

Universitätsklinikum Ulm
Zentrum für Innere Medizin
Klinik für Innere Medizin III

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Hartmut Döhner

**Untersuchung von *PPP4R2* als Kandidatengen bei
der akuten myeloischen Leukämie (AML)**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

verfasst von Philipp Zimmermann,
geboren in Neustadt an der Weinstraße

2017

Amtierender Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Konstanze Döhner

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Holger Cario

Tag der Promotion: 17.05.2018

Teile dieser Arbeit wurden bereits in folgenden Fachartikeln veröffentlicht:

Herzig J K, Bullinger L, Tasdogan A, Zimmermann P, Schlegel M, Teleanu V, Weber D, Rucker F G, Paschka P, Dolnik A, Schneider E, Kuchenbauer F, Heidel F H, Buske C, Dohner H, Dohner K, Gaidzik V I: Protein phosphatase 4 regulatory subunit 2 (PPP4R2) is recurrently deleted in acute myeloid leukemia and required for efficient DNA double strand break repair. *Oncotarget*, 8: 95038-95053 (2017)

I. Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis.....	I
----------------------------	---

II. Abkürzungsverzeichnis	III
---------------------------------	-----

II.I Generelle Abkürzungen.....	III
---------------------------------	-----

II.II Gennamen	VI
----------------------	----

1. Einleitung	1
---------------------	---

1.1 Die akute myeloische Leukämie.....	1
--	---

1.2 Die Bedeutung von molekulargenetischen Veränderungen in der CN-AML	7
--	---

1.3 Klinisch etablierte Marker und ihre prognostische Bedeutung	7
---	---

1.4 Marker mit geringer klinischer Relevanz.....	9
--	---

1.5 Die Suche nach neuen Kandidatengenen.....	11
---	----

1.6 Das <i>PPP4R2</i> -Gen.....	15
---------------------------------	----

1.6.1 Lokalisation und Aufbau.....	15
------------------------------------	----

1.6.2 Funktion von PPP4R2 und Interaktion mit PP4c	15
--	----

1.6.3 Bedeutung von PP4 in der Onkogenese/Leukämogenese	18
---	----

1.7 Zielsetzung.....	18
----------------------	----

2. Material und Methoden	20
--------------------------------	----

2.1 Patientenkollektiv	20
------------------------------	----

2.2 Materialgewinnung und -aufbereitung.....	22
--	----

2.3 DNA- und RNA-Extraktion	23
-----------------------------------	----

2.4 cDNA-Synthese.....	26
------------------------	----

2.5 Real-Time Polymerasekettenreaktion (RQ-PCR).....	27
--	----

2.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)	28
--	----

2.7 PCR-Produktkontrolle / Gelelektrophorese	32
--	----

2.8 PCR-Aufreinigung	33
----------------------------	----

2.9 Cycle Sequencing Reaction.....	33
------------------------------------	----

2.10 Aufreinigung des CSR-Produkts.....	35
2.11 Sequenzierung.....	35
2.12 Globale Expressionsanalyse	36
2.13 Statistische Auswertung und Grafiken.....	37
3. Ergebnisse	38
3.1 Auswertung der Real-Time RQ-PCR	38
3.2 Etablierung der PCR.....	41
3.3 Sequenzanalyse	42
3.4 Globale Expressionsanalyse	47
4. Diskussion	53
4.1 PPP4R2-Expressionsanalyse mittels RQ-PCR.....	53
4.2 Mutationsscreening von PPP4R2	54
4.3 Globale Expressionsanalyse	55
4.3.1 <i>PPP4R2</i> Expression-assoziiertes Genexpressionsmuster	55
4.3.2 Potentielle funktionelle Relevanz des <i>PPP4R2</i> -assoziierten Genexpressionsmusters.....	56
4.4 Bedeutung der MAR und PPP4R2	59
4.5 Ausblick	61
5. Zusammenfassung.....	62
6. Literaturverzeichnis	64
7. Danksagung	73
8. Lebenslauf	74

II. Abkürzungsverzeichnis

II.I Generelle Abkürzungen

A	Adenin
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
APL	Akute Promyelozyten Leukämie
AW1/2	Waschpuffer 1 und 2
B2M	Beta2-Mikroglobulin
CGH	Comparative genomic hybridization
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CNA	Copy number alterations
CN-AML	Akute myeloische Leukämie mit normalem Karyotyp
COSMIC	Catalogue of somatic mutations in cancer
CR	Komplette Remission (complete remission)
CSR	Cycle Sequencing Reaction
CT	Cycle Threshold
C	Cytosin
ddNTP	Didesoxynukleotide
Dm	Double mutations
dNTP	Desoxynukleosid-triphosphat

EB	Eluierungspuffer
EGF	Epidermal growth factor
ELN	European Leukemia Net
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
FAB	French-American-British-Group Klassifikation der AML
FAS	Apoptose vermittelnder Oberflächenrezeptor
GEO	Genome Expression Omnibus
G	Guanin
HOX	Homeobox
inv	Inversion
ITD	Internal tandem duplication
KI	Konfidenzintervall
MAR	Minimally altered region = rekurrente CNA auf 3p in der AML
MGB	Minor groove binder
MgCl₂	Magnesiumdichlorid
miRNA	MicroRNA
Mw	Mittelwert
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NGS	Next generation sequencing
NK	Negativkontrolle

NOS	Not otherwise specified
OS	Gesamtüberleben (overall survival)
p	Kurzer bzw. p-Arm eines Chromosoms
PB	Bindepuffer
PBS	Phosphate buffered saline
PcG	Polycomb Gruppe
PE	Waschpuffer
PML	Promyelocytic leukemia
PTD	Partielle Tandemduplikation
q	Langer bzw. q-Arm eines Chromosoms
RFS	Rezidiv freies Überleben (relapse free survival)
RLT	Lysepuffer
RPA	Replikationsprotein A
RPE	RNA Waschpuffer
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Reverse Transkriptase
RT/RQ-PCR	Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction
RW1	Puffer für membrangebundene RNA
Sm	Single mutations
SNP	Single-nucleotid-polymorphism

t	Translokation
T	Thymin
TE	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
TKD	Tyrosinkinasedomäne
Tm	Schmelztemperatur
Tr	Triplikate
UPD	Uniparentale Disomie
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Verdünnungsreihe
WHO	Weltgesundheitsorganisation
Y	Y-Chromosom

II.II Gennamen

ABI1	Abl interactor 1
ABL1	ABL proto-oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase
AFF4	AF4/FMR2 family member 4
AP1G1	Adaptor related protein complex 1 gamma 1 subunit
ARPP-19	cAMP regulated phosphoprotein 19
ATP11B	ATPase phospholipid transporting 11B (putative)
BACH1	BTB domain and CNC homolog 1

BCR	Breakpoint cluster region
C13orf23	Proline and serine rich 1
C14orf11	E2F associated phosphoprotein
C14orf149	Trans-L-3-hydroxyproline dehydratase
C14orf159	Chromosome 14 open reading frame 159
C16orf72	Chromosome 16 open reading frame 72
C1orf9	SUN domain containing ossification factor
C20orf77	Regulation of nuclear pre-mRNA domain containing 1B
CALML4	Calmodulin like 4
CBFB	Core binding factor beta
CEBPA	CCAAT/ enhancer binding protein alpha Gen
CENPC1	Centromere proteine C1
CTBP2	C-terminal binding proteine 2
CYLD	CYLD lysine 63 deubiquitinase
DBC1	Deleted in breast cancer-1
DCP1A	Decapping mRNA 1A
DCTN4	Dynactin subunit 4
DEK	DEK proto-oncogene
DNMT3A	DNA (cytosine-5) -methyltransferase 3 alpha
EIF4E3	Eukaryotic translation initiation factor 4E family member

EVI1	Ecotropic viral integration site 1
FBXL3	F-box and leucine rich repeat protein 3
FLT3	Fms-related tyrosine kinase 3
FOXP1	Forkheadbox P1
FXR1	FMR1 autosomal homolog 1
GLT8D4	Entspricht GXYLT2 (Glucosidase Xylosyltransferase 2)
GNA13	G protein subunit alpha 13
GPBP1	GC-rich promoter binding protein 1
GPR27	G-protein coupled receptor 27
GTF2B	General transcription factor IIB
GXYLT2	Glucosidase Xylosyltransferase 2
HERC4	HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 4
HMG2L1	HMG-box containing 4
HPK1	Hematopoietic progenitor kinase 1
IDH1/2	Isocitrate dehydrogenase 1 und 2
JARID1A	Lysine demethylase 5A
JMJD1A	Lysine demethylase 3A
KAP1	KRAB-associated protein-1
LATS2	Large tumor suppressor kinase 2
LHX4	LIM homeobox 4

LUC7L2	LUC7 like 2, pre-mRNA splicing factor
MAD2L1BP	MAD2L1 binding protein
MAPK6	Mitogen-activated protein kinase 6
MAX	MYC associated factor X
MDM2	MDM2 oncogene
MIER1	MIER1 transcriptional regulator
MK5	Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 5
MKKS	McKusick-Kaufman syndrome
MKL1	Megakaryoblastic leukemia (translocation) 1
MLL	Mixed lineage leukemia-Gen
MLLT3	MLLT3 super elongation complex subunit
MRPL19	Mitochondrial ribosomal protein L19
MYH11	Myosin heavy chain 11
NECAP1	NECAP endocytosis associated 1
NPM1	Nucleophosmin 1
NRAS	Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog-Gen
NRBF2	Nuclear receptor binding factor 2
NUP214	Nucleoporin 214
NUP54	Nucleoporin 54
PAX5	Paired box gene 5

PBDG	Hydroxymethylbilansynthase
PEA-15	Phosphoprotein enriched in astrocytes 15
PP2Ac	Proteinphosphatase 2 A, catalytic subunit
PP4c	Proteinphosphatase 4, catalytic subunit
PPM1A	Protein phosphatase, Mg ²⁺ /Mn ²⁺ dependent 1A
PPP2R2A	Protein phosphatase 2 regulatory subunit B alpha
PPP4R2	Protein phosphatase 4 regulatory subunit 2
PREI3	MOB family member 4, phocein
PROK2	Prokinectin 2
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RAB1A	RAB1A, member RAS oncogene family
RAB22A	RAB22A, member RAS oncogene family
RAB5A	RAB5A, member RAS oncogene family
RAB8B	RAB8B member RAS oncogene family
RANBP2	RAN binding protein 2
RARA	Retinoic acid receptor alpha
RAS	Rat sarcoma
RBM15	RNA binding motif protein 15
RFFL	Ring finger and FYVE like domain containing E3 ubiquitin protein ligase
Rho	Ras homologue

RLF	Rearranged L-myc fusion
RNF138	Ring finger protein 138
ROCK2	Rho associated coiled-coil containing protein kinase 2
RP2	RP2, ARL3 GTPase activating protein
RPN1	Proteasome regulatory particle base subunit RPN1
RUNX1	Run-related transcription factor 1
RUNX1T	RUNX1 translocation partner 1
RYBP	RING1 and YY1 binding protein
SEC24A	SEC24 homolog A, COPII coat complex component
SERINC1	Serine incorporator 1
SF3B1	Splicing factor 3 subunit 1
SFRS12	Splicing regulatory glutamic acid and lysine rich protein 1
SH3GLB1	SH3 domain containing GRB2 like, endophilin B1
SHOC2	SHOC2, leucine rich repeat scaffold protein
SHQ1	SHQ1, H/ACA ribonucleoprotein assembly factor
SIRT5	Sirtuin 5
SNRK	SNF related kinase
SPAG9	Sperm associated antigen 9
STK17A	Serine/threonine kinase 17a
TBC1D23	TBC1 domain family member 23

TCEA1	Transcription elongation factor A1
TET2	Tet oncogene family member 2
TGF beta	Transforming growth factor beta
TMPRSS2-ERG	Transmembrane protease, serine 2; v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog
TOR1AIP1	Torsin 1A interacting protein 1
TP53	Tumor protein 53
TP53BP2	Tumor protein p53 binding protein 2
TSC22D2	TSC22 domain family member 2
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VISA	Mitochondrial antiviral signaling protein
WDFY1	WD repeat and FYVE domain containing 1
WT1	Wilms Tumor 1
YME1L1	YME1 like 1 ATPase
ZNF281	Zinc finger protein 281
ZNF508	Activity-dependent neuroprotective protein homeobox 2
ZNF638	Zinc finger protein 638
ZNF644	Zinc finger protein 644
ZRANB1	Zinc finger RANBP2-type containing 1

1. Einleitung

1.1 Die akute myeloische Leukämie

Leukämie ist eine Erkrankung des blutbildenden Systems, bei der es zu einer ungehemmten, monoklonalen Proliferation von unreifen Vorläuferzellen der Leukozyten kommt. Unbehandelt entwickelt sich eine Verdrängung und Insuffizienz der anderen Zellreihen des Knochenmarks. Es kann dabei zu einer Ausschwemmung der neoplastischen Zellen in das Blut kommen, wovon sich der Begriff Leukämie ursprünglich ableitet. Eine erste, grobe Unterscheidung wird zwischen der Herkunft der Zellen und dem klinischen Verlauf getroffen. Während lymphatische Leukämien von Vorläuferzellen der Lymphozyten ausgehen, entarten bei myeloischen Leukämien die Vorläufer der Granulozyten, Erythrozyten und Thrombozyten. Der natürliche Verlauf erlaubt eine zweite Unterteilung in akute und chronische Leukämien. Die akute Form kann durch die rapide Entwicklung einer hämatopoetischen Insuffizienz unbehandelt innerhalb weniger Wochen zum Tod führen.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der akuten myeloischen Leukämie (AML). Die AML ist eine klonale, genetisch heterogene Erkrankung einer frühen myeloischen Vorläuferzelle und ist mit einer Inzidenz in Deutschland von 2,5/100.000 Einwohner/Jahr die häufigste akute Leukämieform im Erwachsenenalter; das mittlere Erkrankungsalter liegt bei ca. 65 Jahren (Herold 2010; Harrison u. Fauci 2009).

Bis zu Beginn der 90er Jahre wurde die AML nach rein morphologischen Kriterien mittels FAB-Klassifikation (French-American-British-Group) in mehrere Subtypen eingeteilt.

Basierend auf den Forschungsergebnissen der letzten Jahre, wurde diese Klassifikation weiterentwickelt und das Vorhandensein genetischer Aberrationen, sowie spezifischer Zelloberflächenmarker berücksichtigt.

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass circa 55% der AML-Erkrankungen mit Chromosomenaberrationen einhergehen. Diese Veränderungen können als wichtigster prognostischer Faktor für eine komplette Remission (CR), rezidiv-freies Überleben (RFS) und das Gesamtüberleben (OS) gesehen werden (Döhner et Döhner 2008; Bullinger et al. 2010; Döhner u. Gaidzik 2011). Anhand des Karyotyps werden die Patienten in eine der drei Risikogruppen (günstige, intermediäre und ungünstige Risikogruppe) eingeteilt (Döhner et al. 2010; Lin u. Smith 2011; Byrd et al. 2002).

Tabelle 1 | Risikostratifizierung anhand des Karyotyps in Bezug auf das Gesamtüberleben modifiziert nach Byrd et al CALGB-Studiengruppe 2002 (del: Deletion, t: Translokation, abn: Abnormalität, inv: Inversion, p: kurzer bzw. p-Arm eines Chromosoms, q: langer bzw. q-Arm eines Chromosoms, Y: Y-Chromosom)

Risikogruppe	Karyotyp
günstig	inv(16) oder t(16;16) t(8;21) del(9q)
intermediär	Normaler Karyotyp t(9;11) -Y del(5q)del(7q) +11 del(11q) abn(12p) +13 del(20q) +21
ungünstig	Komplexer Karyotyp ≥ 3 Abnormalitäten t(6;11) -7 +8 [alleinig oder mit einer weiteren Abnormalität außer (8;21), t(9;11) und inv(16) oder t(16;16)] t(11;19)(q23;p13.1) inv 3 oder t(3;3) t(6;9)

Aufgrund der zunehmenden prognostischen Relevanz molekulargenetischer Aberrationen, wurden in der letzten Auflage der WHO-Klassifikation (Weltgesundheitsorganisation) im August 2008 erstmals auch die molekularen Marker *NPM1* (*Nucleophosmin 1*) und *CEBPA* (*CCAAT/ enhancer binding protein alpha Gen*) als sogenannte „provisorische Entitäten“ mit aufgenommen.

Tabelle 2 | Akute myeloische Leukämie (AML) und ähnliche Vorläuferneoplasien, sowie akute Leukämien unklarer Herkunft (Weltgesundheitsorganisation 2008) modifiziert nach Döhner et al. 2010 (*ABL1*: ABL proto-oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase, *APL*: Akute Promyelozyten Leukämie, *AML*: akute myeloische Leukämie, *BCR*: breakpoint cluster region, *CBFB*: core binding factor beta, *DEK*: DEK proto-oncogene, *EVI1*: ecotropic viral integration site 1, *inv*: Inversion, *MKL1*: megakaryoblastic leukemia (translocation) 1, *MLL*: lysine methyltransferase 2A, *MLLT3*: MLLT3 super elongation complex subunit, *MYH11*: myosin heavy chain 11, *NOS*: not otherwise specified, *NUP214*: nucleoporin 214, *p*: kurzer bzw. p-Arm eines Chromosoms, *PML*: promyelocytic leukemia, *q*: langer bzw. q-Arm eines Chromosoms, *RARA*: retinoic acid receptor alpha, *RBM15*: RNA binding motif protein 15, *RPN1*: proteasome regulatory particle base subunit *RPN1*, *RUNX1*: runt related transcription factor 1, *RUNX1T1*: RUNX1 translocation partner 1, *t*: Translokation, Bindestrich zwischen Gennamen: Fusionsgen)

Akute myeloische Leukämie mit rekurrenten genetischen Anomalitäten
AML mit t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
AML mit inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>
APL mit t(15;17)(q22;q12); <i>PML-RARA</i>
AML mit t(9;11)(p22;q23); <i>MLLT3-MLL</i>
AML mit t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i>
AML mit inv(3)(q21q26.2) oder t(3;3)(q21;q26.2); <i>RPN1-EVI1</i>
AML (megakaryoblastisch) mit t(1;22)(p13;q13); <i>RBM15-MKL1</i>
Akute myeloische Leukämie mit Myelodysplasie bezogenen Veränderungen
Therapiebezogene myeloide Neoplasien
AML nicht weiter spezifiziert
AML mit minimaler Differenzierung

Fortsetzung Tabelle 2 auf Seite 5

Fortsetzung Tabelle 2

AML ohne Reifung
AML mit Reifung
Akute myelomonozytische Leukämie
Akute monoblastische/monozytische Leukämie
Akute erythroide Leukämie
rein erythroide Leukämie
Erythroleukämie, erythroid/myeloid
Akute megakaryoblastische Leukämie
Akute basophile Leukämie
Akute Panmyelose mit Myelofibrose
Myeloides Sarkom
Myeloid Proliferationen mit Bezug zum Down Syndrom (Trisomie 21)
Transient abnormale Myelopoese
Myeloische Leukämie assoziiert mit Down-Syndrom
Blastisch plasmazytär-dendritische Zellneoplasie
AML mit unklarer Herkunft
Akute undifferenzierte Leukämie
Akute Leukämie mit gemischtem Phänotyp und t(9;22)(q34;q11.2); <i>BCR-ABL1</i>
Akute Leukämie mit gemischtem Phänotyp und t(v;11q23); <i>MLL</i>
Akute Leukämie mit gemischtem Phänotyp, B/myeloid, NOS
Akute Leukämie mit gemischtem Phänotyp, T/myeloid, NOS

Daten aus Mausmodellen zeigen, dass eine einzelne Mutation nicht ausreichend ist, um eine AML auszulösen. Unterstützt werden diese Ergebnisse durch die humane AML, bei der in einer überwiegenden Zahl der Fälle mehr als eine genetische Veränderung gefunden wird. Bei der Entstehung einer AML scheinen zudem Mutationen unterschiedlicher Klassen zu kooperieren (Döhner u. Döhner 2008; Cancer Genome Atlas Research Network 2013).

Zum einen sind dies Mutationen, welche die Signaltransduktion aktivieren, was zu einer gesteigerten Proliferation und Überlebenszeit hämato-

poetischer Vorläuferzellen führt. Zu diesen zählen Veränderungen im RAS Signalweg wie beispielsweise Mutationen im *FLT3*-Gen (*fms-related tyrosine kinase*). Zum anderen handelt es sich um Mutationen, die Transkriptionsfaktoren beeinflussen; hieraus resultiert eine verminderte Differenzierung der Progenitorzellen. Beispiele hierfür sind Mutationen im *NPM1*-Gen und *CEBPA*. Zusätzlich wurden im Rahmen der Genomsequenzierung und mit Hilfe neuer Technologien, wie beispielsweise dem *next generation sequencing* (NGS) von Leukämiepatienten, Mutationen in Genen gefunden, die nicht in das oben beschriebene Zwei-Klassen-Modell passen, da sie z. B. Einfluss auf die DNA-Methylierung haben.

Durch aberrante Methylierung können Gene aktiviert oder stillgelegt werden. Genbeispiele hierfür sind *isocitrate dehydrogenase 1 und 2 (IDH1/2)*, *tet oncogene family member 2 (TET2)* und *DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3 alpha (DNMT3A)* (Döhner u. Gaidzik 2011). Darüber hinaus wurden Mutationen entdeckt, welche die sogenannte „Splicing machinery“ beeinflussen (*splicing factor 3 subunit 1 SF3B1*) und somit Modifikationen an der RNA bewirken können (Malcovati et al. 2011). In einer Arbeit des Cancer Genome Atlas Research Networks wurde mit Hilfe von verschiedenen NGS-Techniken (whole-genome sequencing, n = 50; whole-exome sequencing, n = 150) an insgesamt 200 AML-Proben umfangreiche Analysen (inklusive RNA und microRNA Sequenzierung, sowie DNA-Methylierungsuntersuchungen) vorgenommen. Interessanterweise waren die AML Genome weniger häufig mutiert als andere Tumorarten, mit einer durchschnittlichen Mutationsinzidenz von 13 Mutationen/Genom. Von diesen waren 5 Gene in der AML rekurrent mutiert. Insgesamt waren 23 Gene signifikant mutiert und weitere 237 Gene in zwei oder mehr Proben verändert. Die gefundenen Mutationen konnten in 9 Kategorien klassifiziert werden (siehe hierzu Abbildung 1) (Naoe u. Kiyoi 2013; Cancer Genome Atlas Research Network

2013).

1.2 Die Bedeutung von molekulargenetischen Veränderungen in der CN-AML

Patienten mit normalem Karyotyp (CN-AML; ca. 40-50% der Patienten) werden der intermediären Risikogruppe zugeordnet, obwohl diese Patientengruppe hinsichtlich ihrer Prognose sehr heterogen ist. Entsprechend ist es notwendig, diese Gruppe anhand weiterer prognostischer Faktoren zu unterteilen. Mit Hilfe neuer molekulargenetischer Techniken konnten eine Reihe molekularer Marker bei der CN-AML identifiziert werden, die nicht nur pathogenetisch relevant sind, sondern auch eine prognostische Bedeutung aufweisen (Schlenk et al. 2008; Schlenk u. Döhner 2008; Marcucci et al. 2011; Döhner u. Gaidzik 2011).

Zu diesen Markern zählen Mutationen in den Genen *NPM1*, *FLT3*, *CEBPA*, *Myeloid-lymphoid oder mixed lineage leukemia-Gen (MLL)*, *Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog-Gen (NRAS)*, *Wilms Tumor 1-Gen (WT1)*, *Runt-related transcription factor 1-Gen (RUNX1)*, *Isocitratdehydrogenase 1 und 2 (IDH1/2)*, *tet oncogene family member 2 (TET2)* und *DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3 alpha (DNMT3A)* (Bullinger et al. 2010; Döhner u. Gaidzik 2011).

1.3 Klinisch etablierte Marker und ihre prognostische Bedeutung

Bei Patienten mit CN-AML werden mit 45-64% am häufigsten *NPM1* Mutationen gefunden. Es wurde dabei eine Assoziation mit Mutationen in *FLT3*, *IDH1/2* und *DNMT3A* festgestellt (Döhner u. Gaidzik 2011).

Annähernd 40% der Patienten mit *NPM1*-Mutationen tragen gleichzeitig eine *FLT3*-ITD (Internal tandem duplication) (Döhner et al. 2010). Eine zweite

Mutation, die in der Tyrosinkinasedomäne vorkommt (*FLT3*-TKD), kann bei 11-14% der Patienten mit einer CN-AML nachgewiesen werden (Bullinger et al. 2010). Der Genotyp *NPM1*^{mut}/*FLT3*-ITD^{pos} (*NPM1* Mutation und gleichzeitiges Vorhandensein einer *FLT3*-ITD) ist mit einem signifikant kürzeren RFS und einem kürzeren OS verbunden.

Im Gegensatz dazu zeigt der Genotyp *NPM1*^{mut}/*FLT3*-ITD^{neg} einen positiven Einfluss auf die Endpunkte CR, RFS und OS (Döhner u. Gaidzik 2011; Döhner et al. 2010; Schlenk et al. 2008).

FLT3-TKD Mutationen sind in ihrem Prognosewert noch unklar (Döhner u. Döhner 2008; Döhner et al. 2010; Schlenk et al. 2008).

CEBPA-Mutationen finden sich bei 10-18% der CN-AML Fälle. Dabei handelt es sich vorwiegend um Nonsense-Mutationen (Döhner u. Döhner 2008). Es wird zwischen den *CEBPA single mutations* (*CEBPAsm*) und den *CEBPA double mutations* (*CEBPAdm*) unterschieden. Mehrere Studien konnten zeigen, dass *CEBPAdm* mit einer günstigen Prognose assoziiert sind, die ähnlich wie der Genotyp *NPM1*^{mut}/*FLT3*-ITD^{neg} zu bewerten ist. Die Prognose der Patienten mit *CEBPAsm* hängt von dem Vorhandensein konkurrierender Mutationen ab; beispielsweise sind diese signifikant höher assoziiert mit *NPM1* und *FLT3*-ITD Mutationen (Döhner u. Gaidzik 2011; Taskesen et al. 2011).

In der aktuellen klinischen Anwendung sind die bisher genannten molekulargenetischen Veränderungen bereits von besonderer Bedeutung. Während Patienten mit *NPM1*^{mut}/*FLT3*-ITD^{neg} oder *CEBPAdm*-Mutationen von einer Standardtherapie profitieren, ist in Fällen mit *NPM1*^{mut}/*FLT3*-ITD^{pos} ein aggressiveres Vorgehen angezeigt. Diese Therapien umfassen neben experimentellen Ansätzen auch die allogene Stammzelltransplantation (Lin u. Smith 2011; Schlenk et al. 2008). Die Transplantation ist mit einer Mortalität von 15-25% assoziiert, weshalb vor allem Patienten mit ungünstiger Prognose einer derartigen Therapie zugeführt werden (Schlenk et al. 2008).

1.4 Marker mit geringer klinischer Relevanz

Partielle Tandemduplikation im *MLL*-Gen (*MLL*-PTD) können bei 5-11% der CN-AML Patienten gefunden werden. Sie zeigen eine Assoziation mit kurzem RFS und kürzerem OS (Döhner et al. 2010; Lin u. Smith 2011; Schlenk et al. 2008).

Mutationen im *NRAS*-Gen werden in 9-14% der Fälle bei jüngeren CN-AML Patienten gefunden und führen zu einer dauerhaften RAS Aktivierung. Bislang konnte jedoch in keiner Studie ein Einfluss auf die Prognose beobachtet werden (Döhner u. Döhner 2008).

WT1-Mutationen sind in 10% der Patienten mit CN-AML zu finden. Die Mutation ist mit Versagen auf die Induktionstherapie assoziiert. Die prognostische Relevanz von *WT1* Mutationen stellt sich bislang widersprüchlich dar. Gaidzik et al. konnten keinen Einfluss von *WT1* als alleinigen Marker feststellen, während der Genotyp *WT1*^{mut}/*FLT3*-ITD^{pos} eine Assoziation mit schlechterem Überleben zeigte. Die Studien von Virappane und Paschka hingegen stufen *WT1*^{mut} als unabhängigen prognostischen Faktor mit negativem Einfluss auf das Überleben ein (Döhner u. Döhner 2008; Döhner et al. 2010; Gaidzik et al. 2009; Virappane et al. 2008; Paschka et al. 2008).

Wie bereits weiter oben erwähnt, wurden mittels NGS Mutationen in den Genen *IDH1* und *2*, *DNMT3A* und *TET2* entdeckt, welche alle als epigenetische Modifikatoren bezeichnet werden können. *IDH1*-Mutationen treten häufig gemeinsam mit anderen Mutationen auf und sind bei *NPM1*^{mut}/*FLT3*^{neg} Patienten mit einer negativen Prognose assoziiert. *IDH2*-Mutationen zeigen zeltener Assoziationen mit *NPM1*^{mut} oder *FLT3*^{pos} und werden mit einer geringeren CR und einem schlechteren OS in Verbindung gebracht (Döhner u. Gaidzik 2011).

DNMT3A-Mutationen zeigen Assoziationen mit *NPM1*, *FLT3* und *IDH*-Mutationen. Studien weisen darauf hin, dass *DNMT3A*-Mutationen mit einem

schlechteren OS vergesellschaftet sind (Döhner u. Gaidzik 2011). Daten an 1700 jüngeren AML Patienten konnten diesen negativen Einfluss auf die Prognose jedoch nur in der durch das European Leukemia Net (ELN) definierten ungünstigen Gruppe der CN-AML Patienten nachweisen. (Gaidzik et al. 2013).

TET2 ist in die DNA-Demethylierung involviert. Die Studienergebnisse zur prognostischen Relevanz von *TET2*-Mutationen zeigen unterschiedliche Daten hinsichtlich der Prognose, sodass deren Einfluss in weiteren Subgruppen untersucht werden sollte (Döhner u. Gaidzik 2011; Gaidzik et al. 2012).

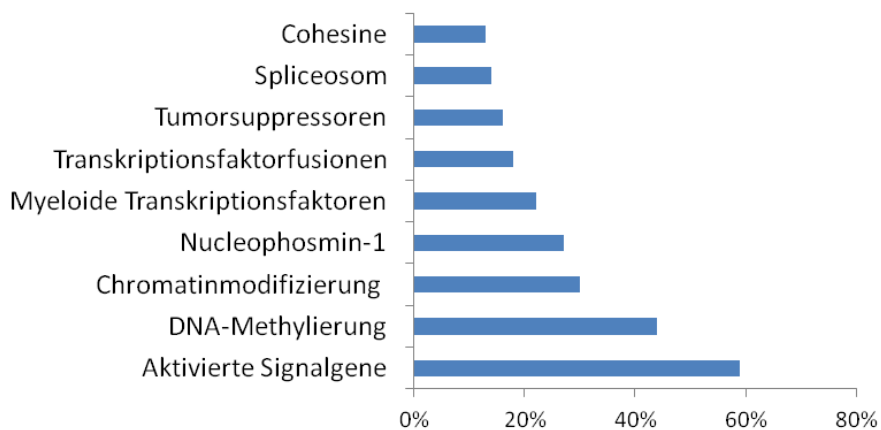


Abbildung 1 | Neun Kategorien von mutierten Genen und ihre Häufigkeit identifiziert bei 200 AML Patienten (nach Cancer Genome Atlas Research Network 2013). Cohesine 13%, Spliceosom 14%, Tumorsuppressoren 16%, Transkriptionsfaktorfusionen 18%, Myeloide Transkriptionsfaktoren 22%, Nucleophosmin-1 27%, Chromatinmodifizierung 30%, DNA-Methylierung 44%, Aktivierte Signalgene 59%

1.5 Die Suche nach neuen Kandidatengenen

Ziel der aktuellen Forschung ist es, mit Hilfe zyto- und molekulargenetischer Untersuchungen die AML besser zu charakterisieren, mehr Einblicke in die Pathomechanismen der AML zu erhalten und eine möglichst genaue prognostische Abschätzung zu erreichen, um so den Patienten eine individuelle, risikoadaptierte Therapie mit maximalem Benefit zu ermöglichen. Allerdings liegen trotz der rasanten molekulargenetischen Entwicklungen bei einem Teil der Patienten keine genetischen Veränderungen vor, sodass die zugrundeliegenden Pathomechanismen in diesen Fällen bislang noch unklar sind. Darüber hinaus herrscht weiterhin große Unklarheit, in wie weit bestimmte genetische Alterationen miteinander interagieren und so zur Entwicklung des leukämischen Phänotyps beitragen. Neben den molekulargenetischen und den oben behandelten mikroskopisch sichtbaren chromosomalen Veränderungen, konnte durch die Anwendung und Weiterentwicklung neuer Techniken das Genom auf kleinste Chromosomenaberrationen, wie uniparentale Disomien (UPD) und „copy number alterations“ (CNA), untersucht werden. UPDs entstehen durch chromosomale Fehltrennung oder homologe Rekombination während der Mitose. Hierdurch kommt es zur einseitigen Duplikation des maternalen oder paternalen Chromosoms, wodurch die Heterozygotie verloren geht. Ihre Rolle in der Leukämieentwicklung liegt in der Entstehung von homozygoten Genmutationen oder der Duplikation genomisch geprägter Segmente (Bullinger et al. 2010). CNAs entsprechen häufig Deletionen und führen so zu einer partiellen Monosomie und ebenfalls zum Verlust der Heterozygotie (Bullinger et al. 2010). Die verwendeten Techniken zur Erfassung dieser Aberrationen umfassen single-nucleotid-polymorphism (SNP) Analysen, vergleichende genomische Hybridisierung (CGH) oder die Sequenzierung des kompletten Genoms (Bullinger et al. 2010; Döhner et al. 2010; Rucker et al.

2006).

Bullinger et al konnten bereits 2008 mit Hilfe von SNP-Arrays bei 3 von 157 Patienten mit CN-AML eine neue rekurrente CNA in Form einer Mikrodeletion auf dem kurzen Arm des Chromosoms 3 in 3p14.1-p13 beschreiben (minimally altered region, MAR). Mittlerweile konnte diese MAR bei weiteren Patienten gefunden werden.

Die MAR hat eine Größe von ca. 2.01 Mb und enthält acht Gene sowie eine microRNA (miRNA 1284). Die acht proteinkodierenden Gene sind *FOXP1* (*Forkheadbox P1*), *GPR27* (*G-protein coupled receptor 27*), *PROK2* (*Prokinectin 2*), *EIF4E3* (*Eucaryotic translation initiation factor 4E family member 3*), *RYBP* (*Ring 1 and YY1 binding protein*), *SHQ1* (*H/ACA ribonucleoprotein assembly factor*), *GLT8D4* (*Glucosidase Xylosyltransferase 2*) und *PPP4R2* (*Proteinphosphatase 4, regulatory subunit 2*).

Das *Forkhead box P1* (*FOXP1*) ist ein Transkriptionsfaktor, der die Entwicklung von Motorneuronen sowie die Entwicklung des Thymus in Kooperation mit verschiedenen *HOX* Genen (homeobox) reguliert. Er zeigt eine deregulierte Expression in verschiedenen Tumorentitäten und ist in verschiedene Translokationen involviert. Beispiele sind die verminderte Expression in Brusttumoren oder die wiederkehrende t(3; 9)(p13; p13) bzw. *PAX5-FOXP1* Translokation (paired box gene 5) in der B-Zell-ALL (akute lymphatische Leukämie) (Taylor et al. 2010; Put et al. 2011). Entsprechend wird für *FOXP1* eine bedeutende Rolle in der Onkogenese bzw. Leukämogenese diskutiert.

G-Protein coupled receptor 27 [*GPR27*, Synonym: *SREB 1* (*super conserved receptor expressed in brain 1*)] gehört zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren mit 7 Transmembrandomänen. *GPR27* ist evolutionär hochkonserviert und im zentralen Nervensystem exprimiert. Extrazelluläre Stimuli führen über GTP-oder G-Proteine zu einer intrazellulären Signalkaskade (Matsumoto et al. 2000).

Prokinectin 2 (PROK2) wird im Nucleus suprachiasmaticus exprimiert und ist ein Teil der zirkadianen Uhr. Daneben dient das Produkt als Chemokin für neuronale Vorläufer im Bulbus olfactorius und ist mit dem Kallmann-Syndrom assoziiert (Dode u. Rondard 2013; Ng et al. 2005).

Eucaryotic translation initiation factor 4E family member 3 (EIF4E3) gehört zur Familie der Translationsinitiationsfaktoren *EIF4E*, die mit der RNA-Cap-Struktur interagieren und mRNA in das Ribosom rekrutieren (Green et al. 2012).

RING1 and YY1 binding protein (RYBP) ist ein Mitglied der Polycomb Gruppe (PcG) und interagiert mit *MDM2* (*MDM2* oncogene) durch Abnahme der *MDM2*-vermittelten p53-Ubiquitinierung. Hierdurch kommt es zu einer Stabilisierung von p53 und zu einem Anstieg der p53 Aktivität. *RYBP* induziert den Zellzyklusarrest und ist an der Antwort von p53 auf DNA Schäden beteiligt. Die Expression von *RYBP* ist in humanen Krebsgeweben herabgesetzt (Chen et al. 2009).

SHQ1 homolog (S. cerevisiae) (SHQ1) hat Funktionen in der Verarbeitung ribosomaler RNA, snRNA-Modifikation und Telomerasestabilisierung (Walbott et al. 2011).

Glucosidase Xylosyl-transferase 2 (GLT8D4 oder GXYLT2) ist eine Transferase, welche Xylose an O-Glucose-modifizierte Reste des EGF (Epidermal Growth Factor) -Rezeptors in Proteinen wie NOTCH1 anfügt (Sethi et al. 2012).

Für die *microRNA1284 (MIR1284)* sind nach aktuellem Wissensstand keine weiteren Daten verfügbar.

Proteinphosphatase 4, regulatory subunit 2 (PPP4R2) ist die regulatorische Untereinheit der Serin-Threonin Proteinphosphatase 4. Für eine hohe *PPP4R2*-Expression konnte eine Resistenz gegenüber dem Zytostatikum Cisplatin in Hefen gezeigt werden, und es kann möglicherweise auch Resistenz in höheren Eukaryoten vermitteln (Martin-Granados et al. 2008). *PPP4R2*

bewirkt bei DNA-Schäden die Assoziation zwischen der Replikationsprotein-Untereinheit (RPA) und der PPP4C-Untereinheit, und man geht davon aus, dass die PP4-vermittelte Dephosphorylierung von RPA2 für eine effiziente Reaktion auf DNA-Schäden notwendig ist (Lee et al. 2010).

Neben den Ergebnissen bei CN-AML Patienten konnten Deletionen des kurzen Arms von Chromosom 3 in verschiedenen soliden Tumoren gefunden werden, wie zum Beispiel die Deletion 3p25, die das *von-Hippel-Lindau* Gen betrifft und bei Patienten mit Nierenzellkarzinom deletiert sein kann (Bhat Singh u. Amare Kadam 2011). Des Weiteren wurden 3p-Deletionen in Lungen- und Ösophagustumoren nachgewiesen (Tepeli et al. 2009; Qin et al. 2008).

Lando und Kollegen detektierten rekurrente 3p-Deletionen in Patientinnen mit Cervixkarzinom mittels array-CGH (Comparative genomic hybridization); zusätzlich konnten sie zeigen, dass die Deletion von *RYBP*, als auch seine reduzierte mRNA-Expression, prognostische Bedeutung hat (Lando et al. 2009).

Im Jahr 2010 wurde die rekurrente Deletion von 3p14.1-p13 in Patienten mit Prostatakarzinom identifiziert. Insgesamt wurden 194 Proben von Patienten mit Prostatakarzinom und einhergehender *TMPRSS2-ERG* Fusion (*transmembrane protease, serine 2; v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog*) hinsichtlich assoziierter CNAs untersucht. Es konnten drei signifikante Bereiche mit Deletionen beschrieben werden. Zwei im Bereich von *PTEN* (*phosphatase and tensin homolog*) und *TP53* (*tumor protein p53*), sowie eine dritte in der Region von 3p14.

Nach Expressionsanalysen und Untersuchung der Deletionsmuster zeigte sich, dass die deletierte Region um 3p14 jeweils mindestens eines der drei Gene *FOXP1*, *RYBP* und *SHQ1* umfasste. Diese Gene befinden sich wie beschrieben ebenfalls in der MAR bei AML-Patienten. Nach Analysen auf Punktmutationen

wurde vor allem *SHQ1* als mögliches Kandidatengen identifiziert. Die Autoren nehmen an, dass neben den drei erwähnten Genen noch weitere Gene in dieser Region mögliche Tumorsuppressorgene sein könnten (Taylor et al. 2010).

Die bisherigen Ergebnisse lassen vermuten, dass die deletierten Gene in der Region 3p14.1-p13 Funktionen als Tumorsuppressoren besitzen. Der Beitrag der einzelnen Gene bei der AML war bislang nicht Gegenstand experimenteller Studien. Die hier vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Rolle des *PPP4R2*-Gen bei der AML.

1.6 Das *PPP4R2*-Gen

1.6.1 Lokalisation und Aufbau

Das *PPP4R2*-Gen befindet sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 3 innerhalb der chromosomalen Bande 3p14.1-13 und umfasst einen Bereich von 72kbp (Kilobasenpaare). Das Transkript besteht aus 9 Exons und hat eine Größe von 1507 Basen. Das Produkt ist hochgradig konserviert und zeigt zwischen *Drosophila melanogaster* und dem humanen Gen eine Übereinstimmung in 91-94% der Aminosäuren (Martin-Granados et al. 2008; Zhou et al. 2004; Cohen et al. 2005).

1.6.2 Funktion von *PPP4R2* und Interaktion mit *PP4c*

Das Produkt des *PPP4R2*-Gens ist die regulatorische Untereinheit 2 (R2) der Proteinphosphatase 4 (PP4). PP4 ist eine Serin/Threonin-Phosphatase und besteht aus einer katalytischen (PP4c) sowie mehreren strukturellen Untereinheiten (Zhou et al. 2004). Die katalytische Untereinheit zeigt engste

Verwandtschaft zu PP2Ac (Proteinphosphatase A 2, catalytic subunit) (Martin-Granados et al. 2008). Bei der Aufreinigung von PP4c Komplexen konnten zwei „core regulatory subunits“ entdeckt werden; R1 und die zuvor erwähnte R2 (Martin-Granados et al. 2008; Cohen et al. 2005). Diese beiden Untereinheiten bilden jeweils mit PP4c Komplexe (PP4c-R1/-R2). PP4c-R1 und PP4c-R2 interagieren dann mit verschiedenen dritten Untereinheiten (R3) oder anderen Substraten. PP4c-R1 greift auf diese Weise in die Histondeacetylierung oder den NFκB Signalweg ein (Cohen et al. 2005).

Die Funktion von R2, bzw. des PP4c-R2 Komplexes wurde anhand von RNA-Interferenz (RNAi) Experimenten untersucht.

An *Drosophila melanogaster* konnte gezeigt werden, dass der trimere Komplex PP4c-R2-R3 die Reifung des Zentrosoms entscheidend steuert. In Zellen mit PP4c-Defizienz konnte eine schwerwiegende Störung der Mikrotubulibildung erkannt werden. Im Weiteren wurde gezeigt, dass eine Verminderung der Expression einer dieser Untereinheiten zu einem gesteigerten Zelltod führt. Neben diesen Einflüssen auf die Mitose, nimmt sowohl die chemokingerichtete, als auch die ungerichtete Zellmigration in PP4c depletierten Zellen ab. Diese Daten legen nahe, dass PP4c-R2-R3 sowohl die Zentrosomenfunktion, als auch die Zellmigration durch die Regulierung von Rho GTPasen steuert (Martin-Granados et al. 2008). Zusätzlich wurde festgestellt, dass der Komplex aus PP4c-R2-R3 eine Cisplatinresistenz in Hefen vermitteln kann (Martin-Granados et al. 2008).

In Untersuchungen zur spinalen muskulären Atrophie konnte außerdem gezeigt werden, dass *PPP4R2* eine wichtige Rolle bei der Differenzierung und dem Überleben von Neuronen inne hat (Bosio et al. 2012).

Neben diesen Eigenschaften konnten mehrere Untersuchungen den Zusammenhang mit Apoptosevorgängen und DNA-Reparatur zeigen. PP4 verlängert die Halbwertszeit von *HPK1* (Hematopoietic progenitor kinase 1),

die bei Erwachsenen ausschließlich in hämatopoetischen Geweben zu finden ist. Sie ist dort an Signalwegen zur T- und B-Zellrezeptorstimulation, mit TGF beta (Transforming growth factor beta), Fas-Ligand Apoptose oder NFkB Aktivierung beteiligt (Zhou et al. 2004). Ein Dimer aus PP4c und R2 interagiert mit dem Replication Protein A 2 (RPA2). RPA2 ist für eine adäquate Antwort bei DNA-Schädigungen zuständig und es konnte gezeigt werden, dass eine PP4c-R2 Defizienz zu einer Verlangsamung und Verringerung der homologen Rekombination führt (Lee et al. 2010).

Daneben konnte die Interaktion von *PPP4R2* mit *KAP1* (KRAB-associated protein-1) nachgewiesen werden.

KAP1 ist ein wichtiger Faktor für die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen, dessen genaue funktionsweise bisher nicht eindeutig festgestellt werden konnte. *PPP4R2* führt zu einer Dephosphorylierung von *KAP1*, welches für den Vorgang der DNA-Reparatur essentiell ist. Es zeigte sich, dass in *PPP4R2* depletierten Zellen nach Schädigung der DNA eine signifikante Reduktion der Reparatur von Doppelstrangbrüchen vorliegt, was vor allem auf die dargelegte Interaktion mit *KAP1* zurückgeführt wird. (Liu et al. 2012)

Eine weitere Interaktion von *PPP4R2* zeigte sich mit *DBC1* (Deleted in breast cancer-1). *DBC1* interagiert je nach Phosphorylierungsgrad mit dem Tumorsuppressor p53. Eine Depletion von *PPP4R2* führte in Zellen nach Induktion von Strahlenschäden zu einer vermehrten Phosphorylierung von *DBC1* und in der Folge zu einer Verstärkung der p53 Expression mit erhöhter Apoptoserate (Lee et al. 2015).

Der Eingriff der Proteinphosphatase 4 in diese essentiellen Vorgänge und speziell die Rolle der regulatorischen Untereinheit 2 in Bezug auf die Zellmigration, Resistenzentwicklung gegenüber Medikamenten, Zentrosomenreifung und Regulation der DNA Reparatur zeigt, dass es sich bei

PPP4R2 um einen interessanten Angriffspunkt für die Therapie bei malignen Erkrankungen handeln könnte.

1.6.3 Bedeutung von PP4 in der Onkogenese/Leukämogenese

Wie beschrieben greift PP4 in verschiedene Signalwege ein. Von besonderem Interesse für die Onkogenese bzw. Leukämogenese sind dabei die Zusammenhänge mit Apoptosevorgängen und den Aufgaben in der DNA-Reparatur (Martin-Granados et al. 2008; Zhou et al. 2004).

Erstmalig 2008 wurde die Rolle von PP4 explizit in der Onkogenese untersucht: Es konnte gezeigt werden, dass sowohl normale, als auch leukämische T-Zellen von Signalen der PP4c abhängen. Durch Steigerung der Expressionslevel von PP4c konnte eine Steigerung der Apoptoserate erzielt werden. Diese Effekte werden zu einem Teil über eine Dephosphorylierung von *PEA-15* (astrozytisches Phosphoprotein) vermittelt. Eine Depletion von PP4 zeigte ebenfalls eine Steigerung von Zelluntergängen, sowie eine Verminderung der Migration von Zellen (Martin-Granados et al. 2008). Das Eingreifen in die sensiblen Mechanismen des Zellzyklus deutet darauf, dass eine Modulation der PP4c Funktion in der Entstehung, aber auch in der Behandlung von malignen Erkrankungen ein wichtiges Schlüsselprotein darstellen könnte. Die Rolle der “core regulatory subunits” von R1 oder R2 ist hierbei noch unklar.

1.7 Zielsetzung

Der Nachweis von Mikrodeletionen in den chromosomalen Banden 3p13.1-14 bei Prostatakarzinom- und Leukämiepatienten, legt nahe, dass die dort lokalisierten Gene in der Entstehung maligner Erkrankungen eine bedeutende Rolle spielen. Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war, das in der „minimally altered region“ (MAR) enthaltene Gen *PPP4R2* als potentiell Kandidatengen

in der Leukämogenese zu untersuchen.

Zunächst erfolgte die Auswertung von Daten einer RQ-PCR (Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction), mit welcher die Expressionslevel von *PPP4R2* bei AML-Patienten (n = 48) im Vergleich zu gesunden Probanden (n = 6), untersucht wurden. Ziel war es dabei, einen ersten Anhaltspunkt im Sinne einer Über- oder Unterexpression von *PPP4R2* bei der AML zu erhalten. Hauptteil dieser Arbeit war jedoch die Analyse von Mutationen in *PPP4R2* bei AML-Patienten mittels konventioneller Sanger Sequenzierung. Grundlage war die Annahme, dass durch eine Mutation von *PPP4R2* eine Haplo-Insuffizienz entstehen könnte, die eine pathogenetische Relevanz in der AML-Entstehung hat. Die Auswahl der zu sequenzierenden Proben erfolgte anhand einer für diese Arbeit zur Verfügung gestellten Microarrayanalyse zur *PPP4R2*-Expression bei 320 AML-Patienten. Von diesen 320 Patienten wurden je 30 Patienten mit der höchsten, niedrigsten, sowie 29 Patienten mittlerer *PPP4R2*-Expression sequenziert. Zusätzlich wurden die 6 bisher beschriebenen Proben mit Deletion in der MAR sequenziert.

Im Anschluss wurde zudem eine globale Expressionsanalyse von 436 AML Patienten ausgewertet, um eine Aussage über die Expressionsmuster von *PPP4R2*, insbesondere in Zusammenhang mit anderen Genen/Signalwegen treffen zu können. Mit Hilfe dieser umfassenden Analysen sollte die Rolle von *PPP4R2* in der Leukämogenese auf molekularer Ebene charakterisiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

Die Proben für die vorliegende Arbeit stammen von Patienten aus den Studien der deutsch/österreichischen AML Studiengruppe (AMLSG): AML HD98A und AMLSG 07-04.

Für die AML HD98A-Studie wurden zwischen 1998 und 2004 insgesamt 844 Patienten rekrutiert. Einschlusskriterien dieses Kollektivs waren ein Alter zwischen 16 und 60 Jahren (Median: 48 Jahre) mit *de novo* AML, sekundärer AML nach Myelodysplasiesyndrom oder therapieinduzierter AML. Ebenso wurde die refraktäre Anämie mit Blastenüberschuss eingeschlossen. Die Diagnose AML wurde morphologisch, zytologisch und immunologisch gestellt (Schlenk et al. 2010). Für die AMLSG 07-04 Studie wurden ab 2004 Patienten zwischen 18 und 60 Jahren mit *de novo* AML, sekundärer AML nach Myelodysplasiesyndrom oder therapieinduzierter AML eingeschlossen. Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 1074, Subprojekt B4 durchgeführt, hierbei liegt eine zustimmende Stellungnahme der Ethikkommission der Universität Ulm unter dem Antrag Nr. 95/12 vor.

Zunächst wurden für diese Arbeit RQ-PCR-Daten von 48 Patienten ausgewertet, die mir durch Dr. Verena Gaidzik zur Verfügung gestellt wurden. Bis auf einen Patienten aus der AML HD98A-Studie, der eine Deletion in der MAR aufwies, stammten alle Proben aus der AMLSG 07-04-Studie. Von diesen Proben wurden dabei 21 aus peripherem Blut gewonnen, während die übrigen Proben aus Knochenmark stammten. Auf die Auswertung der RQ-PCR folgte die Auswertung einer globalen Expressionsuntersuchung von *PPP4R2* an insgesamt 320 Patienten der AML HD98A-Studie; einziges Selektionskriterium war die Materialverfügbarkeit.

Die Ergebnisse dieser Analysen wurden zur Auswertung von Professor Lars Bullinger für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Anhand dieser globalen Expressionsuntersuchung, wurden in der Folge 89 Patienten (je 30 Patienten mit der höchsten, niedrigsten, sowie 29 Patienten mit mittlerer *PPP4R2*-Expression) in Abhängigkeit ihres *PPP4R2* Expressionslevel zur Sequenzierung ausgewählt; zusätzlich wurde ein Patient mit MAR aus der AML HD98A-Studie der Sequenzierung zugeführt, sodass aus der AML HD98A-Studie insgesamt 90 Patienten sequenziert wurden. Darüber hinaus wurden 5 Patienten mit MAR aus der AMLSG 07-04 Studie sequenziert, sodass insgesamt 95 Patienten sequenziert wurden.

Bei den 89 nach Expressionslevel sequenzierten Proben handelte es sich um Patienten mit einem Alter von 19 bis 60 Jahren, mit einem Mittelwert von 44 Jahren. 78 dieser Proben wurden aus Knochenmark gewonnen, der Rest stammte aus peripherem Blut. Eine dieser Proben konnte aufgrund fehlender Information zu Alter und Probenart nicht in die endgültige Kohortenbeschreibung aufgenommen werden. Eine der Proben mittlerer Expression wurde im Verlauf sowohl einer doppelten Expressionsanalyse, als auch einer doppelten Sequenzierung unterzogen und wird im Rahmen dieser Arbeit als interne Kontrolle mitgeführt.

Am Ende der Arbeit stand die Auswertung einer globalen Expressionsanalyse an 436 Patienten aus der AML HD98A-Studie. Der Datensatz stammte dabei aus bereits zuvor veröffentlichten Expressionsdaten und wurde ebenfalls durch Herrn Professor Lars Bullinger für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Die genaue Charakterisierung dieser Patienten kann im gene expression omnibus (GEO) eingesehen werden (nach GEO vom 13.06.2015 Referenznummer GSE16432; www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/). Für einen besseren Überblick fasst Tabelle 3 das Patientenkollektiv zusammen.

Tabelle 3 | Zusammenfassung des Patientenkollektivs [Die Zahlen stehen jeweils für die Anzahl an Patienten. 1. Spalte: Untersuchungstyp (AML HD98A und AMLSG 07/04: Studienamen, PPP4R2: Proteinphosphatase 4, regulatory subunit 2, RQ-PCR: Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction)]

	AML HD98A	AMLSG 07/04	Gesamt
RQ-PCR	1	47	48
Expressionsanalyse von <i>PPP4R2</i>	320	-	320
Sequenzierung	90	5	95
Globale Expressionsanalyse	436	-	436

2.2 Materialgewinnung und -aufbereitung

Das Material für die Studie wurde aus peripherem Blut und Knochenmark gewonnen. In den Entnahmeröhrchen befand sich dabei Heparin oder EDTA als Antikoagulanzen. Nach dem Probeneingang wurde zuerst die vorliegende Zellzahl mit dem Volldifferenzierungsautomat Sysmex XS 800i (Sysmex, Horgen, Schweiz) gemessen. Von den Proben wurden zum einen Kulturen angesetzt, die später zur Karyotypanalyse verwendet wurden, zum anderen die Gewinnung mononukleärer Zellen vorbereitet. Um Lymphozyten und Monozyten von Plasma und restlichen Blutbestandteilen zu separieren, wurde die Dichtegradientenzentrifugation eingesetzt. Hierzu wurde das Probenmaterial auf das gleiche Volumen an Ficollmedium (Ficoll Separating Solution, Biochrom, Berlin) gegeben und bei 2800 Umdrehungen/Minute (U/min) für 20 Minuten zentrifugiert. Nach der Zentrifugation bildete sich zwischen dem Plasma und der Ficolllösung eine Schicht aus mononukleären Zellen, die mittels Pipette extrahiert wurde. Zur Reinigung von Plasma- und Ficollresten wurde eine phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) hinzugegeben

und bei 1200 U/min für 7 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgegossen und eine zweite Reinigung mit PBS durchgeführt. Nachdem der Überstand verworfen war, wurden die Pellets in 900 µl RPMI (Roswell Park Memorial Institute) Kulturmedium resuspendiert und in einer Tischzentrifuge für weitere 5 Minuten bei 5000 U/min zentrifugiert. Am Boden des Gefäßes befand sich das aufgereinigte Zellpellet. Anhand der zuvor gemessenen Konzentration wurde dieses Pellet aufgeteilt. Zielkonzentration waren dabei 1×10^7 Zellen, die bis zur weiteren Bearbeitung bei 80°C gelagert wurden.

2.3 DNA- und RNA-Extraktion

Die DNA- und RNA-Extraktion wurde auf Eis durchgeführt und die Proben jeweils bei 4°C in einer Eppendorf 5424 Zentrifuge zentrifugiert. Zur Extraktion wurden Materialien aus dem Allprep DNA/RNA-Kit (Qiagen, Venlo, Niederlande) verwendet. Dieses enthielt die Allprep DNA Spin-Säule, sowie zwei Waschpuffer (AW1 und AW2). Die gewonnenen Zellpellets wurden je nach Zellzahl mit einer definierten Menge Lysepuffer (RLT) (Qiagen, Venlo, Niederlande) resuspendiert. Lag die Zellzahl unter $0,5 \times 10^7$ Zellen, wurden 350 µl RLT-Plus-Puffer hinzugegeben, darüber 600 µl. Zur Homogenisierung wurde das Lysat auf einen QIAshredder (Qiagen, Venlo, Niederlande) überführt und 3 Minuten bei 13000 U/Min zentrifugiert. Das Lysat wurde anschließend aus dem Eppendorf-Gefäß in die Allprep DNA Spin Säule überführt und für eine Minute bei 13000 U/Min zentrifugiert. Hierdurch wurde die DNA in der Säule gebunden, während sich im Durchfluss die RNA befand. Die DNA Säulen wurden dann zwischengelagert und mit der Extraktion der RNA fortgefahren. Zum Durchfluss wurde entsprechend der Zellzahl 70% Ethanol hinzugegeben. Lag die Zellzahl unter $0,5 \times 10^7$ Zellen wurden 350 µl Ethanol hinzugegeben, darüber 600 µl. Nach gründlicher Durchmischung wurden je 600 µl auf eine

RNeasy Säule gegeben (Qiagen, Venlo, Niederlande). Nach einer Zentrifugation für eine Minute bei 13000 U/Min, konnte der Durchfluss verworfen und das restliche Ethanolgemisch auf die Säulen übertragen werden. Nach erneuter Zentrifugation und Verwerfen des Durchflusses, wurden die Säulen mit 350 µl Waschpuffer für membrangebundene RNA (RW1) (Qiagen, Venlo, Niederlande) bei 13000 U/Min eine Minute gewaschen. Hierauf wurden 80 µl DNase-Mix (Qiagen, Venlo, Niederlande) auf die Membranmitte gegeben und die Säulen 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, mit anschließend erneutem Waschen der Proben mit 350 µl RW1-Puffer bei 13000 U/Min für eine Minute. Nach zweimaligem Waschen mit 500 µl RNA Waschpuffer (RPE) (Qiagen, Venlo, Niederlande) bei 13000 U/Min, wurden die Säulen zusätzlich noch einmal trocken zentrifugiert. Zur Eluierung der RNA wurde RNase-freies Wasser (Qiagen, Venlo, Niederlande) auf die Säulen gegeben, lag die Zellzahl unter $0,5 \times 10^7$ Zellen wurden 30 µl Wasser hinzugegeben, darüber 40 µl. Nach drei Minuten Inkubationszeit wurden die Säulen ein letztes Mal bei 13000 U/Min zentrifugiert. Die letzten Schritte wurden nun auf Eis durchgeführt. Nach der Überführung in 2,0 ml SafeSeal Tubes (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland), wurde zu jeder Probe SUPERase Inhibitor (Life Technologies-Ambion, Darmstadt, Deutschland) gegeben. Dieser bindet eventuelle RNase Kontaminationen und hemmt so die Degradation der gewonnenen RNA. Lag die Zellzahl unter $0,5 \times 10^7$ Zellen wurden 1,5 µl hinzugegeben, darüber 2 µl. Bis zur weiteren Verwendung kam es zur Lagerung der RNA bei -70 °C. Um die DNA zu extrahieren, wurde im nächsten Schritt 500 µl AW1-Puffer auf die zuvor zwischengelagerte Allprep-Säule gegeben und bei 13000 U/Min für 1 Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Säule mit 500 µl AW2-Puffer gewaschen.

Daraufhin erfolgte eine Zentrifugation bei 13000 U/Min für 2 Minuten. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säulen für eine weitere Minute bei gleicher Umdrehungszahl trocken zentrifugiert. Die Allprep-Säule wurde nun in ein neues Eppendorf-Gefäß gesetzt und 100 µl TE-Puffer (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan und EDTA) auf die Säulenmembran pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 3 Minuten wurden die Proben für eine Minute bei 13000 U/Min zentrifugiert. Bis zur weiteren Verwendung wurde die gewonnene DNA aus dem Eppendorf-Gefäß in 1,5 ml Safe Seal-Tubes überführt und bei -20 °C gelagert. Zur Erfolgskontrolle wurde anschließend eine Gelelektrophorese durchgeführt. Die Elektrophoresen für RNA und DNA erfolgten hierbei jeweils in getrennten Gelkammern, um eine Kontamination zu verhindern. Es wurden 2 µl DNA/RNA mit 8 µl Aqua ad iniectabilia (B. Braun, Melsungen, Deutschland) und 2 µl Blue Juice (Invitrogen, Carlsbad, USA) auf ein 1% Agarose-Gel (120 ml H₂O und 1,2 mg Agarose von Sigma Life Science, Steinheim, Deutschland) gegeben. Flankierend zu den Proben wurden jeweils 4 µl einer 1Kb-DNA Ladder (Invitrogen, Carlsbad, USA) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 400 mA und 150 W für 40 Minuten durchgeführt.

Im Anschluss wurde das Gel für 40 Minuten in einem Ethidiumbromidbad [4 l H₂O dest und 200 µl 1%-Ethidiumbromid-Lösung (Firma Roth, Karlsruhe, Deutschland)] gefärbt. Die Produkte konnten mit dem Programm GeneSnap (Syngene, Cambridge, Vereinigtes Königreich) in UV-Licht sichtbar gemacht und daraufhin dokumentiert werden. Daneben wurde die Konzentration der erhaltenen DNA/RNA durch eine spektrophotometrische Untersuchung am NanoDrop-Gerät (Thermo Scientific, Wilmington, USA) gemessen. Hierzu wurde 1 µl der gewonnenen DNA/RNA auf das Gerät gegeben und die Konzentration bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt.

2.4 cDNA-Synthese

RNA ist sehr instabil und kann nicht direkt mittels PCR vervielfältigt werden. Um eine weitere Bearbeitung der Proben zu ermöglichen, wurde die gewonnene RNA daher in die stabilere cDNA (complementary deoxyribonukleinacid) umgeschrieben. Das Produkt bestand entsprechend nur aus Exons und war für weitere molekulare Techniken verwendbar. Die Amplifikation wurde mit dem TaqMan Reverse Transcription Kit (Life Technologies-Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Dieses Kit beinhaltet sämtliche in Tabelle 4 aufgeführten Komponenten.

Bei einer Temperatur von 25 °C lagerten sich die Primer an den RNA Strang an. Durch eine Erwärmung auf 48 °C begann die reverse Transkriptase die cDNA zu synthetisieren. Zum Schluss der Reaktion wurde die DNA-Polymerase dann bei 95 °C denaturiert. Anhand der vorhandenen RNA-Konzentration (DNA/RNA Extraktion) wurde das benötigte Volumen an RNA und RNase-freiem Wasser (Qiagen, Venlo, Niederlande) berechnet. Es wurden maximal 2 µg RNA eingesetzt, um ein Gesamtvolumen von 24 µl zu erreichen. So ergab sich für eine Beispielkonzentration von 500 ng/ml ein Volumen von 4 µl RNA und 20 µl RNase freiem Wasser. Der Mastermix für eine einfache Reaktion mit 24 µl RNA-Wasser-Gemisch wurde wie folgt angesetzt.

Tabelle 4 | Reaktionsansatz für cDNA Synthese (MgCl₂: Magnesiumdichlorid, dNTP: Desoxynukleosid-triphosphat, RT: Reverse Transkriptase)

Bezeichnung	Hersteller	Menge
10x RT Puffer	Applied Biosystems	3 µl
25 mM MgCl ₂	Applied Biosystems	6,6 µl
dNTP Mix (2,5 mM)	Applied Biosystems	6 µl
Random Hexamere (50 µM)	Applied Biosystems	1,5 µl
MultiScribe RT (50 U/µl)	Applied Biosystems	0,75 µl

Tabelle 5 | Konditionen für die cDNA Synthese

Zyklen	1x	1x	1x
Temperatur	25 °C	48 °C	95 °C
Dauer	10 Min	30 Min	5 Min

Nach der Reaktion wurde die cDNA bei -20 °C gelagert.

2.5 Real-Time Polymerasekettenreaktion (RQ-PCR)

Zum quantitativen Nachweis von *PPP4R2*-Transkripten wurde die TaqMan basierte RQ-PCR eingesetzt. Bei dieser Methode wird durch Fluoreszenzmarkierung der Transkripte ein quantitativer Expressionsnachweis ermöglicht. Die Analyse wurde mittels TaqMan Genexpressions-Assays etabliert, zum Einsatz kamen hierbei unter anderem TaqMan MGB-Quencher-Sonden (minor groove binder). Diese geben erst unter Exonukleaseaktivität der Polymerase ein Fluoreszenzsignal ab. Die Normalisierung erfolgte anhand der Expression des Haushaltsgens *B2M* (Beta2-Mikroglobulin). Der Vorteil von *B2M* besteht in einer quasi konstanten Expression, was eine relative Analyse der Ergebnisse erlaubt. Jeder Lauf umfasste zusätzlich eine Plasmidstandardkurve in fortlaufender Verdünnung

($0,3 \times 10^6$ – $0,3 \times 10^1$) für *B2M* und *PPP4R2*, welche zur Berechnung der absoluten Konzentrationen verwendet wurde. Als Ausgangsmaterial für die Analyse diente die zuvor aus RNA umgeschriebene cDNA. Um die Genauigkeit der Messungen zu gewährleisten, wurden die Ansätze für *PPP4R2* und das Haushaltsgen in Triplikaten, die Plasmidstandardreihe in Duplikaten angesetzt. Hinzu kamen außerdem noch eine Negativkontrolle für *PPP4R2* und zwei Negativkontrollen für das Haushaltsgen.

Tr1			Tr2			Tr3			Tr4		
Tr5			Tr6			Tr7			Tr8		
Tr9			Tr10			Tr11			Tr12		
V10 ⁶	V10 ⁶	V10 ⁵	V10 ⁵	V10 ⁴	V10 ⁴	V10 ³	V10 ³	V10 ²	V10 ²	V10 ¹	NK
Tr1			Tr2			Tr3			Tr4		
Tr5			Tr6			Tr7			Tr8		
Tr9			Tr10			Tr11			Tr12		
V10 ⁶	V10 ⁶	V10 ⁵	V10 ⁵	V10 ⁴	V10 ⁴	V10 ³	V10 ³	V10 ²	V10 ²	NK	NK

Abbildung 2 | Plattenschema für RT-PCR (grüne Zahlen: Protein phosphatase 4 regulatory subunit 2 (*PPP4R2*), blaue Zahlen: Haushaltsgen Beta2-Mikroglobulin (*B2M*), Tr: Triplikate, V: Verdünnungsreihe, NK: Negativkontrolle)

Die Proben wurden in einem TaqMan 7900Ht gemessen. Als Ergebnis erhält man den Cycle Threshold (C_T). Dieser Wert gibt die Anzahl der Zyklen an, die abgelaufen sind, bis ein Anstieg der Fluoreszenz detektiert wurde. Aus der Plasmidstandardreihe konnte dann mit dem C_T Wert auf die Kopienanzahl im Ausgangsmaterial geschlossen werden.

2.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Amplifizierung der neun Exons des *PPP4R2*-Gens erfolgte mittels Polymerasekettenreaktion (PCR). Als Ausgangsmaterial diente dabei die zuvor

gewonnene Patienten-DNA. Nach der einmaligen Aktivierung der Polymerase bei 95 °C, kam es bei ebenfalls 95 °C zu einer Phase der Doppelstrangdenaturierung. Hierauf folgte eine Abkühlung auf 57 °C bzw. 58 °C, die eine Primerhybridisierung erlaubte. Unter einer Temperatursteigerung auf 72 °C wurde durch die DNA-Polymerase der gewünschte Genabschnitt amplifiziert. Nach 40 Zyklen lag ein Produkt mit ausreichenden Exonkopien vor. Als Primersequenzen wurden exonnahe Stellen innerhalb der Introns gewählt. Zum einen konnte hierdurch eine ausreichende Stabilität des Assays durch ausreichende Primerbindung erzielt werden, zum anderen wurden so die entsprechenden Splicestellen ebenfalls amplifiziert. Die verwendeten Primersequenzen setzen sich wie folgt zusammen.

Tabelle 6 | Primersequenzen für die Exons 1 bis 9 der Protein phosphatase 4 regulatory subunit 2 (PPP4R2) (T: Thymin, C: Cytosin, A: Adenin, G: Guanin)

Primer	Forward-Primer	Reverse-Primer
Exon 1	GAGGTGCTCGCTCTGTCG	AACCATCCGCCCTGAAAG
Exon 2	GGTGGTAATTTGGTTGAGAGGC	ATTCTCTAAGCGTGCCAAAGC
Exon 3	AATGAGGCATGATGTGTGCTC	TGGATAATCAATCATCAACCAGAC
Exon 4	AAATGACTCATCCATTTATTTCCC	CCCGAACAGATCTTACTCAATG
Exon 5	TCAATGGGAATTTAACCCACC	GCAATGAGTGCCACCACAG
Exon 6	CATTCCACCTTGGGTGACAG	TTTCAGGCCCATGCCTTAC
Exon 7	TTAATTTGGTAAGGCATGGGC	GAAGCCAGTGCTCCTATAAACC
Exon 8	TCCTACTGGGAATTATTCATCAA	CAGCATTATAAGGAGTTCCATTACG
Exon 9	TGTACCCGGCAGCACTGTA	AACTACTACTTACAGGGCCTTCGTT

Für Exon 1 wurde aufgrund seiner GC (Guanin, Cytosin) reichen Sequenz die Hot Star Taq-Polymerase (Qiagen, Venlo, Niederlande) mit den entsprechenden Reagenzien aus Tabelle 7 verwendet. Für Exon 2 bis 9 wurde

die Platinum Taq-Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, USA) eingesetzt. Der Mastermix für 1 µl mit 50 ng DNA wurde wie in Tabelle 8 gezeigt pipettiert und entsprechend der Probenanzahl angesetzt.

Tabelle 7 | Reaktionsansatz für die PCR von Exon 1 bei 1 µl Probe mit 50 ng DNA (Mg: Magnesium)

Bezeichnung	Hersteller	Menge
Aqua ad iniectabilia	Braun (Melsungen, Deutschland)	15 µl
10x PCR Buffer, Minus Mg	Qiagen (Venlo, Niederlande)	2,5 µl
Q-Solution	Qiagen	5 µl
Desoxynukleosidtriphosphat 25 mM	Roche Diagnostics (Indianapolis, USA)	0,25 µl
Forward Primer	Thermo Fisher (Ulm)	0,5 µl
Reverse Primer	Thermo Fisher	0,5 µl
Hot Star <i>Taq</i> DNA-Polymerase	Qiagen	0,25 µl

Tabelle 8 | Reaktionsansatz für die PCR der Exons 2-9 bei 1 µl Probe mit 50 ng DNA

Bezeichnung	Hersteller	Menge
Aqua ad iniectabilia	Braun (Melsungen, Deutschland)	19 µl
10x PCR Buffer, Minus Magnesium	Qiagen (Venlo, Niederlande)	2,5 µl
50 mM Magnesium-Chlorid	Applied Biosystems (Foster City, USA)	0,75 µl
Desoxynukleosidtriphosphat 25 mM	Roche (Indianapolis, USA)	0,25 µl
Forward Primer	Thermo Fisher (Ulm)	1 µl
Reverse Primer	Thermo Fisher	1 µl
Platinum <i>Taq</i> DNA-Polymerase	Invitrogen (Carlsbad, USA)	0,25 µl

Der Reaktionsansatz wurde in eine Micro Amp Optical 96-Well Platte (Applied Biosystems) pipettiert. Zu 1 µl Patientenprobe wurden jeweils 24 µl des entsprechenden Mastermix gegeben. Als Negativkontrolle wurde zusätzlich

für jedes Exon ein PCR-Ansatz ohne DNA-Probe auf die Platte pipettiert.

Zur Berechnung der Hybridisierungstemperatur wurde zur Annäherung die vereinfachende Wallace-Regel verwendet. Hierbei wird angenommen, dass GC reiche Sequenzen wegen ihrer drei Wasserstoffbrücken eine höhere Schmelztemperatur (T_m) besitzen.

$$T_m = 2^{\circ}\text{C} \times (A+T) + 4^{\circ}\text{C} \times (G+C)$$

Bei der Etablierung des PCR Protokolls zeigte sich, dass die Primerhybridisierung bei Exon 1 unter 58 °C ein saubereres Ergebnis erzielen konnte als mit 57 °C, wie bei Exon 2 bis 9 angewendet.

Darüber hinaus wurde die Dauer der einzelnen Schritte den Ergebnissen der Etablierung angepasst, womit sich für die PCR-Reaktionen folgende Konditionen ergaben.

Tabelle 9 | PCR Konditionen für Exon 1

Zyklen	1x	40x			1x
Temperatur	95 °C	95 °C	58 °C	72 °C	72 °C
Dauer	10 Min	1 Min	1 Min	1 Min	10 Min

Tabelle 10 | PCR Konditionen für Exon 2 bis 9

Zyklen	1x	40x			1x
Temperatur	95 °C	95 °C	57 °C	72 °C	72 °C
Dauer	10 Min	10 Sek	30 Sek	30 Sek	7 Min

Die PCR-Reaktion erfolgte in einem Thermocycler (GeneAmp PCR System 2720, Applied Biosystems). Bis zur Entnahme und Aufreinigung des Produkts

wurden die PCR-Amplifikate bei 4 °C gelagert.

2.7 PCR-Produktkontrolle / Gelelektrophorese

Zur Analyse der PCR-Produkte wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Auf ein 2%-Agarosegel (300 ml H₂O und 6 mg Agarose von Sigma Life Science, Steinheim, Deutschland) wurden je 5 µl Probe bzw. Negativkontrolle, gemeinsam mit 5 µl Ladepuffer (0,06 ml Orange G, 30 ml Glycerol und 70 ml H₂O dest) aufgetragen. Zur Größenanalyse wurde eine 100-bp-Ladder (Invitrogen) mitgeführt. Die Elektrophorese erfolgte bei 140 Volt, 400 Milliampere und 100 Watt für 50 Minuten.

Im Anschluss wurde das Gel für 40 Minuten in einem Ethidiumbromidbad [4 l H₂O dest. und 200 µl 1%-Ethidiumbromid-Lösung (Firma Roth, Karlsruhe, Deutschland)] gefärbt. Die PCR-Produkte konnten daraufhin mit GeneSnap (Syngene, Cambridge, Vereinigtes Königreich) unter UV-Licht sichtbar gemacht werden und wurden dokumentiert.

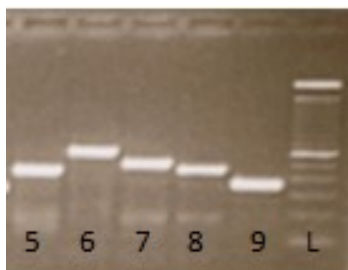


Abbildung 3 | Gelelektrophorese von Exon 5 bis 9 (von links nach rechts) sowie einer 100 Basenpaare-Ladder (L)

2.8 PCR-Aufreinigung

Nach der Produktkontrolle wurde das PCR-Produkt mittels QIAvac 96-Kit (Qiagen) von überschüssigen Reagenzien gereinigt. Dieses Kit enthält die QIAvac 96 Top Plate, eine Auffangplatte sowie den Binde-, Wasch- und Eluierungspuffer (PB-, PE-, und EB-Buffer). Die Proben wurden bei dieser Methode mit Hilfe einer Vakuumpumpe bearbeitet.

Zuerst wurde dem Probenvolumen 100 µl PB-Buffer hinzugefügt. Im nächsten Schritt wurde das Produkt auf die QIAvac 96 Top Plate gegeben und für 1 Minute dem Vakuum ausgesetzt. Durch diesen Vorgang konnte das gesamte Produkt in der stationären Phase der Säulen gebunden werden. Hierauf wurde in jedes Well 750 µl PE-Buffer pipettiert und die Probe weitere 15 Minuten dem Vakuum ausgesetzt, um das Produkt von überschüssigen Reagenzien zu befreien, während die DNA in der stationären Phase zurückblieb. Im letzten Schritt der Aufreinigung wurde die QIAvac 96 Top Plate auf die Auffangplatte gesetzt und 35 µl EB-Buffer in jedes Well pipettiert. Diese Platten wurden darauf bei 3800 U/min für 2,5 Minuten in der Zentrifuge Multifuge 4KR Heraeus (Firma Carl Roth, Karlsruhe) zentrifugiert. Das fertige Produkt wurde zur weiteren Bearbeitung in eine Half Skirt 96-Well PCR Plate (VWR, Radnor, USA) pipettiert und bei -20 °C gelagert.

2.9 Cycle Sequencing Reaction

Die Vorbereitung der Sequenzierung erfolgte mittels Cycle Sequencing Reaction (CSR); als Ausgangsmaterial diente dabei das zuvor aufgereinigte PCR-Produkt. Im Gegensatz zum PCR-Ansatz befinden sich in dem Reaktionsansatz für die CSR neben den Standard dNTPs (Desoxynukleosidtriphosphat) auch fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide (didNTP) der

vier Basen. Diese führen bei einem Einbau in den neuen Strang zu einem Abbruch der Synthese. Durch die unterschiedlichen Längen der synthetisierten Stränge und die basenspezifischen Fluoreszenzeigenschaften, kann im Sequenzierer die Reihenfolge der Nukleotide bestimmt werden.

Nach der einmaligen Aktivierung der Polymerase bei 96 °C, kam es bei ebenfalls 96 °C zur Denaturierung der DNA-Doppelstränge. Bei 54 °C wurde eine Anlagerung des Primers ermöglicht und unter einer Erhöhung der Temperatur auf 60 °C die neuen Stränge synthetisiert. Nach 40 Zyklen war dabei ausreichend Material zur Sequenzierung vorhanden. Der Mastermix für 1 µl aufgereinigtes PCR-Produkt wurde wie folgt pipettiert und entsprechend der Probenzahl angesetzt.

Tabelle 11 | Reaktionsansatz für die Cycle Sequencing Reaction (CSR)

Bezeichnung	Hersteller	Menge
Aqua ad iniectabilia	Braun (Melsungen, Deutschland)	9,3 µl
5xSequencing Buffer	Applied Biosystems (Foster City, USA)	1,7 µl
Primer M13 Forward	Thermo Fisher (Ulm)	1 µl
Big Dye	Applied Biosystems	2 µl

Die dNTPs, didNTPs und die Polymerase waren im Big Dye (Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems) enthalten. Der M13 Forward Primer besteht aus folgender Sequenz.

TGTAACGACGGCCAGT

Die CSR-Reaktion erfolgte in einem Thermocycler (GeneAmp PCR System 2720, Applied Biosystems). Bis zur Entnahme und Aufreinigung des Produkts

wurden die Proben lichtgeschützt bei 4 °C gelagert.

Tabelle 12 | Thermocycler-Konditionen der Cycle Sequencing Reaction (CSR)

Zyklen	1x	40x		
Temperatur	96 °C	96 °C	54 °C	60 °C
Dauer	45 Sek	15 Sek	10 Sek	4 Min

2.10 Aufreinigung des CSR-Produkts

Die Aufreinigung der CSR-Produkte erfolgte mittels Aufreinigungs- und Auffangplatten aus dem DyEx-Kit (Qiagen). Zunächst wurde die Aufreinigungsplatte für 6,5 Minuten bei 2350 Umdrehungen pro Minute in der Multifuge 4KR Heraeus zentrifugiert. Die Beschleunigung wurde dabei auf Stufe 7 und die Bremse auf Stufe 5 gestellt.

Der Überstand wurde verworfen und eine Micro Amp Optical 96-Well Platte (Applied Biosystems) unter der Aufreinigungsplatte positioniert. Anschließend wurde das CSR-Produkt auf die Platte pipettiert und erneut bei oben genannten Konditionen zentrifugiert. Die Micro Amp Optical 96-Well Platte enthielt anschließend das aufgereinigte CSR-Produkt, während die Reagenzien vollständig in der stationären Phase der Platte gebunden waren.

2.11 Sequenzierung

Vor Beginn der Sequenzierung wurde die gereinigte DNA mit Hi-Di Formamid (Applied Biosystems) auf ein Gesamtvolumen von 20 µl gebracht. Die Analyse der Sequenzen erfolgte nach Verfügbarkeit mit dem 3130xl- oder dem 3500Dx-Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Die Geräte erkennen die fluoreszenz-markierten didNTPs und ermitteln durch Stranglänge und Basenposition die Gensequenz.

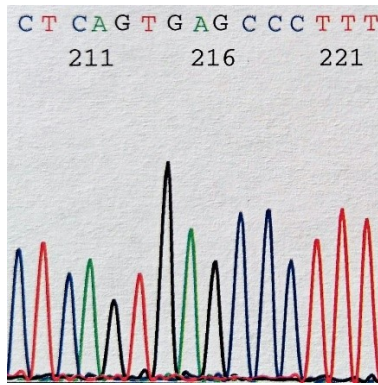


Abbildung 4 | Auszug aus der Sequenz Exon 8 von *PPP4R2* (T: Thymin, C: Cytosin, A: Adenin, G: Guanin. Die Höhe der Kurve gibt die Signalstärke in relativen Fluoreszenzeinheiten wieder und hängt mit der Menge der analysierten DNA zusammen, während die Farbe der jeweiligen Base zugeordnet ist. Die Nummerierung entspricht der Lage im sequenzierten Abschnitt.)

Die Analyse erfolgte mit Hilfe des Programms SeqMan (DNASTar, Madison, USA). Bei fraglichen Abweichungen von der Referenzsequenz wurden die Sequenzen ausgedruckt und manuell ausgewertet. Auf diese Weise können Veränderungen der Sequenz wie Punktmutationen, Insertionen und Deletionen detektiert werden. Als Referenzsequenz wurde dabei das Transkript *PPP4R2*-001 mit der ID ENST00000356692 verwendet (nach ensembl vom 13.06.2015: www.ensembl.org).

2.12 Globale Expressionsanalyse

Um die Expression von *PPP4R2* und den Zusammenhang mit der Expression anderer Gene zu betrachten, wurden Daten einer genomweiten Genexpressionsanalyse verwendet. Die Daten wurden mittels cDNA-Microarray Technologie der Stanford Functional Genomics Facility gewonnen und durch Herrn Professor Lars Bullinger aus der Abteilung für die Analyse zur Verfügung gestellt. Hierfür wurden in einem 436 AML Fälle umfassenden AML Datensatz (Kharas et al. Nat Med 2010) zunächst die jeweils 30 AML Fälle mit der höchsten (high) bzw. niedrigsten (low) *PPP4R2* Expression

identifiziert. Der Datensatz stammte dabei aus bereits zuvor veröffentlichten Expressionsdaten des gene expression omnibus (Referenznummer GSE16432). Anschließend wurden mit Hilfe eines supervidierten Auswertealgorithmus (Class Comparison Analyse; verwendete Software: BRB-ArrayTools, National Cancer Institute, USA) Gene identifiziert, deren Expressionslevel mit den entsprechenden *PPP4R2* high und low Expressionsfällen hochsignifikant korrelierten ($p < 0.005$).

Für Gene mit einem signifikanten Expressionsunterschied zwischen den beiden Klassen wurde der Fold-Change berechnet. Diese Effektgröße gibt an, um wie viel sich die Expression zwischen high und low Expressionsfällen unterscheidet.

Hierzu werden die Expressionen der Gene in beiden Klassen gemittelt und in ein Verhältnis gesetzt, wobei ein Fold-Change über 2,0 bzw. unter 0,5 als biologisch relevanter Unterschied angesehen wird.

$$\frac{\text{Mittelwert Genexpression Klasse 1}}{\text{Mittelwert Genexpression Klasse 2}} = \text{Fold Change}$$

2.13 Statistische Auswertung und Grafiken

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mithilfe von SPSS Version 23.0.0.2 (IBM, New York City, USA). Um die Mittelwerte der einzelnen RQ-PCR Stichproben zu vergleichen, wurde der t-Test für unabhängige Stichproben in Kombination mit dem Levene-Test auf Varianzhomogenität durchgeführt. Im Falle nicht vorliegender Varianzhomogenität wurde die Welch-Korrektur angewendet, p-Werte $\leq 0,05$ wurden hierbei als signifikant gewertet. Die Erstellung der Abbildungen erfolgte hauptsächlich mit Excel 2007 (Microsoft, Redmond, USA), einzig für Abbildung 5 wurde die Software Origin 2016 verwendet (OriginLab, Northampton, USA).

3. Ergebnisse

3.1 Auswertung der Real-Time RQ-PCR

Zu Beginn der Arbeit wurden 48 Proben aus der AML HD98A Studie, sowie 6 Proben gesunder Probanden mittels RQ-PCR auf die *PPP4R2* Expression analysiert. Untersucht wurden dabei Transkriptlevel von *PPP4R2* in unterschiedlichen AML Subgruppen bezogen auf das Haushaltsgen *B2M* (Beta2-Mikroglobulin). Ziel war hierbei eine orientierende Analyse durchzuführen, um eine mögliche Relevanz der *PPP4R2*-Expression zu identifizieren.

Als signifikant erwies sich die verminderte *PPP4R2* Expression bei Patienten mit AML ohne weitere Differenzierung der Subtypen bei einem Mittelwert (Mw) von 0,72 *PPP4R2/B2M* ($p = 0.043$). Bei der Untersuchung der Subtypen zeigte sich eine signifikante Verminderung der *PPP4R2* Expression bei Patienten mit CN-AML ($n = 24$, Mw = 0,27, $p = 0,05$) und bei Patienten mit Deletion in der MAR ($n = 6$, Mw = 0,13, $p = 0,023$). Bei den anderen untersuchten Subtypen waren die Unterschiede nicht signifikant. Hierbei handelte es sich um Patienten mit Inversion 16 ($n = 5$, Mw = 0,22, $p = 0,077$), Translokation t(8;21) ($n = 4$, Mw = 0,29, $p = 0,157$), AML mit Veränderungen der chromosomalen Bande 11q23 unter Beteiligung des *MLL* Gens ($n = 4$, Mw = 0,30, $p = 0,167$), AML mit komplexem Karyotyp ($n = 3$, Mw = 0,17, $p = 0,125$) und um Patienten, die in den vorhergehenden Subtypen nicht umfasste Karyotypen aufwiesen [47,XX,+13[17]/46,XX[7] und (45,XX,-7)] ($n = 2$, Mw = 0,37, $p = 0,403$]. Abbildung 5 zeigt die Verteilung der Transkriptlevel und deren Mittelwert in den einzelnen AML Subtypen.

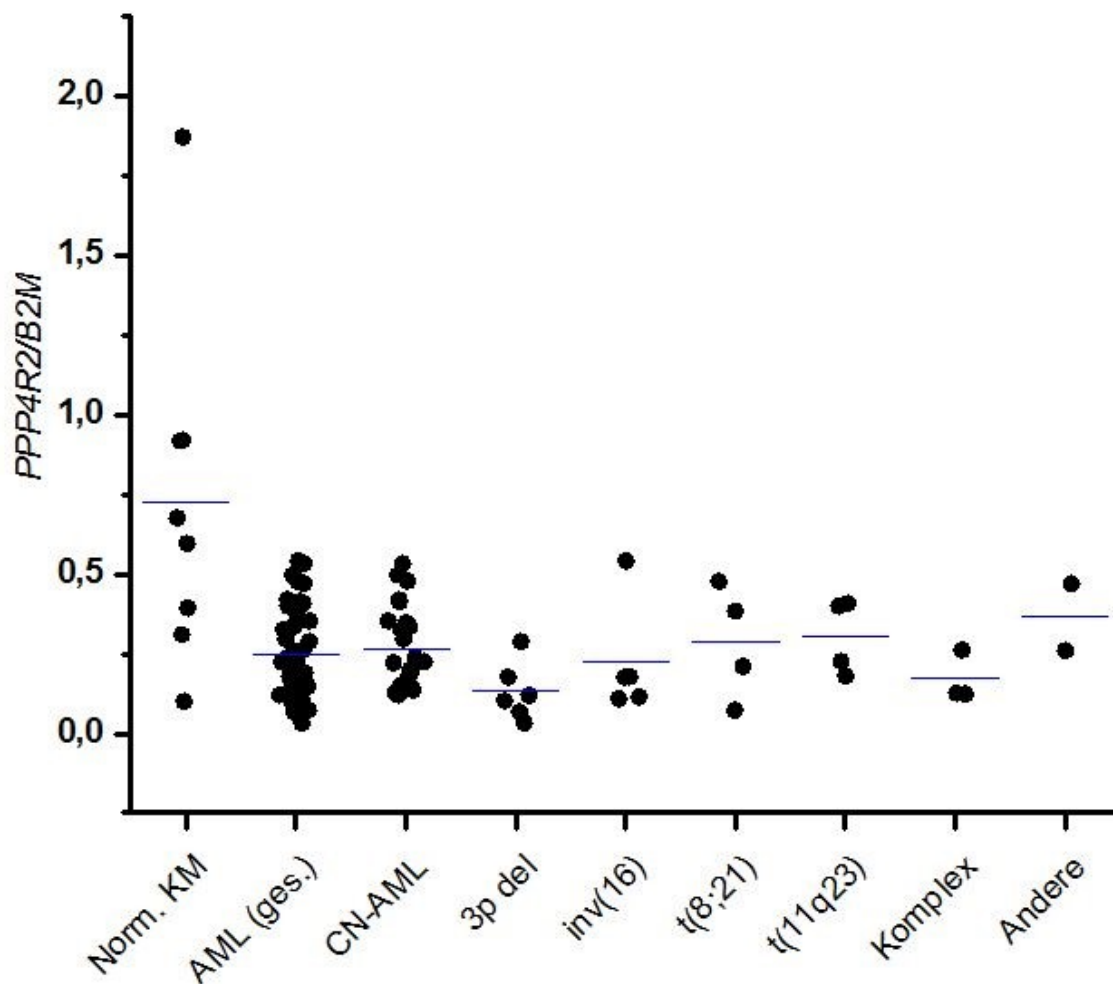


Abbildung 5 | *PPP4R2*-Transkriptlevel. Die Grafik zeigt die Ergebnisse der Real-Time PCR ausgedrückt im Verhältnis aus mRNA-Expression von Protein phosphatase 4 regulatory subunit 2- (*PPP4R2*) zu *Beta2-Mikroglobulin*-Expression (*B2M*) in unterschiedlichen Proben. Die schwarzen Punkte stehen für die einzelnen Werte, die blaue Linie markiert jeweils den Mittelwert (Mw). Es wurden sowohl die einzelnen Untergruppen, als auch alle AML-Proben (akute myeloische Leukämie) gemeinsam aufgetragen. [Norm. KM: gesunde Probanden (n = 6, Mw = 0,72), AML (ges.): alle AML-Proben (n = 48, Mw = 0,25), CN-AML: akute myeloische Leukämie mit normalem Karyotyp (n = 24, Mw = 0,27), 3p del: Patienten mit Deletion der Region 3p13.1-14 entsprechend der minimally altered region (MAR) (n = 6, Mw = 0,13), inv(16): Inversion des Chromosom 16 (n = 5, Mw = 0,22), t(8;21) = Translokation zwischen Chromosom 8 und 12 (n = 4, Mw = 0,29), 11q23: akute myeloische Leukämie mit Anomalitäten betreffend 11q23 unter Beteiligung von *MLL* (Mixed lineage leukemia-Gen) (n = 4, Mw = 0,30), Komplex: Komplexer Karyotyp mit mindestens drei strukturellen und/oder numerischen Veränderungen (n = 3, Mw = 0,17), Andere: in den vorhergehenden Subtypen nicht umfasste Karyotypen entsprechend 47,XX,+13[17]/46,XX[7] und (45,XX,-7) (n = 2, Mw = 0,37,)]

Die Auswahl der Proben zur Sequenzierung erfolgte auf Basis einer globalen Microarray-Genexpressionsanalyse. Hierbei wurden im Folgenden 320 Proben aus der AML HD98A Studie, ohne besondere Vorauswahl, auf ihre *PPP4R2*-Expression untersucht. Tabelle 13 zeigt von diesen 320 Proben je 30 mit den höchsten, niedrigsten, sowie 29 Proben mit mittleren Expressionsleveln. Insgesamt ergab sich eine große Streubreite der Expressionslevel von 1,547 bis -2,592. Um etwaige Mutationen im *PPP4R2*-Gen zu untersuchen, wurde im Weiteren eine Sequenzanalyse an den in Tabelle 13 aufgelisteten 89 Proben durchgeführt (je 30 Proben hoher, niedriger und 29 Proben mittlerer *PPP4R2*-Expression). Zusätzlich wurde die Mutationsanalyse an den sechs in der Einleitung beschriebenen Patienten mit Deletion in der MAR 3p13.1-14 durchgeführt, sodass insgesamt 95 Proben sequenziert wurden.

Tabelle 13 | Ausgewählte Proben mit hoher, niedriger und mittlerer *PPP4R2*-Expression. (HE: hohe Expression, ME: mittlere Expression, NE: niedrige Expression. ME 13 und ME 17 entsprechen dem gleichen Patienten und wurden als interne Kontrolle doppelt bearbeitet)

Proben mit niedriger Expression	Expressions-level	Proben mit mittlerer Expression	Expressions-level	Proben mit hoher Expression	Expressions-level
NE1	-2,592	ME1	-0,126	HE1	0,687
NE2	-1,840	ME2	-0,122	HE2	0,690
NE3	-1,127	ME3	-0,087	HE3	0,703
NE4	-1,126	ME4	-0,058	HE4	0,704
NE5	-1,104	ME5	-0,049	HE5	0,713
NE6	-1,078	ME6	-0,010	HE6	0,724
NE7	-1,075	ME7	-0,004	HE7	0,728
NE8	-1,039	ME8	0,033	HE8	0,759
NE9	-1,019	ME9	0,051	HE9	0,787

Fortsetzung Tabelle 13 auf Seite 41

Fortsetzung Tabelle 13

NE10	-1,006	ME10	0,056	HE10	0,797
NE11	-0,922	ME11	0,087	HE11	0,802
NE12	-0,920	ME12	0,088	HE12	0,802
NE13	-0,911	ME13	0,127	HE13	0,885
NE14	-0,898	ME14	0,128	HE14	0,952
NE15	-0,895	ME15	0,135	HE15	0,976
NE16	-0,878	ME16	0,145	HE16	0,982
NE17	-0,862	ME17	0,175	HE17	1,025
NE18	-0,839	ME18	0,177	HE18	1,031
NE19	-0,825	ME19	0,187	HE19	1,037
NE20	-0,822	ME20	0,194	HE20	1,054
NE21	-0,707	ME21	0,206	HE21	1,072
NE22	-0,701	ME22	0,209	HE22	1,112
NE23	-0,696	ME23	0,211	HE23	1,150
NE24	-0,693	ME24	0,215	HE24	1,203
NE25	-0,677	ME25	0,236	HE25	1,205
NE26	-0,670	ME26	0,248	HE26	1,299
NE27	-0,665	ME27	0,258	HE27	1,357
NE28	-0,659	ME28	0,265	HE28	1,443
NE29	-0,653	ME29	0,354	HE29	1,496
NE30	-0,640	ME30	0,415	HE30	1,547

3.2 Etablierung der PCR

Ziel der Etablierung war es, eine saubere Amplifizierung des PCR-Substrats zu erreichen und das Auftreten von unspezifischen Nebenbanden zu minimieren. Während die Exons 2 bis 9 saubere Ergebnisse mit der Taq Polymerase zeigten, wurde bei Exon 1 die HotStar Polymerase gewählt. Unsaubere Ergebnisse mit vielen Nebenbanden zeigten sich mit der AmpliTaq (Applied Biosystems). Basierend auf der vereinfachten Wallace-Regel wurde in den PCR

Testläufen Temperaturen zwischen 57 und 62 °C gewählt. Für Exon 1 zeigten sich die saubersten Ergebnisse bei 58°C, für die anderen Exons bei 57°C. Um die Spezifität der GC-reichen Exon 1 Banden zu erhöhen, wurden parallel Versuche mit Q-Solution (Qiagen, Venlo, Niederlande) durchgeführt, in denen sich eine Reduktion unspezifischer Banden zeigte. Eine zusätzliche Erhöhung der Magnesiumkonzentration verbesserte die Ergebnisse nicht weiter.

Im Verlauf dieser Arbeit wurden mit den entstandenen Protokollen 95 Patienten bearbeitet (89 Patienten wurden anhand ihrer Expression von *PPP4R2* ausgewählt, 6 Patienten aufgrund des Vorliegens einer MAR). Bei insgesamt 6 Patienten konnte jeweils eines der 9 Exons auch nach Wiederholung der PCR nicht in ausreichender Qualität amplifiziert werden. Hierbei handelte sich um einen Patienten mit Deletion in der MAR, einen Patienten mit hoher *PPP4R2*-Expression, sowie je zwei Patienten mit niedriger und mittlerer Expression. Zudem war bei sieben Patienten mit hoher Expression im Verlauf der Versuche nicht mehr ausreichend Material vorhanden, um bei unsauberer PCR eines Exons eine Wiederholung durchzuführen. Somit konnten von 855 zu untersuchenden Exons (95 Patienten mit jeweils 9 Exons) insgesamt 13 Exons im nächsten Schritt nicht mittels Sequenzierung bearbeitet werden.

3.3 Sequenzanalyse

Bei 11 von 95 untersuchten Patienten wurde ein SNP im *PPP4R2*-Gen in Exon 8 gefunden. Hier zeigte sich ein Austausch der Base an Position 1 des Exons mit einer Tripletänderung von AGT zu AGC. Beide Triplets kodieren für die Aminosäure Serin und stellen so eine synonyme SNP mit einer Variation der Spleiß-Region dar (Reference SNP 61188513). Auch bei den sechs untersuchten Patienten mit Deletion in der MAR zeigten sich keine Mutationen in den untersuchten Exons. Daneben konnten bei 47 Patienten

Veränderungen in angrenzenden Intronbereichen erkannt werden. Diese lagen zwischen Exon 3 und 4, sowie zwischen Exon 6 und 7. Ein Großteil dieser Intronvarianten ist bereits bekannt, lediglich bei 8 Patienten zeigten sich nicht vorbeschriebene Veränderungen. Diese umfassen die Heterozygotie an Position 95 im Intronbereich zwischen Exon 3 und 4, sowie die Heterozygotie an Position 207 zwischen Exon 6 und 7. Tabelle 14 fasst die Ergebnisse der Sequenzierung zusammen.

Tabelle 14 | Ergebnisse der Sequenzierung der Exons und angrenzender Intronbereiche von Protein phosphatase 4 regulatory subunit 2 (*PPP4R2*). (Het: Heterozygot, Del: Deletion, Sub: Substitution C: Cytosin, T: Thymin, A: Adenin, HE: hohe Expression, ME: mittlere Expression, NE: niedrige Expression, ME 13 und ME 17 entsprechen dem gleichen Patienten und wurden als interne Kontrolle doppelt bearbeitet, Pos: Position innerhalb des Exons oder Introns, Intron 3-4 bzw. 6-7: Intron zwischen Exon 3 und 4 bzw. 6 und 7)

Bereich in <i>PPP4R2</i>	Polymorphismus	Expression	Patient
Exon 8	SubT zu CPos1	NE	5
			10
			15
			18
			24
Exon 8	SubT zu CPos1	ME	30
Exon 8	SubT zu CPos1	HE	3
			12
			20
			24
			25
Intron 3-4	HetC+TPos95	NE	10
Intron 3-4	HetC+TPos95	HE	23

Fortsetzung Tabelle 14 auf Seite 44

Fortsetzung Tabelle 14

Intron 6-7	HetA+TPos207	NE	21
			30
Intron 6-7	HetA+TPos207	ME	1
			2
			3
			9
Intron 6-7	SubA zu TPos76	NE	22
Intron 6-7	SubA zu TPos76	ME	4
			11
			13
			17
Intron 6-7	SubA zu TPos76	HE	4
Intron 6-7	HetA+TPos76	MAR	5
Intron 6-7	HetA+TPos76	NE	1
			4
			5
			10
			11
			18
			21
			23
			25
			26
			27
			29
Intron 6-7	HetA+TPos76	ME	1
			2
			5
			6
			8
			12

Fortsetzung Tabelle 14 auf Seite 45

Fortsetzung Tabelle 14

Intron 6-7	HetA+TPos76	ME	14
			16
			18
			22
			26
			27
			30
Intron 6-7	HetA+TPos76	HE	1
			2
			3
			5
			6
			7
			8
			12
			18
			19
			20
			23
			24
Intron 6-7	DeITPos22/23	MAR	5
Intron 6-7	DeITPos22/23	NE	1
			4
			5
			10
			11
			18
			21
			23
			25

Fortsetzung Tabelle 14 auf Seite 46

Fortsetzung Tabelle 14

Intron 6-7	DeITPos22/23	NE	26
			27
			29
Intron 6-7	DeITPos22/23	ME	1
			2
			5
			6
			8
			12
			14
			16
			18
			22
			26
			27
			30
Intron 6-7	DeITPos22/23	HE	1
			2
			3
			5
			6
			7
			8
			12
			18
			19
			20
			23
			24

Bei insgesamt 95 sequenzierten Patienten konnte im Exonbereich somit nur ein vorbeschriebener SNP nachgewiesen werden. Es fanden sich keine Deletionen oder Missense Mutationen.

3.4 Globale Expressionsanalyse

Nachdem in den ersten Untersuchungen der Fokus auf die Verteilung der Expression von *PPP4R2* bei der AML gerichtet war, wurden in der folgenden Analyse die Zusammenhänge mit anderen Genen in einer globalen Expressionsanalyse untersucht. Hierzu wurden die Patienten in zwei Gruppen unterteilt: Klasse 1 mit 30 Patienten hoher *PPP4R2*-Expression und Klasse 2 mit 30 Patienten niedriger *PPP4R2*-Expression.

Verglichen wurde, welche Gene mit der Expression von *PPP4R2* hochsignifikant ($p < 0,005$) korrelieren. Aus den Expressionswerten der beiden Klassen wurde der Fold-Change berechnet. Insgesamt zeigten sich 5952 Gene hochsignifikant in ihrer Korrelation mit der *PPP4R2* Expression. Die weitere Analyse der Ergebnisse erfolgte an den achtzig Genen mit dem größten Fold-Change. Diese sind in Tabelle 15 und in der folgenden Heatmap (Abbildung 6) zusammengefasst. Die fünf Gene mit dem größten Fold-Change waren *RAB8B member RAS oncogene family (RAB8B)*, *G protein subunit alpha 13 (GNA13)*, *Sperm associated antigen 9 (SPAG9)*, *Activity-dependent neuroprotective protein homeobox 2 (ZNF508)* und *Sirtuin 5 (SIRT5)*.

Tabelle 15 | Expressionsdaten: aus der geometrisch gemittelten Expression der Klasse 1 (hohe PPP4R2-Expression) und Klasse 2 (niedrige Expression) wurde der Fold-Change berechnet (Mittelwert Klasse 1 dividiert durch Mittelwert Klasse 2); doppelte Analysen jeweils als Kontrolle mit aufgelistet (kursive Schrift: Gennamen)

Gennamen	Mittelwert Klasse 1	Mittelwert Klasse 2	Fold- change
<i>RAB8B</i>	2,3669586	0,4278384	5,5323657
<i>PPP4R2</i>	2,5029567	0,4582796	5,4616367
<i>RAB8B</i>	2,0900207	0,4067965	5,1377544
<i>GNA13</i>	1,9435438	0,3957332	4,9112480
<i>SPAG9</i>	1,8518065	0,4169174	4,4416632
<i>ZNF508</i>	1,8799140	0,4466861	4,2085794
<i>AFF4</i>	1,7172951	0,4227568	4,0621343
<i>AP1G1</i>	1,9232771	0,4789905	4,0152719
<i>LATS2</i>	1,9239438	0,4874186	3,9472102
<i>CYLD</i>	1,8383530	0,4693925	3,9164516
<i>RYBP</i>	1,9316880	0,4985004	3,8749975
<i>C16orf72</i>	1,7156540	0,4465509	3,8420121
<i>RYBP</i>	1,8941711	0,5043209	3,7558850
<i>DCP1A</i>	1,8560575	0,4968905	3,7353447
<i>SEC24A</i>	1,9797707	0,5350037	3,7004806
<i>HMG2L1</i>	1,8635239	0,5052136	3,6885858
<i>C20orf77</i>	1,6748517	0,4634118	3,6141758
<i>FXR1</i>	1,8009190	0,5067374	3,5539490
<i>PPM1A</i>	1,8721984	0,5299519	3,5327704
<i>GTF2B</i>	1,8016266	0,5100426	3,5323061
<i>BACH1</i>	1,6795794	0,4792111	3,5048839
<i>FXR1</i>	1,7456431	0,5029313	3,4709372
<i>MAX</i>	1,8318906	0,5303806	3,4539168
<i>FBXL3</i>	1,6262698	0,4758240	3,4177969
<i>DCP1A</i>	1,7555625	0,5169034	3,3963065

Fortsetzung Tabelle 15 auf Seite 49

Fortsetzung Tabelle 15

DCP1A	1,7555625	0,5169034	3,3963065
C16orf72	1,5994398	0,4767746	3,3547084
GTF2B	1,7471862	0,5260263	3,3214805
JMJD1A	1,6835034	0,5075189	3,3171249
ZNF644	1,5903886	0,4834594	3,2896011
RLF	1,5666199	0,4789676	3,2708264
C16orf72	1,5979623	0,4955491	3,2246293
MAPK6	1,5807399	0,4927177	3,2082057
NRBF2	1,8207085	0,5765163	3,1581215
C1orf9	1,5964123	0,5128824	3,1126283
TP53BP2	1,6064395	0,5221972	3,0763081
SFRS12	1,6153216	0,5262653	3,0694057
SERINC1	1,6225917	0,5292789	3,0656649
STK17A	1,6389350	0,5375484	3,0489066
RP2	1,7768358	0,5905246	3,0089109
SNRK	1,5780823	0,5265467	2,9970415
CENPC1	1,6133581	0,5493509	2,9368441
RNF138	1,6879046	0,5759163	2,9308158
MAPK6	1,4863426	0,5139025	2,8922655
RANBP2	1,5121137	0,5251093	2,8796172
TSC22D2	1,5602386	0,5434064	2,8712187
MIER1	1,6269917	0,5683954	2,8624296
RAB5A	1,6261196	0,5845563	2,7818016
WDFY1	1,7491249	0,6349141	2,7549001
WDFY1	1,7491249	0,6349141	2,7549001
NUP54	1,4667605	0,5358248	2,7373881
ZRANB1	1,5052827	0,5507998	2,7329034
ZNF281	1,5580411	0,5728119	2,7199875
ZNF281	1,5580411	0,5728119	2,7199875
DCTN4	1,5241448	0,5606768	2,7184016

Fortsetzung Tabelle 15 auf Seite 50

Fortsetzung Tabelle 15

ATP11B	1,5990703	0,5908911	2,7062011
MRPL19	1,7076354	0,6342563	2,6923427
LUC7L2	1,5531889	0,5774361	2,6898020
NECAP1	1,5407506	0,5825821	2,6446925
RAB1A	1,5411778	0,5862278	2,6289742
TCEA1	1,5943850	0,6074482	2,6247257
ABI1	1,5811026	0,6043178	2,6163431
TOR1AIP1	1,7417046	0,6712087	2,5948779
ARPP-19	1,5761447	0,6074342	2,5947580
RAB22A	1,6125382	0,6289280	2,5639474
PPP2R2A	1,6473343	0,6664276	2,4718879
SHOC2	1,4947802	0,6060463	2,4664454
PREI3	1,4873388	0,6080380	2,4461282
RAB5A	1,5609958	0,6402616	2,4380595
C13orf23	1,6248426	0,6684076	2,4309159
GPBP1	1,6729179	0,6912918	2,4199882
CALML4	1,5458854	0,6423211	2,4067173
TBC1D23	1,4680150	0,6215006	2,3620493
RFFL	1,5692044	0,6714879	2,3369065
JARID1A	1,5572494	0,6842680	2,2757888
MAD2L1BP	1,4682185	0,6513026	2,2542799
MIER1	1,4339221	0,6390039	2,2439960
C14orf11	1,5082755	0,6776912	2,2256088
YME1L1	1,4098093	0,6373565	2,2119635
SH3GLB1	1,4048019	0,6433757	2,1834861
ZNF638	0,6014847	1,6315388	0,3686610
VISA	0,6092333	1,6916917	0,3601326
CTBP2	0,5602616	1,5821284	0,3541189
LHX4	0,6415153	1,8702633	0,3430080
VISA	0,5967392	1,7917792	0,3330428

Fortsetzung Tabelle 15 auf Seite 51

Fortsetzung Tabelle 15

<i>C14orf149</i>	0,5917821	1,7992020	0,3289137
<i>MKKS</i>	0,6192097	1,9805485	0,3126456
<i>ROCK2</i>	0,5059387	1,6814311	0,3008977
<i>HERC4</i>	0,5011845	1,6981519	0,2951353
<i>C14orf159</i>	0,4949541	1,8942149	0,2612978
<i>SIRT5</i>	0,4933972	2,2021814	0,2240493

Auf der folgenden Heatmap sind die Genexpressionsdaten für die Einzelfälle graphisch im Rahmen eines hierarchischen Clusters zusammengefasst. Jede Spalte entspricht einem AML Fall (n = 30 Fälle mit hoher und n = 30 Fälle mit niedriger *PPP4R2* Expression) und jede Zeile einem der achtzig Gene, deren Expression am signifikantesten mit den beiden Gruppen korrelierte (Gene mit hoher Expression sind in rot kodiert, Gene mit niedriger Expression in grün). In der Heatmap (Abbildung 6) zeigen sich von den achtzig beschriebenen Genen siebzig Gene gleichsinnig mit *PPP4R2* korreliert. Bei einer hohen *PPP4R2* Expression sind diese Gene also ebenfalls hoch exprimiert und umgekehrt, das Gen mit dem größten Fold-Change ist hierbei *RAB8B* mit 5,53. Zehn der signifikantesten Gene zeigen dagegen eine inverse Korrelation, das Gen mit dem größten Fold-Change ist hierbei *SIRT5* mit 0,22.

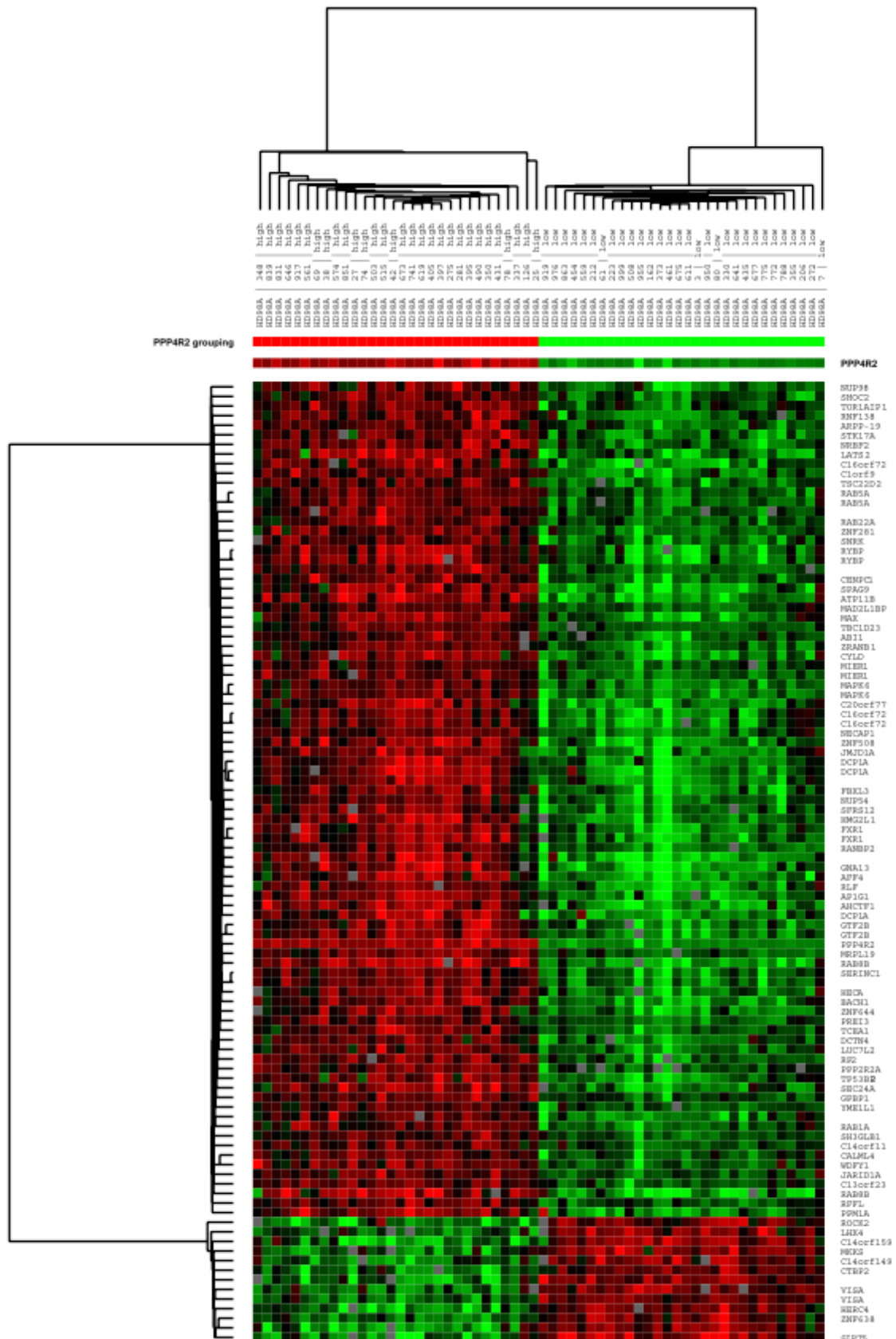


Abbildung 6 | Heatmap - X-Achse: Die 30 AML Fälle mit der höchsten und 30 Fälle mit der niedrigsten *PPP4R2*-Expression. Y-Achse: die 80 signifikantesten Gene. Rot: hohe Expression, Grün: niedrige Expression, Grau: Daten aufgrund schlechter Signalqualität ausgeschlossen.

4. Diskussion

4.1 PPP4R2-Expressionsanalyse mittels RQ-PCR

Zu Beginn der Arbeit wurden RQ-PCR-Daten von 48 Patienten mit unterschiedlichen AML-Subtypen ausgewertet. [CN-AML (n = 24), del 3p (n = 6), inv(16) (n = 5), t(8; 21) (n = 4), 11q23 (n = 4), Komplexer Karyotyp (n = 3), sowie in die in den anderen Klassen nicht erfasste Karyotypen 47, XX, +13[17]/46, XX[7] und (45, XX, -7) (n = 2)]. Die Ergebnisse wurden in Abbildung 5 grafisch zusammengefasst.

Bei den Transkriptleveln von *PPP4R2* zeigte sich die Tendenz zu einer unterschiedlichen *PPP4R2-Expression* zwischen AML-Patienten und gesunden Probanden, sowie innerhalb der untersuchten AML Subtypen. Gesunde Probanden weisen mit 0,72 *PPP4R2/B2M* im Mittelwert gegenüber dem Kollektiv der AML-Patienten eine signifikant höhere *PPP4R2* Expression auf (p=0.043), auch wenn die Ergebnisse eine große Streubreite zeigen. Bei näherer Betrachtung der Subtypen, zeigten sich signifikante Unterschiede bei Patienten mit CN-AML (Mittelwert = 0,27, p = 0,050) und bei Patienten mit Deletion in der MAR (Mittelwert = 0,13, p = 0,023). Die weiteren Subtypen zeigten keine signifikanten Unterschiede zu den gesunden Probanden. Die entsprechenden Mittelwerte finden sich im Ergebnisteil.

Diese zum Teil signifikanten Ergebnisse deuten darauf hin, dass die erniedrigte Expression von *PPP4R2* in bestimmten AML Subtypen von pathogenetischer Relevanz sein könnte. Bisher liegen jedoch keine weiteren Daten zu Analysen mittels RQ-PCR von *PPP4R2* bei der AML oder anderen Tumorentitäten vor. Lediglich in Bezug auf das fetale Alkoholsyndrom untersuchten Downing et al. mittels RQ-PCR die Transkriptlevel von *PPP4R2* in Mäusen, jedoch ohne eine konsistente Aussage über einen pathogenetischen Einfluss treffen zu können

(Downing et al. 2012).

4.2 Mutationsscreening von *PPP4R2*

Die Region um 3p14.1-13 wurde in mehreren Studien mit der Lokalisation von Tumorsuppressorgen in Verbindung gebracht. Insbesondere bei Prostatakarzinomen wurde eine Deletionsregion mit großer Überlappung zu der hier untersuchten MAR beschrieben. In diesen Arbeiten wurden bisher vor allem *RYBP*, *FOXP1* und *SHQ1* eingehend auf Mutationen und ihre Funktion als Tumorsuppressoren untersucht. Für das *PPP4R2* Gen liegen entsprechende Untersuchungen bisher nicht vor (Taylor et al. 2010; Krohn et al. 2013).

Ziel dieser Arbeit war es, umfassende Analysen zur Expression und zum Mutationsstatus von *PPP4R2* bei AML-Patienten durchzuführen. Dabei lag der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Durchführung der Sequenzanalyse des *PPP4R2* Gens an insgesamt 95 AML Patienten. Die Auswahl der zu sequenzierenden Proben erfolgte dabei anhand einer mir zur Verfügung gestellten Microarray-basierten Genexpressionsanalyse an 320 AML-Patienten.

Die untersuchten Proben zeigten eine große Streubreite der *PPP4R2* Expressionslevel zwischen 1,547 und -2,592, innerhalb derer sich drei Gruppen für die Sequenzierung abgrenzen ließen (hohe, mittlere und niedrige Expression).

Mittels Sequenzierung konnte bei 11 Patienten ein bereits vorbeschriebener, synonymer SNP (Reference SNP 61188513) gefunden werden. Innerhalb der kodierenden Genregion Exon 1-9 fanden sich in keiner der drei unterschiedlichen Expressionsgruppen weitere SNPs oder funktionell relevante Mutationen. Diese Ergebnisse decken sich auch mit den Ergebnissen des Cancer Genome Atlas Research Networks. Untersucht wurden hier 200

AML-Patienten unter anderem auf das Vorliegen von Mutationen. Zum Einsatz kamen dabei whole-genome sequencing (n = 50) und whole-exome sequencing (n = 150). Bei keinem der Patienten konnte in diesen Untersuchungen eine Mutation im Bereich von *PPP4R2* festgestellt werden (Cancer Genome Atlas Research Network 2013).

In Bezug auf andere Tumorentitäten mit Mutationen in *PPP4R2* konnten in der COSMIC Datenbank (Catalogue for somatic mutations in cancer) vereinzelte Punktmutationen und CNA (copy number alterations) gefunden werden. Die höchste Rate von Punktmutationen mit bis zu 1 % zeigten hierbei Malignome von Magen, Haut und Endometrium, CNAs zeigten sich prozentual am häufigsten bei Malignomen von Haut, Harntrakt und Magen. (nach COSMIC vom 26.03.2016: <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>). In keiner Veröffentlichung wurde hierbei bisher der Zusammenhang zwischen den gelisteten Mutationen und der Rolle von *PPP4R2* bei malignen Erkrankungen untersucht.

4.3 Globale Expressionsanalyse

4.3.1 *PPP4R2* Expression-assoziiertes Genexpressionsmuster

Die globale Expressionsanalyse wurde an 436 Patienten durchgeführt, mit Hilfe einer supervidierten Analyse konnte hier ein *PPP4R2* assoziiertes Genexpressionsmuster identifiziert werden. Bereits 1999 konnten Golub et al durch diese Analyseform beispielhaft zeigen, dass es möglich ist, zwischen AML und ALL rein anhand des Expressionsprofils zu unterscheiden (Golub et al. 1999). In der vorliegenden Arbeit zeigt sich in der Heatmap für die achtzig signifikantesten Gene ein klares Expressionsmuster für hohe (Klasse 1) und niedrige (Klasse 2) *PPP4R2*-Expression. Unter diesen Genen war der Großteil gleichsinnig mit *PPP4R2* exprimiert (n = 70). Die fünf Gene mit dem größten

Fold-Change waren hierbei *RAB8B*, *GNA13*, *SPAG9*, *ZNF508* und *SIRT5* (Abbildung 6 und Tabelle 15).

Untersuchungen in anderen malignen Erkrankungen konnten zeigen, dass Genexpressionsmuster neben der Identifizierung einzelner Erkrankungsspezifischer Subtypen einen wichtigen Beitrag zur Einschätzung von Prognose und OS liefern können (Bullinger u. Valk 2005). In Bezug auf andere Leukämien oder solide Tumoren wurde das Expressionsprofil von *PPP4R2* bisher nicht bestimmt. Lediglich im Bereich der spinalen Muskelatrophie liegen *PPP4R2* Expressionsprofile vor. Diese deuten auf eine Interaktion zwischen *PPP4R2* und der Differenzierung von Nervenzellen hin (Bosio et al. 2012).

4.3.2 Potentielle funktionelle Relevanz des *PPP4R2*-assoziierten Genexpressionsmusters

In der weiteren Analyse des Expressionsmusters wurde zu den achtzig signifikantesten Genen (Tabelle 15 und Abbildung 6) eine Literaturrecherche bezüglich Funktion und möglichen Zusammenhängen mit *PPP4R2*, sowie der Entstehung von Leukämien durchgeführt.

Hierbei zeigten sich mit *abl-interactor 1 (ABI1)* und *AF4/FMR2 family, member 4 (AFF4)* zwei Gene mit einer nachgewiesenen Rolle in der Entstehung von Leukämien, bei denen zum jetzigen Zeitpunkt jedoch kein direkter Zusammenhang mit *PPP4R2* hergestellt werden konnte.

Daneben zeigten sich in der Recherche mit *MAPK6* und *RYBP* zwei Gene mit möglichen Assoziationen zu *PPP4R2*. Von diesen vier Genen werden zunächst *MAPK6* und *RYBP* besprochen, weiter untenstehend dann *ABI1* und *AFF4*.

MAPK6 (mitogen-activated protein kinase 6) ist Mitglied der Ser/Thr Proteinkinasefamilie und wird durch extrazelluläre Signale reguliert (*ERKs*). *ERKs* phosphorylieren mehrere Transkriptionsfaktoren sowie Koregulatoren und sind an der Regulation von Proliferation, Differenzierung und Expression

beteiligt (Kostenko et al. 2012; Cassinat et al. 2011). Es konnte gezeigt werden, dass erhöhte *MAPK6* Level zu einer Unterbrechung des Zellzyklus in G1 führen und so die Zellproliferation hemmen.

Zusätzlich reguliert *MAPK6* das Produkt von *MK5* (mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 5), welches an der Gefäßneubildung in Tumoren über *VEGF* (vascular endothelial growth factor) beteiligt ist. *MAPK6* zeigte sich in der globalen Expressionsanalyse gleichsinnig mit *PPP4R2* exprimiert, bei einem Fold-Change von 3,21. Ein funktioneller Zusammenhang mit *PPP4R2* ist möglich, was auch die Betrachtung der Signalwege erkennen lässt. Wie in der Einleitung bereits beschrieben, verlängert *PPP4R2* die Halbwertszeit von *HPK1* (auch *MAP4K1* genannt), *HPK1* wiederum führt nach Aktivierung mehrerer MAP-Kinasen seinerseits ebenfalls zu einer Aktivierung von *MK5*. (nach Biocarta vom 13.06.2015: www.biocarta.com/pathfiles/h_mapkPathway.asp).

MAPK6 ist bisher vorwiegend im Zusammenhang mit soliden Tumoren untersucht worden, entsprechend konnten somatische Mutationen von *MAPK6* in Lungen-, Eierstock- und Hautkrebs gefunden werden. Verstärkte Expression, bzw. erhöhte Proteinlevels konnten bisher mit Brust-, Lungen- und Magenkrebs sowie Melanomen in Verbindung gebracht werden (Kostenko et al. 2012). Arbeiten, die einen Zusammenhang mit der Entstehung der AML untersuchen, liegen bislang nicht vor.

RYBP zeigte sich in der globalen Expressionsanalyse ebenfalls gleichsinnig mit *PPP4R2* exprimiert, bei einem Fold-Change von 3,75. Es hat Funktionen in der Steuerung des Zellzyklus und konnte mit Prostata- sowie Zervixkarzinomen in Verbindung gebracht werden (Kostenko et al. 2012). Durch seine Lage auf dem kurzen Arm des Chromosoms 3, innerhalb der MAR 3p14.1-p13, befindet es sich in unmittelbarer Nachbarschaft zu *PPP4R2*. Dies könnte ein Hinweis auf

eine gemeinsame Regulation sein.

Außer *RYBP* und *MAPK6* konnten unter den achtzig signifikantesten Genen keine Gene gefunden werden, deren Funktionen oder Signalwege eine echte Interaktion mit *PPP4R2* vermuten lassen. Dennoch lassen sich Gene finden, die einen direkten Zusammenhang mit der Entwicklung hämatologischer Krebserkrankungen zeigen. Im Folgenden werden daher *ABI1* (abl-interactor 1) und *AFF4* (AF4/FMR2 family, member 4) besprochen.

ABI1 zeigte sich in der globalen Expressionsanalyse gleichsinnig mit *PPP4R2* exprimiert, bei einem Fold-Change von 2,61. *ABI1* spielt eine Rolle in soliden Tumoren, wie Brustkrebs oder Kolonkarzinomen. In seiner Funktion als Tumorsuppressor ist es ein interessanter Ansatzpunkt für die Einschätzung von Prognose und Verlauf maligner Erkrankungen. So konnte beispielsweise für Magenkarzinome gezeigt werden, dass eine niedrige *ABI1* Expression mit einer signifikant schlechteren Tumordifferenzierung und einem geringeren OS assoziiert ist (Cui et al. 2010). Neben den Ergebnissen für solide Tumore, wurden bei AML Patienten wiederholt Translokationen zwischen Chromosom 10 und Chromosom 11 beschrieben, bei denen sich eine Fusion zwischen *ABI1* und *MLL* und zeigt, was eine mögliche Rolle in der Entstehung von Leukämien nahe legt (Shibuya et al. 2001). Eine weitergehende Untersuchung dieser möglichen Assoziation liegt bisher nicht vor.

AFF4 zeigte sich in der globalen Expressionsanalyse gleichsinnig mit *PPP4R2* exprimiert, bei einem Fold-Change von 4,02. *AFF4* ist Mitglied der *AF4* Familie und über die Regulation von CD113 an der Entstehung von akuten lymphatischen Leukämien (ALL) beteiligt (Mak et al. 2012). Daneben wird vor allem in kindlicher ALL häufig eine Fusion zwischen *AF4* und *MLL* mit zentraler Rolle in der Pathogenese beobachtet (Bueno et al. 2013).

4.4 Bedeutung der MAR und PPP4R2

Neben der vorliegenden Arbeit zur minimally altered region in 3p13.1-14 bei der AML, zeigte sich auch bei soliden Tumorentitäten eine Deletion im Bereich des kurzen Arms des Chromosoms 3, der zum Großteil mit der hier untersuchten MAR überlappt. Bei Prostatakarzinomen zeigten sich Deletionen, die nach weiteren Expressionsanalysen ebenfalls Tumorsuppressoren in diesem Bereich vermuten ließen. Vor allem wurde zu diesem Zeitpunkt *SHQ1* als mögliches Kandidatengen eingestuft (Taylor et al. 2010), Lando et al. beschreiben daneben einen rekurrenten Verlust von 3p12-p14 mit einer Reihe möglicher Suppressoren im Zusammenhang mit Zervixkarzinomen. In den Untersuchungen zeigte sich bei 61% von 92 invasiven Zervixkarzinomen die genannte Deletion. Im Fokus der Arbeiten lagen neben sechs weiteren betroffenen Genen auch *RYBP* und *SHQ1*, die ebenso Teil der hier untersuchten MAR sind. Bei Funktionsanalysen konnten bei Patienten mit Deletion Hinweise auf eine Aktivierung Tumor förrender Signalwege nachgewiesen werden. In der Überlebensdauer zeigte sich für diese Patienten eine entsprechende prognostische Relevanz (Lando et al. 2009; Lando et al. 2013).

In einer weiteren Studie zum Prostatakarzinom war erneut die Region 3p13 Gegenstand der Untersuchungen. Unter 77 Prostatakarzinomen wurden 14 (19%) mit Deletionen in diesem Bereich gefunden. Im Rahmen dieser Deletionen zeigten Expressionsprofile für *FOXP1*, *EIF4E3*, *RYBP*, *SHQ1* und *GXYLT2* eine signifikante Verringerung der relativen Expression. Für *FOXP1*, *RYBP* und *SHQ1* konnte sogar nachgewiesen werden, dass eine Überexpression zu einer ausgeprägten Wachstumshemmung in verschiedenen Zelllinien des Prostatakarzinoms führt. Diese Effekte sind vergleichbar mit denen von Tumorsuppressorgenen und legen eine Rolle in der Tumorentstehung nahe. In einer ebenfalls durchgeführten Sequenzierung

bei 271 Patienten mit Prostatakarzinomen konnten je zwei Mutationen in *FOXP1* und *RYBP*, sowie eine Mutation in *SHQ1* gefunden werden. Die anderen Gene der Region 3p13 wurden hierbei nicht untersucht (Krohn et al. 2013). Insbesondere wurden in den beschriebenen Arbeiten keine Daten zu *PPP4R2* präsentiert.

In der Zusammenschau der hier generierten aber auch der bislang publizierten Daten muss angenommen werden, dass zumindest der Mechanismus der Mutation in *PPP4R2* keine Rolle in der Pathogenese der AML spielt. Hier scheint eher der Mechanismus der Deletion und dies vor allem in soliden Tumoren von Bedeutung zu sein. Somit scheint die Haploinsuffizienz von *PPP4R2* durchaus für bestimmte maligne Erkrankungen relevant zu sein. Ein weiterer möglicher Mechanismus, der zur Haploinsuffizienz von *PPP4R2* bei der AML führen könnte, ist die epigenetische Regulation des Gens beispielsweise durch Hypermethylierung. Bisher existieren jedoch keine entsprechenden Untersuchungen bei der AML.

Mit der Identifizierung der MAR, sowohl in soliden Tumoren, als auch bei der Leukämie, scheint eine pathogenetische Rolle in der Leukämogenese sehr wahrscheinlich. Entsprechend sollten die weiteren sieben, in der MAR lokalisierten, proteinkodierenden Gene (*FOXP1*, *GPR27*, *PROK2*, *EIF4E3*, *RYBP*, *SHQ1* und *GLT8D4*) ebenfalls auf Mutationen oder aberrante Genexpression untersucht werden.

4.5 Ausblick

In der Sequenzanalyse von *PPP4R2* konnte bis auf einen vorbeschriebenen synonymen SNP keine funktionell relevante Mutation gefunden werden, sodass einer pathogenetischen Relevanz von Mutationen in *PPP4R2* bei der AML wahrscheinlich kein Stellenwert zukommt. Neben *PPP4R2* liegen innerhalb der MAR 3p14.1-p13 noch sieben weitere Gene, sowie eine microRNA, die in mehreren Studien und anhand ihrer Funktion als mögliche Tumorsuppressoren gelten. Eine Bearbeitung dieser Gene mittels Sequenzierung und Expressionsanalysen kann weitere Aufschlüsse zu ihrer Rolle in der AML Entstehung geben. Insbesondere *RYBP*, welches signifikant gleichsinnig mit *PPP4R2* exprimiert wird und in unmittelbarer Nachbarschaft liegt, ist hierbei ein potentieller Kandidat. Ein weiteres interessantes Gen stellt *FOXP1* dar, welches bereits mit soliden Tumoren, sowie der Entstehung bestimmter ALL-Formen in Verbindung gebracht werden konnte.

Neben den in dieser Arbeit verwendeten Methoden, sollten weitere Untersuchungen an *PPP4R2* sowie den anderen Genen der MAR durchgeführt werden. Hierunter fallen zum einen die Untersuchung epigenetischer Einflüsse, aber auch funktionelle Analysen im Hinblick auf die Rolle von *PPP4R2* im DNA Reparaturweg, sowie phänotypische Untersuchungen beispielsweise am Knock-in oder Knock-out-Mausmodell.

Eine weitere Möglichkeit der Untersuchung von *PPP4R2* und der anderen Kandidatengene stellt die Korrelation zwischen Expression und klinischem Erscheinungsbild dar. Ebenso könnte eine Betrachtung des Expressionsmuster in Korrelation mit zyto- und molekulargenetischen Daten einen etwaigen Zusammenhang aufdecken.

5. Zusammenfassung

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine klonale Stammzellerkrankung, die durch die ungehemmte Proliferation von hämatopoetischen Vorläuferzellen gekennzeichnet ist. Es konnte dabei gezeigt werden, dass molekulargenetische Veränderungen insbesondere bei Patienten mit einem normalem Karyotyp (CN-AML), eine zentrale Rolle in der Pathogenese spielen. Hierbei konnten kleinste Chromosomenaberrationen erkannt werden, die zu einem umschriebenen Verlust der Heterozygotie führen. Eine rekurrente Deletionsregion konnte bei sechs Patienten mit CN-AML identifiziert werden. Sie befindet sich in der chromosomalen Bande 3p14.1-p13; diese kleinste minimal deletierte Region (minimally altered region, MAR), umfasst acht Gene, die in mehreren Studien als mögliche Tumorsuppressorgene diskutiert werden. Eines dieser acht Gene ist *PPP4R2* (Proteinphosphatase 4, regulatory subunit 2), welches Funktionen bei Apoptosevorgängen und der DNA-Reparatur aufweist. Ziel dieser Arbeit war es, *PPP4R2* als Kandidatengen in der AML zu untersuchen. Zu Beginn stand die Analyse der Expression von *PPP4R2*, welche mittels RQ-PCR (Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction) gemessen wurde. Die Transkriptlevel von *PPP4R2* bei 48 Patienten waren signifikant niedriger exprimiert als die gesunder Kontrollen. Bei näherer Betrachtung der AML Subtypen, zeigten sich auch die Ergebnisse für CN-AML Patienten und Patienten mit Deletion in der MAR als signifikant. Diese Daten gaben einen Hinweis auf eine mögliche Relevanz aberranter *PPP4R2*-Expression bei der AML. Nach Etablierung eines DNA-basierten PCR-Assay wurden in der Folge 95 AML-Patienten mit unterschiedlicher *PPP4R2*-Expression nach funktionell relevanten Mutationen sequenziert. Hierbei konnte bis auf einen vorbeschriebenen synonymen SNP (single nucleotid polymorphism, Polymorphismus in einem Nucleotid) keine Mutation

nachgewiesen werden, was sich mit der Tatsache deckt, dass für *PPP4R2* bei der AML bisher keine Mutationen beschrieben wurden. Im Weiteren wurde ein globales Expressionsprofil für Proben mit hoher und niedriger *PPP4R2*-Expression ausgewertet. In einer supervidierten Analyse an 436 Patienten fiel insbesondere *RYBP* auf, welches sich hochsignifikant ($p < 0,005$) gleichsinnig zur *PPP4R2*-Expression verhielt, in unmittelbarer Nachbarschaft zu diesem liegt und ebenfalls wie *PPP4R2* bei AML Patienten mit MAR deletiert vorliegt. Hier stellt sich die Frage nach einer möglichen gemeinsamen Regulation dieser beiden Gene. In der Region 3p14.1-p13 befinden sich neben *PPP4R2* noch weitere Kandidatengene, welche eine Rolle in der Leukämogenese oder Onkogenese spielen könnten. Diese sieben verbleibenden proteinkodierenden Gene der MAR sollten mit der gleichen Fragestellung wie *PPP4R2* untersucht werden. Insbesondere *FOXP1*, *RYBP* und *SHQ1* wurden dabei bereits wiederholt mit der Entstehung von soliden Tumoren, wie dem Prostata- und Cervixkarzinom in Verbindung gebracht und stellen sicherlich die interessantesten Kandidaten dar. Abschließend kann die vorliegende Arbeit als wichtiger Teil der Analyse der Kandidatengene in der Region 3p14.1-p13 (MAR) betrachtet werden. Während sich bei den Expressionsleveln von *PPP4R2* signifikante Unterschiede zwischen gesunden Probanden und AML-Patienten zeigten, konnte kein Hinweis auf für die AML pathogenetisch relevante Mutationen in *PPP4R2* gefunden werden. Vor allem die gezielte Sequenzierung von Patienten mit unterschiedlichem Expressionsniveau, lässt die Möglichkeit von nicht erfassten Mutationen als gering erscheinen. Weiterführende Untersuchungen, wie Knock-in bzw. Knock-out-Mausmodelle oder Untersuchungen eines epigenetischen Einflusses, könnten für *PPP4R2* weitere Erkenntnisse über eine etwaige pathogenetische Relevanz in der AML erbringen.

6. Literaturverzeichnis

1. Bhat Singh R, Amare Kadam P S: Investigation of tumor suppressor genes apart from VHL on 3p by deletion mapping in sporadic clear cell renal cell carcinoma (cRCC). *Urol.Oncol.*, 31: 1333-1342 (2011)
2. Bosio Y, Berto G, Camera P, Bianchi F, Ambrogio C, Claus P, Di Cunto F: PPP4R2 regulates neuronal cell differentiation and survival, functionally cooperating with SMN. *Eur.J.Cell Biol.*, 91: 662-674 (2012)
3. Bueno C, Ayllon V, Montes R, Navarro-Montero O, Ramos-Mejia V, Real P J, Romero-Moya D, Arauzo-Bravo M J, Menendez P: FLT3 activation cooperates with MLL-AF4 fusion protein to abrogate the hematopoietic specification of human ESCs. *Blood*, 121: 3867-3878 (2013)
4. Bullinger L, Kronke J, Schon C, Radtke I, Urlbauer K, Botzenhardt U, Gaidzik V, Cario A, Senger C, Schlenk R F, Downing J R, Holzmann K, Döhner K, Döhner H: Identification of acquired copy number alterations and uniparental disomies in cytogenetically normal acute myeloid leukemia using high-resolution single-nucleotide polymorphism analysis. *Leukemia*, 24: 438-449 (2010)
5. Bullinger L, Valk P J: Gene expression profiling in acute myeloid leukemia. *J.Clin.Oncol.*, 23: 6296-6305 (2005)
6. Byrd J C, Mrozek K, Dodge R K, Carroll A J, Edwards C G, Arthur D C, Pettenati M J, Patil S R, Rao K W, Watson M S, Koduru P R, Moore J O, Stone R M, Mayer R J, Feldman E J, Davey F R, Schiffer C A, Larson R A, Bloomfield C D, Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461): Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and

overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood*, 100: 4325-4336 (2002)

7. Cancer Genome Atlas Research Network: Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N.Engl.J.Med.*, 368: 2059-2074 (2013)

8. Cassinat B, Zassadowski F, Ferry C, Llopis L, Bruck N, Lainey E, Duong V, Cras A, Despouy G, Chourbagi O, Beinse G, Fenaux P, Rochette Egly C, Chomienne C: New role for granulocyte colony-stimulating factor-induced extracellular signal-regulated kinase 1/2 in histone modification and retinoic acid receptor alpha recruitment to gene promoters: relevance to acute promyelocytic leukemia cell differentiation. *Mol.Cell.Biol.*, 31: 1409-1418 (2011)

9. Chen D, Zhang J, Li M, Rayburn E R, Wang H, Zhang R: RYBP stabilizes p53 by modulating MDM2. *EMBO Rep.*, 10: 166-172 (2009)

10. Cohen P T, Philp A, Vazquez-Martin C: Protein phosphatase 4--from obscurity to vital functions. *FEBS Lett.*, 579: 3278-3286 (2005)

11. Cui M, Yu W, Dong J, Chen J, Zhang X, Liu Y: Downregulation of ABI1 expression affects the progression and prognosis of human gastric carcinoma. *Med.Oncol.*, 27: 632-639 (2010)

12. Dode C, Rondard P: PROK2/PROKR2 Signaling and Kallmann Syndrome. *Front.Endocrinol.(Lausanne)*, 4: 1-8 (2013)

13. Döhner et Döhner: Molecular characterization of acute myeloid leukemia. *Haematologica*, 93: 976-982 (2008)

14. Döhner H, Estey E H, Amadori S, Appelbaum F R, Buchner T, Burnett A K, Dombret H, Fenaux P, Grimwade D, Larson R A, Lo-Coco F, Naoe T, Niederwieser D, Ossenkoppele G J, Sanz M A, Sierra J, Tallman M S, Lowenberg B, Bloomfield C D, European LeukemiaNet: Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*, 115: 453-474 (2010)

15. Döhner H, Gaidzik V I: Impact of Genetic Features on Treatment Decisions in AML. *Hematology Am.Soc.Hematol.Educ.Program.*, 2011: 36-42 (2011)

16. Downing C, Flink S, Florez-McClure M L, Johnson T E, Tabakoff B, Kechris K J: Gene expression changes in C57BL/6J and DBA/2J mice following prenatal alcohol exposure. *Alcohol.Clin.Exp.Res.*, 36: 1519-1529 (2012)

17. Gaidzik V I, Paschka P, Spath D, Habdank M, Kohne C H, Germing U, von Lilienfeld-Toal M, Held G, Horst H A, Haase D, Bentz M, Gotze K, Döhner H, Schlenk R F, Bullinger L, Döhner K: TET2 Mutations in Acute Myeloid Leukemia (AML): Results From a Comprehensive Genetic and Clinical Analysis of the AML Study Group. *J.Clin.Oncol.*, 30: 1350-1357 (2012)

18. Gaidzik V I, Schlenk R F, Moschny S, Becker A, Bullinger L, Corbacioglu A, Krauter J, Schlegelberger B, Ganser A, Döhner H, Döhner K, German-Austrian AML Study Group: Prognostic impact of WT1 mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a study of the German-Austrian AML Study Group. *Blood*, 113: 4505-4511 (2009)

19. Gaidzik V I, Schlenk R F, Paschka P, Stolzle A, Spath D, Kuendgen A, von Lilienfeld-Toal M, Brugger W, Derigs H G, Kremers S, Greil R, Raghavachar A, Ringhoffer M, Salih H R, Wattad M, Kirchen H G, Runde V, Heil G, Petzer A L,

Girschikofsky M, Heuser M, Kayser S, Goehring G, Teleanu M V, Schlegelberger B, Ganser A, Krauter J, Bullinger L, Döhner H, Döhner K: Clinical impact of DNMT3A mutations in younger adult patients with acute myeloid leukemia: results of the AML Study Group (AMLSG). *Blood*, 121: 4769-4777 (2013)

20. Golub T R, Slonim D K, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov J P, Coller H, Loh M L, Downing J R, Caligiuri M A, Bloomfield C D, Lander E S: Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science*, 286: 531-537 (1999)

21. Green A S, Grabar S, Tulliez M, Park S, Al-Nawakil C, Chapuis N, Jacque N, Willems L, Azar N, Ifrah N, Dreyfus F, Lacombe C, Mayeux P, Bouscary D, Tamburini J: The eukaryotic initiating factor 4E protein is overexpressed, but its level has no prognostic impact in acute myeloid leukaemia. *Br.J.Haematol.*, 156: 547-550 (2012)

22. Harrison T R, Fauci A S: *Harrisons Innere Medizin*. 17 Aufl, dt Ausg in Zusammenarb mit der Charité / hrsg von M Dietel; 17 Aufl, dt Ausg in Zusammenarb mit der Charité / hrsg von M Dietel, ABW-Wiss.-Verl. [u.a.]; ABW-Wiss.-Verl. [u.a.], S. 845-857 (2009; 2009)

23. Herold G: *Innere Medizin; eine vorlesungsorientierte Darstellung; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung; mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis*. Köln, S. 85-91 (2010; 2010)

24. Kostenko S, Dumitriu G, Moens U: Tumour promoting and suppressing roles of the atypical MAP kinase signalling pathway ERK3/4-MK5. *J.Mol.Signal.*, 7: 1-11 (2012)

25. Krohn A, Seidel A, Burkhardt L, Bachmann F, Mader M, Grupp K, Eichenauer T, Becker A, Adam M, Graefen M, Huland H, Kurtz S, Steurer S,

Tsourlakis M C, Minner S, Michl U, Schlomm T, Sauter G, Simon R, Sirma H: Recurrent deletion of 3p13 targets multiple tumour suppressor genes and defines a distinct subgroup of aggressive ERG fusion-positive prostate cancers. *J.Pathol.*, 231: 130-141 (2013)

26. Lando M, Holden M, Bergersen L C, Svendsrud D H, Stokke T, Sundfor K, Glad I K, Kristensen G B, Lyng H: Gene dosage, expression, and ontology analysis identifies driver genes in the carcinogenesis and chemoradioresistance of cervical cancer. *PLoS Genet.*, 5: 1-12 (2009)

27. Lando M, Wilting S M, Snipstad K, Clancy T, Bierkens M, Aarnes E K, Holden M, Stokke T, Sundfor K, Holm R, Kristensen G B, Steenbergen R D, Lyng H: Identification of eight candidate target genes of the recurrent 3p12-p14 loss in cervical cancer by integrative genomic profiling. *J.Pathol.*, 230: 59-69 (2013)

28. Lee D H, Pan Y, Kanner S, Sung P, Borowiec J A, Chowdhury D: A PP4 phosphatase complex dephosphorylates RPA2 to facilitate DNA repair via homologous recombination. *Nat.Struct.Mol.Biol.*, 17: 365-372 (2010)

29. Lee J, Adelmant G, Marto J A, Lee D H: Dephosphorylation of DBC1 by Protein Phosphatase 4 Is Important for p53-Mediated Cellular Functions. *Mol.Cells*, 38: 697-704 (2015)

30. Lin T L, Smith B D: Prognostically important molecular markers in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Am.J.Med.Sci.*, 341: 404-408 (2011)

31. Liu J, Xu L, Zhong J, Liao J, Li J, Xu X: Protein phosphatase PP4 is involved in NHEJ-mediated repair of DNA double-strand breaks. *Cell.Cycle*, 11: 2643-2649 (2012)

32. Mak A B, Nixon A M, Moffat J: The mixed lineage leukemia (MLL) fusion-associated gene AF4 promotes CD133 transcription. *Cancer Res.*, 72: 1929-1934 (2012)
33. Malcovati L, Papaemmanuil E, Bowen D T, Boultonwood J, Della Porta M G, Pascutto C, Travaglino E, Groves M J, Godfrey A L, Ambaglio I, Galli A, Da Via M C, Conte S, Tauro S, Keenan N, Hyslop A, Hinton J, Mudie L J, Wainscoat J S, Futreal P A, Stratton M R, Campbell P J, Hellstrom-Lindberg E, Cazzola M, on behalf of the Chronic Myeloid Disorders Working Group of the International Cancer Genome Consortium and of the Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro Gruppo Italiano Malattie Mieloproliferative: Clinical significance of SF3B1 mutations in myelodysplastic syndromes and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood*, 118: 6239-6246 (2011)
34. Marcucci G, Haferlach T, Döhner H: Molecular genetics of adult acute myeloid leukemia: prognostic and therapeutic implications. *J.Clin.Oncol.*, 29: 475-486 (2011)
35. Martin-Granados C, Philp A, Oxenham S K, Prescott A R, Cohen P T: Depletion of protein phosphatase 4 in human cells reveals essential roles in centrosome maturation, cell migration and the regulation of Rho GTPases. *Int.J.Biochem.Cell Biol.*, 40: 2315-2332 (2008)
36. Matsumoto M, Saito T, Takasaki J, Kamohara M, Sugimoto T, Kobayashi M, Tadokoro M, Matsumoto S, Ohishi T, Furuichi K: An evolutionarily conserved G-protein coupled receptor family, SREB, expressed in the central nervous system. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 272: 576-582 (2000)
37. Naoe T, Kiyoi H: Gene mutations of acute myeloid leukemia in the genome era. *Int.J.Hematol.*, 97: 165-174 (2013)

38. Ng K L, Li J D, Cheng M Y, Leslie F M, Lee A G, Zhou Q Y: Dependence of olfactory bulb neurogenesis on prokineticin 2 signaling. *Science*, 308: 1923-1927 (2005)
39. Paschka P, Marcucci G, Ruppert A S, Whitman S P, Mrozek K, Maharry K, Langer C, Baldus C D, Zhao W, Powell B L, Baer M R, Carroll A J, Caligiuri M A, Kolitz J E, Larson R A, Bloomfield C D: Wilms' tumor 1 gene mutations independently predict poor outcome in adults with cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a cancer and leukemia group B study. *J.Clin.Oncol.*, 26: 4595-4602 (2008)
40. Put N, Deeren D, Michaux L, Vandenberghe P: FOXP1 and PAX5 are rare but recurrent translocations partners in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer.Genet.*, 204: 462-464 (2011)
41. Qin Y R, Fu L, Sham P C, Kwong D L, Zhu C L, Chu K K, Li Y, Guan X Y: Single-nucleotide polymorphism-mass array reveals commonly deleted regions at 3p22 and 3p14.2 associate with poor clinical outcome in esophageal squamous cell carcinoma. *Int.J.Cancer*, 123: 826-830 (2008)
42. Rucker F G, Bullinger L, Schwaenen C, Lipka D B, Wessendorf S, Frohling S, Bentz M, Miller S, Scholl C, Schlenk R F, Radlwimmer B, Kestler H A, Pollack J R, Lichter P, Döhner K, Döhner H: Disclosure of candidate genes in acute myeloid leukemia with complex karyotypes using microarray-based molecular characterization. *J.Clin.Oncol.*, 24: 3887-3894 (2006)
43. Schlenk R F, Döhner K, Krauter J, Frohling S, Corbacioglu A, Bullinger L, Habdank M, Spath D, Morgan M, Benner A, Schlegelberger B, Heil G, Ganser A, Döhner H, German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study Group:

Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N.Engl.J.Med.*, 358: 1909-1918 (2008)

44. Schlenk R F, Döhner K, Mack S, Stoppel M, Kiraly F, Gotze K, Hartmann F, Horst H A, Koller E, Petzer A, Grimminger W, Kobbe G, Glasmacher A, Salwender H, Kirchen H, Haase D, Kremers S, Matzdorff A, Benner A, Döhner H: Prospective evaluation of allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation from matched related and matched unrelated donors in younger adults with high-risk acute myeloid leukemia: German-Austrian trial AMLHD98A. *J.Clin.Oncol.*, 28: 4642-4648 (2010)

45. Sethi M K, Buettner F F, Ashikov A, Krylov V B, Takeuchi H, Nifantiev N E, Haltiwanger R S, Gerardy-Schahn R, Bakker H: Molecular cloning of a xylosyltransferase that transfers the second xylose to O-glucosylated epidermal growth factor repeats of notch. *J.Biol.Chem.*, 287: 2739-2748 (2012)

46. Shibuya N, Taki T, Mugishima H, Chin M, Tsuchida M, Sako M, Kawa K, Ishii E, Miura I, Yanagisawa M, Hayashi Y: t(10;11)-acute leukemias with MLL-AF10 and MLL-ABI1 chimeric transcripts: specific expression patterns of ABI1 gene in leukemia and solid tumor cell lines. *Genes Chromosomes Cancer*, 32: 1-10 (2001)

47. Taskesen E, Bullinger L, Corbacioglu A, Sanders M A, Erpelinck C A, Wouters B J, van der Poel-van de Luytgaarde, S.C., Damm F, Krauter J, Ganzer A, Schlenk R F, Lowenberg B, Delwel R, Döhner H, Valk P J, Döhner K: Prognostic impact, concurrent genetic mutations, and gene expression features of AML with CEBPA mutations in a cohort of 1182 cytogenetically normal AML patients: further evidence for CEBPA double mutant AML as a distinctive disease entity. *Blood*, 117: 2469-2475 (2011)

48. Taylor B S, Schultz N, Hieronymus H, Gopalan A, Xiao Y, Carver B S, Arora V K, Kaushik P, Cerami E, Reva B, Antipin Y, Mitsiades N, Landers T, Dolgalev I, Major J E, Wilson M, Socci N D, Lash A E, Heguy A, Eastham J A, Scher H I, Reuter V E, Scardino P T, Sander C, Sawyers C L, Gerald W L: Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer.Cell.*, 18: 11-22 (2010)
49. Tepeli E, Muslumanoglu M H, Uludag A, Buyukpinarbasili N, Ozdemir M, Oznur M, Aslan H, Artan S: Detection of deletions and/or amplifications of genes related with lung cancer by multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) technique. *Cancer.Biol.Ther.*, 8: 2160-2165 (2009)
50. Virappane P, Gale R, Hills R, Kakkas I, Summers K, Stevens J, Allen C, Green C, Quentmeier H, Drexler H, Burnett A, Linch D, Bonnet D, Lister T A, Fitzgibbon J: Mutation of the Wilms' tumor 1 gene is a poor prognostic factor associated with chemotherapy resistance in normal karyotype acute myeloid leukemia: the United Kingdom Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party. *J.Clin.Oncol.*, 26: 5429-5435 (2008)
51. Walbott H, Machado-Pinilla R, Liger D, Bland M, Rety S, Grozdanov P N, Godin K, van Tilbeurgh H, Varani G, Meier U T, Leulliot N: The H/ACA RNP assembly factor SHQ1 functions as an RNA mimic. *Genes Dev.*, 25: 2398-2408 (2011)
52. www.biocarta.com/pathfiles/h_mapkPathway.asp vom 13.06.2015
53. www.ensembl.org, ID ENST00000356692 vom 13.06.2015
54. www.ncbi.nlm.nih.gov/geo, Referenznummer GSE16432 vom 13.06.2015
55. Zhou G, Boomer J S, Tan T H: Protein phosphatase 4 is a positive regulator of hematopoietic progenitor kinase 1. *J.Biol.Chem.*, 279: 49551-49561 (2004)

7. Danksagung

Für den erfolgreichen Abschluss meiner Dissertation möchte ich mich zuallererst bei Frau Professor Dr. Konstanze Döhner für die Vergabe dieses interessanten Themas und die Einbindung in ihre hervorragende Arbeitsgruppe mit meiner Betreuerin Dr. med. Verena Gaidzik bedanken. Verena möchte ich im Besonderen für ihr ausgesprochenes Engagement, ihre durchweg konstruktive Kritik, uneingeschränkte Hilfe und Geduld bedanken. Ebenso dürfen alle MTAs und im besonderen Martina und Carmen nicht unerwähnt bleiben, die mir mit viel Geduld die Grundtechniken und -regeln der täglichen Laborarbeit erklärt haben und dabei stets positiv auf meine Motivation wirkten. Darüber hinaus danke ich Professor Dr. Lars Bullinger für die unkomplizierte Bereitstellung der verwendeten Expressionsdaten und seine Anregungen zum Abschluss dieser Arbeit.

Neben diesen fachlichen Unterstützungen spreche ich meinen Eltern Nikolaus und Luise den größten Dank aus für die Ermöglichung dieses einmaligen Studiums und ihre bedingungslose Unterstützung, nicht nur im Rahmen meiner Ausbildung. Simone gilt der gleiche Dank, mit ihrer unglaublich positiven Art hat sie mich durch so manche Motivationslücke begleitet und mich stets an die Welt außerhalb von Labor, Universität und Medizinstudium erinnert.

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Philipp Anthony Zimmermann

Geburtsjahr: 1986

Geburtsort: Neustadt an der Weinstraße

Ausbildung und Berufserfahrung

- | | |
|---------------|--|
| 08 14 - heute | Assistenzarzt am St. Marienkrankenhaus Ludwigshafen
in der Inneren Medizin |
| 12 13 - 05 14 | Freier Mitarbeiter bei der miamed GmbH, Berlin
Mitglied des Redaktionsteams im Rahmen des „Amboss“
Lernsystems |
| 11 07 - 11 13 | Studium der Humanmedizin an der Universität Ulm |
| 10 05 - 10 07 | Ausbildung zum Gesundheits - und Krankenpfleger am
Krankenhaus Hetzelstift, Neustadt a.d.W. bis zur
Zwischenprüfung |
| 08 97 - 03 05 | Abitur am Leibniz Gymnasium Neustadt a.d.W. |