

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

II. Medizinische Klinik und Poliklinik

Prof. Dr. med. Carsten Bokemeyer

**Erhöhte Selbsterneuerungskapazität und Proliferationsrate
hämatopoetischer Stammzellen nach BET-Inhibition durch JQ1**

Dissertation

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

vorgelegt von

Jara Pascale Schlichting
aus Hamburg

Hamburg 2022

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am 10.02.2023**

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

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Boris Fehse

Prüfungsausschuss, zweite Gutachterin: Prof. Dr. Dr. Sonja Loges

Inhaltsverzeichnis

Arbeitshypothese und Fragestellung	6
1. Einleitung	7
1.1 Die <i>Hallmarks of Cancer</i> – Krebs-Kennzeichen	8
1.1.1 <i>Sustaining proliferative signaling</i> – Proliferations-Signale aufrechterhalten	8
1.1.2 <i>Evading growth suppressors</i> – Sich Wachstumshemmern entziehen.....	9
1.1.3 <i>Resisting Cell-Death</i> – Dem Zelltod entgehen.....	9
1.1.4 <i>Enabling replicative immortality</i> – Replikative Unsterblichkeit.....	10
1.1.5 <i>Inducing Angiogenesis</i> – Angiogenese induzieren	10
1.1.6 <i>Activating invasion and metastasis</i> – Invasion und Metastasierung.....	10
1.2 <i>Enabling Characteristics and Emerging Hallmarks</i> – Weitere grundlegende Eigenschaften.....	11
1.2.1 <i>Genome Instability and Mutation</i> – Genominstabilität und Mutation	11
1.2.2 <i>Tumor-Promoting Inflammation</i> – Tumorwachstumsfördernde Entzündung	11
1.2.3 <i>Reprogramming Energy Metabolism</i> – Energie-Stoffwechsel umprogrammieren	12
1.2.4 <i>Evading Immune Destruction</i> – Dem Immunsystem entgehen	12
1.3 Die physiologische Hämatopoese	13
1.3.1 Lymphopoese und Myelopoese	13
1.4 Rolle und Funktion der Krebsstammzelle	15
1.5 Epigenetische Prozesse als Teil der Onkogenese	16
1.6 <i>Bromodomain and extra terminal domain</i> -(BET-)Inhibition mittels JQ1	16
1.7 Ziel dieser Dissertation.....	19
2. Material	20
2.1 Chemikalien	20
2.2 Puffer	20
2.3 Labor-Geräte	20
2.4 Kits und vorgefertigte Substanzen	21
2.5 Oligonukleotide	22
2.6 Antikörper	22

2.7 Mausstämme und Ethik-Richtlinien	23
2.8 Software	23
3. Methoden.....	24
3.1 <i>In vitro</i> -Methoden.....	24
3.1.1 RNA-Isolation.....	24
3.1.2 cDNA-Synthese	25
3.1.3 RT-qPCR	25
3.1.4 Durchflusszytometrie und Analyse	26
3.1.5 Lyse von Erythrozyten.....	26
3.1.6 Depletion <i>lineage</i> -positiver Zellen	26
3.1.7 Bromodesoxyuridine-Färbung	27
3.1.8 Koloniezählung (engl. <i>colony formation assays</i>).....	27
3.1.9 Grenzverdünnungsanalyse	28
3.1.10 Statistik und weitere Berechnungen	28
3.2. <i>In vivo</i> -Methoden	29
3.2.1 Gewinnen und Aufbereitung von Knochenmarkzellen	29
3.2.2 Submandibuläre Blutentnahme	29
3.2.3 Intraperitoneale Applikation von DMSO und JQ1	29
3.2.4 Knochenmark-Transplantation	29
4. Ergebnisse	31
4.1 BET-Expression hämatopoetischer Zellen	31
4.2 Das hämatopoetische System nach Behandlung mit JQ1	33
4.2.1 Myelo- und Lymphopoese.....	37
4.3 Juvenile und adulte Hämatopoese nach JQ1-Behandlung im Vergleich.....	39
4.3.1 Proliferation hämatopoetischer Stammzellen nach Behandlung mit JQ1.....	40
4.4 Kompetitive Repopulation nach Behandlung mit JQ1.....	42
4.5 Myeloische und lymphatische Reihe nach Transplantation mit JQ1 behandelte Knochenmarkzellen	44
4.5.1 Erhöhte Stammzell-Fitness nach Behandlung mit JQ1.....	45

4.6 Rekonstitution der Blutbildung nach Bestrahlung und Behandlung mit JQ1	46
5. Diskussion.....	52
5.1 Zellkontext-abhängige Expression von <i>Brd2</i> , <i>Brd3</i> und <i>Brd4</i>	53
5.2 Wachstumsverzögerung und Depletion der Lymphozyten bei gleichzeitiger Mobilisation der hämatopoetischen Stammzellen durch JQ1-Behandlung	54
5.2.1 Differenzierungs-Stopp der B-Lymphozyten durch JQ1-Behandlung.....	56
5.3 Erhöhte Anzahl und Proliferation hämatopoetischer Stammzellen nach BET-Inhibition mit JQ1	56
5.4 Überlegene Repopulationskapazität hämatopoetischer Stammzellen nach Behandlung mit JQ1 und Stammzelltransplantation	57
5.5 Nicht-anhalten des Zelltyp-assoziierten Effekts JQ1s nach Stammzelltransplantation.....	58
5.5.1 Sekundäre Transplantation mit JQ1 behandelter Zellen – langanhaltend erhöhte Stammzellfitness.....	59
5.6 Schnellere hämatologische Rekonstitution nach JQ1-Behandlung und Myelosuppression durch Bestrahlung	59
Fazit.....	62
Zusammenfassung	66
Summary	67
Literaturverzeichnis.....	68
Danksagung	78
Lebenslauf.....	79
Eidesstattliche Erklärung	80

Arbeitshypothese und Fragestellung

Die Proteine der *bromodomain and extra terminal domain* (BET) Familie erkennen als epigenetische Lesedomänen acetylierte, an Histone gebundene Lysinreste und bewirken durch Interaktion mit ihnen als Transkriptionskofaktoren die Aktivierung und Inaktivierung von Genen (Taniguchi, 2016; Wu & Chiang, 2007). Sie spielen nicht nur in der Entstehung der NUT-Mittellinienkarzinome (French et al., 2003) sondern auch hämatologischer Erkrankungen eine Rolle (Zuber et al., 2011).

Die Beteiligung epigenetischer Prozesse an der Entstehung von Krebserkrankungen rückt in den Fokus moderner Krebsforschung. Substanzen wie Azacitidin, ein DNA-Methyltransferaseinhibitor, werden bereits klinisch eingesetzt. OTX015 und CPI-0610, BET-Inhibitoren, die an die Bromodomänen der BET-Proteine binden, werden in klinischen Studien zur Behandlung hämatologischer Erkrankungen (Berthon et al., 2016; Mascarenhas et al., 2021) und solider Tumore (Riveiro et al., 2016) untersucht.

Ziel dieser Dissertation ist es, einen Überblick über den Effekt einer BET-Inhibition mittels der niedermolekularen Verbindung (englisch *small molecule*) JQ1, welche kompetitiv die Acetyllysin-Bindungsdomäne von BET-Proteinen hemmt (Filippakopoulos et al., 2010), auf die gesunde Hämatopoese zu gewinnen.

Dafür untersuchten wir mittels quantitativer Echtzeit-PCR (engl. *real-time quantitative PCR*, RT-qPCR) zunächst die BET-Expression unterschiedlicher Zellen des hämatopoetischen Systems, bevor wir in Tierversuchen den Effekt der BET-Inhibition auf diese Zellen quantifizierten. Schließlich versuchten wir im Rahmen kompetitiver Repopulations-Experimente nicht nur die Anzahl, sondern auch die Fitness hämatopoetischer Stammzellen nach Behandlung der Versuchstiere mit JQ1 im Vergleich zur mit Placebo behandelten Kontrollgruppe darzustellen.

Die Ergebnisse der Arbeit sind bereits in Coautorenschaft unter dem Titel „BET-inhibition by JQ1 promotes proliferation and self-renewal capacity of hematopoietic stem cells“ im Journal *Haematologica*, Juni 2018, publiziert.

1. Einleitung

Die Diagnose "Krebs" ist ein einschneidendes Lebensereignis, das zahlreiche Fragen aufwirft. Dies ist nicht zuletzt der großen Heterogenität der Erkrankung geschuldet. Unzählige Faktoren tragen zu einer großen Varianz innerhalb des Krankheitsspektrums bei.

Nicht nur Ursprungsgewebe und Fortschritt der Erkrankung sind maßgebliche Einflussfaktoren auf die Prognose, sondern, je nach Entität, weitere Merkmale wie der genetische Hintergrund, ggf. vorhandene Hormon- oder Wachstumsfaktor-Rezeptoren, bei soliden Tumoren das Vorkommen von Tochtergeschwülsten (Metastasen) und nicht zuletzt die vorhandenen Therapiekonzepte.

Die chronisch myeloische Leukämie (CML) ist durch eine spezifische Chromosomenaberration, die Philadelphia-Translokation t(9,22) mit dem Fusionsgen *BCR-ABL*, gekennzeichnet. Der Tyrosinkinaseinhibitor (TKI) Imatinib – das erste Präparat seiner Substanzklasse – ist ein Beispiel für die sogenannte *targeted therapy* (englisch, in etwa „gezielte Therapie“), welche zielgerichtet das krankheitsdefinierende Genprodukt inhibiert. Die gezielte Wirkung der *BCR-ABL* TKI zeigte durchschlagenden Erfolg mit Remissionsraten bis 80 % nach Neudiagnose. Dies führte zu einem Paradigmenwechsel in der Behandlung der Erkrankung (Baccarani et al., 2013; Druker, 2009; Nowell, 2007).

Eine weitere breit eingesetzte Substanz ist der monoklonale Antikörper Rituximab. 1997 wurde Rituximab als erster monoklonaler Antikörper zur Behandlung maligner Erkrankungen eingesetzt. Rituximab bindet an den B-Zell-Oberflächenmarker CD20 und löst eine antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität durch Natürliche-Killer-Zellen (NK-Zellen) aus, welche durch eine Rituximab-vermittelte Polarisierung der B-Zellen begünstigt wird. Initial zur Behandlung von Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) eingesetzt, findet die Substanz inzwischen auch in der Rheumatologie Verwendung (Maloney et al., 1997; Rudnicka et al., 2013).

Patienten mit akuter Promyelozytenleukämie (APL), einer seltenen Form der akuten myeloischen Leukämie (AML), die der Niedrig- bis Intermediär-Risiko-Gruppe angehören, können durch die Chemotherapie-freie Behandlung mit einer Kombination aus All-trans-Retinsäure (ATRA) und Arsentrioxid (ATO) in über 90 % der Fälle kurativ behandelt werden (Platzbecker et al., 2017). ATRA bindet

an den Retinsäurerezeptor- α (engl. *retinoic acid receptor α* , RARA), Teil des pathognomonischen *PML-RARA* Fusiononkogens, und führt zu einer Ausdifferenzierung der Promyelozytenblasten in reife Granulozyten, während ATO über spezifische Bindung an das *Promyelocytotic Leukemia Protein* (PML) sowohl eine partielle Differenzierung vermittelt als auch Apoptose der malignen Zellen induziert (de The & Chen, 2010).

Medizinisch nicht vorgebildeten Personen ist die Unterschiedlichkeit der Behandlungsmethoden – von *targeted therapy* über Chemotherapie, Bestrahlung oder Chirurgie - oft schwer zu erklären. Immer wieder tauchen „Wunderheilmittel gegen Krebs“ in den Medien auf. In Wahrheit scheint ein Allheilmittel weiter entfernt, je mehr wir über die Biologie von Krebszellen erfahren.

1.1 Die *Hallmarks of Cancer* – Krebs-Kennzeichen

2000 fassten Hanahan und Weinberg in ihrer bahnbrechenden Publikation *Hallmarks of Cancer* sechs Merkmale zusammen, die allen Krebsarten gemein sind. Unzählige Therapieansätze moderner Krebstherapie beruhen auf den von ihnen formulierten Eigenschaften (Hanahan & Weinberg, 2000).

Im Folgenden möchte ich einen kurzen Überblick über die genannten *Hallmarks* geben:

1.1.1 *Sustaining proliferative signaling* – Proliferations-Signale aufrechterhalten

Während benigne Zellen zur Aufrechterhaltung der Homöostase in Apoptose gehen, umgehen Krebszellen den programmierten Zelltod. Detaillierte Mechanismen sind weiterhin unklar, jedoch scheint ihre anhaltende Proliferation auf folgenden Grundprinzipien zu beruhen: Autokrin, mittels Überexpression von Wachstumsfaktoren oder deren Rezeptoren, und parakrin, durch Aktivierung des Tumor-Mikromilieus zur Bereitstellung von Wachstumsfaktoren.

Durch Mutation strukturell veränderter Rezeptoren können sie sich außerdem unabhängig von Ligandenbindung aktivieren. Zudem scheint die direkte Aktivierung weiter downstream nachgeschaltet liegender Teile der Enzymkaskade z. B. des Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) Reaktionswegs eine Rolle in der Onkogenese zu spielen (Bhowmick et al., 2004; Jiang & Liu, 2009; Lemmon & Schlessinger, 2010; Yuan & Cantley, 2008).

1.1.2 *Evading growth suppressors* – Sich Wachstumshemmern entziehen

Um eine konstante Proliferation aufrecht zu erhalten, müssen maligne Zellen die dem befallenen Organismus eigenen wachstumshemmenden Mechanismen umgehen. Prominente Beispiele sind die *TP53*- und Retinoblastom- (*RB*-) Tumorsuppressorgene.

Namensgebend für *RB* ist der Verlust beider *RB*-Allele, welcher zur Entstehung des Retinoblastoms führt. Am besten untersucht ist seine Funktion im Zellzyklus. Zahlreiche Studien belegen, dass *RB* in der Entstehung unzähliger weiterer Krebsarten, wie dem kleinzelligen Bronchialkarzinom oder dem Zervixkarzinom, eine Rolle spielt. Zahlreiche Proteine binden an das *RB*-Genprodukt, und die verschiedenen Enzymkaskaden sind bisher nicht ausreichend verstanden (Burkhardt & Sage, 2008; Lipinski & Jacks, 1999).

Das Genprodukt des Tumorsuppressorgen *TP53* ist eine der Schlüsselfiguren für den Erhalt der Genomstabilität. Der „Wächter des Genoms“ wird durch Faktoren wie Zellstress, Genominstabilität oder Zellschäden aktiviert. An verschiedenen Punkten des Zellzyklus verhindert p53 so die Replikation geschädigter DNA (Ghebranious & Donehower, 1998; Pellegata et al., 1996).

1.1.3 *Resisting Cell-Death* – Dem Zelltod entgehen

Um zu überleben, müssen maligne Zellen den physiologischen Mechanismen entgehen, die zum Zelltod führen. Beim „programmierten Zelltod“, der Apoptose, erfolgt intrinsisch eine Permeabilitätssteigerung der mitochondrialen Membran, durch die zahlreiche pro-apoptotische Proteine wie z. B. Cytochrom C in das Zellinnere gelangen. Extrinsisch führt Ligandenbindung an Zelloberflächenrezeptoren downstream, ähnlich dem intrinsischen Weg, zur Aktivierung von Caspasen (Lowe et al., 2004).

Die Autophagozytose führt bei fehlenden Substraten, Wachstumsfaktoren oder Hypoxie durch Bildung eines Autophagosoms, welches ganze Zellorganellen umschließt und schließlich mit Lysosomen fusioniert, zur Selbstverdauung der Zelle. Dadurch hat es eine Recyclingfunktion, in der Zellbestandteile nun anderweitig dem Organismus zur Verfügung stehen, und trägt zudem durch Zersetzung fehlgefalteter Proteine zur Genomstabilität bei (Levine & Kroemer, 2008).

Während maligne Zellen Apoptose und Autophagozytose umgehen müssen, ist Nekrose, durch die damit einhergehende Ausschüttung pro-inflammatorischer Faktoren, meist mit einem Überlebensvorteil für Krebsgeschwüre assoziiert (Hanahan & Weinberg, 2011).

1.1.4 *Enabling replicative immortality* – Replikative Unsterblichkeit

Wesentliches Merkmal der Zellalterung ist die Telomerverkürzung mit jeder Zellteilung. Telomere sind aus Nukleotid-Repeats bestehende Enden linearer Chromosomen. Nach einer endlichen Anzahl an Zellteilungen, der sogenannten Hayflick-Grenze, verlieren sie ihre genomstabilisierende Funktion. In einem gesunden Organismus führt die Verkürzung der Telomere zur Apoptose oder Seneszenz.

Maligne Zellen können z. B. durch Aktivierung der reversen Transkriptase Telomerase die Verkürzung ihrer Telomere verhindern. Auch die Deaktivierung von p53 und Telomerase führt zu einer hohen Tumorzinzidenz. Durch den Ausfall von Apoptose oder Seneszenz führt die Verkürzung der Telomere zu End-zu-End-Fusionen und instabilen Chromosomen mit zwei Zentromeren (Artandi & DePinho, 2010; Shay & Wright, 2000).

1.1.5 *Inducing Angiogenesis* – Angiogenese induzieren

Um anhaltendes Wachstum leisten zu können, benötigen Krebsgeschwüre eine ausreichende Zufuhr an Nährstoffen und Sauerstoff. In Tumoren wird durch ein Überwiegen von angiogeneseinduzierenden Faktoren, wie z. B. *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), gegenüber endogenen Inhibitoren der sogenannte *angiogenic switch* vermittelt und die Bildung neuer Blutgefäße angeregt. Die neu gebildeten Gefäße sind abnormal geformt, unorganisiert und aufgrund der irregulär angeordneten Endothelzellen undicht (Hanahan & Folkman, 1996; McDonald & Baluk, 2002).

1.1.6 *Activating invasion and metastasis* – Invasion und Metastasierung

Transkriptionsfaktoren wie SNAIL (SNAI1), SLUG (SNAI2) und TWIST regulieren die Expression von E-Cadherin, einem Adhäsionsprotein, welches der Stabilisierung von Zell-Zell-Kontakten dient. Sie induzieren zudem einen Übergang epithelialer in Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften, die sogenannte epithelial-mesenchymale Transition (EMT).

Der Verlust von E-Cadherin und der damit einhergehende Verlust der Zell-Zell-Adhäsion ist der erste Schritt der Metastasierungskaskade. Die EMT verändert den Zellphänotyp, was von einer transienten Veränderung der Zellpolarität bis zum kompletten Rearrangement des Zytoskeletts reichen kann (Klymkowsky & Savagner, 2009; Onder et al., 2008).

Während die zugrundeliegenden Mechanismen der Metastasierung weiterhin Gegenstand intensiver Forschung sind, rückt die Interaktion mit dem Tumor-Mikromilieu immer weiter in den Fokus, und es scheint, dass zahlreiche Zellen am Prozess der Metastasierung beteiligt sind (Joyce & Pollard, 2009).

1.2 *Enabling Characteristics and Emerging Hallmarks* – Weitere grundlegende Eigenschaften

Während die *Hallmarks of Cancer* grundlegende Eigenschaften darstellen, die in ihrer Gesamtheit Krebs definieren, beschreiben Hanahan und Weinberg in der 2011 erschienenen Neu-Auflage und Aktualisierung ihres Papers vier weitere Faktoren, welche sie als mögliche weitere *Hallmarks* deklarierten (Hanahan & Weinberg, 2011).

1.2.1 *Genome Instability and Mutation* – Genominstabilität und Mutation

Allen *Hallmarks* liegen Genominstabilität oder Mutationen zugrunde. Angeborene Mutationen der Keimbahn, Chromosomenaberration oder erworbene Mutationen führen durch fehlerhafte DNA-Reparaturprozesse zu chromosomaler Instabilität. Mittels Genomsequenzierung konnten unzählige individuelle Mutationen in malignen Zellen identifiziert werden.

Mutmaßlich ist die große Anzahl erworbener Mutationen maligner Zellen ihrer hohen Proliferationsrate geschuldet. Fehlerhafte DNA-Reparaturprozesse, z. B. durch Deaktivierung von *TP53* lassen dabei eine ungehemmte Replikation weiterer geschädigter Genprodukte zu (Negrini et al., 2010; Salk et al., 2010).

1.2.2 *Tumor-Promoting Inflammation* – Tumorwachstumsfördernde Entzündung

Immunhistochemische Untersuchungen zeigen entzündliche Infiltrate in nahezu allen Krebsgeschwüren. In speziellen Fällen, wie dem MALT-Lymphom (englisch *Mucosa Associated Lymphoid Tissue*) liegt der Erkrankung eine Infektion mit dem Bakterium *Helicobacter pylori* zugrunde. Im Allgemeinen bringen entzündliche Prozesse des Tumor-Mikromilieus u. a. durch Neoangiogenese

pro-proliferative Substanzen wie Wachstumsfaktoren oder Mutagene wie Sauerstoffradikale in die Tumorumgebung ein.

Trotz der zahlreichen Antitumor-Effekte der angeborenen und erworbenen Immunantwort, spielen Entzündungszellen unterschiedlicher Art eine entscheidende Rolle in Entstehung, Progression und Erhalt maligner Erkrankungen (Grivennikov et al., 2010; Mantovani et al., 2008).

1.2.3 *Reprogramming Energy Metabolism* – Energie-Stoffwechsel umprogrammieren

Um ihr ungebremstes Wachstum aufrecht zu erhalten, müssen maligne Zellen ihren Energiestoffwechsel anpassen. Umso erstaunlicher ist die paradox erscheinende Beobachtung Otto Warburgs in den 1920er Jahren, dass Krebszellen im aeroben Milieu Energie nicht durch den Citratzyklus, sondern durch Glykolyse generieren. Ein Effekt, den sich Mediziner mit der Fluordesoxyglucose-Positronen-Emissions-Tomographie (FDG-PET) zunutze machen, um stoffwechselaktive Bereiche von Tumoren bildmorphologisch sichtbar zu machen.

Um die vergleichsweise geringe Effektivität der „aeroben Glykolyse“ auszugleichen, erhöhen Tumorzellen kompensatorisch die Expression von Glucosetransportern. Während die komplexen Zusammenhänge unterschiedlicher Stoffwechselwege und ihrer Bedeutung für die Entstehung und Aufrechterhaltung maligner Geschwüre letztlich nicht verstanden sind, scheinen die veränderten Stoffwechselwege fast immer mit aktivierten Onkogenen assoziiert zu sein (Jones & Thompson, 2009).

1.2.4 *Evading Immune Destruction* – Dem Immunsystem entgehen

Unser Immunsystem überwacht Entstehung und Wachstum bösartiger Tumore. Dabei scheint seine Funktion vielfältig zu sein und nicht nur der sofortigen Erkennung entarteter Zellen, sondern auch der Unterdrückung des Wachstums kleiner, klinisch bisher unauffälliger Läsionen zu dienen.

Klinisch lässt sich eine Zunahme maligner Erkrankungen immunkomprimierter Patienten beobachten. Somit scheint die Fähigkeit, dem angeborenen oder erworbenen Immunsystem zu entgehen, sich als weitere Kernfunktion von Krebsgeschwüren herauszukristallisieren (Kim et al., 2007; Teng et al., 2008).

1.3 Die physiologische Hämatopoese

Die *Hallmarks of Cancer* verdeutlichen, wie eng maligne Prozesse mit physiologischen Körperfunktionen verknüpft sind. Da diese Arbeit Einflüsse auf die physiologische Hämatopoese beleuchtet, möchte ich die untersuchten Zellpopulationen in diesem Abschnitt genauer vorstellen.

Die Bildung der zellulären Blutbestandteile bezeichnet man als Hämatopoese. Mit zunehmender Ausdifferenzierung gewinnen Blutzellen zellspezifische Eigenschaften und verlieren ihre Selbsterneuerungskapazität.

„Langzeit“-Stammzellen (engl. *long term hematopoietic stem cells*, LT-HSC) besitzen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung in alle weiteren Zelltypen des blutbildenden Systems. In Mausversuchen konnte gezeigt werden, dass sie zur langfristigen Rekonstitution des hämatopoetischen Systems fähig sind. Ihnen entspringen „Kurzzeit“-Stammzellen (engl. *short term hematopoietic stem cells*, ST-HSC), welche das blutbildende System nur für einen kurzen Zeitraum aufrechterhalten können (Liu et al., 2012).

Durch asymmetrische Zellteilung der HSC entstehen zwei nicht-identische Tochterzellen; eine mit Stammzeleigenschaften, um den Stammzellpool zu erhalten und eine weiter differenzierte Tochterzelle (Morrison & Kimble, 2006). Die multipotenten Vorläufer- oder Progenitorzellen (MPP) besitzen keine Selbsterneuerungskapazität mehr. Dieser heterogenen Zellgruppe entspringen die linienspezifischen lymphatischen und myeloischen Vorläuferzellen (engl. *common lymphoid progenitor*, CLP; *common myeloid progenitor*, CMP). Während die CLP gemeinsamer Vorläufer der B- und T-Lymphozyten sowie der Natürlichen-Killer-Zellen (NK-Zellen) sind, entstehen aus CMP die Makrophagen-Granulozyten-Vorläuferzellen (GMP) und die Megakaryozyten-Erythrozyten-Vorläuferzellen (MEP) (Seita & Weissman, 2010).

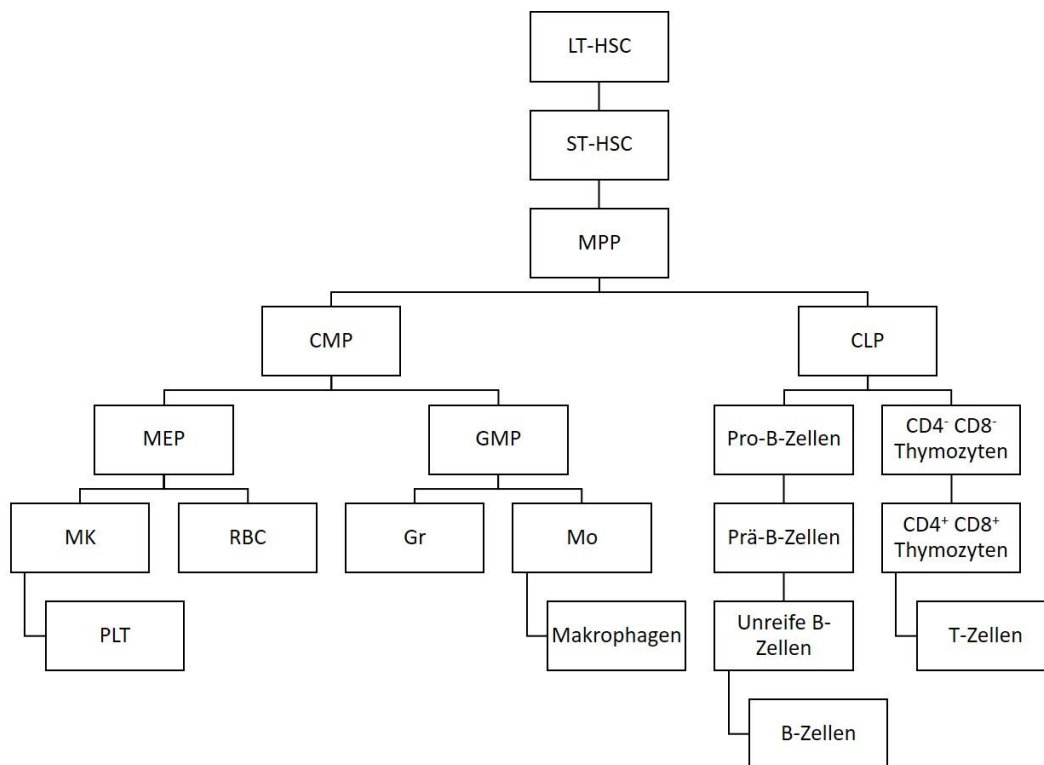
1.3.1 Lymphopoese und Myelopoese

Während aus den MEP im Rahmen weiterer Differenzierungsschritte die roten Blutkörperchen (Erythrozyten, engl. *red blood cells*, RBC) sowie die Megakaryozyten (MK) hervorgehen, aus denen sich die Blutplättchen (Thrombozyten, engl. *platelets*, PLT) bilden, differenzieren die GMP zu eosinophilen, basophilen und neutrophilen Granulozyten (Gr) sowie zu Monozyten (Mo), den Vorläuferzellen der Makrophagen. Gemeinsam mit den

Lymphozyten gehören sie zur Gruppe der weißen Blutkörperchen (Leukozyten, engl. *white blood cells*, WBC).

Aus CLP entstehen in hierarchischer Abfolge frühe Pro-B-Zellen, späte Pro-B-Zellen, große Prä-B-Zellen, kleine Prä-B-Zellen, unreife B-Zellen und schließlich die reifen B-Lymphozyten (B-Zellen).

Die T-Zellreifung findet im Thymus statt und kann anhand der Oberflächenmarker CD4 und CD8 beurteilt werden. Die frühen doppelnegativen Thymozyten (DN, CD4⁻ CD8⁻) durchlaufen dabei vier Entwicklungsstadien (DN1-4) und bilden schließlich die Oberflächenmarker CD4 und CD8 aus. Die CD4⁺ CD8⁺ doppelpositiven Thymozyten reifen im Rahmen der positiven Selektion durch Bindung an MHC-I oder MHC-II zu einfach positiven T-Lymphozyten (T-Zellen) heran und verlassen nach Durchlaufen der negativen Selektion den Thymus (Murphy & Weaver, 2018).



Grafik 1: Hierarchischer Aufbau der Hämatopoese

Durch Ausdifferenzierung entstehen aus „Langzeit“-Stammzellen (engl. *long term hematopoietic stem cells*, LT-HSC) alle Zellen des blutbildenden Systems. ST-HSC: engl. *short term hematopoietic stem cells*, „Kurzzeit“-Stammzellen, MPP: multipotente Progenitorzellen, CMP: engl. *common myeloid progenitor*, myeloische Vorläuferzellen, CLP: engl. *common lymphoid progenitor*, lymphatische Vorläuferzellen, MEP: Megakaryozyten-Erythrozyten-Vorläuferzellen, GMP: Granulozyten-Monozyten-Vorläuferzellen, MK: Megakaryozyten, RBC: engl. *red blood cells*, Erythrozyten, Gr: Granulozyten, Mo: Monozyten, PLT: engl. *platelets*, Thrombozyten

1.4 Rolle und Funktion der Krebsstammzelle

Während die Funktion hämatopoetischer Stammzellen (HSC) weiterhin Gegenstand intensiver Forschung ist, scheint ihre Entartung eine Schlüsselfunktion in der Entstehung maligner Erkrankungen innezuhaben. Wie von Hanahan und Weinberg beschrieben, zeichnen sich Krebszellen durch ihre ungehemmte Selbsterneuerungskapazität aus (Hanahan & Weinberg, 2000). In einem 2001 in der Zeitschrift Nature erschienen Review schreibt Tannishtha Reya, dass ein besseres Verständnis der Selbsterneuerungsregulation hämatopoetischer Stammzellen fundamental für das Verständnis derselben in Bezug auf Krebszellen sei (Reya et al., 2001).

Wie gesundes Gewebe weisen Krebsgeschwüre eine Vielzahl heterogener, in diesem Fall abnorm differenzierter Zellpopulationen auf. Das Konzept der Krebsstammzelle beruht auf dem Gedanken, dass nur ein geringer Anteil dieser Zellen ein unlimitedes Selbsterneuerungspotential besitzt. Der Ursprung solcher Zellen bleibt bisher unklar. Postuliert wurde ihre Entstehung sowohl durch kumulative Anhäufung von Mutationen der ständig den Zellzyklus durchlaufenden Stammzellen selbst, als auch in der Tochtergeneration, der bereits Mutationen tragenden aber weiter differenzierten Zellen (Nguyen et al., 2012).

Eine Dysregulation der Signalwege der Selbsterneuerungsregulation von Stammzellen zeigt sich in zahlreichen Tumorentitäten wie dem Kolonkarzinom (Polakis, 2012), epidermalen Tumoren (Chan et al., 1999), Medulloblastomen (Wechsler-Reya & Scott, 2001), Basalzellkarzinomen (Gailani & Bale, 1999) und T-Zell-Leukämien (Ellisen et al., 1991).

Trotz Erreichen einer molekularen Remission, erleiden 50-60 % der Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie (CML) nach Absetzen der das pathognomonische *BCR-ABL*-Fusionsgen inhibierenden TKI ein Rezidiv (Hochhaus et al., 2017; Mahon et al., 2010). Gehen wir davon aus, dass unseren Messinstrumenten auch nur eine CML-Stammzelle entgeht, würde die fehlende Unterdrückung durch die TKI die Proliferation der Krebsstammzelle zulassen und ein Rezidiv begünstigen (Ross et al., 2011). Im Falle solider Tumore würde das Persistieren von Krebsstammzellen im Organismus die Entstehung von Fernmetastasen trotz morphologisch kompletter Remission erklären (Reya et al., 2001).

1.5 Epigenetische Prozesse als Teil der Onkogenese

Mittels DNA-Sequenzierung konnten in über 50 % aller Krebserkrankungen Mutationen nachgewiesen werden, welche die Chromatinstruktur und somit die Funktionalität des Genoms beeinflussen. Somit scheint nicht nur die Mutation des Erbguts, sondern auch das Epigenom eine Schlüsselrolle in der Entstehung bösartiger Erkrankungen zu spielen. Epigenetische Veränderungen begünstigen nicht nur die Onkogenese, sie vermitteln auch Resistenzen und tragen somit zur Therapierefraktärität bei (Jones et al., 2016).

Im Fall der akuten myeloischen Leukämie (AML) löst die Mutation des Isocitrat Dehydrogenase 2 Gens (*IDH2*) eine DNA-Hypermethylierung aus. Dies geht mit einer *loss-of-function*-Mutation des Tet methylcytosine dioxygenase 2 (TET2) Enzyms einher, fördert die Expression von Stammzell- und Vorläuferzellmarkern und hemmt schließlich die Differenzierung der mutierten in myeloische Zellen (Figuerao et al., 2010). Enasidenib, eine bisher (2022) lediglich in den USA zugelassene niedermolekulare Verbindung (engl. *small molecule*), hemmt das mutierte IDH2 (Myers et al., 2018). Eine Subgruppenanalyse der AG221-C-001-Studie zeigt, dass auch Patienten mit Myelodysplastischem Syndrom (MDS) mit *IDH2*-Mutation von der Behandlung mit Enasidenib profitieren könnten (Stein et al., 2020).

Andere epigenetisch wirksame Substanzen wie Azacitidin, ein DNA-Methyltransferaseinhibitor, werden auch in Deutschland bereits erfolgreich klinisch eingesetzt. Im Vergleich zur konventionellen Chemotherapie bewirkt Azacitidin ein verlängertes Überleben von Patienten mit MDS mit mindestens Intermediär-2-Risiko nach IPSS (engl. *International Prognostic Scoring System*) (Fenaux et al., 2009).

Der Histon-Deacetylase-Inhibitor Panobinostat wird in Kombination mit Bortezomib und Dexamethason auch in Deutschland in der Drittlinientherapie des Multiplen Myeloms eingesetzt. Unter der Kombinationstherapie konnte ein verlängertes progressionsfreies Überleben, jedoch keine verlängerte Gesamtüberlebenszeit, beobachtet werden (San-Miguel et al., 2016).

1.6 *Bromodomain and extra terminal domain*-(BET-)Inhibition mittels JQ1

Die *bromodomain and extra terminal domain* (BET) Familie beinhaltet die Proteine BRD2, BRD3, BRD4 und das hodenspezifische BRDT. In ihrer Funktion

als Transkriptionskofaktoren dienen sie sowohl der Aktivierung als auch Inaktivierung von Genen (Wu & Chiang, 2007). Als epigenetische Leser erkennen BET-Proteine acetylierte, an Histone gebundene Lysinreste, und beeinflussen durch Interaktion mit ihnen die Transkription (Taniguchi, 2016). Zudem ist das durch Translokation t(15;19)(q13, p13.1) entstandene *BRD4-nuclear protein in testis (NUT)*-Fusionsgen ein entscheidender Faktor in der Entstehung der hochaggressiven NUT-Mittellinienkarzinome (French et al., 2003).

Die niedermolekulare Verbindung JQ1 blockiert kompetitiv die Acetyllysin-Bindungsdomäne von BET-Proteinen und hemmt somit ihre Funktion als epigenetischer Leser und Aktivator der Transkription (Filippakopoulos et al., 2010).

Inhibiert man in AML-Zellen BET mittels JQ1 oder hemmt die BRD4-Expression durch *short hairpin (sh)*RNA-knockdown, zeigt dies potente antileukämische Effekte. Durch Verdrängung der Bromodomänen vom Chromatin werden leukämische Stammzellen eliminiert oder zur terminalen Differenzierung gebracht. BRD4 konnte somit als maßgeblicher Einflussfaktor auf die Erhaltung der AML-Stammzellen identifiziert werden (Zuber et al., 2011).

Der antileukämische Effekt der BET-Inhibition scheint MYC-vermittelt zu sein, da BET-Proteine die Transkription seines Protoonkogens regulieren, welches eine zentrale Rolle in der Pathogenese maligner Erkrankungen spielt (Delmore et al., 2011). Mutiertes *MYC* ist eine der häufigsten Veränderungen im Krebsgenom und stellt ein attraktives Target in der Behandlung des Multiplen Myeloms (Holien et al., 2012), der akuten myeloischen Leukämie (Salvatori et al., 2011) und von Lymphomen (Ott et al., 2013) dar. In B-Vorläufer-Akute Lymphatische Leukämie (ALL)-Zellen führte JQ1 nicht nur zur Downregulation der *MYC*-Transkription, auch die Stabilität des *MYC*-Proteins war durch JQ1-Behandlung beeinträchtigt (Da Costa et al., 2013).

Auch die Genexpression des Transkriptionsfaktors MYB wird durch JQ1 herunterreguliert (Delmore et al., 2011). MYB bewirkt die Bindung von BRD4 an Promoter- und Enhancerregionen der DNA. Roe et al. konnten zeigen, dass dieser Mechanismus durch JQ1 inhibiert werden kann (Roe et al., 2015).

Der BET-Inhibitor OTX015, der ebenfalls an die Bromodomäne der BET-Proteine BRD2, BRD3 und BRD4 bindet, wird bereits in klinischen Studien zur Behandlung hämatologischer Erkrankungen (Berthon et al., 2016) und bestimmter solider

Tumore eingesetzt (Riveiro et al., 2016). Interessanterweise scheint die OTX015-Sensitivität der untersuchten nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom- (NSCLC) und kleinzelligen Lungenkarzinom-(SCLC-)Zell-Linien unabhängig von MYC zu sein (Riveiro et al., 2016). Vielmehr scheint das Therapieansprechen von Lungenadenokarzinomzellen auf BET-Inhibition auf der verminderten Expression des Transkriptionsfaktors *FOS-like antigen 1* (FOSL1) zu beruhen. Dies weist darauf hin, dass der Effekt einer BET-Inhibition mittels JQ1 Zellkontext abhängig ist und somit unterschiedliche Auswirkungen auf Zellen unterschiedlichen Ursprungs hat (Lockwood et al., 2012).

Der BET-Inhibitor CPI-0610 (Pelabresib) wurde in der MANIFEST Studie in drei Armen als Monotherapie bei Ruxolitinib-Intoleranz oder therapierefraktären Myelofibrose Patienten, als *add-on* bei unzureichendem Therapieansprechen oder bei therapienaiven Patienten in Kombination mit dem JAK-Inhibitor Ruxolitinib eingesetzt (NCT02158858). Vor allem die Kombinationstherapie führte zu einer signifikanten Reduktion der Milzgröße (Mascarenhas et al., 2021), welche bei der primären Myelofibrose mit einem verlängerten Gesamtüberleben korreliert (Verstovsek et al., 2012).

Bereits präklinische Daten konnten am Mausmodell anhand einer signifikanten Reduktion der proinflammatorischen Zytokine, Verringerung der Splenomegalie und Knochenmarkfibrose einen synergistischen Effekt der Kombination aus BET- und JAK-Inhibition demonstrieren (Kleppe et al., 2018). Weitere Forschung basierend auf diesen Daten findet im Rahmen der placebokontrollierten MANIFEST-2 Studie statt (NCT04603495).

Untersuchungen embryonaler Stammzellen (ESC) zeigen, dass BRD4 über Bindung an die Promoter-Region des Transkriptionsfaktor NANOG wichtig für den Erhalt ihrer Selbsterneuerungskapazität und Pluripotenz ist. Sowohl durch *Brd4*-knockdown als auch BET-Inhibition mittels JQ1 konnte über eine Downregulation von NANOG und LEFTY, einem Marker für Stammzeleigenschaften, eine Differenzierung der ESC ausgelöst werden (Horne et al., 2015). Dies impliziert, dass die Histonacetylierung wichtig für den Erhalt der Stammzellfunktion ist (Saraiva et al., 2010).

1.7 Ziel dieser Dissertation

Obschon, wie oben beschrieben, erste klinische Studien mit BET-Inhibitoren durchgeführt werden, wissen wir wenig über den Effekt von BET-Inhibition auf die physiologische Hämatopoese.

Basierend auf der Expression von BRD4 durch AML-Stammzellen konnte JQ1 bereits erfolgreich wachstumshemmend und apoptoseinduzierend eingesetzt werden. Aber auch Zellen des gesunden hämatopoetischen Systems - u. a. CD34⁺ Stammzellen - exprimieren BRD4, sodass eine umfangreiche Analyse der Auswirkung einer BET-Inhibition auf die physiologische Hämatopoese nicht nur Rückschlüsse auf mögliche Nebenwirkungen, sondern auch entscheidende Informationen über den Einfluss von BET-Proteinen auf die Stammzellfunktion erbringen könnte (Herrmann et al., 2012). Wir untersuchten den Effekt einer Behandlung mit JQ1 auf die gesunde Hämatopoese *in vitro* und *in vivo* und konnten zum einen den Zellkontext-abhängigen Effekt JQ1s, vor allem auf Zellen der lymphatischen Reihe, sowie auf die Selbsterneuerungskapazität und Proliferationsrate hämatopoetische Stammzellen demonstrieren.

2. Material

2.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden in doppelt-destilliertem Wasser gelöst (ddH₂O). Falls nicht anders angegeben, wurden Basischemikalien von folgenden Herstellern verwendet:

Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

2.2 Puffer

Der FACS-Puffer, für die Durchflusszytometrie, und der Erythrozyten-Lyse-Puffer (Ery-Lyse-Puffer) wurden mit deionisiertem Wasser hergestellt.

Puffer	Inhaltsstoffe	Konzentration
FACS-Puffer	10x PBS	10,0 % (v/v)
	FCS (Hitzeinaktiviert)	2,0 % (v/v)
	NaN ₃	1,38 mM
	EDTA	0,816 mM
Ery-Lyse Puffer	NH ₄ Cl	155 mM
	KHCO ₃	10 mM
	EDTA	0,1 mM

Tabelle 1: Puffer

2.3 Labor-Geräte

Name	Hersteller
Accu Check Softclix XL Lanzette	Roche Diabetes Care, Mannheim, Deutschland
Analysenwaage PB30	Mettler-Toledo, Columbus, USA
BioBeam GM 2000	Gamma-Service Medical GmbH, Leipzig, Deutschland
CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
DynaMag-15 Magnet	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Eppendorf Research Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
FACS Canto II	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
FACS sorter Aria IIIu	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Hemavet 950FS	DREW Scientific Inc., Oxford, Connecticut, USA

IKA Vortex 2	IKA-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland
Mastercycler gradient	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mikroskop AxioScope.A1	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
Mikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
Mikroskop DM5000 B	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Mikroskop Olympus IX81	Olympus Life Science Europa GmbH, Hamburg, Deutschland
Mikroskop Primo Vert	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
Multipette M4	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Multipette Plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
NanoDrop2000	VWR International GmbH, Erlangen Deutschland
Neubauer Kammer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Orbitalschüttler	Bbi-Biotech GmbH, Berlin, Deutschland
Sicherheitswerkbank HERAsafe KS	Haraeus GmbH, Hanau, Deutschland
Sicherheitswerkbank LaminAir HB 2448 S	Haraeus GmbH, Hanau, Deutschland
Zentrifuge 5415 C	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge RC 5C PLUS	E. I. du Pont de Nemours and Company, Wilmington, USA

Tabelle 2: Labor-Equipment

2.4 Kits und vorgefertigte Substanzen

Kit	Hersteller
BrdU Staining Kit for Flow Cytometry	eBioscience, San Diego, CA, USA
Binding Buffer 10X	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Dynabeads Sheep Anti-Rat IgG	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
First Strand cDNA Synthesis Kit	Life technologies, Carlsbad, CA, USA
FS-Pack	DREW Scientific Inc., Oxford, Connecticut, USA
JQ1	Prof. Dr. Stefan Knapp und Marek Wanior (Goethe University Frankfurt am Main)
MegaCult-C	Stemcell Technologies, Vancouver, Canada
MethoCult H4034 Optimum	Stemcell Technologies, Vancouver, Canada
MethoCult GF M3434	Stemcell Technologies, Vancouver, Canada

Power SYBR Green RT-qPCR	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
PureLink DNase	Life technologies, Carlsbad, CA, USA
PureLink RNA Mini Kit	Life technologies, Carlsbad, CA, USA
TruStain FcX Fc receptor blocking solution	Biolegend, San Diego, CA, USA

Tabelle 3: Kits und vorgefertigte Substanzen

2.5 Oligonukleotide

Für die RT-qPCR wurden folgende Oligonukleotide verwendet:

Gen	Primer	Oligonukleotid Sequenz
Bcl-2	Bcl-2_fwd Bcl-2_rev	5´- TGG CCT TCT TTG AGT TCG GT -3´ 5´- ATG CCG GTT CAG GTA CTC AG -3´
Bcl2l11 (bim)	Bcl2l11_fwd Bcl2l11_rev	5´- CCA CGT CAA GAT GGC TCA CT -3´ 5´- GTG CAA CGC TGT TTG AGA GG -3´
Mcl1	Mcl1_fwd Mcl1_rev	5´- AAG AGG CTG GGA TGG GTT TGT -3´ 5´- AGT CCC CTA TTG CAC TCA CAA G -3´
Bcl2l1 (bcl-xl)	Bcl2l1_fwd Bcl2l1_rev	5´- GGC CTT TTT CTC CTT TGG CG -3´ 5´- GAT CCA CAA AAG TGT CCC AGC -3´
Bcl2a1a (A1)	Bcl2a1a_fwd Bcl2a1a_rev	5´- TAC GGC AGA ATG GAG GTT GG -3´ 5´- TAA CCA TTC TCG TGG GAG CC -3´
Bax	Bax_fwd Bax_rev	5´- GCC TTT TTG CTA CAG GGT TTC AT -3´ 5´- TTC ATC TCC AAT TCG CCG GA -3´
Bak1	Bak1_fwd Bak1_rev	5´- GGA GCA GAG TCA TTC AGG TGA C -3´ 5´- GTT CCT GCT GGT GGA GGT AAA -3´
Brd2	Brd2_fwd Brd2_rev	5´- GCT TCT GCT CTT GGC CTT CA -3´ 5´- GAA ACT CAA ACA CAT CCT GCA AC -3´
Brd3	Brd3_fwd Brd3_rev	5´- TTT GAG ACC CTG AAG CCA ACC -3´ 5´- CTG AGC CGG ACT TCT CTT TCT TAG -3´
Brd4	Brd4_fwd Brd4_rev	5´- GGA ATT TGG TGC TGA TGT CCG-3´ 5´- GTG GGG CTA CCA CCT TTG TA -3

Tabelle 4: Oligonukleotide

2.6 Antikörper

Für die Durchflusszytometrie benutzen wir folgende Maus-spezifische Antikörper: Lineage-V450 Antikörper Cocktail Kit (BD Bioscience), c-kit-APC (Klon 2B8, eBioscience), Sca-1-PE/Cy7 (Klon E13-161.7, Biolegend), CD48-APC/Cy7 (Klon HM48-1, Biolegend), CD48-FITC (Klon HM48-1, eBioscience), CD150-PE (Klon mShad150, eBioscience), CD150-PB (Klon TC15-12F12.2, Biolegend), CD150-APC (Klon mShad150, eBioscience), CD34-FITC (Klon Ram34, eBioscience), CD34-eFluor660 (Klon Ram34, eBioscience), CD135-PE (Klon A2F10, Biolegend), CD45.1-FITC (Klon A20, eBioscience), CD45.2-PB (Klon 104, Biolegend), FcγRIIPE (Klon 93, Biolegend), CD41-PE (Klon eBioMWRReg30, eBioscience), CD61-FITC (Klon 2C9.G3, eBioscience), IgM-APC/Cy7 (Klon RMM-1, Biolegend), CD43-PE/Cy7 (Klon S7, BD Bioscience), IgD-APC (Klon 11-26c(11-26), eBioscience), CD71-APC (Klon R17217, eBioscience), Ter119-PE

(Klon TER119, eBioscience), CD11b-PE/Cy7 (Klon M1/70, eBioscience), CD3e-APC (Klon 145-2C11, Biolegend), CD4-FITC (Klon RM4-5, eBioscience), CD8a-eFluor450 (Klon 53-6.7, eBioscience), CD25-PE/Cy7 (Klon PC61.5, eBioscience), CD44-APC/Cy7 (Klon IM7, Biolegend), Gr1-APC/Cy7 (Klon RB6-8C5, eBioscience), CD45R-PE (Klon RA3-6B2, eBioscience), Annexin V-APC (BD Pharmingen), BrdU-APC flow kit (BD Pharmingen), CD11b-biotin (Klon M1/70, eBioscience), Gr1-biotin (Klon RB6-8C5, eBioscience), CD3e-biotin (Klon 145-2C11, Biolegend), Ter119-biotin (Klon TER119, eBioscience), CD4-biotin (Klon GK1.5, eBioscience), CD8a-biotin (Klon 53-6.7, eBioscience).

2.7 Mausstämme und Ethik-Richtlinien

Für die *in vivo*-Experimente wurden vier bis acht Wochen alte weibliche C57BL/6J (Ly5.2) und B6.SJL-Ptprca Pepcb/BoyJ (Ly5.1) Mäuse aus der Tierhaltung des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE) oder von Charles River Laboratories (Sulzfeld, Germany) erworben.

Für die Dauer der Experimente wurden die Tiere in speziellen pathogenfreien, individuell ventilierten Käfigen gehalten (IVC). Durch synthetische Beleuchtung wurde ein 12 Stunden Tag/12 Stunden Nacht Rhythmus etabliert.

Behausungs-Standard:

Temperatur: 22±1 °C

Luftfeuchtigkeit: 55 %

Beleuchtung: 12 Stunden Licht (150 – 400 lx) – 12 Stunden Dunkelheit

Futter: ad libitum

Wasser: ad libitum

Alle Experimente wurden durch das Amt für Gesundheit und Verbraucherschutz (Behörde für Soziales, Gesundheit, Familie, Verbraucherschutz, Hamburg, Tierversuchsantrag Nr. G128/16) genehmigt.

2.8 Software

Name	Hersteller
FACS DIVA 8.0	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Microsoft Excel	Microsoft, Redmond, WA, USA
GraphPad Prism 5.0	GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA

Tabelle 5: Software

3. Methoden

3.1 *In vitro*-Methoden

3.1.1 RNA-Isolation

Um die RNA aus dem Knochenmark mit JQ1 oder der Trägerlösung DMSO behandelte Mäuse zu isolieren, benutzten wir das PureLink RNA Mini Kit nach Herstellerangaben.

Hierfür wurden die gemäß 3.2.1 gewonnenen Knochenmarkszellen unter Zugabe von 600 µl frisch angesetztem Lyse-Puffer, versetzt mit 1 % β-Mercaptoethanol, lysiert. Das Lysat wurde durch 5-10-maliges Spülen durch eine 20-Gauge-Nadel homogenisiert und dasselbe Volumen 70 %-Ethanol hinzugegeben. Bis zu 700 µl der mittels IKA Vortex sorgfältig gemischten Proben wurden in die im RNA Mini Kit enthaltenen Spin-Kartuschen gefüllt und 15 Sekunden lang bei Raumtemperatur und 12000 x g zentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen und das Präzipitat nach Zugabe von 350 µl Wasch-Puffer I erneut 15 Sekunden bei Raumtemperatur und 12000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde nach dem Waschvorgang verworfen und die Säulen in neue Sammelröhrchen überführt.

80 µl PureLink DNase wurde direkt auf die Säulen pipettiert und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die gebundene DNA wurde mittels eines erneuten, wie oben beschriebenen, Waschvorgangs entfernt. Überstand und Sammelröhrchen wurden verworfen und die Säulen in neue Sammelröhrchen überführt.

Anschließend wurden die Proben zweimal für 15 Sekunden bei Raumtemperatur und 12000 x g mit 500 µl Wasch-Puffer II zentrifugiert. Um die Silikon-Membranen zu trocknen wurden die Überstände verworfen und die Proben zwei Minuten bei Raumtemperatur und 12000 x g zentrifugiert.

30-100 µl ddH₂O wurden direkt auf die Säulen pipettiert, eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für zwei Minuten bei Raumtemperatur und 12000 x g in den im RNA Mini Kit enthaltenen Recovery-Röhrchen zentrifugiert.

Die RNA wurde mittels NanoDrop 2000 quantifiziert und die Proben bei -80 °C gelagert.

3.1.2 cDNA-Synthese

Zur cDNA-Synthese benutzen wir das First Strand cDNA-Synthesis Kit nach Angaben des Herstellers.

1 µg RNA setzten wir 1 µl *Random Hexamer Primer* und ddH₂O zu, bis ein Gesamtvolumen von 11 µg erreicht war. Um GC-reiche Matrizen zu denaturieren und so die Bildung von Sekundärstrukturen zu verhindern, wurden die Proben fünf Minuten bei 65 °C inkubiert und anschließend auf Eis gekühlt.

Jeder Probe wurden folgende Komponenten zugefügt:

4 µl Reaktions-Puffer (5x)

1 µl RiboLock RNase Inhibitor (20 u/µl)

2 µl dNTP Mix (10 mM)

2 µl M-MuLV Reverse Transkriptase (20 u/µl)

Die vorsichtig gemischten und kurz zentrifugierten Proben wurden zunächst 5 Minuten bei 25 °C und darauffolgend 60 Minuten bei 37 °C im Thermocycler inkubiert. Um die enzymatische Reaktion zu stoppen wurden die Proben 5 Minuten auf 70 °C erhitzt. Die Reverse-Transkriptase-Produkte wurden entweder direkt für die RT-qPCR verwendet oder bei -80 °C gelagert.

3.1.3 RT-qPCR

Um die relative Gen-Expression der BET-Gene mittels quantitativer Echtzeit-PCR (engl. *real time quantitative PCR*, RT-qPCR) zu ermitteln, benutzen wir das CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System. Jede 10 µl-Probe setzte sich aus folgenden Komplementen zusammen:

5,0 µl SYBR Green qPCR Master Mix (2x)

0,5 µl Forward Primer (10 µM)

0,5 µl Reverse Primer (10 µM)

2,0 µl ddH₂O

2,0 µl cDNA

Die Ergebnisse wurden mithilfe der $\Delta\Delta C_t$ -Methode Anhand des Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase-Haushaltsgens (GAPDH) analysiert (Livak & Schmittgen, 2001).

3.1.4 Durchflusszytometrie und Analyse

Zur Differenzierung der an der Hämatopoese beteiligten Zellen nutzten wir die Durchflusszytometrie. Hierfür wurde das gemäß 3.2.1 gewonnene Knochenmark der Versuchstiere gewaschen, in dem es in ca. 3 ml FACS-Puffer suspendiert und anschließend bei 350 x g fünf Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert.

Um die Zellen zu färben wurden 1 µl jedes Antikörpers für bis zu 5×10^6 Zellen hinzugefügt und die Proben für 45 Minuten bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Proben erneut mit 3 ml FACS-Puffer gewaschen und in 400 µl FACS-Puffer resuspendiert.

Die mit den Antikörpern gefärbten Zellen wurden mithilfe des BD FACS Canto II analysiert oder dem BD FACS Aria IIIu sortiert. Eine detailliertere Analyse erfolgte mithilfe der FACS DIVA 8.0 Software.

3.1.5 Lyse von Erythrozyten

In einigen Fällen führten wir im Rahmen der durchflusszytometrischen Analysen zur Depletion der roten Blutkörperchen eine Lyse der Erythrozyten durch, wofür die Zellen in 5 ml Lyse-Puffer suspendiert und anschließend für fünf Minuten bei 400 x g und 4 °C zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde verworfen und die Proben anschließend mit FACS-Puffer gewaschen.

3.1.6 Depletion *lineage*-positiver Zellen

Um die hämatopoetischen Stammzellen zu isolieren wurde neben einer Lyse der Erythrozyten eine Depletion der myeloischen und der lymphatischen Zellreihe durchgeführt. Dafür wurde den in FACS-Puffer gelösten Zellen der Lineage-Antikörper hinzugefügt und die Proben für 40 Minuten auf Eis inkubiert, wobei die Röhren alle zehn Minuten vorsichtig gemischt wurden.

Nachdem die Zellen erneut mit 3 ml FACS-Puffer gewaschen wurden, wurden sie in 1 ml FACS-Puffer resuspendiert und Dynabeads dazugegeben. Die Menge der Beads wurde so kalkuliert, dass sie in einem Verhältnis von 2:1 zu den Zellen stehen würden. Die Proben wurden für fünf Minuten unter ständiger Rotation auf Eis inkubiert.

Anschließend wurde das Volumen durch Zugabe von FACS-Puffer auf 3 ml erhöht und die Proben für 25 Minuten bei 2 – 8 °C inkubiert.

Schließlich wurde ein Magnet genutzt, um die an die Dynabeads gebundenen lineage⁺ Zellen von den negativen Zellen zu trennen. Die lineage⁻ Zellen wurden in einem Reagenzglas aufgefangen und anschließend mit 3 ml FACS-Puffer gewaschen und erneut in 400 µl FACS-Puffer resuspendiert.

3.1.7 Bromodesoxyuridine-Färbung

Zur durchflusszytometrischen Bestimmung der Zellproliferation wurde eine Bromodesoxyuridine (BrdU)-Färbung mittels BrdU Staining Kit for Flow Cytometry nach Herstellerangaben angewendet.

Den gewaschenen Zellen wurde 10 µM BrdU hinzugegeben und die Proben 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurden die Proben erneut in ca. 3 ml FACS-Puffer gewaschen und in dem nach Abgießen des Überstandes verbleibenden Restvolumen resuspendiert.

Anschließend wurde den Proben 1 ml BrdU-Staining Buffer hinzugefügt und die Proben 15 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtschutz inkubiert.

Nach erneutem Waschen mit 3 ml FACS-Puffer, wurde im nächsten Schritt eine Working Solution aus DNASE I und FACS-Puffer (3:7) hinzugefügt und die Proben für eine weitere Stunde bei 37 °C unter Lichtschutz inkubiert.

Nach erneutem Waschen fügten wir schließlich 3-5 µl Anti-BrdU Fluorochrome conjugated Antibody hinzu und inkubierten die Proben für 20 – 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln.

Zum Abschluss wurden die Zellen erneut mit 3 ml FACS-Puffer gewaschen und in 400 µl FACS-Puffer resuspendiert.

3.1.8 Koloniezählung (engl. *colony formation assays*)

Für die Koloniezählungen wurde eine 10-fach konzentrierte Zellsuspension in *Iscove's Modified Dulbecco's Medium* (IMDM) mit 2 % fetalem Kälberserum (FBS) hergestellt (z. B. 1 x 10⁵ Zellen/ml um beim Aussähen eine Konzentration von 1 x 10⁴ Zellen in 550 µl/Well einer 12-Multiwell-Platte zu erreichen). 200 µl dieser Zellsuspension wurden mit 2 ml nach Angaben des Herstellers aufbereitetem MethoCult GF3434 oder MethoCult H4034 Optimum mittels IKA Vortex 2 gemischt und die Proben anschließen 2-5 Minuten ruhen gelassen, so dass Luftbläschen an die Oberfläche steigen konnten. Schließlich wurden jeweils

550 µl in 12-Well-Platten für Gewebekulturen ausgesät und die Proben vorsichtig geschwenkt um den gesamten Boden zu bedecken. Um eine ausreichende Luftfeuchtigkeit zu gewährleisten wurden 3-4 ml steriles Wasser in einen Well gegeben und die Proben bei 37 °C, 5 % CO₂ und > 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die koloniebildenden Einheiten (KBE, engl. *colony forming units, CFU*) wurden nach sieben (GF M3434) und 14 Tagen (H4034 Optimum) lichtmikroskopisch gezählt. Die seriellen Koloniezählungen wurden nach jeweils sieben Tagen durchgeführt.

3.1.9 Grenzverdünnungsanalyse

Für die Grenzverdünnungsanalyse (engl. *extreme limiting dilution analysis, ELDA*) wurde den Versuchstieren 8 Wochen nach Knochenmarktransplantation (siehe 3.2.4) Blut aus dem submandibulären Venenplexus abgenommen (siehe 3.2.2) und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Ein Anteil von > 1 % aller CD45.1⁺ Zellen wurde als positives Ergebnis gewertet und die Ergebnisse mittels der Website <http://bioinf.wehi.edu.au/software/elda/> ausgewertet. (Zuletzt besucht 12.07.2022, 13:15 Uhr)

3.1.10 Statistik und weitere Berechnungen

Alle statistischen Analysen wurden mit GraphPad Prism 5.0 durchgeführt. Um Ausreißer zu identifizieren, wurden suspekte Werte mithilfe des Outlier Exclusion Algorithm von GraphPad Software individuell gegen den Rest der Werte getestet. Statistische Signifikanz wurde mithilfe des Students T-Test getestet, falls nicht anders angegeben.

Die *Repopulating Units* (RU) wurden anhand des prozentuellen Anteils der Spender-Lymphozyten in primär Rezipienten vier Monate nach Transplantation nach folgender Formel berechnet:

$$RU_{\text{Spender}} = RU_{\text{Konkurrent}} \times (\% \text{ Lymphozyten}_{\text{Spender}} / 100 - \% \text{ Lymphozyten}_{\text{Spender}})$$

Dabei ist eine RU als relative Repopulations-Fähigkeit von 100,000 konkurrierenden Knochenmark-Zellen definiert (Harrison, 2021).

3.2. *In vivo*-Methoden

3.2.1 Gewinnen und Aufbereitung von Knochenmarkzellen

Um das Knochenmark der Versuchstiere zu gewinnen, erfolgte unter sterilen Bedingungen die Präparation der Ober- und Unterschenkelknochen. Anschließend wurden Femora und Tibiae mithilfe einer 25-Gauge Nadel mit 2 ml FACS-Puffer gespült. Die gewonnene Zellsuspension wurde in 15 ml-Tubes gesammelt und mit 8 ml FACS-Puffer aufgefüllt. Anschließend erfolgte eine fünfminütige Zentrifugation bei 350 x g bei Raumtemperatur. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 10 ml FACS-Puffer resuspendiert.

Zur Bestimmung der Zellzahl, nutzen wir eine Neubauer-Zählkammer.

Zur weiteren Analyse siehe 3.1.4.

3.2.2 Submandibuläre Blutentnahme

Zur submandibulären Blutentnahme wurden die Versuchstiere durch den Untersucher in einem Zwangsgriff fixiert. Dabei wurde durch ein Zurückziehen der Gesichtshaut („face lifting“) eine Stauung der Venen erreicht. So ließ sich ca. 3-4 mm dorsokaudal des Haarwirbels am Unterkiefer die Vena facialis mithilfe einer AccuCheck-Lanzette punktieren. Pro Versuchstier wurden bis zu drei Tropfen Blut gewonnen.

3.2.3 Intraperitoneale Applikation von DMSO und JQ1

Für die intraperitoneale (i. p.) Applikation von Medikamenten wurden die Tiere in einem Zwangsgriff fixiert und die Bauchdecke in einer gedachten Verlängerung der Oberschenkelfalte in einem flachen Winkel mit einer Kanüle punktiert.

JQ1 wurde in DMSO und die zu injizierende DMSO-Stocklösung tröpfchenweise 1:10 in 10 % (2-Hydroxypropyl)- β -cyclodextrin gelöst.

3.2.4 Knochenmark-Transplantation

Die aus Femur und Tibia gewonnenen Knochenmarkzellen wurden in 1-2 ml IMDM mit 2 % FBS suspendiert und auf Eis gekühlt. Die kernhaltigen Zellen wurden mittels einer Neubauer-Zählkammer gezählt und eine Suspension von 2×10^6 Zellen/ml hergestellt. Durch zehnfache Verdünnung wurde so z. B. eine Konzentration von 2×10^5 Zellen der unbehandelten Ly5.2 Mäuse/100 μ l erreicht.

Am Tag der Transplantation wurden jeweils 2×10^3 , 2×10^4 oder 2×10^5 Knochenmarkzellen der mit JQ1 oder der Trägerlösung DMSO behandelten Ly5.1 Mäuse/100 μ l mit 2×10^5 Knochenmarkzellen unbehandelter Ly5.2 Mäuse/100 μ l gemischt und das Gesamtvolumen von 200 μ l in die Schwanzvene letal mit $2 \times 4,5$ Gy im Abstand von 4 Stunden bestrahlter Ly5.2 Mäuse injiziert. Die Tiere wurden zuvor unter einer Wärmelampe gewärmt um eine Dilatation der lateralen Schwanzvenen zu bewirken und für die Injektion in einer Fixiereinheit fixiert.

Für die Sekundär-Transplantation wurden 4×10^6 Knochenmarkzellen der zuvor transplantierten Versuchstiere/200 μ l in die Schwanzvene letal mit $2 \times 4,5$ Gy bestrahlter Ly5.2 Mäuse injiziert.

Das Engraftment im peripheren Blut und Knochenmark wurde mittels Hemavet und Durchflusszytometrie kontrolliert, wie im Abschnitt „Ergebnisse“ beschrieben. Die Transplantationen wurden mit der absoluten Zahl an Knochenmarkzellen durchgeführt und nicht auf die Zahl hämatopoetischer Stammzellen korrigiert. Aus diesem Grund normierten wir den CD45.1-Chimärismus im peripheren Blut der sekundären Empfänger auf den CD45.1-Chimärismus ihrer Spendertiere, die initial transplantiert wurden.

Somit bedeuten „100 % CD45.1⁺ in % Spender-CD45.1⁺ Zellen“, dass dieselbe Anzahl CD45.1⁺ Zellen im peripheren Blut der sekundären Empfänger nachgewiesen wurde, wie im Blut ihrer Spender vor Transplantation. Zum Vergleich liegen die nicht-normierten Rohdaten ebenfalls vor. (Siehe „Ergebnisse“, Abschnitt 4.5.1)

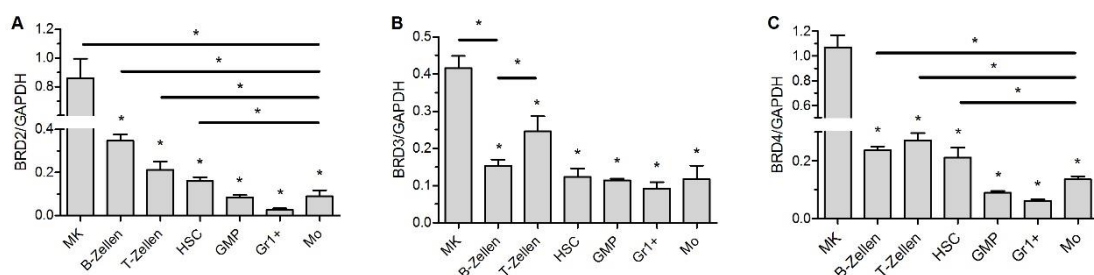
4. Ergebnisse

4.1 BET-Expression hämatopoetischer Zellen

Da die BET-Familie Haupttarget der niedermolekularen Verbindung JQ1 ist, untersuchten wir als Erstes die *Brd2*, *Brd3* und *Brd4* mRNA-Expression durch Zellen des hämatopoetischen Systems unbehandelter acht Wochen alter C57Bl6/J Mäuse. Die Ergebnisse sollten zeigen, welche Zellen des hämatopoetischen Systems als Target für JQ1 geeignet sind.

Zu diesem Zweck sakrifizierten wir drei Versuchstiere mittels CO₂-Insufflation und zervikaler Dislokation. Wir entnahmen unter sterilen Kautelen das Knochenmark aus Femora und Tibiae (Ober- und Unterschenkelknochen) und sortierten mittels FACS-Sorter hämatopoetische Stammzellen (HSC, gekennzeichnet durch die Oberflächenmarker Lin⁻ Sca1⁺ Kit⁺ CD150⁺ CD48⁻), Megakaryozyten (MK, CD61⁺ CD41⁺), B-Lymphozyten (B-Zellen, B220⁺), T-Lymphozyten (T-Zellen, CD3⁺), Makrophagen-Granulozyten-Vorläuferzellen (GMP, Lin⁻ Sca⁻ Kit⁺ CD34⁺ FcgRII^{hi}), Granulozyten (Gr1⁺) und Monozyten (Mo, welche Anhand ihrer Morphologie im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht (engl. *forward scatter* (FSC) und *side scatter* (SSC)) selektiert wurden).

Anschließend quantifizierten wir die *Brd2*, *Brd3* und *Brd4* mRNA-Expression der unterschiedlichen Zellgruppen mittels qRT-PCR in cDNA, die aus den genannten Zellpopulationen synthetisiert wurde. Die Ergebnisse normierten wir auf die Expression des Haushaltsgens Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*GAPDH*).



Grafik 2: Expression von *Brd2*, *Brd3* und *Brd4* durch Zellen des hämatopoetischen Systems Analyse der a) *Brd2*-, b) *Brd3*- und c) *Brd4*-Expression durch Megakaryozyten (MK), B-Lymphozyten (B-Zellen), T-Lymphozyten (T-Zellen), hämatopoetische Stammzellen (HSC), Makrophagen-Granulozyten-Vorläuferzellen (GMP), Granulozyten (Gr1+) und Monozyten (Mo) mittels qRT-PCR, normiert auf *GAPDH*, n=2-3, *P<0,05.

Wir stellten fest, dass *Brd2*, *Brd3* und *Brd4* am stärksten von der Gruppe der Megakaryozyten, gefolgt von T- und B-Lymphozyten sowie den hämatopoetischen Stammzellen, exprimiert wurden. Im Vergleich untereinander zeigte sich eine ähnliche Expression aller drei Gene durch Zellen des hämatopoetischen Systems, mit geringfügigen Abweichungen in der Expression durch B- und T-Lymphozyten.

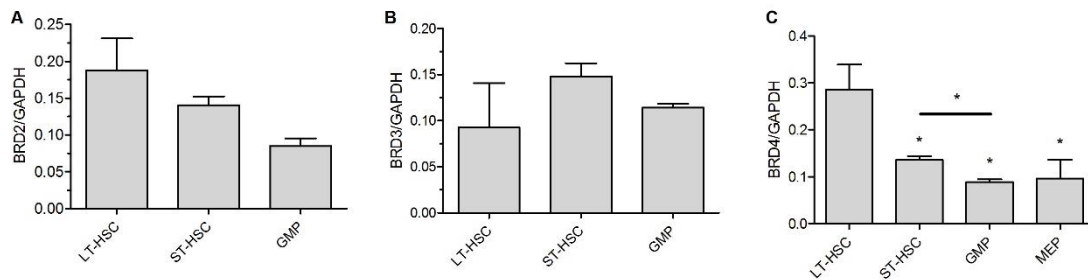
Auffällig war, dass die *Brd4*-Expression der MK ($1,07 \pm 0,09$; $n=3$; $*P<0,05$) nahezu doppelt so hoch war, wie ihre *Brd3*-Expression ($0,41 \pm 0,03$; $n=3$; $*P<0,05$) und die *Brd2*-Expression der Granulozyten ($0,03 \pm 0,02$; $n=3$; $*P<0,05$) signifikant geringer als ihre *Brd3*- ($0,09 \pm 0,02$; $n=3$; $*P<0,05$) und *Brd4*-Expression ($1,07 \pm 0,09$; $n=3$; $*P<0,05$; siehe Grafik 2 und Tabelle 6).

	<i>Brd2</i> -Expression	<i>Brd3</i> -Expression	<i>Brd4</i> -Expression
Megakaryozyten	$0,86 \pm 0,14$	$0,42 \pm 0,03$	$1,07 \pm 0,09$
T-Lymphozyten	$0,21 \pm 0,04$	$0,25 \pm 0,04$	$0,27 \pm 0,03$
B-Lymphozyten	$0,35 \pm 0,03$	$0,15 \pm 0,02$	$0,24 \pm 0,01$
HSC	$0,16 \pm 0,02$	$0,12 \pm 0,02$	$0,21 \pm 0,03$
Granulozyten	$0,03 \pm 0,01$	$0,09 \pm 0,02$	$0,06 \pm 0,01$

Tabelle 6: Expression von *Brd2*, *Brd3* und *Brd4*, normiert auf *GAPDH*, $n=2-3$

Durchflusszytometrisch sind die Untergruppen hämatopoetischer Stammzellen *long term* HSC (LT-HSC, „Langzeit“-Stammzellen, $Lin^- Sca^+ Kit^+ CD150^+ CD48^- CD135/Flt3^- CD34^-$), *short term* HSC (ST-HSC, „Kurzzeit“-Stammzellen, $Lin^- Sca^+ Kit^+ CD150^+ CD48^- CD135/Flt3^- CD34^+$) und multipotente Vorläuferzellen (MPP, $CD34^+ CD135/Flt3^+ CD150^-$) anhand der Expression von *Sca1* (*stem cell antigen 1*), des Tyrosinkinase-Rezeptors Kit oder c-kit, sowie der Abwesenheit von Differenzierungsmarkern (*lineage* negativ) zu erkennen. Man bezeichnet die Zellen daher auch als LSK: $lineage^-, sca1^+, kit^+$. Wir betrachteten die Gruppe der hämatopoetischen Stammzellen an dieser Stelle genauer und teilten sie mittels FACS-Sorter in LT-HSC und ST-HSC. Im Vergleich dazu betrachteten wir die myeloischen Vorläuferzellen GMP und Megakaryozyten-Erythrozyten-Vorläuferzellen (MEP, $Lin^- Sca^- Kit^+ CD34^- FcγRII^{low}$).

Interessanterweise wurde *Brd4* signifikant stärker von LT-HSC exprimiert ($0,29 \pm 0,05$; $n=3$; $*P<0,05$) als von den weiter differenzierten ST-HSC ($0,14 \pm 0,007$; $n=3$; $*P<0,05$), GMP ($0,09 \pm 0,006$; $n=2$; $*P<0,05$) und MEP ($0,09 \pm 0,04$; $n=2$; $*P<0,05$), während sich kein Unterschied in der Expression von *Brd2* und *Brd3* durch die untersuchten Zelltypen zeigte (siehe Grafik 3).



Grafik 3: Expression von Brd2, Brd3 und Brd4 durch Stamm- und Vorläuferzellen

Analyse der a) Brd2-, b) Brd3- und c) Brd4-Expression durch *long term* HSC (LT-HSC, „Langzeit“-Stammzellen), *short term* HSC (ST-HSC, „Kurzzeit“-Stammzellen) und die myeloischen Vorläuferzellen Makrophagen-Granulozyten-Vorläuferzellen (GMP) und Megakaryozyten-Erythrozyten-Vorläuferzellen (MEP) mittels qRT-PCR, normiert auf GAPDH, $n=2-3$, $*P<0,05$.

4.2 Das hämatopoetische System nach Behandlung mit JQ1

Mit dem Ziel, den Einfluss von JQ1 auf das blutbildende System abzubilden, untersuchten wir das periphere Blut, Knochenmark sowie die lymphatischen Organe Milz und Thymus gesunder Versuchstiere nach Behandlung mit JQ1.

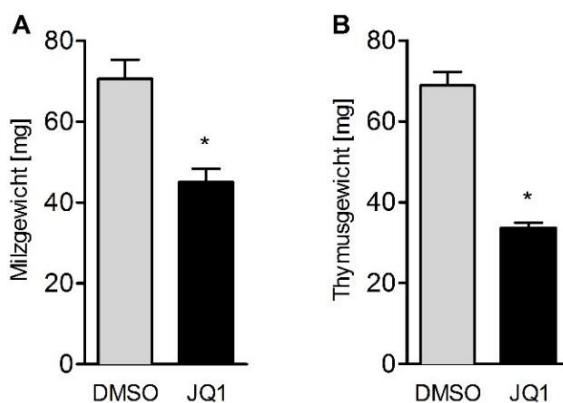
Hierfür behandelten wir 8 sieben Wochen alte C57Bl6/J Mäuse 21 Tage lang mit 50 mg/kg JQ1/Tag, gelöst in 200 μ l DMSO, als i. p.-Injektion. Die ebenfalls 8 Mäuse umfassende Kontrollgruppe wurde analog mit 200 μ l der Trägerlösung DMSO behandelt. An Tag 21 nach Beginn der Behandlung entnahmen wir den Versuchstieren Blut aus dem submandibulären Venenplexus, untersuchten die gewonnenen Proben mittels Hemavet und verglichen die Parameter Leukozyten (WBC), Erythrozyten (RBC) und Thrombozyten (PLT). Je 1 ml peripheres Blut nutzten wir im Verlauf für eine Koloniezählung (engl. *CFU-Assay*, *CFU = colony forming units*). Anschließend wurden die Versuchstiere mittels CO₂-Insufflation und zervikaler Dislokation sakrifiziert und unter sterilen Kautelen Milz, Thymus und Knochenmark aus Femora und Tibiae entnommen. Das Knochenmark wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht und die Anzahl aller mononukleären

Zellen (MNC, anhand ihrer Größe und Granularität mittels FSC und SSC zu identifizieren), der B- (B220⁺) und T-Lymphozyten (CD3⁺), der myeloischen Zellen (CD11b⁺) und Megakaryozyten (MK, CD61⁺ CD41⁺) erhoben.

Wir wogen die entnommenen Organe und stellten fest, dass Milz und Thymus signifikant kleiner als die lymphatischen Organe der Kontrollgruppe waren (siehe Tabelle 7 und Grafik 4).

	DMSO	JQ1
Milz	70,63 ± 4,63	45 ± 3,38
Thymus	68,88 ± 3,34	33,5 ± 1,49

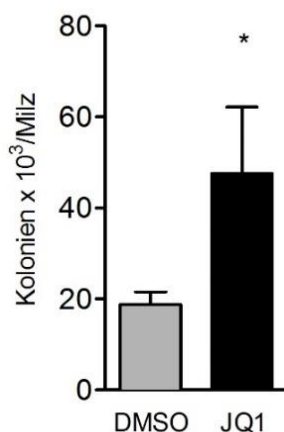
Tabelle 7: Gewicht von Milz und Thymus in mg, n=7-8



Grafik 4: Gewicht von Milz und Thymus nach JQ1-Behandlung

Gewicht der lymphatischen Organe a) Milz und b) Thymus mit JQ1 behandelte Versuchstiere im Vergleich zur mit der Trägerlösung DMSO behandelten Kontrollgruppe in mg, n=7-8, * $P < 0,05$.

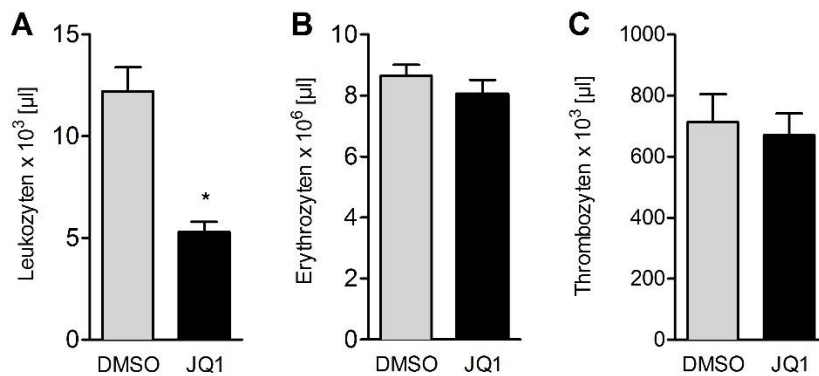
Weiterhin nutzen wir auch Milzgewebe, um im Verlauf eine Koloniezählung durchzuführen. Im Vergleich beider Gruppen konnten wir trotz der geringeren Organgröße mehr als die doppelte Anzahl koloniebildende Einheiten (KBE), im Milzgewebe der mit JQ1 behandelten Versuchstiere feststellen (DMSO: $18,79 \pm 2,77 \times 10^3$ /Milz; JQ1: $47,54 \pm 14,59 \times 10^3$ /Milz; n=4; * $P < 0,05$; siehe Grafik 5).



Grafik 5: Koloniebildende Einheiten/Milz nach JQ1-Behandlung

Koloniebildende Einheiten/Milz von Versuchstieren die mit JQ1 behandelt wurden im Vergleich zur mit DMSO behandelten Kontrollgruppe, n=4, * $P < 0,05$.

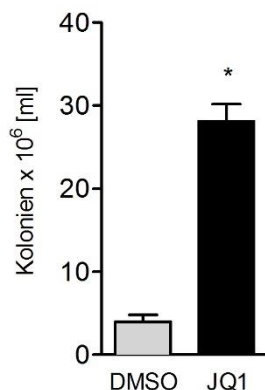
Die mit JQ1 behandelten Tiere waren nach Abschluss der Behandlung leukopen im Vergleich zur mit DMSO behandelten Kontrollgruppe (DMSO: $12,21 \pm 1,18 \times 10^3$ Leukozyten/ μl ; JQ1: $5,29 \pm 0,51 \times 10^3$ Leukozyten/ μl ; $n=8$; $*P<0,05$). Die beiden anderen Zellreihen waren nicht betroffen, und es ergab sich kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der Erythrozyten und Thrombozyten zwischen beiden Gruppen (siehe Grafik 6).



Grafik 6: Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten nach JQ1-Behandlung

Hemavet-Analyse der a) Leukozyten, b) Erythrozyten und c) Thrombozyten im peripheren Blut mit JQ1 behandelter Versuchstiere im Vergleich zur mit DMSO behandelten Kontrollgruppe, $n=8$, $*P<0,05$.

Obwohl die mononukleären Zellen im peripheren Blut der Behandlungsgruppe erniedrigt waren, waren die koloniebildenden Einheiten aus 1 ml peripherem Blut 7-fach erhöht gegenüber der Kontroll-Gruppe (DMSO: $4 \pm 0,82$ KBE x $10^6/\text{ml}$ Blut; JQ1: $28,13 \pm 2,05$ KBE x $10^6/\text{ml}$ Blut; $n=8$; $*P<0,05$; siehe Grafik 7).



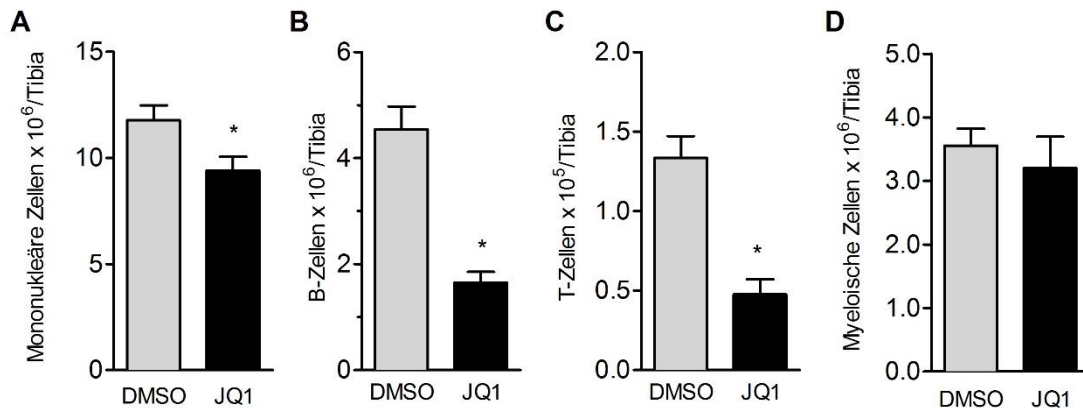
Grafik 7: Koloniebildende Einheiten/ml peripheres Blut nach JQ1-Behandlung

Koloniebildende Einheiten/ml peripheres Blut mit JQ1 behandelter Versuchstiere im Vergleich zur mit DMSO behandelten Kontrollgruppe, $n=8$, $*P<0,05$.

In der durchflusszytometrischen Analyse des Knochenmarks waren sowohl die mononukleären Zellen insgesamt als auch B- und T-Zellen spezifisch vermindert. Die myeloischen Zellen waren in beiden Gruppen in gleicher Anzahl vorhanden (siehe Tabelle 8 und Grafik 8).

	DMSO	JQ1
MNC x 10 ⁶	11,79 ± 0,69	9,41 ± 0,65
B-Lymphozyten x 10 ⁶	4,54 ± 0,43	1,65 ± 0,2
T-Lymphozyten x 10 ⁵	1,34 ± 0,14	0,48 ± 0,09
Myeloische Zellen x 10 ⁶	3,56 ± 0,27	3,2 ± 0,49

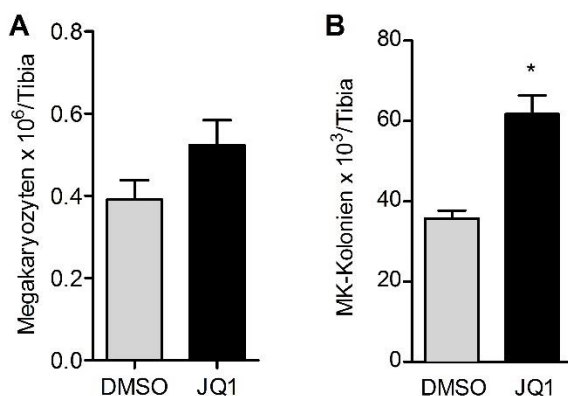
Tabelle 8: MNC, B-Zellen, T-Zellen und myeloische Zellen/Tibia, n=8



Grafik 8: Knochenmarkszellen nach Behandlung mit JQ1

Durchflusszytometrische Analyse der a) mononukleären Zellen, b) B-Lymphozyten (B-Zellen), c) T-Lymphozyten (T-Zellen) und d) myeloischen Zellen aus dem Knochenmark mit JQ1 behandelte Versuchstiere im Vergleich zur mit DMSO behandelten Kontrollgruppe, n=8, **P*<0,05.

Eine Untersuchung der Anzahl an Megakaryozyten (MK) im Knochenmark nach Behandlung mit JQ1 zeigte zum Einen eine absolut erhöhte Anzahl Megakaryozyten, zum Anderen konnten wir eine signifikant erhöhte Anzahl an MK-Kolonien im Vergleich zur mit DMSO behandelten Kontrollgruppe nachweisen (DMSO: 35,7 ± 2,004 x 10³/Tibia; JQ1: 61,71 ± 4,68 x 10³/Tibia; n=5; **P*<0,05; siehe Grafik 9).



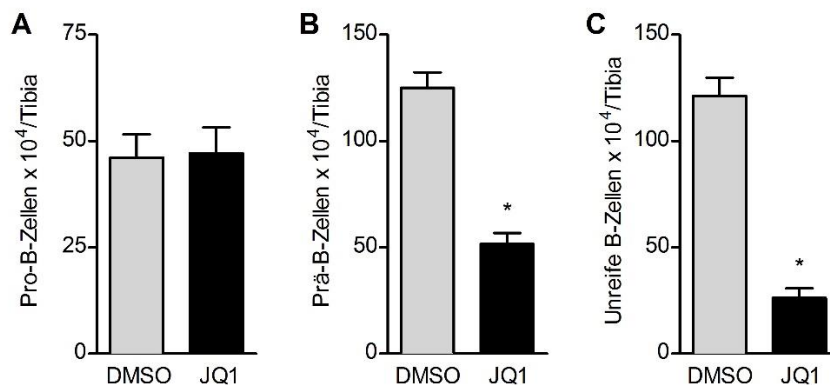
Grafik 9: Megakaryozyten nach JQ1-Behandlung

a) Durchflusszytometrische Analyse der Megakaryozyten (MK) und b) MK-koloniebildenden Einheiten aus dem Knochenmark mit JQ1 behandelte Mäuse im Vergleich zu mit DMSO behandelten Tieren, n=5-8, **P*<0,05

4.2.1 Myelo- und Lymphopoese

Aufgrund des in Abschnitt 4.2 demonstrierten Effekts von JQ1 auf die B- und T-Lymphozyten führten wir das Experiment fort, indem wir die Stadien der Lymphopoese in Knochenmark und Thymus von jeweils 4 der Versuchstiere aus Abschnitt 4.2.1 weitergehend durchflusszytometrisch analysierten. Der Vollständigkeit halber erhoben wir zudem die Anzahl der myeloischen Vorläuferzellen GMP ($\text{Lin}^- \text{Sca}^- \text{Kit}^+ \text{CD34}^+ \text{Fc}\gamma\text{RII}^{\text{hi}}$) und MEP ($\text{Lin}^- \text{Sca}^- \text{Kit}^+ \text{CD34}^- \text{Fc}\gamma\text{RII}^{\text{low}}$).

Zur Differenzierung der Entwicklungsstufen der B-Zellen wurden die Oberflächenmarker Lin, B220, CD34 und IgM verwendet. Während die frühen Pro-B-Zellen ($\text{Lin}^- \text{B220}^+ \text{CD34}^+ \text{IgM}^-$) nach JQ-Behandlung im Vergleich zur mit DMSO behandelten Kontrollgruppe unverändert im Knochenmark vorlagen, waren die weiter differenzierten Prä-B- ($\text{Lin}^- \text{B220}^+ \text{CD34}^- \text{IgM}^-$) und unreifen B-Zellen ($\text{Lin}^- \text{B220}^+ \text{IgM}^+$) um das zwei- (DMSO: $125,1 \pm 7,31 \times 10^4$ Zellen/Tibia; JQ1: $51,6 \pm 5,23 \times 10^4$ Zellen/Tibia; $n=4$; $*P<0,05$) bzw. fünffache (DMSO: $121,2 \pm 8,49 \times 10^4$ Zellen/Tibia; JQ1: $26,3 \pm 4,48 \times 10^4$ Zellen/Tibia; $n=4$; $*P<0,05$) der Zellen in ihrer jeweiligen Kontrollgruppe reduziert (siehe Grafik 10).

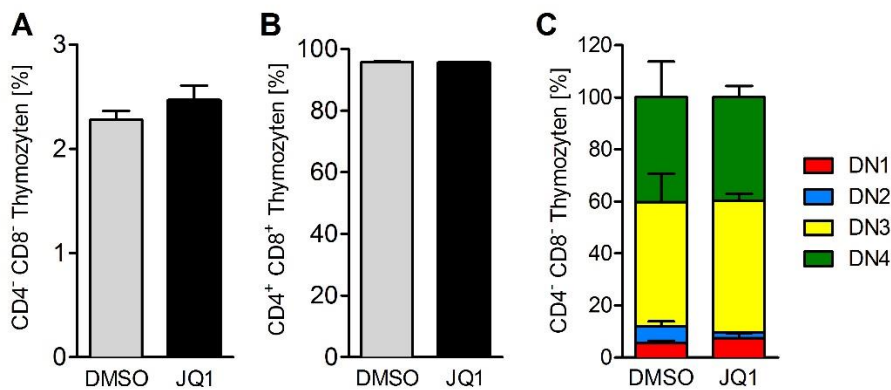


Grafik 10: B-Lymphozyten-Vorläuferzellen unter JQ1-Behandlung

Durchflusszytometrische Analyse der a) Pro-B-Lymphozyten (Pro-B-Zellen), b) Prä-B-Lymphozyten (Prä-B-Zellen) und c) unreifen B-Zellen im Knochenmark mit JQ1 behandelte Versuchstiere im Vergleich zur mit DMSO behandelten Kontrollgruppe, $n=4$, $*P<0,05$.

Um genauere Rückschlüsse auf den Einfluss von JQ1 auf die Entwicklung der T-Lymphozyten zu gewinnen, maßen wir den Anteil der doppelnegativen, frühen Thymozyten ($\text{CD4}^- \text{CD8}^-$), sowie der weiter differenzierten doppelpositiven Thymozyten ($\text{CD4}^+ \text{CD8}^+$) an den gesamten Thymuszellen.

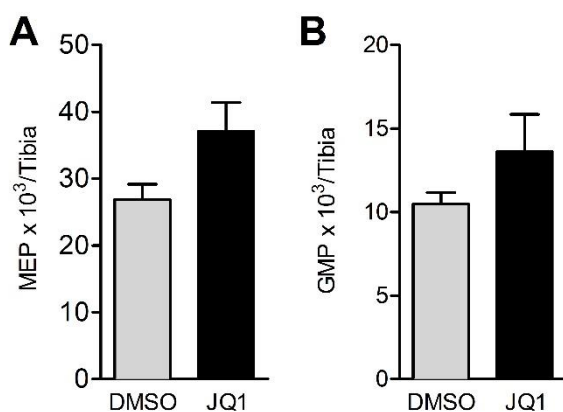
Anhand unserer Analyse ließ sich in den frühen Stadien der T-Zell-Entwicklung keine Differenz zur Kontrollgruppe feststellen. Weiterhin wurden in einer Subgruppenanalyse der Entwicklungsstadien der doppelnegativen Zellen DN1-4 anhand der Oberflächenmarker CD25 und CD44 (DN1: CD25⁻ CD44^{high}, DN2: CD25⁺ CD44^{high}, DN3: CD25⁺ CD44^{low}, DN4: CD25⁻ CD44⁻) die Proportionen der einzelnen Gruppen nicht beeinflusst (siehe Grafik 11).



Grafik 11: T-Lymphozyten-Vorläuferzellen unter JQ1-Behandlung

Durchflusszytometrische Analyse der a) doppelnegativen (CD4⁻ CD8⁻) Thymozyten, b) der doppelpositiven (CD4⁺ CD8⁺) Thymozyten und c) Subgruppenanalyse der doppelnegativen (CD4⁻ CD8⁻) Thymozyten, n=4, *P<0,05.

Eine durchflusszytometrische Messung der Anzahl der myeloischen Vorläuferzellen MEP und GMP ergab keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe (siehe Grafik 12).



Grafik 12: Myeloische Vorläuferzellen nach JQ1-Behandlung

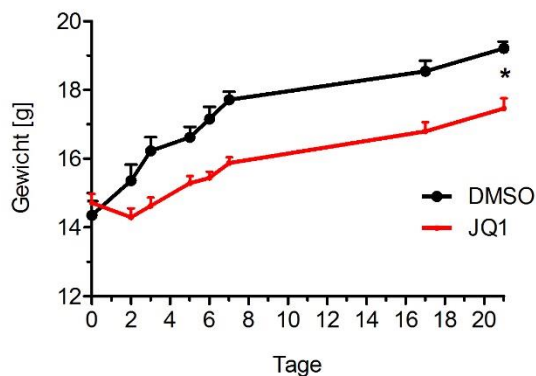
Durchflusszytometrische Analyse der a) Megakaryozyten-Erythrozyten-Vorläuferzellen (MEP) und b) Granulozyten-Makrophagen-Vorläuferzellen (GMP) aus dem Knochenmark mit JQ1 behandelte Mäuse im Vergleich zur mit DMSO behandelten Kontrollgruppe, n=5-8, *P<0,05.

4.3 Juvenile und adulte Hämatopoese nach JQ1-Behandlung im Vergleich

Da sich das hämatopoetische System im Laufe des Lebens verändert, untersuchten wir, welche Auswirkung JQ1 auf Wachstum und Hämatopoese juveniler (vier Wochen alt) und adulter (acht Wochen alt) Versuchstiere hat.

Jeweils 5 vier und acht Wochen alten C57Bl6/J Mäusen wurde über einen Zeitraum von 21 Tagen täglich 50 mg/kg JQ1, gelöst in 200 µl DMSO, als i. p. Injektion verabreicht. Die gleichstarken Kontrollgruppen wurden nach demselben Algorithmus mit der Trägerlösung DMSO behandelt.

Die zu Beginn der Behandlung vier Wochen alten Tiere wurden an Tag 0, 2, 3, 5, 6, 7, 17 und 21 der Behandlung gewogen. Dabei konnten wir eine Wachstumsverzögerung der mit JQ1-behandelten Tiere beobachten (Tag 21 DMSO: $19,21 \pm 0,19$ g, JQ1: $17,46 \pm 0,29$ g; $n=5$, $*P<0,05$; siehe Grafik 13).



Grafik 13: Gewicht nach JQ1-Behandlung

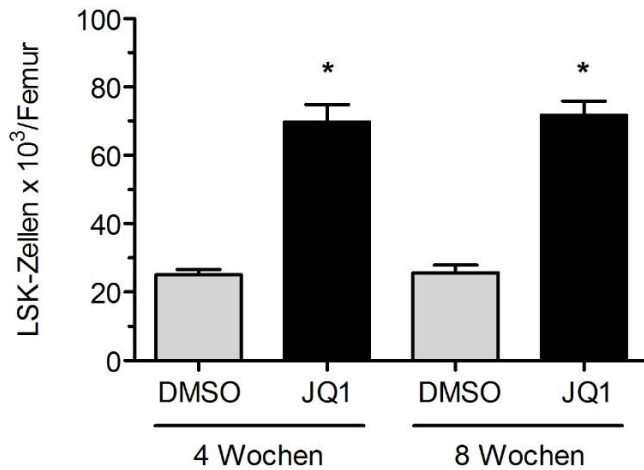
Gewicht der mit JQ1 behandelten Versuchstiere im Vergleich zur mit DMSO behandelten Kontrollgruppe, $n=5$, $*P<0,05$.

Nachdem die Behandlung abgeschlossen war, sakrifzierten wir die Versuchstiere mittels CO₂-Insufflation und zervikaler Dislokation. Das unter sterilen Kautelen entnommene Knochenmark aus Femora und Tibiae untersuchten wir mittels Durchflusszytometrie.

In beiden Altersgruppen zeigte sich interessanterweise ein fast dreifacher Anstieg der lineage⁻, sca1⁺, kit⁺ Zellen gegenüber der Kontrollgruppe. Dabei ergab sich zwischen beiden Altersgruppen keine Differenz bezüglich der absoluten Anzahl LSK/Femur (siehe Tabelle 9 und Grafik 14).

	DMSO	JQ1
4 Wochen alte Mäuse	25,02 ± 1,58	69,7 ± 5,17
8 Wochen alte Mäuse	25,61 ± 2,24	71,73 ± 4,13

Tabelle 9: LSK x 10³/Femur 4 bzw. 8 Wochen alter Mäuse, $n=5$



Grafik 14: LSK juveniler und adulter Versuchstiere nach JQ1-Behandlung

Durchflusszytometrische Analyse lineage⁻sca1⁺kit⁺ Zellen aus dem Knochenmark juveniler 4 Wochen und adulter 8 Wochen alter mit JQ1 behandelter Mäuse im Vergleich zur mit DMSO behandelten Kontrollgruppe, n=5, *P<0,05.

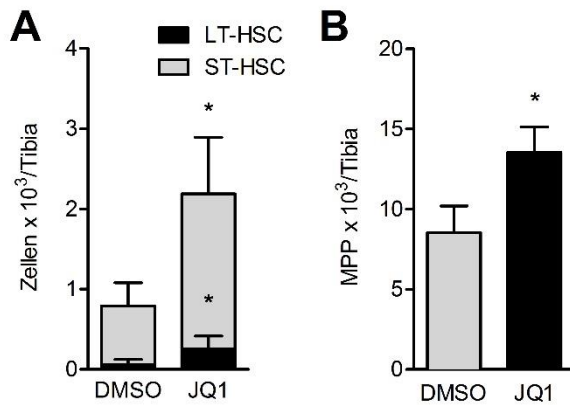
4.3.1 Proliferation hämatopoetischer Stammzellen nach Behandlung mit JQ1

Bezugnehmend auf unserer Ergebnisse aus Abschnitt 4.1, welche eine hohe BET-Expression durch hämatopoetischen Stammzellen, vor allem der LT-HSC, zeigten, vertieften wir unsere Forschung diesbezüglich und untersuchten den Einfluss einer BET-Blockade mittels JQ1 in Bezug auf die verschiedenen Untergruppen hämatopoetischen Stammzellen *in vivo* mittels weiterer durchflusszytometrischer Analysen der gewonnenen Zellen.

In einer differenzierteren Analyse der LSK-Zellen zeigte sich, dass nach Behandlung mit JQ1 sowohl die Anzahl der LT- (Lin⁻ Sca⁺ Kit⁺ CD150⁺ CD48⁻ CD135/Flt3⁻ CD34⁻) und ST-HSC (Lin⁻ Sca⁺ Kit⁺ CD150⁺ CD48⁻ CD135/Flt3⁻ CD34⁺) als auch der MPP (CD34⁺ CD135/Flt3⁺ Cd150⁻) im Knochenmark pro Tibia erhöht war (siehe Tabelle 10 und Grafik 15).

	DMSO	JQ1
LT-HSC	0,06 ± 0,06	0,26 ± 0,16
ST-HSC	0,73 ± 0,29	1,93 ± 0,7
MPP	8,54 ± 1,65	13,54 ± 1,58

Tabelle 10: LT-HSC, ST-HSC und MPP x 10³/Tibia, n=5

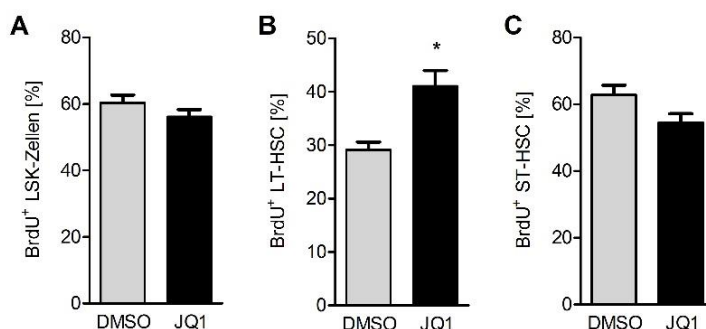


Grafik 15: LT-HSC, ST-HSC und MPP nach Behandlung mit JQ1

Durchflusszytometrische Analyse der a) *long term* und *short term* hämatopoetischen Stammzellen (LT-HSC und ST-HSC) und b) multipotenten Vorläuferzellen (MPP) aus dem Knochenmark mit JQ1 behandelte Mäuse im Vergleich zur mit DMSO behandelten Kontrollgruppe, n=5, * $P < 0,05$.

Um die Proliferation der LSK und ihrer Subgruppen durchflusszytometrisch zu erfassen, injizierten wir den Versuchstieren 48, 24 und 12 Stunden vor der Sakrifizierung jeweils 1 mg Bromodesoxyuridine (BrdU) i. p. So konnten wir mittels BrdU-Assay die Proliferation der LSK insgesamt, sowie der LT- und ST-HSC messen.

In diesen Analysen zeigte sich die Proliferationsrate der LT-HSC deutlich gegenüber der Kontrollgruppe erhöht (DMSO: $29,14 \pm 1,48$ % BrdU⁺; JQ1: $41,08 \pm 2,9$ % BrdU⁺; n=5; * $P < 0,05$), während sich zwischen den Proliferationsraten von sowohl ST-HSC als auch der gesamten LSK im Vergleich zur Kontrollgruppe kein signifikanter Unterschied ergab (siehe Grafik 16).



Grafik 16: LT-HSC, ST-HSC und MPP nach Behandlung mit JQ1

Durchflusszytometrische Analyse der Proliferation a) lineage⁻ ska1⁺ kit⁺ Zellen, b) *long term* und c) *short term* hämatopoetischer Stammzellen (LT-HSC und ST-HSC) aus dem Knochenmark mit JQ1 behandelte Mäuse im Vergleich zur mit DMSO behandelten Kontrollgruppe mittels Bromodesoxyuridine-(BrdU)-Assay, n=5, * $P < 0,05$.

4.4 Kompetitive Repopulation nach Behandlung mit JQ1

Bezugnehmend auf die Ergebnisse aus Abschnitt 4.3.1 führten wir als indirekten Test der Anzahl und Fitness hämatopoetischer Stammzellen nach Behandlung mit JQ1 ein kompetitives Repopulations-Experiment durch.

Hierfür wurden jeweils 3 acht Wochen alte CD45.1⁺ C57Bl6/J Mäuse über 21 Tage mit 50 mg/kg JQ1, gelöst in 200 µl DMSO, behandelt. Die Substanz wurde einmal täglich i. p. injiziert. Die ebenfalls 3 CD45.1⁺ Tiere umfassende Kontrollgruppe wurde nach demselben Algorithmus mit der Trägerlösung DMSO behandelt. Nach Abschluss der Behandlung wurden die Tiere mittels CO₂-Insufflation und zervikaler Dislokation getötet und unter sterilen Kautelen das Knochenmark aus Femora und Tibiae entfernt.

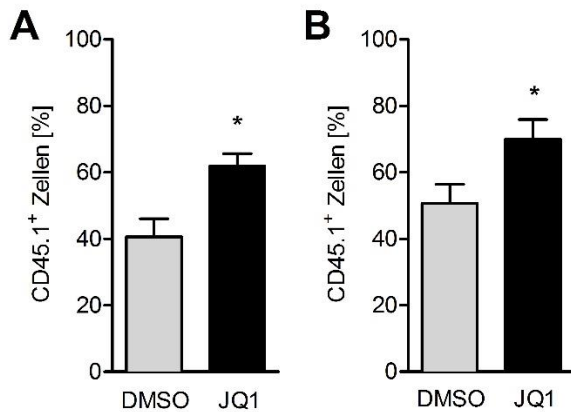
Das Knochenmark einer Maus wurde auf 12 CD45.2⁺ Versuchstiere aufgeteilt. Hierfür wurden 2×10^3 , 2×10^4 und 2×10^5 der entfernten Zellen zusammen mit 2×10^5 CD45.2⁺ Zellen aus dem Knochenmark unbehandelter Tiere in die Schwanzvene je vier zuvor mit $2 \times 4,5$ Gy letal bestrahlter Tiere injiziert.

Das Engraftment der Transplantate wurde durch Untersuchung des peripheren Bluts, nach Blutabnahme aus dem submandibulären Venenplexus, mittels Hemavet überwacht.

Einen und vier Monate nach Transplantation entnahmen wir Blut aus dem submandibulären Venenplexus der mit 2×10^5 CD45.1⁺ Zellen transplantierten Tiere und führten durchflusszytometrische Chimärismusanalysen anhand der kongenen Marker CD45.1 (JQ1- und DMSO-Gruppe) bzw. CD45.2 (unbehandelte Tiere oder vom Wirt stammend, engl. *host-derived*) durch. Dadurch konnten wir einen höheren Anteil CD45.1⁺ Zellen in der Gruppe der Mäuse feststellen, die Knochenmark von Tieren erhalten hatten, die mit JQ1 behandelt wurden. Hier ergab sich also ein höherer Spenderchimärismus (siehe Tabelle 11 und Grafik 17).

Monat	CD45.1 DMSO	CD45.1 JQ1
1	40,46 ± 5,41	61,88 ± 3,79
4	50,63 ± 5,74	69,97 ± 5,93

Tabelle 11: Spenderchimärismus in % der totalen CD45-Anzahl, n=12

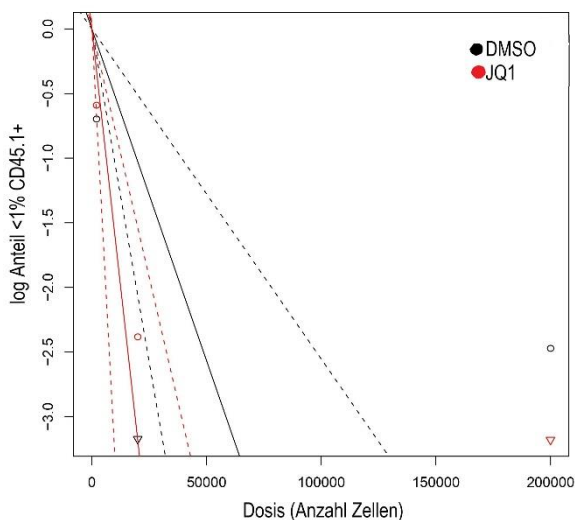


Grafik 17: Chimärismusanalyse anhand des kongenen Marker CD45.1

Durchflusszytometrische Chimärismusanalyse des peripheren Bluts nach a) einem und nach b) vier Monaten. Den CD45.2⁺ Versuchstieren wurde Knochenmark mit JQ1 oder der Trägerlösung DMSO behandelter CD45.1⁺ Versuchstiere transplantiert. Angabe in % der totalen CD45⁺-Zellen, n=12, *P<0,05

Eine Berechnung der *Repopulating Units* (RU) zeigte 2,5-fach mehr HSC in Transplantaten, deren Spendertiere mit JQ1 behandelt wurden ($RU_{\text{Spender (DMSO)}} = 2.15$; $RU_{\text{Spender (JQ1)}} = 4.9$).

Weiterhin ließ eine Grenzverdünnungsanalyse (engl. *extreme limiting dilution analysis*, ELDA) aller Gruppen (2×10^3 , 2×10^4 , 2×10^5) auf eine 3-fach höhere Frequenz hämatopoetischer Stammzellen im Knochenmark der Versuchstiere, die Knochenmark mit JQ1 behandelte Tiere erhielten, im Vergleich zur Kontrollgruppe, schließen (DMSO: 1/19480; JQ1: 1/6284; n=8–12; *P<0.05; siehe Grafik 18).



Grafik 18: Grenzverdünnungsanalyse

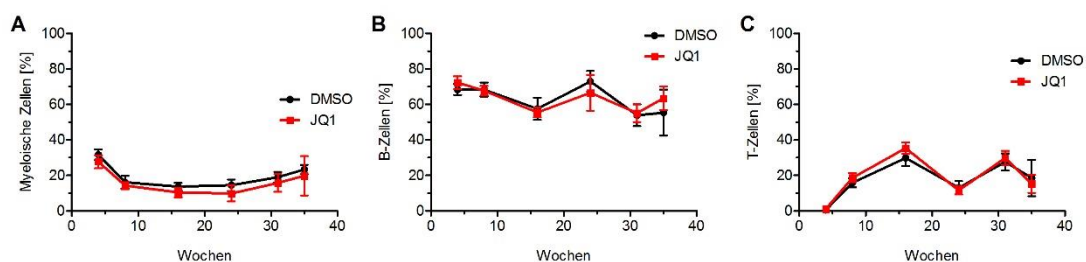
Grenzverdünnungsanalyse (engl. *extreme limiting dilution analysis*, ELDA) anhand durchflusszytometrischer Chimärismusanalysen des peripheren Bluts mit 2×10^3 , 2×10^4 und 2×10^5 CD45.1⁺ Zellen mit JQ1 oder DMSO behandelte Versuchstiere transplantierte CD45.2⁺ Mäuse acht Wochen nach Transplantation, n=64, *P<0,05.

4.5 Myeloische und lymphatische Reihe nach Transplantation mit JQ1 behandelter Knochenmarkzellen

Das folgende Experiment sollte zeigen, ob der in Abschnitt 4.2. beobachtete Zellkontext-abhängige Effekt JQ1s auf die Myelo- und Lymphozyten nach Transplantation persistiert. Weiterhin testeten wir die in 4.4 demonstrierte gesteigerte Repopulationsfähigkeit hämatopoetischer Stammzellen nach sekundärer Transplantation.

Hierfür injizierten wir 2×10^5 Zellen des Knochenmarks von 6 CD45.1⁺ Mäusen, die zuvor mit JQ1 bzw. der Trägerlösung DMSO behandelt wurden, zusammen mit 2×10^5 Zellen von unbehandelten CD45.2⁺ Mäusen in die Schwanzvene von 8 bzw. 6 zuvor mit $2 \times 4,5$ Gy letal bestrahlten CD45.2⁺ Mäusen. Die JQ1-Behandlung erfolgte mit 50 mg/kg, in 200 μ l DMSO gelöst, als tägliche i. p. Injektion über 21 Tage. Die Kontrollgruppe wurde analog mit 200 μ l DMSO behandelt.

Nach 4, 8, 16, 24, 31 und 35 Wochen entnommen wir den transplantierten Versuchstieren Blut aus dem submandibulären Venenplexus und untersuchten es mittels Durchflusszytometrie. Ziel der Untersuchung war, herauszufinden ob die Behandlung der Spendertiere mit JQ1 zu einem *lineage priming* führt, welches sich in einer gesteigerten Rekonstitution der myeloischen oder lymphatischen Zellreihe nach Transplantation äußern würde. Als Parameter wählten wir myeloische Zellen (CD11b⁺), sowie B- (B220⁺) und T-Lymphozyten (CD3⁺).



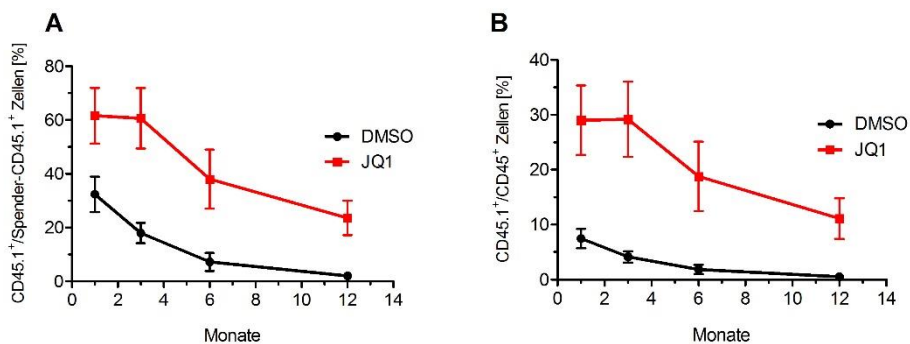
Grafik 19: Myeloische und Lymphatische Reihe nach Transplantation von Knochenmarkzellen mit JQ1 behandelter Mäuse

Durchflusszytometrische Analyse a) myeloischer Zellen, der b) B-Lymphozyten (B-Zellen) und c) T-Lymphozyten (T-Zellen) im peripheren Blut CD45.2⁺ Versuchstiere nach Transplantation CD45.1⁺ Zellen mit JQ1 oder DMSO behandelter Versuchstiere in % aller CD45.1⁺ Zellen, n=6/8, *P<0,05.

Unsere Analyse ergab keine Abweichung der Anteilig an der totalen Anzahl CD45.1⁺ Zellen gemessenen B- oder T-Lymphozyten und myeloischen Zellen (siehe Grafik 19).

4.5.1 Erhöhte Stammzell-Fitness nach Behandlung mit JQ1

Nach 35 Wochen töteten wir jeweils 3 der Versuchstiere und entnahmen unter sterilen Kautelen das Knochenmark aus Femora und Tibiae. Im Rahmen des Reimplantations-Experiments injizierten wir je 4×10^6 der gewonnenen Zellen in die Schwanzvene 2 x 18 mit 2 x 4,5 Gy letal bestrahlter CD45.2⁺ Versuchstiere. Nach einem, drei, sechs und zwölf Monaten entnahmen wir den sekundär transplantierten Tieren Blut aus dem submandibulären Venenplexus und führten durchflusszytometrische Chimärismusanalysen anhand der kongenen Marker CD45.1 bzw. CD45.2 durch.



Grafik 20: Chimärismus-Analyse anhand des kongenen Marker CD45.1 nach sekundärer Transplantation

Durchflusszytometrische Chimärismusanalyse des peripheren Bluts CD45.2⁺ Versuchstiere, die mit Knochenmarkzellen (KM) von Mäusen transplantiert wurden, die KM initial mit JQ1 oder der Trägerlösung DMSO behandelte CD45.1⁺ Versuchstiere erhielten. a) Normiert auf die Anzahl CD45.1⁺ Zellen der Spender, b) % aller CD45⁺ Zellen, n=18, *P<0,05

Um den von uns untersuchten Effekt besser darzustellen, normalisierten wir den Anteil der CD45.1⁺ Zellen im Blut der Sekundär-Transplantats-Empfänger auf die Anzahl der CD45.1⁺ Zellen im Blut ihrer respektiven Spendertiere (Grafik 20 A). Im peripheren Blut der Versuchstiere konnte sowohl nach einem (DMSO: 32,36 %; JQ1: 61,61 %; Zahlen auf Spender normalisiert; n=18; *P<0,05), als auch nach 3 Monaten (DMSO: 17,95 %; JQ1: 60,62 %; norm.; n=18; *P<0,05) ein anhaltend erhöhter Anteil CD45.1⁺ Zellen in der Gruppe der initial mit JQ1 behandelten Tiere nachgewiesen werden.

Während die transplantierten CD45.1⁺ Zellen in der JQ1-Gruppe bis 12 Monate nach Transplantation einen signifikanten Anteil der Hämatopoese ausmachten (21,54 %, norm.; n=18; **P*<0,05), konnten wir zu diesem Zeitpunkt in der Kontrollgruppe einen nur geringfügigen Beitrag der mit DMSO-behandelten Zellen zur Hämatopoese der sekundär transplantierten Mäuse feststellen (2,04 %, norm.; n=18; **P*<0.05; siehe Grafik 20).

4.6 Rekonstitution der Blutbildung nach Bestrahlung und Behandlung mit JQ1

In unserem finalen Experiment untersuchten wir die hämatologische Rekonstitution nach bestrahlungsinduzierter Myelosuppression nach Behandlung mit JQ1 und versuchten den Effekt JQ1s auf die Selbsterneuerungskapazität hämatopoetischer Stammzellen durch serielle Koloniezählungen besser darzustellen.

Hierfür behandelten wir 18 ca. acht Wochen alte C57BL/6J Mäuse über 21 Tage mit 50 mg/kg JQ1, gelöst in 200 µl DMSO, welches einmal täglich i. p. injiziert wurde. Die gleichgroße Kontrollgruppe wurden nach demselben Algorithmus mit 200 µl der Trägerlösung DMSO behandelt. Nach Abschluss der Behandlung bestrahlten wir alle Versuchstiere mit einer subletalen Strahlendosis von 5 Gy. Wir wählten einen Zeitraum von 6 Wochen zur Beobachtung und Monitoring des Blutbilds, um eine möglichst komplette Rekonstitution des blutbildenden Systems untersuchen zu können.

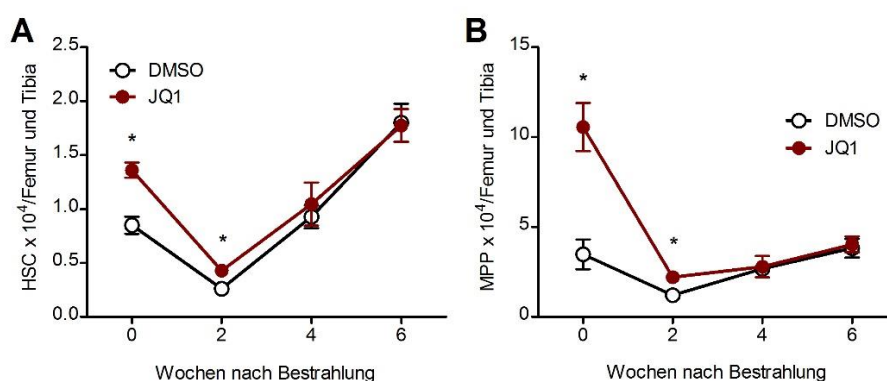
Wir entnahmen jeweils 4 Versuchstieren unmittelbar vor Bestrahlung und anschließend im wöchentlichen Abstand Blut aus dem submandibulären Venenplexus. Die Proben wurden mittels Hemavet und Durchflusszytometrie analysiert. Während wir mit dem Hemavet die Leukozyten (WBC), Erythrozyten (RBC) und Thrombozyten (PLT) quantifizierten, untersuchten wir durchflusszytometrisch die Subpopulationen der B- (B220⁺) und T-Lymphozyten (CD3⁺), sowie der Granulozyten (Gr1⁺) und Monozyten (anhand ihrer Größe und Granularität mittels FSC und SSC zu identifizieren).

Weiterhin töteten wir unmittelbar vor Bestrahlung und im Abstand von zwei Wochen 4 Versuchstiere aus jeder Gruppe und entfernten anschließend unter sterilen Kautelen das Knochenmark aus Femora und Tibiae. Die Proben wurden mittels Durchflusszytometrie analysiert und die Anzahl der hämatopoetischen

Stammzellen (HSC, Lin⁻ Sca⁺ Kit⁺ CD150⁺ CD48⁻) sowie der multipotenten Vorläuferzellen (MPP, CD34⁺ CD135/Flt3⁺ Cd150⁻) erhoben. Zusätzlich nutzen wir Knochenmark der unmittelbar vor Bestrahlung getöteten Tiere, um im Verlauf serielle Koloniezählungen durchzuführen.

Bereits vor Bestrahlung zeigte sich im Knochenmark der Kontrollgruppe eine gegenüber der JQ1-Gruppe signifikant erniedrigte Anzahl hämatopoetischer Stammzellen (DMSO: $0,85 \pm 0,08 \times 10^4/\text{Femur und Tibia}$; JQ1: $1,36 \pm 0,07 \times 10^4/\text{Femur und Tibia}$; $n=3-4$; $*P<0.05$) sowie multipotenter Vorläuferzellen (DMSO: $3,48 \pm 0,82 \times 10^4/\text{Femur und Tibia}$; JQ1: $10,56 \pm 1,33 \times 10^4/\text{Femur und Tibia}$; $n=3-4$; $*P<0.05$). Zum Zeitpunkt der nächsten Knochenmarkanalyse, zwei Wochen nach Bestrahlung, erreichten sowohl die MPP als auch die hämatopoetischen Stammzellen ihren Nadir. Dabei blieben die Zellen in der mit JQ1 behandelten Gruppe im ungefähr gleichen Verhältnis (1,6 x höher) zur Kontrollgruppe erhöht (HSC DMSO: $0,26 \pm 0,04 \times 10^4/\text{Femur und Tibia}$; JQ1: $0,43 \pm 0,05 \times 10^4/\text{Femur und Tibia}$; MPP DMSO: $1,2 \pm 0,2 \times 10^4/\text{Femur und Tibia}$; JQ1: $2,2 \pm 0,27 \times 10^4/\text{Femur und Tibia}$; $n=4$, $*P<0.05$).

In Woche 4 und Woche 6 nach Bestrahlung, konnten wir keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen mehr feststellen (siehe Tabelle 12 und Grafik 21).



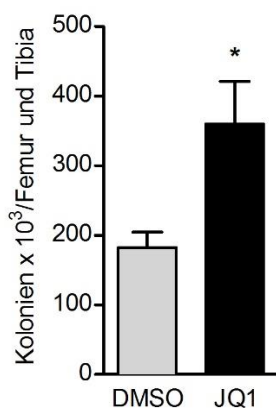
Grafik 21: Hämatopoetische Stammzellen und multipotente Vorläuferzellen nach Behandlung mit JQ1 und Bestrahlung mit 5 Gy

Durchflusszytometrische Analyse der a) hämatopoetischen Stammzellen (HSC) und b) multipotenten Vorläuferzellen (MPP) im Knochenmark mit JQ1 oder der Trägerlösung DMSO behandelter und anschließend mit 5 Gy bestrahlter Versuchstiere, $n=3-4$, $*P<0,05$.

Wochen	HSC DMSO	HSC JQ1	MPP DMSO	MPP JQ1
0	0,85 ± 0,08	1,36 ± 0,07	3,48 ± 0,82	10,56 ± 1,33
2	0,26 ± 0,04	0,43 ± 0,05	1,2 ± 0,2	2,2 ± 0,2
4	0,93 ± 0,1	1,05 ± 0,2	2,67 ± 0,34	2,79 ± 0,59
6	1,8 ± 0,18	1,77 ± 0,15	3,82 ± 0,52	4,03 ± 0,45

Tabelle 12: Anzahl HSC bzw. MPP x 10⁴/Femur + Tibia; n=3-4 (ein Versuchstier starb während der JQ1-Behandlung), *P<0,05.

Auch die Anzahl koloniebildender Einheiten im Knochenmark war in der JQ1-Gruppe signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht (DMSO: 18,21 ± 2,25 KBE x 10⁴/Femur und Tibia; JQ1: 35,96 ± 6,15 KBE x 10⁴/Femur und Tibia; n=3-4; *P<0,05; siehe Grafik 22).



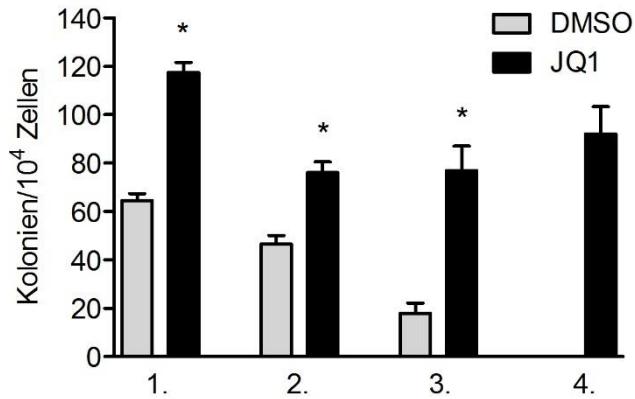
Grafik 22: Koloniebildende Einheiten im Knochenmark nach JQ1-Behandlung

Koloniebildende Einheiten im Knochenmark aus Femur und Tibia mit JQ1 behandelte Versuchstiere im Vergleich zur mit DMSO behandelten Kontrollgruppe, n=3-4, *P<0,05.

Um die Stammzellen im Knochenmark weiter auf ihre Fitness zu testen, überführten wir die KBE seriell in weitere Nährmedien. Die Ergebnisse zeigen, dass während die mit JQ1 behandelten Zellen konstante KBE hervorbrachten, die Zellen aus der DMSO-Gruppe nach jeder Übertragung weniger KBE produzierten (siehe Tabelle 13 und Grafik 23).

	DMSO	JQ1
1. Übertragung	64,43 ± 2,92	117,5 ± 4,21
2. Übertragung	46,5 ± 3,62	76,96 ± 4,47
3. Übertragung	17,92 ± 4,22	76,79 ± 10,18
4. Übertragung		92 ± 11,28

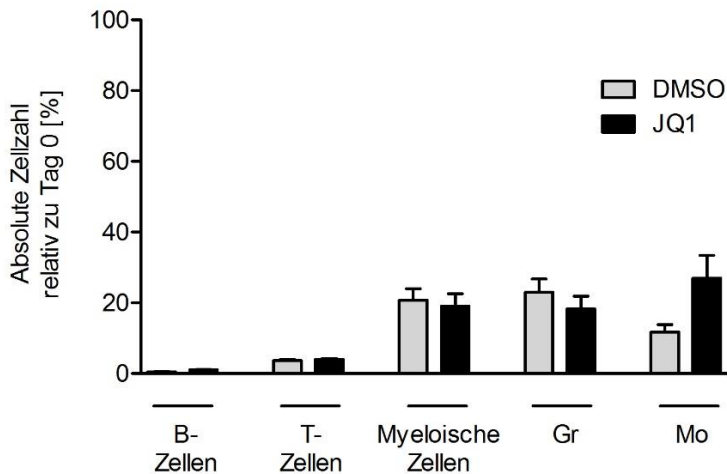
Tabelle 13: Koloniebildende Einheiten/10⁴ Zellen, n=3-4



Grafik 23: Serielle Übertragung koloniebildender Einheiten aus dem Knochenmark nach JQ1-Behandlung

Serielle Übertragung koloniebildender Einheiten aus dem Knochenmark mit JQ1 behandelte Versuchstiere im Vergleich zur mit DMSO behandelten Kontrollgruppe in weitere Nährmedien, n=3-4, *P<0,05.

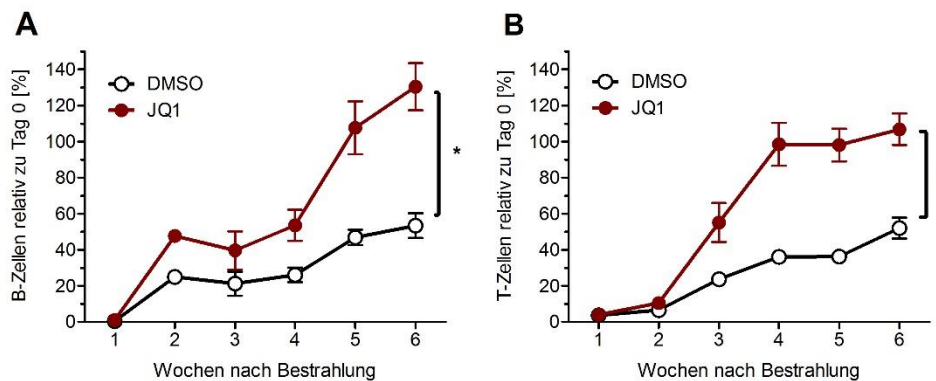
Im peripheren Blut zeigten alle Zellreihen beider Versuchsgruppen einen Abfall von 75 % - 99 % im Vergleich zu Tag 0 vor Bestrahlung. Im Vergleich untereinander waren hier vor allem die B- und T-Lymphozyten betroffen (B-Zellen DMSO: 0,49 ± 0,08 %; JQ1: 1,02 ± 0,09 %; T-Zellen DMSO: 3,63 ± 0,39 %; JQ1: 3,99 ± 0,27%; n=4; siehe Grafik 24).



Grafik 24: B- und T-Lymphozyten, myeloische Zellen, Granulozyten und Monozyten nach Behandlung mit JQ1 und Bestrahlung mit 5 Gy

Durchflusszytometrische Untersuchung der B- und T-Lymphozyten (B- und T-Zellen), myeloischen Zellen, Granulozyten (Gr) und Monozyten (Mo) im peripheren Blut mit JQ1 behandelte Versuchstiere im Vergleich zur mit DMSO behandelten Kontrollgruppe eine Woche nach Bestrahlung mit 5 Gy, n=4, *P<0,05.

Versuchstiere die JQ1 erhalten hatten, konnten ihre B- und T-Lymphozyten jedoch nach 6 Wochen komplett rekonstituieren (B-Zellen: $130,4 \pm 13,06$ %; T-Zellen: $106,8 \pm 8,73$ %; $n=4$; $*P<0.05$), während die Zellen der mit der Trägerlösung DMSO behandelte Kontrollgruppe um ca. 50 % depletiert blieben (B-Zellen: $53,39 \pm 6,90$ %; T-Zellen: $52,02 \pm 5,82$ %; $n=4$; $*P<0.05$; siehe Grafik 25).



Grafik 25: B- und T-Lymphozyten nach JQ1-Behandlung und Bestrahlung mit 5 Gy

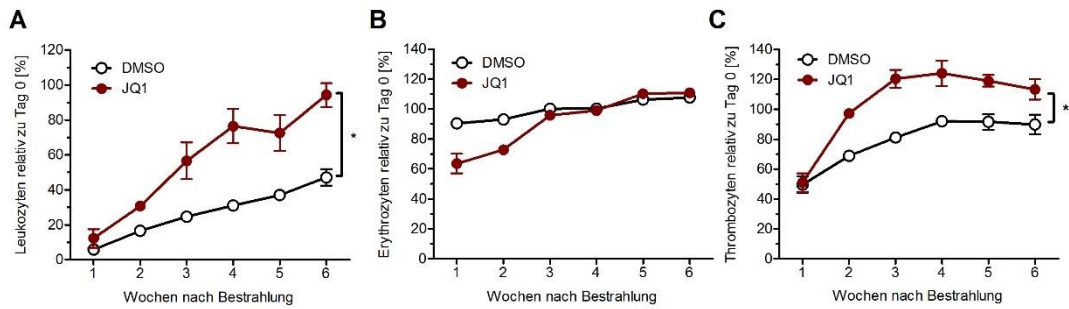
Durchflusszytometrische Analyse der a) B- und b) T-Lymphozyten (B- und T-Zellen) nach Behandlung mit JQ1 oder DMSO und Bestrahlung mit 5 Gy, $n=4$, $*P<0,05$.

In nahezu allen Zellreihen beobachteten wir eine im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant schnellere Rekonstitution des hämatopoetischen Systems der Versuchstiere, die mit JQ1 behandelt wurden.

Während die gesamten Leukozyten der Behandlungsgruppe nach 6 Wochen nahezu ihre Anzahl vor Bestrahlung erreicht hatten ($94,26 \pm 6,7$ %; $n=4$; $*P<0.05$), blieben die der Kontrollgruppe deutlich depletiert ($47,17 \pm 4,66$ %; $n=4$; $*P<0.05$).

Die Erythrozyten blieben der einzige Zelltyp, bei der die Zellen der JQ1-behandelten Versuchstiere nach einer Woche gegenüber der Kontrollgruppe deutlich vermindert waren (DMSO: $90,37 \pm 2,31$ %; JQ1: $63,67 \pm 6,55$ %; $n=4$; $*P<0.05$). Im Verlauf der weiteren fünf Wochen glichen sich beide Kurven bis zur vollkommenen Rekonstitution der roten Blutzellen an.

Die Thrombozyten zeigten insgesamt einen den Leukozyten ähnlichen Verlauf, wobei die Differenz zwischen der mit JQ1 behandelten und der Kontrollgruppe zwar signifikant blieb, jedoch im Vergleich zu den anderen Zellgruppen deutlich geringer ausfiel (DMSO: $89,8 \pm 6,54$ %; JQ1: $113,3 \pm 6,72$ %; $n=4$; $*P<0,05$; siehe Grafik 26).

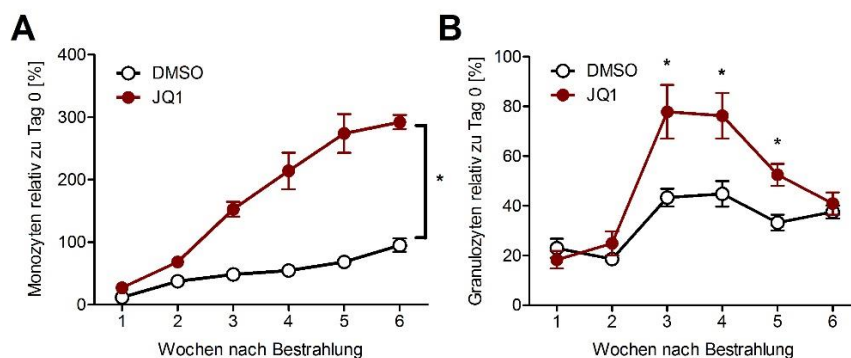


Grafik 26: Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten nach Behandlung mit JQ1 und Bestrahlung mit 5 Gy

Analyse der a) Leukozyten, b) Erythrozyten und c) Thrombozyten nach Behandlung mit JQ1 oder der Trägerlösung DMSO und Bestrahlung mit 5 Gy mittels Hemavet, n=4, * $P < 0,05$.

Während die Monozyten der mit DMSO behandelten Kontrollgruppe sich im Gegensatz zu den anderen Zelltypen vollständig erholten, stiegen die Monozyten der Versuchstiere, die mit JQ1 behandelt wurden, bis auf ein nahezu dreifaches ihres Ausgangswertes an (DMSO: $95,03 \pm 10,9$ %; JQ1: $292,1 \pm 11,28$ %; n=4, * $P < 0,05$).

Im Blut der mit JQ1 behandelten Versuchstiere zeigte sich in Woche 3, 4 und 5 nach Bestrahlung ein signifikanter Anstieg der Granulozyten gegenüber der Kontrollgruppe (Woche 3 DMSO: $43,31 \pm 3,54$ %; JQ1: $77,82 \pm 10,82$ %; Woche 4 DMSO: $44,81 \pm 5,12$ %; JQ1: $76,23 \pm 9,2$ %, Woche 5 DMSO: 33 ± 3 %; JQ1: 52 ± 4 %; n=4, * $P < 0,05$), in Woche 6 näherten sich beide Kurven jedoch wieder einander an (siehe Grafik 27).



Grafik 27: Monozyten und Granulozyten nach Behandlung mit JQ1 und Bestrahlung mit 5 Gy

Durchflusszytometrische Analyse der a) Monozyten und b) Granulozyten nach Behandlung mit JQ1 oder der Trägerlösung DMSO und Bestrahlung mit 5 Gy, n=4, * $P < 0,05$.

5. Diskussion

Ziel dieser Dissertation war es, die Auswirkung des BET-Inhibitors JQ1, der kompetitiv an die Bromodomänen von Proteinen der BET-Familie bindet, auf die gesunde Hämatopoese zu untersuchen. Im Rahmen mehrerer Experimente konnten wir den Zellkontext-abhängigen Effekt JQ1s auf verschiedene Subpopulationen des hämatopoetischen Systems demonstrieren. So zeigten sich die Zellen der lymphatischen Reihe depletiert, während JQ1 nur Auswirkung auf vereinzelte Zelltypen der myeloischen Reihe hatte (vor allem die Megakaryozyten lagen nach Behandlung mit JQ1 vermehrt im Knochenmark vor).

Schließlich konnten wir nicht nur eine erhöhte Expression von *Brd4*, einem Gen der BET-Familie, durch *long term* hämatopoetische Stammzellen („Langzeit“-Stammzellen, LT-HSC) nachweisen (siehe Grafik 3 C, Abschnitt 4.1), welche wiederum einen ausgeprägten JQ1-abhängigen Effekt erwarten ließ, sondern auch eine erhöhte Anzahl hämatopoetischer Stammzellen nach Behandlung mit JQ1 im Knochenmark beweisen (siehe Grafik 15, Abschnitt 4.3.1). Weiterführend ließen die kompetitiven Repopulations-Experimente aus Abschnitt 4.4 und 4.5, in denen bestrahlten Versuchstieren Knochenmark von zuvor mit JQ1 behandelten Mäusen transplantiert wurde, sowie die subletale Bestrahlung mit JQ1 behandelte Versuchstiere in Abschnitt 4.6, nicht nur auf eine erhöhte Anzahl, sondern auch eine vermehrte Fitness der hämatopoetischen Stammzellen rückschließen.

Zusammenfassend ergeben sich folgende Kernaussagen:

1. JQ1 verändert die physiologische Hämatopoese Zelltyp-abhängig, wobei die Leukozyten und spezifisch die Lymphozyten durch JQ1 depletiert werden, während sich kein Effekt auf myeloische Zellen, mit Ausnahme der Megakaryozyten, zeigt. Die Megakaryopoese wirkt durch JQ1 stimuliert. Die dazu im Kontrast stehende reduzierte Zellularität im peripheren Blut und Knochenmark scheint zumindest teilweise auf einem Differenzierungsblock der B-Lymphozyten zu beruhen.
2. JQ1 fördert wiederum die Expansion, Fitness und Mobilisation hämatopoetischer Stammzellen aus dem Knochenmark ins periphere Blut und die lymphatischen Organe und führt somit zur schnelleren hämatologischen

Rekonstitution nach Stammzelltransplantation, sowie zur beschleunigten Rekonstitution des Blutbilds nach Myelosuppression, verdeutlicht am Beispiel subletaler Bestrahlung.

5.1 Zellkontext-abhängige Expression von *Brd2*, *Brd3* und *Brd4*

JQ1 ist eine niedermolekulare Verbindung (engl. *small molecule*) die kompetitiv an Bromodomänen - epigenetische Lesedomänen, die acetylierte Lysine in Histonen erkennen - bindet. BRD2, BRD3 und BRD4 sind Teil der *Bromodomain- and extra-terminal domain*-(BET-)Familie. Ziel unseres ersten Experiments war es, anhand der Expression von *Brd2*, *Brd3* und *Brd4* durch Zellen des hämatopoetischen Systems Zielstrukturen für JQ1 zu identifizieren.

Besonders auffällig war, dass alle drei Gene, im Vergleich der untersuchten Zellpopulationen, am meisten von Megakaryozyten (MK) exprimiert wurden. In der Literatur wird der Effekt von JQ1 unter anderem einer Herunterregulation von MYB zugeschrieben, welches wiederum einen negativen Effekt auf die Megakaryopoese hat (Bianchi et al., 2015). Passend dazu konnten wir in Abschnitt 4.2 einen signifikant erhöhten Anteil MK-koloniebildender Einheiten (KBE, engl. *colony forming units, CFU*) im Knochenmark mit JQ1 behandelte Versuchstiere gegenüber der mit DMSO behandelten Kontrollgruppe nachweisen. Die absolute Anzahl der Megakaryozyten war ebenfalls erhöht, der Unterschied zur Kontrollgruppe jedoch nicht signifikant (siehe Grafik 9 A und B). Dies könnte z. B. Ausdruck einer erhöhten Proliferationsrate der Vorläuferzellen und einem nachfolgenden Differenzierungs-Stopp sein, wobei weitere Experimente notwendig wären, um den zugrunde liegenden Mechanismus zu ergründen.

Ebenfalls hohe Expressionsraten von *Brd2*, *Brd3* und *Brd4* zeigten B- und T-Lymphozyten. Dies ist insofern interessant, als das in Abschnitt 4.2 eine signifikante Reduktion der B- und T-Lymphozyten nach Behandlung mit JQ1 im Knochenmark auffiel, während die Zellen der myeloischen Reihe kaum betroffen waren, was wiederum den Zellkontext-abhängigen Effekt von JQ1 verdeutlicht (siehe Grafik 8 B, C und D).

Als interessante Zielstruktur, besonders im Hinblick auf die Idee der „Krebsstammzelle“ (siehe Abschnitt 1.4), betrachteten wir die Gruppe der hämatopoetischen Stammzellen (HSC) genauer und untersuchten speziell die LT- und ST-HSC (engl. *long term*, „Langzeit“ und *short term*, „kurzfristige“-Stammzellen), sowie die Makrophagen-Granulozyten-Vorläuferzellen (GMP) und Megakaryozyten-Erythrozyten-Vorläuferzellen (MEP), als Vorläuferzellen der myeloischen Reihe. Hier zeigte sich eine hohe *Brd4*-Expression der LT-HSC gegenüber den weiter differenzierten ST-HSC, GMP und MEP (siehe Grafik 3 C, Abschnitt 4.1).

Auffällig bleibt somit, dass, mit Ausnahme der Megakaryozyten, vor allem die wenig differenzierten Stammzellen und downstream nachgeschaltet bevorzugt Zellen des lymphatischen Systems eine hohe Expression der BET-Gene zeigten. In den folgenden Experimenten zeigte sich, dass es diese Zellpopulationen sind, die durch JQ1 beeinflusst werden. Auffällig ist, dass JQ1 Zelltyp-spezifische Effekte auslöst, da es zu einer Depletion der Lymphozyten aber einer Expansion der hämatopoetischen Stammzellen führt.

5.2 Wachstumsverzögerung und Depletion der Lymphozyten bei gleichzeitiger Mobilisation der hämatopoetischen Stammzellen durch JQ1-Behandlung

Die im Vergleich zur Kontrollgruppe geringfügigere Größe der entnommenen lymphatischen Organe deckte sich nicht nur mit der in Abschnitt 4.3 von uns demonstrierten Wachstumsverzögerung der behandelten Versuchstiere (siehe Grafik 13), sondern auch der vorhandenen Literatur (Lee et al., 2016).

Trotz der geringeren Organgröße konnten wir mehr als die doppelte Anzahl koloniebildender Einheiten im Milzgewebe der JQ1-Gruppe nachweisen (siehe Grafik 5, Abschnitt 4.2). Dies lässt eine erhöhte Anzahl hämatopoetischer Vorläuferzellen in den sekundär lymphatischen Organen durch Mobilisation von Stamm- und Vorläuferzellen ins periphere Blut und die Milz vermuten. Die Tatsache, dass Organe des lymphatischen Systems von den Nebenwirkungen JQ1s im Sinne einer Wachstumsverzögerung betroffen sind, könnte ein weiterer Hinweis auf die Zelltyp-spezifische Wirkweise JQ1s auf Lymphozyten sein.

In der Untersuchung des peripheren Bluts waren unsere Versuchstiere zwar leukopen, es zeigte sich jedoch kein Unterschied bei den der myeloischen Reihe zuzuordnenden Erythrozyten, und bemerkenswerterweise waren auch die Thrombozyten gegenüber der Kontrollgruppe nicht vermindert (Abschnitt 4.2, siehe Grafik 6). Dies steht im Kontrast zu klinischen Studien, in denen Thrombopenie als Nebenwirkung von BET-Inhibitoren beschrieben wird (Doroshov et al., 2017; Piha-Paul et al., 2019).

Dabei bleibt zu bedenken, dass JQ1 aufgrund seiner geringen Halbwertszeit im Plasma bisher nicht in klinischen Studien angewendet wurde. (Stand Juli 2022). Somit könnten die unterschiedlichen Effekte der BET-Inhibition auf Spezies-zu-Spezies-Variation oder aber auf strukturellen Unterschieden der genutzten Substanzen beruhen. Wir wählten Dosis und Verabreichungsweise in Übereinstimmung mit bereits publizierten Arbeiten aus (Garcia et al., 2016). Bei der Behandlung von Mäusen bietet sich die intraperitoneale Injektion als einfacher und wenig belastender Zugangsweg an, während man in klinischen Studien am Menschen eine andere Verabreichungsweise wählen würde.

Obschon die Leukozyten im peripheren Blut, nach Behandlung der Versuchstiere mit JQ1, signifikant gegenüber der mit DMSO behandelten Kontrollgruppe erniedrigt war (siehe Grafik 6 A), konnten wir 2,5-mal so viele koloniebildende Einheiten im Blut nachweisen (siehe Grafik 7, beide im Abschnitt 4.2). Dies könnte ebenfalls Ausdruck einer vermehrten Mobilisation von Vorläufer- und Stammzellen ins periphere Blut sein.

Die Durchflusszytometrie des Knochenmarks zeigte ähnlich der Untersuchung des peripheren Bluts eine verminderte Zellularität nach Behandlung mit JQ1. Dieser Befund deckt sich mit der veröffentlichten Literatur zu BET-Inhibitoren (Lee et al., 2016). Bei genauerer Untersuchung fiel auf, dass vor allem die B- und T-Lymphozyten depletiert waren, während die Gesamtzahl der myeloischen Zellen nicht in signifikant veränderter Anzahl vorlagen. Somit scheint JQ1 die Hämatopoese Zell-spezifisch zu verändern und vor allem die Zellen des lymphatischen Systems zu beeinflussen (siehe Grafik 8, Abschnitt 4.2).

Auf die Untersuchung der Megakaryozyten wurde bereits in Abschnitt 5.1 eingegangen.

5.2.1 Differenzierungs-Stopp der B-Lymphozyten durch JQ1-Behandlung

Um den im vorherigen Abschnitt der Diskussion (5.2) hervorgehobenen Zelltyp-abhängigen Effekt von JQ1 weiter zu charakterisieren, untersuchten wir ergänzend die Zellpopulationen, die Vorstufen der Lympho- und Myelopoese ausmachen.

Auffallend war, dass während die frühen Pro-B-Lymphozyten unverändert blieben, die weiter differenzierten Prä-B-Zellen und die unreifen B-Lymphozyten nach Behandlung der Versuchstiere mit JQ1 in deutlich verminderter Anzahl im Knochenmark vorlagen (siehe Grafik 10, Abschnitt 4.2.1). Ein durch JQ1 vermittelter Differenzierungs-Stopp in der Entwicklungsstufe der B-Lymphozyten zwischen Pro-B- und Prä-B-Zellen würde diese Ergebnisse erklären. Wobei anhand der Ergebnisse nicht auszuschließen ist, dass JQ1 spezifisch auf die Zellen der Lymphopoese mit Ausnahme der frühen Pro-B-Zellen wirkt.

Bei Betrachtung der doppelnegativen, frühen Thymozyten sowie der weiter differenzierten, doppelpositiven Thymozyten konnten wir, trotz der, wie in Abschnitt 4.2 demonstriert, erniedrigten Anzahl an T-Lymphozyten im Knochenmark nach Behandlung mit JQ1 (siehe Grafik 8 C), keine Differenz in Anzahl oder proportionalem Anteil ihrer Subpopulationen an der T-Zell-Reifung nachweisen (siehe Grafik 11, Abschnitt 4.2.1).

Passend zur unveränderten Gesamtzahl myeloischer Zellen im Knochenmark nach JQ1-Behandlung (siehe Grafik 8 D, Abschnitt 4.2) waren auch die myeloischen Vorläuferzellen MEP und GEP nicht signifikant reduziert (siehe Grafik 12, Abschnitt 4.2.1).

5.3 Erhöhte Anzahl und Proliferation hämatopoetischer Stammzellen nach BET-Inhibition mit JQ1

Um festzustellen, ob sich JQ1 unterschiedlich auf die juvenile im Vergleich zur adulten Hämatopoese auswirkt, untersuchten wir in diesem Experiment vier und acht Wochen alte Mäuse unter gleichen Versuchsbedingungen.

Über die von uns beobachtete Wachstumsverzögerung wurde bereits in Abschnitt 5.2 der Diskussion berichtet (siehe Grafik 13, Abschnitt 4.3).

Obschon wir in Abschnitt 4.2 sahen, dass JQ1 insgesamt zu einer verminderten Anzahl mononukleärer Zellen sowohl im peripheren Blut als auch im Knochenmark gegenüber der mit DMSO behandelten Kontrollgruppe führt (siehe Grafik 6 A und Grafik 8 A), konnten wir hier zeigen, dass hämatopoetische Stammzellen durch die selbe Behandlung im Knochenmark bis zu dreifach vermehrt vorlagen. Im Vergleich beider Altersgruppen untereinander ergab sich kein signifikanter Unterschied (siehe Abschnitt 4.3, Grafik 14).

In Abschnitt 4.1 der Ergebnisse zeigten wir bereits, dass vor allem die LT-HSC vermehrt *Brd4* exprimieren. Dazu passend zeigte sich die Anzahl der LT-HSC aber auch der ST-HSC und MPP im Knochenmark nach JQ1-Behandlung erhöht (siehe Grafik 15, Abschnitt 4.3.1), wohingegen bereits in Abschnitt 4.2.1 demonstriert wurde, dass die Anzahl der weiter differenzierten myeloischen Vorläuferzellen GMP und MEP durch JQ1 nicht signifikant verändert wurde (siehe Grafik 12).

Die vermehrten hämatopoetischen Stammzellen lassen sich womöglich auf eine durch JQ1 gesteigerte Proliferationsrate der LT-HSC zurückführen. Mittels BrdU-Assay konnten wir eine erhöhte Proliferationsrate der LT-HSC, jedoch weder der ST-HSC noch der Gesamtzahl lineage⁻ ska⁺ kit⁺ Stammzellen nachweisen (siehe Grafik 16, Abschnitt 4.3.1).

Insgesamt ergibt sich anhand dieser Daten der Eindruck, dass vor allem der Effekt JQ1s auf die LT-HSC für die im Rahmen weiterer Experimente beobachteten Effekte auf die hämatopoetische Rekonstitution und Repopulation nach Myelosuppression verantwortlich zu sein scheint.

5.4 Überlegene Repopulationskapazität hämatopoetischer Stammzellen nach Behandlung mit JQ1 und Stammzelltransplantation

Unser kompetitives Repopulations-Experiment erbrachte Daten, welche auf eine gesteigerte Anzahl und Fitness hämatopoetischer Stammzellen durch

Behandlung mit JQ1 hindeuten und eine überlegene Repopulationskapazität der Stammzellen nach Behandlung mit JQ1 demonstrieren.

Der Chimärismus zeigt uns, wie viele Blutzellen nach Transplantation vom Spenderknochenmark gebildet wurden. Zur Zuordnung der untersuchten Zellen nutzen wir die kongenen Marker CD45.1 und CD45.2.

In der Versuchsgruppe der Tiere, die Zellen von Mäusen erhielten, die mit JQ1 behandelt wurden, konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe einen Monat nach Transplantation ein signifikant höherer Anteil von Zellen festgestellt werden, die den kongenen Marker der Spendertiere CD45.1 trugen (siehe Grafik 17 A, Abschnitt 4.4). Dies zeigt eine überlegene Repopulationskapazität der Stammzellen nach Behandlung mit JQ1 und lässt indirekt auf einen höheren Anteil Stammzellen im Transplantat und/oder eine JQ1-vermittelt gesteigerte Stammzellfitness schließen. Das sich auch vier Monate nach Transplantation weiterhin ein höherer Spenderchimärismus in der JQ1-Gruppe nachweisen lässt (siehe Grafik 17 B), würde für eine gesteigerte Stammzellfitness sprechen.

Eine Berechnung der *Repopulating Units* (RU) wiederum ergab 2,5-mal mehr hämatopoetische Stammzellen in Transplantaten, die Zellen von Tieren enthielten, welche mit JQ1 behandelt wurden. Konkordant ließ eine Grenzverdünnungsanalyse (engl. *extreme limited dilution analysis*, ELDA) eine 3-fach höhere Frequenz an Stammzellen im Knochenmark der Versuchstiere nach Behandlung mit JQ1 vermuten (siehe Grafik 18).

5.5 Nicht-anhalten des Zelltyp-assoziierten Effekts JQ1s nach Stammzelltransplantation

Nach Transplantation des Knochenmarks mit JQ1 oder der Trägerlösung DMSO behandelte Mäuse, untersuchten wir im Blut der Empfängertiere Zellen der myeloischen und lymphatischen Reihe, um Aufschluss über ein mögliches *lineage priming* zu erhalten. Dies würde bedeuten, dass die sich im Transplantat befindlichen, mit JQ1 behandelten Stammzellen, eher zu myeloischen oder lymphatischen Zellen ausdifferenzieren.

Während wir in Abschnitt 4.2 anhand der deutlichen Supprimierung von B- und T-Lymphozyten im Knochenmark nach Behandlung mit JQ1 (siehe Grafik 8 B

und C) im Gegensatz zu der unveränderten Anzahl myeloischer Zellen (siehe Grafik 8 D) einen Zelltyp-abhängigen Effekt sahen, konnten wir keinen Unterschied in der Anzahl an myeloischen Zellen und B- bzw. T-Lymphozyten nach Transplantation von Knochenmark mit JQ1 behandelte Versuchstiere sehen (siehe Grafik 19, Abschnitt 4.5). Dies würde darauf schließen lassen, dass JQ1 zwar zur Expansion des Stammzellpools führt aber nicht ihre Differenzierung in spezifische Zellpopulationen fördert.

Möglicherweise hätte ein weiterer myelosuppressiver Stimulus nach Transplantation Unterschiede in der Erholung des Blutbilds gezeigt. Dies wäre im Rahmen weiterer Experimente zu untersuchen.

5.5.1 Sekundäre Transplantation mit JQ1 behandelte Zellen – langanhaltend erhöhte Stammzellfitness

Nach der sekundären Transplantation konnten wir anhand Chimärismusanalysen feststellen, dass der in Abschnitt 4.4 demonstrierte Effekt, der gesteigerten Repopulationskapazität hämatopoetischer Stammzellen durch JQ1, selbst nach erneuter Transplantation anhält.

Besonders auffällig war, dass der Spenderchimärismus der Kontrollgruppe, wie in der Literatur vorbeschrieben (Carnevali et al., 2014), nach 12 Monaten kaum noch zur Hämatopoese beitrug, während wir in der JQ1-Gruppe zwar ebenfalls einen kleineren Anteil als noch nach 3 und 6 Monaten sahen, die CD45.1⁺ Zellen der ursprünglich mit JQ1 behandelte Mäuse aber immer noch signifikant zur Hämatopoese beitrugen (siehe Grafik 20, Abschnitt 4.5.1). Der relative Beitrag der mit JQ1 behandelte CD45.1⁺ Zellen, im Vergleich zur Kontrollgruppe, wuchs sogar kontinuierlich vom 1,9-fachen nach einem Monat, auf das 3,4-fache nach 3, das 5,2-fache nach 6 und schließlich nach 12 Monaten auf das 11,8-fache. Dies lässt auf einen anhaltenden Langzeiteffekt und eine geringere Erschöpfung der Stammzellen nach Behandlung mit JQ1 schließen.

5.6 Schnellere hämatologische Rekonstitution nach JQ1-Behandlung und Myelosuppression durch Bestrahlung

Im letzten von uns durchgeführten Experiment untersuchten wir die hämatologische Rekonstitution nach bestrahlungsinduzierter Myelosuppression. Möglich wäre neben einer akzelerierten Erholung des Blutbilds ebenfalls eine

höhere Empfindlichkeit der mit JQ1 behandelten Tiere gegenüber Strahlung gewesen, da die in Abschnitt 4.3.1 bewiesene erhöhte Proliferationsrate der LT-HSC im Gegenzug eine gesteigerte Zellzyklusaktivität bedeutet, welche die Zellen sensibler auf Bestrahlung reagieren lassen sollte (siehe Grafik 16 B).

Die Tatsache, dass vor Bestrahlung, unmittelbar nach Behandlung mit JQ1, mehr Stammzellen und MPP im Knochenmark der JQ1-Gruppe vorlagen, bestätigt erneut den proliferativen Einfluss von JQ1 auf hämatopoetische Stammzellen (siehe Grafik 21, Abschnitt 4.6). Interessanterweise ließ sich 4 und 6 Wochen nach Bestrahlung kein Unterschied zwischen beiden Gruppen mehr feststellen. Das steht im Kontrast zu den Ergebnissen aus Abschnitt 4.5.1, wo sich Anhand der sekundären Transplantationen ein langanhaltender Effekt von JQ1 postulieren ließ. Möglicherweise könnte dies doch auf dem Effekt der Bestrahlung auf die schnell proliferierenden mit JQ1 behandelten LT-HSC beruhen. (Die das Transplantat erhaltenden Tiere in Abschnitt 4.4 und 4.5 wurden bestrahlt, die Spender Tiere, die mit JQ1 behandelt wurden, jedoch nicht.)

Diese These lässt sich dadurch stützen, dass das Knochenmark nach JQ1-Behandlung konstante koloniebildende Einheiten (KBE) hervorbrachte, was wiederum für eine gesteigerte Stammzellfitness spricht (siehe Grafik 23).

In der durchflusszytometrischen Analyse des peripheren Bluts der Versuchstiere zeigte sich erneut der Effekt JQ1s auf Zellen des lymphatischen Systems. Im Vergleich der verschiedenen Subpopulationen untereinander, waren sie am meisten von der bestrahlungsinduzierten Myelosuppression betroffen, während die myeloischen Zellen weitaus geringfügiger depletiert wurden (siehe Grafik 24). Interessanterweise kam es 6 Wochen nach Bestrahlung zu einer kompletten Rekonstitution der B- und T-Lymphozyten der Tiere, die zuvor mit JQ1 behandelt wurden, während die Tiere der mit der Trägerlösung DMSO behandelten Kontrollgruppe lediglich 50 % ihres Ausgangswertes erreichten (siehe Grafik 25 A und B). Gleiches galt für die Gesamtzahl der Leukozyten, welche nach 6 Wochen ebenfalls nahezu 100 % erreichten, während die Kontrollgruppe um die Hälfte reduziert blieb (siehe Grafik 26 A).

Dies erscheint insofern bedeutsam, als das sowohl die Gesamtzahl der Leukozyten im peripheren Blut und Knochenmark als auch die B- und T-

Lymphozyten in Abschnitt 4.2 nach Behandlung mit JQ1 signifikant vermindert gegenüber der Kontrollgruppe waren (siehe Grafik 6 A und 8 A, B und C). Wie JQ1 die Anzahl der weißen Blutkörperchen reduziert, aber gleichzeitig ihre Rekonstitution nach Myelosuppression fördert, bleibt letztendlich unklar. Selbstverständlich kann dies dem Einfluss JQ1s auf die hämatopoetischen Stammzellen geschuldet sein.

Die Erythrozyten der JQ1-Gruppe waren eine Woche nach Bestrahlung gegenüber der Kontrollgruppe sogar signifikant erniedrigt, obwohl sich in Abschnitt 4.2 kein Unterschied durch Behandlung mit JQ1 zeigte. Insgesamt reagierten beide Gruppen allerdings nur mit gering ausgeprägter Anämie und entwickelten zu keinem Zeitpunkt kritische Werte $<60\%$ von Tag 0, vor Bestrahlung (siehe Grafik 26 B, Abschnitt 4.6).

Die Thrombozyten hingegen zeigten einen den anderen untersuchten Zellgruppen ähnlichen Verlauf und regenerierten schneller, obwohl auch ihre Anzahl durch bloße Behandlung mit JQ1 in Abschnitt 4.2 unbeeinträchtigt blieb (siehe Grafik 6 C) und BET-Inhibitoren in klinischen Studien sogar mit Thrombopenien einhergingen (Doroshov et al., 2017; Piha-Paul et al., 2019). Der Unterschied zwischen DMSO- und JQ1-Gruppe war zwar signifikant, fiel jedoch im Vergleich mit den anderen im peripheren Blut untersuchten Zellen deutlich kleiner aus (siehe Grafik 26 C, Abschnitt 4.6).

Vollkommen unerwartet regenerierten die Monozyten der Kontrollgruppe nach 6 Wochen komplett, während die Monozyten der Tiere, die JQ1 erhielten, sogar auf nahezu 300% ihres Ausgangswertes anstiegen (siehe Grafik 27 A), obwohl die bisherigen Ergebnisse auf einen höchstens geringfügigen Effekt JQ1s auf Zellen der myeloischen Reihe hindeuteten.

Auch die Granulozyten stiegen 3 und 4 Wochen nach Bestrahlung deutlich im Vergleich zur Kontrollgruppe an. Im weiteren Verlauf fielen sie allerdings wieder ab und letztlich glichen sich beide Kurven an (siehe Grafik 27 B).

Fazit

In Zusammenschau der Ergebnisse werden die in den Kernaussagen zusammengefassten Punkte deutlich, dass JQ1 die Hämatopoese Zelltypspezifisch verändert und dabei die Zellen des lymphatischen Systems depletiert, wobei es nahezu keinen Einfluss auf Zellen der myeloischen Zellreihe hat. Weiterhin führt es zu einer Expansion, Mobilisation und gesteigerten Fitness hämatopoetischer Stammzellen.

Anhand der von uns erhobenen Daten lässt sich nur schwer unterscheiden, ob die Effekte JQ1s auf die hämatopoetischen Stammzellen einer höheren Quantität oder Qualität geschuldet sind. So deutet die hohe Anzahl koloniebildender Einheiten nach Behandlung mit JQ1 auf eine hohe Anzahl an Vorläufer- und Stammzellen im jeweiligen Substrat hin (siehe Grafik 5 und 7, Abschnitt 4.2, sowie Grafik 22, Abschnitt 4.6). Das regenerative Potential dieser Zellen, welches sich nach serieller Übertragung in weitere Nährmedien zeigte, spricht jedoch für eine gesteigerte Stammzell-Fitness (siehe Grafik 23, Abschnitt 4.6).

Die Berechnung der *Repopulating Units* in Abschnitt 4.4 weist ebenso wie die Grenzverdünnungsanalyse (engl. extreme limiting dilution analysis, ELDA, siehe Grafik 18) auf einen hohen Stammzellanteil in den Transplantaten hin. Dass der relative Anteil mit JQ1 behandelte Zellen an der Hämatopoese über die Zeit im Vergleich zur Kontrollgruppe in Abschnitt 4.4 ebenso wie in 4.5.1 nur geringfügig abfiel (siehe Grafik 17 und 20), würde wiederum für eine bessere Funktionalität oder Fitness der Zellen im Vergleich zu ihren mit DMSO behandelten Gegenstücken sprechen. Abschließend ließe sich diese Frage nur durch weitere Experimente klären.

Weiterhin bleibt der zugrunde liegende Mechanismus, der den Effekt von JQ1 auf die genannten Zellgruppen vermittelt, unklar. MYB ist ein Transkriptionsfaktor und Protoonkogen, welches die Teilung und Differenzierung von Blutzellen steuert. Einige Forschungsergebnisse deuten darauf hin, dass der Einfluss MYBs auf die Hämatopoese auf einer Rekrutierung von BRD4 beruht (Roe et al., 2015). Zudem hat eine durch die Punktmutation M303V gestörte Interaktion zwischen MYB und seinem Coaktivator p300 weitreichende Effekte auf die Hämatopoese (Sandberg et al., 2005). Ähnlich den von uns beschriebenen Auswirkungen JQ1s

auf die Hämatopoese zeigte sich eine gesteigerte Megakaryopoese, eine durch Blockierung der B- und T-Zelldifferenzierung ausgelöste Lymphopoese, sowie ein 10-facher Anstieg hämatopoetischer Stammzellen. Die gravierende Ähnlichkeit dieser Effekte zu unseren Ergebnissen lässt vermuten, dass die von uns beobachteten Veränderungen der physiologischen Hämatopoese durch JQ1 MYB-vermittelt sind.

Andere Forschungsarbeiten zeigten, dass ein Knockdown von *Brd4* in Vorläufer- und Stammzellen die kurzfristige Rekonstitution der Hämatopoese nach Stammzelltransplantation und letaler Bestrahlung negativ beeinflusst (Bolden et al., 2014). Die offensichtliche Diskrepanz zwischen diesen und unseren Ergebnissen könnte darauf beruhen, dass hier ein selektiver Knockdown von *Brd4* durchgeführt wurde, während JQ1 alle Bromodomänenproteine der BET-Familie hemmt. Da JQ1 ein potenter Inhibitor der gesamten BET-Familie ist, sind weitere Experimente notwendig, um den individuellen Beitrag der Inhibition einzelner Gene zu den von uns beschriebenen Effekten auf die Hämatopoese festzustellen. Weiterhin könnte der von Bolden et al. beobachtete Effekt durch die Extra-Terminale Domäne von BRD4 mitverursacht sein, deren Funktion von JQ1 nicht beeinflusst wird (Rahman et al., 2011).

Maligne Erkrankungen, vor allem des hämatopoetischen Systems, gehen häufig mit einer Myelosuppression einher. Durch die Infiltration des Knochenmarks durch entartete Zellen wird die physiologische Hämatopoese verdrängt. Symptome wie Fatigue (durch Anämie) oder Blutungskomplikationen (durch Thrombopenie) sind direkte Folgen der Depletion Zellen des blutbildenden Systems. Eine gefürchtete Komplikation krankheitsassoziierter Leukopenie sind opportunistische Infektionen, welche aufgrund der geschwächten Immunabwehr der Patienten fatale Auswirkungen haben können.

Auch die mit Bestrahlung und Chemotherapie einhergehende Immunsuppression ist häufig ein therapielimitierender Faktor. Zugunsten der Regeneration des hämatopoetischen Systems verlängerte Behandlungspausen lassen ein mögliches Voranschreiten der Erkrankung zu, und besonders zytotoxische Substanzen erreichen nie ihr theoretisches maximales Therapie-Potential (Deininger et al., 2003).

Behandlungsassoziierte Mortalität ist neben Therapieresistenz einer der Hauptgründe für Therapieversagen in der modernen Krebstherapie. Dabei ist häufig die Molekular- und Zytogenetik der entscheidende resistenzvermittelnde Faktor. So profitieren an AML erkrankte Patienten mit einem komplexen Karyotyp langwierig kaum von der konservativen Standardtherapie ohne allogene Stammzelltransplantation (Estey, 2009).

Um therapielimitierende Nebenwirkungen zu reduzieren, bedient man sich im klinischen Alltag neben dem Einsatz von Transfusion von Blutbestandteilen wie Erythrozyten- oder Thrombozytenkonzentraten, der Induktion von Knochenmarksvorläuferzellen durch G-CSF (Quintas-Cardama et al., 2004) oder Erythropoetin (Bokemeyer et al., 2007), um die physiologische Blutbildung zu unterstützen. Da JQ1 eine gesteigerte Anzahl und Fitness hämatopoetischer Stammzellen vermittelt, wäre hier ein ergänzender klinischer Einsatz der Substanz denkbar. In Abschnitt 4.6 konnten wir zeigen, dass das Blutbild mit JQ1 behandelte Versuchstiere sich signifikant schneller von bestrahlungsinduzierter Myelosuppression erholt.

Die Stammzelltransplantation, ob autolog oder allogene, stellt eine wichtige Therapieoption hämatologischer Erkrankungen dar (Hamadani et al., 2010). Trotz zahlreicher Fortschritte in der Erforschung sowohl der Methode als auch der zugrunde liegenden Erkrankungen bleibt die Therapie mit einer hohen Morbidität und Mortalität verbunden. Wichtig für ein positives Outcome ist das erfolgreiche Engraftment der Stammzellen, welches durch die Einflussfaktoren Quantität und Qualität der Zellen im Transplantat bestimmt wird (Ogonek et al., 2016).

Ca. 2-5 % potentieller Stammzellspender können jedoch trotz Stimulation mit G-CSF keine adäquate Menge CD34⁺ hämatopoetische Stammzellen ins periphere Blut mobilisieren (Ings et al., 2006). Das unterschiedliche Ansprechen auf die Stimulation mit G-CSF (Holig, 2013) stellt eine Herausforderung im Alltag hämatologisch tätiger Ärzte dar. Wir konnten zeigen, dass JQ1 nicht nur zu einer Proliferation hämatopoetischer Stammzellen, sondern auch zu ihrer Mobilisation ins periphere Blut führt. Somit wäre ein möglicher Einsatz im klinischen Alltag für JQ1 als Mittel zur Stammzellmobilisation und Stimulation denkbar.

Dabei bleibt zu bedenken, dass JQ1 zelltypspezifisch wirkt und einige reife hämatopoetische Zellen supprimiert. So könnte eine Lymphopenie durch B- und

T-Zelldepletion den positiven Effekt auf die hämatopoetischen Stammzellen während der Rekonstitution des Blutbilds kompromittieren. Sollte der Effekt langanhaltend sein, wäre z. B. eine höhere Infektionsrate die Folge. Andererseits konnten wir in Abschnitt 4.5 zeigen, dass es nach Transplantation zu keinem *lineage priming* kommt und somit die Stammzellen im Transplantat nicht bevorzugt in myeloische oder lymphatische Zellen ausdifferenzieren, was gegen eine langanhaltende Lymphopenie sprechen würde.

Letztlich bleibt bis zu einem klinischen Einsatz von JQ1 weitere Forschung dringend vonnöten, wobei der Einsatz zur Stammzellmobilisation und Stimulation, sei es als Alternative oder Ergänzung zu G-CSF, durchaus denkbar wäre.

Zusammenfassung

Die niedermolekulare Verbindung (engl. *small molecule*) JQ1 hemmt kompetitiv die Bromodomänen der zur *bromodomain and extra-terminal domain* (BET) Familie gehörenden Proteine BRD2, BRD3 und BRD4, welche als epigenetische Lesedomänen auf die Transkription einwirken (Filippakopoulos et al., 2010). Erste Präparate mit ähnlicher Wirkweise werden bereits in klinischen Studien eingesetzt (Berthon et al., 2016; Mascarenhas et al., 2021; Riveiro et al., 2016). Umfangreiche Untersuchungen der Auswirkung einer BET-Inhibition mittels JQ1 auf die physiologische Blutbildung waren bisher noch ausstehend.

Wir konnten zeigen, dass JQ1 einen zelltypspezifischen Effekt auf die physiologische Hämatopoese hat. In Analysen des peripheren Bluts, Knochenmarks und anderer lymphatischer Organe mit JQ1 behandelte Versuchstiere konnten wir demonstrieren, dass JQ1 zu einer Depletion der B- und T-Lymphozyten führt, während es die Megakaryopoese stimuliert. Ursächlich hierfür scheint anteilig ein Differenzierungsblock der B-Lymphozyten zu sein.

Weiterhin konnten wir nicht nur im Rahmen der oben beschriebenen Experimente einen erhöhten Anteil hämatopoetischer Stammzellen im Knochenmark mit JQ1 behandelte Mäuse feststellen, sondern auch ihre im Vergleich zur Kontrollgruppe gesteigerte Proliferationsrate belegen. Koloniezählungen aus peripherem Blut und Milzgewebe deuten zudem darauf hin, dass es zu einer vermehrten Ausschwemmung hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen ins Blut kommt.

Durch kompetitive Repopulations-Experimente ließ sich zudem eine erhöhte Selbsterneuerung- oder Repopulationskapazität von Stammzellen mit JQ1 behandelte Versuchstiere demonstrieren. Nach Myelosuppression durch Bestrahlung konnten wir zudem eine akzelerierte hämatologische Rekonstitution beobachten.

Weitere Experimente wären notwendig um die von uns beschriebenen Effekte eingehender zu untersuchen. In Zusammenschau der Ergebnisse wäre ein klinischer Einsatz JQ1s zu Stammzellmobilisation und Stimulation denkbar, um die oft lebensbedrohliche Phase der Myelosuppression zu verkürzen oder die Stammzellsammlung vor autologer oder allogener Stammzelltransplantation zu erleichtern.

Summary

The small molecule JQ1 is a competitive inhibitor of the bromodomain and extra terminal domain (BET) family, containing the proteins BRD2, BRD3 and BRD4, which act as epigenetic readers affecting transcription (Filippakopoulos et al., 2010). Clinical studies using similar substances also acting as BET-inhibitors are already being conducted (Berthon et al., 2016; Mascarenhas et al., 2021; Riveiro et al., 2016).

However, until now extensive investigations into the effects of BET-inhibition using JQ1 on physiological haematopoiesis were still outstanding.

We were able to show that JQ1 has a cell type-specific effect on physiological haematopoiesis. Analysing peripheral blood, bone marrow and other lymphatic organs of animals treated with JQ1, we were able to demonstrate that JQ1 leads to a depletion of B- and T-lymphocytes, while stimulating megakaryopoiesis. This seems to be partly due to a differentiation block of B-lymphocytes.

Furthermore, we were not only able to determine an increase of haematopoietic stem cells in the bone marrow of mice treated with JQ1 in context of the experiments described above, but also prove their increased proliferation rate in comparison to the control group. Colony formation assays using peripheral blood and spleen tissue additionally indicate increased mobilisation of hematopoietic stem and progenitor cells into the blood.

Moreover, competitive repopulation experiments also showed an increased self-renewal or repopulation capacity of stem cells in animals treated with JQ1. In addition, we were able to observe accelerated haematological reconstitution after myelosuppression by sublethal radiation.

Further experiments would be necessary to examine the effects we have described in more detail. However, considering our results, clinical use of JQ1 for stem cell mobilization and stimulation would be conceivable in order to shorten the often life-threatening phase of myelosuppression or to facilitate stem cell collection prior to autologous or allogeneic stem cell transplantation.

Literaturverzeichnis

- Artandi, S. E., & DePinho, R. A. (2010, Jan). Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis*, 31(1), 9-18. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp268>
- Baccarani, M., Deininger, M. W., Rosti, G., Hochhaus, A., Soverini, S., Apperley, J. F., Cervantes, F., Clark, R. E., Cortes, J. E., Guilhot, F., Hjorth-Hansen, H., Hughes, T. P., Kantarjian, H. M., Kim, D. W., Larson, R. A., Lipton, J. H., Mahon, F. X., Martinelli, G., Mayer, J., Muller, M. C., Niederwieser, D., Pane, F., Radich, J. P., Rousselot, P., Saglio, G., Saussele, S., Schiffer, C., Silver, R., Simonsson, B., Steegmann, J. L., Goldman, J. M., & Hehlmann, R. (2013, Aug 8). European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood*, 122(6), 872-884. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-05-501569>
- Berthon, C., Raffoux, E., Thomas, X., Vey, N., Gomez-Roca, C., Yee, K., Taussig, D. C., Rezai, K., Roumier, C., Herait, P., Kahatt, C., Quesnel, B., Michallet, M., Recher, C., Lokiec, F., Preudhomme, C., & Dombret, H. (2016, Apr). Bromodomain inhibitor OTX015 in patients with acute leukaemia: a dose-escalation, phase 1 study. *Lancet Haematol*, 3(4), e186-195. [https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(15\)00247-1](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(15)00247-1)
- Bhowmick, N. A., Neilson, E. G., & Moses, H. L. (2004, Nov 18). Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature*, 432(7015), 332-337. <https://doi.org/10.1038/nature03096>
- Bianchi, E., Bulgarelli, J., Ruberti, S., Rontauroli, S., Sacchi, G., Norfo, R., Pennucci, V., Zini, R., Salati, S., Prudente, Z., Ferrari, S., & Manfredini, R. (2015, Dec). MYB controls erythroid versus megakaryocyte lineage fate decision through the miR-486-3p-mediated downregulation of MAF. *Cell Death Differ*, 22(12), 1906-1921. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.30>
- Bokemeyer, C., Apro, M. S., Courdi, A., Foubert, J., Link, H., Osterborg, A., Repetto, L., Soubeyran, P., European Organisation for, R., & Treatment of Cancer Taskforce for the, E. (2007, Jan). EORTC guidelines for the use of erythropoietic proteins in anaemic patients with cancer: 2006 update. *Eur J Cancer*, 43(2), 258-270. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2006.10.014>
- Bolden, J. E., Tasdemir, N., Dow, L. E., van Es, J. H., Wilkinson, J. E., Zhao, Z., Clevers, H., & Lowe, S. W. (2014, Sep 25). Inducible in vivo silencing of Brd4 identifies potential toxicities of sustained BET protein inhibition. *Cell Rep*, 8(6), 1919-1929. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.08.025>
- Burkhardt, D. L., & Sage, J. (2008, Sep). Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat Rev Cancer*, 8(9), 671-682. <https://doi.org/10.1038/nrc2399>
- Carnevali, L. S., Scognamiglio, R., Cabezas-Wallscheid, N., Rahmig, S., Laurenti, E., Masuda, K., Jockel, L., Kuck, A., Sujer, S., Polykratis, A., Erlacher, M., Pasparakis, M., Essers, M. A., & Trumpp, A. (2014, May 5).

- Improved HSC reconstitution and protection from inflammatory stress and chemotherapy in mice lacking granzyme B. *J Exp Med*, 211(5), 769-779. <https://doi.org/10.1084/jem.20131072>
- Chan, E. F., Gat, U., McNiff, J. M., & Fuchs, E. (1999, Apr). A common human skin tumour is caused by activating mutations in beta-catenin. *Nat Genet*, 21(4), 410-413. <https://doi.org/10.1038/7747>
- Da Costa, D., Agathangelou, A., Perry, T., Weston, V., Petermann, E., Zlatanou, A., Oldreive, C., Wei, W., Stewart, G., Longman, J., Smith, E., Kearns, P., Knapp, S., & Stankovic, T. (2013, Jul 19). BET inhibition as a single or combined therapeutic approach in primary paediatric B-precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Blood Cancer J*, 3, e126. <https://doi.org/10.1038/bcj.2013.24>
- de The, H., & Chen, Z. (2010, Nov). Acute promyelocytic leukaemia: novel insights into the mechanisms of cure. *Nat Rev Cancer*, 10(11), 775-783. <https://doi.org/10.1038/nrc2943>
- Deininger, M. W., O'Brien, S. G., Ford, J. M., & Druker, B. J. (2003, Apr 15). Practical management of patients with chronic myeloid leukemia receiving imatinib. *J Clin Oncol*, 21(8), 1637-1647. <https://doi.org/10.1200/JCO.2003.11.143>
- Delmore, J. E., Issa, G. C., Lemieux, M. E., Rahl, P. B., Shi, J., Jacobs, H. M., Kastritis, E., Gilpatrick, T., Paranal, R. M., Qi, J., Chesi, M., Schinzel, A. C., McKeown, M. R., Heffernan, T. P., Vakoc, C. R., Bergsagel, P. L., Ghobrial, I. M., Richardson, P. G., Young, R. A., Hahn, W. C., Anderson, K. C., Kung, A. L., Bradner, J. E., & Mitsiades, C. S. (2011, Sep 16). BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc. *Cell*, 146(6), 904-917. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.017>
- Doroshov, D. B., Eder, J. P., & LoRusso, P. M. (2017, Aug 1). BET inhibitors: a novel epigenetic approach. *Ann Oncol*, 28(8), 1776-1787. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx157>
- Druker, B. J. (2009, Oct). Perspectives on the development of imatinib and the future of cancer research. *Nat Med*, 15(10), 1149-1152. <https://doi.org/10.1038/nm1009-1149>
- Ellisen, L. W., Bird, J., West, D. C., Soreng, A. L., Reynolds, T. C., Smith, S. D., & Sklar, J. (1991, Aug 23). TAN-1, the human homolog of the Drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell*, 66(4), 649-661. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90111-b](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90111-b)
- Estey, E. H. (2009, Jan). Treatment of acute myeloid leukemia. *Haematologica*, 94(1), 10-16. <https://doi.org/10.3324/haematol.2008.001263>
- Fenaux, P., Mufti, G. J., Hellstrom-Lindberg, E., Santini, V., Finelli, C., Giagounidis, A., Schoch, R., Gattermann, N., Sanz, G., List, A., Gore, S.

D., Seymour, J. F., Bennett, J. M., Byrd, J., Backstrom, J., Zimmerman, L., McKenzie, D., Beach, C., Silverman, L. R., & International Vidaza High-Risk, M. D. S. S. G. (2009, Mar). Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *Lancet Oncol*, 10(3), 223-232. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70003-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70003-8)

Figuroa, M. E., Abdel-Wahab, O., Lu, C., Ward, P. S., Patel, J., Shih, A., Li, Y., Bhagwat, N., Vasanthakumar, A., Fernandez, H. F., Tallman, M. S., Sun, Z., Wolniak, K., Peeters, J. K., Liu, W., Choe, S. E., Fantin, V. R., Paietta, E., Lowenberg, B., Licht, J. D., Godley, L. A., Delwel, R., Valk, P. J., Thompson, C. B., Levine, R. L., & Melnick, A. (2010, Dec 14). Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell*, 18(6), 553-567. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.11.015>

Filippakopoulos, P., Qi, J., Picaud, S., Shen, Y., Smith, W. B., Fedorov, O., Morse, E. M., Keates, T., Hickman, T. T., Felletar, I., Philpott, M., Munro, S., McKeown, M. R., Wang, Y., Christie, A. L., West, N., Cameron, M. J., Schwartz, B., Heightman, T. D., La Thangue, N., French, C. A., Wiest, O., Kung, A. L., Knapp, S., & Bradner, J. E. (2010, Dec 23). Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature*, 468(7327), 1067-1073. <https://doi.org/10.1038/nature09504>

French, C. A., Miyoshi, I., Kubonishi, I., Grier, H. E., Perez-Atayde, A. R., & Fletcher, J. A. (2003, Jan 15). BRD4-NUT fusion oncogene: a novel mechanism in aggressive carcinoma. *Cancer Res*, 63(2), 304-307. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12543779>

Gailani, M. R., & Bale, A. E. (1999). Acquired and inherited basal cell carcinomas and the patched gene. *Adv Dermatol*, 14, 261-283; discussion 284. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10643501>

Garcia, P. L., Miller, A. L., Kreitzburg, K. M., Council, L. N., Gamblin, T. L., Christein, J. D., Heslin, M. J., Arnoletti, J. P., Richardson, J. H., Chen, D., Hanna, C. A., Cramer, S. L., Yang, E. S., Qi, J., Bradner, J. E., & Yoon, K. J. (2016, Feb 18). The BET bromodomain inhibitor JQ1 suppresses growth of pancreatic ductal adenocarcinoma in patient-derived xenograft models. *Oncogene*, 35(7), 833-845. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.126>

Ghebranious, N., & Donehower, L. A. (1998, Dec 24). Mouse models in tumor suppression. *Oncogene*, 17(25), 3385-3400. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202573>

Grivennikov, S. I., Greten, F. R., & Karin, M. (2010, Mar 19). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, 140(6), 883-899. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.025>

Hamadani, M., Craig, M., Awan, F. T., & Devine, S. M. (2010, Aug). How we approach patient evaluation for hematopoietic stem cell transplantation.

Bone Marrow Transplant, 45(8), 1259-1268.
<https://doi.org/10.1038/bmt.2010.94>

Hanahan, D., & Folkman, J. (1996, Aug 9). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 86(3), 353-364.
[https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80108-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80108-7)

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000, Jan 7). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57-70. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9)

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011, Mar 4). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

Harrison, D. E. (2021). *Repopulating Units*. Retrieved 28.08.2021 from <https://www.jax.org/research-and-faculty/research-labs/the-harrison-lab/hematology/measuring-stem-cell-function-in-vivo/repopulating-units>

Herrmann, H., Blatt, K., Shi, J., Gleixner, K. V., Cerny-Reiterer, S., Mullauer, L., Vakoc, C. R., Sperr, W. R., Horny, H. P., Bradner, J. E., Zuber, J., & Valent, P. (2012, Dec). Small-molecule inhibition of BRD4 as a new potent approach to eliminate leukemic stem- and progenitor cells in acute myeloid leukemia AML. *Oncotarget*, 3(12), 1588-1599.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.733>

Hochhaus, A., Masszi, T., Giles, F. J., Radich, J. P., Ross, D. M., Gomez Casares, M. T., Hellmann, A., Stentoft, J., Conneally, E., Garcia-Gutierrez, V., Gattermann, N., Wiktor-Jedrzejczak, W., le Coutre, P. D., Martino, B., Saussele, S., Menssen, H. D., Deng, W., Kronic, N., Bedoucha, V., & Saglio, G. (2017, Jul). Treatment-free remission following frontline nilotinib in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase: results from the ENESTfreedom study. *Leukemia*, 31(7), 1525-1531.
<https://doi.org/10.1038/leu.2017.63>

Holien, T., Vatsveen, T. K., Hella, H., Waage, A., & Sundan, A. (2012, Sep 20). Addiction to c-MYC in multiple myeloma. *Blood*, 120(12), 2450-2453.
<https://doi.org/10.1182/blood-2011-08-371567>

Holig, K. (2013, Aug). G-CSF in Healthy Allogeneic Stem Cell Donors. *Transfus Med Hemother*, 40(4), 225-235. <https://doi.org/10.1159/000354196>

Horne, G. A., Stewart, H. J., Dickson, J., Knapp, S., Ramsahoye, B., & Chevassut, T. (2015, Apr 1). Nanog requires BRD4 to maintain murine embryonic stem cell pluripotency and is suppressed by bromodomain inhibitor JQ1 together with Lefty1. *Stem Cells Dev*, 24(7), 879-891.
<https://doi.org/10.1089/scd.2014.0302>

Ings, S. J., Balsa, C., Leverett, D., Mackinnon, S., Linch, D. C., & Watts, M. J. (2006, Sep). Peripheral blood stem cell yield in 400 normal donors mobilised with granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF): impact of

- age, sex, donor weight and type of G-CSF used. *Br J Haematol*, 134(5), 517-525. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2006.06223.x>
- Jiang, B. H., & Liu, L. Z. (2009). PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. *Adv Cancer Res*, 102, 19-65. [https://doi.org/10.1016/S0065-230X\(09\)02002-8](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(09)02002-8)
- Jones, P. A., Issa, J. P., & Baylin, S. (2016, Sep 15). Targeting the cancer epigenome for therapy. *Nat Rev Genet*, 17(10), 630-641. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.93>
- Jones, R. G., & Thompson, C. B. (2009, Mar 1). Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes Dev*, 23(5), 537-548. <https://doi.org/10.1101/gad.1756509>
- Joyce, J. A., & Pollard, J. W. (2009, Apr). Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer*, 9(4), 239-252. <https://doi.org/10.1038/nrc2618>
- Kim, R., Emi, M., & Tanabe, K. (2007, May). Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*, 121(1), 1-14. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02587.x>
- Kleppe, M., Koche, R., Zou, L., van Galen, P., Hill, C. E., Dong, L., De Groote, S., Papalexis, E., Hanasoge Somasundara, A. V., Corder, K., Keller, M., Farnoud, N., Medina, J., McGovern, E., Reyes, J., Roberts, J., Witkin, M., Rapaport, F., Teruya-Feldstein, J., Qi, J., Rampal, R., Bernstein, B. E., Bradner, J. E., & Levine, R. L. (2018, Apr 9). Dual Targeting of Oncogenic Activation and Inflammatory Signaling Increases Therapeutic Efficacy in Myeloproliferative Neoplasms. *Cancer Cell*, 33(4), 785-787. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.03.024>
- Klymkowsky, M. W., & Savagner, P. (2009, May). Epithelial-mesenchymal transition: a cancer researcher's conceptual friend and foe. *Am J Pathol*, 174(5), 1588-1593. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080545>
- Lee, D. U., Katavolos, P., Palanisamy, G., Katewa, A., Sioson, C., Corpuz, J., Pang, J., DeMent, K., Choo, E., Ghilardi, N., Diaz, D., & Danilenko, D. M. (2016, Jun 1). Nonselective inhibition of the epigenetic transcriptional regulator BET induces marked lymphoid and hematopoietic toxicity in mice. *Toxicol Appl Pharmacol*, 300, 47-54. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2016.03.013>
- Lemmon, M. A., & Schlessinger, J. (2010, Jun 25). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, 141(7), 1117-1134. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.011>
- Levine, B., & Kroemer, G. (2008, Jan 11). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, 132(1), 27-42. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.12.018>

- Lipinski, M. M., & Jacks, T. (1999, Dec 20). The retinoblastoma gene family in differentiation and development. *Oncogene*, 18(55), 7873-7882. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203244>
- Liu, L., Papa, E. F., Dooner, M. S., Machan, J. T., Johnson, K. W., Goldberg, L. R., Quesenberry, P. J., & Colvin, G. A. (2012). Homing and long-term engraftment of long- and short-term renewal hematopoietic stem cells. *PLoS One*, 7(2), e31300. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031300>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001, Dec). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lockwood, W. W., Zejnullahu, K., Bradner, J. E., & Varmus, H. (2012, Nov 20). Sensitivity of human lung adenocarcinoma cell lines to targeted inhibition of BET epigenetic signaling proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(47), 19408-19413. <https://doi.org/10.1073/pnas.1216363109>
- Lowe, S. W., Cepero, E., & Evan, G. (2004, Nov 18). Intrinsic tumour suppression. *Nature*, 432(7015), 307-315. <https://doi.org/10.1038/nature03098>
- Mahon, F. X., Rea, D., Guilhot, J., Guilhot, F., Huguet, F., Nicolini, F., Legros, L., Charbonnier, A., Guerci, A., Varet, B., Etienne, G., Reiffers, J., Rousselot, P., & Intergroupe Francais des Leucemies Myeloides, C. (2010, Nov). Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. *Lancet Oncol*, 11(11), 1029-1035. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(10\)70233-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(10)70233-3)
- Maloney, D. G., Grillo-Lopez, A. J., White, C. A., Bodkin, D., Schilder, R. J., Neidhart, J. A., Janakiraman, N., Foon, K. A., Liles, T. M., Dallaire, B. K., Wey, K., Royston, I., Davis, T., & Levy, R. (1997, Sep 15). IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*, 90(6), 2188-2195. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9310469>
- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., & Balkwill, F. (2008, Jul 24). Cancer-related inflammation. *Nature*, 454(7203), 436-444. <https://doi.org/10.1038/nature07205>
- Mascarenhas, J., Gerds, A., & Verstovsek, S. (2021, Dec). Paradigm shift: combination BET and JAK inhibition in myelofibrosis. *Leukemia*, 35(12), 3361-3363. <https://doi.org/10.1038/s41375-021-01405-z>
- McDonald, D. M., & Baluk, P. (2002, Sep 15). Significance of blood vessel leakiness in cancer. *Cancer Res*, 62(18), 5381-5385. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12235011>

- Morrison, S. J., & Kimble, J. (2006, Jun 29). Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature*, *441*(7097), 1068-1074. <https://doi.org/10.1038/nature04956>
- Murphy, K., & Weaver, C. (2018). *Janeway Immunologie* (9 ed.). Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg.
- Myers, R. A., Wirth, S., Williams, S., & Kiel, P. J. (2018, May-Jun). Enasidenib: An Oral IDH2 Inhibitor for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia. *J Adv Pract Oncol*, *9*(4), 435-440. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30719396>
- Negrini, S., Gorgoulis, V. G., & Halazonetis, T. D. (2010, Mar). Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *11*(3), 220-228. <https://doi.org/10.1038/nrm2858>
- Nguyen, L. V., Vanner, R., Dirks, P., & Eaves, C. J. (2012, Jan 12). Cancer stem cells: an evolving concept. *Nat Rev Cancer*, *12*(2), 133-143. <https://doi.org/10.1038/nrc3184>
- Nowell, P. C. (2007, Aug). Discovery of the Philadelphia chromosome: a personal perspective. *J Clin Invest*, *117*(8), 2033-2035. <https://doi.org/10.1172/JCI31771>
- Ogonek, J., Kralj Juric, M., Ghimire, S., Varanasi, P. R., Holler, E., Greinix, H., & Weissinger, E. (2016). Immune Reconstitution after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front Immunol*, *7*, 507. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00507>
- Onder, T. T., Gupta, P. B., Mani, S. A., Yang, J., Lander, E. S., & Weinberg, R. A. (2008, May 15). Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer Res*, *68*(10), 3645-3654. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2938>
- Ott, G., Rosenwald, A., & Campo, E. (2013, Dec 5). Understanding MYC-driven aggressive B-cell lymphomas: pathogenesis and classification. *Blood*, *122*(24), 3884-3891. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-05-498329>
- Pellegata, N. S., Antoniono, R. J., Redpath, J. L., & Stanbridge, E. J. (1996, Dec 24). DNA damage and p53-mediated cell cycle arrest: a reevaluation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *93*(26), 15209-15214. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.26.15209>
- Piha-Paul, S. A., Sachdev, J. C., Barve, M., LoRusso, P., Szmulewitz, R., Patel, S. P., Lara, P. N., Jr., Chen, X., Hu, B., Freise, K. J., Modi, D., Sood, A., Hutti, J. E., Wolff, J., & O'Neil, B. H. (2019, Nov 1). First-in-Human Study of Mivebresib (ABBV-075), an Oral Pan-Inhibitor of Bromodomain and Extra Terminal Proteins, in Patients with Relapsed/Refractory Solid Tumors. *Clin Cancer Res*, *25*(21), 6309-6319. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-0578>

- Platzbecker, U., Avvisati, G., Cicconi, L., Thiede, C., Paoloni, F., Vignetti, M., Ferrara, F., Divona, M., Albano, F., Efficace, F., Fazi, P., Sborgia, M., Di Bona, E., Breccia, M., Borlenghi, E., Cairoli, R., Rambaldi, A., Melillo, L., La Nasa, G., Fiedler, W., Brossart, P., Hertenstein, B., Salih, H. R., Wattad, M., Lubbert, M., Brandts, C. H., Hanel, M., Rollig, C., Schmitz, N., Link, H., Frairia, C., Pogliani, E. M., Fozza, C., D'Arco, A. M., Di Renzo, N., Cortelezzi, A., Fabbiano, F., Dohner, K., Ganser, A., Dohner, H., Amadori, S., Mandelli, F., Ehninger, G., Schlenk, R. F., & Lo-Coco, F. (2017, Feb 20). Improved Outcomes With Retinoic Acid and Arsenic Trioxide Compared With Retinoic Acid and Chemotherapy in Non-High-Risk Acute Promyelocytic Leukemia: Final Results of the Randomized Italian-German APL0406 Trial. *J Clin Oncol*, 35(6), 605-612. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.67.1982>
- Polakis, P. (2012, May 1). Wnt signaling in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4(5). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008052>
- Quintas-Cardama, A., Kantarjian, H., O'Brien, S., Garcia-Manero, G., Rios, M. B., Talpaz, M., & Cortes, J. (2004, Jun 15). Granulocyte-colony-stimulating factor (filgrastim) may overcome imatinib-induced neutropenia in patients with chronic-phase chronic myelogenous leukemia. *Cancer*, 100(12), 2592-2597. <https://doi.org/10.1002/cncr.20285>
- Rahman, S., Sowa, M. E., Ottinger, M., Smith, J. A., Shi, Y., Harper, J. W., & Howley, P. M. (2011, Jul). The Brd4 extraterminal domain confers transcription activation independent of pTEFb by recruiting multiple proteins, including NSD3. *Mol Cell Biol*, 31(13), 2641-2652. <https://doi.org/10.1128/MCB.01341-10>
- Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., & Weissman, I. L. (2001, Nov 1). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414(6859), 105-111. <https://doi.org/10.1038/35102167>
- Riveiro, M. E., Astorgues-Xerri, L., Vazquez, R., Frapolli, R., Kwee, I., Rinaldi, A., Odore, E., Rezai, K., Bekradda, M., Inghirami, G., D'Incalci, M., Noel, K., Cvitkovic, E., Raymond, E., & Bertoni, F. (2016, Dec 20). OTX015 (MK-8628), a novel BET inhibitor, exhibits antitumor activity in non-small cell and small cell lung cancer models harboring different oncogenic mutations. *Oncotarget*, 7(51), 84675-84687. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13181>
- Roe, J. S., Mercan, F., Rivera, K., Pappin, D. J., & Vakoc, C. R. (2015, Jun 18). BET Bromodomain Inhibition Suppresses the Function of Hematopoietic Transcription Factors in Acute Myeloid Leukemia. *Mol Cell*, 58(6), 1028-1039. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.04.011>
- Ross, D. M., Hughes, T. P., & Melo, J. V. (2011, Feb). Do we have to kill the last CML cell? *Leukemia*, 25(2), 193-200. <https://doi.org/10.1038/leu.2010.197>

- Rudnicka, D., Oszmiana, A., Finch, D. K., Strickland, I., Schofield, D. J., Lowe, D. C., Sleeman, M. A., & Davis, D. M. (2013, Jun 6). Rituximab causes a polarization of B cells that augments its therapeutic function in NK-cell-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Blood*, *121*(23), 4694-4702. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-02-482570>
- Salk, J. J., Fox, E. J., & Loeb, L. A. (2010). Mutational heterogeneity in human cancers: origin and consequences. *Annu Rev Pathol*, *5*, 51-75. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-121808-102113>
- Salvatori, B., Iosue, I., Djodji Damas, N., Mangiavacchi, A., Chiaretti, S., Messina, M., Padula, F., Guarini, A., Bozzoni, I., Fazi, F., & Fatica, A. (2011, May). Critical Role of c-Myc in Acute Myeloid Leukemia Involving Direct Regulation of miR-26a and Histone Methyltransferase EZH2. *Genes Cancer*, *2*(5), 585-592. <https://doi.org/10.1177/1947601911416357>
- San-Miguel, J. F., Hungria, V. T., Yoon, S. S., Beksac, M., Dimopoulos, M. A., Elghandour, A., Jedrzejczak, W. W., Gunther, A., Nakorn, T. N., Siritanaratkul, N., Schlossman, R. L., Hou, J., Moreau, P., Lonial, S., Lee, J. H., Einsele, H., Sopala, M., Bengoudifa, B. R., Binlich, F., & Richardson, P. G. (2016, Nov). Overall survival of patients with relapsed multiple myeloma treated with panobinostat or placebo plus bortezomib and dexamethasone (the PANORAMA 1 trial): a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Haematol*, *3*(11), e506-e515. [https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(16\)30147-8](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(16)30147-8)
- Sandberg, M. L., Sutton, S. E., Pletcher, M. T., Wiltshire, T., Tarantino, L. M., Hogenesch, J. B., & Cooke, M. P. (2005, Feb). c-Myb and p300 regulate hematopoietic stem cell proliferation and differentiation. *Dev Cell*, *8*(2), 153-166. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.12.015>
- Saraiva, N. Z., Oliveira, C. S., & Garcia, J. M. (2010, Dec 26). Histone acetylation and its role in embryonic stem cell differentiation. *World J Stem Cells*, *2*(6), 121-126. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v2.i6.121>
- Seita, J., & Weissman, I. L. (2010, Nov-Dec). Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, *2*(6), 640-653. <https://doi.org/10.1002/wsbm.86>
- Shay, J. W., & Wright, W. E. (2000, Oct). Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *1*(1), 72-76. <https://doi.org/10.1038/35036093>
- Stein, E. M., Fathi, A. T., DiNardo, C. D., Pollyea, D. A., Roboz, G. J., Collins, R., Sekeres, M. A., Stone, R. M., Attar, E. C., Frattini, M. G., Tosolini, A., Xu, Q., See, W. L., MacBeth, K. J., de Botton, S., Tallman, M. S., & Kantarjian, H. M. (2020, Apr). Enasidenib in patients with mutant IDH2 myelodysplastic syndromes: a phase 1 subgroup analysis of the multicentre, AG221-C-001 trial. *Lancet Haematol*, *7*(4), e309-e319. [https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(19\)30284-4](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(19)30284-4)

- Taniguchi, Y. (2016, Nov 7). The Bromodomain and Extra-Terminal Domain (BET) Family: Functional Anatomy of BET Paralogous Proteins. *Int J Mol Sci*, 17(11). <https://doi.org/10.3390/ijms17111849>
- Teng, M. W., Swann, J. B., Koebel, C. M., Schreiber, R. D., & Smyth, M. J. (2008, Oct). Immune-mediated dormancy: an equilibrium with cancer. *J Leukoc Biol*, 84(4), 988-993. <https://doi.org/10.1189/jlb.1107774>
- Verstovsek, S., Kantarjian, H. M., Estrov, Z., Cortes, J. E., Thomas, D. A., Kadia, T., Pierce, S., Jabbour, E., Borthakur, G., Rumi, E., Pungolino, E., Morra, E., Caramazza, D., Cazzola, M., & Passamonti, F. (2012, Aug 9). Long-term outcomes of 107 patients with myelofibrosis receiving JAK1/JAK2 inhibitor ruxolitinib: survival advantage in comparison to matched historical controls. *Blood*, 120(6), 1202-1209. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-02-414631>
- Wechsler-Reya, R., & Scott, M. P. (2001). The developmental biology of brain tumors. *Annu Rev Neurosci*, 24, 385-428. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.385>
- Wu, S. Y., & Chiang, C. M. (2007, May 4). The double bromodomain-containing chromatin adaptor Brd4 and transcriptional regulation. *J Biol Chem*, 282(18), 13141-13145. <https://doi.org/10.1074/jbc.R700001200>
- Yuan, T. L., & Cantley, L. C. (2008, Sep 18). PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene*, 27(41), 5497-5510. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.245>
- Zuber, J., Shi, J., Wang, E., Rappaport, A. R., Herrmann, H., Sison, E. A., Magoon, D., Qi, J., Blatt, K., Wunderlich, M., Taylor, M. J., Johns, C., Chicas, A., Mulloy, J. C., Kogan, S. C., Brown, P., Valent, P., Bradner, J. E., Lowe, S. W., & Vakoc, C. R. (2011, Aug 3). RNAi screen identifies Brd4 as a therapeutic target in acute myeloid leukaemia. *Nature*, 478(7370), 524-528. <https://doi.org/10.1038/nature10334>

Danksagung

Ich danke allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Dr. Sonja Loges herzlich für die spannende Zeit im Labor, die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und vor allem die tatkräftige Unterstützung. Mark Wroblewski, ohne den diese Dissertation nie zustande gekommen wäre und der meine Laborzeit nicht nur mit unendlicher Geduld, sondern auch Freundschaft und Humor begleitet hat. Ganz besonders danke ich Sonja Loges, für die Möglichkeit, an diesem Projekt mitzuwirken und vor allem für den anhaltenden Beistand und dafür, dass du auch Jahre später stets ein offenes Ohr und freundliche Worte für mich hast.

Ich danke meiner Familie, die mich während des Studiums finanziell unterstützt hat. Meiner Mutter für die seelische Unterstützung ebenso wie meinem Vater, der diese Arbeit als erster gelesen hat. Meinem Partner Christoph, für die Unterstützung im Alltag und meiner Freundin Lisa, mit der ich manche Stunden auf dem gemeinsamen Leidensweg in der Bibliothek verbracht habe.

Lebenslauf

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

Eidesstattliche Erklärung

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: