

# **Rolle der gemeinsamen Expression von AML1-ETO und weiteren Onkogenen für die Induktion von Leukämie**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Viktoria Eichwald**

geb. am 27.09.1978 in Moskau, Russland

Mainz, 2014

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 10.09.2014

Angefertigt in der Abteilung Molekulare Immunologie im Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg.

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift sind bereits veröffentlicht:

Cabezas-Wallscheid, **Eichwald V**, de Graaf J, Löwer M, Lehr HA, Kreft A, Eshkind L, Hildebrandt A, Abassi Y, Heck R, Dehof AK, Ohngemach S, Sprengel R, Wörtge S, Schmitt S, Lotz J, Meyer C, Kindler T, Zhang DE, Kaina B, Castle JC, Trumpp A, Sahin U, Bockamp E.

Instruction of hAML1-ETomatopoietic lineage choices, evolution of transcriptional landscapes and cancer stem cell hierarchies derived from an AML1-ETO mouse model. *EMBO Mol Med*, 2013. 5(12): p. 1804-20.

## Zusammenfassung

Akute Leukämien treten in allen Altersstufen auf. Akute lymphatische Leukämie (ALL) ist die häufigste Leukämie bei Kindern, während akute myeloischen Leukämien (AML) mit verschiedenen Untergruppen etwa 80% aller akuten Leukämien bei Erwachsenen ausmachen. Die Translokation t(8;21) resultiert in der Entstehung des Fusionsgens AML1-ETO und zählt zu den häufigen Translokationen bei der AML. Dabei fusioniert die DNA-bindende Domäne des AML1 mit dem fast kompletten ETO-Protein. AML1-ETO wirkt als dominanter Repressor der AML1-vermittelten transkriptionellen Regulation wichtiger hämatopoetischer Zielgene. Klinische Daten legen nahe, dass trotz der klarer Assoziation zwischen AML und der t(8;21) Translokation bei AML Patienten zusätzliche genetische Veränderungen – so genannte ‚second hits‘ – notwendig sind, um eine Leukämie effizient zu induzieren. Klinisch relevanten Komplementationonkogene sind unter anderen die aktivierte Rezeptortyrosinkinase FLT3, JAK2, NRAS, KRAS, c-KIT.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein Mausmodell zu etablieren, welches humane akute myeloische Leukämie rekapituliert und bei dem die Expression der entsprechenden Onkogene reguliert werden kann. Als erstes wurde untersucht, ob eine gemeinsame Expression von AML1-ETO mit kRAS<sup>G12D</sup> zur Induktion von Leukämie führen kann. Hierfür wurden Tiere generiert die gemeinsam AML1-ETO und kRAS<sup>G12D</sup> unter der regulatorischen Sequenz des Tetrazyklin-Operators exprimierten. Der große Vorteil dieser Technologie ist die regulierbare Reversibilität der Genexpression. Um die Expression der Zielgene auf blutbildende Zellen zu beschränken, wurden Knochenmarkchimären hergestellt. Im Beobachtungszeitraum von 12 Monaten führte die Expression von AML1-ETO und AML1-ETO/kRAS<sup>G12D</sup> nicht zur Induktion einer akuten Leukämie. Die normale hämatopoetische Entwicklung war jedoch in diesen Tieren gestört. Der beobachtete Phänotyp entsprach einem myelodysplastischen Syndrome (MDS).

Im zweiten Ansatz, wurden Tiere generiert die gemeinsam AML1-ETO und FLT3-ITD exprimierten. Hierfür wurden hämatopoetische Stammzellen aus ROSA26-iM2/tetO-AML1-ETO isoliert und mit Hilfe des retroviralen Vektors mit FLT3-ITD transduziert. In diesem Modell war es möglich, in kurzer Zeit eine akute Leukämie mit zu induzieren. Einige wenige Tiere hatten zum Zeitpunkt des Todes Anzeichen einer biphänotypischen Leukämie mit lymphatischen und myeloischen Blastenpopulationen. In drei Tieren induzierte die alleinige Expression von FLT3-ITD eine Leukämie. Alle Leukämien wurden durch FACS, Zytologie und Histopathologie bestätigt. Knochenmark- bzw. Milzzellen aus den erkrankten Tieren waren in der Lage nach Transfer in sekundäre Rezipienten eine Leukämie auszulösen. Somit besaßen sie ein uneingeschränktes Selbsterneuerungspotential.

Ein erster Versuch, in dem AML1-ETO Expression in leukämischen Zellen abgeschaltet und FLT3-ITD mit Tyrosinkinase-Inhibitor inhibiert wurde, zeigte keine wesentliche Veränderung in der Leukämieprogression.

Dieses Leukämiemodell erlaubt die Rolle der beteiligten Onkogene während verschiedener Stadien der Leukämie zu erforschen und damit möglicherweise neue Ansätze für Therapiestrategien zu entwickeln.

## Abstract

Acute leukemia occurs at all ages. Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common leukemia of children, while acute myeloid leukemia (AML) is more often affecting adults. The translocation t(8;21) results in the formation of the fusion gene AML1-ETO and is among the most common rearrangements found in AML. As a result of the translocation the DNA-binding domain of AML1 is fused to the almost entire ETO protein, a co-repressor for a variety of transcription factors. AML1-ETO function in leukemogenesis is based on its dominant-negative effects on AML1 target genes. Clinical data of AML patients suggest that additional genetic changes - so-called 'second hits' - besides the t(8;21) translocation are necessary to cause leukemia. Such mutations have been described for various genes, such as JAK2, NRAS, KRAS, c-KIT and FLT3-ITD.

The aim of the present study was to establish a mouse model which recapitulates human acute myeloid leukemia and which allows regulation of the expression of the corresponding oncogenes.

First, it was investigated whether or not a cooperation of the AML1-ETO and kRAS<sup>G12D</sup> may lead to induction of leukemia. Therefore, transgenic mice were established which simultaneously expressed AML1-ETO and kRAS<sup>G12D</sup> under tetracycline inducible promoter elements. The great advantage of this technology is the reversibility of the regulated gene expression. In order to restrict the expression of the target genes on hematopoietic cells, bone marrow chimeras were produced. Simultaneous expression of these 2 oncogenes did not lead to leukemia within 12 months. The normal hematopoietic development, however, was disturbed in these animals. The observed phenotype corresponded to myelodysplastic syndrome.

In the second approach, mice were generated in which the hematopoietic cells co-expressed AML1-ETO and FLT3-ITD. Bone marrow of the above mentioned inducible AML1-ETO transgenic mice was transduced with a retroviral vector containing FLT3-ITD. Acute leukemia in these mice developed within a short time. A few animals developed a bi-phenotypic leukemia with lymphoid and myeloid blast populations. Three mice expressing only of FLT3-ITD also developed leukemia. All cases of leukemia were confirmed by cytometry, cytology and histopathology. Bone marrow or spleen cells isolated from leukemic animals were able to transfer leukemia into secondary recipients. Thus these cells had an unlimited self-renewal potential.

A first attempt to simultaneously turn off expression of AML1-ETO and inhibit FLT3-ITD function by a tyrosine kinase inhibitor in leukemic cells, showed no significant change in leukemia progression.

Together, this model of leukemia allows investigating the role of oncogenes involved in different stages of leukemia and thus may facilitate new approaches for therapeutic strategies.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	
<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>ii</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>iv</b>
<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>1</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>6</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>14</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>15</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>19</b>
1.1 Hämatopoese.....	19
1.1.1 Hämatopoetische Stammzellen .....	19
1.1.2 Die Stammzellnische im Knochenmark .....	20
1.2 Leukämien .....	21
1.2.1 Häufigkeit der Leukämien .....	23
1.2.2 Akute myeloische Leukämie .....	24
1.2.3 Therapie von AML .....	29
1.2.4 Akute lymphatische Leukämie .....	30
1.2.5 Minimale Resterkrankung .....	33
1.2.6 Rezidive und Resistenzmechanismen.....	33
1.2.7 Leukämogenese und Krebsstammzellen .....	35
1.3 Die „Two-hit“-Hypothese.....	37
1.4 Das RAS Gen.....	39
1.5 Die Rezeptortyrosinkinase FLT3.....	42
1.5.1 Die Rolle von FLT3 in der Leukämogenese .....	43
1.5.2 FLT3-Tyrosinkinaseinhibitoren .....	44
1.6 Das chimäre Fusionsprotein AML1-ETO .....	46
1.6.1 Rolle von AML1-ETO bei der Leukämieentstehung .....	48
1.6.2 Das ETO-Gen .....	49
1.6.3 Die Zielgene von AML1 und AML1-ETO .....	49
1.7 Fragestellung.....	52
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>53</b>
2.1 Verwendete Materialien.....	53
2.1.1 Bezugsquellen.....	53
2.1.1.1 Chemikalien .....	53
2.1.1.2 Einmalartikel.....	53

2.1.2	Geräte .....	54
2.1.3	Medien, Puffer und Lösungen .....	55
2.1.3.1	Medien .....	55
2.1.3.2	Puffer .....	56
2.1.3.3	Gele .....	57
2.1.4	Antikörper.....	58
2.1.5	Oligonukleotide .....	59
2.1.6	Plasmide und Vektoren.....	60
2.1.7	Bakterien.....	60
2.1.8	Zelllinien.....	60
2.1.9	Mauslinien .....	61
2.2	Molekularbiologische Methoden .....	61
2.2.1	Isolierung von DNA aus der Mausschwanzbiopsien.....	61
2.2.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	61
2.2.3	Restriktion und Dephosphorylierung von DNA.....	63
2.2.4	Herstellung glatter DNA-Enden mit Hilfe der Klenow- Polymerase .....	64
2.2.5	Ligation.....	64
2.2.6	Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen .....	64
2.2.7	Kultivierung und Lagerung von Bakterien.....	65
2.2.8	Herstellung von kompetenten Bakterien .....	65
2.2.9	Transformation von Bakterien.....	66
2.2.10	Animpfen von Bakterienkulturen .....	66
2.2.11	Plasmid-Präparation („Mini- und Maxi-Präp“) .....	66
2.2.12	Bestimmung der DNA-Konzentration.....	66
2.2.13	Genotypisierung der Mäuse.....	67
2.2.14	Klonierung der FLT3-ITD in SF91-IRES-tdTomato .....	67
2.3	Proteinchemische Methoden.....	69
2.3.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	69
2.3.2	Western Blot.....	69
2.4	Zellbiologische Methoden .....	70
2.4.1	Zellen und Kultivierung .....	70
2.4.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	71
2.4.3	Organentnahme bei Mäusen .....	71
2.4.4	Einbettung von Organproben für die Histologie .....	71
2.4.5	Isolation von Knochenmark .....	71
2.4.6	Transplantation von Knochenmark .....	71
2.4.7	Gewinnung von mononukleären Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation .....	72
2.4.8	Aufreinigung Lineage negativer Zellen aus dem Knochenmark.....	72
2.4.9	Isolierung von Zellpopulationen mittels MACS .....	73
2.4.10	Isolation von Milz.....	73

2.4.11	Aufreinigung von Blut für die FACS-Färbung .....	73
2.4.12	Produktion von Virusüberständen mittels Calciumphosphat- methode .....	74
2.4.13	Konzentrierung von Retroviralen Vektoren mittels Ultrazentrifugation .....	75
2.4.14	Bestimmung des Virustiters .....	76
2.4.15	Herstellung Retronektin-beschichteter Zellkulturplatten .....	76
2.4.16	Retrovirale Transduktion von hämatopoetischen LSK-Zellen.....	77
2.4.17	Differentialblutbild .....	77
2.4.18	Ausstriche .....	77
2.4.19	Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....	77
2.5	Immunbiologische Methoden .....	78
2.5.1	Durchflusszytometrie .....	78
2.5.2	Färben der Zellen mit Antikörpern.....	79
2.5.3	Zellsortierung .....	79
2.5.4	Statistik .....	79
2.5.5	Software.....	79
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>80</b>
3.1	Konditionale Induktion von AML1-ETO in bi-transgenen ROSA26-iM2- GFP/TgPtet-AML1-ETO Mäusen führte zu einer schnellen Mortalität.....	80
3.2	Expression von AML1-ETO gemeinsam mit kRAS <sup>G12D</sup> in hämatopoetischen Zellen führt nicht zur Induktion von Leukämie.....	82
3.2.1	Die gemeinsame Expression von AML1-ETO und kRAS <sup>G12D</sup> führte im Beobachtungszeitraum von 12 Monaten nach Transplantation zu einer zum Teil verkürzter Lebensdauer.....	83
3.2.1.1	Überlebensrate der transplantierten Mäuse.....	83
3.2.1.2	Engraftment der transplantierten Zellen und Differentialblutbild .....	84
3.2.1.3	Keine Unterschiede in den Milz- und Lebergewichten der transplantierten Mäuse .....	87
3.2.1.4	Hämatopoese der AML1-ETO und AML1-ETO/kRAS Tiere ist verändert.....	89
3.2.1.5	Die Expression von AML1-ETO und AML1-ETO/kRAS führt zu einer verstärkte Granulopoese .....	90
3.2.1.6	In AML1-ETO und AML1-ETO/kRAS exprimierenden Tieren wurde eine Störung in B-Zell-Differenzierung festgestellt .....	93
3.2.1.7	Die Expression von AML1-ETO und kRAS beeinträchtigt die Erythropoese .....	94
3.2.1.8	Keine Expansion von hämatopoietische Stammzellen (LSK) im Knochenmark.....	95
3.2.1.9	T-Zell-Entwicklung im Thymus .....	96
3.2.1.10	Retransplantierbarkeit der beschriebenen Erkrankungen .....	98
3.2.1.11	Zusammenfassung .....	98

3.3	Induktion von AML1-ETO gemeinsam mit FLT3-ITD in hämatopoetischen Zellen führt zur Entwicklung von Leukämie .....	99
3.3.1	Herstellung von FLT3-ITD Rezeptor Konstrukts .....	100
3.3.1.1	Retroviraler Vektor für die FLT3-ITD Expression in murinen HSCs .....	100
3.3.1.2	Klonierung des SF91.FLT3-ITD.IRES.Tomato Konstrukts.....	100
3.3.1.3	Produktion hochtitriger retroviraler Virusüberstände.....	102
3.3.1.4	Funktionsprüfung der retroviralen Vektoren .....	102
3.3.2	Transduktion von LSK Stammzellen mit retroviralen Partikeln und adoptiver Transfer in letal bestrahlte Rezipienten.....	103
3.3.3	Die gemeinsame Expression von AML1-ETO und FLT3-ITD führte zu einer schnellen Mortalität.....	106
3.3.4	Charakterisierung erkrankter Tiere.....	106
3.3.4.1	Engraftment der transplantierten Zellen und Differentialblutbild .....	107
3.3.4.2	Erkrankte Tiere weisen Leukozytose, Anämie und Thrombozytopenie auf .....	108
3.3.4.3	Gemeinsame Expression von FLT3-ITD und AML1-ETO führt zur Induktion einer akuten Leukämie .....	109
3.3.4.4	Klinisches Bild zeigte eine massive Hepato- und Splenomegalie in den erkrankten Tieren .....	110
3.3.4.5	Immunophänotypische Analyse von Knochenmark, Milz und Thymus .....	115
3.3.4.6	Ein Teil der erkrankten Tiere zeigte eine erhöhte Granulopoese .....	116
3.3.4.7	Gestörte B-Zell-Differenzierung.....	117
3.3.4.8	Im Falle der B-ALL handelt es sich um frühere pro-B-Zellen ..	119
3.3.4.9	T-Zell-Entwicklung im Thymus .....	121
3.3.5	Biphänotypische Leukämie .....	121
3.3.6	FLT3-ITD Expression induziert in einigen wenigen Fällen bereits alleine eine Leukämie.....	123
3.3.7	Die induzierte Leukämie ist retransplantierbar und sehr aggressiv..	127
3.3.8	Abschalten von AML1-ETO bei bereits manifester Leukämie.....	128
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>131</b>
4.1	Tiermodelle zur Rekapitulation humaner Leukämie .....	131
4.2	Genetische Heterogenität der AML.....	133
4.3	Kooperation von AML1-ETO und kRAS Expression in der Induktion von Leukämie .....	133
4.4	FLT3-Mutationen in der AML und ALL.....	135
4.5	Blockierung der Onkogene beeinflusst nicht die Leukämieprogression .....	138
<b>5</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>139</b>
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>140</b>

---

<b>Danksagung .....</b>	<b>153</b>
<b>Lebenslauf.....</b>	<b>154</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Modell der Hämatopoese. MPP (multipotente Progenitoren), CMP (gesamte myeloide Progenitoren), CLP (gesamte lymphoide Progenitoren), MEP (megakaryozytäre/erythroide Progenitoren), GMP (granulozytäre/monozytäre Progenitoren). Übernommen und modifiziert nach [2] .....	20
Abbildung 2: Modell der hämatopoetischen Stammzellnische im Knochenmark (entnommen aus Wilson et al., Ann N Y Acad Sci., 2007) [8] CAR cell, CXCL12-reiche retikuläre Zellen; ECM, extrazellulärer Matrix; MPP, multipotente Progenitor-Zellen .....	21
Abbildung 3: Molekulargenetisch definierte Subgruppeneinteilung der CN-AML. WT bezeichnet den Wildtyp, ein + kennzeichnet das Vorhandensein der Mutation. ....	28
Abbildung 4: Molekulargenetisch definierte Subgruppeneinteilung bei der AML mit komplexem Karyotyp. ....	29
Abbildung 5: Verteilung genetischer Läsionen bei ALL. Basierend auf Daten der SEER Programm (Surveillance, Epidemiology, and End Results, 1973-2012). Entnommen und modifiziert aus [44]. ....	31
Abbildung 6: (A) Modell zur Entstehung von Leukämischen Stammzellen (LSC aus einem primitiven hämatopoetischen Vorläufer. (B) Neue Therapien, die spezifisch die LSC angreifen, versprechen mehr Effizienz zur Ausrottung von LSCs. Übernommen und modifiziert aus [55] .....	34
Abbildung 7: Darstellung der unterschiedlichen Modelle zur Erklärung der Tumorentstehung. (A) Das Modell der klonalen Evolution: dabei weisen alle Zellen gleiche tumorogene Kapazität auf. Mutierte Zellen werden durch Erwerb onkogener Eigenschaften, selektiert und expandiert. (B) Die Tumorstammzelltheorie: in diesem Modell besteht der Tumor aus wenigen Zellen mit Stammzeleigenschaften und der Fähigkeit zur Selbsterneuerung sowie aus sich stark vermehrenden Vorläuferzellen. Aus diesen Vorläuferzellen entwickeln sich die mehr oder weniger differenzierten Zellen der eigentlichen Tumormasse. (C) Das aktuelle Modell berücksichtigt Aspekte beider Theorien. Übernommen aus [70] .....	37
Abbildung 8: Das Venn-Diagramm zeigt einige der wichtigsten Mutationen bei AML, unterteilt nach Klasse-I-, Klasse-II-Mutationen und epigenetischen Faktoren (entnommen aus „The Epigenetic Landscape of Acute Myeloid Leukemia“, Advances in Hematology 2013). ....	39
Abbildung 9: RAS Signalwege. (A) Aktivierung und Deaktivierung von RAS-Proteinen. (B) Der „klassische“ RASs-Signalweg, RAS-RAF-MEK-ERK-Kaskade [92]. ....	40
Abbildung 10: Schematische Darstellung der FLT3 Rezeptor Tyrosinkinase. Diese beinhaltet eine extrazelluläre Domäne mit 5 Immunoglobulin-ähnlichen Domänen, eine Transmembran-Domäne, einer Juxtamembran-Domäne (JM) und zwei konservierte intrazelluläre Tyrosinkinase-Domänen (TKD). FLT3-ITD Längenmutation befindet sich in der JM-Domäne. Entnommen aus [105]. ....	42
Abbildung 11: FLT3-induzierte Signalwege .....	43
Abbildung 12: Selektivität und Affinität von Kinaseinhibitoren getestet auf mehr als 400 Kinasen bei einer Konzentration von 1nM bis 10 µM. Rote Kreise	

zeigen die Bindung des jeweiligen Inhibitor an die Kinasen, und die Größe der Kreise deutet auf die Bindungsaffinität hin. Gezeigt sind Wechselwirkungen mit $K_d < 3 \mu\text{M}$ . AC220 zeigt sich als ein hoch selektives Kinaseinhibitor. $K_d$ , Dissoziationskonstante. Entnommen aus [130].	45
Abbildung 13: Schematische Darstellung eines full-length AML1-ETO Fusionsproteins. RHD, RUNT-homologe Domäne; NHR, nervy homology region. Entnommen und modifiziert nach [134]	46
Abbildung 14: Schematische Darstellung der repressiven Funktion eines AML1-ETO Fusionsprotein. Es behält die RHD-Domäne und somit die DNA-Bindungs-Domäne und seine Interaktion mit CBFb. Durch Interaktion von ETO mit einem Co-Repressor-Komplex, wie N-COR und Sin3A werden Histon-Deacetylasen und DNMTs an AML1-Zielgene rekrutiert, welche die Konformation der Histone in eine inaktivere Form umwandeln, so dass die Zielgene nicht mehr exprimiert werden. Ac, acetylation; Met, methylation; CpG, CpG site; TF, basal transcription factor. Entnommen und modifiziert nach [143]	48
Abbildung 15: Betroffene Gene und Signalwege in der CBF Leukämie. Durch AML1-ETO (schwarz), CBFb-MYH11 (blau) oder beide Fusionsproteine (rot) betroffen. Entnommen aus [152].	50
Abbildung 16: FACS Grundlage	78
Abbildung 17: Generierung bi-transgener ROSA26-iM2/tet-AML1-ETO Mäuse. Die Expression von AML1-ETO wird durch die Zugabe von Doxzyklin (DOX) zum Trinkwasser aktiviert.	80
Abbildung 18: Konditionale Expression von AML1-ETO in adulten bi-trangenenen ROSA26-iM2/tet-AML1-ETO resultierte in hoher und schneller Mortalität. Die Induktion von AML1-ETO Expression erfolgte durch Zugabe von Doxzyklin zum Trinkwasser. +DOX (rot Linie) induzierte R26/AE Tiere. – DOX (schwarze Linie) nicht-induzierten R26/AE Tiere.	81
Abbildung 19: Generierung von dreifach transgenen Mäusen ROSA26-iM2/tetO-AML1-ETO/tetO-kRAS <sup>G12D</sup> , um den Effekt der gemeinsamen Expression von AML1-ETO und kRAS <sup>G12D</sup> auf Leukämieinduktion zu untersuchen. Weitere durch Kreuzung entstandene Nachkommen wie ROSA26-iM2/tetO-AML1-ETO (R26/AE), ROSA26-iM2/tetO- kRAS <sup>G12D</sup> (R26/kRAS) und ROSA26-iM2 (R26) wurden als Kontrollgruppen eingesetzt. Die Expression von AML1-ETO und kRAS wurde durch die Zugabe von Doxzyklin zum Trinkwasser aktiviert.	82
Abbildung 20: Die gemeinsame Expression von AE und kRAS führt nicht wie erwartet zu einer schnellen Mortalität. In der Gruppe AE/kRAS verstarb ein Tier und in der Gruppe AML1-ETO verstarben drei Tiere im Beobachtungsraum von 12 Monaten nach der Dox-Induktion.	84
Abbildung 21: Erfolgreiches Engraftment der transplantierten Zellen in allen Gruppen. 8 Wochen nach der Transplantation zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Engraftment der Spenderzellen (Ly5.1), sowie in der Expression von eGFP (Ly5.1/eGFP). (A) Engraftment der Knochenmark-Spenderzellen (Ly5.1) im peripheren Blut der Empfängermaus als Histogramm. (B) eGFP Expression der Spenderzellen (eGFP/Ly5.1) als Histogramm. (C) Relativer und absoluter Anteil der eGFP/Ly5.1 doppelt positiver Zellen als Balkendiagramm.	85

- Abbildung 22: 12 Monate nach Dox-Induktion zeigten sich die ersten Auffälligkeiten im Differentialblutbild in den Gruppen AE und AE/kRAS. Untersucht wurden Leukozyten (WBC, white blood cell), Erythrozytenzahl (RBC, red blood cell), Thrombozytenzahl (PLT, platelet count), Neutrophile Granulozyten (NE, neutrophile granulocytes), Hämoglobin (HB, hAML1-ETOmoglobin) und großen, ungefärbten Zellen z.B. Blasten (LUC, large unstained cells)..... 86
- Abbildung 23: 12 Monate nach der Transplantation zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Langzeit-Engraftment der Spenderzellen (Ly5.1), aber in der Gruppe AML1-ETO war die Expression von eGFP/Ly5.1 doppelpositive Zellen signifikant höher als in den Kontrollgruppen. (A) Engraftment der Knochenmark-Spenderzellen (Ly5.1) im peripheren Blut der Empfängermaus als Histogramm. (B) eGFP Expression der Spenderzellen (eGFP/Ly-5.1) als Histogramm. (C) Relativer und absoluter Anteil der eGFP/Ly-5.1 doppel positiven Zellen als Balkendiagramm..... 87
- Abbildung 24: 12 Monate nach der Transplantation zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den Milz- und Lebergewichten der transplantierten Mäuse (A-B) Das absolute und relative Milzgewicht und Lebergewicht. (C) Offener Situs einer erkrankten kRAS/AML1-ETO Maus. .... 88
- Abbildung 25: 12 Monate nach der Transplantation zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Körpergewicht der Tiere..... 88
- Abbildung 26: 12 Monate nach der Transplantation war die Expression von eGFP/Ly5.1 doppelpositive Zellen im Knochenmark in der Gruppe AML1-ETO und AML1-ETO/kRAS signifikant höher als in der kRAS Gruppe. (A) eGFP Expression der Spenderzellen als Histogramm. (C) Relativer und absoluter Anteil der eGFP positiven Zellen als Balkendiagramm..... 89
- Abbildung 27: Immunphänotypische Analyse der Granulopoese im Knochenmark mit myeloischen (CD11b/Gr-1) markierenden Antikörpern nach 12 Monaten DOX-Induktion zeigte eine verstärkte Granulopoese bei AE und AE/kRAS transplantierten Tieren. (A) Dot-Plot-Darstellung. (B) Relativer und absoluter Anteil als Balkendiagramm..... 90
- Abbildung 28: Immunphänotypische Analyse der Granulopoese in der Milz mit myeloischen (CD11b/Gr-1) markierenden Antikörpern nach 12 Monaten DOX-Induktion zeigte in der Gruppe AE/kRAS eine verstärkte Granulopoese. (A) Dot-Plot-Darstellung. (B) Relativer und absoluter Anteil als Balkendiagramm..... 91
- Abbildung 29: Immunphänotypische Analyse der eGFP Expression in CD11b/GR-1 positiven Zellen im Knochenmark und in der Milz zeigte, dass in den Gruppen AML1-ETO (A) und AML1-ETO/kRAS (B) die verstärkte Granulopoese aufwies, ebenfalls eine höhere eGFP Expression in diesen Zellen festgestellt wurde. Angegeben sind % der positiven eGFP/CD11b/Gr-1 Zellen als Histogramm (links) und Balkendiagramm (rechts). .... 92
- Abbildung 30: Immunphänotypische Analyse der B-Zell-Entwicklung im Knochenmark mit lymphatischen (B220/CD19) markierenden Antikörpern nach 12 Monaten DOX-Induktion zeigte eine deutliche Reduktion der B-Zellen in den Gruppen AML1-ETO und AML1-ETO/kRAS. (A) Dot-Plot-Darstellung. (B) Relativer und absoluter Anteil als Balkendiagramm. .... 93

- Abbildung 31: Immunphänotypische Analyse der B-Zell-Entwicklung im Knochenmark mit lymphatischen (B220/CD19) markierenden Antikörpern nach 12 Monaten DOX-Induktion zeigte eine deutliche Reduktion der B-Zellen in den Gruppen AE und AE/kRAS. (A) Dot-Plot-Darstellung. (B) Relativer und absoluter Anteil als Balkendiagramm. .... 94
- Abbildung 32: Immunphänotypische Analyse der Erythropoese im Knochenmark mit Erythrozyten (CD71/Ter119) markierenden Antikörpern zeigte nach 12 Monaten DOX-Induktion, dass in allen drei Gruppen AE, kRAS und AE/kRAS signifikant weniger reifen Erythroblasten sich im Knochenmark befanden als bei Kontrolltieren der Gruppe R26. Gating Strategie der Erythrozytenvorläufer ist im Text beschrieben. (A) Dot-Plot-Darstellung. (B) Relativer und absoluter Anteil als Balkendiagramm. .... 95
- Abbildung 33: Immunphänotypische Analyse mit Stammzellen (lin-/ScaI/c-Kit) markierenden Antikörpern nach 12 Monaten DOX-Induktion zeigte keine Expansion von LSK Zellen im Knochenmark. Bei AE transplantierten Tieren zeigte sich eine signifikante Reduktion der LSK Zellen. Bei der AE/kRAS Gruppe zeigte sich eine erhöhte Expression des Progenitormarkers c-KIT und ScaI einzeln positiven Zellen. (A) Dot-Plot-Darstellung. (B) Relativer und absoluter Anteil als Balkendiagramm. .... 96
- Abbildung 34: Immunphänotypische Analyse der T-Zell-Entwicklung im Thymus nach 12 Monaten DOX-Induktion zeigte eine signifikante Reduktion der CD4/CD8 doppelt positiven Zellen in der AML1-ETO Gruppe. (A) Dot-Plot-Darstellung. (B) Relativer und absoluter Anteil als Balkendiagramm. .... 97
- Abbildung 35: Generierung von Mäusen die gemeinsam AE und FLT3-ITD exprimieren. Aus nicht induzierten bi-transgenen R26/AE Mäusen wurden LSK Zelle aufgereinigt und retroviral mit einem FLT3-ITD Konstrukt transduziert. Anschließend wurden die Zellen in letal bestrahlte Rezipienten überführt, um den Effekt der gemeinsamen Expression auf Leukämieinduktion zu untersuchen. Die Expression von AE wurde durch die Zugabe von Doxyzyklin zum Trinkwasser aktiviert. .... 99
- Abbildung 36: Plasmidkarte von pSF91-IRES-tdTomato Vektor. .... 100
- Abbildung 37: Agarosegelelektrophoretische Auftrennung von NotI linearisierten pSF91-Vektors (A), Cla/Spe/Sal-verdauten LeGOi2-Plasmids (B) und evaluierten, und erneut aufgereinigten FLT3-ITD Fragments. .... 101
- Abbildung 38: Restriktionsanalyse. A. Agarosegelelektrophoretische Auftrennung von XhoI-verdauten pSF91-Plasmiden nach der Einklonierung von hFLT3-ITD. Die Klone 29 und 32 stellen die erwarteten Fragmente dar. Rote Pfeile zeigen Fragmente richtiger Größe. B. Kontrollverdau zur Bestimmung korrekter Orientierung des eingebauten Inserts mittels XhoI, RI, Bam/RI und Bam. Positiver Klon mit richtiger Orientierung. .... 101
- Abbildung 39: Mutation im FLT3-Gen. Die häufigsten Mutationen betreffen die Juxtamembrandomäne (JMD; kodiert durch die Exons 14 und 15) und die Tyrosinkinasedomäne (TKD; kodiert durch Exon 20). Modifiziert nach C. Müller-Tidow. .... 103
- Abbildung 40: Western Blot von Extrakten aus 32D Zellen stabil transfiziert mit Wildtyp FLT3 als positiv Kontrolle, 293T Zellen transient transfiziert mit hFLT3-ITD und untransfzierten 293T als negativ Kontrolle. .... 103
- Abbildung 41: Generierung von Mäusen die gemeinsam AE und FLT3-ITD exprimieren. (A) Schematische Darstellung der verwendeten retroviralen

- Vektoren. FLT3-ITD – Transgen; IRES-Tomato – rot fluoreszierendes Protein als stabiler Selektionsmarker. (B) Anreicherung von LSK-Zellen (Lin-ScaI+c-kit+) aus dem Knochenmark der Donormäuse mittels Zellsortierung. (C) FACS-Analyse zur Bestimmung der *in vitro* Transduktionseffizienz der LSK Zellen mit FLT3-ITD Transgen bzw. Leervektor SF91-IRES-Tomato die für den adoptiven Transfer in letal bestrahlte Rezipientenmäuse verwendet wurden. .... 105
- Abbildung 42: Die gemeinsame Expression von AE und FLT3-ITD resultierte in einer schnellen Mortalität mit 100% Penetranz. In der Gruppe FLT3-ITD verstarben drei Tiere. .... 106
- Abbildung 43: Erfolgreiches Engraftment der transplantierten Zellen in allen Gruppen. 6 Wochen nach der Transplantation, bei erkrankten Tieren bereits früher zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Engraftment der Spenderzellen (A) Engraftment der Knochenmark-Spenderzellen Ly5.1 im peripheren Blut der Empfängermaus. (B) Relativer und absoluter Anteil der Ly-5.1 doppelt positiven Zellen. .... 107
- Abbildung 44: Analyse des peripheren Blutes mittels FACS offenbarte eine Expansion von eGFP/Tomato doppelt positiven Population in AML1-ETO/FLT3-ITD transplantierten Mäusen. Anzahl der AML1-ETO-eGFP-, Tomato- und doppelt positiven Lymphozyten (DP) in % dargestellt 3-5 Wochen nach der Transplantation transduzierter LSK Zellen. (A) Dot-Plot-Darstellung. (B) Relativer und absoluter Anteil als Balkendiagramm. .... 108
- Abbildung 45: Differentialblutbild 3-5 Wochen nach der Transplantation, bei den erkrankten Tieren am Todestag, zeigte die ersten Auffälligkeiten im Differentialblutbild in der Gruppe AML1-ETO/FLT3-ITD. Untersucht wurden Leukozyten (WBC, white blood cell), Erythrozytenzahl (RBC, red blood cell), Thrombozytenzahl (PLT, platelet count), Erythrozytenverteilungsbreite (RDW, Red Blood Cell Distribution Width), Hämoglobin (HB, hAML1-ETOmoglobin) und großen, ungefärbten Zellen z.B. Blasten (LUC, large unstained cells). .... 109
- Abbildung 46: Koexpression von FLT3-ITD und AE führt zur Ausbildung sowohl myeloischer als auch lymphatischer sowie einer biphänotypischen Leukämie. Obere Reihe: Blutausstriche. Untere Reihe: Zytospin Knochenmark. Als Kontrolle ist in diesem Fall eine Maus transplantiert mit Leervektor. .... 110
- Abbildung 47: In den erkrankten Tieren waren Milz und Leber deutlich vergrößert. (A) Oben: Offener Situs einer an Leukämie verstorbenen FLT3-ITD/AE Maus mit deutlicher Spleno- und Hepatomegalie. Unten: Unterschiede in Milz- und Lebergröße aus Leukämiemaus FLT3-ITD/AE und einer gesunden Wildtyp Maus. (B) Die entnommen Organe Leber und Milz wurden gewogen und zusätzlich in Relation zum jeweiligen Körpergewicht gesetzt und in mg/g Körpergewicht dargestellt..... 111
- Abbildung 48: Histologisches Bild einer massiven Infiltration des Milzes durch leukämische Zellen in der Gruppe FLT3-ITD/AE (a-c) in Vergleich zu nicht erkrankten Kontrollgruppen (d-k). In der Gruppe FLT3-ITD/AE war die Milz vergrößert und die gesamte Organstruktur von blastären Zellen erfüllt. In der Gruppe FLT3-ITD war die Milzarchitektur nur partiell erhalten. Bereiche der weißen Pulpa waren deutlich reduziert. Im Bereich der roten Pulpa imponierten dunkelblau gefärbte Zellen. Das Milzgewicht und die Milzgröße waren nicht verändert, was gegen eine massive Expansion dieser

- Zellpopulation spricht. 1, rote Pulpa; 2, weiße Pulpa; 3, Marginalzone (MZ); 4, periarterioläre lymphatische Scheide (PALS); 5, Arterie. .... 112
- Abbildung 49: Histologisches Milzbefund bei 63x Vergrößerung lässt die Unterschiede in der Zellgröße der dunkelblau gefärbten Zellen in den Gruppen FLT3-ITD/AE und FLT3-ITD erkennen. In den Gruppen AE und Leervektor sind keine dunkelblau gefärbten Areale zu erkennen sowie keine Strukturveränderungen des Milzes..... 113
- Abbildung 50: Histologisches Bild einer massiven Infiltration des Leberparenchyms durch leukämische Zellen in der Gruppe FLT3-ITD/AML1-ETO (a-c) in Vergleich zu nicht erkrankten Kontrollgruppen (d-j). Schwarze Pfeile deuten auf Infiltrate hin. .... 114
- Abbildung 51: Histologisches Leberbefund bei 63x Vergrößerung lässt eine periportale Zellinfiltration in der Gruppe FLT3-ITD/AML1-ETO erkennen (schwarze Pfeile)..... 114
- Abbildung 52: Analyse des Knochenmarkes mittels FACS. Analysiert wurde die Anzahl der eGFP-, Tomato- und doppelt positiven Lymphozyten (DP) in %. In der Gruppe FLT3-ITD/AE zeigte sich, wie zuvor im peripheren Blut, eine Expansion von eGFP/Tomato doppelt positiver Population. (A) Dot-Plot-Darstellung. (B) Relativer und absoluter Anteil als Balkendiagramm..... 115
- Abbildung 53: Immunphänotypische Analyse der Granulopoese im Knochenmark mit myeloischen (CD11b/Gr-1) markierenden Antikörpern zeigte bei einem Teil der Tiere aus der Gruppe FLT3-ITD/AE eine erhöhte Granulopoese, bei einem anderen Teil dagegen eine dramatische Reduktion der CD11b/Gr-1 Population. (A) Dot-Plot-Darstellung. (B) Relativer und absoluter Anteil als Balkendiagramm. .... 116
- Abbildung 54: Immunphänotypische Analyse der Granulopoese in der Milz mit myeloischen (CD11b/Gr-1) markierenden Antikörpern zeigte ähnlich wie die Analyse des Knochenmarks bei einem Teil der Tiere aus der Gruppe FLT3-ITD/AE eine erhöhte Granulopoese, bei einem anderen Teil dagegen eine dramatische Reduktion der CD11b/Gr-1 Population. (A) Dot-Plot-Darstellung. (B) Relativer und absoluter Anteil als Balkendiagramm. .... 117
- Abbildung 55: Immunphänotypische Analyse der B-Zell-Entwicklung im Knochenmark mit lymphatischen (B220/CD19) markierenden Antikörpern zeigte bei einem Teil der Tiere aus der Gruppe FLT3-ITD/AML1-ETO eine enorme Expansion der B-Zell-Population, bei einem anderen Teil dagegen eine dramatische Reduktion. Bei FLT3-ITD Tieren war die Differenzierung der B-Zellen dramatisch gestört. Bei AML1-ETO Tieren ließ sich eine leichte, aber signifikante Reduktion der B-Zellen feststellen. (A) Dot-Plot-Darstellung. (B) Relativer und absoluter Anteil als Balkendiagramm. .... 118
- Abbildung 56: Immunphänotypische Analyse der B-Zell-Entwicklung in der Milz mit lymphatischen (B220/CD19) markierenden Antikörpern zeigte ein ähnliches Bild wie die Analyse des Knochenmarks. (A) Dot-Plot-Darstellung. (B) Relativer und absoluter Anteil als Balkendiagramm. .... 119
- Abbildung 57: Immunphänotypische Analyse der B-Zell-Entwicklung im Knochenmark mit Marker IgM, B220 und CD43 konnte festgestellt werden, dass bei an B-Zell-ALL erkrankten Tieren, die B-Zelle einen pro-B-Phänotyp haben. (A) Mittels Oberflächenmarker IgM und B220 wurden als erstes B220<sup>low</sup>IgM<sup>+</sup> unreife B-Zelle (Immature), B220<sup>high</sup>IgM<sup>+</sup> reife B-Zellen (Mature) und B220<sup>low</sup>IgM<sup>-</sup> Pre/Pro-B Zellen identifiziert. (B) Im

- nächsten Schritt wurden Pre/Pro-B-Zellen mit Hilfe der CD43 Marker weiter in B220<sup>low</sup>CD43<sup>-</sup>IgM<sup>-</sup> Pre-B-Zelle und B220<sup>low</sup>CD43<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup> Pro-B-Zellen eingeteilt. (C) Relativer und absoluter Anteil als Balkendiagramm. .... 120
- Abbildung 58: Immunphänotypische Analyse der T-Zell-Entwicklung im Thymus ließ kein T-ALL-Phänotyp feststellen. Bei erkrankten Tieren wurde eine Reduktion der CD4/CD8 doppelt positiven Zellen festgestellt. .... 121
- Abbildung 59: Immunphänotypische Analyse einer biphänotypischen Leukämie. Die Besonderheit liegt darin, dass der Großteil der FLT3-ITD/AE positiven Zellen aus dem Knochenmark positiv für die lymphatischen Marker CD19/B220, während der Großteil der FLT3-ITD einzeln positiven Population positiv für die myeloischen Marker CD11b/Gr-1 positiv ist. (A) Dot-Plot-Darstellung. (B) Relativer und absoluter Anteil als Balkendiagramm. .... 122
- Abbildung 60: Histologisches Bild einer Infiltration des Milzes und der Leber durch leukämische Zellen in der Gruppe FLT3-ITD. Die Milz war vergrößert und die gesamte Organstruktur von blastären Zellen erfüllt. Ebenso lässt sich in der Leber eine periportale Zellinfiltration erkennen (schwarze Pfeile deuten auf Infiltrate hin). .... 123
- Abbildung 61: Immunphänotypische Analyse des Knochenmarks mit myeloischen (CD11b/Gr-1) sowie lymphatischen (IgM/B220) markierenden Antikörpern. Der Großteil der FLT3-ITD<sup>high</sup> positiven Zellen ist positiv für die myeloischen Marker CD11b/Gr-1, während die B-Zell-Population kaum nachgewiesen werden konnte. Dagegen ist der Großteil der FLT3-ITD<sup>low</sup> positiven Zellen sich in der Pro/Pre-B-Zellstadium befindet (IgM<sup>-</sup>/B220<sup>low</sup>). . 124
- Abbildung 62: Immunphänotypische Analyse des Knochenmarks mit myeloischen (CD11b/Gr-1) sowie lymphatischen (IgM/B220) markierenden Antikörpern. Bei diesem Tier überwiegt die FLT3-ITD<sup>low</sup> Population. Dabei ist wiederum der Großteil davon positiv für die lymphatischen B-Zellmarker. Dabei liegen die Zellen zu über 90% in Pro/Pre-B-Zell-Stadium (IgM<sup>-</sup>/B220<sup>low</sup>). Während CD11b/Gr-1 Population kaum vorhanden war. .... 125
- Abbildung 63: Immunphänotypische Analyse des Knochenmarks mit myeloischen (CD11b/Gr-1) sowie lymphatischen (IgM/B220) markierenden Antikörpern. Der Großteil der FLT3-ITD<sup>high</sup> positiven Zellen ist positiv für die myeloischen Marker CD11b/Gr-1, während die B-Zell-Population kaum nachgewiesen werden konnte. Dagegen ist der Großteil der FLT3-ITD<sup>low</sup> positiven Zellen positiv für B-Zell-Marker, wobei sich die meisten in der Pro/Pre-B-Zellstadium befanden (IgM<sup>-</sup>/B220<sup>low</sup>). .... 126
- Abbildung 64: Retransplantationsexperimente mit den primären leukämischen Blasten zeigten, dass beide Krankheitsphänotypen (ALL und AML) retransplantierbar sind, wobei die Aggressivität der Zellen mit jeder Transferrunde zunimmt. (A) Beim seriellen Transfer von Tumorzellen aus B-ALL erkrankten Tieren in subletal bestrahlten Rezipienten verkürzte sich die Latenzzeit mit jeder Transferrunde erheblich. (B) Tumorzellen aus sekundären Rezipienten wurden in letal, subletal und nicht bestrahlte Rezipienten eingebracht. Die Tumorzellen sind sehr aggressiv und induzieren auch in nichtbestrahlten Tieren eine Leukämie. (C) Beim Transfer von Tumorzellen aus AML erkrankten Tieren in subletal bestrahlten Rezipienten verkürzte sich die Latenzzeit ebenso mit jeder Transferrunde. .... 127
- Abbildung 65: Repräsentative FACS-Analyse zeigt das Abschalten/die Herunterregulierung von AE bzw. FLT3-ITD. (A) Rezipienten wurden mit

den sekundären leukämischen Blasten retransplantiert. Sofort danach wurde die Gruppe I auf Wasser umgesetzt, um die Expression von AE abzuschalten. Gruppe II bekam zusätzlich AC220 5mg/kg oral, um FLT3-ITD Expression runter zu regulieren. Gruppe III wurde nur mit AC220 behandelt. Gruppe IV blieb unbehandelt und diente als Kontrolle für die Leukämie Induktion. Anhand von eGFP Expression stellt man fest, dass die Expression von AML1-ETO effizient abgeschaltet wurde. Dagegen scheint die Behandlung mit AC220 nur bedingt die FLT3-ITD Expression zu inhibieren. (B) Relativer und absoluter Anteil der FLT3-ITD (Tomato), FLT3-ITD/AE (DP) und AE (eGFP) Population..... 129

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifikation der myeloischen Neoplasien. Einteilung nach der WHO [18].....	25
Tabelle 2: Auszug aus der WHO-Klassifikation der AML (Die Onkologie, Springer Verlag 2007) .....	26
Tabelle 3: Zytogenetisch basierte Risikogruppen in der AML (nach Mrózek 2007).....	27
Tabelle 4: Immunologische Klassifikation der ALL entsprechend den Definitionen einer europäischen Arbeitsgruppe, der EGIL (European Group for Immunologic Classification of Leukemias).....	31
Tabelle 5: Risikogruppen in der ALL.....	32
Tabelle 6: Tumore des Menschen mit hohem Prozentsatz an RAS-Mutationen.....	41
Tabelle 7: Die Familie der Core-Binding-Faktoren (CBF). Modifiziert nach [137].....	47
Tabelle 8: Zusammenfassung der AML1- und AML1-ETO-Zielgene.....	50
Tabelle 9: Laborgeräte .....	54
Tabelle 10: Puffer und Lösungen für Elektrophoresen, PCR und Western-Blots.....	56
Tabelle 11: Färbungs- und Bindungspuffer .....	56
Tabelle 12: Puffer und Lösungen für die Zelllyse oder dem Mausschwanzverdau.....	57
Tabelle 13: Puffer und Lösungen für Transfektion und retrovirale Transduktion .....	57
Tabelle 14: Primärantikörper .....	58
Tabelle 15: Sekundärantikörper.....	59
Tabelle 16: Primer .....	59
Tabelle 17: Plasmide.....	60
Tabelle 18: Zelllinien.....	60
Tabelle 19: Mauslinien .....	61
Tabelle 20: Gruppenaufteilung .....	83
Tabelle 21: Gruppenaufteilung .....	104
Tabelle 22: Gruppenaufteilung .....	130

## Abkürzungsverzeichnis

AE	AML1-ETO
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
AML	Akute Myeloische Leukämie
APC	Allophycocyanin
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CBF	Core Binding Factor
CLP	Common Lymphoid Progenitor
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CD	cluster of differentiation
CMP	Common Myeloid Progenitor
Cre	Cre-Rekombinase
DMEM	Dulbecco´s modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosid-5´-triphosphat
DNMT	DNA-Methyltransferase
Eco	ökotrop (ecotrop)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	„enhanced green fluorescent protein“, grün fluoreszierendes Protein
Env	Hüllprotein (envelope)
ETO	Eight-Twenty-One Gen
FAB	French-American-British
FACS	Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung)
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
FLT3	FMS-related tyrosine kinase 3

---

FLT3L	FMS-related tyrosine kinase 3 ligand
FSC	Forward Scatter
gag	virales Strukturgen
Gy	Gray (Energiedosis, 1 Gy = 1 J/kg)
HDAC	Histon-Deacetylase
HBSS	Name einer Salzlösung, Hanks Balanced Salt Solution
HCl	Salzsäure
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HEPES	2-(N-Hydroxyethylpiperazin)-2-ethansulfonsäure
HSC	Hämatopoetische Stammzelle(n)
Ig	Immunglobulin
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
ip.	intraperitoneal
IRES	internal ribosome entry site
ITD	interne Tandem-Duplikation
i.v.	intravenös
JMML	Juvenile myelomonozytare Leukämie
JMD	Juxtamembran-Domäne
kb	Kilobase(n)
KM	Knochenmark
KMT	KM-Transplantation
LB Medium	Luria Broth Base Medium
LEF1	lymphoid enhancing factor-1
Lin-	engl. Lineage negative Zellen.
LTR	Long Terminal Repeat
m.o.i.	Multiplizität der Infektion
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
MLV	murines Leukämievirus
MDS	myelodysplastisches Syndrom
MPS	myeloproliferatives Syndrom

---

MSCV	murines Stammzellvirus
NP-40	Nonidet-P-40
NPM1	nucleophosmin, member 1
OD	optische Dichte
PB	peripheres Blut
PBL	Primäre Blutlymphozyten
PBMC	Primäre mononukleäre Blutzellen
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PerCP	Peridin Chlorophyll Protein
PLT(s)	Thrombozyten
Pol	Polymerase
PRE	Posttranskriptionelles regulatorisches Element
Rev	Regulatorisches Protein von HIV, reguliert das Splicing und den RNA-Transport
rpm	Umdrehungen pro Minute
RHD	RUNT-homologe Domäne
RUNX1	Runt-related Transcription Factor 1
SCF	Stammzellfaktor
SDS	Natriumdodecylsulfat
SF91	SFFV/MESV-Hybridpromotor
SFFV	Eng. spleen focus-forming virus
SIN	selbstinaktivierend
SSC	Seitwärtsstreulicht (Side Scatter)
t(8;21)	Translokation die Chromosomen 8 und 21 betreffend
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris buffered saline
TEMED	N,N,N,N Tetramethylethylendiamin

---

tetO	Tetrazyklin Operator
tdTomato	rot fluoreszierendes Protein
TKD	Tyrosinkinasedomäne
td	Tandem-Dimer
Thy	Thymus
U3	Teil der LTR, spezifisch für das 3'-Ende der viralen RNA
U5	Teil der LTR, spezifisch für das 5'-Ende der viralen RNA
UTR	untranslatierte Region
v/v	Volumen pro Volumen
WBC	Leukozyten (white blood count)
WHO	world health organization (Weltgesundheitsorganisation)
Ψ	Verpackungssignal

# 1 Einleitung

## 1.1 Hämatopoese

Hämatopoese bezeichnet einen komplexen biologischen Prozess der embryonalen und adulten Blutbildung, sowie auch die Fähigkeit von adulten hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) sich selbst zu erneuern, zu proliferieren und zu differenzieren, um eine konstante Anzahl an Blutzellen im Körper aufrechtzuerhalten (Homöostase).

Die Entwicklung des hämatopoetischen Systems beginnt während der Embryogenese in den Blutinseln des Dottersacks, geht dann auf Leber und Milz über und wird in den späteren Abschnitten der Entwicklung vom roten Knochenmark übernommen [1].

### 1.1.1 Hämatopoetische Stammzellen

HSCs können unterteilt werden in Zellen, die unbegrenzt in der Lage sind sich selbst zu replizieren LT-HSCs (long-term HSCs) und somit das Blutsystem lebenslang zu rekonstituieren und solche Stammzellen, die nur ein begrenztes Potential zur Selbsterneuerung aufweisen ST-HSCs (short-term HSCs). Die pluripotente Stammzellen bilden somit die Spitze einer Stammzellhierarchie. Danach erfolgt eine immer stärkere Determinierung der Zellen und somit eine kontinuierliche Einschränkung des Differenzierungspotenzial (Abbildung 1). ST-HSCs differenzieren in stärker determinierte, multipotente hämatopoetische Progenitoren (MPP), die nur noch ein gewisses Potenzial zur Selbsterneuerung aufweisen. Aus diesen wiederum gehen myeloide (CMP, common myeloid progenitor) und lymphoide (CLP, common lymphoid progenitor) Stammzellen hervor, die sich wiederum zu verschiedenen Blutzelltypen differenzieren (Übersicht in Graf und Trumpp, online Poster, Nature Reviews).

Aus myeloiden Vorläuferzellen (CMP) können zunächst entweder megakaryozytäre/erythroide Vorläuferzellen (MEP, megakaryocytic erythroid progenitors) hervorgehen, die in Erythrozyten, Megakaryozyten und Thrombozyten differenzieren können oder die granulozytäre/monozytäre Vorläuferzellen (GMP, granulocyte-macrophage progenitor), aus denen Granulozyten oder Makrophagen hervorgehen können. Lymphoide Vorläuferzellen (CLP) bringen T- und B- Lymphozyten sowie natürliche Killerzellen (NK) hervor. Dabei werden die T-Lymphozyten ausschließlich im Thymus aus dort eingewanderten CLPs gebildet. Die Reifung von NK-Zellen, sowie der lebenslange Produktionsort der B-Lymphozyten bleibt das Knochenmark. Die reifen T- und B-Zellen verlassen nach Ausreifung ihre primäre Differenzierungsorte und migrieren zu den peripheren lymphatischen Organen (wie Milz und Lymphknoten). Dendritische Zellen (DCs) können über entsprechenden Vorstufen entweder von lymphoiden oder myeloiden Vorstufen abstammen.

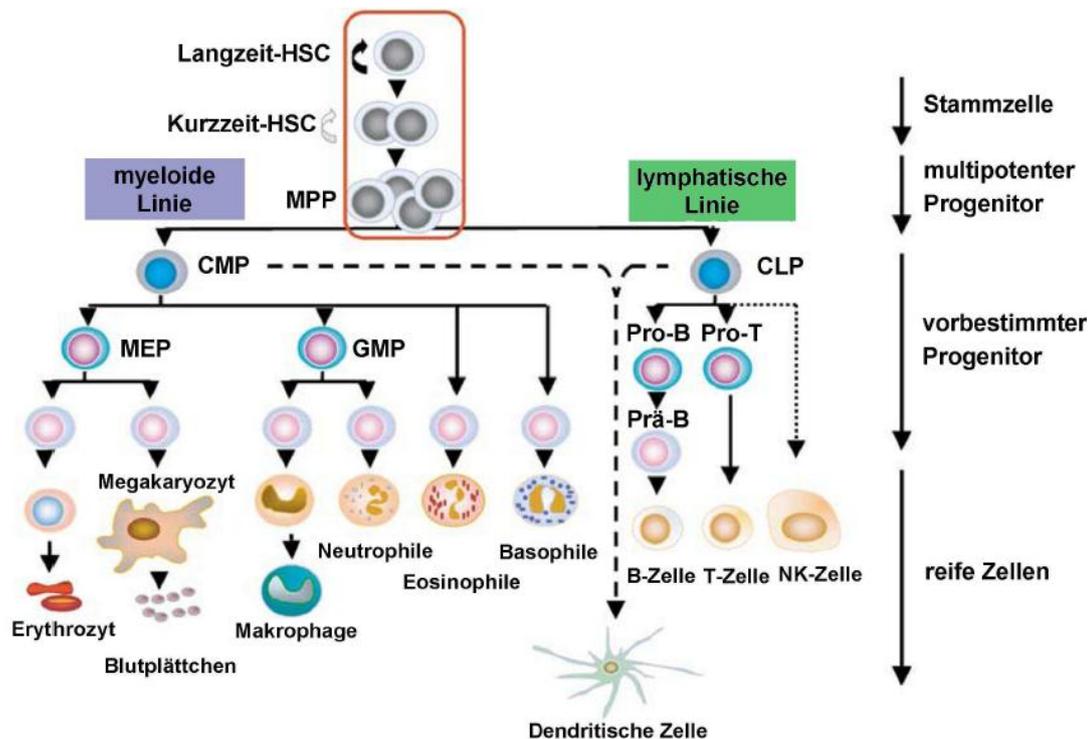


Abbildung 1: Modell der Hämatopoese. MPP (multipotente Progenitoren), CMP (gesamte myeloide Progenitoren), CLP (gesamte lymphoide Progenitoren), MEP (megakaryozytäre/erythroide Progenitoren), GMP (granulozytäre/monozytäre Progenitoren). Übernommen und modifiziert nach [2]

### 1.1.2 Die Stammzellnische im Knochenmark

Es wird angenommen, dass die blutbildenden Stammzellen (HSCs) in speziellen Nischen im Bindegewebe des Knochenmarks sich befinden. Die Interaktion zwischen HSCs mit der extrazellulären Umgebung bildet ein wichtiges Steuerungselement den Zellzyklus von HSCs zu regulieren und gegebenenfalls auf die aktuellen Anforderungen des Organismus anzupassen.

Das in Abbildung 2 dargestellte Modell zeigt, wie Stammzellen in spezialisierten Nischen lokalisiert sind, wobei man zwischen einer sich direkt am Knochengewebe befindenden endostealen Stammzellnische [3-5] und der an den Blutgefäßen angesiedelten vaskulären Stammzellnische unterscheiden kann [6, 7]. Der Großteil der HSC („dormant“ HSC) ruht in der endostealen Nische, die hauptsächlich aus Osteoblasten und andere von mesenchymale Stammzellen (Mesenchymal stem cells, MSCs) abstammende Zellen (ECM) geformt wird, und bilden somit ein Art Stammzellreservoir. In der vaskulären Nische, die durch Endothelzellen in den Sinusoiden des Knochenmarks gebildet wird, befinden sich vorwiegend die aktiven HSC, welche dort proliferieren, sich differenzieren und in die Blutbahn auswandern.

Vermutlich fördert das Endothel der sinusoidalen Gefäße die Proliferation und Differenzierung von Stammzellen durch eine nährstoffreichere Umgebung, mit einer höheren

Konzentration an Sauerstoff und Wachstumsfaktoren. Beiden Stammzellnischen ist allerdings gemein, dass die HSC jeweils auch in direkter Wechselwirkung zu mesenchymalen Stromazellen stehen, die deshalb in vielen in vitro Studien, als Modell stellvertretend für die Stammzellnische verwendet werden.

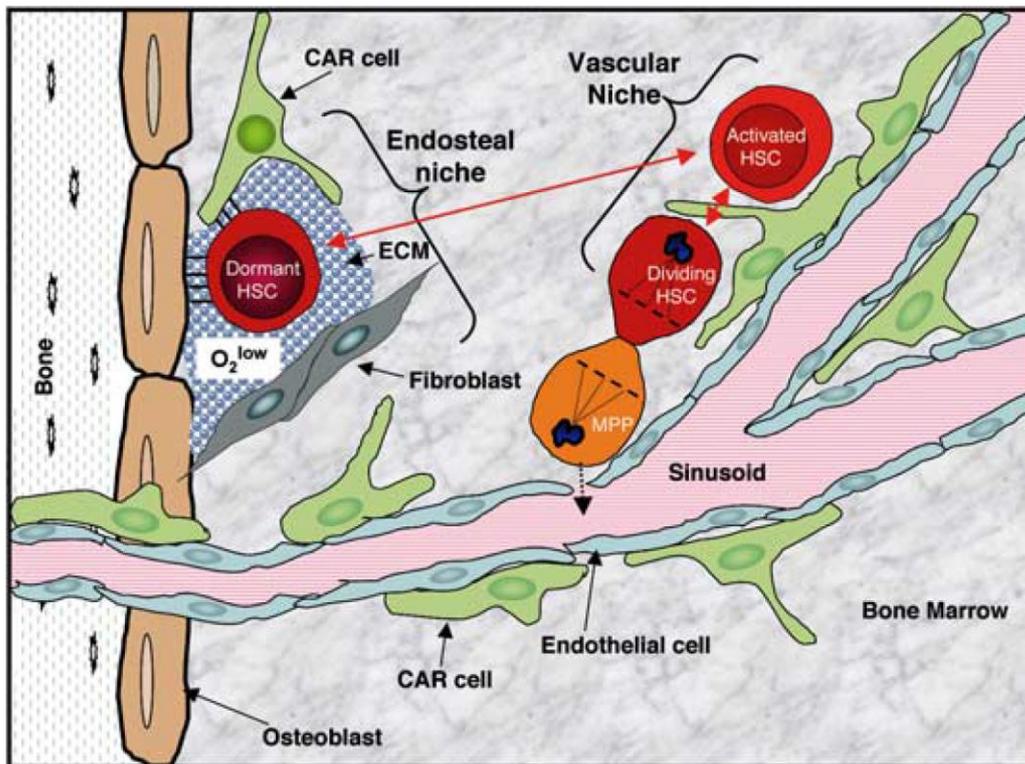


Abbildung 2: Modell der hämatopoetischen Stammzellnische im Knochenmark (entnommen aus Wilson et al., Ann N Y Acad Sci., 2007) [8] CAR cell, CXCL12-reiche retikuläre Zellen; ECM, extrazellulärer Matrix; MPP, multipotente Progenitor-Zellen

## 1.2 Leukämien

Die Leukämie (von altgriechisch λευκός leukós „weiß“ und αἷμα haima „das Blut“) ist eine Erkrankung des blutbildenden Systems, bei der Teilung und Reifung der weißen Blutkörperchen gestört ist. Zum ersten Mal wurde das Phänomen etwa zeitgleich vom schottischen Arzt John Bennett und dem Berliner Mediziner Rudolf Virchow um 1845-1847 beschrieben. Als gemeinsames Merkmal der Leukämien wird die Proliferation unreifer hämatopoetischer Zellen verstanden, die durch ihr Wachstum die normale Hämatopoese im Knochenmark verdrängen und somit zu Anämie, Thrombozytopenie und Granulozytopenie führen. Zudem können die entarteten Zellen extramedulläre Organe infiltrieren.

Genetische Veränderungen können zum Verlust der strengen Kontrolle der Blutbildung führen und in einer malignen Entartung resultieren. Dabei teilen sich die hämatopoetische Zellen unkontrolliert und verlieren ihre Fähigkeit, sich in reife Blutzellen zu diffe-

renzieren. Je nachdem, welche Blutlinie von der Entartung betroffen ist, unterscheidet man zwischen myeloiden und lymphoiden, oder nach ihrer Entstehungsweise und Verlaufsform zwischen chronischen und akuten Leukämien. Daraus ergeben sich vier Formen der Leukämie:

- akute lymphatische Leukämie (ALL)
- akute myeloische Leukämie (AML)
- chronisch myeloische Leukämie (CML)
- chronisch lymphatische Leukämie (CLL)

Die chronischen Leukämien sind durch einen schleichenden Verlauf gekennzeichnet und werden oft zufällig diagnostiziert, weil zunächst trotz verstärkter Expansion von Vorläuferzellen im Knochenmark noch ausgereifte Blutzellen gebildet werden können. Dagegen verlaufen die akuten Leukämien sehr schnell und führen unbehandelt innerhalb von Tagen oder wenigen Wochen zum Tod. Dabei ist die auftretende Differenzierungsblockade einer Vorläuferzelle charakteristisch, so dass sich die myeloiden oder lymphoiden Vorläuferzellen ansammeln und nicht ausreifen können. Folglich findet eine klonale Proliferation und Akkumulation atypischer Zellen sowie eine Verdrängung der physiologischen Blutbildung im Knochenmark statt. Und anschließend eine Ausbreitung über das Blut im Organismus.

Das klinische Krankheitsbild wird in der Regel durch die Folgen Knochenmarksinsuffizienz bestimmt. Es kommt zu einer Verminderung an Erythrozyten und Thrombozyten, was mit Schwäche aufgrund verminderter Sauerstoffversorgung und mit Blutungszeichen und Gerinnungsstörungen einhergeht. Die verminderte Anzahl an funktionsfähigen Leukozyten bewirkt zudem eine erhöhte Infektionsanfälligkeit der Betroffenen. Die Infiltration von Organen mit leukämischen Zellen führt oft zu einer Hepato- und/oder Splenomegalie sowie Lymphknotenvergrößerung.

Es gibt auch myeloische Neoplasien, die nur einen Teilaspekt der vollen Leukämie aufweisen, z. B. nur expansives Wachstum (MPS, myeloproliferatives Syndrom) oder nur Differenzierungsblock (MDS, myelodysplastisches Syndrom) [9-11] (Tabelle 1). Etwa ein Drittel der Patienten entwickeln früher oder später eine akute myeloische Leukämie (AML) [12]. Bislang gibt es allerdings keine Therapiemöglichkeiten, die das Blutbild vollständig und dauerhaft normalisiert, außer der Durchführung einer allogenen Knochenmarktransplantation (KMT), eine Übertragung gesunder Stammzellen eines anderen Menschen im Anschluss auf eine hochdosierte Chemo- oder Strahlentherapie. Diese Behandlungsmaßnahme stellt eine hohe Heilungschance dar, aber ist auch mit einem hohen Risiko für das Auftreten von Komplikationen verbunden. Neben den bösartigen

Erkrankungen der Blutbildung kann es aber auch zu einem Ausfall der Neubildung von Blutzellen aus dem Knochenmark kommen, die wichtigsten Erkrankungen sind hier die aplastische Anämie oder bestimmte schwere Immundefekterkrankungen.

Eine weitere bösartige Erkrankung des Blutes und des lymphatischen Systems, sind die Lymphome. Während die Leukämie meist systemisch den ganzen Körper befällt, treten Lymphome vor allem in Form eines soliden Tumors im Bereich verschiedener Lymphknotenstationen, z. B. im Brustkorb, im Nasen-Rachen-Raum oder auch im Bauch auf. Maligne Lymphome gliedern sich in Hodgkin-Lymphom und Non-Hodgkin-Lymphome (NHL). Die Non-Hodgkin-Lymphome unterteilen sich wiederum in B- (über 80 Prozent der Fälle) und T-Zell-Lymphome. Derzeit klassifiziert die WHO (World Health Organisation) die chronische lymphatische Leukämie (CLL) als niedrig malignes Lymphom, das durch eine leukämische Verlaufsform gekennzeichnet ist.

Da für diese Arbeit vor allem die ALL und AML von Bedeutung sind, wird im Folgenden genauer auf die unterschiedlichen Formen und möglichen Ursachen dieser Erkrankungen eingegangen.

### 1.2.1 Häufigkeit der Leukämien

Leukämien sind die häufigsten Krebserkrankungen des Kindes- und Jugendalters. In Deutschland erkranken jährlich etwa 600 Kinder unter 15 Jahren an Leukämie. Die akute lymphoblastische Leukämie (ALL) ist dabei die häufigste Krebsform im Kindesalter. Sie macht in dieser Altersgruppe rund 80 Prozent der akuten Leukämien aus [13, 14]. Die akute myeloische Leukämie (AML) ist mit 15 – 20 % nach der ALL die zweithäufigste Leukämieform bei Kindern und Jugendlichen.

Im Erwachsenenalter, zwischen dem 20. und 50. Lebensjahr, kehrt sich das Verhältnis zwischen AML und ALL um (80 % AML, 20 % ALL). Ihre Häufigkeit beträgt etwa 3,7 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr und steigt bei Patienten im Alter über 70 Jahren über 100 Fällen pro 100.000 Einwohner. Ab dem mittleren Lebensalter kommt es ebenfalls zu einem verstärkten Auftreten der chronischen lymphatischen Leukämien (CLL), die dann auch bei älteren Menschen die vorherrschende Form der Leukämie ist.

Etwa 11.500 Menschen, davon etwa 6 Prozent Kinder unter 15 Jahren, erkrankten 2010 in Deutschland an einer Leukämie (Zahlen zu Leukämien: [www.krebsdaten.de](http://www.krebsdaten.de)).

### 1.2.2 Akute myeloische Leukämie

Die akuten myeloischen Leukämien sind durch die maligne, klonale Expansion und einen Reifungsarrest mit Akkumulation meist unreifen myeloischer Zellen im Knochenmark charakterisiert.

Die Unterteilung der AML erfolgt gegenwärtig nach der WHO-Klassifikation der Tumoren des hämatopoetischen und lymphatischen Gewebes (WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, 2008). Dabei vorgeschlagene Klassifikation der AML beruht auf der Kombination der bisher im Rahmen der FAB-Klassifikation verwendeten morphologischen, zytochemischen und immunologischen Befunde mit der Zyto- und Molekulargenetik [7] (Tabelle 2). Das FAB-Klassifizierungsschema (French-American-British, nach einer Gruppe Hämatologen, die diese Einteilung entwickelt haben) wurde bereits 1976, basierend auf dem Differenzierungsstatus der transformierten Zellen, vorgeschlagen. Hierzu wurden Daten von Patienten von insgesamt 7 Hämatologen aus Frankreich, den USA und Großbritannien gesammelt und deren Status der Blutzellentartung beziehungsweise noch vorhandener Differenzierungskapazität nach morphologischen und zytologischen Kriterien kategorisiert [15]. Aufgrund der Fortschritte innerhalb der letzten Jahre, Veränderungen auf DNA-Ebene identifizieren zu können, die für eine AML-Initiierung und deren Fortschreiten verantwortlich sein können, veranlasste die WHO weitere Klassifizierungsschemata zu etablieren. In diesen steht nicht mehr der morphologische Phänotyp der entarteten Zellen, sondern die Identifikation von Mutationen in den entarteten Zellen im Vordergrund [16, 17].

Vereinfacht sieht die WHO-Klassifikation eine Einteilung der AML in vier Gruppen vor (Tabelle 1, Tabelle 2):

1. Genetisch definierte AML mit spezifischen Chromosomenaberrationen oder Mutationen.
2. AML mit Dysplasie in mindestens zwei Linien.
3. Therapieinduzierte AML/MDS (Myelodysplastisches Syndrom).
4. AML nicht anderweitig klassifiziert.

Eine weitere im Rahmen der WHO-Klassifikation vorgenommene Neudefinition ist die Herabsetzung der Grenze zwischen MDS und AML von 30% auf 20% Blasten im Knochenmark.

Tabelle 1: Klassifikation der myeloischen Neoplasien. Einteilung nach der WHO [18]

Kategorien	Leukämieformen
Akute myeloische Leukämie (AML)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• AML mit typischen zytogenetischen Veränderungen</li> <li>• AML mit Myelodysplasie induzierten Veränderungen</li> <li>• Therapieinduzierte AML und therapieinduziertes MDS</li> <li>• AML ohne andere Einordnungsmöglichkeit</li> </ul>
Myelodysplastische Syndrome (MDS)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Refraktäre Zytopenie mit unilineärer Dysplasie (RCUD)</li> <li>• Refraktäre Anämie (RA)</li> <li>• Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten (RARS)</li> <li>• Refraktäre Anämie mit Blastenexzess (RAEB)</li> <li>• Refraktäre Zytopenie mit multilineärer Dysplasie (RCMD)</li> <li>• MDS mit isolierter Deletion 5q</li> <li>• Unklassifizierbare MDS</li> </ul>
Myeloproliferative Neoplasien (MPN)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Chronische myeloische Leukämie (CML)</li> <li>• Polycythemia vera (PV)</li> <li>• Essentielle Thrombozythämie (ET)</li> <li>• Primäre Myelofibrose (PMF)</li> <li>• Chronische neutrophile Leukämie (CNL)</li> <li>• Chronische eosinophile Leukämie (CEL-NOC)</li> <li>• Hypereosinophiles Syndrom (HES)</li> <li>• Mastozytose</li> <li>• Unklassifizierbare myeloproliferative Neoplasien (MPN-u)</li> </ul>
Myelodysplastische/myeloproliferative Neoplasien (MDS/MPN)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Chronische myelomonozytäre Leukämie (CMML)</li> <li>• Juvenile myelomonozytäre Leukämie (JMML)</li> <li>• Atypische chronische Leukämie (aCML)</li> <li>• Unklassifizierbare MDS/MPN</li> </ul>

Tabelle 2: Auszug aus der WHO-Klassifikation der AML (Die Onkologie, Springer Verlag 2007)

Kategorien	Leukämieformen
AML mit typischen zytogenetischen Veränderungen	AML mit t(8 ;21)(q22 ;q22) ; AML1-ETO
	AML mit abnormen Knochenmarkseosinophilen und inv(16)(p13q22) oder t(16;16)(p13;q22); CBFβ-MYH11
	Akute Promyelozytenleukämie – AML M3 mit t(15;17)(q22;q11-12); PML-RARα und Varianten
	AML mit 11q23-(MLL-)Anomalien
AML mit multilineärer Dysplasie (mindestens zwei Linien betroffen)	AML mit vorausgegangener Myelodysplasie/myeloproliferativem Syndrom
	De-novo-AML ohne vorausgegangenes Syndrom
Therapieinduzierte AML und therapieinduziertes myelodysplastisches Syndrom (MDS)	AML/MDS nach Gabe von Alkylanzien
	AML/MDS nach Therapie mit Topoisomerase-II-Inhibitoren
	AML/MDS nach sonstiger Chemo-/Strahlentherapie
AML ohne andere Einordnungsmöglichkeit	AML, minimal differenziert (FAB M0)
	AML ohne Ausreifung (FAB M1)
	AML mit Ausreifung (FAB M2)
	Akute myelomonozytäre Leukämie (FAB M4)
	Akute monozytäre Leukämie (FAB M5A, B)
	Akute Erythroleukämie (FAB M6)
	Akute Megakaryoblastenleukämie (FAB M7)
	Akute Basophilenleukämie
	Akute Panmyelose mit Myelofibrose
	Myelosarkom/Chlorom

Akute Leukämien sind immer durch zwei wesentliche Merkmale gekennzeichnet:

1. durch eine gesteigerte, über den eigentlichen Bedarf hinausgehende Zellproliferation und 2. durch eine Blockade der Differenzierung. Man geht davon aus, dass in mindestens zwei verschiedenen Signalwegen eine Mutation auftreten muss, um eine myelopoeische Zelle in eine Zelle zu transformieren, aus der eine AML hervorgehen kann. Molekulargenetische Mechanismen, die für die Pathogenese der AML von Bedeutung sind, können auf chromosomaler Aberration, auf Genmutationen oder auf einer veränderten Genexpression beruhen.

### Chromosomale Translokationen in AML

Bei ca. 50 % aller AML-Patienten können chromosomale Aberrationen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose detektiert werden und dienen der Risikobeurteilung für die Behandlung der AML [19, 20]. Zu den häufigen chromosomalen Aberrationen in der AML zählen die Translokationen t(8;21)(q22;q22), t(16;16)(p13.1;q22) bzw. inv(16)(p13.1q22) sowie die t(15;17)(q22;q12). Die Translokation t(8;21), die zur Bil-

derung des chimären AML1-ETO-Proteins führt, tritt mit einer Inzidenz von 12% auf, bezogen auf alle de novo AML. Gemäß der FAB-Klassifizierung ist diese Translokation bei etwa 40% aller AML Patienten der AML-FAB-M2 Untergruppe nachweisbar [21-24]. AML mit dieser Translokation werden zu den so genannten Core-Binding Faktor (CBF)-Leukämien gezählt. Beim CBF handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor der in der Hämatopoese von großer Relevanz ist.

Interessanterweise zeigten klinisch-molekularbiologische Analysen, dass die t(8;21) Translokation auch in hämatopoetischen Stammzellen zu finden ist [25-27]. Des Weiteren wird die Vermutung eines pränatalen Ursprungs der Leukämogenese durch mehrere Studien unterstützt. Zum einem zeigten Zwillingsforschungsergebnisse eine hohe Konkordanzrate von 20 bis 25% bei Leukämien auf. Zum anderen ergaben retrospektive Analysen neonataler Guthrie-Karten von Kindern, die später an Leukämie erkrankten, dass bei einigen zum Zeitpunkt ihrer Geburt bereits chromosomale Translokationen vorlagen [28, 29].

Dagegen wird angenommen, dass die akute lymphoblastische Leukämie (ALL) des Kindesalters zwar auch in utero initiiert werden kann, dass es aber weiterer postnataler Ereignisse bedarf, ehe es zu einer klinisch manifesten Leukämie kommt [30]. Dafür spricht vor allem die lange Latenzzeit zwischen der Bildung von z.B. Fusionen wie AML1-ETO (AE) in Folge einer chromosomalen Translokation und der Entwicklung einer Leukämie. Es ist daher anzunehmen, dass die ersten genetischen Läsionen schon während der embryonalen Phase auftreten, gefolgt von unterschiedlich langer präleukämischer Latenzperiode vor der eigentlichen Initiation klinischer Symptome.

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass der Karyotyp den wichtigsten Prognosefaktor bei der Diagnose darstellt und eine Einteilung der AML-Patienten in die drei Risikogruppen erlaubt: günstig, intermediär und ungünstig [31]. Ungefähr 45% der AML-Patienten weisen einen normalen Karyotyp (cytogenetic normal AML: CN-AML) auf und werden der intermediären Risikogruppe zugeordnet, obwohl diese Patientengruppe hinsichtlich ihrer Prognose sehr heterogen ist [32] (Tabelle 2).

Tabelle 3: Zytogenetisch basierte Risikogruppen in der AML (nach Mrózek 2007)

Zytogenetische Risikogruppe	Chromosomale Aberration	Fusionsgen
<b>günstig</b>	t(8;21)(q22;q22) inv(16)(p13.1q22) / t(16;16)(p13.1;q22) t(15;17)(q22;q12)	AML1-ETO CBFβ-MYH11 PML-RARα
<b>intermediär</b>	normaler Karyotyp -Y	
<b>ungünstig</b>	komplexer Karyotyp mit ≥ 3 Veränderungen inv(3)(q21q26) / t(3;3)(q21;q26) -7 MLL(PTD) (11q23)	

### Molekulare Marker bei AML

Innerhalb der Gruppe von Patienten mit normalem Karyotyp (CN-AML, cytogenetically normal AML) kommt es zu einer Unterteilung in molekulargenetisch definierte Subgruppen kommt (Abbildung 3). Dazu gehören die Gene NPM1, FLT3, CEBPA, RAS und das mixed lineage bzw. myeloid lymphoid leukemia (MLL) Gen [33]. Diese molekularen Marker spielen nicht nur bei der Prognose eine Rolle, sondern bilden auch die Grundlage für eine Individualisierung der Therapie gemäß dem genetischen Risikoprofil.

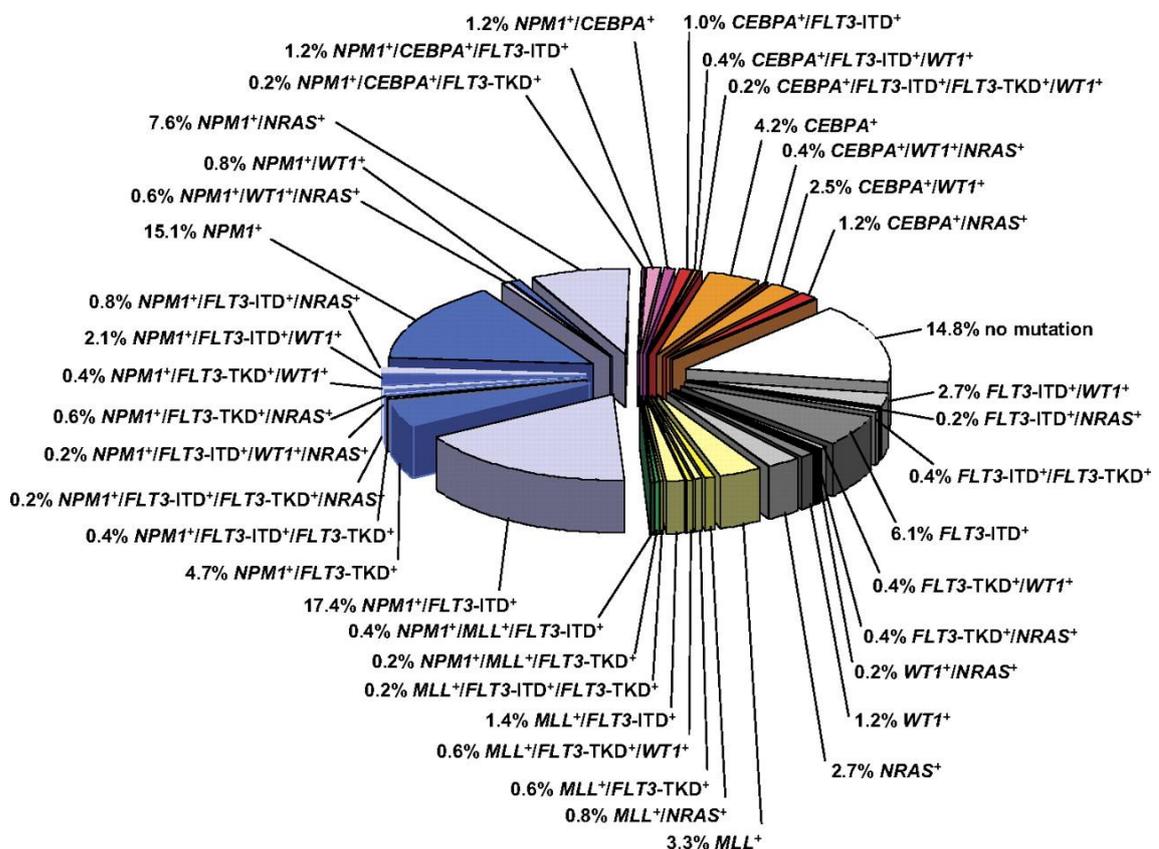


Abbildung 3: Molekulargenetisch definierte Subgruppeneinteilung der CN-AML. WT bezeichnet den Wildtyp, ein + kennzeichnet das Vorhandensein der Mutation.

Bei der AML mit komplexem Karyotyp finden sich deutlich weniger Mutationen in oben genannten Genen [34] (Abbildung 4). Mutationen im Nucleophosmin-Gen (NPM1), für welches eine Funktion als Tumorsuppressor postuliert wurde, repräsentieren die häufigsten bekannten Mutationen. Man findet sie in einem Drittel aller Patienten mit primärer AML und bei ungefähr 48 % der AML-Patienten mit normalem Karyotyp [35]. Mutationen im Bereich der Rezeptortyrosinkinase FLT3 finden sich bei etwa 25% aller AML-Patienten bzw. bei etwa 40 % der Patienten mit normalem Karyotyp. Sie zeichnen sich durch eine schlechte Prognose aus und werden nachfolgend ausführlicher

besprochen. Mutationen in n- oder kRAS werden bei 10-30 % aller Patienten gefunden [36]. Die prognostische Bedeutung von Ras-Mutationen bei AML, sowie eine eindeutige Assoziation zu bestimmten Subtypen der AML, ist nach wie vor unklar und wird kontrovers diskutiert. Mutationen in MLL-Gen sind in 5-10 % der AML-Patienten beschrieben [37]. Veränderungen dieses Gens finden sich deutlich seltener bei Patienten mit AML, als bei Patienten mit ALL, vor allem bei pädiatrischen Patienten.

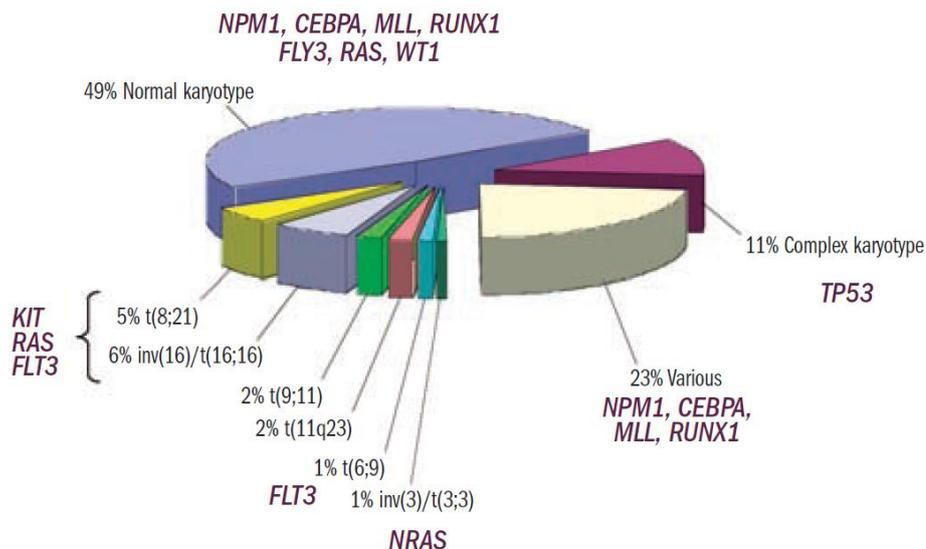


Abbildung 4: Molekulargenetisch definierte Subgruppeneinteilung bei der AML mit komplexem Karyotyp.

### 1.2.3 Therapie von AML

Eine AML ist schwer zu therapieren. Wichtige Komponente der AML-Therapie ist eine Behandlung mit aggressiven zytotoxischen Medikamenten, gefolgt von einer allogenen Knochenmarkstransplantation, vorausgesetzt die gesundheitliche Verfassung des Patienten diese zulässt. Für das Erstellen einer optimalen Behandlungsstrategie, welche zwischen minimal möglicher Toxizität und maximal nötiger Intensität abwägt, ist es nötig, möglichst früh das individuelle Risiko für ein Therapieversagen abzuschätzen. Als erstes wird eine Induktionstherapie mit Anthrazyklinen und Cytarabine durchgeführt, die in der DNA-Synthesephase der Zelle wirken, und somit vor allem in schnell proliferierenden Zellen. Somit ist das Proliferationsverhalten der Targetzellen von entscheidender Bedeutung. Eines der effektivsten Medikamente bei der Chemotherapie ist das Cytosinarabinosid (ARA-C). Es wird intrazellulär zu ARA-CTP umgewandelt, welches anstelle des natürlichen Analogons in die DNA der Zelle eingebaut wird und so u.a. den Zelltod verursachen kann. Gleichzeitig kommt es durch Hemmung der DNA-Polymerasen zu einer Blockierung der DNA-Replikation. Anthrazykline, wie Doxorubicin,

bicin sind isolierte zytostatisch wirksame Antibiotika. Sie hemmen u.a. die Wirkung der Topoisomerase II [38]. Daneben werden Inhibitoren eingesetzt, die spezifische Proteine in Signalwegen hemmen. Dazu zählen zum Beispiel Flt3-, c-Kit-, VEGFR (vascular endothelial Growth factor receptor)-, mTOR (mammalian target of rapamycin)-, Bcl2 (B-cell lymphoma 2)-Inhibitoren und HDAC (Histon-Deacetylase). Als Ras-Inhibitoren werden Farnesyltransferase-Inhibitoren (FTI) eingesetzt, die die Farnesylierung von Ras, die für seine transformierenden Eigenschaften essentiell ist, verhindern. Bei AML mit AML1-ETO oder CBFβ-MYH11 konnte eine aberrante Histon-Acetylierung gezeigt werden [39]. HDAC-Inhibitoren induzieren eine terminale Differenzierung sowie eine Hemmung der Zellzyklusprogression in diesen Zellen.

Somit dient die Induktionstherapie der deutlichen Reduktion der Tumormasse. Mit dieser Behandlung erreichen 60-80% der Patienten eine komplette klinische Remission (CR, complete remission), ein Stadium, in dem die Blastenpopulation im Knochenmark auf 5 % oder weniger reduziert ist [40]. Anschließend folgen Konsolidierungstherapien mit dem Ziel ein residuales Rezidiv dauerhaft zu verhindern. Dabei handelt es sich um eine Chemotherapie sowie eine autologe oder, häufiger, allogene Stammzelltransplantation. Trotz dieser aggressiven Therapie ist die langfristige Prognose unbefriedigend. Viele Patienten erleiden einen Rückfall.

#### 1.2.4 Akute lymphatische Leukämie

Nach zytomorphologischen und zytochemischen Kriterien unterteilt die FAB-Klassifikation ALL in drei Subtypen:

L<sub>1</sub>-Subtyp: überwiegend kleine gleichförmige Blasten mit relativ großem Kern und geringem Zytoplasmaanteil (kindlicher Typ),

L<sub>2</sub>-Subtyp: größere Blasten mit auffälligen Nukleoli und größerem Zytoplasma Anteil (erwachsener Typ),

L<sub>3</sub>-Subtyp: Blasten mit Vakuolen und basophilem Zytoplasma, vor allem bei B-ALL (Burkitt-Typ).

Die FAB-Klassifikation erlaubt jedoch wie bei der AML keinerlei Rückschlüsse auf die Prognose des Patienten. Deshalb hat sich die Einteilung anhand von immunologischen Kriterien als relevanter erwiesen. Innerhalb der WHO-Klassifikation lassen sich drei Gruppen (B-ALL, T-ALL und andere) unterscheiden, die bezüglich Krankheitsverlauf, Prognose und Therapie relevant sind [41, 42]. Eine leukämische Transformation und klonale Expansion können in den verschiedenen Reifestadien während der Lymphozytendifferenzierung stattfinden. Anhand immunologischer Marker kann die B-Linien ALL weiter unterteilt werden in die pro-B, die common, die prä-B und die reife B-ALL.

Die T-Linien ALL kann in die pro-T, die prä-T, die thymische und die reife T-ALL eingeteilt werden (Tabelle 4, Abbildung 5). Mit den immunphänotypischen Subtypen der ALL sind spezifische klinische und molekulargenetische Veränderungen assoziiert.

Tabelle 4: Immunologische Klassifikation der ALL entsprechend den Definitionen einer europäischen Arbeitsgruppe, der EGIL (European Group for Immunologic Classification of Leukemias)

Typ und Subtyp	Häufigkeit des Auftretens
<b>B-Zell ALL</b>	<b>75%</b>
Pro-B oder prä-prä-B	20%
Common	40%
Prä-B	10%
Reife B	5%
<b>T-Zell ALL</b>	<b>25%</b>
Pro-/prä-T	6%
Kortikale/thymische T	13%
Reife T	6%

Die bei ALL zu findenden genetischen Veränderungen korrelieren häufig eng mit bestimmten Immunphänotypen und unterscheiden sich im Kindes- und im Erwachsenenalter erheblich [43] (Abbildung 5). Dementsprechend werden meist andere Marker zur Diagnose der ALL bei Kindern und Erwachsenen herangezogen.

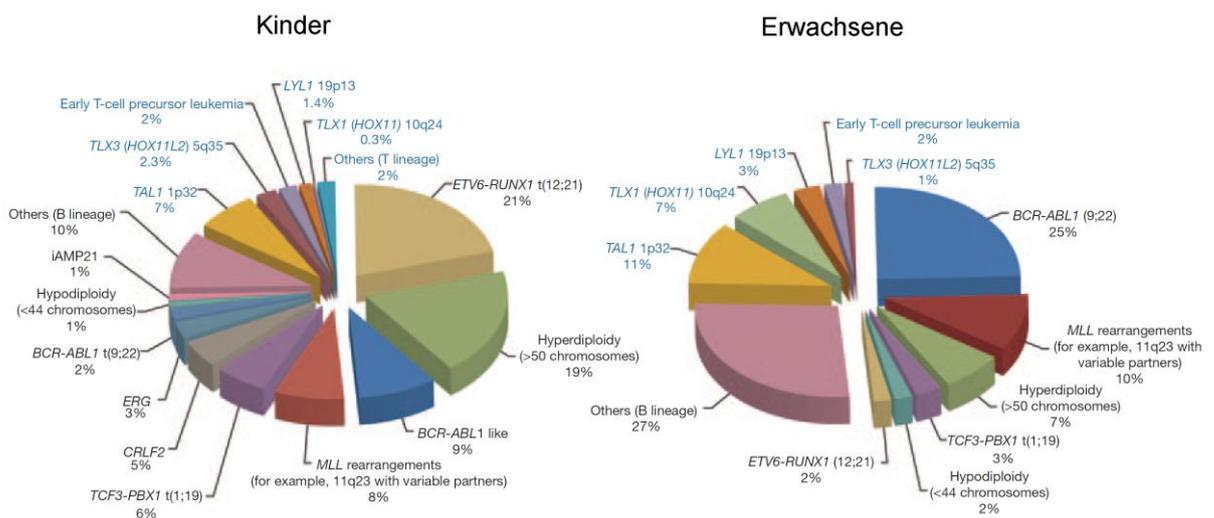


Abbildung 5: Verteilung genetischer Läsionen bei ALL. Basierend auf Daten der SEER Programm (Surveillance, Epidemiology, and End Results, 1973-2012). Entnommen und modifiziert aus [44].

t(9;22)(q34;q11) BCR-ABL

Das Philadelphia-Chromosom mit der Translokation t(9;22)(q34;q11) stellt die häufigste Translokation (20-36%) der erwachsenen Patienten dar. Dagegen sind nur ca. 3-5% der Kinder BCR-ABL-positiv. Die Prävalenz steigt kontinuierlich vom frühen Kindesalter bis etwa zum 35. Lebensjahr an.

t(11;19)(q23;p13.3) MLL-ENL

Die zweithäufigste strukturelle Chromosomenveränderung bei ALL beruht auf der MLL-Translokation. Translokationen unter Beteiligung des MLL-Gens auf 11q23 finden sich bei etwa 5-10% der akuten Leukämien (ALL und AML). Eine große Vielzahl verschiedenen Loci, in die MLL transloziert wird, ist bekannt.

t(12;21)(p13;q22) TEL-AML1 (ETV6-RUNX1)

Häufigste Aberration bei Kindern. Es hat die höchste Prävalenz im Alter von 4 Jahren, danach nimmt die Häufigkeit kontinuierlich ab und kommt jenseits des 35. Lebensjahres nicht mehr vor.

Die Molekulargenetik sowie klinische und morphologische Parameter bilden die Grundlage der Risikostratifikation der B-ALL und sind in der Tabelle 5 dargestellt [45]. Die Behandlung erfolgt nach Risikogruppen hinsichtlich der Rezidivgefahr. Bis auf die B-ALL, welche wie die reifen B-Zell Non-Hodgkin-Lymphome behandelt wird, werden allen genannten Unterformen ähnlich behandelt. Die Therapie findet in mehreren Phasen statt und dauert insgesamt etwa 2 Jahre: Induktions-, Konsolidierungs-, Reintensivierungs- und Erhaltungstherapie. Durch die Induktionstherapie soll eine komplette Remission erzielt werden, welche durch die weiteren Phasen erhalten bleiben soll. Wesentliche Bestandteile diese Chemotherapie sind Kortison, Vinca-Alkaloide, Anthracycline, Asparaginase, Cytarabin, Cyclophosphamid, Methotrexat, sowie Pyrimidinanaloga. Bei manchen Patienten erfolgt zusätzlich eine Strahlentherapie des Zentralnervensystems. In bestimmten Fällen kommt noch eine Hochdosis-Chemotherapie mit anschließender Stammzelltransplantation zum Einsatz.

Tabelle 5: Risikogruppen in der ALL

<b>Standardrisiko</b>
B-Vorläufer ALL Komplette Remission nach der Induktion I Leukozytenzahl < 30.000/ $\mu$ l Keine molekularen Risikofaktoren
<b>Hochrisiko</b>
B-Vorläufer ALL Leukozytenzahl > 30.000/ $\mu$ l Späte komplette Remission MLL-AF4
<b>Höchstrisiko</b>
BCR-ABL

### 1.2.5 Minimale Resterkrankung

Als minimale Resterkrankung (MRD, Minimal Residual Disease) bezeichnet man das Vorkommen von residualen Blasten, die nach Induktions- bzw. Konsolidierungsphase im Knochenmark persistieren. Es ist ein weiterer zuverlässiger Risikofaktor, der das Therapieansprechen reflektiert und hat innerhalb der letzten Jahre bei der prognostischen Einteilung der Patienten hinsichtlich der Rezidivwahrscheinlichkeit von akuten Leukämien zunehmend an Bedeutung gewonnen, auch wenn diese geringer bei der AML als bei der ALL zu bewerten ist. In mehreren Studien konnte eine enge Korrelation zwischen MRD-Niveau mit dem klinischen Verlauf, der Prognose und dem Rezidivrisiko gezeigt werden [46-48]. Die Diagnose der minimalen Resterkrankung durch molekulargenetische Verfahren wie der Polymeraseketten-Reaktion (PCR)-Analyse oder der Immunphänotypisierung mittels Durchflusszytometrie bietet die Möglichkeit, die weitergehende Therapie noch genauer an individuelle Bedürfnisse anzupassen. Das Prinzip dabei ist der Nachweis leukämiespezifischer zellulärer und/oder molekularer Veränderungen, um leukämische Blasten von normalen hämatopoetischen Zellen zu differenzieren [49, 50]. Die Durchflusszytometriemethode basiert hauptsächlich auf dem Nachweis von Leukozyten mit aberrantem Immunophänotyp, einer Kombination von Oberflächenantigenen, die auf normalen hämatopoetischen Zellen nicht vorkommt [51]. Und mittels PCR werden entweder Gen-Rearrangements oder die Amplifikationen von Fusionstranskripten nachgewiesen.

### 1.2.6 Rezidive und Resistenzmechanismen

Trotz deutlicher Optimierung der therapeutischen Konzepte sind die Überlebensraten von erwachsenen Patienten mit AML bzw. ALL weiterhin unbefriedigend. So liegt die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten mit AML bei etwa 30% bzw. 35% bei Patienten mit ALL [52]. Die Ursache hierfür ist u.a. die Resistenz der Erkrankungen gegen die primäre Chemotherapie sowie die hohen Rezidivraten (bis zu ca. 50%).

Eine der wichtigsten Gründe für die hohen Rezidivraten sowohl bei der AML als auch bei der ALL stellt die Existenz der sogenannten leukämischen Stammzellen (LSCs) dar (Abbildung 6). Diese haben mit den hämatopoetischen Stammzellen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Dormanz/Quieszenz, u.a. durch ihre Interaktion (Adhäsion) mit der Stammzellnische gemeinsam [53]. Quieszenz ist ein Stadium des Zellzyklus, in dem sich HSC zumeist befinden. Hierbei findet keinerlei Teilung statt. Die Zelle befindet sich in einem Ruhezustand. Da aber die Replikation einen wesentlichen Angriffspunkt für die herkömmlichen zellzyklusabhängigen Zytostatika stellt, entgehen die LSCs zumindest teilweise dem Zugriff durch konventionelle Chemotherapeutika [54, 55].

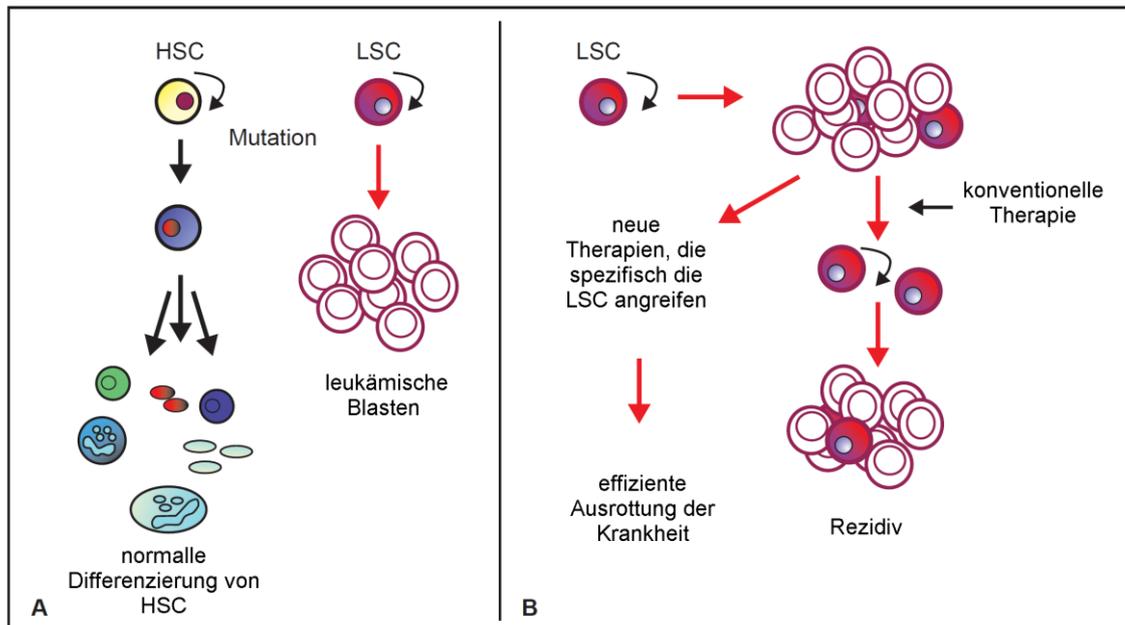


Abbildung 6: (A) Erklärungsmodell zur Entstehung von Leukämien aus leukämischen Stammzellen (LSC). (B) Ein vielversprechende Therapieansatz ist ein spezifisch gegen LSC gerichteter Angriff. Übernommen und modifiziert aus [55]

Das Entstehen chemoresistenter Subpopulationen von leukämischen Blasten bereitet ebenfalls große Schwierigkeiten in der Therapie und ist mit einer deutlich ungünstigeren Prognose assoziiert. Ursächlich hierfür ist zum einem auf der Organismus-Ebene eine verminderte Absorption von Zytostatika im Organismus, zum Beispiel infolge einer erhöhten Ausscheidung des Medikamentes oder verminderter Diffusion aus dem Blut. Zum anderen erschweren auf der zellulären Ebene Mutationen und Selektion von resistenten Tumorzellen gegenüber den nicht-chemoresistenten Blasten eine effektive Therapie [56, 57]. Zu den wichtigsten zellulären Mechanismen zählen der aktive Transport des Wirkstoffs aus der Tumorzelle, z.B. infolge einer Überexpression der so genannten Multidrug-Transportern [58], verminderter Transport des Wirkstoffs in die Tumorzelle, Inhibition der Apoptose oder Desregulation des Zellzyklus-kontrolle. Man unterscheidet dabei zwischen intrinsischer, vor der Therapie bereits vorhandenen Chemoresistenz, bei der die Blasten bereits auf die primäre Therapie nicht ansprechen und einer im Laufe der Chemotherapie erworbenen Resistenz.

Im Allgemeinen ist die Prognose für Patienten, die nicht auf die primäre Therapie ansprechen oder nach einer ersten Remission rezidivieren, eher ungünstig, wobei der Zeitpunkt des Rezidivs eine wichtige Rolle spielt. Je länger die erste komplette Remission anhält, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, nach dem Rezidiv eine zweite komplette Remission zu erreichen. Die Dauer der ersten Remission gilt als wichtigster prognostischer Faktor im Rezidiv – sowohl für das krankheitsfreie Überleben als auch für das Gesamtüberleben.

### 1.2.7 Leukämogenese und Krebsstammzellen

In der gegenwärtigen Forschung werden unterschiedliche Modelle der Leukämie-Entstehung diskutiert. Bedeutende Rolle spielt dabei die „Krebsstammzell“-CSC-Hypothese und das Konzept der klonalen Evolution. Das Konzept der Tumorstammzellen ist ein relativ neuer Bereich der Stammzell-Forschung und geht auf die kanadischen Forscher Dominique Bonnet und John Dick zurück [59]. Wurde am Anfang teilweise umstritten angesehen, inzwischen aber durch immer mehr klare Hinweise untermauert wird (Abbildung 7).

#### Die Tumorstammzellhypothese

Die Hypothese postuliert, dass auch Tumore Stammzellen besitzen. Es handelt sich dabei um eine kleine Untergruppe von Knochenmarkszellen mit typischen Eigenschaften adulter Stammzellen, die durch Mutationen aus normalen Stammzellen oder reifen Körperzellen entstanden sind und eine treibende Kraft sowohl für die Einleitung und die Metastasenbildung darstellen, sowie für die Resistenz gegen manche Therapien verantwortlich sind. Sie machen oft nur weniger als ein Prozent der gesamten Krebszellen aus und wurden ursprünglich in Leukämien, aber nun auch in einer Reihe von soliden Tumoren wie Prostata-, Pankreas-, Hirn- und Darmkrebs nachgewiesen.

Die besondere Widerstandskraft gegen konventionelle Tumorbehandlungen, die vor allem sich teilende Gewebe- und Tumorzellen angreifen, beruht auf den Eigenschaften, die sie mit normalen Stammzellen gemeinsam haben: ruhender Zustand (Quieszenz), effiziente DNA-Reparatur, unbegrenzte Kapazität zur Selbsterneuerung und Proliferation, hohe Expression von Multidrug-Resistenz-Typ-Membrantransporter, um die Giftstoffe zuverlässig aus der inneren der Zellen hinauszubefördern, und Schutz durch Existenz einer speziellen Mikroumgebung (der sogenannten Stammzellnische), die einen sicheren Zellaufbewahrungsort darstellt (Abbildung 2).

Bis vor wenigen Jahren war wenig bekannt, welche Signalstoffe die Stammzellen aus ihrem Schlafzustand wecken können. Die Vermutung über die Funktion der HSCs legte nahe, dass die Stammzellen vor allem unter Stressbedingungen aktiviert werden müssen, wie zum Beispiel bei Blutverlust oder Infektionen, wenn viele reife Blutzellen verloren gehen. Die Gruppe um Professor Andreas Trumpp aus dem Deutschen Krebsforschungszentrum veröffentlichte im Jahre 2009 in Nature, dass der Immunbotenstoff Interferon-alpha ( $IFN\alpha$ ) durch direkte Beeinflussung zur Aktivierung ruhender Stammzellen führt [60-62]. Gegenwärtig wird intensiv geforscht, wie man diese neuen Erkenntnisse für die Krebsmedizin nutzbar machen kann.

Die Behandlung von CML mit Imatinib (Glivec) gilt heute als eine erfolgreiche molekular gerichtete Therapie. Es handelt sich dabei um einen spezifischen Proteinkinase-Inhibitor, der nicht wahllos proliferierende Zellen angreift, sondern Krebszellen an molekularen Besonderheiten erkennt und gezielt vernichtet. Bei der CML betrifft die Muta-

tion die BCR-ABL-Tyrosinkinase, die von Krebszellen überexprimiert und durch Imatinib gehemmt wird.

Allerdings bietet Imatinib keine Heilung. Das Absetzen des Medikamentes führt innerhalb weniger Wochen zu einem Rückfall. Die wenigen verbliebenen Krebsstammzellen scheinen in besonderen Stammzellnischen im Knochenmark zu überdauern. Sie sind somit Therapie-resistent und sorgen für Nachschub. Die neuen Ansätze, Krebsstammzellen aus ihren Nischen zu locken, könnte zu einem Durchbruch in der Krebstherapie führen. Vorläufigen Daten, die Imatinib-Behandlung mit INF $\alpha$  zu kombinieren, scheinen erfolgreich. Für eine endgültige Bewertung sind aber noch langfristige Studien zur Remission und Verträglichkeit notwendig [63, 64].

### Das Modell der klonalen Evolution

Das Konzept der klonalen Evolution während der Tumorgenese wurde von Nowell entwickelt und besagt, dass Krebszellen verschiedene Kombinationen von Mutationen im Laufe der Zeit erwerben, wobei sich die aggressivsten Zellen durch natürliche Selektion durchsetzen und zur Progression des Tumors führen [65]. Dabei nimmt man an, dass die Initiation eines Tumors erst nach multiplen Ereignissen, infolge eines Selektionsvorteils und genetischer Instabilität, in differenzierten oder undifferenzierten Zellen, stattfinden kann. Somit entsteht im Laufe der Zeit eine Mischung aus Zellen, die diverse Mutationen akkumuliert haben und die durch Zufall Proliferationsvorteile und/oder Resistenzen gegen Apoptose erworben haben. Diese Zellen können in Krebszellen mit neuen Eigenschaften, wie Metastasierung, Invasivität, Therapieresistenzen und Rezidivpotential transformieren und zu einem heterogenen Tumorphänotyp führen [65-67].

### Vergleich beider Konzepte

Beide Konzepte, die Stammzellhypothese und das Modell der klonalen Evolution stimmen in vielen Aspekten überein. Zum Beispiel gehen beide von der Existenz einer Ursprungszelle („Cell of Origin“) aus, die durch Akkumulation von Mutationen das Tumorentstehen initiieren [68]. Des Weiteren werden Faktoren der unmittelbaren Umgebung (Microenvironment, Stroma) sowie stammzelltypischen Eigenschaften, die den Tumorzellen ein unbegrenztes Proliferationspotenzial verleihen, berücksichtigt [69].

Der wesentliche Unterschied beider Konzepte liegt in der Erklärung der Tumorerheterogenität. Nach der Stammzellhypothese unterliegen vor allem die Stamm- und Vorläuferzellen mit Selbsterneuerungspotential der malignen Transformation. Damit trägt nur eine kleine Subpopulation zur Progression des Tumors bei, während im klonalen Evolutionsmodell jede Zelle in den jeweiligen Differenzierungsstufen der normalen

Reifungsstadien sich verändern und somit die Fähigkeit zur Selbsterneuerung erlangen kann. Daraus ergeben sich unterschiedliche Erklärungsmöglichkeiten für Therapieresistenz: Sind nur die Tumorstammzellen therapieresistent oder selektiert die Therapie für entsprechend resistente Klone? Nach den heutigen Erkenntnissen müssen bei der Entwicklung effizienterer Ansätze zur Therapie beide Konzepte der Stammzellmodells gleichermaßen berücksichtigt werden.

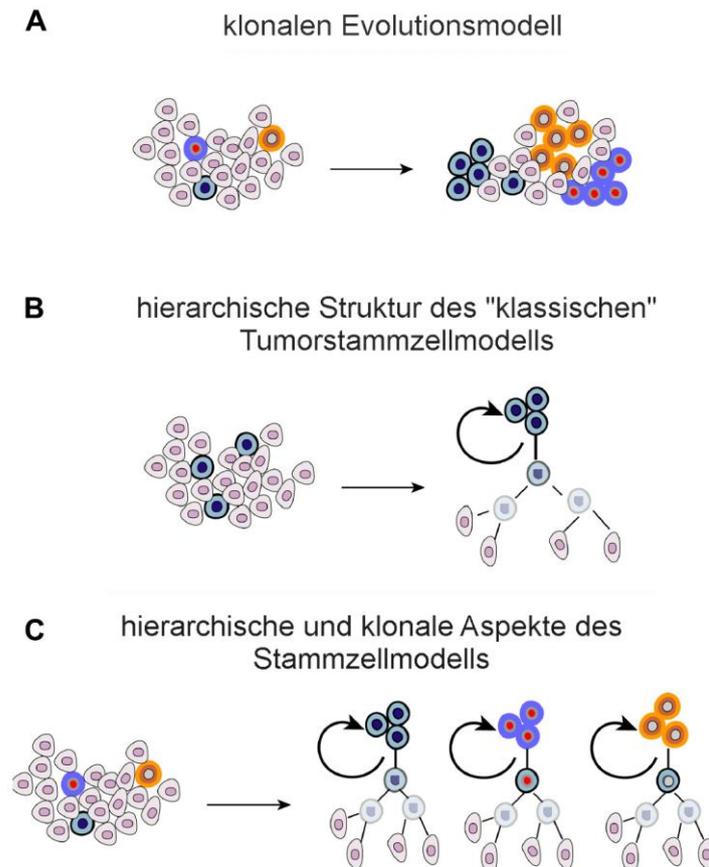


Abbildung 7: Darstellung der unterschiedlichen Modelle zur Erklärung der Tumorentstehung. (A) Das Modell der klonalen Evolution: dabei weisen alle Zellen gleiche tumorigene Kapazität auf. Mutierte Zellen werden durch Erwerb onkogener Eigenschaften, selektiert und expandiert. (B) Die Tumorstammzelltheorie: in diesem Modell besteht der Tumor aus wenigen Zellen mit Stammzeleigenschaften und der Fähigkeit zur Selbsterneuerung sowie aus sich stark vermehrenden Vorläuferzellen. Aus diesen Vorläuferzellen entwickeln sich die mehr oder weniger differenzierten Zellen der eigentlichen Tumormasse. (C) Das aktuelle Modell berücksichtigt Aspekte beider Theorien. Übernommen aus [70]

### 1.3 Die „Two-hit“-Hypothese

Das „Two-Hit-Modell“ nach Knudsons beschreibt die Tumorentstehung als einen mehrstufigen Prozess, in dem erst nach einem kompletten Funktionsverlust beider Allele

eines Gens sich ein Tumor entwickeln kann [71, 72]. Daraus postulierten Dash und Gilliland, 2001 die Hypothese, dass für die Entwicklung akuter Leukämien mindestens zwei verschiedene genetische Ereignisse stattfinden [73]. In den letzten Jahren gibt es immer mehr Hinweise aus den klinischen Mutations-Screening Studien und aus Mausmodellen, die diese Hypothese bestätigen. Im Falle akuter Leukämien basiert diese Annahme u.a. darauf, dass die in Patienten gefundenen, genetischen Mutationen im Mausmodell alleine oft nicht in der Lage sind, eine Leukämie zu induzieren [74, 75]. Des Weiteren unterscheidet man bei diesen Mutationen zwischen zwei Klassen: Klasse-I-Mutationen, die ein proliferatives Signal und/oder Überlebensvorteil der hämatopoetischen Vorläuferzellen vermitteln. Hierzu zählen u.a. aktivierende Mutationen in FLT3, RAS, BCR-ABL oder auch KIT [76-78]. In ALL-Patienten werden auch Veränderungen von FLT3 sowie aktivierende Mutationen der Janus-Kinasen JAK1-3 gefunden, die zu einer dauerhaften Aktivierung des Signalwegs führen [79].

Klasse-II-Mutationen führen zu einer Blockade der Differenzierung in den betroffenen Zellen. Vertreter dieser Gruppe sind u.a. Fusionsgene infolge chromosomaler Translokationen, wie AML1-ETO, PML-RAR $\alpha$ , CBF $\beta$ -MYH11 und Punktmutation von Transkriptionsfaktoren der Hämatopoese wie z.B. AML1, CEBP $\alpha$  und Pu.1 [73, 80-82]. Bei ALL-Patienten betreffen die Klasse-II-Mutationen Transkriptionsfaktoren, wie PAX5 und IKAROS und sind in den meisten Fällen mit einem B-lymphoiden Phänotyp assoziiert [83].

Basierend auf diesen Befunden ergibt sich die Annahme, dass Mutationen beider Klassen in der Pathogenese akuter Leukämien kooperieren [84]. Durch das zunehmende Wissen über die Rolle epigenetischer Mechanismen wie DNA-Methylierung und Histonacetylierung, welche die Genaktivität ebenfalls beeinflussen, konnte Knudsons Theorie um den Faktor der epigenetisch bedingten Genveränderungen erweitert werden (Abbildung 8).

Außerdem zeigen einige Studien, dass bestimmte Mutationen duale Funktionen haben können. Somit ergeben sich Überlappungen in deren Klassifizierung. Zum Beispiel FLT3-ITD zählt gemäß der Klassifizierung von Dash und Gilliland zu den Mutationen der Klasse I, die einen Zellteilungs- und Überlebensvorteil vermittelten. Allerdings zeigen Analysen in myeloischen Vorläuferzelllinien, dass FLT3-ITD auch die Differenzierung dieser Zellen beeinträchtigt und somit eine myeloproliferativen Erkrankungen (MPD) induziert [85], sowie einen Block in der frühen B-Lymphozyten-Entwicklung erzeugt [86]. Deshalb fungiert FLT3-ITD zusätzlich auch als schwache Klasse II-Mutation.

Durch neue Technologien wie Next Generation Sequencing (NGS) kann das gesamte Genom sequenziert und auf Mutationen auf DNA- und RNA-Ebene genauestens analysiert werden. Die Ergebnisse solcher Studien deuten immer mehr darauf hin, dass die

„Two-hit“-Hypothese nicht auf alle Leukämiepatienten übertragbar ist. In einer gerade erschienen Studie, in der 200 Proben von de-novo AML Patienten sequenziert und analysiert wurden, konnte nur rund 20 % der Proben Mutationen beider Klassen gleichzeitig nachgewiesen werden. Mutationen in epigenetischen Regulatoren traten in zweidrittel aller analysierten AML-Proben auf. Somit stellen sie eine neue Klasse von Mutationen in Leukämien dar. [87]

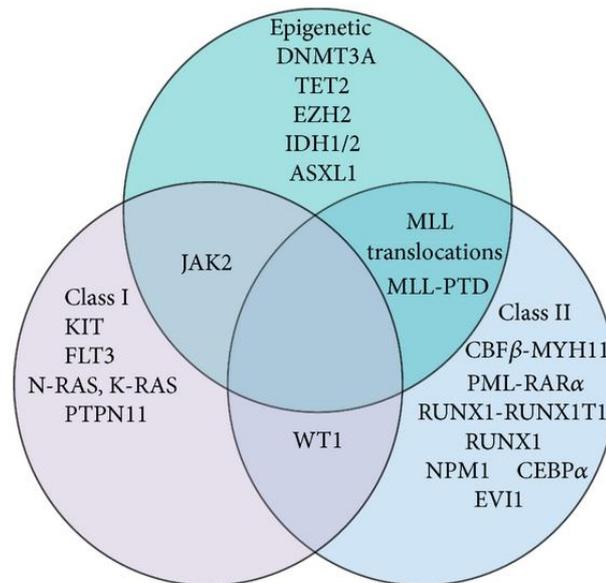


Abbildung 8: Das Venn-Diagramm zeigt einige der wichtigsten Mutationen bei AML, unterteilt nach Klasse-I-, Klasse-II-Mutationen und epigenetischen Faktoren (entnommen aus „The Epigenetic Landscape of Acute Myeloid Leukemia“, Advances in Hematology 2013).

## 1.4 Das RAS Gen

Die RAS Gene wurden ursprünglich als virale Onkogene in Rattensarcom (Rat sarcoma, RAS) identifiziert [88]. Zehn Jahre später wurden die humanen Onkogene identifiziert, die in einigen Tumorarten zu finden sind [89]. Da aber auch normale Zellen ähnliche Gene aufweisen, wird RAS als Protoonkogene bezeichnet. Zur humanen Gruppe der RAS-Gene gehören drei Hauptvertreter: kRAS (Kirsten), hRAS (Harvey) sowie nRAS. RAS Proteine sind Signalschaltmoleküle, die nach Aktivierung durch Wachstumsfaktoren mit Rezeptortyrosinkinaseaktivität (RTKs) GTP binden und damit die Signaltransduktionskaskade weiterleiten. Sie regulieren somit fundamentale zelluläre Prozesse wie Proliferation-, und Differenzierungsprozesse sowie Apoptose. RAS wechselt zwischen zwei Zuständen, aktiven gebundenem GTP (RASG) oder inaktiven zu GDP hydrolysiertes Form (RAS). Nur im GTP-gebundenen Zustand nimmt RAS eine Konformation

ein, die die Interaktion und Stimulation von Effektormolekülen ermöglicht, die ihrerseits die Signalweiterleitung vermitteln. Unter Abspaltung einer Phosphatgruppe wird GTP zu GDP hydrolysiert und somit wieder inaktiviert (Abbildung 9), was die Signalweiterleitung durch Loslösung von Effektormolekülen beendet. Da sowohl die GTP-Hydrolyse als auch der Nukleotidaustausch relativ langsame Prozesse sind, werden sie durch zusätzliche Proteine wie Nukleotid-Austauschfaktoren (GNEFs, guanine-nucleotide exchange factor) und GTPase-aktivierende Proteine (GAP) beschleunigt. Durch Wechselwirkung mit verschiedenen Effektoren aktiviert GTP-gebundenes RAS eine Kaskade von Signalwegen wie z.B. MAP-Kinase- und ERK-Signalwege [90, 91].

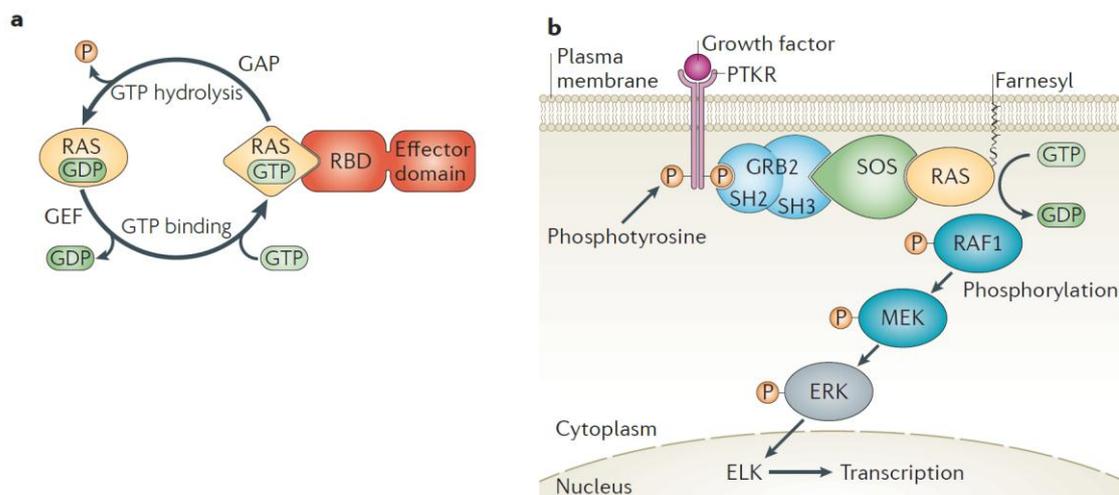


Abbildung 9: RAS Signalwege. (A) Aktivierung und Deaktivierung von RAS-Proteinen. (B) Der „klassische“ RASs-Signalweg, RAS-RAF-MEK-ERK-Kaskade [92].

RAS ist mit einer Farnesylgruppe post-translational modifiziert, welche essentiell für seine biologische Funktion ist. Sie vermittelt die Assoziation mit der Zytoplasmamembran. Ohne diese Modifikation verbleibt RAS-Protein funktionslos im Zytoplasma.

Störungen in der Regulation von RAS Genen führen zu einer konstitutiven Aktivierung von RAS-Proteinen und zur Folge zu einer unkontrollierten Zellteilung führt. Die Mutationen betreffen in der Regel den homologen Bereich der GTPase-Funktion, der für die Funktion der RAS-Proteine entscheidend ist. Daher ist es nicht überraschend, dass mutierte RAS Proteine bei ca. 30 % aller menschlichen Tumorzellen nachgewiesen werden, allerdings mit unterschiedlicher Inzidenz bei verschiedenen Tumorarten.

Aktivierende RAS Mutationen kommen in beinahe allen malignen Tumoren des Menschen vor. Am häufigsten in Pankreas- (ca. 90 %), Kolon- (ca. 50 %) und Schilddrüsenkarzinom (ca. 50 %). Bei malignen hämatologischen Erkrankungen werden RAS-Mutationen in unterschiedlicher Frequenz nachgewiesen, insbesondere in Erkrankungen der myeloischen Reihe wie MDS und AML. Bis zu 25% aller Patienten mit AML weisen eine RAS-Mutation auf [36, 93-97]. Hauptsächlich im NRAS- und KRAS-, seltener in HRAS-Gen [98, 99]. Dabei finden die Mutationen bei der AML-assoziierten Veränderungen am häufigsten in den hoch konservierten Codons 12, 13 oder 61 [100].

Tabelle 6: Tumore des Menschen mit hohem Prozentsatz an RAS-Mutationen

<i>Maligne</i>		
Pankreaskarzinom	kRAS 12	90 %
Kolonkarzinom	kRAS	50 %
Schilddrüsenkarzinom	k-, h-, nRAS	50 %
Lungenkarzinom	kRAS	45 %
AML	n-, kRAS	25 %
<i>Benigne</i>		
Keratoakanthom	hRAS	30 %

Die klinische Relevanz, sowie die Frage, ob das Auftreten während der AML ein frühes oder spätes Ereignis im Verlauf der Krankheitsprogression ist, konnte bislang nicht abschließend geklärt werden. Die Beobachtung, dass nicht allen Blasten einer leukämischen Population eine RAS-Mutation tragen, lässt ein spätes Ereignis der Mutation im Laufe der Zeit vermuten [101]. Andererseits, bei 10% der Patienten mit MDS werden bereits in prämaligen Klonen RAS-Mutationen nachgewiesen. Dabei geht bei etwa 30 % der Fälle die MDS in eine AML über [102, 103]. Das heißt möglicherweise können RAS-Mutationen in unterschiedlichen Erkrankungsstadien auftreten. Bis jetzt ist es aber nicht eindeutig geklärt, inwieweit das Vorhandensein einer RAS-Mutation als molekulargenetischer Marker für das Ansprechen auf eine Therapie, Remission oder Erkrankungsrezidiv verwendet werden kann.

Die RAS Hemmer die sogenannten Farnesyltransferase-Inhibitoren (FTIs) können Anlagerung von Farnesyl-Gruppen bremsen und somit RAS Funktion hemmen. Bis jetzt wurden Ftase-Inhibitoren nur in hämatologischen Erkrankungen zugelassen. Dagegen

haben sie bei soliden Tumoren (Kolon, Pankreas) bisher keine überzeugende Wirkung gezeigt.

## 1.5 Die Rezeptortyrosinkinase FLT3

FLT3 (Fms-like tyrosine kinase 3) gehört zu der Klasse III Rezeptortyrosinkinase-Familie. Weitere Rezeptoren dieser Klasse sind c-KIT, PDGFR $\alpha/\beta$  (Platelet Derived Growth Factor alpha/beta) und M-CSF. FLT3 wird auf hämatopoetischen Stammzellen sowie Vorläuferzellen exprimiert [104]. Mutierte Formen dieses Rezeptors mit konstitutiver Aktivität werden häufig in Patienten mit AML gefunden. In der Abbildung 10 ist eine vereinfachte Struktur eines FLT3 Rezeptors dargestellt [105].

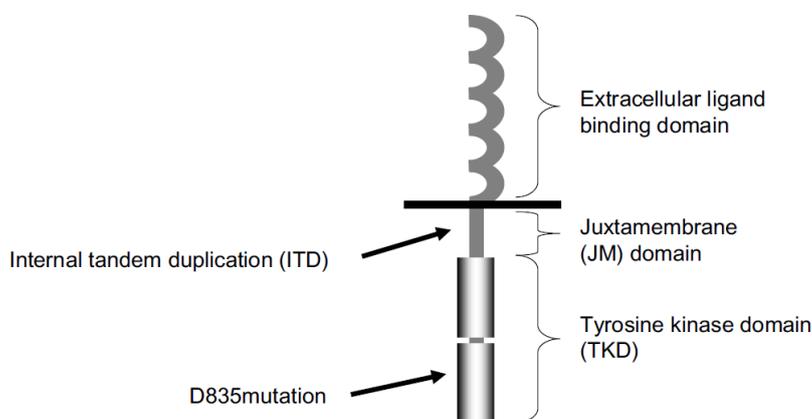


Abbildung 10: Schematische Darstellung der FLT3 Rezeptor Tyrosinkinase. Diese beinhaltet eine extrazelluläre Domäne mit 5 Immunoglobulin-ähnlichen Domänen, eine Transmembran-Domäne, einer Juxtamembran-Domäne (JM) und zwei konservierte intrazelluläre Tyrosinkinase-Domänen (TKD). FLT3-ITD Längenmutation befindet sich in der JM-Domäne. Entnommen aus [105].

Die Tyrosinkinaseaktivität von FLT3 wird normalerweise nach Liganden-abhängiger Bindung induziert und führt zur Autotyrosinphosphorylierung des Rezeptors und zur Aktivierung verschiedener Signalkaskadewegen, wie etwa Ras/MAPK (mitogen-activated-protein-kinase), PI3K-(Phosphoinositid-3-Kinase)/AKT sowie STAT5 (signal transducer and activator of transcription 5), die eine wichtige Rolle bei Zellproliferation und Differenzierung, sowie Regulation der Apoptose spielen (Abbildung 11).

STAT5 ist ein Transkriptionsfaktor und scheint eine wichtige Rolle in der Ausbildung von hämatopoetischen Neoplasien zu spielen. Er führt des Weiteren zu einer Hemmung von CCAAT/enhancer-binding protein  $\alpha$  (c/EBP $\alpha$ ) und PU.1 (ein Transkriptionsfaktor). Diese Proteine spielen eine wichtige Rolle in der Differenzierung von myeloischen Zellreihen.

Der FLT3-Rezeptor ist beteiligt an der Regulation der Proliferation, Differenzierung und Überleben von hämatopoetischen Zellen.

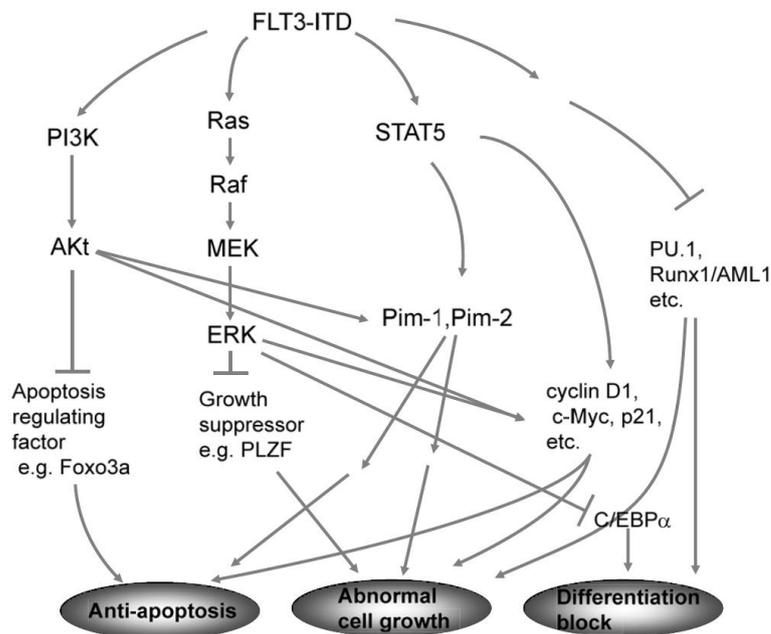


Abbildung 11: FLT3-induzierte Signalwege

### 1.5.1 Die Rolle von FLT3 in der Leukämogenese

Obwohl Mutationen im FLT3-Gen in erster Linie an der AML Pathogenese beteiligt sind, zeigen lymphoide Vorläuferzellen eine hohe physiologische FLT3-Expression, die dann mit Zunahme der Zelldifferenzierung komplett verschwindet. Dies bestätigt die Vermutung, dass FLT3 eine wichtige Rolle in der frühen Entwicklung spielt. Außerdem zeigen leukämische Blasten eine hohe physiologische FLT3-Expression. FLT3 ist in nahezu 100% der B-ALL, in einem Teil der T-ALL und in 90% der AML überexprimiert [106-108].

Die Längenmutation (Interne Tandem Duplikation, ITD) der juxtamembranären Domäne (JMD) sowie eine Punktmutation, meist an der Aminosäureposition D835 in der TKD (Tyrosinkinasedomäne), sind die zwei häufigsten Mutationen des FLT3-Gens [109, 110]. Die Interne Tandem Duplikationen des FLT3-Rezeptors entstehen durch Duplikation von Nukleotiden in einer für JMD kodierenden Sequenz. Das Leseraster wird dabei nicht verändert. Die Länge der ITD variiert hierbei von 3 bis  $\geq 400$  Basenpaaren [111]. FLT3-ITDs sind sehr heterogen, was ihre Länge [112], Allelic Ratio [113], Insertionsstelle [114, 115] sowie die Anzahl der FLT3-ITD-Klone [116] pro Pati-

ent betrifft. Dabei zeigt sich eine steigende Prävalenz der ITD-Mutationen mit zunehmendem Alter.

FLT3-ITD wird in ca. 30 % aller AML Fälle vorgefunden und ist mit schlechter Prognose und erhöhten Rückfallquoten verbunden [117, 118]. Dagegen scheinen FLT3 TKD Mutationen keinen Einfluss auf die klinischen Verlauf von AML-Patienten zu haben [119, 120]. In beiden Fällen beruht der Phänotyp auf einer konstitutiven Aktivierung des Rezeptors, allerdings ist unklar welche Mechanismen zu einem Auftreten von unterschiedlichen Phänotypen führen. Möglicherweise bewirkt die unterschiedliche Struktur des FLT3- Proteins, dass unterschiedliche Signalwege aktiviert werden.

In Mausmodellen wurde gezeigt, dass FLT3-TKD einen lymphatischen Phänotyp und FLT3-ITD eine myeloproliferative Erkrankung induziert, aber keine Leukämie. Die unterschiedliche Aktivierung von STAT5 könnte dabei eine Rolle spielen [121]. TKD führt, im Vergleich zur ITD, nur zu einer geringfügigen Induktion von STAT5-Zielgenen und hemmt auch nicht die für die myeloische Differenzierung wichtigen Proteine c/EBP $\alpha$  und PU.1.

Darüber hinaus kommen, wenn auch mit einer geringeren Frequenz, FLT3-Mutationen auch in der ALL vor [122, 123]. Auch wenn bisher angenommen wird, dass vorwiegend Mutationen in den Kinasedomänen (TKD) mit dem Krankheitsbild einer ALL besonders im Kindesalter assoziiert sind [124, 125], sind beide Mutationen nicht ausschließlich in nur einer der Leukämieform zu finden. So wurden auch FLT3-ITD Mutationen bei Patienten mit ALL sowohl bei Kindern als auch in Erwachsenen identifiziert [109, 126-129].

### 1.5.2 FLT3-Tyrosinkinaseinhibitoren

Eine Mutation der Rezeptortyrosinkinase FLT3 ist ein ungünstiger prognostischer Indikator bei Patienten mit AML. Die Induktionstherapie selbst wird durch den FLT3 Mutationsstatus nicht beeinflusst. Allerdings beim Vorliegen einer FLT3 Mutation während Remission werden Patienten in Gruppen mit unterschiedlichen Erhaltungstherapien eingeteilt. Die Wirkung besteht meist in einer transienten Reduktion von peripheren Blasten. Weniger häufig werden Blasten im Knochenmark reduziert. Ein großes Problem stellt allerdings die Entwicklung von primären und sekundären Resistenzen dar.

Aktuell befindet sich eine Vielzahl kleinmolekularer FLT3- Tyrosinkinaseinhibitoren (KTI) in der klinischen Erprobung wie z.B. PKC-412, CEP-701, MLN518 und AC220. AC220 (Quizartinib) ist ein in klinischer Phase II befindlicher selektiver FLT3-Rezeptor-Tyrosinkinaseinhibitor [130]. Die Inhibitoren haben eine unterschiedliche Effizienz in Bezug auf Selektivität und Inhibierung der FLT3-Autophosphorylierung.

Das Wirkprinzip der meisten Kinaseinhibitoren beruht darauf, sich reversibel in der ATP-Bindungstasche anzulagern und damit die enzymatische Wirkung der Kinase zu blockieren [131]. Vereinfacht können drei Mechanismen der Inhibition unterschieden werden:

Typ-I-Inhibitoren binden ähnlich dem ATP nur an die aktive Konformation der ATP-Bindungstasche und sind deshalb relativ unselektiv. Dadurch werden zusätzliche Kinasen inhibiert (off-target Effekte), die für unerwünschte Nebenwirkungen von großer Bedeutung sein könnten.

Typ-II-Inhibitoren binden an die hochkonservierte ATP-Bindungstasche, aber in der inaktiven Konformation.

Typ-III-Inhibitoren sind rein allosterische Modulatoren, die fern der ATP-Bindungstasche binden und deshalb am selektivsten sind.

Inhibitionsprofile unterschiedlicher Kinaseinhibitoren sind in Abbildung 12 dargestellt.

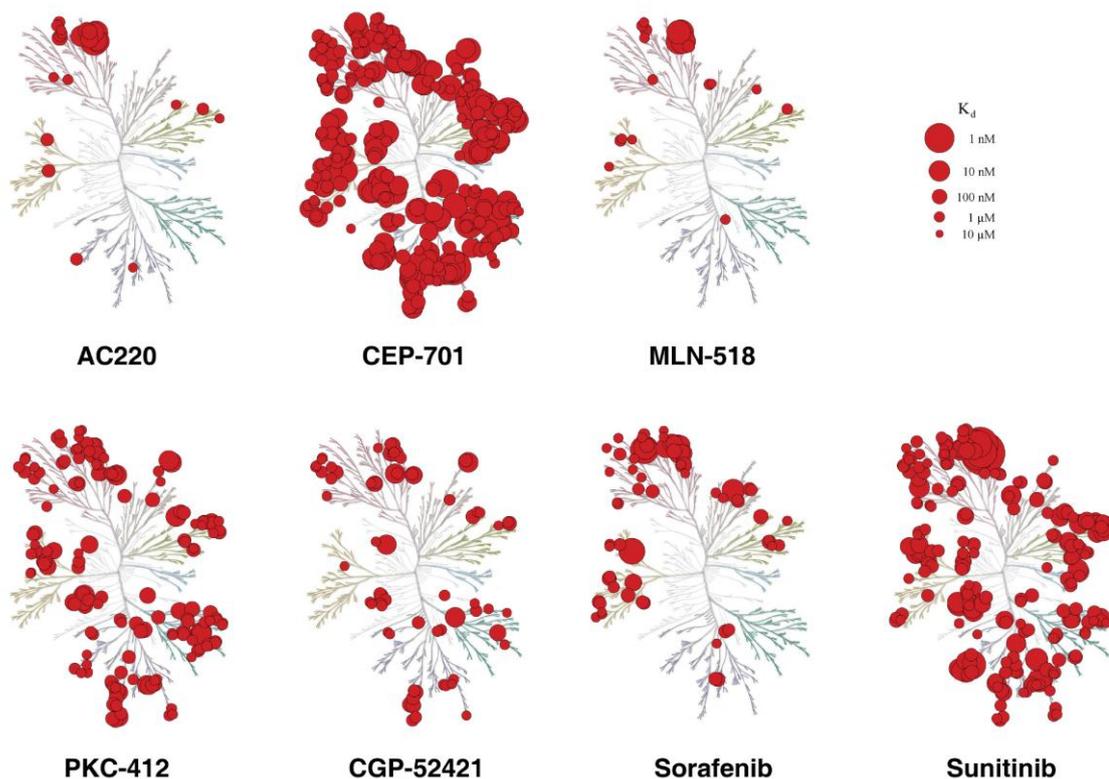


Abbildung 12: Selektivität und Affinität von Kinaseinhibitoren getestet auf mehr als 400 Kinasen bei einer Konzentration von 1nM bis 10  $\mu$ M. Rote Kreise zeigen die Bindung des jeweiligen Inhibitor an die Kinasen, und die Größe der Kreise deutet auf die Bindungsaffinität hin. Gezeigt sind Wechselwirkungen mit  $K_d < 3 \mu$ M. AC220 zeigt sich als ein hoch selektives Kinaseinhibitor.  $K_d$ , Dissoziationskonstante. Entnommen aus [130].

## 1.6 Das chimäre Fusionsprotein AML1-ETO

Die Translokation t(8;21) ist eine der häufigsten chromosomalen Aberrationen bei der akuten myeloischen Leukämie. Das daraus resultierende Fusionsgen verbindet den N-terminalen Abschnitt von AML1 (RUNX1) mit der C-terminalen Region des ETO-Gens (eight-twenty-one; MTG8) auf Chromosom 8 [132, 133] (Abbildung 13). Erstmals wurde das AML1-Gen bei einem Patienten mit AML vom Typ FAB M2 identifiziert.

Die Gene des CBF-Komplexes sind häufig von chromosomalen Rearrangements bei humanen Leukämien betroffen: bei der t(8;21) bei der AML-M2, der t(3;21) [AML1-EVI1] bei myelodysplastischen Syndromen und der t(12;21) [TEL-AML1] bei den akuten lymphoblastischen Leukämien (ALL) im Kindesalter.

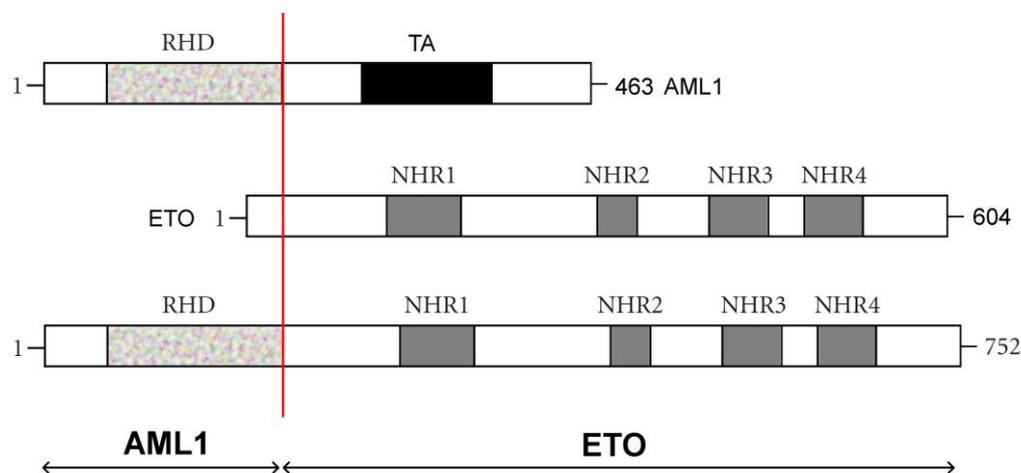


Abbildung 13: Schematische Darstellung eines full-length AML1-ETO Fusionsproteins. RHD, RUNT-homologe Domäne; NHR, nervy homology region. Entnommen und modifiziert nach [134]

Das AML1-Gen ist ein hämatopoetischer Transkriptionsfaktor und gehört zur Familie der RUNX-Gene. Die RUNX-Gene haben sehr hohe Homologie zum Drosophila Runt Transkriptionsfaktoren und spielen eine wichtige Rolle in der embryonalen Entwicklung: AML1/RUNX1 in der Hämatopoese [135], AML3/RUNX2 in der Osteogenese und AML2/RUNX3 in der Neurogenese sowie Thymopoese [136].

Tabelle 7: Die Familie der Core-Binding-Faktoren (CBF). Modifiziert nach [137]

Gen	Altern. Name	Funktion	Mausphänotyp (-/-)	Expression	Assoziierte humane Krankheit
AML1	RUNX1 CBP $\alpha$ 2 PEBP $\alpha$ B AML1	definitive Hämato-poe-se	embryonal letal; keine definitive Hämato-poe-se	in hämatopoetischen Geweben; zusätzlich in Nervengeweben, Skelettmuskeln, Fortpflanzungsorganen	AML, ALL, MDS
AML2	RUNX3 CBP $\alpha$ 3 PEBP $\alpha$ C	Neurogenese Entwicklung des Gastrointestinaltraktes	versterben kurz nach der Geburt aufgrund Hyperplasie des Magenmucosa	In hämatopoetischen Zellen	Karzinogenese des Magens
AML3	RUNX2 CBP $\alpha$ 1 PEBP $\alpha$ A	Knochenbildung	fehlende Knochenentwicklung	in Knochen; zusätzlich in Kolon, Herz, Tonsillen, Lunge, Eierstöcke.	Cleidocraniale Dysplasie
CBF $\beta$	CBFb	definitive Hämato-poe-se	Embryonal letal. Keine definitive Hämato-poe-se.	ubiquitär	AML, FAB bei inv(16)

Das AML1-Protein bildet die  $\alpha$ -Untereinheit des heterodimeren Transkriptionsfaktors CBF $\alpha/\beta$  „Core Binding Factor“ [138]. AML1 besitzt eine DNA Bindungsstelle in der „Runt Homologous Domäne“ (RHD), welche an die regulatorische Region bestimmter Zielgenen bindet und die Rekrutierung von Koaktivatoren sowie die transkriptionelle Aktivität von AML1 vermittelt. [139]. CBF $\beta$  besitzt keine DNA-Bindungsdomäne und bindet daher nicht direkt die DNA, sondern verstärkt lediglich die Affinität des CBF-Komplexes zu der DNA durch Interaktion mit der „RHD“-Region des AML1-Proteins [140] und schützt somit vor der Proteolyse [141].

Beim AML1-ETO Protein bleibt die DNA bindende Domäne des AML1 erhalten, was die Interaktion mit CBF $\beta$  und die Bindung an die AML1-regulierten Gene weiterhin erlaubt. Da ETO jedoch nukleäre Korepressorkomplexe, wie N-CoR, mSIN3A, HDAC, MeCP2 und DNMT1 rekrutiert, wird die Transkription supprimiert, so dass der gebildete Komplex zu einem transkriptionellen Repressor konvertiert (Abbildung 14). Eine Tetramerisierung von AML1-ETO steigert die Affinität zur DNA. Daher gibt es einen kompetitiven Vorteil gegenüber Wildtyp AML1 [142].

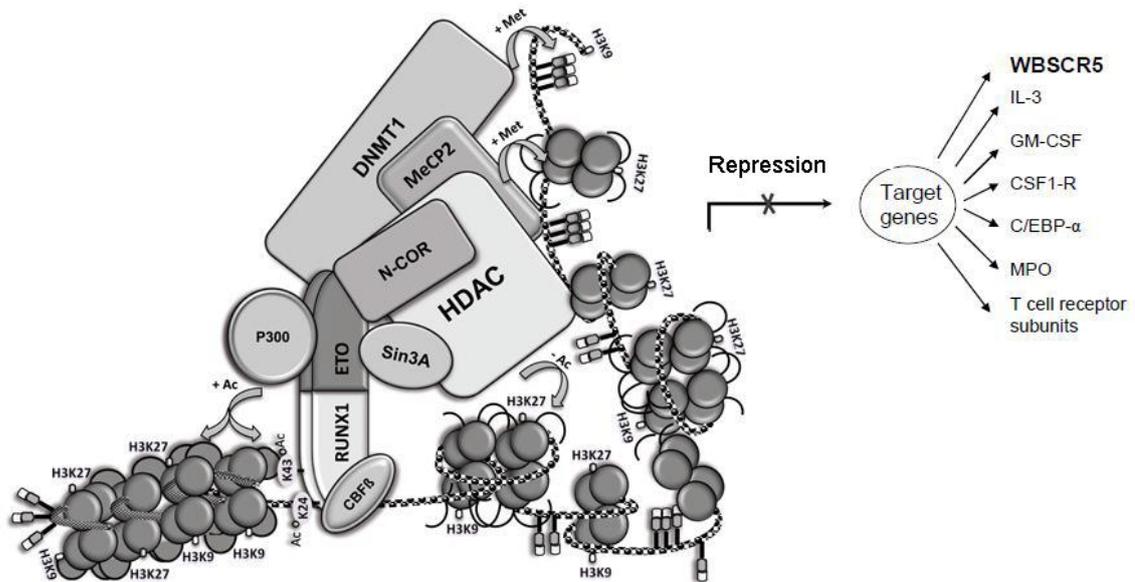


Abbildung 14: Schematische Darstellung der repressiven Funktion eines AML1-ETO Fusionsprotein. Es behält die RHD-Domäne, die für DNA-Bindung und die Interaktion mit CBFβ essentiell ist. Durch Interaktion von ETO mit einem Co-Repressor-Komplex, wie N-COR und Sin3A werden Histon-Deacetylasen und DNMTs an AML1-Zielgene rekrutiert, welche die Konformation der Histone in eine inaktivere Form umwandeln, so dass die Zielgene nicht mehr exprimiert werden. Ac, acetylation; Met, methylation; CpG, CpG site; TF, basal transcription factor. Entnommen und modifiziert nach [143]

### 1.6.1 Rolle von AML1-ETO bei der Leukämieentstehung

Im Hinblick auf die große Anzahl der humanen Patienten mit AML1-ETO positiver AML wurden bereits in der Vergangenheit viele Experimente sowohl im humanen als auch im murinen Bereich durchgeführt.

In retroviral transfizierten humanen CD34<sup>+</sup> Vorläuferzellen förderte die Expression von AML1-ETO die Proliferation von multipotenten hämatopoetischen Stammzellen, und gleichzeitig Inhibition von differenzierten Zellen [144]. Knock-in von AML1-ETO in den AML1-Lokus führte zu embryonalen Letalität durch fehlende Hämatopoese. Diese konnte mit Hilfe von Tetrazyklin-induzierbares Systems umgegangen werden. Diese Tiere entwickelten keine Leukämie, in-vitro zeigte sich jedoch ein Block in der myeloischen Differenzierung der AML1-ETO positive Vorläuferzellen und eine gesteigerte Selbsterneuerungskapazität [145]. Weiterhin entwickelten Mäuse, bei denen die Expression von AML1-ETO unter der Kontrolle des humanen MRP8-Promotors stand, ebenfalls keine Leukämie [146]. MRP8 ist ein kalziumbindendes Protein, das nur von myeloischen, nicht aber von frühen hämatopoetische Zellen exprimiert wird. Erst die Behandlung mit einem DNA alkylierenden Mutagen ENU (N-ethyl-N-nitrosourea) induzierte eine AML. Diese Daten legen nahe, dass für Entstehung einer Leukämie weitere genetische Alterationen notwendig sind.

### 1.6.2 Das ETO-Gen

Das ETO/MTG8-(myeloid transforming gene 8)-Gen war bis zu seiner Entdeckung als Fusionspartner von AML bei der Translokation t(8;21) unbekannt. Es befindet sich auf Chromosom 8 Bande q22. Obwohl ETO stark im Gehirn und Nervengewebe exprimiert wird und zwei putative Zinc-Fingermotive hat [147], bleibt seine genaue physiologische Funktion bis jetzt weitgehend ungeklärt. Außerdem wird eine Rolle bei der Entwicklung des Darms angenommen [148].

ETO hat vier evolutionär konservierte Domänen, die wegen Ihrer Ähnlichkeit zum Drosophila Protein Nervy Homology regions 1-4 genannt werden, und kann über die mit anderen Proteinen interagieren (Abbildung 13). Eine kritische Rolle scheint dabei die NHR4 zu spielen. Es enthält zwei Zink-Finger-Motive, die direkt mit den nukleären Korepressoren wie N-COR und mSin3a interagieren können und zu die Rekrutierung von Histone-Deacetylasen (HDAC) führen [149]. Somit kann die Genexpression negativ regulieren werden [150, 151].

### 1.6.3 Die Zielgene von AML1 und AML1-ETO

Die funktionelle Analysen von AML1-ETO Zielgenen brachten ein neues Verständnis über die Wirkungsweise des Fusionsmoleküls. AML1 und AML1-ETO regulieren transkriptionelle Expression für die Hämatopoese relevanten Gene. AML1 aktiviert die Transkription der Zielgene durch Interaktion von Transkriptionskomplex mit den Koaktivatoren, AML1-ETO dagegen unterdrückt die AML1-vermittelten transkriptionalen Aktivierungen durch Interaktion des ETO-Anteil mit nukleären Korepressoren wie HDACs und DNMTs. Somit greift AML1-ETO in die normale Funktion von AML1 ein und wirkt dabei als ein dominant negativer Repressor.

Bereits identifizierte Zielgene von Fusionsprotein AML1-ETO in der CBF Leukämien sind in der Abbildung 15 genannt und werden in der Tabelle 8 näher erläutert.

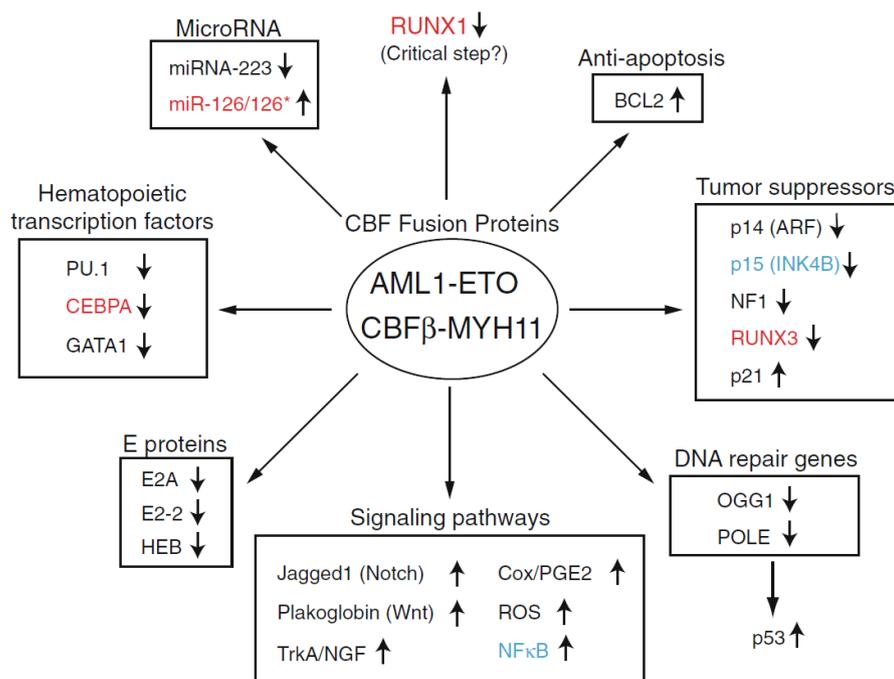


Abbildung 15: Betroffene Gene und Signalwege in der CBF Leukämie. Durch AML1-ETO (schwarz), CBFβ-MYH11 (blau) oder beide Fusionsproteine (rot) betroffen. Entnommen aus [152].

Tabelle 8: Zusammenfassung der AML1- und AML1-ETO-Zielgene

Gen Name	Funktion des Protein
BCL-2	Ist beteiligt an der Regulation der Apoptose, bei vielen Krebserkrankungen überexprimiert z.B. in AML1-ETO positiven Zelllinien gefunden [153]. Überexpression erschwert die Apoptose und führt somit zu Unempfindlichkeit gegenüber Zytostatika.
OGG1 POLE1	Gene, die an der DNA-Reparatur beteiligt sind und oft in humanen HSC runterreguliert sind [150, 154]. Dies könnte möglicherweise die Akkumulation von sekundären Mutationen begünstigen.
C/EBPα	Ein Transkriptionsfaktor, essentiell für eine normale myeloische Differenzierung. Herunterreguliert in AML1-ETO positiven Blasten und Zelllinien [155].
G-CSF Rezeptor	Stimuliert die Proliferation und Differenzierung der granulozytären Reihe. Bei AML häufig dysreguliert. [156].
PU.1	Ist essentiell für die myeloische Differenzierung. Transkriptionelle Aktivität wird durch AML1-ETO durch physikalischen Interaktion inhibiert [157].
GATA1	Essentieller Transkriptionsfaktor für die Erythrozyten-Differenzierung.

---

	AML1-ETO inhibiert die transkriptionelle Aktivität von Gata-1, durch Hemmung der Acetylierung [158].
IL-3	Wachstumsfaktor von HSC und myeloischen Vorläufer. AML1-ETO reprimiert IL-3 mittels HDAC und DNMT in Zelllinien und myeloischen Blasten [159].
T-Zell Rezeptor $\delta$	Spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung der T-Zellen. AML1-Bindung ist notwendig für die Aktivierung der Transkription [160].

---

## 1.7 Fragestellung

Trotz der klaren Assoziation zwischen AML und der t(8;21) Translokation bei AML Patienten treten häufig zusätzliche aktivierende Mutationen auf wie z.B. mutiertes FLT3, RAS, c-KIT und WT-1. In der Vergangenheit wurden bereits einige AML1-ETO-spezifische Mausmodelle generiert (für einen Übersichtsartikel siehe [161, 162]).

Diese Modelle zeigten, dass ab initio AML1-ETO Expression embryonal letal ist [163, 164]. Dabei versterben die Tiere jedoch nicht an Leukämie, sondern es kommt zu einer gestörten Ausreifung verschiedener Zellreihen der Hämatopoese. Transgene knock-in Mäuse für AML1-ETO versterben ebenfalls in der Embryonalphase durch einen Verlust der normalen Hämatopoese. Ein ähnlicher Phänotyp wurde auch in AML1- [135] und CFB- [165] knock-out Mäusen beobachtet. Somit scheinen die Fusionsgene AML1-ETO und CBF-MYH11 eine dominant-negative Rolle über den Transkriptionskomplex CBF („Core Binding Factor“) zu spielen. Darüber hinaus wurden AML1-ETO Knock-in-Mausmodelle unter der Kontrolle eines tetrazyklin-kontrollierbaren Promoters [145], eines humanes des humanen hMRP8-Promotors [166], sowie durch Cre/loxP-vermittelte Rekombination [146] generiert. So bewirkte die Expression von AML1-ETO in diesen Mausmodellen eine Anhäufung unreifer myeloischer Vorläuferzellen. Dies entspricht einer präleukämischen Phase. Ebenso führte eine gezielte Expression des Fusionsgens in murinen hämatopoetischen Stammzellen nicht zur Entartung, sondern verursachte nur ein nicht letal verlaufendes myeloproliferatives Syndrom [167]. Erst durch zusätzliche Behandlung mit dem stark DNA-alkylierenden Mutagen N-Ethyl-N-nitrosurea (ENU) [166], gelang es, in einem murinen Knochenmarktransplantationsmodell eine AML-ähnliche Krankheit auszulösen. All diese Studien bestätigten, dass AML1-ETO alleine keine transformierenden Eigenschaften besitzt, sondern nur zusammen mit zusätzlichen Faktoren, welche das Proliferationsverhalten oder das Apoptoseprogramm der Zellen verändern, Leukämie induzieren kann. Auch die Beobachtung, dass bei Gesunden AML1-ETO, ebenso wie bei Patienten in Remission [26, 27], positive Vorläuferzellen nachgewiesen werden können, untermauern diese Aussage. In keinem dieser Modelle wurde die Expression von AML1-ETO nach induziertem Phänotyp wieder abgeschaltet. Somit blieb die Frage, welche Funktion die kontinuierliche AML1-ETO Expression, nach bereits erfolgter Leukämieinduktion für die Progression und Aufrechterhaltung des Krankheitsverlaufes hat, bisher ungeklärt. Daher war ein Ziel dieser Arbeit zu zeigen, wie effektiv zusätzliche Komplementationonkogene zur Manifestation der Leukämie beitragen können. Ferner sollte geklärt werden, inwieweit die beteiligten Gene für die Erhaltung der AML essentiell sind, d.h. ob durch Abschalten bzw. Inhibition dieser Gene eine vollständige oder zeitweilige Remission erreicht werden kann oder ob die Leukämogenese unabhängig von der jeweiligen Onkogenexpression fortschreitet.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Verwendete Materialien**

#### **2.1.1 Bezugsquellen**

##### **2.1.1.1 Chemikalien**

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien von den Firmen Roche (Mannheim), Sigma-Aldrich/Fluka (Taufkirchen), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Invitrogen (Eggenstein), Becton-Dickenson (BD) Biosciences (Heidelberg) oder Roth (Karlsruhe) in Analysequalität bezogen.

##### **2.1.1.2 Einmalartikel**

Die Plastikartikel für Zellkultur und molekularbiologischen Arbeiten wurden von den Firmen Greiner (Frickenhausen), Starlab (Hamburg), Falcon (BD Biosciences, Heidelberg), Eppendorf (Hamburg), Nalgene (Langenselbold), Gilson (Villiers le Bel, Frankreich), Nunc (Wiesbaden) und TPP (über Firma Renner, Dannstadt) bezogen.

### 2.1.2 Geräte

Tabelle 9: Laborgeräte

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller</b>
Brutschrank 3029	Forma Scientific/Thermo Fisher Scientific (Bonn)
Elektrophoresekammern Easy Cast	MWG Biotech (Ebersberg)
Eismaschine Wessamat	Zugck (Leimen)
FACScan/FACS-Calibur/FACSCanto II	Becton Dickinson (Heidelberg)
Flüssigstickstoff-Lagerbehälter	Messer Griesheim (Düsseldorf)
HEMAVET 950FS	DREW Scientific Inc
Kühlzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus (Osterode)
Magnetrührer, Heizplatte MR 3002	Heidolph (Schwabach)
Mikroskop	Olympus (Hamburg)
Neubauer Zählkammer	Marienfeld (Lauda-Königshofen)
PCR-Block Peltier Thermal Cycler 200	MJ Research Inc. (Watertown, USA)
pH-Meter 761 Calimetric	Knick (Berlin)
Photometer Ultraspec 2000	Amersham Pharmacia Biotech/ GE Healthcare Europe (München)
Schüttelinkubator Incubator Shaker 6725	New Brunswick Scientific, Eppendorf Vertrieb Deutschland (Nürtingen)
Schüttel-Wasserbad	Köttermann (Hänigsen)
Sterilbank Biogard Hood	Baker Company Inc. (Maine, USA)
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus (Osterode)
Zentrifuge Minifuge 2	Heraeus Christ (Osterode)
Zentrifuge TJ-6	Beckman Instruments (München)

### 2.1.3 Medien, Puffer und Lösungen

#### 2.1.3.1 Medien

##### LB Medium/Platten (pH 7,5)

1% (w/v) Bactotrypton (Difco); 0,5% (w/v) Bacto-Hefe Extrakt (Difco); 1% (w/v) NaCl; für Platten zusätzlich 2% (w/v) Select Agar (Invitrogen). Autoklavieren (12 psi, 121°C, 20 min) und nach Abkühlen auf etwa 50°C Antibiotika hinzufügen (Ampicillin 100 µg/ml, Kanamycin 50 µg/ml).

##### D-PBS (Dulbecco's phosphatgepufferte Kochsalzlösung, Gibco)

0,1 g/l CaCl<sub>2</sub>; 0,2 g/l KCl; 0,2 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,049 g/l MgCl<sub>2</sub>; 8,0 g/l NaCl; 1,15 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

##### FKS (Sigma, München)

Die Zellkulturmedien wurden mit fötalem Kälberserum versetzt. Zur Inaktivierung der enthaltenen Komponenten des Komplementsystems, wurde das FKS 30 min bei 56°C erwärmt.

##### DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)

DMEM wurde für die Kultivierung von 293 T verwendet und vor Gebrauch mit 10 % FKS, 100 U/ml Penicillin/Streptomycin, 2 mM Glutamin und 1 mM Natriumpyruvat versetzt.

##### IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Invitrogen)

IMDM wurde mit 10 % FCS für die Verwahrung von Knochenmarkzellen während der Aufreinigung und mit 2 % FCS als Waschlösung für die Säule bei der „Liniendepletion“ verwendet. Die Knochenmarkzellen wurden generell in Gegenwart von Antibiotika (1 % Penicillin/Streptomycin, Pen/Strep) kultiviert.

Für die in-vitro-Kultur von aufgereinigten Knochenmarkzellen wurde IMDM mit 20 % FCS mit den Zytokinen mSCF (50 ng/ml), hFLT-3 (100 ng/ml), hIL-11 (100 ng/ml) und mIL3 (20 ng/ml) (PeproTech, NJ und CellSystems, St.Katherinen) eingesetzt.

##### Einfriermedium

Die Zelllinien wurden mit 90 % FCS und 10 % DMSO über Nacht auf -70°C abgekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff verwahrt.

## 2.1.3.2 Puffer

Tabelle 10: Puffer und Lösungen für Elektrophoresen, PCR und Western-Blots

<b>6x DNA Auftragspuffer</b> 100 mM EDTA, pH 8,0 20 % (w/v) Ficoll 400 0,25 % (w/v) Bromphenolblau 0,25 % (w/v) Xylencyanol	<b>HEPES Puffer (pH 7,9)</b> 6,7 mM KCl 142 mM NaCl 10 mM HEPES
<b>Anodenpuffer (pH 10,4)</b> 25 mM Tris	<b>Kathodenpuffer (pH 9,4)</b> 25 mM Tris 40 mM 6-Amino-Caprinsäure
<b>Laufpuffer SDS-PAGE</b> 25 mM Tris pH 8,3 192 mM Glycin 0,1 % SDS (w/v)	<b>10x PCR Puffer</b> 100 mM Tris pH 8,3 500 mM KCl 25 mM MgCl <sub>2</sub>
<b>PBS/Tween</b> 0,05 % (v/v) Tween20 in PBS; pH 7,2	<b>Blockpuffer</b> 5 % (w/v) Milchpulver in PBS/Tween
<b>TAE-Puffer pH 8,0</b> 40 mM Tris-Acetat 2 mM EDTA	<b>TE Puffer (pH 8,0)</b> 10 mM Tris HCl 1 mM EDTA
<b>1 M Tris-HCl (pH 6,8)</b> 121,1 g Trizma Base in 800 ml H <sub>2</sub> O mit HCl auf pH 6,8 eingestellt und auf 1 l mit Aqua bidest aufgefüllt	<b>1,5 M Tris/HCl (pH 8,7)</b> 181,7 g Trizma Base in 800 ml H <sub>2</sub> O mit 1 M HCl auf pH 8,7 eingestellt und auf 1 l mit Aqua bidest aufgefüllt
<b>Trypanblau (pH 7,0)</b> 0,2% Trypanblau 150 mM NaCl	

Tabelle 11: Färbungs- und Bindungspuffer

<b>FACS-Puffer:</b>	PBS pH 7,2 2 % FKS
<b>MACS Laufpuffer</b>	PBS pH 7,2 2 mM EDTA 0,5 % FKS
<b>MACS Waschpuffer</b>	MACS Laufpuffer ohne 0,5 % FKS

Tabelle 12: Puffer und Lösungen für die Zelllyse oder dem Mausschwanzverdau

<b>Tailsbuffer</b>	100mM Tris.HCl pH 8,5 5mM EDTA, 0,2% SDS 200mM NaCl
<b>Proteinase K-Puffer</b>	50 mM Tris pH 8,0 20 mM NaCl 1 mM EDTA 1 % SDS 2 mg/ml Proteinase K
<b>Blutentnahmepuffer</b>	<b>Heparinpuffer</b> 5 U/ml Heparin 0,1 % Na-Azid 2 % FKS
1x PBS 1% BSA 5,45 $\mu$ M EDTA	
<b>Zell-Lysepuffer</b>	120 mM NaCl 50 mM Tris-HCl (pH 7,4) 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> 1 mM EDTA 10 % Glycerol 0,5 % NP40

Tabelle 13: Puffer und Lösungen für Transfektion und retrovirale Transduktion

<b>2x HBS-Puffer</b>	274 mM NaCl 10 mM KCl 1,4 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 12 mM Glukose 24 mM HEPES pH 7,05 (mit NaOH exakt einstellen)
<b>2,5 mM Chloroquin</b>	

### 2.1.3.3 Gele

#### Trenngel (10 %)

10 % (v/v) Rotiphorese; 0,375 M Tris; pH 8,8; 1 % SDS (w/v); 1 % APS (w/v); 0,04 % TEMED (v/v)

#### Sammelgel (5 %)

5 % (v/v) Rotiphorese; 125 mM Tris; pH 6,8; 0,1 % SDS (w/v); 0,1 % APS (w/v); 0,01 % TEMED (v/v)

#### X % Agarosegel

1 x TAE-Puffer (pH 8,0)

x% (w/v) Agarose

### 2.1.4 Antikörper

Tabelle 14: Primärantikörper

<b>Antikörper</b>	<b>Isotyp</b>	<b>Farbstoff</b>	<b>Bezug</b>
CD3e	IgG <sub>1</sub> , λ	PerCP-Cy5.5	BD
CD4	IgG <sub>2a</sub> , κ	Alexa Fluor 647	BD
CD4	IgG <sub>2a</sub> , κ	PE	BD
CD5 (Ly-1)	IgG <sub>1</sub> , κ	Biotin	BD
CD8	IgG <sub>1</sub> , κ	APC	BD
CD8	IgG <sub>1</sub> , κ	PerCP-Cy5.5	BD
CD11b (Mac-1)	IgG <sub>2b</sub> , κ	PerCP-Cy5-5	BD
CD19	IgG <sub>2a</sub> , κ	PerCP-Cy5-5	BD
CD25	IgG <sub>1</sub> , κ	PE	BD
CD25	IgG <sub>1</sub> , κ	Biotin	BD
CD43	IgG <sub>2a</sub> , κ	Biotin	BD
CD43	IgG <sub>2a</sub> , κ	APC	BD
CD44	IgG <sub>2b</sub> , κ	APC	BD
CD45R/B220	IgG <sub>2a</sub> , κ	PE	BD
CD45R/B220	IgG <sub>2a</sub> , κ	APC	BD
CD45.1 (Ly5.1)	IgG <sub>2a</sub> , κ	Pacific Blue	Biolegend
CD45.2 (Ly5.2)	IgG <sub>2a</sub> , κ	APC	BD
CD71	IgG <sub>1</sub> , κ	PerCP-Cy5-5	BD
CD71	IgG <sub>2a</sub> , κ	PE	BD
CD117 (c-Kit)	IgG <sub>2b</sub> , κ	Biotin	BD
CD117 (c-Kit)	IgG <sub>2b</sub> , κ	Pacific Blue	Biolegend
Gr-1 (Ly-6G)	IgG <sub>2b</sub> , κ	PerCP-Cy5-5	BD
CD117 (c-Kit)	IgG <sub>2b</sub> , κ	Biotin	BD
CD117 (c-Kit)	IgG <sub>2b</sub> , κ	APC	BD
Ter119 (Ly-76)	IgG <sub>2b</sub> , κ	APC	BD

IgM	IgM $\kappa$	PE	BD
IgM	IgM $\kappa$	PerCP-Cy5.5	BD

Tabelle 15: Sekundärantikörper

Antikörper	Farbstoff	Bezug
Streptavidin	PE-Cy7	eBioscience
Streptavidin	PerCP	BD
Streptavidin	APC	BD
Streptavidin	APC-Cy7	BD

### 2.1.5 Oligonukleotide

Tabelle 16: Primer

Maus	Typ	Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'
Rosa26 rtTA	Knock-in	RosaFA	AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT
		RosaRE	GGAGCGGGAGAAATGGATATG
		RE SpliAcB	CATCAAGGAAACCCTGGACTACTG
AML1-ETO	Transgene	Forward (AML1-ETO1)	ACCCTGCCCATCGCTTTCAA
		Reverse (AML1-ETO2)	TCCACTCTTCTGCCATTCT
kRAS <sup>G12D</sup>	Transgene	Forward	GGGAATAAGTGTGATTTGCCT
		Reverse	GCCTGCGACGGCGGCATCTGC
Interne Kontrolle:			
Actin		Forward	TCATCAGGTAGTCAGTGAGGTCGC
		Reverse	CACCACACCTTCTACAATGAGCTG

Banden bei Rosa26-rtTA:

Homozygot (+/+) für Rosa26: 1 Bande (300bp)

Heterozygot (+/-): 2 Banden (300bp and 600bp)

### 2.1.6 Plasmide und Vektoren

Tabelle 17: Plasmide

<b>Plasmide</b>	
M57	Expressionsplasmid für Gag/Pol aus MLV
K73	Expressionsplasmid für Eco Hüllprotein
<b>Retrovirale Vektoren</b>	
SF91	Retroviraler Vektor unter LTR-Kontrolle mit Intron [168]

### 2.1.7 Bakterien

#### One Shot Top10 –E. coli (Invitrogen)

One Shot Top 10 –E. coli sind chemisch kompetente Zellen, die für Transformationsreaktionen eingesetzt werden.

Genotyp:

*F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 araD139*

*Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG*

### 2.1.8 Zelllinien

Tabelle 18: Zelllinien

<b>Zelllinie</b>	<b>Medium</b>	<b>Herkunft</b>
NIH3T3	DMEM	Spezies: Maus; Fibroblastenzelllinie
293T	DMEM	Spezies: Mensch; Nierenzelllinie

Es handelt sich bei allen Zelllinien um adhären wachsende Zellen. Bei Konfluenz wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst und in neue Kulturflaschen ausgesät. Alle Zelllinien wurden bei 37°C/7,5% CO<sub>2</sub> propagiert.

### 2.1.9 Mauslinien

Alle Tiere wurden in pathogenfreier Umgebung in der Barrierestation des Zentralen Tierlabors am Deutschen Krebsforschungszentrum bei einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 h gehalten und hatten *ad libitum* Zugang zu Futter und Trinkwasser.

Tabelle 19: Mauslinien

<b>Liniename</b>	<b>Referenz</b>
C57BL/6	Dr. C.C. Little, Jackson Laboratory
ROSA26-iM2 knock-in Effektormaus	Freundlicherweise von Prof. Dong-Er Zhang (University of California San Diego, USA) zur Verfügung gestellt
Bi-transgene tetO-AML1-ETO Respondermaus	Freundlicherweise von Prof. Dr. Rolf Sprengel (Max-Planck Institute for Medical Research; Heidelberg) zur Verfügung gestellt
Bi-transgene tetO-kRAS <sup>G12D</sup> Respondermaus	Dr. C.C. Little, Jackson Laboratory

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 Isolierung von DNA aus der Mausschwanzbiopsien

Zur Bestimmung des Genotyps durch PCR-Reaktionen wurden 1-2 mm Schwanzspitze in 20 µl Proteinase K Puffer aufgenommen und für 2 - 3 h bei 56 °C im Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Probe kurz abzentrifugiert (4000 U/min, 10 Sek.) und mit 300 µl ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt. Das Erhitzen für 1 min. inaktiviert die Proteinase K. Danach wurde der Reaktionsgefäß bei 4°C gelagert.

### 2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR ist es möglich eine spezifische Sequenz eines DNA-Doppelstranges *in vitro* zu amplifizieren. Das Prinzip dieser Methode besteht aus drei Schritten, die zyklisch wiederholt werden:

I. Denaturierung (Auftrennung) der doppelsträngigen DNA bei ca. 95 °C.

II. Ankopplung („Annealing“) von spezifischen Oligonukleotid-Primer an die 3' Enden der DNA Einzelstränge bei einer Temperatur zwischen 50 °C und 68 °C.

III. Verlängerung (Elongation) von komplementären Basen durch die Taq-Polymerase. Da die Komplementierung an beiden Strängen der Matrizen-DNA abläuft, wird theoretisch in jedem PCR-Zyklus die Anzahl der Matrizen-DNA verdoppelt. Durch die Verwendung einer hitzestabilen *Taq*-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* ist es nicht mehr notwendig nach dem Denaturieren wieder neues Enzym zusetzen zu müssen. Somit konnte der ganze PCR-Prozess erheblich optimiert werden. Die Nukleotidsequenz der einzelnen Primer wird gemäß der Sequenzen des Zielgens ausgewählt und hat in der Regel eine Länge von 18-30 Nukleotiden. Dabei gilt ein hoher Prozentsatz an GC-Basenpaarungen zwischen Primer und dem komplementären cDNA-Fragment wegen der größeren Anzahl an möglichen Wasserstoffbrückenbindungen als stabiler.

Beispiel AML1-ETO-Typisierung:

	<b>1x Mix [µl]</b>
10x PCR Puffer	2,5
50 mM MgCl	1
10 mM dNTPs	0,5
AML1-ETO FA Primer (10 pmol/µl)	1
AML1-ETO RE (10 pmol/µl)	1
β2m 1 Primer (10 pmol/µl)	1
β2m 2 Primer (10 pmol/µl)	1
Taq Polymerase	0,25
ddH <sub>2</sub> O	16,75
Template DNA* (Schwanz-DNA)	0,6
Σ in µl	50

\*Template-DNA: 3 µl aus 300 µl Verdau von ca. 1 mm Schwanzbiopsie.

Diese Bestandteile wurden für die Gesamtanzahl der untersuchten Proben in ein 5 ml großes Reaktionsgefäß (Master-Mix) pipettiert, geschüttelt und auf die einzelnen Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt. Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte im 1%-igen, Ethidiumbromid-gefärbtem Agarose-Gel. Die Visualisierung der DNA-Banden erfolgte durch Anregung im UV-Licht. Zur Bestimmung der Fragmentgröße wurde 100 bp-DNA-Größenmarker verwendet.

Programm:

	Temperatur	Zeit	Zyklusanzahl
Denaturierung	94 °C	2 min	
Denaturierung	94 °C	0:30 min	35 Zyklen
Annealing	60 °C	0:30 min	
Elongation	72 °C	1:00 min	
Elongation	72 °C	10 min	
	4 °C	∞	

Die Länge der gewählten Elongationszeit richtete sich nach der Größe der zu erwartenden Produkte, je 1 kb wurden für die *Taq*-DNA-Polymerase etwa 60 s kalkuliert. Die Annealingtemperatur wurde in der Regel so gewählt, dass sie mindestens 5-10 °C unter der Schmelztemperatur der Primer lag, wobei jeweils der geringere Wert maßgebend war.

Die Berechnung der Schmelztemperatur erfolgte dabei nach folgender Formel (BERTRAM and GASSEN 1991):

$$T_m [^{\circ}\text{C}] = 2 \text{ }^{\circ}\text{C} \times \text{Anzahl der A/T-Paare} + 4 \text{ }^{\circ}\text{C} \times \text{Anzahl der G/C-Paare}$$

$$\text{Schmelztemperatur } T_m [^{\circ}\text{C}] = 69.3^{\circ}\text{C} + 0.41 \times (\text{GC-Gehalt [\%]} - 650 / \text{Primerlänge})$$

### 2.2.3 Restriktion und Dephosphorylierung von DNA

Für Klonierungsexperimente wurden DNA Fragmenten mit geeigneten Restriktionsendonukleasen (Fermentas oder NEB) wie folgt geschnitten: 1 bis 10 µg DNA und 0,5 - 3 µl Restriktionsendonuklease (2,5 - 10 U/µg DNA) wurden in 1fach-Restriktionspuffer gemäß Herstellerangaben 1-3h bei 37°C inkubiert.

Um eine Selbstligation eines linearen Plasmidvektors mit kompatiblen Enden zu verhindern wurden alkalische Phosphatasen eingesetzt. Diese katalysieren die Entfernung von 5'-Phosphatgruppen von DNA und RNA. Dazu wurden Plasmidvektoren mit 1 U

CIAP (Calf Intestine Alkaline Phosphatase, 1 U/ $\mu$ l, Fermentas) pro 1-5  $\mu$ g DNA inkubiert.

#### **2.2.4 Herstellung glatter DNA-Enden mit Hilfe der Klenow-Polymerase**

Damit DNA-Fragmente mit glatten und überhängenden Enden ligiert werden konnten, mussten zunächst die Überhänge aufgefüllt werden. Die Klenow-Polymerase ist in der Lage, 5'-überstehende Einzelstrangenden in 5'-3'-Richtung in Gegenwart einer geeigneten Konzentration freier Nukleotide aufzufüllen. Zur Auffüllreaktion wurden etwa 100 ng DNA mit 40  $\mu$ M Desoxyribonukleotiden und einer

Unit Klenow-Polymerase (Boehringer, Mannheim, Deutschland) pro  $\mu$ g DNA versetzt und in einem Endvolumen von 50  $\mu$ l für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte eine Hitzeinaktivierung des Enzyms für 10 Minuten bei 75 °C.

#### **2.2.5 Ligation**

Für die Ligation der Fragmente in den präparierten Vektor wurde T4 Ligase verwendet. T4 DNA Ligasen katalysieren die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylenden der DNA. Für die Ligation wurden Vektor und Insert-DNA im molaren Verhältnis 1: 3 gemischt.

Dazu wurden 50-100 ng des linearisierten und dephosphorylierten Vektors mit der dreifachen Menge des Insertfragmentes und je 1  $\mu$ l T4 DNA Ligase (1,3 Weiss Units/ $\mu$ l, NEB Frankfurt) und Ligationspuffer (NEB) gemischt und mit H<sub>2</sub>O bidest auf ein Volumen von 10  $\mu$ l aufgefüllt. Die Inkubation wurde bei 16°C über Nacht durchgeführt und anschließend in der Transformation eingesetzt.

#### **2.2.6 Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen**

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte gemäß ihrer Länge in 0,7 - 2 %-igen Agarosegelen in TAE-Puffer. Die Proben wurden mit Ladepuffer versetzt und im Gel bei 90 Volt aufgetrennt. Als Größenstandard wird eine 1 kb Leiter von der Firma Fermentas verwendet (1 Kb-Leiter, GeneRuler DNA Ladder Mix). Zur Detektion der Banden wurde das Gel anschließend für 15 min. in Ethidiumbromid-Lösung (1 x TAE, 0,5  $\mu$ g/ml EtBr) gelegt.

Die DNA-Banden wurden für präparative Gele auf dem UV-Transilluminator bei langwelligem UV-Licht (366 nm) ausgeschnitten und unter Verwendung von QiaQuick Säulen (Qiagen) gemäß Herstellerangaben aufgereinigt. Analytische Gele wurden mit einer Kamera fotografiert und dokumentiert.

## 2.2.7 Kultivierung und Lagerung von Bakterien

### Flüssigkultur

Die Bakterien werden in LB-Medium unter Zusatz eines zur Selektion bestimmten Antibiotikums in den angegebenen Konzentrationen normalerweise bei 37°C unter Schütteln inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von ca. 0,5 - 0,6 erreicht ist. Tragen die Bakterien Plasmide, die eine hohe interne Rekombinationswahrscheinlichkeit aufweisen, wie z.B. Virusplasmide mit zwei LTR-Regionen, so werden diese Bakterien bei 25°C kultiviert.

### Nährböden

Die Kultivierung auf Nährböden erfolgt durch Ausstreichen von 100 µl Bakteriensuspension auf LB-Agar-Platten (1.5% (w/v) Agar-Agar), die ebenfalls mit einem Antibiotikum versetzt sein können. Diese Platten werden bei 37°C oder 25°C kultiviert, bis sich deutliche Kolonien zeigen. Danach können diese Platten für einige Zeit bei 4°C gelagert werden.

## 2.2.8 Herstellung von kompetenten Bakterien

Um Plasmide in Bakterien (Abkömmlinge von *E. coli*-Zellen K12) einbringen und dort vervielfältigen zu können, müssen die Bakterien erst transformationskompetent gemacht werden. Dies kann auf chemischem Wege über die Behandlung mit CaCl<sub>2</sub> und Schwermetallsalzen erfolgen.

100 ml LB-Medium werden mit 2,5 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C im Bakterienschüttler inkubiert, bis eine OD<sub>550</sub> von 0,6, d.h. die logarithmische Wachstumsphase, erreicht war. Nach dem Abkühlen der Bakteriensuspension auf Eis und dem Aliquotieren auf zwei Portionen (je 50 ml) wird die Kultur pelletiert (6.000 rpm, 4°C, 10 min).

Die Zellen werden in 20 ml TFB1-Puffer resuspendiert, 5 min auf Eis inkubiert und wiederum pelletiert (6.000 rpm, 4°C, 10 min). Nach Resuspendierung in 2 ml TFB2-Puffer folgt eine weitere 15-minütige Inkubation auf Eis. Die Zellsuspension wird nun auf Eis aliquotiert (je 100 µl) und bei -80°C eingefroren.

### 2.2.9 Transformation von Bakterien

100 µl der kompetenten Zellen (i.d.R. E. coli Top 10 oder Top 10 F') wurden langsam auf Eis aufgetaut, danach mit 50 ng bis 1 µg Plasmid-DNA gemischt und danach 1 h auf Eis inkubiert. Danach folgte ein Hitzeschock für 90 Sekunden bei 42°C, anschließend sofort Kühlung auf Eis. Unter Zugabe von 250 ml LB-Medium wurden die Zellen für 60 min bei 37°C und 180 U/min kultiviert. 100 µl der bakteriellen Suspension wurden mit 50 µg/ml Ampicillin (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland), auf vorgewärmte LB-Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert bis sich die Bakterienkolonien zeigen.

### 2.2.10 Animpfen von Bakterienkulturen

Zum Animpfen von Übernachtflüssigkulturen im Miniprep-Maßstab wurden Einzelkolonien von einer Agarplatte mit einer ausgeglühten Impföse gepickt und in 3 - 5 ml LB-Selektionsmedium (je nach Antibiotikaresistenz Ampicillin 100 µg/ml bzw. Kanamycin 50 µg/ml) resuspendiert. Die Kultur wurde bei 37°C im Inkubationsschüttler über Nacht inkubiert. Zur Isolierung größerer Mengen an Plasmid-DNA (bis 500 µg) aus Bakterien suspensionen wurden 100 ml LB Medium mit einer einzelnen Kolonie angeimpft und ebenso über Nacht im Schüttler inkubiert.

### 2.2.11 Plasmid-Präparation („Mini- und Maxi-Präp“)

Die Präparation der Plasmid-DNA aus Übernachtbakterienkulturen erfolgte unter Verwendung von „Qiaprep® Miniprep Spin Säulen“ im Miniprep-Maßstab bzw. mit „Qiaprep® HiSpeed Säulen“ (Qiagen, Hilden) im Maxiprep-Maßstab entsprechend den Anweisungen der Hersteller. Das angewandte Verfahren beruht auf der alkalischen Lyse in Gegenwart von SDS. Nach der Renaturierung der Plasmid DNA in der nachfolgenden Neutralisation wird die DNA an eine Silikat-Gel-Membran gebunden und anschließend mit H<sub>2</sub>O bidest eluiert [169].

### 2.2.12 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentrationsbestimmung und Reinheit wurde photometrisch bestimmt. Die Purin- und Pyrimidinringe der Nukleinsäurebasen zeigen bei 260 nm maximale Absorption. Die Reinheit der Probe lässt sich aus dem Verhältnis der Absorption bei 260 nm zu 280 nm berechnen (Werte sollen im Bereich 1,7 bis 1,9 liegen). Aus der Extinktion der Probe kann die Konzentration anhand der folgenden Formel berechnet werden:

Konzentration [ng/ml] = OD<sub>260</sub> x Faktor des Nukleinsäuretyps x Verdünnungsfaktor

OD<sub>260</sub> = 1 entspricht 50 µg/mL dsDNA, 33 ng/µl für ssDNA

### 2.2.13 Genotypisierung der Mäuse

Um den Genotyp der transgenen Mäuse zu bestimmen, wurden Schwanzbiopsien genommen, die über Nacht mit Verdauungspuffer bei 55°C verdaut wurden, um die DNA zu extrahieren. Die im Puffer enthaltene Proteinase K wurde anschließend durch Erhitzen auf 95°C inaktiviert. Die Genotypisierung erfolgte mittels Polymerasekettenreaktion (PCR). Das Endprodukt der PCR wurde anschließend auf ein 1,5%-iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

### 2.2.14 Klonierung der FLT3-ITD in SF91-IRES-tdTomato

Im ersten Schritt wurde der 7407 kb großer SF91-IRES-tdTomato Vektor (pSF91) linearisiert. Dafür wurde zunächst der Vektor mit dem Restriktionsenzym NotI geschnitten, dann mit einer alkalischen Phosphatase inkubiert, um eine 5'-Dephosphorylierung zu erreichen und anschließend mit dem Klenow-Fragment aufgefüllt und mittels Agarosegelsaufreinigung gereinigt.

Das hFLT3-ITD Insert wurde mittels Cla und Spe aus dem LeGOiT2 Plasmid ausgeschnitten, ebenfalls mit Hilfe von Klenow-Polymerase aufgefüllt, mittels Agarosegel aufgereinigt und über glatte Enden in das zuvor linearisierte Plasmid pSF91 kloniert. Dabei wurde ein molares Verhältnis von Vektor zu Insert von 1:7 gewählt.

#### Linearisierung des pSF91-IRES-tdTomato-Plasmids:

ddH <sub>2</sub> O	Auffüllen auf 40 µl
10XPuffer	2 µl
DNA	15 µl (1 µg)
NotI	2 µl

Inkubation für eine Stunde bei 37 °C

#### Dephosphorylierung

CIP	1 µl
-----	------

Inkubation für 1/2 Stunde bei 37 °C

#### Klenow

dNTP	2 µl
Klenow	1 µl

Inkubation 10 min bei 37 °C; Inkubation 10 min bei 75 °C; Aufreinigung mittels Agarosegel (Fragmentgröße 7407 bp).

Restriktion des hFLT3-ITD aus dem LeGOiT2:

ddH <sub>2</sub> O	Auffüllen auf 30 µl
10XPuffer	3 µl
DNA	20 µl (1 µg)
Cla	1,5 µl
Spe	1,5 µl
Sal	1,5 µl

Inkubation für eine Stunde bei 37 °C

Klenow

dNTP	3 µl
Klenow	1 µl

Inkubation 10 min bei 37 °C; Inkubation 10 min bei 75 °C; Aufreinigung mittels Agarosegel (entstandene Fragmente 8, 38, 250, 595,621, 2223, 2384, 2515 bp und das richtige Fragment 3023 bp).

Ligation:

Ansatz	I	II	III
ddH <sub>2</sub> O	-	7 µl	1 µl
10x Ligase Puffer	1 µl	1 µl	1 µl
Plasmid 7407 bp	1 µl	1 µl	-
Insert 3023 bp	7 µl	-	7 µl
Ligase	1 µl	1 µl	1 µl

Inkubation für 24 Stunden bei RT

Nach der Ligation wurde das Produkt in die kompetenten Zellen transformiert, 100µl der Suspension wurden am Ende der Prozedur auf ampicillinhaltigen LB-Agarplatten ausgestrichen. Nach Inkubation der Platten über Nacht bei 37°C konnten vom Agar Einzelkolonien gepickt werden, von denen Minipräparationen angeimpft wurden. Es folgte die Inkubation auf dem Schüttler bei 37°C über Nacht. Mittels Mini-DNA-Präparation konnten die Plasmide aus den Bakterien isoliert und durch Restriktionsverdau auf Vorhandensein und Orientierung des klonierten PCR-Produktes untersucht werden. Nach einem Kontrollverdau wurde mittels Gel-Elektrophorese das Ergebnis der DNA-Präparation überprüft.

Die Klone 29 und 32, die in Abbildung 37 dargestellt sind, stellen die erwarteten Fragmente dar. Um die korrekte Orientierung bei Einbau des hFLT3-ITD-Inserts in pSF91s-Vektor zu bestimmen wurden diese einem zusätzlichen Kontrollverdau mit XhoI, Bam/RI und Bam unterzogen (Abbildung 38).

Kontrollverdau:

Restriktionsenzyme	Fragmente bei korrekter Orientierung des Inserts (in bp)	Fragmente bei falscher Orientierung des Inserts (in bp)
XhoI	1660 2552/2440 6227/6400	1660 2880/2940 6000/5834
Bam/RI	3282/3100 7056/7300	4700 5700
Bam	10438	

## 2.3 Proteinchemische Methoden

### 2.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

In der denaturierenden SDS-PAGE werden Proteine in Anwesenheit von SDS elektrophoretisch gemäß ihrer molaren Masse aufgetrennt. In den in dieser Arbeit beschriebenen Experimenten wurden 10 bis 15%-ige Acrylamidgele eingesetzt. Es wurden sowohl 8x7 cm-Minigele (Mini-Protean® III System, Biorad, München) als auch 16x20 cm Großgele (Protean® II xi, Biorad) verwendet. Die Proben wurden in 150 µl Lysepuffer resuspendiert, für 5 min bei 95 °C aufgekocht und zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand mit 6x SDS-Probenpuffer versetzt und aufgetragen. Als Proteingrößenmarker wurde der Precision Plus Protein Dual Color Standards (BioRad) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte je nach Gelgröße bei 180 mA und 90 V (Standartgel) bzw. bei 150 V (Minigel), bis die Bromphenolblau-Front den Fuß des Gels erreicht hatte.

### 2.3.2 Western Blot

Mit Hilfe der Western Blot Methode können Proteine in Proteingemischen wie Zell- oder Organextrakten qualitativ und quantitativ nachgewiesen werden, sowie deren Größe näherungsweise bestimmt werden. Im klassischen Western Blot wird die Probe mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteinbanden können dann elektrophoretisch positi-

ongenau auf eine Membran transferiert werden und immunchemisch mittels spezifischer Antikörper detektiert werden.

Western Blot wurde auf Nitrozellulose-Membran (PVDF-Membran, Immobilon-P, Millipore, Schwalbach) im Semi-dry Blotapparat (Semi-dry Trans-Blot SD, BioRad SD 1, cti) bei einer konstanten Spannung von 10 V für etwa 1,5 h durchgeführt (2 Minigele bei 17 V für ca. 35 min, 1 Minigel nur 17 min). Gefolgt von der Inkubation in Blockpuffer für 1 h bei RT oder ü/N bei 4 °C.

Daraufhin erfolgte eine Inkubation mit dem Erst-Antikörper (in Blockpuffer verdünnt). Nach dem 5-maligen Waschen mit PBS/Tween schloß sich die Inkubation mit dem Meerrettichperoxidase-konjugiertem Sekundär-Antikörper (1:200000 in Blockpuffer) für 45 min bei RT sowie mehrmaligen Waschen mit PBS/Tween.

Die Detektion des gesuchten Proteins erfolgte mittels eines Chemilumineszenznachweises („Enhanced Chemilumineszenz“) unter Verwendung von „SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate“-Kits (Pierce Perbio Science/Thermo Fisher Scientific, Bonn). Die Banden des Molekulargewichtmarkers mit einem fluoreszierenden Stift gekennzeichnet (Scienceware® „autoradiography pen“, Sigma, Schnelldorf). Die Detektion der Chemolumineszenz erfolgte am Lumi-Imager (Boehringer Mannheim Diagnostics/Roche, Mannheim).

## **2.4 Zellbiologische Methoden**

### **2.4.1 Zellen und Kultivierung**

Alle Zellen wurden in einem wasserdampfgesättigten Hera Cell 240 Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt in beschichteten Zellkulturgefäßen kultiviert. Die Kurzzeitlagerung der Zellen erfolgte im Einfriermedium (80% FCS, 20% DMSO) in 1,5 ml Kryoröhrchen (Cryo, Nalgen) bei -80 °C. Die Langzeitlagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

### **2.4.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Zum Einfrieren wurden etwa  $5 \times 10^6$  Zellen abzentrifugiert (1200 rpm, 5 min) in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und in 1,5 ml-Kryoröhrchen pipettiert. Um die Zellen schonend abzukühlen, erfolgte der Einfriervorgang langsam bei  $-80^\circ\text{C}$  in einem verschlossenen Styroporbehälter. Zur Lagerung wurden die Zellen anschließend in flüssigen Stickstoff überführt. Der Auftauvorgang von Zellen sollte nach Möglichkeit schnell erfolgen. Dafür wurden die Einfrierröhrchen in ein  $37^\circ\text{C}$  Wasserbad und die Zellsuspension wurde sofort nach Auftauen in 20 ml erwärmtes Medium überführt und die Zellen für 10 Minuten bei 1.300 rpm pelletiert. Anschließend wurden die Zellen resuspendiert und in Kultur genommen. Am nächsten Tag folgte ein weiterer Mediumwechsel.

### **2.4.3 Organentnahme bei Mäusen**

Die Tötung der Mäuse zur Organentnahme erfolgte durch  $\text{CO}_2$ -Begasung oder zervikale Dislokation.

### **2.4.4 Einbettung von Organproben für die Histologie**

Zur histologischen Untersuchung wurden von Organproben Dauerpräparate über die Einbettung in Paraffin hergestellt. Hierzu wurden die entnommenen Organe über Nacht in 4% PFA fixiert und anschließend von AG Zelluläre und Molekulare Pathologie in Paraffinblöcke eingebettet. Um das Fixiermittel zu entfernen, wurden die Proben zunächst mal gewässert. Daraufhin erfolgten eine vollständige Entwässerung der Gewebe in einer aufsteigenden Alkoholreihe sowie die Entfernung von Alkoholresten durch Einlegen in Xylol. Anschließend erfolgte die Einbettung mit erwärmten, verflüssigten Paraffin. Nach vollständigem Erstarren ließen sich die Paraffinblöcke zur Herstellung von Dünnschnitten im Mikrotom verwenden.

### **2.4.5 Isolation von Knochenmark**

Dafür wurden Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und unter sterilen Bedingungen Femur und Tibia aus beiden Hinterläufen der Maus entnommen und von Fell, Haut und Muskeln befreit. Die Knochen wurden anschließend mit Mörser und Pistill unter Zugabe von Medium zerrieben und die Zellen durch einen  $45\ \mu\text{m}$  Filter gefiltert, zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml FACS-Puffer resuspendiert. Die Zellzahl wurde im Analysegerät Hemavet 950 (Drew Scientific) bestimmt.

### **2.4.6 Transplantation von Knochenmark**

Für die allogene Transplantation von Knochenmark wurden die Empfängermäuse 24 Stunden vor der Transplantation mit 950 rad im gamma-Strahler bestrahlt. Die Knochenmarkzellen der Spendermäusen wurden wie in 2.4.5 beschrieben isoliert, mit

FACS-Puffer gespült, danach in PBS aufgenommen und im Volumen von 200  $\mu$ l in die laterale Schwanzvene eines jeden Rezipienten gespritzt.

T-Zellen wurden nicht depletiert, da alle Versuchstiere im C57BL/6 genetischen Hintergrund zur Verfügung standen und demzufolge keine Immunreaktionen gegen fremde MHC-Moleküle zu erwarten waren.

#### **2.4.7 Gewinnung von mononukleären Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation**

Bei einem Teil der Experimente wurden zunächst Gradientenzentrifugationen durchgeführt, um ausschließlich lebende, mononukleäre Zellen zu isolieren. Knochenmarkszellen aus Tibia und Femur wurden wie in 2.4.5 beschrieben isoliert, in 3 ml IMDM-Medium resuspendiert und damit 5 ml Histopaque 1083 in einem 15 ml-Röhrchen überschichtet, so dass sich beide Phasen nicht mischen konnten. Anschließend wurde für 20 Minuten bei 2000 rpm ohne Bremse bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die als weißlicher Ring erkennbare Lymphozytenfraktion wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen, zweimal durch Zentrifugation in großem Volumen (30 ml) IMDM-Medium gewaschen, resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Zum Einstellen der gewünschten Zellkonzentration wurde das jeweilige Volumen des Mediums, in dem sich die Zellen befanden, angeglichen.

#### **2.4.8 Aufreinigung Lineage negativer Zellen aus dem Knochenmark**

Um eine Anreicherung hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen (Lineage-negative Zellen) zu erhalten, wurden Knochenmarkszellen aus Femur und Tibia isoliert (siehe 2.4.5), über Ficoll-Gradienten aufgereinigt (siehe 2.4.7) und anschließend mit Hilfe des Lineage Cell Depletion Kits (Miltenyi Biotec) markiert und die Lineage-negativen Zellen mit Magnetic Cell Sorting (MACS) Trennsäulen separiert. Um die Zellen separieren zu können wurden die Lineage-positiven Zellen mit einem Cocktail Biotin-konjugierter monoklonaler Antikörper (CD5, B220, CD11b, Anti-Gr-1 (Ly-6G/C) und Ter119) (eBioscience) markiert. Bei diesen Antikörpern handelt es sich um linienspezifische Antikörper, die nur auf determinierten oder reifen Blutzellen exprimiert werden. CD5 wird auf B- und T-Lymphozyten exprimiert, CD45R auf B-Zellen, Cd11b auf Monozyten, Gr-1 auf Granulozyten und Ter119 auf Erythrozyten CLPs. An diese markierten Zellen binden im zweiten Schritt die Streptavidin-konjugierten Microbeads (Biotin Binder Dynabeads, Invitrogen), welche die Lineage positiven Zellen durch magnetische Anziehung in der Trennsäule auffangen, während die Lineage negativen Zellen durch die Säule hindurch laufen. Die Reinheit beider Zellfraktionen wurde per FACS-Analyse verifiziert. Anschließend wurden die Zellen mit den Antikörpern Lineage cocktail, Sca-1 und cKit angefärbt und durchflusszytometrisch sortiert.

### **2.4.9 Isolierung von Zellpopulationen mittels MACS**

Zur Isolierung verschiedener Zellpopulationen aus einem Zellgemisch wurde die Methode der magnetischen Zelltrennungssystem MACS (Magnetic cell sorting) angewandt. Dabei werden Antikörper gegen spezifisches Antigen auf der Zelloberfläche verwendet, die mit gebundenen, superparamagnetischen Mikropartikeln (MicroBeads) gekoppelt sind. Die Trennung spezifisch markierter Zellen von unmarkierten Zellen aus einem Gemisch erfolgt in einem starken Magnetfeld [170]. Wird die Säule aus dem magnetischen Feld entfernt, können markierte Zellen durch Ausspülen der Säule gewonnen werden (Elution). Das MACS-System kann zur Anreicherung oder zum Ausschluss einer Zellpopulation (Depletion) aus einer Gesamtzellpopulation eingesetzt werden. Die aufgereinigte Zellsuspension wurde in MACS-Puffer resuspendiert und mit den entsprechenden Partikeln bei 4°C für 15 min inkubiert. Anschließend wurden die gekoppelten Zellen mit MACS-Puffer gewaschen und entsprechend ihrer Konzentration über MACS-Säulen (MS, LS, LD) im starken Magnetfeld nach Herstellerangaben aufgereinigt. Nach der Aufreinigung erfolgte eine Kontrolle der Effizienz und Reinheit mittels FACS Analyse. Diese betrug standardisiert etwa 90-99%.

### **2.4.10 Isolation von Milz**

Aus den Spendermäusen wurden weiterhin die Milzen herauspräpariert, welche zerdrückt und mit HF2+ Puffer durch einen 100 µm Filter (BD Falcon™, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) gespült wurden. Die Zellsuspension wurde nochmals durch einen 45 µl Filter (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) gefiltert, zentrifugiert, der Überstand dekantiert und in 1 ml FACS-Puffer resuspendiert.

### **2.4.11 Aufreinigung von Blut für die FACS-Färbung**

Zur Isolierung von Blutlymphozyten wurde circa 5 Tropfen Blut aus der Vena facialis entnommen und in ein Reaktionsgefäß mit 400 µl Heparinpuffer zur Vermeidung der Koagulation gesammelt. 3 ml Lymphoprep™ (AXIS-SHIELD, Oslo; Dichte 1,077 g/ml) wurden in 5ml Röhrchen vorgelegt, langsam mit Blut überschichtet und für 20 Minuten mit 1800 U/Minute (Beckmann TJ-6; ohne Bremse) zentrifugiert. Dabei erfolgte eine Auftrennung der Bestandteile nach Dichte. Während Erythrozyten abzentrifugiert wurden, sammelten sich die mononukleären Zellen, v.a. die Lymphozyten, an der Interphase zwischen Serum und Ficoll. Diese Interphase wurde abgenommen, mit PBS gewaschen und in einem zweiten Schritt bei 4500 U/min für 5 min zentrifugiert. Das entstehende Lymphozyten-Pellet wurde in 50 µl FACS-Puffer mit fluorochrommarkierten Antikörper-Mix resuspendiert und für 30 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und abzentrifugiert, und das Pellet in 50 µl FACS-Puffer aufgenommen.

### 2.4.12 Produktion von Virusüberständen mittels Calciumphosphatmethode

Für die Infektion von murinen Knochenmarkzellen mussten Virusüberstände hergestellt werden. Das Einringen der Expressionsplasmide in eukaryotische Zellen wurde mittels der Calciumphosphat-Methode durchgeführt. Man nimmt an, dass sich Plasmid-DNA dabei an Calciumphosphatkristalle anlagert und mittels Endocytose in die Zellen aufgenommen wird. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Transfektionen wird das Vektorplasmid mit einem *gag/pol* Expressionplasmid und einem *env* Expressionplasmid co-transfiziert. Die Expressionsplasmide stellen die viralen Strukturproteine her. Es wurden 293T Zellen transfiziert, welche das SV 40 große T-Antigen stabil exprimieren. Das SV 40 große T-Antigen bindet an den SV 40 origin of replication, welcher sich in sämtlichen verwendeten Expressionsplasmiden befindet und so eine intrazelluläre Plasmid Replikation ermöglicht, die ebenfalls zu verstärkter Genexpression führt. Die Vektoren knospen von den 293T-Zellen in das umgebende Medium und können zur Transduktion auf Zielzellen verwendet werden.

#### Ansatz pro 10 cm Petrischale:

8 µg des jeweiligen retroviralen Vektorplasmids

10 µg *gag/pol* Plasmid

3 µg *env* Plasmid

36 µl CaCl<sub>2</sub> 2M

auf 300 µl mit H<sub>2</sub>O auffüllen

Wachstumsmedium	Sammelmedium
DMEM 4,5 g Glukose	DMEM 4,5 g Glukose
10 % FKS	10 % FKS
1 % Pen/Strep	1 % Pen/Strep
	pH auf 7,8 – 7,9 mit NaOH einstellen
	1 % Hepes
	1% L-Glutamin

Die Zelllinien wurden bei 37 °C und unter 5% CO<sub>2</sub> Begasung in Zellkulturflaschen gehalten. Nach dem Erreichen von 70-80 % Konfluenz wurde die Transfektion gestartet. In der Regel wurde es erreicht in dem man am Vorabend die Zellen 1:7 gesplittet hat.

#### Zeitlicher Ablauf:

Tag 0 (Nachmittag) – 293 T Zellen wurden so gesplittet, dass sie in 24 Stunden etwa 70% konfluent waren.

Tag 1 (Nachmittag) – Am nächsten Tag wurde der Transfektionsmix hergestellt, dabei wurden die Plasmide mit 36 µl 2,5 M CaCl<sub>2</sub> versetzt, mit aqua dest auf ein Volumen von 300 µl gebracht und zum Präzipitieren tropfenweise in 300 µl blubbernden 2x HBS-Puffer (Präzipitationspuffer) gegeben. Anschließend wurde das Wachstumsmedium mit Zusatz von 25 µM Chloroquin (Sigma) erneuert. Anschließend wurde die kopräzipitierte DNA vorsichtig auf die Zellen gegeben. Bei Verwendung von Chloroquin, einer endosomolytischen Substanz, kann die Transfektionseffizienz deutlich gesteigert werden [171].

Tag 2 (Vormittag) - nach 8 bis 10 Stunden wurde erneut das Wachstumsmedium gegen frisches ohne Chloroquin ausgetauscht.

Tag 2 (Nachmittag) – wiederum nach 8 wurde das Wachstumsmedium gegen ein frisches Sammelmedium ausgetauscht und ab dem folgenden Tag alle 12 Stunden der Überstand abgenommen, steril filtriert und die Zellen mit frischem Sammelmedium versehen. Die Virusernte wurde 2-3 Tagen vorgenommen.

Tag 3 (Vormittag und Nachmittag): Virusernte.

Tag 4 (Vormittag und Nachmittag): Virusernte.

Nach der Transfektion befanden sich im Nährmedium der 293T-Zellen gereifte Vektorpartikel. Das Medium wurde durch ein 0,45µm Filter gegeben, um Zellen und Zelltrümmer herauszufiltern. Der Vektorüberstand wurde bei 4°C weiterverarbeitet.

### **2.4.13 Konzentrierung von Retroviralen Vektoren mittels Ultrazentrifugation**

Im Anschluss wurde der gesammelte virushaltige Überstand in 35 ml Ultrazentrifugenröhrchen überführt und in einer Beckman Ultrazentrifuge mit einem Schwingrotor SW28 bei 10,000 RPM und 4°C über Nacht pelletiert und der Rotor auslaufen gelassen. Der Überstand wurde dekantiert und das Viruspellet in 350 µl X-Vivo gelöst. Danach wurde die Lösung in Kryoröhrchen aliquotiert, da ein häufiges Auftauen und Einfrieren zum Verlust von infektiösem Virus führt, und bei -80°C gelagert.

#### 2.4.14 Bestimmung des Virustiters

Bevor die vektorhaltige Zellkulturüberstände für die Infektion primärer Knochenmarkzellen eingesetzt konnten wurden sie titriert, um zu gewährleisten, dass die Zellen durch den Virusüberstand ausreichend infiziert werden können.

Dafür wurden am Vortag  $2,5 \times 10^4$  NIH/3T3-Zellen pro Schale einer 6 well-Zellkulturplatte ausgesät. Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen mit 10-fach Verdünnungen des zu titrierenden Virusüberstandes unter Zugabe von  $4 \mu\text{g/ml}$  Polybren für 48-72 h inkubiert. Da der untersuchte retrovirale Vektorkonstrukt dieser Arbeit das Markergen tdTomato trug, konnte die Bestimmung transduzierter Zellen mit Hilfe der durchflusszytometrischen Analyse durchgeführt werden. Der Titer der Überstände berechnete sich aus der Anzahl der ausgesäten Zellen, dem Prozentsatz der tdTomato-positiven Zellen, dem Volumen des eingesetzten Überstandes und einem Faktor 2, der sich aus der notwendigen Bedingung ergibt, dass die Zellen sich zur Transduktion einmal teilen mussten:

$$\text{Titer [Partikel/ml]} = \frac{2 \times 5 \times 10^4 \text{ ausgesäte Zellen} \times \% \text{ tdTomato-positiv}}{\text{ml eingesetzter Virusüberstand}}$$

Der Virus Titer betrug durchschnittlich  $5 \times 10^5$  (beim SF91-FLT3-ITD-IRES-tdTomato) und  $1 \times 10^6$  (beim Leervektor SF91-IRES-tdTomato).

#### 2.4.15 Herstellung Retronektin-beschichteter Zellkulturplatten

Die Transduktionseffizienz der liniennegativen Knochenmarkzellen wurde durch den Einsatz von Retronektin gesteigert. Retronektin besitzt Bindungsstellen sowohl für Viruspartikel als auch für Wirtszellen, was die Kolo-kalisation zwischen beiden erleichtert. Die Vorbereitungen der Platten wurden am Vorabend durchgeführt. Dazu wurden 2 ml einer  $48 \mu\text{g/ml}$  Retronektinlösung (PBS mit rekombinantem Fibronektinfragment CH-296, TAKARA, Cambrex BioScience, Verviers, Belgien) in eine Vertiefung einer 6-Loch-Schale gegeben. Nach einer Inkubation über Nacht bei  $4^\circ \text{C}$  wurde die Lösung entfernt und der Boden der Schale mit 2 ml PBS/2 % FSK für 30 min überschichtet, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Nach einer halben Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Platten zweimal mit HBSSPuffer (Sigma, Deisenhofen) gewaschen und zur Lagerung bei  $4^\circ \text{C}$  mit  $500 \mu\text{l}$  bzw. 1 ml PBS überschichtet. Die Retronektin-beschichteten Platten können bei  $4^\circ \text{C}$  mehrere Monate gelagert werden.

#### **2.4.16 Retrovirale Transduktion von hämatopoetischen LSK-Zellen**

Linienegative Knochenmarkzellen wurde wie im Kapitel 2.4.8 beschrieben isoliert, und mittels FACS Sorter durchflusszytometrisch aufgereinigt. Die Transduktion erfolgte 48 und 72 Stunden nach der Isolation der Zellen in X-VIVO10 (Bio Whittaker, Walkersville, MD), versetzt mit 100 ng/ml SCF (PeproTech), 50 ng/ml FLT3-Ligand (PeproTech), 50 ng/ml TPO (PeproTech), 20ng/ml Interleukin 3 (PeproTech) und Zugabe von 4 µg/ml Polybrene. Die Infektion wurde 2-mal im Abstand von 12 Stunden wiederholt. Anschließend wurden die Zellen geerntet, gewaschen und intravenös in die letal bestrahlten Mäuse transplantiert. Ein kleines Aliquot wurde per FACS-Analyse auf den Anteil tdTomato-positiven Zellen untersucht (Abbildung 41).

#### **2.4.17 Differentialblutbild**

Zur Bestimmung der Anzahl der Leukozyten und weiterer Blutzellen aus dem peripheren Blut von Mäusen wurde 60 ml Blut aus der Vena facialis entnommen und in ein Eppendorfgefäß, in dem sich 180 µl Blutentnahmepuffer befanden gegeben. Das Blut und der Puffer wurden gut gemischt und im automatischen Cell Counter ADVIA 120 gemessen.

#### **2.4.18 Ausstriche**

Blutausstriche wurden durch Auftropfen von einem Tropfen Blut auf einen Objektträger und anschließendem Ausstreichen unter Zuhilfenahme eines zweiten Objektträgers angefertigt. Für die Knochenmarkausstriche wurde zunächst eine Einzelzellsuspension von Knochenmarkzellen vorbereitet und anschließend wurden je  $1 \times 10^5$  Zellen in 150 µl PBS gelöst und mittels einer Zytospin-Zentrifuge auf ein Objektträger aufgetragen (5 min bei 800 U/min).

Blut- und Knochenmarkausstriche wurden über Nacht luftgetrocknet und im Knochenmark-Labor der V. Medizinischen Klinik der Universität Heidelberg mit May-Grünwald/Giemsa gefärbt. Die gefärbten Ausstriche wurden auf das Vorhandensein von leukämischen Zellen untersucht.

#### **2.4.19 Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Bei der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E-Färbung) werden subzelluläre Bestandteile des Gewebes angefärbt. Hierbei färbt der Farbstoff Hämatoxylin die Nuklei dunkelviolett, während der rote Eosin-Farbstoff an Proteine des Zytoplasmas bindet.

## 2.5 Immunbiologische Methoden

### 2.5.1 Durchflusszytometrie

Die immunphänotypische Analyse der Zellproben aus peripherem Blut, Knochenmark, Milz und Thymus erfolgte mit einem FACS Canto II bzw. FACS LSR Fortessa Durchflusszytometer (BD). Bei der Durchflusszytometrie oder auch *Fluorescence Activated Cell Sorting* (FACS) werden die Eigenschaften der zu untersuchenden Zellen während der Bewegung in einem Flüssigkeitsstrom gemessen. Dabei fließen die Zellen als Einzelpartikel durch einen Laserlichtstrahl und senden unmittelbar nach Kontakt mit diesem Photonen aus und streuen so das Licht. Dieses fällt dann auf spezifische Detektoren, die elektrische Impulse abgeben. Anschließend werden die Daten digitalisiert. Das Ergebnis wird mit Hilfe des Programmes FlowJo als so genannter Dot Plot dargestellt, in dem jede einzelne Zelle der Probe als Punkt in einem Koordinatensystem wiedergegeben wird. Alternativ werden die Ergebnisse auch als Histogramme dargestellt.

Folgende Zelleigenschaften werden dabei untersucht:

1. Vorwärtsstreulicht (FSC): Die Vorwärtsstreuung ist ungefähr proportional zur Zellgröße. Dieser Parameter wird entlang der Achse des einfallenden Lichtes gemessen.
2. Zellgranularität (SSC): Dieser Parameter korreliert mit der Zellgranularität und -komplexität innerhalb der Zellen. Dieser Parameter wird gemessen, wenn das Licht im rechten Winkel zum Laserstrahl gestreut wird.

Durch die FSC- und SSC-Werte lassen sich Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten voneinander unterscheiden (Abbildung 16).

Zusammensetzung der Oberflächenproteine: Nach vorheriger Färbung mit spezifischen Antikörpern, die an Fluorochrome gebunden sind, werden die Oberflächenantigene erkannt und die Zellen können genauer einer bestimmten Zellgruppe zugeordnet werden.

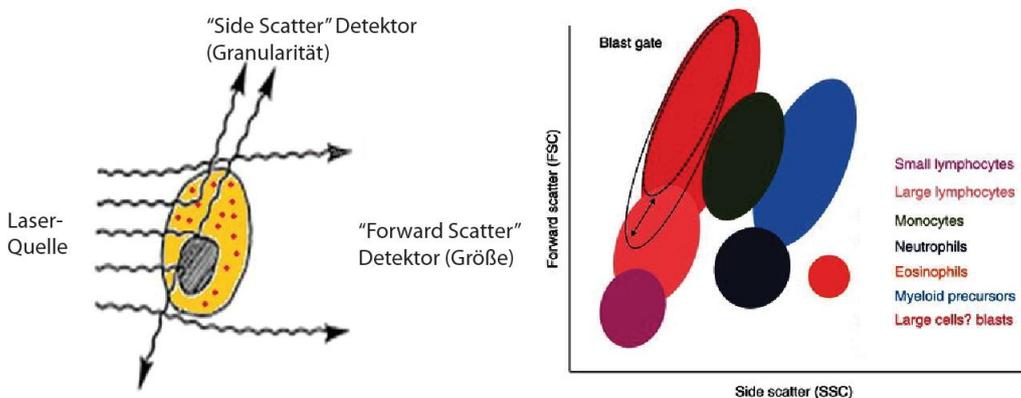


Abbildung 16: FACS Grundlage

### 2.5.2 Färben der Zellen mit Antikörpern

Für Standardfärbungen wurden  $1 \times 10^6$  Zellen in 100  $\mu\text{l}$  eiskaltem FACS Puffer mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern (meist 1:100 verdünnt,  $\sim 1\text{-}5 \mu\text{g/ml}$ ) resuspendiert und 30 min bei  $4^\circ\text{C}$  im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Zellen in FACS-Puffer gewaschen und in 100  $\mu\text{l}$  FACS Puffer mit  $1 \mu\text{g/ml}$  Propidiumiodid aufgenommen. Dieser fluoreszierende Farbstoff dringt durch permeabilisierte Zellmembranen von nekrotische Zellen ein, interkaliert in die DNA und macht somit tote Zellen im FACS sichtbar. Alternativ zu direktmarkierten Antikörpern wurden biotinylierte Antikörper gefolgt von Streptavidin (SA) gekoppelten Konjugaten verwendet.

Als Analysegerät diente das FACS Canto II oder FACS LSR Fortessa (BD Lifesciences, Heidelberg), die Auswertung der FACS-Messung erfolgte mit der FlowJo-Software (Tree Star, Ashland USA).

### 2.5.3 Zellsortierung

Das Sortieren erfolgte am FACSVantage™-, FACSDiva™-oder FACS Aria™-Geräten von BeckmanCoulter. Dabei wird analog zur Durchflusszytometrie eine FACS Färbung durchgeführt und es werden zusätzlich bestimmte Zellpopulationen heraussortiert.

### 2.5.4 Statistik

Zur Überprüfung der statistischen Signifikanz der Messwerte wurden Mittelwerte als arithmetisches Mittel mit ihrem Standardfehler berechnet. Zwei Messwertreihen wurden, wenn sie normal verteilt waren und eine vergleichbare Standardabweichung hatten, mit dem parametrischen Student's t-Test verglichen. Mehrere Vergleiche mit einer Kontrollgruppe wurden mit einer einseitig gerichteten Analyse der Varianzen (one-way-ANOVA) durchgeführt. Signifikanzen sind mit Sternen gekennzeichnet, dabei stehen \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  und \*\*\* $p < 0,001$ . Statistische Auswertung erfolgte mit der Software GraphPad Prism.

### 2.5.5 Software

Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

CellQuestPro (BD-Bioscience)

FACSDiva (BD-Bioscience)

FlowJo (Treestar)

VISTA (<http://genome.lbl.gov/vista/index.shtml>)

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Konditionale Induktion von AML1-ETO in bi-transgenen ROSA26-iM2-GFP/TgPtet-AML1-ETO Mäusen führte zu einer schnellen Mortalität

Um zunächst die Funktion aberranter AML1-ETO (AE) Expression alleine überprüfen zu können, haben wir die ROSA26-iM2 knock-in Effektormaus [172] mit der AML1-ETO Respondermaus [145] verpaart (Abbildung 17). Mit diesem konditionalen Mausmodell ROSA26-iM2/tetO-AML1-ETO (R26/AE) kann humanes AML1-ETO mit Hilfe des Tetrazyklinsystems exogen induzierbar und reversibel exprimiert werden [173]. Dabei wird der reverse Tetrazyclin-abhängige Transaktivator (iM2, oder rtTA) konstitutiv unter Kontrolle des endogenen ROSA26-Promotors exprimiert. Aber erst in Anwesenheit von Tetrazyclin (bzw. Doxyzyclin) nimmt rtTA eine Konformation ein, die eine Interaktion mit dem Operatorsequenz erlaubt und somit die Expression von eGFP (*enhanced green fluorescence protein*) sowie AML1-ETO induziert. Die Expression findet ubiquitär, mit Ausnahme des Gehirnes, statt, variiert aber gewebespezifisch [172].

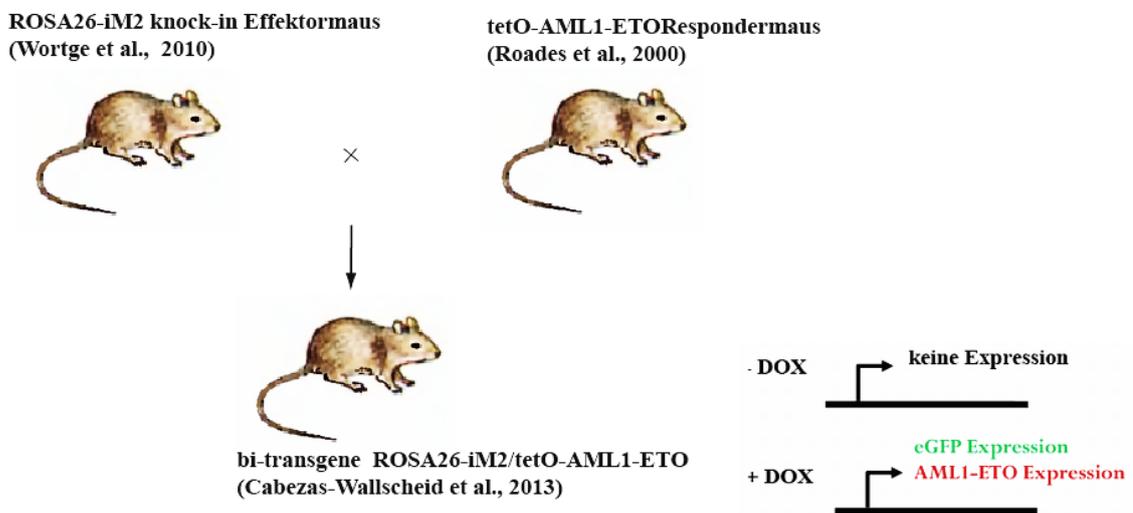


Abbildung 17: Generierung bi-transgener ROSA26-iM2/tet-AML1-ETO Mäuse. Die Expression von AML1-ETO wird durch die Zugabe von Doxyzyclin (DOX) zum Trinkwasser aktiviert.

Die konditionale Expression von AML1-ETO mit Hilfe transkriptioneller Steuerelementen des ROSA26 Locus wurde durch Zugabe von 1mgDOX/ml zu Trinkwasser in bi-transgenen R26/AML1-ETO Mäusen induziert und führte zu einem schnellen Tod der Tiere. In einem Beobachtungszeitraum von 60 Tagen wurde eine mediane Überlebenszeit von 12 Tagen erreicht. Die Kontrollmäuse bekamen normales Trinkwasser und überlebten während des gesamten Lebenszeitraumes (Abbildung 18).

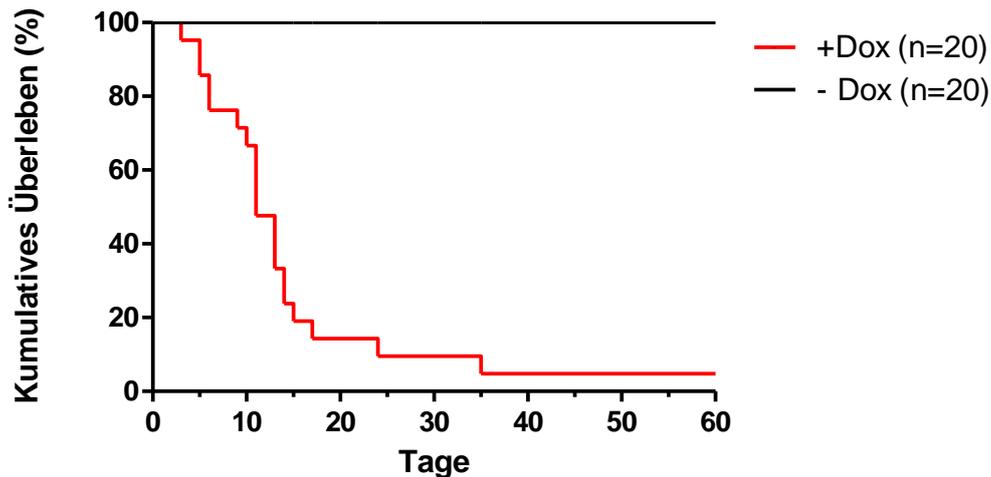


Abbildung 18: Konditionale Expression von AML1-ETO in adulten bi-transgenen ROSA26-iM2/tet-AML1-ETO resultierte in hoher und schneller Mortalität. Die Induktion von AML1-ETO Expression erfolgte durch Zugabe von Doxyzyklin zum Trinkwasser. +DOX (rot Linie) induzierte R26/AE Tiere. -DOX (schwarze Linie) nicht-induzierten R26/AE Tiere.

Da im R26/AML1-ETO Mausmodell eine generalisierte Expression von AML1-ETO stattfindet, ist es sehr schwer den beobachteten Effekt eindeutig zu erklären. Um die Mortalität umzugehen und um die konditionale Expression von AML1-ETO ausschließlich auf das hämatopoetische System zu begrenzen, wurden AML1-ETO Knochenmarkschimären hergestellt. Des Weiteren war es somit auch möglich, mit Hilfe viraler Vektoren zusätzliche aktivierende Mutationen in die Knochenmarkszellen bi-transgener R26/AML1-ETO Tiere einzuführen.

### 3.2 Expression von AML1-ETO gemeinsam mit $\text{kRAS}^{\text{G12D}}$ in hämatopoetischen Zellen führt nicht zur Induktion von Leukämie

Zur Untersuchung des Zusammenwirkens von AML1-ETO zusammen mit zusätzlichen Komplementationonkogenen wurde als erstes mutiertes  $\text{kRAS}^{\text{G12D}}$  ausgewählt. Dafür wurden die bi-transgenen R26/AML1-ETO Mäuse mit tetO- $\text{kRAS}^{\text{G12D}}$  Mäusen verpaart, die das  $\text{kRAS}^{\text{G12D}}$  Onkogen unter der regulatorischen Sequenz des Tetrazyklin-Operators exprimiert. Aus dreifach transgenen Mäusen ROSA26-iM2/tetO-AML1-ETO/tetO- $\text{kRAS}^{\text{G12D}}$  (R26/AE/kRAS) (CD45.1/Ly5.1) wurden nicht-induzierte Knochenmarkszellen in bestrahlte C57BL/6 Mäuse (CD45.2/Ly5.2) transferiert (Abbildung 19, Tabelle 20). Die Bestrahlung gewährleistet, dass eine vollständige Wiederherstellung der Blutbildung der Empfängermause nach der Transplantation ausschließlich von den Spenderzellen ausgeht. Sofort nach dem adoptiven Transfer wurde AML1-ETO und  $\text{kRAS}^{\text{G12D}}$  Expression konditional durch Zugabe von 1mgDOX/ml Trinkwasser aktiviert. Mit Hilfe der differentiell exprimierten Oberflächenmarker (Ly5.1 bzw. Ly5.2) zusätzlich zur eGFP Expression ist es möglich transgene Donorzellen von Empfängerzellen zu unterscheiden. Dabei nutzt man einen Polymorphismus des Oberflächenantigens CD45 (oder Ly5), dass alle hämatopoetischen Zellen charakteristischerweise exprimieren. Wöchentlich wurde der Allgemeinzustand (Gewicht, Motilität, Morbidität) bestimmt. Nachdem sich der Allgemeinzustand der Tiere verschlechterte wurde alle vier Wochen Blut für ein großes Blutbild sowie für eine Immunphänotypisierung mittels Durchflusszytometrie genommen.



Abbildung 19: Generierung von dreifach transgenen Mäusen ROSA26-iM2/tetO-AML1-ETO/tetO- $\text{kRAS}^{\text{G12D}}$ , um den Effekt der gemeinsamen Expression von AML1-ETO und  $\text{kRAS}^{\text{G12D}}$  auf Leukämieinduktion zu untersuchen. Weitere durch Kreuzung entstandene Nachkommen wie ROSA26-iM2/tetO-AML1-ETO (R26/AE), ROSA26-iM2/tetO- $\text{kRAS}^{\text{G12D}}$  (R26/kRAS) und ROSA26-iM2 (R26) wurden als Kontrollgruppen eingesetzt. Die Expression von AML1-ETO und  $\text{kRAS}^{\text{G12D}}$  wurde durch die Zugabe von Doxyzyklin zum Trinkwasser aktiviert.

Tabelle 20: Gruppenaufteilung

Gruppen	Transgen	Dox	eGFP Expression	Beobachtung
1	R26/AE	+	+	Effekt von AML1-ETO alleine
2	R26/kRAS <sup>G12D</sup>	+	+	Effekt von kRAS <sup>G12D</sup> alleine
3	R26/AE/ kRAS <sup>G12D</sup>	+	+	Effekt der gemeinsamen Expression von AML1-ETO und kRAS <sup>G12D</sup>
4	R26/Kontrolle	-	-	Kontrolle der regulierbaren <i>tet on/off</i> Systems auf „Dichtigkeit“ (Hintergrundexpression)

Bei deutlichen Anzeichen einer Erkrankung wurden die Tiere getötet, um weiteres Leiden zu verhindern. Alle Tiere wurden am Ende des Experimentes mauspathologisch untersucht (Knochenmark, Milz, Blut, Invasion von leukämischen Zellen, Zytospins) und eine ausführliche FACS Analyse der hämatopoetischen Zellen durchgeführt. Außerdem wurde geprüft ob der Transfer von Knochenmarkzellen aus kranken Tieren in sekundäre Rezipienten eine Leukämie auszulösen kann, als entscheidender Unterschied zu anderen hämatologischen Erkrankungen.

### 3.2.1 Die gemeinsame Expression von AML1-ETO und kRAS<sup>G12D</sup> führte im Beobachtungszeitraum von 12 Monaten nach Transplantation zu einer zum Teil verkürzter Lebensdauer

#### 3.2.1.1 Überlebensrate der transplantierten Mäuse

Wie in der Graphik zum kumulativen Überleben (Abbildung 20) zu sehen ist, beträgt die Überlebensrate bei den Kontrollgruppen R26 (n=10) und kRAS (n=12) 100%. In der Gruppe AML1-ETO überlebten 81,2 % (12/n=15) und in der Gruppe AML1-ETO/kRAS überlebten 91% (14/n=15). Die Unterschiede im Überleben im Vergleich zu Kontrollgruppe R26 sind nicht signifikant.

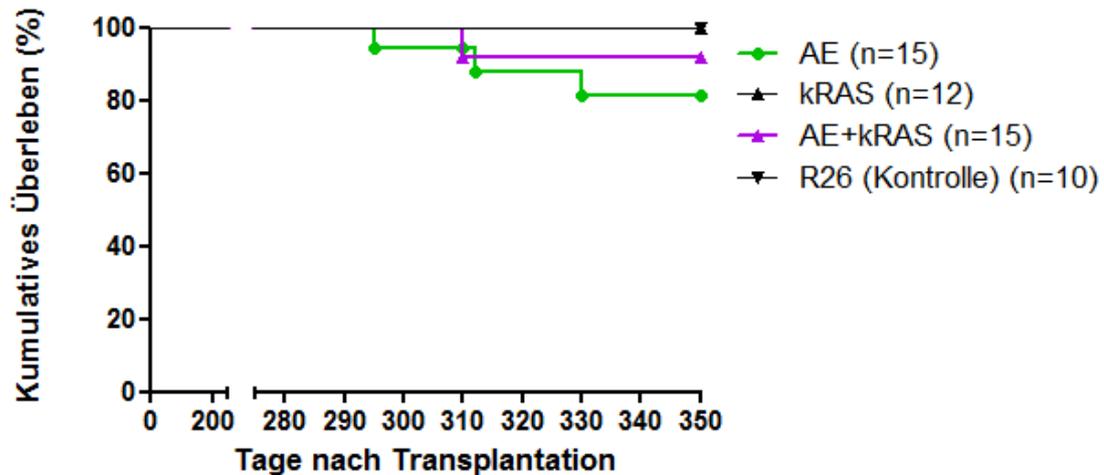


Abbildung 20: Die gemeinsame Expression von AE und kRAS führt nicht wie erwartet zu einer schnellen Mortalität. In der Gruppe AE/kRAS verstarb ein Tier und in der Gruppe AE verstarben drei Tiere im Beobachtungsraum von 12 Monaten nach der Dox-Induktion.

### 3.2.1.2 Engraftment der transplantierten Zellen und Differentialblutbild

Engraftment bezeichnet den Zeitpunkt, an dem die transplantierten Stammzellen im Knochenmark des Empfängers angewachsen sind und mit Bildung neuer Blutzellen beginnen. Dass die Transplantation tatsächlich funktioniert hat und die Blutzellen von den übertragenen Spenderstammzellen kommen, kann man an den Oberflächenmarkern der Leukozyten feststellen. 8 Wochen nach der Transplantation wurde die Rekonstitutionseffizienz mit Hilfe der differentiell exprimierten Oberflächenmarker Ly5.1 (Spenderzellen) Ly5.2 (Rezipientenzellen) durch FACS Analyse bestimmt. Die Induktion der Onkogenexpression konnte über eGFP Expression verfolgt werden (Abbildung 21).

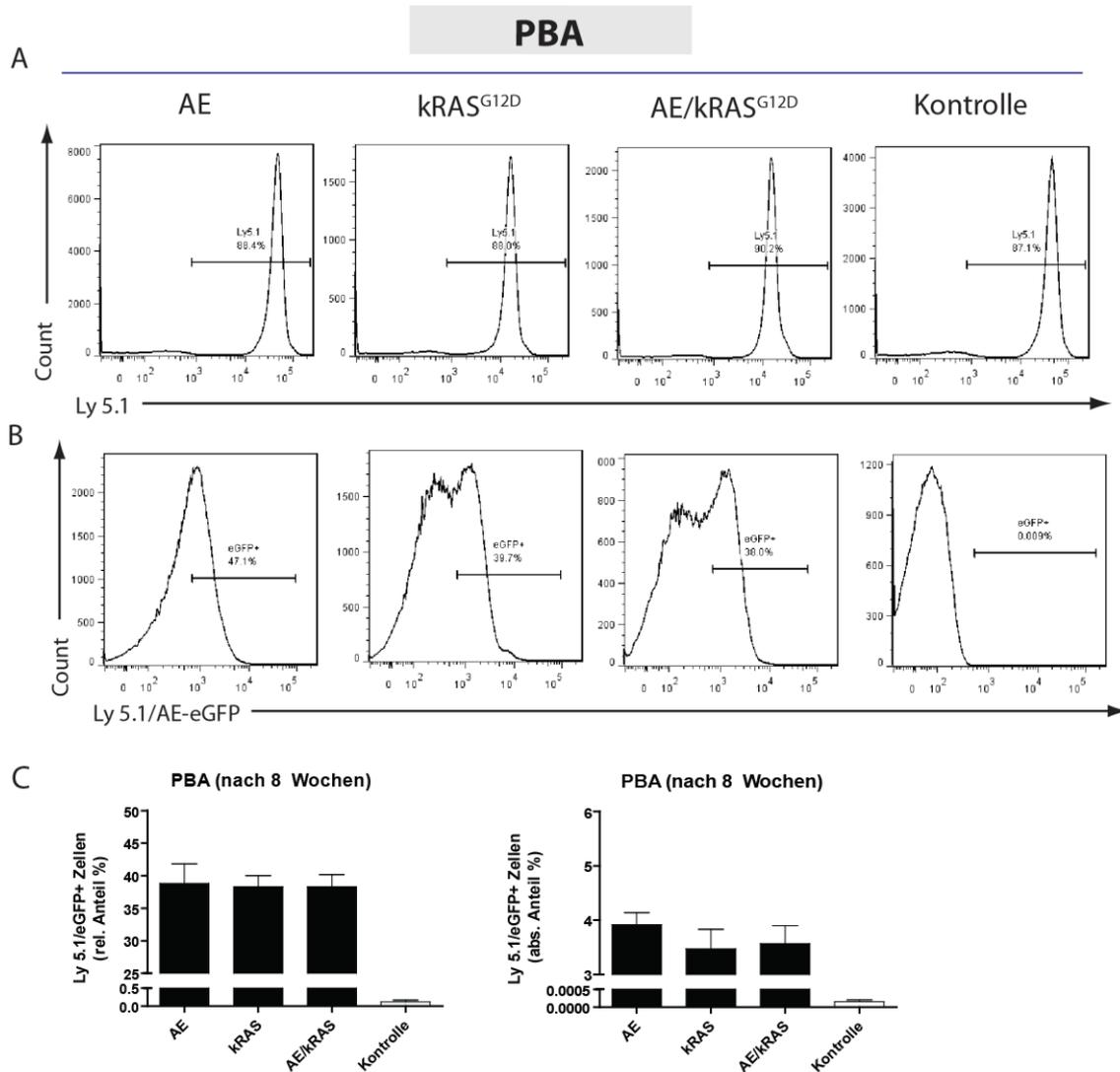


Abbildung 21: Erfolgreiches Engraftment der transplantierten Zellen in allen Gruppen. 8 Wochen nach der Transplantation zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Engraftment der Spenderzellen (Ly5.1), sowie in der Expression von eGFP (Ly5.1/eGFP). (A) Engraftment der Knochenmark-Spenderzellen (Ly5.1) im peripheren Blut der Empfängermaus als Histogramm. (B) eGFP Expression der Spenderzellen (eGFP/Ly5.1) als Histogramm. (C) Relativer und absoluter Anteil der eGFP/Ly5.1 doppelt positiver Zellen als Balkendiagramm.

12 Monaten nach Dox-Induktion konnte in den AML1-ETO und AML1-ETO/kRAS exprimierenden Tieren eine leichte Reduktion von Erythrozyten (RBC), Thrombozyten (PLT) und Hämoglobin (HB), und gleichzeitig eine leichte Erhöhung der Neutrophilen im peripheren Blut festgestellt werden. Dagegen war die Anzahl der Leukozyten (WBC, white blood cell count) und der großen, ungefärbten Zellen (LUC, „large unstained cells“) nicht signifikant verändert (Abbildung 22).

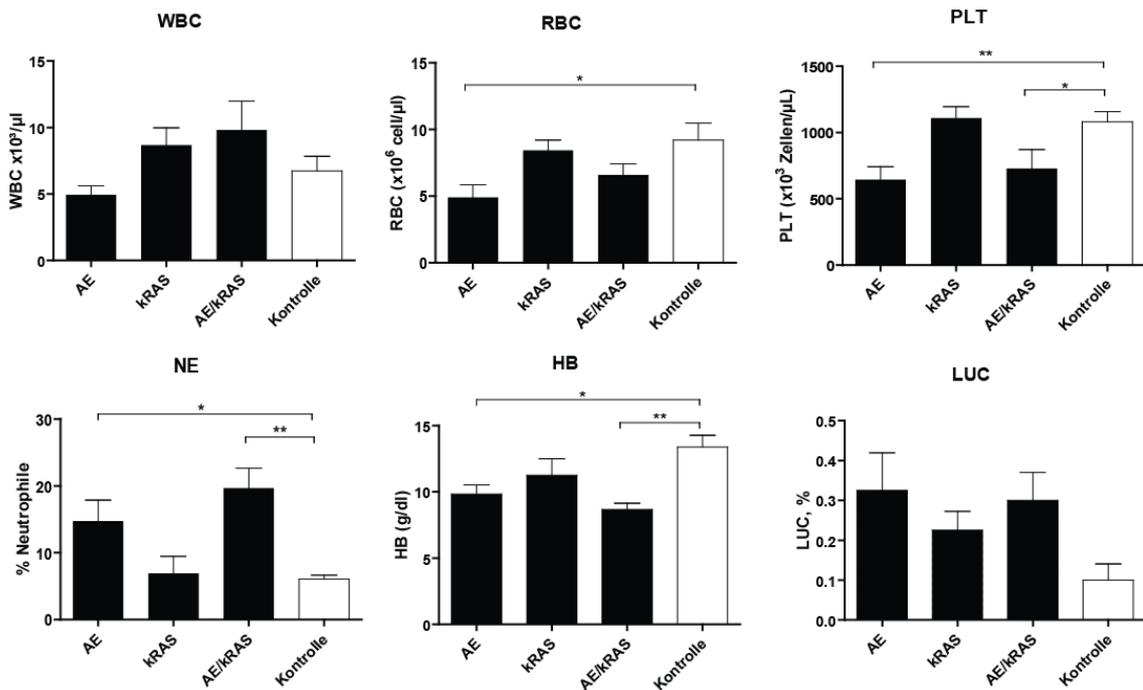


Abbildung 22: 12 Monate nach Dox-Induktion zeigten sich die ersten Auffälligkeiten im Differentialblutbild in den Gruppen AE und AE/kRAS. Untersucht wurden Leukozyten (WBC, white blood cell), Erythrozytenzahl (RBC, red blood cell), Thrombozytenzahl (PLT, platelet count), Neutrophile Granulozyten (NE, neutrophile granulocytes), Hämoglobin (HB, haemoglobin) und großen, ungefärbten Zellen z.B. Blasten (LUC, large unstained cells).

Weitere Auffälligkeit zeigte sich bei der durchflußzytometrischen Untersuchung. Der Anteil der eGPF exprimierenden Zellen im peripheren Blut von AML1-ETO Mäusen war von 39% auf 64,7% (1,6fache) und bei AML1-ETO/kRAS von 38,1% auf 52,3% (1,3fache) gestiegen (Abbildung 23).

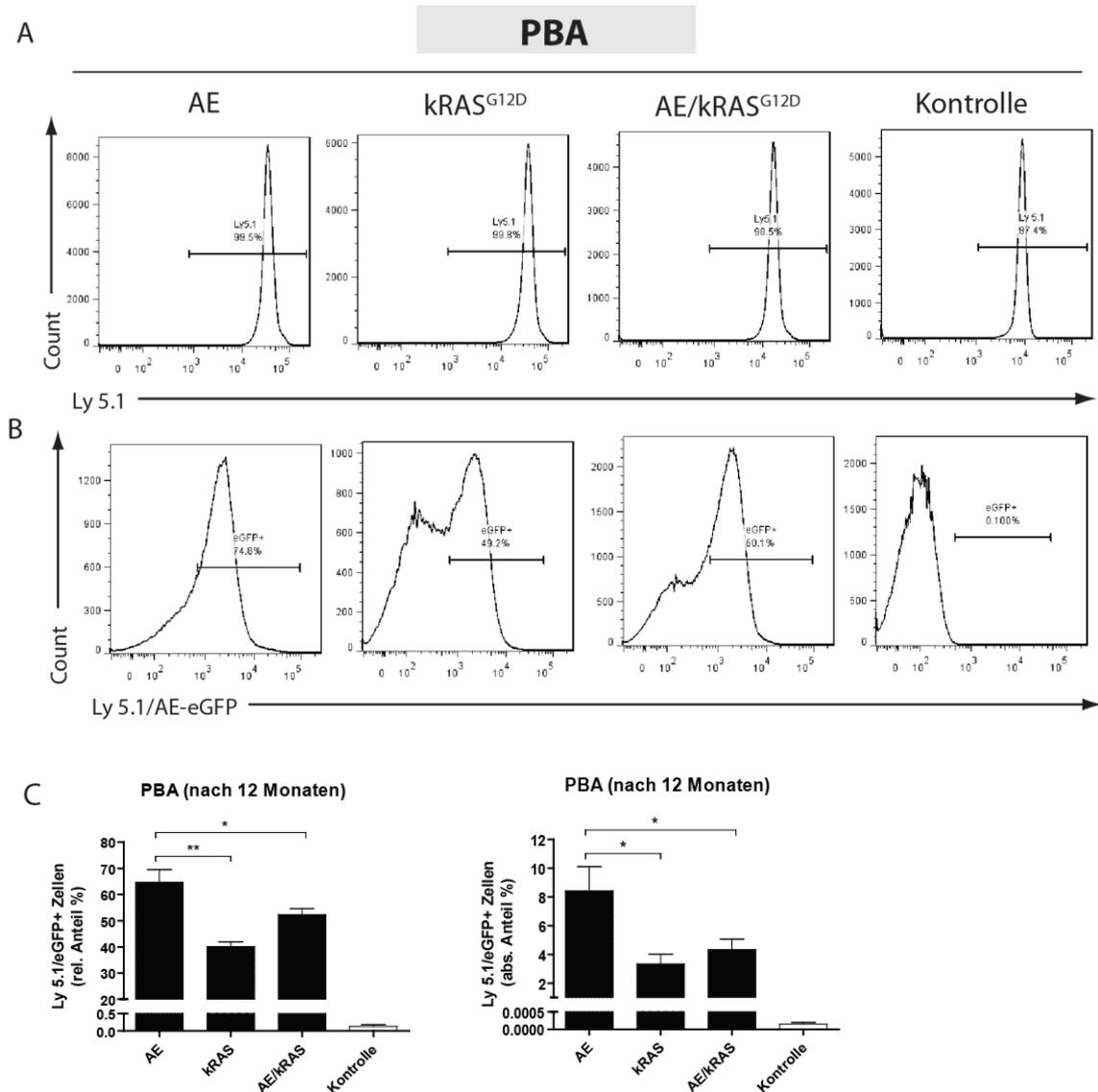


Abbildung 23: 12 Monate nach der Transplantation zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Langzeit-Engraftment der Spenderzellen (Ly5.1), aber in der Gruppe AE war die Expression von eGFP/Ly5.1 doppelpositive Zellen signifikant höher als in den Kontrollgruppen. (A) Engraftment der Knochenmark-Spenderzellen (Ly5.1) im peripheren Blut der Empfängermaus als Histogramm. (B) eGFP Expression der Spenderzellen (eGFP/Ly-5.1) als Histogramm. (C) Relativer und absoluter Anteil der eGFP/Ly-5.1 doppel positiven Zellen als Balkendiagramm.

### 3.2.1.3 Keine Unterschiede in den Milz- und Lebergewichten der transplantierten Mäuse

Bei allen erkrankten Tieren wurde vor dem Tötung das Körpergewicht sowie das Gewicht entnommener Organe notiert. Alle anderen Tiere wurden erst zum Ende des Experiments nach 12 Monate Dox-Induktion getötet. Trotz deutlicher Anzeichen einer Erkrankung bei den wenigen AML1-ETO und AML1-ETO/kRAS ergab die Sektion

keine signifikanten Veränderungen im absoluten und relativen Gewicht der Milz und Leber (Abbildung 24). Die relativen Organgewichte wurden in Relation zum jeweiligen Körpergewicht ermittelt. Als „erkrankt“ galten Mäuse mit Auffälligkeiten wie Bewegungsunlust, Gewichtsabnahme, struppiges Fell und aufgekrümmter Rücken. Das Körpergewicht wurde zu vier verschiedenen Zeitpunkten notiert und daraus eine Gewichtskurve erstellt (Abbildung 25). In AML1-ETO und AML1-ETO/kRAS Mäusen ist eine leichte, aber nicht signifikante Gewichtsabnahme festzustellen.

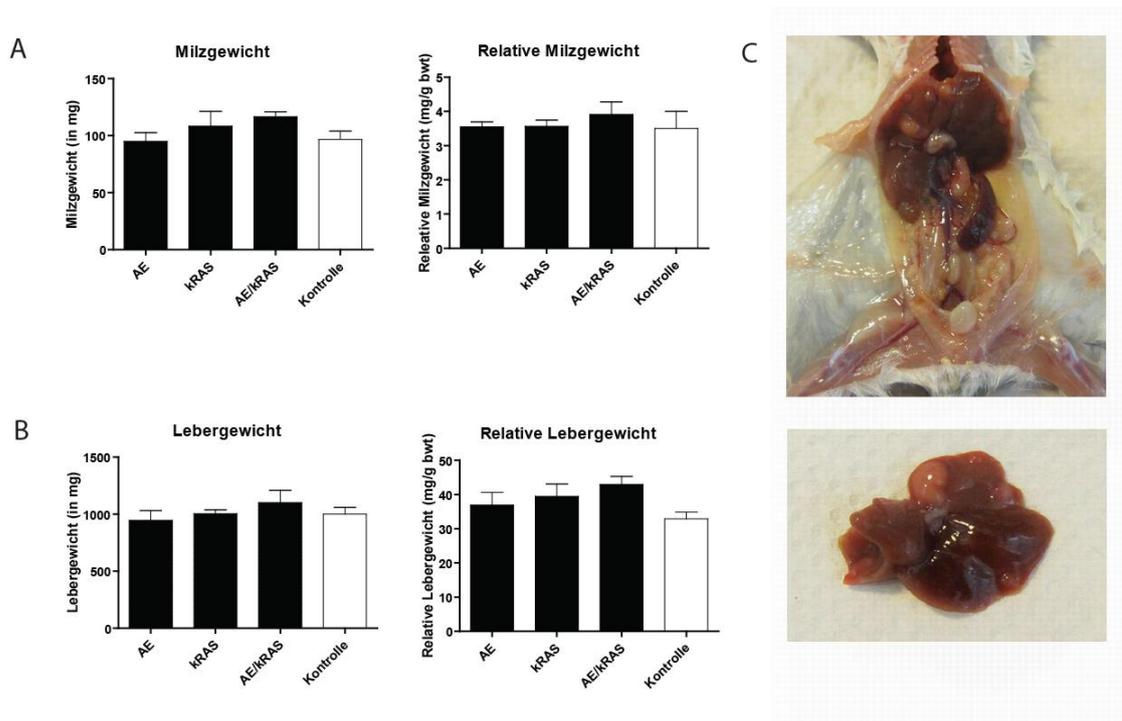


Abbildung 24: 12 Monate nach der Transplantation zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den Milz- und Lebergewichten der transplantierten Mäuse (A-B) Das absolute und relative Milzgewicht und Lebergewicht. (C) Offener Situs einer erkrankten AE/kRAS Maus.

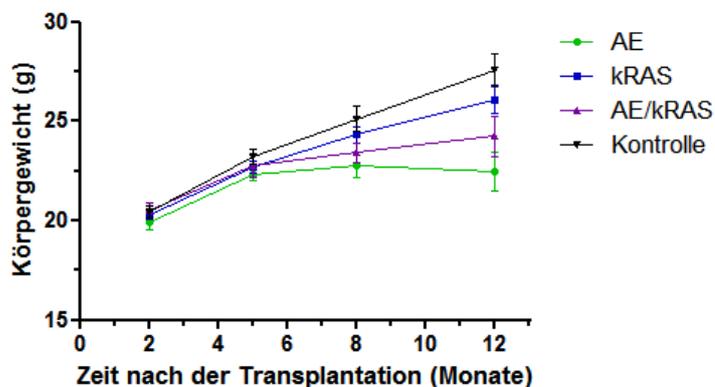


Abbildung 25: 12 Monate nach der Transplantation zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Körpergewicht der Tiere.

### 3.2.1.4 Hämatopoese der AML1-ETO und AML1-ETO/kRAS Tiere ist verändert

Um zu überprüfen, ob die Auffälligkeiten, die im Differentialblutbild festgestellt waren auf Veränderungen der Hämatopoese im Knochenmark zurückzuführen sind, wurden die Tiere einer detaillierten durchflußzytometrischen Analyse unterzogen. Dabei ließ sich feststellen, dass auch im Knochenmark der Anteil der eGFP-positiven Zellen bei AML1-ETO und AML1-ETO/kRAS Mäusen signifikant höher war als bei kRAS.

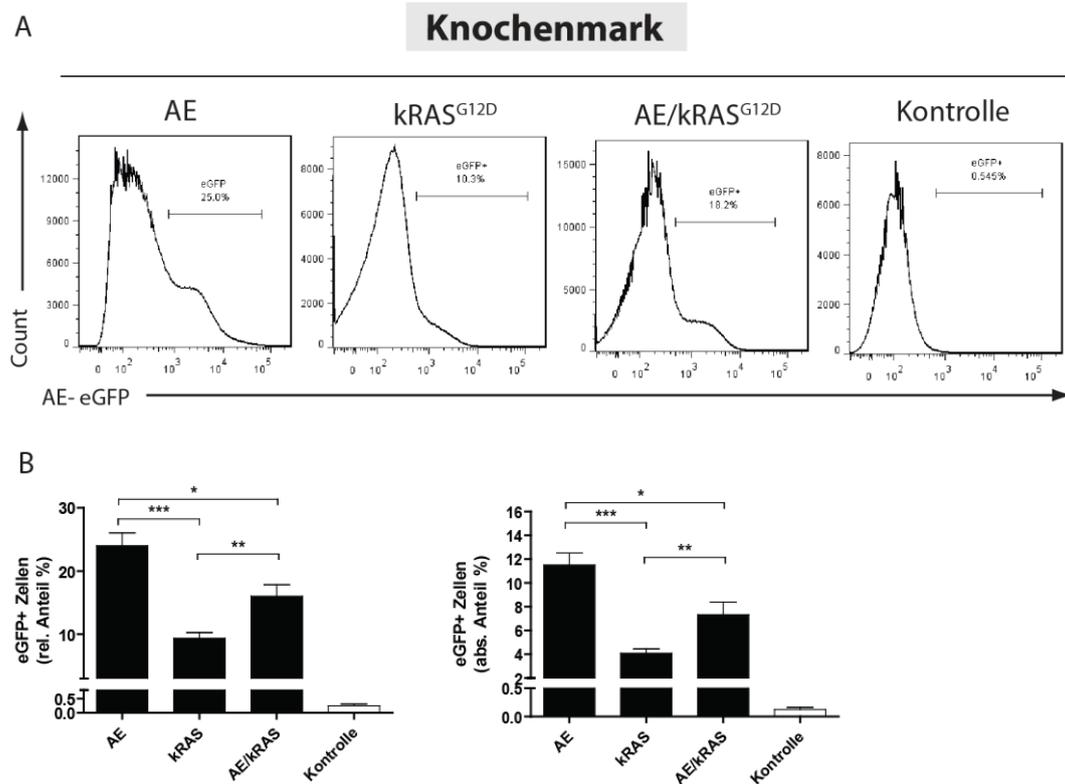


Abbildung 26: 12 Monate nach der Transplantation war die Expression von eGFP/Ly5.1 doppelpositive Zellen im Knochenmark in der Gruppe AE und AE/kRAS signifikant höher als in der kRAS Gruppe. (A) eGFP Expression der Spenderzellen als Histogramm. (C) Relativer und absoluter Anteil der eGFP positiven Zellen als Balkendiagramm.

### 3.2.1.5 Die Expression von AML1-ETO und AML1-ETO/kRAS führt zu einer verstärkte Granulopoese

Die Granulopoese findet im Knochenmark statt und verläuft in drei Reifungsphasen ab. Ausgehend von der GMP über den Myeloblast, Promyelozyt und Myelozyt mit anschließender Ausdifferenzierung. Diese Zellen bilden den Pool der morphologisch identifizierbaren proliferativen Vorläuferzellen. Im Laufe der Differenzierung kommt es zur Verdichtung sowie zu Segmentartigen Abschnürungen des Kerns. Der größte Teil der reifen Granulozyten verbleibt als Reservepool im Knochenmark. Sie dienen als Puffer und können bei Bedarf innerhalb kurzer Zeit in das periphere Blut freigesetzt werden. Dort üben sie ihre Funktionen aus, haben hierbei aber nur eine relativ kurze Lebensdauer. Der Immunphänotyp wurde mittels Durchflußzytometrie charakterisiert. In den AML1-ETO und AML1-ETO/kRAS exprimierenden Tieren wurde eine verstärkte Granulopoese mit einer weitreichenden Differenzierung der Zellen festgestellt. Der Anteil an CD11b/Gr-1-positiven Population (Marker für differenzierte myeloische Zellen) im Knochenmark und der Milz war signifikant erhöht (Abbildung 27, Abbildung 28). Der Anteil an Gr-1/CD11b doppelt positiven Zellen im Knochenmark lag in der Gruppe AML1-ETO bei  $45,8\% \pm 17,06$ , bei  $42,3\% \pm 13,2$  in der Gruppe AML1-ETO/kRAS, bei  $34,3\% \pm 3,5$  in der Gruppe kRAS und bei  $27,8\% \pm 2,9$  in der Kontrollgruppe.

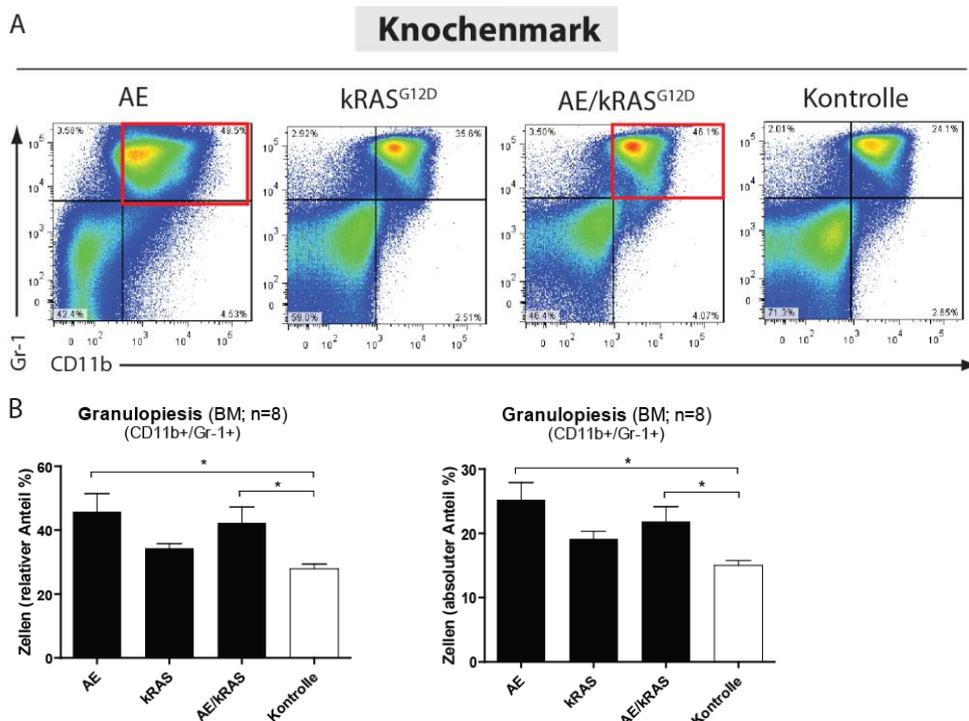


Abbildung 27: Immunphänotypische Analyse der Granulopoese im Knochenmark mit myeloischen (CD11b/Gr-1) markierenden Antikörpern nach 12 Monaten DOX-Induktion zeigte eine verstärkte Granulopoese bei AE und AE/kRAS transplantierten Tieren. (A) Dot-Plot-Darstellung. (B) Relativer und absoluter Anteil als Balkendiagramm.

Ähnliches konnte auch für die Milz festgestellt werden, wobei hierbei eine signifikante Zunahme der Zellpopulation, welche CD11b und Gr1 exprimierten, nur in der Gruppe AML1-ETO/kRAS festgestellt werden konnte. Der Anteil an Gr-1/CD11b doppelt positiven Zellen in der Gruppe AML1-ETO/kRAS lag bei  $4,9\% \pm 2,7$ , bei  $3,6\% \pm 2,9$  in der Gruppe AML1-ETO, bei  $1,5\% \pm 0,6$  in der Gruppe kRAS und bei  $1,1\% \pm 0,4$  in der Gruppe R26/Kontrolle.

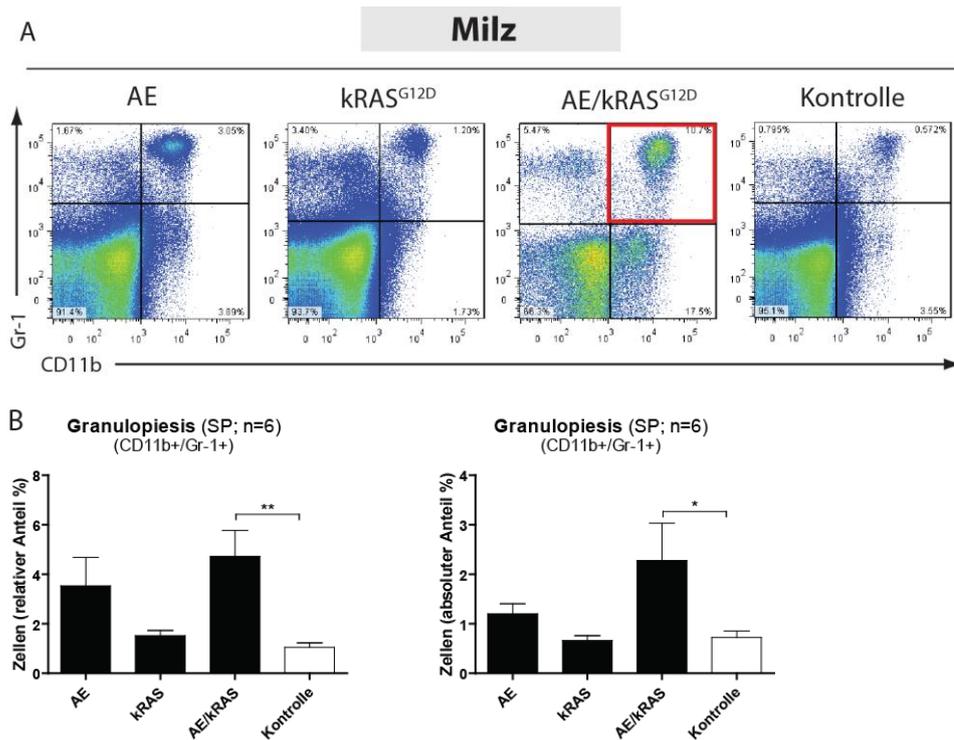


Abbildung 28: Immunphänotypische Analyse der Granulopoese in der Milz mit myeloischen (CD11b/Gr-1) markierenden Antikörpern nach 12 Monaten DOX-Induktion zeigte in der Gruppe AE/kRAS eine verstärkte Granulopoese. (A) Dot-Plot-Darstellung. (B) Relativer und absoluter Anteil als Balkendiagramm.

Wie bereits erwähnt gibt der Bezug zur eGFP-Expression an, ob es sich bei den Veränderungen im hämatopoetischen System um einen Effekt des entsprechenden Transgens handelt. So zeigten alle Mäuse mit gesteigerter Myeloproliferation deutlich erhöhte eGFP Expression in den akkumulierten Zellen. Die Abbildung 29 zeigt den eGFP Expressionslevel in an Gr-1/CD11b doppelt positiven Zellen an. Im Knochenmark lag der Anteil an Gr-1/CD11b/eGFP positiven Zellen in der Gruppe AML1-ETO/kRAS lag bei  $32,7\% \pm 7,8$ , bei  $30\% \pm 10,2$  in der Gruppe AML1-ETO, bei  $6,4\% \pm 2,6$  in der Gruppe kRAS und bei  $0,1\% \pm 0,2$  in der Gruppe R26/Kontrolle (Abbildung 29 A). In der Milz war die Verteilung ähnlich und lag  $29,8\% \pm 10,3$  in der Gruppe AML1-ETO/kRAS, bei  $24,8\% \pm 3,8$  in der Gruppe AML1-ETO, bei  $5,9\% \pm 1,3$  in der Gruppe kRAS und bei  $0,1\% \pm 0,1$  in der Gruppe R26/Kontrolle.

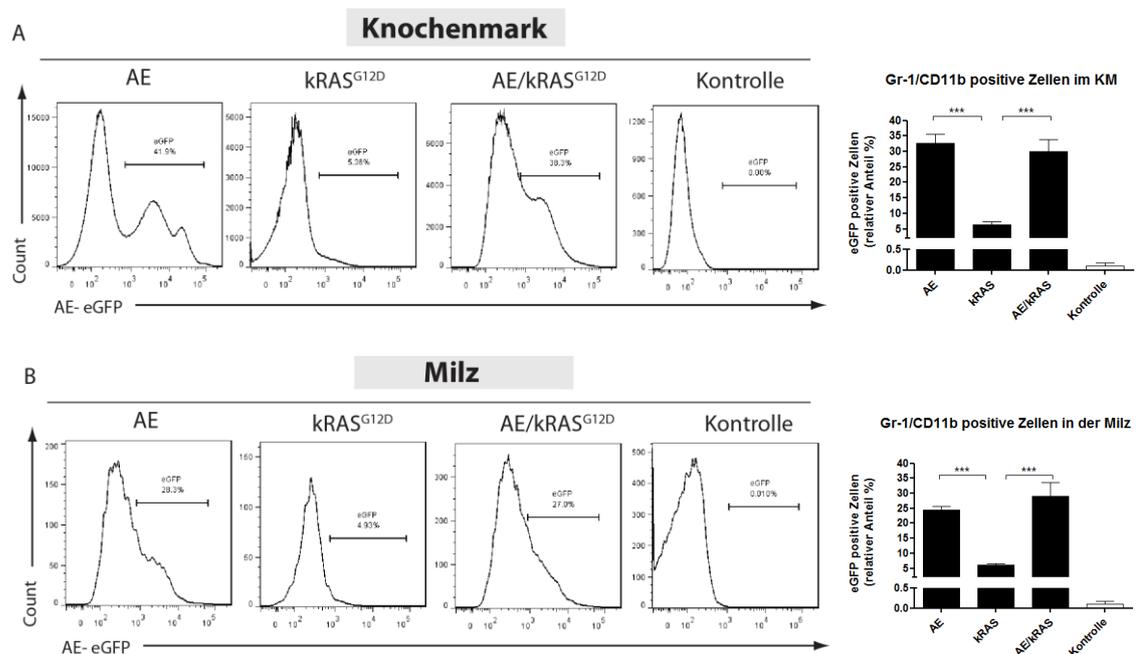


Abbildung 29: Immunphänotypische Analyse der eGFP Expression in CD11b/Gr-1 positiven Zellen im Knochenmark und in der Milz zeigte, dass in den Gruppen AE (A) und AE/kRAS (B) die verstärkte Granulopoese aufwies, ebenfalls eine höhere eGFP Expression in diesen Zellen festgestellt wurde. Angegeben sind % der positiven eGFP/CD11b/Gr-1 Zellen als Histogramm (links) und Balkendiagramm (rechts).

### 3.2.1.6 In AML1-ETO und AML1-ETO/kRAS exprimierenden Tieren wurde eine Störung in B-Zell-Differenzierung festgestellt

Die Analyse des Knochenmarks, jenem Organ, in dem die B-Zellen in adulten Mäusen gebildet werden und reifen, zeigt, dass in allen drei Gruppen AML1-ETO, kRAS und AML1-ETO/kRAS Auffälligkeiten in B-Zell-Entwicklung gefunden werden. Besonders der Anteil der B-Zellen (CD19/B220) in der Gruppe AML1-ETO und AML1-ETO/kRAS war dramatisch reduziert. Analog dazu, war auch die Zellzahl der reifen B-Zellen in der Milz sowohl im relativen Anteil, als auch bezogen auf die absoluten Zellzahlen drastisch reduziert. Im Knochenmark lag der Anteil an CD19/B220 doppelt positiven Zellen in der Gruppe AML1-ETO/kRAS lag bei  $12,7\% \pm 6,5$ , bei  $13,6\% \pm 4$  in der Gruppe AML1-ETO, bei  $21,1\% \pm 3,6$  in der Gruppe kRAS und bei  $28,7\% \pm 5,4$  in der Gruppe R26/Kontrolle.

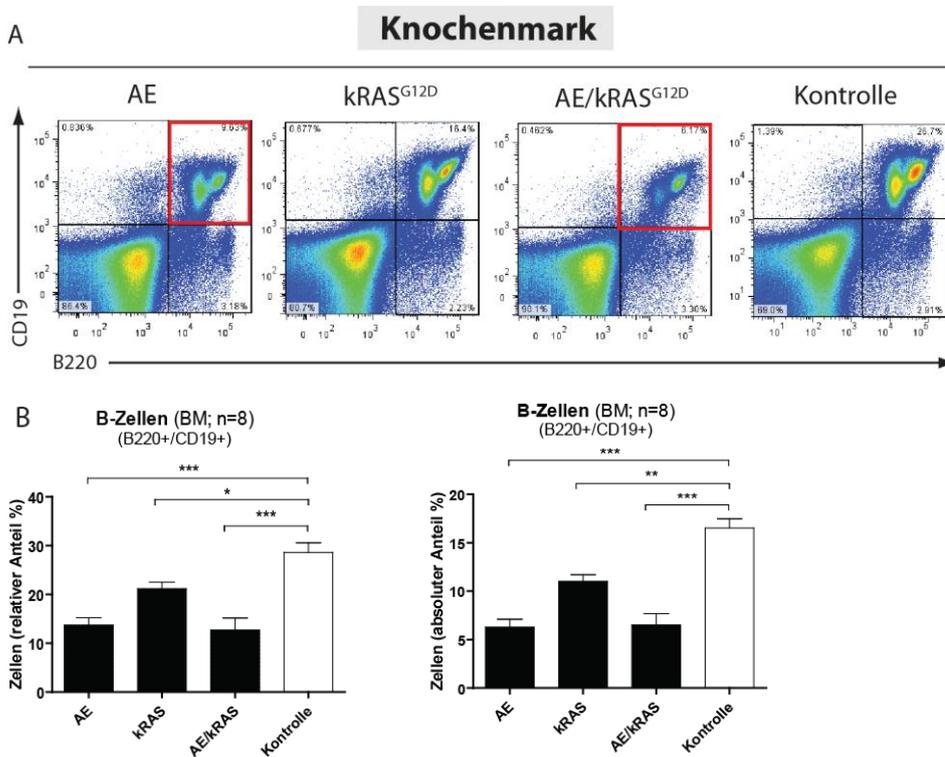


Abbildung 30: Immunphänotypische Analyse der B-Zell-Entwicklung im Knochenmark mit lymphatischen (B220/CD19) markierenden Antikörpern nach 12 Monaten DOX-Induktion zeigte eine deutliche Reduktion der B-Zellen in den Gruppen AE und AE/kRAS. (A) Dot-Plot-Darstellung. (B) Relativer und absoluter Anteil als Balkendiagramm.

In der Milz lag der Anteil an CD19/B220 doppelt positiven Zellen in der Gruppe AML1-ETO/kRAS lag bei  $18,6\% \pm 2,8$ , bei  $26,3\% \pm 4,1$  in der Gruppe AML1-ETO, bei  $47,1\% \pm 5,4$  in der Gruppe kRAS und bei  $48,3\% \pm 6,5$  in der Gruppe R26/Kontrolle.

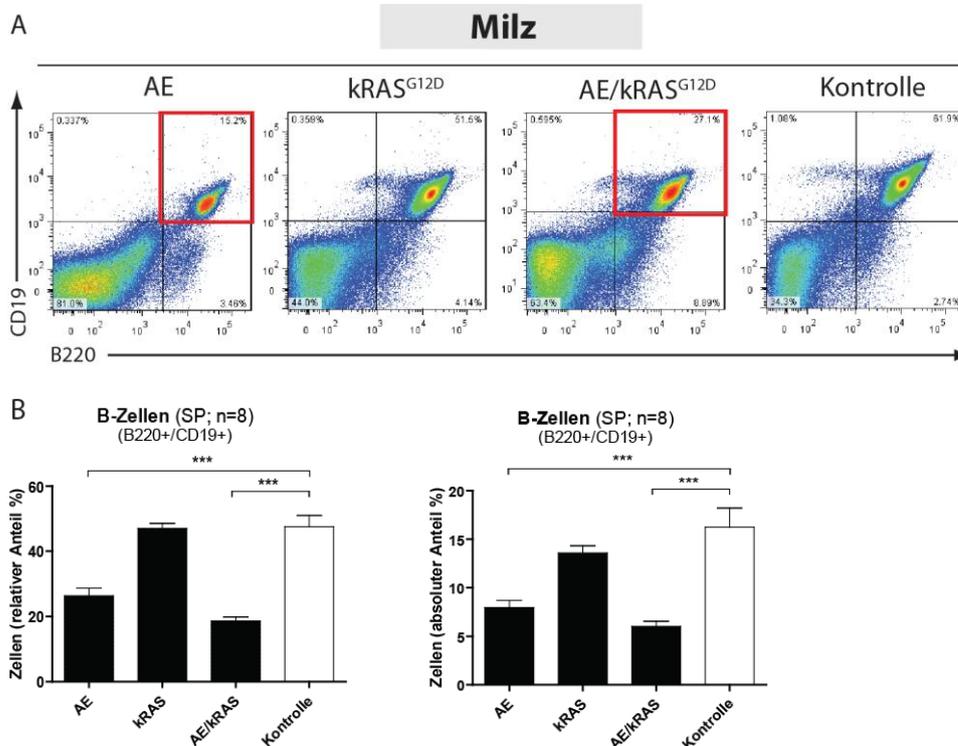


Abbildung 31: Immunphänotypische Analyse der B-Zell-Entwicklung im Knochenmark mit lymphatischen (B220/CD19) markierenden Antikörpern nach 12 Monaten DOX-Induktion zeigte eine deutliche Reduktion der B-Zellen in den Gruppen AE und AE/kRAS. (A) Dot-Plot-Darstellung. (B) Relativer und absoluter Anteil als Balkendiagramm.

### 3.2.1.7 Die Expression von AML1-ETO und kRAS beeinträchtigt die Erythropoese

Für die Analyse der Erythropoese, die im Knochenmark stattfindet, wurden gemäß der Klassifizierung von Socolovsky und Liu [174] Oberflächenmarker gegen CD71 (Transferrin-Rezeptor) und Ter119, das mit dem Oberflächenprotein Glykophorin A assoziiert ist, verwendet. Basierend auf diesen Markern können erythroide Zellen in verschiedene Reifungsstufen von Erythrozytenvorläufern, I bis IV, eingeteilt werden. Stufe I, Proerythroblasten ( $CD71^{high}Ter119^{low}$ ); Stufe II, basophile Erythroblasten ( $CD71^{high}Ter119^{high}$ ); Stufe III, späte basophile und chromatophile Erythroblasten ( $CD71^{med}Ter119^{high}$ ); und am weitesten ausdifferenzierte Entwicklungsstufe stellt die Population IV dar, die späte orthochromatophile Erythroblasten ( $CD71^{low}Ter119^{high}$ ). Die Gating Strategie ist in Abbildung 32 abgebildet. Bei der Analyse lässt sich feststellen, dass in allen drei Gruppen AML1-ETO, kRAS und AML1-ETO/kRAS im Ver-

gleich zu Kontrollgruppe signifikant weniger Zellen sich im letzten Reifungsstadium IV befinden. Der Anteil an  $CD71^{low}Ter119^{high}$  positiven reifen Erythroblasten lag in der Gruppe AML1-ETO lag bei  $1,9\% \pm 1,3$ , bei  $2,6\% \pm 1,6$  in der Gruppe kRAS, bei  $1,2\% \pm 1,1$  in der Gruppe AML1-ETO/kRAS und bei  $14,3\% \pm 3,5$  in der Gruppe R26/Kontrolle (Abbildung 32). AML1-ETO/kRAS exprimierende Tiere zeigen gleichzeitig einen leichten Anstieg der basophilen Erythroblasten. Somit lässt sich eine Störung in der Bildung von reifen Erythrozyten feststellen und möglicherweise damit eingehende beim Differentialblutbild erkennbare Anämie.

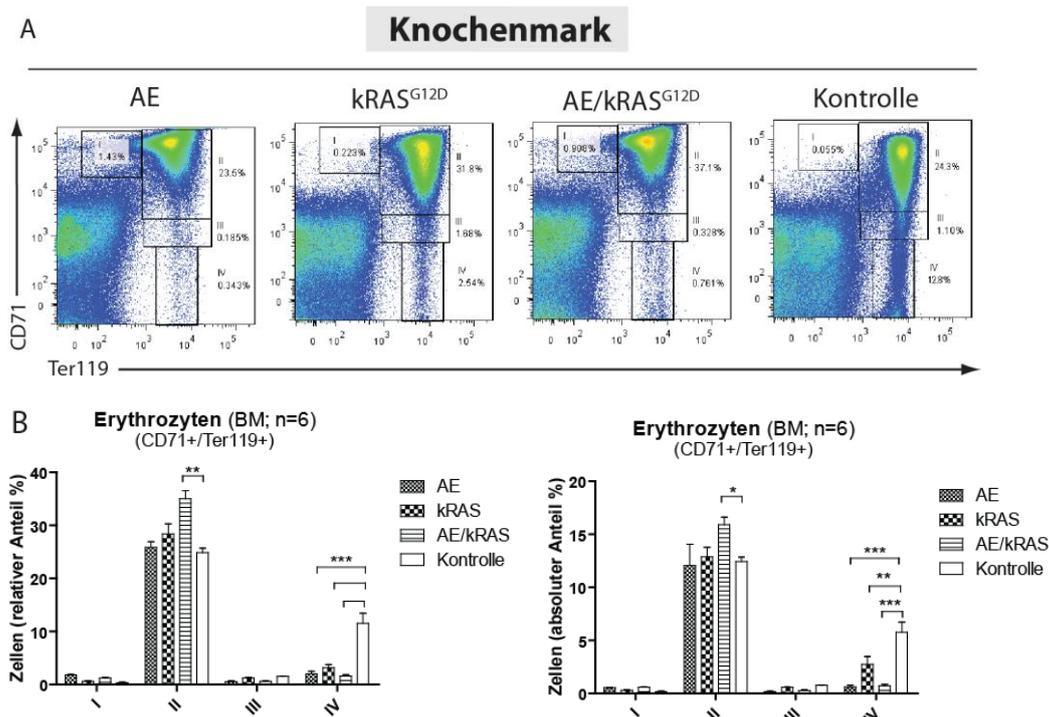


Abbildung 32: Immunphänotypische Analyse der Erythropoese im Knochenmark mit Erythrozyten (CD71/Ter119) markierenden Antikörpern zeigte nach 12 Monaten DOX-Induktion, dass in allen drei Gruppen AE, kRAS und AE/kRAS signifikant weniger reifen Erythroblasten sich im Knochenmark befanden als bei Kontrolltieren der Gruppe R26. Gating Strategie der Erythrozytenvorläufer ist im Text beschrieben. (A) Dot-Plot-Darstellung. (B) Relativer und absoluter Anteil als Balkendiagramm.

### 3.2.1.8 Keine Expansion von hämatopoietische Stammzellen (LSK) im Knochenmark

Als weiterführende Analyse der Auswirkung von AML1-ETO und kRAS Expression auf die normale Hämatopoese erfolgte Analyse der hämatopoetischen Stammzellen. Murine hämatopoetische Stammzellen sind durch Abwesenheit sogenannte „lineage Marker“ gekennzeichnet, die auf bereits differenzierten Zellen zu finden sind, wie CD3, CD4, CD8, CD19, B220, Gr-1, Ter119, und IgM, und exprimieren gleichzeitig die Oberflächenmarker Sca-1 und c-Kit [ $Lin^{-}Sca-1^{+}c-Kit^{+}$  (LSK)]. Bei der Analyse ließ sich

feststellen, dass bei AML1-ETO exprimierenden Tieren die Sca-1/c-Kit doppelt positive Population signifikant erniedrigt war. Bei AML1-ETO/kRAS exprimierenden Tieren war eine deutliche Erhöhung c-Kit, sowie Sca-1 einfach positiven Population zu beobachten. In kRAS exprimierenden Tieren ließ sich keine Auffälligkeiten festzustellen.

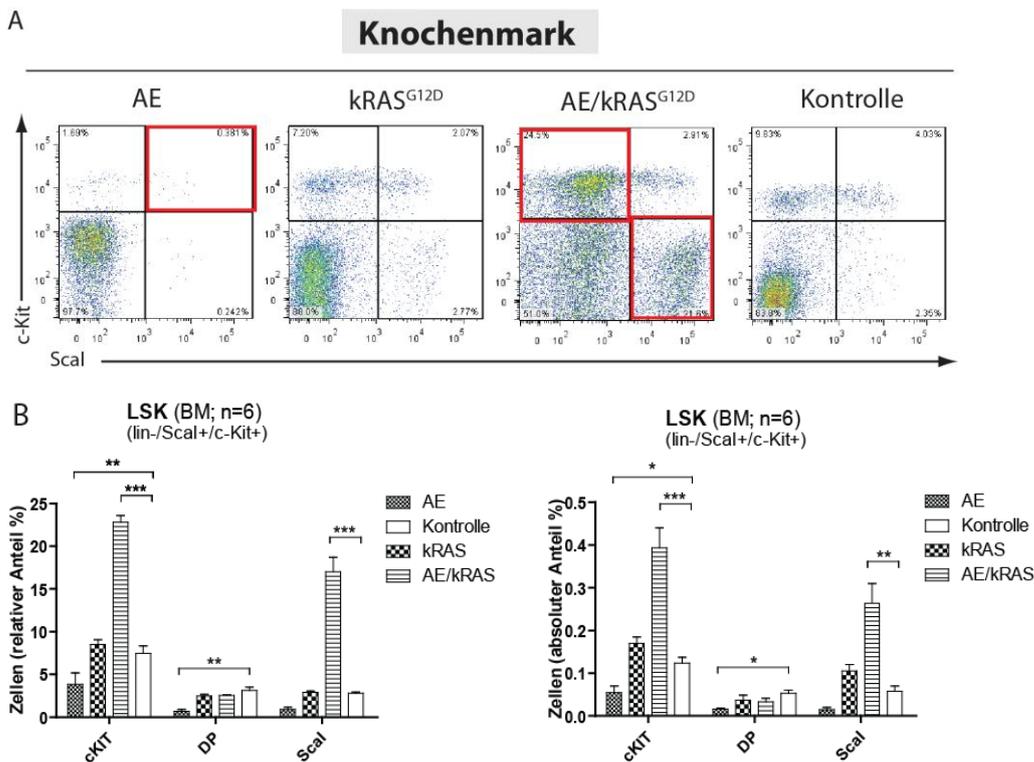


Abbildung 33: Immunphänotypische Analyse mit Stammzellen (lin-/Sca1/c-Kit) markierenden Antikörpern nach 12 Monaten DOX-Induktion zeigte keine Expansion von LSK Zellen im Knochenmark. Bei AE transplantierten Tieren zeigte sich eine signifikante Reduktion der LSK Zellen. Bei der AE/kRAS Gruppe zeigte sich eine erhöhte Expression des Progenitormarkers c-KIT und Sca1 einzeln positiven Zellen. (A) Dot-Plot-Darstellung. (B) Relativer und absoluter Anteil als Balkendiagramm.

### 3.2.1.9 T-Zell-Entwicklung im Thymus

Die klinische Bedeutung der Ras-Mutationen bei akuten Leukämien ist bisher nicht abschließend geklärt. Bei bis zu 50% der Patienten mit T-Zell-Leukämie wird eine Überexpression von RAS festgestellt. Dabei wird oft nicht unterschieden, um welche Alterationen es sich dabei genau handelt und welche RAS Gene betroffen sind. In einer Publikation wurde in einem Mausmodell, kRAS<sup>G12D</sup> ausgehend von einem endogenen Promotor in Knochenmarkchimären konditional exprimiert, was mit hoher Penetranz ein aggressives T-Zell-Lymphome auslöste was sich in einer Expansion von CD4/CD8 doppelt positiven Zellen im Thymus äußerte [175]. Aus diesem Grund wurde eine durchflusszytometrische Analyse vom Thymus durchgeführt.

Vorläufer der T-Lymphozyten wandern aus dem Knochenmark in den Thymus und reifen dort aus. Bei der Reifung durchlaufen die T-Zellen bestimmte Stadien, dabei können Kombinationen von Oberflächenmolekülen als Marker für die verschiedenen T-Zell-Entwicklungsstadien angesehen werden. Folgende Thymozytenpopulationen können unterschieden werden: 1. unreife  $CD4^-CD8^-$ -Thymozyten (DN), 2.  $CD4^+CD8^+$ -Thymozyten (DP), 3. reife  $CD4^+$  (CD4 SP)- und  $CD8^+$  (CD8 SP)-Thymozyten. Bei diesen Analysen lassen sich zum einem keine Auffälligkeiten in kRAS exprimierenden Mäusen feststellen. Bei den AML1-ETO exprimierenden Tieren zeigte sich eine leichte, aber signifikante Reduktion der DP  $CD4^+CD8^+$ -Population.

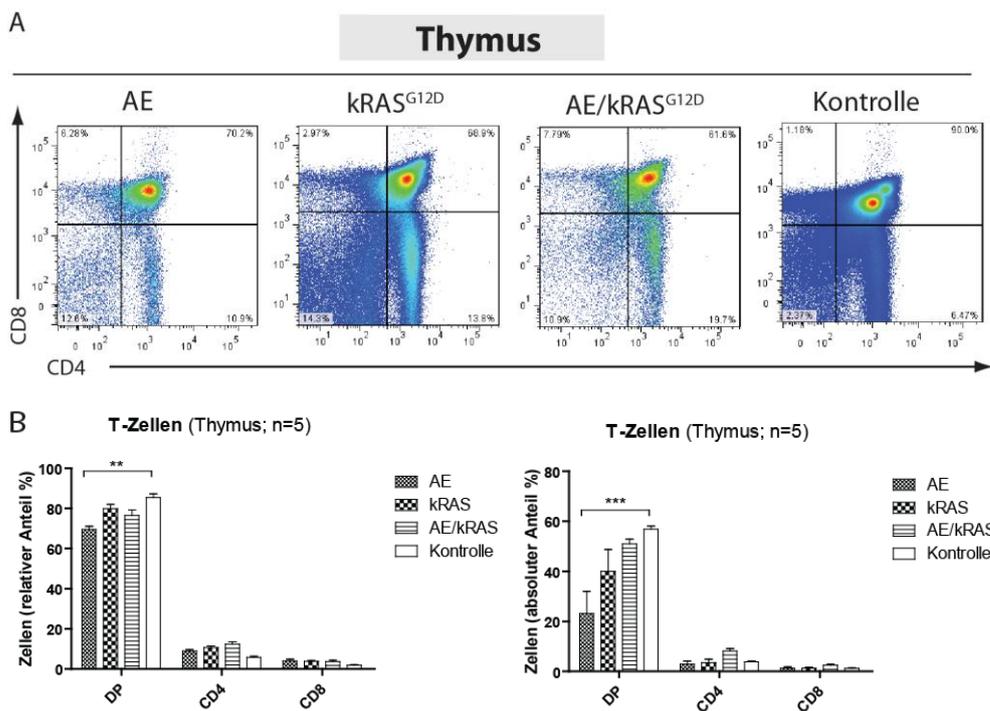


Abbildung 34: Immunphänotypische Analyse der T-Zell-Entwicklung im Thymus nach 12 Monaten DOX-Induktion zeigte eine signifikante Reduktion der  $CD4/CD8$  doppelt positiven Zellen in der AML1-ETO Gruppe. (A) Dot-Plot-Darstellung. (B) Relativer und absoluter Anteil als Balkendiagramm.

### 3.2.1.10 Retransplantierbarkeit der beschriebenen Erkrankungen

Durch Retransplantation in sekundäre Rezipienten kann bestätigt werden, ob es sich bei dem festgestellten Phänotyp in der Tat um eine Leukämie im Unterschied zu anderen, nicht retransplantierbaren myeloproliferativen Erkrankungen handelt. Zu diesem Zweck, wurden aus jeweils drei Mäusen der Gruppe AML1-ETO und AML1-ETO/kRAS je  $1 \times 10^6$  Knochenmarkzellen entnommen und im Verhältnis 1:1 mit Wildtyp-Knochenmarkzellen erneut in letal bestrahlte sekundäre Rezipienten transferiert. Im Beobachtungsraum von 6 Monaten nach Transplantation betrug die Überlebensrate bei allen Tieren 100%.

### 3.2.1.11 Zusammenfassung

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass eine gemeinsame Expression von AML1-ETO und kRAS in unserem Modell im Beobachtungszeitraum von 12 Monaten nicht zur Induktion von akuter Leukämie, jedoch zu einer Beeinträchtigung der Hämatopoese mit Anzeichen einer Anämie und Thrombozytopenie führen kann. Gleichzeitig tritt eine erhöhte Myeloproliferation im Knochenmark und der Milz sowie einem erhöhten Anteil der Neutrophilen im peripheren Blut auf. Da die Erkrankung nicht in sekundäre Rezipienten retransplantierbar ist, aber gestörte Reifung der Blutzellen festzustellen ist, kann man den beobachteten Phänotyp als myelodysplastische Syndrome (MDS) bezeichnen.

### 3.3 Induktion von AML1-ETO gemeinsam mit FLT3-ITD in hämatopoetischen Zellen führt zur Entwicklung von Leukämie

Um in konditional aktivierbaren HSCs in unserem AML1-ETO Mausmodell zusätzlich FLT3-ITD exprimieren zu können, wurde ein entsprechendes rekombinantes Retrovirus generiert. Zu diesem Zweck wurde eine humane FLT3-ITD cDNA mit einer internen Tandemduplikation (Frau Dr. Lara Tickenbock und Herr Prof. Dr. Carsten Müller-Tidow, Universitätsklinikum Münster) in einen gammaretroviralen Vektor pSF91.FLT3-ITD.IRES.Tomato kloniert. Nach transients Transfektion von 293T Zellen wurden Virusüberstände produziert und durch Ultrazentrifugation konzentriert. Mit diesen Virusüberständen wurden sortierte LSK-Zellen (Langzeithämatopoetische Stammzellen;  $lin^{-}$ ,  $Sca1^{+}$ ,  $cKit^{+}$ ) aus dem Knochenmark von R26/AML1-ETO Ly5.1 bzw. Wildtyp Ly5.1 transduziert, und diese Zellen anschließend in letal bestrahlte Empfängermause (Wildtyp Ly5.2) injiziert (Abbildung 35). Die Induktion der Onkogenexpression konnte im Falle der AML1-ETO über eGFP Expression, im Falle von FLT3-ITD bzw. Leervektor über tdTomato Expression verfolgt werden. Das tdTomato Protein resultiert aus der Fusion von zwei dTomato Genen [176], wodurch seine Leuchtkraft die des ebenfalls rot fluoreszierenden DsRed (rot fluoreszierende Protein drFP583 aus *Drosophila*) um 60% übersteigt [177]. tdTomato Sequenz wurde zusammen mit der cDNA von hFLT3-ITD als bicistronisches (auf derselben mRNA lokalisiertes) Transkript exprimiert und von der *internal ribosome entry site* (IRES) des viralen Vektors translatiert. Die einzelnen Schritte werden nachfolgend ausführlich beschrieben.

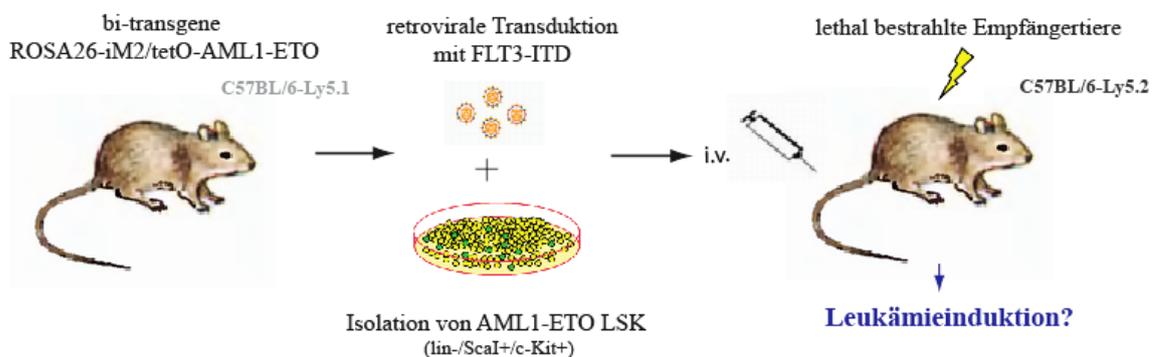


Abbildung 35: Generierung von Mäusen die gemeinsam AE und FLT3-ITD exprimieren. Aus nicht induzierten bi-transgenen R26/AE Mäusen wurden LSK Zelle aufgereinigt und retroviral mit einem FLT3-ITD Konstrukt transduziert. Anschließend wurden die Zellen in letal bestrahlte Rezipienten überführt, um den Effekt der gemeinsamen Expression auf Leukämieinduktion zu untersuchen. Die Expression von AE wurde durch die Zugabe von Doxozyklin zum Trinkwasser aktiviert.

### 3.3.1 Herstellung von FLT3-ITD Rezeptor Konstrukts

#### 3.3.1.1 Retroviraler Vektor für die FLT3-ITD Expression in murinen HSCs

Für die Expression der FLT3-ITD wurde der Vektor SF91-IRES-tdTomato verwendet (Abbildung 36). In Kombination mit der FLT3-ITD wird das tdTomato-Reportergen über eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) ko-exprimiert. Die gemeinsame Expression wird über die Promotor- und Enhancer-Elemente des Spleen Focus Forming Virus (SFFV) und des „Murine Embryonic Stem Cell Virus“ (MESV) reguliert. Als Kontrolle diente der Vektor SF91-tdTomato, der ausschließlich tdTomato exprimiert. Der gammaretroviraler Vektor basiert auf einem SFFV/MESV-Hybridvektor, der für die Expression in hämatopoetischen Zellen optimiert wurde [178, 179] (Abbildung 41A).

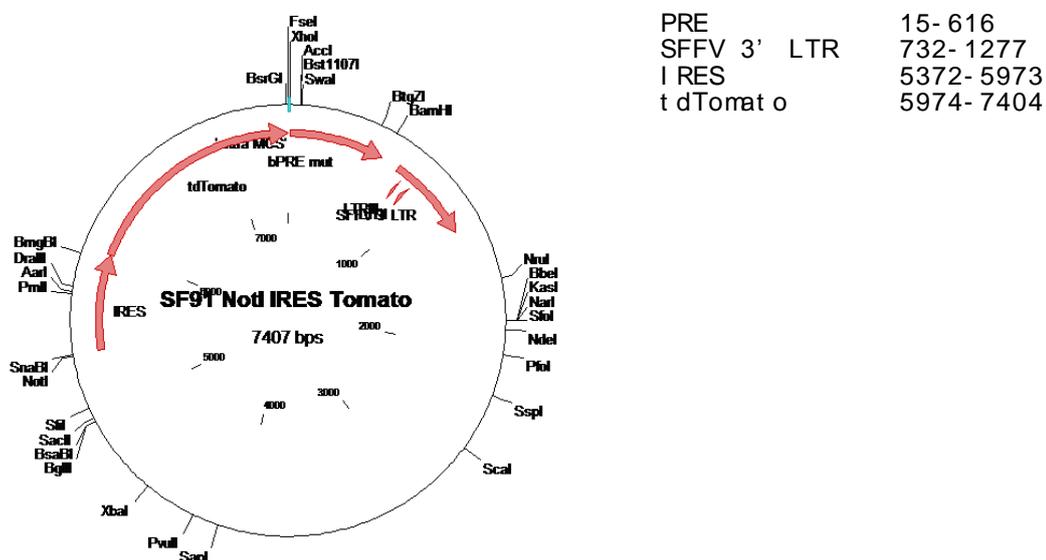


Abbildung 36: Plasmidkarte von pSF91-IRES-tdTomato Vektor.

#### 3.3.1.2 Klonierung des SF91.FLT3-ITD.IRES.Tomato Konstrukts

Für die Klonierung des Konstruktes wurde im ersten Schritt der SF91-Vektor an der NotI Restriktionsstelle linearisiert, die überhängenden Enden auf glatte Enden mit dem Klenow-Fragment aufgefüllt (s. 2.2.4) und die 5'-Enden dephosphoryliert (s. 2.2.3). Die komplette hFLT3-ITD cDNA wurde aus dem Vektor LeGOiT2 mittels Cla/Spe/Sal-Restriktion isoliert (Abbildung 37), die überhängenden Enden ebenfalls auf glatte Enden aufgefüllt und das resultierende Fragment in den SF91-IRES-tdTomato Vektor kloniert. Nach der Isolation des Vektors aus den Bakterienzellen wurde eine Restriktionsanalyse mit dem Enzymen XhoI, RI, Bam/RI und Bam durchgeführt (s. 2.2.14). Diese

diente dazu rekombinante Klone aufgrund des spezifischen Fragmentmusters auf das Vorhandensein und die richtige Orientierung des Inserts zu überprüfen (Abbildung 38).

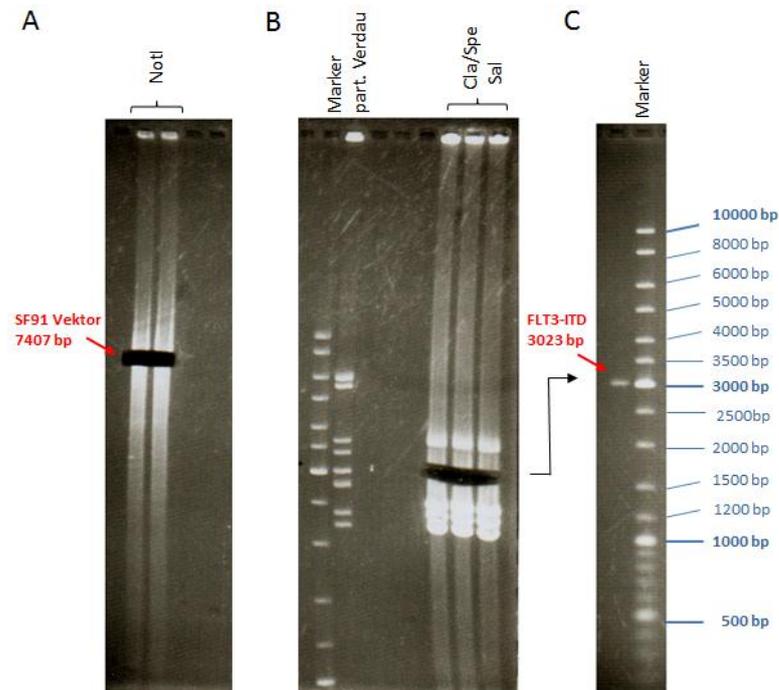


Abbildung 37: Agarosegelelektrophoretische Auftrennung von NotI linearisierten pSF91-Vektors (A), ClaI/SpeI/SalI-verdauten LeGOiT2-Plasmids (B) und evaluierten, und erneut aufgereinigten FLT3-ITD Fragments.

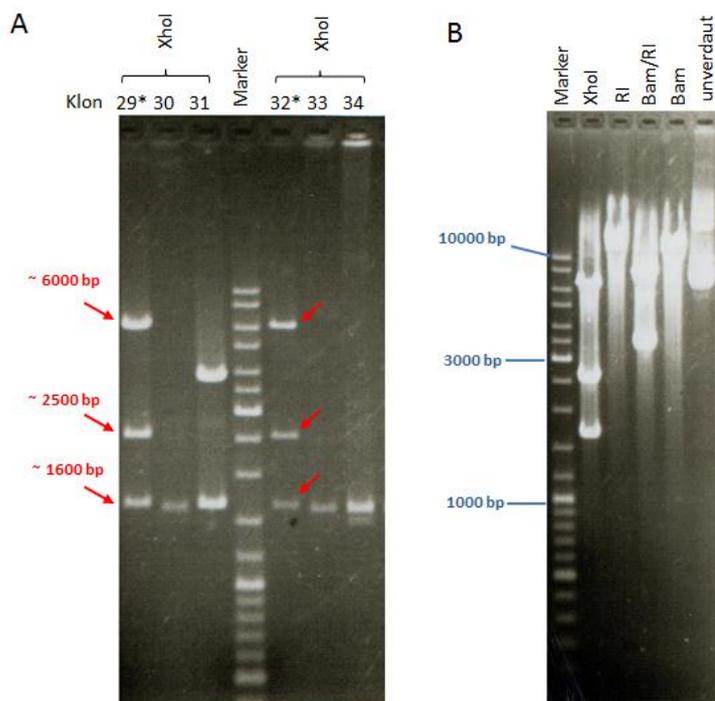


Abbildung 38: Restriktionsanalyse. A. Agarosegelelektrophoretische Auftrennung von XhoI-verdauten pSF91-Plasmiden nach der Einklonierung von hFLT3-ITD. Die Klone 29 und 32 stellen die erwarteten Fragmente dar. Rote Pfeile zeigen Fragmente richtiger

Größe. B. Kontrollverdau zur Bestimmung korrekter Orientierung des eingebauten Inse-  
rts mittels XhoI, RI, Bam/RI und Bam. Positiver Klon mit richtiger Orientierung.

### 3.3.1.3 Produktion hochtitriger retroviraler Virusüberstände

Gammaretrovirale Vektoren wurden durch transiente Transfektion unter Verwendung der Calcium-Phosphat Methode produziert. Die virushaltigen Zellkulturüberstände wurden 36 und 48 Stunden nach Transfektion abgenommen, mit 0,45 µm Filtern sterilfiltriert und bei 10,000 RPM über Nacht ultrazentrifugiert. Anschließend wurden die Vektoren in 1% des Ausgangsvolumens resuspendiert, so dass eine ca. 100-fache Konzentration erreicht wurde. Zur Bestimmung des retroviralen Titers wurden NIH3T3 Zellen mit Virusüberstand transduziert. Der Prozentsatz der transduzierten Zellen wurde 36 Stunden später durchflusszytometrisch bestimmt. Um murine hämatopoetische Stammzellen effizient infizieren zu können ist ein Virustiter von mindestens  $10^5$ /ml erforderlich. Der Virustiter betrug für den Kontrollvektor SF91.IRES.tdTomato  $3,8 \times 10^6$ /ml und für SF91.IRES.FLT3-ITD.tdTomato  $6,6 \times 10^5$ /ml.

### 3.3.1.4 Funktionsprüfung der retroviralen Vektoren

Die cDNA-Sequenz des gesamten FLT3-Rezeptors sowie die Präsenz, Länge und Position der „internal tandem duplication“ wurden mit Hilfe von Sequenzierung kontrolliert. Die häufigsten Mutationen betreffen unter anderem die juxtamembrane Domäne, zum Teil durch die Insertion variabler, meist duplizierter Sequenzen. In unserem Falle beträgt die zusätzlich inserierte Tandemmutation 12 Aminosäure NEYFYVDFREYE (Abbildung 39).

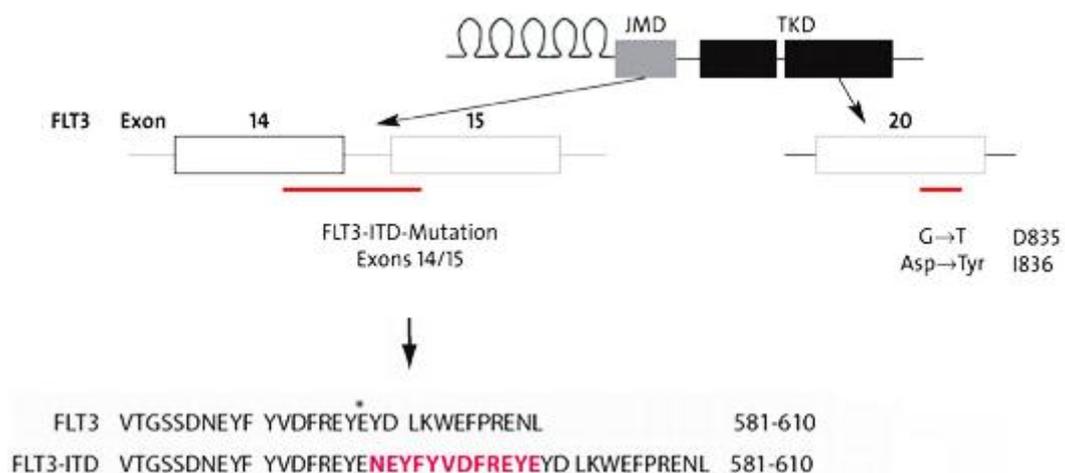


Abbildung 39: Die häufigsten Mutationen im FLT3-Gen. Zusätzliche Insertion von 12 Aminosäuren NEYFYVDFREYE im Bereich der Juxtamembrandomäne (JMD; kodiert durch die Exons 14 und 15). Dagegen finden sich im Bereich die Tyrosinkinasedomäne (TKD; kodiert durch Exon 20) überwiegend Punktmutationen. Modifiziert nach C. Müller-Tidow.

Die Expression des FLT3-ITD Rezeptors wurde auf Proteinebene mit Hilfe von transienter Transfektion des Konstrukts in Zellkulturexperimenten bestimmt. Hierzu wurden 293T Zellen verwendet und nach transienter Transfektion die Expression von FLT3-ITD (sc-192 Kaninchen anti-FLT3 polyklonales Antiserum, Santa Cruz) im Western Blot nachgewiesen (Abbildung 40). Im Falle der FLT3-ITD sind zwei Banden zu sehen, da FLT3 in einer glykosylierten und einer nicht glykosylierten Form vorliegen kann. Während bei FLT3-wt die glykosylierte Form dominiert, liegen FLT3-ITD Rezeptorproteine hauptsächlich unglykosyliert, nicht an Membran gebunden [104]. Bei untransfizierten 293 T Zellen wurde kein FLT3 nachgewiesen.

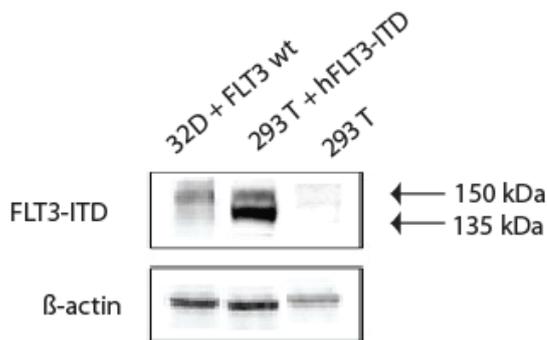


Abbildung 40: Western Blot von Extrakten aus 32D Zellen stabil transfiziert mit Wildtyp FLT3 als positiv Kontrolle, 293T Zellen transient transfiziert mit hFLT3-ITD und untransfizierten 293T als negativ Kontrolle.

### 3.3.2 Transduktion von LSK Stammzellen mit retroviralen Partikeln und adoptiver Transfer in letal bestrahlte Rezipienten

Um die Transduktion von Knochenmarkzellen effizient durchzuführen, wurden zunächst Stammzellen aus Knochenmark über einem Histopaque-Dichtegradienten (Histopaque 1083, Sigma Chemicals, Dichte 1083 mg/ml) aufgereinigt.

Anschließend wurde aus der über dem Dichtegradienten separierten mononukleären Zellpopulation Differenzierungsmarker-negative („Lineage-negative“) Vorläuferzellen von nicht-induzierten R26/AML1-ETO bzw. Wildtyp C57BL/6 Mäusen angereichert. Dazu wurden die Zellen mit Hilfe des Lineage Cell Depletion Kits (Miltenyi Biotec) markiert und die Lineage-negativen Zellen mit Magnetic Cell Sorting Trennsäulen separiert. Aus der angereicherten Stammzellpopulation wurde danach die LSK Population

mit Hilfe von c-Kit und Sca-1 Oberflächenmarkern durchflusszytometrisch sortiert (Abbildung 41B).

Anschließend erfolgte die Transduktion mit SF91-FLT3-ITD-IRES-Tomato oder SF91-IRES-Tomato (Leervektor) und nach 48 Stunden wurden die transduzierten Zellen anhand ihrer Expression von tdTomato durch durchflusszytometrische Analyse überprüft (Abbildung 41 B). Die Verwendung von Retronektin (Takara Bio, Otsu, Shiga, Japan ), ein rekombinantes, humanes Fibronektinfragment, erhöht zusätzlich die retroviralvermittelte Transduktionseffizienz, indem es die Fusion zwischen Virusvektoren und Wirtszellen durch räumliche Annäherung fördert [180, 181]. Die Steigerung der Gen-transfer-Effizienz wird dem Vorhandensein spezifischer Bindungsstellen sowohl für retrovirale Vektoren (heparinbindende Region), als auch für hämatopoetische Zellen (Integrinrezeptor VLA-4- und VLA-5). Die erfolgreich transduzierten Zellen wurden mit Hilfe der Expression von tdTomato analysiert.

Der Anteil tdTomato-exprimierender Zellen in FLT3-ITD transduziertem Knochenmark in der Gruppe I (AML1-ETO LSK + FLT3-ITD) lag bei 4,6%, in der Gruppe II (wt LSK + FLT3-ITD) bei 22,8%. Der Anteil tdTomato-exprimierender Zellen in mit Leervektor transduziertem Knochenmark lag in der Gruppe III (AML1-ETO LSK + Leervektor) bei 2,7%, in der Gruppe IV (wt LSK + Leervektor) bei 15,7% (Abbildung 41C). Abschließend wurden die transduzierten Ly5.1 LSK Zellen, entsprechend der Gruppenaufteilung in der Tabelle 21, in letal bestrahlte Ly5.2 C57BL/6 Mäuse eingebracht. Die Kontrollgruppe AML1-ETO wurde auch mit dem Leervektor transduziert, damit der Einfluss von den viralen Elementen ausgeschlossen werden kann. Sofort nach dem adoptiven Transfer wurde AML1-ETO Expression konditional durch Zugabe von 1mgDOX/ml Trinkwasser aktiviert.

Tabelle 21: Gruppenaufteilung

Gruppen	Transgen	Dox	eGFP Expression	Tomato Expression	Beobachtung
1	FLT3-ITD/ AML1-ETO	+	+	+	Effekt der Ko- Expression von AML1- ETO und FLT3-ITD
2	FLT3-ITD	-	-	+	Effekt von FLT3-ITD alleine
3	AML1-ETO/ Leervektor	+	+	+	Effekt von AML1-ETO alleine
4	Leervektor	-	-	+	Einfluss viraler Ele- menten

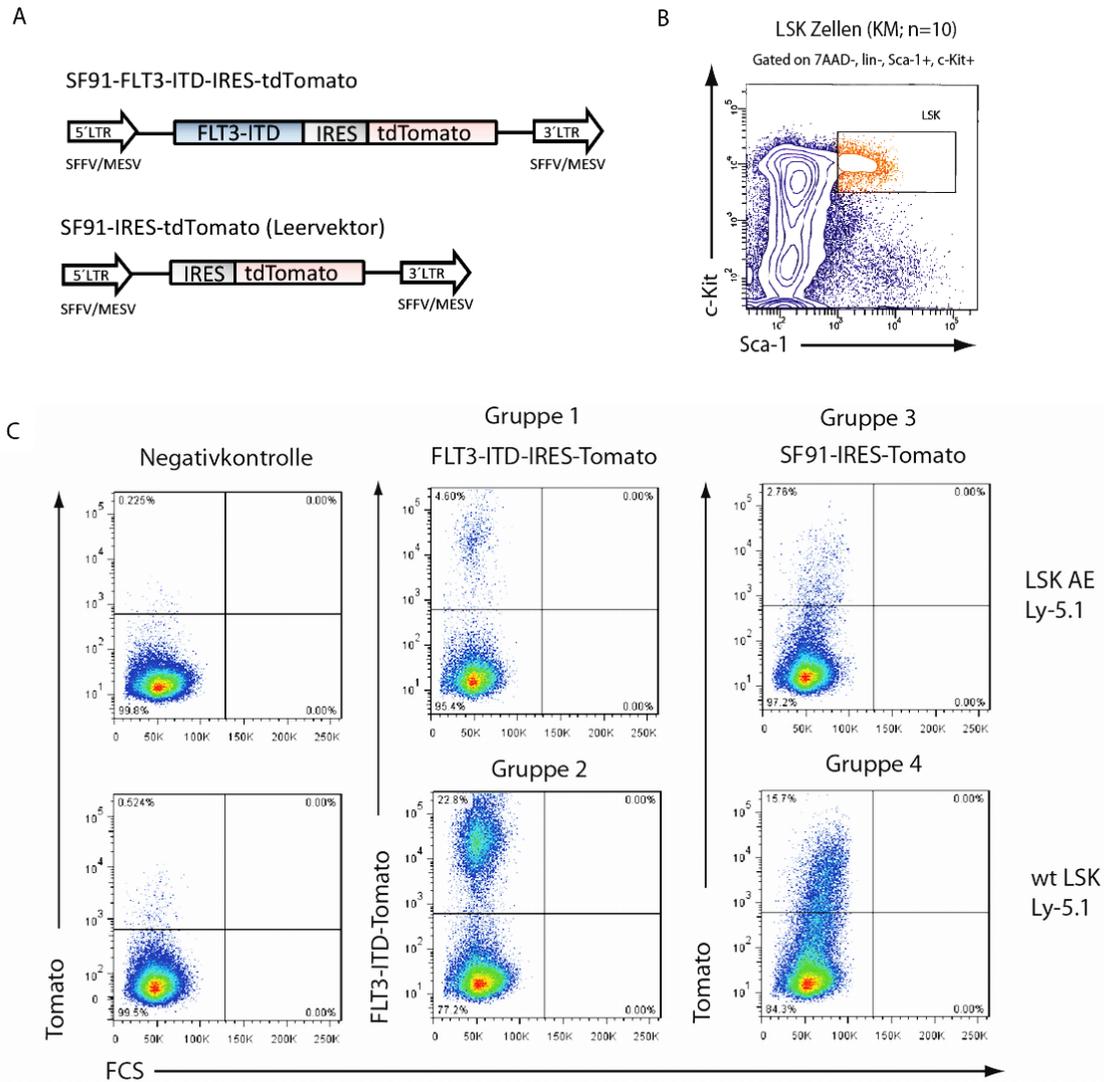


Abbildung 41: Generierung von Mäusen die gemeinsam AE und FLT3-ITD exprimieren. (A) Schematische Darstellung der verwendeten retroviralen Vektoren. FLT3-ITD – Transgen; IRES-Tomato – rot fluoreszierendes Protein als stabiler Selektionsmarker. (B) Anreicherung von LSK-Zellen (Lin-ScaI+c-kit+) aus dem Knochenmark der Donormäuse mittels Zellsortierung. (C) FACS-Analyse zur Bestimmung der *in vitro* Transduktionseffizienz der LSK Zellen mit FLT3-ITD Transgen bzw. Leervektor SF91-IRES-Tomato die für den adoptiven Transfer in letal bestrahlte Rezipientenmäuse verwendet wurden.

### 3.3.3 Die gemeinsame Expression von AML1-ETO und FLT3-ITD führte zu einer schnellen Mortalität

Bereits 3 Wochen nach der Transplantation zeigten die ersten Tiere der Experimentalgruppe (FLT3-ITD/AML1-ETO) die ersten Auffälligkeiten wie z.B. offensichtliche Gewichtsabnahme, struppiges Fell, Buckel und zum Teil eine Lähmung der Hinterbeine. Wie in der Abbildung 42 zu sehen ist, betrug die mediane Überlebenszeit 37 Tage. Alle 20 Tiere verstarben. In den Kontrollgruppen AML1-ETO bzw. Leervektor verstarben im gesamten Beobachtungszeitraum keine Tiere. In der Kontrollgruppe FLT3-ITD verstarben drei von 13 Tieren im Laufe des Experimentes.

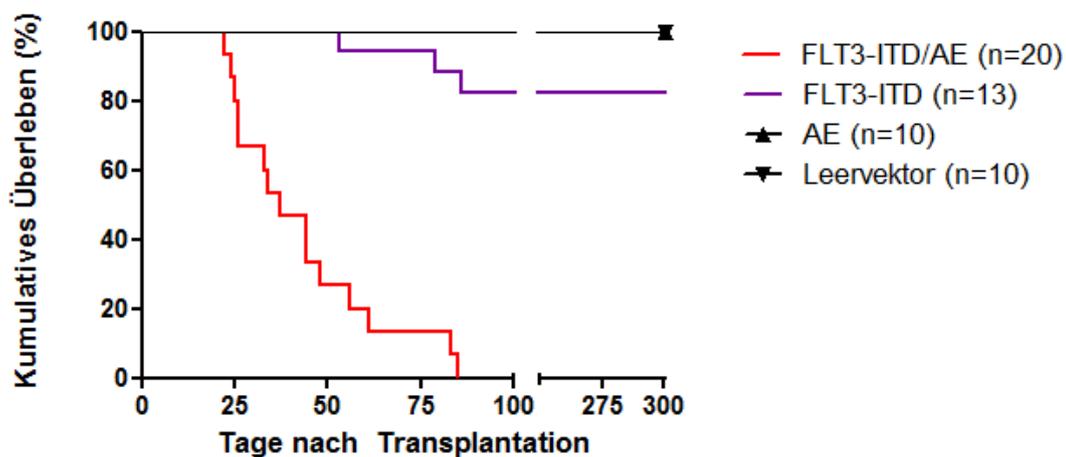


Abbildung 42: Die gemeinsame Expression von AE und FLT3-ITD resultierte in einer schnellen Mortalität mit 100% Penetranz. In der Gruppe FLT3-ITD verstarben drei Tiere.

### 3.3.4 Charakterisierung erkrankter Tiere

Um den Einfluss verschiedener Transgene auf die Entstehung einer hämatologischen Erkrankung zu untersuchen, wurde von allen Tieren alle 4 Wochen erstmals 4-6 Wochen nach der Transplantation, bei den erkrankten Tieren am Todestag, Blut zur Bestimmung des großen Blutbildes, sowie zur Herstellung von Blutausstrichen entnommen. Das Engraftment der Spenderzellen sowie deren weitere Differenzierung in die verschiedenen Blutzelllinien wurde per FACS-Analyse untersucht. Nach Tötung wurden Organen wie Leber und Milz histologisch untersucht. Außerdem wurde geprüft, ob die transplantierten Zellen aus dem Knochenmark bzw. der Milz der erkrankten Tiere in der Lage sind, in sekundären Rezipienten erneut das Krankheitsbild auszulösen.

### 3.3.4.1 Engraftment der transplantierten Zellen und Differentialblutbild

Eine erste vorläufige FACS Analyse des peripheren Blutes der rekonstituierten Tiere zeigte keine Unterschiede im Engraftment der Spenderzellen. 6 Wochen nach der Transplantation bei gesunden und bereits 3-4 Wochen bei erkrankten Tieren lag der relative Anteil an Ly5.1 Spenderzellen im peripheren Blut bei über 90 % (Abbildung 43).

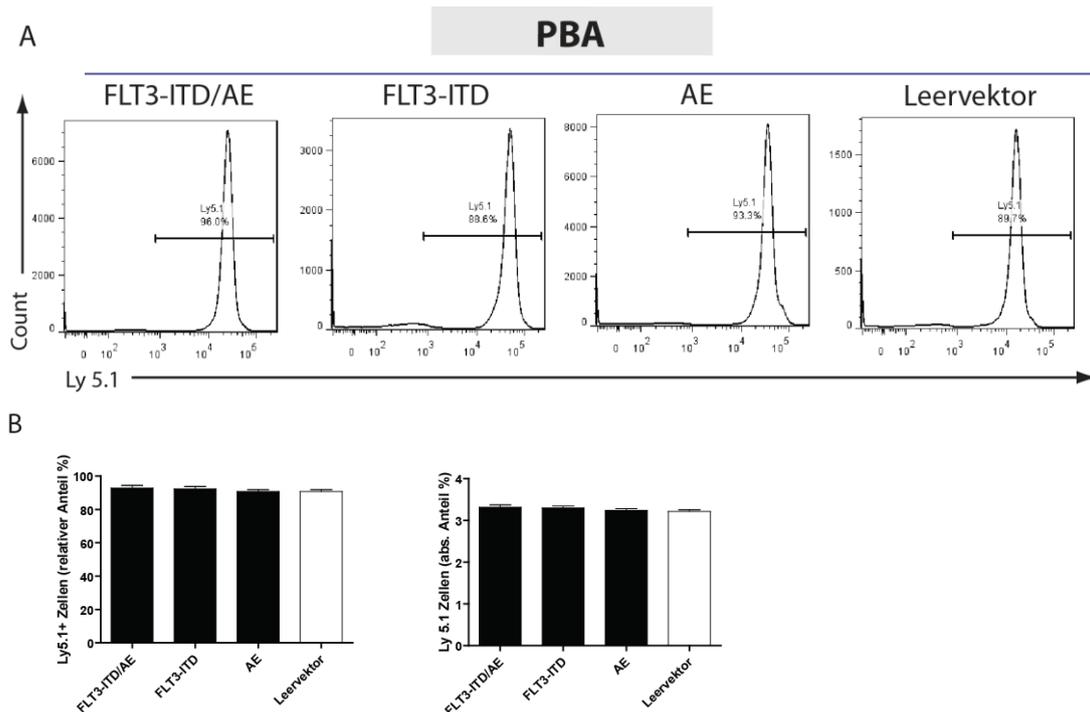


Abbildung 43: Erfolgreiches Engraftment der transplantierten Zellen in allen Gruppen. 6 Wochen nach der Transplantation, bei erkrankten Tieren bereits früher. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Engraftment der Spenderzellen. (A) Engraftment der Knochenmark-Spenderzellen Ly5.1 im peripheren Blut der Empfängermaus. (B) Relativer und absoluter Anteil der Ly-5.1 doppelt positiven Zellen.

Die Verteilung der Zellpopulationen nach eGFP- und Tomato- Expression erwies folgendes Bild (Abbildung 44). In der Kontrollgruppe FLT3-ITD lag der Prozentzahl an FLT3-ITD-Tomato-positiven Zellen bei  $15,1\% \pm 4,5$ . Die mit dem Leervektor transplantierten Mäuse zeigten eine ähnliche Verteilung an Tomato-positiven Zellen  $13,6\% \pm 1,3$  an. Die AML1-ETO Kontrollmäuse, die zusätzlich mit dem Leervektor transduziert wurden, wiesen wie zu erwarten, neben der negativen, drei verschiedene Zellpopulationen auf: Tomato-positive Zellen  $5,5\% \pm 1,5$ , doppelt positive Population AML1-ETO-eGFP/Tomato  $11,5\% \pm 1,8$  und AML1-ETO-eGFP positive Population  $26,2\% \pm 7,7$ . Bei den Mäusen mit beiden Mutationen dominierte dagegen in den meisten Fällen die doppelt positive FLT3-ITD-Tomato/AML1-ETO-eGFP Population je nach dem Fortschrei-

ten der Erkrankung  $64,5\% \pm 17$ . Die einzelpositive FLT3-ITD-Tomato Population lag bei  $8\% \pm 6,5$  und die einzelpositive AML1-ETO-eGFP Population bei  $5,9\% \pm 4,3$ . Somit zeigte sich bereits bei der durchflusszytometrischen Untersuchung des Blutes eine deutliche Auffälligkeit in der Zunahme der Zellen die beide Mutationen tragen.

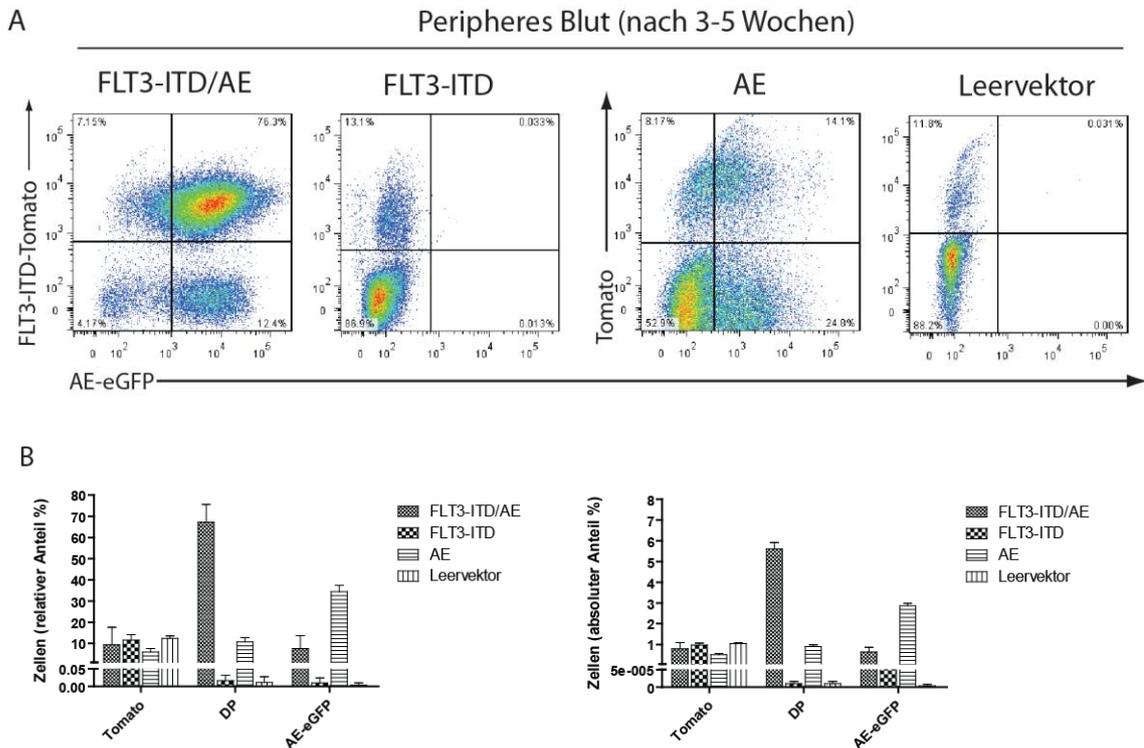


Abbildung 44: Analyse des peripheren Blutes mittels FACS offenbarte eine Expansion von eGFP/Tomato doppelt positiven Population in FLT3-ITD/AE transplantierten Mäusen. Anzahl der AE-eGFP-, Tomato- und doppelt positiven Lymphozyten (DP) in % dargestellt 3-5 Wochen nach der Transplantation transduzierter LSK Zellen. (A) Dot-Plot-Darstellung. (B) Relativer und absoluter Anteil als Balkendiagramm.

### 3.3.4.2 Erkrankte Tiere weisen Leukozytose, Anämie und Thrombozytopenie auf

Bereits zu diesem Zeitpunkt ergab das Blutbild deutliche Auffälligkeiten bei den Mäusen mit beiden Mutationen (Abbildung 45). Es zeigte sich eine leicht erhöhte, aber signifikante Anzahl von Leukozyten (WBC, white blood cell count) sowie ein deutlicher Anstieg an großen, ungefärbten Zellen (LUC, „large unstained cells“). Thrombozytenzahl (PLT) war signifikant erniedrigt. Ein erniedrigter Hämatokritwert (HKT) und Hämoglobinwert (HB) sowie ein erhöhter RDW-Wert (Red Blood Cell Distribution Width, Erythrozytenverteilungsbreite) deutete auf eine Anämie. Außerdem wurde eine wesentlich ausgeprägte Anisozytose festgestellt, hierbei handelt es sich um starke Größenschwankungen der Erythrozyten. Zusammenfassend war bereits nach 3-4 Wochen fest-

zustellen, dass Tiere mit beiden Mutation Indizien für eine hämatologische Systemerkrankung aufweisen. Alle anderen Kontrolltiere zeigten keine Auffälligkeiten.

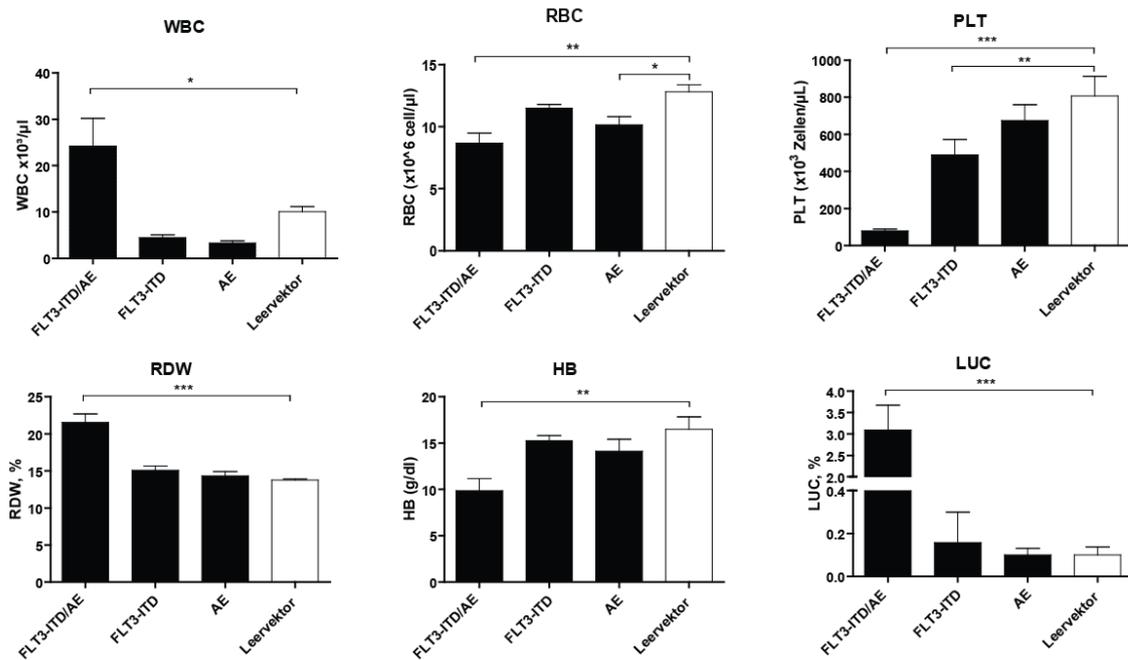


Abbildung 45: Differentialblutbild 3-5 Wochen nach der Transplantation, bei den erkrankten Tieren am Todestag, zeigte die ersten Auffälligkeiten im Differentialblutbild in der Gruppe AE/FLT3-ITD. Untersucht wurden Leukozyten (WBC, white blood cell), Erythrozytenzahl (RBC, red blood cell), Thrombozytenzahl (PLT, platelet count), Erythrozytenverteilungsbreite (RDW, Red Blood Cell Distribution Width), Hämoglobin (HB, haemoglobin) und großen, ungefärbten Zellen z.B. Blasten (LUC, large unstained cells).

### 3.3.4.3 Gemeinsame Expression von FLT3-ITD und AML1-ETO führt zur Induktion einer akuten Leukämie

Morphologische Untersuchungen von Blutaussstrichen zeigten bei den meisten erkrankten Tieren zirkulierende Blasten (Abbildung 46). Um den Typus der Leukämien zu bestimmen, wurden die Verteilungen der Zellpopulationen sowie die Anzahl der Blastenzellen in den erkrankten Mäusen analysiert.

11 der 20 erkrankten Tiere zeigten eine lymphatische Morphologie dieser Zellen, fünf Tiere einen myeloischen Phänotyp und vier Tiere unerwarteter Weise einen Biphänotyp, d.h. bereits im Blut waren beide Arten von Blasten gleichzeitig vorhanden. Mäuse mit lymphatischer Leukämie zeigten auf den Zytospins von Knochenmarkzellen eine erhöhte Anzahl an Blastenzellen und eine stark erhöhte Lymphozytenzahl unter Reduktion der myeloischen Zellen. Myeloische Leukämien ließen sich durch eine erhöhte Anzahl an Blastenzellen und eine erhöhte Anzahl an neutrophilen Granulozyten, bei reduzierter Anzahl an Lymphozyten diagnostizieren.

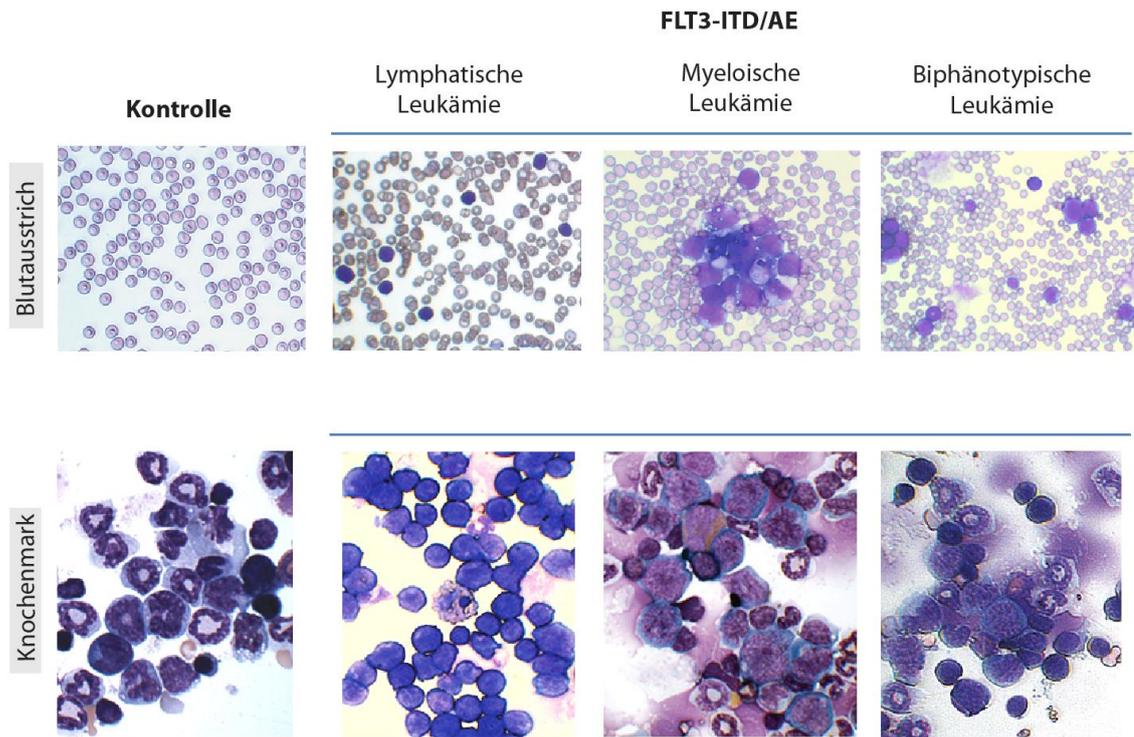


Abbildung 46: Koexpression von FLT3-ITD und AE führt zur Ausbildung sowohl myeloischer als auch lymphatischer sowie einer biphänotypischen Leukämie. Obere Reihe: Blutausstriche. Untere Reihe: Zytopsin Knochenmark. Als Kontrolle ist in diesem Fall eine Maus transplantiert mit Leervektor.

#### 3.3.4.4 Klinisches Bild zeigte eine massive Hepato- und Splenomegalie in den erkrankten Tieren

Bei allen erkrankten Tieren wurden vor der Tötung das Körpergewicht sowie das Gewicht entnommener Organe wie Milz und Leber notiert und in Relation zum jeweiligen Körpergewicht ermittelt. Tiere der Kontrollgruppen wurden erst zum Ende des Experiments nach 300 Tagen getötet. Die Sektion der erkrankten Tiere ergab eine massive Splenomegalie zumeist kombiniert mit einer Hepatomegalie (Abbildung 47). Histologisch war eine diffuse Infiltration der seziierten Organe durch leukämische Blasten zu erkennen (Abbildung 48).

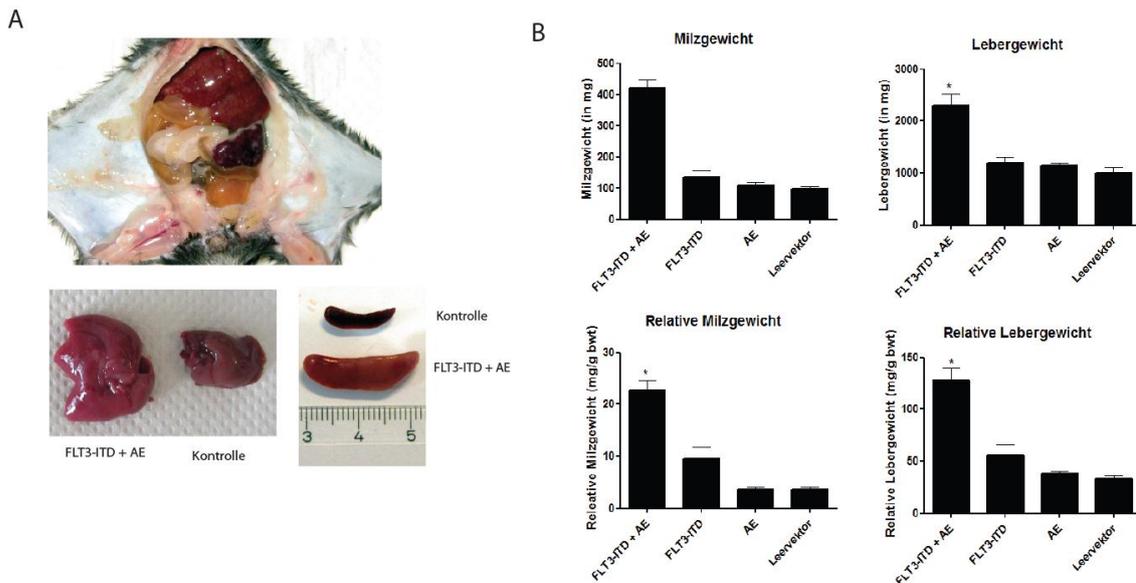


Abbildung 47: In den erkrankten Tieren waren Milz und Leber deutlich vergrößert. (A) Oben: Offener Situs einer an Leukämie verstorbenen FLT3-ITD/AE Maus mit deutlicher Spleno- und Hepatomegalie. Unten: Unterschiede in Milz- und Lebergröße aus Leukämiemaus FLT3-ITD/AE und einer gesunden Wildtyp Maus. (B) Die entnommenen Organe Leber und Milz wurden gewogen und zusätzlich in Relation zum jeweiligen Körpergewicht gesetzt und in mg/g Körpergewicht dargestellt.

### Milz

Das Milzparenchym lässt sich in rote und weiße Pulpa unterteilen (Abbildung 48i, Pfeil 1), wobei sich in der roten Pulpa vor allem Blutzellen, wie Makrophagen, B-Zellen sowie T-Zellen vom gamma/delta Typ, finden. Die weiße Pulpa hingegen stellt das eigentliche lymphatische Gewebe der Milz dar (Abbildung 48i, Pfeil 2). Der Hauptanteil der weißen Pulpa wird von periarteriolen lymphatischen Scheiden (PALS) gebildet in der die T-Lymphozyten gruppiert sind (Abbildung 48j, Pfeil 4) [182]. In den Lymphfollikeln wiederum überwiegen die B-Zellen in den verschiedenen Stadien ihrer Ausreifung. Es handelt sich dabei um kleine, zirkulierende B-Zellen, sogenannte folliculäre B-Zellen (Fo-B-Zellen). Die Marginalzone ist eine zellreiche Übergangszone zwischen weißer und roter Pulpa, in der viele arterielle Gefäße offen enden. Sie ist je nach Mausstamm unscheinbar bis deutlich ausgebildet (Abbildung 48j, Pfeil 3). Sie setzt sich aus mittelgroßen, residualen B-Lymphozyten, sogenannten Marginalzonen-B-Zellen (Mz-B-Zellen) zusammen. So spielt die Milz neben einer Filterfunktion, auch eine wichtige Rolle bei der Immunfunktion. Die Zellen des Immunsystems kommen permanent mit angespülten Antigenen in Kontakt und bringen die Immunreaktion in Gang. Aktivierte B-Zellen gelangen aus der Marginalzone, zur weiteren Differenzierung in das Keimzentrum und können von der Milz direkt ins Blutbann abgegeben werden. Im Gegensatz zum Menschen findet bei der Maus während der gesamten Lebensdauer eine mehr oder weniger starke, extramedulläre

Hämatopoiese in der Milz statt [183]. Die für gewöhnlich geringe Granulopoiese bleibt auf die unmittelbare Umgebung der Septen aus glatten Muskell- und Bindegewebezellen begrenzt, die die Milzkapsel umschließen. Bei entzündlichen und leukämischen Prozessen finden sich Myeloblasten und Granulozyten in der gesamten roten Pulpa. Thrombozytopoiese und Erythropoiese sind meist diffus in der roten Pulpa zu erkennen und stärker als die Granulopoiese ausgeprägt. Die Tatsache, dass bei Mäusen die Milz neben dem Knochenmark lebenslang wesentliches Blutbildungsorgan bleibt, ist bei der Diagnostik leukämischer Erkrankungen von besonderer Bedeutung [184]. In der Abbildung 48 sind Milzbefunde der erkrankten sowie der Kontrolltiere dargestellt. Bei den Tieren aus der Gruppe FLT3-ITD/AML1-ETO ist erkennbar, dass die bei der Sektion beobachtete Splenomegalie weitgehend mit Rückbildung der weißen Pulpa verknüpft ist und die Milzgewebe fast zu einer „Reinkultur“ von Blasten transformiert ist.

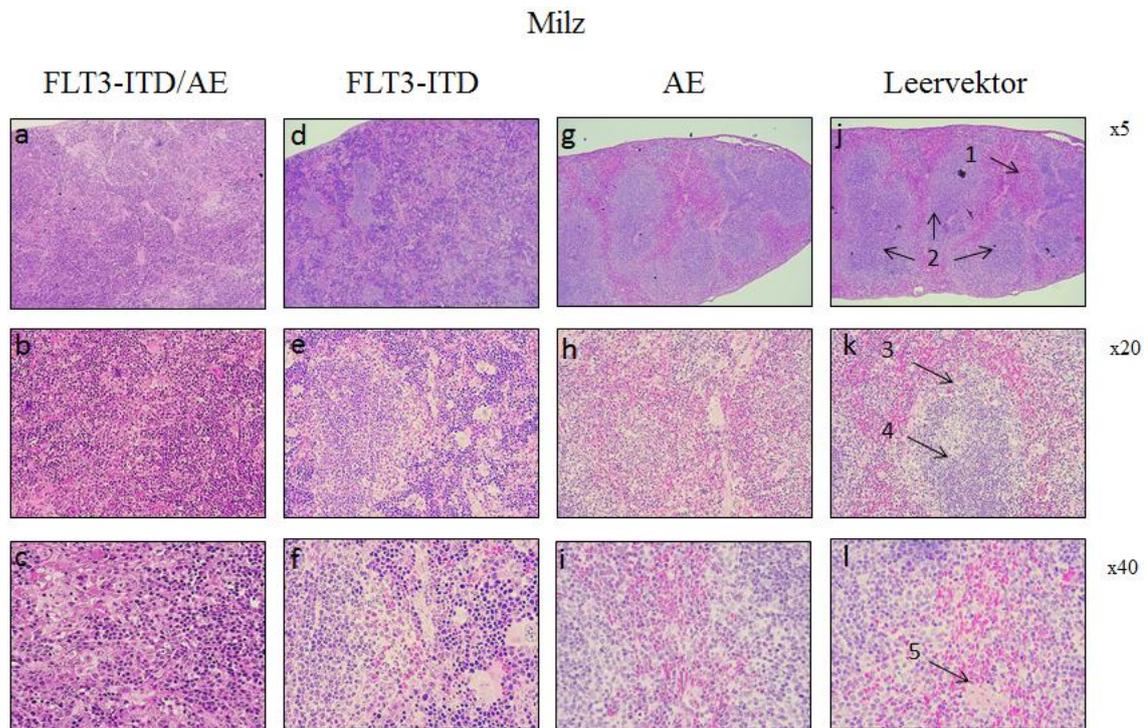


Abbildung 48: Histologisches Bild einer massiven Infiltration des Milzes durch leukämische Zellen in der Gruppe FLT3-ITD/AE (a-c) in Vergleich zu nicht erkrankten Kontrollgruppen (d-k). In der Gruppe FLT3-ITD/AE war die Milz vergrößert und die gesamte Organstruktur von blastären Zellen erfüllt. In der Gruppe FLT3-ITD war die Milzarchitektur nur partiell erhalten. Bereiche der weißen Pulpa waren deutlich reduziert. Im Bereich der roten Pulpa imponierten dunkelblau gefärbte Zellen. Das Milzgewicht und die Milzgröße waren nicht verändert, was gegen eine massive Expansion dieser Zellpopulation spricht. 1, rote Pulpa; 2, weiße Pulpa; 3, Marginalzone (MZ); 4, periarteriolar lymphatische Scheide (PALS); 5, Arterie.

Bei FLT3-ITD exprimierenden Tieren ist festzustellen, dass die Milzarchitektur nur partiell erhalten ist und die Regionen der weißen sowie roten Pulpa deutlich reduziert sind. In der Peripherie imponieren zum Teil dunkelblau gefärbte Bezirke, die möglicherweise auf eine entzündliche Reaktion bzw. Infiltration von tumorösen Zellen deuten können als eine mögliche Entwicklung in Richtung Präleukemie. Die Abbildung 49 zeigt bei 63x Vergrößerung die Unterschiede in der Zellgröße dunkelblau gefärbten Zellen zwischen FLT3-ITD/AML1-ETO und FLT3-ITD exprimierenden Tieren. Dagegen in den Kontrollgruppen AML1-ETO und Leervektor ist die Milzstruktur unverändert. In der PALS ist die Lagerung der Lymphozyten besonders dicht. Die breiten Straßen roter Pulpa zeichnen sich durch den Reichtum an Erythrozyten.

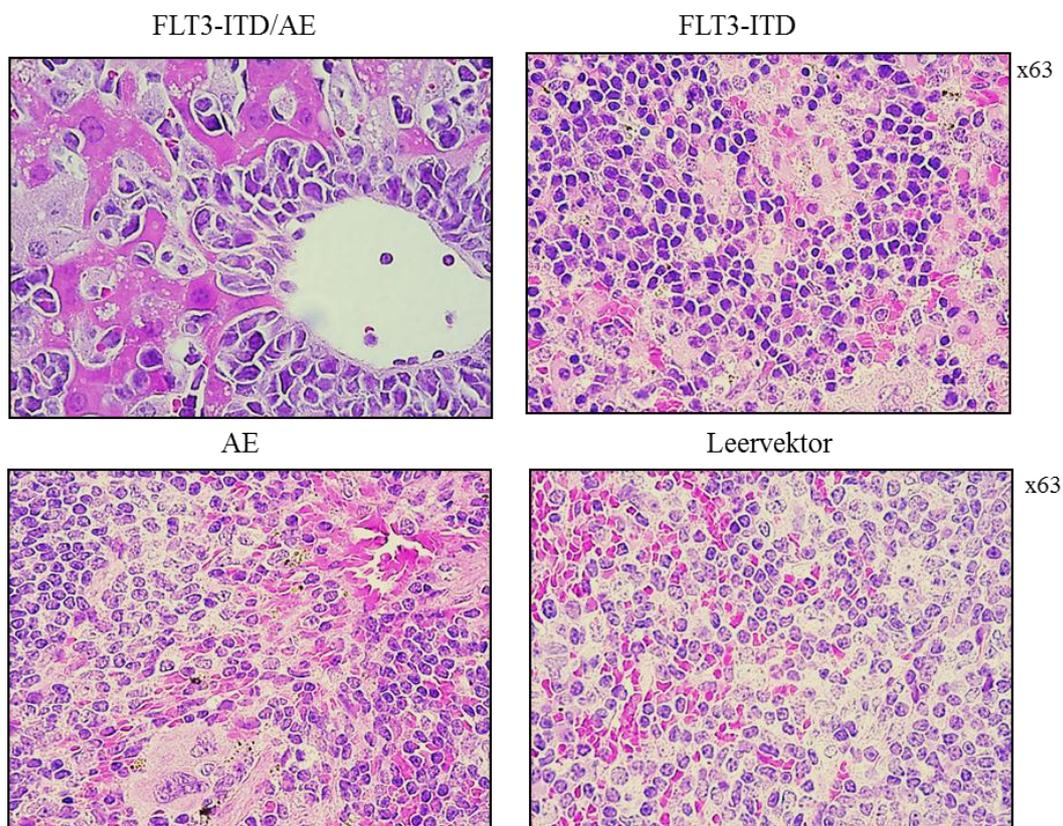


Abbildung 49: Histologisches Milzbefund bei 63x Vergrößerung lässt die Unterschiede in der Zellgröße der dunkelblau gefärbten Zellen in den Gruppen FLT3-ITD/AE und FLT3-ITD erkennen. In den Gruppen AE und Leervektor sind keine dunkelblau gefärbten Areale zu erkennen sowie keine Strukturveränderungen des Milzes.

### Leber

Im Rahmen dieser Arbeit kam bei der hämatologischen Diagnostik der Leber nur eine untergeordnete Rolle zu. Eine Leberbeteiligung im Rahmen des leukämischen Prozesses äußert sich vor allem durch periportale Zellinfiltrationen, die bei den Tieren aus der Gruppe FLT3-ITD/AML1-ETO zu beobachten sind (Abbildung 50 a-b, Abbildung 51). Die Leberschnitte der Kontrolltiere, waren unauffällig.

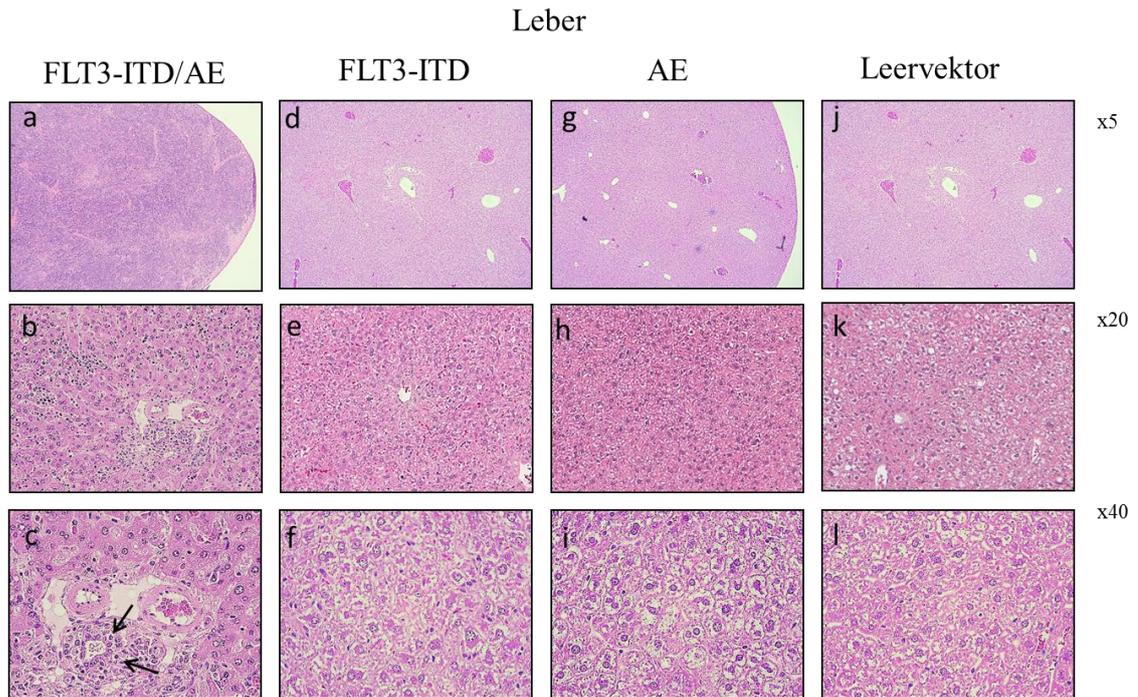


Abbildung 50: Histologisches Bild einer massiven Infiltration des Leberparenchyms durch leukämische Zellen in der Gruppe FLT3-ITD/AML1-ETO (a-c) in Vergleich zu nicht erkrankten Kontrollgruppen (d-j). Schwarze Pfeile deuten auf Infiltrate hin.

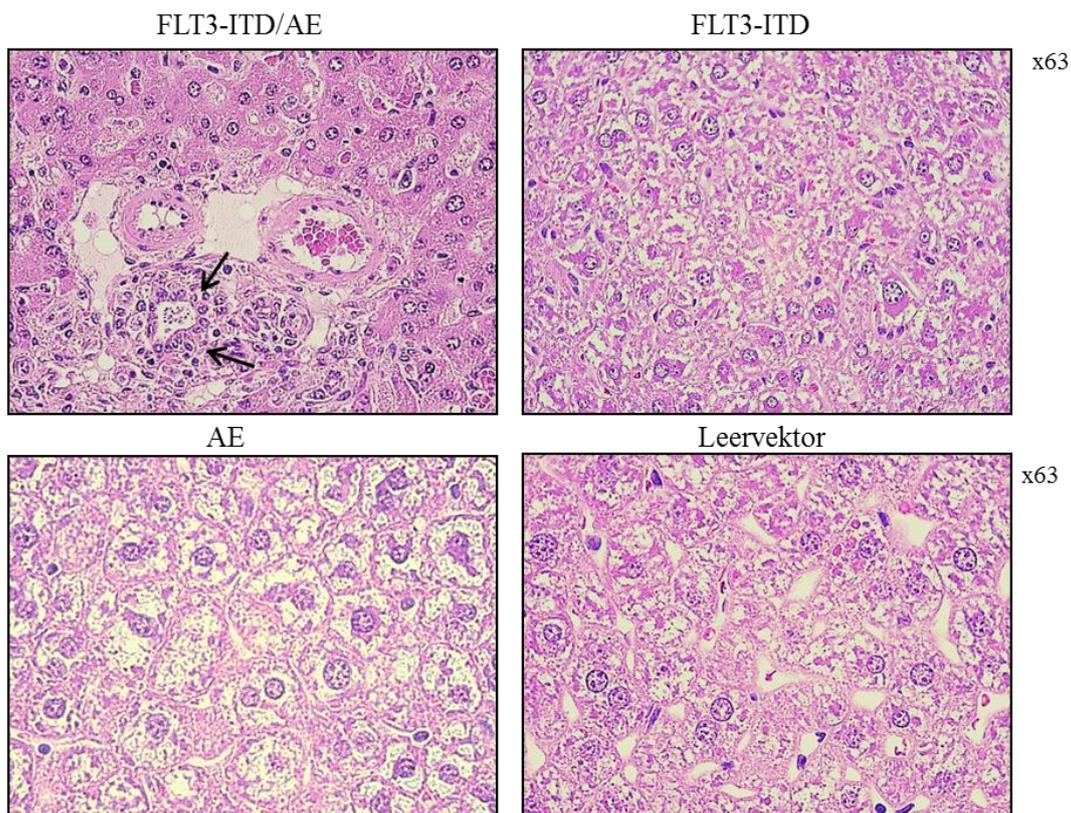


Abbildung 51: Histologisches Leberbefund bei 63x Vergrößerung lässt eine periportale Zellinfiltration in der Gruppe FLT3-ITD/AE erkennen (schwarze Pfeile).

Somit lässt sich zusammenfassend feststellen, dass es sich bei den erkrankten Tieren aus der FLT3-ITD/AML1-ETO Gruppe um eine maligne hämatologische Erkrankung verbunden mit Hepato- und Splenomegalie unter vollständiger Aufhebung der normalen Organarchitektur handelt. Es zeigten sich Blutbildveränderungen wie Leukozytose, Anämie, ausgeprägte Thrombozytopenie, sowie das Auftreten von Blasten im Knochenmark und im peripheren Blut.

### 3.3.4.5 Immunphänotypische Analyse von Knochenmark, Milz und Thymus

Um die histologische Befunde zu bestätigen sowie die Linienzugehörigkeit der jeweiligen Blasten zu bestimmen wurde eine weiterführende durchflusszytometrische Immunphänotypisierung durchgeführt. Als erstes wurde die Expression der Reportergene analysiert. Dabei zeigte die Analyse des Knochenmarks eine ähnliche Verteilung der Zellpopulationen nach eGFP- und Tomato- Expression wie im peripheren Blut. Der Anteil doppelt positiver Zellen in FLT3/ITD/AML1-ETO Gruppe war enorm expandiert (Abbildung 52).

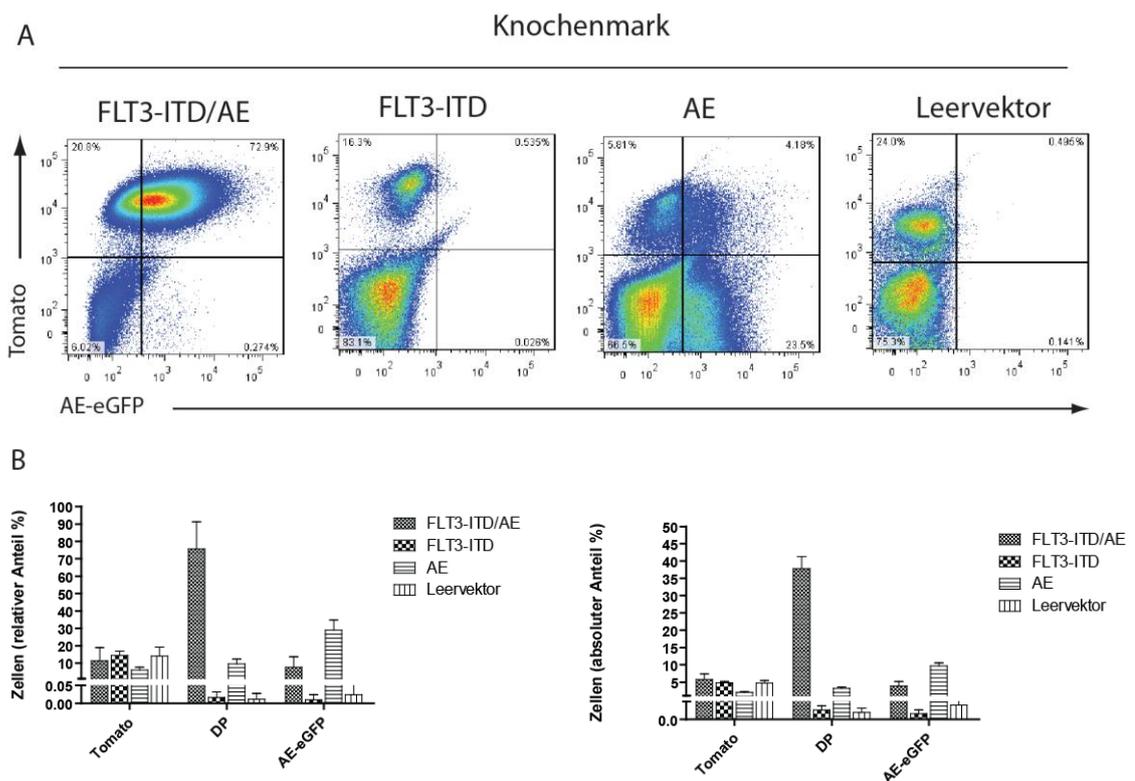


Abbildung 52: Analyse des Knochenmarkes mittels FACS. Analysiert wurde die Anzahl der eGFP-, Tomato- und doppelt positiven Lymphozyten (DP) in %. In der Gruppe FLT3-ITD/AE zeigte sich, wie zuvor im peripheren Blut, eine Expansion von eGFP/Tomato doppelt positiver Population. (A) Dot-Plot-Darstellung. (B) Relativer und absoluter Anteil als Balkendiagramm.

### 3.3.4.6 Ein Teil der erkrankten Tiere zeigte eine erhöhte Granulopoese

Als erstes wurde die Granulopoese im Knochenmark und der Milz angeschaut. Bei fünf Tieren aus der Gruppe FLT3-ITD/AML1-ETO lag der Anteil an Gr-1/CD11b doppelt positiven Zellen bei  $70,3\% \pm 8,5$  im Knochenmark und bei  $28,1\% \pm 2,4$  in der Milz, diese Tiere litten an AML. Bei weiteren 11 Tieren dagegen lag der Anteil an Gr-1/CD11b doppelt positiven Zellen deutlich unter dem Normwert bei  $3,2\% \pm 1,4$  im Knochenmark und bei  $1,1\% \pm 0,6$  in der Milz. Bei den Kontrollgruppen gab es keine signifikanten Unterschiede und Auffälligkeiten. Bei AML1-ETO Tieren lag der Anteil an Gr-1/CD11b doppelt positiven Zellen bei  $32,3\% \pm 4,5$  im Knochenmark und bei  $3,6\% \pm 2,4$  in der Milz. Und bei Kontrolltieren transduziert mit Leervektor lag der Anteil an Gr-1/CD11b doppelt positiven Zellen bei  $29,7\% \pm 3,9$  im Knochenmark und bei  $1,1\% \pm 1,3$  in der Milz (Abbildung 53, Abbildung 54).

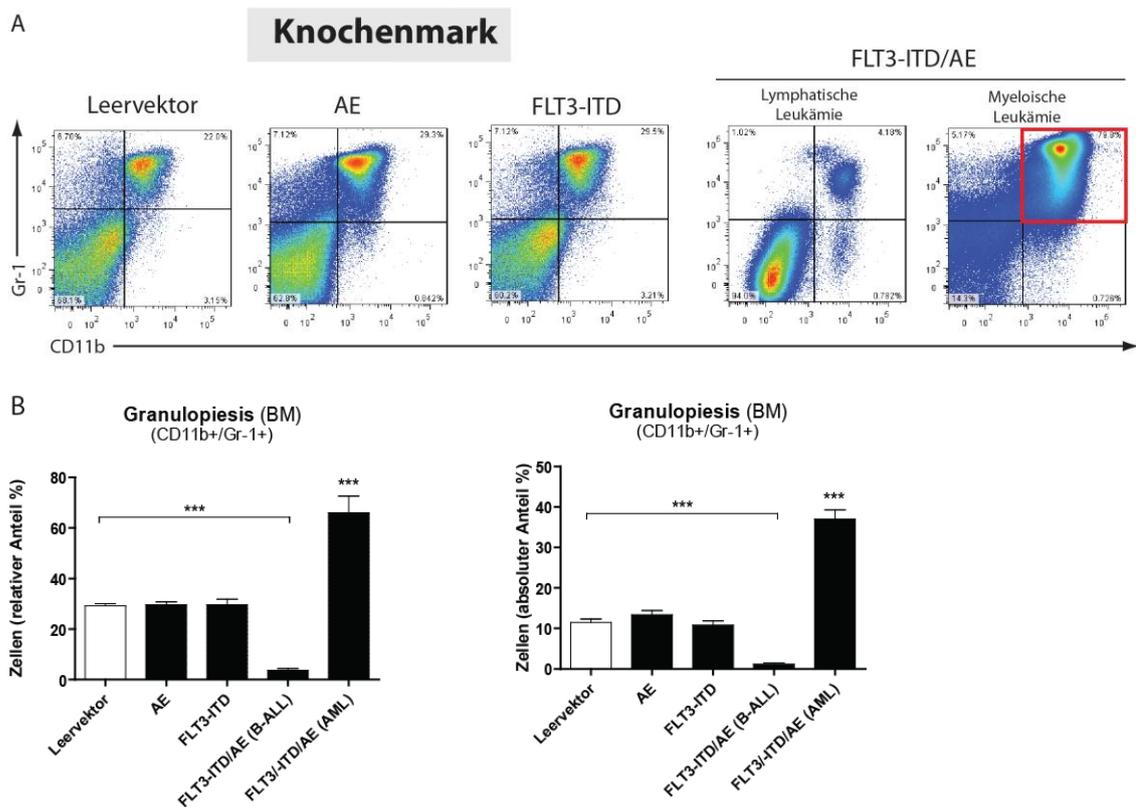


Abbildung 53: Immunphänotypische Analyse der Granulopoese im Knochenmark mit myeloischen (CD11b/Gr-1) markierenden Antikörpern zeigte bei einem Teil der Tiere aus der Gruppe FLT3-ITD/AE eine erhöhte Granulopoese, bei einem anderen Teil dagegen eine dramatische Reduktion der CD11b/Gr-1 Population. (A) Dot-Plot-Darstellung. (B) Relativer und absoluter Anteil als Balkendiagramm.

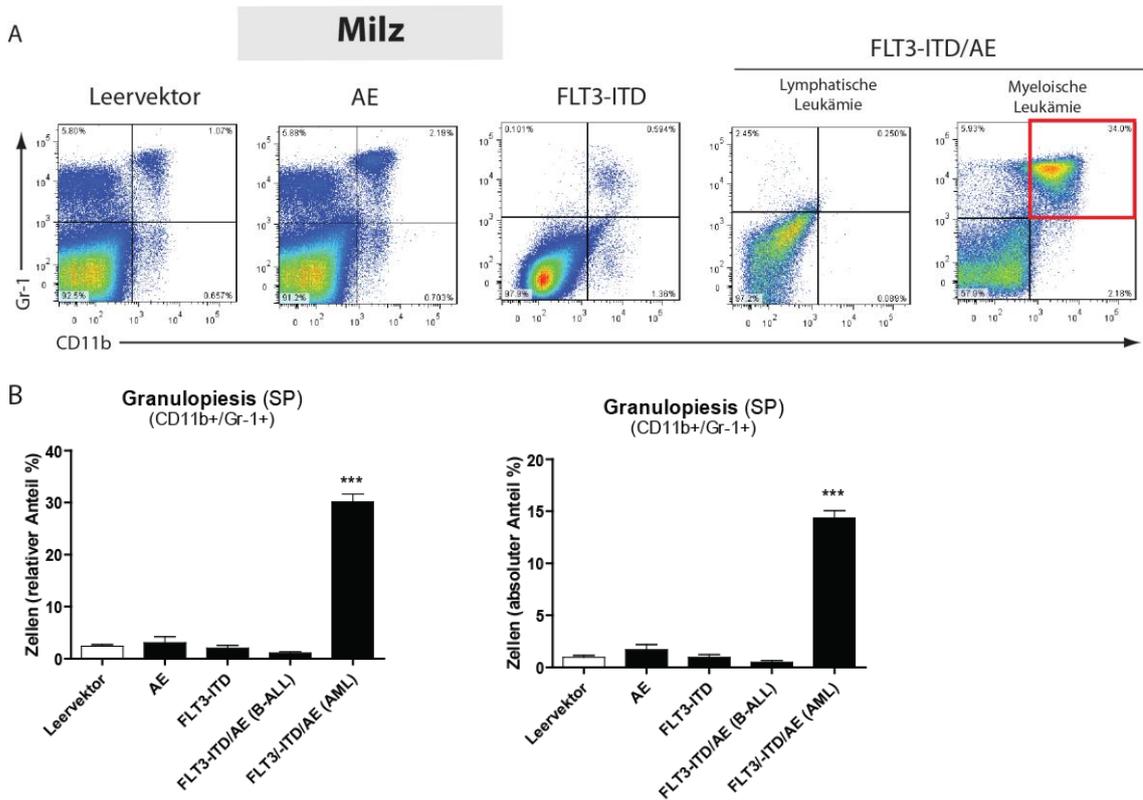


Abbildung 54: Immunphänotypische Analyse der Granulopoese in der Milz mit myeloischen (CD11b/Gr-1) markierenden Antikörpern zeigte ähnlich wie die Analyse des Knochenmarks bei einem Teil der Tiere aus der Gruppe FLT3-ITD/AE eine erhöhte Granulopoese, bei einem anderen Teil dagegen eine dramatische Reduktion der CD11b/Gr-1 Population. (A) Dot-Plot-Darstellung. (B) Relativer und absoluter Anteil als Balkendiagramm.

### 3.3.4.7 Gestörte B-Zell-Differenzierung

Als nächstes wurde die Entwicklung von B-Lymphozyten im Knochenmark und der Milz untersucht. Bei den fünf Tieren aus der Gruppe FLT3-ITD/AML1-ETO mit dem myeloischen Phänotyp war der Anteil an doppelt positiven CD19/B220 B-Zellen im Knochenmark stark reduziert und lag bei  $4,7\% \pm 2,1$  und bei  $6,1\% \pm 2,4$  in der Milz. Bei den anderen 11 Tieren war der Anteil an CD19/B220 doppelt positiver B-Zellen deutlich erhöht und lag um  $85,3\% \pm 9,5$  im Knochenmark und bei  $93,7\% \pm 3,2$  in der Milz. Diese Tiere litten an einer B-ALL. Eine weitere Auffälligkeit war eine leichte, aber signifikante Reduktion von B-Zellen in der AML1-ETO Gruppe, was bereits in den vorgegangenen Versuchen mit kRAS zu beobachten war. Interessanterweise war bei 10 phänotypisch nicht erkrankten Tieren der FLT3-ITD Gruppe ein kompletter Differenzierungsblock in B-Zell-Entwicklung zu beobachten. Der Anteil an B-Zellen lag bei diesen Tieren bei  $2,4\% \pm 1,3$  im Knochenmark und bei  $11,2\% \pm 2,9$  in der Milz. In Vergleich dazu wurden bei den Kontrolltieren transduziert mit Leervektor keine Auffälligkeiten festgestellt. Der Anteil der differenzierten B-Zellen lag mit  $35,4\% \pm 4,3$  im

Knochenmark und bei  $57,9\% \pm 4,7$  in der Milz im Normbereich (Abbildung 55, Abbildung 56). Hiermit lässt sich vermuten, dass die alleinige Expression von FLT3-ITD sowie AML1-ETO in hämatopoetischen Zellen zu Beeinträchtigung der Differenzierung lymphatischer Zellen führt.

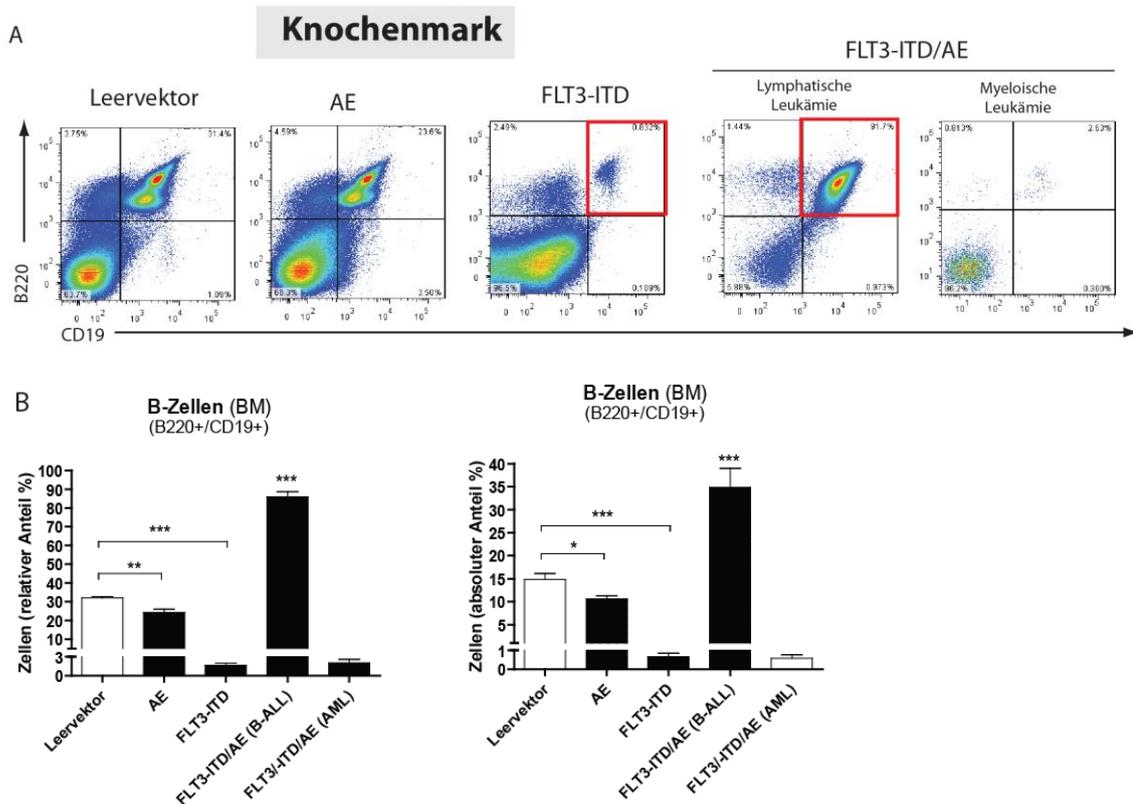


Abbildung 55: Immunphänotypische Analyse der B-Zell-Entwicklung im Knochenmark mit lymphatischen (B220/CD19) markierenden Antikörpern zeigte bei einem Teil der Tiere aus der Gruppe FLT3-ITD/AML1-ETO eine enorme Expansion der B-Zell-Population, bei einem anderen Teil dagegen eine dramatische Reduktion. Bei FLT3-ITD Tieren war die Differenzierung der B-Zellen dramatisch gestört. Bei AML1-ETO Tieren ließ sich eine leichte, aber signifikante Reduktion der B-Zellen feststellen. (A) Dot-Plot-Darstellung. (B) Relativer und absoluter Anteil als Balkendiagramm.

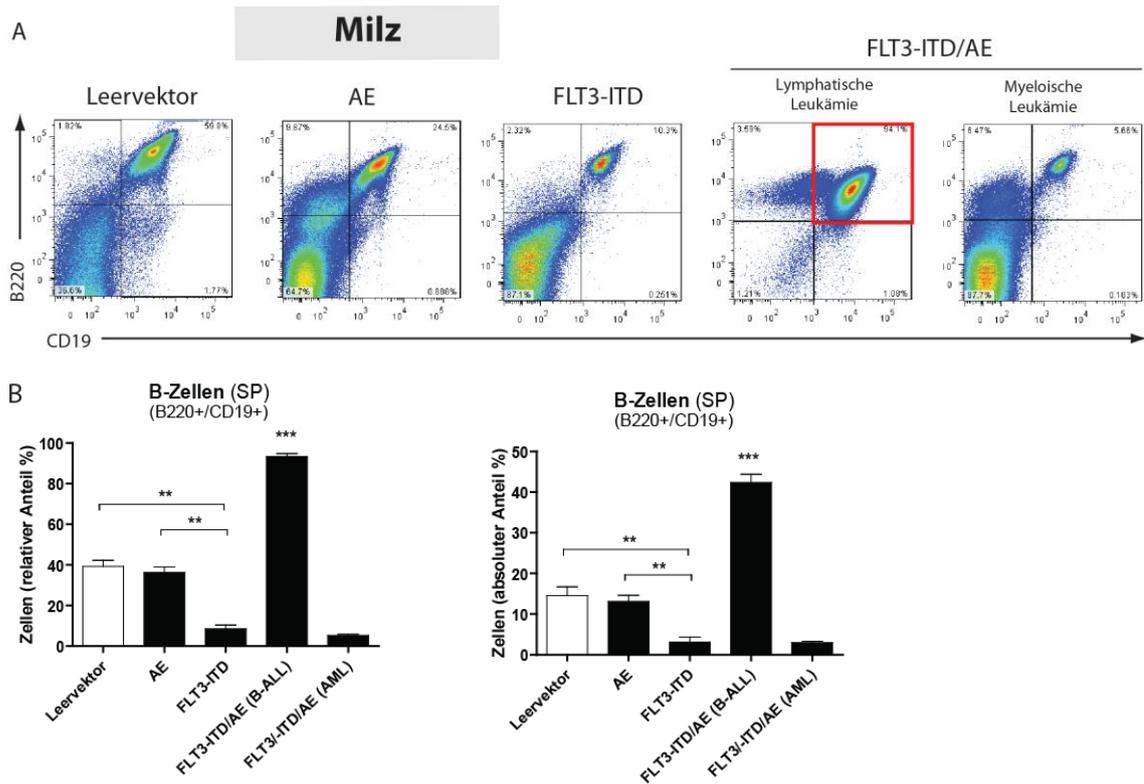


Abbildung 56: Immunphänotypische Analyse der B-Zell-Entwicklung in der Milz mit lymphatischen (B220/CD19) markierenden Antikörpern zeigte ein ähnliches Bild wie die Analyse des Knochenmarks. (A) Dot-Plot-Darstellung. (B) Relativer und absoluter Anteil als Balkendiagramm.

### 3.3.4.8 Im Falle der B-ALL handelt es sich um frühere pro-B-Zellen

Um zu festzustellen, in welcher Phase der Differenzierung die Tumorzellen sich befinden wurde Knochenmarkzellen auf ihre verschiedenen B-Zellentwicklungsstadien mit Hilfe der Oberflächenmarker IgM, B220 und CD43 analysiert. Die Strategie, um die Entwicklungsstufen der B-Zellen zu identifizieren ist in der Abbildung 57 dargestellt.

Als erstes erfolgte die Markierung der B-Zellen mit B220 als Marker, da CD19 erst in späteren Entwicklungsstufen exprimiert wird. Im nächsten Schritt wurde mit Hilfe der IgM und CD43 Expressionen die B-Zellen in verschiedene Fraktionen unterteilt: B220<sup>low</sup>CD43<sup>-</sup>IgM<sup>+</sup> unreife B-Zelle; B220<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup> Pro-B Zelle; B220<sup>+</sup>CD43<sup>-</sup>IgM<sup>-</sup> Pre-B-Zelle; B220<sup>high</sup>CD43<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup> reife B-Zellen.

Bei Tieren aus der Gruppe FLT3-ITD/AML1-ETO bei den sich eine enorme Expansion der B-Zellen zeigte und die somit an B-ALL litten waren die Tumorzellen frühere B-Zellen, die in ihrer Differenzierung zwischen dem Pro- und Prä-B Zellstadium blockiert sind. Zu über 90% hatten die Zellen folgenden Immunphänotyp IgM<sup>-</sup>CD43<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>.

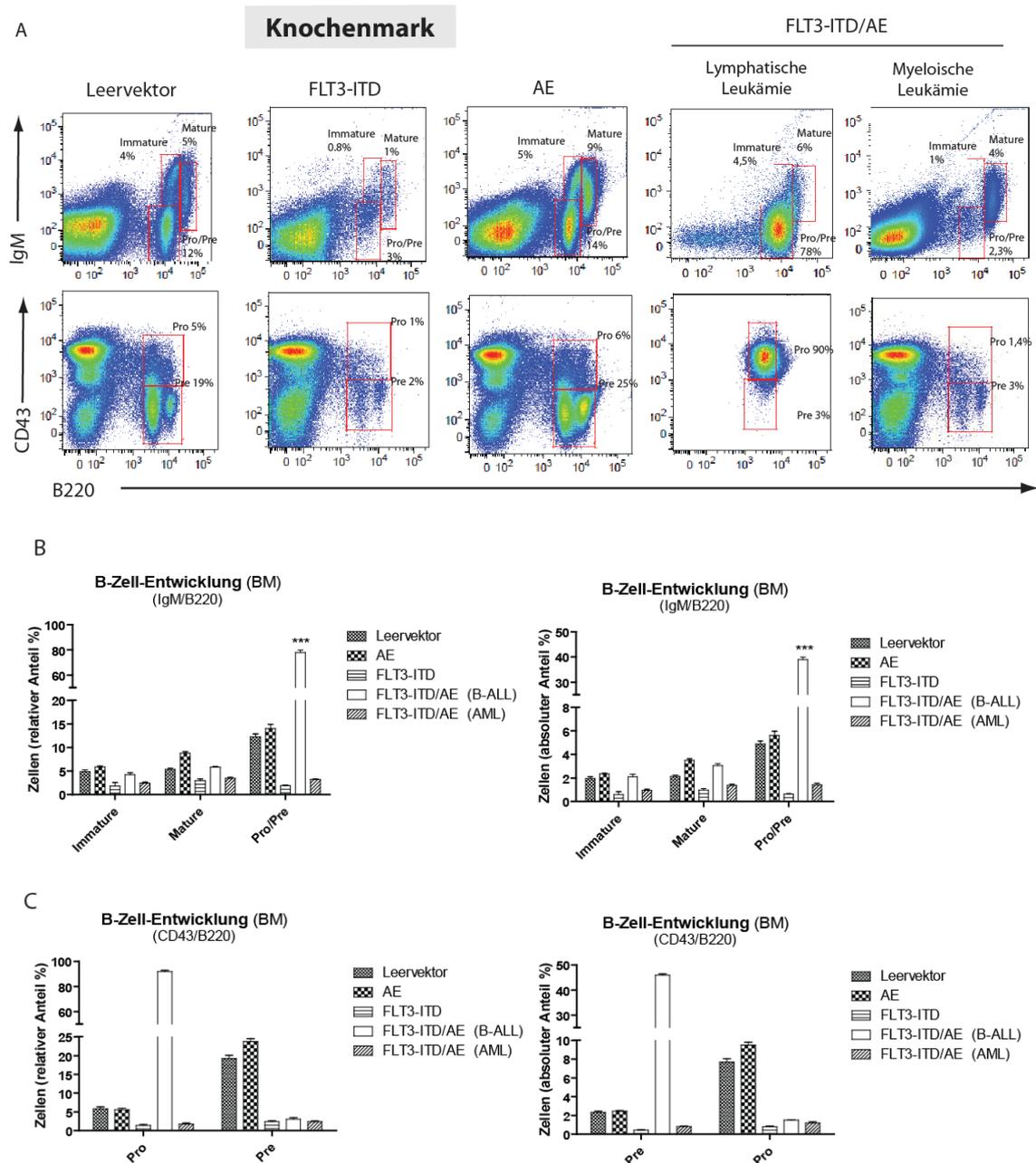


Abbildung 57: Immunphänotypische Analyse der B-Zell-Entwicklung im Knochenmark mit Marker IgM, B220 und CD43 konnte festgestellt werden, dass bei an B-Zell-ALL erkrankten Tieren, die B-Zelle einen pro-B-Phänotyp haben. (A) Mittels Oberflächenmarker IgM und B220 wurden als erstes  $B220^{low}IgM^{+}$  unreife B-Zelle (Immature),  $B220^{high}IgM^{+}$  reife B-Zellen (Mature) und  $B220^{low}IgM^{-}$  Pre/Pro-B Zellen identifiziert. (B) Im nächsten Schritt wurden Pre/Pro-B-Zellen mit Hilfe der CD43 Marker weiter in  $B220^{low}CD43^{-}IgM^{-}$  Pre-B-Zelle und  $B220^{low}CD43^{+}IgM^{-}$  Pro-B-Zellen eingeteilt. (C) Relativer und absoluter Anteil als Balkendiagramm.

### 3.3.4.9 T-Zell-Entwicklung im Thymus

Um eventuelle Fälle von T-ALL festzustellen wurde auch der Thymus mit Hilfe von CD4 und CD8 Marker durchflusszytometrisch untersucht.

Die Charakterisierung der T-Zelldifferenzierung von erkrankten Tieren im Thymus zeigte, dass bei den FLT3-ITD/AML1-ETO Tieren die Population von CD8/CD4 doppelpositiven Zellen deutlich erniedrigt sowohl bei Tieren mit B-ALL als auch bei Tieren mit AML.

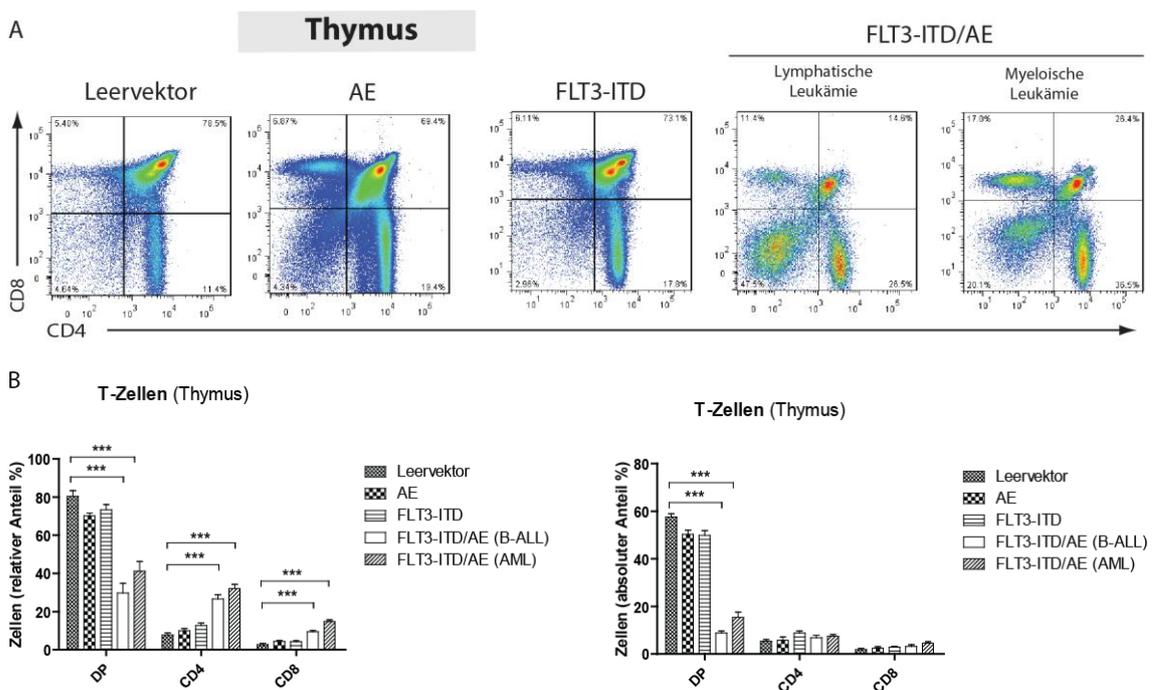


Abbildung 58: Immunphänotypische Analyse der T-Zell-Entwicklung im Thymus ließ kein T-ALL-Phänotyp feststellen. Bei erkrankten Tieren wurde eine Reduktion der CD4/CD8 doppel positiven Zellen festgestellt.

### 3.3.5 Biphänotypische Leukämie

Biphänotypische akute Leukämien (BAL) ist eine eher seltene Erkrankung und macht etwas ca. 5 Prozent aller akuten Leukämien aus. BAL zeichnet sich entweder durch eine synchrone „hybride“ Expression lymphatischer und myeloischer Antigene oder es lassen sich zwei differente Blastenpopulationen (*mixed*) nachweisen. BAL Subgruppe leitet sich von einer unreifen Leukämienstammzelle ab, die Differenzierungspotenzial für die myeloische und lymphatische Reihe besitzt. Die klinische Bedeutung dieser seltenen Form ist bis jetzt unklar.

Bei 4 Tieren aus der Gruppe FLT3-ITD/AML1-ETO wurde zum Zeitpunkt des Todes ein Mischphänotyp mit zwei voneinander unabhängigen lymphoblastischen sowie

myeloblastischen Zellklonen festgestellt. Die Besonderheit lag daran, dass bei diesen Tieren der Prozentsatz der FLT3-ITD-Tomato/AML1-ETO-eGFP doppelt positiven Population vergleichsweise niedriger mit  $42\% \pm 7,3$ , davon hatten die meisten ebenfalls B-Zell-Phänotyp (CD19/B220) mit  $77,9\% \pm 6,8$ . Interessanterweise gab es auch eine FLT3-ITD-Tomato einzeln positive Population mit  $17,3\% \pm 8,4$ , von den die meisten  $78,1\% \pm 6,4$  myeloischen Gr-1/CD11b Phänotyp aufwiesen (Abbildung 59). Allerdings war festzustellen, dass die absoluten Anteile von B-Lymphozyten-Subpopulation höher lagen.

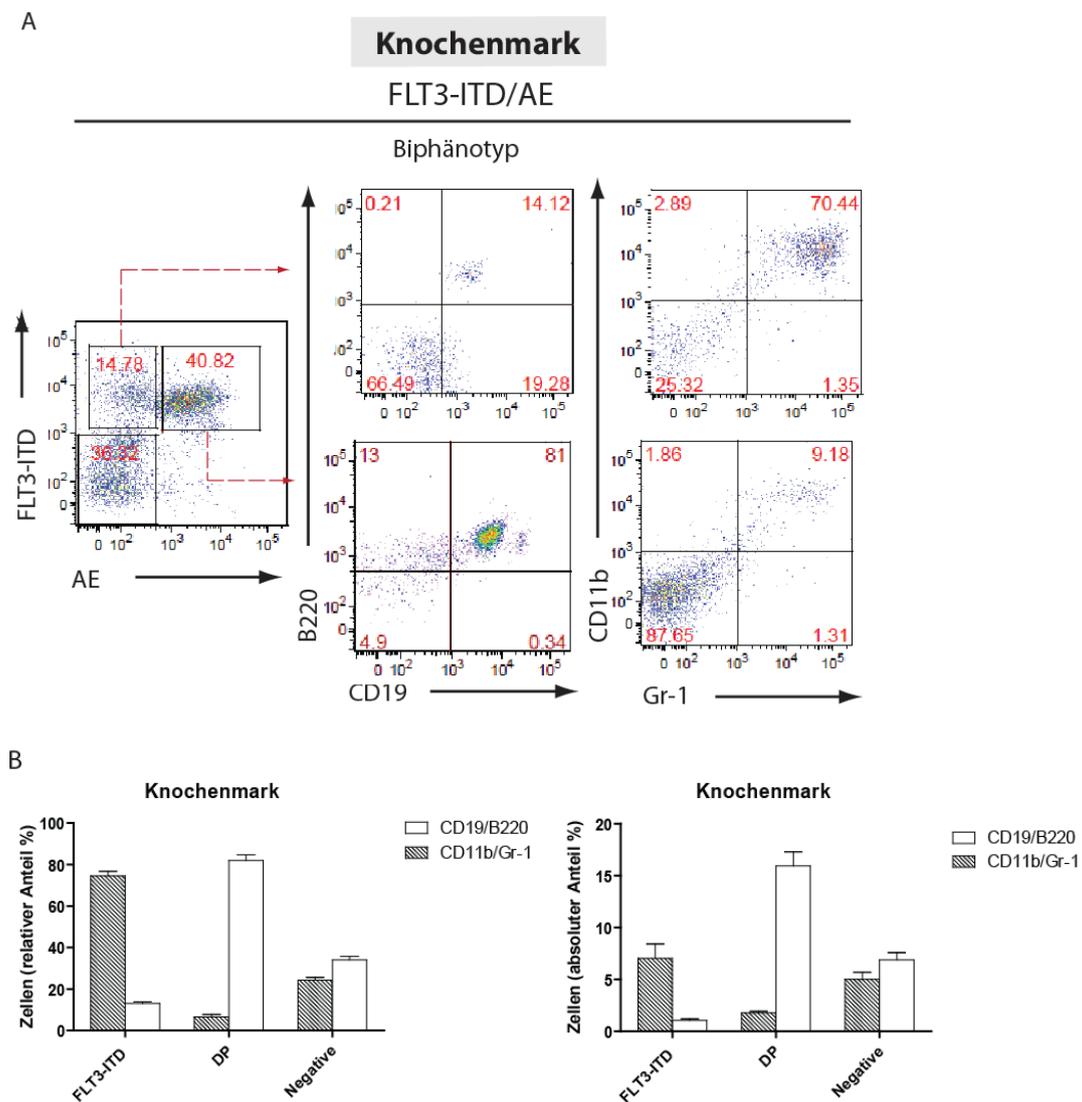


Abbildung 59: Immunphänotypische Analyse einer biphenotypischen Leukämie. Die Besonderheit liegt darin, dass der Großteil der FLT3-ITD/AE positiven Zellen aus dem Knochenmark positiv für die lymphatischen Marker CD19/B220, während der Großteil der FLT3-ITD einzeln positiven Population positiv für die myeloischen Marker CD11b/Gr-1 positiv ist. (A) Dot-Plot-Darstellung. (B) Relativer und absoluter Anteil als Balkendiagramm.

### 3.3.6 FLT3-ITD Expression induziert in einigen wenigen Fällen bereits alleine eine Leukämie

Bisher wurde in Mausmodellen anderer Arbeitsgruppen gezeigt, dass sowohl AML1-ETO als auch FLT3-ITD alleine nicht in der Lage war eine Leukämie effektiv auszulösen. Bei der Gruppe FLT3-ITD verstarben drei Tiere. Die histopathologische Untersuchung zeigte eine Spleno- und Hepatomegalie sowie die Infiltration der Organe.

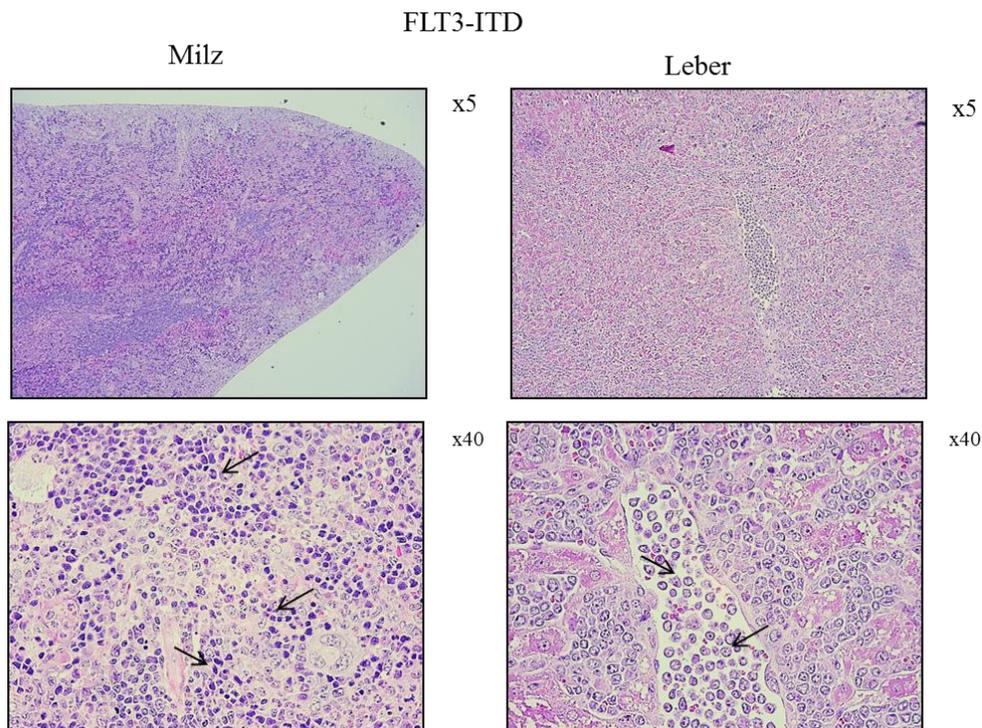


Abbildung 60: Histologisches Bild einer Infiltration des Milzes und der Leber durch leukämische Zellen in der Gruppe FLT3-ITD. Die Milz war vergrößert und die gesamte Organstruktur von blastären Zellen erfüllt. Ebenso lässt sich in der Leber eine periportale Zellinfiltration erkennen (schwarze Pfeile deuten auf Infiltrate hin).

Mit Hilfe der durchflusszytometrischen Charakterisierung wurde der Immunphänotyp der auftretenden hämatologischen Erkrankungen identifiziert. Dabei litten zwei an B-ALL und eine an AML (Abbildung 63). Dabei zeigte sich zusätzlich interessante Besonderheit, es gab zwei verschiedene FLT3-ITD Populationen. Bei der FLT3-ITD<sup>high</sup> Population handelte es sich zum überwiegenden Teil um Gr-1/CD11b Zellen, B-Zell-Antigene fehlten fast völlig. Bei der FLT3-ITD<sup>int</sup> Population handelte es sich dagegen zum größten Teil um B-Zellen, wobei diese sich in einem unreifen Pro/Pre- Stadium (IgM<sup>-</sup>/CD43<sup>+</sup>/B220<sup>+</sup>) befanden. Die absoluten Werte der beiden FLT3-ITD Populationen variierten in jeder Maus und dementsprechend verlief die Entwicklung in Richtung des lymphatischen oder myeloischen leukämischen Phänotyps.

Tier Nr. 1 - AML

Der Anteil der CD11b/Gr-1 Zellen im Knochenmark lag bei 77,6%, dagegen der Anteil der B220-positiven B-Zellen lag bei nur 13,4%. Es waren zwei verschiedene FLT3-ITD Populationen zu erkennen. Der Anteil der FLT3-ITD<sup>high</sup> Population lag bei 47,3 % und davon waren 96,2 % CD11b/Gr-1 positive Zellen und nur 0,3% B220-positive Zellen. Der Anteil der FLT3-ITD<sup>low</sup> lag bei 14,2% und davon waren nur 14,2% CD11b/Gr-1 positive Zellen, dafür aber 73,4% B-positiv Zellen.

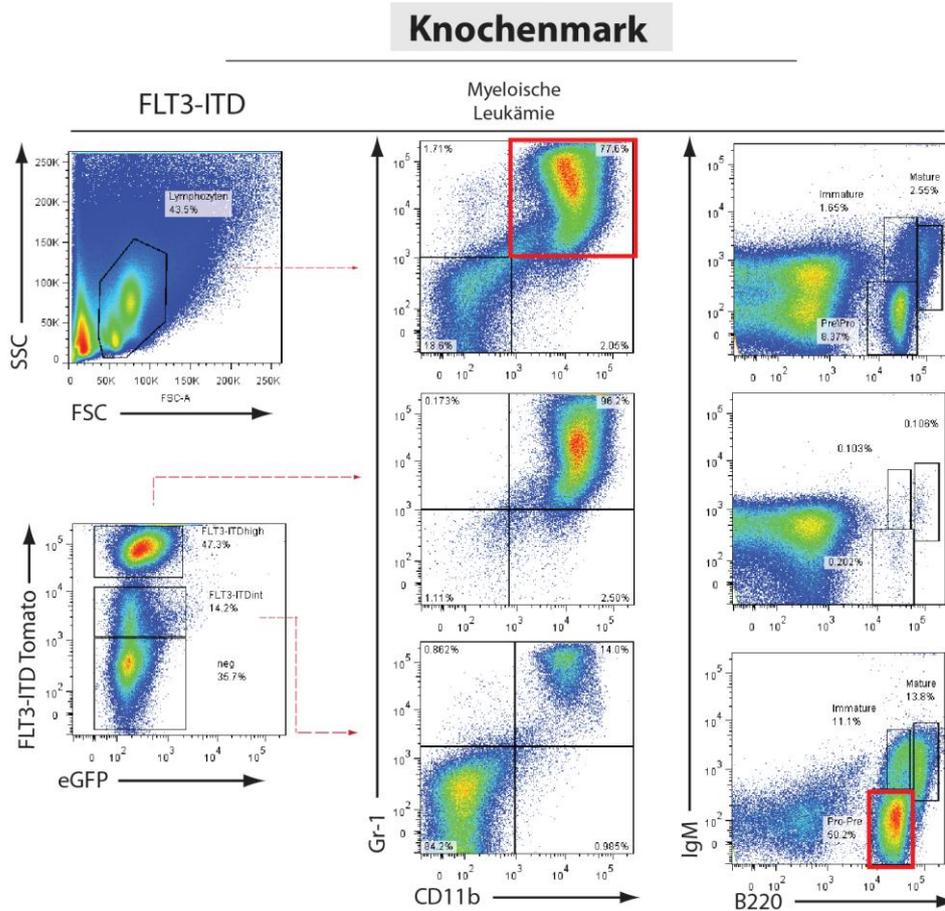


Abbildung 61: Immunphänotypische Analyse des Knochenmarks mit myeloischen (CD11b/Gr-1) sowie lymphatischen (IgM/B220) markierenden Antikörpern. Der Großteil der FLT3-ITD<sup>high</sup> positiven Zellen ist positiv für die myeloischen Marker CD11b/Gr-1, während die B-Zell-Population kaum nachgewiesen werden konnte. Dagegen war der Großteil der FLT3-ITD<sup>low</sup> positiven Zellen B-Zell, die sich in der Pro/Pre-B-Zellstadium befanden (IgM/B220<sup>low</sup>).

Tier Nr. 2 - ALL

Der Anteil der CD11b/Gr-1 Zellen im Knochenmark lag bei 1,13%, dagegen der Anteil der B220-positiven B-Zellen lag bei 82,4%. Bei diesem Tier dominierte deutlich die FLT3-ITD<sup>low</sup> Populationen. Der Anteil der FLT3-ITD<sup>high</sup> Population lag bei nur 2,7%.

Davon war der Großteil positiv für CD11b/Gr-1 mit 52,6 % und nur 25,7% für B-Zell-Marke. Der Anteil der FLT3-IDT<sup>low</sup> lag bei 76,7% und davon waren nur 2,7% CD11b/Gr-1 positive Zellen, dafür aber 92,4% B-Zell positive Zellen, die sich in der Pro/Pre-B-Zellstadium befanden.

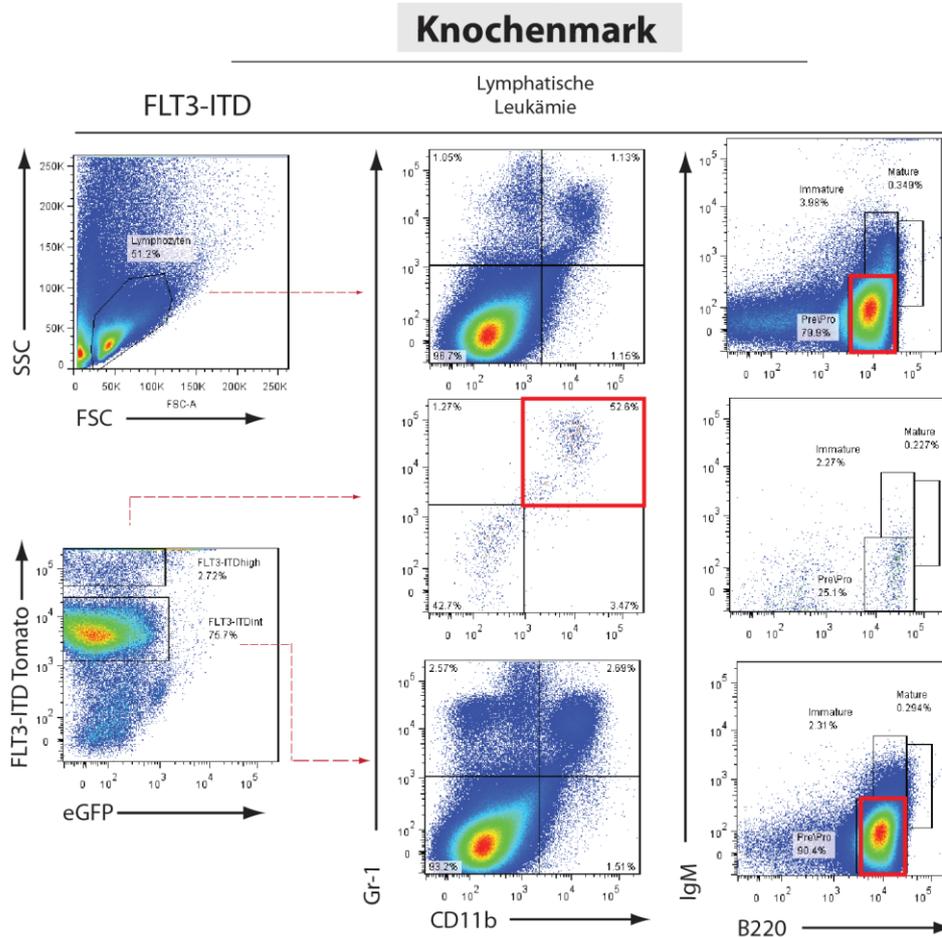


Abbildung 62: Immunphänotypische Analyse des Knochenmarks mit myeloischen (CD11b/Gr-1) sowie lymphatischen (IgM/B220) markierenden Antikörpern. Bei diesem Tier überwog die FLT3-IDT<sup>low</sup> Population. Dabei war wiederum der Großteil davon positiv für die lymphatischen B-Zellmarker. Dabei befanden sich die Zellen zu über 90% in Pro/Pre-B-Zell-Stadium (IgM/B220<sup>low</sup>). Während CD11b/Gr-1 Population kaum vorhanden war.

### Tier Nr. 3 - ALL

Der Anteil der CD11b/Gr-1 Zellen im Knochenmark lag bei 32,2% und somit im Normbereich. Der Anteil der B220-positiven B-Zellen war mit 53,4% erhöht. Der Anteil der FLT3-ITD<sup>high</sup> Population lag bei 16,6% und davon waren 95,3% CD11b/Gr-1 positive Zellen und nur 0,5% B220-positiv. Der Anteil der FLT3-ITD<sup>low</sup> lag bei 43,2% und davon waren nur 13,2% CD11b/Gr-1 positive Zellen, dafür aber 69,6% B-positiv. Davon befanden sich 40,6% im Pro/Pre-B-Zell Stadium.

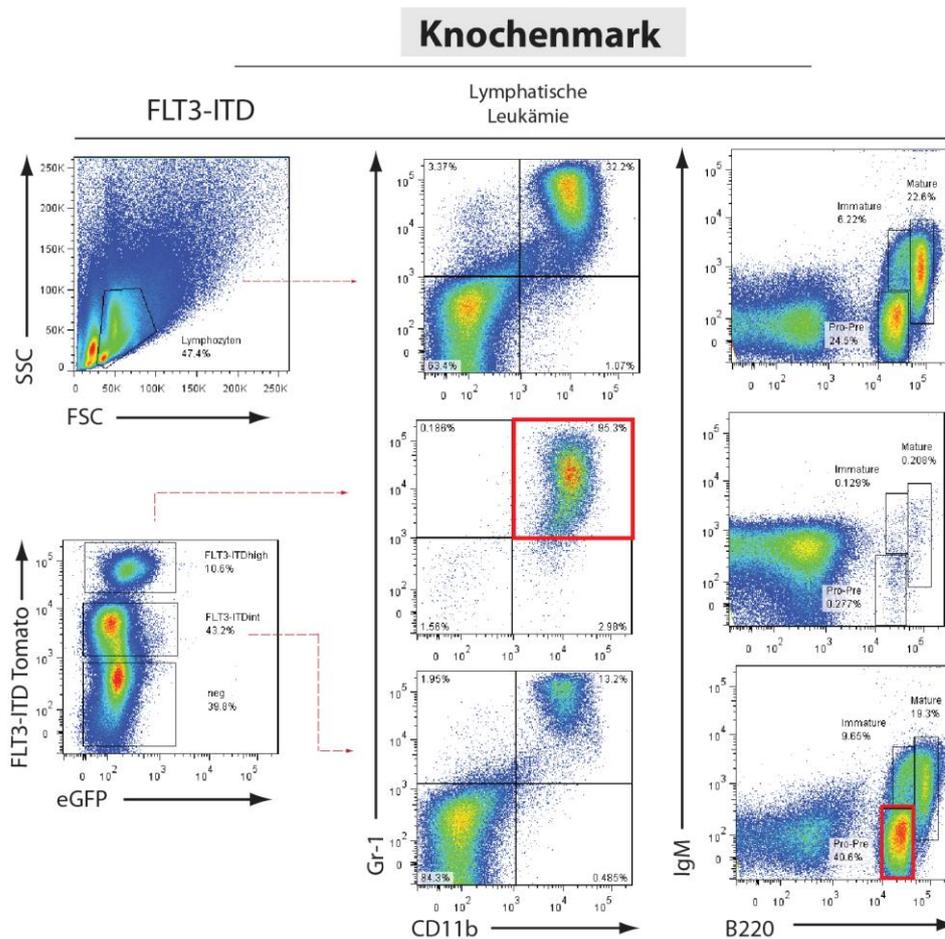


Abbildung 63: Immunphänotypische Analyse des Knochenmarks mit myeloischen (CD11b/Gr-1) sowie lymphatischen (IgM/B220) markierenden Antikörpern. Der Großteil der FLT3-ITD<sup>high</sup> positiven Zellen war positiv für die myeloischen Marker CD11b/Gr-1, während die B-Zell-Population kaum nachgewiesen werden konnte. Dagegen war der Großteil der FLT3-ITD<sup>low</sup> positiven Zellen positiv für B-Zell-Marker, wobei sich die meisten in der Pro/Pre-B-Zellstadium befanden (IgM/B220<sup>low</sup>).

Zusammenfassend zeigten diese Daten, dass die Überexpression von FLT3-ITD in einigen wenigen Fällen bereits alleine zu einer hämatologischen Erkrankung führen kann, die sowohl myeloischen als auch lymphatischen Ursprungs sein können.

### 3.3.7 Die induzierte Leukämie ist retransplantiertbar und sehr aggressiv

Mit Hilfe von Retransplantationsexperimenten kann ermittelt werden, ob Zellen die Fähigkeit zur Selbsterhalt und Proliferation besitzen, wie es für Tumorzellen beschrieben ist, im Unterschied zu myeloproliferativen Erkrankungen, die als nicht retransplantiertbar gelten. Um zu ermitteln, ob die transformierten Zellen, welche aus erkrankten Mäusen entnommen wurden in der Lage sind in sekundären Rezipienten wieder eine Leukämie auszulösen, wurden je  $3 \times 10^5$  dieser Zellen (aus der Milz) intravenös in sublethal bestrahlte Rezipienten gespritzt. Es war den Zellen in kurzer Zeit möglich wieder eine Leukämie in den sekundären Rezipienten auszulösen, was für eine aggressive Form der Krankheit spricht. In der Abbildung 64 ist ersichtlich, dass mit jeder Transferrunde, es immer schneller zum Ausbruch der Krankheit kam. Bei dem sekundären Transfer wiesen die sekundären, retransplantierten Rezipienten einen leukämischen Phänotyp auf bei B-ALL nach einer medianen Latenzzeit von 21 Tagen (39 Tage bei AML), beim tertiären Transfer von 12 Tagen (29 Tage bei AML) und bei dem quartären Transfer 8 Tage (9 Tage bei AML). Außerdem wurde auch der Zusammenhang zwischen der Bestrahlungsdosis und der Latenzzeit bestimmt. Ohne Bestrahlung betrug die Latenzzeit bei einem tertiären Transfer 20 Tage, bei subletalen Dosis 12 Tage und bei der letalen Dosis gerade mal 6,5 Tage.

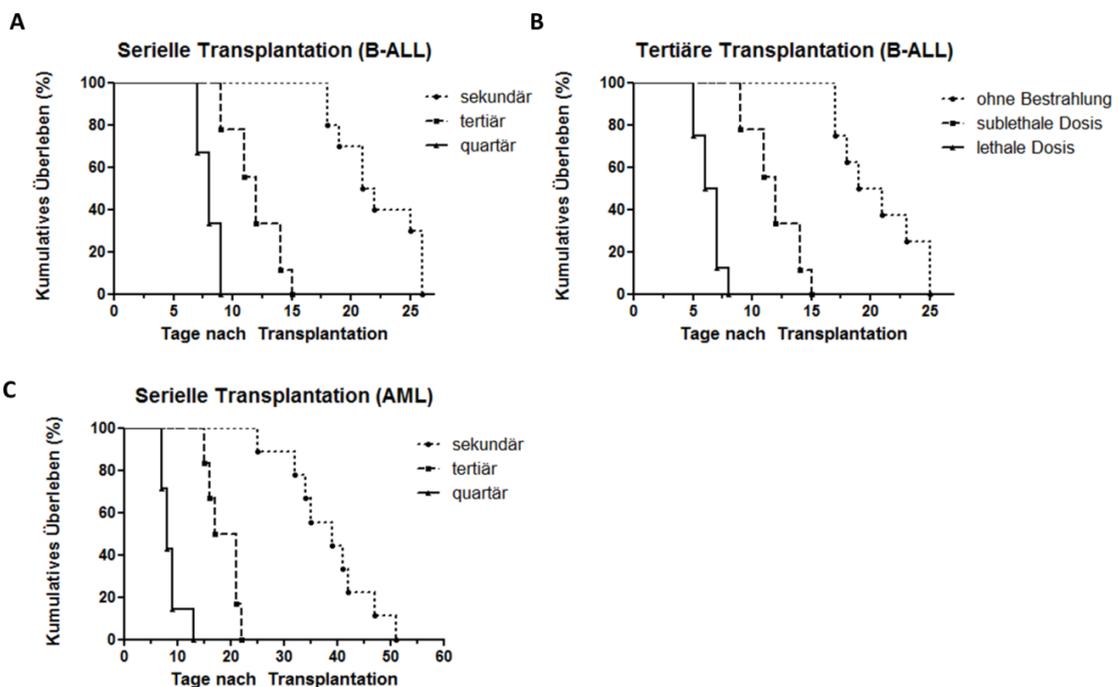


Abbildung 64: Retransplantationsexperimente mit den primären leukämischen Zellen zeigten, dass beide Krankheitsphänotypen (ALL und AML) retransplantiertbar sind, wobei die Aggressivität der Zellen mit jeder Transferrunde zunimmt. (A) Beim seriellen Transfer von Tumorzellen aus B-ALL erkrankten Tieren in sublethal bestrahlten Rezipienten verkürzte sich die Latenzzeit mit jeder Transferrunde erheblich. (B) Tumorzellen aus sekundären Rezipienten wurden in letal, sublethal und nicht bestrahlte Rezipienten

eingbracht. Die Tumorzellen sind sehr aggressiv und induzieren auch in nichtbestrahlten Tieren eine Leukämie. (C) Beim Transfer von Tumorzellen aus AML erkrankten Tieren in subletal bestrahlten Rezipienten verkürzte sich die Latenzzeit ebenso mit jeder Transferrunde.

Die Retransplantierbarkeit der Krankheit in den sekundären Rezipienten war einer der Hauptkriterien zum Nachweis der Leukämie, neben weiteren morphologischen, zytologischen und histopathologischen Parametern.

Tumorzellen aus den Tieren mit anfänglichen Biphänotyp induzierten in sekundären Rezipienten ebenfalls erneut eine Leukämie, wobei die Entwicklung in Richtung B-ALL ging. Nach einigen Transferrunden waren keine myeloide Zellen mehr vorhanden.

Ebenfalls der serielle Transfer von Milzzellen aus den FLT3-ITD erkrankten Tieren induzierte in Kürze eine erneute Leukämie in sekundären Rezipienten mit 100% Penetranz.

### **3.3.8 Abschalten von AML1-ETO bei bereits manifester Leukämie**

Eines der Ziele dieser Arbeit war zu erklären, inwieweit das Wachstum der leukämischen Zellen durch Abschalten der beteiligten Onkogene beeinflusst werden kann. Dafür wurden vier Gruppen mit jeweils 5 Tieren pro Gruppe eingesetzt. Alle Tiere wurden subletal bestrahlt und bekamen  $3 \times 10^5$  Milzzellen aus einer vorher an der Leukämie erkrankten Maus gespritzt. Die Tiere der Gruppe I bekamen sofort nach der Transplantation Wasser, statt DOX, um die Expression der AML1-ETO abzuschalten. Die Tiere der Gruppe II wurden zusätzlich mit Tyrosinkinase-Inhibitor Quizartinib (AC220) behandelt, um neben der Abschaltung der AML1-ETO Expression auch die FLT3-ITD Expression zu inhibieren. Die Tiere der Gruppe III blieben an DOX, wurden aber ebenfalls mit AC220 behandelt und die Tiere der Gruppe IV erhielten DOX und blieben unbehandelt als Kontrolle für Leukämie Induktion. Der Experiment wurde jeweils zwei Mal mit Tumorzellen aus sekundären an B-ALL bzw. AML erkrankten Rezipienten wiederholt. AC220 wurde in 22% hydroxypropyl-cyclodextrin gelöst und in einer Dosis 5mg/kg oral den Mäusen einmal täglich zu gleichen Tageszeit verabreicht. Die Kontrolltiere bekamen stattdessen PBS.

Anhand der FACS-Analyse ist zu sehen, dass die Abschaltung von AML1-ETO sehr effizient durch Entzug von DOX geschieht, dagegen die Expression von FLT3-ITD nur zum geringen Teil inhibiert wird.

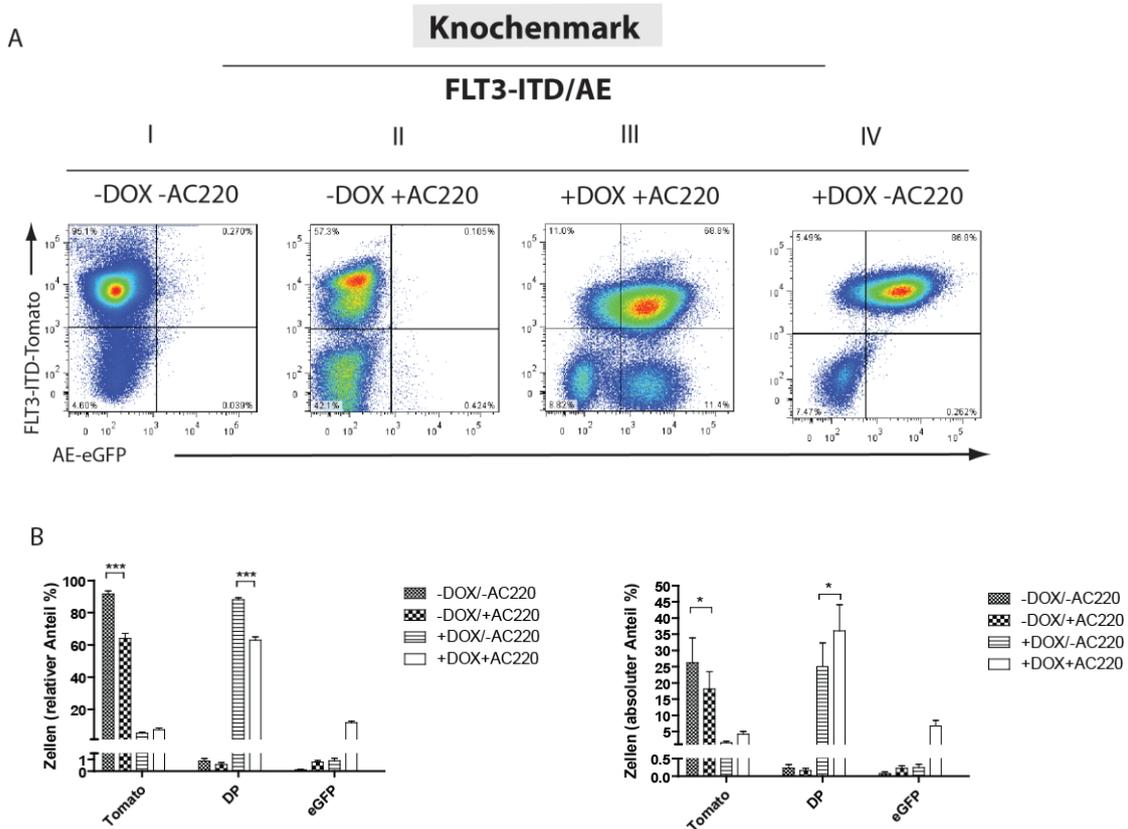


Abbildung 65: Repräsentative FACS-Analyse zeigt das Abschalten/die Herunterregulierung von AE bzw. FLT3-ITD. (A) Rezipienten wurden mit den sekundären leukämischen Blasten retransplantiert. Sofort danach wurde die Gruppe I auf Wasser umgesetzt, um die Expression von AE abzuschalten. Gruppe II bekam zusätzlich AC220 5mg/kg oral, um FLT3-ITD Expression runter zu regulieren. Gruppe III wurde nur mit AC220 behandelt. Gruppe IV blieb unbehandelt und diente als Kontrolle für die Leukämie Induktion. Anhand von eGFP Expression stellt man fest, dass die Expression von AML1-ETO effizient abgeschaltet wurde. Dagegen scheint die Behandlung mit AC220 nur bedingt die FLT3-ITD Expression zu inhibieren. (B) Relativer und absoluter Anteil der FLT3-ITD (Tomato), FLT3-ITD/AE (DP) und AE (eGFP) Population.

Wie aus der Tabelle 22 zu entnehmen ist zeigte die Analyse unter der Therapie und Abschaltung von AML1-ETO ein mediane Überleben von 17 Tagen (B-ALL) und 18 Tage (AML) gegenüber 14,5 und 15 Tage ohne Behandlung und Abschaltung von AML1-ETO. Es zeigte sich somit, dass nach einer kompletten malignen Transformation, d.h. nach Einleitung der akuten Phase die induzierte Leukämie unabhängig von Inhibition der FLT3-ITD sowie exogen induzierten Abschalten der AML1-ETO fortschreitet.

Tabelle 22: Gruppeneinteilung

<b>Gruppe</b>	<b>DOX</b>	<b>AC220</b>	<b>Bemerkung</b>
I	-	-	AML1-ETO Abschaltung
II	-	+	AML1-ETO Abschaltung und FLT3-ITD Inhibition
III	+	+	FLT3-ITD Inhibition
IV	+	-	Kontrolle für Leukämie-induktion

Mögliche Gründe für die Ursache des Fortschreitens der Leukämie wie Beeinflussung der viralen Transduktion, Integrationsstellen, Expressionslevel der Onkogene im Mausmodell, Mausstamm sowie Mutationen in FLT3-ITD die zu Resistenzen gegenüber dem Inhibitor oder möglicherweise Destabilisierung der inaktiven Form der Tyrosinkinase führen können, wodurch eine insuffiziente Bindung von AC220 induziert wird, werden ausführlich im nächsten Kapitel diskutiert.

## 4 Diskussion

Das höchste Ziel der Leukämieforschung ist es, bessere therapeutische Strategien für Krebspatienten zu entwickeln. In der Onkologie ist das innovative Konzept der „zielgerichteten Therapien“ (oder personalisierte Medizin) für die Diagnostik, Behandlung und Prävention am weitesten fortgeschritten. Der entscheidende Aspekt dabei ist die Erforschung der Komplexität von Krebserkrankungen, wie die Identifizierung genetischer Veränderungen und umfassende eine Aufklärung molekularen Ursachen.

Durch diesen neuen Ansatz könnten Patienten mit genetisch unterschiedlichen Tumoren nicht mit einem allgemein wirksamen Medikament behandelt werden, sondern einem gezielt, durch molekulare Diagnosemethoden ermittelten Wirkstoff, der nur bei dieser speziellen Subgruppe von Patienten eine hochselektive Wirkung zeigt. Somit sollte die Effektivität der Behandlung erhöht und gleichzeitig die Nebenwirkungen wirkungsloser Therapien vermieden werden. In Zukunft soll das verbesserte genetische Verständnis auch dazu führen, dass Tumore nicht nach dem Ort ihrer Ausprägung, sondern nach dem ihnen zugrunde liegenden gestörten Signalweg kategorisiert und behandelt werden.

Leukämien, insbesondere die AML, sind klinisch und biologisch sehr heterogene Erkrankungen, bei denen sich die krankheitsauslösenden genetischen Veränderungen, die zur neoplastischen Transformation führen, stark variieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Mausmodell entwickelt, welches die Untersuchung des Zusammenwirkens von AML1-ETO in Kombination mit sekundären Läsionen ermöglichte. Dabei wurde untersucht wie effektiv beide Ereignisse zur Induktion und Manifestierung von Leukämie beitragen können und ob diese Genprodukte für die Erhaltung der AML essentiell sind, d.h. ob durch das Abschalten bzw. Inhibition dieser Gene eine vollständige oder zeitweilige Remission erreicht werden kann. Nachfolgend werde das etablierte Tiermodell sowie die festgestellte Erkrankungen erläutert und die Bedeutung der Ergebnisse in Bezug auf vorherige Studien und weiterführende Studien zur Leukämieentstehung diskutiert.

### 4.1 Tiermodelle zur Rekapitulation humaner Leukämie

Genetisch veränderte Mausmodelle eignen sich hervorragend humane Krebserkrankungen, insbesondere Leukämien, in vivo abzubilden und so die zu Grunde liegende Ursachen und die Entstehung experimentell zu erforschen. Zunächst werden daher einige Aspekte dieses Mausmodells näher betrachtet.

Prinzipiell kann man zwischen zwei grundsätzlichen Regulationssystemen unterscheiden, das Tet- und Cre/loxP-System [185]. Beide Systeme sind induzierbar einsetzbar, allerdings funktioniert die Regulation bei Rekombinase-vermittelten Genveränderung

nach dem „Alles oder Nichts“-Prinzip. Auch wenn die Genexpression dabei Zelltyp- oder Gewebe-spezifisch und/oder zeitlich steuerbar ist, wird das entsprechende Target-Gen entweder einmal aktiviert oder ausgeschaltet, d.h. die Regulation ist irreversibel. Im Gegensatz dazu verfügt das Tet-System aufgrund seiner großen Variationsbreite mit beteiligten Transaktivatoren, Transrepressoren und induzierbaren Promotoren über eine präzise und reversible Regulierbarkeit. Daher ist es ein am häufigsten angewandtes induzierbares Genregulationssystem [186, 187] und wird auch in der vorliegenden Arbeit verwendet.

Zur Untersuchung der Mechanismen akuter Leukämie wurde ein konditional induzierbares tet on/off Mausmodell verwendet, welche die gezielte exogen regulierbare Expression von AML1-ETO erlaubt. Der einzigartige Vorteil dieses Modells besteht darin, dass aufgrund der regulierbaren Reversibilität der Genexpression die Onkogenexpression zu jeden Zeitpunkt des Phänotyps bzw. der Pathologie wieder abgeschaltet werden kann.

In der Vergangenheit wurde bereits eine Vielzahl AML1-ETO-spezifischer Mausmodelle generiert und analysiert. Diese Modelle zeigten, dass ab initio AML1-ETO Expression, ähnlich wie AML1 knock-out, embryonal letal ist [163, 164] und zu einer Beeinflussung der Ausreifung verschiedener Zellreihen der Hämatopoese führt. Ebenso zeigen AML1-ETO (+/-) knock-in Mäuse einen letalen Phänotyp. Deshalb wurde ein dominant-negativer Effekt von AML1-ETO auf die physiologische AML1-Funktion postuliert. Neben dem Differenzierungsblock ist, nach dem „two hit“-Modell in der Leukämie, zumindest noch eine weitere Genmutation nötig, die einen proliferativen Vorteil bewirkt [166, 188]. In einem konditionalem AML1-ETO Modell entwickelten die Tiere durch Behandlung mit ENU eine AML oder ein T-Zell Lymphom [146]. Darüber hinaus wurde beschrieben, dass alleinige Induktion von AML1-ETO die Entwicklung eines myeloproliferativen Phänotyps hervorruft, welcher als ein präleukämischer Zustand aufgefasst wird und durch das Auftreten weiterer Mutationen eine Leukämie induzieren kann [123, 145, 146, 166, 167, 189-195].

Kürzlich haben wir gezeigt [173], dass auch alleinige Expression von AML1-ETO nach 15 bis 17 Monaten Expression eine myeloproliferative Erkrankung, eine MPD-ähnliche myeloide Leukämie, auslösen kann. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass AML1-ETO DNA-Reparatur-Gene, wie OGG1 und POLE1, reprimiert. Somit wird die Reparatur genetischer Fehler blockiert, wodurch die Akkumulation sekundärer Mutationen und eine neoplastische Transformation der Zelle begünstigt werden kann. Somit ist es denkbar, dass auf diese Weise AML1-ETO den zweiten „hit“ im Laufe der Zeit alleine sporadisch induzieren kann.

Um den Einfluss potentieller Onkogene auf die Hämatopoese in hämatologischen Erkrankungen zu untersuchen sind Knochenmarktransplantationsmodelle unerlässlich. Sie

erlauben, die Expression des Zielgens auf die blutbildenden Zellen zu beschränken und bieten zusätzlich die Möglichkeit weiterer Modifikationen, wie zum Beispiel einen retroviraler Gentransfer, vorzunehmen. Seit langem konnte gezeigt werden, dass die kongene Transplantation von Knochenmark in eine letal bestrahlte Maus das hämatopoetische System der Empfängermaus ersetzen kann, und zwar mit vollständig funktionsfähigen Zellen aller Blutzelllinien [196-198]. Transfer von Knochenmark aus ROSA26-iM2/tetO-AML1-ETO Mäusen (Ly5.1) in bestrahlte C57BL/6 Mäuse (Ly5.2) zeigte 4-6 Wochen nach Transplantation eine erfolgreiche Rekonstitution. Rekonstitutionseffizienz wurde mit Hilfe der differentiell exprimierten Oberflächenmarker der Leukozyten Ly5.1 vs. Ly5.2 bestimmt.

## 4.2 Genetische Heterogenität der AML

Die balancierte Translokation t(8;21) (q22;q22) findet sich in etwa 12 % aller primären akuten myeloischen Leukämien bzw. bei etwa 40% von Krebspatienten mit AML-M2. Die Proteine CBF $\beta$  und AML1 bilden den DNA-bindenden CBF-Transkriptionsfaktor, der essentiell für die normale Hämatopoese ist. Das AML1-ETO-Protein ist zusammengesetzt aus dem N-terminalen Teil des AML1-Proteins und fast dem gesamten ETO-Protein. Durch die Interaktion von ETO-Anteil mit weiteren nukleären Korepressoren und durch die Fähigkeit der DNA-Bindung wirkt AML1-ETO weitestgehend als transkriptioneller Repressor. Durch die Fusionsproteine kommt es zu einer Hemmung der CBF-Zielgene, was einen Differenzierungsblock und eine Störung der Hämatopoese zur Folge hat. Daten aus klinischen Studien offenbaren, dass trotz der klaren Assoziation zwischen AML und der t(8;21) Läsion, bei AML Patienten häufig eine Reihe zusätzlicher aktivierenden Mutationen auftreten die einen wichtigen Parameter in der molekularen Diagnostik und Prognose spielen.

## 4.3 Kooperation von AML1-ETO und kRAS Expression in der Induktion von Leukämie

Ras Proto-Onkogene kodieren für kleine transformierende GTPasen, spielen eine entscheidende regulative Bedeutung innerhalb zahlreichen wichtigen Signalkaskaden und werden normalerweise von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen aktiviert. Die Mutationen in einem der drei RAS Gene betreffen meistens Kodon 12 und 13 (und wesentlich seltener Kodon 61) und führen durch Konformationsänderung zu einer permanenten Aktivierung des RAS-Proteins und schließlich zu unkontrolliertem Zellwachstum führen kann. Somit gehören nach der „Two-Hit“-Hypothese Veränderungen in RAS-Genen zu Typ-I-

Mutationen, die Proliferation der Zellen steigern. Sie gehören mit ca. 25% zu den häufigsten genetischen Alterationen bei malignen hämatologischen Erkrankungen, sowie in soliden Tumoren [90]. Immer mehr publizierter Ergebnisse von Mutationsanalysen deuten darauf hin, dass RAS in Kombination mit anderen molekularen Aberrationen bei Patienten mit AML zu Leukämieentstehung beitragen.

Zu den myeloischen Neoplasien gehört ebenfalls die juvenile myelomonozytäre (JMML). Bei dieser myeloproliferativen Erkrankung (MPD) der frühen Kindheit werden Mutationen in NRAS oder KRAS (~25%) oder in anderen Genen des Ras-Signalweges identifiziert [199, 200]. Die ubiquitäre Expression von endogenem kRAS<sup>G12D</sup> in transgenen Mäusen ist embryonal letal [201]. Die somatische Aktivierung von kRas in hämatopoetischen Zellen führte dagegen zu einer aggressiven letalen MPD, welche der JMML ähnelt [202]. Die prognostische Bedeutung sowie eine eindeutige Assoziation von Mutationen der Ras-Gene zu bestimmten Subtypen der AML ist bis jetzt nicht eindeutig geklärt. Es ist auch unklar, ob bei sekundären Leukämien die Ras-Mutationen in Folge der vorausgegangenen Chemotherapie bzw. Strahlungsbelastung entstanden sind. Ein Indiz dafür wäre die Beobachtung, dass nicht alle leukämischen Blasten die RAS Mutation tragen [101].

Basierend auf diesen Kenntnissen wurden in dem ersten Ansatz Tiere generiert die gemeinsam AML1-ETO und kRAS<sup>G12D</sup> exprimieren, um zu klären inwieweit die gemeinsame Expression bei der Induktion der Leukämie eine Rolle spielt.

Um die gemeinsame Expression von AML1-ETO und kRAS<sup>G12D</sup> untersuchen zu können wurden dreifach transgene Mäuse ROSA26-iM2/tetO-AML1-ETO/tetO-kRAS<sup>G12D</sup> generiert. Das Expressionsmodul der ROSA26-iM2 Effektor knock-in Maus [172] beinhaltet sowohl den reversen Tetrazyclin-abhängigen Transaktivator (iM2) der konstitutiv unter der Kontrolle des endogenen ROSA26-Promotors steht, als auch das Reporter-gen eGFP (grün fluoreszierendes Protein), das unter der Kontrolle eines induzierbaren Tetrazyclin-Operators (tetO) und des Zytomegalovirus-Minimalpromotors (CMV<sub>m</sub>) exprimiert wird. Der Vorteil des Einfügens von rtTA Effektor- und tetO-EGFP Responselementen in den gleichen Genloкус besteht darin, dass der Aktivierungsstatus des tet on/off Systems in jeder Zelle mittels eGFP Expression direkt bestimmt werden kann.

Somit war es möglich, in dem konditional reversiblen, dreifach transgenen Mausmodell die Expression der Gene AML1-ETO und kRAS<sup>G12D</sup> gemeinsam anzuschalten, um die Auswirkungen in vivo zu studieren. Um die konditionale Expression der beiden Onkogene ausschließlich auf das blutbildende hämatopoetische System zu begrenzen, wurden Knochenmarkschimären hergestellt. Dazu wurden nicht-induzierte Knochenmarkszellen aus dreifach transgenen ROSA26-iM2/tetO-AML1-ETO/tetO-kRAS<sup>G12D</sup> Mäusen in bestrahlte C57BL/6 Mäuse transferiert. Sofort nach dem adoptiven Transfer wurde

die AML1-ETO und kRAS<sup>G12D</sup> Expression konditional durch Zugabe von 1mgDOX/ml Trinkwasser aktiviert. Mit Hilfe der differentiell exprimierten Oberflächenmarker (Ly5.1 bzw. Ly5.2) zusätzlich zu der eGFP Expression war es möglich, transgene Donorzellen von Empfängerzellen im FACS zu unterscheiden. Allerdings war es nicht möglich die AML1-ETO und kRAS<sup>G12D</sup> exprimierenden Zellen zu unterscheiden.

In dem hier vorgestellten Modell führte die gemeinsame Expression von AML1-ETO und kRAS<sup>G12D</sup> im Beobachtungsraum von 12 Monaten nicht, wie erwartet, zur Induktion einer Leukämie. Es wurde aber eine zum Teil ineffektive Hämatopoese mit Anzeichen einer Anämie und Thrombozytopenie sowie ein vermehrte Auftreten von neutrophilen Granulozyten im Knochenmark und Blut der Tiere, die AML1-ETO bzw. AML1-ETO/kRAS<sup>G12D</sup> exprimierten, festgestellt. Da eine Ausreifungsstörung verschiedener Blutzellreihen im Knochenmark, welche möglicherweise auf einen genetischen Defekt der Vorläuferzellen zurückzuführen ist, zu beobachten war, kann man diesen Phänotyp als myelodysplastische Syndrome (MDS) bezeichnen. Diese Erkrankungen können zu einem hohen Prozentsatz in eine AML übergehen, wenn es zusätzlich zu der Fehlsteuerung der Differenzierung auch zu einer erhöhten Vermehrung unreifer Vorläuferzellen kommt und damit zur Verdrängung der übrigen Hämatopoese führt.

#### 4.4 FLT3-Mutationen in der AML und ALL

Das FLT3-Gen auf Chromosom 13q12 kodiert für eine Rezeptortyrosinkinase, die vor allem in frühen hämatopoetischen Zellen exprimiert wird. Mutationen dieses Gens konnten bisher fast ausschließlich bei Patienten mit AML [111, 119, 203] und MDS [204] identifiziert werden. Selten finden sich FLT3-Mutationen auch bei Patienten mit ALL (etwa bei 5%) [125, 205] und chronischen myeloproliferativen Erkrankungen [206]. Interessanterweise findet man eine hohe physiologische FLT3-Expression in leukämischen Blasten.

Eine Untergruppe der akuten myeloische Leukämie, in der sowohl FLT3- als auch CBF-Mutationen häufig auftreten ist die „core-binding factor“- (CBF)-AML. Sie ist gekennzeichnet durch die Chromosomentranslokationen t(8;21) und inv(16)/t(16;16) und die daraus resultierenden Fusionsgene CBFB/MYH11 und RUNX1/RUNX1T1 [8, 301-305]. FLT3-ITD-Mutationen bei AML-Patienten sind mit schlechter Prognose und erhöhten Rückfallquoten verbunden [113, 117, 207]. Es wurden bereits mehrere selektive FLT3-Tyrosinkinaseinhibitoren entwickelt und in präklinischen Studien untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass diese Inhibition der Autophosphorylierung von FLT3 die FLT3-ITD-vermittelte Proliferation sowohl in Zelllinien als auch in primären AML-Blasten unterbinden kann und in diesen Zellen Apoptose auslöst. Dennoch entwickeln die meisten Patienten Rezidive, die am ehesten durch neue Resistenzmutationen ausge-

löst werden und die auch für andere, bei der AML angewendete Tyrosinkinaseinhibitoren bereits beschrieben worden sind.

Eine Monotherapie der „core-binding factor“- (CBF)-Leukämien mit TK-Inhibitoren bringt in der Klinik nur einen mäßigen therapeutischen Nutzen. Deswegen war eines der Ziele dieser Arbeit beide Onkogene im Mausmodell nach erfolgreicher Leukämie-Induktion auszuschalten.

Um AML1-ETO und FLT3-ITD gemeinsam in hämatopoetischen Zellen zu exprimieren, wurden Knochenmarkzellen aus nicht induzierten bi-transgenen ROSA26-iM2/tetO-AML1-ETO C57BL/6 Mäusen isoliert und retroviral mit hFLT3-ITD cDNA transduziert. Sofort nach dem adoptiven Transfer wurde AML1-ETO Expression konditional durch Zugabe von 1mgDOX/ml Trinkwasser aktiviert. Durch gemeinsame Expression war es möglich, nach kurzer Zeit und mit 100% Penetranz eine akute Leukämie in Mäusen auszulösen. Es entstanden in diesem Modell sowohl myeloische, als auch lymphatische Leukämien vom B-Zelltyp, die kindlichen B-Zell ALL ähneln. Bei einem kleinen Anteil der Tiere wurde zum Zeitpunkt des Todes ein Biphänotyp festgestellt. Dabei konnte man zwei verschiedenen Zellpopulationen erkennen: zum einem FLT3-ITD/AML1-ETO doppelt positiven Zellen, die zum größten Teil B-Zellen (CD19/B220) waren und zum anderen FLT3-ITD einzeln positiven Zellen, die zum größten Teil reife Granulozyten (CD11b/Gr-1) waren.

Ein wichtiger und eindeutiger Nachweis dafür, dass es sich bei dem festgestellten Phänotyp in der Tat um eine Leukämie handelte, war neben den histologischen und klinischen Befunden, die Tatsache, dass die Erkrankung transplantierbar war. Milz- und Knochenmarkzellen aus erkrankten Tieren konnten in sekundären Rezipienten erneut Leukämie auslösen. Transplantationsexperimente mit biphänotypischen Tieren zeigten, dass sich in sekundären Rezipienten die Entwicklung der Leukämie in Richtung B-Zell ALL verschoben hatte.

Während die anderen Arbeitsgruppen mit ihren FLT3-ITD Konstrukten in den Mäusen vor allem myeloproliferative Erkrankungen oder Lymphome [208-210] erhalten haben, gelang es in unserem Mausmodell sowohl eine AML als auch ALL auszulösen.

Die unterschiedlichen Phänotypen in unserem und den publizierten Mausmodellen können durch eine Vielzahl an Veränderungen in der methodischen Vorgehensweise entstanden sein: die Länge der internen Tandemduplikation [123], der verwendete Mausstamm, die Integrationsstellen, die Infektionsrate und die Expressionsstärke des Transgens. Die Lokalisation bzw. die Länge der internen Tandemduplikation variiert von Patient zu Patient, der Leseraster wird dabei nicht verschoben. Inzwischen konnte eine Korrelation zwischen der Länge und dem Behandlungserfolg bzw. Überleben gezeigt werden [211]. Die zusätzlich inserierte Tandemmutation, die in dem hier

verwendeten Mausmodell genutzt wurde, entsprach einer Insertion von 12 Aminosäuren NEYFYVDFREYE.

Die Auswahl des eingesetzten Mausstammes kann ebenfalls eine Rolle auf den Phänotyp der Krankheit spielen. Im Gegensatz zu unserem C57BL/6 Modell induzierte FLT3 Aktivität in BALB/c Tieren ausschließlich eine myeloproliferative Erkrankung [75, 209]. Dabei können eventuell stammeigene genetische Faktoren die Ausprägung von Krankheiten mit beeinflussen.

Die Verwendung viraler Vektorsysteme ermöglicht Transgene effizient und stabil in ein Wirtsgenom einzubringen. Dennoch kann die Integration des Vektors in das Zielgenom eine Insertionsmutagenese per se auslösen. Ebenso kann die Infektionsrate die Expressionsstärke der Transgene beeinflussen. Dabei ist die Rate der sich teilenden Zellen, ein wichtiger Parameter, der die Transduktionseffizienz beeinflussen kann. Ebenso könnte eine höhere Anzahl an Integrationen der Proviren pro Zelle die Genexpression beeinflussen.

Eine weitere Möglichkeit für das Auftreten von verschiedenen leukämischen Phänotypen wäre, dass das transformierende Ereignis in bereits differenzierten Zellen stattfindet, die sich jeweils schon in eine Linie entwickelt haben.

Bisher wurde in Mausmodellen anderer Arbeitsgruppen gezeigt, dass FLT3-ITD allein nicht in der Lage ist, eine Leukämie auszulösen. Im Gegensatz dazu entwickelten in unserem Mausmodell in einigen wenigen Fällen die FLT3-ITD transplantierte Tiere eine Leukämie. Auch hier war der verursachte Phänotyp in einem Tier eine akute myeloische und in weiteren zwei Tieren eine akute lymphatische Leukämie. Dabei zeigte sich zusätzlich die interessante Besonderheit, dass es zwei verschiedene FLT3-ITD exprimierende Populationen, FLT3-ITD<sup>high</sup> und FLT3-ITD<sup>low</sup>, gab. Bei der FLT3-ITD<sup>high</sup> Population handelte es sich zum überwiegenden Teil um Granulozyten (Gr-1/CD11b doppelt positive Zellen). Bei der FLT3-ITD<sup>low</sup> Population handelte es sich dagegen zum größten Teil um B-Zellen, wobei diese sich in einem unreifen Pro/Pre-B-Zellstadium befanden.

Die Tatsache, dass auch FLT3-ITD alleine in der Lage war, einen leukämischen Phänotyp zu verursachen, könnte ebenfalls auf die methodische Vorgehensweise zurück zu führen sein. Um diese Annahme jedoch zu bestätigen, müsste man die retroviralen Integrationsstellen genau analysieren.

## 4.5 Blockierung der Onkogene beeinflusst nicht die Leukämieprogression

Trotz großer Fortschritte in der Krebsmedizin sind tumorale Erkrankungen des blutbildenden Systems bislang weitestgehend unheilbar. Obwohl die Therapiemöglichkeiten der akuten Leukämien in den letzten Jahren wesentlich verbessert werden konnten, kommt es häufig nach einer zunächst vollständigen Rückbildung der Leukämie (komplette Remission) zu einem Rückfall (Rezidiv). Bei t(8;21)-assoziierten Leukämien können auch bei Patienten in Remission AML1-ETO-Transkripte im Knochenmark nachgewiesen werden. Diese residuale AML1-ETO Expression wird mit einem höheren Risiko für ein Rezidiv in Zusammenhang gebracht.

Daher war eines der Ziele des Vorhabens zu untersuchen, welche Funktion die kontinuierliche Expression der Onkogene nach bereits erfolgter Leukämieinduktion für die Progression der Erkrankung hat. Eine Abschaltung der AML1-ETO Genexpression wurde durch Absetzen von Doxyzyklin erreicht. Die Inhibition von FLT3-ITD wurde durch Behandlung der Tiere mit Tyrosinkinase-Inhibitor (TKI) Quizartinib (AC220) erreicht.

In unserem Mausmodell vermittelte die Inhibition bei bereits manifester Leukämie kein längeres Überleben der Versuchstiere. Dabei sieht man mit Hilfe durchflußzytometrischer Analysen, dass AML1-ETO-Deaktivierung durch Wegnahme von Doxyzyklin sehr effizient geschieht. Dagegen wurde die Expression von FLT3-ITD mit TKI nur in geringem Maße inhibiert.

Die möglichen Gründe für das Fortschreiten der Leukämie könnten sein, dass nach der einmal erfolgten malignen Transformation zur Krebszelle das Wachstum der Zelle unumkehrbar und unabhängig von der Onkogenexpression verläuft, so dass auch eine gezielte Abschaltung dieser Gene nicht zum Absterben der Krebszellen führt. Die maligne Transformation könnte auch bereits mit weiteren Veränderungen der nachgeschalteten Signalproteine einhergehen.

Somit lässt sich festhalten, dass nach induziertem Phänotyp während der akuten Phase der Leukämie das Abschalten bzw. Herunterregulieren der verantwortlichen Gene die Progression der Leukämien nicht aufhalten kann.

Als nächstes wäre zu erforschen, ob eine Abschaltung der Onkogenexpression während der Chemotherapie diese möglicherweise verbessern kann. Im Falle von t(8;21)-Leukämie wäre zu klären, ob eine Eliminierung AML1-ETO exprimierender Klone in diesem Tiermodell den Therapieerfolg während der Remission verbessert.

## 5 Ausblick

Durch die hier vorgestellte Strategie war es möglich, ein adäquates Mausmodell zu etablieren, welches die im Patienten gefundenen molekularen und morphologischen Prozesse während der Leukämieentstehung in der Maus rekapituliert. Es erlaubt, eine detaillierte Analyse fundamentaler Mechanismen zu erforschen, welche Initiation und Progression von Leukämien determinieren. Der Einsatz von FLT3-Tyrosinkinase-Inhibitoren stellt eine neue, zielgerichtete, molekulare Therapieform dar. Trotz erster vielversprechender Ergebnisse müssen aufgrund auftretender Resistenzmutationen weitere Optimierungen vorgenommen werden. Darüber hinaus ist auch nicht bekannt, ob bei t(8;21)-Leukämien das Abschalten/die Herunterregulierung von AML1-ETO während der Chemotherapie diese möglicherweise verbessern kann.

Das hier etablierte Modell eignet sich sehr gut für die Entwicklung und Erprobung dieser neuen Therapiestrategien und ist somit von großer Bedeutung für die biomedizinische Forschung.

## Literaturverzeichnis

1. Medvinsky, A.L. and E.A. Dzierzak, *Development of the definitive hematopoietic hierarchy in the mouse*. Dev Comp Immunol, 1998. **22**(3): p. 289-301.
2. Larsson, J. and S. Karlsson, *The role of Smad signaling in hematopoiesis*. Oncogene, 2005. **24**(37): p. 5676-92.
3. Zhang, J., et al., *Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size*. Nature, 2003. **425**(6960): p. 836-41.
4. Nakamura, Y., et al., *Isolation and characterization of endosteal niche cell populations that regulate hematopoietic stem cells*. Blood, 2010. **116**(9): p. 1422-32.
5. Levesque, J.P., F.M. Helwani, and I.G. Winkler, *The endosteal 'osteoblastic' niche and its role in hematopoietic stem cell homing and mobilization*. Leukemia, 2010. **24**(12): p. 1979-92.
6. Kopp, H.G., et al., *The bone marrow vascular niche: home of HSC differentiation and mobilization*. Physiology (Bethesda), 2005. **20**: p. 349-56.
7. Doan, P.L. and J.P. Chute, *The vascular niche: home for normal and malignant hematopoietic stem cells*. Leukemia, 2012. **26**(1): p. 54-62.
8. Wilson, A., et al., *Dormant and self-renewing hematopoietic stem cells and their niches*. Ann N Y Acad Sci, 2007. **1106**: p. 64-75.
9. Sawyers, C.L., C.T. Denny, and O.N. Witte, *Leukemia and the disruption of normal hematopoiesis*. Cell, 1991. **64**(2): p. 337-50.
10. Sachs, L., *The control of hematopoiesis and leukemia: from basic biology to the clinic*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(10): p. 4742-9.
11. Raskind, W.H., L. Steinmann, and V. Najfeld, *Clonal development of myeloproliferative disorders: clues to hematopoietic differentiation and multistep pathogenesis of cancer*. Leukemia, 1998. **12**(2): p. 108-16.
12. Weinberg, O.K., et al., *Clinical characterization of acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes as defined by the 2008 WHO classification system*. Blood, 2009. **113**(9): p. 1906-8.
13. Dugas, M., et al., *German multicenter study group for adult ALL (GMALL): recruitment in comparison to ALL incidence and its impact on study results*. Ann Hematol, 2003. **82**(2): p. 83-7.
14. Spix, C., et al., *Temporal trends in the incidence rate of childhood cancer in Germany 1987-2004*. Int J Cancer, 2008. **122**(8): p. 1859-67.
15. Bennett, J.M., et al., *Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group*. Br J Haematol, 1976. **33**(4): p. 451-8.
16. Tenen, D.G., *Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(2): p. 89-101.
17. Rosenbauer, F. and D.G. Tenen, *Transcription factors in myeloid development: balancing differentiation with transformation*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(2): p. 105-17.

18. Vardiman, J.W., et al., *The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes*. *Blood*, 2009. **114**(5): p. 937-51.
19. Mrozek, K., K. Heinonen, and C.D. Bloomfield, *Clinical importance of cytogenetics in acute myeloid leukaemia*. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2001. **14**(1): p. 19-47.
20. Byrd, J.C., et al., *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*, 2002. **100**(13): p. 4325-36.
21. Rege, K., et al., *Disease features in acute myeloid leukemia with  $t(8;21)(q22;q22)$ . Influence of age, secondary karyotype abnormalities, CD19 status, and extramedullary leukemia on survival*. *Leuk Lymphoma*, 2000. **40**(1-2): p. 67-77.
22. Rowe, D., et al., *Cytogenetically cryptic AML1-ETO and CBF beta-MYH11 gene rearrangements: incidence in 412 cases of acute myeloid leukaemia*. *Br J Haematol*, 2000. **111**(4): p. 1051-6.
23. Nucifora, G. and J.D. Rowley, *AML1 and the 8;21 and 3;21 translocations in acute and chronic myeloid leukemia*. *Blood*, 1995. **86**(1): p. 1-14.
24. Langabeer, S.E., et al., *Incidence of AML1/ETO fusion transcripts in patients entered into the MRC AML trials*. *MRC Adult Leukaemia Working Party*. *Br J Haematol*, 1997. **99**(4): p. 925-8.
25. Miyamoto, T., et al., *Persistence of multipotent progenitors expressing AML1/ETO transcripts in long-term remission patients with  $t(8;21)$  acute myelogenous leukemia*. *Blood*, 1996. **87**(11): p. 4789-96.
26. Nucifora, G., R.A. Larson, and J.D. Rowley, *Persistence of the 8;21 translocation in patients with acute myeloid leukemia type M2 in long-term remission*. *Blood*, 1993. **82**(3): p. 712-5.
27. Miyamoto, T., I.L. Weissman, and K. Akashi, *AML1/ETO-expressing nonleukemic stem cells in acute myelogenous leukemia with 8;21 chromosomal translocation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(13): p. 7521-6.
28. Wiemels, J.L., et al., *In utero origin of  $t(8;21)$  AML1-ETO translocations in childhood acute myeloid leukemia*. *Blood*, 2002. **99**(10): p. 3801-5.
29. Ford, A.M., et al., *In utero rearrangements in the trithorax-related oncogene in infant leukaemias*. *Nature*, 1993. **363**(6427): p. 358-60.
30. Wiemels, J.L., et al., *Prenatal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children*. *Lancet*, 1999. **354**(9189): p. 1499-503.
31. Mrozek, K., et al., *Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification?* *Blood*, 2007. **109**(2): p. 431-48.
32. Bloomfield, C.D., et al., *Frequency of prolonged remission duration after high-dose cytarabine intensification in acute myeloid leukemia varies by cytogenetic subtype*. *Cancer Res*, 1998. **58**(18): p. 4173-9.

33. Dohner, H., et al., *Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet*. Blood, 2010. **115**(3): p. 453-74.
34. Dohner, K. and H. Dohner, *Molecular characterization of acute myeloid leukemia*. Haematologica, 2008. **93**(7): p. 976-82.
35. Falini, B., et al., *Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype*. N Engl J Med, 2005. **352**(3): p. 254-66.
36. Bacher, U., et al., *Implications of NRAS mutations in AML: a study of 2502 patients*. Blood, 2006. **107**(10): p. 3847-53.
37. Schnittger, S., et al., *Screening for MLL tandem duplication in 387 unselected patients with AML identify a prognostically unfavorable subset of AML*. Leukemia, 2000. **14**(5): p. 796-804.
38. O'Dwyer, P.J., et al., *Etoposide (VP-16-213). Current status of an active anticancer drug*. N Engl J Med, 1985. **312**(11): p. 692-700.
39. Minucci, S., et al., *Histone deacetylases: a common molecular target for differentiation treatment of acute myeloid leukemias?* Oncogene, 2001. **20**(24): p. 3110-5.
40. Cheson, B.D., et al., *Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia*. J Clin Oncol, 2003. **21**(24): p. 4642-9.
41. Pui, C.H., M.V. Relling, and J.R. Downing, *Acute lymphoblastic leukemia*. N Engl J Med, 2004. **350**(15): p. 1535-48.
42. Armstrong, S.A. and A.T. Look, *Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia*. J Clin Oncol, 2005. **23**(26): p. 6306-15.
43. Bernt, K.M. and S.P. Hunger, *Current Concepts in Pediatric Philadelphia Chromosome-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia*. Front Oncol, 2014. **4**: p. 54.
44. Downing, J.R., et al., *The Pediatric Cancer Genome Project*. Nat Genet, 2012. **44**(6): p. 619-22.
45. Gokbuget, N. and D. Hoelzer, *Treatment of adult acute lymphoblastic leukemia*. Seminars in Hematology, 2009. **46**(1): p. 64-75.
46. Flohr, T., et al., *Minimal residual disease-directed risk stratification using real-time quantitative PCR analysis of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in the international multicenter trial AIEOP-BFM ALL 2000 for childhood acute lymphoblastic leukemia*. Leukemia, 2008. **22**(4): p. 771-82.
47. Bader, P., et al., *Minimal residual disease (MRD) status prior to allogeneic stem cell transplantation is a powerful predictor for post-transplant outcome in children with ALL*. Leukemia, 2002. **16**(9): p. 1668-72.
48. Langebrake, C., et al., *Residual disease monitoring in childhood acute myeloid leukemia by multiparameter flow cytometry: the MRD-AML-BFM Study Group*. J Clin Oncol, 2006. **24**(22): p. 3686-92.

49. Campana, D. and W. Leung, *Clinical significance of minimal residual disease in patients with acute leukaemia undergoing haematopoietic stem cell transplantation*. Br J Haematol, 2013. **162**(2): p. 147-61.
50. Szczepanski, T., et al., *Minimal residual disease in leukaemia patients*. Lancet Oncol, 2001. **2**(7): p. 409-17.
51. Borowitz, M.J., et al., *Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study*. Blood, 2008. **111**(12): p. 5477-85.
52. Deschler, B. and M. Lubbert, *Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology*. Cancer, 2006. **107**(9): p. 2099-107.
53. Ho, A.D. and W. Wagner, *Bone marrow niche and leukemia*. Ernst Schering Found Symp Proc, 2006(5): p. 125-39.
54. Ravandi, F. and Z. Estrov, *Eradication of leukemia stem cells as a new goal of therapy in leukemia*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(2): p. 340-4.
55. Guzman, M.L. and C.T. Jordan, *Considerations for targeting malignant stem cells in leukemia*. Cancer Control, 2004. **11**(2): p. 97-104.
56. Gatti, L. and F. Zunino, *Overview of tumor cell chemoresistance mechanisms*. Methods Mol Med, 2005. **111**: p. 127-48.
57. Chabner, B.A. and T.G. Roberts, Jr., *Timeline: Chemotherapy and the war on cancer*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(1): p. 65-72.
58. Gottesman, M.M., *Mechanisms of cancer drug resistance*. Annu Rev Med, 2002. **53**: p. 615-27.
59. Bonnet, D. and J.E. Dick, *Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell*. Nat Med, 1997. **3**(7): p. 730-7.
60. Essers, M.A., et al., *IFNalpha activates dormant haematopoietic stem cells in vivo*. Nature, 2009. **458**(7240): p. 904-8.
61. Trumpp, A., M. Essers, and A. Wilson, *Awakening dormant haematopoietic stem cells*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(3): p. 201-9.
62. Essers, M.A. and A. Trumpp, *Targeting leukemic stem cells by breaking their dormancy*. Mol Oncol, 2010. **4**(5): p. 443-50.
63. Burchert, A., et al., *Sustained molecular response with interferon alfa maintenance after induction therapy with imatinib plus interferon alfa in patients with chronic myeloid leukemia*. J Clin Oncol, 2010. **28**(8): p. 1429-35.
64. Simonsson, B., et al., *Interferon alpha for treatment of chronic myeloid leukemia*. Curr Drug Targets, 2011. **12**(3): p. 420-8.
65. Nowell, P.C., *The clonal evolution of tumor cell populations*. Science, 1976. **194**(4260): p. 23-8.
66. Nicolson, G.L. and N.L. Rosenberg, *Diversification and progression of malignant tumors*. Bioessays, 1987. **6**(5): p. 204-8.
67. Crespi, B. and K. Summers, *Evolutionary biology of cancer*. Trends Ecol Evol, 2005. **20**(10): p. 545-52.
68. Visvader, J.E., *Cells of origin in cancer*. Nature, 2011. **469**(7330): p. 314-22.

69. Karlic, H. and P. Baurek, *Epigenetics and the power of art*. Clin Epigenetics, 2011. **2**(2): p. 279-82.
70. Maugeri, N., et al., *Platelet clearance by circulating leukocytes: a rare event or a determinant of the "immune continuum"?* Platelets, 2014. **25**(3): p. 224-5.
71. Knudson, A.G., *Two genetic hits (more or less) to cancer*. Nat Rev Cancer, 2001. **1**(2): p. 157-62.
72. Jones, P.A. and P.W. Laird, *Cancer epigenetics comes of age*. Nat Genet, 1999. **21**(2): p. 163-7.
73. Dash, A. and D.G. Gilliland, *Molecular genetics of acute myeloid leukaemia*. Best Pract Res Clin Haematol, 2001. **14**(1): p. 49-64.
74. Gilliland, D.G. and J.D. Griffin, *The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia*. Blood, 2002. **100**(5): p. 1532-42.
75. Grundler, R., et al., *FLT3-ITD and tyrosine kinase domain mutants induce 2 distinct phenotypes in a murine bone marrow transplantation model*. Blood, 2005. **105**(12): p. 4792-9.
76. Tallman, M.S., D.G. Gilliland, and J.M. Rowe, *Drug therapy for acute myeloid leukemia*. Blood, 2005. **106**(4): p. 1154-63.
77. Mizuki, M., et al., *Flt3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways*. Blood, 2000. **96**(12): p. 3907-14.
78. Boissel, N., et al., *Incidence and prognostic impact of c-Kit, FLT3, and Ras gene mutations in core binding factor acute myeloid leukemia (CBF-AML)*. Leukemia, 2006. **20**(6): p. 965-70.
79. Mullighan, C.G., et al., *JAK mutations in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(23): p. 9414-8.
80. Michaud, J., et al., *In vitro analyses of known and novel RUNX1/AML1 mutations in dominant familial platelet disorder with predisposition to acute myelogenous leukemia: implications for mechanisms of pathogenesis*. Blood, 2002. **99**(4): p. 1364-72.
81. Mueller, B.U., et al., *Heterozygous PU.1 mutations are associated with acute myeloid leukemia*. Blood, 2002. **100**(3): p. 998-1007.
82. Pabst, T., et al., *Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein-alpha (C/EBPalpha), in acute myeloid leukemia*. Nat Genet, 2001. **27**(3): p. 263-70.
83. Mullighan, C.G., et al., *Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia*. N Engl J Med, 2009. **360**(5): p. 470-80.
84. Haferlach, T., et al., *Insight into the molecular pathogenesis of myeloid malignancies*. Curr Opin Hematol, 2007. **14**(2): p. 90-7.
85. Zheng, R., A.D. Friedman, and D. Small, *Targeted inhibition of FLT3 overcomes the block to myeloid differentiation in 32Dcl3 cells caused by expression of FLT3/ITD mutations*. Blood, 2002. **100**(12): p. 4154-61.
86. Li, L., et al., *Defective nonhomologous end joining blocks B-cell development in FLT3/ITD mice*. Blood, 2011. **117**(11): p. 3131-9.

87. *Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia.* N Engl J Med, 2013. **368**(22): p. 2059-74.
88. Shih, T.Y., et al., *Comparison of the genomic organization of Kirsten and Harvey sarcoma viruses.* J Virol, 1978. **27**(1): p. 45-55.
89. Barbacid, M., *ras genes.* Annu Rev Biochem, 1987. **56**: p. 779-827.
90. Beaupre, D.M. and R. Kurzrock, *RAS and leukemia: from basic mechanisms to gene-directed therapy.* J Clin Oncol, 1999. **17**(3): p. 1071-9.
91. Byrne, J.L. and C.J. Marshall, *The molecular pathophysiology of myeloid leukaemias: Ras revisited.* Br J Haematol, 1998. **100**(2): p. 256-64.
92. Ahearn, I.M., et al., *Regulating the regulator: post-translational modification of RAS.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(1): p. 39-51.
93. Beaupre, D.M. and R. Kurzrock, *RAS inhibitors in hematologic cancers: biologic considerations and clinical applications.* Invest New Drugs, 1999. **17**(2): p. 137-43.
94. Kohlmann, A., et al., *Next-generation sequencing technology reveals a characteristic pattern of molecular mutations in 72.8% of chronic myelomonocytic leukemia by detecting frequent alterations in TET2, CBL, RAS, and RUNX1.* J Clin Oncol, 2010. **28**(24): p. 3858-65.
95. Goemans, B.F., et al., *Mutations in KIT and RAS are frequent events in pediatric core-binding factor acute myeloid leukemia.* Leukemia, 2005. **19**(9): p. 1536-42.
96. Bowen, D.T., et al., *RAS mutation in acute myeloid leukemia is associated with distinct cytogenetic subgroups but does not influence outcome in patients younger than 60 years.* Blood, 2005. **106**(6): p. 2113-9.
97. Barletta, E., et al., *Ras gene mutations in patients with acute myeloid leukaemia and exposure to chemical agents.* Carcinogenesis, 2004. **25**(5): p. 749-55.
98. Ritter, M., et al., *Prognostic significance of N-RAS and K-RAS mutations in 232 patients with acute myeloid leukemia.* Haematologica, 2004. **89**(11): p. 1397-9.
99. Liang, D.C., et al., *K-Ras mutations and N-Ras mutations in childhood acute leukemias with or without mixed-lineage leukemia gene rearrangements.* Cancer, 2006. **106**(4): p. 950-6.
100. Bos, J.L., *ras oncogenes in human cancer: a review.* Cancer Res, 1989. **49**(17): p. 4682-9.
101. Bashey, A., et al., *Mutational activation of the N-ras oncogene assessed in primary clonogenic culture of acute myeloid leukemia (AML): implications for the role of N-ras mutation in AML pathogenesis.* Blood, 1992. **79**(4): p. 981-9.
102. Horiike, S., et al., *N-ras mutation and karyotypic evolution are closely associated with leukemic transformation in myelodysplastic syndrome.* Leukemia, 1994. **8**(8): p. 1331-6.
103. Liu, E., et al., *Mutations of the Kirsten-ras proto-oncogene in human preleukaemia.* Nature, 1987. **330**(6144): p. 186-8.
104. Parcells, B.W., et al., *FMS-like tyrosine kinase 3 in normal hematopoiesis and acute myeloid leukemia.* Stem Cells, 2006. **24**(5): p. 1174-84.

105. Takahashi, S., *Downstream molecular pathways of FLT3 in the pathogenesis of acute myeloid leukemia: biology and therapeutic implications*. J Hematol Oncol, 2011. **4**: p. 13.
106. Carow, C.E., et al., *Expression of the hematopoietic growth factor receptor FLT3 (STK-1/Flk2) in human leukemias*. Blood, 1996. **87**(3): p. 1089-96.
107. Drexler, H.G., *Expression of FLT3 receptor and response to FLT3 ligand by leukemic cells*. Leukemia, 1996. **10**(4): p. 588-99.
108. Rosnet, O., et al., *Human FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase is expressed at the surface of normal and malignant hematopoietic cells*. Leukemia, 1996. **10**(2): p. 238-48.
109. Nakao, M., et al., *Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia*. Leukemia, 1996. **10**(12): p. 1911-8.
110. Meshinchi, S., et al., *Clinical implications of FLT3 mutations in pediatric AML*. Blood, 2006. **108**(12): p. 3654-61.
111. Schnittger, S., et al., *Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease*. Blood, 2002. **100**(1): p. 59-66.
112. Stirewalt, D.L., et al., *Size of FLT3 internal tandem duplication has prognostic significance in patients with acute myeloid leukemia*. Blood, 2006. **107**(9): p. 3724-6.
113. Kottaridis, P.D., et al., *The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials*. Blood, 2001. **98**(6): p. 1752-9.
114. Kayser, S., et al., *Insertion of FLT3 internal tandem duplication in the tyrosine kinase domain-1 is associated with resistance to chemotherapy and inferior outcome*. Blood, 2009. **114**(12): p. 2386-92.
115. Breitenbuecher, F., et al., *Identification of a novel type of ITD mutations located in nonjuxtamembrane domains of the FLT3 tyrosine kinase receptor*. Blood, 2009. **113**(17): p. 4074-7.
116. Gale, R.E., et al., *The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia*. Blood, 2008. **111**(5): p. 2776-84.
117. Frohling, S., et al., *Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm*. Blood, 2002. **100**(13): p. 4372-80.
118. Rombouts, E.J., et al., *Relation between CXCR-4 expression, Flt3 mutations, and unfavorable prognosis of adult acute myeloid leukemia*. Blood, 2004. **104**(2): p. 550-7.
119. Thiede, C., et al., *Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis*. Blood, 2002. **99**(12): p. 4326-35.

120. Moreno, I., et al., *Incidence and prognostic value of FLT3 internal tandem duplication and D835 mutations in acute myeloid leukemia*. Haematologica, 2003. **88**(1): p. 19-24.
121. Choudhary, C., et al., *Signal transduction of oncogenic Flt3*. Int J Hematol, 2005. **82**(2): p. 93-9.
122. Peng, H.L., et al., *Fms-like tyrosine kinase (FLT) 3 and FLT3 internal tandem duplication in different types of adult leukemia: analysis of 147 patients*. Croat Med J, 2008. **49**(5): p. 650-69.
123. Schessl, C., et al., *The AML1-ETO fusion gene and the FLT3 length mutation collaborate in inducing acute leukemia in mice*. J Clin Invest, 2005. **115**(8): p. 2159-68.
124. Taketani, T., et al., *FLT3 mutations in the activation loop of tyrosine kinase domain are frequently found in infant ALL with MLL rearrangements and pediatric ALL with hyperdiploidy*. Blood, 2004. **103**(3): p. 1085-8.
125. Armstrong, S.A., et al., *FLT3 mutations in childhood acute lymphoblastic leukemia*. Blood, 2004. **103**(9): p. 3544-6.
126. Yokota, S., et al., *Internal tandem duplication of the FLT3 gene is preferentially seen in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome among various hematological malignancies. A study on a large series of patients and cell lines*. Leukemia, 1997. **11**(10): p. 1605-9.
127. Xu, F., et al., *Tandem duplication of the FLT3 gene is found in acute lymphoblastic leukaemia as well as acute myeloid leukaemia but not in myelodysplastic syndrome or juvenile chronic myelogenous leukaemia in children*. Br J Haematol, 1999. **105**(1): p. 155-62.
128. Xu, F., et al., *Tandem duplication of the FLT3 gene is infrequent in infant acute leukemia*. Japan Infant Leukemia Study Group. Leukemia, 2000. **14**(5): p. 945-7.
129. Brown, P. and D. Small, *FLT3 inhibitors: a paradigm for the development of targeted therapeutics for paediatric cancer*. Eur J Cancer, 2004. **40**(5): p. 707-21, discussion 722-4.
130. Zarrinkar, P.P., et al., *AC220 is a uniquely potent and selective inhibitor of FLT3 for the treatment of acute myeloid leukemia (AML)*. Blood, 2009. **114**(14): p. 2984-92.
131. Cheng, H. and T. Force, *Molecular mechanisms of cardiovascular toxicity of targeted cancer therapeutics*. Circ Res, 2010. **106**(1): p. 21-34.
132. Miyoshi, H., et al., *t(8;21) breakpoints on chromosome 21 in acute myeloid leukemia are clustered within a limited region of a single gene, AML1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(23): p. 10431-4.
133. Erickson, P., et al., *Identification of breakpoints in t(8;21) acute myelogenous leukemia and isolation of a fusion transcript, AML1/ETO, with similarity to Drosophila segmentation gene, runt*. Blood, 1992. **80**(7): p. 1825-31.
134. Reikvam, H., et al., *Acute myeloid leukemia with the t(8;21) translocation: clinical consequences and biological implications*. J Biomed Biotechnol, 2011. **2011**: p. 104631.

135. Okuda, T., et al., *AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis*. Cell, 1996. **84**(2): p. 321-30.
136. Levanon, D., et al., *The Runx3 transcription factor regulates development and survival of TrkC dorsal root ganglia neurons*. EMBO J, 2002. **21**(13): p. 3454-63.
137. Licht, J.D., *AML1 and the AML1-ETO fusion protein in the pathogenesis of t(8;21) AML*. Oncogene, 2001. **20**(40): p. 5660-79.
138. Okuda, T., et al., *Biological characteristics of the leukemia-associated transcriptional factor AML1 disclosed by hematopoietic rescue of AML1-deficient embryonic stem cells by using a knock-in strategy*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(1): p. 319-28.
139. Otto, F., M. Lubbert, and M. Stock, *Upstream and downstream targets of RUNX proteins*. J Cell Biochem, 2003. **89**(1): p. 9-18.
140. Ogawa, E., et al., *PEBP2/PEA2 represents a family of transcription factors homologous to the products of the Drosophila runt gene and the human AML1 gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(14): p. 6859-63.
141. Huang, G., et al., *Dimerization with PEBP2beta protects RUNX1/AML1 from ubiquitin-proteasome-mediated degradation*. EMBO J, 2001. **20**(4): p. 723-33.
142. Bushweller, J.H., *CBF--a biophysical perspective*. Semin Cell Dev Biol, 2000. **11**(5): p. 377-82.
143. Faridi, F., et al., *Aberrant epigenetic regulators control expansion of human CD34+ hematopoietic stem/progenitor cells*. Front Genet, 2013. **4**: p. 254.
144. Mulloy, J.C., et al., *Maintaining the self-renewal and differentiation potential of human CD34+ hematopoietic cells using a single genetic element*. Blood, 2003. **102**(13): p. 4369-76.
145. Rhoades, K.L., et al., *Analysis of the role of AML1-ETO in leukemogenesis, using an inducible transgenic mouse model*. Blood, 2000. **96**(6): p. 2108-15.
146. Higuchi, M., et al., *Expression of a conditional AML1-ETO oncogene bypasses embryonic lethality and establishes a murine model of human t(8;21) acute myeloid leukemia*. Cancer Cell, 2002. **1**(1): p. 63-74.
147. Lo Coco, F., S. Pisegna, and D. Diverio, *The AML1 gene: a transcription factor involved in the pathogenesis of myeloid and lymphoid leukemias*. Haematologica, 1997. **82**(3): p. 364-70.
148. Calabi, F., R. Pannell, and G. Pavloska, *Gene targeting reveals a crucial role for MTG8 in the gut*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(16): p. 5658-66.
149. Amann, J.M., et al., *ETO, a target of t(8;21) in acute leukemia, makes distinct contacts with multiple histone deacetylases and binds mSin3A through its oligomerization domain*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(19): p. 6470-83.
150. Alcalay, M., et al., *Acute myeloid leukemia fusion proteins deregulate genes involved in stem cell maintenance and DNA repair*. J Clin Invest, 2003. **112**(11): p. 1751-61.

151. Gelmetti, V., et al., *Aberrant recruitment of the nuclear receptor corepressor-histone deacetylase complex by the acute myeloid leukemia fusion partner ETO*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(12): p. 7185-91.
152. Goyama, S. and J.C. Mulloy, *Molecular pathogenesis of core binding factor leukemia: current knowledge and future prospects*. Int J Hematol, 2011. **94**(2): p. 126-33.
153. Klampfer, L., et al., *The AML1/ETO fusion protein activates transcription of BCL-2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(24): p. 14059-64.
154. Banker, D.E., et al., *The t(8;21) translocation is not consistently associated with high Bcl-2 expression in de novo acute myeloid leukemias of adults*. Clin Cancer Res, 1998. **4**(12): p. 3051-62.
155. Pabst, T., et al., *AML1-ETO downregulates the granulocytic differentiation factor C/EBPalpha in t(8;21) myeloid leukemia*. Nat Med, 2001. **7**(4): p. 444-51.
156. Shimizu, K., et al., *AML1-MTG8 leukemic protein induces the expression of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) receptor through the up-regulation of CCAAT/enhancer binding protein epsilon*. Blood, 2000. **96**(1): p. 288-96.
157. Vangala, R.K., et al., *The myeloid master regulator transcription factor PU.1 is inactivated by AML1-ETO in t(8;21) myeloid leukemia*. Blood, 2003. **101**(1): p. 270-7.
158. Choi, Y., et al., *Erythroid inhibition by the leukemic fusion AML1-ETO is associated with impaired acetylation of the major erythroid transcription factor GATA-1*. Cancer Res, 2006. **66**(6): p. 2990-6.
159. Liu, C.F., et al., *[Clinical significance of detection of AML1/ETO fusion transcripts in childhood AML using real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction]*. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi, 2005. **13**(1): p. 76-82.
160. Redondo, J.M., et al., *Indistinguishable nuclear factor binding to functional core sites of the T-cell receptor delta and murine leukemia virus enhancers*. Mol Cell Biol, 1992. **12**(11): p. 4817-23.
161. Muller, A.M., et al., *Complementing mutations in core binding factor leukemias: from mouse models to clinical applications*. Oncogene, 2008. **27**(44): p. 5759-73.
162. McCormack, E., O. Bruserud, and B.T. Gjertsen, *Review: genetic models of acute myeloid leukaemia*. Oncogene, 2008. **27**(27): p. 3765-79.
163. Yergeau, D.A., et al., *Embryonic lethality and impairment of haematopoiesis in mice heterozygous for an AML1-ETO fusion gene*. Nat Genet, 1997. **15**(3): p. 303-6.
164. Okuda, T., et al., *Expression of a knocked-in AML1-ETO leukemia gene inhibits the establishment of normal definitive hematopoiesis and directly generates dysplastic hematopoietic progenitors*. Blood, 1998. **91**(9): p. 3134-43.
165. Wang, Q., et al., *The CBFbeta subunit is essential for CBFalpha2 (AML1) function in vivo*. Cell, 1996. **87**(4): p. 697-708.

166. Yuan, Y., et al., *AML1-ETO expression is directly involved in the development of acute myeloid leukemia in the presence of additional mutations*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(18): p. 10398-403.
167. Fenske, T.S., et al., *Stem cell expression of the AML1/ETO fusion protein induces a myeloproliferative disorder in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(42): p. 15184-9.
168. Hildinger, M., et al., *Design of 5' untranslated sequences in retroviral vectors developed for medical use*. J Virol, 1999. **73**(5): p. 4083-9.
169. Birnboim, H.C. and J. Doly, *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. Nucleic Acids Res, 1979. **7**(6): p. 1513-23.
170. Miltenyi, S., et al., *High gradient magnetic cell separation with MACS*. Cytometry, 1990. **11**(2): p. 231-8.
171. Pouton, C.W., et al., *Polycation-DNA complexes for gene delivery: a comparison of the biopharmaceutical properties of cationic polypeptides and cationic lipids*. J Control Release, 1998. **53**(1-3): p. 289-99.
172. Wortge, S., et al., *Tetracycline-controlled transgene activation using the ROSA26-iM2-GFP knock-in mouse strain permits GFP monitoring of DOX-regulated transgene-expression*. BMC Dev Biol, 2010. **10**: p. 95.
173. Cabezas-Wallscheid, N., et al., *Instruction of haematopoietic lineage choices, evolution of transcriptional landscapes and cancer stem cell hierarchies derived from an AML1-ETO mouse model*. EMBO Mol Med, 2013. **5**(12): p. 1804-20.
174. Socolovsky, M., et al., *Ineffective erythropoiesis in Stat5a(-/-)5b(-/-) mice due to decreased survival of early erythroblasts*. Blood, 2001. **98**(12): p. 3261-73.
175. Kindler, T., et al., *K-RasG12D-induced T-cell lymphoblastic lymphoma/leukemias harbor Notch1 mutations and are sensitive to gamma-secretase inhibitors*. Blood, 2008. **112**(8): p. 3373-82.
176. Campbell, R.E., et al., *A monomeric red fluorescent protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(12): p. 7877-82.
177. Bjorkoy, G., et al., *p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death*. J Cell Biol, 2005. **171**(4): p. 603-14.
178. Baum, C., et al., *Novel retroviral vectors for efficient expression of the multidrug resistance (mdr-1) gene in early hematopoietic cells*. J Virol, 1995. **69**(12): p. 7541-7.
179. Hildinger, M., et al., *Bicistronic retroviral vectors for combining myeloprotection with cell-surface marking*. Gene Ther, 1999. **6**(7): p. 1222-30.
180. Hanenberg, H., et al., *Colocalization of retrovirus and target cells on specific fibronectin fragments increases genetic transduction of mammalian cells*. Nat Med, 1996. **2**(8): p. 876-82.
181. Chono, H., et al., *Removal of inhibitory substances with recombinant fibronectin-CH-296 plates enhances the retroviral transduction efficiency of CD34(+)CD38(-) bone marrow cells*. J Biochem, 2001. **130**(3): p. 331-4.
182. Morse, H.C., 3rd, et al., *Cells of the marginal zone--origins, function and neoplasia*. Leuk Res, 2001. **25**(2): p. 169-78.

183. Long, R.E., G. Knutsen, and M. Robinson, *Myeloid hyperplasia in the SENCAR mouse: differentiation from granulocytic leukemia*. Environ Health Perspect, 1986. **68**: p. 117-23.
184. Kogan, S.C., et al., *Bethesda proposals for classification of nonlymphoid hematopoietic neoplasms in mice*. Blood, 2002. **100**(1): p. 238-45.
185. Gossen, M. and H. Bujard, *Studying gene function in eukaryotes by conditional gene inactivation*. Annu Rev Genet, 2002. **36**: p. 153-73.
186. Ryding, A.D., M.G. Sharp, and J.J. Mullins, *Conditional transgenic technologies*. J Endocrinol, 2001. **171**(1): p. 1-14.
187. Bockamp, E., et al., *Of mice and models: improved animal models for biomedical research*. Physiol Genomics, 2002. **11**(3): p. 115-32.
188. Castilla, L.H., et al., *The fusion gene Cbfb-MYH11 blocks myeloid differentiation and predisposes mice to acute myelomonocytic leukaemia*. Nat Genet, 1999. **23**(2): p. 144-6.
189. Buchholz, F., et al., *Inducible chromosomal translocation of AML1 and ETO genes through Cre/loxP-mediated recombination in the mouse*. EMBO Rep, 2000. **1**(2): p. 133-9.
190. Guzman, M.L., et al., *Preferential induction of apoptosis for primary human leukemic stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(25): p. 16220-5.
191. Schwieger, M., et al., *AML1-ETO inhibits maturation of multiple lymphohematopoietic lineages and induces myeloblast transformation in synergy with ICSBP deficiency*. J Exp Med, 2002. **196**(9): p. 1227-40.
192. Grisolano, J.L., et al., *An activated receptor tyrosine kinase, TEL/PDGFBetaR, cooperates with AML1/ETO to induce acute myeloid leukemia in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(16): p. 9506-11.
193. Nishida, S., et al., *AML1-ETO rapidly induces acute myeloblastic leukemia in cooperation with the Wilms tumor gene, WT1*. Blood, 2006. **107**(8): p. 3303-12.
194. Putz, G., et al., *AML1 deletion in adult mice causes splenomegaly and lymphomas*. Oncogene, 2006. **25**(6): p. 929-39.
195. Peterson, L.F., et al., *Inability of RUNX1/AML1 to breach AML1-ETO block of embryonic stem cell definitive hematopoiesis*. Blood Cells Mol Dis, 2007. **39**(3): p. 321-8.
196. Akashi, K., et al., *A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages*. Nature, 2000. **404**(6774): p. 193-7.
197. Reya, T., et al., *Stem cells, cancer, and cancer stem cells*. Nature, 2001. **414**(6859): p. 105-11.
198. Domen, J. and I.L. Weissman, *Self-renewal, differentiation or death: regulation and manipulation of hematopoietic stem cell fate*. Mol Med Today, 1999. **5**(5): p. 201-8.
199. Flotho, C., et al., *RAS mutations and clonality analysis in children with juvenile myelomonocytic leukemia (JMML)*. Leukemia, 1999. **13**(1): p. 32-7.
200. Lauchle, J.O., et al., *Inherited predispositions and hyperactive Ras in myeloid leukemogenesis*. Pediatr Blood Cancer, 2006. **46**(5): p. 579-85.

201. Tuveson, D.A., et al., *Endogenous oncogenic K-ras(G12D) stimulates proliferation and widespread neoplastic and developmental defects*. *Cancer Cell*, 2004. **5**(4): p. 375-87.
202. Braun, B.S., et al., *Somatic activation of oncogenic Kras in hematopoietic cells initiates a rapidly fatal myeloproliferative disorder*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(2): p. 597-602.
203. Kottaridis, P.D., et al., *Studies of FLT3 mutations in paired presentation and relapse samples from patients with acute myeloid leukemia: implications for the role of FLT3 mutations in leukemogenesis, minimal residual disease detection, and possible therapy with FLT3 inhibitors*. *Blood*, 2002. **100**(7): p. 2393-8.
204. Au, W.Y., et al., *Low frequency of FLT3 gene internal tandem duplication and activating loop mutation in therapy-related acute myelocytic leukemia and myelodysplastic syndrome*. *Cancer Genet Cytogenet*, 2004. **149**(2): p. 169-72.
205. Paietta, E., et al., *Activating FLT3 mutations in CD117/KIT(+) T-cell acute lymphoblastic leukemias*. *Blood*, 2004. **104**(2): p. 558-60.
206. Lin, P., et al., *Activating FLT3 mutations are detectable in chronic and blast phase of chronic myeloproliferative disorders other than chronic myeloid leukemia*. *Am J Clin Pathol*, 2006. **126**(4): p. 530-3.
207. Rombouts, W.J., et al., *Biological characteristics and prognosis of adult acute myeloid leukemia with internal tandem duplications in the Flt3 gene*. *Leukemia*, 2000. **14**(4): p. 675-83.
208. Lee, B.H., et al., *FLT3 mutations confer enhanced proliferation and survival properties to multipotent progenitors in a murine model of chronic myelomonocytic leukemia*. *Cancer Cell*, 2007. **12**(4): p. 367-80.
209. Kelly, L.M., et al., *FLT3 internal tandem duplication mutations associated with human acute myeloid leukemias induce myeloproliferative disease in a murine bone marrow transplant model*. *Blood*, 2002. **99**(1): p. 310-8.
210. Kim, H.G., et al., *FLT3-ITD cooperates with inv(16) to promote progression to acute myeloid leukemia*. *Blood*, 2008. **111**(3): p. 1567-74.
211. Meshinchi, S., et al., *Structural and numerical variation of FLT3/ITD in pediatric AML*. *Blood*, 2008. **111**(10): p. 4930-3.

## **Danksagung**

Aus datenschutzrechtlichen Bedenken gestattet die Johannes Gutenberg-Universität Mainz in ihrem elektronischen Publikationssystem ArchiMeD weder die Nennung der Gutachter, noch die namentliche Nennung Dritter in der Danksagung. In dieser Version wurden diese Namen deshalb entfernt.

Die vorliegende Arbeit entstand im Rahmen einer Zusammenarbeit der Abteilung „Molekulare Immunologie“ des Deutschen Krebsforschungszentrums in Heidelberg und der Abteilung für Angewandte Toxikologie, Universität Mainz.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater für die Betreuung und vertrauensvolle Unterstützung meiner Arbeit. Sowie meinen Kollegen für die gute Arbeitsklima und ihre Hilfsbereitschaft.

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

