

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik für Stammzelltransplantation

Prof. Dr. med. Nicolaus Kröger

Etablierung eines Mausmodells der Chronisch Myeloischen Leukämie für die Untersuchung der kombinierten Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren und Spenderlymphozyten

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Lina Mechtild Alexandra Hildebrandt
aus Oldenburg

Hamburg 2015

(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 24.09.2015**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD. Dr.med. Francis Ayuk

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr.med. Gunhild von Amsberg

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr.med. Mascha Binder

Inhalt

1. Einleitung:	5
1.1 Definition und Epidemiologie	5
1.2 Ätiologie und Pathogenese:	6
1.3 Diagnosestellung	9
1.4 Klinik.....	9
1.5 Prognose	11
1.6 Therapie	12
1.6.1 Bewertungskriterien:	12
1.6.2 Frühere Behandlungsoptionen:.....	13
1.6.3 Tyrosinkinaseinhibitoren:	13
1.6.3a Erste Generation:	13
1.6.3b Zweite Generation:	17
1.6.3c Neuere, noch nicht zugelassene TKI	20
1.6.3d Immunsuppressive Wirkung der TKI	20
1.6.4 Allogene Stammzelltransplantation.....	21
1.6.4a Therapie von Rezidiven nach allogener Stammzelltransplantation:	22
1.6.4b Adoptive Immuntherapie mit DLI.....	23
1.7 Spender-gegen-Wirt-Reaktion	23
1.8 Spender-gegen-Leukämie-Effekt	26
1.9 Kombination von DLI und TKI nach Rezidiv nach SZT	27
1.10 Fazit	28
1.11 Mausmodelle	28
2. Fragestellung:.....	30
3. Material und Methoden	30
3.1 Material	30
3.1.1 Geräte und Laborausstattung:	30
3.1.2 EDV:.....	31
3.1.3 Verbrauchsmaterialien:	32
3.1.4a Chemikalien.....	32
3.1.4b Puffer:.....	33
3.1.5 Kits:	34
3.1.6 Zytokine:.....	34
3.1.7 Primer:.....	34
3.1.8 Medien für die Zellkultur	35
3.1.9 Zelllinien	35
3.2 Methoden	35
3.2.1 allgemeine zellbiologische Methoden	35
3.2.2 Umklonierung von Plasmiden	37
3.2.2a Lentivektoren:	37
3.2.2b Gammaretrovektoren:.....	39
3.2.3 Transplantationsversuche.....	43
3.2.4 Nachweismethoden:	48
4. Ergebnisse	52
4.1 Transduktionsversuche	52
4.1.1 Lentivektor.....	52
4.1.1a Klonierung der Legovektoren:.....	52
4.1.1b Transfektion und Titration der Lego-Vektoren:.....	54
4.1.1.c Transduktion von BAF3 Zellen mit den beiden Lentivektoren.....	55
4.1.1.d Imatinibtestung der mit den beiden Lentivektoren transduzierten BA/F3-Zellen.....	56
4.1.1e Transduktion von murinen Stammzellen mit dem WT-Bcr-Abl und dem Bcr-Abl-T3151 Lentivektor.....	57
4.1.1f Stimulation von murinen Stammzellen mit zwei verschiedenen Zytokincocktails mit anschließender Facs-Färbung auf Stammzellmarker, an verschiedenen Zeitpunkten nach Entnahme.....	58
4.1.g Verbesserung der Transduktionsrate.....	62

Dreifache Transduktion muriner Stammzellen	63
4.1.2 Gammaretrovektor.....	64
4.1.2a Klonierung der retroviralen Vektoren	64
4.1.2b Transduktion muriner Stammzellen mit den retroviralen Vektoren	67
4.2 Transplantationsversuche.....	68
4.2.1 Lentivektor.....	68
4.2.1a Dosisfindung der Knochenmark letalen Bestrahlung und Testung einer Knochenmarksupportdosierung.....	68
4.2.1b Transplantation von dreifach transduzierten murinen Stammzellen	72
4.2.2 Gammaretrovektor.....	73
4.2.2a Erste Transplantationen von mit dem Retrovirus transduzierten Knochenmarkzellen	73
4.2.2b Zweiter Transplantationsversuch	78
4.3 Therapietestungen und weitere Transplantationsversuche	82
4.3.1 Übersichten über die Hemmung der beiden Leukämiezellarten durch die verschiedenen Behandlungen	99
4.3.2 Übersicht über die mittlere Überlebenszeit in den verschiedenen Behandlungsgruppen	102
5. Diskussion.....	103
5.1. Das Tiermodell	103
5.2. Die Therapien.....	107
6. Abkürzungsverzeichnis.....	110
7. Literaturverzeichnis	113
8. Eidesstattliche Versicherung	123

1. Einleitung:

1.1 Definition und Epidemiologie

Die chronisch myeloische Leukämie (Synonym: chronische Myelose) ist eine myeloproliferative Erkrankung (*myeloproliferative disease*, MPD) des hämatopoetischen Systems. Sie geht mit einer klonalen Expansion von hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarkes einher und führt zur Anreicherung von hauptsächlich myeloiden Zellen im Blut. Dabei steigt sowohl die Zahl der reifen neutrophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten, als auch derer Vorstufen an. Die chronisch myeloische Leukämie (CML) macht 15-20% der Leukämien bei Erwachsenen aus. Die jährliche Inzidenz liegt weltweit bei 1-2 Neuerkrankungen (Torgerson et al. 2012). Das mediane Alter bei Entdeckung der Krankheit liegt bei 53 Jahren, aber es können alle Altersklassen, auch Kinder betroffen sein (Sawyers 1999). 2,8% der Patienten sind bei der Diagnosestellung jünger als 20 Jahre (National Cancer Institute, NCI, 2005-2009). Die Inzidenz ist in verschiedenen ethnischen Gruppen unterschiedlich, so sind zum Beispiel Weiße 1,4-mal öfter betroffen als Asiaten (NCI, 2005-2009). Das Verhältnis von Erkrankungen bei Männer und Frauen liegt bei 1,4:1 (Torgerson et al. 2012). Die Prävalenz der CML steigt weltweit und gerade in der westlichen Welt stetig an, da aufgrund verbesserter Behandlungsstrategien ein enormer Effekt auf das Überleben erreicht wurde (Torgerson et al. 2012).

Der Begriff MPD wurde 1951 von William Damsback geprägt, im Jahre 2008 von der *World Health Organisation* (WHO) aber umbenannt in *myeloproliferative neoplasms* (MPN) um zu betonen, dass die klonalen Zellen, zwar maligner Entität sind, nicht aber von Natur aus dysplastisch (Kim et al. 2012). Zu dieser Gruppe von Erkrankungen zählen nach der typischen Definition neben der CML, auch die Polycythaemia vera (PV), die essentielle Thrombozythämie und die Osteomyelofibrose (OMF). Des Weiteren werden die chronisch neutrophile Leukämie, die chronisch eosinophile Leukämie und die Mastzelleleukämie laut WHO dazugezählt (Tefferi et al. 2009). Die CML geht im Gegensatz zu den anderen MPNs mit der Bildung des so genannten Philadelphia-Chromosoms einher. Dabei entsteht

durch Translokation das Bcr-Abl-Fusionsgen ($[(t9;22)(q34;q11)]$). Diese Mutation führt zur Produktion einer daueraktiven Bcr-Abl-Tyrosinkinase, die wiederum eine starke Proliferation auslöst.

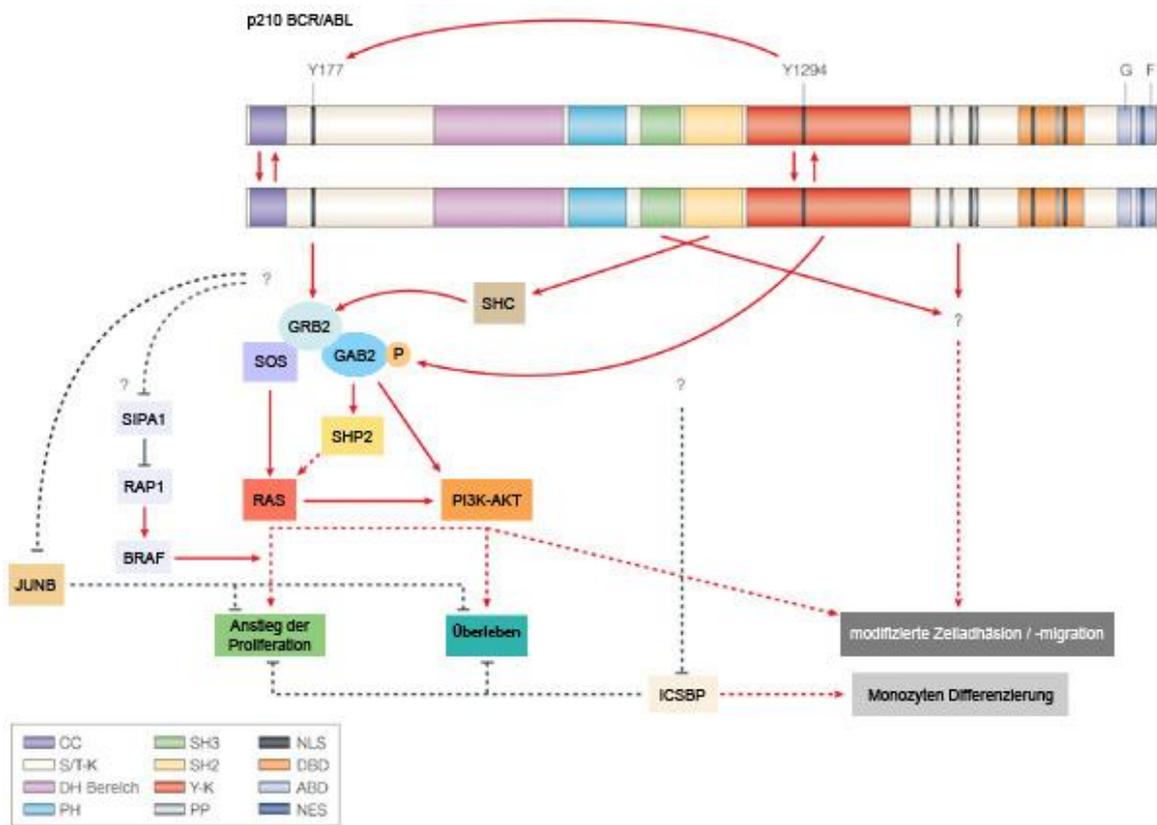
Die CML ist die erste neoplastische Erkrankung bei der die Identifikation des Genotyps zur Entwicklung wirkungsvoller Medikamente geführt hat. Daher dient sie als Modell für die Behandlung anderer Neoplasien und ist Inhalt vieler Studien, deren Zahl in keinem Verhältnis zu ihrer eher geringen Inzidenz steht (Hehlmann et al. 2007).

1.2 Ätiologie und Pathogenese:

Die Ätiologie der CML ist weitestgehend ungeklärt. Es wird vermutet, dass ionisierende Strahlen einen Risikofaktor darstellen, dieser Zusammenhang konnte aber nicht eindeutig belegt werden (Hehlmann et al. 2007). Zudem korreliert die Erkrankung mit peptischen Ulzera und anderen Krebserkrankungen in der persönlichen Vorgeschichte, auch nach Ausschluss von Bestrahlung und Chemotherapiebehandlungen; Als mögliche Erklärung dafür werden genetische Faktoren, die die Anfälligkeit für multiple Krebserkrankungen erhöhen, gehandelt (Johnson et al. 2012).

Bei der Pathogenese spielt die Bildung des Bcr-Abl-Fusionsgens eine wichtige Rolle. Dabei kommt es durch eine Translokation zur Verbindung des ABL-Genes auf Chromosom 9 und des BCR-Genes auf Chromosom 22, welche dann zum Fusionsgen verschmelzen. ABL steht dabei für *Abelson murine leukemia viral oncogene* und BCR für *Breakpoint cluster region*. Das ABL-Gen kodiert für eine rezeptorunabhängige Tyrosinkinase, die in zahlreichen Geweben exprimiert wird und sowohl im Zellkern, als auch im Zytoplasma lokalisiert ist. Sie kann auch zwischen diesen beiden Kompartimenten wandern. Dabei ist die nukleäre ABL für die Transkriptionskontrolle im Falle von DNA-Schäden verantwortlich und kann auch die Apoptose einleiten. (Wang 2000). Die zytoplasmatische ABL dagegen wird von Wachstumsfaktoren und Zelladhäsion aktiviert und spielt eine wichtige Rolle in der Dynamik des Zytoskeletts (Woodring et al. 2003). Die ABL Tyrosinkinase wird durch Phosphorylierung aktiviert. Durch die Fusion von BCR und ABL wird die Aktivität der

ABL Tyrosinkinase gesteigert. Dies erklärt sich durch die Möglichkeit der Trans-Autophosphorylierung durch Dimer- und Tetramerbildung über die doppeltgewundenen Bereiche der Bcr-Abl-Proteine. Die Phosphorylierung generiert eine hochaffine Bindungsstelle für *Gaba-B Receptor-2* (GBR2), welche über *Src-homology 2* (SH2) an Bcr-Abl und über *Src-homology 3* (SH3) an *Son of sevenless* (SOS) und *GRB2-associated binding protein 2* (GAB2) bindet. SOS aktiviert dann *Rat sarcoma* (RAS), GAB2 rekrutiert Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) und *SH2 tyrosine phosphatase* (SHP2) Proteine. Das SH2 Modul von Abl kann SHC binden, welches nach erfolgter Phosphorylierung ebenfalls GRB2 rekrutieren kann. Der SH3 Bereich von ABL und die SH3 Bindungsstelle am c-terminalen Ende sind in der Lage einige Proteine, die für die Regulation der Zelladhäsion und –migration wichtig sind, zu binden. Außerdem kann Bcr-Abl mit *Interferon Consensus Sequence Binding Protein* (ICSBP), *jun B proto-oncogene* (JUNB) und *signal-induced proliferation-associated 1* (SIPA1) interagieren, welche die Proliferation und das Überleben von myeloiden Zellen negativ regulieren. ICSBP in dem es deren Differenzierung zu Monozyten triggert, JUNB in dem es das Downstreamtarget von RAS JUN inhibiert und SIPA1 über die Inaktivierung von *Ras-proximate-1* (RAP1), welches in aktiver Form über *proto-oncogene B-Raf* (BRAF) positiv auf die Proliferation von myeloiden Zellen wirkt. Bcr-Abl kann also über vielfältige Wege die Proliferation und das Überleben myeloider Zellen stimulieren: es aktiviert RAS, SHP2 und PI3K-AKT Signalwege und reguliert die Transkription von ICSBP, JUNB und SIPA1 herunter (Ren 2005).



Nature Reviews | Cancer

Abbildung 1: Modifiziert nach: „Mechanisms of BCR–ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia”, Ruibao Ren 2005

Bei der CML wird Bcr-Abl in sich selbst erneuernden hämatopoetischen Stammzellen exprimiert. Diese sind in der Lage sich zu myeloiden oder lymphozytären Vorläuferzellen zu differenzieren. In der ersten Phasen der CML, der chronischen Phase, kommt es durch die proliferationssteigernden Effekte von Bcr-Abl zu einer exzessiven Vermehrung aller drei Granulozytenformen. Durch im Verlauf auftretende weitere Mutationen, welche durch die hohe Proliferationsrate und chromosomale Instabilität der Erkrankung noch getriggert werden, kommt es zum Übergang in die Akzelerationsphase und letztlich die Blastenkrise. Hierbei reichern sich unreife Vorstufen entweder der myeloiden (2/3 der Fälle) oder der lymphozytären (1/3 der Fälle) Reihe in Knochenmark und Blut an (Ren 2005). Die Blastenkrise entspricht dem Übergang in eine akute Leukämie (Torgerson et al. 2012)

1.3 Diagnosestellung

Um die Diagnose einer CML zu stellen und sie von den anderen MPN abzugrenzen, bedient man sich der konventionellen Zytogenetik, über die die Translokation nachgewiesen werden kann. Ist dies nicht direkt möglich, kommen modernere, sensitivere Verfahren wie die reverse Transkriptase (RT)- *Polymerase Chain Reaction* (PCR) bzw. die Fluoreszenz-in-situ-Hybrisierung (FISH) zum Einsatz. Wegweisend ist außerdem die Knochenmarksbiopsie und das Differentialblutbild, welches eine exzessive Granulozytose mit Linksverschiebung zeigt (Hehlmann et al. 2007). Bei der RT- PCR handelt es sich um eine Variante der PCR, bei der das Enzym reverse Transkriptase genutzt wird, um in Proben enthaltene *Ribonucleic acid* (RNA) in komplementäre DNA umzuwandeln und diese dann mittels PCR zu vervielfachen. Hierüber lässt sich das Bcr-Abl-Transkript in Blut oder Knochenmark nachweisen. Mit der FISH lässt sich dagegen das Philadelphia-Chromosom direkt nachweisen. Die Methode wurde 1982 von Langer-Safer et al. erstmals vorgestellt und beinhaltet die Hybridisierung der Probe mit einer vorher mit fluoreszierenden Verbindungen markierten Sonde aus DNA. Die gebundenen Sondenmoleküle können dann z.B. mittels Fluoreszenzmikroskop detektiert werden (Langer-Safer et al. 1982).

1.4 Klinik

Die CML verläuft unbehandelt gewöhnlich in 3 Phasen:

chronische Phase	fortgeschrittene Phasen	
	Akzelerierte Phase	Blastenkrise
Mediane Dauer 5-6 Jahre	Mediane Dauer 6-9 Monate	Medianes Überleben 3-6 Monate



Abbildung 2: Übersicht der drei Phasen der CML mit medianer Dauer (modifiziert nach: Central European Leukemia Study Group, www.cml-info.com)

Die chronische Phase dauert zumeist fünf bis sechs Jahre an (Schiffer et al. 2003). Ihr Leitsymptom ist die Leukozytose mit pathologischer Linksverschiebung und eine

Splenomegalie, als Folge der extramedullären Blutbildung. Der Blastenanteil liegt aber noch unter 10%. Da in 90% der Fälle die Diagnose der CML in dieser chronischen Phase gestellt wird, sind 20-50% der Patienten bei Diagnosestellung asymptomatisch (Torgerson et al. 2012). Die CML ist häufig ein Zufallsbefund bei Differentialblutbilduntersuchungen. Hier fällt eine Leukozytose mit Erhöhung der Granulozytenwerte auf. Treten Symptome auf, handelt es sich meist um Müdigkeit/Abgeschlagenheit, Blutungen, aufgrund von verringerter Plättchenfunktion, wie z.B. Epistaxis oder Menorrhagien, Völlegefühl, vermehrte Schweißneigung oder ungewollten Gewichtsverlust. Seltener lassen sich Symptome einer Splenomegalie, wie abdominelle Schmerzen feststellen.

Es folgt die ca. sechs Monate währende Akzelerationsphase, in der die Krankheit schneller fortschreitet und die anderen Reihen der Blutbildung zunehmend verdrängt werden. Daraus ergibt sich eine stärkere Leukozytose, eine Thrombozytopenie und Anämie, sowie eine stärker ausgeprägte Splenomegalie. Den Patienten geht es in diesem Stadium deutlich schlechter. Die WHO legte folgende Kriterien für die Einordnung in die Akzelerationsphase fest, dabei gilt schon ein erfüllter Punkt als ausreichend:

- 10-19% Blasten in den peripheren weißen Blutzellen oder Knochenmarkzellen
- Mindestens 20% basophile Granulozyten im peripheren Blut
- andauernde Thrombozytopenie ($< 100 \times 10^9/L$) unabhängig von der Therapie
- andauernde Thrombyzytose ($> 1000 \times 10^9/L$) unempänglich für Therapie
- zunehmende Milzgröße und steigende Leukozytenzahl, unempänglich für Therapie
- zytogenetischer Nachweis von klonaler Entwicklung (z.B. das Auftreten von zusätzlichen genetischen Abnormalitäten, die zur Zeit der Diagnosestellung nicht in der Probe vorhanden waren)
- Megakaryozytenproliferation, verbunden mit Retikulin oder Kollagenfibrose und /oder starke Granulozytendysplasie weisen auf eine Akzelerationsphase hin, sind aber nicht beweisend.

Letztendlich geht diese Phase in die Blastenkrise über, bei der der Blastenanteil im Blut und/oder Knochenmark nun mehr als 20 (nach *World Health Organisation*, WHO) bzw. 30% (nach deutscher CML-Studiengruppe) beträgt bzw. großflächige

Cluster von Blasten in Knochenmarkbiopsien gefunden werden. In dieser Phase können sich die CML-Zellen neben Knochenmark, Lymphknoten und Milz auch in anderen Geweben ansammeln und dort s.g. Chlorome bilden (Vardiman et al. 2002). Die mittlere Überlebenszeit in dieser Phase beträgt weniger als 6 Monate (Schiffer 2007). Dadurch dass die Blasten die normale Blutbildung weitestgehend verdrängen, verstärken sich die oben genannten Symptome so stark, dass Infekte, Blutungen etc. das Leben des Patienten akut gefährden. Forscher des M.D. Anderson Cancer Center postulierten folgende Parameter als entscheidend für die Prognose und der Verlauf der Erkrankung (Kantarjian et al. 1988):

- zytogenetischer Nachweis einer klonalen Evolution
- periphere Blasten $\geq 15\%$
- $\geq 20\%$ periphere Basophile
- $\geq 30\%$ periphere Blasten und Promyelozyten
- Thrombozytopenie

Dank neuer Behandlungsmethoden nimmt die Erkrankung nur noch selten diesen dreistufigen Weg und kann oft in der chronischen Phase gehalten werden.

1.5 Prognose

Die Überlebenszeit ist sehr variabel und hängt unter anderem vom Zeitpunkt der Diagnosestellung, dem Zeitpunkt des Behandlungsbeginns, evtl. vorhandenen Tyrosinkinaseinhibitor-resistenten Formen von Bcr-Abl (He et al. 2012), dem Alter der Patienten und der Compliance des Patienten ab (Rosti et al. 2007). Bevor es Behandlungsmöglichkeiten gab, lag die mittlere Überlebenszeit bei etwa 3,5 Jahren (Sokal et al. 1984). Je nach Studie schwanken die Überlebensraten zwischen 89% nach 60 Monaten Imatinib-Behandlung (Druker et al. 2006) und 97,7% nach 6 bzw. 95,2% nach 8 Jahren Imatinib-Behandlung (Gambacorti-Passerini et al. 2011). Die Überlebensraten nach Stammzelltransplantation (SZT) wurden lange als deutlich tiefer liegend eingeschätzt, da es hier deutlich höhere Komplikationsraten gibt. Allerdings zeigen neuere Studien, dass z.B. das 3-Jahres-Überleben nach Stammzelltransplantation mit dem von Patienten mit Imatinib-Behandlung vergleichbar ist (Saussele et al. 2010). Dafür ist aber nur durch die SZT eine

komplette Heilung der Erkrankung möglich. Abschätzen lässt sich das Risiko der Patienten mit Hilfe des 1984 entwickelten und noch bis heute Anwendung findenden Sokal Score, bei dem am Zeitpunkt der Diagnose folgende Parameter bestimmt werden und so eine Einteilung der Patienten in Niedrig-, Mittel- und Hoch-Risikopatienten möglich ist (Sokal et al. 1984):

- Prozentsatz der Blasten im peripheren blut
- Thrombozytenzahl
- Milzgröße (gemessen in cm unter dem Rippenbogen)
- Alter des Patienten

1.6 Therapie

1.6.1 Bewertungskriterien:

Therapieerfolge werden bei der CML in 3 Arten unterteilt. Das hämatologische Ansprechen ist dabei definiert als Grad der Normalisierung des Blutbildes und der Milzgröße. Ein vollständiges hämatologisches Ansprechen beinhaltet ein komplettes Erfüllen der folgenden Punkte: Hämoglobin: $>11\text{g/dl}$, Thrombozytenzahl: $<500.000/\text{mm}^3$, Leukozytenzahl: $<10.000/\text{mm}^3$, ein Differentialblutbild ohne Blasten und Promyelozyten und $< 5\%$ Metamyelozyten und Myelozyten, sowie eine nicht palpable Milz. Ein partielles hämatologisches Ansprechen ist definiert als das Vorliegen eines der folgenden Punkte: Hämoglobin: $9-11\text{g/dl}$, Thrombozytenzahl: $>500.000/\text{mm}^3$, Leukozytenzahl: $10-50.000/\text{mm}^3$, 1-5 Vorläuferzellen im Differentialblutbild oder eine 1-5cm unter dem Rippenbogen tastbare Milz. Das zytogenetische Ansprechen entspricht dem Prozentsatz der Metaphasen ohne nachweisbares Philadelphia-Chromosom. Dabei sollten mindestens 25 Metaphasen untersucht werden Es wird unterteilt in: kein zytogenetisches Ansprechen: 0%, minimales: 1-32%, geringes: 33-66%, partielles: 67-99%, komplettes: 100% (the Italian cooperative study group on chronic myeloid leukemia, 1994). Abschließend gibt es noch das molekulare Ansprechen, welches per RT und/oder nested-PCR untersucht wird und den genauesten Nachweis liefert. Als komplettes molekulares Ansprechen (*complete molecular response*, CMR) wird keinerlei Nachweis von Bcr-Abl-mRNA-Transkripten in 2 aufeinander folgenden Blutproben angesehen. Von

einem partiellen Ansprechen (*major molecular response*, MMR) spricht man bei einem Verhältnis von Bcr-Abl zu Abl von $\leq 0,1$ auf der internationalen Skala, die eingeführt wurde um die Ergebnisse verschiedener Labore vergleichbar zu machen. Selbst durch eine langjährige Tyrosinkinaseinhibitorbehandlung ist nur selten ein komplettes molekulares Ansprechen möglich (Gambacorti-Passerini et al. 2011). Als wohl wichtigster Therapieerfolg ist das verlängerte Überleben der Patienten zu sehen, dieses wird zumeist als 5-Jahres-Überleben angegeben. Aber auch andere Zeiträume werden je nach Studiendauer angewendet.

1.6.2 Frühere Behandlungsoptionen:

Die erste mögliche Therapie bestand in der Gabe von Zytostatika wie Hydroxycarbamid, welches die DNA-Synthesekapazität durch Inhibition der Ribonukleotidreduktase stark einschränkt und Busulfan, welches Zellen durch die Alkylierung ihrer DNA zerstört. Dies beeinflusste das *Outcome* der Patienten nur gering, wobei Hydroxycarbamid aber noch deutlich überlegen war (Hehlmann et al. 1993). Der nächste Schritt in der Geschichte der Therapie der CML war der Übergang zur Behandlung mit Interferon-alpha (IFN-alpha). IFN-alpha ist ein von Leukozyten produziertes Zytokin, das zytotoxische T-Zellen und Makrophagen aktiviert, sowie negativ auf die Proliferation von (virus-)infizierten Zellen wirkt. Es hat insgesamt einen immunsuppressiven Effekt. Ein lebensverlängernder Effekt im Vergleich zu Hydroxycarbamid und Busulfan konnte in zahlreichen Studien gezeigt werden und betrug im Mittel etwa 15% Zuwachs, auf 57% im fünf-Jahres-Überleben (O'Brien & Deininger 2003). Die Kombination von IFN-alpha mit Cytarabin, einem weiteren Zytostatikum, welches als Isomer des Nucleosids Cytosin in die DNA eingebaut wird und zum Kettenabbruch führt, führte zwar zu einer besseren hämatologischen und zytogenetischen Antwort, eine Verlängerung des Überlebens konnte aber nicht gezeigt werden (Baccarani et al. 2002).

1.6.3 Tyrosinkinaseinhibitoren:

1.6.3a Erste Generation:

Revolutioniert wurde die medikamentöse Therapie der CML durch die Entwicklung des Tyrosinkinaseinhibitors Imatinib. Imatinib ist ein kompetitiver Inhibitor der Bcr-Abl-Tyrosinkinase und das erste Medikament, das anhand der Kristallstruktur eines Enzyms (Tyrosinkinase) entwickelt wurde. Es wurde damit zum Vorbild für viele

weitere Medikamente, die ein bestimmtes Enzym als Ziel haben. Imatinib blockiert die ATP-Bindungsstelle des Enzyms und verhindert dadurch die weitere Phosphorylierung von Proteinen in der Bcr-Abl-Signalkaskade. Es verhindert eine Proliferation von Bcr-Abl-positiven hämatopoetischen Zellen oder führt sogar zu deren Apoptose (Druker et al. 1996). Imatinib ist in hohem Maße spezifisch für Bcr-Abl, bindet aber auch an den Plättchen-abhängigen Wachstumshormonrezeptor (Buchdunger et al. 1995) und die c-Kit-Tyrosinkinase. Letztere ist als Stammzellefaktorrezeptor in die Hämatopoese involviert und ihre Inhibition daher ebenfalls ein wichtiger Bestandteil der *in vivo* Wirksamkeit von Imatinib (Druker & Lydon 2000). Entdeckt wurde Imatinib 1992 von Nicolas Lydon und Brian Druker. Vertrieben wird das Medikament unter dem Namen Glivec (deutsch) bzw. Gleevec (englisch) von Novartis. Seine Wirksamkeit wurde in zahlreichen Studien belegt (z.B. (Druker et al. 2001), (Kantarjian et al. 2002), (O'Brien & Deininger 2003)). In der s.g. IRIS (International Randomized Study of IFN versus STI571) wurde eine 6-Jahresüberlebensrate von 88% nachgewiesen. Patienten, die sich zwei Jahre nach Therapiebeginn in kompletter zytogenetischer Remission befinden, haben sogar keinerlei Überlebensnachteil gegenüber der nicht erkrankten Normalbevölkerung (Gambacorti-Passerini et al. 2011). Kritiker der IRIS-Studie betonen, dass die Ergebnisse durch den Ausschluss von Patienten aus der Statistik, die die Therapie aus anderen Gründen als Krankheitsprogression abbrechen, geschönt wurden. Reproduzierende Studien zeigten, dass etwa ein Drittel der neudiagnostizierten Patienten eine potenziell besser wirkende Therapie als Imatinib benötigen, wie z.B. neuere Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) oder eine Kombination mehrerer TKI (Pinilla-Ibarz & Flinn 2012). Verabreicht wird Imatinib je nach Verträglichkeit ein- oder zweimal täglich oral. Seine Halbwertszeit beträgt 22 Stunden. Seine orale Bioverfügbarkeit beträgt etwa 98%, wobei die höchsten Plasmakonzentrationen 2-4 Stunden nach Einnahme gemessen werden. Üblich sind Dosierungen von 400mg/d in der Behandlung der CML, bei Unwirksamkeit kann auf 600mg/d gesteigert werden. Da Imatinib plazentagängig und auch über die Muttermilch an das Kind weitergegeben wird, sollte die Einnahme während der Schwangerschaft und Stillzeit sorgfältig abgewogen werden. Über die Anwendung in dieser Zeit gibt es wenige Daten (Di Gion et al. 2011). Das Nebenwirkungsprofil von Imatinib beinhaltet Muskelkrämpfe, Ödeme, allgemeines Schwächegefühl, Hautbrüchigkeit, Diarrhoe, Haarausfall sowie Läsionen von Bändern und Sehnen. Selten wird über

Hepatotoxizität und Herzfehler berichtet. Ernsthafte Nebenwirkungen sind aber selten und treten nur in 3,2% der Fälle auf (Gambacorti-Passerini et al. 2011). Neben der Behandlung der CML ist Imatinib auch für die Behandlung von gastrointestinalen Stromatumoren (GIST), Philadelphia-Chromosom-positiver akuter lymphatischer Leukämie (ALL) und anderen myelodysplastische Syndrome zugelassen. Es wird eine Wirkung gegen pulmonale Hypertension (Tapper et al. 2009) und das retikuläre Neurofibrom erforscht (Yang et al. 2008)

Imatinib bindet an eine Konformation der Kinasendomäne, in der das s.g. DFG-Motiv (Asp381–Phe382–Gly383, siehe Abbildung unten) eine um fast 180° gedrehte Konstellation annimmt, genannt DFG-out. Diese Konstellation bildet jenseits des Thr315 „Türhüter“-Restes eine Tasche, in der das Amid und das *N*-Methylpiperazin von Imatinib binden. Das hochgradig konservierte DFG-Motiv liegt am N-terminalen Ende der Aktivierungsschleife, welche der Standort von aktivierender Phosphorylierung in vielen Proteinkinasen ist. Die Aktivierungsschleife als ganzes nimmt eine eindeutig inaktive Konformation im Komplex mit Imatinib an; Sie faltet sich auf das aktive Zentrum und tritt eher mit der phosphatbindenden P-Schleife in Kontakt, als die „Haarnadel“-Konformation, die charakteristisch für aktive Kinasen ist einzunehmen. Die P-Schleife selbst verbindet sich eng mit Imatinib. Sechs Wasserbrückenbindungen stabilisieren den Imatinib Komplex. Sie beinhalten das Pyridin-N und das *Backbone*-NH von Met318, das Aminopyrimidin und Seitenketten-Hydroxyl von Thr315, das Amid-NH und Seitenketten Carboxylat von Glu285, das Carbonyl und *Backbone*-NH von Asp381, das protonierte Methylpiperazin mit den *Backbone*-Carbonyl Atomen von Ile360 und His361. Zusätzlich unterstützen zahlreiche van der Waal's Kräfte die Bindung (Eck & Manley 2009). So stabilisiert Imatinib die inaktive Form der Tyrosinkinase, verhindert die Autophosphorylierung und hemmt dadurch die Proliferation von hämatopoetischen Zellen.

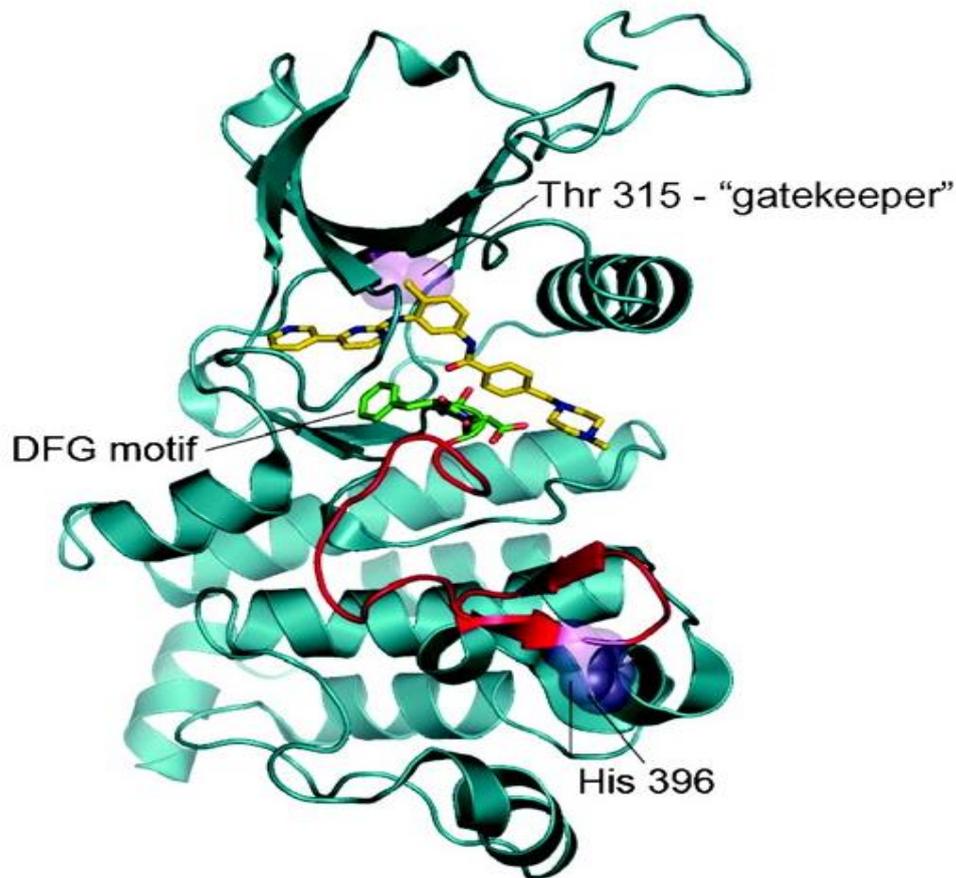


Abbildung 3: Darstellung der Kristallstruktur der Abl Kinasendomäne im Komplex mit Imatinib (gelb) (Young et al. 2006).

Trotz der guten Wirksamkeit treten immer wieder Fälle von Imatinib-Resistenz auf. Etwa 25% neudiagnostizierter Patienten erreichen keine komplette zytogenetische Remission und 25% der anfangs empfänglichen Patienten werden im Laufe der Behandlung resistent. Patienten die erst in der Akzelerationsphase oder Blastenkrise mit Imatinib behandelt werden weisen noch deutlich häufiger Resistenzen auf (Apperley 2007). Zuerst vermutete Ursachen waren eine Überexpression von Bcr-Abl (le Coutre et al. 2000) und/oder P-Glykoprotein (Mahon et al. 2000), die aber nur ein verringertes Ansprechen auf Imatinib erklärten und keine komplette Resistenz. Weitere Analysen ergaben als ursächlich hierfür Mutationen im Bcr-Abl-Gen, die zu Veränderungen im Aufbau der Tyrosinkinase führen und somit eine Bindung von Imatinib an den ATP-bindenden Bereich verhindern. Die zuerst entdeckte Mutation ist die T315I-Mutation, bei der eine Punktmutation (statt eines Cytosin wird ein Thymin eingebaut) einen Austausch von Threonin zu Isoleucin an Stelle 315 veranlasst. Das nun fehlende Sauerstoffatom verhindert die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen Imatinib und der ATP-bindenden Region von

Bcr-Abl. Außerdem führt das voluminösere Isoleucin zu einem sterischen Zusammenprall mit Imatinib, sodass eine Bindung nicht mehr möglich ist. Der hemmende Effekt von Imatinib entfällt also komplett (Gorre et al. 2001). Die Glu255Lys Mutation führt zu einem Verlust von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Glutamatseitenkette und dem Tyrosinhydroxyl an Stelle 257 und dem Lysinamin an Stelle 247, welche die Konformation von Bcr-Abl stabilisieren an die Imatinib bindet (Eck & Manley 2009). Die Entdeckung dieser und zahlreicher weiterer Mutationen, sowie deren Strukturaufklärung spornt die Forschung zur Entwicklung immer neuer Tyrosinkinaseinhibitoren an.

1.6.3b Zweite Generation:

Dasatinib wurde 2004 als vielfältiger Inhibitor von Abl und SRC-Kinasenfamilien vorgestellt. In der Röntgenstrukturanalyse der Verbindung aus Dasatinib und Abl zeigt sich, dass im Gegensatz zur Bindung mit Imatinib, hier sowohl die aktive, als auch die inaktive Form gebunden und durch drei Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert wird. Es wird vermutet, dass die weniger strengen Bindungsanforderungen von Dasatinib im relativen Vergleich zu denen von Imatinib, verantwortlich für die günstige Aktivität gegenüber mutierten Kinaseformen ist (Talpaz et al. 2006). Dasatinib ist neben seiner ATP-kompetitiven Inhibition von Src und Bcr-Abl auch wirksam gegen c-Kit und PDGFR β . *In vitro* wurde eine Wirksamkeit gegen 32 von 33 Bcr-Abl-Mutationen nachgewiesen, einzige Ausnahme bildet die oben beschriebene T315I-Mutation. Die orale Bioverfügbarkeit – also der Anteil des Wirkstoffs der nach oraler Aufnahme unverändert im Blutkreislauf zur Verfügung steht - im Menschen ist unbekannt. In Tierversuchen wurden Werte zwischen 14 und 51% bei Mäusen gemessen und die Halbwertszeit liegt zwischen 3 und 5 Stunden (Di Gion et al. 2011). Typische Nebenwirkungen sind Diarrhö, Ödeme und Kopfschmerzen. Seltener treten Fälle von Pleuraergüssen und Leberfunktionsstörungen auf. Patienten, die Imatinib nicht vertrugen, hatten keine ähnlichen Beschwerden bei der Einnahme von Dasatinib. In einer Phase-1 Dosis-Eskalationsstudie konnte die Wirkung von Dasatinib gegen Imatinib-resistente Mutationen von Bcr-Abl gezeigt werden. Dasatinib inhibiert Bcr-Abl deutlich effektiver als Imatinib (es ist etwa 325mal potenter) und ist zudem kein Substrat von P-Glykoprotein, was zu einer höheren intrazellulären Anreicherung in Stammzellen führen kann, da diese die Effluxpumpe hochgradig exprimieren (Talpaz et al. 2006). In präklinischen Studien wurden Bcr-Abl Mutationen entdeckt, die zwar gegen Dasatinib, nicht aber gegen Imatinib resistent

sind, daher wurden Überlegungen zu einer Kombinationsbehandlung angestellt (Burgess et al. 2005). Dasatinib wird von Bristol-Myers-Squibb unter dem Namen Sprycel vertrieben und ist seit Ende 2006 in der EU für die Behandlung von der CML bei Patienten, die Imatinib nicht tolerieren oder nicht darauf ansprechen, zugelassen. 2010 erfolgte die Zulassung als first-line Behandlung anhand der Phase3-Studie: „Dasatinib versus Imatinib Study in Treatment-Naive CML Patients (DASISION)“ (Kantarjian et al. 2010). Die normale Dosierung beträgt 100mg einmal täglich.

Für die Entwicklung von Nilotinib war die Strukturaufklärung der Bindung von Imatinib an Bcr-Abl ausschlaggebend. Es wurde 2005 erstmalig unter dem Namen AMN107 vorgestellt und unterscheidet sich von Imatinib nur durch die Einführung einer alternativen Bindungsgruppe (Weisberg et al. 2005). Dadurch hat Nilotinib eine höhere Selektivität gegenüber Bcr-Abl, was zu einer mindestens 10-fach höheren pharmakologischen Potenz führt. Es stabilisiert aber wiederum die inaktive DFG-out Form, die oben beschrieben wurde (Eck & Manley 2009). Die Art der Bindung unterscheidet sich aber von der des Imatinib: Die Met351 enthaltende Helix wird in einer Aussparung neben Leu364 in Position gehalten (Weisberg et al. 2005).

Nilotinib verhindert ebenfalls die Autophosphorylierung von Bcr-Abl und schränkt so die Proliferation hämatopoetischer Zellen ein. Zusätzlich fördert es die Entdifferenzierung der CML-Vorläuferzellen und unterbindet dadurch deren klonale Expansion. Da eine große Menge an Vorläuferzellen die Bildung von Resistenzen fördert, wurde Nilotinib auch eine vorbeugende Wirkung gegen Resistenzen zugeschrieben und seine Nutzung als First-line Behandlung gefordert (Pinilla-Ibarz & Flinn 2012). Nilotinib ist gegen viele der Imatinib-resistenten Mutationen von Bcr-Abl in verträglichen Konzentrationen wirksam (Weisberg et al. 2005). Nilotinib wird zweimal täglich oral eingenommen, mit einer Tagesgesamtdosis von 600 (neu diagnostizierte CML) bzw. 800mg (Imatinib-resistente vorbehandelte CML), da die orale Bioverfügbarkeit bei lediglich 30% liegt. Da die Aufnahme von Nilotinib durch (fettreiche) Nahrung noch weiter abnimmt, sollte es in größerem zeitlichem Abstand zu Nahrungsaufnahmen eingenommen werden (Di Gion et al. 2011). In der ENESTnd-Studie (Evaluating Nilotinib Efficacy and Safety in Clinical Trials – Newly Diagnosed Patients), in der die Wirkung von Nilotinib und Imatinib in Patienten verglichen wurde, erreichten doppelt so viele Patienten eine MMR nach 12 Monaten und auch der Prozentsatz der CMRs nach 24 Monaten war mehr als doppelt so hoch

in der Nilotinibgruppe (Pinilla-Ibarz & Flinn 2012). Nilotinib wird wie Imatinib allgemein gut vertragen, das Nebenwirkungsprofil beinhaltet eher Ausschläge, Haarausfall, Kopfschmerzen und Juckreiz, als gastrointestinale Nebenwirkungen (wie bei Imatinib beobachtet). Es ist unbekannt, ob Nilotinib die Plazentaschranke überwinden kann und ob es in die Muttermilch übertritt, daher sollte es in Schwangerschaft und Stillzeit nicht verschrieben werden (Di Gion et al. 2011). Nilotinib wird unter der Handelsnamen Tasigna von der Firma Novartis vertrieben. Das Medikament ist seit 2008 in der EU für die Behandlung der CML bei Patienten, die Imatinib nicht tolerieren oder nicht darauf ansprechen, sowie auch seit 2010 für neu diagnostizierte CML Patienten zugelassen (Europäischer öffentlicher Beurteilungsbericht (EPAR) und Produktinformation zu Tasigna).

Bosutinib ist ebenfalls ein TKI der zweiten Generation, erstmalig vorgestellt als Inhibitor von Abl im Jahre 2003. Es wirkt wiederum gegen alle Mutationen, außer T315I. Die übliche Dosierung beträgt 500mg und in einer Phase2 Studie wurde eine gute Wirksamkeit und Verträglichkeit nachgewiesen (Santos et al. 2011). In Europa erfolgte die Zulassung im März 2013, zur Behandlung von Patienten mit CML, die mit einem oder mehreren TKI vorbehandelt sind, und bei denen die Behandlung mit einem der anderen TKI Imatinib, Nilotinib oder Dasatinib nicht geeignet sind.

2009 wurde mit AP24534, genannt Ponatinib ein vielversprechender pan-Inhibitor – die Substanz hemmt also die Proliferation aller, auch der mutierten, Formen von Bcr-Abl - von Bcr-Abl und der T315I Mutation vorgestellt. Dieser bindet die T315I-Seitenkette mit einer Kohlenstoff-Kohlenstoff Dreifachbindung und es zeigen sich sogar van-der-Waals-Kräfte zwischen dem Isoleucin der Mutation, statt Abstoßung durch sterische Schwierigkeiten, wie es bei den anderen TKI der Fall ist. Dieses Medikament zeigte *in vitro* Wirksamkeit gegen alle bisher bekannten Imatinib-resistenten Bcr-Abl-Mutationen und sogar gegen die Kombination mehrerer Mutationen auf einem Allel. Auch in Mausmodellen konnte die Wirksamkeit bestätigt werden (O'Hare et al. 2009). In einer Phase I Studie wurde die antileukämische Wirkung auch gegen T315I gezeigt und eine Dosierung von 45mg/d für weitere Studien empfohlen. In einer Phase II Studie ("PONATINIB for Chronic Myeloid Leukemia (CML) Evaluation and Ph+ Acute Lymphoblastic Leukemia" (PACE), Studiennummer: NCT01207440) zeigte sich die Effektivität des Medikaments bei Patienten, die TKI der zweiten Generation nicht tolerieren oder bei denen die T315I

Mutation nachgewiesen wurde. Daher erfolgte im Juli 2013 die Zulassung von Ponatinib in Europa. Entwickelt wurde Ponatinib von ARIAD Pharmaceuticals. (O'Hare et al. 2011).

1.6.3c Neuere, noch nicht zugelassene TKI

2008 wurde SGX393 als Inhibitor der T315I Mutation vorgestellt. Seine inhibitorische Potenz ist mit der von Dasatinib vergleichbar. Die Wirkung von SGX393 gegen Bcr-Abl-T315I konnte sowohl *in vitro* anhand von leukämischen Zelllinien, als auch im Mausmodell (subkutan, s.c. injizierte Leukämiezelllinie) gezeigt werden. Gegen einige andere Imatinib-resistente Mutationen von Bcr-Abl, zeigt SGX393 allerdings keine Wirkung. Eine Kombination von SGX393 und Nilotinib oder Dasatinib zeigte vielversprechende Ergebnisse (O'Hare et al. 2008).

Bei DCC-2036 handelt es sich um einen weiteren Inhibitor der T315I-Mutation, der aufgrund seiner Bindung ohne die Wasserstoffbrücke am Threonin315, nicht am voluminösen Isoleucin in der mutierten Variante abprallt und unabhängig davon seine Wirkung entfalten kann. DCC-2036 ist wiederum nicht für alle Imatinib-resistenten Mutationen wirksam. Diese Substanz wurde 2011 vorgestellt und auch bei dieser zeigte die Kombination mit Nilotinib oder Dasatinib bessere Ergebnisse. (Eide et al. 2011).

1.6.3d Immunsuppressive Wirkung der TKI

Für alle drei bisher zugelassenen TKI wurde *in vitro* eine dosisabhängige immunmodulatorische Wirkung nachgewiesen.

Für Imatinib wurde eine Inhibierung der T-Zell-Proliferation nachgewiesen. Es führt zu einer Verminderung der T-cell-receptor (TCR)-vermittelten T-Zellaktivierung durch Inhibierung der Signaltransduktion des CD3-TCR Komplexes und Verringerung der Phosphorylierung von ZAP70 und LAT, welche für die T-Zellaktivierung wichtig sind. Die Produktion von IL-2 wurde ebenfalls gehemmt. Außerdem konnten Homologien zwischen der ATP-Bindungstasche von bekannten Imatinibzielen wie Bcr-Abl und der ATP-Bindungstasche cytoplasmatischer Tyrosinkinase, die in Immunrezeptor Signalwege involviert sind, nachgewiesen werden. Eine direkte Apoptose der T-

Zellen wurde nicht ausgelöst (Seggewiss et al. 2005). Imatinib hemmt ebenfalls die Entwicklung dendritischer Zellen, inhibiert deren Fähigkeit T-Zell-Antworten hervorzurufen (Appel et al. 2004) und wirkt sich auch negativ auf die Proliferation von Monozyten und Makrophagen aus (Dewar et al. 2005).

Dasatinib inhibiert ebenfalls die T-Zellaktivierung und Proliferation ohne Auslösung der Apoptose der Zellen. Es konnte zusätzlich eine Inhibierung der Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie z.B. TNF- α , IL-2 und IL-6 nachgewiesen werden. Außerdem konnte eine Potenzierung der immunsuppressiven Wirkung von Cyclosporin-A und Rapamycin durch Kombination mit Dasatinib gezeigt werden (Schade et al. 2008).

Nilotinib inhibiert als Struktur-Analogon von Imatinib ähnliche Tyrosinkinase und hat somit ebenfalls einen immunsuppressiven Effekt, bei dem vor allem CD8⁺-T-Zellen in Aktivierung und Proliferation gehemmt werden. Dieser Effekt war doppelt so stark wie bei Imatinib (Chen et al. 2008).

Diese Effekte könnten als Unterdrückung bzw. Verringerung der Entzündungsreaktion im Sinne einer Graft-versus-Host-Disease (GvHD) in Patienten genutzt werden, die im Rahmen eines Rezidivs nach allogener SZT Donor-lymphocyte-infusion (DLIs) erhalten.

1.6.4 Allogene Stammzelltransplantation

Die allogene Stammzelltransplantation ist bisher die einzige gesicherte kurative Therapieoption der CML. Kurativ bedeutet dabei, dass keine Bcr-Abl-Transkripte nach der Therapie im Patientenmaterial mehr nachweisbar sind und es nach Absetzen aller Medikamente nicht zu einem Rückfall der CML kommt. Die ersten erfolgreichen Stammzelltransplantationen erfolgten 1979, wobei die Spender jeweils eineiige Zwillingspartner waren (Fefer et al. 1979). Dies nennt man syngene Stammzelltransplantation. Bis zur Einführung von Imatinib, war die allogene Stammzelltransplantation die Behandlungsmethode der ersten Wahl für Patienten, für die ein passender Spender zur Verfügung stand (Gratwohl et al. 1998). Heute wird sie nur noch für Hochrisikopatienten, Patienten in höheren Krankheitsstadien, sowie bei Versagen der Therapie mit TKI in Betracht gezogen, da es sich um eine komplikationsreiche Behandlung mit vergleichsweise hoher Mortalität und Morbidität

handelt (Zuckerman et al. 2012). Die Faktoren Therapieversagen und höheres Krankheitsstadium korrelieren insofern miteinander, als aus TKI-resistenten Formen der CML schneller fortgeschrittene Stadien entstehen. Diese Gruppen von Patienten haben ein höheres Rezidivrisiko, als Patienten ohne diese Faktoren. In einer Studie über Patienten die zwischen 1989 und 1997 transplantiert wurden, lebten nach über 10 Jahren etwa 50% der Patienten, deren Spender HLA-identische Geschwister waren, ohne Anzeichen eines Rückfalls. Die Transplantations-assoziierte-Mortalität (*transplantation related mortality*, TRM) nach 5 Jahren lag bei etwa 20%, wenn die Patienten eine Risikobewertung von 0-1 hatten (dieser wurde aus Transplantatart, Phase der CML, Alter, Geschlechterkombination von Spender und Empfänger, sowie der Zeit zwischen Diagnosestellung und Transplantation berechnet und kann zwischen 0 und 7 betragen) und bei etwa 70% bei einem Score von 6-7 (Gratwohl et al. 1998). Die häufigsten Gründe für TRM sind Infektionen, die durch Immunsuppression und/oder Spender-gegen-Wirt-Reaktion (GvHD) begünstigt werden, sowie Organversagen (Khoury et al. 2012). Versuche die TRM durch T-Zell-Depletion zu verringern, führten zu einer höheren Rezidivrate, durch Verringerung des Spender-gegen-Leukämie-Effektes. Dank verbesserter Nachsorge und mehr klinischer Routine konnte eine vergleichbare Sterblichkeit zur TKI-Behandlung erreicht werden, die TRM betrug in dieser Studie nur noch 8%, dennoch bleiben die TKIs *first-line* Behandlung (Saussele et al. 2010).

1.6.4a Therapie von Rezidiven nach allogener Stammzelltransplantation:

Bevor es geeignete Behandlungsoptionen gab, bestand die einzige Möglichkeit bei Rezidiven nach SZT in einer zweiten SZT. Dies birgt ein hohes Risiko für den Patienten, hohe Kosten und ist nicht immer effektiv. Aufgrund des erhöhten Rezidivrisikos durch die aktuelle Patientenselektion für SZT, wurde verstärkt nach Optionen für diese Patienten geforscht. Dabei wurden im Wesentlichen zwei Möglichkeiten entdeckt:

- Behandlung auch nach der SZT mit TKI, um die Rezidivrate zu senken. Dabei werden bei Patienten, welche die SZT aufgrund von Imatinibresistenz erhalten haben, vor allem TKIs der zweiten Generation angewendet, bei denen ein Ansprechen aufgrund des größeren Wirkungsprofils wahrscheinlicher ist. Die Wirkung ist bei Patienten in der chronischen Phase am besten und auch eine prophylaktische Gabe erscheint sinnvoll (Klyuchnikov et al. 2009).

- Adoptive Immuntherapie mit Spenderlymphozyteninfusionen (*donor lymphocyte infusion*, DLI) um die Immunantwort der Spenderzellen gegen auch nach der SZT verbliebene Leukämiezellen zu verstärken (Kolb et al. 1990).

1.6.4b Adoptive Immuntherapie mit DLI

Die adoptive Immuntherapie mit DLI für Patienten mit Rezidiven der CML nach SZT begann 1990 mit einem ersten Bericht über 3 mit DLI von ihrem ursprünglichen Spender behandelte Patienten, bei denen eine Remission nach der Behandlung beobachtet wurde (Kolb et al. 1990). Diese Ergebnisse wurden in zahlreichen Studien bestätigt und es wurden Versuche der Kombination bzw. Vorbehandlung der DLI mit Interleukin-2 (IL-2) (Slavin et al. 1996) oder humanem Granulozyten Kolonie-stimulierendem Faktor (*recombinant human granulocyte colony stimulating factor*, rhG-CSF) (Sica et al. 1995) unternommen. Anfangs wurden DLI nur bei Patienten, die Stammzellspenden von HLA-identischen Geschwistern erhalten hatten angewandt, nach einigen Jahren Routine wurde auch von DLI nach SZT von HLA-identischen, nicht verwandten Spendern berichtet. Die besten Ergebnisse werden bei Patienten beobachtet, die nur einen molekularen und/oder zytogenetischen Rückfall hatten (zwischen 82 und 100% komplette Remission je nach Studie). Bei den Patienten, die einen hämatologischen Rückfall erlitten, sprachen diejenigen deutlich besser auf die Therapie an, die sich in der chronischen Phase der Erkrankung befanden (Collins et al. 1997), (Shiobara et al. 2000). Für Patienten in späteren Phasen ist die Wirkung begrenzt, lässt sich aber durch vorherige Reduktion der Leukämiezellen durch Chemotherapie verbessern. Die DLI-Behandlung hat eine spät einsetzende (erste Wirkungen können nach etwa 2-3 Monaten beobachtet werden, die komplette Bandbreite der Wirkung kann aber erst nach einem Jahr beurteilt werden (Deol & Lum 2010), aber lang anhaltende Wirkung; der erste Patient, der vor über 20 Jahren so behandelt wurde, lebt immer noch in Remission (Kolb 2008). Die Wirkung der DLI beruht auf dem Spender-gegen-Leukämie-Effekt, Schwierigkeiten bereitet die oft gemeinsam auftretende Spender-gegen-Wirt-Reaktion.

1.7 Spender-gegen-Wirt-Reaktion

Spender-gegen-Wirt-Reaktionen (*Graft-versus-host-disease*, GvHD) können nach allogenen Stammzelltransplantationen und nach DLI als akute oder chronische Form

auftreten (Khoury et al. 2012). Etwa 60-80% der Patienten mit HLA-kompatiblen nicht verwandtem Spender erleiden eine mehr oder minder schwerer Form der GvHD (Derlin et al. 2014). Die akute GvHD wird in 4 Stadien nach Glucksberg unterteilt (Glucksberg et al. 1974), diese Einteilung wurde aber kontrovers diskutiert (Przepiorka et al. 1995) und in einem Consensus Treffen des National Institutes of Health (NIH) wurde beschlossen, die GVHD insgesamt nach Symptomen und nicht nach dem Zeitpunkt der Manifestation zu klassifizieren, sodass die late-onset akute GVHD und das Overlapsyndrom als Kategorie der GVHD aufgenommen wurden. Tabelle 1 zeigt diese Klassifikation nach NIH Konsensus. Die late-onset akute GVHD tritt häufiger nach einem reduced-intensity conditioning (RIC) auf (Ferrara et al. 2009).

Tabelle 1			
Kategorie	Zeitpunkt nach HSCT oder DLI	Manifeste Zeichen der akuten GVHD	Manifeste Zeichen der chronischen GVHD
Akute GVHD			
Klassische akute GVHD	≤ 100 Tage	Ja	Nein
Persistierende, rezidivierende oder late-onset akute GVHD	>100 Tage	Ja	Nein
Chronische GVHD			
Klassische chronische GVHD	Keine Grenzen	Nein	Ja
Overlapsyndrom	Keine Grenzen	Ja	Ja

Tabelle 1: Klassifikation der GVHD nach NIH Konsensus (Filipovich et al. 2005)

Ihre Ursache liegt unter anderem in Unterschieden zwischen den HLA-Molekülen von Spender und Empfänger. Es gibt HLA-Moleküle der Klasse I, die auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert und von CD8+-T-Zellen erkannt werden sowie HLA-Moleküle der Klasse II, die nur auf immunkompetenten Zellen exprimiert und von CD4+-T-Zellen erkannt werden. Diese Oberflächenantigene helfen dem Körper zwischen körpereigenen und körperfremd zu unterscheiden. Je größer die Unterschiede zwischen Spender und Empfänger ausfallen, desto wahrscheinlicher ist eine GvHD, da die übertragenden T-Zellen des Spenders die Antigene, die ihnen von immunkompetenten Zellen des Empfängers in sekundären Lymphorganen präsentiert werden, als fremd erkennen. Daraufhin vermehren sich vom Spender abstammende naive T-Zellen und entwickeln sich zu Effektor T-Zellen, die dann vor allem im Gastrointestinaltrakt, der Leber, der Lunge und der Haut Entzündungsreaktionen auslösen (Joo et al. 2012). Die Hautmanifestation tritt häufig zuerst auf. Charakteristisch ist ein makulopapulöser Ausschlag, der sich auf dem ganzen Körper außer der Kopfhaut ausbreiten kann. In schweren Fällen kann es zu

Blasenbildung und Ulzerationen kommen. Eine gastrointestinale Beteiligung zeigt sich meist mit schleimigen, bis hin zu blutigen Diarrhoen, aber auch mit Erbrechen und abdominellen Krämpfen. Eine Lebermanifestation der GVHD ist oft schwer von anderen Komplikationen mit Leberbeteiligung, wie z. B. der veno-okklusiven Krankheit, Medikamententoxizität oder virale Infektion, zu unterscheiden und bleibt oft eine Ausschlussdiagnose (Ferrara et al. 2009). In Tabelle 2 und 3 werden die Stadieneinteilung und das Grading der akuten GVHD gezeigt.

Tabelle 2			
Organ	Haut	Leber	Gastrointestinal Trakt
Parameter	Makulopapulöses Exanthem	Gesamtbilirubin	Diarrhoe
Stadium 1	<25% der Haut betroffen	2-2,9 mg/ dl	500-1000 ml/ Tag oder persistierende Übelkeit
Stadium 2	25-50% der Haut betroffen	3-6 mg/ dl	1000-1500 ml/ Tag
Stadium 3	>50% der Haut betroffen	6,1-15 mg/ dl	>1500 ml /Tag
Stadium 4	Generalisiert, z. T. Blasenbildung	>15 mg/ dl	>2000 ml/ Tag und starke Schmerzen mit/ ohne Ileus

Tabelle 2: Akute GVHD Stadien Einteilung (Przepiorka et al. 1995)

Tabelle 3			
Grad	Haut Stadium	Leber Stadium	Gastrointestinal Trakt Stadium
I	1 bis 2	0	0
II	3 oder	1 oder	1
III	-	2 bis 3 oder	2 bis 4
IV	4 oder	4	4

Tabelle 3: Grading der akuten GVHD (Przepiorka et al. 1995)

Ein Spender sollte daher ein möglichst ähnliches HLA-Profil besitzen. Schon 1979 wurde erkannt, dass das Auftreten einer GVHD die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs verringert (Weiden et al. 1979). Insgesamt bestätigte sich, dass die chronische GVHD mit geringeren Rezidivraten, aber einer höheren TRM assoziiert ist (Lee et al. 2002).

Die *firstline* Therapie der akuten GvHD (aGvHD) beinhaltet im Stadium I topische Glukokortikoide oder Calcineurininhibitoren. In fortgeschritteneren Stadien wird

ebenfalls mit systemischen Glukokortikoiden behandelt. Die *secondline* Therapie bei steroidrefraktärer aGvHD wird nach Patienten- und Arztpräferenz, zu erwartenden Arzneimittelinteraktionen, Kosten und Praktikabilität ausgewählt. Es stehen zahlreiche Therapieoptionen zur Verfügung, jedoch ohne eindeutige prospektive Daten für eins dieser Agenzien. Verwendet werden u.a. niedrig dosiertes Methotrexat (MTX), Mycophenolat-Mofetil (MMF), extrakorporale Photopherese, CD3-, CD7-, CD25-, CD52-, CD147-, IL-2R-, IL-1- und TNF α -Antikörper, Antithymozytenglobulin (ATG) und mesenchymale Stammzellinfusionen (Qian et al. 2013). Zur Vorbeugung einer GvHD werden u.a. ATG, Calcineurininhibitoren, sowie MTX und MMF verwendet (Ferrara et al. 2009). Behandelt wird die chronische GvHD üblicherweise mit systemischen Kortikosteroiden. Durch Kombination mit Calcineurininhibitoren kann die Mortalität von Patienten mit niedrigen Thrombozytenzahlen gesenkt werden. Milde Formen der GvHD können auch mit topischen Immunsuppressiva behandelt werden, um negative Effekte der systemischen Gabe zu verhindern (Wolff et al. 2010).

1.8 Spender-gegen-Leukämie-Effekt

Der Spender-gegen-Leukämie- (*Graft-versus-leukemia*, GvL) Effekt wurde erstmals von Barnes et al. beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass bestrahlte leukämische Mäuse durch die Transplantation von allogenen, nicht aber von syngenen Knochenmark geheilt werden können (BARNES et al. 1956). Der GvL-Effekt wird wie der GvHD Effekt durch CD4+ und CD8+ T-Zellen vermittelt, wobei erstere hauptsächlich durch Fas-FasLigand induzierte Apoptose und letztere eher durch die Ausschüttung von Perforin und Granzym wirken (Hsieh & Korngold 2000). Von T-Zellen produzierte Zytokine wie IL-2, Interferon- γ (IFN- γ) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) potenzieren den Effekt durch Rekrutierung anderer Effektorzellen (Schmaltz et al. 2003). Auch *Natural Killer* Zellen (NK-Zellen) scheinen einen –wenn auch schwächeren- GvL-Effekt zu vermitteln, der im Gegensatz zu dem Effekt der T-Zellen aber vermutlich nur in den ersten ca. sechs Monaten zum Tragen kommt (Yu et al. 2009). Dieser Effekt funktioniert besonders in Fällen, bei denen dem

Empfänger ein HLA-I Allel fehlt, das der Spender besitzt. Dieses Mismatch führt dazu, dass es dem Empfänger an Liganden für Spender-inhibitorische Killer-Zell-Immunglobulin-Rezeptoren (KIRs) fehlt. Somit haben KIR-inkompatible NK-Zellen vermutlich einen größeren GvL-Effekt. (Ruggeri et al. 2002). Außerdem wurde der GvL-Effekt vermittelt durch IL-2 aktivierte NK-Zellen beschrieben (Hauch et al. 1990). Der genaue Mechanismus des GvL-Effektes ist noch nicht geklärt. Da er aber eng mit dem GvH-Effekt verknüpft ist, wird vermutet, dass ein ähnlicher Mechanismus zugrunde liegt. Die beiden Effekte treten oft gemeinsam auf, wobei ein guter GvL-Effekt oft mit einer chronischen GvHD einhergeht. Es gibt aber auch Fälle in denen der GvL-Effekt allein auftritt (Weiden et al. 1981). Abhängig ist der GvL-Effekt vor allem von Tumormasse und Stadium der Erkrankung. Somit funktioniert der Effekt am besten in der chronischen Phase der CML, in der die Zahl der leukämischen Zellen noch vergleichsweise niedrig ist. Genutzt wird dieser Effekt unter anderem beim RIC, bei der im Vorfeld der Stammzelltransplantation nur ein Teil der leukämischen Zellen durch Bestrahlung und/oder Chemotherapie zerstört wird und die verbliebenen Zellen dem GvL-Effekt überlassen bleiben. Diese Variante ermöglicht besonders älteren und multimorbiden Patienten, die eine myeloablative Konditionierung nicht verkraften würden, eine Stammzelltransplantation und somit mögliche Heilung ihrer Erkrankung (Storb 2009)

1.9 Kombination von DLI und TKI nach Rezidiv nach SZT

Den GvL-Effekt der DLIs zur Eradikation verbleibender Leukämiezellen nach SZT in Verbindung mit der einerseits immunsuppressiven, andererseits auch antileukämischen Wirkung der TKIs gemeinsam zu nutzen, erscheint als eine sinnvolle Option zur Behandlung von Rezidiven der CML nach SZT. Dabei reduziert der TKI den Großteil der Leukämiezellen, sodass eine zytogenetische Remission erreicht wird. Eine dauerhafte molekulare Remission ist allein durch TKI aber selten möglich, da leukämische Vorläuferzellen nicht komplett ausgelöscht werden und sich gerade nach Absetzen des Medikaments wieder vermehren und entdifferenzieren, sodass es zum Rezidiv kommt. Hier setzt dann die Wirkung der Spenderlymphozyten ein, die die wenigen verbleibenden Zellen abtöten und so zu einer molekularen Remission führen, die auch ohne Weiterführung der TKI anhält (Savani et al. 2005). Erfahrungen mit dieser Kombination sind minimal. 2002 wurde von einigen Patienten berichtet, die DLI's im zeitlichen Abstand von 3-29 Monaten vor Imatinib-Behandlung erhielten. Die Behandlung war zwar gut verträglich, zeigte aber keine bessere

Wirkung als ohne die DLIs (Kantarjian et al. 2002). Insgesamt wurden DLIs und TKI meistens im Abstand von mehreren Monaten verabreicht und es gab keine negativen Auswirkungen der Kombination (Palandri et al. 2007). Savani et al. berichteten dagegen schon 2005 von einer konkurrierenden Gabe von Imatinib und DLI. Diese sowie auch die zeitverzögerte getrennte Gabe der Behandlungen zeigte eine deutlich schnellere und häufigere molekulare Remission im Vergleich zu DLI oder TKI-Gabe allein. Auch die Überlebensrate in der Kombinationsbehandlungsgruppe war höher (100%). GvHD Grad 1 entwickelte sich in weniger Fällen in der Kombinationsgruppe, als in der DLI Gruppe (2/11, 5/13). GvHD höheren Grades wurde überhaupt nicht beobachtet. Allerdings handelt es sich um eine kleine Studie mit nur 9-13 Patienten pro Gruppe (Savani et al. 2005). Inwiefern der oben beschriebene immunmodulatorische Effekt der TKI den GvH-Effekt, als auch den GvL-Effekt einschränkt, wurde bisher nicht geklärt.

1.10 Fazit

TKI der ersten und zweiten Generation sind für den Großteil der Patienten eine gute Behandlungsmöglichkeit, da sie eine gute Wirkung zeigen und mit relativ geringen Nebenwirkungen einhergehen. Für TKI-resistente Formen von Bcr-Abl befinden sich zahlreiche TKI der dritten Generation in Erprobung. Die Stammzelltransplantation erscheint immer noch als risikoreiche Option und wird daher seltener und meist zu späten Zeitpunkten im Krankheitsverlauf verwendet. Das führt zu einer hohen Rezidivrate, die wiederum mit TKI oder DLI allein oder in Kombination behandelt wird. Für junge Patienten in wenig fortgeschrittenem Krankheitsstadium und Patienten, die an einer TKI-resistenten Variante leiden, für die ein passender Spender zur Verfügung steht, bietet die SZT jedoch gute Heilungschancen und den Ausblick auf ein Leben ohne tägliche Medikamenteneinnahmen. Für Rezidive nach SZT stellt die Kombination von DLI und TKI eine vielversprechende Möglichkeit dar, die es zu testen gilt.

1.11 Mausmodelle

Es existieren bisher zahlreiche Mausmodelle zur Erforschung der CML-Behandlung. Sie reichen von s.c. Modellen, bei denen Leukämiezelllinien wie BAF-3-Zellen eingesetzt werden (O'Hare et al. 2008), über iv. Modelle mit injizierten Leukämiezelllinien wie K562 (Wicklein et al. 2013) bis hin zu Modellen, in denen retroviral transduzierte Stammzellen in zuvor bestrahlte Mäuse transplantiert werden

(Weisberg et al. 2007). Das in dieser Doktorarbeit genutzte Modell wurde weiterentwickelt nach einem Mausmodell von Krause und van Etten (Krause & Van Etten 2004). Dieses beinhaltet einen gemischten Chimärismus und eine Bcr-Abl-positive myeloproliferative Erkrankung und wurde zur Erforschung der DLI Wirkung allein genutzt. In diesem Modell stellen männliche Balb/c Mäuse die Spender dar, ihnen wird nach einer Vorbehandlung mit 5-Fluoruracil Knochenmark entnommen und dieses mit dem p210 *BCR-ABL* MSCV-IRES/GFP Retrovirus transduziert. Die Empfänger sind weibliche Balb/c, welche nach einer Bestrahlung mit 1200 cGy die transduzierten Zellen und im Verhältnis 1:150 untransduzierte T-Zell-depletierte Knochenmarkzellen von männlichen C57Bl/6 Spendern (total *major histocompatibility complex* (MHC) -mismatch) erhalten. Dieses Verhältnis wird zur Induktion des gemischten Chimärismus benötigt. Dieser sowie die myeloproliferative Erkrankung lassen sich nach 13 Tagen nachweisen und die Erkrankung kann mit DLIs aus männlichen C57Bl/6 behandelt werden. Um näher an der Patientensituation, deren Spender meistens gematchte Geschwister oder andere gematchte Spender sind, zu forschen, wurde ein ähnliches Modell beschrieben. Bei diesem wurde jedoch statt des C57Bl/6 Knochenmark, B10.D2 Knochenmark im Verhältnis 1:30, welches auf MHC-Ebene, nicht aber auf *minor histocompatibility antigen* (miHA)-Ebene zu den Balb/c gematcht war, verwendet. In diesem Modell verlängerten DLIs zwar das Überleben der Mäuse, aber geheilt werden konnten sie nicht. Dies suggeriert, dass in der mismatch-Situation die Wirkung der DLI deutlich stärker ist (Krause & Van Etten 2004).

All diese Modelle sind geeignet um die Wirkung von Behandlungen wie TKI und/oder DLI zu testen. Allerdings ist es mit ihnen, im Falle einer Kombinationstherapie unmöglich zu beurteilen, welcher Teil des Behandlungserfolgs von welcher Behandlung herrührt. Um den antileukämischen und evtl. immunsuppressiven Effekt der TKI und gleichzeitig, aber getrennt davon, die Wirkung der DLIs messen zu können, wird ein neues Mausmodell benötigt. Das in dieser Arbeit etablierte Modell enthält ebenfalls einen gemischten Chimärismus und eine Bcr-Abl-positive myeloproliferative Erkrankung. Es unterscheidet sich vom oben beschriebenen Modell aber insofern, als ein Teil der Erkrankung durch syngene mit dem Wildtyp-Bcr-Abl transduzierte Zellen und ein anderer Teil durch allogene mit der TKI-resistenten T315I Mutation transduzierte Zellen ausgelöst wird. Empfänger sind wiederum weibliche Balb/c Mäuse, die unbehandelte Knochenmarkspenden von

männlichen C57Bl/6, sowie Spenden für transduziertes Knochenmark von männlichen Balb/c (für die T315I Mutation) und C57Bl/6 Mäusen (für Wildtyp Bcr-Abl) erhalten. Sie entwickeln dann eine Erkrankung, die sich zum Teil (Bcr-Abl) durch TKI und zum Teil (T315I) durch DLI aus männlichen C57Bl/6 Milzen behandeln lässt. Für die Transduktion wurden γ -Retroviren genutzt, wobei die Wildtyp Bcr-Abl Variante mit einem GFP und die Bcr-Abl-T315I Variante mit einem Venus-Protein gekoppelt ist. Daher können per Durchflusszytometrie beide Teile der Erkrankung nachgewiesen werden und eine Zu- oder Abnahme der Erkrankung durch die Behandlung beurteilt werden. Getestet wurden verschiedene DLI Dosierungen, verschiedene Nilotinib (als TKI) Dosierungen, sowie die Kombination von beiden. Analysiert wurde der Therapieeffekt auf TKI-resistente und -sensitive CML-Zellen und klinische Zeichen der GvHD.

2. Fragestellung:

Es soll ein Mausmodell entwickelt und etabliert werden, welches es ermöglicht, die Wirkung von TKI und DLI simultan zur Entfaltung zu bringen und zu beurteilen. Dabei soll ein Knochenmarktransplantations-Mausmodell entwickelt werden, das einen gemischten Chimärismus und eine Bcr-Abl-positive chronisch myeloproliferative Erkrankung simultan in den Empfänger-mäusen etabliert, bei dem ein Teil der Erkrankung (syngen) nur durch die Wirkung der TKI und der andere Teil (allogen und TKI-resistent) durch immunkompetente Spenderzellen, aber nicht durch TKI eliminiert werden kann. In diesem Modell sollen dann TKI und Spenderlymphozyteninfusionen allein und in Kombination untersucht werden. Analysiert werden der Therapieeffekt auf TKI-resistente und -sensitive CML-Zellen und klinische Zeichen der GvHD.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte und Laborausstattung:

Abzug: Tee-onomic AZ 1500

Brutschrank 5% CO₂, 37°C Binder Art.Nr.: 9240-0018 CB150

Durchflusszytometer: Facs Cantoll BD
Fluoreszenzmikroskop Leitz Fluoroverf FS
Knopfkanüle gebogen, Luer Lock
Kompaktnetzteil Biometra Standard Powerpack P25
Kryoboxen inkl. Rastereinsatz, Pappe, Hassa Laborbedarf, Lübeck
Kryoboxen, Plastik
Kühlschränke: 4°C Liebherr profi line, -20°C Privileg, -20°C Siemens, -80°C Heraeus
Hera freeze HFU688Top
Mikroskop invers Olympus CKX41
Mikrowelle Bosch
Neubauer Zählkammer, improved, Assistent, Sondheim, Germany
PCR-Geräte: Eppendorf Mastercycler gradient, Biometra UNO-Thermoblock
Pipetten: Eppendorf Research 10, 20, 100, 200, 1000µl Gilson Pipetman 2, 10, 20,
200, 1000µl
Pipettierhilfe: Hirschmann Pipetus, Stripettor Costar, IBS Pipetboy acu Integra
Bioscience
Reagenzglasgestell, Biochrom, Berlin
Reagenzglasständer, Biochrom, Berlin
Reaktionsgefäßständer, Neolab, Heidelberg und Omnilab, Bremen
Sicherheitswerkbank „Herasafe“ Klasse II HS18 Heraeus Instruments
Spectrophotometer: Nanodrop 1000, Peqlab
Steriles Besteck: Pinzette und Schere, Hammacher, Solingen
Thermomixer compact und comfort, Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifugen: Heraeus Biofuge pico, Eppendorf Centrifuge 5417R
Ultraschallbad Sonorex TK22, Bandelin, Berlin
Vortexer: Janke&Kunkel VF2, Heidolph
Waagen: Sartorius TI5412, Sartorius MC1 und LC6205
Wasserbad 37°C, GFL
Wecker: Beckmann Coulter “Timer Countdown”
Zellseparator: MACS, Multistand 2fach und 4fach
Zentrifugen: Heraeus Megafuge 1.OR, Sigma 6K10, Sorvall RC5C Plus

3.1.2 EDV:

BD FACSDiva Software 2008, Version 6.1.2., BD Biosciences, San Jose, USA

Microsoft® Office Professional Edition 2003, Microsoft Corporation, Redmond, USA
pDRAW, Acaclone Software

3.1.3 Verbrauchsmaterialien:

Cellstrainer 70µm, Nylon, BD, Franklin Lakes, USA

Einwegkanülen: Microlance 3, steril 0,45mm*13mm und Eclipse 0,8mm*40mm, BD
Franklin Lakes, USA

Einwegspritzen 1ml, 20ml, 50ml latexfrei Omnifix, Braun, Melsungen

Filter Millex HV 0,45µm 33mm PVDF, Hassa Laborbedarf, Lübeck

Flow Cytometry Röhren, Sarstedt, Nürnberg-Rommelsdorf

Gewebekulturschalen, 100*20mm, Sarstedt, Nürnberg-Rommelsdorf

Handschuhe: Nitrile Powder Free Blue, Aurelia, Supermax Healthcare Inc, Aurora,
USA und Peha-soft satin, Hartmann, Heidenheim

Kapillaren, bds offen AD 1,0 LG 75mm, Hirschmann, Schalksmühle

Kryoeinfriergerät: Mister Frosty, Schmidt Laborgeräte, Wien, Austria

Kryotubes 1ml, 2ml, Nunc, Langenselbold

Lanzetten Accu-Ceck Softelix XL, Roche Diagnostics, Grenzach-Wyhlen

Op-Tücher, steril, Barrier, Göteborg

PCR-Rack, Carl Roth, Karlsruhe

Plastik-Stabpipetten 2 ,5, 10, 25ml Falcon, BD, Franklin Lakes, USA

Pipettenspitzen 10, 200, 1000µl, Sarstedt, Nürnberg-Rommelsdorf

Plastikröhrchen 15, 50ml Falcon, BD, Franklin Lakes, USA

Reaktionsgefäße 0,5, 1,5, 2ml Eppendorf, Hamburg

Weißdeckeltubes, Röhrchen PS 30ml, Greiner bio-one, Frickenhausen

Zellkulturflaschen, cellstar® tissue culture flasks Greiner bio-one, Frickenhausen

-white filter cap, PS, 50 ml/250ml - für Suspensionszellen

-red filter cap, PS, 50 ml/250ml- für adhären wachsende Zellen

Zellkulturplatten: 6-Well, 12-Well, 24-Well, 96-Well, Greiner bio-one, Frickenhausen

Zellseparationssäulen MACS 25LS, MiltenyiBiotec, Gladbach

3.1.4a Chemikalien

Ampicillin Natriumsalz 10g, Th. Geyer, Renningen

Baytril, Bayer AG, Leverkusen

Calciumchlorid, Merck, Darmstadt

Chloroquine

Dimethylsulfoxid (DMSO) Merck, Darmstadt

DNA-Marker, 1kb Plus Gene ruler, Fermentas, St. Leon-Rot

dNTPs Set 4*100µmol, Fermentas, St. Leon-Rot

DMEM, Life Technologies Invitrogen, Carlsbad, USA

Ethanol 70%, 80%, vergällt TH. Geyer, 100% reinst

FACSFlow™ Becton Dickinson, Heidelberg

Fötiales Kälberserum (FKS) Gibco

Glycogen, MB Grade, Roche Diagnostics, Grenzach-Wyhlen

Hepes Sigma, Life Technologies Invitrogen, Carlsbad, USA

Hepes-buffered-saline (HBS)-Puffer, Life Technologies Invitrogen, Carlsbad, USA

Isopropanol J. T. Baker, Griesheim

LB-Medium (Lennox) 1kg, Th. Geyer, Renningen

L-Glutamin 200MM, Life Technologies Invitrogen, Carlsbad, USA

Millipore-Wasser

N-Methyl-2-pyrrolidon

Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml) Invitrogen, Karlsruhe

Phosphate Buffered Saline (PBS), Dulbecco's CA MG, Life Technologies Invitrogen, Carlsbad, USA

Polybrene = Hexadimetrin-Bromid, Sigma, Steinheim

Polyethylenglykol 300, Sigma Aldrich Chemie, St. Gallen

Polymerasen: Dream-Taq, Fermentas, St. Leon-Rot

Retronektin, Lonza, Basel

RPMI 1640 Medium Liquid, Life Technologies Invitrogen, Carlsbad, USA

Sodium Pyruvat MEM, Life Technologies Invitrogen, Carlsbad, USA

Stemspan SFEM Medium, Stemcell Technologies, Grenoble, France

T4 DNA Ligase, Fermentas, St. Leon-Rot

Trypan-Blau (0,4 %) Sigma, Deisenhofen

Trypsin/EDTA 0,05 %, Life Technologies Invitrogen, Carlsbad, USA

Versuchssubstanz: Nilotinib: NVP-AMN107-AA, Novartis Institutes for BioMedical Research, Oncology

3.1.4b Puffer:

Macs-Puffer (PBS + 0,5 BSA und 2mM EDTA)

Blockpuffer (2% BSA in PBS)

Erythrozytenlysepuffer (8,3g NH₄Cl, 1,0g KHCO₃, 0,0372g Mg-Titriplex auf 1l Wasser + mit 5M KOH auf pH 7,4 einstellen)

3.1.5 Kits:

Lineage Cell Depletion Kit (mouse), MiltenyiBiotec, Gladbach

CD3e Microbeads Kit (mouse), MiltenyiBiotec, Gladbach

Miniprep Kit, Qiagen, Hilden

Qiamp DNA Blood Mini und Micro Kit, Qiagen, Hilden

Qiaprep Spin Mini und Maxiprep, Qiagen, Hilden

Qiaquick Gelextraktionskit, Qiagen, Hilden

3.1.6 Zytokine:

Cocktail A:

SCF recombinant murine 10µg, Peprotech, USA

Fl+3-Ligand recombinant human, 10µg, Peprotech, USA

IL-11 recombinant human, 10µg, Peprotech, USA

IL-3 recombinant human, 10µg, Peprotech, USA

Cocktail B:

SCF recombinant murine 10µg, Peprotech, USA

TPO recombinant murine 10µg, Peprotech, USA

FGF-acidic recombinant human 10µg, Peprotech, USA

IGF2, recombinant murine 50µg, Peprotech, USA

3.1.7 Primer:

für die PCR und die Kontrollsequenzierungen wurden spezielle Primer designt, hierfür wurde die Software der Firma Eurofins MWG Operon genutzt, hier wurden die Primer ebenfalls bestellt. Primersequenzen:

bcrab13: 5`-TGGGTCCCAAGCAACTACATCAC

CS697: 5'-TGCTTTACATGTGTTTGTAGTCGAGGT

Bcrab1 Blut rev: GCACACCGGCCTTATTCCAAGC

Bcrab14: GAAATCAGTGACATAGTGCAGAGG

Bcrab18: 5'- TTTCCACCCAAATCAAGAGC

Bcrab19: 5'- ACAGTGGCTGACAAGGGACT

3.1.8 Medien für die Zellkultur

Für die Kultur der Zelllinien wurden RPMI 1640 und DMEM GlutaMAX als Grundmedien verwendet, welche mit 1 % Penicillin/Streptomycin, 1% Natrium Pyruvat und 10 % FCS supplementiert wurden. RPMI 1640 musste zusätzlich mit L-Glutamin supplementiert werden, DMEM mit 25 mM HEPES. Für die transduzierten Stammzellen wurde mit dem supplementierten RPMI, jedoch ohne Pen/Strep als Zusatz gearbeitet. Zusätzlich wurde für die Stammzellen das StemSpan Medium (SFEM) der Firma Stemcell Technologies verwendet.

3.1.9 Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien wurden freundlicher Weise von der AG Fehse zur Verfügung gestellt:

1. HEK 293T Zellen (humane embryonale Nierenzelllinie)
2. NIH3T3 Zellen (murine embryonale Fibroblasten Zelllinie)
3. BA/F3 Zellen (murine prä B-Zelllinie)

3.2 Methoden

3.2.1 allgemeine zellbiologische Methoden

Zentrifugation: Abgesehen von den näherbezeichneten wurden alle Zentrifugationen bei 426 x g, Raumtemperatur (RT) und für 5 Minuten durchgeführt.

Kryokonservierung von Zellen: Die Zellen wurden mittels Neubauer-Zählkammer gezählt, zentrifugiert und in der Menge Einfriermedium (90% *fetal calf serum* (FCS) und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO)) aufgenommen, die benötigt wurde, um die erforderliche Konzentration pro Kryotube (5×10^7 für Spenderlymphozyten, $3-5 \times 10^6$ für Zelllinien) zu erzielen. Diese Zellsuspension wurde, in 1ml Fraktionen aufgeteilt, in Kryotubes pipettiert und in einem Kryo-Einfriergerät im -80°C Gefrierschrank kontinuierlich (1°C pro Minute) heruntergekühlt. Am Folgetag wurden die Kryotubes in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Zellen revitalisieren: Die Zellen enthaltenden Kryotubes wurden im 37°C Wasserbad geschwenkt, bis sich ein kleiner Flüssigkeitssaum bildete. Der Inhalt des Kryotubes wurde in entsprechend passendes Medium (z.B. DMEM+ für 293T-Zellen) in einem Falcon-Röhrchen dekantiert. Um evtl. vorhandene Zellreste im Kryotube nicht zu verlieren, wurde dieses noch einmal mit 1ml Medium ausgespült. Anschließend wurde das Röhrchen zentrifugiert und der Überstand verworfen, um das DMSO zu entfernen. Das Zellpellet wurde nun in frischem Medium aufgenommen und weiter kultiviert.

Zellzahlbestimmung mit Neubauer-Zählkammer: Mit einer Neubauer-Zählkammer lässt sich unter dem Lichtmikroskop die Zellzahl/ml einer Zellsuspension bestimmen. Es kann entweder pur gezählt werden, für einen groben Überblick oder in einer geeigneten Verdünnung (variiert nach Konzentration, üblich sind z.B. 1/10 oder 1/100) mit Trypanblau. Trypanblau färbt letale Zellen an und lässt somit zwischen vitalen und letalen Zellen unterscheiden, um die Konzentration und gegebenenfalls Vitalität der Zellen in einer Flüssigkeit zu bestimmen. Es kann auch eine Leukozytenzählung im Blut mit Hilfe von Türkslösung vorgenommen werden, hierbei werden die Erythrozyten durch die enthaltene Essigsäure zerstört und es leuchten nur noch die Leukozyten auf. Grundsätzlich werden 4 Großquadrate gezählt und dann nach folgender Formel die Zellkonzentration bestimmt: Mittelwert der 4 Großquadrate x Verdünnungsfaktor (z.B. 10 oder 100) * Kammerfaktor (10000) = Zellzahl/ml. Dieser Wert kann abschließend noch mit dem Volumen der Zellsuspension multipliziert werden um die gesamte Zellzahl zu ermitteln.

Transformation: Es wurden 1-100ng DNA in Wasser zu den aufgetauten kompetenten Bakterien (E. coli) gegeben, diese 30 Minuten auf Eis gestellt, zwei Minuten auf 42°C erhitzt, wieder zwei Minuten auf Eis abgekühlt, mit 900µl LB-Medium aufgefüllt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation der Mischung zwei Minuten bei 6000rpm und RT, sowie Resuspendieren in 100µl LB-Medium. Die Suspension wurde auf LB+Ampicillin-Agarplatten mit einem Drigalskispatel ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Bakterien, die ein Plasmid mit Ampicillinresistenz aufgenommen hatten, wuchsen zu Kolonien und konnten zur DNA-Gewinnung genutzt werden.

3.2.2 Umklonierung von Plasmiden

3.2.2a Lentivektoren:

Für die ersten Transduktionen der Stammzellen wurden zwei Lentiviren genutzt, die folgenderweise hergestellt wurden:

1. „Wildtyp-Bcr-Abl-Vektor“ (WT-Bcr-Abl-Vektor)

Plasmidpräparation: Grundlage für die Vektorklonierung war hier der MSCVp210eGFP Vektor, der von der AG Dr. Dr. Stefan Balabanov zur Verfügung gestellt wurde und der Lego-IG2 Vektor der AG Prof. Dr. Boris Fehse. Ersterer enthält das p210 Bcr-Abl-Fragment (ligiert über EcoRI) in einem MIEG3 Vektor. Zur Vervielfältigung wurden daraus eine Transformation und anschließend ein Maxiprep durchgeführt.

Restriktionsverdau: Aus diesem Plasmid wurde nun das WT-Bcr-Abl Fragment mittels EcoRI herausgeschnitten, wobei Scal (schneidet einmal im Vektor) zur besseren Auftrennung ebenfalls hinzugegeben wurde (4µg DNA, je 1µl Enzym, mit Wasser und Puffer auf 20µl auffüllen, 2h bei 37°C verdauen). Zeitgleich wurde der Lego-IG2 Vektor mittels EcoRI aufgeschnitten (4µg DNA, 1µl Enzym, mit Wasser auf 20µl auffüllen, 1h bei 37°C verdauen) und dann durch Zugabe von CIAP (Calf intestine Alkaline Phosphatase) vor der Selbstligation geschützt (1µl CIAP, 1h bei 37°C inkubieren).

Gelelektrophorese: Es folgte eine gelelektrophoretische Auftrennung (0,8%iges Agarosegel, 110V 2,5h Laufzeit) der einzelnen Fragmente und des aufgeschnittenen LegoIG2 Vektors.

Gelextraktion: Anschließend wurde das WT-Bcr-Abl-Fragment und der aufgeschnittene Vektor ohne Einfluss von UV-Licht aus dem Gel geschnitten und mittels Gelextraktionskit DNA gewonnen.

Ligation: Das WT-Bcr-Abl-Fragment wurde dann mit dem aufgeschnittenen Lego-IG2-Vektor ligiert (4 Teile Fragment auf 1 Teil Vektor, 1µl 5U/µl Ligase, 5h bei 16°C inkubieren) und anschließend transformiert.

Kontrollen: Aus den gewachsenen Kolonien wurden 8 ausgewählt und per Miniprep vervielfältigt. Die Hälfte des Miniprep-Ansatzes wurde zur Plasmid-DNA Gewinnung genutzt, der Rest für ein späteres Maxiprep aufbewahrt. Die gewonnene Plasmid-

DNA wurde nun auf die korrekte Lage des WT-Bcr-Abl-Fragmentes überprüft. Hierfür erfolgte ein Verdau mit 1) Acc651 und Not1 und 2) KpnI und NotI (1µg DNA, je 0,5µl Enzym, gesamt 15µl, 2h bei 37°C verdauen). Aus den Minis mit korrekter Lage des Fragments wurde nun ein Maxiprep angesetzt, welches aber eine zu geringe Plasmid-DNA-Ausbeute lieferte. Daher wurde eine neue Transformation aus der Plasmid-DNA, die aus den Minis gewonnen worden war, angesetzt und mit den gewachsenen Kolonien dann ein neues Maxiprep angeimpft, welches eine gute Plasmid-DNA-Ausbeute lieferte (1,03µg/µl).

2. „Bcr-Abl-T315I-Vektor“:

Plasmidpräparation: Grundlage für die Vektorklonierung war hier der Bcr-Abl-T315I in MIEG3 Vektor, der von der AG Dr. Dr. Sonja Loges zur Verfügung gestellt wurde und der Lego-IV2 der AG Prof. Dr. Boris Fehse. Ersterer enthält die TKI resistente T315I-Mutation (ligiert über EcoRI). Zur Vervielfältigung wurden daraus eine Transformation und anschließend ein Maxiprep durchgeführt.

Restriktionsverdau: Aus diesem Plasmid wurde nun das Bcr-Abl-T315I Fragment mittels EcoRI herausgeschnitten, wobei XbaI (schneidet zweimal im Vektor) zur Vermeidung zweier gleichgroßer Banden ebenfalls hinzugegeben wurde (4µg DNA, je 1,5µl Enzym, mit Wasser und Puffer auf 20µl auffüllen, 2h bei 37°C verdauen). Zeitgleich wurde der Lego-IV2 Vektor mittels EcoRI aufgeschnitten (4µg DNA, 1,5µl Enzym, mit Wasser auf 20µl auffüllen, 1h bei 37°C verdauen) und dann durch Zugabe von CIAP vor der Selbstligation geschützt (1µl CIAP, 1h bei 37°C inkubieren).

Gelelektrophorese: Es folgte eine gelelektrophoretische Auftrennung (0,8%iges Agarosegel, 100V, 1h45min Laufzeit) der einzelnen Fragmente und des aufgeschnittenen LegoIV2 Vektors.

Gelextraktion: Anschließend wurde das Bcr-Abl-T315I-Fragment und der aufgeschnittene LegoIV2 Vektor ohne Einfluss von UV-Licht aus dem Gel geschnitten und mittels Gelextraktionskit DNA gewonnen.

Ligation: Das T315I-Fragment wurde dann mit dem aufgeschnittenen Lego-IV2-Vektor ligiert (4 Teile Fragment auf 1 Teil Vektor, 1µl 5U/µl Ligase, 5h bei 16°C inkubieren) und anschließend transformiert.

Kontrollen: Aus den gewachsenen Kolonien wurden 8 ausgewählt und per Miniprep vervielfältigt. Die Hälfte des Miniprep-Ansatzes wurde zur Plasmid-DNA Gewinnung genutzt, der Rest für ein späteres Maxiprep aufbewahrt. Die gewonnene Plasmid-DNA wurde nun auf die korrekte Lage des T315I-Fragmentes überprüft. Hierfür erfolgte ein Verdau mit BamHI (1µg DNA, je 0,5µl Enzym, gesamt 15µl, 2h bei 37°C verdauen). Aus den Minis mit korrekter Lage des Fragments wurde nun ein Maxiprep angesetzt, um eine ausreichende Menge an Plasmid-DNA zur Verfügung zu haben.

3.2.2b Gammaretrovektoren:

Für die späteren Transduktionen der Stammzellen wurden zwei eigens für diesen Zweck klonierte γ-Retroviren genutzt. Dafür waren folgende Schritte notwendig (der besseren Übersicht wegen in Stichpunkten dargestellt):

1. „WT-Bcr-Abl-Vektor“:

- Verdau des Legol2+WT-Bcr-Abl-Vektor (dieser entstand im Vorfeld der Versuche durch Umklonierung aus dem MSCVp210eGFP-Vektor von Dr. Dr. Stefan Balabanov, UKE) mittels der Enzyme EcoRI (schneidet WT-Bcr-Abl Fragment heraus) und Scal (schneidet im Vektorbackbone für bessere Auftrennung): 4µg DNA, je 1µl Enzym, 1µl Fast Digest Puffer Green und auf 20µl mit Wasser auffüllen. 30 Minuten Inkubation bei 37°C, 10 Minuten Inaktivierung bei 80°C.
- Auftrennung der drei Fragmente durch Gelelektrophorese im 1%-igen Agarosegel bei 80V, Extraktion des WT-Bcr-Abl-Fragmentes aus dem ausgeschnittenen Gel, mittels Gelextraktions Kit. Konzentration 36,2ng/µl
- Verdau des M387 Retrovirus nach gleichem Schema mit EcoRI
- Zugabe von 1µl Fast-AP (alkalische Phosphatase), als Selbstligationsschutz 30 Minuten Inkubation bei 37°
- Aufreinigung durch Gelelektrophorese in 0,8%-igem Agarosegel bei 130V und DNA-Extraktion aus dem Gel durch das Gelextraktionskit. Konzentration: 65,3ng/µl
- Ligation durch Zugabe von T4 Ligase im Verhältnis 4 Teile Fragment auf 1 Teil Vektor mit dem WT-Bcr-Abl Fragment über Nacht bei 16°C

- Transformation in kompetenten Bakterien
- Auswahl von 5 Kolonien und Überführung in je 4ml LB+Ampicillin-Medium, Inkubation über Nacht in einem 37°C Inkubator mit Schüttelfunktion.
- Plasmid-DNA-Extraktion aus den 2ml der Bakteriensuspension mittels Miniprep-Kit. Konzentration: 360,6 ng/µl
- Kontrolle der korrekten Lage in 5'3' Richtung des WT-Bcr-Abl-Fragment in den fünf Proben mittels Verdau mit den Enzymen PmlI und BamHIII, nach obigem Schema.
- Gelelektrophorese und Kontrolle der Banden
- Auswahl einer Probe mit richtigem Vektoraufbau und höchster Konzentration (176,9ng/µl), Überführung der restlichen 2ml Bakteriensuspension in 250ml LB+Ampicillin-Medium und Inkubation über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator.
- Plasmid-DNA-Extraktion mittels Maxiprep-Kit, Konzentration: 1591,4 ng/µl 500µl.
- Kontrollsequenzierung der DNA, mit zwei Primern, wobei einer zum Nachweis von WT-Bcr-Abl (Bcrabl 3) und einer zum Nachweis von GFP (CS697) im Plasmid diente. Für beides lag zwei Tage später ein positiver Nachweis vor.

2. „Bcr-Abl-T315I Vektor“

- Verdau des M387 Vektors mit BsrGI und PmlI unter gleichen Bedingungen zur Entfernung des GFP
- Auftrennung mittels Gelelektrophorese im 1,2-%-igen Gel bei 110V Spannung und DNA-Extraktion mit dem Gelextraktionskit. Konzentration: 73,3ng/µl
- Reinheitskontrolle mittels Gelelektrophorese
- Ligation des eröffneten M387 Vektor mit dem Venusfragment, welches freundlicherweise von Dr. Kerstin Cornils, UKE bereitgestellt wurde. Durchführung wie oben beschrieben, aber nur 3 Teile Fragment (Venus) pro Vektor.
- Transformation des Plasmids in kompetenten Bakterien
- Überführung von 8 Kolonien in je 4ml LB+Ampicillin-Medium und Inkubation über Nacht bei 37°C
- Plasmid-DNA-Extraktion mittels Miniprep-Kit. Konzentration: 72ng/µl.
- Kontrollverdau mit PmlI und BsrGI bzw. HindIII (gleiche Vorgehensweise wie oben) und Gelelektrophorese
- Auswahl einer Probe mit richtigem Vektoraufbau, Überführung in 250ml frisches LB+Ampicillin-Medium und Inkubation über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator
- DNA-Extraktion mittels Maxiprep von Quiagen. 100µl, Konzentration 469,3ng/µl.

- Verdau des LegoIV2+T315I-Vektors (dieser entstand im Vorfeld der Versuche durch Umklonierung eines Retrovirus von Sonja Loges, UKE) mit den Restriktionsenzymen EcoRI (schnitt Bcr-Abl-T315I-Fragment heraus) und Scal (bessere Auftrennung) und Gelelektrophorese nach obigem Protokoll.
- DNA-Extraktion aus dem Gelschnitt mit Gelextraktionskit. Konzentration: 53,7ng/μl.
- Verdau des zuvor erstellten Vektor M387+Venus mit EcoRI und Eigenligationsschutz wie oben mittels Fast-AP.
- Aufreinigung durch Gelelektrophorese und –extraktion. Konzentration: 18,7ng/μl.
- Ligation des aufgeschnittenen M387+Venus-Vektor mit dem Bcr-Abl- T315I-Fragment im Verhältnis 1:4
- Transformation in kompetenten Bakterien
- Auswahl von fünf Kolonien, Überführung in je 4ml LB+Ampicillin-Medium und Inkubation über Nacht bei 37°C
- Plasmid-DNA-Extraktion mit Miniprep-Kit.
- Lagekontrolle des Bcr-Abl- T315I-Fragments in den fünf Proben mittels Verdau, wie beim WT-Bcr-Abl-Vektor beschrieben.
- Aufgrund zu geringer DNA-Konzentration in der positiven Probe, erneute Transformation und anschließende Überführung in 250ml LB+Ampicillin-Medium und Inkubation über Nacht bei 37°C
- Plasmid-DNA-Extraktion mit Maxiprep-Kit. 500μl, Konzentration 1558,6ng/μl.
- Kontrollsequenzierung wie oben mit positivem Ergebnis für den Bcr-Abl-T315I und Venus-Nachweis. Ersterer wurde über die Punktmutation sequenziert.

Transfektion von viralen Plasmiden:

Zur Gewinnung von Virusüberstand wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

- Aussaat von $4-5 \times 10^6$ 293T-Zellen je Zellkulturplatte und Inkubation über ca. 12h, so dass sie am nächsten Tag eine Konfluenz von etwa 75% haben.
- Elution der Plasmide zur Virusproduktion nach folgendem Schema (pro 10cm Zellkulturschale) in steril filtriertem Wasser.

Für Lentiviren:

Tabelle 4	
Bestandteil	µg
Vektor	10
lenti gag pol	10
rev	5
VSVG env	2
H2O add to	500

Tabelle 4: Pipettierschema für Lentivirentransduktion

Für γ-Retroviren:

Tabelle 5	
Bestandteil	µg
Vektor	8
retro gag pol	6
Eco env	3
H2O add to	500

Tabelle 5: Pipettierschema für Y-Retrovirentransduktion

- Mediumwechsel der 293T-Zellen für bessere Aufnahmebereitschaft: Absaugen des Standardmediums (Medium A) und Auffüllen mit Medium A + 25µM Chloroquine.
 - Vorlegen von je 500µl HBS-Puffer pro 15 ml Röhrchen pro Platte.
 - Zugabe von 50µl CaCl₂-Lösung (2,5M) zu den Virusbestandteilen und Mischung durch vortexen
 - Tröpfchenweise Zugabe der Virusbestandteile in das 15ml Röhrchen gegeben, während durch eine 2ml Plastikpipette Luft in den HBS-Puffer geleitet wurde.
 - Inkubationszeit von 10-20 Minuten bei Raumtemperatur
 - Verteilung von 1ml Plasmid-HBS-Gemisch pro Platte: mäanderförmiges Auftragen auf die Zellen und anschließendes leichtes Schwenken der Platte.
 - Mediumwechsel: nach 6 Stunden Inkubation im Brutschrank bei 37°C, Absaugen des Mediums und Ersatz durch 10ml frisches Medium A.
 - Virusernte nach 24 Stunden: Abnahme des Mediums und Überführung in ein 50ml Röhrchen, Zentrifugation 2 Minuten bei 2000 rpm um eventuell mitabgelöste Zellen zu entfernen und anschließende Filtration der restlichen Zelltrümmer durch einen 0,45µm Filter in ein Corex-Zentrifugenglasröhrchen.
 - Ankonzentration des Virusüberstandes durch Zentrifugation über Nacht bei 8000xg und 4°C.
 - Verwerfen des Großteils des Überstandes und gründliches Resuspendieren der verbleibenden (etwa 300µl) Flüssigkeit
 - Lagerung des Virus in 2ml Eppendorfreaktionsgefäßen bei -80°C.
- Der letzte Zentrifugationsschritt über Nacht war nur für Lentiviren nötig, da bei diesen ohne Ankonzentration kein annehmbarer Titer erreicht wurde.

Bestimmung des Virustiters: Um den Titer des gewonnenen Virus zu bestimmen, wurden 5×10^4 293T-Zellen (bzw. NIH3T3-Zellen für Viren mit einer Eco-Hülle) pro Well einer 24-Well-Platte ausgesät und 2-5 Stunden bei 37°C inkubiert. Dann wurde 0,5µl Polybrene pro Well dazugegeben und der aufgetaute Virusüberstand auf die adhärennten Zellen pipettiert. Dies erfolgte in aufsteigender Menge: 0,1 µl, 1µl, 10µl, 100µl pro Well. Nach einstündiger Zentrifugation bei RT und 1000xg und Inkubation über Nacht bei 37°C wurde am folgenden Tag das Medium abgesaugt und durch neues Medium (ohne Polybrene) ersetzt. Am vierten Tag nach Beginn der Titration konnte nun mittels Durchflusszytometrie der Titer bestimmt werden.

3.2.3 Transplantationsversuche

Mäuse: als Spendertiere wurden männliche C57Bl/6 im Alter von 8-10 Wochen, sowie männliche Balb/c im selben Alter verwendet. Als Empfängertiere wurden weibliche Balb/c im Alter von 8-10 Wochen genutzt. Sämtliche Mäuse wurden aus der Versuchstierhaltung des UKE bezogen und im S1 Bereich in keimarmer Umgebung, in individuell belüfteten Käfigen (*individual ventilated cage*, IVC) gehalten. Ab dem Tag der Bestrahlung erhielten die Mäuse eine Antibiotikaprophylaxe durch Baytril. Dieses wurde 0,02%ig dem Trinkwasser zugesetzt.

Ablauf eines Transplantationsversuches: Die Transplantationsversuche erfolgten immer nach folgendem Schema. Eine tägliche Gewichtskontrolle der Tiere erfolgte ab dem Tag der Transplantation.

- d-4: Knochenmarkpräparation, Stammzellseparation und Stimulation über 72h
- d-1 : Transduktion der Stammzellen
- d0: Knochenmarkpräparation für Knochenmarksupport, Bestrahlung der Tiere mit 8,5Gy und anschließende Transplantation
- d2: *fluorescence-activated cell sorting* (Facs) -analyse der transplantierten Stammzellen zur Berechnung der relativen Zahl maligner Zellen im Transplantat. Dieser lässt sich erst drei Tage nach Transduktion bestimmen, da erst zu diesem Zeitpunkt die Zellen das GFP exprimieren.

- d12: Blutentnahme und Facsanalyse
- d13: Beginn der Behandlung

Knochenmarkdepletion zur Gewinnung von Stammzellen: Um Stammzellen für die Transduktion zu gewinnen, wurde den Spendermäusen vier Tage vor der geplanten Transplantation unter sterilen Bedingungen (Sicherheitswerkbank, sterile Instrumente) Knochenmark aus Femur- und Tibiaknochen entnommen, nachdem die Tiere mittels CO₂ getötet worden waren. Die Knochen wurden von Geweberesten befreit, an beiden Enden durch Abschneiden eröffnet und das Knochenmark mittels Einwegkanüle und Spritze aus ihnen herausgespült. Das Knochenmark wurde je Tier in 10ml P/S-haltigem Medium aufgenommen, zentrifugiert und in 10ml Erylysepuffer resuspendiert. Das gesamte Knochenmark einer Mauslinie wurde gepoolt und für 2 Minuten bei RT inkubiert. Es wurden 15ml PBS hinzugefügt, zentrifugiert und in passender Menge PBS resuspendiert. Mittels Neubauer-Zählkammer wurde die Zellzahl bestimmt und die Stammzellen dann mit dem Lineage-Cell-Depletion-Kit aus dem Knochenmark aufgereinigt. Hierbei wurden reife blutbildende Zellen mit Antikörpern markiert und anschließend magnetisch mittels MACS-Säule und Separator von den Stamm- und Vorläuferzellen getrennt. Die Stammzellen wurden in Stemsan-Medium aufgenommen und weiter verarbeitet.

T-Zell-Depletion des Knochenmarks für Knochenmarksupport: Die Entnahme und Aufreinigung des Knochenmarks erfolgte wie oben beschrieben. Für den Knochenmarksupport wurde nur Knochenmark von männlichen C57Bl/6 Mäusen verwendet, welches am Tag der Transplantation entnommen wurde. Die T-Zell-Depletion erfolgte mit dem CD3 ϵ -Depletion-MicroBead-Kit, bei dem CD3 ϵ ⁺ Zellen, also T-Zellen und NK-Zellen mit Antikörpern markiert und somit aus dem Transplantat entfernt werden. Das CD3 ϵ ⁻ Knochenmark wurde in PBS resuspendiert, und bis zur Verwendung auf Eis gekühlt.

Stammzelltransduktion: Die murinen Stammzellen wurden direkt nach der Isolation aus dem Knochenmark über 3 Tage bei 37°C mit einem Cytokin-Cocktail inkubiert. Die Zytokine lagen gelöst in PBS + 0,1% BSA vor und wurden im Verhältnis 1/10000 in das Medium der Stammzellen gegeben. Für die eigentliche Transduktion wurden folgende Schritte durchgeführt

- Beschichtung der Wells einer 6-Well Platte mit je 2ml Retronektin (48 µg/ml), zwei Stunden Inkubation bei RT und absaugen
- Zugabe von je 2ml Blockpuffer (2% BSA in PBS), 30 Minuten Inkubation bei RT und absaugen
- Zweimaliges Spülen des Wells mit HBSS 1x + 2,5% HEPES 1M.
- Auftragen von bis zu 2ml Virus, je nach Virustiter und gewünschter MOI (hierbei handelt es sich um die s.g. „Multiplicity of infection“, die sich wie folgt berechnet:

$$MOI = \frac{Volumen(Virus) \cdot Konzentration(Virus)}{Volumen(Zellkultur) \cdot Konzentration(Zellkultur)} = \frac{V_v \cdot C_v}{V_z \cdot C_z}$$

- 30-minütige Zentrifugation bei 1000xg und 4°C und absaugen
- Wiederholung der letzten beiden Schritte bis zu dreimal möglich, zur Erhöhung der MOI
- Zugabe von 1×10^6 Stammzellen in 2ml je Well und Inkubation über Nacht bei 37°C.
- Mediumwechsel zur Entfernung des Retronektins: Überführung der Zellen in ein 50ml Falcon Röhrchen, mehrmaliges kräftiges Spülen des Wells mit PBS und Zentrifugation.
- Resuspension der Stammzellen in entweder PBS für die Transplantation oder zytokinhaltigem Medium für die Aussaat auf einer 96Well Platte und anschließende durchflusszytometrische Analyse nach weiteren 48h Inkubation bei 37°C.

Vorbereitung des Transplantats: Das Transplantat bestand aus den transduzierten Stammzellen und dem Knochenmarksupport. Pro Maus wurden 5×10^6 Zellen Knochenmarksupport und variierende Mengen transduzierter Stammzellen verwendet, die zusammen in 150µl PBS gelöst wurden und direkt transplantiert wurden.

- Am dritten Tag nach der Transduktion konnten die Stammzellen per Durchflusszytometrie analysiert und so die Transduktionsrate bestimmt werden.

Scoring der Tiere:

Eine vorzeitige Tötung erfolgte ab einer Gesamtpunktzahl von mehr als 25.

Die Untersuchung der Tiere auf Körpergewicht, Spontanverhalten, Atmung und Fellbeschaffenheit wurde 1x täglich ab Knochenmarktransplantation bis zum Ende der Beobachtungszeit von 6 Wochen durchgeführt.

Tabelle 6	
Punktebewertung:	
Körpergewicht	
unbeeinflusst oder Anstieg	0
Gewichtsreduktion 5-10%	5
Gewichtsreduktion 11-20%	10
Gewichtsreduktion >20%	20
Spontanverhalten	
normal	0
eingeschränkte Motorik o. Hyperkinetik	5
Selbstisolation, Lethargie, ausgeprägte Hyperkinetik	10
Schmerzlaute beim Ergreifen, Autoaggression	20
Atmung	
Atmung normal	0
leichte Luftnot (leichtes Hecheln)	5
starke Luftnot	20
Fell	
normal (glatt, glänzend)	0
gesträubt	5
struppig	10

Tabelle 6: Scoring der Tiere

Blutentnahmen: Die Blutentnahmen erfolgten in CO₂ (80%)/O₂ (20%) Narkose retrobulbär mit einer Glaskapillare. Es wurden 2-3 Tropfen, ca. 30µl für Kontrollen bzw. so viel wie möglich für Endanalysen entnommen. Das Blutvolumen wurde in 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen, die mit 10µl Heparinlösung gefüllt waren, aufgefangen und bei 4°C bis zur Analyse gekühlt.

Spenderlymphozytengewinnung: Spenderlymphozyten (DLI) wurden aus Milzen von männlichen C57Bl/6 Mäusen gewonnen. Die Milzen wurden direkt nach der Entnahme mit Hilfe eines planaren Stempels schonend und vorsichtig durch ein Zellsieb mit 70µm Porengröße gedrückt, zentrifugiert, in Erylysepuffer resuspendiert und fünf Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, durch jeweiliges Resuspendieren in PBS und darauf folgendes Zentrifugieren. Mit der Neubauer-Zählkammer wurde die Zellzahl bestimmt; die Milzzellen wurden in Einfriermedium (90% FCS+ 10%DMSO) aufgenommen und in 1ml Portionen à 5×10^7 Zellen kryokonserviert.

Spenderlymphozytengabe: Am Tag der Behandlung wurden die kryokonservierten DLIs revitalisiert, dreimal mit PBS gewaschen und einer Zellzählung unterzogen. Die Zellen wurden in der Menge PBS resuspendiert, die nötig war, um 150µl pro Maus mit der gewünschten Zellzahl verabreichen zu können. Die DLIs wurden intravenös in eine der Schwanzvenen der Maus injiziert, während die Maus in einem Schwanzveneninjektionsgestell (Restrainer) gehalten wurde.

Tyrosinkinaseinhibitoren auflösen: Nilotinib lag als Pulver vor. Es wurde mit 10% N-Methyl-2-pyrrolidon (NMP) und 90% PolyEthylenGlykol (PEG)300 gemischt und durch mehrmaliges vortexen und unter Verwendung eines Ultraschallbades gelöst. Die Lösung wurde pro Transplantationsversuch neu angesetzt und während des Versuchs bei -20°C in Eppendorfreaktionsgefäßen in je nach Mausanzahl variierenden Aliquots gelagert.

Tyrosinkinaseinhibitorengabe: Vor der Behandlung wurde die Nilotinib-Lösung aufgetaut und leicht erwärmt (etwa Handwärme). Nilotinib wurde einmal täglich oral verabreicht. Hierfür wurde eine Knopfkanüle aus Edelstahl und eine 1ml Einwegspritze verwendet, mit der die gewünschte Dosis genau verabreicht werden konnte. Die Lösung wurde kontinuierlich und schnell appliziert. Es wurden verschiedene Dosen getestet, diese wurden jeweils an das aktuelle Gewicht der Maus angepasst.

Endanalysen: Endanalysen wurden abhängig von der Punktzahl beim Scoring, Symptomen der GvHD (hierfür wurden Durchfall und Hautveränderungen beobachtet) und Gesamteindruck des Tieres durchgeführt. Entnommen wurden jeweils das größtmögliche Blutvolumen, die Milz und das Knochenmark. Begutachtet wurden außerdem die Lymphknoten, der Magendarmtrakt, die Leber, die Gallenblase

und die Lunge. Die Narkose der Tiere erfolgte durch CO₂/O₂, Tötung im Anschluss der Narkose durch CO₂ bzw. Genickbruch. Die Analyse erfolgte am Tag der Tötung mittels FACS.

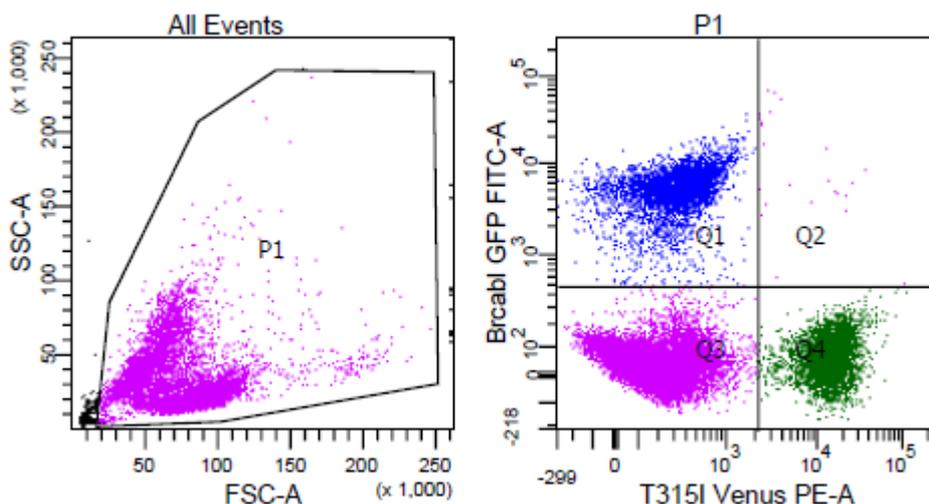
3.2.4 Nachweismethoden:

Durchflusszytometrie: Für alle durchflusszytometrischen Analysen wurde der FACS-Canto II von BD verwendet. Die Datenaufnahme und Auswertung erfolgte mit der BD FACSDiva Software.

Allgemeines zur Durchflusszytometrie: Die Durchflusszytometrie ermöglicht es, simultan Größe, Granularität, sowie unterschiedliche Fluoreszenzsignale von Zellen zu analysieren oder sogar per Counting Beads zu quantifizieren. Dafür werden Einzelzellsuspensionen mit Überdruck in das Analysegerät geleitet und dort in einem Hüllstrahl vereinzelt an einem Laser vorbeigeleitet. Dabei emittieren die Zellen spezifische Lichtsignale aus. Ein optisches Detektorsystem misst nun die je nach Zelle unterschiedlichen Lichtsignale. Das Detektorsystem besteht aus mehreren Detektoren. Der *forward scatter* (FSC)-Detektor misst das s.g. Vorwärtstreulicht, welches dem Teil des Streulichts entspricht, das bis zu einem Winkel von 10° zum einfallenden Licht gestreut wird. Der *side scatter* (SSC) Detektor misst dagegen den Anteil des Streulichtes, das in einem Winkel von 90° abgelenkt wird. Das Vorwärtstreulicht korreliert dabei mit der Querschnittsfläche bzw. der Zellgröße und das Seitwärtstreulicht mit dem Refraktionsindex bzw. der Granularität der Zelle. Daneben gibt es noch drei Fluoreszenzdetektoren, die die Intensität der Fluoreszenz messen. Fluoreszenz entsteht durch die Anregung von Fluorochromen durch Lichtenergie. Diese Energie sorgt dafür, dass Elektronen im Fluorochrom auf ein höheres Energieniveau gehoben werden. Fallen diese Elektronen dann wieder zurück ins Ursprungsniveau emittieren sie ein Photon, welches als Fluoreszenzlicht vom Detektor gemessen werden kann. Dieses Licht ist energieärmer, hat also eine längere Wellenlänge, als das anregende Laserlicht, da Energie in Form von Wärme verloren geht und ist spezifisch je nach Fluorochrom. Die Signalintensität wird in Volt gemessen und lässt sich linear oder logarithmisch darstellen. Da die Wellenlängenbereiche verschiedener Fluorochrome sich teils überlappen, ist bei der Messung mehrerer Fluoreszenzen zugleich, eine Kompensation notwendig. Hierbei

wird der sich überschneidende Anteil subtrahiert. Darstellungsformen sind zum einen der Dotplot, der in dieser Arbeit verwendet wurde, und bei dem jeder Punkt (Dot) eine Zelle repräsentiert (siehe Beispiel unten). Zum anderen gibt es den Histogrammplot, bei der die Zellzahl in Abhängigkeit von der Lichtintensität als Kurve dargestellt wird.

Anwendung als Nachweis der Leukämie: Als Routinenachweis für WT-Bcr-Abl und Bcr-Abl-T315I diente die Durchflusszytometrie mittels FACS-Gerät. Das WT-Bcr-Abl Fragment ist im Vektor mit einem GFP (grün) und die Bcr-Abl-T315I Variante mit einem Venus (gelb) Fragment kombiniert, daher exprimieren die leukämischen Zellen grünes bzw. gelbes Protein. und lassen sich somit in der Durchflusszytometrie nachweisen und voneinander abtrennen. GFP wurde im *Fluorescein isothiocyanate* (FITC) Kanal und Venus im *Phycoerythrin* (PE) Kanal des Gerätes gemessen. Für eine genaue Messung war ein Tausch der Filter im Gerät notwendig, sodass aus dem PE-Kanal ein Venus-Kanal und aus dem FITC-Kanal ein GFP-Kanal wurde. Wie in der folgenden Abbildung zu sehen ist, befinden sich die Venus-positiven Zellen unten rechts im Feld (Q3) und die GFP-positiven Zellen oben links (Q1). Hierzu wurden je mindestens 1×10^5 Zellen in FACS-Röhrchen überführt, zentrifugiert, in 100 μ l PBS resuspendiert und direkt im FACS gemessen. Die FITC bzw. GFP-Signale wurden im grünen Wellenlängenbereich und die PE bzw. Venus-Signale im gelben Wellenlängenbereich gemessen.



Vorbereitung der Proben für die FACS-Analyse: Es wurden nach Möglichkeit immer mindestens 2×10^4 Zellen gemessen, restliche Zellen der Proben wurde für spätere Analysen kryokonserviert.

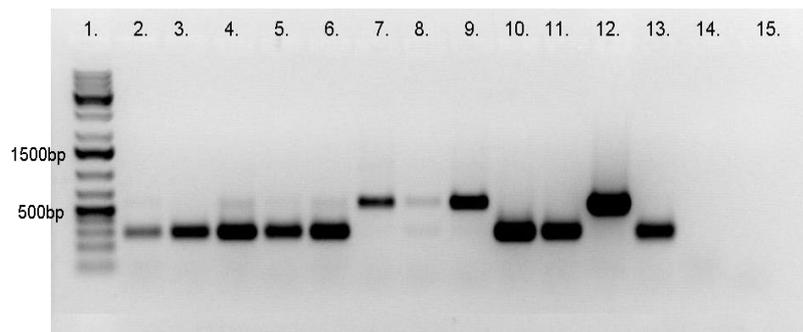
- transduzierte Stammzellen: Überführung von mindestens 1×10^5 Zellen aus dem Well in ein FACS-Röhrchen. Dieses wird mit PBS aufgefüllt und zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in ca. 100µl PBS resuspendiert
- Blutproben: Volumen der Blutprobe mit Pipette bestimmen und Zellzählung mit Türkslösung im Verhältnis 1:50 (variiert je nach Leukozytenzahl im Blut) durchführen. 1×10^5 Zellen in ein FACS-Röhrchen überführen und mit 1ml Erythrozytenlysepuffer auffüllen, fünf Minuten bei RT inkubieren, zentrifugieren und den Vorgang wiederholen bis das Pellet nur noch leicht rötlich ist. Pellet in ca. 100µl PBS resuspendieren
- Knochenmarkproben: Knochenmark zentrifugieren, in passender Menge (5-10 ml, je nach Pelletgröße) Erylysepuffer resuspendieren und zwei Minuten bei RT inkubieren. Mit PBS auffüllen, zentrifugieren, in passender Menge PBS resuspendieren und Trypanblauzählung durchführen. 1×10^5 Zellen in ein FACS-Röhrchen überführen, zentrifugieren und in ca. 100µl PBS resuspendieren.
- Milzproben: Milzen halbieren, durch 70µm Cellstrainer drücken, zentrifugieren, in 10ml Erylysepuffer resuspendieren und fünf Minuten auf Eis inkubieren. Mit PBS auffüllen, zentrifugieren, in passender Menge PBS resuspendieren und Trypanblauzählung durchführen. 1×10^5 Zellen in ein FACS-Röhrchen überführen, zentrifugieren und in ca. 100µl PBS resuspendieren.

PCR als Nachweis der Leukämie: Für den molekularbiologischen Nachweis, dass die WT-Bcr-Abl-Mutation bzw. die TKI-resistente Bcr-Abl-T315I Form in den Versuchstieren vorlag, wurde stichprobenartig die Polymerasekettenreaktion (als Nested-PCR) und eine anschließende Gelelektrophorese genutzt. Es wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

1. PCR		2. PCR	
	1x		1x
Wasser	1	Wasser	19
10x Green Puffer	2,5	10x Green Puffer	2,5
dNTPs	0,5	dNTPs	0,5
Primer Bcrabl 14	0,5	Primer Bcrabl 19 for	0,5
Primer Bcrabl Blut rev	0,5	Primer Bcrabl 18 rev	0,5
Dream Taq	1	Dream Taq	1
24µl MM pro Well + 1µl DNA		24µl MM pro Well + 1µl aus PCR1 1:100 verdünnt	
95°C	3min	95°C	3min
95°C	30sec	95°C	30sec
60°C	30sec	55°C	30sec
72°C	2min	72°C	45sec
72°C	10min	72°C	10min
10°C	hold	10°C	hold

Für die Gelelektrophorese wurde ein 1,5%-iges Agarosegel mit Ethidiumbromidanteil gegossen, die Proben neben einer DNA-Leiter als Orientierungshilfe aufgetragen und an ca. 100V Spannung angelegt. Unter UV-Licht und wurden die Banden sichtbar. Wie in der folgenden Abbildung zu sehen ist, lassen sich das WT-Bcr-Abl und das Bcr-Abl-T315I Fragment deutlich voneinander trennen, da die Bcr-Abl-T315I Variante kürzer ist, somit in der Gelelektrophorese schneller fließt und weiter unten abgebildet wird.

- 1.1kb bp Plus DNA Ladder Fermentas
- 2.7311 (8,5Gy) Blut d13
- 3.7312 (8,5Gy) Blut d13
- 4.7313 (8,5Gy) Blut d13
- 5.7311 (8,5Gy) Milz d15
- 6.7313 (8,5Gy) Milz d15
- 7.7316 (8,5Gy) Milz d22
- 8.7316 (8,5Gy) Blut d22
- 9.7316 (8,5Gy) KM d22
- 10.7317 (8,5Gy) Milz d18
- 11.7317 (8,5Gy) KM d18
- 12.Transduzierte SC invitro Bcrabl
- 13.Transduzierte SC invitro T315I
- 14.Balb/c Blut unbehandelt neu (15.3.12)
- 15.Balb/c Blut unbehandelt alt



Erwartete Bandengröße:
Nested-PCR

Bcrabl: **564bp**
Bcrabl T315I: **282bp**

Abbildung 4: Beispiel einer Gelelektrophorese der zweiten PCR (1µl aus erster PCR 1:100 verdünnt) einer Nested PCR einiger Versuchstiere

4. Ergebnisse

4.1 Transduktionsversuche

4.1.1 Lentivektor

4.1.1a Klonierung der Legovektoren:

Das Mausmodell sollte auf Stammzellen, die mit einem lentiviralen Vektor transduziert werden basieren, daher wurden zu Beginn zwei Lentiviren kloniert, die das WT-Bcr-Abl Fragment bzw. die mutierte Variante Bcr-Abl-T315I enthielten (siehe Methodenteil).

WT-Bcr-Abl-Vektor: Mit Acc65I und NotI bzw. KpnI und NotI wurden jeweils der Ursprungsvektor MSCVp210eGFP, der Lego Ig2 und die Plasmid-DNA aus den Miniansätzen verdaut und per Gelelektrophorese aufgetrennt und verglichen. In zwei der Minis wurde die gleiche Bande wie im Originalvektor nachgewiesen, welches die richtige Lage des Fragments beweist.

Ganz links mit der Nummer 1 ist die GeneRuler 1kb Plus Ladder aufgetragen zur Bandengrößenbestimmung. Probe 2-8 verdaut mit Acc65I und NotI, Probe 9-15 verdaut mit KpnI und NotI.

- | | |
|-------------------|-------------------|
| 1. DNA Ladder | 9. Lego Ig2 |
| 2. Lego Ig2 | 10. MIEG3+Bcr-Abl |
| 3. MIEG3+ Bcr-Abl | 11. Mini 1 + |
| 4. Mini 1 | 12. Mini 2 |
| 5. Mini 2 | 13. Mini 3 |
| 6. Mini 3 | 14. Mini 4 |
| 7. Mini 4 | 15. Mini 5 |
| 8. Mini 5 | |

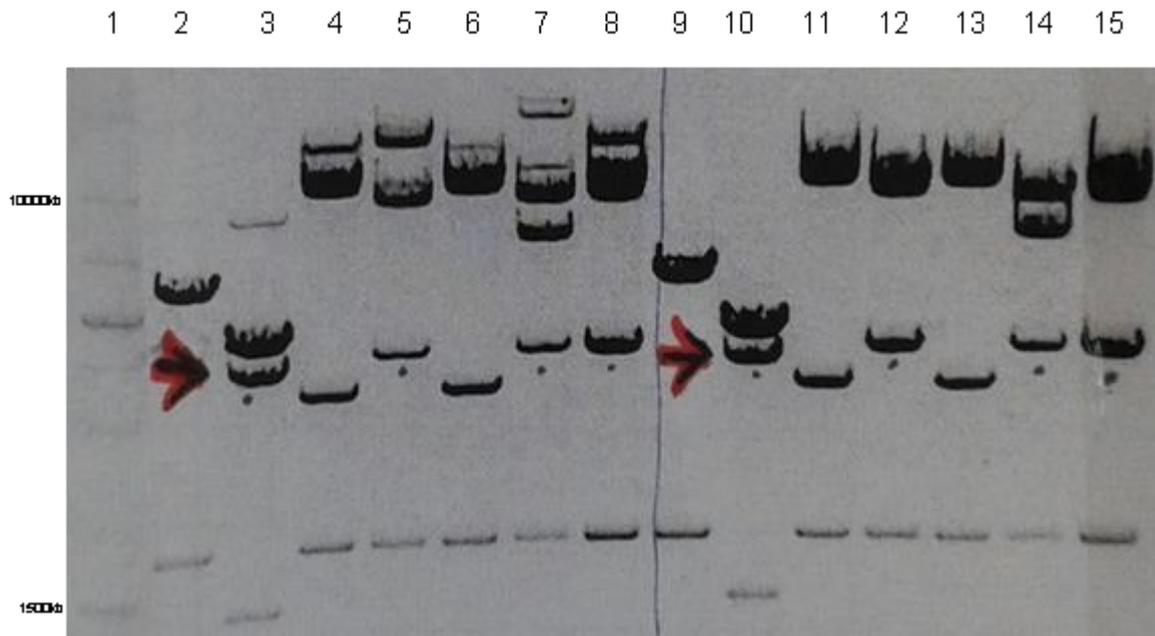


Abbildung 5: Gelelektrophorese des Restriktionsverdaus (WT-Bcr-Abl Lentivektor) mit Acc651 + Not1 bzw. Kpn1 + Not1. Mit Pfeilen gekennzeichnet sind die Proben, in denen das Insert korrekt eingebaut wurde. Mit 1 ist die DNA-Ladder als Marker bezeichnet.

T315I-Bcr-Abl-Vektor: Mit BamH1 wurden jeweils der Lego-IV2 und die Plasmid-DNA aus den Miniansätzen verdaut, per Gelelektrophorese aufgetrennt und verglichen. In zwei der Minis (1 und 5) wurden die korrekten Banden nachgewiesen (620kb, 1414kb und 12789kb, ergibt sich durch die drei Schnittstellen des BamH1-Enzyms im Vektor bei 3189,3809 und 5223kb bei korrekter Lage des Inserts. Bei Probe 1 nur zu erahnen.) Ganz links ist wiederum die 1kb Plus Ladder aufgetragen.

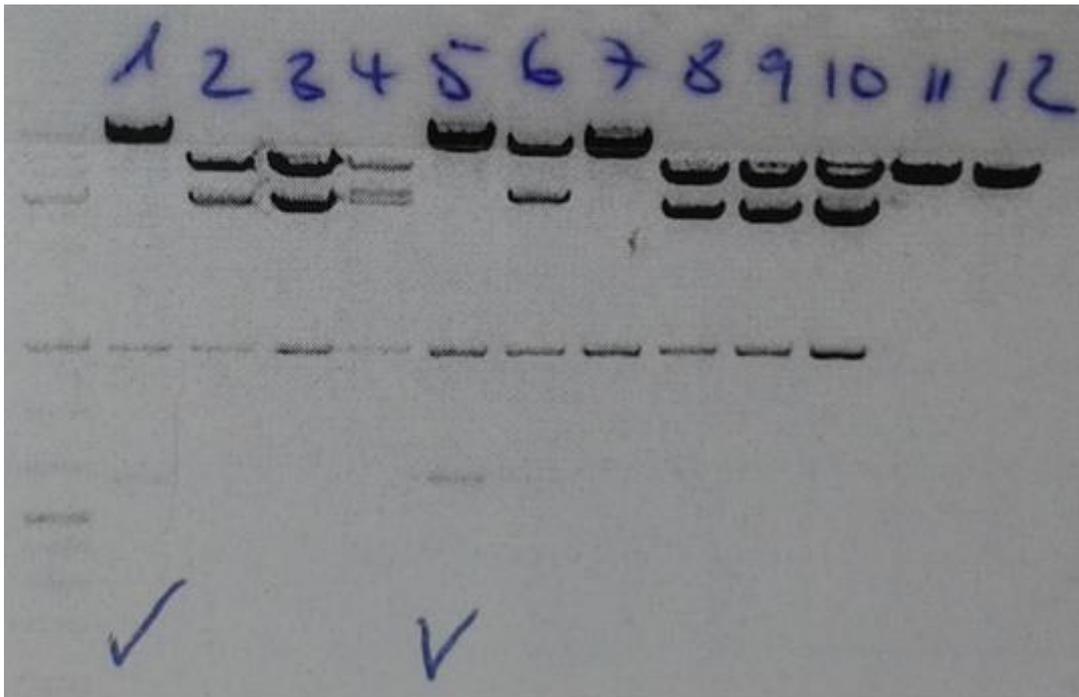


Abbildung 6: Gelelektrophorese des Restriktionsverdau (T315I-Lentivektor) mit BamH1. Mit Haken sind die Proben gekennzeichnet in denen das Isert korrekt eingebaut wurde.

4.1.1b Transfektion und Titration der Lego-Vektoren:

Die Transfektion und Titration der beiden Vektoren erfolgte nach den Protokollen im Methodenteil. Dabei wurden zwei verschiedene Hüllproteine verwendet, nämlich Eco und VSV-G, um herauszufinden, mit welchem ein höherer Titer und später eine höhere Transduktionsrate erreicht werden kann. Die Tabellen 7 und 8 zeigen den erzeugten Titer zu den jeweiligen Hüllproteinen und Erntezeitpunkten. Dabei steht z.B. Eco 12h für den Virusüberstand mit Eco Hüllprotein, der nach 12h Inkubation von den Produzentenzellen geerntet wurde.

Tabelle 7	
Probe WT-Bcr-Abl	Titer (IE/ml)
Eco 12h	$1,1 \times 10^5$
Eco 24h	$3,2 \times 10^5$
Eco 36h	$6,5 \times 10^4$
Eco 48h	$2,3 \times 10^4$
VSV-G 24h	$2,5 \times 10^6$
VSV-G 48h	$1,8 \times 10^5$

Tabelle 4: Übersicht der erzeugten Titer verschiedener WT-Bcr-Abl Virusproben mit unterschiedlichen Hüllproteinen (VSV-G aufkonzentriert und Eco) zu unterschiedlichen Erntezeitpunkten

Tabelle 8	
Probe Bcr-Abl-T315I	Titer (IE/ml)
Eco 12h	$1,9 \times 10^6$
Eco 24h	$3,0 \times 10^6$
Eco 36h	$9,3 \times 10^5$
Eco 48h	$5,3 \times 10^5$
VSV-G 24h	$7,8 \times 10^7$
VSV-G 48h	$5,8 \times 10^6$

Tabelle 5: Übersicht der erzeugten Titer verschiedener Bcr-Abl-T315I Virusproben mit unterschiedlichen Hüllproteinen (VSV-G aufkonzentriert und Eco) zu unterschiedlichen Erntezeitpunkten

Die Berechnung erfolgte mit folgender Formel:

Titer= Zellzahl im Well x Transduktionsrate in % (gemessen im Facs)/ verwendeter Virusüberstand in μl x 10

So ergibt sich z.B. für Eco 12h: $50000 \times 22,1/100\mu\text{l} \times 10 = 1,1 \times 10^5$

Der höchste Titer ergab sich jeweils für die 24h Ernte mit VSV-G Hüllprotein, allerdings lässt sich mit diesem Hüllprotein keine Mehrfach-Beschichtung der mit Retronektin vorbeschichteten Platten (Preloading) durchführen (Kühlcke et al. 2002). Unter Berücksichtigung der bekannten Zytotoxizität des VSV-G Hüllproteins und der nur auf murine Zellen eingeschränkten Pathogenität des ECO Hüllproteins wurde Letzteres für die Versuche gewählt. Damit verbunden war auch die Möglichkeit, die Transplantationsversuche unter S1 Bedingungen durchführen zu können und höhere MOI's (durch Preloading) zu erzielen, ohne die Gefahr der höheren Zytotoxizität bei der Transduktion der Stammzellen in Kauf nehmen zu müssen.

4.1.1.c Transduktion von BAF3 Zellen mit den beiden Lentivektoren

Als erster Test wurden BAF3-Zellen (murine Pro-B-Zelllinie, IL-3-abhängig) nach dem Retronektinprotokoll (siehe Methodenteil) mit dem WT-Bcr-Abl-Vektor mit einer MOI von 20 und mit dem Bcr-Abl-T315I-Vektor mit einer MOI von 10 transduziert. Nach 72h erfolgte eine Transduktionskontrolle mittels Facs-Analyse:

Tabelle 9		
Probenname	Transduktionsrate in %	Vitale Zellen in %
Bcr-Abl transduziert	25,5 GFP+	15,9
T315l transduziert	0,1 Venus+	91,5

Tabelle 9: Transduktionsraten und Vitalitätsraten der mit den beiden Lentivektoren transduzierten BA/F3-Zellen nach 72h

Nach der Transduktionskontrolle erfolgte ein IL-3 Entzug, nach 7 Tagen zeigten sich 70% GFP+ und 59% Venus+ Zellen bei 10% bzw 40% vitalen Zellen in der Kultur. Die WT-Bcr-Abl-positiven und die Bcr-Abl-T315l-positiven Zellen wachsen IL-3 unabhängig, die untransduzierten Zellen sterben durch den Zytokinentzug ab, daher nimmt der WT-Bcr-Abl / Bcr-Abl-T315l-positive Anteil zu. Nach einer weiteren Woche erfolgte eine Ficollgradientenzentrifugation, um die avitalen Zellen zu eliminieren. Die daraus entstandenen, zu > 80% vitalen Populationen wurden für die weiteren Analysen verwendet.

4.1.1.d Imatinibtestung der mit den beiden Lentivektoren transduzierten BA/F3-Zellen

Hierfür wurden 5×10^5 Zellen je Well einer 12-Wellplatte ausgesät, über 96h mit oder ohne Behandlung (5 μ M Imatinib) inkubiert und anschließend mit Trypanblau angefärbt und manuell unter dem Mikroskop gezählt.

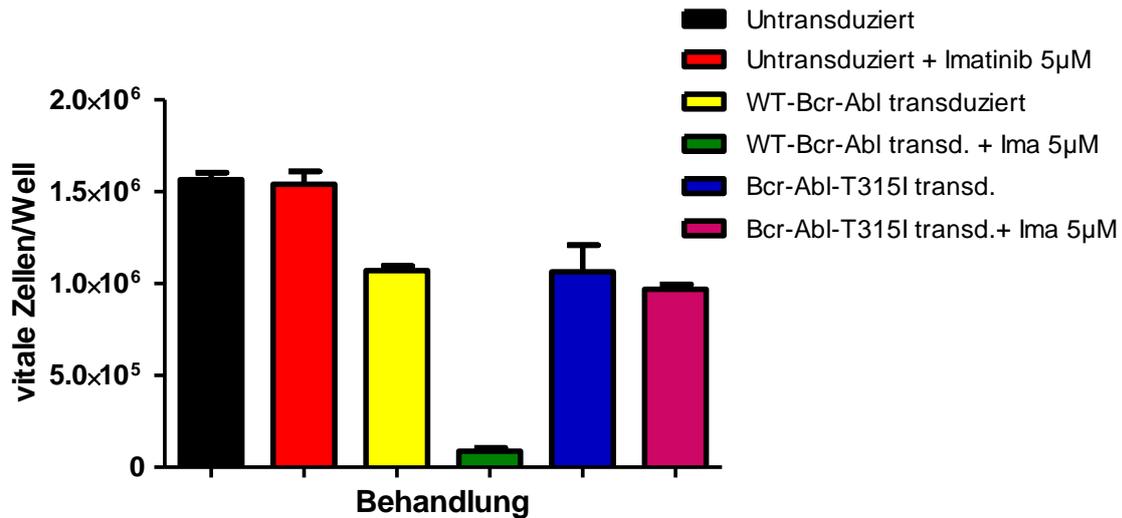


Abbildung 7: Vitale Zellen je Well nach 96h Inkubation mit/ohne Behandlung, dargestellt sind die Mittelwerte der Dreifachbestimmung mit Standardfehler

Die Testung zeigt, dass die WT-Bcr-Abl transduzierten Zellen unter der TKI Behandlung absterben, also sensibel sind und die T315I-Bcr-Abl transduzierten Zellen vital bleiben, also resistent sind.

4.1.1e Transduktion von murinen Stammzellen mit dem WT-Bcr-Abl und dem Bcr-Abl-T315I Lentivektor

Als nächstes erfolgte eine Transduktion von frischen murinen Stammzellen (SZ), da diese als Transplantat für die Mäuse genutzt werden sollten. Die Transduktion erfolgte ebenfalls nach dem Retronektinprotokoll und erbrachte folgende Ergebnisse in der Facsanalyse nach 72h:

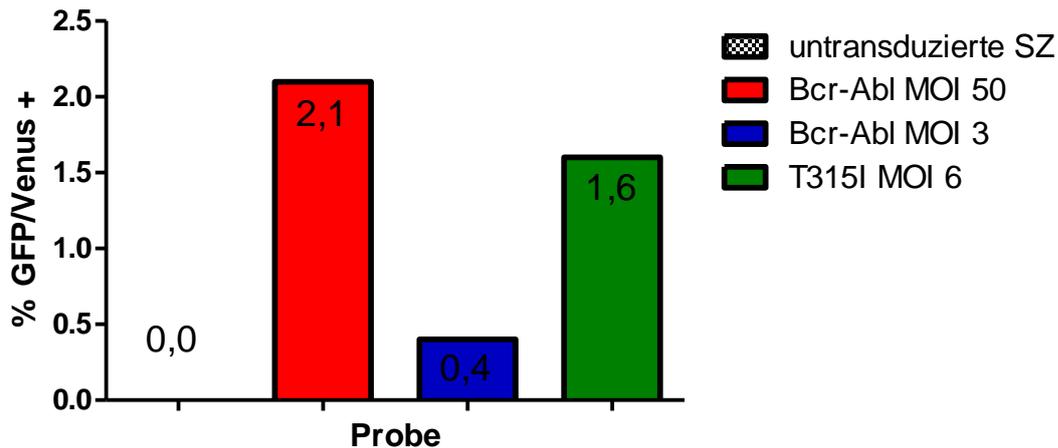


Abbildung 8: Transduktionsraten der murinen Stammzellen in %GFP+ (bei Transduktion mit WT-Bcr-Abl) bzw %Venus+ (bei Transduktion mit Bcr-Abl-T315I) bei verschiedenen MOIs nach 72h

Die Transduktion war erfolgreich, es zeigte sich, dass mit einer deutlich höheren MOI auch eine höhere Transduktionsrate erzielt werden kann. Außerdem wird mit der Mutationsvariante des Vektors auch bei geringerer MOI eine höhere Transduktionsrate erzielt.

Nach einer erfolglosen Transplantation (siehe 4.2) wurden zum einen eine evtl. zu geringe Transduktionsrate, zum anderen die Möglichkeit, dass die Stammzellen sich während der Stimulation schon ausdifferenzieren und folglich nicht mehr transduziert werden können, als ursächlich angesehen. Diese beiden Hypothesen wurden im Folgenden untersucht:

4.1.1f Stimulation von murinen Stammzellen mit zwei verschiedenen Zytokincocktails mit anschließender Facs-Färbung auf Stammzellmarker, an verschiedenen Zeitpunkten nach Entnahme

Zur Klärung der Vermutung, dass die transplantierten transduzierten Zellen nicht anwachsen, weil sie sich schon vor Transplantation ausdifferenzieren und zur Testung ob sich dies durch die Nutzung eines anderen Zytokincocktails aus mSCF, mTPO, mIGF-2, hFGF-A (Cocktail B - NEU) verhindern lässt, wurden frische murine Stammzellen mit je einem der beiden Cocktails stimuliert und an d0 (vor Stimulation), d2, d5 und d7 per Facs analysiert.

Tabelle 10	
d0	
Marker	% Parent
Isotyp PE	1,3
Isotyp APC	1,3
Sca1 pos	7,1
cKit pos	76,6
Sca1+cKit pos	4,6

Tabelle 6: Facsergebnisse vor Zytokin-Stimulation (d0). Dargestellt sind die prozentuellen Anteile der exprimierten Marker

Tabelle 11	
Marker	% Parent
Sca1 pos	5,8
cKit pos	75,3

Tabelle 7: Ergebnisse abzüglich Isotyp

Tabelle 12		
d2	ALT	NEU
Marker	% Parent	% Parent
Isotyp PE	1,1	0,5
Isotyp PerCP Cy5.5	1	1,3
Isotyp APC	1	0,7
Sca1 pos	6,8	12,3
cKit pos	5,2	76,4
CD3ε pos	0,6	0,7
Sca1+ cKit pos	0,2	7,8

Tabelle 8: Facsergebnisse an d2 der Stimulation. Gegenüberstellung der prozentuellen Anteile der Marker unter Stimulation mit dem alten und neuen Zytokincocktail.

Tabelle 13		
Marker	ALT	NEU
	% Parent	% Parent
Sca1 pos	5,7	11,8
cKit pos	4,2	75,7
CD3ε pos	0	0

Tabelle 9: Ergebnisse abzüglich Isotyp

Schon am zweiten Tag nach Stimulationsbeginn zeigen sich die Stammzellmarker Sca1 und cKIT unter dem neuen Cocktail deutlicher, als unter dem alten. Auch abzüglich der Isotypen als Korrekturwert, bleibt dieses Ergebnis eindeutig. Um zu zeigen, ob auch die Transduktionsrate durch die Verwendung des neuen Cocktails verbessert wird oder zumindest gleich effektiv verläuft, wurde an d2 nach Stimulationsbeginn eine Transduktion mit einem LeGoG2 Lentivektor mit VSV-G (enthält nur das GFP-Fragment) und einer MOI von 50 vorgenommen.

Tabelle 14		
Untransduziert d5 Marker	ALT % Parent	NEU % Parent
Isotyp PE	0,1	0,3
Isotyp APC	0,1	1
Isotyp PerCP Cy5.5	0,1	0,8
GFP pos	0	0
Sca1 pos	2,7	26,3
cKit pos	14,3	87,6
CD3e pos	0,1	0,9
Sca1+ cKit pos	0,5	21,2

Tabelle 10: Facsergebnisse an d5 der untransduzierten Zellen. Dargestellt sind im Vergleich die prozentuellen Anteile der Marker unter Stimulation mit dem alten und neuen Cocktail.

Tabelle 15		
untransduziert Marker	ALT % Parent	NEU % Parent
Sca1 pos	2,6	26
cKit pos	14,2	86,6
CD3e pos	0	0,1

Tabelle 15: Ergebnisse abzüglich Isotyp

Tabelle 16		
Transduziert d5 Marker	ALT % Parent	NEU % Parent
Isotyp PE	0,9	1,4
Isotyp APC	0,7	2,5
Isotyp PerCP Cy5.5	0,5	2
GFP pos	40,2	41,6
Sca1 pos	9,5	16,2
cKit pos	42,3	83,4
CD3e pos	0,6	2,2
Sca1+ cKit pos	3,9	11,6
GFP+ Sca1 pos	0,9	0,5
GFP+ cKit pos	7,6	8,8
GFP+ Sca1+cKit pos	1,1	1,9

Tabelle 16: Facsergebnisse an d5 der transduzierten Zellen. Dargestellt sind im Vergleich die prozentuellen Anteile der Marker unter Stimulation mit dem alten und neuen Cocktail

Tabelle 17		
transduziert Marker	ALT % Parent	NEU % Parent
Sca1 pos	8,6	14,8
cKit pos	41,6	80,9
CD3e pos	0,1	0,2

Tabelle 17: Ergebnisse abzüglich Isotyp

Wie zu sehen ist, steigen die beiden Stammzellmarker unter beiden Cocktails weiter an, unter dem neuen Cocktail immer noch deutlich stärker ausgeprägt. Die Transduktionsrate von 40,2 bzw. 41,6% ist bei beiden Cocktails nahezu identisch. Es zeigt sich, dass unter dem neuen Cocktail auch mehr transduzierte GFP+ Zellen mit Stammzellmarkern vorhanden sind, als unter dem alten. Im Vergleich zur Transduktion mit dem WT-Bcr-Abl Lentivektor werden mit dem GFP Lentivektor viel

höhere Transduktionsraten erreicht. Ursächlich hierfür ist vermutlich der Größenunterschied zwischen beiden Vektoren.

Tabelle 18		
Untransduziert d7 Marker	ALT % Parent	NEU % Parent
Isotyp PE	0,9	2,6
Isotyp APC	0,1	2,1
Isotyp PerCP Cy5.5	0,1	1,7
GFP pos	0,3	1,7
Sca1 pos	1,2	15,7
cKit pos	16,7	64,9
CD3e pos	0	1,9
Sca1+ cKit pos	0,1	6,2

Tabelle 18: Facsergebnisse an d7 der untransduzierten Zellen. Dargestellt sind im Vergleich die prozentuellen Anteile der Marker unter Stimulation mit dem alten und neuen Cocktail

Tabelle 19		
untransduziert Marker	ALT % Parent	NEU % Parent
Sca1 pos	0,3	13,1
cKit pos	16,6	62,8
CD3e pos	-0,1	0,2

Tabelle 19: Ergebnisse abzüglich Isotyp

Tabelle 20		
Transduziert d7 Marker	ALT % Parent	NEU % Parent
Isotyp PE	2,2	4,3
Isotyp APC	1,3	1,5
Isotyp PerCP Cy5.5	0,3	1,4
GFP pos	28,4	37,5
Sca1 pos	4,3	8,8
cKit pos	4,3	54,6
CD3e pos	0,4	1,5
Sca1+ cKit pos	0,4	3,4
GFP+ Sca1 pos	0,9	0,5
GFP+ cKit pos	1,4	4
GFP+ Sca1+cKit pos	0,2	0,5

Tabelle 20: Facsergebnisse an d7 der transduzierten Zellen. Dargestellt sind im Vergleich die prozentuellen Anteile der Marker unter Stimulation mit dem alten und neuen Cocktail

Tabelle 21		
transduziert Marker	ALT % Parent	NEU % Parent
Sca1 pos	2,1	4,5
cKit pos	3	53,1
CD3e pos	0,1	0,1

Tabelle 21: Ergebnisse abzüglich Isotyp

An d7 nach Stimulationsbeginn zeigt sich sehr deutlich der Unterschied, der durch die beiden Cocktails hervorgerufen wird: Unter dem alten Cocktail sind kaum noch Stammzellmarker nachweisbar, während unter dem neuen Cocktail diese noch deutlich exprimiert werden. Auch die GFP+ Stammzellmarker+ Zellen sind unter dem neuen Cocktail an d7 noch stärker vertreten, als unter dem alten. Auch die

Transduktionsrate an d7 scheint unter dem neuen Cocktail höher zu sein. Von nun an wurde also der neue Cocktail für sämtliche Transduktionen von Stammzellen verwendet, um eine vorzeitige Ausdifferenzierung zu vermeiden.

4.1.g Verbesserung der Transduktionsrate

Um eine höhere Transduktionsrate zu erzielen, wurden zwei Versuche durchgeführt. Zum einen wurde an einer Verbesserung des Virustiters durch Änderungen in der Transfektion gearbeitet, um eine höhere MOI gewährleisten zu können, zum anderen wurden dreifache Transduktionen getestet.

Optimierung der Transfektion

Zur Optimierung des Virustiters wurden zwei unterschiedliche Varianten des HBS-Puffers parallel und in Dreifachbestimmung getestet. Zum einen der gekaufte Puffer der Firma Gibco, zum anderen der im Labor selbstangesezte Puffer, der deutlich günstiger herzustellen ist, als das Fertigprodukt. Es zeigte sich, dass mit dem gekauften Puffer nahezu identische Titer erzielt wurden. Daher wurde von dort an auf die günstige Variante zurückgegriffen.

Tabelle 22				
Probe(IE/ml)	1	2	3	Mittelwert
Puffer				
gekauft	2,5 x 10 ⁶	1,4 x 10 ⁶	1,2 x 10 ⁶	1,7 x 10 ⁶
selbstangesezt	2,7 x 10 ⁶	1,2 x 10 ⁶	8,7 x 10 ⁵	1,59 x 10 ⁶

Tabelle 22: Vergleich der Titer unter Nutzung zwei verschiedener HBS-Puffer. Getestet wurde mittels Dreifachbestimmung (Proben 1-3)

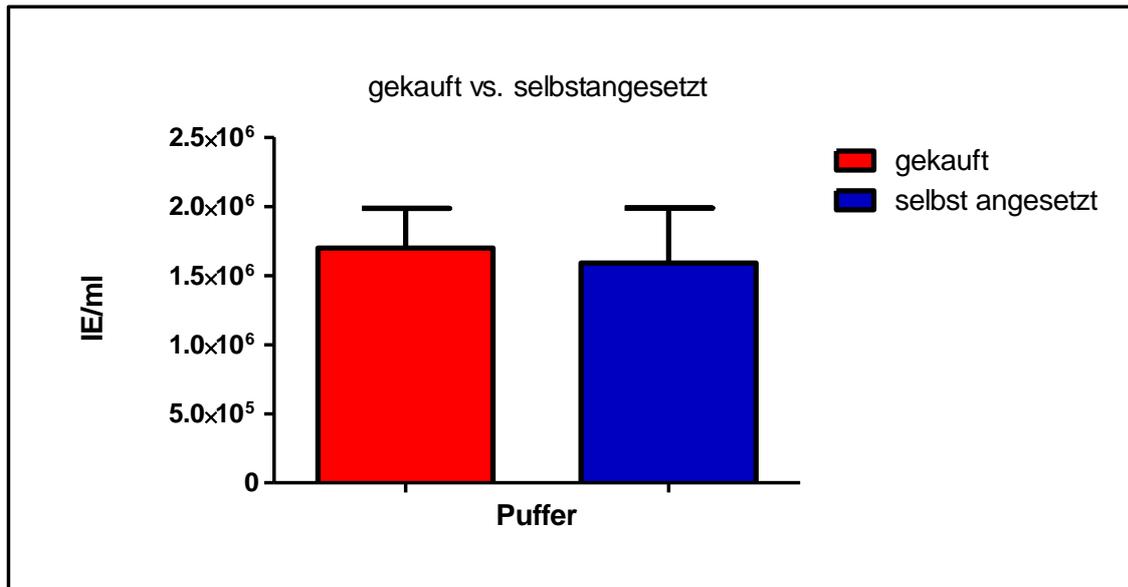


Abbildung 9: Vergleich der Titer unter Nutzung zwei verschiedener HBS-Puffer mittels Dreifachbestimmung. Dargestellt ist hier der Mittelwert mit Standardfehler.

Außerdem wurden verschiedene Erntezeitpunkte getestet, mit dem Ergebnis, dass eine alleinige Ernte nach 24h die besten Titer zeigte, auch wenn es sich um das Eco-Hüllprotein handelte. Daher wurde zu anderen Zeitpunkten kein Virus mehr geerntet.

Dreifache Transduktion muriner Stammzellen

Die Stammzellen wurden nach Entnahme und Aufreinigung wiederum über 72h mit dem neuen Zytokincocktail stimuliert und anschließend an drei aufeinander folgenden Tagen je einmal transduziert mit folgenden MOIs: d1 29, d2 27, d3 6,8. Dabei wurde ein Vektor mit VSV-G Hüllprotein genutzt, da bei diesem durch Aufkonzentrierung höhere Titer und dadurch höhere MOIs möglich waren. So sollte die Transduktionsrate gesteigert werden und somit ein Anwachsen der CML-Zellen bewirkt werden. Eine Facsanalyse am Tag der Transplantation zeigte folgende Werte:

Tabelle 23				
Probe	Anteil in %	vitale Zellen	GFP+	Venus+
Untransduzierte SZ		62,5	0,1	0,0
WT-Bcr-Abl transduziert		6,6	52,5	0,0
Bcr-Abl-T315I transduziert		15,9	0,0	0,2

Tabelle 23: Transduktions- und Vitalitätsraten der Stammzellen nach dreifacher Transduktion im Vergleich zu untransduzierten Stammzellen

Die Transduktionsrate konnte beim WT-Bcr-Abl Vektor gesteigert werden. Allerdings sind kaum noch vitale Zellen im Transplantat, wohl bedingt durch die mehrfache Transduktion mit dem zytotoxischen VSV-G Vektor.

4.1.2 Gammaretrovektor

4.1.2a Klonierung der retroviralen Vektoren

Da eine Verbesserung der Transduktionsrate auch durch Optimierung des Stimulationscocktails nicht möglich war und so immer noch kein Anwachsen der transduzierten Zellen erreicht worden war, wurden zwei neue γ -Retro-Viren kloniert, die wiederum WT-Bcr-Abl mit GFP, sowie Bcr-Abl-T315I mit dem Venusprotein enthielten, mit denen aber mehr Erfahrung in der Stammzelltransduktion bestand.

Die Arbeitsschritte zur Klonierung der beiden Retroviren finden sich im Material- und Methodenteil. Ergebnisse des Restriktionsverdau mit anschließender Gelelektrophorese zur Kontrolle, ob die Inserts (WT-Bcr-Abl und Bcr-Abl-T315I) jeweils richtig herum eingebaut wurden:

Ganz links ist wieder der 1kb Plus Ladder aufgetragen.

1: unverdautes Plasmid

2+3: Probe 1 verdaut mit Pml1 bzw. BamH1

4+5: Probe 2 verdaut mit Pml1 bzw. BamH1

6+7: Probe 3 verdaut mit Pml1 bzw. BamH1

8+9: Probe 4 verdaut mit Pml1 bzw. BamH1

10+11: Probe 5 verdaut mit Pml1 bzw. BamH1

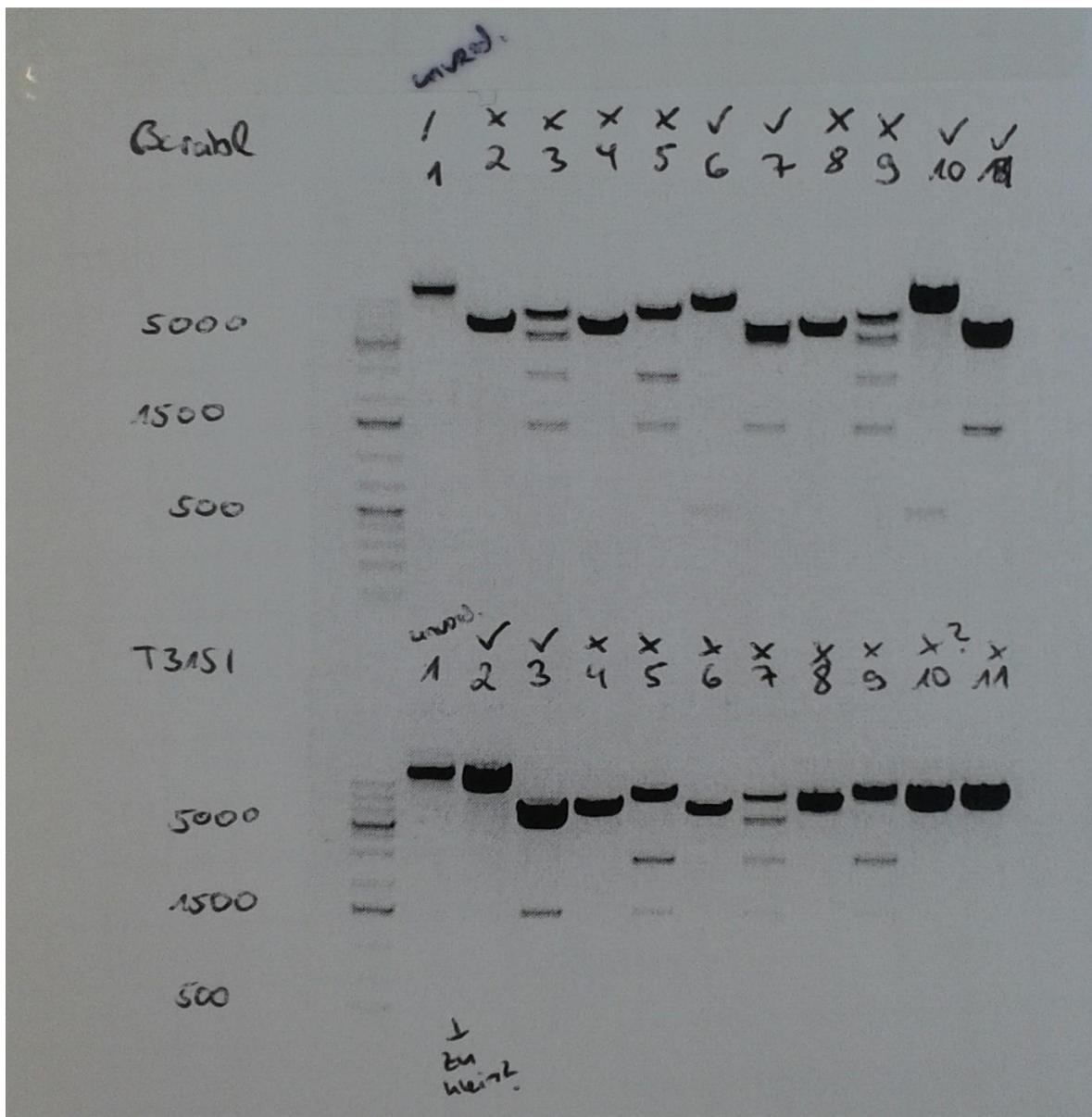


Abbildung 10: Gelelektrophorese des Restriktionsverdaus der Vektorplasmide. Dargestellt sind die 5 Proben jeweils verdaut mit Pml1 bzw BamH1. Links findet sich als Marker die DNA-Ladder, daneben je eine unverdaute Probe. Mit Haken sind die Proben mit korrekter Lage des Inserts gekennzeichnet.

Pml1 schneidet zweimal in den Plasmiden und erzeugt im WT-Bcr-Abl Plasmid bei korrekter Lage des Inserts Banden von 509bp und 13301bp. BamH1 schneidet dreimal in den Plasmiden und erzeugt im WT-Bcr-Abl Plasmid bei korrekter Lage Banden von 1414bp, 5342bp und 7054bp. Probe 3 und 5 enthalten also das Insert in korrekter Lage. Für T315I ergeben sich ähnliche Schnittstellen, diese sind nur in Probe 1 enthalten, wobei hier die kleinere Bande beim Verdau mit Pml1 aufgrund des entgegen laufenden Ethidiumbromids nicht mehr zu erkennen ist. Beim Verdau mit BamH1 ergeben sich größere Banden, diese sind deutlich zu erkennen. Die Sequenzierung ergab ebenfalls eine korrekte Lage der beiden Inserts und ließ nun auch eine optische Darstellung der beiden Plasmide mit Hilfe der pDRAWSoftware zu:

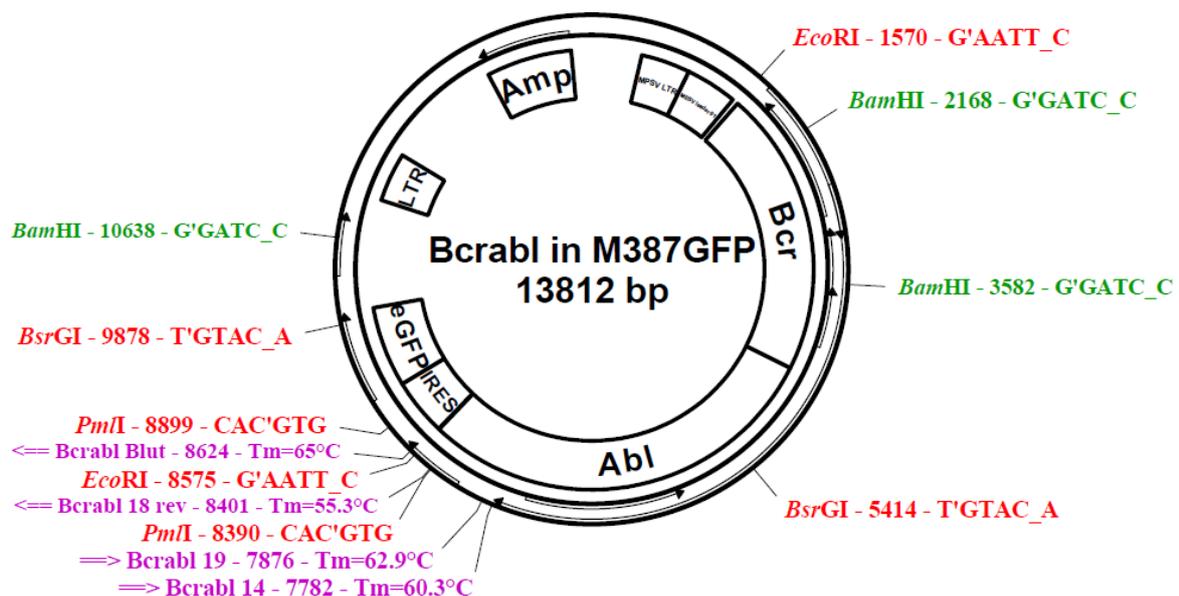
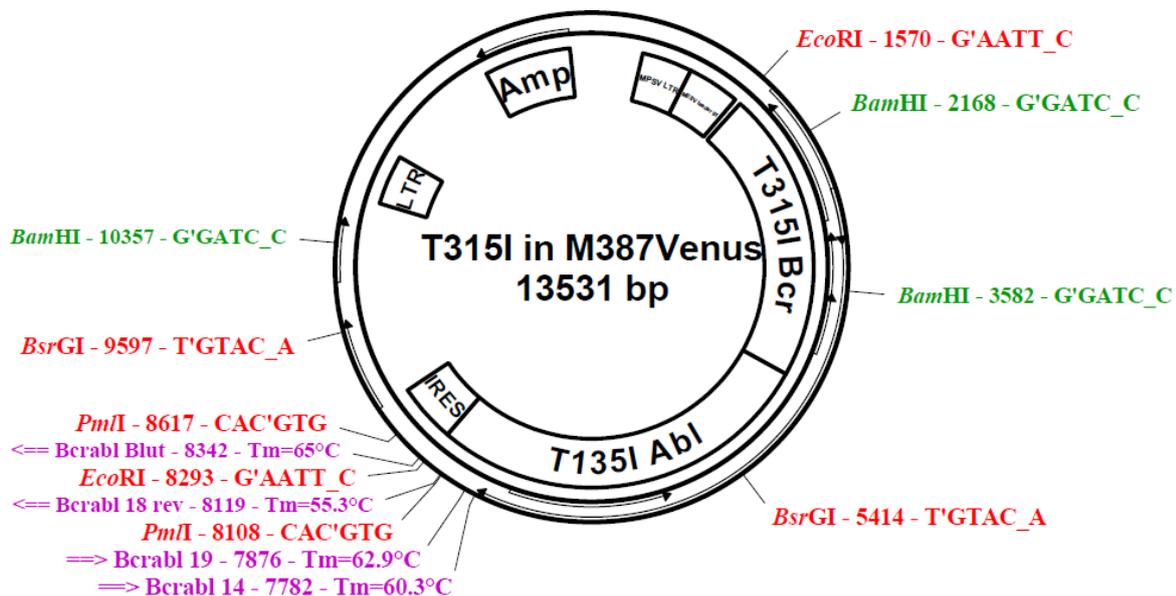


Abbildung 11: Wildtyp Bcr-Abl im M387 Vektor mit GFP, dargestellt mit Enzymschnittstellen und Inserts



pcDNA3.2 revision 1.1.115 UNLICENSED Printed 23.04.2013

http://www.academics.com

Abbildung 12: Bcr-Abl-T315I im M387 Vektor mit Venus, dargestellt mit Enzymschnittstellen und Inserts

4.1.2b Transduktion muriner Stammzellen mit den retroviralen Vektoren

Es wurde das Knochenmark einer männlichen C57Bl/6 und einer männlichen Balb/c Maus entnommen, aufgereinigt und die Stammzellen dann über 72h mit dem neuen Zytokincocktail stimuliert. Anschließend erfolgte die Transduktion nach dem Retronektinprotokoll mit der höchstmöglichen MOI. Diese entsprach im Falle von WT-Bcr-Abl auf C57Bl/6 Stammzellen 30 und für Bcr-Abl-T315I auf Balb/c Stammzellen 5,95. Nach 72h Inkubation bei 37°C und einem Mediumwechsel zur Entfernung des Retronektin, erfolgte eine Facskontrolle. Diese ergab Transduktionsraten von 17,3% für WT-Bcr-Abl und 9,7% für Bcr-Abl-T315I. 68,2% der WT-Bcr-Abl Zellen und 70,1% der Bcr-Abl-T315I waren vital. Durch einen erneuten Mediumwechsel diesmal zu RPMI (+1% NaPy, 10% FCS und 1% L-Glutamin) wurden den transduzierten Stammzellen die Zytokine entzogen. In einer erneuten Facskontrolle am 8. Tag nach Transduktion zeigten sich 48,7% GFP+ und 35,9% Venus+ Zellen. Eine parallel durchgeführte Zellzählung mit Trypanblau zeigte 47,5% vitale Zellen im WT-Bcr-Abl Well und 48% im Bcr-Abl-T315I Well. Es zeigte sich also, dass durch den Zytokinenzug nur die transduzierten Zellen überlebten und proliferierten, sodass ihr

Anteil größer wurde. Nach dieser erfolgreichen Transduktion wurde nun die erste Transplantation mit dem Retrovirus als Vektor vorgenommen.

4.2 Transplantationsversuche

4.2.1 Lentivektor

4.2.1a Dosisfindung der Knochenmark letalen Bestrahlung und Testung einer Knochenmarksupportdosierung

Da für die vorgesehenen Empfängertiere (weibliche Balb/c Mäuse) und das genutzte Bestrahlungsgerät keine eindeutigen Angaben für eine letale Bestrahlungsdosis vorhanden waren, wurden zwei Bestrahlungsdosen verglichen: 8,5Gy und 10Gy. Als Knochenmarksupport erhielten die Mäuse jeweils 5×10^6 CD3 ϵ depletierte Knochenmarkszellen von männlichen C57Bl/6 Spendern, welche in PBS gelöst und intravenös in die Schwanzvene appliziert wurden. Diese Dosis wurde gewählt, da sich in den Versuchen davor (nicht beschrieben, kein Anwachsen der mit den Lentivektoren transduzierten Stammzellen) $2,5$ und 5×10^5 Zellen als zu geringe Menge herausstellten (Tiere verstarben innerhalb von 6 Tagen). Um zu erkennen, welche Bestrahlungsdosis wirklich letal war, erhielten je 2 Mäuse pro Gruppe keine Transplantation. Den anderen 12 Tieren wurden zusätzlich zum Knochenmarksupport auch leukämische Zellen (BA/F3 transduziert mit WT-Bcr-Abl bzw. Bcr-Abl-T315I) transplantiert, da noch kein Anwachsen von transduzierten primären Stammzellen erfolgreich gewesen war. Wie aus der untenstehenden Tabelle hervorgeht, waren 8,5Gy als letale Bestrahlungsdosis ausreichend. Die Tiere dieser Gruppe starben im Durchschnitt 13 Tage nach Knochenmarktransplantation (KMT), nach 7 Tagen wurde ein Gewichtsminimum erreicht. In der 10Gy Gruppe starben sie durchschnittlich 10 Tage nach KMT. Auch unter Einbezug der transplantierten Tiere starben die Tiere der 10 Gy Gruppe nur etwas früher (im Schnitt 10 Tage nach KMT, im Vergleich in der 8,5 Gy Gruppe im Schnitt nach 11 Tagen). Somit wurde fortan 8,5Gy als Bestrahlungsdosis genutzt. Der Knochenmarksupport fiel ebenfalls zufriedenstellend aus, so dass 5×10^6 für weitere Versuche als Standarddosis beibehalten wurde.

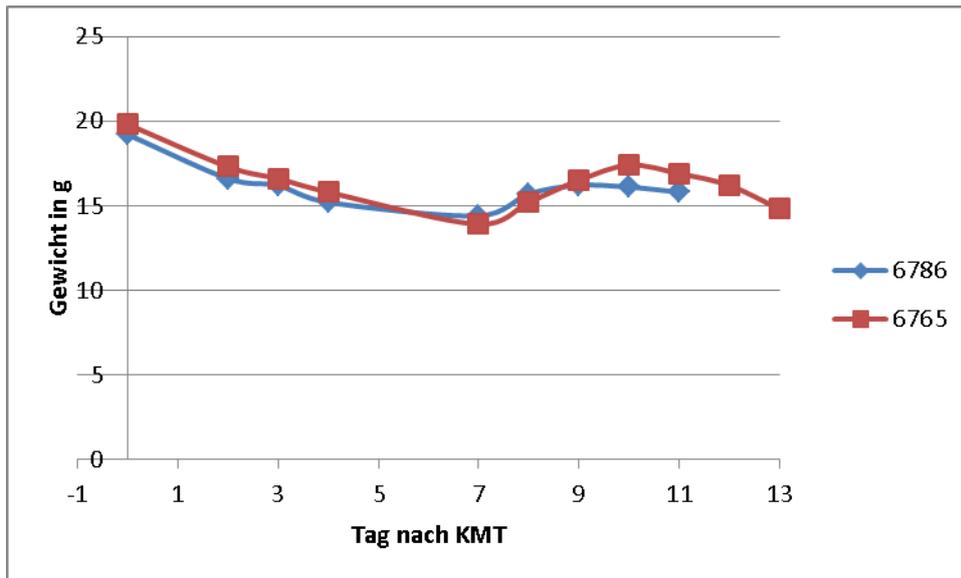


Abbildung 13: Gewichtsverlauf zweier mit 8,5 Gy bestrahlten Tiere (Mausnummer 6786 und 6765)

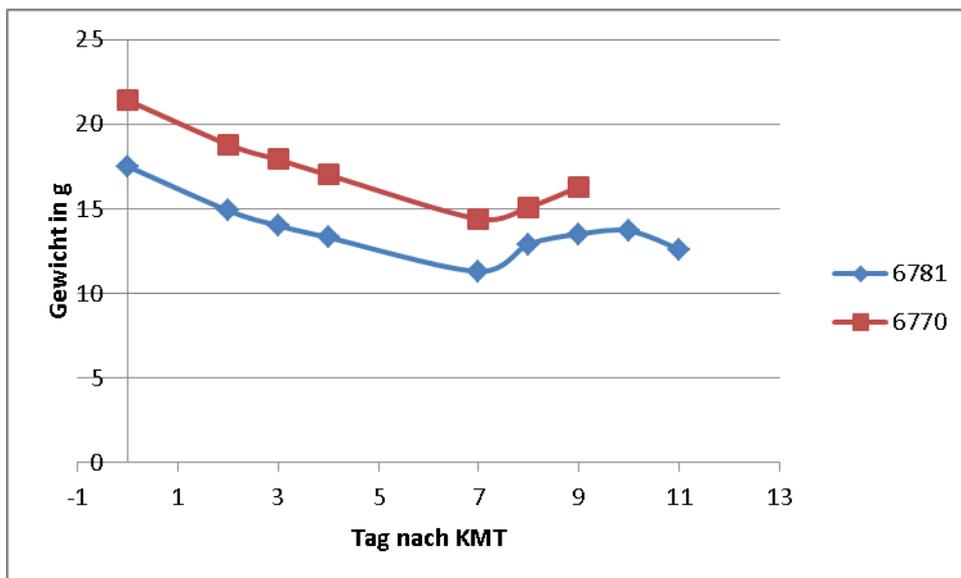


Abbildung 14: Gewichtsverlauf zweier mit 10Gy bestrahlten Tiere (Mausnummern 6781 und 6770)

Überleben

Tabelle 24		
Maus	d n KMT	Durchschnitt
6786 8,5 Gy Bestrahlungskontrolle	12	13
6765 8,5 Gy Bestrahlungskontrolle	14	
6770 10 Gy Bestrahlungskontrolle	9	10
6781 10 Gy Bestrahlungskontrolle	11	

Tabelle 24: Überlebenszeit nach Bestrahlung. Gegenüberstellung der beiden Gruppen 8,5Gy und 10Gy Bestrahlung. Dargestellt sind die Überlebenszeiten der einzelnen Tiere sowie der Mittelwert innerhalb der Gruppen.

Die Endanalysen erfolgten zwischen d9 und d14, da einzelne Tiere schon schnell Gewicht verloren und sich auffällig verhielten. Die Facs-Analyse zeigte in allen Tieren ein Anwachsen sowohl der WT-Bcr-Abl- als auch der Bcr-Abl-T315I-Zellen. Auch in der PCR konnten beide Varianten nachgewiesen werden.

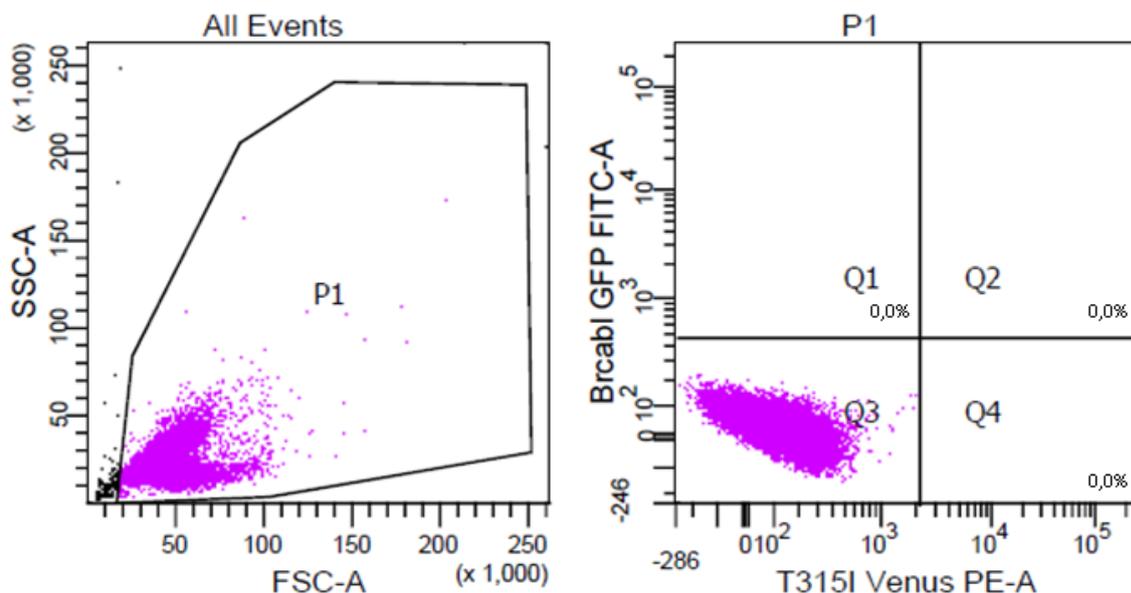


Abbildung 15: Facsanalyse einer Negativkontrolle. In Q3 sind die gesunden KM-Zellen zu sehen.

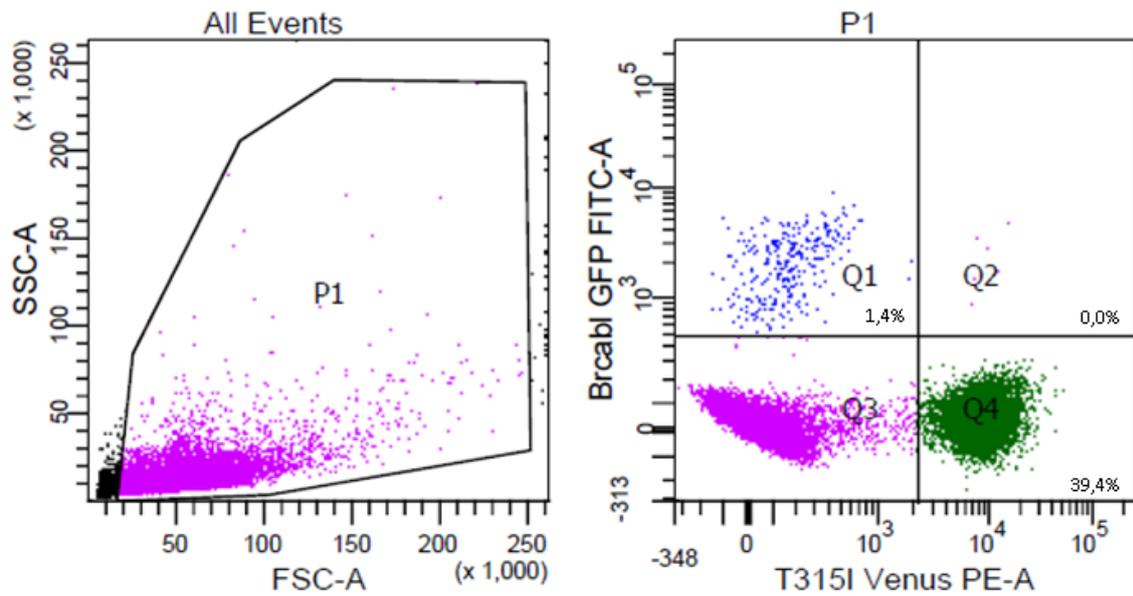


Abbildung 16: Facsanalyse des Knochenmarkes einer mit transduzierten BA/F3-Zellen transplantierten Maus. In Q1 sind die GFP+ (blau) und in Q4 die Venus+ (grün) Zellen zu sehen

Abbildung 15 zeigt eine Negativkontrolle, bei der in Feld Q3 das gesunde Knochenmark zu sehen ist. In Abbildung 16 ist beispielhaft das Knochenmark einer Maus am Tage der Endanalyse zu sehen. In Feld Q1 sind die GFP+ und WT-Bcr-Abl+ Zellen und in Feld Q4 die Venus+ und Bcr-Abl-T315I+ Zellen dargestellt. In Feld Q2 sind einige doppelt positive Zellen zu erkennen, die vermutlich durch ein Zusammenkleben der einzelnen Zellen hervorgerufen werden.

Bcrabl-PCR

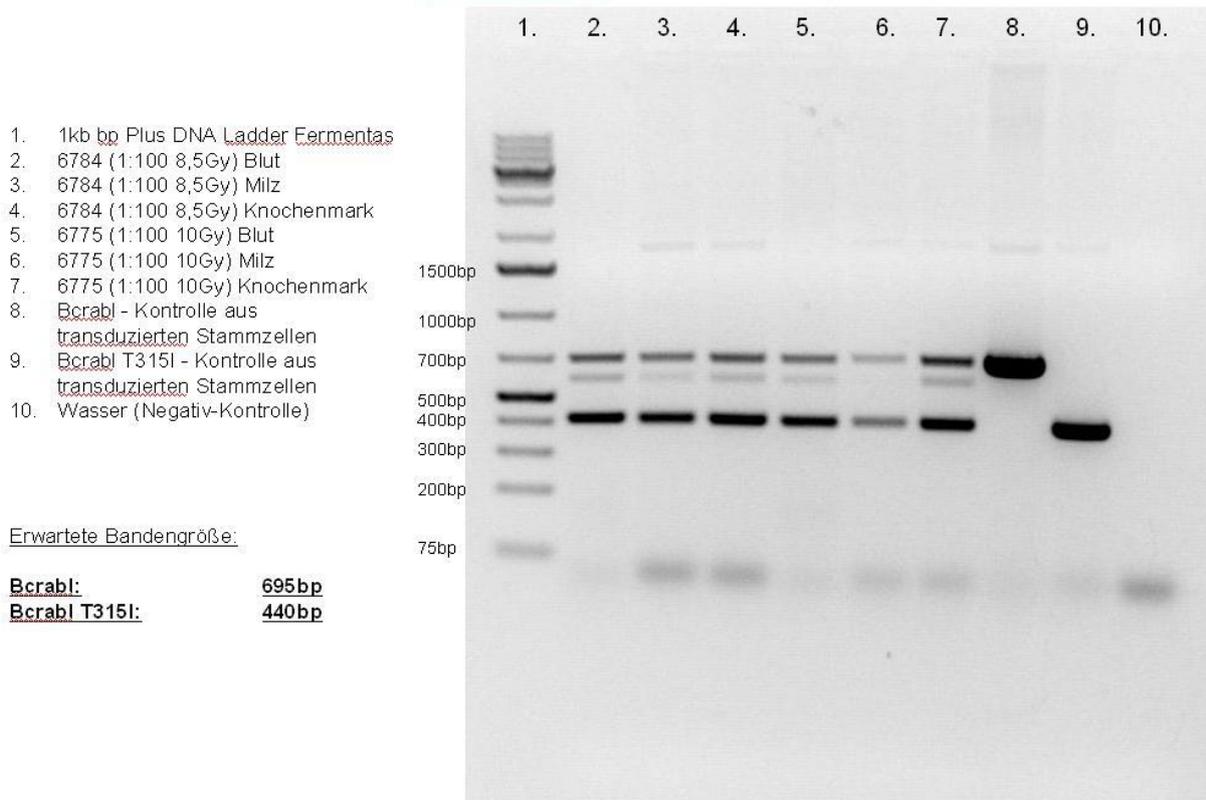


Abbildung 17: Gelelektrophorese der PCR der Endanalyse. Dargestellt sind 9 Proben inklusive Kontrollen neben der DNA-Ladder als Marker.

4.2.1b Transplantation von dreifach transduzierten murinen Stammzellen

In diesem Versuch wurden je 5×10^6 CD3 ϵ + -depletierte Knochenmarkszellen und im Verhältnis 1:5000, 1:500 und 1:50 die dreifach transduzierten Stammzellen (siehe 4.1.1g) transplantiert. Die Endanalyse der Mäuse erfolgte an d34 n KMT. Es konnte in keiner der drei Gruppen ein Anwachsen der Leukämiezellen gezeigt werden.

Da auch nach Verbesserung der Transduktionsrate und Optimierung des Stimulationscocktails kein Anwachsen der transduzierten Zellen erreicht worden war, wurden zwei Retro-Viren kloniert, die wiederum WT-Bcr-Abl mit GFP, sowie Bcr-Abl-T315I mit dem Venusprotein enthielten, mit denen aber mehr Erfahrung in der Stammzelltransduktion bestand.

4.2.2 Gammaretrovektor

4.2.2a Erste Transplantationen von mit dem Retrovirus transduzierten Knochenmarkzellen

Fragestellungen: Wachsen die mit dem Retrovirus transduzierten Stammzellen an? Welcher Transplantationszeitpunkt ist besser, d1 oder d3 nach Transduktion.

Im ersten Transplantationsversuch wurden $8,32 \times 10^6$ untransduzierte Knochenmarkzellen (Aufteilen der aus einer C57Bl/6 Maus gewonnenen Menge auf 3 Empfänger und Einberechnung des Anteils untransduzierter Zellen im Transduktionsteil) und $5,52 \times 10^4$ WT-Bcr-Abl+ Zellen und $3,39 \times 10^4$ Bcr-Abl-T315I+ Zellen (Verhältnis 1,6:1) je Maus transplantiert. Somit lag das Verhältnis von transduzierten zu untransduzierten Zellen bei etwa 1:100 und das Verhältnis von WT-Bcr-Abl zu Bcr-Abl-T315I bei 1,6:1. Diese wurden einen Tag nach Transduktion transplantiert. Hierdurch wurden am Tag 13 nach KMT im Schnitt 0,8% (0-1,4%) WT-Bcr-Abl und 25,8% (17,9-32,6%) Bcr-Abl-T315I im Blut per Facs nachgewiesen. Die Tiere wurden an Tag 15 nach KMT getötet, da es ihnen sehr schlecht ging, eine war bereits tot und konnte nicht mehr analysiert werden. Die Endanalyse am Tag 15 ergab starke Splenomegalie (638 und 704mg Milzgewicht) und die Facsanalyse ergab bei einer Maus 1,0% WT-Bcr-Abl-positive Zellen und 33,9% Bcr-Abl-T315I-positive Zellen in der Milz. Bei der anderen waren es 1,2% und 48,4%.

Maus	Milzgewicht in mg	Bcr-Abl-pos in %	T315I-pos in %
Kontrollmaus	135	0	0
7311	638	1,2	48,4
7313	704	1,0	33,9

Tabelle 25: Übersicht über die Endanalyse der Milzen an d15. Dargestellt sind das Milzgewicht und die prozentuellen Anteile der WT-Bcr-Abl und Bcr-Abl-T315I+ Zellen, im Vergleich zu einer gesunden Kontrollmaus

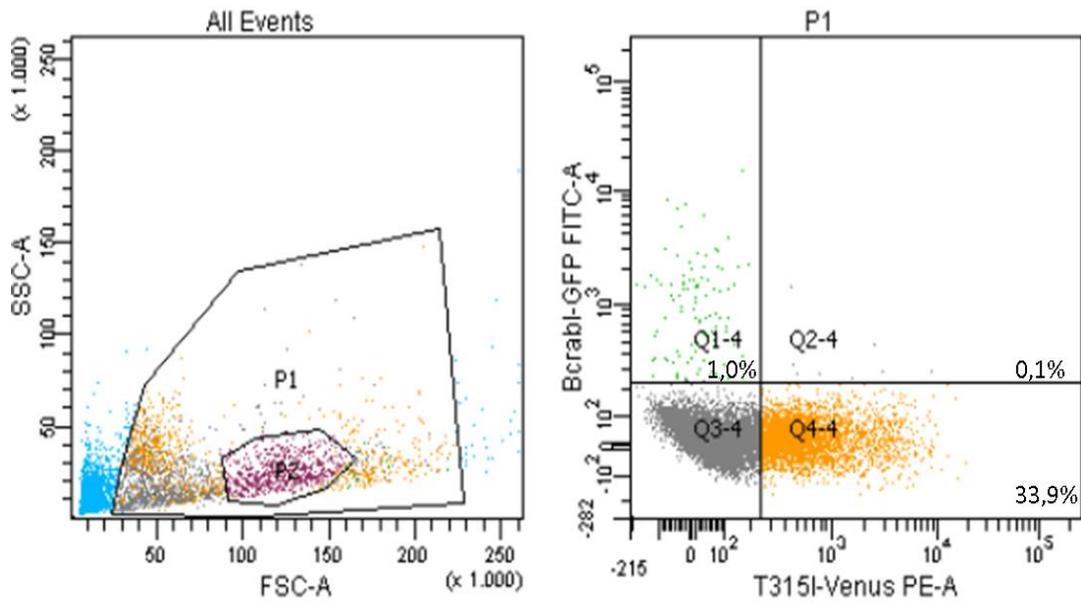


Abbildung 18: Facsanalyse der Milz an d15 nach KMT. Dargestellt sind in Q3-4 die gesunden Milzzellen, in Q1-4 die WT-Bcr-Abl+ Zellen, in Q4-4 die Bcr-Abl-T315l+ Zellen und in Q2-4 die doppelt positiven (zusammengeklebten) Zellen.

Die Abbildung zeigt das stark zu Bcr-Abl-T315l verschobene Verhältnis der beiden Leukämiezellarten. Der Gewichtsverlauf der Tiere gestaltete sich folgendermaßen:

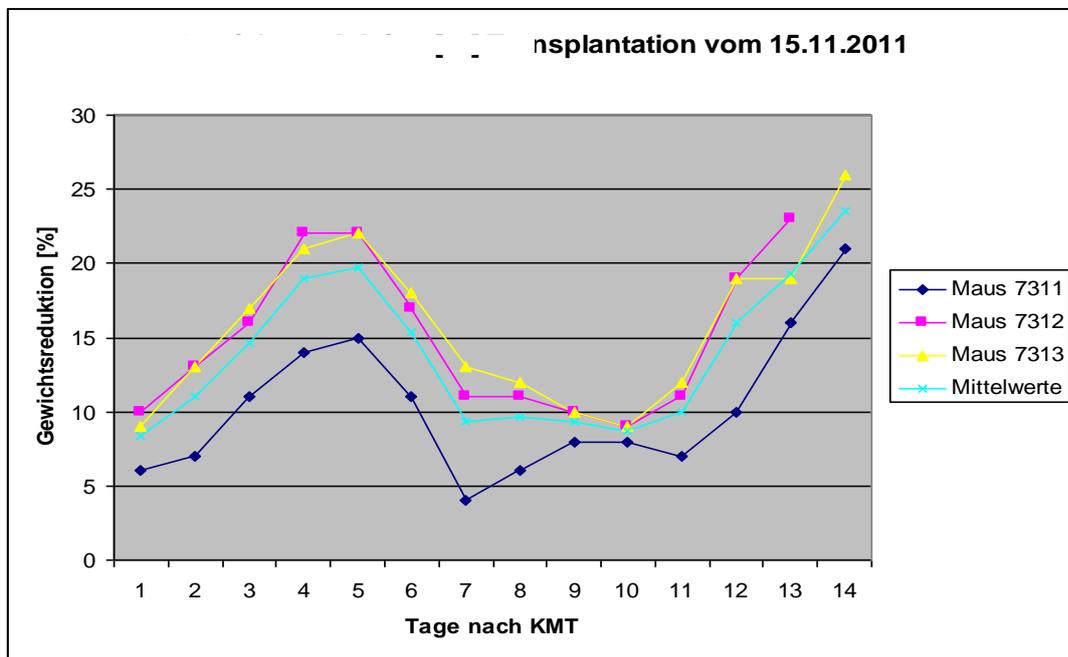


Abbildung 19: Gewichtsreduktion dreier Tiere nach KMT (mit Retrovirus transduzierte SZ mit verschiedenen Zellzahlen + Knochenmarksupport) mit Darstellung des Mittelwertes. Ab Tag 11 zeigt sich eine stetige Gewichtsabnahme als Zeichen der fortschreitenden Erkrankung.

Ein erstes Minimum wurde nach 5 Tagen nach Transplantation als Zeichen der letalen Bestrahlung erreicht, es folgte eine kurze Erholungsphase in der das gesunde Knochenmark angewachsen war und dann eine schnelle Vermehrung der leukämischen Zellen, sodass die Tiere ab Tag 11 kontinuierlich abnahmen. Auch eine Fellveränderung zum struppigen hin, sowie eine Verhaltensänderung wurden beobachtet. Es konnte gezeigt werden, dass die Bcr-Abl-T315I Variante deutlich besser oder schneller anwächst. Es sollten daher im nächsten Versuch weniger Bcr-Abl-T315I Zellen transplantiert werden.

Der zweite Teil dieses Versuches beinhaltete die Transplantation der Zellen an Tag 3 nach Transduktion. Hier wurden $8,1 \times 10^6$ untransduzierte Knochenmarkzellen (Aufteilen der aus einer C57Bl/6 Maus gewonnenen Menge auf 3 Empfänger und Einberechnung des Anteils untransduzierter Zellen im Transduktionsteil), $7,56 \times 10^4$ WT-Bcr-Abl+ Zellen und $9,59 \times 10^4$ Bcr-Abl-T315I+ Zellen je Maus transplantiert. Somit lag das Verhältnis von transduzierten zu untransduzierten Zellen bei 1/50 und das Verhältnis von WT-Bcr-Abl zu Bcr-Abl-T315I bei 1/1,2. Hier wurden am Tag 13 nach KMT im Schnitt 1,76% (0-3,5%) WT-Bcr-Abl und 10,55% (5,7-16,0%) Bcr-Abl-T315I im Blut per Facs nachgewiesen. Auch in der PCR ließ sich die Leukämie nachweisen:

- 1.PCR: Primer Bcrabl14 + Blut Bcrabl rev
 2.PCR: Primer Bcrabl 19 for + Bcrabl 18 rev

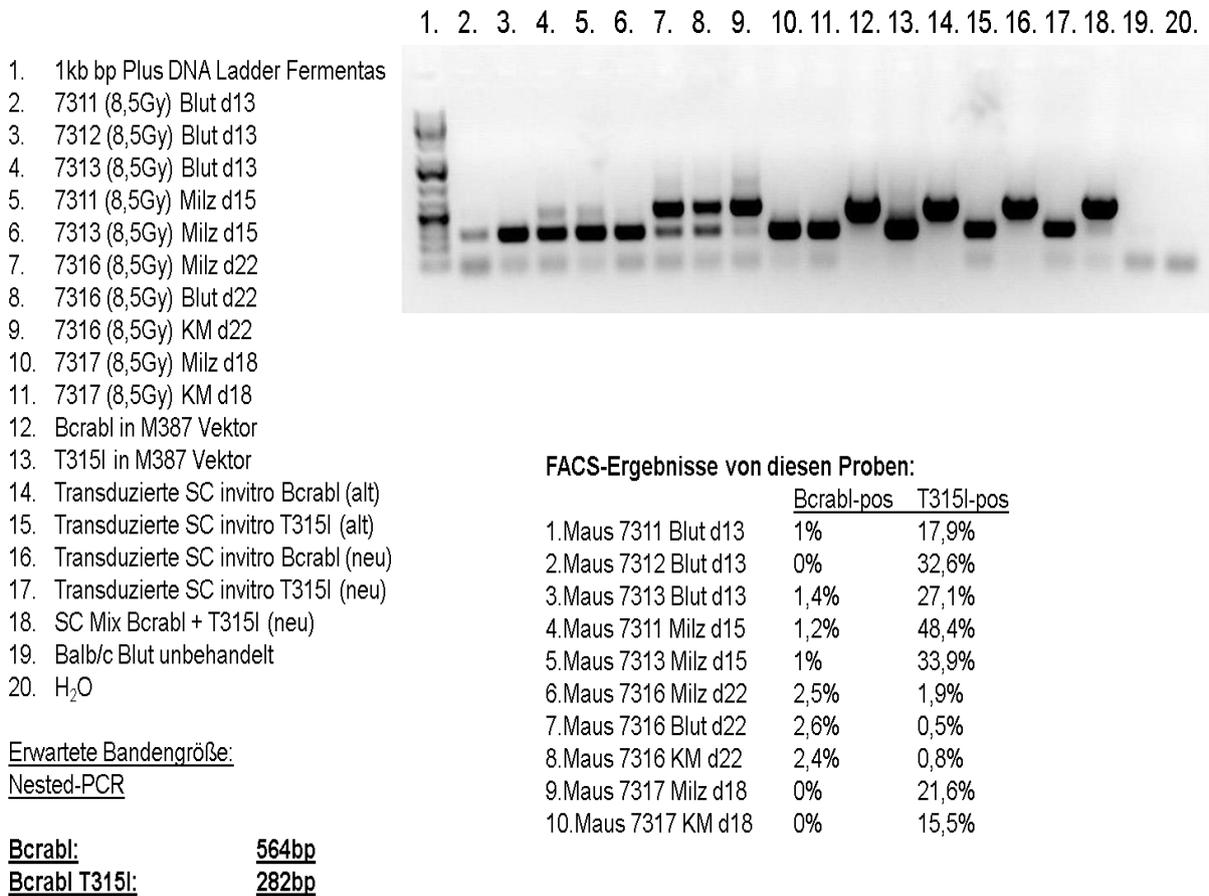


Abbildung 20: Gelelektrophorese der Nested- PCR von 19 Proben inklusive Kontrollen neben der DNA-Ladder als Marker. Untersucht wurden die Blutproben von d13 einiger Tiere sowie die Endanalyseprodukte (Milz, KM und Blut) einiger Tiere. Dargestellt sind dazu jeweils die entsprechenden Facsergebnisse der Proben aus den transplantierten Tieren zum Vergleich.

Die Tiere wurden an Tag 18 bzw. 22 endanalysiert (die dritte Maus wurde bereits an Tag 17 tot gefunden, es erfolgte daher keine Analyse). Der Gewichtsverlauf gestaltete sich dem vorherigen Versuch entsprechend.

Tabelle 26			
Maus 7317	Bcrabl- pos [%]	T315l- pos [%]	Milzgewicht
d13 Blutentnahme	0	5,7	
d18 Blutentnahme	0	16,2	
d18 Milz	0	21,6	571mg
d18 KM	0	15,5	
Maus 7316			
d13 Blutentnahme	1,8	16	
d18 Blutentnahme	1,6	10,5	
d22 Blutentnahme	2,6	0,5	
d22 Milz	2,5	1,9	166mg
d22 KM	2,4	0,8	

Tabelle 26: Übersicht über die Ergebnisse der Blutanalysen an d13 und 18, sowie der Endanalysen an d18 bzw. 22 der Tiere. Dargestellt sind jeweils WT-Bcr-Abl+, Bcr-Abl-T315l+ Zellen in Blut, Milz und Knochenmark und das Milzgewicht

Die Ergebnisse der beiden Versuche zeigten, dass die mit dem Retrovirus transduzierten Stammzellen in den letal bestrahlten Tieren anwachsen und proliferieren. Zudem wurde ein besseres Anwachsen der Bcr-Abl-T315l Zellen beobachtet, daher sollten im nächsten Versuch die Bcr-Abl-T315l Zellen in 10-fach geringerer Menge eingesetzt werden. Der frühe Transplantationszeitpunkt, einen Tag nach Transduktion wurde von nun an gewählt, da keine großen Unterschiede im Verlauf beobachtet wurden und durch die kürzere in *vitro*-Phase ein geringeres Risiko der Ausdifferenzierung vor Transplantation besteht.

4.2.2b Zweiter Transplantationsversuch

Fragestellungen: Vergleich der Transplantation von frisch transduzierten SZ (wie beim Vorversuch) und einer Zelllinie aus seit 2 Monaten in Kultur gehaltenen transduzierten SZ. 2. Kontrolle des Krankheitsverlaufs durch Einsatz von 2 Mäusen, die nur untransduziertes KM erhalten. 3. Testung einer Nilotinib-Dosis von 100mg/kg KG, und einer DLI Dosis von 5×10^7 , sowie der Kombination von beidem. 4. Kann durch geringeren Einsatz der Bcr-Abl-T315I Zellen (1:10 zu WT-Bcr-Abl) ein gleichverteiltes Anwachsen erreicht werden?

Da nun ein Anwachsen der Leukämiezellen möglich war, wurde der nächste Versuch größer angesetzt. Insgesamt wurden 14 Mäuse transplantiert. 2 davon erhielten nur Knochenmarksupport, 4 wurden mit einer Zelllinie aus seit 2 Monaten in Kultur gehaltenen transduzierten SZ und Knochenmarksupport transplantiert und 8 erhielten frisch transduziertes Knochenmark, das einen Tag nach Transduktion transplantiert wurde. Alle Tiere wurden am Tage der Transplantation mit 8,5Gy bestrahlt. Die 8 Mäuse erhielten pro Maus $5,88 \times 10^4$ WT-Bcr-Abl+ und $5,64 \times 10^3$ Bcr-Abl-T315I+ Zellen, also Zellen im Verhältnis $\sim 1/10$ Bcr-Abl-T315I/WT-Bcr-Abl, da im Vorversuch bei einem Verhältnis von 1,2/1 die Bcr-Abl-T315I Zellen deutlich stärker proliferierten. Die 4 Mäuse erhielten jeweils $6,07 \times 10^4$ WT-Bcr-Abl+ und $4,84 \times 10^3$ Bcr-Abl-T315I+ Zellen aus Kultur. Alle Tiere erhielten jeweils 5×10^6 Knochenmarksupport. An d13 nach KMT erfolgte eine Blutentnahme und -analyse, um zu kontrollieren, ob die Leukämiezellen angewachsen waren. Die Facsanalyse zeigte folgendes Bild:

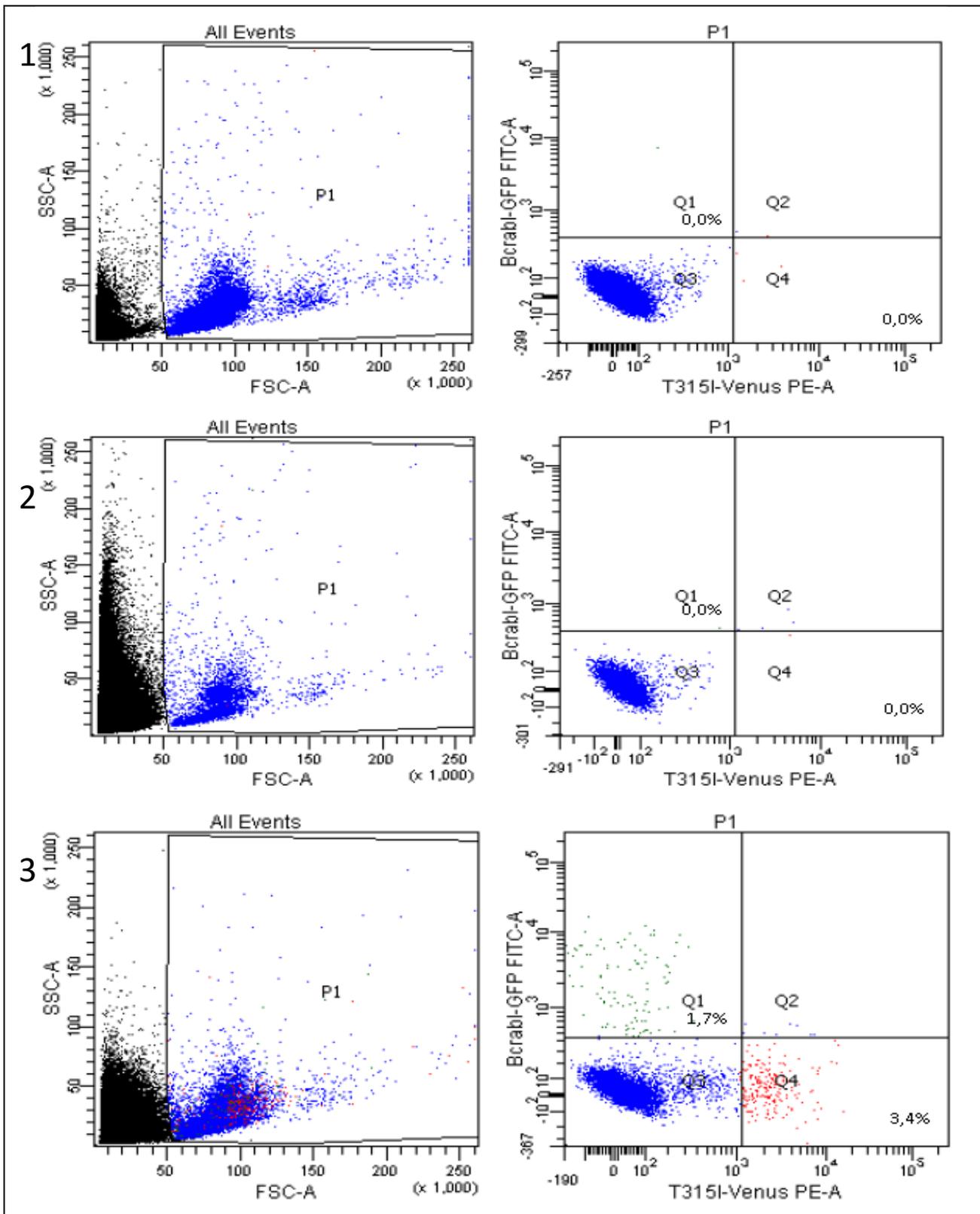


Abbildung 21: Facsanalyse des Blutes je eines Tieres aus jeder Transplantationsgruppe. 1. nur Knochenmarksupport 2. CML-Zellen aus kultivierter Zelllinie und Knochenmarksupport 3. frisch transduzierte CML-Zellen und Knochenmarksupport. In den Felder Q1 sind jeweils die WT-Bcr-Abi+ Zellen abgebildet, in Q4 die Bcr-Abi-T315I+ Zellen.

Exemplarisch ist hier pro Gruppe nur ein Facsergebnis gezeigt. Die obere Abbildung zeigt die Facsanalyse des Blutes einer Maus, die nur Knochenmarksupport transplantiert bekam, es sind also nur gesunde Zellen in Feld Q3 zu sehen. Die mittlere Abbildung entspricht der Facsanalyse des Blutes einer Maus, die die CML-Zellen aus der kultivierten Zelllinie erhalten hat, hier sind ebenfalls nur gesunde Zellen messbar, die kultivierten Zellen scheinen nicht anzuwachsen. Spätere Blutanalysen und auch die Endanalyse an d30 zeigten ebenfalls nur negative Zellen. Die untere Abbildung zeigt das Blutfacs einer Maus, die frisch transduzierte Stammzellen und Knochenmarksupport erhalten hat. Hier sind 3,4% Bcr-Abl-T315l Zellen (Q4) und 1,7% WT-Bcr-Abl Zellen (Q2) nachweisbar.

Zu 2: die Mäuse die nur KM erhalten haben, leben länger und verlieren nur anfangs an Gewicht. Der anfängliche Gewichtsverlust ist auf die letale Bestrahlung zurückzuführen, die Erholung auf das Anwachsen des gesunden Knochenmarkes.

Zu 3:

Tabelle 27					
Mausnummer	d13 % Bcrabl+	Endanalyse % Bcrabl+	d13 % T315l+	Endanalyse % T315l+	Behandlung
7740	0,7	0,3	0,5	6,6	unbehandelt
7730	1,7	3	3,4	0	DLI 5 x 10 ⁷
7733	2,6	3,5	0,4	0,2	Nilotinib 100mg/kg
7739	2,9	23	0,1	0,2	Kombination
7728	5	8,2	5,6	0	Kombination
7741	9,8	2,6	1,2	0,1	Kombination

Tabelle 27: Übersicht über die prozentuellen Anteile von WT-Bcr-Abl+ und Bcr-Abl-T315l+ Zellen im Blut an d13 und am Tag der Endanalyse mit Darstellung der jeweiligen Behandlung ab d13.

Tabelle 28					
Mausnummer	d13 Bcr-Abl Zellzahl/ml	Endanalyse Bcr-Abl Zellzahl/ml	d13 T315I Zellzahl/ml	Endanalyse T315I Zellzahl/ml	Behandlung
7740	1,32E+04	9,21E+04	9,45E+03	2,03E+06	unbehandelt
7730	9,96E+04	3,30E+05	1,99E+05	0	DLI 5 x 10 ⁷
7733	9,80E+04	8,58E+04	1,51E+04	4,90E+03	Nilotinib 100mg/kg
7739	1,17E+05	1,35E+06	4,02E+03	1,17E+04	Kombination
7728	2,52E+05	5,36E+05	2,82E+05	0	Kombination
7741	3,33E+05	2,40E+05	1,02E+04	9,23E+03	Kombination

Tabelle 28: Übersicht über die absoluten Anteile von WT-Bcr-Abl+ und Bcr-Abl-T315I+ Zellen im Blut an d13 und am Tag der Endanalyse mit Darstellung der jeweiligen Behandlung ab d13.

Die mit frisch transduzierten Stammzellen transplantierten Tiere erhielten ab d14 nach KMT ihre Behandlung. Zwei Tiere erhielten Nilotinib 100mg/kg p.o., zwei Tiere je 5 x 10⁷ DLIs i.v. im Abstand von 72h, drei Tiere wurden doppelt behandelt und eine erhielt keinerlei Behandlung. Die oberen beiden Tabellen zeigen die %-Werte von WT-Bcr-Abl und Bcr-Abl-T315I im Blut gemessen per Facsanalyse. Die erste an d13 nach KMT, die andere entspricht der Endanalyse, die zwischen d20 und 29 erfolgte, je nach Gewichtsverlauf und Allgemeinzustand des Tieres. Zwei Tiere sind während der Beobachtungszeit nachts verstorben und konnten am nächsten Tag nicht mehr analysiert werden. Wie zu sehen ist, steigt in der unbehandelten Maus 7740 die Bcr-Abl-T315I Zellzahl/ml sehr stark an, während die WT-Bcr-Abl Zellzahl/ml etwas langsamer ansteigt. Die nur mit Nilotinib behandelte Maus 7733 zeigt eine nahezu konstante WT-Bcr-Abl Zellzahl, das Medikament scheint die Zellproliferation zwar einzuschränken, schafft es aber in dieser Dosis nicht, die Zellen komplett zu eliminieren. Die Bcr-Abl-T315I Zellzahl/ml nimmt leicht ab. Die nur mit 5 x 10⁷ DLIs behandelte Maus 7730 verliert durch die Behandlung sämtliche Bcr-Abl-T315I Zellen. Die WT-Bcr-Abl Zellen wachsen in einem ähnlichen Tempo wie bei der unbehandelten Maus. Bei den doppelt behandelten Tieren zeigen sich unterschiedliche Verläufe, wobei alle im Anschluss an die Behandlung mit DLIs unterschiedlich schnell Durchfall entwickelten. 7739: Hier steigen beide Zellarten an, WT-Bcr-Abl um etwa eine 10'er Potenz, Bcr-Abl-T315I um eine halbe. 7728: Die WT-Bcr-Abl Zellzahl/ml steigt leicht an, was wiederum ein Hinweis für die zu geringe Nilotinibdosis ist. Die Bcr-Abl-T315I Zellen wurden komplett durch die DLI-Behandlung ausgelöscht, trotz nur zweimaliger DLI-Gabe. 7741: Hier zeigt sich

sowohl bei Bcr-Abl-T315I, als auch bei WT-Bcr-Abl eine leichte Abnahme der Zellzahl/ml.

Zu 4: Ein wirklich gleichmäßiges Anwachsen der Zellen konnte nicht erreicht werden, allerdings wurden in einigen Tieren vergleichbare Zellzahlen nachgewiesen. Es werden mehr Versuche benötigt.

4.3 Therapietestungen und weitere Transplantationsversuche

Von nun an wurde eine höhere Dosis Nilotinib getestet (200mg/kg KG), sowie absteigende Dosen der DLIs (1×10^7 , 5×10^6 und 1×10^6) jeweils allein und in Kombination mit Nilotinib. Die Mäuse wurden immer ganzkörperbestrahlt (8,5Gy) und anschließend mit Knochenmarksupport (5×10^6) (In Tabellen als KM bezeichnet) und transduzierten Stammzellen (in Tabellen als CML bezeichnet) transplantiert. Im Folgenden sind die Ergebnisse aus drei Versuchen zusammengefasst. In zwei der Versuche erfolgte an Tag 13 nach KMT eine Blutentnahme zur Kontrolle des Anwachsens der Leukämiezellen. Die transplantierten Leukämiezellzahlen variieren in jedem Versuch, da die Transduktionsraten schwankten:

Tabelle 29		
Versuch	WT-Bcr-Abl+ Zellzahl im Transplantat	T315I+ Zellzahl im Transplantat
1	1.22×10^4	1.03×10^4
2	8.28×10^4	5.20×10^3
3	1.42×10^5	9.50×10^3

Tabelle 29: Übersicht über die Transplantate in den drei zusammengefassten Versuchen

Die Ergebnisse der Blutanalyse an Tag 13 nach KMT zeigen ein relativ gleichmäßiges Anwachsen der transplantierten Zellen:

Tabelle 30					
Maus	FACS Bcrabl %	FACS T135l %	WT-Bcrabl Zellzahl/ml	Bcr-Abl-T315l Zellzahl/ml	Transplantat
7853	1,60%	0,40%	5,63E+04	1,41E+04	KM+CML
7851	3,80%	0,80%	1,60E+05	3,36E+04	KM+CML
8015	0,80%	1,00%	3,17E+04	3,97E+04	KM+CML
7848	0,00%	0,20%	0	2,87E+03	KM+CML
7844	0,00%	3,00%	0	5,27E+04	KM+CML
8004	0,70%	0,80%	1,88E+04	2,15E+04	KM+CML
8017	0,20%	0,90%	7,06E+03	3,18E+04	KM+CML
8018	0,10%	0,60%	3,38E+03	2,03E+04	KM+CML
8016	0,70%	0,70%	2,64E+04	2,64E+04	KM+CML
7845	0,30%	1,30%	7,48E+03	3,24E+04	KM+CML
8003	1,00%	3,10%	3,44E+04	1,07E+05	KM+CML
7847	0,40%	0,40%	1,34E+04	1,34E+04	KM+CML
7846	2,80%	0,60%	7,34E+04	1,57E+04	KM+CML
8523	2,50%	1,40%	1,69E+04	9,48E+03	KM+CML
8524	0,80%	0,80%	3,03E+04	3,03E+04	KM+CML
8527	1,50%	2,40%	3,04E+04	4,86E+04	KM+CML
8531	1,20%	0,90%	1,82E+04	1,36E+04	KM+CML
8536	0,70%	0,20%	3,74E+04	1,07E+04	KM+CML
8528	1,10%	0,30%	1,92E+04	5,24E+03	KM+CML
8529	0,70%	0,40%	8,56E+03	4,89E+03	KM+CML
8533	0,90%	0,60%	2,93E+04	1,95E+04	KM+CML
8535	0,50%	0,80%	1,06E+04	1,70E+04	KM+CML
8537	0,30%	1,80%	8,59E+03	5,15E+04	KM+CML
8532	2,10%	1,70%	keine Zählung möglich		KM+CML
8534	0,60%	1,40%	2,46E+04	5,75E+04	KM+CML
8525	0,60%	0,40%	9,17E+03	6,11E+03	KM+CML
8526	0,40%	0,30%	8,13E+03	6,09E+03	KM+CML
8530	0,10%	0,20%	2,84E+03	5,69E+03	KM+CML

Tabelle 30: Übersicht über die prozentuellen und absoluten Werte der WT-Bcr-Abl+ und Bcr-Abl-T315l+ Zellen im Blut an d13. Vier Tiere erhielten nur Knochenmarksupport als Transplantat um die Verträglichkeit der höheren Nilotinibdosis (200mg/kg KG) zu testen.

Ab Tag 14 nach KMT erfolgte die Behandlung. Die Gabe von Nilotinib erfolgte alle 24h per Magensonde, die DLIs wurden anfangs dreimal im Abstand von 72h verabreicht. In folgenden Versuchen wurden die DLIs im Abstand von einer Woche verabreicht um den Venen mehr Erholungszeit zu geben, so die Injektion zu

vereinfachen und auch die teils starken GvHD Symptome zu vermindern. Die Endanalysen erfolgten zwischen d16 und 42 nach KMT, abhängig vom Scoring der Tiere. Nach Möglichkeit wurden immer Blut, Milz und Knochenmark analysiert, in Einzelfällen war dies durch Auffinden der schon toten Tiere nicht mehr vollständig möglich. Im Folgenden sind die Ergebnisse der Facsanalysen sortiert nach den verschiedenen Behandlungsgruppen tabellarisch und graphisch dargestellt. In die graphische Darstellung wurden einzelne Tiere nicht mit einbezogen, da sich bei ihnen im Verlauf eine akute Leukämie entwickelte, erkennbar an deutlich größeren Proliferationsraten als die unbehandelte Kontrolle (bis zu 76% maligne Zellen im Blut). Da hier kein Ansprechen auf die Therapie zu erwarten war, da es sich um keine chronische Erkrankung mehr handelt, wurden sie aus der Wertung genommen. In den Tabellen sind sie mit aufgeführt und gekennzeichnet.

Tabelle 31												
Behandlung	Transplantat	Mausnummer		Blut d13		Blut finale Analyse		KM finale Analyse		Milz finale Analyse		Analysetag n. KMT
				Bcr-Abl	T315I	Bcr-Abl	T315I	Bcr-Abl	T315I	Bcr-Abl	T315I	
unbehandelt	8.28 x 10 ⁴ Bcr-Abl 5.20 x 10 ³ T315I	8210	absolut prozentual	nicht erhoben		8,34E+07 31,70%	2,05E+07 7,80%	1,18E+06 21,50%	3,80E+05 6,90%	2,28E+07 44,70%	2,45E+06 4,80%	21
Nilotinib 200mg/kg KG	1.22 x 10 ⁴ Bcr-Abl 1.03 x 10 ⁴ T315I	7851	absolut prozentual	1,60E+05 3,80%	3,36E+04 0,80%	4,57E+06 45,60%	1,00E+04 0,10%	8,34E+06 29,80%	2,80E+04 0,10%	4,68E+06 12,00%	7,80E+04 0,20%	40
		8015	absolut prozentual	3,17E+04 0,80%	3,97E+04 1,00%	0 0,00%	6,04E+03 0,10%	0 0,00%	3,40E+04 0,20%	9,40E+04 0,10%	2,82E+05 0,30%	40
		7848	absolut prozentual	0 0,00%	2,87E+03 0,20%	0 0,00%	1,51E+06 7,80%	0 0,00%	3,95E+04 0,50%	1,40E+04 0,10%	5,60E+04 0,40%	40
		8226	absolut prozentual	nicht erhoben		4,82E+04 0,30%	1,43E+06 8,90%	5,00E+03 0,10%	3,20E+05 6,40%	3,50E+04 0,10%	2,94E+06 8,40%	42
	8.28 x 10 ⁴ Bcr-Abl 5.20 x 10 ³ T315I	8227	absolut prozentual	nicht erhoben		0 0,00%	3,04E+05 1,50%	8,00E+02 0,20%	7,28E+04 18,20%	1,53E+05 0,30%	3,32E+06 6,50%	42
		8211	absolut prozentual	nicht erhoben		6,94E+06 8,60%	5,65E+05 0,70%	6,37E+05 4,90%	3,90E+04 0,30%	4,51E+04 4,10%	2,64E+04 2,40%	42
		8197	absolut prozentual	nicht erhoben		2,51E+05 0,10%	1,91E+08 76,10%	7,60E+03 0,10%	3,89E+06 51,20%	4,10E+04 0,10%	2,83E+07 69,00%	22
	1.42 x 10 ⁵ Bcr-Abl 9.50 x 10 ³ T315I	8528	absolut prozentual	1,92E+04 1,10%	5,24E+03 0,30%	1,71E+04 0,10%	8,54E+04 0,50%	0 0,00%	1,53E+05 0,90%	8,50E+04 0,10%	1,53E+06 1,80%	38
		8529	absolut prozentual	8,56E+03 0,70%	4,89E+03 0,40%	0 0,00%	5,54E+04 0,40%	0 0,00%	2,38E+05 3,60%	0 0,00%	7,80E+05 1,30%	38
		8533	absolut prozentual	2,93E+04 0,90%	1,95E+04 0,60%	0 0,00%	7,03E+05 3,00%	0 0,00%	1,46E+05 2,40%	9,10E+04 0,10%	2,18E+06 2,40%	33
		8535	absolut prozentual	1,06E+04 0,50%	1,70E+04 0,80%	3,31E+06 47,00%	5,63E+04 0,80%	2,23E+06 26,90%	1,41E+05 1,70%	1,74E+06 26,00%	8,04E+04 1,20%	33
		8537	absolut prozentual	8,59E+03 0,30%	5,15E+04 1,80%	0 0,00%	1,69E+04 0,30%	0 0,00%	4,50E+04 0,30%	0 0,00%	6,80E+05 1,00%	38

Tabelle 31: Übersicht der Ergebnisse der Behandlungsgruppe Nilotinib 200mg/kg im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Dargestellt sind -soweit erhoben- jeweils prozentuale und absolute Werte der Blutanalyse an d13 (vor Behandlung), sowie der Blut-, Knochenmark- und Milzanalyse am Endanalysetag und der Endanalysezeitpunkt. Farblich hervorgehoben wurde eine Maus, die eine akute Bcr-Abl T315I+ Leukämie entwickelt hat und somit aus der Wertung genommen wurde.

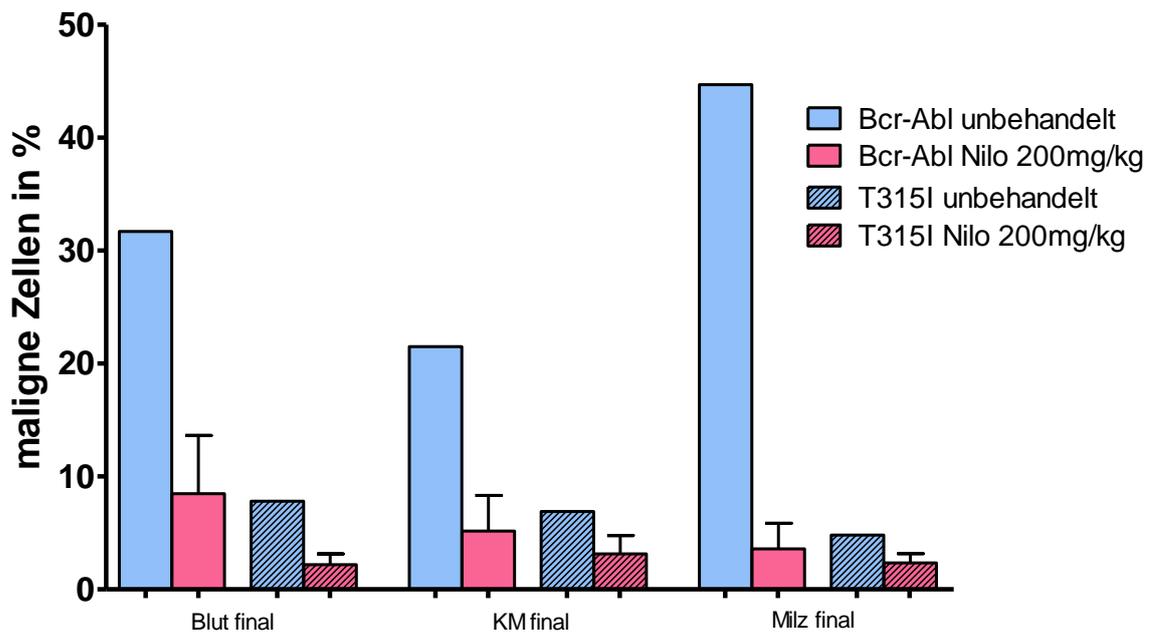


Abbildung 22: Ergebnisse der Behandlungsgruppe Nilotinib 200mg/kg KG (n=11) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollmaus (n=1). Dargestellt sind jeweils die prozentualen Anteile der WT-Bcr-Abl und Bcr-Abl-T315I-positiven Zellen am Tag der Endanalyse (final) in Blut, Knochenmark und Milz.

Die Ergebnisse in Abbildung 22 zeigen, dass die 200mg/kg Nilotinib Dosis zum einen die WT-Bcr-Abl Zellen abtötet, zum anderen dadurch bedingt zu einer Verlängerung des Überlebens führt. Im Schnitt überlebten die behandelten Tiere 37,3 Tage nach KMT, die unbehandelte nur 21 Tage. Gegen die Bcr-Abl-T315I Zellen zeigt sich abgesehen von den prozentualen Werten im Blut wie erwartet keine deutliche Wirkung. Bei den absoluten Werten (siehe Tabelle) zeigt sich auch im Blut eine deutlich stärkere Hemmung der WT-Bcr-Abl Zellen. In einer der Mäuse hat sich eine akute Leukämie entwickelt, weswegen sie aus der Wertung genommen wurde (8197: Bcr-Abl-T315I).

Tabelle 32													
Behandlung	Transplantat	Mausnummer		Blut d13		Blut finale Analyse		KM finale Analyse		Milz finale Analyse		Analysetag n. KMT	
				Bcr-Abl	T315I	Bcr-Abl	T315I	Bcr-Abl	T315I	Bcr-Abl	T315I		
unbehandelt	8.28 x 10 ⁴ Bcr-Abl 5.20 x 10 ³ T315I	8210	absolut	nicht erhoben		8,34E+07	2,05E+07	1,18E+06	3,80E+05	2,28E+07	2,45E+06	21	
			prozentual			31,70%	7,80%	21,50%	6,90%	44,70%	4,80%		
DLI 1 x 10 ⁷	1.22 x 10 ⁴ Bcr-Abl 1.03 x 10 ⁴ T315I	7844	absolut	0	5,27E+04	0	7,00E+04	1,30E+04	5,20E+04	0	2,16E+05	40	
		8004	prozentual	0,00%	3,00%	0,00%	0,80%	0,10%	0,40%	0,00%	1,20%	28	
	8.28 x 10 ⁴ Bcr-Abl 5.20 x 10 ³ T315I	8186	absolut	keine Analyse									34
			prozentual										
		8187	absolut			3,37E+05	3,83E+04	7,68E+05	6,40E+04	5,76E+05	5,44E+05	25	
		prozentual			4,40%	0,50%	2,40%	0,20%	3,60%	3,40%			
		8193	absolut			1,52E+05	6,07E+04	6,30E+04	9,00E+03	6,93E+03	1,98E+04	33	
		prozentual			2,00%	0,80%	7,00%	1,00%	2,10%	6,00%			
8194	absolut			1,27E+06	2,48E+04	7,65E+05	3,60E+04	2,25E+06	1,50E+05	38			
prozentual			15,30%	0,30%	8,50%	0,40%	15,00%	1,00%					

Tabelle 32: Übersicht der Ergebnisse der Behandlungsgruppe DLI 1 x 10⁷ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Dargestellt sind -soweit erhoben- jeweils prozentuale und absolute Werte der Blutanalyse an d13 (vor Behandlung), sowie der Blut-, Knochenmark- und Milzanalyse am Endanalysetag und der Endanalysezeitpunkt

Die Ergebnisse in Tabelle 32 zeigen, dass die 1×10^7 DLI Dosis zum einen die Bcr-Abl-T315I Zellen abtötet, zum anderen dadurch bedingt zu einer Verlängerung des Überlebens führt. Die behandelten Tiere überlebten im Schnitt 33 Tage nach KMT, die unbehandelte nur 21 Tage. Die WT-Bcr-Abl Zellen scheinen ebenfalls im Wachstum gehemmt im Vergleich zur Kontrollmaus. Diese Hemmung ist aber deutlich geringer als bei den Bcr-Abl-T315I Zellen und ist vermutlich durch eine Immunreaktion auf das Transgenprodukt (sowohl Bcr-Abl als auch GFP) bedingt. Im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit Nilotinib 200mg/kg (s.o.) überleben die Tiere dieser Gruppe deutlich kürzer, dies hängt mit dem häufigeren (bei 3/6 Tieren) Auftreten von GvHD zusammen.

Tabelle 33												
Behandlung	Transplantat	Mausnummer		Blut d13		Blut finale Analyse		KM finale Analyse		Milz finale Analyse		Analysetag n. KMT
				Bcr-Abl	T315I	Bcr-Abl	T315I	Bcr-Abl	T315I	Bcr-Abl	T315I	
unbehandelt	8.28 x 10 ⁴ Bcr-Abl 5.20 x 10 ³ T315I	8210	absolut prozentual	nicht erhoben		8,34E+07 31,70%	2,05E+07 7,80%	1,18E+06 21,50%	3,80E+05 6,90%	2,28E+07 44,70%	2,45E+06 4,80%	21
Nilotinib 200mg/kg + DLI 1 x 10 ⁷	1.22 x 10 ⁴ Bcr-Abl 1.03 x 10 ⁴ T315I	8017	absolut prozentual	7,06E+03 0,20%	3,18E+04 0,90%	1,91E+04 0,30%	1,91E+04 0,30%	0 0,00%	0 0,00%	6,76E+04 0,00%	5,20E+03 0,10%	28
		8018	absolut prozentual	3,38E+03 0,10%	2,03E+04 0,60%	0 0,00%	1,22E+04 0,10%	0 0,00%	0 0,00%	1,10E+04 0,10%	1,10E+04 0,10%	28
		8016	absolut prozentual	2,64E+04 0,70%	2,64E+04 0,70%	4,46E+03 0,10%	3,97E+05 8,90%	4,92E+03 0,40%	1,11E+04 0,90%	4,00E+03 0,10%	1,20E+04 0,30%	26
		8202	absolut prozentual	nicht erhoben		1,40E+05 2,00%	7,00E+03 0,10%	4,55E+05 1,30%	1,75E+05 0,50%	2,85E+05 1,50%	2,47E+05 1,30%	24
		8204	absolut prozentual			5,73E+04 0,70%	4,91E+04 0,60%	6,00E+04 0,40%	4,50E+04 0,30%	2,52E+04 0,60%	9,66E+04 2,30%	29
		8178	absolut prozentual			keine Analyse		2,10E+04 0,60%	4,55E+04 1,30%	3,78E+03 0,60%	1,49E+05 23,60%	29
	8180	absolut prozentual	2,55E+05 2,90%			2,64E+04 0,30%	2,09E+04 1,90%	2,20E+03 0,20%	5,10E+04 1,70%	1,32E+05 4,40%	29	
	8181	absolut prozentual	7,26E+05 6,40%			3,40E+04 0,30%	6,76E+04 5,20%	5,20E+03 0,40%	7,70E+04 3,50%	8,14E+04 3,70%	29	

Tabelle 33: Übersicht der Ergebnisse der Behandlungsgruppe Nilotinib 200mg/kg KG + DLI 1 x 10⁷ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Dargestellt sind -soweit erhoben- jeweils prozentuale und absolute Werte der Blutanalyse an d13 (vor Behandlung), sowie der Blut-, Knochenmark- und Milzanalyse am Endanalysetag und der Endanalysezeitpun

Die Ergebnisse in Tabelle 33 zeigen, dass die Kombinationsbehandlung sowohl die Bcr-Abl-T315I+, als auch die WT-Bcr-Abl+ Zellen abtötet. Die Tiere überlebten im Schnitt aber nur 27,75 Tage nach KMT, also kürzer als die einzeln behandelten (Nilotinib 200mg/kg KG einzeln: 37,3 Tage, DLI 1×10^7 einzeln: 33 Tage). Eine GvHD wurde bei 5/8 Tieren beobachtet im Sinne von Durchfall und teilweise starkem Haarausfall. Dies entspricht einer Steigerung der Rate an GvHD im Vergleich zur nur mit DLI behandelten Gruppe.

Tabelle 34												
Behandlung	Transplantat	Mausnummer		Blut d13		Blut finale Analyse		KM finale Analyse		Milz finale Analyse		Analysetag n. KMT
				Bcr-Abl	T315I	Bcr-Abl	T315I	Bcr-Abl	T315I	Bcr-Abl	T315I	
unbehandelt	8.28 x 10 ⁴ Bcr-Abl 5.20 x 10 ³ T315I	8210	absolut prozentual	nicht erhoben		8,34E+07 31,70%	2,05E+07 7,80%	1,18E+06 21,50%	3,80E+05 6,90%	2,28E+07 44,70%	2,45E+06 4,80%	21
DLI 5 x 10 ⁶	1.22 x 10 ⁴ Bcr-Abl 1.03 x 10 ⁴ T315I	7845	absolut prozentual	7,48E+03 0,30%	3,24E+04 1,30%	2,16E+05 0,20%	7,93E+07 73,40%	1,74E+04 0,20%	2,98E+06 34,30%	4,32E+05 0,60%	1,89E+07 26,30%	20
		8003	absolut prozentual	3,44E+04 1,00%	1,07E+05 3,10%	9,66E+04 0,60%	4,83E+04 0,30%	4,80E+04 0,30%	0 0,00%	6,90E+04 0,30%	4,60E+04 0,20%	20
	8.28 x 10 ⁴ Bcr-Abl 5.20 x 10 ³ T315I	8209	absolut prozentual	nicht erhoben		1,53E+08 36,00%	2,55E+06 0,60%	2,63E+06 28,90%	7,28E+04 0,80%	2,03E+07 46,20%	9,68E+05 2,20%	22
		8215	absolut prozentual			4,88E+05 5,40%	8,14E+04 0,90%	7,02E+05 3,90%	1,26E+05 0,70%	3,94E+06 8,20%	5,28E+05 1,10%	21
		8216	absolut prozentual			2,96E+06 20,50%	5,78E+04 0,40%	1,03E+06 10,60%	3,88E+04 0,40%	1,76E+07 35,90%	4,41E+05 0,90%	21
		8217	absolut prozentual			keine Zellzählung 66,20%		4,29E+06 0,50%	3,80E+04 0,40%	3,39E+07 55,60%	4,88E+05 0,80%	20

Tabelle 34: Übersicht der Ergebnisse der Behandlungsgruppe DLI 5 x 10⁶ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Dargestellt sind -soweit erhoben- jeweils prozentuale und absolute Werte der Blutanalyse an d13 (vor Behandlung), sowie der Blut-, Knochenmark- und Milzanalyse am Endanalysetag und der Endanalysezeitpunkt. Farblich gekennzeichnet sind zwei Tiere in denen sich eine akute Leukämie entwickelt hat und die folglich aus der Wertung genommen wurden.

Die Ergebnisse in Tabelle 34 zeigen, dass die DLI Behandlung auch in einer Dosis von 5×10^6 die Bcr-Abl-T315I+ Zellen abtötet. Die WT-Bcr-Abl+ Zellen werden im Vergleich zur höheren DLI-Dosis weniger angegriffen. Die Tiere überlebten im Schnitt aber nur 21 Tage, die Behandlung führte also zu keiner Verlängerung des Überlebens im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (ebenfalls 21d). Eine GvHD wurde bei 1/6 Tieren beobachtet. Wiederum hat sich bei zwei Mäusen eine akute Leukämie entwickelt (7845: Bcr-Abl-T315I+, 8217 WT-Bcr-Abl+), sodass sie aus der Wertung genommen wurden.

Tabelle 35												
Behandlung	Transplantat	Mausnummer		Blut d13		Blut finale Analyse		KM finale Analyse		Milz finale Analyse		Analysetag n. KMT
				Bcr-Abl	T315I	Bcr-Abl	T315I	Bcr-Abl	T315I	Bcr-Abl	T315I	
unbehandelt	8.28 x 10 ⁴ Bcr-Abl 5.20 x 10 ³ T315I	8210	absolut prozentual	nicht erhoben		8,34E+07 31,70%	2,05E+07 7,80%	1,18E+06 21,50%	3,80E+05 6,90%	2,28E+07 44,70%	2,45E+06 4,80%	21
Nilotinib 200mg/kg + DLI 5 x 10 ⁶	1.22 x 10 ⁴ Bcr-Abl 1.03 x 10 ⁴ T315I	7847	absolut prozentual	1,34E+04 0,40%	1,34E+04 0,40%	1,02E+04 0,10%	0 0,00%	0 0,00%	0 0,00%	0 0,00%	0 0,00%	32
		7846	absolut prozentual	7,34E+04 2,80%	1,57E+04 0,60%	6,29E+04 2,70%	5,59E+04 2,40%	2,60E+05 2,00%	0 0,00%	1,50E+04 1,50%	1000 0,10%	34
	8.28 x 10 ⁴ Bcr-Abl 5.20 x 10 ³ T315I	8195	absolut prozentual			5,14E+05 6,50%	1,58E+04 0,20%	7,54E+05 5,80%	3,90E+04 0,30%	7,56E+05 6,30%	1,68E+05 1,40%	28
		8196	absolut prozentual			4,23E+06 21,70%	0 0,00%	2,51E+06 11,40%	6,60E+04 0,30%	4,48E+07 28,00%	6,40E+05 0,40%	24
		8203	absolut prozentual	nicht erhoben		3,55E+04 5,00%	1,13E+04 1,60%	9,00E+04 1,20%	7,50E+03 0,10%	7,92E+05 2,40%	4,95E+05 1,50%	23
		8205	absolut prozentual			1,68E+05 5,20%	3,24E+03 0,10%	1,87E+05 1,70%	2,20E+04 0,20%	5,40E+03 1,20%	6,44E+04 14,30%	36
		8179	absolut prozentual			7,40E+03 0,20%	1,85E+04 0,50%	1,80E+04 0,10%	3,60E+04 0,20%	1,00E+03 0,20%	5,75E+04 11,50%	37

Tabelle 35: Übersicht der Ergebnisse der Behandlungsgruppe Nilotinib 200mg/kg KG + DLI 5 x 10⁶ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Dargestellt sind -soweit erhoben- jeweils prozentuale und absolute Werte der Blutanalyse an d13 (vor Behandlung), sowie der Blut-, Knochenmark- und Milzanalyse am Endanalysetag und der Endanalysezeitpunkt

Die Ergebnisse in Tabelle 35 zeigen, dass auch die Kombinationsbehandlung mit den niedriger dosierten DLIs zuverlässig beide Leukämiezellarten abtötet und auch zu einer Verlängerung des Überlebens auf im Schnitt 30,57 Tage führt, die unbehandelte Kontrolle überlebte nur 21 Tage. Eine GvHD wurde bei 3/7 Tieren beobachtet, bei zweien mit starkem Haarausfall, bei einer mit Durchfall.

Tabelle 36												
Behandlung	Transplantat	Mausnummer		Blut d13		Blut finale Analyse		KM finale Analyse		Milz finale Analyse		Analysetag n. KMT
				Bcr-Abl	T315I	Bcr-Abl	T315I	Bcr-Abl	T315I	Bcr-Abl	T315I	
unbehandelt	8.28 x 10 ⁴ Bcr-Abl 5.20 x 10 ³ T315I	8210	absolut prozentual	nicht erhoben		8,34E+07 31,70%	2,05E+07 7,80%	1,18E+06 21,50%	3,80E+05 6,90%	2,28E+07 44,70%	2,45E+06 4,80%	21
DLI 1 x 10 ⁶	1.42 x 10 ⁵ Bcr-Abl 9.50 x 10 ³ T315I	8532	absolut prozentual	keine Zählung 2,10% 1,70%		keine Analyse						23
		8534	absolut prozentual	2,46E+04 0,60%	5,75E+04 1,40%	2,99E+03 0,10%	5,98E+03 0,20%	1,40E+04 0,10%	1,40E+04 0,10%	2,88E+05 1,20%	1,20E+05 0,50%	32
		8525	absolut prozentual	9,17E+03 0,60%	6,11E+03 0,40%	3,97E+03 0,10%	3,18E+04 0,80%	0 0,00%	1,56E+04 0,20%	1,70E+04 0,20%	3,40E+04 0,40%	33
		8526	absolut prozentual	8,13E+03 0,40%	6,09E+03 0,30%	1,92E+07 48,30%	7,93E+04 0,20%	5,58E+06 55,80%	8,00E+04 0,80%	3,38E+07 48,30%	1,40E+05 0,20%	21
		8530	absolut prozentual	2,84E+03 0,10%	5,69E+03 0,20%	2,32E+05 2,30%	3,03E+04 0,30%	3,68E+05 2,30%	3,20E+04 0,20%	3,40E+06 6,30%	7,02E+05 1,30%	21

Tabelle 36: Übersicht der Ergebnisse der Behandlungsgruppe DLI 1 x 10⁶ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Dargestellt sind -soweit erhoben- jeweils prozentuale und absolute Werte der Blutanalyse an d13 (vor Behandlung), sowie der Blut-, Knochenmark- und Milzanalyse am Endanalysetag und der Endanalysezeitpunkt

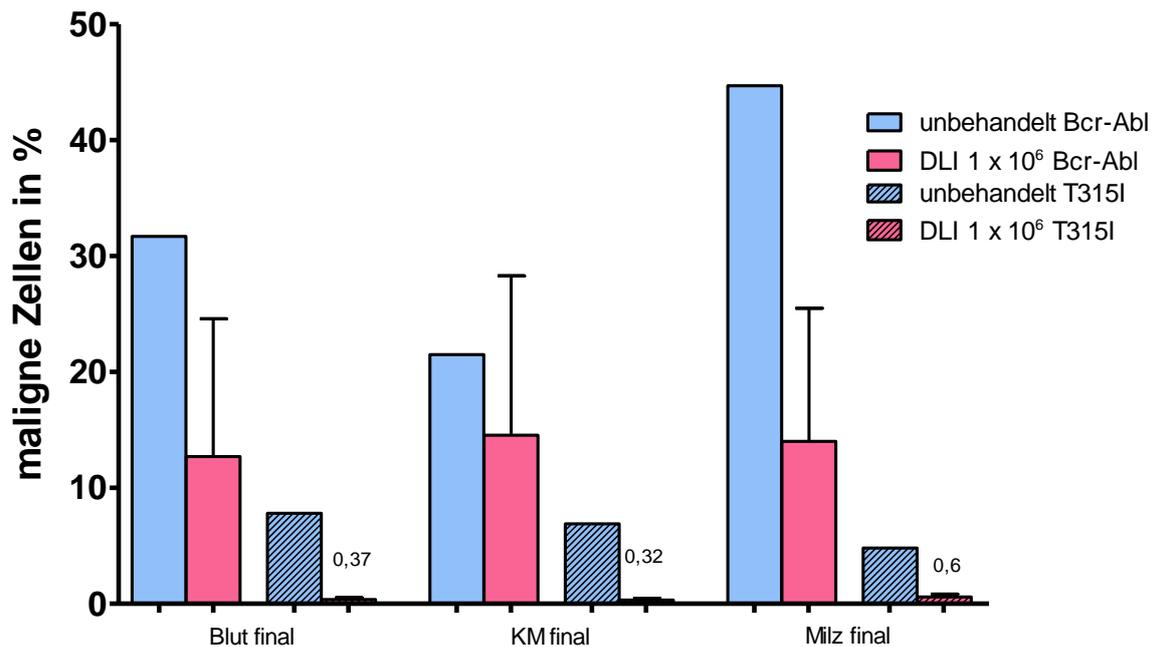


Abbildung 23: Ergebnisse der Behandlungsgruppe DLI 1 x 10⁶ (n=5) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollmaus (n=1). Dargestellt sind jeweils die prozentualen Werte der WT-Bcr-Abl und Bcr-Abl-T315I-positiven Zellen am Tag der Endanalyse (final) in Blut, Knochenmark und Milz.

Die Ergebnisse in Abbildung 23 zeigen, dass auch die Behandlung mit der geringsten DLI-Dosis (1 x 10⁶) zuverlässig die Bcr-Abl-T315I+ Zellen abtötet. Die WT-Bcr-Abl+ Zellen zeigen hier eine -wenn auch deutlich geringere- Beeinträchtigung, als Zeichen der auch bei den höheren DLI Dosen gezeigten Immunreaktion (siehe Tabellen) auf das Transgenprodukt. Die Tiere überlebten im Schnitt 26 Tage, also länger als ohne Behandlung (21d) und es zeigte sich eine GvHD bei 1/5 Tieren.

Tabelle 37												
Behandlung	Transplantat	Mausnummer		Blut d13		Blut finale Analyse		KM finale Analyse		Milz finale Analyse		Analysetag n. KMT
				Bcr-Abl	T315I	Bcr-Abl	T315I	Bcr-Abl	T315I	Bcr-Abl	T315I	
unbehandelt	8.28 x 10 ⁴ Bcr-Abl 5.20 x 10 ³ T315I	8210	absolut prozentual	nicht erhoben		8,34E+07 31,70%	2,05E+07 7,80%	1,18E+06 21,50%	3,80E+05 6,90%	2,28E+07 44,70%	2,45E+06 4,80%	21
Nilotinib 200mg/kg + DLI 1 x 10 ⁶	1.42 x 10 ⁵ Bcr-Abl 9.50 x 10 ³ T315I	8523	absolut prozentual	1,69E+04 2,50%	9,48E+03 1,40%	keine Analyse						31
		8524	absolut prozentual	3,03E+04 0,80%	3,03E+04 0,80%	2,03E+04 0,50%	4,07E+03 0,10%	2,20E+04 0,20%	1,10E+04 0,10%	7,60E+03 0,20%	4,94E+04 1,30%	32
		8527	absolut prozentual	3,04E+04 1,50%	4,86E+04 2,40%	1,60E+06 29,90%	0,00E+00 0,00%	3,26E+06 14,80%	2,20E+04 0,10%	1,78E+06 13,70%	3,90E+04 0,30%	32
		8531	absolut prozentual	1,82E+04 1,20%	1,36E+04 0,90%	1,99E+04 0,40%	9,94E+03 0,20%	6,48E+05 0,90%	3,60E+05 0,50%	1,32E+05 0,20%	3,30E+05 0,50%	32
		8536	absolut prozentual	3,74E+04 0,70%	1,07E+04 0,20%	3,25E+04 0,50%	2,60E+04 0,40%	1,30E+04 0,10%	1,30E+04 0,10%	1,80E+04 0,10%	1,44E+05 0,80%	33

Tabelle 37: Übersicht der Ergebnisse der Behandlungsgruppe Nilotinib 200mg/kg KG + DLI 1 x 10⁶ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Dargestellt sind -soweit erhoben- jeweils prozentuale und absolute Werte der Blutanalyse an d13 (vor Behandlung), sowie der Blut-, Knochenmark- und Milzanalyse am Endanalysetag und der Endanalysezeitpunkt

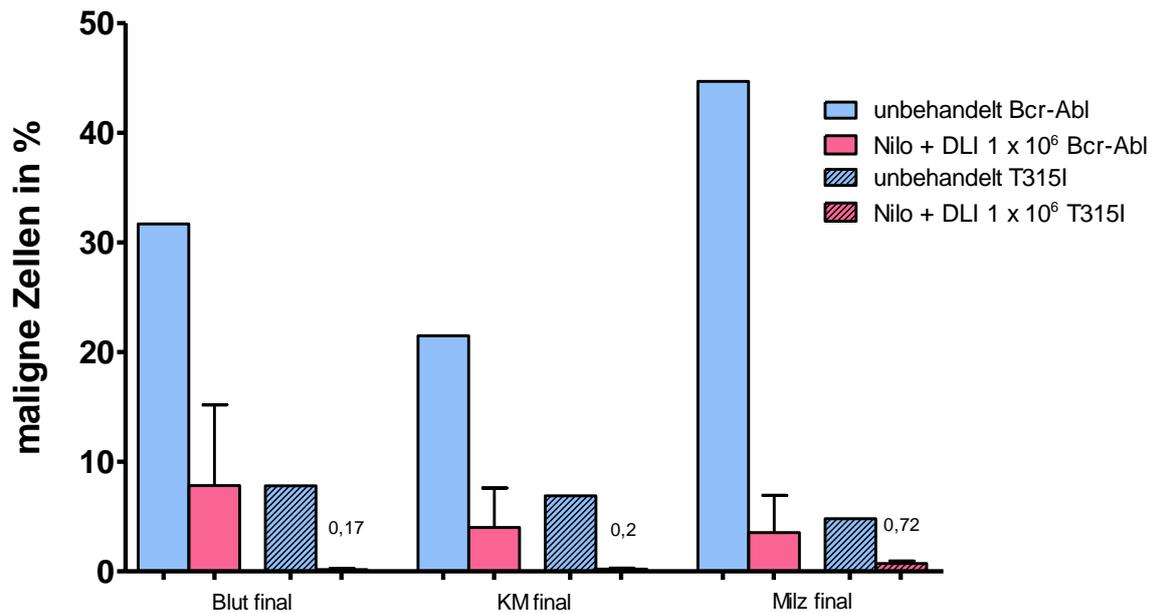


Abbildung 24: Ergebnisse der Behandlungsgruppe Nilotinib 200mg/kg KG + DLI 1 x 10⁶. (n=5) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollmaus (n=1). Dargestellt sind jeweils die prozentualen Werte der WT-Bcr-Abl und Bcr-Abl-T315I-positiven Zellen am Tag der Endanalyse (final) in Blut, Knochenmark und Milz.

Die Ergebnisse in Abbildung 24 zeigen, dass auch die Kombinationsbehandlung mit den niedrigst dosierten DLIs zuverlässig beide Leukämiezellarten abtötet und auch zu einer Verlängerung des Überlebens auf im Schnitt 32 Tage führt. Die unbehandelte Kontrolle überlebte nur 21 Tage. Eine GvHD wurde bei 1/5 Tieren beobachtet.

4.3.1 Übersichten über die Hemmung der beiden Leukämiezellarten durch die verschiedenen Behandlungen

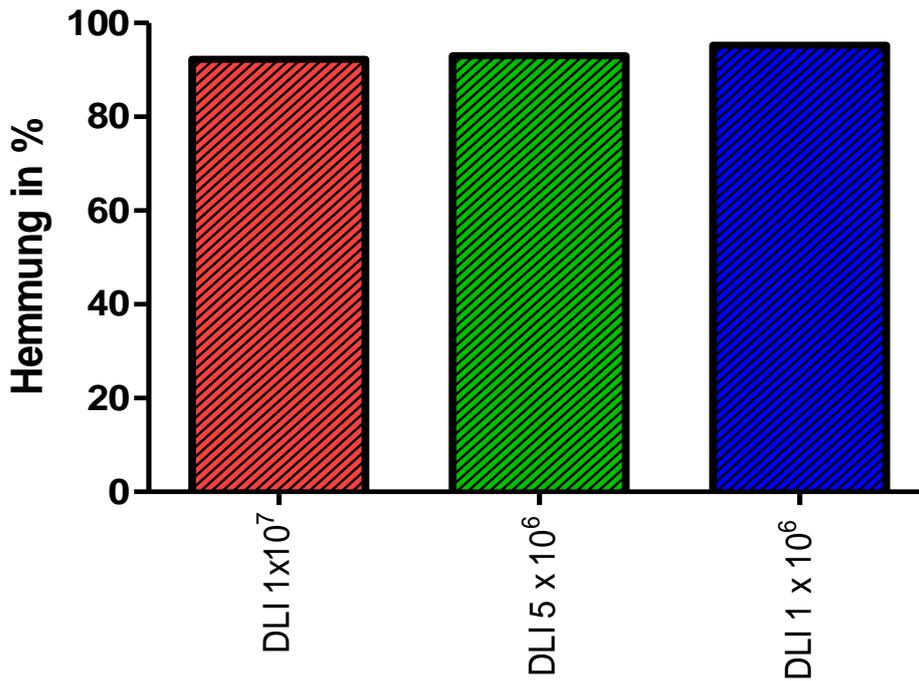


Abbildung 25: Dargestellt sind jeweils die durchschnittliche prozentuale Hemmung von Bcr-Abl T315I im Blut durch die verschiedenen DLI Dosierungen in Bezug auf die unbehandelte Kontrolle

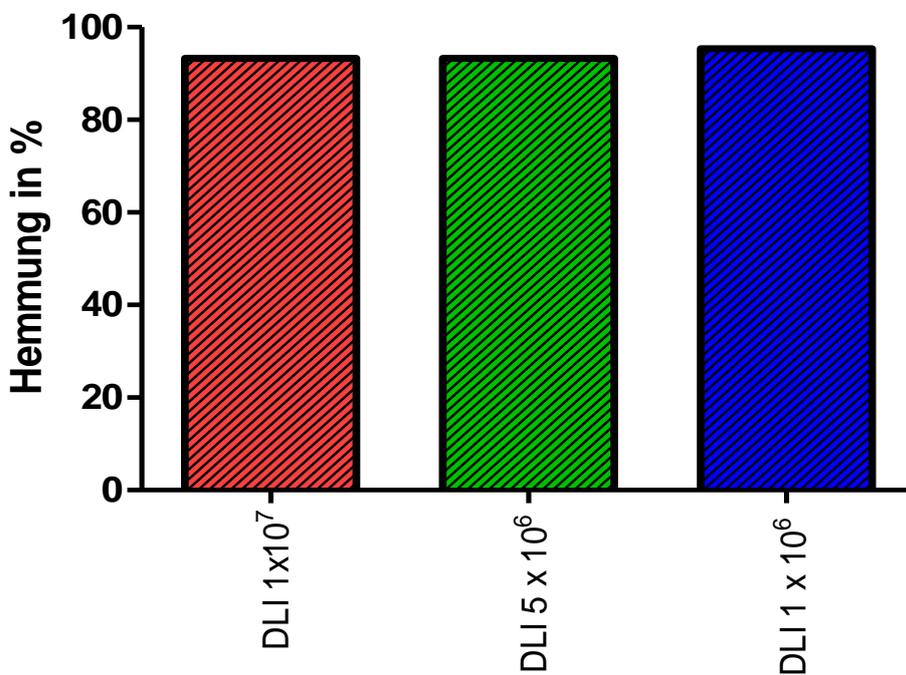


Abbildung 26: Dargestellt sind jeweils die durchschnittliche prozentuale Hemmung von Bcr-Abl T315I im Knochenmark durch die verschiedenen DLI Dosierungen in Bezug auf die unbehandelte Kontrolle

Die Ergebnisse in Abbildung 25 und 26 zeigen, dass die alleinige Gabe von DLI in allen drei getesteten Dosierungen die Bcr-Abl T315I Zellen im Wachstum hemmt.

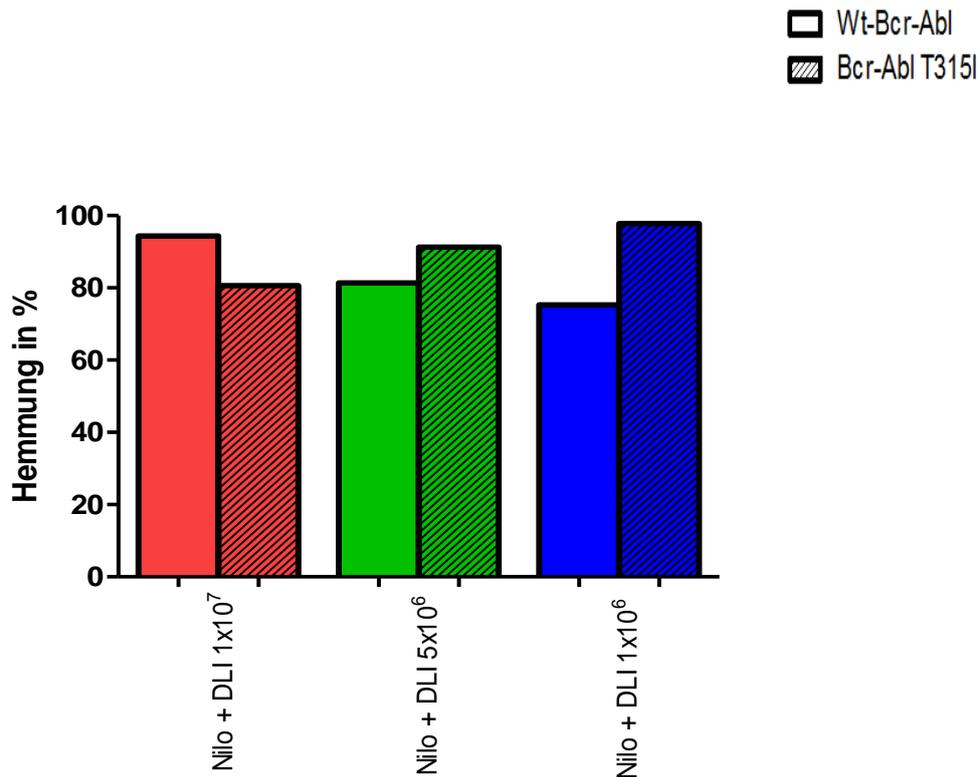


Abbildung 27: Dargestellt sind jeweils die durchschnittliche prozentuale Hemmung von WT-Bcr-Abl und Bcr-Abl T315I im Blut durch die verschiedenen Kombinationsbehandlungen in Bezug auf die unbehandelte Kontrolle

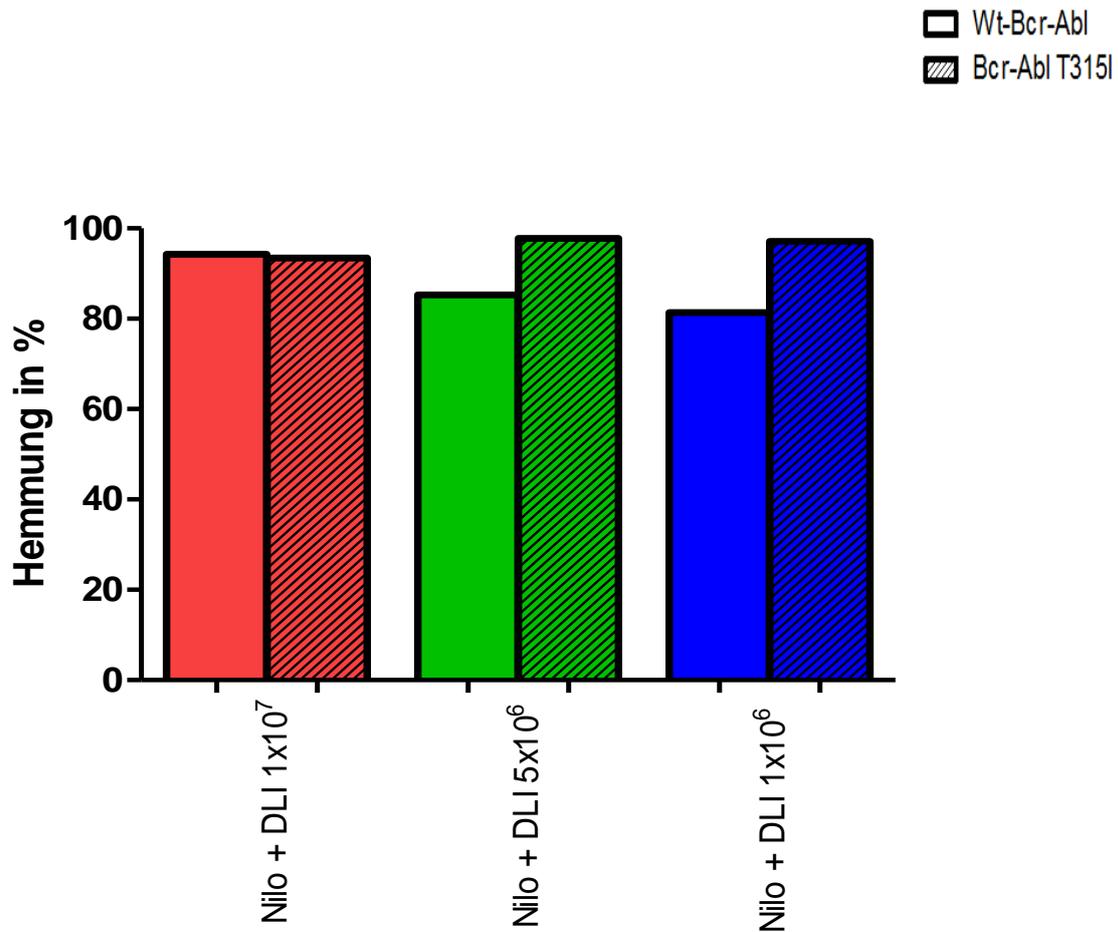


Abbildung 23: Dargestellt sind jeweils die durchschnittliche prozentuale Hemmung von WT-Bcr-Abl und Bcr-Abl T315I im Knochenmark durch die verschiedenen Kombinationsbehandlungen in Bezug auf die unbehandelte Kontrolle

Die Kombinationsbehandlung hemmt in allen drei Dosierungen beide Zellarten im Wachstum. Die Darstellung der Hemmung in der Milz wurde bewusst nicht gezeigt, da sich in den Versuchen ein deutlich geringeres Ansprechen der Bcr-Abl T315I Zellen auf alle DLI Dosierungen zeigte.

4.3.2 Übersicht über die mittlere Überlebenszeit in den verschiedenen Behandlungsgruppen

Beim Endpunkt Überlebenszeit zeigte sich eine Dosierung von 1×10^7 etwa gleichwertig zur niedrigsten Dosierung in Kombination mit Nilotinib. Bei drei von vier Dosierungen zeigte sich, dass durch die Kombination mit Nilotinib das Überleben deutlich verlängert werden kann. Durchschnittlich überlebten die mit Nilotinib allein behandelten Tiere am längsten.

Tabelle 38	
Therapie	mittlere Überlebenszeit in Tagen
DLI 5×10^7 mit Nilotinib	22 24,66
DLI 1×10^7 mit Nilotinib	33 27,75
DLI 5×10^6 mit Nilotinib	21 30,75
DLI 1×10^6 mit Nilotinib	26 32
Nilotinib allein	37,3

Tabelle 38: Darstellung der mittleren Überlebenszeit in Tagen der verschiedenen Behandlungsgruppen. Gezählt wurden die Tage nach KMT.

5. Diskussion

Die Behandlung von Rezidiven der CML nach allogenen Transplantationen gestaltet sich aktuell schwieriger, weil die Patienten in einem späteren Stadium der Erkrankung transplantiert werden, oft nach einer Blastenkrise oder nach Nachweis einer Resistenz gegenüber mindestens einem TKI. Der Erforschung der Therapie des Rezidivs nach allogener Stammzelltransplantation kommt eine große Bedeutung zu, da es zwar Behandlungsoptionen, wie eine erneute SZT, die Gabe von DLI oder TKI gibt, diese jedoch bei diesen Patienten nicht mehr regelmäßig ohne z.T. starke Nebenwirkungen wie eine GvHD zur Heilung führen. Daher ist die Entwicklung eines Modells zur Erforschung der Behandlungsoptionen, deren Kombination und möglichen Nebenwirkungen erforderlich.

Eine Möglichkeit ist die Untersuchung der medikamentösen Therapie und adoptiven Immuntherapie *in vitro*, mit entsprechenden Bcr-Abl-positiven Zelllinien. In diesem Rahmen lassen sich jedoch die komplexen Zusammenhänge einer malignen Erkrankung und Interaktionen zwischen der Erkrankung, Medikamenten und dem Immunsystem kaum erfassen. Aus ethischen Gründen ist auch die Erforschung der Behandlung im Menschen, ohne ausreichende Vortestungen und klinische Studien obsolet. Folglich bleiben *in vivo* Versuche im Tiermodell die sinnvollste Option.

5.1. Das Tiermodell

Das in dieser Doktorarbeit genutzte Modell wurde weiterentwickelt aus einem Mausmodell von Krause und van Etten (Krause & Van Etten 2004). Um den antileukämischen und evtl. immunsuppressiven Effekt der TKI und gleichzeitig, aber getrennt davon, die Wirkung der DLIs messen zu können, wird ein neues Mausmodell benötigt. Das in dieser Arbeit etablierte Modell enthält ebenfalls einen gemischten Chimärismus und eine Bcr-Abl-positive myeloproliferative Erkrankung. Es unterscheidet sich vom oben beschriebenen Modell aber insofern, als ein Teil der Erkrankung durch syngene mit dem Wildtyp-Bcr-Abl transduzierte Zellen und ein anderer Teil durch allogene mit der TKI-resistenten T315I Mutation transduzierte Zellen ausgelöst wird. Empfänger sind wiederum weibliche Balb/c Mäuse, die unbehandelte Knochenmarkspenden von männlichen C57Bl/6, sowie Spenden für transduziertes Knochenmark von

männlichen Balb/c (für die T315I Mutation) und C57Bl/6 Mäusen (für Wildtyp Bcr-Abl) erhalten. Sie entwickeln dann eine Erkrankung die sich zum Teil (Bcr-Abl) durch TKI und zum Teil (T315I) durch DLI aus männlichen C57Bl/6 Milzen behandeln lässt. Für die Transduktion wurden γ -Retroviren genutzt, wobei die Wildtyp Bcr-Abl Variante mit einem GFP und die Bcr-Abl-T315I Variante mit einem Venus-Protein gekoppelt ist. Daher können per Durchflusszytometrie beide Teile der Erkrankung nachgewiesen und eine Zu- oder Abnahme der Erkrankung durch die Behandlung beurteilt werden. Getestet wurden verschiedene DLI Dosierungen, verschiedene Nilotinib (als TKI) Dosierungen, sowie die Kombination von beiden. Analysiert wurde der Therapieeffekt auf TKI-resistente und -sensitive CML-Zellen und klinische Zeichen der GvHD.

Das Mausmodell sollte ursprünglich auf Stammzellen, die mit einem lentiviralen Vektor transduziert werden, beruhen. Ein Vorteil der Lentivektoren ist deren Fähigkeit auch ruhende, sich nicht teilende Zellen, zu infizieren (Mochizuki et al. 1998). Dies betrifft bei den hämatopoetischen Stammzellen immerhin 15 % (Wilson et al. 2008) und sollte daher nicht außer Acht gelassen werden. Ein weiterer Vorteil ist die langanhaltende Transgen-Expression *in vitro* (Sugiyama et al. 2005). In dieser Arbeit konnte kein Anwachsen der lentiviral transduzierten Stammzellen gezeigt werden. Auch durch Änderung des Stimulationscocktails und Optimierung der Transfektion zur Erhöhung der möglichen MOI bei Transduktion konnte kein Anwachsen erreicht werden. Dies hing womöglich mit zu niedrigen Transduktionsraten (WT-Bcr-Abl 2,1% und Bcr-Abl-T315I 1,6%) zusammen, weswegen auf einen γ -Retrovektor umgestiegen wurde, mit dem mehr Erfahrung bei *in vivo* Experimenten bestand. Hiermit wurden deutlich höhere Transduktionsraten erreicht (WT-Bcr-Abl 17,3% und Bcr-Abl-T315I 9,7%) und ein Anwachsen der transduzierten Zellen konnte ebenfalls gezeigt werden. Eine Erklärung für die Probleme bei der Transduktion mit dem lentiviralen Vektor könnte die geringe Ausprägung des VSV Rezeptors *low-density lipid receptor* (LDL-R) auf hämatopoetischen Stammzellen sein, die zu geringen Transduktionsraten bei Nutzung des VSV-G Hüllproteins führt. (Amirache et al. 2014). Die Nutzung des Eco-Hüllproteins in Kombination mit lentiviralen Vektoren führt erfahrungsgemäß zu niedrigeren Titern bei der Virusproduktion (Barrilleaux & Knoepfler 2011)

Der Transplantationszeitpunkt wird in anderen Arbeiten ebenfalls unterschiedlich angegeben. Uchida et al. empfehlen den ersten Tag nach Transduktion für die Transplantation (Uchida et al. 2009), während Li et al. eine zweimalige Transduktion im Abstand von 48h, und eine direkt auf die zweite Transduktion folgende Transplantation durchführen (Li et al. 1999). Peng et al. führten ebenfalls eine zweizeitige Transduktion, allerdings im Abstand von 24h und anschließende Transplantation durch (Peng & Li 2010). Eine mehrmalige Transduktion führte in unseren Versuchen zwar zu einer höheren Transduktionsrate, es blieben aber kaum vitale Zellen im Transplantat übrig, sodass ein Anwachsen der Zellen nicht zu erwarten war und auch nicht nachgewiesen werden konnte. Im unserem direkten Vergleich zwischen d1 und d3 nach Transduktion als Transplantationszeitpunkt konnten im Anwachsen und im Verlauf der Erkrankung keine großen Unterschiede festgestellt werden. Da aber durch eine längere Kultivierung die Gefahr einer Ausdifferenzierung der Stammzellen erhöht wird, wodurch sich dann keine CML, sondern ggf. eine akute Leukämie entwickeln könnte, wurde d1 nach Transduktion gewählt.

In dieser Arbeit wurden die weiblichen Balb/c Mäuse vor der Transplantation mit 8,5Gy Ganzkörper bestrahlt, um eine letale Bestrahlung zu erreichen. Dies wurde in einem entsprechenden Versuch gezeigt. In anderen Arbeiten wurde i.v. verabreichtes 5-Fluorouracil in der Dosierung 2 x 125mg/kg als Konditionierung verwendet (van Os et al. 1997) oder es erfolgte eine Bestrahlung mit 9Gy (Bryson et al. 1997; Blazar et al. 1996) oder zwei Bestrahlungen im Abstand von 14h mit je 5,5Gy (Chinnery et al. 2010). Die zeitlichen Vorteile einer einmaligen Bestrahlung liegen auf der Hand, auch für die Mäuse bedeutet das nur einmaligen Stress durch das Bestrahlungsprocedere. Die nötigen Bestrahlungsdosen sind außerdem von Alter und Gewicht der Tiere, der Rasse, sowie vom Bestrahlungsgerät abhängig. In den meisten Arbeiten werden jedoch C57Bl/6 als Empfänger genutzt, sodass die o.g. Bestrahlungsdosen nicht unbedingt auch für die in dieser Arbeit verwendete Balb/c Mäuse gültig sind. In unserem Vergleich zweier Dosen zeigte sich die geringere (8,5Gy) als ausreichend, um ein Anwachsen des Transplantates zu ermöglichen.

Die Transplantation selbst erfolgte am Nachmittag des Bestrahlungstages, nachdem die Tiere sich von der morgendlichen Bestrahlung selbst wieder erholt hatten. Die Empfängertiere erhielten jeweils 5×10^6 untransduzierte CD3ε

depletierte Knochenmarkzellen und je nach Versuch variierende Zahlen von transduzierten Stammzellen. In anderen Arbeiten wurden 3×10^7 bzw. 6×10^6 (Krause & Van Etten 2004), $1-2 \times 10^7$ (Blazar et al. 1996), 1×10^7 (Bryson et al. 1997; Lu et al. 2012), $3-5 \times 10^6$ Knochenmarkzellen im Abstand von 3h (Chinnery et al. 2010) bzw. 4-6h (Bryson et al. 1997) zur Bestrahlung transplantiert.

In jedem Transplantationsversuch wurden unterschiedliche Zahlen an transduzierten Stammzellen je Maus transplantiert. Diese Unterschiede ergaben sich durch variierende Transduktionsraten. Tabelle 40 gibt einen Überblick über die Transplantate. In jedem dieser Versuche konnte ein Anwachsen der Zellen gezeigt werden, sodass leichte Schwankungen in den Transduktionsraten bzw. transplantierten Zellzahlen keinen Einfluss auf die Durchführbarkeit der Experimente haben.

Tabelle 39				
Versuch	WT-Bcr-Abl+ Zellzahl im Transplantat	T315I+ Zellzahl im Transplantat	untransduzierte KM- Zellen	Verhältnis transduziert/untransduziert
1	$5,52 \times 10^4$	$3,39 \times 10^4$	$8,32 \times 10^6$	~ 1/100
2	$7,56 \times 10^4$	$9,59 \times 10^4$	$8,1 \times 10^6$	~ 1/50
3	$5,88 \times 10^4$	$5,64 \times 10^3$	5×10^6	~ 1/90
4	$1,22 \times 10^4$	$1,03 \times 10^4$	5×10^6	~ 1/250
5	$8,28 \times 10^4$	$5,20 \times 10^3$	5×10^6	~ 1/60
6	$1,42 \times 10^5$	$9,50 \times 10^3$	5×10^6	~ 1/30

Tabelle 39: Überblick über die verschiedenen Transplantate in den fünf Versuchen die mit retroviralen Vektoren transduzierten Stammzellen durchgeführt wurden. Dargestellt sind jeweils die WT-Bcr-Abl+, die Bcr-Ab-T315I+ Zellen und das untransduzierte KM im Transplantat, sowie das Verhältnis zwischen transduzierten und untransduzierten Zellen.

In anderen Arbeiten wurden 2×10^5 (Krause & Van Etten 2004) oder 1×10^4 transduzierte Stammzellen transplantiert, wobei die geringere Zahl mit einem längeren Überleben korrelierte. Als optimal wurde ein Verhältnis von 1:500 zwischen transduzierten und untransduzierten Zellen beschrieben (Lu et al. 2012). Das optimale Verhältnis ist jedoch vermutlich von der Wachstumsdynamik der transduzierten Zellen abhängig. In Tabelle 40 sind die Verhältnisse zwischen transduzierten und untransduzierten Zellen in den einzelnen Versuchen dargestellt, diese reichen von 1/30 bis 1/250. Eine signifikante Verlängerung des Überlebens bei geringerer Dosis transduzierter Zellen wurde nicht gesehen, dies

ist jedoch aufgrund der unterschiedlichen Behandlungen im Verlauf nach KMT auch nicht zu vergleichen.

13 Tage nach KMT konnten im Blut im Schnitt 1,4% bzw. $4,8 \times 10^4$ WT-Bcr-Abl+ Zellen und 2,5% bzw. $3,7 \times 10^4$ Bcr-Abl-T315I+ Zellen per Facsanalyse nachgewiesen werden.

5.2. Die Therapien

Die Tiere wurden ab Tag 14 nach KMT mit Nilotinib und/oder DLIs in verschiedenen Dosierungen behandelt. Dieser Zeitpunkt entspricht den Angaben in vergleichbaren Arbeiten (Lu et al. 2012; Krause & Van Etten 2004).

Im Falle von Nilotinib konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass 200mg/kg KG die WT-Bcr-Abl+ Zellen deutlich in ihrer Proliferation hemmt und in einigen Tiere auch komplett unter die Facs-Nachweisgrenze drückt. In anderen Arbeiten wurde eine Dosierung von 20mg/kg (Weisberg et al. 2007) benutzt, hier handelte es sich allerdings um keine transduzierten Stammzellen als Transplantat, sondern eine Zelllinie. In den meisten Arbeiten mit transduzierten Stammzellen wird im Gegensatz zu unseren Versuchen Imatinib benutzt. Da sich in unseren *in vitro* Resistenztestungen mit Imatinib eine Resistenz der transduzierten Stammzellen auf geringe Dosierungen von Imatinib gezeigt hatte, begannen wir *in vivo* direkt mit einer etwas höheren Dosierung von Nilotinib (50mg/kg) und steigerten diese bis sich ein Ansprechen der Zellen zeigte. Dies trat erst bei 200mg/kg ein. Es erfolgte außerdem eine Verträglichkeitstestung dieser hohen Dosierung an Mäusen, die nur untransduziertes Knochenmark als Transplantat erhielten. Hier zeigte sich eine gute Verträglichkeit.

Für die DLIs konnte gezeigt werden, dass auch eine Dosierung von 1×10^6 noch wirkungsvoll die Bcr-Abl-T315I+ Zellen tötet. Begonnen wurde mit einer Dosierung von 5×10^7 , diese Dosierung orientierte sich an vergleichbaren Arbeiten: 4×10^7 (Krause & Van Etten 2004), 3×10^7 (Lu et al. 2012). Um auftretende GvHD Symptome wie Hautveränderungen, Diarrhoe und damit einhergehend starker Gewichtsverlust zu minimieren reduzierten wir von Versuch zu Versuch die Dosis um die Hälfte ohne einen signifikanten Verlust an Wirkung zu beobachten.

Die Kombination von Nilotinib + DLI führte im Durchschnitt zu einer Lebensverlängerung (28,79 Tage vs. 25,5 Tage) im Vergleich zur Behandlung mit DLI allein. Gründe hierfür können die Wirkung des Nilotinibs auf die Wilttyp Bcr-

Abl Zellen aber auch eine Reduktion der Intensität der GVHD, auch wenn Letztere nicht klinisch Evident wurde. Die Behandlung mit Nilotinib allein führte im Schnitt zum längsten Überleben (37,3 Tage), was dafür spricht, dass die zusätzliche Behandlung mit DLI zwar eine bessere antileukämische Kontrolle ermöglicht, aber auch mehr Toxizität verursacht. Eine weitere Reduktion der DLI-Dosis scheint erforderlich zu sein.

Außerdem fiel in den Versuchen auf, dass die Bcr-Abl-T315I+ Zellen in der Milz jeweils das geringste Ansprechen auf die Behandlung mit DLI zeigten.

Wie in den Ergebnissen erwähnt, wurden einzelne Tiere aus der Wertung genommen (dort farblich markiert), da sich eine akute Leukämie entwickelte und daher die auf eine langsam proliferierende chronische Leukämie ausgelegten Therapien keine Wirkung zeigen konnten. Als Ursache dieser akuten Leukämien wird die zufällige Integration des Vektors ins Wirtsgenom während der Transduktion gesehen. Hieraus ergibt sich die Möglichkeit, dass die Mutation in einen Bereich integriert wird, der durch Enhancer transkriptionsverstärkt wird, wodurch sich die deutlich stärkere Proliferation erklärt.

Zusammenfassung

Es konnte ein Mausmodell der chronisch myeloischen Leukämie basierend auf der Transplantation von frisch transduzierten lineage-cell-depletierten Knochenmarkzellen etabliert werden, an dem sich die Wirkung einer Behandlung mit zum einen Tyrosinkinaseinhibitoren und zum anderen DLIs getrennt voneinander und kombiniert beobachten lässt. Dafür wurden zwei Retroviren kloniert, die zuverlässig Wildtyp Bcr-Abl+ Stammzellen bzw. Bcr-Abl T315I Mutation+ Stammzellen transduzieren. Diese Stammzellen wachsen in zuvor Knochenmark letal bestrahlten weiblichen Balb/c Mäusen an und führen zu einer WT-Bcr-Abl positiven bzw. Bcr-Abl-T315I positiven Leukämie, die sich innerhalb von 12-13d nach KMT per Facs und PCR in Blut, Milz und Knochenmark nachweisen lassen. Die PCR wurde ebenfalls zu diesem Zweck etabliert.

In der Behandlung der Tiere wurde eine Dosis von 200mg/kg KG Nilotinib als behandelungseffektiv eingestuft. Mit dieser Dosis lässt sich in den meisten Fällen die Wildtyp Bcr-Abl+ Leukämie gut im Wachstum hemmen oder sogar unter die Nachweisgrenze der Facsanalyse senken.

Für die DLIs konnte gezeigt werden, dass die Bcr-Abl-T315I+ Leukämie noch gut auf eine Behandlung mit einer Dosierung von 1×10^6 CD3- Splenocyten anspricht.

Die Kombinationsbehandlung von Nilotinib und DLIs wurde von den Tieren gut vertragen, wirkte in der entsprechenden Dosierung auch gegen beide Leukämiezellarten, jedoch konnte der Effekt einer Verringerung der GvHD nicht direkt gezeigt werden. Jedoch zeigte sich tendenziell eine Verlängerung des Überlebens der doppelt behandelten Tiere, was indirekt die Hypothese untermauert. Die in dieser Arbeit durchgeführten Behandlungen dienten nur der Testung dieses Modells. Weitergehende Untersuchungen sind erforderlich, um die Effekte der TKI und DLIs genauer zu quantifizieren.

6. Abkürzungsverzeichnis

<i>Abelson murine leukemia viral oncogene</i>	Abl
Adenosintriphosphat	ATP
Akute lymphatische Leukämie	ALL
Basenpaare	bp
<i>Bovines Serumalbumin</i>	BSA
<i>Breakpoint Cluster Region</i>	Bcr
Calciumchlorid	CaCl
<i>Calf intestine Alkaline Phosphatase</i>	CIAP
Chronisch myeloische Leukämie	CML
<i>Cluster of differentiation</i>	CD
<i>Complete molecular response</i>	CMR
<i>Deoxyribonucleic acid</i>	DNA
Dimethylsulfoxid	DMSO
<i>Donor lymphocyte infusion</i>	DLI
<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>	DMEM
Escherichia coli (Hüllprotein)	Eco
Ethylendiamintetraacetat	EDTA
<i>Fetal calf serum</i>	FCS
<i>Fibroblast growth factor</i>	FGF
Fluorescein isothiocyanate	FITC
<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>	FACS
Fluoreszenz-in-situ-Hybrisierung	FISH
<i>Forward scatter</i>	FSC
Gaba-B Rezeptor 2	GBR2
Gastrointestinale Stromatumoren	GIST
<i>Graft-versus-Host-Disease</i>	GvHD
<i>Graft-versus-Leukemia</i>	GvL
<i>GRB2-associated binding protein 2</i>	GAB2
<i>Green fluorescent protein</i>	GFP
<i>Hepes-buffered-saline</i>	HBS
<i>Human leukocyte antigen</i>	HLA
Imatinib	Ima
<i>individual ventilated cage</i>	IVC
<i>Insulin-like growth factor</i>	IGF2
<i>Interferon Consensus Sequence Binding Protein</i>	ICSBP
Interferon-alpha	IFN-alpha
Interleukin	IL
<i>International Randomized Study of IFN versus STI571</i>	IRIS
Intravenös	iv
<i>Jun B proto-oncogene</i>	JUNB
Killer-Zell-Immunglobulin-Rezeptoren	KIR
Knochenmarktransplantation	KMT

Körpergewicht	KG
<i>Linker of activated T cells</i>	LAT
<i>Lysogeny broth</i>	LB
<i>Major histocompatibility complex</i>	MHC
<i>Major molecular response</i>	MMR
<i>Messenger RNA</i>	mRNA
<i>Multiplicity of infection</i>	MOI
Myeloproliferative Erkrankung (<i>myeloproliferative disease</i>)	MPD
<i>Myeloproliferative neoplasms</i>	MPN
<i>National Cancer Institute</i>	NCI
Natriumpyruvate	NaPy
Natural Killer Zellen	NK-Zellen
Nilotinib	Nilo
N-Methyl-2-pyrrolidon	NMP
Osteomyelofibrose	OMF
Philadelphia-Chromosom-positiv	Ph+
<i>Phosphate buffered saline</i>	PBS
Phosphoinositid-3-Kinase	PI3K
Phycoerythrin	PE
<i>Platelet-derived growth factor receptor-β</i>	PDGFR- β
Polycythaemia vera	PV
PolyEthylenGlykol	PEG
<i>Polymerase Chain Reaction</i>	PCR
<i>Proto-oncogene B-Raf</i>	BRAF
<i>Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src (sarcoma)</i>	Src
<i>Ras-proximate-1</i>	RAP1
Rat sarcoma	Ras
Raumtemperatur	RT
<i>Recombinant human granulocyte colony stimulating factor</i>	rhG-CSF
<i>Reduced intensity conditioning</i>	RIC
Reverse Transkriptase	RT
<i>Ribonucleic acid</i>	RNA
Roswell Park Memorial Institute	RPMI
Serum-Free Expansion Medium	SFEM
SH2 tyrosine phosphatase	SHP2
SH2-containing protein	SHC2
<i>Side scatter</i>	SSC
<i>Signal-induced proliferation-associated 1</i>	SIPA1
Son of sevenless	SOS
Src-homology 2	SH2
<i>Src-homology 3</i>	SH3
Stammzellen	SZ
Stammzelltransplantation	SZT

Stemcellfactor	SCF
Subkutan	s.c.
Tag (day)	d
T-cell-receptor	TCR
Thrombopoetin	TPO
Transduziert	transd.
Transplantation related mortality	TRM
Tumornekrosefaktor	TNF
Tyrosinkinaseinhibitoren	TKI
Ultraviolett	UV
Vesicular stomatitis virus (Hüllprotein)	VSV-G
Wildtyp	WT
<i>World Health Organisation</i>	WHO
Zeta-chain-associated protein kinase 70	ZAP70

7. Literaturverzeichnis

- Amirache, F. et al., 2014. Mystery solved: VSV-G-LVs do not allow efficient gene transfer into unstimulated T cells, B cells, and HSCs because they lack the LDL receptor. *Blood*, 123(9), pp.1422–4. Available at: <http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/123/9/1422.long?sso-checked=1> [Accessed July 1, 2014].
- Appel, S. et al., 2004. Imatinib mesylate affects the development and function of dendritic cells generated from CD34+ peripheral blood progenitor cells. *Blood*, 103(2), pp.538–44. Available at: <http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/103/2/538> [Accessed April 17, 2013].
- Apperley, J.F., 2007. Part I: mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. *The lancet oncology*, 8(11), pp.1018–29. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17976612> [Accessed August 17, 2012].
- Baccarani, M. et al., 2002. A randomized study of interferon-alpha versus interferon-alpha and low-dose arabinosyl cytosine in chronic myeloid leukemia. *Blood*, 99(5), pp.1527–35. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11861264> [Accessed March 25, 2014].
- BARNES, D.W. et al., 1956. Treatment of murine leukaemia with X rays and homologous bone marrow; preliminary communication. *British medical journal*, 2(4993), pp.626–7. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2035298&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 18, 2012].
- Barrilleaux, B. & Knoepfler, P., 2011. Transduction of human cells with polymer-complexed ecotropic lentivirus for enhanced biosafety. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (53). Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3196183&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 1, 2014].
- Blazar, B.R. et al., 1996. Lethal murine graft-versus-host disease induced by donor gamma/delta expressing T cells with specificity for host nonclassical major histocompatibility complex class Ib antigens. *Blood*, 87(2), pp.827–37. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8555509> [Accessed November 4, 2013].
- Bryson, J.S. et al., 1997. Enhanced graft-versus-host disease in older recipient mice following allogeneic bone marrow transplantation. *Bone marrow transplantation*, 19(7), pp.721–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9156250> [Accessed November 4, 2013].
- Buchdunger, E. et al., 1995. Selective inhibition of the platelet-derived growth factor signal transduction pathway by a protein-tyrosine kinase inhibitor of the 2-phenylaminopyrimidine class. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(7), pp.2558–62. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=42257&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 17, 2012].

Burgess, M.R. et al., 2005. Comparative analysis of two clinically active BCR-ABL kinase inhibitors reveals the role of conformation-specific binding in resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(9), pp.3395–400. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=552942&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 17, 2012].

Chen, J. et al., 2008. Nilotinib hampers the proliferation and function of CD8+ T lymphocytes through inhibition of T cell receptor signalling. *Journal of cellular and molecular medicine*, 12(5B), pp.2107–18. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18194453> [Accessed August 20, 2012].

Chinnery, H.R., Ruitenber, M.J. & McMenamin, P.G., 2010. Novel characterization of monocyte-derived cell populations in the meninges and choroid plexus and their rates of replenishment in bone marrow chimeric mice. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 69(9), pp.896–909.

Collins, R.H. et al., 1997. Donor leukocyte infusions in 140 patients with relapsed malignancy after allogeneic bone marrow transplantation. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 15(2), pp.433–44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9053463> [Accessed August 20, 2012].

Le Coutre, P. et al., 2000. Induction of resistance to the Abelson inhibitor STI571 in human leukemic cells through gene amplification. *Blood*, 95(5), pp.1758–66. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10688835> [Accessed August 17, 2012].

Deol, A. & Lum, L.G., 2010. Role of donor lymphocyte infusions in relapsed hematological malignancies after stem cell transplantation revisited. *Cancer treatment reviews*, 36(7), pp.528–38. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2921454&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 20, 2012].

Dewar, A.L. et al., 2005. Imatinib inhibits the functional capacity of cultured human monocytes. *Immunology and cell biology*, 83(1), pp.48–56. Available at: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1711.2004.01296.x> [Accessed May 12, 2013].

Druker, B.J. et al., 1996. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nature medicine*, 2(5), pp.561–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8616716> [Accessed August 17, 2012].

Druker, B.J. et al., 2001. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *The New England journal of medicine*, 344(14), pp.1031–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11287972> [Accessed March 25, 2014].

- Druker, B.J. et al., 2006. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *The New England journal of medicine*, 355(23), pp.2408–17. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17151364> [Accessed August 17, 2012].
- Druker, B.J. & Lydon, N.B., 2000. Lessons learned from the development of an abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. *The Journal of clinical investigation*, 105(1), pp.3–7. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=382593&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 30, 2012].
- Eck, M.J. & Manley, P.W., 2009. The interplay of structural information and functional studies in kinase drug design: insights from BCR-Abl. *Current opinion in cell biology*, 21(2), pp.288–95. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19217274> [Accessed July 19, 2012].
- Eide, C.A. et al., 2011. The ABL switch control inhibitor DCC-2036 is active against the chronic myeloid leukemia mutant BCR-ABL T315I and exhibits a narrow resistance profile. *Cancer research*, 71(9), pp.3189–95. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3206627&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 17, 2012].
- Fefer, A. et al., 1979. Disappearance of Ph1-positive cells in four patients with chronic granulocytic leukemia after chemotherapy, irradiation and marrow transplantation from an identical twin. *The New England journal of medicine*, 300(7), pp.333–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/366408> [Accessed August 17, 2012].
- Ferrara, J.L.M. et al., 2009. Graft-versus-host disease. *Lancet*, 373(9674), pp.1550–61. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673609602373> [Accessed May 6, 2014].
- Gambacorti-Passerini, C. et al., 2011. Multicenter independent assessment of outcomes in chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib. *Journal of the National Cancer Institute*, 103(7), pp.553–61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21422402> [Accessed August 17, 2012].
- Di Gion, P. et al., 2011. Clinical pharmacokinetics of tyrosine kinase inhibitors: focus on pyrimidines, pyridines and pyrroles. *Clinical pharmacokinetics*, 50(9), pp.551–603. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21827214> [Accessed August 17, 2012].
- Glucksberg, H. et al., 1974. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation*, 18(4), pp.295–304. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4153799> [Accessed August 18, 2012].
- Gorre, M.E. et al., 2001. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science (New York, N.Y.)*, 293(5531), pp.876–80. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11423618> [Accessed August 3, 2012].

- Gratwohl, A. et al., 1998. Risk assessment for patients with chronic myeloid leukaemia before allogeneic blood or marrow transplantation. Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Lancet*, 352(9134), pp.1087–92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9798583> [Accessed August 17, 2012].
- Hauch, M. et al., 1990. Anti-leukemia potential of interleukin-2 activated natural killer cells after bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. *Blood*, 75(11), pp.2250–62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2189508> [Accessed August 18, 2012].
- He, H. et al., 2012. Prognostic analysis of chronic myeloid leukemia in Chinese population in an imatinib era. *Frontiers of medicine*, 6(2), pp.204–11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22660978> [Accessed July 22, 2013].
- Hehlmann, R. et al., 1993. Randomized comparison of busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia: prolongation of survival by hydroxyurea. The German CML Study Group. *Blood*, 82(2), pp.398–407. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8329700> [Accessed March 25, 2014].
- Hehlmann, R., Hochhaus, A. & Baccarani, M., 2007. Chronic myeloid leukaemia. *Lancet*, 370(9584), pp.342–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17662883> [Accessed August 14, 2012].
- Hsieh, M.H. & Korngold, R., 2000. Differential use of FasL- and perforin-mediated cytolytic mechanisms by T-cell subsets involved in graft-versus-myeloid leukemia responses. *Blood*, 96(3), pp.1047–55. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10910921> [Accessed August 18, 2012].
- Johnson, K.J. et al., 2012. Medical conditions and risk of adult myeloid leukemia. *Cancer causes & control : CCC*, 23(7), pp.1083–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22576581> [Accessed August 17, 2012].
- Joo, Y.-D. et al., 2012. G-CSF-treated donor CD4(+) T cells attenuate acute GVHD through a reduction in Th17 cell differentiation. *Cytokine*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22819244> [Accessed August 18, 2012].
- Kantarjian, H. et al., 2010. Dasatinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *The New England journal of medicine*, 362(24), pp.2260–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20525995> [Accessed March 25, 2014].
- Kantarjian, H.M. et al., 1988. Characteristics of accelerated disease in chronic myelogenous leukemia. *Cancer*, 61(7), pp.1441–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3162181> [Accessed August 17, 2012].
- Kantarjian, H.M. et al., 2002. Imatinib mesylate therapy for relapse after allogeneic stem cell transplantation for chronic myelogenous leukemia. *Blood*, 100(5), pp.1590–1595. Available at: <http://bloodjournal.hematologylibrary.org/cgi/content/abstract/100/5/1590> [Accessed August 21, 2012].

- Khoury, H.J. et al., 2012. Prognostic factors for outcomes in allogeneic transplantation for CML in the imatinib era: a CIBMTR analysis. *Bone marrow transplantation*, 47(6), pp.810–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21986636> [Accessed August 18, 2012].
- Kim, J., Haddad, R.Y. & Atallah, E., 2012. Myeloproliferative neoplasms. *Disease-a-month : DM*, 58(4), pp.177–94. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22449367> [Accessed July 29, 2012].
- Klyuchnikov, E. et al., 2009. Second-generation tyrosine kinase inhibitors in the post-transplant period in patients with chronic myeloid leukemia or Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia. *Acta haematologica*, 122(1), pp.6–10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19602874> [Accessed August 18, 2012].
- Kolb, H.J. et al., 1990. Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood*, 76(12), pp.2462–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2265242> [Accessed August 20, 2012].
- Kolb, H.-J., 2008. Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. *Blood*, 112(12), pp.4371–83. Available at: <http://bloodjournal.hematologylibrary.org/cgi/content/abstract/112/12/4371> [Accessed July 22, 2012].
- Krause, D.S. & Van Etten, R.A., 2004. Adoptive immunotherapy of BCR-ABL-induced chronic myeloid leukemia-like myeloproliferative disease in a murine model. *Blood*, 104(13), pp.4236–44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15308567> [Accessed August 21, 2012].
- Kühlcke, K. et al., 2002. Highly efficient retroviral gene transfer based on centrifugation-mediated vector preloading of tissue culture vessels. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 5(4), pp.473–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11945075> [Accessed March 25, 2014].
- Langer-Safer, P.R., Levine, M. & Ward, D.C., 1982. Immunological method for mapping genes on Drosophila polytene chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(14), pp.4381–5. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=346675&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 25, 2014].
- Li, S. et al., 1999. The P190, P210, and P230 Forms of the BCR/ABL Oncogene Induce a Similar Chronic Myeloid Leukemia-like Syndrome in Mice but Have Different Lymphoid Leukemogenic Activity. *Journal of Experimental Medicine*, 189(9), pp.1399–1412. Available at: http://jem.rupress.org/content/189/9/1399.abstract?ijkey=90af1f2169c733bfcd21fd527f51574ec0f08938&keytype2=tf_ipsecsha [Accessed October 30, 2012].
- Lu, Y.-F. et al., 2012. Distinct graft-versus-leukemic stem cell effects of early or delayed donor leukocyte infusions in a mouse chronic myeloid leukemia model. *Blood*, 119(1), pp.273–84. Available at:

- <http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/119/1/273.full> [Accessed October 29, 2012].
- Mahon, F.X. et al., 2000. Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance. *Blood*, 96(3), pp.1070–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10910924> [Accessed August 17, 2012].
- Mochizuki, H. et al., 1998. High-Titer Human Immunodeficiency Virus Type 1-Based Vector Systems for Gene Delivery into Nondividing Cells. *J. Virol.*, 72(11), pp.8873–8883. Available at: <http://jvi.asm.org/content/72/11/8873.long> [Accessed November 4, 2013].
- O'Brien, S.G. & Deininger, M.W.N., 2003. Imatinib in patients with newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *Seminars in hematology*, 40(2 Suppl 2), pp.26–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12783372> [Accessed August 17, 2012].
- O'Hare, T. et al., 2009. AP24534, a pan-BCR-ABL inhibitor for chronic myeloid leukemia, potently inhibits the T315I mutant and overcomes mutation-based resistance. *Cancer cell*, 16(5), pp.401–12. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2804470&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 15, 2012].
- O'Hare, T. et al., 2008. SGX393 inhibits the CML mutant Bcr-AblT315I and preempts in vitro resistance when combined with nilotinib or dasatinib. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(14), pp.5507–12. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2291110&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 17, 2012].
- O'Hare, T. et al., 2011. Targeting the BCR-ABL signaling pathway in therapy-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemia. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 17(2), pp.212–21. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21098337> [Accessed August 17, 2012].
- Van Os, R. et al., 1997. Host Conditioning With 5-Fluorouracil and kit-Ligand to Provide for Long-Term Bone Marrow Engraftment. *Blood*, 89(7), pp.2376–2383. Available at: <http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/89/7/2376.long> [Accessed November 9, 2013].
- Palandri, F. et al., 2007. Imatinib therapy for chronic myeloid leukemia patients who relapse after allogeneic stem cell transplantation: a molecular analysis. *Bone marrow transplantation*, 39(3), pp.189–91. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bmt.1705554> [Accessed August 21, 2012].
- Peng, C. & Li, S., 2010. CML mouse model in translational research. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 602, pp.253–66. Available at: <http://www.springerlink.com/content/u5370g1633w4271u/> [Accessed October 30, 2012].

- Pinilla-Ibarz, J. & Flinn, I., 2012. The expanding options for front-line treatment in patients with newly diagnosed CML. *Critical reviews in oncology/hematology*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22487423> [Accessed August 17, 2012].
- Przepiorka, D. et al., 1995. 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. *Bone marrow transplantation*, 15(6), pp.825–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7581076> [Accessed August 18, 2012].
- Qian, L., Wu, Z. & Shen, J., 2013. Advances in the treatment of acute graft-versus-host disease. *Journal of cellular and molecular medicine*, 17(8), pp.966–75. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3780546&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 20, 2014].
- Ren, R., 2005. Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. *Nature reviews. Cancer*, 5(3), pp.172–83. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15719031> [Accessed July 17, 2012].
- Rosti, G. et al., 2007. Impact of age on the outcome of patients with chronic myeloid leukemia in late chronic phase: results of a phase II study of the GIMEMA CML Working Party. *Haematologica*, 92(1), pp.101–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17229641> [Accessed July 22, 2013].
- Ruggeri, L. et al., 2002. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science (New York, N.Y.)*, 295(5562), pp.2097–100. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11896281> [Accessed July 14, 2012].
- Santos, F.P.S. et al., Evolution of therapies for chronic myelogenous leukemia. *Cancer journal (Sudbury, Mass.)*, 17(6), pp.465–76. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22157290> [Accessed August 17, 2012].
- Saussele, S. et al., 2010. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo SCT) for chronic myeloid leukemia in the imatinib era: evaluation of its impact within a subgroup of the randomized German CML Study IV. *Blood*, 115(10), pp.1880–5. Available at: <http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/115/10/1880.long> [Accessed May 12, 2013].
- Savani, B.N. et al., 2005. Imatinib synergizes with donor lymphocyte infusions to achieve rapid molecular remission of CML relapsing after allogeneic stem cell transplantation. *Bone marrow transplantation*, 36(11), pp.1009–15. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bmt.1705167> [Accessed August 21, 2012].
- Sawyers, C.L., 1999. Chronic myeloid leukemia. *The New England journal of medicine*, 340(17), pp.1330–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10219069> [Accessed August 17, 2012].
- Schade, A.E. et al., 2008. Dasatinib, a small-molecule protein tyrosine kinase inhibitor, inhibits T-cell activation and proliferation. *Blood*, 111(3), pp.1366–77. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2214733&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 16, 2012].

- Schiffer, C.A., 2007. BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors for chronic myelogenous leukemia. *The New England journal of medicine*, 357(3), pp.258–65. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17634461> [Accessed March 25, 2014].
- Schiffer, C.A., Hehlmann, R. & Larson, R., 2003. Perspectives on the treatment of chronic phase and advanced phase CML and Philadelphia chromosome positive ALL(1). *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, 17(4), pp.691–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12682626> [Accessed August 17, 2012].
- Schmaltz, C. et al., 2003. Donor T cell-derived TNF is required for graft-versus-host disease and graft-versus-tumor activity after bone marrow transplantation. *Blood*, 101(6), pp.2440–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12424195> [Accessed August 18, 2012].
- Seggewiss, R. et al., 2005. Imatinib inhibits T-cell receptor-mediated T-cell proliferation and activation in a dose-dependent manner. *Blood*, 105(6), pp.2473–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15572591> [Accessed August 1, 2012].
- Shiobara, S. et al., 2000. Donor leukocyte infusion for Japanese patients with relapsed leukemia after allogeneic bone marrow transplantation: lower incidence of acute graft-versus-host disease and improved outcome. *Bone marrow transplantation*, 26(7), pp.769–74. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11042659> [Accessed August 20, 2012].
- Sica, S. et al., 1995. Chemotherapy and recombinant human granulocyte colony-stimulating factor primed donor leukocyte infusion for treatment of relapse after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone marrow transplantation*, 16(3), pp.483–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8535325> [Accessed August 20, 2012].
- Slavin, S. et al., 1996. Allogeneic cell therapy with donor peripheral blood cells and recombinant human interleukin-2 to treat leukemia relapse after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*, 87(6), pp.2195–204. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8630379> [Accessed August 20, 2012].
- Sokal, J.E. et al., 1984. Prognostic discrimination in “good-risk” chronic granulocytic leukemia. *Blood*, 63(4), pp.789–99. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6584184> [Accessed August 17, 2012].
- Storb, R., 2009. Reduced-intensity conditioning transplantation in myeloid malignancies. *Current opinion in oncology*, 21 Suppl 1, pp.S3–5. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2895692&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 26, 2014].
- Sugiyama, O. et al., 2005. Lentivirus-mediated gene transfer induces long-term transgene expression of BMP-2 in vitro and new bone formation in vivo. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 11(3), pp.390–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15727935> [Accessed November 4, 2013].

- Talpaz, M. et al., 2006. Dasatinib in imatinib-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemias. *The New England journal of medicine*, 354(24), pp.2531–41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16775234> [Accessed August 1, 2012].
- Tapper, E.B. et al., 2009. Portopulmonary hypertension: imatinib as a novel treatment and the Emory experience with this condition. *Transplantation proceedings*, 41(5), pp.1969–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19545770> [Accessed August 17, 2012].
- Tefferi, A., Thiele, J. & Vardiman, J.W., 2009. The 2008 World Health Organization classification system for myeloproliferative neoplasms: order out of chaos. *Cancer*, 115(17), pp.3842–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19472396> [Accessed August 17, 2012].
- Torgerson, S.R., Haddad, R.Y. & Atallah, E., 2012. Chronic myelogenous leukemia for primary care physicians. *Disease-a-month : DM*, 58(4), pp.168–76. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22449366> [Accessed July 29, 2012].
- Uchida, N. et al., 2009. Leukemogenesis of b2a2-type p210 BCR/ABL in a bone marrow transplantation mouse model using a lentiviral vector. *Journal of Nippon Medical School = Nippon Ika Daigaku zasshi*, 76(3), pp.134–47. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19602820> [Accessed October 30, 2012].
- Vardiman, J.W., Harris, N.L. & Brunning, R.D., 2002. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*, 100(7), pp.2292–302. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12239137> [Accessed July 30, 2012].
- Wang, J.Y., 2000. Regulation of cell death by the Abl tyrosine kinase. *Oncogene*, 19(49), pp.5643–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11114745> [Accessed August 17, 2012].
- Weiden, P.L. et al., 1981. Antileukemic effect of chronic graft-versus-host disease: contribution to improved survival after allogeneic marrow transplantation. *The New England journal of medicine*, 304(25), pp.1529–33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7015133> [Accessed March 25, 2014].
- Weisberg, E. et al., 2007. Beneficial effects of combining nilotinib and imatinib in preclinical models of BCR-ABL+ leukemias. *Blood*, 109(5), pp.2112–20. Available at: <http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/109/5/2112.long> [Accessed October 31, 2012].
- Weisberg, E. et al., 2005. Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl. *Cancer cell*, 7(2), pp.129–41. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2005.01.007> [Accessed July 21, 2012].
- Wicklein, D. et al., 2013. E- and p-selectins are essential for repopulation of chronic myelogenous and chronic eosinophilic leukemias in a scid mouse xenograft model. *PloS one*, 8(7), p.e70139. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3724803&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 13, 2013].

- Wilson, A. et al., 2008. Hematopoietic Stem Cells Reversibly Switch from Dormancy to Self-Renewal during Homeostasis and Repair. *Cell*, 135(6), pp.1118–1129. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S009286740801386X> [Accessed November 4, 2013].
- Wolff, D. et al., 2010. Consensus conference on clinical practice in chronic graft-versus-host disease (GVHD): first-line and topical treatment of chronic GVHD. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, 16(12), pp.1611–28. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20601036> [Accessed August 10, 2012].
- Woodring, P.J., Hunter, T. & Wang, J.Y.J., 2003. Regulation of F-actin-dependent processes by the Abl family of tyrosine kinases. *Journal of cell science*, 116(Pt 13), pp.2613–26. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12775773> [Accessed August 17, 2012].
- Yang, F.-C. et al., 2008. Nf1-dependent tumors require a microenvironment containing Nf1+/- and c-kit-dependent bone marrow. *Cell*, 135(3), pp.437–48. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2788814&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 17, 2012].
- Young, M.A. et al., 2006. Structure of the kinase domain of an imatinib-resistant Abl mutant in complex with the Aurora kinase inhibitor VX-680. *Cancer research*, 66(2), pp.1007–14. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16424036> [Accessed July 30, 2013].
- Yu, J. et al., 2009. Breaking tolerance to self, circulating natural killer cells expressing inhibitory KIR for non-self HLA exhibit effector function after T cell-depleted allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood*, 113(16), pp.3875–84. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2670800&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 22, 2014].
- Zuckerman, T. et al., 2012. Allogeneic stem cell transplantation for patients with chronic myeloid leukemia: Risk stratified approach with a long-term follow-up. *American journal of hematology*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22847303> [Accessed August 6, 2012].

8. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift:

Lebenslauf entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

Lebenslauf entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei Herrn PD. Dr. med. Francis Ayuketang Ayuk, Oberarzt der Klinik für Stammzelltransplantation des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit unter seiner Leitung und Betreuung durchzuführen. Auch für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens möchte ich mich herzlich bedanken.

Besonderen Dank auch an die gesamte Arbeitsgruppe Fehse für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, viele wertvolle Anregungen und stete Hilfsbereitschaft, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Besonders hervorheben möchte ich hier Tanja Sonntag, die mir stets zur Seite stand und zu einer guten Freundin geworden ist.

Bei meinen Eltern möchte ich mich ganz besonders herzlich bedanken für die uneingeschränkte, liebevolle und vielseitige Unterstützung während meines Studiums, ohne die diese Arbeit so nicht möglich gewesen wäre.