06	1,00 0,801388
ITGA3	Integrin, alpha 3 (CD49C, alpha 3 subunit of VLA-3 receptor)	C07	0,96 0,922225
ITGA4	Integrin, alpha 4 (CD49D, alpha 4 subunit of VLA-4 receptor)	C08	0,81 0,575635
ITGA5	Integrin, alpha 5 (fibronectin receptor, alpha polypeptide)	C09	0,97 0,919964
ITGA6	Integrin, alpha 6	C10	1,87 0,690952
ITGA7	Integrin, alpha 7	C11	1,07 0,450753
ITGA8	Integrin, alpha 8	C12	0,96 0,922225
ITGAL	Integrin, alpha L	D01	0,51 0,053782
ITGAM	(antigen CD11A, lymphocyte function-associated antigen 1)	D02	1,64 0,285474
ITGAV	Integrin, alpha M (complement component 3 receptor 3 subunit)	D03	1,04 0,703731
	Integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, CD51)		
ITGB1	Integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, CD29)	D04	0,67 0,334508
ITGB2	Integrin, beta 2	D05	1,27 0,107648
	(complement component 3 receptor 3 and 4 subunit)		
ITGB3	Integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, CD61)	D06	1,76 0,220325
ITGB4	Integrin, beta 4	D07	1,03 0,760167
ITGB5	Integrin, beta 5	D08	3,00 0,173818
KAL1	Kallmann syndrome 1 sequence	D09	0,48 0,229952

Protein		Regulation		
Symbol	Beschreibung	Position	Molm14	p-Wert
LAMA1	Laminin, alpha 1	D10	0,96	0,922225
LAMA2	Laminin, alpha 2	D11	0,74	0,254000
LAMA3	Laminin, alpha 3	D12	0,97	0,944328
LAMB1	Laminin, beta 1	E01	1,45	0,212217
LAMB3	Laminin, beta 3	E02	0,58	0,168667
LAMC1	Laminin, gamma 1 (formerly LAMB2)	E03	0,68	0,221612
MMP1	Matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)	E04	0,96	0,922225
MMP10	Matrix metalloproteinase 10 (stromelysin 2)	E05	0,96	0,922225
MMP11	Matrix metalloproteinase 11 (stromelysin 3)	E06	0,80	0,419896
MMP12	Matrix metalloproteinase 12 (macrophage elastase)	E07	0,86	N/A
MMP13	Matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3)	E08	1,03	0,840358
MMP14	Matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted)	E09	1,02	0,955928
MMP15	Matrix metalloproteinase 15 (membrane-inserted)	E10	0,96	0,922225
MMP16	Matrix metalloproteinase 16 (membrane-inserted)	E11	0,96	0,922225
MMP2	Matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A)	E12	4,48	0,318028
MMP3	Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase)	F01	0,96	0,922225
MMP7	Matrix metalloproteinase 7 (matrilysin, uterine)	F02	0,96	0,922225
MMP8	Matrix metalloproteinase 8 (neutrophil collagenase)	F03	1,04	0,845494
MMP9	Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B)	F04	4,44	0,043078
NCAM1	Neural cell adhesion molecule 1	F05	0,95	0,693753
PECAM1	Platelet/endothelial cell adhesion molecule	F06	0,70	0,249233
SELE	Selectin E	F07	1,00	0,946280
SELL	Selectin L	F08	1,05	0,810907
SELP	Selectin P (granule membrane protein, CD62)	F09	0,96	0,922225

Protein		Regulation	
Symbol	Beschreibung	Position	Molm14 p- Wert
SGCE	Sarcoglycan, epsilon	F10	0,92 0,676775
SPARC	Secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)	F11	1,29 0,180149
SPG7	Spastic paraplegia 7, Paraplegin	F12	1,65 0,036848
SPP1	Secreted phosphoprotein 1	G01	1,24 0,436658
TGFBI	Transforming growth factor, beta-induced	G02	1,08 0,804861
THBS1	Thrombospondin 1	G03	1,12 0,454535
THBS2	Thrombospondin 2	G04	0,86 0,600935
THBS3	Thrombospondin 3	G05	1,50 0,154747
TIMP1	TIMP metalloproteinase inhibitor 1	G06	1,66 0,108923
TIMP2	TIMP metalloproteinase inhibitor 2	G07	1,26 0,389793
TIMP3	TIMP metalloproteinase inhibitor 3	G08	0,96 0,922225
CLEC3B	C-type lectin domain family 3, member B	G09	1,55 0,094168
TNC	Tenascin C	G10	1,14 0,482592
VCAM1	Vascular cell adhesion molecule 1	G11	0,98 0,986889
VTN	Vitronectin	G12	1,17 0,844814
B2M	Beta-2-microglobulin	H01	0,87 0,142141
HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	H02	1,14 0,144655
RPL13A	Ribosomal protein L13a	H03	1,03 0,990715
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	H04	0,66 0,232055
ACTB	Actin, beta	H05	1,12 0,778555

Tabelle A.1: Kompletter Datensatz der Transkriptionsanalyse nach Kokultivierung von Molm-14 mit MS5-Zellen (72h). Für jedes Protein ist - sortiert nach Position auf der Arrayplatte - dessen Regulation in der Kokultur und die statistische Auswertung angegeben. Jeder Wert entspricht dem Mittelwert von 5 unabhängigen Versuchen. Hochregulation ist rot, Herunterregulation grün markiert. Es wurde ein Array verwendet, der die Transkription von Proteinen der extrazellulären Matrix und von Adhäsionsmolekülen detektiert. Die letzten fünf Reihen geben die Regulation der Haushaltsgene wieder. Eine statistisch signifikante Regulation mit $p < 0,05$ ist grau markiert. N/A steht für ein Fehlen der statistischen Auswertung, da nur ein Wert gemessen werden konnten.

	Mittelwerte der Ct-Werte mit Standardabweichung				Regulation (KK/MK)
	Monokultur		Kokultur		
ADAMTS1	29,52	1,55	29,12	0,96	1,04
ADAMTS13	36,79	0,10	35,57	0,30	1,03
ADAMTS8	35,79	0,30	36,32	0,34	0,78
CD44	26,16	1,74	25,89	0,85	1,00
CDH1	40,00	0,00	36,52	0,00	0,96
CNTN1	40,00	0,00	36,88	0,09	0,99
COL11A1	40,00	0,00	37,97	0,00	0,96
COL12A1	40,00	0,00	34,67	0,34	1,07
COL14A1	38,43	0,00	38,70	0,25	1,04
COL15A1	34,91	1,23	34,74	1,05	0,57
COL16A1	40,00	0,00	36,01	0,00	0,96
COL1A1	34,79	0,46	32,23	1,06	5,53
COL4A2	29,75	1,89	28,43	1,48	1,77
COL5A1	35,62	0,37	35,36	0,26	0,98
COL6A1	36,21	0,00	36,12	0,00	0,96
COL6A2	40,00	0,00	39,77	0,00	0,96
COL7A1	36,44	0,00	35,24	0,85	1,44
COL8A1	39,19	0,00	39,58	0,00	0,96
VCAN	28,91	3,35	34,50	0,53	0,29
CTGF	31,52	1,53	29,54	1,34	4,06
CTNNA1	28,32	2,83	27,82	1,64	0,89
CTNNB1	27,67	2,12	27,39	0,93	0,98
CTNND1	30,46	1,63	29,73	1,10	1,23
CTNND2	40,00	0,00	N/A	0,00	0,96
ECM1	28,21	1,47	26,93	1,09	1,85
FN1	38,32	0,00	38,60	0,00	0,96
HAS1	38,44	0,00	37,92	0,00	0,96
ICAM1	28,65	1,33	27,96	1,69	1,23
ITGA1	35,45	1,19	33,81	1,01	1,30
ITGA2	34,24	0,64	34,89	0,66	1,00
ITGA3	40,00	0,00	38,44	0,00	0,96
ITGA4	25,96	0,40	26,15	0,99	0,81
ITGA5	26,75	0,66	26,69	0,80	0,97
ITGA6	31,55	2,66	29,80	2,24	1,87
ITGA7	30,02	0,67	29,68	1,55	1,07
ITGA8	40,00	0,00	40,00	0,00	0,96
ITGAL	24,96	0,24	25,80	0,93	0,51
ITGAM	29,77	1,42	28,63	0,94	1,64
ITGAV	29,26	0,54	29,01	0,53	1,04
ITGB1	25,94	1,14	26,41	1,13	0,67
ITGB2	24,14	0,67	23,54	0,53	1,27
ITGB3	36,16	1,13	33,52	1,66	1,76
ITGB4	34,84	0,47	34,13	0,68	1,03
ITGB5	32,08	1,91	30,92	2,26	3,00

	Mittelwerte der Ct-Werte mit Standardabweichung				Regulation
	Monokultur		Kokultur		(KK/MK)
KAL1	32,83	1,14	34,01	1,62	0,48
LAMA1	40,00	0,00	40,00	0,00	0,96
LAMA2	35,63	0,90	36,37	0,23	0,74
LAMA3	36,67	0,00	36,00	0,01	0,97
LAMB1	33,17	0,96	32,57	0,40	1,45
LAMB3	32,09	0,87	32,99	0,96	0,58
LAMC1	27,54	1,36	27,69	0,95	0,68
MMP1	40,00	0,00	37,77	0,00	0,96
MMP10	37,91	0,00	39,62	0,00	0,96
MMP11	36,29	0,58	37,60	0,17	0,80
MMP12	11,79	N/A	11,91	N/A	0,86
MMP13	40,00	0,00	36,96	0,21	1,03
MMP14	28,84	0,40	28,72	1,01	1,02
MMP15	40,00	0,00	40,00	0,00	0,96
MMP16	36,64	0,00	40,00	0,00	0,96
MMP2	32,27	2,99	29,30	1,17	4,48
MMP3	37,57	0,00	38,39	0,00	0,96
MMP7	40,00	0,00	37,02	0,00	0,96
MMP8	35,68	0,00	37,01	0,24	1,04
MMP9	34,08	1,15	31,42	1,34	4,44
NCAM1	28,43	1,17	28,13	0,97	0,95
PECAM1	32,95	1,34	33,07	0,96	0,70
SELE	40,00	0,00	35,45	0,12	1,00
SELL	37,37	0,00	35,82	0,16	1,05
SELP	40,00	0,00	37,75	0,00	0,96
SGCE	37,54	0,33	35,73	0,35	0,92
SPARC	37,61	0,30	35,84	0,61	1,29
SPG7	28,05	0,69	27,21	0,60	1,65
SPP1	35,30	0,06	36,62	0,92	1,24
TGFBI	35,13	0,15	36,26	0,52	1,08
THBS1	36,57	0,57	34,46	0,71	1,12
THBS2	30,72	0,40	30,92	0,45	0,86
THBS3	32,77	0,83	31,97	0,41	1,50
TIMP1	25,23	0,91	24,25	0,35	1,66
TIMP2	28,81	0,80	28,25	0,56	1,26
TIMP3	40,00	0,00	40,00	0,00	0,96
CLEC3B	34,30	0,53	33,45	0,96	1,55
TNC	37,56	0,20	35,15	0,43	1,14
VCAM1	40,00	0,00	37,43	0,06	0,98
VTN	34,59	0,98	33,95	0,91	1,17

Abbildung A.1: Komplette Ergebnisse des qPCR-Arrays. Dargestellt ist die gemittelte Regulation jedes Gens mit Standardabweichung in Molm-14-Zellen nach Kokultivierung mit MS5-Zellen für 72h in fünf unabhängigen Versuchen. Gelb markiert sind C_t -Werte, die bei ≥ 35 liegen. Grün hinterlegt sind Regulationen $< 1,1x$ und $> 0,8x$. Orange gefärbt sind CTGF und Gene, die signifikant reguliert sind.

B

Primer

Primer für qPCR

human	fw(5'-3')	rv (5'-3')
BNIP3	GCTCCTGGGTAGAACTGCAC	TGTGAGCTGTTTTTCTCTCCAA
CTGF	CCTGGTCCAGACCACAGAGT	ATGTCTTCATGCTGGTGCAG
Cyr61	TCCTCTGTGTCCCCAAGAAC	GCTTCAGTGAGCTGCCTTTT
GAPDH	GGGAAGCTTGTCATCAATGG	TGGACTCCACGACGTACTCA
TAZ	ACCCTAGGAAGGCGATGAAT	AGTTTCTGCTGCTGCTGCT
VEGF	GGGCAGAATCATCACGAAGT	TGGTGATGTTGGACTCCTCA

murin	fw(5'-3')	rv (5'-3')
CTGF	CCACCCGAGTTACCAATGAC	GTTCTGTGCGGTGTGCAG
Cyr61	ACGAGGACTGCAGCAAAACT	GTTCTTGGGGACACAGAGGA
HPRT	GTTAAGCAGTACAGCCCCAAA	AGGGCATATCCAACAACAAACTT

Primer für PCR

Gateway[®]-Klonierung

attB-TAZ

fw GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCACCATGGATGGACTACAAA
GACCATGACGG

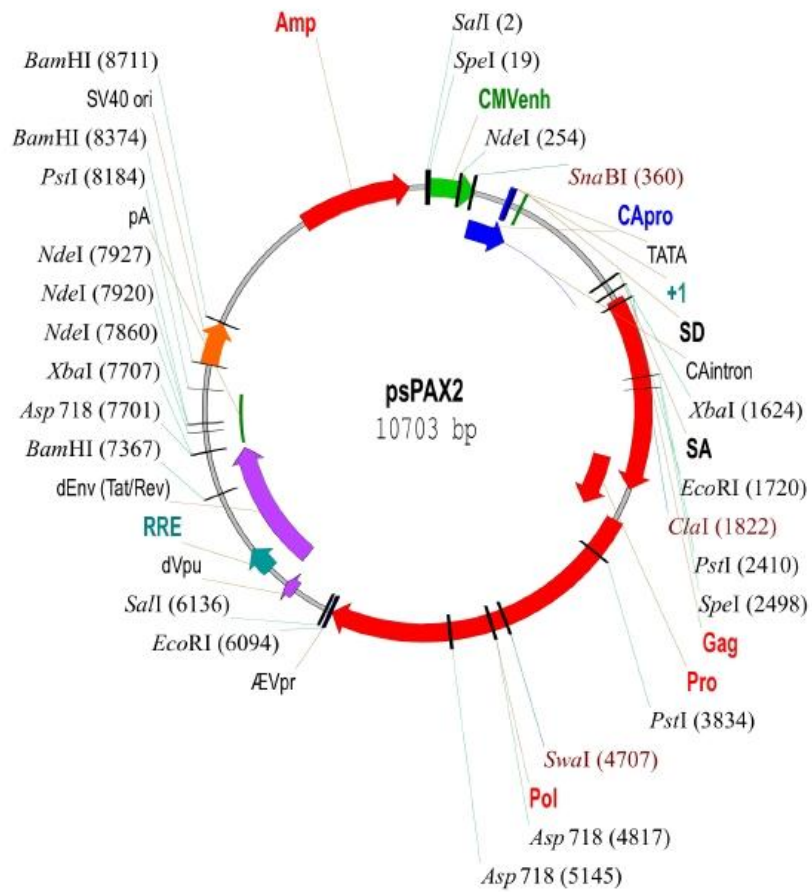
rv GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTACAGCCAGGTTAGAAAGG

Sequenzierung

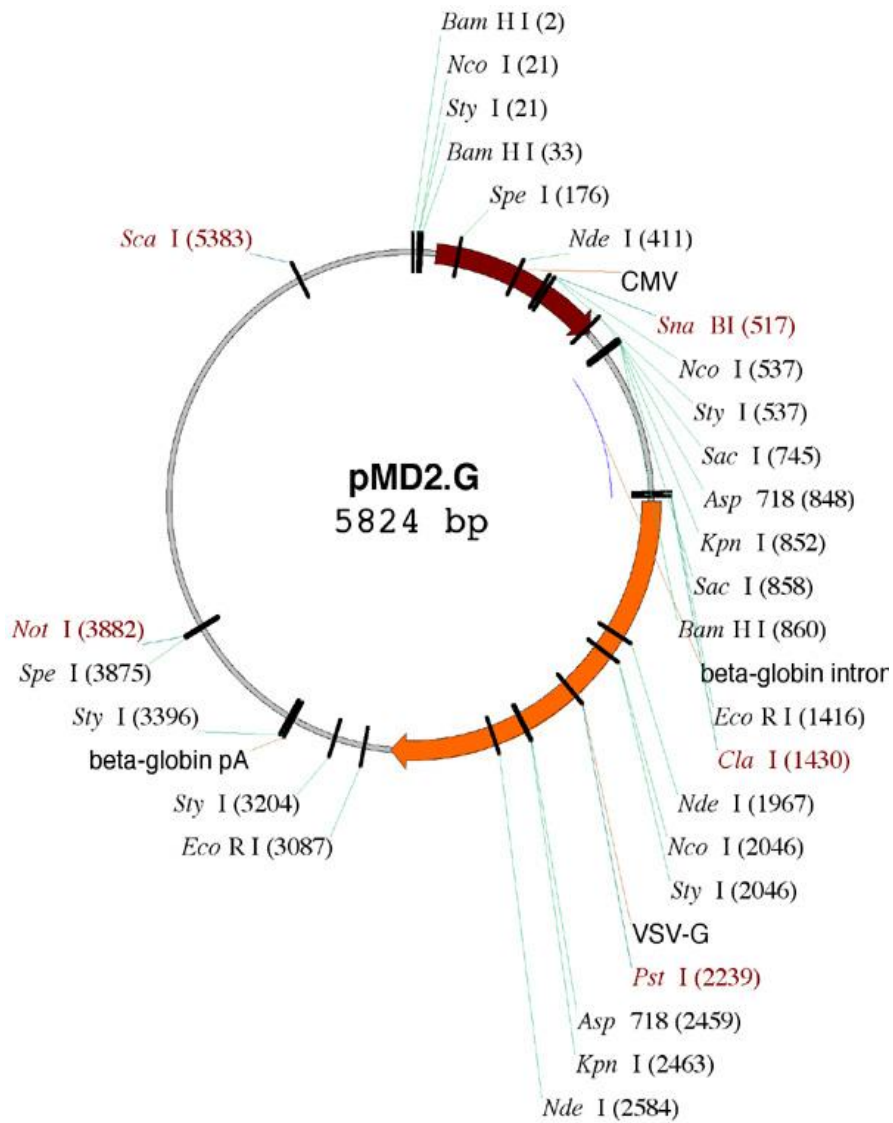
ACGTCAATGGGAGTTTGTTTTTGGCACC	bindet im CMV-Promotor (fw)
GAACCGTCAGAATTGATCTGG	bindet im humanen TAZ-Gen (fw)
AGCAGTCCTACGACGTGACC	bindet im humanen TAZ-Gen (fw)
GACCACTCAGCAGCAGCA	bindet im humanen TAZ-Gen (fw)
GTAAAACGACGGCCAG	bindet in der M13-Sequenz (fw)
CAGGAAACAGCTATGAC	bindet in der M13-Sequenz (rv)

C

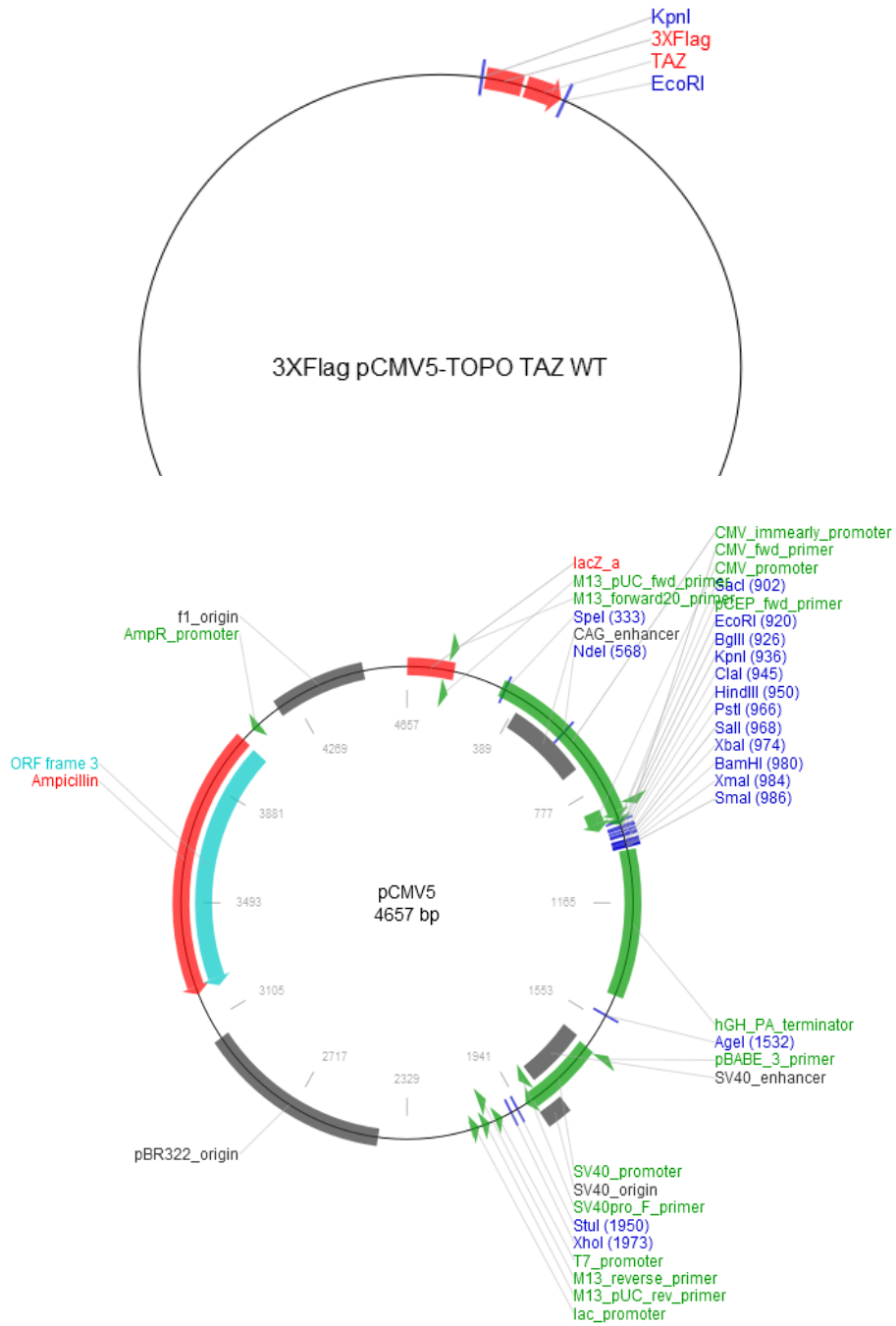
Plasmidkarten



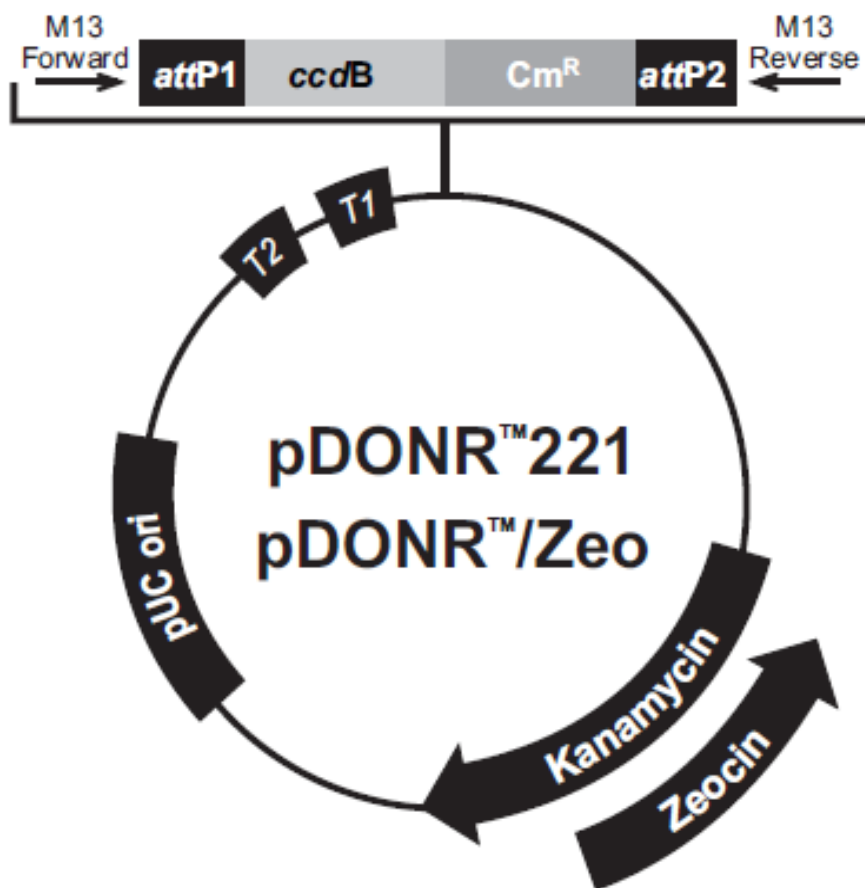
<http://www.addgene.org/12260/>



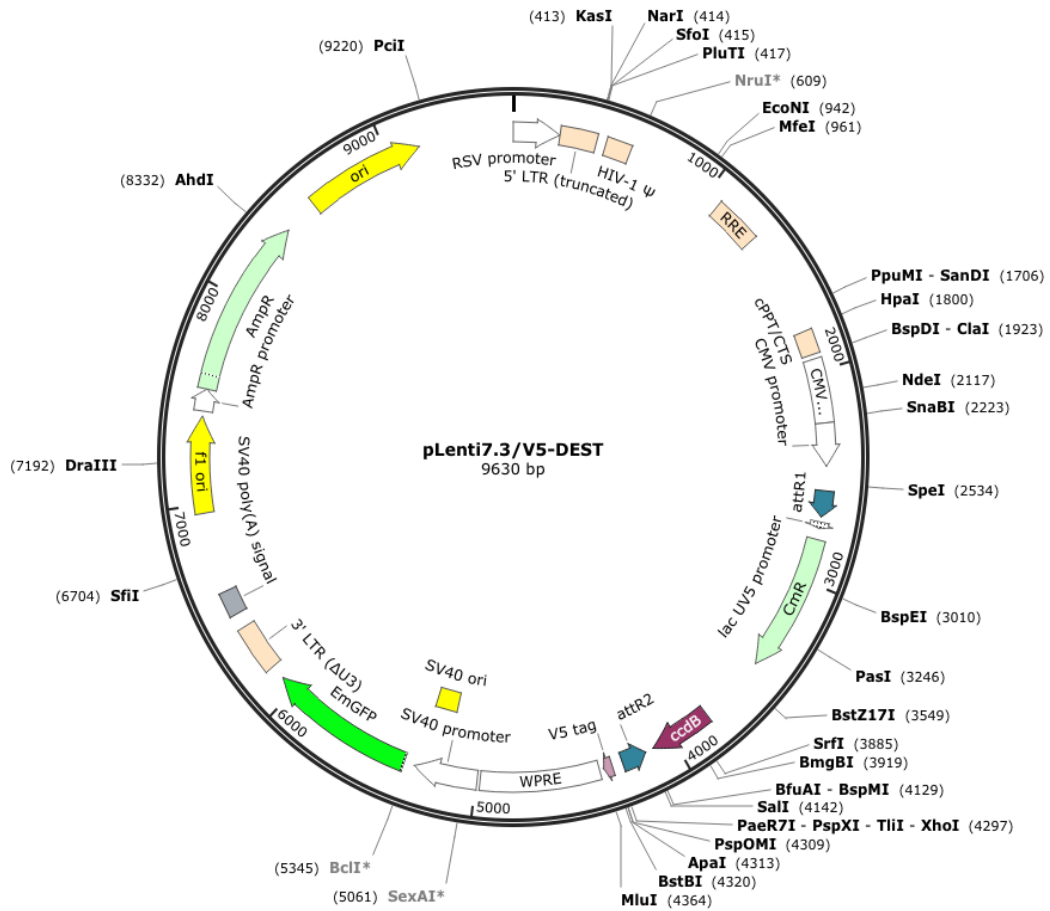
<http://www.addgene.org/12259/>



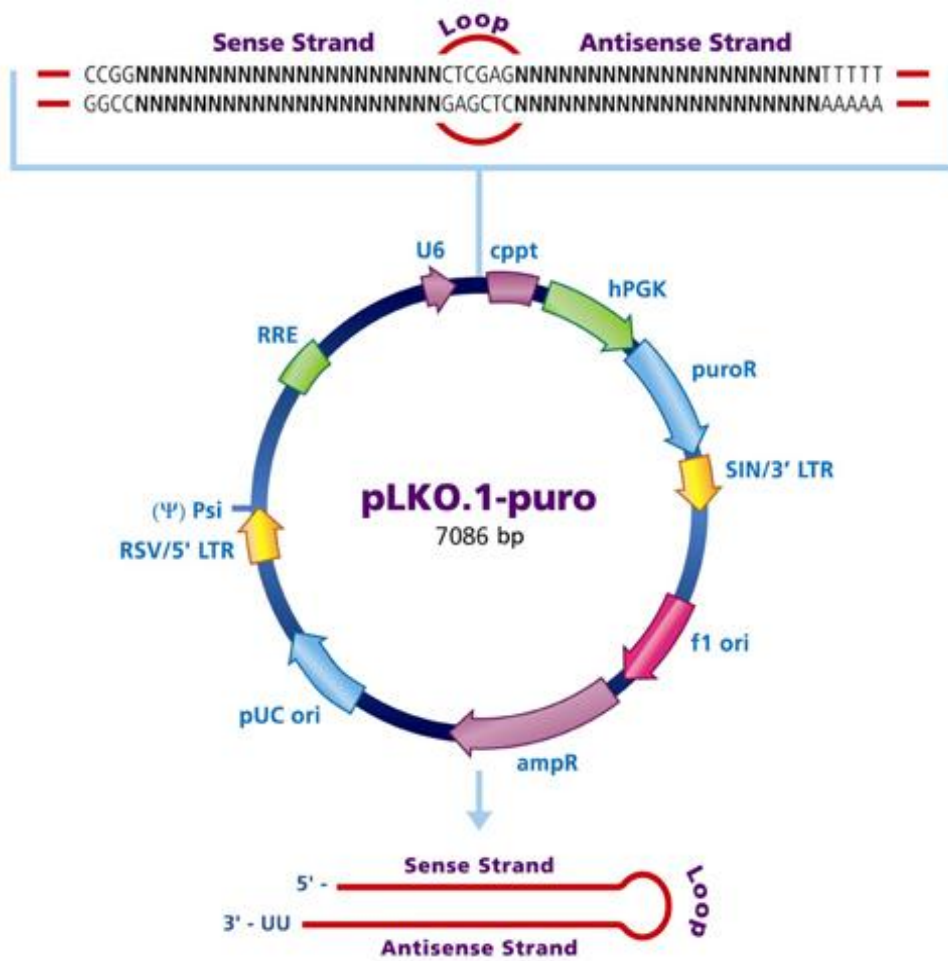
<http://www.addgene.org/24809/> und
<http://www.addgene.org/vector-database/2242/>



<http://www.lifetechnologies.com/1/1/12556-gateway-pdonr221-vector.html>



http://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/viral_expression_and_packaging_vectors/pLenti7.3_V5-DEST/



<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/functional-genomics-and-rnai/shrna/library-information/vector-map.html>

D

Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
Abb.	Abbildung
A. dest.	Aqua destillata
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AK	Antikörper
AML	Akute myeloische Leukämie
APS	Ammoniumpersulfat
AraC	Cytosin-Arabinosid, Cytarabin
ATCC	American Type Culture Collection
ATRA	All-trans Retinolsäure
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BNIP3	BCL2 adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3
BSA	Bovines Serumalbumin
C_t	Cycle threshold
ca.	circa
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Komplementäre DNA
CML	Chronische myeloische Leukämie
COL1A1	Kollagen Typ I α 1
CP	Crossing Point
CTGF	Connective tissue growth factor
C_t	Cycle Threshold
CXCR4	CXC-Motiv Chemokinrezeptor Typ 4
CXCL12	Chemokin 12
Cyr61	Cysteine-rich angiogenic inducer 61
Da	Dalton
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
env	envelope, Hüllprotein

D-PBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Salines
FAK	Focale adhesion kinase
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierer
FCS	Fötales Kälberserum
FSC	Vorwärtsstreulicht
FLT3	FMS-like Tyrosinkinase 3
fw	forward
rv	reverse
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GOI	Gene of interest
GFP	Green fluorescent protein
Gy	Gray
h	Stunde(n)
H. sapiens	Homo sapiens
HKG	House keeping gene
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HSC	Hämatopoetische Stammzelle
HIF1- α	hypoxia inducible factor 1-alpha
Ig	Immunglobulin
ITD	Interne Tandemduplikation
k	kilo
kDa	Kilodalton
Lats1/2	Large tumor suppressor 1/2
LSC	Leukämische Stammzelle
μ	mikro (10^{-6})
m	milli (10^{-3})
M	molar
MSC	mesenchymale Stromazelle
MFI	Mean fluorescence intensity
Mob1	Mob kinase activator 1
Mst1/2	Mammalian STE20-like protein kinase 1/2
min	Minute(n)
MMP	Matrix-Metalloprotease
mRNA	messenger RNA
M. musculus	Mus musculus
n	nano (10^{-9})
Nf2	Neurofibromatosis 2
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NPM	Nucleophosmin
NSG	Non-obese diabetic(NOD)-severe combined immunodeficiency(SCID)

	-Interleukin-2Rezeptor γ (IL-2R γ) ^{null}
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS-T	PBS-Tween20
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	Potentia hydrogenii
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
qPCR	quantitative PCR
RISC	RNA inducing silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNAi	RNA Interferenz
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkriptase
s	Sekunde(n)
Sav 1	Salvador homolog 1
SCC	Seitwärtsstreulicht
scr	scrambled
shRNA	small hairpin RNA
SPG7	Spastic paraplegia 7
SV40 large t-Antigen	Simian Vacuolating Virus 40 large tumor-Antigen
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEAD	TEA domain family member
TEMED	N,N,N,N - Tetramethylethyldiamin
Taq	Thermus Aquaticus
TAZ	transcriptional coactivator with PDZ-binding motif
TGF- α	Transforming growth factor- α
TGF β	Transforming growth factor β
Tris	Trishydroxymethyl-aminomethan
U	Unit(s)
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VLA-4	Very late antigen-4
VSV-G	Vesicular stomatitis virus-Glykoprotein
Wnt	Wingless/Int-1
Wts	Warts
WWTR1	WW domain-containing transcription regulator protein 1
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein
YAP	Yes-associated protein

E

Herstellerverzeichnis

Air Liquid	Düsseldorf, Deutschland
ATCC	Wesel, Deutschland
AppliChem	Darmstadt, Deutschland
BD	Heidelberg, Deutschland
Biolegend	San Diego, California, USA
Biorad	München, Deutschland
Binder	Tuttlingen, Deutschland
B. Braun	Melsungen, Deutschland
Bristol-Myers Squibb	New York City, New York, USA
Greiner Bio One	Kremsmünster, Österreich
Cell Signaling	Frankfurt a. M., Deutschland
Calbiochem	Schwalbach, Deutschland
Corning Inc.	New York City, New York, USA
DSMZ	Braunschweig, Deutschland
eBioscience	San Diego, California, USA
Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Fibrogen, Inc.	San Francisco, California, USA
GE Healthcare	Freiburg, Deutschland
GeneOn	Ludwigshafen, Deutschland
Graphpad Software, Inc.	La Jolla, California, USA
H+P Labortechnik	Oberschleissheim, Deutschland
Hanna-Instruments	Kehl am Rhein, Deutschland
Heraeus	Hanau, Deutschland
Heidolph	Schwabach, Deutschland
Hund	Wetzlar, Deutschland
Intas	Göttingen, Deutschland
Integra Biosciences	Fernwald, Deutschland
Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.	West Grove, Pennsylvania, USA
Keison	Chelmsford, England
KPL	Gaithersburg, Maryland, USA
Memmert	Schwabach, Deutschland
Merck	Darmstadt, Deutschland

Microsoft	Redmond, Washinhton, USA
Millipore	Billerica, Maryland, USA
Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
Nalgene	Rochester, New York, USA
Neolab	Heidelberg, Deutschland
New England Biolabs	Frankfurt a. M., Deutschland
Novartis Pharma	Nürnberg, Deutschland
Nunc	Roskilde, Dänemark
Olympus	Hamburg, Deutschland
Orbigen	San Diego, California, USA
P-D Industriegesellschaft mbH	Dresden, Deutschland
PAA	Pasching, Österreich
Partec	Görlitz, Deutschland
Peqlab	Erlangen, Deutschland
Qiagen	Hilden, Deutschland
Ratiolab	Dreieich, Deutschland
Roche	Grenzach-Wyhlen, Deutschland
Rockland	Gilbertsville, Pennsylvania, USA
Roth	Karlsruhe, Deutschland
SABiosciences	Frederick, Maryland, USA
Santa Cruz	Heidelberg, Deutschland
Sarorius	Göttingen, Deutschland
Sharp	Hamburg, Deutschland
Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Systec	Wettenberg, Deutschland
Thermo Scientific	Braunschweig, Deutschland
Tree Star Inc.	Ashland, Oregon, USA
Vilber Lourmat	Marne La Vallée, Frankreich

Literaturverzeichnis

- Abreu, J. G., N. I. Ketpura, B. Reversade und E. De Robertis (2002). Connective-tissue growth factor (ctgf) modulates cell signalling by bmp and $\text{tgf-}\beta$. *Nature cell biology* 4(8), 599–604.
- Adler, S. G., S. Schwartz, M. E. Williams, C. Arauz-Pacheco, W. K. Bolton, T. Lee, D. Li, T. B. Neff, P. R. Urquilla und K. L. Sewell (2010). Phase 1 study of anti-ctgf monoclonal antibody in patients with diabetes and microalbuminuria. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 5(8), 1420–1428.
- Aiuti, A., I. Webb, C. Bleul, T. Springer und J. Gutierrez-Ramos (1997). The chemokine sdf-1 is a chemoattractant for human cd34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of cd34+ progenitors to peripheral blood. *The Journal of experimental medicine* 185(1), 111–120.
- Al-Hajj, M., M. Wicha, A. Benito-Hernandez, S. Morrison und M. Clarke (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(7), 3983–3988.
- Ameres, S. L., J. Martinez und R. Schroeder (2007). Molecular basis for target rna recognition and cleavage by human risc. *Cell* 130(1), 101–112.
- Arai, F., A. Hirao, M. Ohmura, H. Sato, S. Matsuoka, K. Takubo, K. Ito, G. Koh und T. Suda (2004). Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* 118(2), 149–161.
- Avigdor, A., P. Goichberg, S. Shivtiel, A. Dar, A. Peled, S. Samira, O. Kollet, R. Hershkoviz, R. Alon, I. Hardan et al. (2004). Cd44 and hyaluronic acid cooperate with sdf-1 in the trafficking of human cd34+ stem/progenitor cells to bone marrow. *Blood* 103(8), 2981–2989.
- Azzolin, L., F. Zanconato, S. Bresolin, M. Forcato, G. Basso, S. Bicciato, M. Cordegnoni und S. Piccolo (2012). Role of taz as mediator of wnt signaling. *Cell* 151(7), 1443–1456.

- Baribaud, F., T. G. Edwards, M. Sharron, A. Brelot, N. Heveker, K. Price, F. Mortari, M. Alizon, M. Tsang und R. W. Doms (2001). Antigenically distinct conformations of cxcr4. *Journal of virology* 75(19), 8957–8967.
- Battula, V. L., Y. Chen, M. da Graca Cabreira, V. Ruvolo, Z. Wang, W. Ma, S. Konoplev, E. Shpall, K. Lyons, D. Strunk et al. (2013). Connective tissue growth factor regulates adipocyte differentiation of mesenchymal stromal cells and facilitates leukemia bone marrow engraftment. *Blood* 122(3), 357–366.
- Ben-Batalla, I., A. Schultze, M. Wroblewski, R. Erdmann, M. Heuser, J. S. Wai-zenegger, K. Riecken, M. Binder, D. Schewe, S. Sawall et al. (2013). Axl, a prognostic and therapeutic target in acute myeloid leukemia mediates paracrine crosstalk of leukemia cells with bone marrow stroma. *Blood* 122(14), 2443–2452.
- Birnie, G. (1988). The hl60 cell line: a model system for studying human myeloid cell differentiation. *The British journal of cancer. Supplement* 9, 41.
- Bleul, C. C., M. Farzan, H. Choe, C. Parolin, I. Clark-Lewis, J. Sodroski und T. A. Springer (1996). The lymphocyte chemoattractant sdf-1 is a ligand for lestr/fusin and blocks hiv-1 entry.
- Bleul, C. C., R. C. Fuhlbrigge, J. M. Casasnovas, A. Aiuti und T. A. Springer (1996). A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (sdf-1). *The Journal of experimental medicine* 184(3), 1101–1109.
- Blom, I. E., R. Goldschmeding und A. Leask (2002). Gene regulation of connective tissue growth factor: new targets for antifibrotic therapy? *Matrix Biology* 21(6), 473–482.
- Bonnet, D. und J. Dick (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Medicine* 3(7), 730–737.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72(1-2), 248–254.
- Brüggemann, M., G. T. Williams, C. I. Bindon, M. R. Clark, M. R. Walker, R. Jefferys, H. Waldmann und M. Neuberger (1987). Comparison of the effector functions of human immunoglobulins using a matched set of chimeric antibodies. *The Journal of experimental medicine* 166(5), 1351–1361.
- Burnett, A., M. Wetzler und B. Löwenberg (2011). Therapeutic advances in acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology* 29(5), 487–494.

- Campbell, J. J., J. Hedrick, A. Zlotnik, M. A. Siani, D. A. Thompson und E. C. Butcher (1998). Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science* 279(5349), 381–384.
- Carter, B. Z., Y. Qiu, X. Huang, L. Diao, N. Zhang, K. R. Coombes, D. H. Mak, M. Konopleva, J. Cortes, H. M. Kantarjian et al. (2012). Survivin is highly expressed in cd34+ 38- leukemic stem/progenitor cells and predicts poor clinical outcomes in aml. *Blood* 120(1), 173–180.
- Casari, G., M. De Fusco, S. Ciarmatori, M. Zeviani, M. Mora, P. Fernandez, G. De Michele, A. Filla, S. Cocozza, R. Marconi et al. (1998). Spastic paraplegia and oxphos impairment caused by mutations in paraplegin, a nuclear-encoded mitochondrial metalloprotease. *Cell* 93(6), 973–983.
- Chan, S. W., C. J. Lim, K. Guo, C. P. Ng, I. Lee, W. Hunziker, Q. Zeng und W. Hong (2008). A role for taz in migration, invasion, and tumorigenesis of breast cancer cells. *Cancer research* 68(8), 2592–2598.
- Chaqour, B. und M. Goppelt-Struebe (2006). Mechanical regulation of the cyr61/ccn1 and ctgf/ccn2 proteins. *FEBS Journal* 273(16), 3639–3649.
- Chen, C.-C., N. Chen und L. F. Lau (2001). The angiogenic factors cyr61 and connective tissue growth factor induce adhesive signaling in primary human skin fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry* 276(13), 10443–10452.
- Chen, C.-C. und L. F. Lau (2009). Functions and mechanisms of action of ccn matrix-cellular proteins. *The international journal of biochemistry & cell biology* 41(4), 771–783.
- Chen, P.-S., M.-Y. Wang, S.-N. Wu, J.-L. Su, C.-C. Hong, S.-E. Chuang, M.-W. Chen, K.-T. Hua, Y.-L. Wu, S.-T. Cha et al. (2007). Ctgf enhances the motility of breast cancer cells via an integrin- α v β 3-erk1/2-dependent s100a4-upregulated pathway. *Journal of cell science* 120(12), 2053–2065.
- Chen, S., Y.-H. Han, Y. Zheng, M. Zhao, H. Yan, Q. Zhao, G.-Q. Chen und D. Li (2009). Ndr1 contributes to retinoic acid-induced differentiation of leukemic cells. *Leukemia research* 33(8), 1108–1113.
- Chen, Y., D. J. Abraham, X. Shi-wen, J. D. Pearson, C. M. Black, K. M. Lyons und A. Leask (2004). Ccn2 (connective tissue growth factor) promotes fibroblast adhesion to fibronectin. *Molecular biology of the cell* 15(12), 5635–5646.
- Chen, Y., R. Jacamo, Y.-x. Shi, R.-y. Wang, V. L. Battula, S. Konoplev, D. Strunk, N. A. Hofmann, A. Reinisch, M. Konopleva et al. (2012). Human extramedullary bone marrow in mice: a novel in vivo model of genetically controlled hematopoietic

- microenvironment. *Blood* 119(21), 4971–4980.
- Chien, W., T. Kumagai, C. W. Miller, J. C. Desmond, J. M. Frank, J. W. Said und H. P. Koeffler (2004). Cyr61 suppresses growth of human endometrial cancer cells. *Journal of Biological Chemistry* 279(51), 53087–53096.
- Chien, W., D. Yin, D. Gui, A. Mori, J. M. Frank, J. Said, D. Kusuanco, A. Marchevsky, R. McKenna und H. P. Koeffler (2006). Suppression of cell proliferation and signaling transduction by connective tissue growth factor in non-small cell lung cancer cells. *Molecular cancer research* 4(8), 591–598.
- Cipolleschi, M. G., P. D. Sbarba und M. Olivotto (1993). The role of hypoxia in the maintenance of hematopoietic stem cells. *Blood* 82(7), 2031–2037.
- Cordenonsi, M., F. Zanconato, L. Azzolin, M. Forcato, A. Rosato, C. Frasson, M. Inui, M. Montagner, A. R. Parenti, A. Poletti et al. (2011). The hippo transducer taz confers cancer stem cell-related traits on breast cancer cells. *Cell* 147(4), 759–772.
- Croci, S., L. Landuzzi, A. Astolfi, G. Nicoletti, A. Rosolen, F. Sartori, M. Y. Follo, N. Oliver, C. De Giovanni, P. Nanni et al. (2004). Inhibition of connective tissue growth factor (ctgf/ccn2) expression decreases the survival and myogenic differentiation of human rhabdomyosarcoma cells. *Cancer research* 64(5), 1730–1736.
- Degos, L., H. Dombret, C. Chomienne, M. Daniel, J. Miclea, C. Chastang, S. Castaigne und P. Fenaux (1995). All-trans-retinoic acid as a differentiating agent in the treatment of acute promyelocytic leukemia [see comments]. *Blood* 85(10), 2643–2653.
- Dhar, A. und A. Ray (2010). The ccn family proteins in carcinogenesis. *Exp Oncol* 32(1), 2–9.
- Dornhöfer, N., S. Spong, K. Bennewith, A. Salim, S. Klaus, N. Kambham, C. Wong, F. Kaper, P. Sutphin, R. Nacalumi et al. (2006). Connective tissue growth factor-specific monoclonal antibody therapy inhibits pancreatic tumor growth and metastasis. *Cancer research* 66(11), 5816–5827.
- Drexler, H., H. Quentmeier und R. MacLeod (2003). Malignant hematopoietic cell lines: in vitro models for the study of mll gene alterations. *Leukemia* 18(2), 227–232.
- DuBridges, R., P. Tang, H. Hsia, P. Leong, J. Miller und M. Calos (1987). Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Molecular and cellular biology* 7(1), 379–387.

- Dupont, S., L. Morsut, M. Aragona, E. Enzo, S. Giulitti, M. Cordenonsi, F. Zanconato, J. Le Digabel, M. Forcato, S. Bicciato et al. (2011). Role of yap/taz in mechanotransduction. *Nature* 474(7350), 179–183.
- Eagle, H. und E. M. Levine (1967). Growth regulatory effects of cellular interaction. *Nature* 213, 1102–1106.
- Estey, E. und H. Döhner (2006). Acute myeloid leukaemia. *The Lancet* 368(9550), 1894–1907.
- Estey, E. H., P. F. Thall, S. Pierce, J. Cortes, M. Beran, H. Kantarjian, M. J. Keating, M. Andreeff und E. Freireich (1999). Randomized phase ii study of fludarabine+ cytosine arabinoside+ idarubicin+/- all-trans retinoic acid+/- granulocyte colony-stimulating factor in poor prognosis newly diagnosed acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Blood* 93(8), 2478–2484.
- Feng, Y., C. C. Broder, P. E. Kennedy und E. A. Berger (1996). Hiv-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, g protein-coupled receptor. *Science* 272(5263), 872–877.
- Finazzi, G., V. Caruso, R. Marchioli, G. Capnist, T. Chisesi, C. Finelli, L. Gugliotta, R. Landolfi, J. Kutti, H. Gisslinger et al. (2005). Acute leukemia in polycythemia vera: an analysis of 1638 patients enrolled in a prospective observational study. *Blood* 105(7), 2664–2670.
- Finger, E., C. Cheng, T. Williams, E. Rankin, B. Bedogni, L. Tachiki, S. Spong, A. Giaccia und M. Powell (2013). Ctgf is a therapeutic target for metastatic melanoma. *Oncogene*.
- Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver und C. C. Mello (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded rna in caenorhabditis elegans. *nature* 391(6669), 806–811.
- Frederiksen, K., P. Jat, N. Valtz, D. Levy und R. McKay (1988). Immortalization of precursor cells from the mammalian CNS. *Neuron* 1(6), 439–448.
- Gallagher, R., S. Collins, J. Trujillo, K. McCredie, M. Ahearn, S. Tsai, R. Metzgar, G. Aulakh, R. Ting, F. Ruscetti et al. (1979). Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (hl-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood* 54(3), 713–733.
- Gao, Y., C. Li, M. Nie, Y. Lu, S. Lin, P. Yuan und X. Sun (2014). Cxcr4 as a novel predictive biomarker for metastasis and poor prognosis in colorectal cancer. *Tumor Biology*, 1–5.

- Gery, S., D. Xie, D. Yin, H. Gabra, C. Miller, H. Wang, D. Scott, S. Y. William, M. L. Popoviciu, J. W. Said et al. (2005). Ovarian carcinomas: Ccn genes are aberrantly expressed and ccn1 promotes proliferation of these cells. *Clinical cancer research* 11(20), 7243–7254.
- Goodwin, C. R., B. Lal, X. Zhou, S. Ho, S. Xia, A. Taeger, J. Murray und J. Laterra (2010). Cyr61 mediates hepatocyte growth factor–dependent tumor cell growth, migration, and akt activation. *Cancer research* 70(7), 2932–2941.
- Gothot, A., R. Pyatt, J. McMahonel, S. Rice und E. F. Srour (1997). Functional heterogeneity of human cd34+ cells isolated in subcompartments of the g0/g1 phase of the cell cycle. *Blood* 90(11), 4384–4393.
- Graham, F., J. Smiley, W. Russell und R. Nairn (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *Journal of General Virology* 36(1), 59–74.
- Guo, K., G. Searfoss, D. Krolkowski, M. Pagnoni, C. Franks, K. Clark, K. Yu, M. Jaye und Y. Ivashchenko (2001). Hypoxia induces the expression of the proapoptotic gene bnip3. *Cell death and differentiation* 8(4), 367.
- Gupta, S. K., P. G. Lysko, K. Pillarisetti, E. Ohlstein und J. M. Stadel (1998). Chemokine receptors in human endothelial cells functional expression of cxcr4 and its transcriptional regulation by inflammatory cytokines. *Journal of Biological Chemistry* 273(7), 4282–4287.
- Halder, G., S. Dupont und S. Piccolo (2012). Transduction of mechanical and cytoskeletal cues by yap and taz. *Nature reviews Molecular cell biology* 13(9), 591–600.
- Hall-Glenn, F. und K. M. Lyons (2011). Roles for ccn2 in normal physiological processes. *Cellular and Molecular Life Sciences* 68(19), 3209–3217.
- Hamaratoglu, F., M. Willecke, M. Kango-Singh, R. Nolo, E. Hyun, C. Tao, H. Jafar-Nejad und G. Halder (2006). The tumour-suppressor genes nf2/merlin and expanded act through hippo signalling to regulate cell proliferation and apoptosis. *Nature cell biology* 8(1), 27–36.
- Haque, I., S. Mehta, M. Majumder, K. Dhar, A. De, D. McGregor, P. J. Van Veldhuizen, S. K. Banerjee und S. Banerjee (2011). Cyr61/ccn1 signaling is critical for epithelial-mesenchymal transition and stemness and promotes pancreatic carcinogenesis. *Mol Cancer* 10(8).
- Hartel, M., F. F. di Mola, A. Gardini, A. Zimmermann, M. Pierluigi Di Sebastiano, A. Guweidhi, P. Innocenti, T. Giese, N. Giese, M. W. Büchler et al. (2004). Des-

- moplastic reaction influences pancreatic cancer growth behavior. *World journal of surgery* 28(8), 818–825.
- Hartley, J. L., G. F. Temple und M. A. Brasch (2000). Dna cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome research* 10(11), 1788–1795.
- Hartmann, T. N., J. A. Burger, A. Glodek, N. Fujii und M. Burger (2005). Cxcr4 chemokine receptor and integrin signaling co-operate in mediating adhesion and chemoresistance in small cell lung cancer (sclc) cells. *Oncogene* 24(27), 4462–4471.
- Harvey, K. F., X. Zhang und D. M. Thomas (2013). The hippo pathway and human cancer. *Nature Reviews Cancer* 13(4), 246–257.
- Hatse, S., K. Princen, E. D. Clercq, M. M. Rosenkilde, T. W. Schwartz, P. E. Hernandez-Abad, R. T. Skerlj, G. J. Bridger und D. Schols (2005). Amd3465, a monomacrocyclic cxcr4 antagonist and potent hiv entry inhibitor. *Biochemical pharmacology* 70(5), 752–761.
- Heid, C. A., J. Stevens, K. J. Livak und P. M. Williams (1996). Real time quantitative pcr. *Genome research* 6(10), 986–994.
- Hesselgesser, J., M. Halks-Miller, V. DelVecchio, S. C. Peiper, J. Hoxie, D. L. Kolson, D. Taub und R. Horuk (1997). Cd4-independent association between hiv-1 gp120 and cxcr4: functional chemokine receptors are expressed in human neurons. *Current Biology* 7(2), 112–121.
- Higgins, D. F., M. P. Biju, Y. Akai, A. Wutz, R. S. Johnson und V. H. Haase (2004). Hypoxic induction of ctgf is directly mediated by hif-1. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 287(6), F1223–F1232.
- Hishikawa, K., T. Nakaki und T. Fujii (1999). Transforming growth factor-beta induces apoptosis via connective tissue growth factor in human aortic smooth muscle cells. *European journal of pharmacology* 385(2), 287–290.
- Hofmeister, J. K., D. Cooney und K. M. Coggeshall (2000). Clustered cd20 induced apoptosis: src-family kinase, the proximal regulator of tyrosine phosphorylation, calcium influx, and caspase 3-dependent apoptosis. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 26(2), 133–143.
- Hope, K., L. Jin und J. Dick (2004). Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity. *Nature immunology* 5(7), 738–743.
- Hoshijima, M., T. Hattori, M. Inoue, D. Araki, H. Hanagata, A. Miyauchi und M. Takigawa (2006). Ct domain of ccn2/ctgf directly interacts with fibronectin and enhances cell adhesion of chondrocytes through integrin $\alpha 5\beta 1$. *FEBS*

letters 580(5), 1376–1382.

Imai, K. und A. Takaoka (2006). Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer. *Nature Reviews Cancer* 6(9), 714–727.

Inoki, I., T. Shiomi, G. Hashimoto, H. Enomoto, H. Nakamura, K.-i. Makino, E. Ikeda, S. Takata, K.-i. Kobayashi und Y. Okada (2002). Connective tissue growth factor binds vascular endothelial growth factor (vegf) and inhibits vegf-induced angiogenesis. *The FASEB Journal* 16(2), 219–221.

Internet: *ClinicalTrials.gov*, MDX-1338 (Stand: 03.02.2014).
<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01120457?term=MDX-1338rank=1>.

Internet: *Stanford School of Medicine, Majeti Lab, Overview* (Stand: 05.02.2014).
<http://majetilab.stanford.edu/overview.html>.

Ishikawa, F., S. Yoshida, Y. Saito, A. Hijikata, H. Kitamura, S. Tanaka, R. Nakamura, T. Tanaka, H. Tomiyama, N. Saito et al. (2007). Chemotherapy-resistant human aml stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region. *Nature biotechnology* 25(11), 1315–1321.

Ito, M., H. Hiramatsu, K. Kobayashi, K. Suzue, M. Kawahata, K. Hioki, Y. Ueyama, Y. Koyanagi, K. Sugamura, K. Tsuji et al. (2002). Nod/scid/ γ mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood* 100(9), 3175–3182.

Itoh, K., H. Tezuka, H. Sakoda, M. Konno, K. Nagata, T. Uchiyama, H. Uchino und K. Mori (1989). Reproducible establishment of hemopoietic supportive stromal cell lines from murine bone marrow. *Exp. Hematol.:(United States)* 17(2).

Ivkovic, S., B. S. Yoon, S. N. Popoff, F. F. Safadi, D. E. Libuda, R. C. Stephenson, A. Daluiski und K. M. Lyons (2003). Connective tissue growth factor coordinates chondrogenesis and angiogenesis during skeletal development. *Development* 130(12), 2779–2791.

Jan, M. und R. Majeti (2012). Clonal evolution of acute leukemia genomes. *Oncogene* 32(2), 135–140.

Janowska-Wieczorek, A., L. Marquez, A. Matsuzaki, H. Hashmi, L. Larratt, L. Boshkov, A. Turner, M. Zhang, D. Edwards und A. Kossakowska (1999). Expression of matrix metalloproteinases (MMP-2 and-9) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1 and-2) in acute myelogenous leukaemia blasts: comparison with normal bone marrow cells. *British journal of haematology* 105(2), 402–411.

Jansson, L. und J. Larsson (2012). Normal hematopoietic stem cell function in mice with enforced expression of the hippo signaling effector yap1. *PloS one* 7(2), e32013.

- Jim Leu, S.-J., J.-S. Sung, M.-L. Huang, M.-Y. Chen und T.-W. Tsai (2013). A novel anti-ccn1 monoclonal antibody suppresses rac-dependent cytoskeletal reorganization and migratory activities in breast cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications* 434(4), 885–891.
- Jimenez-Velasco, A., J. Roman-Gomez, X. Agirre, M. Barrios, G. Navarro, I. Vazquez, F. Prosper, A. Torres und A. Heiniger (2005). Downregulation of the large tumor suppressor 2 (lats2/kpm) gene is associated with poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 19(12), 2347–2350.
- Jin, L., K. Hope, Q. Zhai, F. Smadja-Joffe und J. Dick (2006). Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells. *Nature medicine* 12(10), 1167–1174.
- Jin, L., E. M. Lee, H. S. Ramshaw, S. J. Busfield, A. G. Peoppl, L. Wilkinson, M. A. Guthridge, D. Thomas, E. F. Barry, A. Boyd et al. (2009). Monoclonal antibody-mediated targeting of cd123, il-3 receptor α chain, eliminates human acute myeloid leukemic stem cells. *Cell stem cell* 5(1), 31–42.
- Jun, J.-I. und L. F. Lau (2011). Taking aim at the extracellular matrix: Ccn proteins as emerging therapeutic targets. *Nature reviews Drug discovery* 10(12), 945–963.
- Justice, R. W., O. Zilian, D. F. Woods, M. Noll und P. J. Bryant (1995). The drosophila tumor suppressor gene warts encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation. *Genes & development* 9(5), 534–546.
- Kanai, M., F. Hirayama, M. Yamaguchi, J. Ohkawara, N. Sato, K. Fukazawa, K. Yamashita, M. Kuwabara, H. Ikeda und K. Ikebuchi (2000). Stromal cell-dependent ex vivo expansion of human cord blood progenitors and augmentation of transplantable stem cell activity. *Bone marrow transplantation* 26(8), 837–844.
- Kim, H.-S., S. R. Nagalla, Y. Oh, E. Wilson, C. T. Roberts und R. G. Rosenfeld (1997). Identification of a family of low-affinity insulin-like growth factor binding proteins (igfbps): characterization of connective tissue growth factor as a member of the igfbp superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94(24), 12981–12986.
- Kojima, S., T. Matsuyama, T. Sato, K. Horibe, S. Konishi, M. Tsuchida, Y. Hayashi, H. Kigasawa, Y. Akiyama und J. Okamura (1990). Down's syndrome and acute leukemia in children: an analysis of phenotype by use of monoclonal antibodies and electron microscopic platelet peroxidase reaction [see comments]. *Blood* 76(11), 2348–2353.

- Kollet, O., I. Petit, J. Kahn, S. Samira, A. Dar, A. Peled, V. Deutsch, M. Gunetti, W. Piacibello, A. Nagler et al. (2002). Human cd34+ cxcr4- sorted cells harbor intracellular cxcr4, which can be functionally expressed and provide nod/scid repopulation. *Blood* 100(8), 2778–2786.
- Konopleva, M., S. Konoplev, W. Hu, A. Zaritsky, B. Afanasiev und M. Andreeff (2002). Stromal cells prevent apoptosis of AML cells by up-regulation of anti-apoptotic proteins. *Leukemia* 16(9), 1713–1724.
- Kopp, H.-G., S. T. Avecilla, A. T. Hooper und S. Rafii (2005). The bone marrow vascular niche: home of hsc differentiation and mobilization. *Physiology* 20(5), 349–356.
- Koschmieder, S., F. D’Alò, H. Radomska, C. Schöneich, J. S. Chang, M. Konopleva, S. Kobayashi, E. Levantini, N. Suh, A. Di Ruscio et al. (2007). Cddo induces granulocytic differentiation of myeloid leukemic blasts through translational up-regulation of p42 ccaat enhancer-binding protein alpha. *Blood* 110(10), 3695–3705.
- Koshiba, T., R. Hosotani, Y. Miyamoto, J. Ida, S. Tsuji, S. Nakajima, M. Kawaguchi, H. Kobayashi, R. Doi, T. Hori et al. (2000). Expression of stromal cell-derived factor 1 and cxcr4 ligand receptor system in pancreatic cancer: a possible role for tumor progression. *Clinical Cancer Research* 6(9), 3530–3535.
- Kottaridis, P. D., R. E. Gale, M. E. Frew, G. Harrison, S. E. Langabeer, A. A. Belton, H. Walker, K. Wheatley, D. T. Bowen, A. K. Burnett et al. (2001). The presence of a flt3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (aml) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the united kingdom medical research council aml 10 and 12 trials. *Blood* 98(6), 1752–1759.
- Kuhne, M. R., T. Mulvey, B. Belanger, S. Chen, C. Pan, C. Chong, F. Cao, W. Nie-kro, T. Kempe, K. A. Henning et al. (2013). Bms-936564/mdx-1338: A fully human anti-cxcr4 antibody induces apoptosis in vitro and shows antitumor activity in vivo in hematologic malignancies. *Clinical Cancer Research* 19(2), 357–366.
- Labrosse, B., A. BreLOT, N. Heveker, N. Sol, D. Schols, E. De Clercq und M. Alizon (1998). Determinants for sensitivity of human immunodeficiency virus coreceptor cxcr4 to the bicyclam amd3100. *Journal of virology* 72(8), 6381–6388.
- Laemmli, U. et al. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259), 680–685.
- Lai, D., K. C. Ho, Y. Hao und X. Yang (2011). Taxol resistance in breast cancer cells is mediated by the hippo pathway component taz and its downstream

- transcriptional targets *cyr61* and *ctgf*. *Cancer research* 71(7), 2728–2738.
- Lapidot, T., C. Sirard, J. Vormoor, B. Murdoch, T. Hoang, J. Caceres-Cortes, M. Minden, B. Paterson, M. Caligiuri und J. Dick (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367(6464), 645–648.
- Larsson, J., M. Ohishi, B. Garrison, M. Aspling, V. Janzen, G. B. Adams, M. Curto, A. I. McClatchey, E. Schipani und D. T. Scadden (2008). Nf2/merlin regulates hematopoietic stem cell behavior by altering microenvironmental architecture. *Cell Stem Cell* 3(2), 221–227.
- Lataillade, J.-J., D. Clay, P. Bourin, F. Hérodin, C. Dupuy, C. Jasmin und M.-C. Le Bousse-Kerdilès (2002). Stromal cell-derived factor 1 regulates primitive hematopoiesis by suppressing apoptosis and by promoting g0/g1 transition in cd34+ cells: evidence for an autocrine/paracrine mechanism. *Blood* 99(4), 1117–1129.
- Lau, A. N., S. J. Curtis, C. M. Fillmore, S. P. Rowbotham, M. Mohseni, D. E. Wagner, A. M. Beede, D. T. Montoro, K. W. Sinkevicius, Z. E. Walton et al. (2014). Tumor-propagating cells and yap/taz activity contribute to lung tumor progression and metastasis. *The EMBO Journal*.
- Leask, A. und D. J. Abraham (2006). All in the ccn family: essential matricellular signaling modulators emerge from the bunker. *Journal of cell science* 119(23), 4803–4810.
- Leask, A., S. K. Parapuram, X. Shi-wen und D. Abraham (2009). Connective tissue growth factor (*ctgf*, *ccn2*) gene regulation: a potent clinical bio-marker of fibroproliferative disease? *Journal of cell communication and signaling* 3(2), 89–94.
- Lee, B., M. Sharron, L. J. Montaner, D. Weissman und R. W. Doms (1999). Quantification of *cd4*, *ccr5*, and *cxc4* levels on lymphocyte subsets, dendritic cells, and differentially conditioned monocyte-derived macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96(9), 5215–5220.
- Lei, Q.-Y., H. Zhang, B. Zhao, Z.-Y. Zha, F. Bai, X.-H. Pei, S. Zhao, Y. Xiong und K.-L. Guan (2008). Taz promotes cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition and is inhibited by the hippo pathway. *Molecular and cellular biology* 28(7), 2426–2436.
- Lin, B.-R., C.-C. Chang, R. J.-C. Chen, Y.-M. Jeng, J.-T. Liang, P.-H. Lee, K.-J. Chang und M.-L. Kuo (2011). Connective tissue growth factor acts as a therapeutic agent and predictor for peritoneal carcinomatosis of colorectal cancer. *Clinical Cancer Research* 17(10), 3077–3088.

- Liotta, L., K. Tryggvason, S. Garbisa, I. Hart, C. Foltz und S. Shafie (1980). Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature* 284(5751), 67–68.
- Lipson, K. E., C. Wong, Y. Teng, S. Spong et al. (2012). Ctgf is a central mediator of tissue remodeling and fibrosis and its inhibition can reverse the process of fibrosis. *Fibrogenesis & tissue repair* 5(Suppl 1), S24.
- Liu, L.-Y., Y.-C. Han, S.-H. Wu und Z.-H. Lv (2008). Expression of connective tissue growth factor in tumor tissues is an independent predictor of poor prognosis in patients with gastric cancer. *World journal of gastroenterology: WJG* 14(13), 2110.
- Livak, K. J. und T. D. Schmittgen (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the $2^{-(\Delta\Delta C_t)}$ method. *methods* 25(4), 402–408.
- Lu, H., K. Kojima, V. L. Battula, B. Korchin, Y. Shi, Y. Chen, S. Spong, D. A. Thomas, H. Kantarjian, R. B. Lock et al. (2013). Targeting connective tissue growth factor (ctgf) in acute lymphoblastic leukemia preclinical models: anti-ctgf monoclonal antibody attenuates leukemia growth. *Annals of hematology*, 1–8.
- Ma, Q., D. Jones, P. R. Borghesani, R. A. Segal, T. Nagasawa, T. Kishimoto, R. T. Bronson und T. A. Springer (1998). Impaired b-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in cxcr4-and sdf-1-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95(16), 9448–9453.
- Maeda, A., T. Nishida, E. Aoyama, S. Kubota, K. M. Lyons, T. Kuboki und M. Takigawa (2009). Ccn family 2/connective tissue growth factor modulates bmp signalling as a signal conductor, which action regulates the proliferation and differentiation of chondrocytes. *Journal of biochemistry* 145(2), 207–216.
- Matsunaga, T., N. Takemoto, T. Sato, R. Takimoto, I. Tanaka, A. Fujimi, T. Akiyama, H. Kuroda, Y. Kawano, M. Kobune et al. (2003). Interaction between leukemic-cell VLA-4 and stromal fibronectin is a decisive factor for minimal residual disease of acute myelogenous leukemia. *Nature medicine* 9(9), 1158–1165.
- Matsuo, Y., R. MacLeod, C. Uphoff, H. Drexler, C. Nishizaki, Y. Katayama, G. Kimura, N. Fujii, E. Omoto, M. Harada et al. (1997). Two acute monocytic leukemia (aml-m5a) cell lines (molm-13 and molm-14) with interclonal phenotypic heterogeneity showing mll-af9 fusion resulting from an occult chromosome insertion, ins(11; 9)(q23; p22p23). *Leukemia* 11(9), 1469–1477.
- Mizuki, M., R. Fenski, H. Halfter, I. Matsumura, R. Schmidt, C. Muller, W. Gruning, K. Kratz-Albers, S. Serve, C. Steur et al. (2000). Flt3 mutations from patients

- with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways. *Blood* 96(12), 3907–3914.
- Möhle, R., C. Failenschmid, F. Bautz und L. Kanz (1999). Overexpression of the chemokine receptor *cxcr4* in b cell chronic lymphocytic leukemia is associated with increased functional response to stromal cell-derived factor-1 (*sdf-1*). *Leukemia* 13(12), 1954–1959.
- Moore, K. A., H. Ema und I. R. Lemischka (1997). In vitro maintenance of highly purified, transplantable hematopoietic stem cells. *Blood* 89(12), 4337–4347.
- Mori, T., S. Kawara, M. Shinozaki, N. Hayashi, T. Kakinuma, A. Igarashi, M. Takigawa, T. Nakanishi und K. Takehara (1999). Role and interaction of connective tissue growth factor with transforming growth factor- β in persistent fibrosis: A mouse fibrosis model. *Journal of cellular physiology* 181(1), 153–159.
- Moscicki, R., E. Amento, S. Krane, J. Kurnick und R. Colvin (1983). Modulation of surface antigens of a human monocyte cell line, u937, during incubation with t lymphocyte-conditioned medium: detection of t4 antigen and its presence on normal blood monocytes. *The Journal of Immunology* 131(2), 743–748.
- Müller, A., B. Homey, H. Soto, N. Ge, D. Catron, M. E. Buchanan, T. McClanahan, E. Murphy, W. Yuan, S. N. Wagner et al. (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *nature* 410(6824), 50–56.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn und H. Erlich (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology* 51(1), 263–273.
- Nazha, A., C. Bueso-Ramos, E. Estey, S. Faderl, S. O'Brien, M. H. Fernandez, M. Nguyen, C. Koller, E. Freireich, M. Beran et al. (2013). The addition of all-trans retinoic acid to chemotherapy may not improve the outcome of patient with *npm1* mutated acute myeloid leukemia. *Frontiers in oncology* 3.
- Neesse, A., K. K. Frese, T. E. Bapiro, T. Nakagawa, M. D. Sternlicht, T. W. Seeley, C. Pilarsky, D. I. Jodrell, S. M. Spong und D. A. Tuveson (2013). Ctgf antagonism with mab fg-3019 enhances chemotherapy response without increasing drug delivery in murine ductal pancreas cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(30), 12325–12330.
- Nishida, T., H. Kawaki, R. M. Baxter, R. A. DeYoung, M. Takigawa und K. M. Lyons (2007). *Ccn2* (connective tissue growth factor) is essential for extracellular matrix production and integrin signaling in chondrocytes. *Journal of cell communication and signaling* 1(1), 45–58.

- Nishida, T., S. Kubota, E. Aoyama, D. Janune, A. Maeda und M. Takigawa (2011). Effect of *ccn2* on *fgf2*-induced proliferation and *mmp9* and *mmp13* productions by chondrocytes. *Endocrinology* 152(11), 4232–4241.
- Nolta, J., F. Thiemann, J. Arakawa-Hoyt, M. Dao, L. Barsky, K. Moore, I. Lemischka und G. Crooks (2002). The aft024 stromal cell line supports long-term ex vivo maintenance of engrafting multipotent human hematopoietic progenitors. *Leukemia* 16(3), 352–361.
- O’Neill, E. E., D. Matallanas und W. Kolch (2005). Mammalian sterile 20-like kinases in tumor suppression: An emerging pathway. *Cancer research* 65(13), 5485–5487.
- Ota, M. und H. Sasaki (2008). Mammalian tead proteins regulate cell proliferation and contact inhibition as transcriptional mediators of hippo signaling. *Development* 135(24), 4059–4069.
- Overholtzer, M., J. Zhang, G. A. Smolen, B. Muir, W. Li, D. C. Sgroi, C.-X. Deng, J. S. Brugge und D. A. Haber (2006). Transforming properties of *yap*, a candidate oncogene on the chromosome 11q22 amplicon. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(33), 12405–12410.
- Pan, D. (2010). The hippo signaling pathway in development and cancer. *Developmental cell* 19(4), 491–505.
- Perbal, B. (2004). *Ccn* proteins: multifunctional signalling regulators. *The Lancet* 363(9402), 62–64.
- Quentmeier, H., M. Martelli, W. Dirks, N. Bolli, A. Liso, R. MacLeod, I. Nicoletti, R. Mannucci, A. Pucciarini, B. Bigerna et al. (2005). Cell line *oci/aml3* bears exon-12 *npm* gene mutation-a and cytoplasmic expression of nucleophosmin. *Leukemia* 19(10), 1760–1767.
- Quentmeier, H., J. Reinhardt, M. Zaborski und H. Drexler (2003). *Flt3* mutations in acute myeloid leukemia cell lines. *Leukemia* 17(1), 120–124.
- Ramos, A. und F. D. Camargo (2012). The hippo signaling pathway and stem cell biology. *Trends in cell biology* 22(7), 339–346.
- Reslan, L., S. Dalle und C. Dumontet (2009). Understanding and circumventing resistance to anticancer monoclonal antibodies. In *MAbs*, Volume 1, pp. 222–229. Landes Bioscience.
- Rettig, M. P., G. Anstas und J. F. DiPersio (2011). Mobilization of hematopoietic stem and progenitor cells using inhibitors of *cxcr4* and *vla-4*. *Leukemia* 26(1), 34–53.

- Rosenbluh, J., D. Nijhawan, A. G. Cox, X. Li, J. T. Neal, E. J. Schafer, T. I. Zack, X. Wang, A. Tsherniak, A. C. Schinzel et al. (2012). β -catenin-driven cancers require a yap1 transcriptional complex for survival and tumorigenesis. *Cell* 151(7), 1457–1473.
- Saito, Y., H. Kitamura, A. Hijikata, M. Tomizawa-Murasawa, S. Tanaka, S. Takagi, N. Uchida, N. Suzuki, A. Sone, Y. Najima et al. (2010). Identification of therapeutic targets for quiescent, chemotherapy-resistant human leukemia stem cells. *Science translational medicine* 2(17), 17ra9.
- Sala-Torra, O., H. M. Gundacker, D. L. Stirewalt, P. A. Ladne, E. L. Pogossova-Agadjanyan, M. L. Slovak, C. L. Willman, S. Heimfeld, D. H. Boldt und J. P. Radich (2007). Connective tissue growth factor (ctgf) expression and outcome in adult patients with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 109(7), 3080–3083.
- Schlenk, R. F., K. Döhner, M. Kneba, K. Götze, F. Hartmann, F. Del Valle, H. Kirchen, E. Koller, J. T. Fischer, L. Bullinger et al. (2009). Gene mutations and response to treatment with all-trans retinoic acid in elderly patients with acute myeloid leukemia. results from the amlsg trial aml hd98b. *haematologica* 94(1), 54–60.
- Schober, J. M., N. Chen, T. M. Grzeszkiewicz, I. Jovanovic, E. E. Emeson, T. P. Ugarova, D. Y. Richard, L. F. Lau und S. C.-T. Lam (2002). Identification of integrin $\alpha\text{m}\beta\text{2}$ as an adhesion receptor on peripheral blood monocytes for *cyr61* (*ccn1*) and connective tissue growth factor (*ccn2*): immediate-early gene products expressed in atherosclerotic lesions. *Blood* 99(12), 4457–4465.
- Shakunaga, T., T. Ozaki, N. Ohara, K. Asaumi, K. Nishida, A. Kawai, T. Nakanishi, M. Takigawa, H. Inoue et al. (2000). Expression of connective tissue growth factor in cartilaginous tumors. *Cancer* 89(7), 1466–1473.
- Shan, D., J. A. Ledbetter und O. W. Press (1998). Apoptosis of malignant human b cells by ligation of cd20 with monoclonal antibodies. *Blood* 91(5), 1644–1652.
- Shapiro, H. M. (1981). Flow cytometric estimation of dna and rna content in intact cells stained with hoechst 33342 and pyronin y. *Cytometry* 2(3), 143–150.
- Shi-wen, X., L. A. Stanton, L. Kennedy, D. Pala, Y. Chen, S. L. Howat, E. A. Renzoni, D. E. Carter, G. Bou-Gharios, R. J. Stratton et al. (2006). *Ccn2* is necessary for adhesive responses to transforming growth factor- β1 in embryonic fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry* 281(16), 10715–10726.
- Shultz, L. D., P. A. Schweitzer, S. W. Christianson, B. Gott, I. B. Schweitzer, B. Tenent, S. McKenna, L. Mobraaten, T. Rajan und D. L. Greiner (1995). Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in *nod/ltsz-scid* mice. *The*

Journal of Immunology 154(1), 180–191.

- Shweiki, D., A. Itin, D. Soffer und E. Keshet (1992). Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359(6398), 843–845.
- Singh, S., C. Hawkins, I. Clarke, J. Squire, J. Bayani, T. Hide, R. Henkelman, M. Cusimano und P. Dirks (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432(7015), 396–401.
- Song, H., K. K. Mak, L. Topol, K. Yun, J. Hu, L. Garrett, Y. Chen, O. Park, J. Chang, R. M. Simpson et al. (2010). Mammalian mst1 and mst2 kinases play essential roles in organ size control and tumor suppression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(4), 1431–1436.
- Spoo, A. C., M. Lübbert, W. G. Wierda und J. A. Burger (2007). Cxcr4 is a prognostic marker in acute myelogenous leukemia. *Blood* 109(2), 786–791.
- Springer, T. A. (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76(2), 301–314.
- St, M. A., W. Tao, X. Fei, R. Fukumoto, M. L. Carcangiu, D. G. Brownstein, A. F. Parlow, J. McGrath und T. Xu (1999). Mice deficient of lats1 develop soft-tissue sarcomas, ovarian tumours and pituitary dysfunction. *Nature genetics* 21(2), 182–186.
- Stewart, S. A., D. M. Dykxhoorn, D. Palliser, H. Mizuno, E. Y. Yi, D. S. An, D. M. Sabatini, I. S. Chen, W. C. Hahn, P. A. Sharp et al. (2003). Lentivirus-delivered stable gene silencing by rnaï in primary cells. *Rna* 9(4), 493–501.
- Stone, R., D. DeAngelo, V. Klimek, I. Galinsky, E. Estey, S. Nimer, W. Grandin, D. Lebowhl, Y. Wang, P. Cohen et al. (2005). Patients with acute myeloid leukemia and an activating mutation in FLT3 respond to a small-molecule FLT3 tyrosine kinase inhibitor, PKC412. *Blood* 105(1), 54–60.
- Sundström, C. und K. Nilsson (1976). Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (u-937). *International journal of cancer* 17(5), 565–577.
- Suzuma, K., K. Naruse, I. Suzuma, N. Takahara, K. Ueki, L. P. Aiello und G. L. King (2000). Vascular endothelial growth factor induces expression of connective tissue growth factor via kdr, flt1, and phosphatidylinositol 3-kinase-akt-dependent pathways in retinal vascular cells. *Journal of Biological Chemistry* 275(52), 40725–40731.

- Tachibana, K., S. Hirota, H. Iizasa, H. Yoshida, K. Kawabata, Y. Kataoka, Y. Kitamura, K. Matsushima, N. Yoshida, S.-i. Nishikawa et al. (1998). The chemokine receptor *cxcr4* is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* 393(6685), 591–594.
- Takahashi, Y., Y. Miyoshi, C. Takahata, N. Irahara, T. Taguchi, Y. Tamaki und S. Noguchi (2005). Down-regulation of *lats1* and *lats2* mrna expression by promoter hypermethylation and its association with biologically aggressive phenotype in human breast cancers. *Clinical Cancer Research* 11(4), 1380–1385.
- Takubo, K., N. Goda, W. Yamada, H. Iriuchishima, E. Ikeda, Y. Kubota, H. Shima, R. S. Johnson, A. Hirao, M. Suematsu et al. (2010). Regulation of the *hif-1 α* level is essential for hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* 7(3), 391–402.
- Tan, T.-W., C.-H. Lai, C.-Y. Huang, W.-H. Yang, H.-T. Chen, H.-C. Hsu, Y.-C. Fong und C.-H. Tang (2009). *Ctgf* enhances migration and *mmp-13* up-regulation via $\alpha v \beta 3$ integrin, *fak*, *erk*, and *nf- κ b*-dependent pathway in human chondrosarcoma cells. *Journal of cellular biochemistry* 107(2), 345–356.
- Tavor, S., M. Eisenbach, J. Jacob-Hirsch, T. Golan, I. Petit, K. Benzion, S. Kay, S. Baron, N. Amariglio, V. Deutsch et al. (2008). The *cxcr4* antagonist *amd3100* impairs survival of human aml cells and induces their differentiation. *Leukemia* 22(12), 2151–2158.
- Tavor, S. und I. Petit (2010). Can inhibition of the *sdf-1/cxcr4* axis eradicate acute leukemia? In *Seminars in cancer biology*, Volume 20, pp. 178–185. Elsevier.
- Tavor, S., I. Petit, S. Porozov, A. Avigdor, A. Dar, L. Leider-Trejo, N. Shemtov, V. Deutsch, E. Naparstek, A. Nagler et al. (2004). *Cxcr4* regulates migration and development of human acute myelogenous leukemia stem cells in transplanted *nod/scid* mice. *Cancer research* 64(8), 2817–2824.
- Teicher, B. A. und S. P. Fricker (2010). *Cxcl12 (sdf-1)/cxcr4* pathway in cancer. *Clinical Cancer Research* 16(11), 2927–2931.
- Tesfai, Y., J. Ford, K. W. Carter, M. J. Firth, R. A. O’Leary, N. G. Gottardo, C. Cole und U. R. Kees (2012). Interactions between acute lymphoblastic leukemia and bone marrow stromal cells influence response to therapy. *Leukemia research* 36(3), 299–306.
- Tong, X., D. Xie, J. O’Kelly, C. W. Miller, C. Muller-Tidow und H. P. Koeffler (2001). *Cyr61*, a member of *ccn* family, is a tumor suppressor in non-small cell lung cancer. *Journal of Biological Chemistry* 276(50), 47709–47714.

- Towbin, H., T. Staehelin und J. Gordon (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76(9), 4350–4354.
- Travaglino, E., C. Benatti, L. Malcovati, M. Della Porta, A. Galli, E. Bonetti, V. Rosti, M. Cazzola und R. Invernizzi (2008). Biological and clinical relevance of matrix metalloproteinases 2 and 9 in acute myeloid leukaemias and myelodysplastic syndromes. *European journal of haematology* 80(3), 216–226.
- Uy, G. L., M. P. Rettig, I. H. Motabi, K. McFarland, K. M. Trinkaus, L. M. Hladnik, S. Kulkarni, C. N. Abboud, A. F. Cashen, K. E. Stockerl-Goldstein et al. (2012). A phase 1/2 study of chemosensitization with the cxcr4 antagonist plerixafor in relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood* 119(17), 3917–3924.
- Vermes, I., C. Haanen, H. Steffens-Nakken und C. Reutellingsperger (1995). A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V. *Journal of immunological methods* 184(1), 39–51.
- Vorwerk, P., H. Wex, B. Hohmann, Y. Oh, R. Rosenfeld und U. Mittler (2000). Ctgf (igfbp-rp2) is specifically expressed in malignant lymphoblasts of patients with acute lymphoblastic leukaemia (all). *British journal of cancer* 83(6), 756.
- Wang, M.-Y., P.-S. Chen, E. Prakash, H.-C. Hsu, H.-Y. Huang, M.-T. Lin, K.-J. Chang und M.-L. Kuo (2009). Connective tissue growth factor confers drug resistance in breast cancer through concomitant up-regulation of bcl-xl and ciap1. *Cancer research* 69(8), 3482–3491.
- Warrell Jr, R. P., S. R. Frankel, W. H. Miller Jr, D. A. Scheinberg, L. M. Itri, W. N. Hittelman, R. Vyas, M. Andreeff, A. Tafuri, A. Jakubowski et al. (1991). Differentiation therapy of acute promyelocytic leukemia with tretinoin (all-trans-retinoic acid). *New England Journal of Medicine* 324(20), 1385–1393.
- Weinberg, O. K., M. Seetharam, L. Ren, K. Seo, L. Ma, J. D. Merker, J. Gotlib, J. L. Zehnder und D. A. Arber (2009). Clinical characterization of acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes as defined by the 2008 who classification system. *Blood* 113(9), 1906–1908.
- Wenger, C., V. Ellenrieder, B. Alber, U. Lacher, A. Menke, H. Hameister, M. Wilda, T. Iwamura, H. G. Beger, G. Adler et al. (1999). Expression and differential regulation of connective tissue growth factor in pancreatic cancer cells. *Oncogene* 18(4), 1073–1080.

- Winer, J., C. K. S. Jung, I. Shackel und P. M. Williams (1999). Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase–polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes *in vitro*. *Analytical biochemistry* 270(1), 41–49.
- Wong, M. und J. Medrano (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* 39(1), 75–85.
- Xie, D., K. Nakachi, H. Wang, R. Elashoff und H. P. Koeffler (2001). Elevated levels of connective tissue growth factor, wisp-1, and cyr61 in primary breast cancers associated with more advanced features. *Cancer research* 61(24), 8917–8923.
- Xie, D., D. Yin, H.-J. Wang, G.-T. Liu, R. Elashoff, K. Black und H. P. Koeffler (2004). Levels of expression of cyr61 and ctgf are prognostic for tumor progression and survival of individuals with gliomas. *Clinical Cancer Research* 10(6), 2072–2081.
- Yang, F., J. A. Tuxhorn, S. J. Ressler, S. J. McAlhany, T. D. Dang und D. R. Rowley (2005). Stromal expression of connective tissue growth factor promotes angiogenesis and prostate cancer tumorigenesis. *Cancer research* 65(19), 8887–8895.
- Yuen, H.-F., C. M. McCrudden, Y.-H. Huang, J. M. Tham, X. Zhang, Q. Zeng, S.-D. Zhang und W. Hong (2013). Taz expression as a prognostic indicator in colorectal cancer. *PloS one* 8(1), e54211.
- Zeng, Z., I. J. Samudio, M. Munsell, J. An, Z. Huang, E. Estey, M. Andreeff und M. Konopleva (2006). Inhibition of cxcr4 with the novel rcp168 peptide overcomes stroma-mediated chemoresistance in chronic and acute leukemias. *Molecular Cancer Therapeutics* 5(12), 3113–3121.
- Zeng, Z., Y. Xi Shi, I. Samudio, R. Wang, X. Ling, O. Frolova, M. Levis, J. Rubin, R. Negrin, E. Estey et al. (2009). Targeting the leukemia microenvironment by CXCR4 inhibition overcomes resistance to kinase inhibitors and chemotherapy in AML. *Blood* 113(24), 6215–6224.
- Zhang, H., C.-Y. Liu, Z.-Y. Zha, B. Zhao, J. Yao, S. Zhao, Y. Xiong, Q.-Y. Lei und K.-L. Guan (2009). Tead transcription factors mediate the function of taz in cell growth and epithelial-mesenchymal transition. *Journal of biological chemistry* 284(20), 13355–13362.
- Zhang, H., H. A. Pasolli und E. Fuchs (2011). Yes-associated protein (yap) transcriptional coactivator functions in balancing growth and differentiation in skin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(6), 2270–2275.

- Zhang, J., C. Niu, L. Ye, H. Huang, X. He, W.-G. Tong, J. Ross, J. Haug, T. Johnson, J. Q. Feng et al. (2003). Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 425(6960), 836–841.
- Zhao, B., Q.-Y. Lei und K.-L. Guan (2008). The hippo–yap pathway: New connections between regulation of organ size and cancer. *Current opinion in cell biology* 20(6), 638–646.
- Zhao, B., L. Li, Q. Lu, L. H. Wang, C.-Y. Liu, Q. Lei und K.-L. Guan (2011). Angiomotin is a novel hippo pathway component that inhibits yap oncoprotein. *Genes & development* 25(1), 51–63.
- Zhao, B., X. Wei, W. Li, R. S. Udan, Q. Yang, J. Kim, J. Xie, T. Ikenoue, J. Yu, L. Li et al. (2007). Inactivation of yap oncoprotein by the hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes & development* 21(21), 2747–2761.
- Zhao, B., X. Ye, J. Yu, L. Li, W. Li, S. Li, J. Yu, J. D. Lin, C.-Y. Wang, A. M. Chinnaiyan et al. (2008). Tead mediates yap-dependent gene induction and growth control. *Genes & development* 22(14), 1962–1971.
- Zhou, Z., Y. Hao, N. Liu, L. Raptis, M. Tsao und X. Yang (2011). Taz is a novel oncogene in non-small cell lung cancer. *Oncogene* 30(18), 2181–2186.
- Zufferey, R., T. Dull, R. J. Mandel, A. Bukovsky, D. Quiroz, L. Naldini und D. Trono (1998). Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *Journal of virology* 72(12), 9873–9880.
- Zufferey, R., D. Nagy, R. J. Mandel, L. Naldini und D. Trono (1997). Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nature biotechnology* 15(9), 871–875.
- Zuo, G.-W., C. D. Kohls, B.-C. He, L. Chen, W. Zhang, Q. Shi, B.-Q. Zhang, Q. Kang, J. Luo, X. Luo et al. (2010). The ccn proteins: important signaling mediators in stem cell differentiation and tumorigenesis. *Histology and histopathology* 25(6), 795.

Danksagung

Allen, die zum Entstehen dieser Doktorarbeit beigetragen und mich auf diesem Wege unterstützt haben, möchte ich herzlich Danke sagen.

