

Untersuchungen zur Rolle  
der mutierten Rezeptor-Tyrosinkinase FLT3  
bei der Leukämogenese  
mit Hilfe humaner und muriner Transplantationsmodelle  
[*Mus musculus* (Linnaeus, 1758)]



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) am  
Department Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und  
Naturwissenschaften an der Universität Hamburg

vorgelegt von

Diplom-Agrarbiologin Birte Niebuhr

geboren in Uelzen

Hamburg, April 2009

Genehmigt vom Department Biologie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
an der Universität Hamburg  
auf Antrag von Professor Dr. K. HARBERS  
Weiterer Gutachter der Dissertation:  
Herr Professor Dr. H.-P. MÜHLBACH  
Tag der Disputation: 29. Mai 2009

Hamburg, den 01. Mai 2009



A handwritten signature in black ink, appearing to read "J. Ganzhorn".

Professor Dr. Jörg Ganzhorn  
Leiter des Departments Biologie

Diese Arbeit entstand in der Zeit von Mai 2004 bis April 2009 in der Abteilung Molekulare Pathologie am Heinrich-Pette-Institut für Experimentelle Virologie und Immunologie in der Arbeitsgruppe von Frau Carol Stocking, PhD.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	1
<b>1 Einleitung</b> .....	3
1.1 Die Hämatopoese.....	3
1.2 Die frühe B-Zell-Entwicklung.....	5
1.2.1 Die Stadien der B-Zell-Entwicklung.....	5
1.2.2 Die intrazelluläre Regulation der frühen B-Zell-Entwicklung durch Transkriptionsfaktoren.....	7
1.2.3 Die extrazelluläre Regulation der frühen B-Zell-Entwicklung durch Zytokine und Rezeptoren.....	10
1.2 Die Leukämie.....	18
<b>Fragestellung</b> .....	24
<b>2 Material und Methoden</b> .....	25
2.1 Material.....	25
2.1.1 Enzyme.....	25
2.1.2 Kits.....	25
2.1.3 Medien.....	25
2.1.3.1 Bakterienkulturmedien.....	25
2.1.3.2 Medien, Reagenzien und Lösungen für Zellkultur und Mausversuche.....	26
2.1.4 Bakterienstamm.....	27
2.1.5 Mausstämme.....	27
2.1.6 Zellen.....	28
2.1.6.1 Primäre Zellen.....	28
2.1.6.2 Zelllinien.....	28
2.1.7 Puffer.....	28
2.1.7.1 DNA-analytische Methoden.....	28
2.1.7.2 Proteinbiochemische Methoden.....	29
2.1.8 Antikörper.....	30
2.1.8.1 Proteinbiochemische Methoden.....	30
2.1.8.2 Durchflußzytometrie.....	31
2.1.9 Plasmide.....	32
2.1.10 Geräte.....	33
2.2 Methoden.....	34
2.2.1 Zellbiologische Methoden.....	34
2.2.1.1 Kultivierung der Zelllinien.....	34
2.2.1.2 Gewinnung der Primärzellen.....	34

2.2.1.3	Auftauen und Einfrieren von Zellen.....	35
2.2.1.4	Herstellung retroviraler Pseudotypen.....	35
2.2.1.5	Bestimmung der Virustiter.....	36
2.2.1.6	Analyse am Durchflußzytometer.....	37
2.2.1.7	Infektion der Primärzellen.....	37
2.2.2	Mausversuche.....	38
2.2.2.1	Allotransplantation.....	38
2.2.2.2	Xenotransplantation.....	38
2.2.2.3	Analyse erkrankter Tiere.....	38
2.2.3	Nukleinsäure-analytische Methoden.....	40
2.2.3.1	Standardmethoden.....	40
2.2.3.2	Klonierung der FLT3mut cDNA in einen retroviralen Vektor.....	40
2.2.3.3	Sequenzierung.....	40
2.2.4	Nukleinsäure-analytische Methoden im Rahmen des Southern-Blot-Verfahrens.....	41
2.2.5	Proteinbiochemische Methoden im Rahmen des Western-Blot-Verfahrens.....	43
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>45</b>
3.1	Konstruktion eines retroviralen Vektors und Herstellung pseudotypisierter Retroviren zur Expression von FLT3mut in hämatopoetischer Vorläuferzellen.....	45
3.2	FLT3mut im Knochenmark-Transplantationsmodell (Allotransplantation).....	46
3.2.1	Infektion und Transplantation hämatopoetischer Vorläuferzellen.....	46
3.2.2	FLT3mut Mäuse entwickelten letale lymphoproliferative Erkrankungen.....	48
3.2.3	FLT3mut wurde in den hämatopoetischen Organen der erkrankten Tieren exprimiert.....	53
3.2.4	FLT3mut Expression löste in 23 von 24 erkrankten Tieren eine B-Zell-Leukämie aus.....	55
3.2.5	FLT3mut Expression führte in einem von 24 erkrankten Tieren zur Bildung eines T-Zell-Tumors im Thymus.....	58
3.3.	Transplantation der FLT3mut Tumore.....	60
3.3.1	Im Gegensatz zu leukämischen FLT3mut T-Zellen lösten leukämische FLT3mut B-Zellen innerhalb einer sehr kurzen Latenzzeit Sekundärtumore aus.....	60
3.3.2	Hohe Frequenz Tumor-induzierender Zellen in FLT3mut B-Zell-Leukämie.....	61

3.3.3	Die Differenzierung der FLT3mut exprimierenden leukämischen B-Zell-Population war am Übergang von der frühen zur späten prä-B-Zelle blockiert.....	63
3.4	FLT3mut ALL Zellen waren klonal.....	65
3.5	FLT3mut Tumore zeigten eine konstitutive Aktivierung von STAT5.....	67
3.6	Aktiviertes STAT5 im Knochenmark-Transplantationsmodell.....	68
3.6.1	Infektion und Transplantation hämatopoetischer Vorläuferzellen.....	68
3.6.2	STAT5 1*6 Expression löste im Knochenmark-Transplantationsmodell keine prä-B-Zell-ALL aus.....	68
3.6.3	Konstitutive Expression von aktiviertem STAT5 führte zu einer Störung der B-Zell-Differenzierung.....	71
3.7	FLT3mut im Xenotransplantations-Modell.....	73
3.7.1	Infektion und Transplantation humaner hämatopoetischer Vorläuferzellen.....	73
3.7.2	FLT3mut exprimierende humane hämatopoetische Vorläuferzellen waren im Knochenmark der Empfängertiere nachweisbar.....	74
3.7.3	Der Anteil myeloischer Zellen war in der FLT3mut Population vergrößert.....	75
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>77</b>
4.1	Ein Vergleich der etablierten Mausmodelle untereinander und mit humanen Erkrankungen.....	77
4.1.1	Das Allotransplantations-Modell.....	77
4.1.2	Das Xenotransplantations-Modell.....	78
4.2	Die Untersuchung von aktivierenden FLT3 Mutationen in murinen Zellen. Ein Vergleich der vorliegenden Arbeit mit aktuellen Studien.....	80
4.3	Die Bedeutung von FLT3 Mutationen während der Leukämogenese.....	89
4.4	Die Bedeutung von zusätzlichen Mutationen bei der FLT3-ITD-assoziierten Entstehung einer prä-B-ALL im Mausmodell.....	91
4.5	Die Bedeutung von aktiviertem STAT5 bei der FLT3-ITD-assoziierten Entstehung einer prä-B-ALL im Mausmodell.....	92
4.6	Ein Modell zur FLT3mut-assoziierten Entstehung einer prä-B ALL in der Maus.....	93
4.7	Inwiefern können die Ergebnisse dieser Arbeit zum Verständnis der Leukämie-Entstehung und -Heilung beitragen?.....	95
	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>96</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>107</b>
	<b>Danksagungen.....</b>	<b>109</b>

## Zusammenfassung

*FLT3* ist eines der am häufigsten mutierten Gene in akuten Leukämien. Es kodiert für eine Rezeptor-Tyrosinkinase, die durch ihre normale Signalwirkung die Differenzierung, Zellteilung und Apoptose früher hämatopoetischer Zellen der myeloischen und lymphatischen Linie beeinflusst. *FLT3* Mutationen treten besonders häufig in Form von internen Tandem-Duplikationen (*FLT3-ITD*) auf. Diese führen dazu, dass der Rezeptor Ligand-unabhängig aktiv ist. Infolgedessen kommt es zu einer andauernden Signalwirkung der Tyrosinkinase, wodurch *FLT3*-abhängige Differenzierungs-, Zellteilungs- und Apoptose-Prozesse der hämatopoetischen Entwicklung aus dem Gleichgewicht gebracht werden. Solche Störungen spielen auf dem Weg zur Entstehung von akuten myeloischen und lymphatischen Leukämien (AML und ALL) eine wichtige Rolle.

Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, welche Rolle eine *FLT3* aktivierende Mutation bei der Entstehung einer Leukämie spielt und ob diese Mutation allein ausreicht, um eine Leukämie auszulösen. Zur Beantwortung dieser Fragen wurden zwei Mausmodelle etabliert. Mit ihrer Hilfe sollte untersucht werden, wie sich die Expression eines *FLT3-ITD* auf die Entwicklung hämatopoetischer Zellen von Maus (Allotransplantation) und Mensch (Xenotransplantation) *in vivo* auswirkt. Die *FLT3-ITD* cDNA eines Leukämiepatienten (*FLT3mut*) wurde in einen retroviralen Vektor kloniert und zur Infektion von murinem Knochenmark oder humanen Primärzellen aus Nabelvenenblut verwendet. Die infizierten Zellen wurden in genetisch identische Empfängertiere, beziehungsweise immundefiziente *NOD/scid* Mäuse transplantiert. Da *FLT3* Mutationen häufig in Verbindung mit anderen genetischen Veränderungen auftreten, ging die zugrunde liegende Arbeitshypothese davon aus, dass *FLT3mut* allein nicht ausreicht, um in den transplantierten Tieren eine Leukämie auszulösen. Aus diesem Grund wurde das murine Modell durch den *Irf8*<sup>-/-</sup> Mausstamm erweitert. In diesen Tieren ist das hämatopoetische System durch myeloische und lymphatische Entwicklungsstörungen bereits vorgeschädigt. Es sollte untersucht werden, ob das fehlende *Irf8* Gen bei der Entstehung einer Leukämie mit *FLT3mut* kooperiert.

Alle Mäuse, denen *FLT3mut*-Knochenmark transplantiert worden war, erkrankten innerhalb kürzester Zeit an einer ALL, wobei das Fehlen des *Irf8* Gens zu einem signifikant schnelleren Ausbrechen der Krankheit führte. Die leukämische Population bestand aus B-Zellen, die in ihrer Differenzierung am Übergang von der frühen zur späten prä-B-Zelle blockiert waren. In diesem Differenzierungsstadium übernimmt *Irf8* vermutlich eine wichtige Rolle als Tumorsuppressor. Retransplantationsversuche verdeutlichten die Aggressivität der Leukämie. Weniger als 200 Zellen reichten aus, um im Empfängertier erneut eine ALL zu induzieren. War die Expression von *FLT3mut* allein ausreichend, um

eine ALL auszulösen? Die Untersuchungen der FLT3mut Tumorpulationen zeigten, dass sie aus Zellen klonalen Ursprungs bestanden. Vermutlich besaß FLT3mut allein nicht ausreichend transformierende Eigenschaften, um eine ALL zu induzieren, sondern wirkte gemeinsam mit genetischen Veränderungen, die entweder spontan oder durch die Integration des Provirus zustande gekommen waren. Eine Analyse dieser Integrationsstellen bietet die Möglichkeit Faktoren zu identifizieren, die mit FLT3mut bei der Entstehung einer ALL kooperieren.

Untersuchungen der vom FLT3mut Rezeptor ausgehenden Signaltransduktion ließen vermuten, dass die ungewöhnlich starke Aktivierung von STAT5 eine Rolle beim transformierenden Prozess spielen könnte. Aus diesem Grund wurde versucht den FLT3mut-Effekt durch Expression eines aktivierten STAT5 im Knochenmark-Transplantationsmodell zu imitieren. Obwohl es in den STAT5 Tieren zu einer mit FLT3mut vergleichbaren Störung der B-Zell-Differenzierung kam, reichte aktiviertes STAT5 nicht aus, um eine ALL zu induzieren. Vermutlich sind hierfür weitere, FLT3mut nachgeschaltete, pro-proliferative oder anti-apoptotische Signale notwendig.

Im Gegensatz zum Transplantationsmodell mit murinen Knochenmarkzellen löste die Expression von FLT3mut in humanen Primärzellen aus Nabelvenenblut nach der Transplantation keine Leukämie aus. Im Xenotransplantations-Modell führte FLT3mut zur Expansion einer frühen myeloischen Population, ohne dabei jedoch die Differenzierung zu blockieren. Das Xenotransplantations-Modell ist aus diesem Grund besonders geeignet, um genetische Veränderungen zu testen, die in Verdacht stehen gemeinsam mit aktiviertem FLT3 für die Entstehung einer AML verantwortlich zu sein.

Stellt man die schwerwiegende Blockade der B-Zell-Differenzierung im murinen Knochenmark der myeloischen Expansion humaner Primärzellen gegenüber, wird deutlich, dass FLT3mut in diesen Zelltypen unterschiedlich stark transformierendes Potenzial besaß. Die phänotypische Abweichung könnte durch Spezies-spezifische Unterschiede erklärt werden. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass Herkunft (Knochenmark oder Nabelvenenblut) und Infektionsbedingungen den Phänotyp der FLT3mut Zellen beeinflusst haben.

Die im Zuge der vorliegenden Arbeit etablierten Modelle könnten zur Beantwortung der Frage beitragen, ob die Behandlung mit einem niedermolekularen Kinase-Inhibitor allein ausreicht, die Leukämie zu heilen, da FLT3 Mutationen meist in Verbindung mit anderen genetischen Veränderungen auftreten. Der Einsatz von Kinase-Inhibitoren ist eine vielversprechende therapeutische Maßnahme für Patienten, deren Heilungschancen aufgrund einer FLT3 Mutation schlechter sind, als bei Patienten ohne FLT3 Mutation. Die zwei etablierten Modelle bieten die Möglichkeit neue Therapeutika für ALL und AML auf ihre Wirksamkeit und Wirkungsweise zu überprüfen.



# 1 Einleitung

## 1.1 Die Hämatopoese

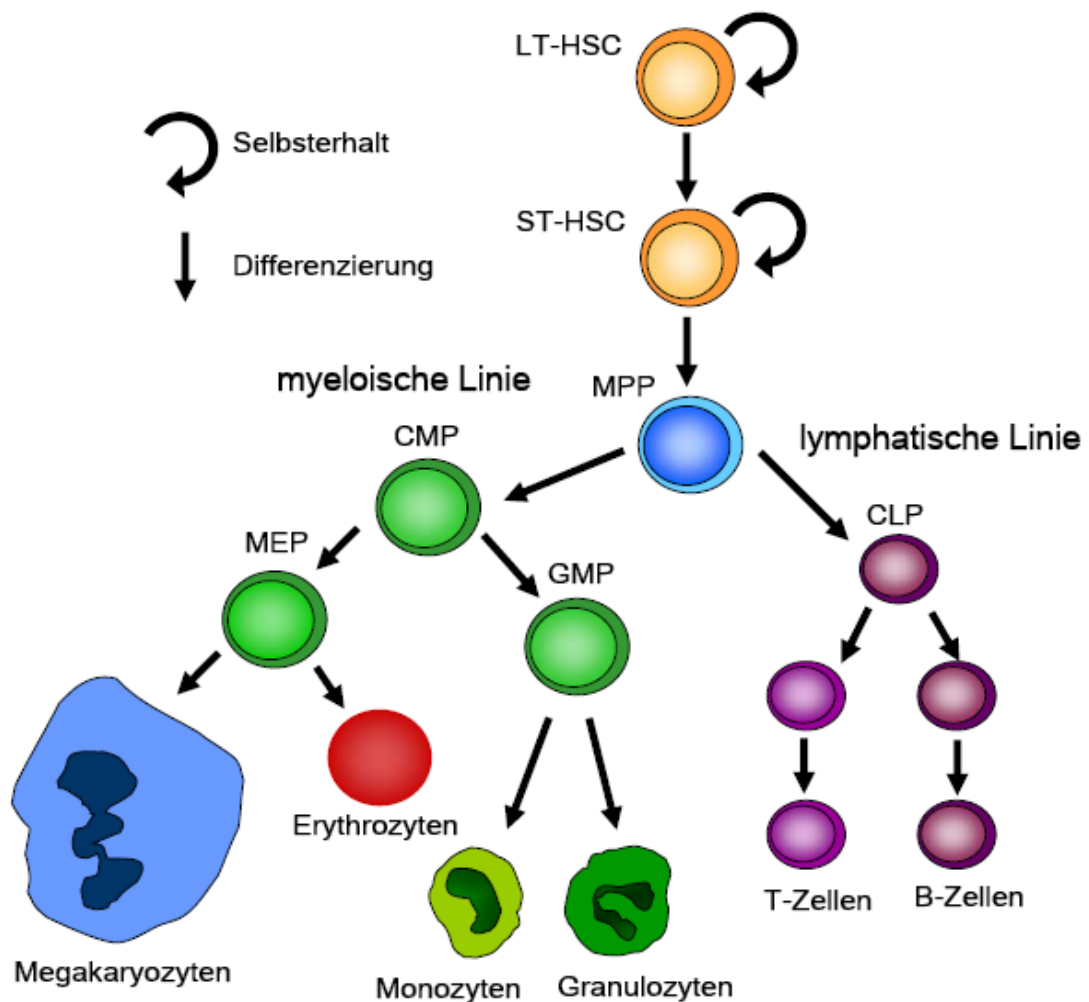


Abbildung 1.1 Stammbaum der hämatopoetischen Entwicklung.

Hämatopoese bezeichnet den Prozess der Blutentwicklung von der Stammzelle im Knochenmark bis hin zur ausgereiften Blutzelle. Abbildung 1.1 stellt diesen hierarchischen Prozess stark vereinfacht dar. Am Ausgangspunkt dieser Entwicklung stehen die hämatopoetischen Stammzellen (HSC, *Hematopoietic Stem Cell*). Im Laufe eines gesamten Lebens gehen aus ihnen nicht nur alle Blutzellen der dargestellten Hierarchie hervor, sondern sie sorgen auch für den Selbsterhalt (Metcalf, 1989; Orkin, 2000). Erkenntnisse aus Transplantationsversuchen waren für die Unterscheidung zweier Stammzelltypen und deren Namensgebung verantwortlich. Zellen, die das

hämatopoetische System vollständig rekonstruieren können und damit in der Lage sind, das Überleben einer Maus nach deren letaler Bestrahlung lebenslang (>16 Wochen) zu sichern, werden als Langzeit-Stammzellen (LT-HSC, *Long-Term HSC*) bezeichnet. Beschränkt sich diese Fähigkeit auf einen kürzeren Zeitraum, spricht man von Kurzzeit-Stammzellen (ST-HSC, *Short-Term HSC*). Der Selbsterhalt funktioniert in den ST-HSCs nur noch eingeschränkt und ist auf einen Zeitraum von 8 bis 12 Wochen beschränkt. Im Laufe der weiteren Differenzierung geht die Fähigkeit zur Selbsterneuerung im Stadium der multipotenten Vorläuferzellen (MPP, *Multipotent Progenitor*) verloren (Jones et al., 1990; Keller and Snodgrass, 1990; Spangrude et al., 1991). Sie dient damit als ein Kriterium, um hämatopoetische Stammzellen von den sich unmittelbar aus ihnen entwickelnden Vorläuferstadien zu unterscheiden.

Ausgehend von den MPPs gabelt sich der hierarchische Entwicklungsverlauf und führt zu lymphatischen oder myeloischen Vorläuferzellen (CLP, *Common Lymphoid Progenitor*; CMP, *Common Myeloid Progenitor*). CLPs differenzieren über unreife Zwischenstufen zu B- oder T-Zellen, welche die spezifische Immunität vermitteln. Der Entwicklungspfad der CMPs gabelt sich in megakaryozytäre/erythroide (*Megakaryotic/Erythroid Progenitor*, MEP) und granulo-monozytäre (GMP, *Granulo/Monocytic Progenitor*) Vorläuferzellen. Aus den MEPs entwickeln sich Megakaryozyten und Erythrozyten. Megakaryozyten setzen Thrombozyten, die Schlüsselzellen der Blutgerinnung, frei. Erythrozyten sind für den Sauerstofftransport verantwortlich. Die GMPs differenzieren zu Zellen der unspezifischen Immunantwort, den Granulozyten und Monozyten/Makrophagen. Dieses hierarchische Modell der hämatopoetischen Entwicklung wird besonders auf Stammzelebene ständig untersucht, neu diskutiert und erweitert. Je nach Arbeitsgruppe und experimenteller Vorgehensweise ergeben sich dadurch unterschiedliche Bezeichnungen, weitere Zwischenstufen der Entwicklung und sogar Querverbindungen zwischen den Pfaden bis hin zu Dedifferenzierung (Iwasaki and Akashi, 2007; Laiosa et al., 2006).

Die hämatopoetischen Zellen durchlaufen während der Entwicklung von der HSC zur ausgereiften Zelle eine Reihe von unterschiedlichen Differenzierungsstadien, deren Übergänge durch die Expression oder den Verlust der Expression von Linien-spezifischen Proteinen auf der Zelloberfläche gekennzeichnet sind. Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper, die gegen diese Proteine gerichtet sind, werden eingesetzt, um unterschiedliche hämatopoetische Entwicklungsstufen mittels Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung (FACS, *Fluorescence Activated Cell Sorting*) im Durchflußzytometer sichtbar zu machen.

### 1.2 Die frühe B-Zell-Entwicklung

Ein dichtes Netz an Regulationsmechanismen ist dafür verantwortlich, dass das Verhältnis der unterschiedlichen Blutlinien ausgewogen ist und alle Zelltypen in ausreichender Zahl vorliegen, um beispielsweise Sauerstofftransport und Infektionsabwehr zu gewährleisten. Zytokine und Transkriptionsfaktoren sind solche die Genexpression positiv und negativ regulierenden Faktoren. Sie spielen bei der Entwicklung und der Kontrolle hämatopoetischer Zellen eine entscheidende Rolle. In den folgenden Abschnitten soll anhand ausgewählter Faktoren besonders die frühe B-Zell-Entwicklung im Knochenmark erläutert werden, da diese wichtig für das Verständnis der vorliegenden Arbeit ist. Die Erkenntnisse der B-Zell-Entwicklung basieren in erster Linie auf Mausstudien. Obwohl Unterschiede zum humanen System bekannt sind, wird allgemein angenommen, dass sich die grundlegende Differenzierung bei beiden Spezies ähnelt, da die involvierten Regulatoren ähnliche Funktionen erfüllen (Payne and Crooks, 2007).

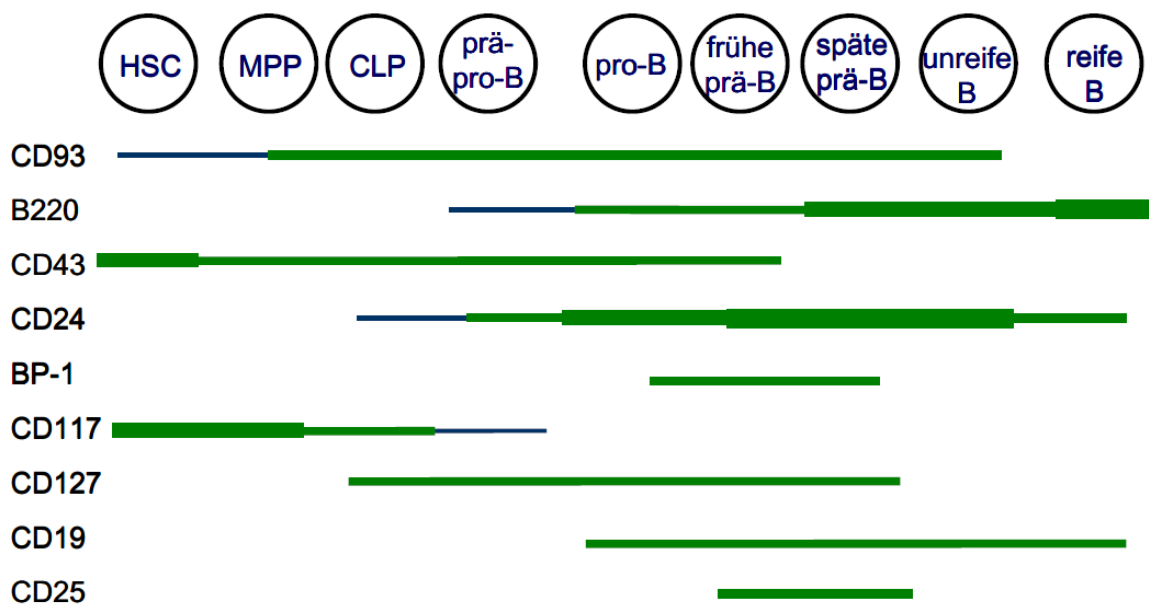
#### 1.2.1 Die Stadien der B-Zell-Entwicklung

Schon früh wurden Klassifizierungssysteme entwickelt, um die zahlreichen B-Zell-Differenzierungsstadien beschreiben und unterscheiden zu können. Die Expression verschiedener Oberflächenproteine spielte hierbei eine wichtige Rolle (Hardy et al., 2007; Osmond et al., 1998). Mit Hilfe spezifischer Antikörper, die gegen diese Oberflächenproteine der B-Zellen gerichtet sind (Tabelle 1.1) (Abbildung 1.2), können die entsprechenden B-Zell-Entwicklungsstadien isoliert und auf Genexpression oder Zytokin-Abhängigkeit untersucht werden. Außerdem bieten sie die Möglichkeit, das Differenzierungsstadium von B-Zellen in Mausmodellen zu bestimmen, in denen die B-Zell-Entwicklung, beispielsweise aufgrund eines fehlenden Gens, gestört ist. Diese Klassifikationssysteme tragen maßgeblich zum besseren Verständnis der B-Zell-Differenzierungsprozesse und den damit verbundenen Kontrollpunkten und Regulatoren (zum Beispiel Transkriptionsfaktoren und Zytokine) bei.

Ausgangspunkt der in Abbildung 1.2 dargestellten B-Zell-Differenzierung sind die HSCs. Genau wie die MPPs exprimieren sie bereits Oberflächenproteine (CD93, CD43, CD117), die sich auch während späterer Stadien der B-Zell-Entwicklung nachweisen lassen. Die Festlegung der lymphatischen Differenzierungsrichtung erfolgt jedoch erst mit der Expression des Interleukin-7 Rezeptors (IL-7R oder CD127) auf den CLPs. Differenziert ein CLP weiter auf dem Entwicklungspfad der B-Zellen, entsteht eine prä-pro-B-Zelle. Sie ist der erste identifizierbare Zelltyp der B-Zell-Linie. Alle Zellen der B-Zell-Linie exprimieren das Oberflächenprotein B220. Auf prä-pro-, pro- und frühen prä-B-Zellen ist außerdem CD43 nachweisbar.

Antigen	Weitere Bezeichnungen	Gen Name
CD93	AA4.1, C1qr1, Ly68	Cd93
B220	CD45R, Ly5	Ptprc
CD43	Leukosialin, Sialophorin, Ly48	Spn
CD24	HSA, Nectadrin, Ly52	Cd24a
BP-1	Enpep, BP-1/6C3, APA, Ly51	Enpep
CD117	c-kit, SCFR, Steel factor R	Kit
CD127	IL-7R $\alpha$	Il7r
CD19	B4	Cd19
CD25	IL-2R $\alpha$ , Ly43	Il2ra

**Tabelle 1.1 Wichtige Antigene der B-Zell-Entwicklung.** CD, *Cluster of Differentiation*; Ly, *Lymphocyte Antigen*; C1qr1, *Complement component 1, q subcomponent, receptor 1*; Ptprc, *Protein tyrosine phosphatase, receptor type, C*; HSA, *Heat Stable Antigen*. Übernommen aus Alaverdi et al. (Alaverdi, 2002) und <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez> (gefunden im Februar 2009).



**Abbildung 1.2 Expression ausgewählter Oberflächenproteine während der Differenzierung von der Stammzelle zur reifen B-Zelle.** Abgewandelt nach Hardy et al. (Hardy and Hayakawa, 2001; Hardy et al., 2007).

Der endgültige Verlust der Fähigkeit, in Richtung anderer Linien zu differenzieren, geht mit der Expression von CD19 im pro-B-Zell-Stadium einher. Pro-B-Zellen exprimieren außerdem vermehrt CD24 und verlieren den c-kit Rezeptor (CD117). Frühe prä-B-Zellen sind zusätzlich zu HSA und CD19 auch BP-1 und CD25 positiv. In den späten prä-B-Zellen wird die CD43 Expression wieder gedrosselt. Es kommt zur Bildung

der B-Zell-Rezeptor (BZR) Bestandteile. Exprimiert wird der BZR jedoch erst auf den Zellen der folgenden Entwicklungsstufe (unreife B-Zelle) (Hardy et al., 2007; Satterthwaite and Witte, 1996).

### 1.2.2 Die intrazelluläre Regulation der frühen B-Zell-Entwicklung durch Transkriptionsfaktoren

Die frühen Schritte der B-Zell-Entwicklung werden durch mindestens zehn verschiedene Transkriptionsfaktoren reguliert (Fuxa and Skok, 2007; LeBien and Tedder, 2008; Matthias and Rolink, 2005; Moschese et al., 2004; Nutt and Kee, 2007; Singh et al., 2005). In den folgenden Abschnitten soll auf einige dieser Faktoren und ihre Rolle während der B-Zell-Entwicklung eingegangen werden. Behandelt werden Pu.1, Ikaros, Ebf1, E2a, Pax5, Irf4 und Irf8. Ihre Inaktivierung führt in jedem einzelnen Fall zu einem Phänotyp, der mit schwerwiegenden Veränderungen der B-Zell-Entwicklung verbunden ist. Die folgende Tabelle 1.2 fasst vorab die wichtigsten Informationen zu den besprochenen Transkriptionsfaktoren zusammen.

Transkriptionsfaktor ( <i>Gen Symbol</i> )	DNA-Bindungs- motiv	B-Zell Phänotyp ausgelöst durch Fehlen des Gens in der Keimbahn	Verbindung zu humaner B-ALL
Pu.1 ( <i>Sfpi1</i> )	Ets	Fötale B-Zellen und CLPs fehlen <sup>(1)</sup>	Nicht mutiert
Ikaros ( <i>Ikzf1</i> )	Zink Finger	Alle B-Zellen fehlen <sup>(3)</sup>	Deletionen <sup>(2)</sup>
E2a ( <i>TcfE2a</i> )	bHLH	Blockade vor der prä-pro-B-Zelle, keine <i>Igh</i> Rekombination <sup>(4)</sup>	Translokationen und Mutationen <sup>(2)</sup>
Ebf1 ( <i>Ebf1</i> )	Zink "knuckle"	Blockade vor der prä-pro-B-Zelle, keine <i>Igh</i> Rekombination <sup>(5)</sup>	Monoallelische Deletionen <sup>(2)</sup>
Pax5 ( <i>Pax5</i> )	"Paired domain"	Blockade im pro-B-Zell-Stadium, nur D-J <sub>H</sub> Rekombination <sup>(6)</sup>	Monoallelische Deletionen und Translokationen <sup>(2)</sup>
Irf8 ( <i>Irf8</i> )	nicht beschrieben	Absolute Menge B-Zellen reduziert; Verhältnis früher zu später prä-B- Zellen ist vergrößert <sup>(7)</sup>	Reduzierte Expression in BCR-ABL <sup>+</sup> ALL <sup>(8)</sup>
Irf4 ( <i>Irf4</i> )	nicht beschrieben	Lymphadenopathy; Blockade der späten B-Zell-Entwicklung <sup>(9)</sup>	Reduzierte Expression in BCR-ABL <sup>+</sup> ALL <sup>(8)</sup>

**Tabelle 1.2 Struktur und Funktion ausgewählter Transkriptionsfaktoren der B-Zell-Entwicklung.**

(1), (McKercher et al., 1996; Scott et al., 1994; DeKoter et al., 2002); (2), (Kawamata et al., 2008a; Kawamata et al., 2008b; Mullighan et al., 2007); (3), (Wang et al., 1996; Georgopoulos et al., 1994); (4) (Bain et al., 1997; Borghesi et al., 2005); (5), (Lin and Grosschedl, 1995); (6) (Nutt et al., 1999; Nutt et al., 1997); (7), (Lu et al., 2003); (8), (Klein et al., 2005); (9), (Mittrucker et al., 1997).Tabelle abgewandelt nach Nutt et al. (Nutt and Kee, 2007).

**Pu.1:** In den früheren Entwicklungsstadien (MPPs) scheint Pu.1 wichtig für einen Prozess zu sein, der bewirkt, dass sich die Zellen bevorzugt in Richtung der B-Zell Linie entwickeln, denn es aktiviert die Expression von zwei essentiellen Faktoren der B-Zell-Entwicklung (*Ebf1* und *Ii7r*). Bei diesem Prozess ist vermutlich besonders das Expressionsniveau von Pu.1 entscheidend. Untersuchungen haben gezeigt, dass niedrige Pu.1 Level mit der B-Zell-Entwicklung korrelieren, während eine hohe Expression die myeloische Differenzierung begünstigt. Ist die Entscheidung für eine Differenzierung in B-Zell-Richtung gefallen, wird Pu.1 grundsätzlich nicht mehr benötigt (Matthias and Rolink, 2005; Nutt and Kee, 2007).

**Ikaros:** Ikaros gilt neben Pu.1 als weiterer wichtiger Faktor, der die lymphatische Entwicklung in CLPs einleitet. In Zellen, denen das Ikaros Gen fehlt, werden wichtige Gene für die lymphatische Differenzierung gar nicht oder schwächer als üblich exprimiert (*Ii7r*, *Flt3*, *Rag-1* und *Rag-2*). Ein direktes Zielgen von Ikaros ist *Igll1*, eine Komponente des prä-B-Zell-Rezeptors (prä-BZR). Es wird vermutet, dass Pu.1 und Ikaros wichtige Funktionen in parallelen Signalwegen erfüllen (Matthias and Rolink, 2005; Nutt and Kee, 2007).

**E2a:** E2a aktiviert vermutlich gemeinsam mit PU.1 die Ebf1 Expression. Aus diesem Grund wird E2a im Kontext der B-Zell-Entwicklung (genauso wie Pu.1) als initiiender Faktor angesehen, der für den Erhalt der B-Zell Genexpression nicht unbedingt notwendig ist (Nutt and Kee, 2007). Andererseits ist E2a zusammen mit Ebf1 essentiell für die Bildung des prä-BZR. Gemeinsam aktivieren diese zwei Faktoren die Expression des RAG-1/RAG-2 Komplexes und leiten dadurch die D-J<sub>H</sub> Rekombination ein. Außerdem sind E2a und Ebf1 für die Expression weiterer Bestandteile des prä-BZRs (VpreB,  $\lambda 5$ , Ig $\alpha$  und Ig $\beta$ ) verantwortlich. Die beiden Faktoren demethylieren die DNA und verändern beispielsweise das Chromatin des *CD79a* Promotors, so dass Transkriptionsfaktoren wie Pax5 (siehe unten) die Expression dieses Gens aktivieren können (Kee, 2009; Ye and Graf, 2007).

**Ebf1:** Als Folge der Signalwirkung des IL-7R wird Ebf1 im CLP-Stadium erstmals in signifikanter Menge exprimiert. E2a und Pu.1 aktivieren die Expression des *Ebf1* Locus. Dieser Effekt wird durch einen Rückkopplungsmechanismus von Ebf1 selbst verstärkt. Pax5, ein Zielgen von Ebf1, erhöht die Ebf1 Expression zusätzlich. Durch diese Vorgänge steigt das Ebf1 Expressionsniveau im Laufe der weiteren Differenzierung an. Gleichzeitig geht das Potenzial dieser Zellen, in Richtung anderer Linien zu differenzieren, verloren (Lukin et al., 2008). Die Expression von Ebf1 allein reicht aus, um ohne Pu.1 und E2a das B-Zell Programm zu starten. Allerdings können Ebf1 exprimierende TcfE2a<sup>-/-</sup> pro-B-Zellen nicht auf einen IL-7 Stimulus reagieren. Hierfür wird E2a benötigt, das bei der IL-7R induzierten Regulation eines pro-proliferativen Faktors wichtig ist (Nutt and Kee, 2007).

**Pax5:** Ebf1 und Stat5 gelten als direkte Regulatoren der Pax5 Expression. Pax5 kann Gene, die für die B-Zell-Entwicklung wichtig sind, aktivieren (*CD19*, *CD79a*). Gleichzeitig ist es aber auch in der Lage, die Expression von Genen, die für frühe Entwicklungsstadien (MPP, CLP) oder die Differenzierung in Richtung anderer Blutlinien (myeloische Zellen) wichtig sind, zu unterdrücken (*Flt3*, *Csf1r*). Pax5 ist demnach essentiell für die Vermittlung eines unumkehrbaren Schrittes in der B-Zell-Differenzierung, der die Zellen als B-Zellen festlegt, so dass sich diese nicht mehr in Richtung anderer Linien entwickeln können. Beispielsweise können sich prä-pro-B-Zellen noch zu T- oder NK-Zellen entwickeln, doch sobald Pax5 die Expression von CD19 in pro-B-Zellen eingeleitet hat, geht dieses Entwicklungspotential verloren. Im Gegensatz zu Ebf1 reicht Pax5 allein jedoch nicht aus, um ohne Pu.1 und E2a die B-Zell-Entwicklung einzuleiten. Wie oben angedeutet, hat Ebf1 neben der Aktivierung von Pax5 noch weitere Funktionen, die für den reibungslosen Ablauf der B-Zell-Entwicklung wichtig sind (Cobaleda et al., 2007; Nutt and Kee, 2007; Ye and Graf, 2007).

E2a und Ebf1 können als Faktoren bezeichnet werden, die als erste den Entwicklungsverlauf früher B-Zellen bestimmen und sie dadurch in Richtung B-Zell-Linie lenken. Pax5 übernimmt die Funktion des zweiten wegweisenden Faktors der B-Zell-Entwicklung, indem er die Zellen in ihrer Differenzierungsrichtung endgültig festlegt (Medina and Singh, 2005).

**Irf4, Irf8:** Die Familie der Interferon-regulierenden Faktoren (Irf) besteht aus neun Mitgliedern. Zwei dieser Faktoren Irf4 und Irf8 wird besondere Bedeutung während der hämatopoetischen Entwicklung beigemessen. Untersuchungen von Irf4<sup>-/-</sup> Tieren beweisen die Bedeutung dieses Faktors für Funktion und Selbstregulation reifer B- und T-Zellen (Mittrucker et al., 1997). Außerdem scheint Irf4 in der frühen B-Zell-Entwicklung Tumorsuppressor-Funktionen zu übernehmen (Acquaviva et al., 2008). Transplantationsversuche mit Irf8<sup>-/-</sup> Knochenmark konnten zeigen, dass die Differenzierung ausgehend von den HSCs zugunsten der myeloischen Linie beeinflusst wird (Wang et al., 2008). Vermutlich trägt Irf8 zu diesem Zeitpunkt durch die Verminderung der Expressionsniveau von Pu.1 dazu bei, dass ein ausgeglichenes Verhältnis von CLPs zu GMPs vorliegt. Außerdem sind im Irf8<sup>-/-</sup> Knochenmark deutlich weniger B-Zellen (B220<sup>+</sup>) vorhanden, wobei das Verhältnis von frühen zu späten prä-B-Zellen signifikant vergrößert ist. In diesem Zusammenhang wird spekuliert, dass Irf8 dem regulatorischen Komplex aus Ebf1, E2a und Pax5 vorgeschaltet ist und auf diese Weise die B-Zell-Entwicklung beeinflusst. Bei Mäusen, denen zusätzlich zum Irf8 auch das Irf4 Gen fehlt, sind die Auswirkungen noch drastischer (Lu et al., 2003). Die B-Zell-Differenzierung ist am Übergang von der frühen zur späten B-Zelle blockiert. Gleichzeitig ist diese Zellpopulation stark vergrößert, denn die vom prä-B-Zell-Rezeptor ausgehenden

Überlebens- und Zellteilungs-Signale werden nicht abgeschaltet. Begründet wird dieser Phänotyp mit der Kontrollfunktion, die Irf4 und Irf8 während des prä-B-Zell-Stadiums erfüllen, indem sie direkt oder indirekt die Expression zweier wichtiger Faktoren des prä-B-Zell-Rezeptors (VpreB und  $\lambda 5$ ) regulieren. Nur wenn der prä-B-Zell-Rezeptor nicht mehr exprimiert wird, kann das weitere Differenzierungsprogramm (zum Beispiel die Rekombination der leichten Kette des B-Zell-Rezeptors) gestartet werden, an dem Irf8 und Irf4 vermutlich auch beteiligt sind (Matthias and Rolink, 2005).

### 1.2.3 Die extrazelluläre Regulation der frühen B-Zell-Entwicklung durch Zytokine und Rezeptoren

Zytokine und ihre spezifischen Rezeptoren vermitteln die Aktivierung verschiedener Signalwege und sichern dadurch das Überleben der Zelle oder schützen diese aktiv vor dem Zelltod. Solche Prozesse sind während der Entwicklung hämatopoetischer Zellen sehr wichtig, zum Beispiel um das Gleichgewicht der B-Zell Population zu gewährleisten (Metcalf, 2008).

#### Der FLT3 Rezeptor

Das *Flt3* Gen kodiert für die gleichnamige Rezeptor-Tyrosinkinase. Als Teil der Rezeptor-Tyrosinkinase Subklasse III besitzt Flt3 starke Ähnlichkeit mit vier weiteren dieser Familie angehörigen Rezeptoren (M-CSF, *Macrophage Colony Stimulating Factor*; c-kit, *Stem Cell Factor Receptor*; PDGFR $\alpha/\beta$ , *Platelet Derived Growth Factors Alpha/Beta*) (Small, 2006).

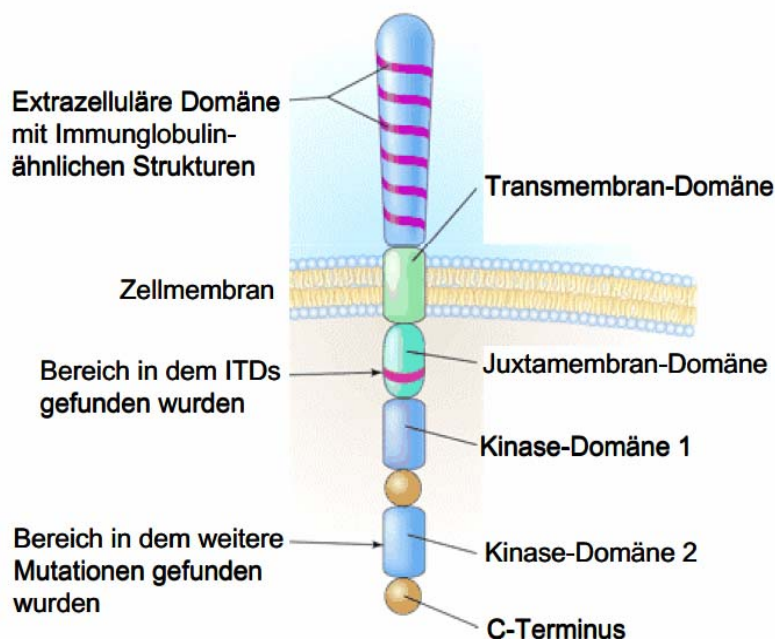


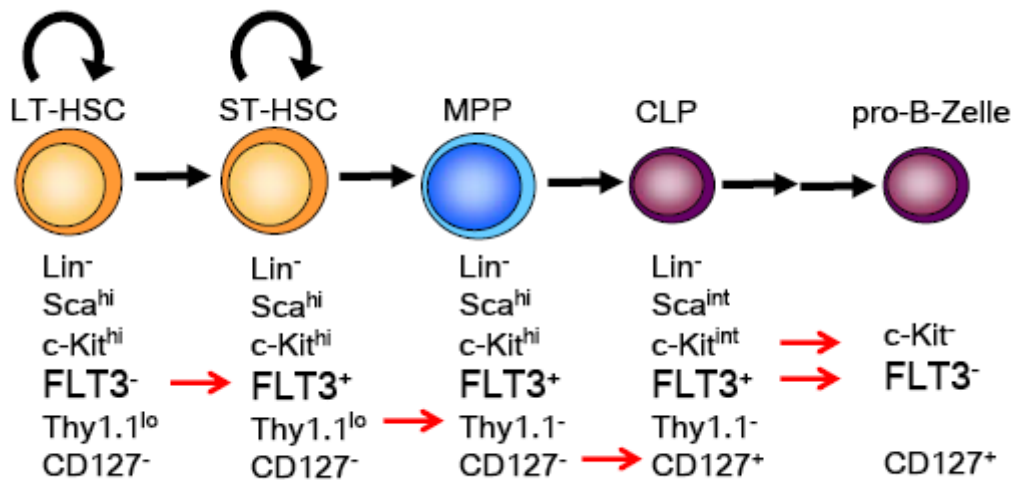
Abbildung 1.3 Der FLT3 Rezeptor.

Illustration von Kenneth Probst. Abbildung übernommen von Litzow (Litzow, 2005).



Zu den Eigenschaften dieser Klasse der Wachstumsfaktor-Rezeptor-Tyrosinkinasen gehört unter anderem eine spezielle Struktur im extrazellulär gelegenen N-Terminus, bestehend aus fünf Immunglobulin-ähnlichen Domänen (Extrazelluläre Domäne, ED). Dieser Bereich der Rezeptoren dient als Bindungsstelle für den entsprechenden Liganden. Die zur Signalübertragung notwendigen Proteinabschnitte liegen im Zytoplasma hinter der Transmembran-Domäne (TD) und bestehen aus einer Juxtamembran-Domäne (JM) und zwei durch eine Interkinase-Domäne verbundenen Kinase-Domänen (KD) (Lyman, 1995).

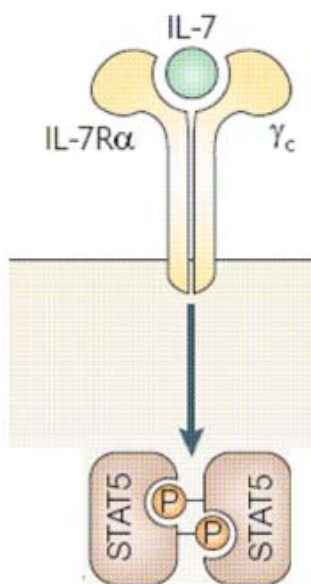
**Expression:** Untersuchungen zur Expression von Flt3 in unterschiedlichsten Zelltypen ergaben, dass diese Rezeptor-Tyrosinkinase hauptsächlich in frühen Zellstadien des hämatopoetischen Systems zu finden ist. Abbildung 1.4 zeigt die Entwicklung von der LT-HSC zur pro-B-Zelle und die bei diesem Prozess auf der Zelloberfläche exprimierten Proteine. Die dargestellten Differenzierungsstadien wurden in zahlreichen Veröffentlichungen untersucht (Adolfsson et al., 2001; Christensen and Weissman, 2001; Karsunky et al., 2008; Yang et al., 2005). Es wurde relativ einheitlich postuliert, dass die Expression von Flt3 auf frühen hämatopoetischen Zellen der Maus mit dem Verlust des Selbsterneuerungspotenzials einher geht. Ob es sich hierbei jedoch um einen schrittweisen Prozess handelt (Christensen and Weissman, 2001; Karsunky et al., 2008), oder ob nur Zellen mit bereits festgelegter lymphatischer oder sogar B-Zell-Entwicklungsrichtung Flt3 exprimieren (Adolfsson et al., 2001; Yang et al., 2005) wird kontrovers diskutiert. Die Expression von Flt3 wird im weiteren Verlauf der Entwicklung durch Pax5 ausgeschaltet (Holmes et al., 2006b). Dieser Prozess ist besonders wichtig für die Festlegung der Differenzierungsrichtung entlang der B-Zell Linie. Im Gegensatz zu den Ergebnissen im murinen System, ergaben Untersuchungen in humanen Zellen aus Knochenmark und Nabelvenenblut, dass dort auch LT-HSCs FLT3 exprimieren (Kikushige et al., 2008). Außerdem schützt FLT3 humane HSCs, GMPs und CLPs durch die Regulation eines Überlebensfaktors vor dem Zelltod.



**Abbildung 1.4** Expression ausgewählter Oberflächenproteine während der Differenzierung von der LT-HSC zur pro-B-Zelle (Christensen and Weissman, 2001; Karsunky et al., 2008). Lin<sup>-</sup>, negativ für Linien-spezifische Marker; Sca<sup>hi</sup>, Sca-1 wird hoch exprimiert; Thy1.1<sup>lo</sup>, niedriges Thy1.1 Expressionslevel; c-kit<sup>int</sup>, mittleres c-kit Expressionslevel. Die roten Pfeile kennzeichnen eine für den Differenzierungsstatus wichtige Veränderung im Expressionsniveau des markierten Oberflächenproteins.

**Signalwirkung:** Die Bindung des Flt3-Liganden (FL) an die ED führt zur Homodimer-Bildung zweier Flt3 Rezeptoren. Zeitgleich werden deren intrazelluläre Rezeptorbereiche nebeneinander positioniert, wodurch spezifische Tyrosin-Reste (589 und 591, siehe Abbildung 2.1) in der JM des einen Rezeptors Phosphatgruppen auf den anderen Rezeptor übertragen und umgekehrt. Dieser als Transphosphorylierung bezeichnete Vorgang löst die Kinaseaktivität des Flt3-Rezeptors aus. Im Zuge dieser enzymatischen Reaktion werden Phosphatreste auf verschiedenste Substratproteine übertragen, die in Verbindung zu weiteren Signalproteinen stehen und bei Apoptose, Zellteilung und Differenzierung eine Rolle spielen. Der Flt3 Rezeptor übernimmt damit eine Vermittlerrolle in Signalkaskaden (zum Beispiel PI3K/AKT und RAS/MAP Kinase) ausgehend von der Zellmembran bis hin zum Zellkern (Levis and Small, 2003; Parcels et al., 2006).

## Der Interleukin-7 Rezeptor



**Abbildung 1.5** Aktivierung von STAT5 durch Signalwirkung des IL-7 Rezeptors Abbildung aus (Kee, 2009).

Der Interleukin-7 Rezeptor (IL-7R) setzt sich aus zwei unterschiedlichen Proteinketten zusammen. Der IL-7R $\alpha$  genannte Teil wird vom Gen *Il7r* kodiert und ist entweder Teil des IL-7Rs oder bildet gemeinsam mit einem anderen Protein den Rezeptor für TSLP (TSLP, *Thymic Stromal Lymphopoietin*). Auch die  $\gamma_c$  Kette ist nicht nur als Teil des IL-7Rs zu finden, sondern wird außerdem für die Bildung anderer Interleukin-Rezeptoren benötigt (IL-2R, IL-4R, IL-9R, IL-15R, IL-21R) (Milne and Paige, 2006).

**Expression und Signalwirkung:** Die Entwicklungsstufe der CLPs ist das frühe Stadium während der hämatopoetischen Entwicklung, in dem die Expression des IL-7R nachweisbar ist. Die Signalwirkung des Rezeptors ist zu diesem Zeitpunkt ein wichtiger Faktor bei der Festlegung der B-Zell-Entwicklungsrichtung. Der IL-7R trägt zur Bildung eines Transkriptionsfaktor-Netzwerks bei, indem er über den nachgeschalteten Faktor Stat5 (siehe Abbildung 1.5) die Expression von Ebf1, einer Komponente dieses Netzwerkes, verstärkt und damit den Übergang von prä-pro-B-Zellen zu reiferen B-Zell-Stadien fördert. Außerdem scheint es eine starke Interaktion zwischen den Signalwegen zu geben, die vom IL-7R und prä-BZR ausgelöst werden. Die Expression des prä-BZR auf frühen prä-B-Zellen verstärkt die Expression des IL-7R an der Zelloberfläche, wodurch die Zellen stärker auf IL-7 ansprechen. Hierdurch kommt es zur selektiven Vermehrung prä-BZR positiver Zellen auch unter Bedingungen, in denen weniger IL-7 vorliegt. Gleichzeitig wird die Vermehrung der frühen prä-B-Zellen jedoch auch eingeschränkt, indem der prä-BZR zur selben Zeit die Differenzierung der frühen prä-B-Zellen induziert. Im späten prä-B-Zell-Stadium sprechen die Zellen nicht mehr so effektiv auf IL-7 an. Diese Wirkungsweisen zeigen, dass IL-7R und prä-BZR eine zentrale Rolle bei der Kontrolle von Zellteilung, Überleben und Differenzierung der B-Zellen spielen (Herzog et al., 2009; Nutt and Kee, 2007). Dennoch gilt der IL-7R allein nicht als unverzichtbar für die B-Zell-Entwicklung. Wird in IL7R<sup>-/-</sup> Mäusen jedoch zusätzlich die Flt3-Expression ausgeschaltet, lassen sich keine B-Zellen mehr nachweisen. Demnach ist auch das gemeinsame Wirken von Flt3 und IL-7 Rezeptoren essentiell für die B-Zell-Entwicklung (Sitnicka et al., 2003; Vosshenrich et al., 2003).

### Der c-kit Rezeptor

Die Rezeptor-Tyrosinkinase c-kit wird durch den „*Steel Factor*“ aktiviert, einem Liganden, der das Überleben und den Selbsterhalt der HSCs unterstützt und deshalb auch Stammzellsfaktor (SCF, *Stem Cell Factor*) genannt wird. Das Fehlen beider *c-kit* Allele führt bei neugeborenen Mäusen normalerweise zum Tod. Dennoch gelang es mit Hilfe einer überlebenden c-kit-defizienten Maus einen Mausstamm zu züchten, dessen Nachkommen lebensfähig waren (Waskow and Rodewald, 2002). Untersuchungen der lymphatischen Linie dieser Tiere zeigten, dass c-kit in der fötalen B-Zell-Entwicklung nicht notwendig ist. Der Defekt in der B-Zell-Linie zeigt sich erst in ausgewachsenen Tieren. Aus deren HSCs gehen zwar lymphatische Vorläufer hervor, die B-Zell-spezifische Oberflächenproteine exprimieren, doch ein Großteil dieser Zellen ist in der Entwicklung gestört. Der c-kit Rezeptor ist demnach essentiell, um auch im erwachsenen Tier die Entwicklung von B-Zellen aus der HSC zu gewährleisten. Im Laufe der Entwicklung von der HSC bis hin zur prä-pro-B-Zelle wird c-kit stetig niedriger exprimiert und ist im pro-B-Zell Stadium schließlich gar nicht mehr nachweisbar (Abbildungen 1.2 und 1.4) (Pelayo et al., 2006).

### Der IL-2 Rezeptor

Der CD25 Antikörper bindet an die IL-2 Rezeptor alpha-Kette (IL-2R $\alpha$ ), die auf frühen und späten prä-B-Zellen exprimiert wird. Es ist unklar, ob sie in diesem B-Zell-Stadium als Teil des IL-2 Rezeptors (IL-2R) zusammen mit den  $\beta$  und  $\gamma_c$  Ketten vorliegt, oder allein exprimiert wird. Eine *in vitro* Stimulation mit IL-2 hat keine Auswirkungen auf die Teilung oder Differenzierung von prä-B-Zellen. Auch Mäuse mit fehlender IL-2 Expression zeigen keinen offensichtlichen B-Zell Defekt (Rolink et al., 1994). In Mäusen, denen das *Il2ra* Gen fehlt, kommt es zwar zu einer massiven Expansion lymphatischer Zellen, doch bei diesen handelt es sich um T- und B-Zellen ausgereifter Entwicklungsstadien. Die Studien konnten zeigen, dass IL-2R $\alpha$  für die Entwicklung früher B-Zellen nicht essentiell ist (Willerford et al., 1995).

### Prä-B-Zell-Rezeptor und B-Zell-Rezeptor

Die frühe B-Zell-Entwicklung ist durch eine geordnete Umlagerung von Genen, die für Antigen-Rezeptoren kodieren, gekennzeichnet. Durch diesen Vorgang entsteht die Vielfalt der B-Zell-Rezeptoren, die für die spezifische Immunantwort verantwortlich sind. Die Genrekombination wird durch einen Komplex zweier Proteine eingeleitet, die von den Rekombinations-aktivierenden-Genen 1 und 2 (*Rag1* und *Rag2*) kodiert werden. Dieser RAG1/RAG2 Komplex verursacht Doppelstrangbrüche zwischen Gensegmenten der Immunglobulin (Ig) Loci und spezifischen Erkennungssequenzen. Die geschnittenen DNA

Enden werden anschließend durch Proteine verbunden, die Doppelstrang-Brüche ungeachtet ihrer Sequenzhomologie reparieren.

**Expression:** Der erste Schritt in der B-Zell-Entwicklung ist die Umordnung des Ig Locus der schweren Kette (*Heavy Chain, HC*) (*IgH*). Dieser Prozess wird V(D)J Rekombination genannt, denn die Umlagerung betrifft V (*Variable*), D (*Diversity*) und J (*Joining*) Segmente des *IgH* Locus und beginnt im pro-B-Zell-Stadium durch die Umlagerung von  $D_H$  zu  $J_H$ . Es folgt die Umlagerung von  $V_H$  zu  $DJ_H$  im frühen prä-B-Zell-Stadium. War diese Rekombination erfolgreich, wird eine HC exprimiert. Zwei HCs bilden zusammen mit zwei vorläufigen leichten Ketten (*Surrogate Light Chain, SLC*) und den Polypeptiden  $Ig\alpha$  und  $Ig\beta$  (kodiert durch die Gene *Cd79a* und *Cd79b*) den membranständigen prä-B-Zell-Rezeptor (prä-BZR) (Abbildung 1.6). Die SLC besteht aus zwei Proteinen,  $\lambda 5$  und  $VpreB$ , die von nicht rekombinierten Genen (*Igll1* und *Vpreb2*) kodiert werden (Herzog et al., 2009; LeBien and Tedder, 2008). Der prä-BZR wird zwar nur vorübergehend exprimiert, stellt aber den ersten wichtigen Kontrollpunkt der B-Zell-Entwicklung dar. Die vom Rezeptor abgegebenen Signale zeigen, ob dieser intakt ist. Nur Zellen mit funktionierendem prä-BZR, das heißt intakter HC, werden durch diese Signale verstärkt zur Zellteilung angeregt (klonale Expansion). Gleichzeitig differenzieren diese Zellen weiter in Richtung des späten prä-B-Zell-Stadiums, denn die Signalwirkung des prä-BZR führt außerdem dazu, dass die  $\lambda 5$  Expression gedrosselt und damit auch die SLC Expression beendet wird. Die späten prä-B-Zellen exprimieren folglich keinen prä-BZR mehr. In diesem Stadium der B-Zell-Entwicklung findet die Rekombination des Ig Locus der leichten Kette (*Light Chain, LC*) (*IgL*) statt. Die HC liegt zu diesem Zeitpunkt lediglich im Zytoplasma vor. Erst im darauf folgenden Stadium der unreifen B-Zellen wird der spezifische B-Zell-Rezeptor (BZR) bestehend aus HCs und LCs auf der Zelloberfläche exprimiert (Abbildung 1.6). Die unreifen B-Zellen unterliegen einem Selektionsprozess, dem zweiten Kontrollpunkt der B-Zell-Entwicklung, bei dem getestet wird, ob der auf ihnen exprimierte BZR mit Antigenen des eigenen Organismus reagiert, also autoreaktiv ist. Ist dies der Fall, werden sie eliminiert, andernfalls verlassen sie das Knochenmark, wandern in die Milz und differenzieren dort zu reifen B-Zellen (Herzog et al., 2009; LeBien and Tedder, 2008). In Abbildung 1.7 sind die beschriebenen Prozesse während der Entwicklung vom CLP zur reifen B-Zelle schematisch dargestellt.

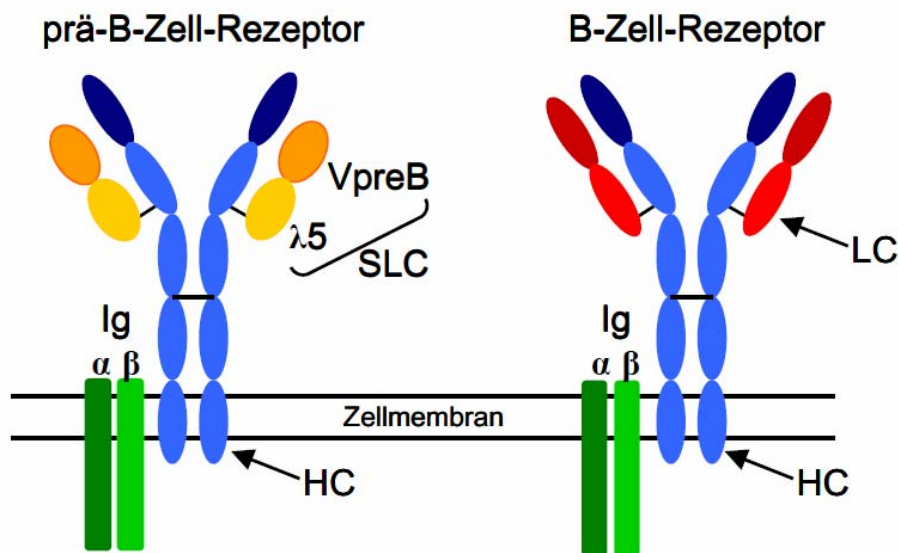


Abbildung 1.6 Prä-B-Zell-Rezeptor und B-Zell-Rezeptor.

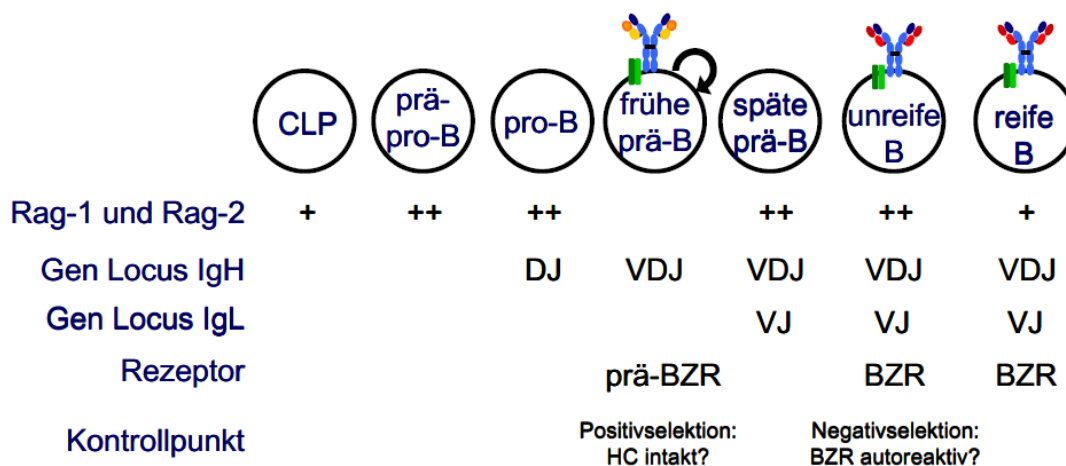


Abbildung 1.7 Entwicklung vom CLP zur reifen B-Zellen. Der schwarze Pfeil symbolisiert die klonale Expansion früher prä-B-Zellen mit intakter HC. Abgewandelt nach Herzog et al. und Hardy et al. (Hardy et al., 2007; Herzog et al., 2009).

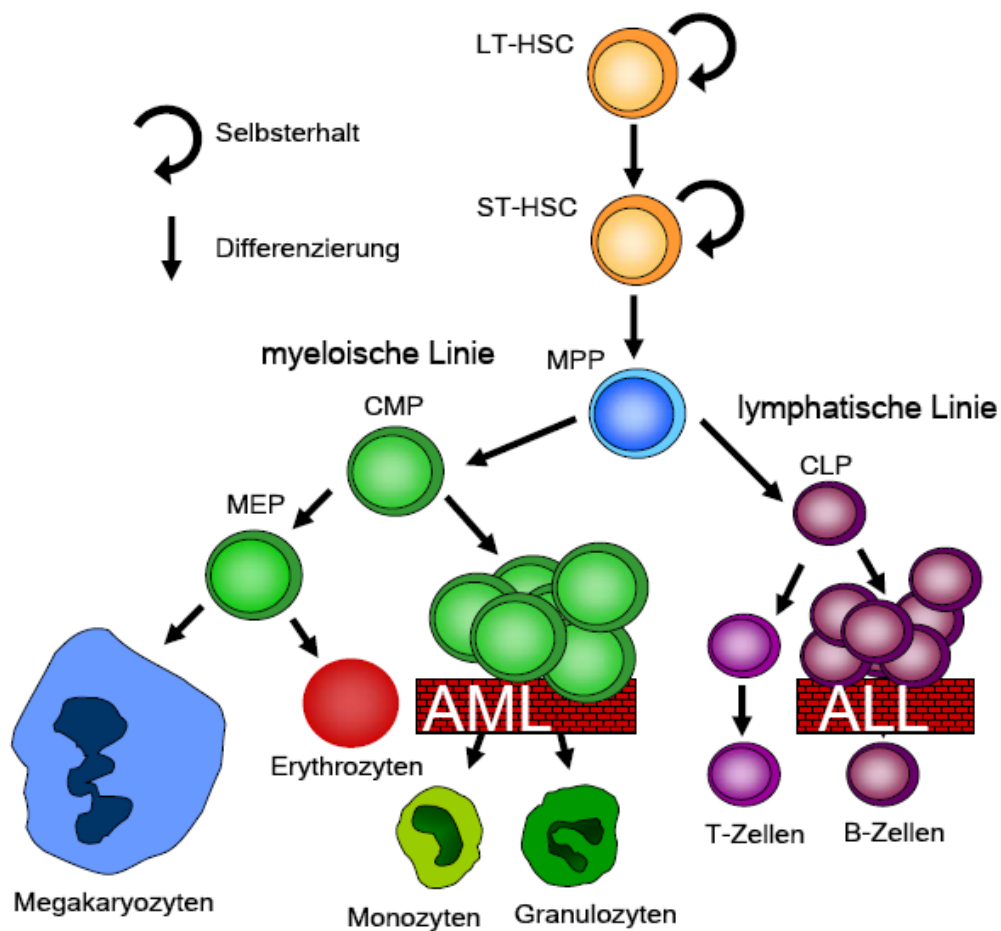
**Signalwirkung:** Die Aktivierung und damit verbundene Signalwirkung des prä-BZR erfolgt vermutlich unabhängig von einem Liganden durch Zusammenlagerung mehrerer Rezeptorproteine (Bankovich et al., 2007). Hendriks et al. unterscheiden vier wichtige Wirkungsrichtungen der teilweise zusammenlaufenden Signale des prä-BZR und des IL-7R (Hendriks and Kersseboom, 2006). (1) Sie verhindern eine Rekombination auf dem zweiten IgH Allel (*Allelic Exclusion*), um zu gewährleisten, dass wirklich nur ein einziger spezifischer BZR exprimiert wird. (2) Sie stimulieren die Zellteilung und

verhindern den Zelltod durch Expression pro-proliferativer (N-myc, c-myc) und anti-apoptotischer (Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>) Faktoren. (3) Sie beenden die Zellteilung durch Minderung der Expressionsniveaus von SLC und IL-7R Genen. (4) Sie fördern die Reifung der Zelle und leiten die ersten Schritte zur Rekombination des *IgL* Locus ein. Die Vermittlung dieser Signale erfolgt durch zahlreiche Signalproteine.

Der BZR erfüllt zwei Hauptaufgaben: (1) Er leitet regulatorische Signale weiter, die über das Schicksal der jeweiligen B-Zelle entscheiden und (2) vermittelt die Prozessierung von Antigenen, die daraufhin den T-Zellen präsentiert werden, was zu einer vollständigen Aktivierung der B-Zellen führt (Niiro and Clark, 2002). Da sich diese Einleitung auf die früheren Stadien der B-Zell-Entwicklung beschränkt, wird nur Punkt (1) näher erläutert. Bindet ein Antigen an den BZR kommt es zur Signalwirkung des B-Zell-Rezeptors über verschiedene Signalproteine und Signalkaskaden. Im Stadium der unreifen B-Zelle erfolgt auf diesem Weg ein Selektionsprozess, der autoreaktive und tolerante BZR unterscheidet. Nur in unreifen B-Zellen, die körpereigene Antigene erkennen, wird der BZR aktiv. Dies führt zur Eliminierung der autoreaktiven Zellen, ein Prozess, der auf 3 Wegen erfolgen kann: (A) BZR-induzierter Zelltod, (B) Inaktivierung oder (C) Korrektur der BZR-Spezifität. Unreife B-Zellen, die diesen Kontrollpunkt passiert haben, verlassen das Knochenmark. Sie wandern in die Milz und unterliegen dort, und später in den Lymphknoten, weiteren Selektionsprozessen und Reifungsvorgängen, die unter anderem auch über den BZR gesteuert werden (Niiro and Clark, 2002).

### 1.3 Die Leukämie

Wenn die Selbsterneuerungs- und Differenzierungs-Prozesse hämatopoetischer Zellen während der Entwicklung aus dem Gleichgewicht geraten, kann dies zur Entstehung einer Leukämie führen. Diese bösartige Erkrankung ist gekennzeichnet durch eine unbegrenzte Teilungsfähigkeit der betroffenen Zellen, die sich massiv in Knochenmark, Blut und anderen Organen ausbreiten. Akute Leukämien sind durch unterschiedliche genetische Auffälligkeiten, klinische Charakteristika und schwankende Heilungserfolge gekennzeichnet. Ihre Klassifizierung erfolgte bereits vor 25 Jahren anhand morphologischer Kriterien durch die sogenannte *French-American-British* (FAB) Klassifikation. Die Weltgesundheitsorganisation (*WHO*) hat ein neues Klassifikationssystem eingeführt, für das zusätzlich zytogenetische, molekulargenetische und immuno-phänotypische Erkenntnisse in Betracht gezogen werden. Diese diagnostischen Mittel sind wichtig, um die Art der Leukämie möglichst genau zu bestimmen und mit Hilfe dieser Informationen gezielte Therapien einleiten zu können (Gilliland and Tallman, 2002).

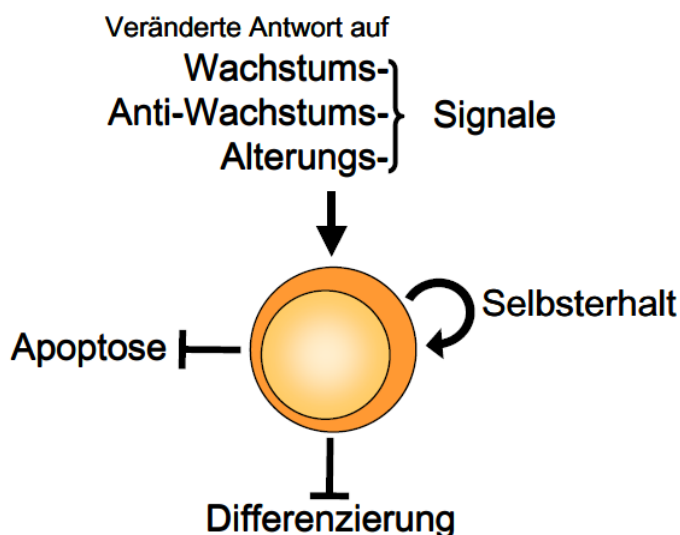


**Abbildung 1.8** Akute myeloische Leukämien (AML) und akute lymphatische Leukämien der B-Zellen (B-ALL) sind durch eine Differenzierungsblockade in der jeweiligen hämatopoetischen Linie gekennzeichnet.



Abhängig davon, ob die leukämischen Zellen noch ausdifferenzieren oder in einem unreifen Entwicklungsstadium blockiert sind, handelt es sich um chronische oder akute Leukämien. Im weiteren Verlauf dieser Einleitung werden die akuten Leukämien im Vordergrund stehen. Hier unterscheidet man akute myeloische Leukämien (AML) und akute lymphatische Leukämien (ALL) (Abbildung 1.8). AML treten vermehrt im Erwachsenenalter auf, wobei die Anzahl der Erkrankungen ab einem Alter von 40 Jahren linear ansteigt und der Median bei etwa 65 Jahren liegt. Das alters-spezifische Auftreten der ALL hat ihren Höhepunkte im Alter von 2 und 4 Jahren, nimmt während des späten Kindes- und frühen Erwachsenenalters ab und steigt bei älteren Erwachsenen noch mal an (Gilliland and Tallman, 2002).

Viele Anzeichen deuten darauf hin, dass es sich bei der Krebsentstehung um einen mehrstufigen Prozess handelt (Hanahan and Weinberg, 2000). Vermutlich müssen auch zur Entstehung einer Leukämie erst mehrere genetische Veränderungen erfolgen, bevor aus einer normalen hämatopoetischen Zelle eine leukämische Zelle wird.



**Abbildung 1.9** Was macht aus einer hämatopoetischen Zelle eine leukämische Zelle? Die normalen Mechanismen der Selbstregulation müssen umgangen werden. Abgewandelt nach Pui et al. (Pui et al., 2004).

Bei einer akuten Leukämie sammeln sich große Mengen unreifer Zellen an. Diese sogenannten Blasten entwickeln sich, abhängig von der Art der Leukämie, nur bis zu einem unreifen Differenzierungsstadium. Dies deutet darauf hin, dass die Störung des normalen Differenzierungsprogramms in Verbindung mit der Entwicklungsblockade ein Schlüsselereignis während der Leukämogenese darstellt. Zusätzlich muss es im leukämischen Klon zu Veränderungen kommen, die ihm einen deutlichen Zellteilungs- oder Selbsterneuerungs-Vorteil vermitteln, damit er die übrigen Zellen überwachsen kann.

Auch Störungen in Signalwegen, die für den Zelltod verantwortlich sind, führen im Zuge des dadurch vermittelten Überlebensvorteils zu einer Vermehrung der anomalen Zellen. Für die unbegrenzte Teilungsfähigkeit der Zellen ist es schließlich wichtig, Mechanismen zu erwerben, die zur Erhaltung der Telomer-DNA beitragen. Zusammenfassend sind also folgenden Eigenschaften an der Entstehung einer leukämischen Zelle beteiligt: blockierte Differenzierung, verstärkte Zellteilung, verändertes Selbsterneuerungs-Potenzial, Überlebensvorteil und Telomer-Erhalt (Abbildung 1.9) (Warner et al., 2004).

Welche genetischen Veränderungen wurden in akuten Leukämien gefunden? Und welche der oben genannten „leukämischen Eigenschaften“ vermitteln sie? Bei der Beantwortung dieser Fragen kann ein 2001 von Dash und Gilliland vorgestelltes vereinfachtes Modell der Leukämogenese helfen (Dash and Gilliland, 2001). Sie unterscheiden zwei Klassen von Mutationen. Klasse 1 Mutationen vermitteln den hämatopoetischen Vorläuferzellen einen Zellteilungs- und Überlebensvorteil, beeinflussen jedoch nicht die Differenzierung. Klasse 2 Mutationen verändern das Differenzierungsprogramm und können zu einer Expansion hämatopoetischer Vorläuferzellen führen. Eine leukämische Zelle ist also deshalb durch verstärkte Zellteilung, den Überlebensvorteil und eine Differenzierungsblockade gekennzeichnet, weil in ihr Mutationen beider Klassen vorliegen (Gilliland and Tallman, 2002). Bereits im Jahr 1983 ging eine solche These aus Studien mit dem Vogel-Erythroblastose-Virus (AEV, *Avian Erythroblastosis Virus*) hervor. Die vollen transformierenden Eigenschaften dieser Viren kamen nur durch das Zusammenwirken zweier Gene zustande, die Zellteilungsraten und Differenzierungsvorgänge der Wirtszellen veränderten (Graf and Beug, 1983).

**Klasse 2 Mutationen:** In die Gruppe der Klasse 2 Mutationen lassen sich chromosomale Translokationen (A) und Mutationen (B) von Transkriptionsfaktoren einordnen. Translokationen werden in etwa 50% aller akuten Leukämien gefunden und entstehen durch die Rekombination zweier nicht-homologer Chromosomen. Dieser Vorgang führt dazu, dass zwei Gene fälschlicherweise miteinander verknüpft werden, wodurch es zur Bildung eines sogenannten Fusionsproteins kommt, das in gesunden Zellen normalerweise nicht vorkommt. Umfangreiche Gen-Expressions-Analysen haben die Vermutung untermauert, dass spezifische chromosomale Translokationen bezeichnend für bestimmte Leukämie-Subtypen sind. Üblicherweise stören Translokationen die geregelte Expression der Transkriptionsfaktoren. Diese kontrollieren in vielen Fällen die Differenzierung, werden abhängig vom Entwicklungsstand reguliert und kodieren meist für Proteine, die an der Spitze transkriptioneller Kaskaden stehen. Solche onkogenen Transkriptionsfaktoren, die nachgeschaltete Gene entweder positiv

oder negativ kontrollieren, werden in leukämischen Zellen anormal, zum Beispiel in Form eines Fusionsproteins oder als Mutante, exprimiert (Pui et al., 2004).

(A) Fast die Hälfte aller AML Fälle sind durch das Auftreten einer chromosomalen Translokation gekennzeichnet (Abbildung 1.10). Betreffen solche genetischen Veränderungen den Retinolsäure-Rezeptor alpha (*Retinoic Acid Receptor alpha*, RAR $\alpha$ ), leiden die Leukämiepatienten unter einer Blockade der granulozytären Differenzierung. Ein noch früheres Stadium der myeloischen Entwicklung ist von der Translokation t(8;21) betroffen. Die Gene *RUNX1* (*Runt Related Transcription Factor 1*) (Chromosom 21) und *ETO* (*Eight Twenty One Oncogene*) (Chromosom 8) werden hierbei miteinander verknüpft und kodieren für das Fusionsprotein AML1-ETO. Es wird, abhängig vom genetischen Hintergrund und geographischer Lage, in 8 bis 20% aller AML Fälle gefunden (Gilliland et al., 2004).

Translokationen des *RUNX1* Gens spielen auch in der ALL eine wichtige Rolle. In etwa 25% aller Fälle mit früher B-Zell-ALL, der häufigsten Leukämieform in Kindern, kann das ETV6-RUNX1 (ETV6, *ETS Variant 6*) Fusionsprotein nachgewiesen werden, das durch die chromosomale Translokation t(12;21) entsteht. Es führt in Vorläuferzellen der B-Zell Linie zu einer gestörten Entwicklung der frühen B-Zellen, wodurch es zur Expansion sogenannter leukämischer Lymphoblasten kommt. Eine solche Störung tritt auch in Leukämien mit Translokationen des *MLL* (*Mixed Lineage Leukemia*) Gens auf, für das mehr als 40 Fusionspartner bekannt sind. Darunter befinden sich unter anderem *AF-4* (*AFF1, AF4/FMR2 family, member 1*) und *ENL* (*Eleven Nineteen Leukemia*), die an der Entstehung von ALLs beteiligt sind und besonders häufig im Säuglingsalter auftreten (Armstrong and Look, 2005; Pui et al., 2004).

(B) Neben den erwähnten Translokationen werden auch Mutationen und Deletionen von Transkriptionsfaktorgenen in akuten Leukämien gefunden. Das Gen *CEBPA* (*CCAAT/enhancer binding protein alpha*) kodiert für einen Transkriptionsfaktor (C/EBP $\alpha$ ), der in 9% aller AML Fälle mutiert ist (Radomska et al., 1998). C/EBP $\alpha$  ist während der normalen Hämatopoese in den frühen Stadien der myeloischen Differenzierung aktiv und wird in heranreifenden Granulozyten vermehrt exprimiert. Der Verlust dieser Funktionen kann durch die Blockade der granulozytären Differenzierung zur Entstehung einer Leukämie beitragen (Koschmieder et al., 2009; Schwieger et al., 2004). Die SNP-Technologie (SNP, *Single Nucleotide Polymorphism*) hat durch Genom-übergreifende Analysen von Proben aus Leukämiepatienten in neuster Zeit dazu beigetragen bis jetzt noch nicht entdeckte genetische Veränderungen zu identifizieren. Untersuchungen von ALL-Proben mit Hilfe dieser Methode haben gezeigt, dass in 40% der Fälle Transkriptionsfaktoren, die während der frühen B-Zell-Entwicklung wichtige Funktionen erfüllen, von Mutationen (PAX5), Deletionen (PAX5, IKAROS, EBF1) oder

Translokationen (PAX5) betroffen sind (Kawamata et al., 2008a; Kawamata et al., 2008b; Mullighan et al., 2007).

**Klasse 1 Mutationen:** Ein Gen, das den Klasse 1 Mutationen zugeordnet wird, ist *FLT3* (*FMS-like Tyrosine Kinase 3*), das am häufigsten mutierte Gen in akuten Leukämien. Man unterscheidet zwei Arten von Mutationen dieser Rezeptor-Tyrosinkinase. (1) Interne Tandem-Duplikationen (ITD) betreffen die Juxtamembran-Domäne des Rezeptors und liegen in der Größenordnung zwischen 3 und 400 Basenpaaren, wobei das Leseraster des *FLT3* Gens erhalten bleibt (Abbildung 1.3). Die Folge der ITD Mutation ist eine unkontrollierte Signalwirkung der Tyrosinkinase, wodurch es zu einer andauernden Aktivierung von Signalwegen kommt, die dafür bekannt sind, dass sie einen Zellteilungs- und Überlebens-Vorteil vermitteln, zum Beispiel RAS/MAP-Kinase, STAT5 und PI3K/AKT (MAP-Kinase, *Mitogen Activated Proteinkinase*; STAT5, *Signal Transducer and Activator of Transcription 5*; PI3K, *Phosphatidylinositol 3-Kinase*; PKB/AKT, *Protein Kinase B*). (2) Punktmutationen betreffen häufig die Asparaginsäure 835, die in der Kinase-Domäne (KD) des FLT3 Rezeptors liegt. Sie führen, wie ITD, zur konstitutiven Aktivierung von FLT3 (Gilliland et al., 2004; Small, 2006). Abbildung 1.10 zeigt, dass FLT3-aktivierende Mutationen in etwa 30 bis 35% aller AML Fälle nachweisbar sind. Ihr Vorkommen in Patienten mit AML1-ETO und RAR $\alpha$  Translokationen liegt dem oben besprochenen Modell der 2 Mutationsklassen zugrunde. Auch in Kindern mit B-Zell-ALL (B-ALL) werden ITD und KD Mutationen gefunden (Abbildung 1.11). Betroffen sind hier besonders die Fälle mit einer MLL Translokation und Patienten mit hyperdiploidem Chromosomensatz, deren leukämische Zellen durch das Auftreten von mehr als 46 Chromosomen gekennzeichnet sind.

Neben FLT3 werden auch aktivierende Mutationen von *KIT* und *RAS* zu den Klasse 1 Mutationen gezählt (Gilliland and Tallman, 2002). *KIT* kodiert für eine Rezeptor-Tyrosinkinase (c-KIT), die besonders häufig in Patienten mit AML1-ETO Translokation mutiert ist (Warner et al., 2004). *RAS* Onkogene kodieren für eine Familie der Guanin-Nukleotid-bindenden Proteine. Diese regulieren die Weiterleitung von Signalen, indem sie an membrangebundene Rezeptoren wie zum Beispiel c-KIT und FLT3 binden. Mutationen dieser Gene sind in fast 20% aller AML Patienten zu finden (Renneville et al., 2008).

Die vorliegende Arbeit soll durch die nähere Untersuchung einer aktivierenden FLT3 Mutation dabei helfen zu verstehen, wie diese kooperierenden genetischen Veränderungen und die dadurch betroffenen Signalwege interagieren, um Zellteilung, Differenzierung und Überleben hämatopoetischer Zellen zu verändern und sie dadurch zu leukämischen Zellen transformieren.

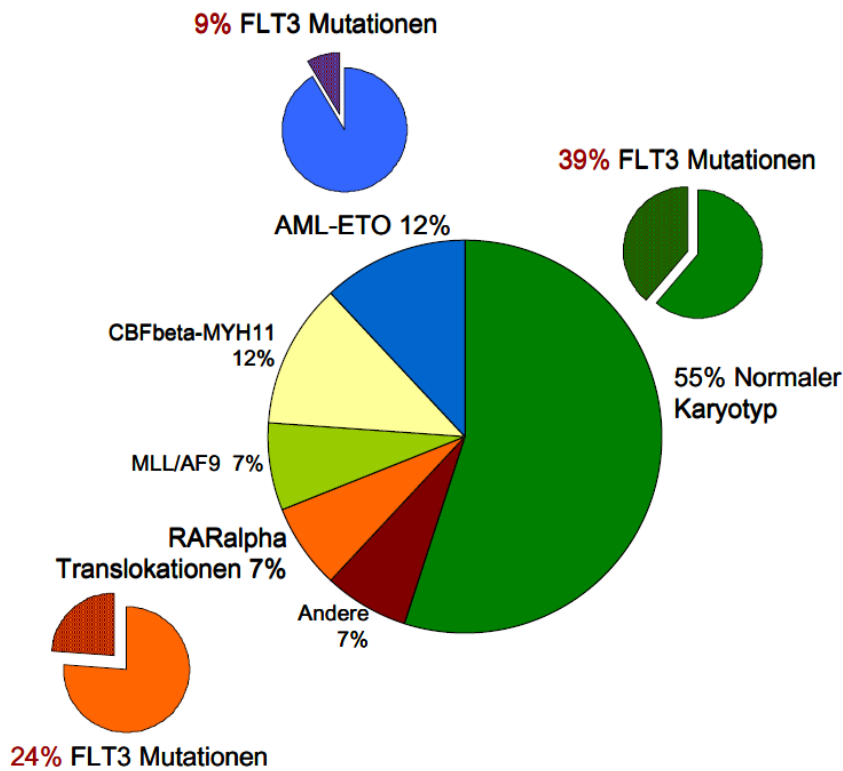


Abbildung 1.10 FLT3 Mutationen in AML. Abgewandelt nach Look et al. (Look, 1997; Schnittger et al., 2002; Thiede et al., 2006).

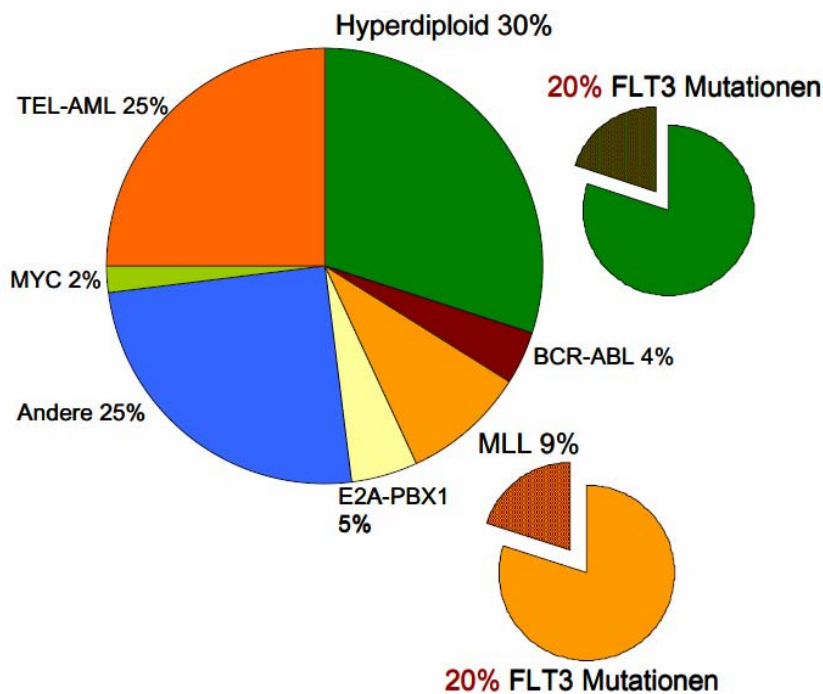


Abbildung 1.11 FLT3 Mutationen in pädiatrischer B-ALL. Abgewandelt nach Armstrong et al. (Armstrong and Look, 2005; Armstrong et al., 2004; Paulsson et al., 2008; Taketani et al., 2004).

## Fragestellung

FLT3 ist eines der am häufigsten mutierten Gene in akuten Leukämien. Es kodiert für eine Rezeptor-Tyrosinkinase, die durch ihre normale Signalwirkung die Differenzierung, Zellteilung und Apoptose früher hämatopoetischer Zellen der myeloischen und lymphatischen Linie beeinflusst. Mutationen von FLT3 führen zu einer unkontrollierten, andauernden Signalwirkung des Rezeptors und bringen dadurch die oben genannten Prozesse aus dem Gleichgewicht. Solche Störungen der hämatopoetischen Entwicklung spielen auf dem Weg zur Entstehung von akuten myeloischen und lymphatischen Leukämien (AML und ALL) eine wichtige Rolle.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen Mausmodelle etabliert werden, um zu untersuchen, wie sich die Expression eines FLT3 Rezeptors mit interner Tandem-Duplikation (FLT3-ITD) auf die Entwicklung hämatopoetischer Zellen von Maus (Allotransplantation) und Mensch (Xenotransplantation) *in vivo* auswirkt. FLT3 Mutationen treten häufig in Verbindung mit weiteren genetischen Veränderungen auf, deshalb führt ihre Expression allein vermutlich nicht zur Entstehung einer Leukämie. Das Modell der Allotransplantation soll deshalb durch den *Irf8*<sup>-/-</sup> Mausstamm erweitert werden. In diesen Tieren ist das hämatopoetische System durch myeloische und lymphatische Entwicklungsstörungen bereits vorgeschädigt. Das fehlende *Irf8* soll eine zusätzliche genetische Veränderung darstellen, die bei der Entstehung einer Leukämie möglicherweise mit FLT3-ITD kooperiert oder deren Verlauf oder Phänotyp beeinflusst.

Für die Experimente soll FLT3-ITD cDNA eines Leukämiepatienten (FLT3mut) in einen retroviralen Vektor kloniert werden, der hämatopoetische Zellen effektiv infiziert und stabil in das Wirtsgenom integriert. Er soll zur Infektion von murinem Knochenmark oder humanen Primärzellen aus Nabelvenenblut verwendet werden. Die infizierten Zellen sollen in genetisch identische Empfängertiere beziehungsweise immundefiziente NOD/*scid* Mäuse transplantiert werden, deren hämatopoetischen Organe in einem Beobachtungszeitraum von 3 Monaten auf etwaige FLT3mut bedingte makroskopische und mikroskopische Befunde untersucht werden sollen. Durchflußzytometrische Analysen von Knochenmark-, Milz- und Blutzellen sollen zeigen, ob und falls ja, in welchen Blutlinien, es durch die Expression von FLT3mut zu unkontrollierter Zellteilung oder gestörten Differenzierungsprozessen kommt.

Aus Untersuchungen zur Signalwirkung von aktiviertem FLT3 ist bekannt, dass die Expression von FLT3-ITD zu einer verstärkten Aktivierung von STAT5 führt. Aus diesem Grund soll außerdem untersucht werden, ob STAT5 auch in den FLT3mut Zellen der etablierten Modelle aktiviert ist und falls ja, ob sich der FLT3mut Effekt im Allotransplantations-Modell durch Expression eines aktivierten STAT5 imitieren lässt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

Sofern nicht anders angegeben, wurden Reagenzien und Chemikalien von Sigma (Taufkirchen), MERCK (Darmstadt), Invitrogen (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), MBI-Fermentas (St. Leon-Rot) oder BD Beckton-Dickinsen (Heidelberg) bezogen.

#### 2.1.1 Enzyme

Alle in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Enzyme wurden von MBI-Fermentas bezogen und gemäß den Herstellerangaben eingesetzt.

#### 2.1.2 Kits

BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems (Darmstadt)
DecaLabel™ DNA Labeling Kit	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
DNA Gel Extraction Kit	Millipore (Schwalbach)
Amersham ECL-Detection™ plus Kit	(GE Healthcare, Little Chalfont, UK)
Easy Sep™ Human Cord Blood CD34 Selection Kit	Stem Cell Technologies (Vancouver, Kanada)
Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden)
Profection Mammalian Transfection System Calcium Phosphate	Promega (Mannheim)
Qiaquick PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)
Taq Polymerase Core Kit	Qiagen (Hilden)

#### 2.1.3 Medien

##### 2.1.3.1 Bakterienkulturmedien

Luria-Bertani (LB) Medium	10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Bacto-Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, pH 7,5 eingestellt mit NaOH
LB Agar	5 g/l Agar in LB Medium

Die Medien wurden 20 Minuten bei 121°C (1,1 kg/cm<sup>2</sup>) autoklaviert. Dem Agar wurde nach Abkühlen auf 55°C 100 µg/ml Ampizillin zugesetzt, bevor er in Petrischalen gegossen wurde. Dem Flüssigmedium wurde vor Gebrauch 100 µg/ml Ampizillin zugesetzt.

### 2.1.3.2 Medien, Reagenzien und Lösungen für Zellkultur und Mäuseversuche

#### Zellkulturlösungen und Reagenzien

BSA-Lösung	2% BSA, Zellkultur getestet
Chloroquine-Lösung	25mM Chloroquine in PBS
FCS	Fötale Kälberserum (SIGMA, Taufkirchen)
Ficoll	Amersham Biosciences, Freiburg
HBSS-Lösung	HBSS versetzt mit 20mM HEPES
PBS	140 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7,4.
PenStrep	5000 U/ml Penizillin, 5000 µg/ml Streptomycin
Polybrene-Lösung	8mg Polybrene (Sigma, Taufkirchen) pro ml PBS
RetroNectin®-Lösung	48µg RetroNectin® (Cambrex, Karlskoga, Schweden)/ml PBS
Lyse-Puffer	10% (v/v) BD PharmLyse 10x Konzentrat in Wasser
Serum Supreme	Synthetisch modifiziertes Kälberserum (Cambrex Bioscience, Verviers, Belgien)
Trypsin-Lösung	20% (v/v) Trypsin/EDTA 10 × Konzentrat (Biochrom, Berlin) in Wasser

#### Zytokine

Gelöst nach Herstellerangaben

Muriner Stammzell-Faktor (mSCF)	Strathmann (Hamburg)
Murines Interleukin-3 (mIL-3)	Strathmann (Hamburg)
Humaner FLT3-Ligand (hFLT3-L)	CellSystems (St. Katharinen)
Humanes Interleukin-11 (hIL-11)	CellSystems (St. Katharinen)
Humanes Thrombopoetin (hTPO)	CellSystems (St. Katharinen)
Humaner Stamzell-Faktor(hSCF)	CellSystems (St. Katharinen)
Humanes Interleukin-6 (hIL-6)	CellSystems (St. Katharinen)

#### Zellkulturmedien

DMEM-Medium	DMEM (PAA, Pasching, Österreich), 10% (v/v) Serum Supreme für Phoenix-gp oder FCS für Sc-1 und TE-671, 4 mM Glutamin, 1 mM Natrium-Pyruvat; pH 8,2; eingestellt mit Natrium-hydrogencarbonat
DMEM- HEPES-Medium	DMEM, 20 mM HEPES; pH 7,2
DMEM-Polybrene-Medium	DMEM, 8 µg/ml Polybrene
Einfriermedium	90% (v/v) FCS, 10% (v/v) DMSO
IMDM	IMDM Trockensubstanz gelöst in Wasser



	(auf 280 mOs); pH 7,6
IMDM-Medium	IMDM, 5%FCS, 1% PenStrep, 2% Glutamin
SFEM-Medium (murin)	Stem Span SFEM (Cell Systems, St. Katharinen), 4 mM Glutamin, 1 mM Natrium-Pyruvat, 1% PenStrep, 50 ng/ml mSCF, 10 ng/ml mL-3, 100 ng/ml hIL-11, 100 ng/ml hFLT3-L
SFEM-Medium (human)	Stem Span SFEM, 4 mM Glutamin, 1 mM Natrium- Pyruvat, 1% PenStrep, 100 ng/ml hFLT3-L, 20 ng/ml hTPO, 100 ng/ml hSCF, 20 ng/ml hIL-6

### Lösungen und Reagenzien für Mausversuche

Baytril®, orale Lösung, Wirkstoff: Enrofloxacin	BayerVital GmbH (Leverkusen)
Fluorouracil-GRY®, Injektionslösung, Wirkstoff: 5-Fluorouracil (5-FU)	GRY-Pharma GmbH (Kirchzarten)
ProTaqS CALfix	BIOCYC GmbH & Co (Luckenwalde)
ProTaqS CALless	BIOCYC GmbH & Co (Luckenwalde)

#### 2.1.4 Bakterienstamm

Für die vorliegende Arbeit wurde der *Escherichia coli* Laborstamm XL10-Gold® (Stratagene, La Jolla, USA) verwendet. Die Herstellung kompetenter Bakterien mit Kalziumchlorid, die Transformation, die Kultivierung und die Stammhaltung erfolgten nach Standardmethoden (Sambrook and Russel, 2001).

#### 2.1.5 Mäusstämme

Die Allotransplantations-Experimente wurden mit Hilfe von C57BL/6J (Jackson Laboratory) oder C57BL/6J Irf8<sup>-/-</sup> (Holtschke et al., 1996) Mäusen durchgeführt. Zur Unterscheidung zwischen Spender- und Empfängerzellen wurden Zellen aus Mäusen mit der Antigen-Variante Ly 5.2 in Mäuse transplantiert, die abgesehen vom Ly 5.1 Antigen genetisch identisch waren.

Die Xenotransplantation erfolgte in Tiere des NOD/*scid* Stammes (Prochazka et al., 1992). Da es sich bei diesem Mäusstamm um immundefiziente Tiere handelt, wurden sie in sterilen Isolator Käfigen gehalten und nur mit sterilen Futtermitteln und Trinkwasser versorgt. Die Handhabung erfolgte unter der Sterilwerkbank.

### 2.1.6 Zellen

#### 2.1.6.1 Primäre Zellen

##### Primärzellen aus murinem Knochenmark

Die Gewinnung der Knochenmarkszellen erfolgte aus C57BL/6J Irf8<sup>+/+</sup> und C57BL/6J Irf8<sup>-/-</sup> Mäusen und wird im Methodenteil (2.2) der vorliegenden Arbeit erklärt.

##### Primärzellen aus humanem Nabelvenenblut

Die Entnahme des Nabelvenenblutes erfolgte mit Genehmigung einer Ethikkommission der Hamburger Ärztekammer und dem Einverständnis der Eltern im Albertinen-Krankenhaus Hamburg. Die Aufarbeitung ist im Methodenteil dieser Arbeit beschrieben.

#### 2.1.6.2 Zelllinien

Phoenix-gp            Derivat der aus humanen, embryonalen Nierenzellen gewonnenen Zelllinie 293T mit stabiler Expression der *gag* und *pol* Genprodukte. ATCC #3514. Die werden von ATCC kommerziell vertrieben. Weitere Informationen (gefunden im Februar 2009) unter:

[http://www.stanford.edu/group/nolan/retroviral\\_systems/phx.html](http://www.stanford.edu/group/nolan/retroviral_systems/phx.html)

Die Kultivierung erfolgte in DMEM-Medium.

SC-1                    Aus Mausembryo-Fibroblasten gewonnene Zelllinie, ATCC #CRL-1404. Die Kultivierung erfolgte in DMEM-Medium.

TE-671                Humane Rhabdomyosarkom-Zelllinie (McAllister et al., 1977), DSMZ Nummer ACC263. Die Kultivierung erfolgte in DMEM-Medium.

### 2.1.7 Puffer

#### 2.1.7.1 DNA-analytische Methoden

##### Gelelektrophorese

1 × TAE	40 mM Tris, 1 mM EDTA, 20 mM Essigsäure
1 × TAE (modifiziert)	40 mM Trisacetat (pH 8,0), 0,1 mM EDTA
1 × TBE	89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA
TE	10 mM Tris/HCl (pH 8,0), 0,1 mM EDTA (pH 8,0)

##### Isolation genomischer DNA aus Organen

Puffer 1	75 mM NaCl, 25 mM EDTA (pH 8)
Puffer 2	10 mM Tris/HCl (pH 8), 10 mM EDTA (pH 8), 10 mM NaCl. Vor Gebrauch Zugabe von 1% SDS, 200 µg/ml Proteinase K.

### Southern-Blot Verfahren

20 × SSC	3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat; pH 7
50 × Denhardt	1% (w/v) Ficoll, 1% (w/v) Polyvinylpyrrolidon, 1% (w/v) BSA
Denaturierungslösung	0,5 M NaOH, 1 M NaCl
Neutralisierungslösung	1,5 M NaCl, 0,5 M Tris; pH 7,5
Hybridisierungspuffer	6 × SSC, 0,5 M deionisiertes Formamid, 0,5% SDS, 2,5 × Denhardt, 8% Dextransulfat, 100 µg/ml Lachssperma-DNA
Waschlösung I	1 × SSC
Waschlösung II	0,1% SDS, 0,1 × SSC

### 2.1.7.2 Proteinbiochemische Methoden

10 x TBS	1,5 M NaCl, 0,1 M Tris/HCl (pH 8,0)
TBS-Tween	1/10 10 x TBS, 0,5% Tween
TCA-Lysepuffer	10 mg Trichloracetat in 100 ml 150 mM NaCl-Lösung
10 x Laufpuffer	2 M Glycin, 250 mM Tris Base
1 x Laufpuffer	1/10 10 x Laufpuffer, 1% SDS
10% APS	10 g APS in 100 ml ddH <sub>2</sub> O
Sammelgelpuffer	500 mM Tris Base, 0,1% SDS, mit HCl exakt auf pH 6,8 eingestellt
Trenngelpuffer	1,5 M Tris Base, 0,1% SDS, mit HCl exakt auf pH 8,8 eingestellt
Sammelgel (5%ig)	500 mM Tris/HCl (pH 6,8), 5% Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1), 0,1% SDS, 0,5% APS, 0,05% TEMED
Trenngel (8,5%ig)	370 mM Tris/HCl (pH 8,8), 8,5% Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1), 0,1% SDS, 0,5% APS, 0,05% TEMED
2 x Probenpuffer	250 mM Tris/HCl (pH 6,8), 4% SDS, 25% Glycerol
3 x Probenpuffer	180 mM Tris/HCl (pH 6,8), 6% SDS, 28% Glycerol, 0,001% Bromphenolblau
Transferpuffer	1 x Laufpuffer, 20% (v/v) Methanol
Block-Puffer	1 x TBS, 0,5% Tween, 5% Magermilchpulver
Wasch-Puffer	1 x TBS, 0,5% Tween, 2% Magermilchpulver

### 2.1.8 Antikörper

#### 2.1.8.1 Proteinbiochemische Methoden

##### Primäre Antikörper

Anti-STAT5	Kaninchen IgG, 1:2000 eingesetzt, #610191 (Beckton-Dickinsen, Heidelberg)
Anti-FLT3 (8F2)	Kaninchen IgG, 1:1000 eingesetzt, 130-160kD; #3462 (CellSystems, St. Katherinen)
Anti-Phospho-STAT5 (Y694)	Maus IgG, 1:2000 eingesetzt, 90kD; #9351 (CellSystems, St. Katherinen)
Anti-Phospho-FLT3 (Y591)	Kaninchen IgG, 1:1000 eingesetzt, 130kD; #3461 (CellSystems, St. Katherinen)
Anti- $\beta$ -Aktin	Maus IgG, 1:10 000 eingesetzt, 130kD; A5316 (Sigma, Taufkirchen)

##### Sekundäre Antikörper

Anti-Kaninchen-HRP	Ziege IgG, konjugiert mit Meerrettich Peroxidase, 1:5000 eingesetzt, #sc-2004 (Santa Cruz).
Anti-Maus-HRP	Ziege IgG, konjugiert mit Meerrettich Peroxidase, 1:5000 eingesetzt, #sc-2005 (Santa Cruz)

## 2.1.8.2 Durchflußzytometrie

Die aufgeführten Antikörper wurden gemäß den Herstellerangaben zur Färbung von Zellen eingesetzt.

## Antikörper anti-Maus

Antikörper	Fluorochrom	Hersteller	Klon	Katalognummer
CD3e	APC	BioLegend	145-2C11	#100312
CD4	APC	BioLegend	RM5-4	#100516
CD8a	PE	Pharmingen	53-6.7	#553033
CD19	APC	BioLegend	6D5	#115512
CD24	PE	BioLegend	M1/69	#101808
CD25	PE	Pharmingen	7D4	#01092D
CD43	Biotin + SA-APC	BioLegend	1B11	#121214
B220	PE	BioLegend	RA3-6B2	#103208
CD71	PE	BioLegend	RI7217	#113808
CD90.2	PE	Pharmingen	53-2.1	#553004
CD117	APC	BioLegend	2B8	#105812
CD127	PE	BioLegend	SB/199	#121112
Ter119	APC	BioLegend	Ter-119	#116212
IgM	Biotin + SA-APC	BioLegend	RMM1	#406504
BP-1, Ly51	Biotin + SA-APC	BioLegend	6C3	#108304
AA4.1	PE	Pharmingen	AA4.1	#558039
<b>Antikörper zur Kompensation</b>				
CD45 LCA	PE	BioLegend	30-F11	#103106
CD45 LCA	APC	BioLegend	30-F11	#103112
<b>Isotypkontrollen</b>				
IgG <sub>1k</sub>	PE	BioLegend	RTK2071	#400408
IgG <sub>1k</sub>	APC	BioLegend	RTK2071	#400412
<b>Zweitantikörper</b>				
Streptavidin (SA)	APC	BioLegend	-	#405207

Antikörper anti-human

Antikörper	Fluorochrom	Hersteller	Klon	Katalognummer
CD15	PE	BD Pharmingen	WM53	#551378
CD33	APC	BD Pharmingen	HI98	#555402
CD45	PE-Cy7	BioLegend	HI30	#304016
<b>Antikörper zur Kompensation</b>				
CD45	PE	BioLegend	HI30	#304008
CD45	APC	BD	2D1	#340910
<b>Isotypkontrollen</b>				
Maus IgG <sub>1</sub>	PE	BD	X40	#345816
Maus IgG <sub>1</sub>	APC	BD Pharmingen	MOPC-21	#557872
Maus IgG <sub>1</sub>	PE-Cy7	BD Pharmingen	MOPC-21	#555751

2.1.9 Plasmide

Die Bezeichnungen R und # unterscheiden Plasmide, die im Labor hergestellt wurden (R) von denen, die aus anderen Quellen bezogen wurden (#).

Retrovirale Konstrukte

- #634 pMys-i-GFP;  $\gamma$ -retroviraler Vektor, (Kitamura et al., 2003)
- #731 pSF91-STAT5A1\*6-i-GFP; (Onishi et al., 1998)
- #733 pSF91-STAT5B1\*6-i-GFP; (Onishi et al., 1998)
- R780 pSF91-i-GFP;  $\gamma$ -retroviraler Vektor, (Schwieger et al., 2002)
- R1079 pMYs-FLT3/ITD-i-GFP; im Rahmen der vorliegenden Arbeit kloniert.

Helferplasmide für die Virusproduktion

- #522 pEcoenv-I-puro; trägt das ökotrope *ecoenv*-Gen unter Kontrolle des EF1 $\alpha$  Promotors (Morita et al., 2000).
- R690 pSV40-gag-pol; trägt die MoMLV *gag*- und *pol*-Gene unter Kontrolle des SV40 Promotors (Beyer et al., 2002).
- R916 phCMV-RD114env; trägt das RD114env-Gen unter Kontrolle des CMV Promotors (Cosset et al., 1995).

### **2.1.10 Geräte**

Genannt werden hier nur die für die Datenerhebung relevanten Geräte. Weitere Geräte wie Zentrifugen, Pipetten, Waagen und Brutschränke entsprechen heutigen Laborstandards und werden nicht gesondert aufgeführt.

Durchflußzytometer            BD FACS Canto Flow Cytometer mit der FACS Diva Software Version 4.1.2 (Becton Dickinson, Heidelberg)

Durchflußzytometer            BD FACS Aria Flow Cytometer mit Sortierfunktion und FACS Diva Software Version 4.1.1 (Becton Dickinson, Heidelberg)

### 2.2 Methoden

Alle hier geschilderten Methoden wurden mit den im Materialteil (2.1) beschriebenen Substanzen und Materialien durchgeführt. Die Hersteller werden in diesem Kapitel nicht erneut aufgeführt.

#### 2.2.1 Zellbiologische Methoden

Die Haltung aller in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Zellen erfolgte bei 37°C, 5%iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre und einer relativen Luftfeuchte von 95%. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten, sofern nicht anders angegeben, für 5 min bei RT und 300 ×g.

##### 2.2.1.1 Kultivierung der Zelllinien

SC-1, TE-671 und Phoenix-gp wurden in beschichteten Gewebekulturschalen subkonfluent gehalten. Je nach Dichte der Zellen und ihrer Wachstumsgeschwindigkeit wurden diese montags, mittwochs und freitags gefüttert oder passagiert und verdünnt. Für die Passagierung wurden die Zellen mit PBS gewaschen, durch Zugabe von Trypsin-Lösung abgelöst und in frischem Medium suspendiert. In Abhängigkeit der gewünschten Verdünnung wurden Aliquots der Zellen in frische Zellkulturschalen gegeben und mit einer geeigneten Menge Medium versetzt.

##### 2.2.1.2 Gewinnung der Primärzellen

Primäre Zellen aus Mausknochenmark oder humanem Nabelvenenblut wurden unter den oben genannten Bedingungen kultiviert. Die Haltung erfolgte in unbeschichteten Zellkulturschalen.

#### Murines Knochenmark

Allen Tieren (9 bis 16 Wochen alt) wurde 5 Tage vor der Knochenmarkentnahme 150 µg 5-Fluorouracil (5-FU) pro g Körpergewicht in einem Volumen von etwa 300 µl injiziert. Das 5-FU wirkt toxisch auf stark proliferierende Zellen und führt im hämatopoetischen System zur Anreicherung einer Population früher Vorläuferzellen. Nach Ablauf der 5 Tage wurden die zuvor narkotisierten Tiere durch Genickbruch getötet. Das Knochenmark wurde aus Ober- und Unterschenkelknochen (Tibiae und Femurae) steril entnommen. Dies geschah durch Ausspülen der Knochen mit Hilfe von Kanüle und Spritze, wobei das Knochenmark in ein Gefäß mit IMDM-Medium gespült wurde. Nach einem Waschschrift mit PBS/ 5% FCS, wurde die Zellsuspension in Lyse-Puffer aufgenommen, um die Erythrozyten durch den osmotischen Schock zum Platzen zu bringen. Der anschließende Waschschrift erfolgte mit SFEM-Medium, dem noch keine Zytokine zugesetzt worden waren. Das resultierende Zellpellet wurde in murinem SFEM-Medium resuspendiert, so dass pro ml



etwa  $1 \times 10^6$  bis  $3 \times 10^6$  Zellen vorlagen. Die Kultivierung erfolgte unter den oben angegebenen Bedingungen.

### Humane Primärzellen aus Nabelvenenblut

Das Blut wurde über einen Ficoll-Gradienten getrennt und die Zellen aus der Interphase für eine Positiv-Selektion verwendet. Die Gewinnung der Primärzellen erfolgte nach Herstellerangaben mit Hilfe des *Easy Sep<sup>TM</sup> Human Cord Blood CD34 Selection Kit*, das die CD34<sup>+</sup> Zielzellen immuno-magnetisch selektiert. Die gewonnenen Zellen wurden bis zu ihrer Verwendung nach dem unten beschriebenen Protokoll eingefroren.

#### 2.2.1.3 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Adhärente Zellen wurden vor dem Einfrieren mit Trypsin-Lösung aus der Kulturschale gelöst und zur Inaktivierung des Trypsins in frischem Kulturmedium aufgenommen. Nach einem Zentrifugationsschritt wurden bis zu  $5 \times 10^6$  Zellen in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und anschließend in gekühlten Einfriercontainern (Nalgene Cryo 1°C Freezing Container, Rochester, USA) bei  $-70^\circ\text{C}$  eingefroren. Nach 24 Stunden wurden die Zellen zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen wurden die Einfriereröhrchen im  $37^\circ\text{C}$  Wasserbad zügig erwärmt. Danach erfolgte der Transfer in 10 ml vorgewärmtes Kulturmedium. Nach der Zentrifugation wurden die Zellen in der gewünschten Menge Kulturmedium resuspendiert und anschließend kultiviert.

#### 2.2.1.4 Herstellung retroviraler Pseudotypen

Die unter 2.1.9 aufgeführten retroviralen Vektoren wurden in Form von infektiösen Partikeln zur Infektion hämatopoetischer Zielzellen verwendet. Da die genutzten viralen Partikel ausgesuchte Hüllproteine tragen, die im Ursprungsvirus nicht vorkommen, spricht man von viralen Pseudotypen. Durch den vom Hüllprotein vermittelten Tropismus lassen sich mit den Pseudotypen gezielt humane (*RD114*) oder murine (*eco-env*) Zelltypen infizieren.

Zur Herstellung der Pseudotypen wurden Phoenix-gp Zellen mit dem entsprechenden retroviralen Vektor und zwei Helferplasmiden, die für virale Hüllproteine bzw. *gag-pol* Proteine kodieren (siehe 2.1.10), nach der Kalzium-Phosphat-Methode transfiziert (Pear et al., 1993). Hierfür wurden Reagenzien des *Profection Mammalian Transfection System Calcium Phosphate Kit* eingesetzt. Das verwendete Protokoll wurde in dieser Abteilung entwickelt (Beyer et al., 2002). Die zu transfizierenden Phoenix-gp Zellen wurden am Abend vor der Transfektion mit einer Dichte von  $5 \times 10^6$  in einer 9 cm Zellkulturschale ausgesät. Am folgenden Morgen wurden das alte Medium durch 1 0ml

frisches DMEM-Medium, das 25 nM Chloroquine enthielt, ersetzt. Die Plasmid-DNA (5 µg retrovirale Plasmid-DNA und 10 µg *gag-pol* Plasmid-DNA und 3 µg *eco-env* Plasmid-DNA oder 5 µg *RD114* Plasmid-DNA) wurde in Wasser aufgenommen und mit 62,5 µl CaCl<sub>2</sub> auf ein Gesamtvolumen von 500 µl aufgefüllt. In einem 15 ml Polypropylen-Röhrchen wurden 500 µl Präzipitationspuffer vorgelegt. Das CaCl<sub>2</sub>-DNA-Gemisch wurde zum Präzipitationspuffer getropft. Gleichzeitig wurden mit Hilfe einer Pasteurpipette Luftblasen im Präzipitationspuffer erzeugt, um die Oberfläche des Präzipitationspuffers zu vergrößern. Das entstehende Calciumphosphat bildet mit der DNA unlösliche Präzipitate. Die Lösung wurde auf das Medium der Zellen in der Schale getropft. Die Präzipitate binden sich an die Oberfläche der Zellen und werden durch Endozytose aufgenommen. Sechs Stunden später wurde das alte Medium durch 6 ml frisches DMEM-HEPES ersetzt. Nach Transkription der Plasmide, intrazellulärer Translation und Assemblierung der viralen Proteine zu einem infektiösen Partikel werden diese in das umgebene Medium abgegeben. Am folgenden Tag wurde der erste Virusüberstand geerntet. Dazu wurde das Medium mit einer Spritze von den Zellen genommen und durch einen sterilen Millex-GP Filter (0,22 µm) in ein Weißkappenröhrchen gegeben. Für die Titerbestimmung wurde 1 ml des Überstandes separat aliquotiert. Der Überstand wurde zügig bei -70°C eingefroren. Die transfizierten Zellen wurden mit 6ml DMEM-HEPES-Medium gefüttert. Nach dem gleichen Prinzip wurde bis zum fünften Überstand etwa alle 12 Stunden verfahren.

### 2.2.1.5 Bestimmung der Virustiter

Zur Bestimmung der Virustiter wurden in einer 24-Loch Zellkulturschale pro Vertiefung 5x10<sup>4</sup> Zellen ausgesät und mit 1 ml DMEM-Medium gefüttert. Für jeden abgenommenen Virusüberstand wurden zwei unterschiedliche Viruskonzentrationen getestet. Die Titration der Überstände mit *eco-env* Pseudotypen erfolgte auf SC-1-Zellen. Überstände mit *RD114* Pseudotypen wurden auf TE671-Zellen getestet. Nachdem sich die Zellen auf dem Boden der Schale abgesetzt hatten, wurde das alte Medium durch 500 µl frisches DMEM-Polybrene-Medium ersetzt. Die 1ml Aliquots der virushaltigen Überstände wurden unterdessen im Kühlschrank bei 4°C aufgetaut. Aus jedem Aliquot wurden 20µl und 100µl entnommen und in die zwei für den jeweiligen Virusüberstand vorgesehenen Vertiefungen pipettiert. Es folgte eine einstündige Zentrifugationsphase bei 37°C und 700 xg. Am Folgetag wurde das Medium der Zellen erneuert.

Drei Tage nach der Infektion der Zellen erfolgte die Bestimmung der Infektionsraten am Durchflußzytometer. Zur Vorbereitung wurden die Zellen gewaschen und in 500 µl PBS resuspendiert. Aus der Menge des eingesetzten Virusüberstandes und der Anzahl GFP exprimierender Zellen ließ sich errechnen, wie viele GFP Transfer Einheiten ein Milliliter (GTE/ ml) Virusüberstand enthielt.

### 2.2.1.6 Analyse am Durchflußzytometer

Das Durchflußzytometer nimmt Zellen aus einer Zellsuspension auf und vermisst diese mit Hilfe von verschiedenen Lasern. Auf diese Weise können Fluoreszenzfarbstoffe detektiert werden, die entweder von Reportergenen gebildet werden oder mittels Antikörper an die Zellen gekoppelt sind. Bei Messung von zwei und mehr Farben gleichzeitig wurde die automatische Kompensationsroutine des Durchflußzytometers verwendet. Sie berücksichtigt die Überlappung der Emissionsspektren der Fluoreszenzproteine und eliminiert diese aus den Ergebnissen. Die Messungen erfolgten in einem Volumen zwischen 300 µl und 500 µl.

### 2.2.1.7 Infektion der Primärzellen

#### Murines Knochenmark

Für eine effiziente Virusinfektion von primären Zellen war die Zuhilfenahme eines rekombinanten humanen Fibronectin-Fragments notwendig. Im ersten Schritt wurden die Vertiefungen einer 6-Loch Platte jeweils mit 2ml RetroNectin®-Lösung für mindestens 2 Stunden beschichtet. Die Inkubation erfolgte gelegentlich auch über Nacht bei 4°C. Jeder cm<sup>2</sup> des 6-Loch-Plattenbodens (9,62 cm<sup>2</sup>) war nach diesem Prozess mit 10 µg RetroNectin® beschichtet. Die RetroNectin®-Lösung wurde entfernt und zum Blocken für 30 min durch 2 ml BSA-Lösung ersetzt. Anschließend folgte ein Waschschrift mit 3 ml HBSS-Lösung, die erst unmittelbar vor der Zugabe von 1,5 bis 2 ml Virusüberstand entfernt wurde. Die Platten wurde daraufhin für 30 min bei 4°C und 700 xg zentrifugiert. Im Anschluss daran wurde der alte virale Überstand durch neuen ersetzt. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde der Virusüberstand verworfen und durch 3 ml der Primärzellsuspensionskultur ersetzt. Die Zellen wurden vorher den alten Kulturschalen entnommen und durch Zugabe von frischen SFEM-Medium (murin) auf eine Konzentration von 0,5x10<sup>6</sup> Zellen pro ml eingestellt. Es folgte eine zwölfstündige Inkubationsphase unter den oben beschriebenen Haltungsbedingungen im Brutschrank. Der beschriebene Vorgang wurde nach dieser Inkubationsphase ein weiteres Mal wiederholt. Im Anschluss an die zweite Inkubationsphase wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für die Transplantation auf eine Konzentration zwischen 1x10<sup>6</sup> und 3x10<sup>6</sup> Zellen pro 300 µl PBS eingestellt. Außerdem wurden Zellen für die Analyse der GFP Expression am Durchflußzytometer zurückbehalten.

#### Humane Primärzellen aus Nabelvenenblut

Die CD34<sup>+</sup> Zellen wurden 48 Stunden vor der ersten Infektionsrunde aufgetaut. Pro Vertiefung einer 6-Loch Platte wurden 1,5x10<sup>6</sup> Zellen in 3 ml SFEM-Medium (human)

gehalten. Die Infektion und die Vorbereitung für die Transplantation erfolgte wie für die murinen Knochenmarkzellen beschrieben.

### 2.2.2 Mausversuche

Alle Tierversuche erfolgten gemäß der Bestimmungen zu gentechnologischen Arbeiten an Tieren in der Tierhaltung des Heinrich-Pette-Instituts.

#### 2.2.2.1 Allotransplantation

Vor der Transplantation des murinen Knochenmarks wurden die 8 bis 12 Wochen alten Empfängertiere (C57BL/6J Ly5.1) einer letalen Dosis  $\gamma$ -Strahlen (9 Gy) ausgesetzt. Die Bestrahlung erfolgte mit Hilfe einer offenen Cäsium-137 Strahlenquelle des Heinrich-Pette-Instituts. Einige Stunden nach der Bestrahlung wurden die vorbereiteten Zellen den bestrahlten Mäusen über die Schwanzvene injiziert.

#### 2.2.2.2 Xenotransplantation

Die Bestrahlung und die Transplantation der 8-16 Wochen alten NOD/*scid* Mäuse erfolgte wie bei der Allotransplantation beschrieben. Die Strahlendosis betrug lediglich 3,5 Gy, war also nicht letal.

Allen Empfängertieren wurde nach der Transplantation über einen Zeitraum von 14 Tagen das Antibiotikum Enrofloxacin in einer Konzentration von 5 mg pro 100 ml über das Trinkwasser verabreicht. Die Tiere wurden mindestens dreimal pro Woche auf Krankheitssymptome untersucht. Im Falle krankhafter Veränderungen wie Apathie, Gewichtsverlust, Atembeschwerden, unphysiologischer Körperhaltung und motorischer Auffälligkeiten (z.B. Lähmung) wurden die Tiere durch Äther betäubt. In diesem Zustand erfolgte die Blutabnahme durch Punktion der Mandibularvene. Anschließend wurden die Tiere durch Genickbruch getötet.

#### 2.2.2.3 Analyse erkrankter Tiere

##### Analyse der Blutparameter

Leukozytenzahl: Zur Bestimmung der Leukozytenzahl wurden die Erythrozyten in 3  $\mu$ l Blut durch Zugabe von 57  $\mu$ l 3%ige Essigsäure lysiert.

Hämatokrit: Zur Bestimmung des Hämatokrit-Wertes wurden etwa 60  $\mu$ l Blut in eine Hämatokrit-Kapillare aufgezogen. Es folgte ein Zentrifugationsschritt und die Bestimmung des Wertes mit Hilfe einer Schablone.

### **Blutausstriche**

Die Anfertigung der Blutausstriche erfolgte, indem 2 µl Blut an den Rand eines Objektträgers pipettiert und mit Hilfe eines weiteren Objektträgers gleichmäßig über die Oberfläche verteilt wurden. Nach einer Trocknungsphase von mindestens 24 Stunden erfolgte eine Pappenheimfärbung mit May-Grünwald- und Giemsa-Färbelösungen gemäß Herstellerangaben. Vor der Untersuchung am Mikroskop wurden die Objektträger mit Hilfe von Eukitt® und einem Deckglas versiegelt.

### **Analyse der Organe**

Zur Analyse der Organe wurde das getötete Tier in Rückenlage fixiert. Nach einem Hautschnitt in der Mittellinie, wurde die Haut abpräpariert, um die Lymphknoten der Achselhöhlen, des Lendebereichs und an den Speicheldrüsen auf krankhafte Vergrößerungen hin zu untersuchen. Anschließend wurde das Tier entlang der Mittellinie eröffnet, so dass die Organe des Bauchraums (Milz, Leber, Nieren, Magen, Darm, Harnblase, Geschlechtsorgane und assoziierte Lymphknoten) nach und nach freigelegt und untersucht werden konnten. Die Brusthöhle wurde durch Entfernen des Brustbeins (Sternum) geöffnet, wodurch Herz, Lunge, Thymus und Lymphknoten des Thymus genauer betrachtet werden konnten. Im Fall einer krankhaften Veränderung wurde das entsprechende Organ zur weiteren Verarbeitung entnommen. Zur späteren Aufarbeitung genomischer DNA wurden Teile entsprechender Organe in Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei  $-70^{\circ}\text{C}$  eingelagert.

### **Histologie**

Für histologische Zwecke wurden Teile von Milz, Leber, Lunge, Niere, Thymus und Lymphknoten in einer gepufferten Formalinlösung fixiert. Die Fixierung von Sternum und Wirbelsäule erfolgte zunächst in CALfix. Vor der Einbettung in Paraffin wurde den Knochen durch die Inkubation mit CALless das Kalzium entzogen. Aus den in Paraffinblöcken eingebetteten Organen wurden histologische Schnitte gefertigt, die nach dem Entfernen des Paraffins entweder einer Hämtoxylin/Eosin- oder Wright/Giemsa-Färbung unterzogen wurden.

Die angegebenen Arbeitsschritte und darauffolgende Analysen der Präparate wurden freundlicherweise im Histologie-Labor von Dr. Löhler im Heinrich-Pette-Institut durchgeführt.

### **Vorbereitung von Milz, Blut und Knochenmark für die Messung am Durchflußzytometer**

Für die Analysen am Durchflußzytometer wurde ein Teil der Milz zu einer Einzelzellsuspension verarbeitet. Hierzu wurde das Organ mit Hilfe eines

Spritzenstempels durch ein Drahtsieb von 160 µm Maschenweite gedrückt und dabei in IMDM-Medium resuspendiert. Die Verarbeitung des Knochenmarks erfolgte wie bei der Gewinnung der Primärzellen aus Knochenmark beschrieben (2.2.1.2). Die Zellsuspensionen aus Knochenmark, Milz und Blut wurden vor der Färbung mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern durch eine Behandlung mit Lyse-Puffer von Erythrozyten befreit.

### 2.2.3 Nukleinsäure-analytische Methoden

#### 2.2.3.1 Standardmethoden

Phenol/Chloroform-Extraktion, Ethanol-Präzipitation, Agarose-Gelelektrophorese wurden nach Standardprotokollen durchgeführt. Isolation und Aufreinigung von Plasmid DNA aus Bakterienkulturen und Agarose-Gelen erfolgte mit Hilfe von Kits (*Plasmid Maxi Kit*; *DNA Gel Extraction Kit*), die den Herstellerangaben gemäß eingesetzt wurden.

#### 2.2.3.2 Klonierung der FLT3mut cDNA einen retroviralen Vektor

Der Zielvektor pMYs-i-GFP wurde mit Hilfe des Restriktionsenzym *NotI* linearisiert und anschließend dephosphoryliert. Zur Gewinnung der FLT3mut cDNA wurde der Ursprungsvektor ebenfalls mit *NotI* behandelt. Anschließend wurden das FLT3mut Fragment durch Gelelektrophorese von der Vektor-DNA getrennt und isoliert. Die DNA-Menge wurde durch Vergleich der Bandenintensität mit einem Größenstandard abgeschätzt. Die Ligation der DNA in den retroviralen Vektor pMYs-i-GFP erfolgte nach Herstellerprotokoll mit 30 U T4 Ligase im molaren Vektor/ DNA Verhältnis 1:5. Als Hintergrundkontrolle wurde ein Ligationsansatz nur mit dephosphoryliertem Vektor mitgeführt. Nach der Transformation wurden die erhaltenen Kolonien auf die korrekte Orientierung des eingebauten FLT3-Fragments überprüft. Dies geschah durch eine Spaltung der gewonnenen DNA mit geeigneten Restriktionsenzymen und die Sequenzierung der DNA mit den Primern CS413 (5' > 3': GGC CTT ATT CCA AGC GGC TT) und CS248 (5' > 3': GGT GGA CCA TCC TCT AGA CT).

#### 2.2.3.3 Sequenzierung

Die DNA wurde nach der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode nach Sanger (Sanger et al., 1977) mit Hilfe des *BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit* sequenziert. In einem Ansatz von 20 µl wurden 800 ng DNA, 3 µl BigDye (IV.1.2) und 15 pmol Primer vermischt. Die Ansätze wurden im Thermocycler nach folgendem Programm inkubiert: initiale Denaturierung (1 min, 95°C), 40 Zyklen Denaturierung (30 sec, 95°C), Annealing (15 sec, 50°C) und Elongation (4 min, 60°C). Der Reaktionsansatz wurde durch Ethanol-

Präzipitation gefällt, das Pellet getrocknet und im Sequenzierservicelabor (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg) analysiert.

### 2.2.4 Nukleinsäure-analytische Methoden im Rahmen des Southern-Blot-Verfahrens

#### Isolation und genomischer DNA aus Organen

Genomische DNA wurde aus bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagertem Gewebe extrahiert. Dazu wurden die Organe im gefrorenen Zustand in einen Glas-Homogenisator gegeben und in 2-4 ml Puffer 1, je nach Größe des Organstücks, homogenisiert. Die Suspension wurde anschließend mit dem gleichen Volumen Puffer 2 vermischt und bei  $37^{\circ}\text{C}$  über Nacht im Wasserbad inkubiert. Zur Entfernung von Proteinen erfolgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion. Dazu wurde die Lösung zweimal mit einem Volumen Phenol versetzt, vorsichtig geschüttelt und jedes Mal 5 Minuten bei  $1.040 \times g$  (RT) zentrifugiert. Die wässrige, DNA-haltige Phase wurde jeweils in ein neues Gefäß überführt. Es folgte eine analoge Extraktion mit einem Gemisch aus Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1, v/v/v). Zum Entfernen von Phenolresten wurde die wässrige Phase aus diesem Ansatz wie oben beschrieben mit einem Volumen Chloroform extrahiert. Zur Fällung der DNA wurde die wässrige Phase nach der Chloroform-Extraktion in ein steriles Corex-Röhrchen überführt und vorsichtig mit  $1/2$  Volumen Isopropanol überschichtet. Nach Zugabe von  $1/20$  Volumen 5 M NaCl erfolgte eine erneute Überschichtung mit halben Volumen Isopropanol. Die genomische DNA kondensierte zu gut sichtbaren Fäden, die mit einer Pasteurpipette aufgewickelt und in 70% Ethanol gewaschen wurden. Die aufgespulte DNA wurde kurz an der Luft getrocknet und abhängig von der Menge in einem Volumen von 200-500  $\mu\text{l}$  TE-Puffer aufgenommen. Die Konzentration und Reinheit der Nukleinsäuren konnte mit Hilfe eines UV-Spektralphotometers durch Messung der Absorption bei 260 nm und 280 nm bestimmt werden. Eine Absorption von 1,0 bei 260 nm entspricht einer DNA-Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$ . Die Lagerung der DNA erfolgte bei  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### Herstellung der radioaktiv markierten Sonde und des Größenstandards

Zur Herstellung eines radioaktiv markierten Größenstandards wurden 2  $\mu\text{g}$   $\lambda$ -DNA mit 15 U *HindIII* in einem Volumen von 20  $\mu\text{l}$  1,5 Stunden bei  $37^{\circ}\text{C}$  gespalten. Die vollständige Spaltung wurde mit einem Aliquot des Spaltungsansatzes gelelektrophoretisch überprüft. Anschließend wurden die verbliebenen 17  $\mu\text{l}$  mit 1,11 MBq [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]-dCTP, 3  $\mu\text{l}$  Mix C des DecaLabel™ Kits und 5 U Klenow Polymerase in einem Volumen von 30  $\mu\text{l}$  bei entsprechenden Pufferbedingungen radioaktiv markiert. Nach 20 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden zum Stoppen der enzymatischen

Reaktion und Erhöhung des Probenvolumens 5 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0) und 45 µl TE-Puffer zugesetzt. Nicht eingebaute Nukleotide wurden mit Hilfe von Sephacryl-Säulen (MobiSpin S300, MoBiTec, Göttingen) durch Zentrifugation (2 min, 800 × g) entfernt. Die DNA für die in dieser Arbeit genutzte GFP Sonde wurde durch einen *NcoI* Restriktionsverdau von Plasmid R780 hergestellt und durch Gelelektrophorese aufgereinigt. Die radioaktive Markierung der aus dem Gel eluierten DNA erfolgte mit dem DecaLabel™ Kit entsprechend den Herstellerangaben in einem Volumen von 50 µl. Nach dem Einbau von 1,85 MBq [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0) gestoppt, die nicht eingebauten Nukleotide wie oben beschrieben mit Hilfe von Sephacryl-Säulen entfernt und der Ansatz im Szintillator vermessen. Es wurden mindestens  $1,5 \times 10^7$  cpm für 10 ml Hybridisierungspuffer eingesetzt werden.

### Nachweis von DNA im Southern-Blot-Verfahren

Der Nachweis von DNA-Sequenzen erfolgte mit der Southern-Blot-Methode. Die DNA Fragmente können hierbei durch die spezifische Bindung einer radioaktiv markierten Sonde detektiert werden. Für die Southern-Blot-Analyse wurden 10 µg genomische DNA mit Restriktionsendonukleasen (35 U) in einem Volumen von 50 µl für 5 Stunden bei der entsprechenden Temperatur gespalten. Nach etwa 1 Stunde wurden die Ansätze durch Auf- und Abpipettieren gründlich gemischt. Die Trennung der Spaltprodukte erfolgte auf einem 0,8% (w/v) 1 × TAE Agarose-Gel. Als Größenstandard wurde radioaktiv markierte (ca.  $2 \times 10^5$  cpm), *HindIII* gespaltene  $\lambda$ -DNA mitgeführt. Die Elektrophorese fand bei 30 V über Nacht statt. Nach der Elektrophorese wurde der Erfolg des Restriktionsverdaus mittels UV-Illumination überprüft, das Gel wurde vermessen, 20 Minuten in Denaturierungslösung und anschließend 20 Minuten in Neutralisierungslösung geschwenkt. Der Transfer der DNA auf eine Nylonmembran erfolgte durch Ausnutzung von Kapillarkräften. Für den Blot wurde eine Plastikwanne mit 1,5 l 10 × SSC gefüllt, eine Glasscheibe diente als Brücke, auf der zwei übereinander liegende Stücke Whatman-Papier so platziert wurden, dass die Enden in den Laufpuffer ragten. Auf diese wurde das Gel luftblasenfrei aufgelegt, es folgte die auf Gelgröße zurechtgeschnittene, angefeuchtete Membran (0,45 µm Biotodyne B Transfer Membrane, PALL, Pensacola, USA) und dann zwei ebenfalls angefeuchtete Whatman-Papiere in Gelgröße. Der Bereich um das Gel wurde mit Frischhaltefolie abgedeckt, um den Pufferfluss exklusiv durch das Gel zu gewährleisten. Mehrere Lagen saugfähige Papierhandtücher, die mit einem Gewicht beschwert wurden, bildeten den Abschluss. Der Transfer der DNA fand über Nacht statt. Zur Fixierung der DNA auf der Membran wurde diese zweimal mit der Auto Crosslinker Funktion im UV-Crosslinker (1800, Stratagene, La Jolla, USA) vernetzt. Danach wurde die Membran im Hybridisierungsröhrchen mit 10 ml vorgewärmtem Hybridisierungspuffer für



mindestens 30 Minuten bei 55°C prähybridisiert. Die radioaktiv markierte Sonde wurde unmittelbar vor der Zugabe zum Hybridisierungspuffer 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Nach Zugabe der Sonde erfolgte die Hybridisierung bei 55°C über Nacht. Dabei wurde das Hybridisierungsröhrchen im Hybridisierungssofen in Rotation gehalten, um die Membran stetig benetzt zu halten. Nach Verwerfen der Hybridisierungslösung wurde die Membran zweimal kurz mit 20 ml Waschlösung I im Hybridisierungsröhrchen gewaschen. Die nächsten beiden Waschschrirte erfolgten in einer Plastikwanne mit 250 ml vorgewärmter Waschlösung II für jeweils 40 Minuten bei 65°C. Danach wurde die Membran in Folie eingeschweißt und in einer Filmkassette fixiert. Die Detektion der spezifisch gebundenen, radioaktiven Sonden erfolgte durch Auflage eines Röntgenfilms, der je nach Signalstärke bei -70°C exponiert wurde. Die Filmentwicklung erfolgte mit dem Classic E.O.S. Filmentwickler (AGFA, Köln).

### 2.2.5 Proteinbiochemische Methoden im Rahmen des Western-Blot-Verfahrens

#### Herstellung von Zellsedimenten und Zellyse

Vor der Lyse wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und 5 min bei 1200rpm abzentrifugiert. Bis zu  $1 \times 10^6$  Zellen wurden im frisch angesetzten 200  $\mu$ l TCA-Lysepuffer vorsichtig lysiert. Anschließend wurde die Zellsuspension gemischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Die lysierten Zellen wurden für 5 min bei 4°C und 16000xg abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Proteinlysate in 100  $\mu$ l 2x Probenpuffer aufgenommen. Zusätzlich wurden 50  $\mu$ l 1M Tris Lösung zu den Proben gegeben, um diese 15 min auf Eis zu lagern, bis das Protein durch Sonifizierung aufgeschlossen wurde. Anschließend wurden die Proben 1 min bei 16000xg abzentrifugiert und bei -70°C eingefroren.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in den Lysaten, erfolgte eine Absorptionmessung bei 620 nm. Dazu wurden die Lysate zunächst 1:10 in 2 x SDS-Probenpuffer verdünnt und anschließend mit dem BioRad DC-Protein Assay nach Angaben des Herstellers aufgearbeitet. Die Konzentration konnte durch das Mitführen einer Standardreihe mit bekannter Proteinkonzentration berechnet werden. Hierzu wurde eine Verdünnungsreihe von BSA in 2 x SDS-Probenpuffer benutzt, die insgesamt acht Proteinkonzentrationen von 0 bis 2,5  $\mu$ g/ $\mu$ l beinhaltete.

#### SDS-PAGE

Die Proteingemische wurden mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Trenn- und Sammelgel wurden, wie in Kapitel 2.1 angegeben, vorbereitet. Zuvor wurde aus 1M DTT und 3 x SDS-Probenpuffer eine 1:3 Mischung hergestellt, die wiederum 1:3 mit 20 $\mu$ g Protein gemischt

und anschließend für fünf Minuten bei 95°C erhitzt wurde. Zur Abschätzung der Proteingrößen wurde ein gefärbter Größenstandard (SM#1816, Fermentas) mitgeführt. Die Elektrophorese erfolgte bei 120 V, bis der Größenstandard vollständig aufgetrennt war.

### **Western-Blot und Immunologische Detektion**

Durch den Transfer auf eine Membran im Western-Blot Verfahren können zu untersuchende Proteine über Zugabe von spezifischen Antikörpern sichtbar gemacht werden. Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden im Tankblot-Verfahren (Mini-Trans Blot Cell, Biorad, München) bei 100 V unter Eiskühlung auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P, Millipore) übertragen. Vorab wurde die Membran kurz mit Methanol aktiviert und nach Abspülen mit Wasser in Blot-Puffer äquilibriert. Nach dem Blot wurde die Membran auf dem Schwenktisch für 45min in Block-Puffer inkubiert, um freie Bindungsstellen zu besetzen. Es folgte ein Waschschriff mit TBS-Tween. Die Inkubation mit spezifischen primären Antikörpern erfolgte bei 4°C über Nacht. Die Membran wurde dreimal für 10 min mit TBS-Tween gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Es folgte eine 60 min Inkubationsphase mit dem zur Bindung an den primären Antikörper geeigneten sekundären, Peroxidase-konjugierten Antikörper. Zur Entfernung von ungebundenem Sekundärantikörper erfolgten drei weitere Waschschriffe, analog zu den oben beschriebenen.

### **ECL-Reaktion**

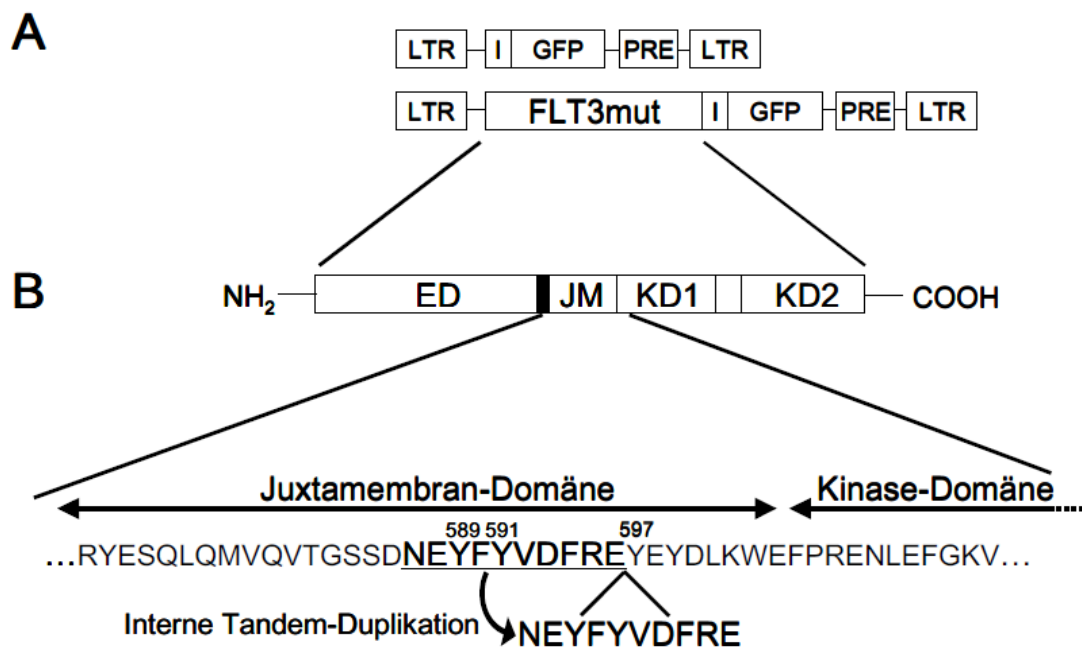
Mit Hilfe des Amersham ECL-Detection™ plus Kit (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) wurden die spezifischen Antikörperinteraktionen sichtbar gemacht. Die im Kit enthaltenen Lösungen A und B wurden im Verhältnis 1:40 gemischt und auf die Proteinseite der Membran pipettiert. Nach einer fünfminütigen Inkubationsphase wurde ein Röntgenfilm auf die Membran gelegt, auf dem die durch den Sekundärantikörper gebundenen Proteine durch die ECL-Reaktion sichtbar gemacht wurden.

Zur Weiterverwendung der Membran wurde diese erneut in TBS-Tween gewaschen und vor Zugabe eines neuen primären Antikörpers für mindestens 30 Minuten in Block-Puffer inkubiert.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Konstruktion eines retroviralen Vektors und Herstellung pseudotypisierter Retroviren zur Expression von FLT3mut in hämatopoetischen Vorläuferzellen

In Tumorzellen aus Leukämiepatienten wurden Mutationen der Rezeptor-Tyrosinkinase FLT3 besonders häufig gefunden. Die vorliegende Arbeit sollte mit Hilfe eines retroviralen Vektorsystems untersuchen, welchen Effekt die Expression einer solchen Mutation in hämatopoetischen Zellen von Maus und Mensch hat. Zu diesem Zweck wurde aus den Leukämiezellen eines Patienten der kodierende Bereich des mutierten *FLT3* (FLT3mut) Gens isoliert (B. Steffen und H. Serve, Münster) und in die multiple Klonierungsstelle (*Multiple Cloning Site, MCS*) des retroviralen Expressionsvektors pMYs kloniert (Kitamura et al., 2003). Der in Abbildung 3.1 schematisch dargestellte retrovirale Vektor exprimiert über eine interne Ribosomen-Eintrittsstelle (*Internal Ribosome Entry Site, IRES*) zusätzlich zum FLT3mut ein grün fluoreszierendes Protein (*Green Fluorescent Protein, GFP*), das für die nachfolgenden Analysen der infizierten Zellen als Reporterprotein diente. Dasselbe Expressionskonstrukt ohne FLT3mut Sequenz wurde als Kontrollvektor eingesetzt.



**Abbildung 3.1** **A** Retrovirale Expressionskonstrukte GFP Kontrollvektor, FLT3mut Vektor; LTR, *Long Terminal Repeat*, I, IRES; PRE, *Post Regulatory Element*. **B** Schematische Darstellung des FLT3mut Proteins und Lage der Internen Tandem Duplikation in dessen Aminosäuresequenz; ED, Extrazelluläre Domäne; JM, Juxtamembran-Domäne; KD, Kinase-Domäne, in schwarz dargestellt ist die Transmembran-Domäne. Ausgewählte Aminosäuren (Tyrosin) sind nummeriert.

Ziel der nachfolgenden Versuche war die stabile Integration des Expressionsvektors in das Genom der hämatopoetischen Zielzellen, welche daraufhin FLT3mut und GFP exprimieren sollten. Das Einbringen der Vektoren in die Wirtszelle erfolgte durch retrovirale Pseudotypen, die mit Hilfe einer Verpackungszelllinie hergestellt wurden. Da den Expressionsvektoren Sequenzen für virale Oberflächen- und Prozessierungsproteine fehlten, wurden diese in Plasmidform über eine transiente Transfektion zusammen mit den oben beschriebenen retroviralen Konstrukten in Verpackungszellen gebracht. Diese Zellen gaben daraufhin replikations-inkompetente Viren an das umgebene Kulturmedium ab, welches zur Infektion der Zielzellen eingesetzt wurde.

Um zu testen, ob die Menge der Viren im gewonnenen Überstand für die Infektion der hämatopoetischen Zellen ausreichte, wurden Virustiterbestimmungen auf Fibroblastenzelllinien durchgeführt. Der Anteil infizierter Zellen (Transduktionseffizienz) wurde anhand der GFP Expression im Durchflußzytometer bestimmt. Aus der Menge des eingesetzten Virusüberstandes und der Anzahl GFP exprimierender Zellen ließ sich errechnen, wie viele GFP Transfer Einheiten ein Milliliter (GTE/ml) Virusüberstand enthielt. Zur Infektion der hämatopoetischen Zellen wurden Virustiter eingesetzt, die für den FLT3mut Vektor bei  $1 \times 10^5$  bis  $6 \times 10^5$  GTE/ml und für den Kontrollvektor zwischen  $4 \times 10^5$  und  $2 \times 10^6$  GTE/ml lagen. Die Ergebnisse dieser Infektionsversuche sind in den folgenden Abschnitten dargestellt.

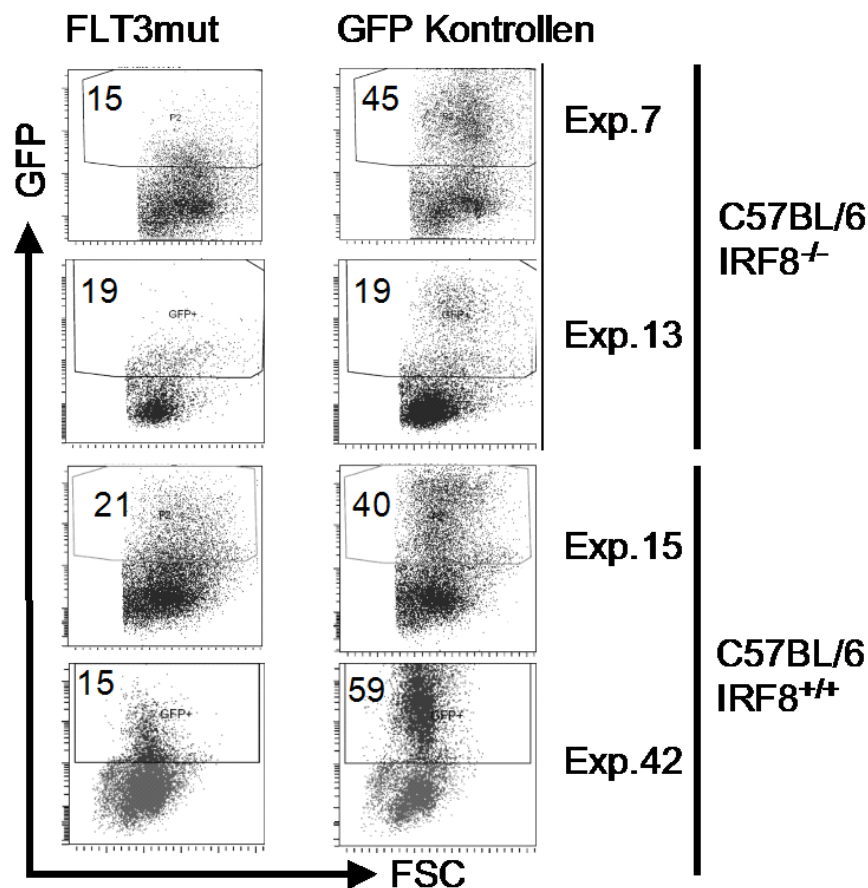
### 3.2 FLT3mut im Knochenmark-Transplantationsmodell (Allotransplantation)

#### 3.2.1 Infektion und Transplantation hämatopoetischer Vorläuferzellen

Die oben beschriebenen retroviralen Pseudotypen des FLT3mut Vektors wurden in den folgenden Experimenten benutzt, um frühe hämatopoetische Mauszellen zu infizieren. Mit Hilfe eines Knochenmark-Transplantationsmodells sollten die Auswirkungen der FLT3mut Expression auf das hämatopoetische System der Maus *in vivo* untersucht werden. Die in diesem Abschnitt beschriebenen Experimente wurden in zwei unterschiedlichen Mausstämmen (C57BL/6J Irf8<sup>+/+</sup> und C57BL/6J Irf8<sup>-/-</sup>) durchgeführt. Es sollte gleichzeitig überprüft werden, ob das in einem dieser Stämme fehlende Irf8 Gen möglicherweise einen Einfluss auf die Krankheitsentstehung und/oder den Krankheitsverlauf hat, denn Leukämogenese-Modelle lassen vermuten, dass FLT3mut allein nicht ausreicht, um eine Leukämie auszulösen

Zur Anreicherung weitgehend undifferenzierter hämatopoetischer Zellen im Knochenmark, wurde den Spendermäusen intraperitoneal der Wirkstoff 5-Fluoruracil (5-FU) verabreicht. Fünf Tage nach der 5-FU Gabe wurde den Tieren das Knochenmark aus Schienbein und Oberschenkelknochen entnommen und *ex vivo* in eine Suspensionskultur

überführt. Das hierfür verwendete Kulturmedium stimulierte die Teilung der entnommenen Knochenmarkszellen. Nach dieser sogenannten Expansionsphase, die bis zu 24 Stunden dauerte, wurden die hämatopoetischen Zellen an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit den pseudotypisierten Kontroll- und FLT3mut Vektoren infiziert. Die Transduktionseffizienz wurde 24 Stunden nach der letzten Infektionsrunde anhand der GFP-Expression im Durchflußzytometer bestimmt.

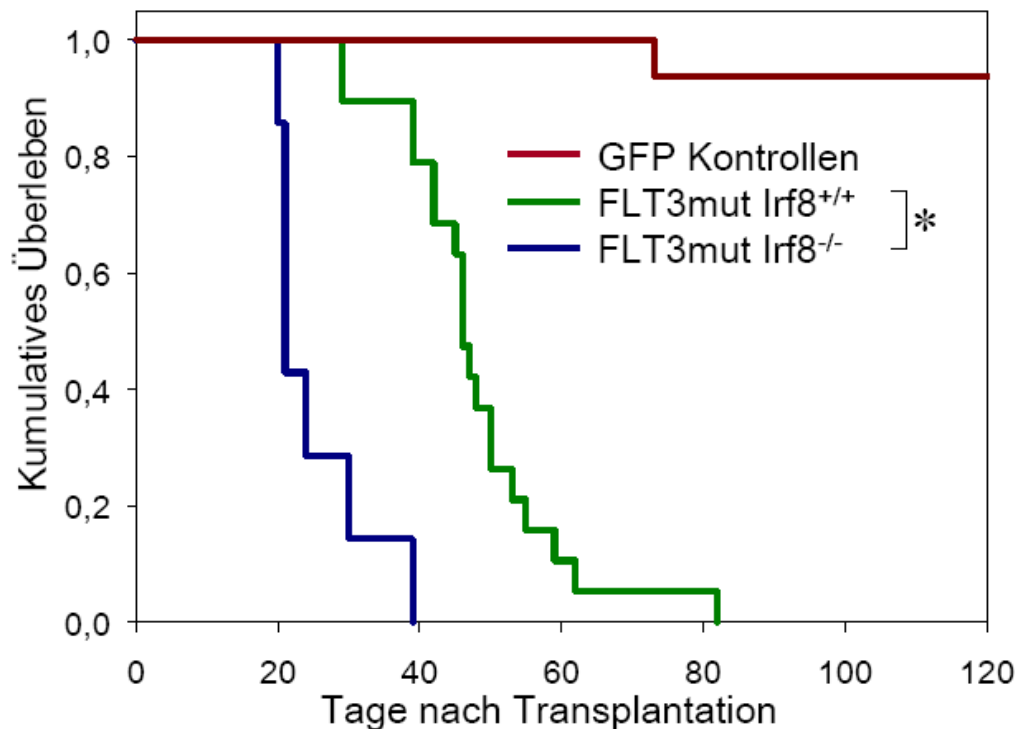


**Abbildung 3.2** GFP-Expression FLT3mut und Kontrollvektor infizierter Knochenmarkszellen vor der Transplantation. Die Bestimmung der GFP-Expression des infizierten Knochenmarks aus vier unabhängigen Experimenten erfolgte mittels Durchflußzytometrie. FSC, Forward Scatter; Exp., Experiment.

Der Anteil infizierter Zellen lag in vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten für den FLT3mut Vektor zwischen 15 und 22%, und für den Kontrollvektor bei 19 bis 45% (Abbildung 3.2). Direkt nach der Ermittlung der Transduktionseffizienz wurden  $1 \times 10^6$  bis  $3 \times 10^6$  Zellen (Exp.7:  $1,0 \times 10^6$ ; Exp.13:  $1,0 \times 10^6$ ; Exp.15:  $2,6 \times 10^6$ ; Exp.42:  $3 \times 10^6$ ) über die Schwanzvene in zuvor letal bestrahlte Empfängermäuse transplantiert.

### 3.2.2 FLT3mut Mäuse entwickelten letale lymphoproliferative Erkrankungen

Alle Empfänger-mäuse, die Kontrollvektor exprimierende Zellen erhalten hatten, zeigten im Verlauf einer Untersuchungsphase von 120 Tagen keine krankheitsbedingten Auffälligkeiten. Im Gegensatz dazu erkrankten alle mit FLT3mut Zellen transplantierten Tiere, von denen die ersten bereits 20 Tage nach der Transplantation Krankheitssymptome wie Apathie, gekrümmte Körperhaltung, struppiges Fell und/oder eine beginnende Lähmung der Hinterbeine (Paraparese) aufwiesen (Tabelle 2.1). Die Latenzzeit, mit der diese Mäuse äußerliche Krankheitssymptome entwickelten, lag im Mittel bei 25 (C57BL/6J Irf8<sup>-/-</sup>) und 48 Tagen (C57BL/6J Irf8<sup>+/+</sup>) (Abbildung 2.3). Die Tiere mit FLT3mut Knochenmark aus C57BL/6J Irf8<sup>-/-</sup> Hintergrund erkrankten demnach signifikant schneller, als die Mäuse, denen C57BL/6J Irf8<sup>+/+</sup> FLT3mut Knochenmark verabreicht worden war ( $P < 0,05$ ).



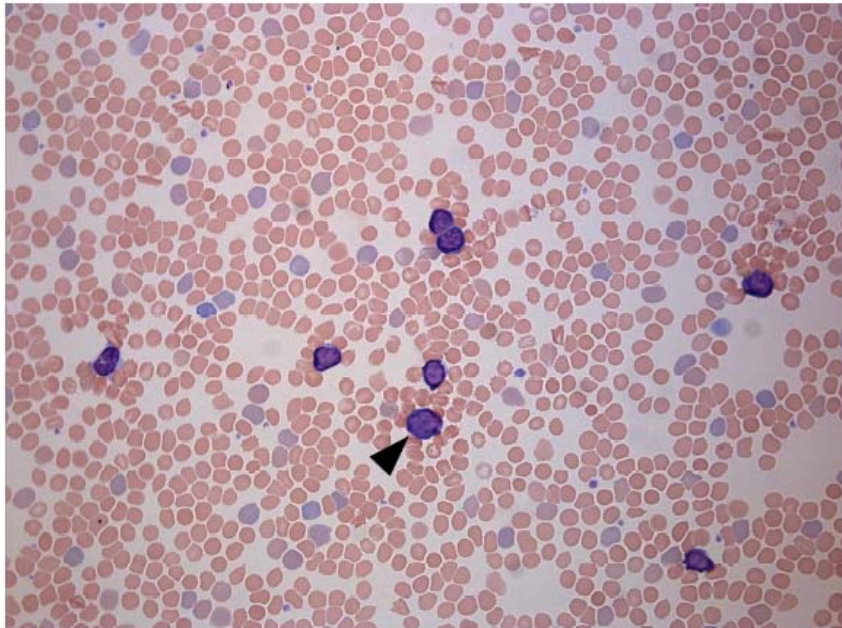
**Abbildung 3.3** Mit FLT3mut Irf8<sup>-/-</sup> Knochenmark transplantierte Mäuse erkranken signifikant schneller als Tiere mit FLT3mut im Wildtyp-Hintergrund. Dargestellt ist das kumulative Überleben der FLT3mut Irf8<sup>-/-</sup> (n=7), FLT3mut Irf8<sup>+/+</sup> (n=19) und GFP Kontroll-Tiere (n=16) aus vier unabhängigen Experimenten gegen die Zeit, angegeben in Tage nach Transplantation. \* $P < 0,05$  (Logrank Test).

	IRF8	Tage nach Transplantation	Milzgröße (mg)	Leukozytenzahl (x10 <sup>6</sup> /ml)	Hämatokrit	Paraparese
7/2	-/-	20	>130	NA	NA	Nein
7/3	-/-	21	>130	NA	28	Nein
7/4	-/-	21	>130	NA	23	Nein
7/5	-/-	21	>130	NA	26	Nein
13/1	-/-	24	305	0,3	14	Ja
13/2	-/-	30	56	0,8	42	Ja
13/3	-/-	39	270	NA	NA	Ja
15/5	+/+	47	129	1,3	37	Ja
15/6	+/+	55	225	14,3	29	Ja
15/7	+/+	59	NA	NA	NA	NA
15/8*	+/+	82	109	NA	51	Nein
42/6	+/+	29	237	1,1	46	Ja
42/7	+/+	29	371	5,9	34	Nein
42/8	+/+	39	255	6,6	41	Ja
42/9	+/+	39	363	9,4	20	Nein
42/10	+/+	42	295	5,1	40	Ja
42/11	+/+	42	172	1,7	36	Ja
42/12	+/+	46	167	1,4	49	Ja
42/13	+/+	46	146	15,8	34	Ja
42/14	+/+	46	225	18,0	38	Ja
42/15	+/+	45	NA	NA	NA	NA
42/16	+/+	48	116	6,0	43	Nein
42/17	+/+	50	99	9,9	43	Ja
42/18	+/+	50	228	8,4	37	Nein
42/19	+/+	53	142	6,1	41	Ja
42/20	+/+	62	262	4,0	44	Ja

**Tabelle 3.1** Aufgeführt sind alle mit FLT3mut infiziertem Knochenmark transplantierten Mäuse. NA= nicht analysiert; (\*)= vergrößerter Thymus.

Untersuchungen der Blutparameter ergaben Hämatokritwerte, die bei der Hälfte (n=11) der analysierten FLT3mut Mäuse (n=22) mit einem Mittel von 28,84% +/- 7,29 deutlich unter den Normalwerten (42,82 +/- 3,79) für bestrahlte GFP Kontrollmäuse (n=11) lagen. Die Tiere waren demnach leicht anämisch. Erhöhte Leukozytenzahlen (>10x10<sup>6</sup> Leukozyten/ml Blut) in drei von 18 untersuchten Mäusen ließen vermuten, dass es sich dabei um eine Ausschwemmung leukämischer Zellen aus dem Knochenmark in das periphere Blut handelte (Tabelle 3.1). Mikroskopische Untersuchungen gefärbter

Blutausstriche bestätigten den erhöhten Anteil von Leukozyten, bei denen es sich um unreife Zellen lymphatischen Ursprungs, sogenannte Lymphoblasten, handelte (Abbildung 3.4).



**Abbildung 3.4** Ausschwemmung leukämischer Lymphoblasten in das periphere Blut.

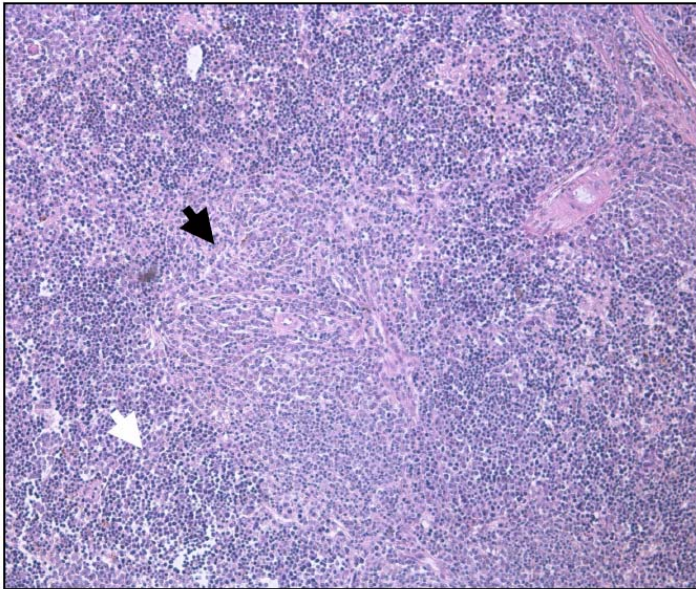
Histopathologische Untersuchung des Blutastriches eines FLT3mut Tieres mit B-Zell-ALL (Exp.15 #3). Der Pfeilkopf deutet auf einen der zahlreichen Lymphoblasten. #, Mausnummer.

Makroskopische Untersuchungen der Organe ergaben, dass die Lymphknoten bei keiner der analysierten Mäuse auffällig verändert waren. Die Leber war in einigen Fällen blasser als normal. Eine Beobachtung, die mit dem niedrigen Hämatokrit korrelierte. Bei einem Tier mit schwerer Atemnot war der Thymus mit 365 mg stark vergrößert. Der auffälligste Befund in 19 von 24 untersuchten Flt3mut Tieren war jedoch die vergrößerte Milz. Der Mittelwert der vergrößerten Milzen (n=15) lag bei 244 mg +/- 68 (Tabelle 3.1), wobei nur Milzmassen über 130mg als krankhaft gewertet wurden.

#### **Histologie**

In Abbildung 3.5 ist beispielhaft der histologische Befund einer FLT3mut Milz dargestellt. Der Schnitt zeigt deutlich die massive Zerstörung der Milzstruktur durch infiltrierende Zellen, bei denen es sich um Lymphoblasten handelte. Die erythroiden Zellen deuten auf eine in die Milz ausgelagerte Erythropoese hin, da das Knochenmark vermutlich von leukämischen Zellen überschwemmt war.



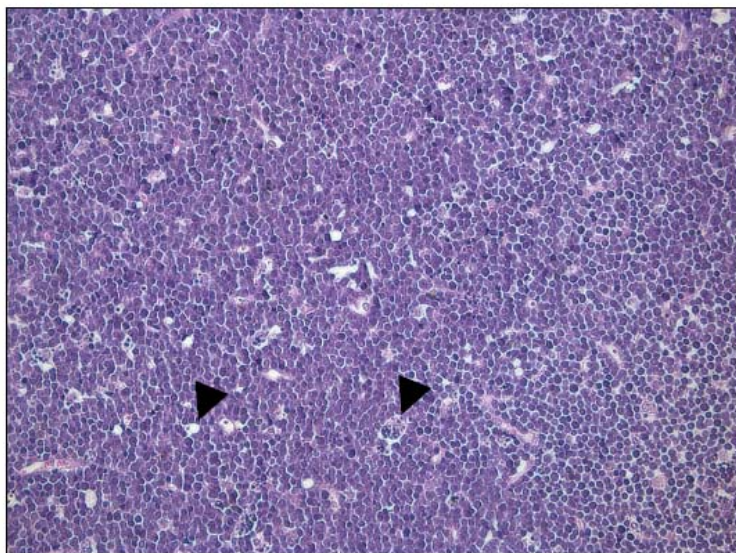


**Abbildung 3.5**

**Zerstörung der Milzstruktur durch infiltrierende FLT3mut Tumorzellen.**

Histopathologische Untersuchung des Milzschnittes eines FLT3mut Tieres mit B-Zell-ALL. Der schwarze Pfeil deutet auf infiltrierende Lymphoblasten. Der weiße Pfeil kennzeichnet erythrozytäre Zellen.

Histologische Untersuchungen des bei nur einem Tier stark vergrößerten Thymus bestätigten auch hier das Bild unreifer lymphatischer Zellen. Zu sehen war der für invasive Tumore typische „Sternenhimmel“-artige Phänotyp (*starry-sky phenotype*) (vergleichbar mit Abbildung 2.6). Dieses Bild wird durch Makrophagen bedingt, die eingestreut zwischen den Lymphoblasten liegen und durch Apoptose entstandene Zellfragmente beseitigen.



**Abbildung 3.6 Infiltrierter Thymus mit „Sternenhimmel“-Phänotyp.**

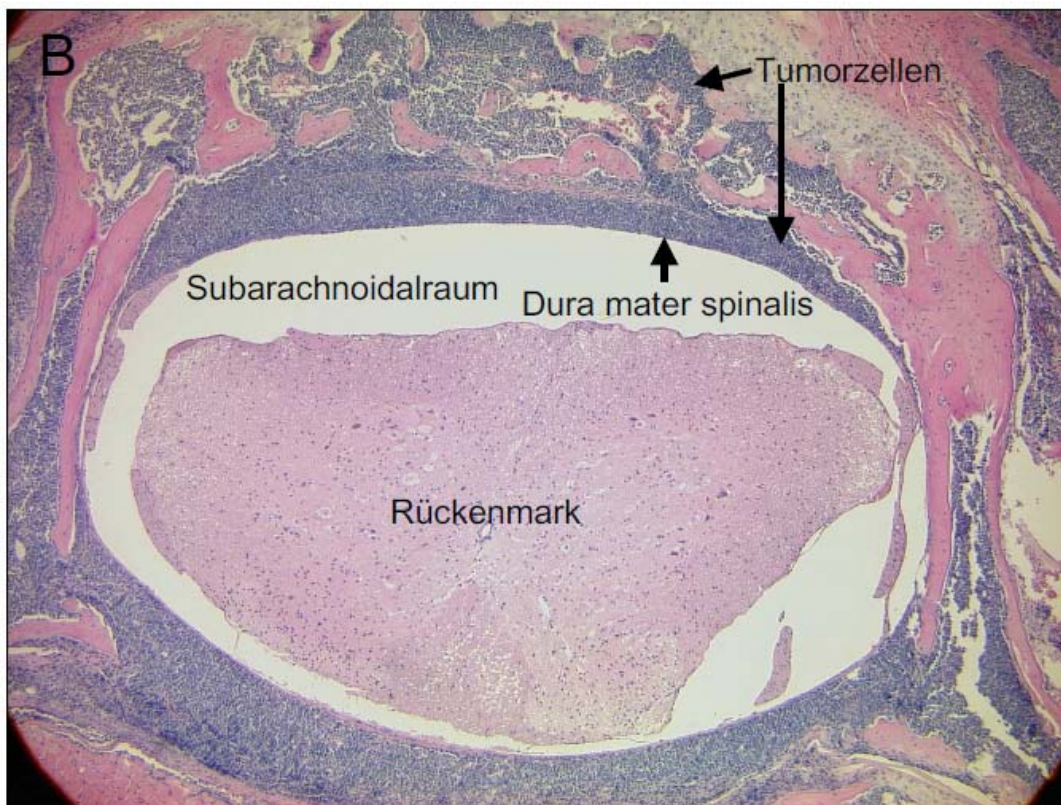
Histopathologische Untersuchung eines Thymusschnittes einer an T-ALL erkrankten Maus (vergleichbar mit FLT3mut Exp.15 #8). Schwarze Pfeilspitzen kennzeichnen Makrophagen, die eingestreut zwischen den Lymphoblasten liegen und durch Apoptose entstandene Zellfragmente beseitigen.



**Abbildung 3.7** Die Hälfte der erkrankten FLT3mut Tiere litt an einer partiellen Lähmung der hinteren Extremitäten, verursacht durch infiltrierende Tumorzellen im peripheren Nervensystem.

**A** FLT3mut Maus mit leichter Paraparese der Hinterbeine.

**B** Histopathologische Untersuchung des Wirbelsäulenschnittes einer FLT3mut Maus (Exp.13 #3) mit gelähmten Hinterbeinen.



Eine Erklärung für die partielle Lähmung der Hinterläufe (Paraparese), die bei 50% der analysierten Tiere zu beobachten war (Abbildung 3.7A), lieferte die histologische Untersuchung eines Schnittes durch den Lendenbereich der Wirbelsäule einer gelähmten FLT3mut Maus. Abbildung 3.7 B zeigt eine solche Sektion, in der die Ausbreitung von Lymphoblasten im peripheren Nervensystem deutlich erkennbar ist. Aufgrund der starken Proliferation dieser Tumorzellen, war deren Wachstum nicht mehr nur auf Bereiche begrenzt, in denen Knochenmarkszellen normalerweise zu finden wären, sondern reichte bis an die harte Rückenmarkshaut (Dura mater spinalis). Diese Ausbreitung leukämischer Zellen im peripheren Nervensystem hatte vermutlich eine Einengung der vom Rückenmark abgehenden Nervenfasern zur Folge. Möglicherweise führte die daraus

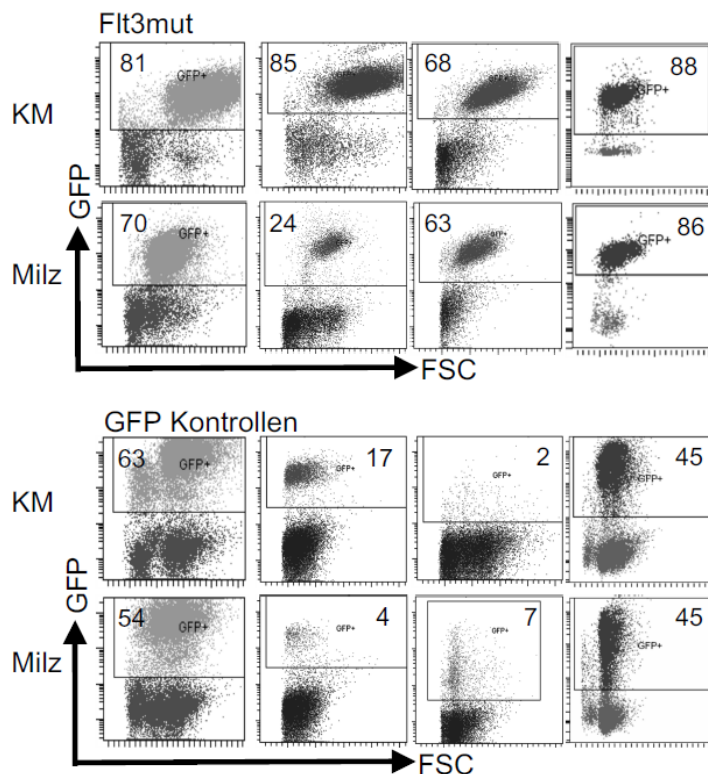


resultierende Störung der Reizleitung zu einer eingeschränkten Funktionsfähigkeit der hinteren Extremitäten.

Die Transplantation von FLT3mut Knochenmark führte in allen Tieren zu letalen Erkrankungen, wobei das fehlende *Irf8* Gen deren Ausbruch signifikant beschleunigte. Die mikroskopischen Untersuchungen ergaben, dass es sich bei den Tumorzellen, die sich in Milz und Thymus und im peripheren Nervensystem ausgebreitet hatten, um unausgereifte lymphatische Zellen, sogenannte Lymphoblasten, handelte.

### 3.2.3 FLT3mut wurde in den hämatopoetischen Organen der erkrankten Tieren exprimiert

Durchflußzytometrische Untersuchungen von Knochenmark, Milz und Blut erkrankter Tiere ergaben, dass sich die Population der FLT3mut exprimierenden Zellen im Vergleich zur Ausgangsinfektionsrate stark vergrößert hatte. Beispielhaft ist dies anhand ausgewählter durchflußzytometrischer Analysen von Knochenmark und Milz aus vier FLT3mut Mäusen im Vergleich zu vier gesunden Kontrolltieren in Abbildung 3.8 dargestellt. Abbildung 3.9 zeigt zusätzlich zu Knochenmark und Milz auch die Expression von FLT3mut in Blut und Thymus von Maus 8 aus Experiment 15.



**Abbildung 3.8** Der Anteil FLT3mut/GFP bzw. GFP exprimierender Zellen in Knochenmark und Milz. Dargestellt sind repräsentative durchflußzytometrischen Analysen der GFP Expression von Knochenmark und Milz erkrankter FLT3mut Mäuse (Exp.7 #4; Exp.13 #1; Exp.15 #6; Exp.42 #6) und gesunder GFP Kontrolltiere (Exp.7 #1; Exp.13 #6; Exp.15 #1; Exp.42 #2). KM, Knochenmark.

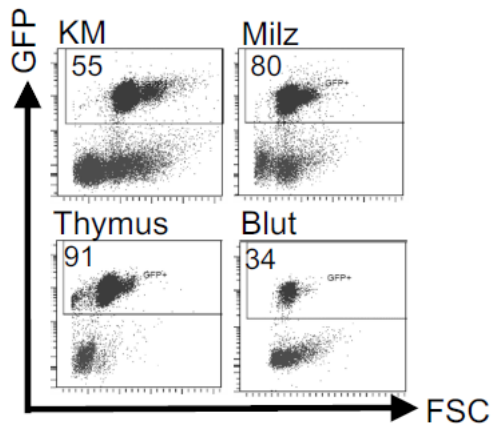


Abbildung 3.9 In einer der untersuchten FLT3mut Mäuse war neben Knochenmark, Milz und Blut auch der Thymus von Tumorzellen befallen.

Dargestellt sind durchflußzytometrischen Analysen der GFP Expression betroffener hämatopoetischer Organe (Exp.15 #8).

In den vier unabhängigen Versuchen bestanden Milzen, Knochenmark und Blut zum Zeitpunkt der Erkrankung bei einem Großteil der Tiere zu über 60% aus FLT3mut exprimierenden Tumorzellen (Abbildung 2.10). Wobei kein signifikanter Unterschied zwischen Mäusen mit *Irf8*<sup>-/-</sup> oder *Irf8*<sup>+/+</sup> Knochenmark zu erkennen war.

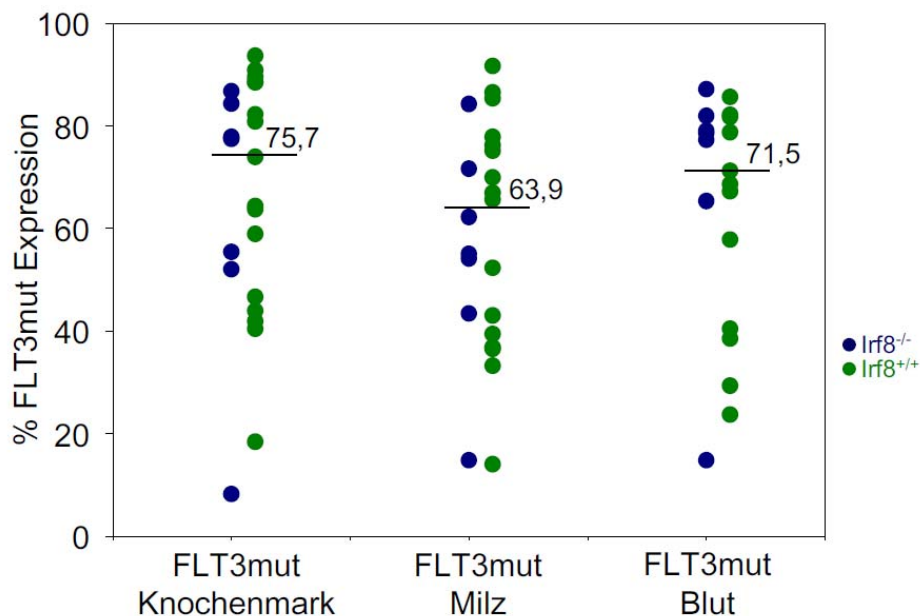


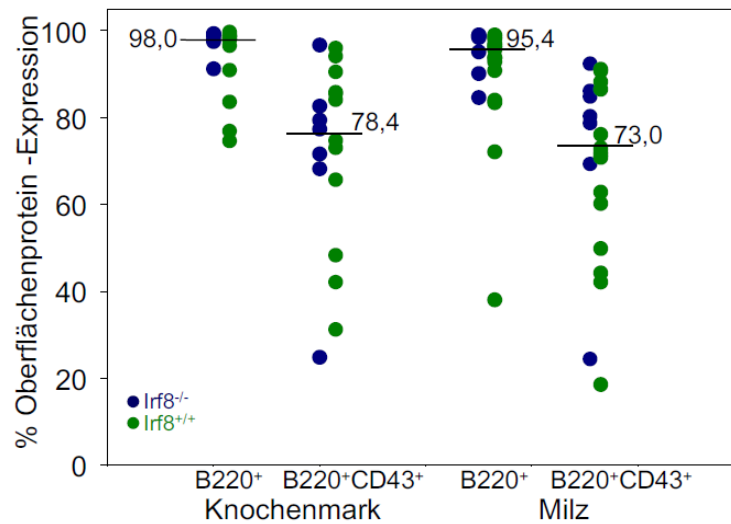
Abbildung 3.10 Die hämatopoetischen Organe der FLT3mut Tiere bestanden zum Großteil aus Tumorzellen. Dargestellt ist der Anteil FLT3mut exprimierender Zellen in Knochenmark, Milz und Blut der FLT3mut Tiere, wobei jeder Punkt den mittels Durchflußzytometrie bestimmten GFP Expressionswert einer Maus im entsprechenden Organ repräsentiert. Angegeben ist der Median der jeweiligen Kohorte. Blau= *Irf8*<sup>+/+</sup>; grün= *Irf8*<sup>-/-</sup>.

### **3.2.4 FLT3mut Expression löste in 23 von 24 erkrankten Tieren eine B-Zell-Leukämie aus**

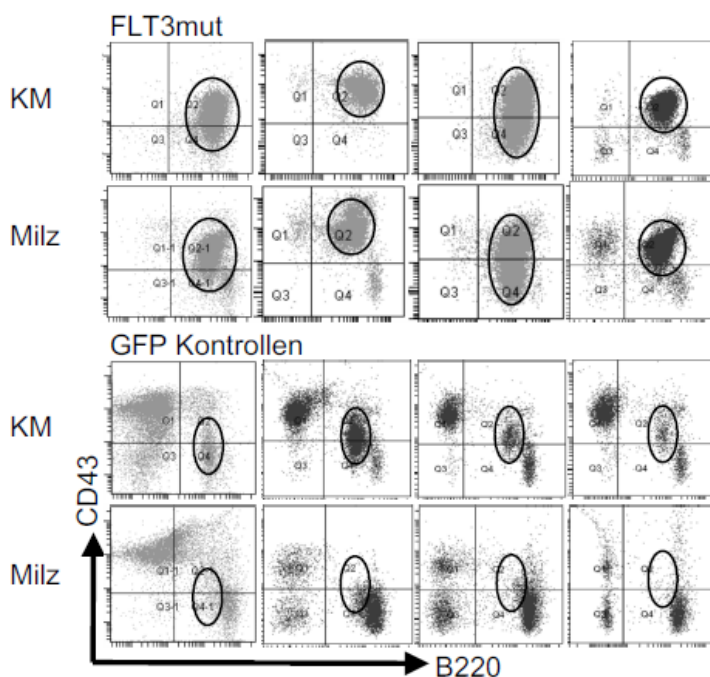
Eine Charakterisierung des Immunphänotyps der Tumorzell-Populationen erfolgte durch weiterführende Analysen am Durchflußzytometer (Kogan et al., 2002; Morse et al., 2002) (Hardy and Hayakawa, 2001; Hardy et al., 2007). Hierbei wurde die Expression Zelltyp-spezifischer Oberflächenproteine genutzt, um die Differenzierungsstadien der in den hämatopoetischen Organen vorliegenden Zellen mit Hilfe von Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern zu bestimmen.

Die FLT3mut Populationen in Knochenmark und Milz aus 19 von 20 analysierten Tieren bestanden bei einem Großteil der Tiere zu über 80% aus B-Zellen, das heißt, sie exprimierten das für B-Zellen charakteristische Oberflächenprotein B220 (Abbildung 3.11). Das Oberflächeprotein Leukosialin (CD43) detektiert in Kombination mit B220 eine Population früher B-Zellen. In Abbildung 3.12 sind beispielhaft aus jedem der vier unabhängigen Experimente durchflußzytometrische Analysen dargestellt, die eine Expression von CD43 und B220 in Milz- und Knochenmarkzellen erkrankter FLT3mut und gesunder GFP Kontrolltiere zeigen. Analysen der Kontrollmäuse machten deutlich, dass es sich bei dieser Population um ein B-Zell-Differenzierungsstadium handelte, das im Knochenmark nur schwach und in der Milz gar nicht nachweisbar war (Abbildung 2.12). In 19 von 20 FLT3mut Tieren war dagegen eine auffällige B220<sup>+</sup>/CD43<sup>+</sup> Population sichtbar gewesen. Unabhängig vom gewählten Maushintergrund (IRF8<sup>-/-</sup> oder IRF8<sup>+/+</sup>) bestanden die FLT3mut Populationen in Milz und Knochenmark bei einem Großteil dieser Tiere zu über 60% aus B220 und CD43 positiven Zellen (Abbildung 3.11). Die Expression des Transferrin-Rezeptors (CD71) und des CD90 Glykoproteins wurden auf fast allen FLT3mut Zellen detektiert. Sie wurden als Indikatoren für eine starke Zellteilung interpretiert (Abbildung 3.13). Erythrozytäre (Ter119), myeloische (Gr-1/CD11b) oder T-Zell spezifische (CD3) Oberflächenproteine wurden kaum exprimiert (Tabelle 3.2).

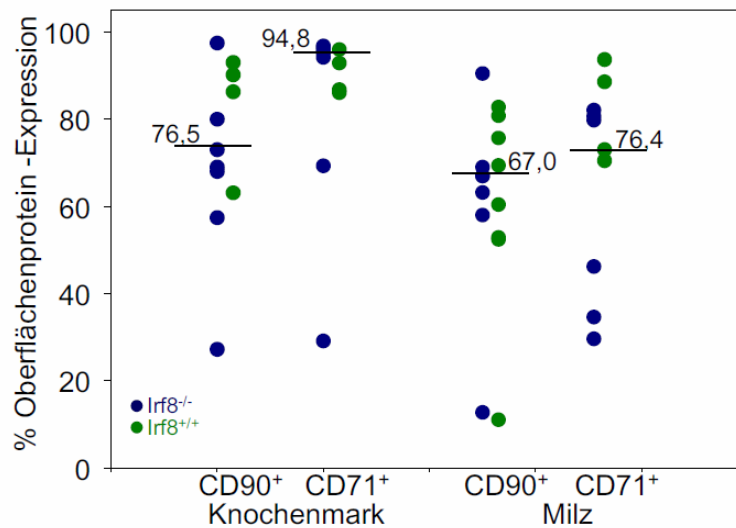
Zusammengefasst bestätigten alle gezeigten durchflußzytometrischen Analysen der hämatopoetischen Organe den in Abschnitt 3.2.2 durch mikroskopische Untersuchungen erhaltenen Lymphoblasten-Phänotyp. In 23 von 24 FLT3mut Tieren hatten sich B-Zell Tumorphpopulationen im Knochenmark entwickelt, dem Ort der frühen B-Zell-Differenzierung, und infiltrierte von dort ausgehend die Milz. Diese Tiere waren an einer akuten lymphatischen Leukämie erkrankt.



**Abbildung 3.11 Die Tumorzellen in Knochenmark und Milz der FLT3mut Tiere bestanden zum Großteil aus frühen B-Zellen.** Dargestellt ist der Anteil B220 bzw. B220 und CD43 positiver Zellen innerhalb der Population GFP exprimierender Zellen von Knochenmark und Milz untersuchter FLT3mut Tiere, wobei jeder Punkt den mittels Durchflußzytometrie bestimmten Expressionswert einer Maus im entsprechenden Organ repräsentiert. Angegeben ist der Median der jeweiligen Kohorte.



**Abbildung 3.12 Akkumulation einer Population früher B-Zellen (B220+CD43<sup>+/-</sup>) in Milz und Knochenmark von FLT3mut Tieren.** Dargestellt sind die durchflußzytometrischen Analysen GFP exprimierender Zellpopulationen von FLT3mut (#3 Exp.7, #3 Exp.13, #6 Exp.15, #7 Exp.42) und GFP Kontrollmäusen (#1 Exp.7, #1 Exp.42, #3 Exp.42, #4 Exp.42). Die Zellen wurden mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern gefärbt, die sich gegen zwei B-Zell-spezifische Oberflächenproteine richteten (B220/CD43). Die in FLT3mut Tieren auffällige B220<sup>+</sup>CD43<sup>+/-</sup> Population ist in allen Analysen durch eine Umrahmung markiert.



**Abbildung 3.13** Die Tumorzellen in Knochenmark und Milz der FLT3mut Tiere bestanden zum Großteil aus stark proliferierenden Zellen. Dargestellt ist der Anteil CD90 bzw. CD71 positiver Zellen innerhalb der Population GFP exprimierender Zellen von Knochenmark und Milz untersuchter FLT3mut Tiere, wobei jeder Punkt den mittels Durchflußzytometrie bestimmten Expressionswert einer Maus im entsprechenden Organ repräsentiert. Angegeben ist der Median der jeweiligen Kohorte.

Zelltyp	B-Zellen		Myeloisch		Erythrozytär
	% B220 <sup>+</sup>	% B220 <sup>+</sup> /CD43 <sup>+</sup>	% Gr-1 <sup>+</sup>	% Gr-1 <sup>+</sup> /CD11b <sup>+</sup>	% CD71 <sup>+</sup> /Ter119 <sup>+</sup>
FLT3mut KM	94,5+/-7,5 (n=19)	74,8 +/-17,9 (n=18)	7,0+/-14,1 (n=10)	1,2+/-1,7 (n=10)	0,9+/-0,5 (n=10)
FLT3mut Milz	90,6+/-13,3 (n=22)	70,9 +/-18,7 (n=22)	10,2+/-9,9 (n=11)	1,8+/-1,2 (n=11)	3,0+/-1,7 (n=10)
FLT3mut Blut	98,5+/-0,6 (n=6)	85,4+/-1,2 (n=2)	6,3+/-3,1 (n=2)	1,1+/-1,0 (n=2)	15,9+/-5,2 (n=6)

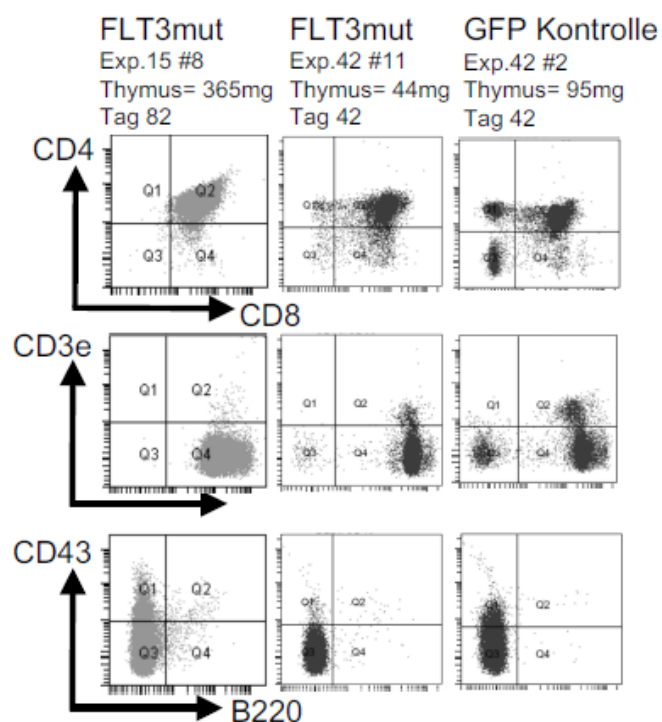
  

Zelltyp	Frühe T-Zellen	Proliferierende Zellen	
	% CD90 <sup>+</sup> /CD3e <sup>+</sup>	% CD90 <sup>+</sup> /CD3e <sup>-</sup>	% CD71 <sup>+</sup> /Ter119 <sup>-</sup>
FLT3mut KM	2,5 +/-2,5 (n=10)	77,8+/-13,0 (n=10)	91,0+/-8,1 (n=10)
FLT3mut Milz	1,5+/-1,1 (n=8)	64,3+/-18,2 (n=14)	67,9+/-21,6 (n=10)
FLT3mut Blut	NA	51,9+/-3,8 (n=2)	25,6+/-8,0 (n=2)

**Tabelle 3.2** Expression B- und T-Zell-spezifischer, myeloischer, erythrozytärer und sonstiger Oberflächenproteine in Knochenmark, Milz und Blut erkrankter FLT3mut Tiere. Die prozentualen Anteile (Mittelwerte) wurden mittels durchflußzytometrischer Analysen der FLT3mut exprimierenden Tumorphosphorpopulation bestimmt.

### 3.2.5 FLT3mut Expression führte in einem von 24 erkrankten Tieren zur Bildung eines T-Zell-Tumors im Thymus

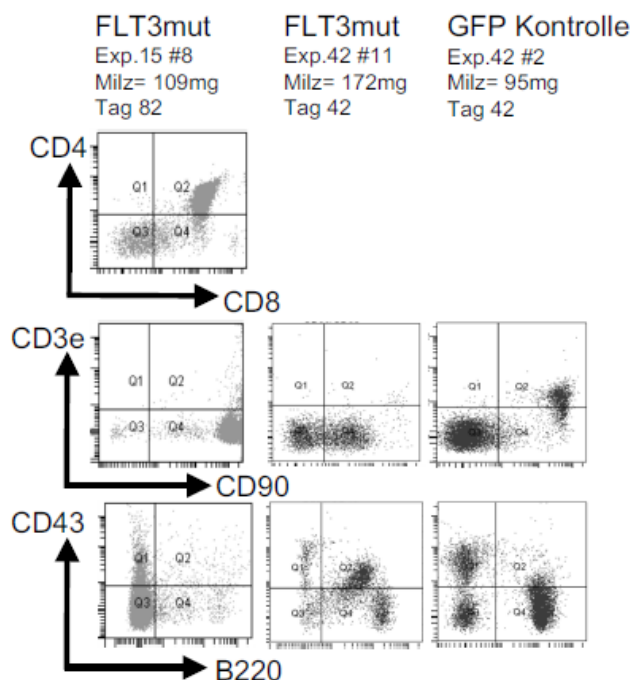
Eine FLT3mut Maus (Exp.15 #8) erkrankte im Vergleich zu den übrigen Tieren deutlich später. Knochenmark, Milz und Blut bestanden, ebenso wie bei den übrigen Tieren, aus einem Großteil FLT3mut exprimierender Zellen. Der vergrößerte Thymus war sogar zu 95% FLT3mut positiv (Abbildung 3.9). Neben dem vergrößerten Thymus (Abbildung 3.6) unterschied sich das Krankheitsbild dieser Maus von den übrigen Tieren auch dadurch, dass in den FLT3mut Populationen von Knochenmark, Milz, Blut und Thymus keine B-Zellen (B220) nachgewiesen werden konnten. Erweiterte durchflußzytometrische Analysen ergaben, dass es sich bei der Tumorphosphorpopulation um T-Zellen handelte (Abbildung 3.14). Abgebildet ist die Expression T-Zell-spezifischer Oberflächenproteine (CD4, CD8, CD25, CD90) auf den Zellen des vergrößerten Thymus und der Milz. Verglichen wurden diese Ergebnisse mit den Expressionsanalysen der Thymuszellen einer gesunden GFP Kontrolle (Exp.42 #2) und einer an einer B-ALL erkrankten FLT3mut Maus (Exp.42 #11).



**Abbildung 3.14** Die leukämische Population im stark vergrößerten Thymus der erkrankten FLT3mut Maus #8 bestand aus unreifen T-Zellen. Dargestellt sind durchflußzytometrische Analysen GFP positiver Zellpopulationen des Thymus der FLT3mut Maus mit stark vergrößertem Thymus (Exp.15 #8, 95,8% GFP), einer FLT3mut Maus mit B-ALL (Exp.42 #11, 68% GFP) und einer gesunden GFP Kontrollmaus (Exp.42 #2, 60% GFP). Untersucht wurden T-Zell-spezifische (CD4/CD8; CD90/CD3e) und B-Zell-spezifische (B220/CD43) Oberflächenproteine. Angegeben sind außerdem Thymus-Masse und Zeitpunkt der Analyse, wobei die Transplantation Tag 0 repräsentierte.



Die Tumorzellen im Thymus dieser FLT3mut Maus bestanden aus einer zu 100% CD4 und CD8 doppelt positiven (DP) T-Zell-Population. Hierbei handelt es sich um fast ausgereifte, kurzlebige T-Zellen, die den Thymus nach einem weiteren Differenzierungsschritt als reife CD4 oder CD8 positive Zellen verlassen würden. Am Beispiel der GFP Kontrollmaus wird deutlich, dass die DP Population auch in der normalen T-Zell-Entwicklung den Großteil der Thymuszellen einer ausgewachsenen Maus ausmachten. Im Thymus des Kontrolltieres waren jedoch noch zusätzliche Populationen (CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup>, CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup>) nachweisbar, die verschiedene T-Zell Differenzierungsstadien repräsentierten und in der Tumorphosphorpopulation fehlten. Die Tumorzellen exprimierten neben CD4 und CD8 keinen T-Zell-Rezeptor, der durch den verwendeten CD3 Antikörper hätte detektiert werden können und dessen Expression zumindest für einen Teil der DP Populationen üblich wäre (Abbildung 2.14). Demnach handelte sich bei den Tumorzellen von Maus 8 um eine vom Differenzierungsstatus her relativ einheitliche T-Zell Population, die nicht nur im Thymus, sondern auch in Knochenmark (nicht gezeigt) und Milz (Abbildung 3.15) nachweisbar war. Vermutlich wurden die Thymuszellen durch eine Störung der T-Zell Differenzierung zu Tumorzellen und infiltrierten vom Thymus ausgehend Knochenmark und Milz.



**Abbildung 3.15** Die Tumorzellen aus dem stark vergrößerten Thymus einer FLT3mut Maus hatten auch die Milz infiltriert. Dargestellt sind durchflußzytometrische Analysen GFP positiver Zellpopulationen der Milz des FLT3mut Tieres mit stark vergrößertem Thymus (Exp.15 #8, 80% GFP), einer FLT3mut Maus mit B-ALL (Exp.42 #11, 37% GFP) und einer gesunden GFP Kontrollmaus (Exp.42 #2, 46% GFP). Untersucht wurden T-Zell-spezifische (CD4/CD8; CD90/CD3e) und B-Zell-spezifische (B220/CD43) Oberflächenproteine. Angegeben sind außerdem Milz-Masse und Zeitpunkt der Analyse, wobei die Transplantation Tag 0 repräsentierte.

### 3.3. Transplantation der FLT3mut Tumore

Um die FLT3mut Tumore auf ihre Malignität hin zu untersuchen, wurden Knochenmark-, Milz-, oder Thymuszellen erkrankter Mäuse, die nach steriler Entnahme als Zellsuspension eingefroren worden waren, erneut transplantiert. Bei den Tumorzellen aus Milz und Knochenmark handelte es sich um Material einer Maus mit B-Zell-Leukämie (Exp.15 #6). Die Thymuszellen stammten aus dem Tier, das an einem T-Zell-Tumor erkrankt war (Exp.15 #8). Die Transplantation erfolgte in die Schwanzvene subletal bestrahlter Empfängertiere. Pro Tumortyp sollte der Effekt zweier unterschiedlicher Zellzahlen untersucht werden ( $1 \times 10^5$  und  $1 \times 10^6$  B-Zellen bzw.  $0,5 \times 10^5$  und  $5 \times 10^5$  T-Zellen).

#### 3.3.1 Im Gegensatz zu leukämischen FLT3mut T-Zellen lösten leukämische FLT3mut B-Zellen innerhalb einer sehr kurzen Latenzzeit Sekundärtumore aus

Über einen Untersuchungszeitraum von sechs Monaten entwickelte keines der mit T-Zellen transplantierten Tiere äußerliche Krankheitssymptome. Analysen geopferter Tiere, die äußerlich gesund waren, ergaben weder auffällige Blutparameter (Leukozytenzahlen, Hämatokritwerte), noch augenfällige Veränderungen der inneren Organe (Milz, Lymphknoten, Thymus, Leber, Niere). Durchflußzytometrische Untersuchungen von Knochenmark, Milz und Blut bestätigten diesen Befund. FLT3mut exprimierende Tumorzellen waren gar nicht oder nur zu einem sehr geringen Prozentsatz (bis 1,6%) zu finden. Im Gegensatz dazu waren alle Tiere, denen leukämische B-Zellen verabreicht worden waren, bereits 18 Tage nach der Transplantation erkrankt. Es traten die für FLT3mut Primärtumore beschriebenen Krankheitssymptome wie Apathie, gekrümmte Haltung, eingefallene Seiten und Hinterhand-Paraparese (8 von 16 analysierten Mäusen) auf. Die Milzen waren bei allen Tieren stark vergrößert ( $376 \text{ mg} \pm 13$ ,  $n=9$ ) und bestanden laut Analyse am Durchflußzytometer im Mittel zu über 84% ( $84,4\% \pm 5,7$ ;  $n=14$ ) aus FLT3mut exprimierenden Tumorzellen. Auch das Knochenmark aus Schienbein und Oberschenkelknochen verdeutlichte mit über 90% FLT3mut Expression ( $91,3\% \pm 1,6$ ;  $n=4$ ) die extreme Invasivität der transplantierten Tumorzellen. Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass lediglich die leukämischen B-Zellen aus Milz und Knochenmark, jedoch nicht die Thymuszellen des T-Zell Tumors in der Lage waren, einen Sekundärtumor auszulösen.

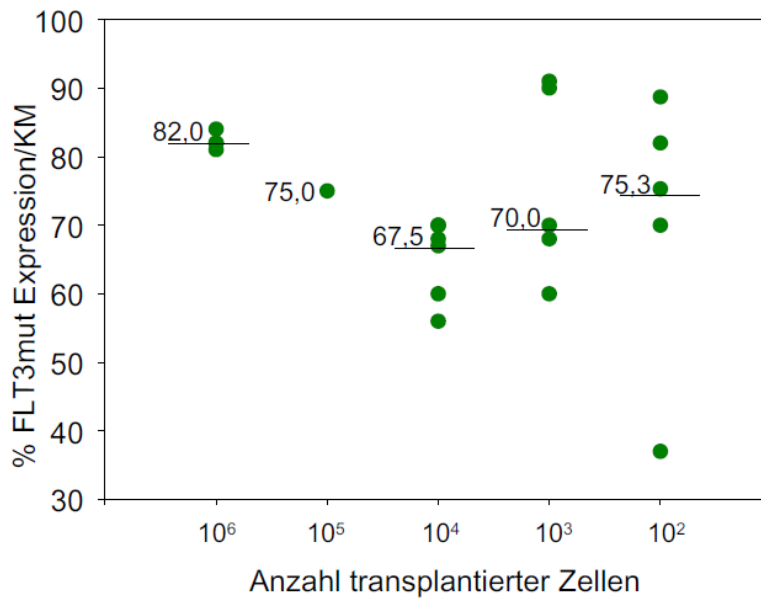
### 3.3.2 Hohe Frequenz Tumor-induzierender Zellen in FLT3mut B-Zell-Leukämie

Mit Hilfe eines weiteren Transplantationsexperiments sollte bestimmt werden, ob alle oder nur einige wenige Zellen der B-Zell Sekundärtumore in der Lage sind, eine Leukämie auszulösen. Zu diesem Zweck wurden Milztumorzellen (Exp.18 #9 und #10) unterschiedlicher Anzahl [ $1 \times 10^6$  (n=4);  $1 \times 10^5$  (n=3);  $1 \times 10^4$  (n=3);  $1 \times 10^3$  (n=6);  $1 \times 10^2$  (n=6);  $1 \times 10^1$  (n=3)] in subletal bestrahlte Empfängertiere transplantiert. Daraufhin wurde beobachtet, ob und mit welcher Latenz die Mäuse an einer frühen B-Zell Leukämie erkrankten.

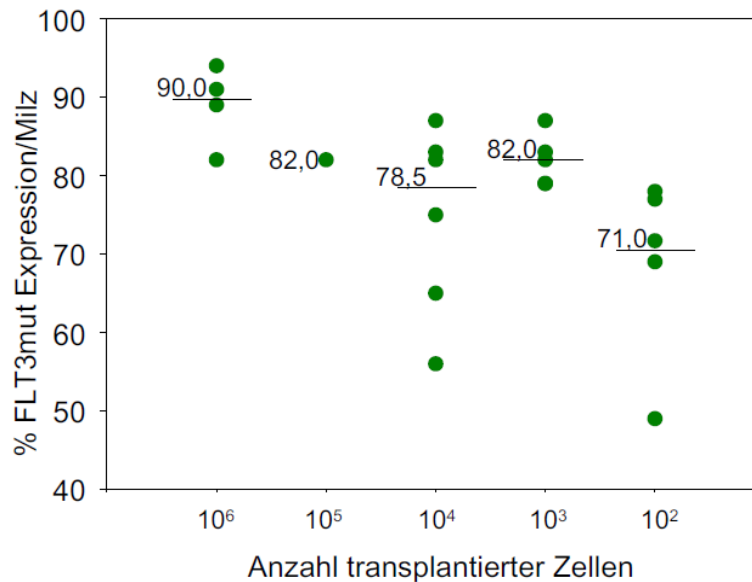
Die drei Mäuse, denen zehn Tumorzellen transplantiert worden waren, überlebten den Beobachtungszeitraum von über 120 Tagen, ohne äußerliche Krankheitssymptome zu entwickeln. Abgesehen von zwei Empfängertieren, die im oben genannten Zeitraum ebenfalls unauffällig blieben, waren bereits 26 Tage nach der Transplantation alle Mäuse (n=20) erkrankt. Die Latenzzeit, mit der die Tiere erkrankten, war bei  $1 \times 10^6$  transplantierten Leukämiezellen mit 12 Tagen nur unwesentlich kürzer als bei Mäusen, denen  $1 \times 10^5$  (15 Tage),  $1 \times 10^4$  (15 Tage),  $1 \times 10^3$  (17 Tage) oder  $1 \times 10^2$  (21,8 Tage) Tumorzellen verabreicht worden waren.

Analysen der Blutparameter ergaben, abgesehen von zwei Ausnahmen (Kohorte  $1 \times 10^2$ ), stark erhöhte Leukozytenzahlen (Mittelwert (MW)  $42,6 \times 10^6 \pm 16,8 \times 10^6$  Leukozyten/ml Blut; n=13) und außerhalb des Normbereichs (40-50%) liegende Hämatokritwerte (MW 31,0 +/- 5,8%; n=14). Die Blutbildung war, wie in den zuvor beschriebenen Tieren mit Primärtumoren bereits gezeigt, durch die Ausbreitung der Tumorzellen erheblich gestört. Die in diesem Versuch bei allen Tieren beobachteten hohen Leukozytenzahlen lassen vermuten, dass die Ausschwemmung der Tumorzellen ins das Blut der Mäuse deutlich schneller erfolgte, als noch in den Tieren mit Primärtumoren.

Durchflußzytometrische Analysen der FLT3mut Expression machten deutlich, dass die leukämischen Zellen Knochenmark und Milz der erkrankten Tiere überschwemmt hatten (Abbildungen 3.16 und 3.17). Knochenmark und Milz bestanden bei der Hälfte der Tiere zu über 65% aus FLT3mut exprimierenden Zellen. Der Anteil FLT3mut exprimierender Zellen korrelierte hierbei nicht mit der Anzahl transplantierte Zellen. Im transplantierten Sekundärtumor waren demnach weniger als 200 Zellen in der Lage, im Empfängertier in kürzester Zeit eine B-Zell-Leukämie auszulösen.



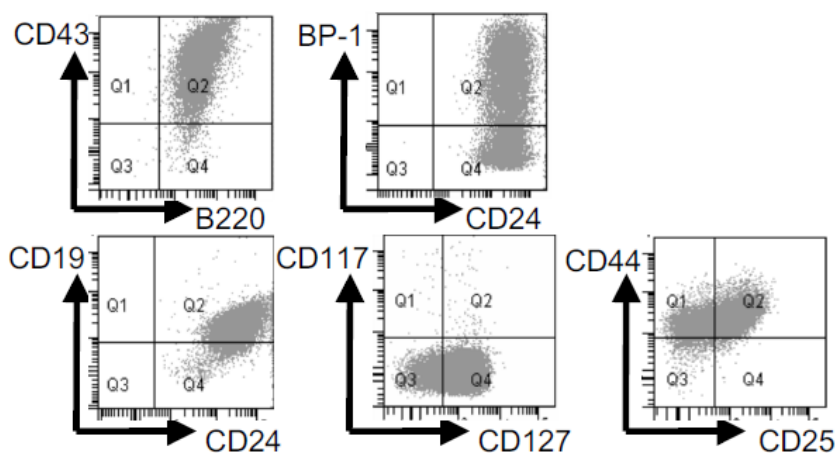
**Abbildung 3.16** Das Knochenmark der FLT3mut Tiere bestand, unabhängig von der Anzahl transplantierte Zellen, zum Großteil aus FLT3mut exprimierenden Zellen. Dargestellt ist der Anteil FLT3mut exprimierender Zellen im Knochenmark, abhängig von der Anzahl transplantierte Zellen. Jeder Punkt repräsentiert den mittels Durchflußzytometrie bestimmten GFP-Expressionswert einer Maus im entsprechenden Organ. Angegeben ist der Median der jeweiligen Kohorte.



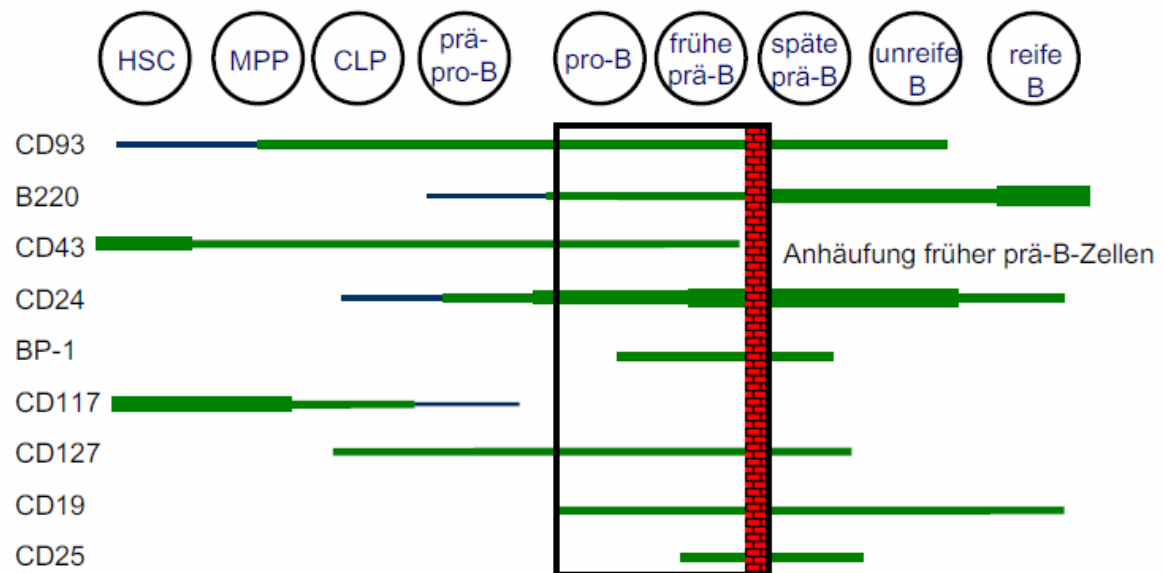
**Abbildung 3.17** Die Milz der FLT3mut Tiere bestand, unabhängig von der Anzahl transplantierte Zellen, zum Großteil aus FLT3mut exprimierenden Zellen. Dargestellt ist der Anteil FLT3mut exprimierender Milzzellen abhängig von der Anzahl transplantierte Zellen. Jeder Punkt repräsentiert den mittels Durchflußzytometrie bestimmten GFP-Expressionswert einer Maus im entsprechenden Organ. Angegeben ist der Median der jeweiligen Kohorte.

### 3.3.3 Die Differenzierung der FLT3mut exprimierenden leukämischen B-Zell Population war am Übergang von der frühen zur späten prä-B-Zelle blockiert

Um die Untersuchungen der B-Zell-Tumore aus den vorangegangenen Experimenten zu erweitern, wurde eine noch genauere Charakterisierung der leukämischen Zellpopulation mittels Durchflußzytometrie vorgenommen. Orientierung zur Wahl der Antikörper boten Veröffentlichungen von Hardy et al., in denen die Entwicklungsstufen der B-Zell-Differenzierung genau dargelegt sind (Hardy and Hayakawa, 2001; Hardy and Hayakawa, 2005; Hardy et al., 2007). In Abbildung 3.18 sind beispielhaft die Ergebnisse einer durchflußzytometrischen Analyse dargestellt, für die ein FLT3mut Tertiärtumor der Milz mit B-Zell-spezifischen Antikörpern gefärbt wurde. Mit Hilfe dieser und weiterer Antikörper, wurden mehrere, durch Transplantation leukämischer Zellen erhaltenen FLT3mut Tumore auf die Expression von B-Zell-typischen Oberflächenproteinen untersucht.



**Abbildung 3.18** Die leukämische Population der retransplantierten FLT3mut Mäusen bestand aus unreifen B-Zellen. Dargestellt sind repräsentative durchflußzytometrische Analysen des FLT3mut exprimierenden Knochenmarks einer an B-ALL erkrankten FLT3mut Maus. Untersucht wurden B-Zell-spezifische Oberflächenproteine.

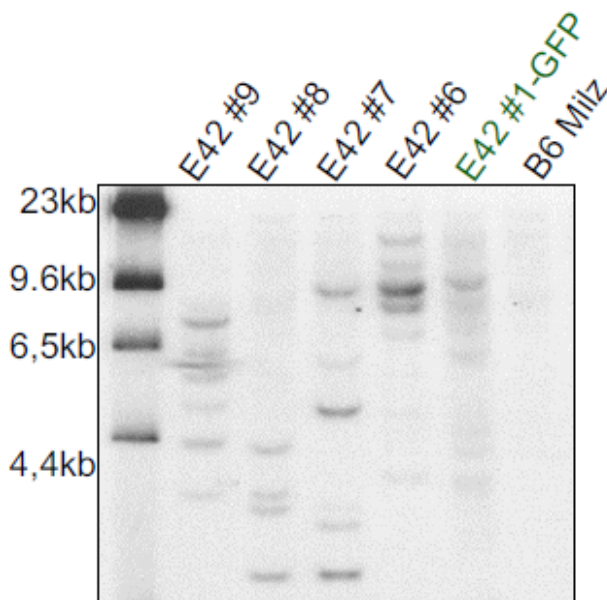


**Abbildung 3.19** Die leukämische Population der retransplantierten FLT3mut Mäusen bestand aus unreifen B-Zellen. Zusammenfassend ergaben die durchflußzytometrischen Analysen, dass es sich bei den transplantierbaren Tumorzellen um undifferenzierte B-Zellen handelte, die im Übergang von der frühen zur späten prä-B-Zelle blockiert waren. Differenzierungsschema abgewandelt nach Hardy et al. (Hardy and Hayakawa, 2001; Hardy et al., 2007).

Abbildung 3.19 fasst die Ergebnisse der durchflußzytometrischen Immuno-Phänotyp-Analysen zusammen. Hier sind zum einen alle untersuchten Oberflächenproteine und der entsprechende exprimierende B-Zell Typ aufgelistet, gleichzeitig wird verdeutlicht, dass das Profil der exprimierten Oberflächenproteine von Knochenmark und Milz erkrankter FLT3mut Tiere die aus den Analysen der FLT3mut Primärtumore erhaltenen Ergebnisse bestätigt. Es handelte sich demnach bei den transplantierbaren Tumorzellen um nicht ausdifferenzierte B-Zellen, die in ihrer Entwicklung im Übergang von der frühen zur späten prä-B-Zelle blockiert waren.

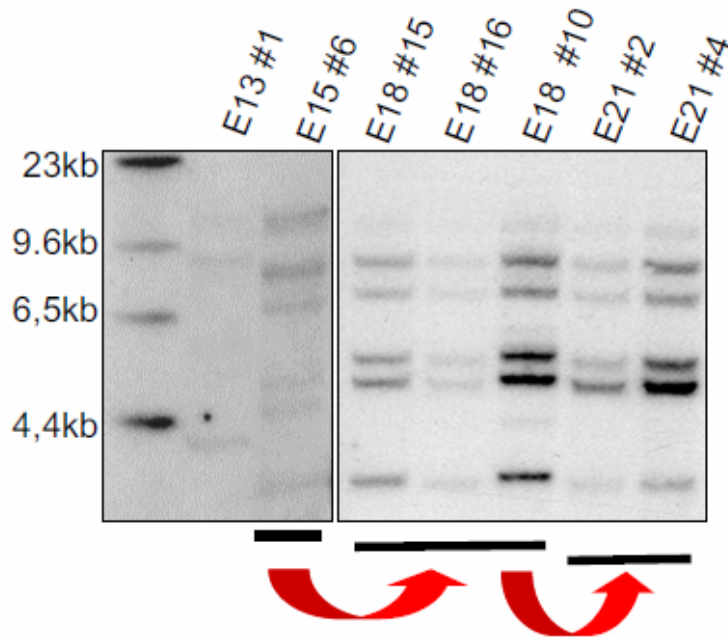
### 3.4 FLT3mut ALL Zellen waren klonal

Im besprochenen FLT3mut Knochenmark-Transplantations-Modell wurden retrovirale Vektoren benutzt, um FLT3mut in hämatopoetischen Vorläuferzellen zu exprimieren. Die Integrationsorte dieser Viren sollten dabei helfen herauszufinden, ob es sich um Tumore klonalen Ursprungs handelte. Zur Beantwortung dieser Frage wurde genomische DNA aus FLT3mut Tumorzellen in Southern-Blot-Analysen untersucht. In unabhängigen FLT3mut Tumoren aus verschiedenen Mäusen eines Experiments konnten jeweils mindestens vier oder mehr virale Integrationsstellen nachgewiesen werden (Abbildung 3.20). Die Zellen dieser Tumore waren in allen Fällen klonalen Ursprungs (Exp.42 #6-9). Als Kontrollen dienten Milzzellen einer GFP-Maus mit oligoklonalem Integrationsmuster und Milzzellen eines uninfizierten C57BL/6J Tieres.



**Abbildung 3.20** FLT3mut prä-B-Zell Tumore waren klonal und weisen mehrere virale Integrationsstellen auf. Dargestellt sind Southern-Blot-Analysen genomischer DNA aus Milzzellen unabhängiger FLT3mut Tumore, Milzzellen einer GFP Kontrolle (GFP) und Milzzellen einer untransplantierten C57BL/6J (B6) Maus. (E, Experiment)

Um zu zeigen, dass die Tumore wirklich klonal waren und nicht etwa polyklonal mit einzelnen Integrationen der Proviren, wurden die seriell transplantierten Tumore aus Abschnitt 3.3 und deren Ursprungszellen aus Abschnitt 3.2 im Southern-Blot untersucht (Abbildung 3.21). Zellen des Ursprungstumors von Maus 6 aus Experiment 15 lösten in Empfängertieren 15, 16, 10 aus Experiment 18 Sekundärtumore mit einem sehr ähnlichen Integrationsmuster aus. Auch nach einem weiteren Transplantationsschritt blieb dieses Integrationsmuster in den Tertiärtumoren von Experiment 21 erhalten.



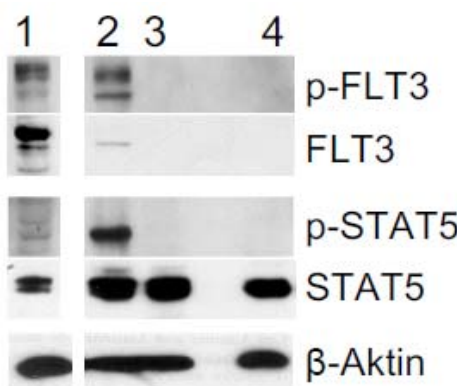
**Abbildung 3.21** FLT3mut prä-B-Zell Tumore waren klonal und wiesen mehrere virale Integrationsstellen auf. Dargestellt sind Southern-Blot-Analysen genomischer DNA aus Milzzelltumoren. Die roten Pfeile geben an, welche Tumorzellen für weitere Transplantationen benutzt wurden und zeigen von dort aus auf die aus ihnen entstandenen Tumore.

Diese Southern-Blot-Analysen konnten zeigen, dass die FLT3mut Tumore klonalen Ursprungs waren und pro Klon immer mehrere virale Integrationen vorlagen.



### 3.5 FLT3mut Tumore zeigten eine konstitutive Aktivierung von STAT5

Frühere Arbeiten haben bereits gezeigt, dass die stromabwärts gerichtete Signaltransduktion von mutiertem FLT3 zu einer Phosphorylierung und damit Aktivierung des STAT5 Proteins führt, die im Gegensatz dazu beim Wildtyp-FLT3 nicht oder nur kaum nachweisbar war (Grundler et al., 2003; Hayakawa et al., 2000; Kiyoi et al., 2002; Mizuki et al., 2000; Mizuki et al., 2003). Diese Ergebnisse bezogen sich jedoch nur auf Erkrankungen mit myeloischem Phänotyp. Um zu untersuchen, ob auch in den durch FLT3mut ausgelösten B-Zell-Tumoren (CD43<sup>+</sup>/B220<sup>+</sup>) aktiviertes STAT5 vorliegt, wurden Proben aus dem Knochenmark erkrankter Tiere im Western Blot Verfahren analysiert. Als Vergleichsprobe diente eine B220<sup>+</sup>/CD43<sup>+</sup> B-Zell-Population, die aus dem Knochenmark unbehandelter C57BL/6J Mäuse mittels Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung isoliert wurde.



**Abbildung 3.22 Leukämische FLT3mut Zellen enthalten phosphorylierte Formen der FLT3 und STAT5 Proteine.**

Western-Blot-Analyse sortierter (Zielpopulation= GFP<sup>+</sup>) FLT3mut Zellen aus dem Knochenmark einer Maus mit B-ALL (2) im Vergleich mit einer humanen ALL Zelllinie (1), sortiertem (Zielpopulation= CD43<sup>+</sup>/B220<sup>+</sup>) (3) und unsortiertem Knochenmark einer C57BL/6J Maus (4). Die Detektion von phosphoryliertem FLT3 (p-FLT3) und p-STAT5 zeigt, verglichen mit (3) und (4), eine Überexpression der entsprechenden Proteine in der FLT3mut Population. Die REH Zellen (1) dienen als FLT3 Expressionskontrolle. Als Ladekontrolle wurde ein Antikörper gegen β-Aktin verwendet.

In den murinen FLT3mut Tumorzellen konnte die Expression von humanem FLT3 nachgewiesen werden, wobei der Anteil an phosphoryliertem FLT3 (pFLT3) gegenüber der unphosphorylierten Form (FLT3) überwog (Abbildung 3.22, Spur 2). Dieses Ergebnis unterstützt die Annahme, dass es sich bei FLT3mut um eine konstitutiv aktive Form der Rezeptor-Tyrosinkinase handelt. Eine humane ALL-Zelllinie (REH) diente in diesem Versuch als positive Kontrolle für die Expression von FLT3. Auch in dieser Probe war phosphoryliertes und unphosphoryliertes FLT3 zu erkennen.

Untersuchungen der STAT5 Expression in den B220<sup>+</sup>/CD43<sup>+</sup> B-Zellen der gesunden Maus konnten unphosphoryliertes STAT5 (STAT5) sichtbar machen, phosphoryliertes STAT5 (pSTAT5) war jedoch nicht detektierbar. Die pSTAT5 Signale waren nur in den Tumorzellen aus der FLT3mut induzierten B-Zell-Leukämie nachweisbar (Abbildung 3.22, Spur 2). Phosphoryliertes STAT5 könnte demnach auch bei der Entstehung lymphatischer Leukämien mit mutiertem FLT3 eine Rolle spielen.

### 3.6 Aktiviertes STAT5 im Knochenmark-Transplantationsmodell

In den unter 3.2 beschriebenen FLT3mut Tumoren konnte mittels Western Blot Analyse eine Aktivierung des STAT5 Signalweges nachgewiesen werden. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit sollte deshalb untersucht werden, ob die Expression konstitutiv aktiver STAT5 Formen in hämatopoetischen Vorläuferzellen ausreicht, um den für FLT3mut beschriebenen Krankheitsverlauf im Knochenmark-Transplantations-Modell nachzubilden. Für dieses Experiment wurden zwei konstitutiv aktive STAT5 (STAT5 1\*6= STAT5a1\*6 und STAT5b1\*6) Formen verwendet (Onishi et al., 1998). STAT5a und b werden von zwei unterschiedlichen Genen kodiert, weisen aber eine 96%ige Sequenzhomologie auf. In den nachfolgend aufgeführten Ergebnissen werden die zwei STAT5 1\*6 Formen zum Teil nicht differenziert betrachtet, sondern aufgrund identischer Effekte als STAT5 1\*6 zusammengefasst.

#### 3.6.1 Infektion und Transplantation hämatopoetischer Vorläuferzellen

Die Gewinnung und Infektion der hämatopoetischen Vorläuferzellen erfolgte wie unter 3.2 für die FLT3mut Versuche beschrieben. Abbildung 3.23 zeigt die Infektionsraten des nach 5-FU Injektion gewonnenem Knochenmarks vor der Transplantation in die Empfängermäuse.

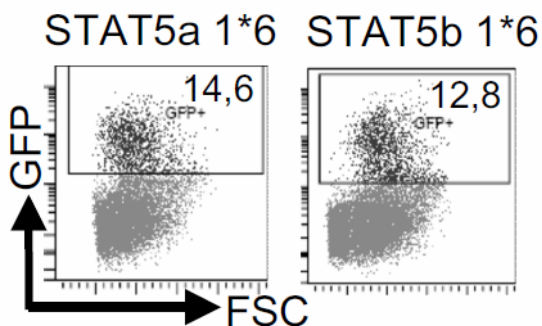


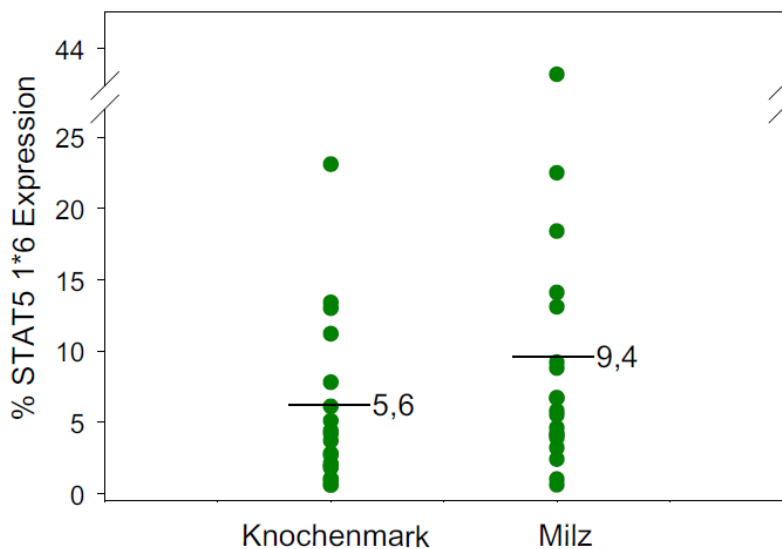
Abbildung 3.23 Expression STAT5a 1\*6 und STAT5b 1\*6 infizierter Knochenmarkzellen vor der Transplantation.

#### 3.6.2 STAT5 1\*6 Expression löste im Knochenmark-Transplantationsmodell keine prä-B-Zell ALL aus

Bereits nach 24 und 34 Tagen erlagen 4 Tiere vermutlich den Folgen der letalen Bestrahlung, die vor der Transplantation verabreicht wurde, um den Spenderzellen das Anwachsen im Organismus zu ermöglichen. Die transplantierten Vorläuferzellen hatten die Bildung peripherer Blutzellen nicht übernommen, was zu einem anämischen Zustand der Tiere führte. Dies ging aus den mit <26% extrem niedrigen Hämatokritwerte hervor (Tabelle 3.3). Im weiteren Verlauf des Experiments (Tag 95 und 140) waren die

Hämatokritwerte bei zwei zusätzlichen Tieren auffällig niedrig (31 und 13%). In diesen Fällen waren im Transplantat vermutlich keine LT-HSCs enthalten gewesen, die nach einer letalen Bestrahlung normalerweise das Langzeit-Überleben einer Maus sichern können. Der Rest der Tiere musste aufgrund unterschiedlichster Symptome geopfert werden, die teilweise mit denen der erkrankten FLT3mut Tiere vergleichbar waren (Tabelle 3.3). Der Versuch umfasste einen Zeitraum von 120 Tagen.

Waren im hämatopoetischen System der Tiere Veränderungen aufgetreten, die mit den Symptomen der FLT3mut Mäuse vergleichbar sind? Zwar waren die Milzen einiger Tiere stark vergrößert und auch die Leukozytenzahlen waren teilweise erhöht, doch diese Beobachtungen korrelierten nicht, wie in den FLT3mut Versuchen, mit dem Auftreten einer ausgeprägten STAT5<sup>1\*6</sup> positiven Population. Durchflußzytometrische Analysen der hämatopoetischen Organe konnten zeigen, dass die STAT5<sup>1\*6</sup> Expression nur bei einem Tier (Exp.36/#3) in Milz und Knochenmark (41 und 23%) deutlich über der Infektionsrate der transplantierten Zellpopulation (14%) lag. Ansonsten war die Expression von STAT5<sup>1\*6</sup> vergleichbar mit oder niedriger als die Ausgangsinfektionsrate und variierte stark von Maus zu Maus (Abbildung 3.24). Vermutlich erlag keine der mit STAT5<sup>1\*6</sup> Knochenmark transplantierten Mäuse im Untersuchungszeitraum von 210 Tagen einer letalen Erkrankung des hämatopoetischen Systems, die direkt auf die Expression von STAT5<sup>1\*6</sup> zurückzuführen wäre.



**Abbildung 3.24** STAT5<sup>1\*6</sup> Expression in Knochenmark und Milz.

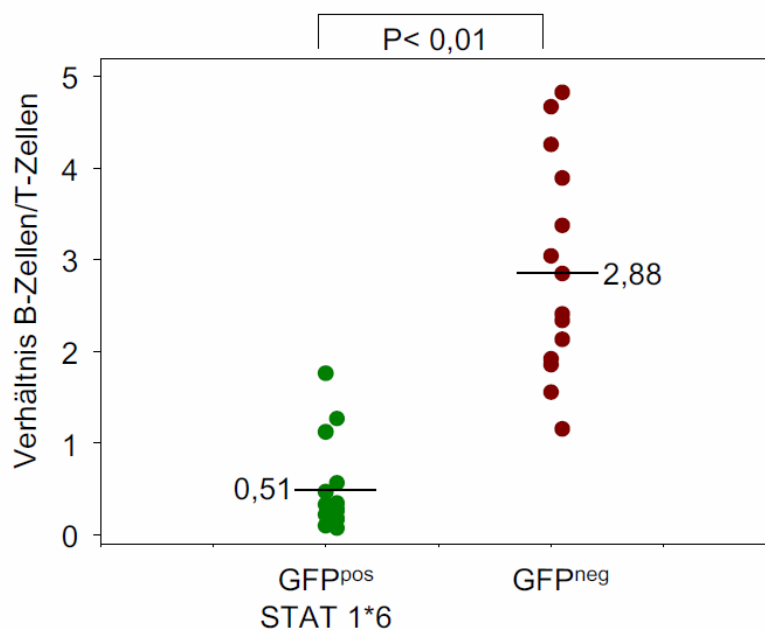
Dargestellt ist der Anteil GFP exprimierender Zellen in Knochenmark und Milz der STAT5<sup>1\*6</sup> Tiere (n=19), wobei jeder Punkt den mittels Durchflußzytometrie bestimmten GFP Expressionswert einer Maus im entsprechenden Organ repräsentiert. Der Mittelwert ist angegeben.

Exp./ Maus	STAT5 1*6 a oder b	Tage nach Transplantation	Milzgröße (mg)	Leukozytenzahl (x10 <sup>6</sup> /ml)	Hämatokrit	äußere Symptome
36/1	a	24	NA	NA	NA	NA
36/2	a	24	NA	NA	NA	NA
36/3	a	34	246	NA	18	1; 2
36/4	a	34	282	NA	25	1; 2
36/5	a	49	138	NA	44	1; 3
36/6	a	67	NA	NA	NA	NA
36/7	a	69	328	12,3	36	1; 3
36/8	a	210	64	11,8	37	4
36/9	a	126	261	8,2	47	4
36/10	a	111	65	7,4	42	1; 2
36/11	a	95	164	6,5	31	1; 3
36/12	b	67	171	NA	40	1
36/13	b	67	211	NA	44	1
36/14	b	69	65	1,3	36	1; 3
36/15	b	75	101	NA	45	1; 4
36/16	b	88	88	10,6	47	5
36/17	b	91	68	3,4	41	4
36/18	b	95	122	11,6	43	4
36/19	b	104	94	14,4	38	1; 2; 6
36/20	b	111	64	1,1	41	1; 2; 4
36/21	b	132	101	4,5	40	4
36/23	b	140	55	1,4	13	5

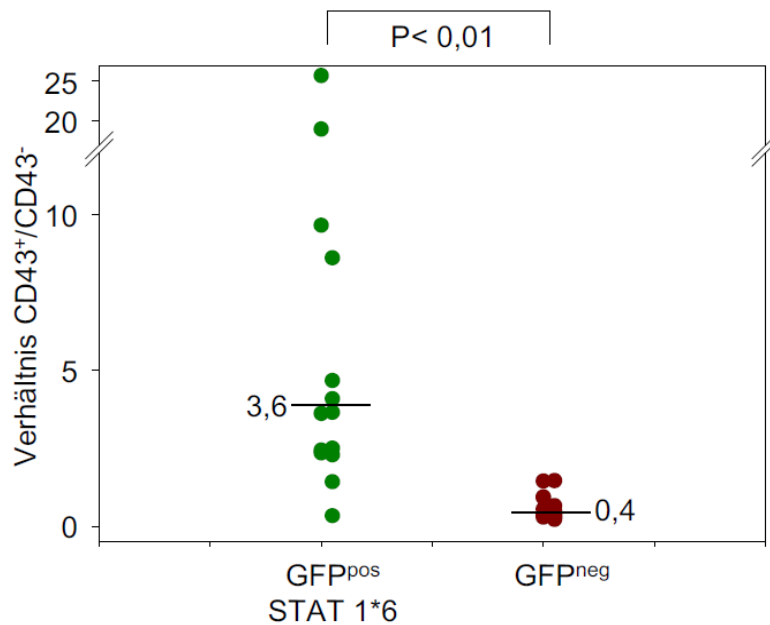
**Tabelle 3.3** Aufgeführt sind alle mit STAT5 1\*6 infiziertem Knochenmark transplantierten Mäuse. nicht analysiert, NA; 1, gekrümmte Haltung; 2, abgemagert; 3, eingefallene Seiten; 4, aufgekratzte Haut; 5, neurologische Störungen; 6, beginnende Paraparese.

### 3.6.3 Konstitutive Expression von aktiviertem STAT5 führte zu einer Störung der B-Zell-Differenzierung

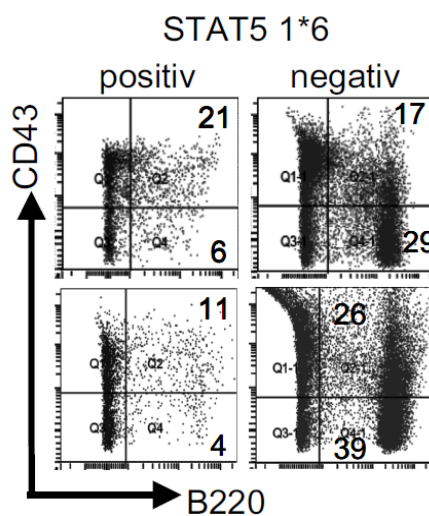
Die Expression von aktiviertem STAT5 hatte im Allotransplantations-Modell keine Leukämie ausgelöst. Trotzdem sollten mit Hilfe durchflußzytometrischer Analysen der Milzzellpopulationen die Auswirkungen einer STAT5 1\*6 Expression auf die Hämatopoese untersucht werden. Auffällig war das verschobene Verhältnis von B-Zellen (B220<sup>+</sup> und CD43<sup>+/-</sup>) zu T-Zellen (CD4<sup>+</sup> und/oder CD8<sup>+</sup>) (Abbildung 3.25). Die STAT5 1\*6 positive Milzzellpopulation bestand im Vergleich zur STAT5 1\*6 negativen Population (interne Kontrolle = uninfizierte Milzzellen der analysierten Maus) aus signifikant weniger B-Zellen. Innerhalb der B-Zell-Population war außerdem das Verhältnis früher zu später B-Zellen zugunsten der früheren Entwicklungsstufen verschoben (Abbildung 3.26). Beispielhaft ist dies anhand ausgewählter durchflußzytometrischer Analysen in Abbildung 3.27 verdeutlicht. Abbildung 3.28 hebt dagegen den Entwicklungsvorteil der T-Zellen hervor.



**Abbildung 3.25** Das Verhältnis von B-Zellen zu T-Zellen war in den Milzen der STAT1\*6 Tiere verschoben. Dargestellt ist das Verhältnis von B220<sup>+</sup> zu CD4<sup>+</sup> und/oder CD8<sup>+</sup> Milzzellen der STAT5 1\*6<sup>pos</sup> (grün) und STAT5 1\*6<sup>neg</sup> (rot) Populationen, wobei jeder Punkt (n=14) den errechneten Wert einer Maus repräsentiert. Statistik mittels SigmaPlot 9.0 errechnet (t-test).

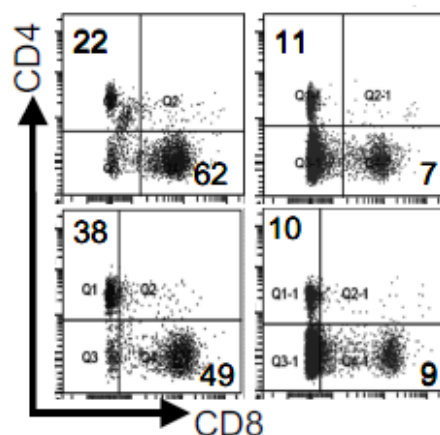


**Abbildung 3.26** Das Verhältnis früher zu später B-Zellen war in den Milzen der STAT1\*6 Tiere verschoben. Dargestellt ist das Verhältnis von B220<sup>+</sup>/CD43<sup>+</sup> zu B220<sup>+</sup>/CD43<sup>-</sup> Milzzellen der STAT5 1\*6<sup>pos</sup> (grün) und STAT5 1\*6<sup>neg</sup> (rot) Populationen, wobei jeder Punkt (n=14) den errechneten Wert einer Maus repräsentiert. Angegeben ist der Median der jeweiligen Kohorte. Statistik mittels SigmaPlot 9.0 errechnet (t-test).



**Abbildung 3.27** Die Akkumulation einer Population früher B-Zellen (B220<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>) in STAT51\*6 Milzen.

Dargestellt sind die durchflußzytometrischen Analysen der STAT5 1\*6<sup>pos</sup> und STAT5 1\*6<sup>neg</sup> Milzzellpopulationen (Exp. 36 #4 STAT5a, 4,1% GFP; Exp. 36 #19 STAT5b, 5,5% GFP). Die Zellen wurden mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern gefärbt, die sich gegen zwei B-Zell-spezifische Oberflächenproteine richteten (B220 /CD43).



**Abbildung 3.28** Der Anteil reifer T-Zellen war in den STAT5 1\*6<sup>pos</sup> Milzzellpopulationen erhöht.

Dargestellt sind repräsentative durchflußzytometrischen Analysen der STAT5 1\*6<sup>pos</sup> und STAT5 1\*6<sup>neg</sup> Milzzellpopulationen (Exp.36 #11 STAT5a, 14,1% GFP; Exp.36 #12 STAT5b, 4,6% GFP), wobei der T-Zell Anteil auf Kosten der B-Zellen deutlich erhöht war. Die Zellen wurden mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern gefärbt, die sich gegen T-Zell-spezifische (CD4/CD8) Oberflächenproteine richteten.

Die Expression eines konstitutiv aktiven STAT5 Proteins im Knochenmark-Transplantationsmodell reichte diesen Ergebnissen zufolge nicht aus, die lymphoproliferativen Erkrankungen einer FLT3mut Expression nachzubilden. Dennoch wurde deutlich, dass konstitutiv aktives STAT5 eine massive Entwicklungsstörung innerhalb der lymphatischen Blutlinie auslöst. Zwar entwickelten sich aus den STAT5 1\*6 positiven Vorläuferzellen insgesamt weniger B-Zellen, doch genau wie in der FLT3mut B-Zell Population, konnte auch hier eine Anhäufung unreifer B-Zellen auf Kosten reiferer B-Zellen nachgewiesen werden. Im STAT5 1\*6 Modell kam es jedoch nicht zur Vermehrung bösartiger Zellklone dieses Entwicklungsstadiums, also zum Ausbruch einer Leukämie.

#### 3.7 FLT3mut im Xenotransplantations-Modell

Mit Hilfe des Xenotransplantations-Modells sollte untersucht werden, welchen Effekt die Expression von aktiviertem FLT3 (FLT3mut) in frühen humanen hämatopoetischen Zellen quasi *in vivo* hat. Der für diese Versuche eingesetzte NOD/*scid* Mausstamm besitzt verschiedenste Defekte in den erworbenen und ererbten immunologischen Funktionen, was den transplantierten humanen Zellen das Überleben in der Empfängermaus ermöglicht.

##### 3.7.1 Infektion und Transplantation humaner hämatopoetischer Vorläuferzellen

Die in diesem Modell verwendeten humanen Zellen stammten aus immuno-magnetisch aufgereinigtem Nabelvenenblut, wobei das Oberflächenprotein CD34 als Kriterium für die Positivselektion diente. Die Gesamtheit der CD34 positiven Zellen stellt eine heterogene Zellpopulation dar, die aus Stamm- und Vorläuferzellen unterschiedlicher Entwicklungsstadien besteht. Zur Optimierung der Transduktionseffizienz, wurden die Zellen 48 Stunden in Expansionsmedium gehalten, bevor die erste und 24 Stunden später die zweite Infektionsrunde folgte. Etwa 18 Stunden nach der zweiten Infektion lag die Infektionsrate für den Kontrollvektor bei 62% und bei 19% für das FLT3mut exprimierende Konstrukt (Abbildung 3.29). Die Transplantation der Zellen erfolgte über die laterale Schwanzvene der subletal bestrahlten (350cGy) Empfängertiere.

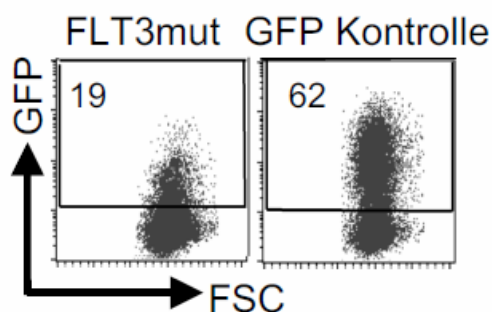


Abbildung 3.29

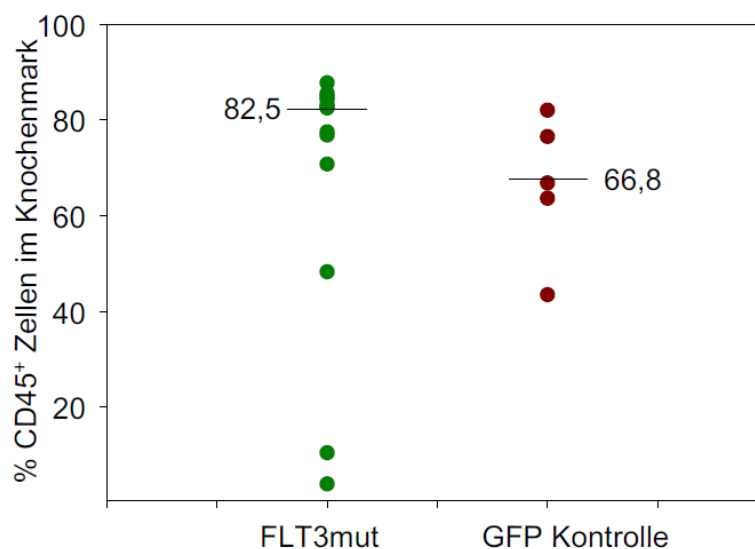
GFP Expression FLT3mut und Kontrollvektor infizierter CD34<sup>+</sup> Zellen vor der Transplantation.

Die Bestimmung der GFP-Expression der infizierten humanen CD34<sup>+</sup> Zellen erfolgte mittels Durchflußzytometrie.

### 3.7.2 FLT3mut exprimierende humane hämatopoetische Vorläuferzellen waren im Knochenmark der Empfängertiere nachweisbar

Keines der Tiere in diesem Versuch zeigte im Laufe eines Beobachtungszeitraums von 6 bis 17 Wochen nach der Transplantation äußerliche Symptome, die auf eine Erkrankung des hämatopoetischen Systems schließen ließen. Aus diesem Grund wurden innerhalb der genannten Zeitspanne einzelne Mäuse geopfert, um die Entwicklung der humanen Zellen im murinen System zu verfolgen. Die äußerliche Untersuchung hämatopoetischer und anderer Organe (Knochenmark, Milz, Lymphknoten, Leber) ergab weder für die mit GFP noch für die mit FLT3mut exprimierenden Zellen transplantierten Mäuse ein Krankheitsbild.

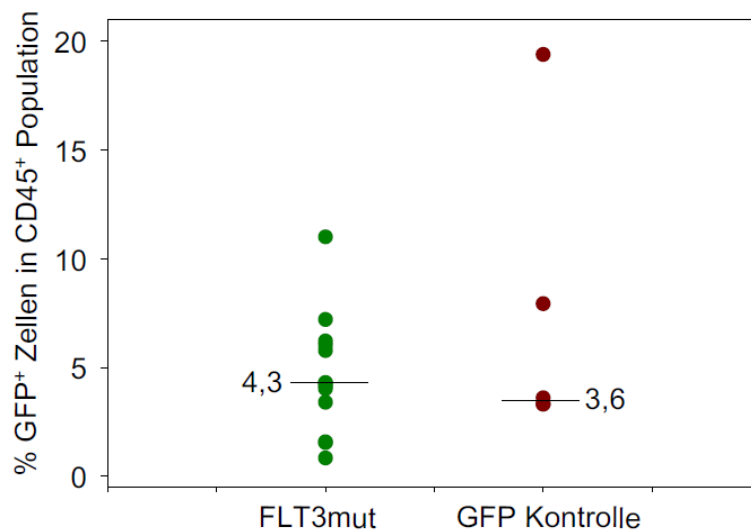
Um den gesamten Anteil humaner Zellen (infiziert und uninfiziert) in Knochenmark, Milz und Blut zu bestimmen, wurden Analysen am Durchflußzytometer durchgeführt. Diese Untersuchungen erfolgten mit Hilfe eines Fluoreszenz-gekoppelten anti-human CD45 Antikörpers, der an ein Oberflächenprotein bindet, dass auf allen humanen Leukozyten exprimiert wird.



**Abbildung 3.30** Im NOD/*scid* Knochenmark waren Populationen humaner Zellen nachweisbar. Jeder Punkt repräsentiert den mittels Durchflußzytometrie bestimmten prozentualen Anteil humaner Zellen (CD45<sup>+</sup>) im Knochenmark einer FLT3mut Maus (grün) (n=13) oder eines GFP Kontrolltieres (rot) (n=5). Angegeben ist der Median der jeweiligen Kohorte.



Im peripheren Blut und in der Milz der geopferten Versuchstiere waren nur sehr wenige oder gar keine humanen Zellen nachweisbar. Im Gegensatz dazu zeigten die Untersuchungen des Knochenmarks der einzelnen Mäuse, dass der Anteil humaner Zellen (CD45<sup>+</sup>) zwar stark variierte, bei der Hälfte der Kontrolltiere jedoch über 66% und in FLT3mut Mäusen sogar über 82% lag (3.30). Ausgehend von dieser Population humaner Knochenmarkszellen ergaben Analysen der GFP-Expression im Knochenmark der Kontrolltiere Werte zwischen 3 bis 19%, im Knochenmark der FLT3mut-Mäusen lag die GFP Expression zwischen 1 und 10% (Abbildung 3.31).

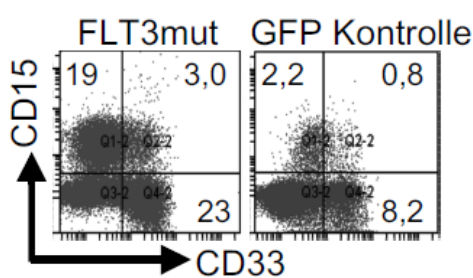


**Abbildung 3.31** Im *NOD/scid* Knochenmark waren Populationen FLT3mut exprimierender Zellen nachweisbar. Jeder Punkt repräsentiert den mittels Durchflußzytometrie bestimmten prozentualen Anteil humaner (CD45<sup>+</sup>), GFP positiver Zellen im Knochenmark einer FLT3mut Maus (grün) (n=13) oder eines GFP Kontrolltieres (rot) (n=5). Angegeben ist der Median der jeweiligen Kohorte.

#### 3.7.3 Der Anteil myeloischer Zellen war in der FLT3mut Population vergrößert

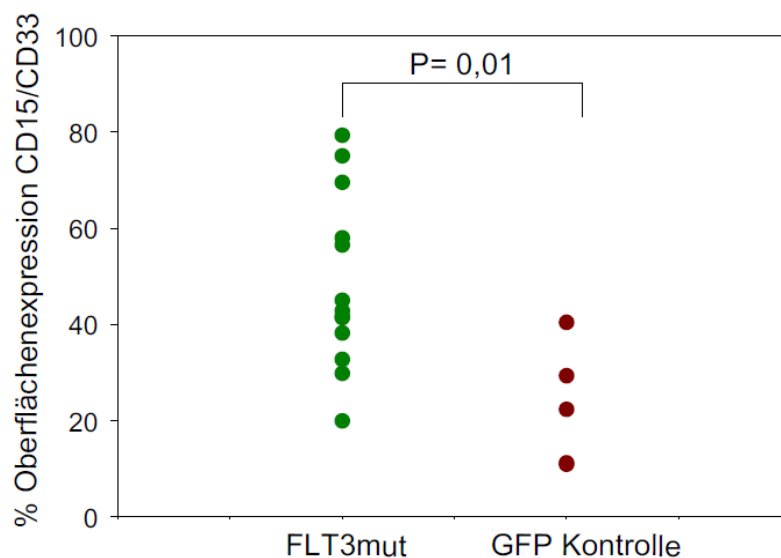
Im Folgenden sollten die Auswirkungen der Expression von FLT3mut auf die Differenzierung der humanen hämatopoetischen Zellen und damit auch der Einfluss von FLT3mut auf die Blutlinienverteilung im Xenograftmodell untersucht werden. Hierzu wurde die Expression myeloischer Oberflächenproteine auf den Knochenmarkszellen von FLT3mut und GFP Mäusen mit Hilfe Fluoreszenz-gekoppelter Antikörper (anti-human CD15 und anti-human CD33) am Durchflußzytometer analysiert. Der Vergleich zeigte, dass FLT3mut exprimierende Knochenmarkszellen zu einem wesentlich größeren Anteil positiv für die myeloischen Oberflächenmarker CD15 und CD33 waren, als die nur GFP exprimierenden Zellen. Abbildung 3.32 verdeutlicht dies mit repräsentativen durchflußzytometrischen Analysen einer FLT3mut und einer GFP Maus, deren anti-human CD45<sup>+</sup>

Knochenmarkzellen zusätzlich mit anti-human CD15 und anti-human CD33 gefärbt worden waren. Einen Überblick über die Verteilung der myeloischen Marker in allen analysierten Mäusen gibt Abbildung 3.33. Diese Daten beweisen statistisch signifikant ( $P=0,01$ ), dass es in der FLT3mut Knochenmarkpopulation zu einer signifikanten Verschiebung zu Gunsten der myeloischen Blutlinie kam.



**Abbildung 3.32 Vergrößerte Population myeloischer Zellen im FLT3mut Knochenmark.**

Dargestellt sind repräsentative durchflußzytometrische Analysen der humanen ( $CD45^+$  und  $GFP^+$ ) Populationen des Knochenmarks einer FLT3mut und einer GFP Kontrollmaus. Die Zellen wurden mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern gefärbt, die sich gegen zwei myeloische Oberflächenproteine richteten (CD15 und CD33).



**Abbildung 3.33 Signifikant vergrößerte Population myeloischer Zellen im FLT3mut Knochenmark.** Jeder Punkt repräsentiert den mittels Durchflußzytometrie bestimmten prozentualen Anteil humaner myeloischer Zellen ( $CD45^+/GFP^+/CD15^+$  und/oder  $CD33^+$ ) im Knochenmark einer FLT3mut Maus (grün) ( $n=13$ ) oder eines GFP Kontrolltieres (rot) ( $n=5$ ). Statistik mittels SigmaPlot 9.0 errechnet (t-test).

Das Xenograftmodell hat gezeigt, dass die Expression von FLT3mut in humanen hämatopoetischen Vorläuferzellen nach der Transplantation in *NOD/scid* Mäuse zwar zu einer Expansion myeloischer Zellen in deren Knochenmark führte, jedoch nicht ausreichte, um eine Leukämie auszulösen.

## 4 Diskussion

Aktivierende Mutationen der Rezeptor-Tyrosinkinase FLT3 sind die am häufigsten gefundenen genetischen Veränderungen in akuten myeloischen und lymphatischen Leukämien (AML und ALL). Sie führen zu einer unkontrollierten, andauernden Signalwirkung des Rezeptors und bringen dadurch zelluläre Prozesse wie Zellteilung, Differenzierung und Apoptose aus dem Gleichgewicht. Solche Störungen der hämatopoetischen Entwicklung spielen auf dem Weg zur Entstehung einer Leukämie eine entscheidende Rolle.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, zwei Modelle zu etablieren, mit deren Hilfe untersucht wurde, wie sich die Expression eines mutierten FLT3 Rezeptors (FLT3mut) auf die Entwicklung hämatopoetischer Zellen von Maus (Allotransplantation) und Mensch (Xenotransplantation) *in vivo* auswirkt. Im Allotransplantations-Modell erkrankten die Tiere innerhalb kürzester Zeit an einer akuten lymphatischen Leukämie, wobei das Fehlen des *Irf8* Gens zu einem signifikant schnelleren Ausbrechen der Krankheit führte. Die leukämische Population bestand aus B-Zellen, die in ihrer Differenzierung am Übergang von der frühen zur späten prä-B-Zelle blockiert waren. Retransplantationsversuche verdeutlichten die Aggressivität der Leukämie. Sie ergaben außerdem, dass es sich bei den leukämischen Populationen um Zellen klonalen Ursprungs handelte. Untersuchungen der vom FLT3mut Rezeptor ausgehenden Signaltransduktion zeigten eine starke Aktivierung von STAT5. Aus diesem Grund wurde versucht den FLT3mut Effekt durch Expression eines aktivierten STAT5 im Knochenmark-Transplantationsmodell zu imitieren. Obwohl es in den STAT5 Tieren zu einer mit FLT3mut vergleichbaren Störung der B-Zell-Differenzierung kam, reichte aktiviertes STAT5 nicht aus, um eine ALL zu induzieren. Im Gegensatz zum Knochenmark-Transplantationsmodell löste FLT3mut nach der Xenotransplantation keine Leukämie aus, sondern führte zur Expansion einer frühen myeloischen Population, ohne dabei jedoch die Differenzierung zu blockieren.

### 4.1 Ein Vergleich der etablierten Mausmodelle untereinander und mit humanen Erkrankungen

#### 4.1.1 Das Allotransplantations-Modell

Die Maus ist ein wertvolles Modellsystem, um die Entstehung von Leukämien *in vivo* experimentell zu analysieren. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit induzierte die Expression von FLT3mut im murinen Knochenmark-Transplantationsmodell eine ALL mit sehr kurzer Latenzzeit. Der Phänotyp dieser Erkrankung zeichnete sich in 28 von 29 untersuchten Tieren durch eine Blockade der B-Zell-Differenzierung am Übergang von der

frühen zur späten prä-B-Zelle aus. Milz, Leber und Lunge der betroffenen Tiere waren ausgehend vom Knochenmark durch die leukämische Population früher prä-B-Zellen (B220<sup>+</sup>/CD43<sup>+</sup>) überschwemmt worden. In Tieren aus bisher veröffentlichten Studien hatte die FLT3 Mutation meist Auswirkungen auf die Entwicklung der myeloischen Linie (siehe Tabellen 4.1 und 4.2). Lediglich ein Tier im transgenen Mausmodell von Lee et al. entwickelte eine letale Erkrankung der B-Zell-Linie (Lee et al., 2005). Einige phänotypische Gemeinsamkeiten wie Paraparese, vergrößerte Milz, CD43/B220/CD19 positive Tumorzellen und Transplantierbarkeit der Tumorzellen mit sehr kurzer Latenz ließen sich beim Vergleich des transgenen Tieres mit den FLT3mut Mäusen der vorliegenden Arbeit nachweisen. Das transgene Tier war jedoch an einem B-Zell-Lymphom erkrankt, das heißt, die Tumorzellen gingen aus einem Lymphknoten und nicht, wie die ALL der FLT3mut Mäuse, aus dem Knochenmark hervor.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist es demnach zum ersten Mal gelungen, ein Modell zur FLT3-assoziierten Entstehung einer frühen prä-B-ALL zu etablieren. Diese Form der Leukämie wird auch Vorläufer B-Zell-ALL genannt. Sie ist die am häufigsten auftretende Krebserkrankung im Kindesalter. Aktivierende FLT3 Mutationen werden in dieser Gruppe der pädiatrischen Leukämien mit jeweils etwa 20% besonders häufig in Patienten mit hyperdiploider ALL oder MLL Translokationen gefunden (Armstrong and Look, 2005; Armstrong et al., 2004; Paulsson et al., 2008; Taketani et al., 2004). Und auch im Großteil der ALL-Zellen ohne FLT3 Mutationen kommt es durch Veränderungen der Genregulation zu einer erhöhten FLT3 Expression (Birg et al., 1992; Brown et al., 2005; Carow et al., 1996). Diese Zahlen verdeutlichen die Rolle von FLT3 in pädiatrischer prä-B-ALL. Zugleich unterstreichen sie die Notwendigkeit Modelle, wie das im Rahmen dieser Arbeit etablierte Allotransplantations-Modell, zu entwickeln, die zum Verständnis und zur Heilung dieser Krankheit beitragen könnten.

### 4.1.2 Das Xenotransplantations-Modell

Ergebnisse aus Mausversuchen lassen sich nicht uneingeschränkt auf das humane System übertragen. Besonders deutlich zeigten dies Versuche zum Transkriptionsfaktor C/EBP $\alpha$  (Niebuhr et al., 2008; Schwieger et al., 2004). In humanen Zellen führte die Expression mutierter C/EBP $\alpha$  Proteine, egal ob humanen oder murinen Ursprungs, zu einer Blockade der granulozytären Differenzierung. Im Maussystem dagegen wurde durch keine der beiden Mutanten eine Differenzierungsstörung verursacht. Vermutlich weichen die Expressionsmuster von Transkriptionsfaktoren und Zytokinrezeptoren während der Differenzierung in den beiden Spezies teilweise voneinander ab. Auch beim Vergleich von humaner und muriner B-Zell-Differenzierung treten feine regulatorische Unterschiede

hervor, die bei der Übertragung von Mausmodellen auf das hämatopoetische System des Menschen beachtet werden sollten (Payne and Crooks, 2007).

Die oben angedeuteten Abweichungen in der Regulation der Hämatopoese von Maus und Mensch unterstreichen die Bedeutung von Xenotransplantations-Modellen. Mit ihrer Hilfe können Differenzierungsvorgänge humaner Zellen unter komplexen *in vivo* Bedingungen ablaufen, die in der Zellkultur schwer nachzustellen sind. In der vorliegenden Arbeit wurden aus Nabelvenenblut aufgereinigte, humane Vorläuferzellen in Mäuse transplantiert, um in deren Knochenmark quasi unter *in vivo* Bedingungen zu proliferieren und differenzieren. Die Expression von FLT3mut führte nicht, wie im Allotransplantations-Modell, zu einer malignen Veränderung der lymphatischen Linie, sondern äußerte sich in einer signifikanten Vergrößerung der Population myeloischer Vorläuferzellen. Bisher wurden die Auswirkungen der Expression eines mutierten FLT3 Rezeptors auf die Differenzierung humaner hämatopoetischer Zellen nur *in vitro*, also in Methyzellulose-Kulturen (*Colony Assay*) und auf Stromazellen (*Cobblestone Area Forming Cell Assay*) untersucht (Chung et al., 2005; Li et al., 2007). FLT3-ITD Expression führte in diesen Versuchen, genau wie in dem hier vorgestellten *in vivo* Modell, zu einem selektiven Wachstumsvorteil. Zwar war bei Chung et al. auch eine leichte Zunahme myeloischer Vorläufer zu beobachten, aber in erster Linie wurden vermehrt frühe erythroide Zellen nachgewiesen.

Warum ist im FLT3mut Xenotransplantations-Modell nicht wie im Allotransplantations-Modell die lymphatische, sondern die myeloische Linie betroffen? Spezies-spezifische Unterschiede könnten hierbei eine Rolle spielen. Dagegen sprechen jedoch die Ergebnisse aus Allotransplantations-Modellen anderer Gruppen, die zeigen, dass FLT3-ITD auch dort in der Lage ist, myeloische Erkrankungen zu induzieren (Grundler et al., 2005; Kelly et al., 2002b). Außerdem ist zu beachten, dass die Zellen des Xenotransplantations-Modells aus Nabelvenenblut und nicht, wie im Allotransplantations-Modell, aus Knochenmark isoliert wurden. Hinzu kommt, dass beide Populationen nach unterschiedlichen Infektionsprotokollen behandelt wurden. Es ist demnach wahrscheinlicher, dass in diesen Modellen besonders Herkunft und Eigenschaften der Zielzelle für Entstehung und Verlauf der Erkrankung von Bedeutung waren.

Ist die im Xenotransplantations-Modell durch FLT3-ITD ausgelöste Expansion myeloischer Zellen eine Veränderung, die auch in Leukämiepatienten stattgefunden hat und den ersten Schritt in Richtung Leukämieentstehung darstellt? Es wird kontrovers diskutiert, ob dies der Fall ist oder ob FLT3 Mutationen erst zu einem späteren Zeitpunkt in prä-leukämischen Zellen auftreten (Levis and Small, 2003). Analysen von Rezidiv-Proben aus Leukämiepatienten führten zu diesen unterschiedlichen Standpunkten. Auf der einen Seite gibt es Patienten, in denen beim erneuten Ausbruch der Leukämie keine

FLT3 Mutation mehr nachweisbar war oder deren FLT3 erst im Rezidiv mutiert war (Cools et al., 2004). Andererseits konnte gezeigt werden, dass in der Mehrheit der Rückfälle die FLT3 Mutationen in den leukämischen Zellen erhalten geblieben waren (Gilliland and Griffin, 2002; Kottaridis et al., 2001; Shih et al., 2002; Wellmann et al., 2005). Ein weiteres Argument für FLT3-ITD als Leukämie-induzierende Mutation liefern Transplantationsversuche mit Patientenproben in NOD/*scid* Mäusen. Diese Studien konnten mutiertes FLT3 in leukämischen Stammzellen nachweisen (Levis et al. 2005).

Warum führt die Expression von FLT3mut in humanen Zellen nicht, wie in den Allotransplantations-Modellen, zur Entstehung einer malignen Erkrankung? Dieses Ergebnis entspricht der zugrunde liegenden Arbeitshypothese, die besagt, dass für eine maligne Transformation zusätzlich zur FLT3 Mutation weitere genetische Veränderungen notwendig sind. Zahlreiche, in dieser Arbeit diskutierte Modelle und auch Untersuchungsergebnisse von Leukämiepatienten, in denen neben FLT3 Mutationen zum Beispiel chromosomale Translokationen gefunden wurden, unterstützen diese Vermutung (Armstrong et al., 2004; Gilliland and Griffin, 2002; Taketani et al., 2004). Im weiteren Verlauf der Diskussion soll dieser Aspekt der FLT3-induzierten Leukämogenese noch mal aufgegriffen werden.

Das etablierte Xenotransplantations-Modell zeigt, dass die Expression von FLT3-ITD zwar nicht zu einer malignen Transformation der hämatopoetische Zellen führte, doch sie hat die normale Differenzierung aus dem Gleichgewicht gebracht und stellt so möglicherweise den ersten Schritt in Richtung Leukämieentstehung dar.

### **4.2 Die Untersuchung von aktivierenden FLT3 Mutationen in murinen Zellen.**

#### **Ein Vergleich der vorliegenden Arbeit mit aktuellen Studien.**

Zu Beginn dieser Arbeit lagen nur wenige Modelle vor, um die Auswirkungen von aktivierenden FLT3 Mutationen *in vivo* zu analysieren. In den darauffolgenden Jahren haben sich jedoch auch andere Gruppen mit dieser Fragestellung befasst und FLT3 Mutationen in unterschiedlichen Mausmodellen untersucht. Die Tabellen 4.1 und 4.2 fassen diese Studien zusammen, indem sie die verwendeten Mausstämme und den Krankheitsverlauf aufzeigen.

Referenz	FLT3 Mutation; -verdoppelte(r) Tyrosin-Rest(e); *** kooperierende Mutation	Mausstamm; KM- Anreicherung	Expressions- system	FCS; Zytokine <i>in vitro</i>	Infektionsrate	Phänotyp
Modelle mit Knochenmarktransplantation						
<b>Vorliegende Arbeit</b>	<b>ITD (10); •589, 591</b>	<b>B6; 5d 5-FU</b>	<b>RV (pMYs)</b>	<b>0%; IL-3,6, SCF, FL</b>	<b>15-21%</b>	<b>28 x frühe prä-B ALL, L, t, klonal; 1x T-Zell Lymphom, L, nt</b>
(Kelly et al., 2002b)	ITD (7 und 22); •597,599 und 589,591,597	BALB/c; 6d 5-FU	RV (MSCV)	10%; IL-3,6, SCF	n.a.	LM; oligoklonal; nt
(Kelly et al., 2002a)	ITD (7); •597,599; **PML-RAR $\alpha$ transgen	(B6 x C3H) <sup>F1</sup> ; 6d 5-FU	RV (MSCV)	10%; IL-3,6, SCF	5-10%	T-Zell Lph; **APL-ähnliche Erkrankung
(Ono et al., 2005)	ITD (20); •n.a. **MLL-ENL, MLL-SEPT6	B6; 4d 5-FU	RV (pMY)	20%; IL-6, SCF, TPO, FL	niedrig	Kein Phänotyp; **biphänotypische Leukämie oder AML
(Grundler et al., 2005)	ITD (n.a.); •n.a.; KDmut	BALB/c; 4d 5-FU	RV (MigR1)	20%; IL-3,6, SCF	n.a.	LM; oligoklonal; B oder T-Zell Lph
(Schessl et al., 2005)	ITD (28); •589,591,597,599; **RUNX1-ETO	(B6-Ly-Pep3b x C3H/HeJ) <sup>F1</sup> ; 4d 5-FU	RV (MSCV)	15%;IL-3,6, SCF	Sortierte Zellen transpl.	Keine Erkrankung; **7x M, oligoklonal, nt; **3x B-Zell Lph; **1x T-Zell Lph
(Kim et al., 2008)	ITD (n.a.); •n.a.; **CBFB-SMMHC	B6; KLSF	RV (MSCV)	n.a. ; IL-6, SCF	n.a.	Keine Erkrankung; *AML
(Stubbs et al., 2008)	ITD (7); •597,599; **MLL-AF9	B6; 4d 5-FU	RV (MSCV)	10%; IL-3,6, SCF	n.a.	Keine Erkrankung; *AML

**Tabelle 4.1 FLT3 Mutationen im Mausmodell (Knochenmarktransplantation.** RV, Retroviraler Vektor; n.a., nicht angegeben; B6, C57BL/6; d, Tage; IL, Interleukin; SCF, Stem Cell Factor; FL, FLT3 Ligand; KDmut, mutierte FLT3 Kinase-Domäne; KLSF, c-kit positiv, *lineage negative*, sca-1 positiv, Flt3 negativ.

Referenz	FLT3 Mutation; ▶verdoppelte(r) Tyrosin-Rest(e)	Mausstamm	Promotor	Phänotyp
<b>Transgene Mausmodelle</b>				
(Lee et al., 2005)	ITD (7); ▶597,599	FVB	vav	5x M, oligoklonal, nt; 1x B-Lymphom, t; 1x T-Zell Lymphom, nt
(Baldwin et al., 2007)	Tel-FLT3	B6 x C3H	CMV	2x M, nt
(Lee et al., 2007)	ITD (7); ▶597,599	B6 und BALB/c, letztere nicht gezeigt	Promotor des murinen <i>Fli3</i> Locus	CMML und Blockade der B-Zell Differenzierung, t
(Li et al., 2008)	ITD (6); ▶n.a.	B6	Promotor des murinen <i>Fli3</i> Locus	M und Blockade der B-Zell Differenzierung

**Tabelle 4.2** FLT3 Mutationen im Mausmodell (transgene Mäuse). N.a., nicht angegeben; CMML, Chronische Myelo-Monozytäre Leukämie



Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, ein für die humane prä-B-ALL relevantes Mausmodell zu etablieren. In bisherigen Veröffentlichungen konnte dagegen allein durch die Expression eines FLT3-ITD in Mausknorpelmark keine ALL induziert werden. Die Tiere in anderen FLT3-ITD Modellen blieben entweder ohne Befund oder fielen durch myeloproliferative Erkrankungen oder Lymphome auf. Warum entstehen durch die Expression von mutiertem FLT3 in murinen hämatopoetischen Zellen so unterschiedliche Krankheitsbilder? Diese Frage soll in den folgenden Abschnitten diskutiert werden, wobei (A) Art der FLT3 Mutation, (B) gewählter Mausstamm, (C) Zielzelle, (D) Infektionsrate und (E) Expressionssysteme berücksichtigt werden.

### **A Spielen Länge und Lage der ITD Mutation eine Rolle bei Entstehung und Entwicklung einer hämatopoetischen Erkrankung?**

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Interne Tandem Duplikation (ITD) des FLT3 Rezeptors war 30 Basenpaare lang und führte zur Bildung eines Proteins (FLT3mut), das im Vergleich zum Wildtyp-Rezeptor um 10 Aminosäuren vergrößert war. Kann die Länge der ITD erklären, warum die Tiere dieses Modells an einer ALL erkrankten? In den übrigen Mausmodellen war die am häufigsten verwendete ITD (ITD<sub>7</sub>) 7 Aminosäuren lang und führte entweder zum Ausbruch von myeloproliferativen Erkrankungen, zur Entstehung von Lymphomen oder hatte gar keine Auswirkungen auf die Hämatopoese (Kelly et al., 2002a; Kelly et al., 2002b; Lee et al., 2007; Lee et al., 2005; Stubbs et al., 2008). Im Rahmen einer von Kelly et al. veröffentlichten Versuchsreihe führte dagegen die Expression der ITD<sub>7</sub>, genauso wie die einer deutlich längeren ITD (28 Aminosäuren), zu myeloproliferativen Erkrankungen mit vergleichbaren Latenzen (Kelly et al., 2002b). Obwohl klinische Studien den Einfluss der ITD Länge auf Überleben und Behandlungserfolg betroffener Patienten zeigen konnten (Meshinchi et al., 2008; Stirewalt et al., 2006), deuten diese variierenden Phänotypen darauf hin, dass in erster Linie nicht die Länge der ITD, sondern andere Faktoren Einflüsse auf Entstehung und Entwicklung der FLT3-ITD-induzierten Erkrankungen in den Mausmodellen hatten.

Ein möglicher Einflussfaktor, der in direktem Zusammenhang mit der ITD steht, sind die durch die Mutation betroffenen Tyrosin-Reste. Insbesondere Y589 und Y591 spielen bei der Aktivitätskontrolle und Phosphorylierung von FLT3 eine wichtige Rolle (Meshinchi et al., 2008). ITD<sub>7</sub> betrifft die Tyrosin-Reste 597 und 599, während bei FLT3mut Y589 und Y591 verdoppelt sind. Doch auch in anderen Modellen sind genau diese zwei (589 und 591) oder mehrere Tyrosin-Reste dupliziert, was in einem Fall zu einer Myeloproliferation führt und im anderen Modell keine krankheitsbedingten Auffälligkeiten zur Folge hat (Kelly et al., 2002a; Schessl et al., 2005). Diese Vergleiche zeigen, dass die Entstehung einer ALL in der vorliegenden Arbeit, im Gegensatz zu den

von anderen Gruppen gezeigten myeloproliferativen Erkrankungen oder Lymphomen, allein durch Unterschiede in Lage oder Länge der ITD Mutationen vermutlich nicht zu begründen ist.

### **B Welchen Einfluss hat der gewählte Maustamm auf den Krankheitsphänotyp?**

In einem Modell mit C57BL/6J (B6) Hintergrund löste FLT3-ITD allein letale T-Zell-Lymphome aus (Kelly et al., 2002a). Das betroffene T-Zell-Stadium wurde anhand der Expression T-Zell-spezifischer Oberflächenproteine charakterisiert. Es ist mit dem Phänotyp einer Maus der vorliegenden Arbeit, die nach langer Latenz an einem T-Zell Tumor des Thymus erkrankt war, vergleichbar. Hierbei handelte es sich jedoch um einen Einzelfall in den FLT3mut Versuchen, denn alle übrigen untersuchten Tiere erkrankten an einer frühen prä-B-ALL.

Die FLT3-ITD-induzierten Leukämiefälle in B6 Hintergrund stehen mit ihrer betroffenen lymphatischen Linie im deutlichen Gegensatz zu den myeloischen Erkrankungen, die aktiviertes FLT3 in BALB/c Tieren bei Grundler et al. und Kelly et al. auslöste (Grundler et al., 2005; Kelly et al., 2002b). Ein möglicher Einfluss Mausstamm-spezifischer Eigenschaften auf die Krankheitsentstehung wird von Rivera und Tessarollo diskutiert (Rivera and Tessarollo, 2008). Sie erwähnen eine Veröffentlichung von Szymanska et al., welche die Bedeutung stammeigener genetischer Modifikatoren bei der Entwicklung einer Erkrankung beweist (Szymanska et al., 1999). Rekombinante Mausstämmen, die sich nur durch bekannte Genomabschnitte unterschieden (*congenic*), wurden auf ihre Strahlungsanfälligkeit getestet. Es konnten nicht nur stammsspezifische Unterschiede in Auftreten und Latenz von Lymphomen und Leukämien gezeigt werden, die von der Erkrankung betroffenen Blutlinien variierten ebenfalls. Der bei Grundler et al. und Kelly et al. verwendete Mausstamm BALB/c weist im Vergleich zu den in der vorliegenden Arbeit eingesetzten B6 Mäusen funktionelle Veränderungen eines wichtigen Tumorsuppressorgens (*Cdkn2a*) auf (Zhang et al., 2003; Zhang et al., 1998). Eine solche genetische Vorschädigung könnte die Entwicklung spezifischer Erkrankungen, in den besprochenen Modellen die Entstehung einer Myeloproliferation, begünstigen.

### **C Welchen Einfluss hat der Phänotyp der Zielzelle auf den Krankheitsphänotyp?**

FLT3 aktivierende Mutationen führten im Großteil der transgenen Modelle zum Ausbrechen myeloproliferativer Syndrome, unabhängig ob die Tiere aus einem B6, BALB/c oder FVB Hintergrund stammten (Baldwin et al., 2007; Lee et al., 2007; Lee et al., 2005; Li et al., 2008). In diesen Tieren wurde der mutierte FLT3 Rezeptor von allen Zellen des hämatopoetischen Systems exprimiert und nicht, wie in den Transplantationsmodellen, von einer weitgehend undefinierten Zellpopulation, die das Ziel

der viralen Infektion war. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass zum Beispiel auch der Differenzierungsstatus der Zielzelle, also die Zelle, in der das aktivierte FLT3 exprimiert wird, Auswirkungen auf den Krankheitsphänotyp haben könnte.

Bereits 1992 haben Andrew G. Elefanty und Suzanne Cory in einer Veröffentlichung verdeutlicht, dass nicht nur der verwendete Mausstamm, sondern auch die Kulturbedingungen im Rahmen der Infektion einen entscheidenden Einfluss auf die entstehende Krankheit und deren Verlauf haben (Elefanty and Cory, 1992). Sie verwendeten Knochenmark von BALB/c Mäusen und exprimierten darin das Onkogen BCR-ABL. Im Vergleich zu vorher veröffentlichten BCR-ABL Transplantations-Experimenten war es ihnen durch die Veränderung des Infektionsprotokolls gelungen, einen neuen Krankheitsphänotyp zu erzeugen. Statt bösartiger lymphatischer oder Makrophagen-Tumore, entstand unter diesen abgewandelten Bedingungen eine myeloproliferative Erkrankung. In einer aktuellen Veröffentlichung von Wei et al. wird ebenfalls eindrucksvoll dokumentiert, wie die Kulturbedingungen Entstehung und Verlauf einer Krankheit im Transplantationsmodell beeinflussen (Wei et al., 2008). Untersucht wurden die Auswirkungen der Expression eines Fusionsproteins (MLL-AF9), das häufig in Leukämiezellen gefunden wurde. Abhängig davon, mit welchen Zytokinen die Zellen vor der Transplantation behandelt worden waren, entwickelten sich myeloische und/oder lymphatische Leukämien. Dass auch die Zusammensetzung der zu infizierenden Zellpopulation, das heißt die betroffene Zielzelle, den Krankheitsphänotyp beeinflussen kann, zeigen Versuche mit BCR-ABL (Li et al., 1999). Die Verwendung von 5-Fluorouracil (5-FU) angereichertem BCR-ABL Knochenmark oder BCR-ABL Gesamtknochenmark löste in den transplantierten Tiere entweder einheitliche Erkrankungen oder unterschiedliche Leukämieformen aus.

Sicherlich bestimmen Anreicherungsverfahren und Kulturbedingungen auch in den hier verglichenen Transplantationsmodellen den Phänotyp der Zelle, die das Ziel der FLT3 Mutation ist und damit vermutlich auch die entstehende Erkrankung. In sechs der verglichenen Transplantationsmodelle wurde, genau wie in der vorliegenden Arbeit, 5-FU stimuliertes Knochenmark verwendet. Entnahmezeitpunkt, Kultur- und Infektionsbedingungen variierten jedoch von Studie zu Studie. Im Folgenden soll der Einfluss dieser Faktoren einzeln diskutiert werden.

**Entnahmezeitpunkt nach 5-FU Behandlung:** Es ist bekannt, dass bereits der Zeitpunkt der Knochenmarkgewinnung nach der 5-FU Gabe die Zusammensetzung der Zellpopulation beeinflusst (Haug et al., 2008; Nishio et al., 1996). Aufgrund unterschiedlicher Entnahmezeitpunkte könnten sich die zur Infektion verwendeten Zielzellen bereits in ihrer Blutlinien-Verteilung unterscheiden. Die Zahl der hämatopoetischen Stammzellen nimmt in den ersten drei Tagen nach der Transplantation

stark ab und beginnt erst am Tag vier langsam wieder anzusteigen (Randall and Weissman, 1997). Diese Untersuchungen von Randall et al. lassen vermuten, dass das für diese Arbeit verwendete, am Tag 5 entnommen Knochenmark, im Vergleich zu den nach 4 Tagen gewonnenen Zellen bei Gundler et al., deutlich mehr hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen enthielt. Allerdings entwickelten die Tiere bei Grundler et al., genauso wie bei Kelly et al. eine myeloproliferative Erkrankung, wobei letztere das Knochenmark für ihre Versuche erst nach 6 Tagen entnommen hatten. Zu diesem Zeitpunkt sollten ausreichend Stammzellen vorliegen. Der Entnahmezeitpunkt des Knochenmarks nach der 5-FU Behandlung kann in diesen Vergleichen das Auftreten einer lymphatischen im Vergleich zu einer myeloischen Erkrankung demnach nicht erklären.

**Serumzusatz:** Während der Expansions- und Infektionsphase der Knochenmarkzellen wurde in der vorliegenden Arbeit ausschließlich serumfreies Kulturmedium verwendet. Es sollte verhindert werden, dass dieser undefinierte Kulturzusatz die Differenzierung der Vorläuferzellen begünstigt (Sponcer et al., 1986). Dieser Effekt könnte in beiden Transplantationsmodellen mit myeloproliferativer Erkrankung eine Rolle spielen (Grundler et al., 2005; Kelly et al., 2002b). Dort wurde fötales Rinderserum eingesetzt, was die Zusammensetzung der zu infizierenden Zellpopulation beeinflussen könnte.

**Zytokine:** In den Versuchen von Kelly et al. und Grundler et al. wurde den Kulturen IL-6, IL-3 und SCF zugesetzt (Grundler et al., 2005; Kelly et al., 2002b). Für die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden ebenfalls IL-3 und SCF verwendet. Statt IL-6 enthielt das Kulturmedium jedoch IL-11 und FL. IL-6 und IL-11 werden aufgrund ähnlicher Eigenschaften der gleichen Gruppe von Faktoren zugeordnet (*Early-Acting Hematopoietic Synergistic Factors*) (Tsuji et al., 1992). Gemeinsam mit SCF und IL-3 wirken sie zu einem frühen Zeitpunkt der Differenzierung auf die Proliferation der hämatopoetischen Zellen. Einen wichtigen Unterschied in der Zytokin-Zusammensetzung der verglichenen Experimente stellt der Zusatz des FL dar. Hat der FL Auswirkungen auf die Zusammensetzung der zu infizierende Zellpopulation? Sitnicka et al. vermuten, dass der FL entscheidend zu Entstehung, Vermehrung und Erhalt der frühesten lymphatischen Vorläuferzellen (CLPs) beiträgt (Sitnicka et al., 2002). Es ist demnach nicht auszuschließen, dass die FL Gabe während der Expansions- und Infektionsphase zu einer verstärkten Vermehrung der Population früher lymphatischer Zellen geführt hat (Ceredig et al., 2006). Diese Zellen waren das Ziel der Infektion mit pseudotypisierten FLT3mut Vektoren. Möglicherweise sind durch diese Infektionsbedingungen bereits Grundvoraussetzungen für die Entstehung einer lymphatischen Erkrankung gegeben. Es soll jedoch darauf hingewiesen werden, dass die mit dem GFP-Vektor infizierten Zellen

der Kontrollgruppen auch in Richtung anderer Blutlinien differenzieren konnten. Dies macht deutlich, dass auch HSCs oder MPPs FLT3mut exprimierten. Außerdem lassen Transplantationsexperimente vermuten, dass der FL Zusatz zur Kultur notwendig war, um das Anwachsen von LT-HSCs im Knochenmark der Empfängertiere zu gewährleisten (Diehl et al., 2007).

### **D Beeinflusst die Infektionsrate im Knochenmark-Transplantationsmodell Verlauf und Erscheinungsbild der Erkrankungen?**

Die FLT3-ITD Expression führte in den C57BL/6J (B6) Tieren der vorliegenden Arbeit zum Ausbruch einer ALL. Dagegen blieb die Transplantation von B6 Knochenmark in den meisten anderen Modellen ohne Befund (Kim et al., 2008; Ono et al., 2005; Schessl et al., 2005; Stubbs et al., 2008). Bei Ono et al. wurden die Infektionsraten absichtlich niedrig gehalten, um keine Myeloproliferation auszulösen (Ono et al., 2005). Eine andere Veröffentlichung zeigt, dass es vermutlich einer kritischen Anzahl infizierter Zellen zur Krankheitsentstehung bedarf (Grundler et al., 2005). Möglicherweise wurde diese Zellzahl bei Ono et al. und in weiteren Veröffentlichungen unterschritten, so dass keine FLT3-ITD assoziierten Erkrankungen entstehen konnten (Kim et al., 2008; Schessl et al., 2005; Stubbs et al., 2008). In den zuletzt zitierten Modellen erkrankten die Tiere nur, wenn die transplantierten Knochenmarkzellen zusätzlich zum konstitutiv aktiven FLT3 noch eine weitere Mutation trugen.

### **E Welchen Einfluss hat das gewählte Expressionssystem auf den Krankheitsphänotyp?**

Retrovirale Vektorsysteme bedienen sich viraler Promotorelemente, um die Expression der eingebauten cDNA zu gewährleisten. Bereits vor 20 Jahren wurde gezeigt, dass diese viralen Promotoren Art und Entstehung einer Krankheit entscheidend beeinflussen können (Daley et al., 1990; Stocking et al., 1985). Die Stärke der Promotoraktivität ist einerseits abhängig vom Promotor selbst, andererseits spielen auch genregulatorische Einflüsse der Zielzelle eine Rolle. Die unterschiedlichen Phänotypen, die durch aktivierende FLT3 Mutationen in Allotransplantations-Modellen ausgelöst wurden, könnten demnach auch durch die variierenden Expressionssysteme bedingt sein. Ein Vergleich der Studien zeigt jedoch, dass sich alle Vektortypen vom MoMLV (*Moloney Murine Leukemia Virus*) ableiten und ähnliche Promotorregionen besitzen (Hawley et al., 1994; Kitamura et al., 2003). Unterschiedlich starke FLT3-ITD Expressionsniveaus können, wie bei Grundler et al. gezeigt, die Latenz der Erkrankung beeinflussen (Grundler et al., 2005). Ein solcher Effekt kann für die verglichenen Systeme nicht ausgeschlossen werden, und müsste überprüft werden.

Ein weiterer Effekt, der bei Vektorsystemen eine Rolle spielt, ist die Insertionsmutagenese. Durch stabile Integration des Provirus in das Genom der Wirtszelle kann es zu einer Aktivierung oder Inaktivierung umliegender zellulärer Gene kommen (Jonkers and Berns, 1996). Ist dies mit einem Selektionsvorteil der betroffenen Zelle verbunden, wird sie sich schneller als üblich teilen, andere Zellen überwachsen und möglicherweise zu einem Tumor auswachsen. Diese Folgen einer retroviralen Infektion könnten auch Art und Verlauf der durch FLT3mut ausgelösten Erkrankung beeinflusst haben.

Im transgenen Mausmodell von Lee et al. löste FLT3-ITD unter scheinbar gleichen Bedingungen Krankheiten aus, die sowohl lymphatische als auch myeloische Linien betrafen (Lee et al., 2005). Fünf der Tiere entwickelten eine Myeloproliferation, die jedoch im Vergleich zu den BALB/c Transplantationsmodellen nicht tödlich verlief. Die übrigen zwei Founder entwickelten lymphatische Erkrankungen. Die transgenen Tiere waren durch Einbringen von FLT3-ITD Konstrukten in den Vorkern von murinen Eizellen entstanden. Eine mit Hilfe dieser Methode in die Zelle eingebrachte DNA setzt sich zufällig an beliebige Stellen des Genoms und kann dabei ganze Gene zerstören. Außerdem ist es wahrscheinlich, dass die DNA Konstrukte anschließend nicht einzeln, sondern aneinandergereiht als Wiederholungssequenzen in das Genom eingebaut werden. Demnach wurde das FLT3-ITD bei Lee et al. vermutlich, je nach Größe der Wiederholung, in verschiedenen Foundern unterschiedlich stark exprimiert. Vermutlich beeinflussen Expressionsniveau und Veränderungen anderer Gene in diesem Modell den hämatopoetischen Phänotyp. Die Klonalität der letalen lymphatischen Erkrankungen unterstützt diese Vermutung. Zusätzlich zur FLT3-ITD Expression haben wahrscheinlich zerstörte Genfunktionen oder spontane Mutationen bestimmten Zellen einen Wachstumsvorteil verschafft, die durch den vermittelten Selektionsvorteil zu einem Tumor ausgewachsen sind.

Eine Möglichkeit Krankheits-modifizierende Faktoren, wie Insertionsmutagenese oder den Einfluss künstlicher Promotoren auszuschließen, und physiologische Expressionsniveau zu erhalten, besteht in der gezielten Mutation des mauseigenen FLT3 Gens durch das Einfügen einer ITD. Diese Methode wurde, mit dem Ergebnis einer myeloproliferativen Erkrankung, in den neuesten Veröffentlichungen von Li et al. und Lee et al. im C57BL/6J Stamm angewandt (Lee et al., 2007; Li et al., 2008). Neben der Schädigung der myeloischen Linie, die sich entweder chronisch manifestierte oder nach 6 bis 20 Monaten tödlich verlief, zeigten die Tiere eine Störung der B-Zell-Differenzierung. Lee et al. berichten von einer spezifischen Blockade der B220<sup>+</sup>/CD43<sup>neg</sup> B-Zell-Entwicklung, die B220<sup>+</sup>/CD43<sup>+</sup> Population war hingegen nicht betroffen. Im Gegensatz

dazu führte die Expression eines FLT3-ITD bei Li et al., genau wie in der vorliegenden Arbeit, zur Akkumulation von frühen B-Zellen (B220<sup>+</sup>/CD43<sup>+</sup>). Leukämische Veränderungen wurden jedoch nicht beobachtet. In beiden Fällen wird spekuliert, dass das Signal des konstitutiv aktiven FLT3-ITD die normale FLT3 Funktion während der B-Zell-Differenzierung stört. Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Blockade am Übergang von frühen zu späten prä-B-Zellen bestätigt die Störung der B-Zell-Differenzierung durch FLT3mut.

### 4.3 Die Bedeutung von FLT3 Mutationen während der Leukämogenese

Wie unterscheiden sich gesunde Blutzellen von Leukämiezellen? Die Antwort auf diese Frage müsste im Detail wohl für jede individuelle Leukämie einzeln beantwortet werden. Generell wird jedoch im Sinne eines Modells der Krebsentstehung angenommen, dass mehrere genetische Veränderungen gemeinsam wirken und so aus einer normalen Körperzelle eine Tumorzelle wird. Viele Gene und Signalwege, die durch solche Prozesse betroffen sind, wurden bereits identifiziert (Vogelstein and Kinzler, 2004). Welche „besonderen“ Eigenschaften Krebszellen tragen, haben Hanahan und Weinberg zusammengefasst (Hanahan and Weinberg, 2000). Tumorzellen sind (1) unabhängig von Wachstumssignalen, (2) resistent gegen wachstumshemmende Signale, (3) resistent gegen apoptotische Signale, (4) unbegrenzt teilungsfähig, (5) besitzen die Fähigkeit zur Angiogenese und (6) können Metastasen bilden.

Das in der Einleitung vorgestellte Modell von Dash und Gilliland versucht speziell die Faktoren zu benennen, die zur Entstehung einer akuten myeloischen Leukämie notwendig sind (Dash and Gilliland, 2001). Es werden zwei Klassen von Mutationen unterschieden, die zum Teil die bei Hanahan und Weinberg aufgeführten Krebszell-Eigenschaften vermitteln und bei der Entstehung einer Leukämie zusammen wirken. Klasse 1 Mutationen erhöhen die Teilungsrate der Zelle und verschaffen ihr einen Überlebensvorteil. Klasse 2 Mutationen gehen mit einer Funktionsveränderung der betroffenen Gene einher, wodurch deren Einfluss auf die Zelldifferenzierung verändert wird.

Bezugnehmend auf dieses Modell besagte die dieser Arbeit zugrunde liegende Hypothese, dass die FLT3mut Expression allein nicht zum Ausbruch einer Leukämie führen kann. Die oben bereits vorgestellten Veröffentlichungen machen deutlich, dass es tatsächlich weiterer Mutationen bedarf, um aus Zellen mit konstitutiv aktivem FLT3 Rezeptor Tumorzellen zu machen. Im transgenen Mausmodell von Baldwin et al. wird eine besondere Form des konstitutiv aktiven FLT3 untersucht, dessen Aktivität nicht auf einer Gen-internen Mutation beruht, sondern durch die fälschlicherweise stattfindende Verknüpfung der FLT3 und TEL Gene (Baldwin et al., 2007). Letzteres enthält eine

Oligomerisierungs-Domäne, die auf Proteinebene zur Ligand-unabhängigen Dimer-Bildung und damit Aktivierung des TEL/FLT3 Rezeptors führt. Im C57BL/6xC3H Hintergrund entstanden in den zwei Foundern, die dieses Mausmodell hervorgebracht hat, nach sehr langer Latenzzeit myeloproliferative Erkrankungen. Vermutlich haben auch hier nach der Transplantation erworbene Mutationen zur Entstehung dieser hämatologischen Erkrankung geführt.

Die weiteren Mausmodelle untersuchten direkt das Modell zur AML Entstehung. Im Rahmen dieser Studien wurden genetische Veränderungen in Form von Klasse 2 Mutationen identifiziert (RUNX1-ETO, PML-RAR $\alpha$  und CBF $\beta$ -SMMHC), deren Expression nur zusammen mit FLT3-ITD zum Ausbruch von Leukämien führte (Kelly et al., 2002a; Kim et al., 2008; Schessl et al., 2005). Im Gegensatz dazu besitzen MLL-Translokationen (MLL-ENL, MLL-AF9, MLL-SEPT6) ausreichend transformierendes Potenzial, um allein eine Leukämie zu induzieren (Ono et al., 2005; Stubbs et al., 2008). Die Expression von FLT3-ITD beschleunigte in diesen Modellen jedoch den Ausbruch der Leukämie.

In allen zitierten Arbeiten löste aktiviertes FLT3 Erkrankungen der myeloischen Linie aus. Prä-B-Zell Leukämien konnten in solchen Modellen bisher nicht erzeugt werden. Lässt sich das Mutations-Klassen-Modell auch auf die durch FLT3mut ausgelöste frühe prä-B-ALL übertragen? FLT3mut als konstitutiv aktive Tyrosinkinase aktiviert verstärkt stromabwärts gelegene Signalproteine wie RAS, ERK, AKT und STAT5 (A. Lehmann, unveröffentlichte Ergebnisse. Zahlreiche Veröffentlichungen konnten zeigen, dass sich dadurch meist nicht nur die Teilungsrate der betroffenen Zellen erhöht, sondern dass sie auch einen Überlebensvorteil erlangen (Agrawal et al., 2008; Birkenkamp et al., 2001; Brandts et al., 2005; Kajiguchi et al., 2007; Kim et al., 2005; Li et al., 2007; Mizuki et al., 2000; Mizuki et al., 2003; Okamoto et al., 2007; Tam et al., 2008). Untersuchungen von Patientenproben konnten außerdem zeigen, dass in Zellen mit FLT3-ITD Mutationen das anti-apoptische Protein Bcl-2 stark exprimiert wird (Irish et al., 2007).

Vermutlich ist ein konstitutiv aktiver FLT3 Rezeptor auch bei der Entstehung einer B-ALL den Klasse 1 Mutationen zuzuordnen. Doch es ist nicht auszuschließen, dass es durch FLT3-ITD im Sinne der Klasse 2 Mutationen auch zur Störung der Differenzierungsvorgänge kommt. Anlass zu dieser Annahme geben Untersuchungen eines Mausstammes, dessen FLT3 Sequenz auf beiden Allelen embryonaler Stammzellen durch homologe Rekombination zerstört wurde, so dass keine funktionelle mRNA gebildet werden konnte (Mackaretschian et al., 1995). In diesen Tieren wurden signifikant weniger frühe prä-B-Zellen (B220<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>; dort pro-B-Zellen genannt) gefunden. Ähnliche Beobachtungen wurden auch für einen transgenen Mausstamm gemacht, der keinen FLT3-Liganden exprimieren kann (McKenna et al., 2000). Im Vergleich zu Mausmodellen, in denen die Funktion des FLT3 Rezeptors oder seines Liganden zerstört wurden, konnte



in der vorliegenden Arbeit durch Expression eines konstitutiv aktiven FLT3 Rezeptors demnach ein quasi gegensätzlicher Effekt, nämlich die Expansion einer frühen prä-B-Zell-Population, erzeugt werden. Während der B-Zell-Entwicklung wird die FLT3 Expression normalerweise durch PAX5 eingeschränkt (Holmes et al., 2006a; Nutt et al., 1999). Ein ständig aktiver FLT3 Rezeptor könnte diesen Prozess stören und dadurch zu einer Blockade der B-Zell-Entwicklung führen. Für diese Hypothese spricht die Tatsache, dass bei diesem Prozess frühe prä-B-Zellen betroffen sind, also genau das Stadium, in dem die leukämischen FLT3mut Zellen blockiert sind. Diese Studien machen den entscheidenden Einfluss des FLT3 Rezeptors, seines Liganden und damit auch den möglichen Einfluss eines aktivierten FLT3 auf die Differenzierung der lymphatischen Linie deutlich. Die Übertragung des Mutations-Klassen-Modell auf die durch FLT3mut erzeugte B-ALL ist folglich nicht trivial, da sich FLT3mut mit seinen möglichen Eigenschaften auf Zellteilung, Überleben und Differenzierung der B-Zellen auswirken könnte.

#### **4.4 Die Bedeutung von zusätzlichen Mutationen bei der FLT3-ITD-assoziierten Entstehung einer prä-B-ALL im Mausmodell**

Überraschenderweise waren die Zellen der FLT3mut Tumore trotz der kurzen Latenzzeit klonalen Ursprungs. Dies zeigten Analysen proviraler Integrationen der FLT3mut Zellen. Entweder haben spontane Mutationen oder die integrierten Proviren den FLT3mut Zellen einen Wachstumsvorteil vermittelt und dadurch zum Auswachsen leukämischer prä-B-Zellklone geführt. Hätte die Mutation von FLT3 allein ausgereicht, um die ALL zu induzieren, wären die Tumore polyklonal gewesen.

Statistisch gesehen sind bei einer Infektionsrate von 22,1% nur in 0,1% der Zellen vier Integrationen zu erwarten. Die Wahrscheinlichkeit sechs Integrationen pro Zelle zu finden liegt bei weniger als 0,05% (Fehse et al., 2004). Trotzdem scheint es, als wären die Tumore bevorzugt aus Zellen mit besonders vielen Integrationen entstanden. Die Tatsache, dass bis zu sechs Integrationen pro Zellklon nachgewiesen werden konnten, obwohl die FLT3mut Infektionsraten in allen vier Experimenten mit bis zu 20% relativ niedrig waren, spricht, genauso wie die Penetranz der ALL, für die Auswirkungen der Insertionsmutagenese. Hinzu kommt, dass es sich bei den Berechnungen zur Anzahl der Integrationen um rein statistische Werte handelt, die unter anderem davon ausgehen, dass die Infektionseffizienz aller Zellen gleich gut ist. Möglicherweise ließen sich jedoch bestimmte Zelltypen, zum Beispiel lymphatische Vorläufer (CLPs), besser infizieren als andere. Außerdem könnten bevorzugt Zellen mit mehreren Integrationen zum Tumorwachstum beigetragen haben, weil die Wahrscheinlichkeit, ein kooperierendes Gen zu aktivieren, in diesen Fällen erhöht war. Vermutlich lassen sich auch einige der hierdurch betroffenen Gene den Klasse 1 oder Klasse 2 Mutationen zuordnen.

Untersuchungen der Integrationsorte könnten zeigen, welche weiteren Faktoren und Signalwege zusammen mit FLT3mut zur Entstehung einer ALL führen.

Das fehlende Irf8 Gen könnte ein mit FLT3mut kooperierender Faktoren sein. Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass Mäuse mit FLT3mut Irf8<sup>-/-</sup> Knochenmark, im Vergleich zu FLT3mut Irf8<sup>+/+</sup> Tieren, signifikant schneller an einer Leukämie erkrankten. Untersuchungen von Irf8<sup>-/-</sup> Knochenmark haben bereits gezeigt, dass das Verhältnis früher zu später prä-B-Zellen in diesen Tieren vergrößert ist (Wang et al., 2008). Diese Störung der Differenzierungsvorgänge könnte eine mit FLT3mut kooperierende genetische Veränderung auf dem Weg zur Entstehung einer ALL darstellen. Doch nicht nur gestörte Differenzierungsvorgänge, sondern auch ein Überlebensvorteil könnte dazu beitragen, dass die prä-B-ALL in Irf8<sup>-/-</sup> FLT3mut Tieren schneller ausbricht. Acquaviva et al. diskutieren in ihrer Veröffentlichung die Tumorsuppressor-Eigenschaften von Irf4. Das fehlende Irf4 Gen beschleunigte dort die Entstehung einer durch BCR-ABL ausgelösten ALL, was auf den Verlust der von IRF4 zurückgeführt wurde. Der Verlust des Irf8 Gens könnte demnach aufgrund fehlender Tumorsuppressor-Eigenschaften gemeinsam mit den durch FLT3mut ausgeübten Einflüssen zu einem schnelleren Ausbrechen der Leukämie führen. Könnte die IRF8 Expression auch in den ALLs mit IRF8<sup>+/+</sup> Hintergrund reduziert sein? Ein solcher Effekt wurde hier nicht untersucht, wäre aber aufgrund der erhöhten STAT5 Aktivität in FLT3mut Tumoren denkbar. In dendritischen Zellen wird die IRF8 Expression nämlich durch aktives STAT5 reduziert (Esashi et al., 2008).

Die klonalen Tumore und der durch das fehlende Irf8 Gen erzeugte Effekt machen deutlich, dass zusätzliche, mit FLT3mut kooperierende genetische Veränderungen bei der Entstehung einer prä-B-ALL eine wichtige Rolle spielen.

### **4.5 Die Bedeutung von aktiviertem STAT5 bei der FLT3-ITD-assoziierten Entstehung einer prä-B-ALL im Mausmodell**

Die vorliegende Arbeit konnte, ebenso wie zahlreiche Veröffentlichungen, belegen, dass sich ein konstitutiv aktiver FLT3-ITD Rezeptor in seiner Signaltransduktion deutlich vom Wildtyp-Rezeptor unterscheidet (Choudhary et al., 2007; Rocnik et al., 2006; Stirewalt and Radich, 2003). Aus diesen Veröffentlichungen zu *in vitro* Experimenten und Untersuchungen von AML Patientenproben geht, ebenso wie aus den Analysen leukämischer FLT3mut Zellen dieser Arbeit, hervor, dass Signalproteine wie RAS, ERK, AKT und STAT5 durch FLT3-ITD Mutationen verstärkt aktiviert werden (A. Lehmann, unveröffentlichte Ergebnisse). Eine durch FLT3-ITD ausgelöste prä-B-ALL scheint sich auf dieser Ebene der Signaltransduktion also nicht von einer AML zu unterscheiden. Diese Behauptung widerspricht teilweise einer auf der Grundlage des Mausmodells von Grundler et al. formulierten Hypothese (Grundler et al., 2005). Dort löste FLT3-ITD eine

myeloproliferative Erkrankung aus, während der FLT3 Rezeptor mit einer Mutation in der Tyrosinkinase-Domäne (FLT3-TKD) zur Entstehung von Lymphomen führte. Das Auftreten dieser unterschiedlichen Krankheitsphänotypen (betroffene lymphatische Linie vs. myeloische Linie) wurde damit begründet, dass sich die Signaltransduktion, die von FLT3-TKD ausgeht, von der Signaltransduktion eines FLT3-ITD, insbesondere in Hinblick auf den STAT5 Signalweg, unterscheidet. Proteinexpressions-Analysen leukämischer prä-B-Zellen haben in der vorliegenden Arbeit jedoch gezeigt, dass die Aktivierung des STAT5 Signalweges auch bei der Entstehung einer lymphatischen Erkrankung eine Rolle spielen könnte. Um dies näher zu überprüfen, wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht, den FLT3mut Effekt durch Expression eines aktivierten STAT5 im Knochenmark-Transplantationsmodell zu imitieren.

Aktiviertes STAT5 führte zu einer mit FLT3mut vergleichbaren Störung der B-Zell-Differenzierung am Übergang von der frühen zur späten prä-B-Zelle. Das Verhältnis früher zu später prä-B-Zellen war signifikant vergrößert. Diese Ergebnisse bestätigen die Bedeutung von STAT5 während der Differenzierung lymphatischer Zellen, die bereits in anderen Veröffentlichungen beschrieben wurde (Dai et al., 2007; Yao et al., 2006). Das Fehlen von STAT5 führte in Mausmodellen zu einer massiven Störung der Entwicklung lymphatischer Zellen. In der B-Zell Linie kam es zu einer Blockade der Differenzierung im prä-pro-B-Zell Stadium. Dieser Phänotyp ähnelt dem von  $Il7^{-/-}$  Tieren, was die Bedeutung von STAT5, als dem IL-7 Rezeptor nachgeschaltetem Signalprotein, während der frühen B-Zell-Entwicklung deutlich macht.

Trotz der mit FLT3mut vergleichbaren Blockade der B-Zell-Differenzierung reichte die Expression einer konstitutiv aktiven Form des FLT3mut nachgeschalteten Signalproteins STAT5 jedoch nicht aus, um eine Expansion der Population oder gar eine prä-B-ALL zu induzieren. Für diese Transformation sind vermutlich weitere genetische Veränderungen und/oder durch FLT3mut aktivierte Signalwege notwendig, die einen Überlebensvorteil und/oder eine erhöhte Zellteilungsrate vermitteln.

### **4.6 Ein Modell zur FLT3mut-assoziierten Entstehung einer prä-B-ALL in der Maus**

Der Übergang von der frühen zur späten prä-B-Zelle stellt den ersten wichtigen Kontrollpunkt während der B-Zell-Differenzierung dar (Herzog et al., 2009). In diesem Stadium wird der prä-B-Zell-Rezeptor (prä-BZR) auf seine Funktionsfähigkeit überprüft. Frühe prä-B-Zellen, die kein Überlebenssignal von diesem Rezeptor bekommen, können nicht weiter differenzieren. Möglicherweise setzt der programmierte Zelltod ein, oder die Zellen verharren in einem Status der Teilungsunfähigkeit (Melchers et al., 1993). Ist die Signalvermittlung durch den prä-BZR jedoch erfolgreich, erhalten die Zellen das

Überlebens-Signal und treten gleichzeitig in eine Phase der klonalen Expansion ein. Dieser Proliferations-Prozess muss durch interne Mechanismen genau kontrolliert werden, damit es nicht zu einer unkontrollierten Vermehrung der frühen prä-B-Zellen kommt. Nahar et al. haben eine Hypothese formuliert, wie diese Kontrolle ausgeübt werden könnte und wie leukämische Zellen diesen Kontrollmechanismen entgehen könnten (Nahar et al., 2008). Prä-B-ALLs werden hierfür in Typ I und Typ II Leukämien unterteilt. Typ I ALL Zellen sind durch einen funktionierenden prä-BZR gekennzeichnet, was in Proben mit E2A-PBX1 Translokationen der Fall war. In leukämischen Zellen des Typ II (BCR-ABL, MLL-AF4 oder hyperdiploid) zeigt der prä-BZR dagegen keine Signalwirkung. Außerdem sind die Expressionsniveaus des pro-proliferativen Onkogens MYC in diesen Zellen stark erhöht. Experimente von Nahar et al. zeigen, dass Zellen einer Typ II Leukämie in Apoptose gingen, wenn in ihnen ein funktioneller prä-BZR exprimiert wurde. MYC transformierte frühe B-Zellen, in denen die Expression des prä-BZR induziert wurde, erlagen zwar nicht dem programmierten Zelltod, gingen aber in einen Wachstumsarrest. Sie proliferierten erst wieder, nachdem die Expression des prä-BZR wieder eingestellt wurde. Hieraus ergab sich die Hypothese, dass der prä-BZR das leukämische Wachstum von Typ II Leukämien verhindert, indem er auf erhöhte MYC Expressionsniveau mit einem Signal zur Differenzierungs- und Proliferationsblockade reagiert.

FLT3 Mutationen sind häufig in Patienten zu finden, die den Typ II prä-B-ALLs zugeordnet werden (MLL Translokationen, hyperdiploide). Außerdem ist bekannt, dass FLT3-ITD Expression zu einer starken Aktivierung der *c-MYC* Expression führt (Li et al., 2007). Die frühen prä-B-Zellen des Allotransplantations-Modells wurden zwar nicht auf ihre Myc Expression untersucht, doch vermutlich war das Expressionsniveau durch die FLT3mut Signalwirkung auch hier stark erhöht. Bei funktionierendem prä-BZR sollte dies zu einer Blockade der Differenzierung und zum Wachstumsarrest führen. Im Allotransplantations-Modell der vorliegenden Arbeit kam es zu einer deutlichen Blockade am Übergang von der frühen zur späten prä-B-Zelle. Den Wachstumsarrest scheinen die FLT3mut prä-B-Zellen umgangen zu haben. Sie wuchsen zu einer leukämischen Population aus. Dem oben beschriebenen Modell zu Folge müsste dafür die Signalwirkung des prä-BZR in den FLT3mut Zellen gestört sein. Die Zellen sind in diesem Fall zwar noch der Differenzierungsblockade unterlegen, da ein Übergang in das späte pro-B-Zell Stadium ohne funktionierenden prä-BZR nicht möglich ist, aber sie unterliegen nicht dem wachstumshemmenden Signal, das der prä-BZR normalerweise aussenden würde. Die Aktivität des prä-BZR wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Die Klonalität der Tumore zeigt jedoch, dass virale Integrationen oder spontane Mutationen dazu geführt haben, dass die Zellen wachstumshemmenden Signalen entgingen und

einen Wachstumsvorteil erlangt haben. Möglicherweise haben diese genetischen Veränderungen zu einer Störung der prä-BZR Signalwirkung geführt. Die Untersuchung der retroviralen Integrationsorte könnte diese Frage beantworten.

### **4.7 Inwiefern können die Ergebnisse dieser Arbeit zum Verständnis der Leukämie-Entstehung und -Heilung beitragen?**

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse und die diskutierten Mausmodelle anderer Arbeitsgruppen machen deutlich, dass die im Kontext von FLT3 Mutationen auftretenden hämatologischen Erkrankungen in Art, Entstehung und Verlauf unmittelbar von weiteren Faktoren abhängig sind. Für ein besseres Verständnis der Leukämieentstehung und sich daraus ergebenden Therapieansätzen ist es nötig, die bei diesem Prozess kooperierenden Faktoren zu ermitteln. Die proviralen Integrationsorte des B-ALL Modells könnten erste Kandidaten liefern. Einen mit FLT3mut kooperierenden Faktor hat diese Arbeit hervor gebracht: das fehlende IRF8 Gen. Die Relevanz dieses Ergebnisses bestätigen ALL Proben, in denen eine deutlich verringerte IRF8 Expression bereits nachgewiesen wurde (Klein et al., 2005). Das Xenotransplantations-Modell bietet die Möglichkeit, solche Synergien im Kontext humaner Zellen zu untersuchen.

Die im Zuge der vorliegenden Arbeiten etablierten Modelle könnten außerdem zur Beantwortung der Frage beitragen, ob allein die Behandlung mit einem niedermolekularen Kinase-Inhibitor ausreicht, die Leukämie zu heilen, da FLT3 Mutationen meist in Verbindung mit anderen genetischen Veränderungen auftreten. Der Einsatz von Kinase-Inhibitoren ist eine vielversprechende therapeutische Maßnahme für Patienten, deren Heilungschancen aufgrund einer FLT3 Mutation schlechter sind, als bei Patienten ohne FLT3 Mutation. Ihre Anwendung, die sich meist auf die Behandlung von akuten myeloischen Leukämien beschränkt, könnte so möglicherweise auf ALL Patienten mit einer gestörten FLT3 Expression ausgedehnt werden, wie bereits an anderer Stelle vorgeschlagen (Armstrong et al., 2003; Brown et al., 2005). Die zwei etablierten Modelle bieten die Möglichkeit neue und bereits existierende Therapeutika für ALL und AML auf ihre Wirksamkeit und Wirkungsweise zu überprüfen.

- Acquaviva, J., Chen, X., and Ren, R. (2008). IRF-4 functions as a tumor suppressor in early B-cell development. *Blood* *112*, 3798-3806.
- Adolfsson, J., Borge, O. J., Bryder, D., Theilgaard-Monch, K., Astrand-Grundstrom, I., Sitnicka, E., Sasaki, Y., and Jacobsen, S. E. (2001). Upregulation of Flt3 expression within the bone marrow Lin(-)Sca1(+)c-kit(+) stem cell compartment is accompanied by loss of self-renewal capacity. *Immunity* *15*, 659-669.
- Agrawal, S., Koschmieder, S., Baumer, N., Reddy, N. G., Berdel, W. E., Muller-Tidow, C., and Serve, H. (2008). Pim2 complements Flt3 wild-type receptor in hematopoietic progenitor cell transformation. *Leukemia* *22*, 78-86.
- Alaverdi, N. (2002). Monoclonal antibodies to mouse cell-surface antigens. *Curr Protoc Immunol Appendix 4*, Appendix 4B.
- Armstrong, S. A., Kung, A. L., Mabon, M. E., Silverman, L. B., Stam, R. W., Den Boer, M. L., Pieters, R., Kersey, J. H., Sallan, S. E., Fletcher, J. A., *et al.* (2003). Inhibition of FLT3 in MLL: Validation of a therapeutic target identified by gene expression based classification. *Cancer Cell* *3*, 173-183.
- Armstrong, S. A., and Look, A. T. (2005). Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* *23*, 6306-6315.
- Armstrong, S. A., Mabon, M. E., Silverman, L. B., Li, A., Gribben, J. G., Fox, E. A., Sallan, S. E., and Korsmeyer, S. J. (2004). FLT3 mutations in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* *103*, 3544-3546.
- Bain, G., Robanus Maandag, E. C., te Riele, H. P., Feeney, A. J., Sheehy, A., Schlissel, M., Shinton, S. A., Hardy, R. R., and Murre, C. (1997). Both E12 and E47 allow commitment to the B cell lineage. *Immunity* *6*, 145-154.
- Baldwin, B. R., Li, L., Tse, K. F., Small, S., Collector, M., Whartenby, K. A., Sharkis, S. J., Racke, F., Huso, D., and Small, D. (2007). Transgenic mice expressing Tel-FLT3, a constitutively activated form of FLT3, develop myeloproliferative disease. *Leukemia* *21*, 764-771.
- Bankovich, A. J., Raunser, S., Juo, Z. S., Walz, T., Davis, M. M., and Garcia, K. C. (2007). Structural insight into pre-B cell receptor function. *Science* *316*, 291-294.
- Beyer, W. R., Westphal, M., Ostertag, W., and von Laer, D. (2002). Oncoretrovirus and lentivirus vectors pseudotyped with lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein: generation, concentration, and broad host range. *J Virol* *76*, 1488-1495.
- Birg, F., Courcoul, M., Rosnet, O., Bardin, F., Pebusque, M. J., Marchetto, S., Tabilio, A., Mannoni, P., and Birnbaum, D. (1992). Expression of the FMS/KIT-like gene FLT3 in human acute leukemias of the myeloid and lymphoid lineages. *Blood* *80*, 2584-2593.
- Birkenkamp, K. U., Geugien, M., Lemmink, H. H., Kruijer, W., and Vellenga, E. (2001). Regulation of constitutive STAT5 phosphorylation in acute myeloid leukemia blasts. *Leukemia* *15*, 1923-1931.
- Borghesi, L., Aites, J., Nelson, S., Lefterov, P., James, P., and Gerstein, R. (2005). E47 is required for V(D)J recombinase activity in common lymphoid progenitors. *J Exp Med* *202*, 1669-1677.
- Brandts, C. H., Sargin, B., Rode, M., Biermann, C., Lindtner, B., Schwable, J., Buerger, H., Muller-Tidow, C., Choudhary, C., McMahon, M., *et al.* (2005). Constitutive activation of Akt by Flt3 internal tandem duplications is necessary for increased survival, proliferation, and myeloid transformation. *Cancer Res* *65*, 9643-9650.
- Brown, P., Levis, M., Shurtleff, S., Campana, D., Downing, J., and Small, D. (2005). FLT3 inhibition selectively kills childhood acute lymphoblastic leukemia cells with high levels of FLT3 expression. *Blood* *105*, 812-820.

- Carow, C. E., Levenstein, M., Kaufmann, S. H., Chen, J., Amin, S., Rockwell, P., Witte, L., Borowitz, M. J., Civin, C. I., and Small, D. (1996). Expression of the hematopoietic growth factor receptor FLT3 (STK-1/Flk2) in human leukemias. *Blood* *87*, 1089-1096.
- Ceredig, R., Rauch, M., Balciunaite, G., and Rolink, A. G. (2006). Increasing Flt3L availability alters composition of a novel bone marrow lymphoid progenitor compartment. *Blood* *108*, 1216-1222.
- Choudhary, C., Brandts, C., Schwable, J., Tickenbrock, L., Sargin, B., Ueker, A., Bohmer, F. D., Berdel, W. E., Muller-Tidow, C., and Serve, H. (2007). Activation mechanisms of STAT5 by oncogenic Flt3-ITD. *Blood* *110*, 370-374.
- Christensen, J. L., and Weissman, I. L. (2001). Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 14541-14546.
- Chung, K. Y., Morrone, G., Schuringa, J. J., Wong, B., Dorn, D. C., and Moore, M. A. S. (2005). Enforced expression of an Flt3 internal tandem duplication in human CD34+ cells confers properties of self-renewal and enhanced erythropoiesis. *Blood* *105*, 77-84.
- Cobaleda, C., Jochum, W., and Busslinger, M. (2007). Conversion of mature B cells into T cells by dedifferentiation to uncommitted progenitors. *Nature* *449*, 473-477.
- Cools, J., Mentens, N., Furet, P., Fabbro, D., Clark, J. J., Griffin, J. D., Marynen, P., and Gilliland, D. G. (2004). Prediction of resistance to small molecule FLT3 inhibitors: implications for molecularly targeted therapy of acute leukemia. *Cancer Res* *64*, 6385-6389.
- Cosset, F. L., Takeuchi, Y., Battini, J. L., Weiss, R. A., and Collins, M. K. (1995). High-titer packaging cells producing recombinant retroviruses resistant to human serum. *J Virol* *69*, 7430-7436.
- Dai, X., Chen, Y., Di, L., Podd, A., Li, G., Bunting, K. D., Hennighausen, L., Wen, R., and Wang, D. (2007). Stat5 Is Essential for Early B Cell Development but Not for B Cell Maturation and Function. *J Immunol* *179*, 1068-1079.
- Daley, G. Q., Van Etten, R. A., and Baltimore, D. (1990). Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science* *247*, 824-830.
- Dash, A., and Gilliland, D. G. (2001). Molecular genetics of acute myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* *14*, 49-64.
- Diehl, A., Stoelting, S., Nadrowitz, R., Wagner, T., and Peters, S. O. (2007). Improved hematopoietic stem cell engraftment following ex vivo expansion of murine marrow cells with SCF and Flt3L. *Cytotherapy* *9*, 532-538.
- Elefanty, A. G., and Cory, S. (1992). Hematologic disease induced in BALB/c mice by a bcr-abl retrovirus is influenced by the infection conditions. *Mol Cell Biol* *12*, 1755-1763.
- Esashi, E., Wang, Y.-H., Perng, O., Qin, X.-F., Liu, Y.-J., and Watowich, S. S. (2008). The Signal Transducer STAT5 Inhibits Plasmacytoid Dendritic Cell Development by Suppressing Transcription Factor IRF8. *Immunity* *28*, 509-520.
- Fehse, B., Kustikova, O. S., Bubenheim, M., and Baum, C. (2004). Pois(s)on--it's a question of dose. *Gene Ther* *11*, 879-881.
- Fuxa, M., and Skok, J. A. (2007). Transcriptional regulation in early B cell development. *Curr Opin Immunol* *19*, 129-136.
- Gilliland, D. G., and Griffin, J. D. (2002). The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood* *100*, 1532-1542.
- Gilliland, D. G., Jordan, C. T., and Felix, C. A. (2004). The Molecular Basis of Leukemia. *Hematology* *2004*, 80-97.

- Gilliland, D. G., and Tallman, M. S. (2002). Focus on acute leukemias. *Cancer Cell* *1*, 417-420.
- Graf, T., and Beug, H. (1983). Role of the v-erbA and v-erbB oncogenes of avian erythroblastosis virus in erythroid cell transformation. *Cell* *34*, 7-9.
- Grundler, R., Miething, C., Thiede, C., Peschel, C., and Duyster, J. (2005). FLT3-ITD and tyrosine kinase domain mutants induce 2 distinct phenotypes in a murine bone marrow transplantation model. *Blood* *105*, 4792-4799.
- Grundler, R., Thiede, C., Miething, C., Steudel, C., Peschel, C., and Duyster, J. (2003). Sensitivity toward tyrosine kinase inhibitors varies between different activating mutations of the FLT3 receptor. *Blood* *102*, 646-651.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* *100*, 57-70.
- Hardy, R. R., and Hayakawa, K. (2001). B cell development pathways. *Annu Rev Immunol* *19*, 595-621.
- Hardy, R. R., and Hayakawa, K. (2005). Development of B cells producing natural autoantibodies to thymocytes and senescent erythrocytes. *Springer Seminars in Immunopathology* *26*, 363-375.
- Hardy, R. R., Kincade, P. W., and Dorshkind, K. (2007). The Protean Nature of Cells in the B Lymphocyte Lineage. *Immunity* *26*, 703-714.
- Haug, J. S., He, X. C., Grindley, J. C., Wunderlich, J. P., Gaudenz, K., Ross, J. T., Paulson, A., Wagner, K. P., Xie, Y., Zhu, R., *et al.* (2008). N-Cadherin Expression Level Distinguishes Reserved versus Primed States of Hematopoietic Stem Cells. *2*, 367-379.
- Hawley, R. G., Lieu, F. H., Fong, A. Z., and Hawley, T. S. (1994). Versatile retroviral vectors for potential use in gene therapy. *Gene Ther* *1*, 136-138.
- Hayakawa, F., Towatari, M., Kiyoi, H., Tanimoto, M., Kitamura, T., Saito, H., and Naoe, T. (2000). Tandem-duplicated Flt3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines. *Oncogene* *19*, 624-631.
- Hendriks, R. W., and Kersseboom, R. (2006). Involvement of SLP-65 and Btk in tumor suppression and malignant transformation of pre-B cells. *Semin Immunol* *18*, 67-76.
- Herzog, S., Reth, M., and Jumaa, H. (2009). Regulation of B-cell proliferation and differentiation by pre-B-cell receptor signalling. *Nat Rev Immunol* *9*, 195-205.
- Holmes, M. L., Carotta, S., Corcoran, L. M., and Nutt, S. L. (2006a). Repression of Flt3 by Pax5 is crucial for B-cell lineage commitment. *Genes Dev* *20*, 933-938.
- Holmes, M. L., Carotta, S., Corcoran, L. M., and Nutt, S. L. (2006b). Repression of Flt3 by Pax5 is crucial for B-cell lineage commitment. *Genes Dev* *20*, 933-938.
- Holtzschke, T., Lohler, J., Kanno, Y., Fehr, T., Giese, N., Rosenbauer, F., Lou, J., Knobloch, K. P., Gabriele, L., Waring, J. F., *et al.* (1996). Immunodeficiency and chronic myelogenous leukemia-like syndrome in mice with a targeted mutation of the ICSBP gene. *Cell* *87*, 307-317.
- Irish, J. M., Anensen, N., Hovland, R., Skavland, J., Borresen-Dale, A.-L., Bruserud, O., Nolan, G. P., and Gjertsen, B. T. (2007). Flt3 Y591 duplication and Bcl-2 overexpression are detected in acute myeloid leukemia cells with high levels of phosphorylated wild-type p53. *Blood* *109*, 2589-2596.
- Iwasaki, H., and Akashi, K. (2007). Myeloid Lineage Commitment from the Hematopoietic Stem Cell. *Immunity* *26*, 726-740.



- Jones, R. J., Wagner, J. E., Celano, P., Zicha, M. S., and Sharkis, S. J. (1990). Separation of pluripotent haematopoietic stem cells from spleen colony-forming cells. *Nature* *347*, 188-189.
- Jonkers, J., and Berns, A. (1996). Retroviral insertional mutagenesis as a strategy to identify cancer genes. *Biochim Biophys Acta* *1287*, 29-57.
- Kajiguchi, T., Chung, E. J., Lee, S., Stine, A., Kiyoi, H., Naoe, T., Levis, M. J., Neckers, L., and Trepel, J. B. (2007). FLT3 regulates [beta]-catenin tyrosine phosphorylation, nuclear localization, and transcriptional activity in acute myeloid leukemia cells. *Leukemia* *21*, 2476-2484.
- Karsunky, H., Inlay, M. A., Serwold, T., Bhattacharya, D., and Weissman, I. L. (2008). Flk2+ common lymphoid progenitors possess equivalent differentiation potential for the B and T lineages. *Blood* *111*, 5562-5570.
- Kawamata, N., Ogawa, S., Zimmermann, M., Kato, M., Sanada, M., Hemminki, K., Yamamoto, G., Nannya, Y., Koehler, R., Flohr, T., *et al.* (2008a). Molecular allelokaryotyping of pediatric acute lymphoblastic leukemias by high-resolution single nucleotide polymorphism oligonucleotide genomic microarray. *Blood* *111*, 776-784.
- Kawamata, N., Ogawa, S., Zimmermann, M., Niebuhr, B., Stocking, C., Sanada, M., Hemminki, K., Yamamoto, G., Nannya, Y., Koehler, R., *et al.* (2008b). Cloning of genes involved in chromosomal translocations by high-resolution single nucleotide polymorphism genomic microarray. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *105*, 11921-11926.
- Kee, B. L. (2009). E and ID proteins branch out. *Nat Rev Immunol* *9*, 175-184.
- Keller, G., and Snodgrass, R. (1990). Life span of multipotential hematopoietic stem cells in vivo. *J Exp Med* *171*, 1407-1418.
- Kelly, L. M., Kutok, J. L., Williams, I. R., Boulton, C. L., Amaral, S. M., Curley, D. P., Ley, T. J., and Gilliland, D. G. (2002a). PML/RARalpha and FLT3-ITD induce an APL-like disease in a mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 8283-8288.
- Kelly, L. M., Liu, Q., Kutok, J. L., Williams, I. R., Boulton, C. L., and Gilliland, D. G. (2002b). FLT3 internal tandem duplication mutations associated with human acute myeloid leukemias induce myeloproliferative disease in a murine bone marrow transplant model. *Blood* *99*, 310-318.
- Kikushige, Y., Yoshimoto, G., Miyamoto, T., Iino, T., Mori, Y., Iwasaki, H., Niino, H., Takenaka, K., Nagafuji, K., Harada, M., *et al.* (2008). Human Flt3 Is Expressed at the Hematopoietic Stem Cell and the Granulocyte/Macrophage Progenitor Stages to Maintain Cell Survival. *J Immunol* *180*, 7358-7367.
- Kim, H.-G., Kojima, K., Swindle, C. S., Cotta, C. V., Huo, Y., Reddy, V., and Klug, C. A. (2008). FLT3-ITD cooperates with inv(16) to promote progression to acute myeloid leukemia. *Blood* *111*, 1567-1574.
- Kim, K. T., Baird, K., Ahn, J. Y., Meltzer, P., Lilly, M., Levis, M., and Small, D. (2005). Pim-1 is up-regulated by constitutively activated FLT3 and plays a role in FLT3-mediated cell survival. *Blood* *105*, 1759-1767.
- Kitamura, T., Koshino, Y., Shibata, F., Oki, T., Nakajima, H., Nosaka, T., and Kumagai, H. (2003). Retrovirus-mediated gene transfer and expression cloning: powerful tools in functional genomics. *Exp Hematol* *31*, 1007-1014.
- Kiyoi, H., Ohno, R., Ueda, R., Saito, H., and Naoe, T. (2002). Mechanism of constitutive activation of FLT3 with internal tandem duplication in the juxtamembrane domain. *Oncogene* *21*, 2555-2563.
- Klein, F., Feldhahn, N., Mooster, J. L., Sprangers, M., Hofmann, W. K., Wernet, P., Wartenberg, M., and Muschen, M. (2005). Tracing the pre-B to immature B cell transition in human leukemia cells reveals a coordinated sequence of primary and secondary IGK gene rearrangement, IGK deletion, and IGL gene rearrangement. *J Immunol* *174*, 367-375.

- Kogan, S. C., Ward, J. M., Anver, M. R., Berman, J. J., Brayton, C., Cardiff, R. D., Carter, J. S., de Coronado, S., Downing, J. R., Fredrickson, T. N., *et al.* (2002). Bethesda proposals for classification of nonlymphoid hematopoietic neoplasms in mice. *Blood* *100*, 238-245.
- Koschmieder, S., Halmos, B., Levantini, E., and Tenen, D. G. (2009). Dysregulation of the C/EBPalpha differentiation pathway in human cancer. *J Clin Oncol* *27*, 619-628.
- Kottaridis, P. D., Gale, R. E., Frew, M. E., Harrison, G., Langabeer, S. E., Belton, A. A., Walker, H., Wheatley, K., Bowen, D. T., Burnett, A. K., *et al.* (2001). The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood* *98*, 1752-1759.
- Laiosa, C. V., Stadtfeld, M., and Graf, T. (2006). Determinants of lymphoid-myeloid lineage diversification. *Annu Rev Immunol* *24*, 705-738.
- LeBien, T. W., and Tedder, T. F. (2008). B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* *112*, 1570-1580.
- Lee, B. H., Tothova, Z., Levine, R. L., Anderson, K., Buza-Vidas, N., Cullen, D. E., McDowell, E. P., Adelsperger, J., Frohling, S., Huntly, B. J. P., *et al.* (2007). FLT3 Mutations Confer Enhanced Proliferation and Survival Properties to Multipotent Progenitors in a Murine Model of Chronic Myelomonocytic Leukemia. *Cancer Cell* *12*, 367-380.
- Lee, B. H., Williams, I. R., Anastasiadou, E., Boulton, C. L., Joseph, S. W., Amaral, S. M., Curley, D. P., Duclos, N., Huntly, B. J. P., Fabbro, D., *et al.* (2005). FLT3 internal tandem duplication mutations induce myeloproliferative or lymphoid disease in a transgenic mouse model. *24*, 7882-7892.
- Levis, M., and Small, D. (2003). FLT3: ITD Does matter in leukemia. *Leukemia* *17*, 1738-1752.
- Li, L., Piloto, O., Kim, K. T., Ye, Z., Nguyen, H. B., Yu, X., Levis, M., Cheng, L., and Small, D. (2007). FLT3/ITD expression increases expansion, survival and entry into cell cycle of human haematopoietic stem/progenitor cells. *Br J Haematol* *137*, 64-75.
- Li, L., Piloto, O., Nguyen, H. B., Greenberg, K., Takamiya, K., Racke, F., Huso, D., and Small, D. (2008). Knock-in of an internal tandem duplication mutation into murine FLT3 confers myeloproliferative disease in a mouse model. *Blood* *111*, 3849-3858.
- Li, S., Ilaria, R. L., Jr., Million, R. P., Daley, G. Q., and Van Etten, R. A. (1999). The P190, P210, and P230 forms of the BCR/ABL oncogene induce a similar chronic myeloid leukemia-like syndrome in mice but have different lymphoid leukemogenic activity. *J Exp Med* *189*, 1399-1412.
- Lin, H., and Grosschedl, R. (1995). Failure of B-cell differentiation in mice lacking the transcription factor EBF. *Nature* *376*, 263-267.
- Litzow, M. R. (2005). More flitting about FLT3. *Blood* *106*, 3331-3332.
- Look, A. T. (1997). Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science* *278*, 1059-1064.
- Lu, R., Medina, K. L., Lancki, D. W., and Singh, H. (2003). IRF-4,8 orchestrate the pre-B-to-B transition in lymphocyte development. *Genes Dev* *17*, 1703-1708.
- Lukin, K., Fields, S., Hartley, J., and Hagman, J. (2008). Early B cell factor: Regulator of B lineage specification and commitment. *Semin Immunol* *20*, 221-227.
- Lyman, S. D. (1995). Biology of flt3 ligand and receptor. *Int J Hematol* *62*, 63-73.

- Mackarehtschian, K., Hardin, J. D., Moore, K. A., Boast, S., Goff, S. P., and Lemischka, I. R. (1995). Targeted disruption of the *flk2/flt3* gene leads to deficiencies in primitive hematopoietic progenitors. *Immunity* **3**, 147-161.
- Matthias, P., and Rolink, A. G. (2005). Transcriptional networks in developing and mature B cells. *Nat Rev Immunol* **5**, 497-508.
- McAllister, R. M., Isaacs, H., Rongey, R., Peer, M., Au, W., Soukup, S. W., and Gardner, M. B. (1977). Establishment of a human medulloblastoma cell line. *Int J Cancer* **20**, 206-212.
- McKenna, H. J., Stocking, K. L., Miller, R. E., Brasel, K., De Smedt, T., Maraskovsky, E., Maliszewski, C. R., Lynch, D. H., Smith, J., Pulendran, B., *et al.* (2000). Mice lacking *flt3* ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood* **95**, 3489-3497.
- Medina, K. L., and Singh, H. (2005). Genetic networks that regulate B lymphopoiesis. *Curr Opin Hematol* **12**, 203-209.
- Melchers, F., Karasuyama, H., Haasner, D., Bauer, S., Kudo, A., Sakaguchi, N., Jameson, B., and Rolink, A. (1993). The surrogate light chain in B-cell development. *Immunol Today* **14**, 60-68.
- Meshinchi, S., Stirewalt, D. L., Alonzo, T. A., Boggon, T. J., Gerbing, R. B., Rocnik, J. L., Lange, B. J., Gilliland, D. G., and Radich, J. P. (2008). Structural and numerical variation of *FLT3/ITD* in pediatric AML. *Blood* **111**, 4930-4933.
- Metcalf, D. (1989). The molecular control of cell division, differentiation commitment and maturation in haemopoietic cells. *Nature* **339**, 27-30.
- Metcalf, D. (2008). Hematopoietic cytokines. *Blood* **111**, 485-491.
- Milne, C. D., and Paige, C. J. (2006). IL-7: a key regulator of B lymphopoiesis. *Semin Immunol* **18**, 20-30.
- Mittrucker, H. W., Matsuyama, T., Grossman, A., Kundig, T. M., Potter, J., Shahinian, A., Wakeham, A., Patterson, B., Ohashi, P. S., and Mak, T. W. (1997). Requirement for the transcription factor LSIRF/IRF4 for mature B and T lymphocyte function. *Science* **275**, 540-543.
- Mizuki, M., Fenski, R., Halfter, H., Matsumura, I., Schmidt, R., Muller, C., Gruning, W., Kratz-Albers, K., Serve, S., Steur, C., *et al.* (2000). *Flt3* mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways. *Blood* **96**, 3907-3914.
- Mizuki, M., Schwable, J., Steur, C., Choudhary, C., Agrawal, S., Sargin, B., Steffen, B., Matsumura, I., Kanakura, Y., Bohmer, F. D., *et al.* (2003). Suppression of myeloid transcription factors and induction of STAT response genes by AML-specific *Flt3* mutations. *Blood* **101**, 3164-3173.
- Morita, S., Kojima, T., and Kitamura, T. (2000). Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. *Gene Ther* **7**, 1063-1066.
- Morse, H. C., 3rd, Anver, M. R., Fredrickson, T. N., Haines, D. C., Harris, A. W., Harris, N. L., Jaffe, E. S., Kogan, S. C., MacLennan, I. C., Pattengale, P. K., and Ward, J. M. (2002). Bethesda proposals for classification of lymphoid neoplasms in mice. *Blood* **100**, 246-258.
- Moschese, V., Orlandi, P., Di Matteo, G., Chini, L., Carsetti, R., Di Cesare, S., and Rossi, P. (2004). Insight into B cell development and differentiation. *Acta Paediatr Suppl* **93**, 48-51.
- Mullighan, C. G., Goorha, S., Radtke, I., Miller, C. B., Coustan-Smith, E., Dalton, J. D., Girtman, K., Mathew, S., Ma, J., Pounds, S. B., *et al.* (2007). Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* **446**, 758-764.

- Nahar, R., Trageser, D., Klemm, L., Duy, C., van Essen, P., Kim, Y.-m., Heisterkamp, N., Martinelli, G., Hofmann, W.-K., Jack, H.-M., *et al.* (2008). The Pre-B Cell Receptor Suppresses Leukemogenesis by Censoring MYC Expression. *ASH Annual Meeting Abstracts 112*, 1918-.
- Niebuhr, B., Iwanski, G. B., Schwieger, M., Roscher, S., Stocking, C., and Cammenga, J. (2008). Investigation of C/EBPalpha function in human (versus murine) myelopoiesis provides novel insight into the impact of CEBPA mutations in acute myelogenous leukemia (AML). *Leukemia*. Online veröffentlicht.
- Niuro, H., and Clark, E. A. (2002). Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nat Rev Immunol 2*, 945-956.
- Nishio, N., Hisha, H., Ogata, H., Inaba, M., Yamamoto, Y., Amoh, Y., Yasumizu, R., Hanada, K.-i., Hamada, H., and Ikehara, S. (1996). Changes in Markers, Receptors and Adhesion Molecules Expressed on Murine Hemopoietic Stem Cells After a Single Injection of 5-Fluorouracil. *Stem Cells 14*, 584-591.
- Nutt, S. L., Heavey, B., Rolink, A. G., and Busslinger, M. (1999). Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. *Nature 401*, 556-562.
- Nutt, S. L., and Kee, B. L. (2007). The Transcriptional Regulation of B Cell Lineage Commitment. *Immunity 26*, 715-725.
- Nutt, S. L., Urbanek, P., Rolink, A., and Busslinger, M. (1997). Essential functions of Pax5 (BSAP) in pro-B cell development: difference between fetal and adult B lymphopoiesis and reduced V-to-DJ recombination at the IgH locus. *Genes Dev 11*, 476-491.
- Okamoto, M., Hayakawa, F., Miyata, Y., Watamoto, K., Emi, N., Abe, A., Kiyoi, H., Towatari, M., and Naoe, T. (2007). Lyn is an important component of the signal transduction pathway specific to FLT3//ITD and can be a therapeutic target in the treatment of AML with FLT3//ITD. *Leukemia 21*, 403-410.
- Onishi, M., Nosaka, T., Misawa, K., Mui, A. L. F., Gorman, D., McMahon, M., Miyajima, A., and Kitamura, T. (1998). Identification and Characterization of a Constitutively Active STAT5 Mutant That Promotes Cell Proliferation. *Mol Cell Biol 18*, 3871-3879.
- Ono, R., Nakajima, H., Ozaki, K., Kumagai, H., Kawashima, T., Taki, T., Kitamura, T., Hayashi, Y., and Nosaka, T. (2005). Dimerization of MLL fusion proteins and FLT3 activation synergize to induce multiple-lineage leukemogenesis. *J Clin Invest 115*, 919-929.
- Orkin, S. H. (2000). Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nat Rev Genet 1*, 57-64.
- Osmond, D. G., Rolink, A., and Melchers, F. (1998). Murine B lymphopoiesis: towards a unified model. *Immunol Today 19*, 65-68.
- Parcells, B. W., Ikeda, A. K., Simms-Waldrup, T., Moore, T. B., and Sakamoto, K. M. (2006). FMS-Like Tyrosine Kinase 3 in Normal Hematopoiesis and Acute Myeloid Leukemia. *Stem Cells 24*, 1174-1184.
- Paulsson, K., Horvat, A., Strombeck, B., Nilsson, F., Heldrup, J., Behrendtz, M., Forestier, E., Andersson, A., Fioretos, T., and Johansson, B. (2008). Mutations of FLT3, NRAS, KRAS, and PTPN11 are frequent and possibly mutually exclusive in high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer 47*, 26-33.
- Payne, K. J., and Crooks, G. M. (2007). Immune-Cell Lineage Commitment: Translation from Mice to Humans. *Immunity 26*, 674-677.
- Pear, W. S., Nolan, G. P., Scott, M. L., and Baltimore, D. (1993). Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A 90*, 8392-8396.

- Pelayo, R., Welner, R. S., Nagai, Y., and Kincade, P. W. (2006). Life before the pre-B cell receptor checkpoint: specification and commitment of primitive lymphoid progenitors in adult bone marrow. *Semin Immunol* *18*, 2-11.
- Prochazka, M., Gaskins, H. R., Shultz, L. D., and Leiter, E. H. (1992). The nonobese diabetic scid mouse: model for spontaneous thymomagenesis associated with immunodeficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* *89*, 3290-3294.
- Pui, C. H., Relling, M. V., and Downing, J. R. (2004). Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* *350*, 1535-1548.
- Radomska, H. S., Huettner, C. S., Zhang, P., Cheng, T., Scadden, D. T., and Tenen, D. G. (1998). CCAAT/enhancer binding protein alpha is a regulatory switch sufficient for induction of granulocytic development from bipotential myeloid progenitors. *Mol Cell Biol* *18*, 4301-4314.
- Randall, T. D., and Weissman, I. L. (1997). Phenotypic and functional changes induced at the clonal level in hematopoietic stem cells after 5-fluorouracil treatment. *Blood* *89*, 3596-3606.
- Renneville, A., Roumier, C., Biggio, V., Nibourel, O., Boissel, N., Fenaux, P., and Preudhomme, C. (2008). Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature. *Leukemia* *22*, 915-931.
- Rivera, J., and Tessarollo, L. (2008). Genetic Background and the Dilemma of Translating Mouse Studies to Humans. *Immunity* *28*, 1-4.
- Rocnik, J. L., Okabe, R., Yu, J.-C., Lee, B. H., Giese, N., Schenkein, D. P., and Gilliland, D. G. (2006). Roles of tyrosine 589 and 591 in STAT5 activation and transformation mediated by FLT3-ITD. *Blood* *108*, 1339-1345.
- Rolink, A., Grawunder, U., Winkler, T. H., Karasuyama, H., and Melchers, F. (1994). IL-2 receptor alpha chain (CD25, TAC) expression defines a crucial stage in pre-B cell development. *Int Immunol* *6*, 1257-1264.
- Sambrook, J., and Russel, D. W. (2001). *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, 3rd edn (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* *74*, 5463-5467.
- Satterthwaite, A., and Witte, O. (1996). Genetic analysis of tyrosine kinase function in B cell development. *Annu Rev Immunol* *14*, 131-154.
- Schessl, C., Rawat, V. P., Cusan, M., Deshpande, A., Kohl, T. M., Rosten, P. M., Spiekermann, K., Humphries, R. K., Schnittger, S., Kern, W., *et al.* (2005). The AML1-ETO fusion gene and the FLT3 length mutation collaborate in inducing acute leukemia in mice. *J Clin Invest* *115*, 2159-2168.
- Schnittger, S., Schoch, C., Dugas, M., Kern, W., Staib, P., Wuchter, C., Loffler, H., Sauerland, C. M., Serve, H., Buchner, T., *et al.* (2002). Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. *Blood* *100*, 59-66.
- Schwieger, M., Lohler, J., Fischer, M., Herwig, U., Tenen, D. G., and Stocking, C. (2004). A dominant-negative mutant of C/EBPalpha, associated with acute myeloid leukemias, inhibits differentiation of myeloid and erythroid progenitors of man but not mouse. *Blood* *103*, 2744-2752.
- Schwieger, M., Lohler, J., Friel, J., Scheller, M., Horak, I., and Stocking, C. (2002). AML1-ETO inhibits maturation of multiple lymphohematopoietic lineages and induces myeloblast transformation in synergy with ICSPB deficiency. *J Exp Med* *196*, 1227-1240.

- Shih, L.-Y., Huang, C.-F., Wu, J.-H., Lin, T.-L., Dunn, P., Wang, P.-N., Kuo, M.-C., Lai, C.-L., and Hsu, H.-C. (2002). Internal tandem duplication of FLT3 in relapsed acute myeloid leukemia: a comparative analysis of bone marrow samples from 108 adult patients at diagnosis and relapse. *Blood* *100*, 2387-2392.
- Singh, H., Medina, K. L., and Pongubala, J. M. (2005). Contingent gene regulatory networks and B cell fate specification. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 4949-4953.
- Sitnicka, E., Bryder, D., Theilgaard-Monch, K., Buza-Vidas, N., Adolfsson, J., and Jacobsen, S. E. (2002). Key role of flt3 ligand in regulation of the common lymphoid progenitor but not in maintenance of the hematopoietic stem cell pool. *Immunity* *17*, 463-472.
- Sitnicka, E., Buza-Vidas, N., Larsson, S., Nygren, J. M., Liuba, K., and Jacobsen, S. E. (2003). Human CD34+ hematopoietic stem cells capable of multilineage engrafting NOD/SCID mice express flt3: distinct flt3 and c-kit expression and response patterns on mouse and candidate human hematopoietic stem cells. *Blood* *102*, 881-886.
- Small, D. (2006). FLT3 mutations: biology and treatment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 178-184.
- Spangrude, G. J., Smith, L., Uchida, N., Ikuta, K., Heimfeld, S., Friedman, J., and Weissman, I. L. (1991). Mouse hematopoietic stem cells. *Blood* *78*, 1395-1402.
- Sponcer, E., Heyworth, C. M., Dunn, A., and Dexter, T. M. (1986). Self-renewal and differentiation of interleukin-3-dependent multipotent stem cells are modulated by stromal cells and serum factors. *Differentiation* *31*, 111-118.
- Stirewalt, D. L., Kopecky, K. J., Meshinchi, S., Engel, J. H., Pogossova-Agadjanian, E. L., Linsley, J., Slovak, M. L., Willman, C. L., and Radich, J. P. (2006). Size of FLT3 internal tandem duplication has prognostic significance in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* *107*, 3724-3726.
- Stirewalt, D. L., and Radich, J. P. (2003). The role of FLT3 in haematopoietic malignancies. *Nat Rev Cancer* *3*, 650-665.
- Stocking, C., Kollek, R., Bergholz, U., and Ostertag, W. (1985). Long terminal repeat sequences impart hematopoietic transformation properties to the myeloproliferative sarcoma virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* *82*, 5746-5750.
- Stubbs, M. C., Kim, Y. M., Krivtsov, A. V., Wright, R. D., Feng, Z., Agarwal, J., Kung, A. L., and Armstrong, S. A. (2008). MLL-AF9 and FLT3 cooperation in acute myelogenous leukemia: development of a model for rapid therapeutic assessment. *Leukemia* *22*, 66-77.
- Szymanska, H., Sitarz, M., Krysiak, E., Piskorska, J., Czarnomska, A., Skurzak, H., Hart, A. A., de Jong, D., and Demant, P. (1999). Genetics of susceptibility to radiation-induced lymphomas, leukemias and lung tumors studied in recombinant congenic strains. *Int J Cancer* *83*, 674-678.
- Taketani, T., Taki, T., Sugita, K., Furuichi, Y., Ishii, E., Hanada, R., Tsuchida, M., Ida, K., and Hayashi, Y. (2004). FLT3 mutations in the activation loop of tyrosine kinase domain are frequently found in infant ALL with MLL rearrangements and pediatric ALL with hyperdiploidy. *Blood* *103*, 1085-1088.
- Tam, W. F., Gu, T.-L., Chen, J., Lee, B. H., Bullinger, L., Frohling, S., Wang, A., Monti, S., Golub, T. R., and Gilliland, D. G. (2008). Id1 is a common downstream target of oncogenic tyrosine kinases in leukemic cells. *Blood* *112*, 1981-1992.
- Thiede, C., Koch, S., Creutzig, E., Steudel, C., Illmer, T., Schaich, M., Ehninger, G., and for the Deutsche Studieninitiative, L. (2006). Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood* *107*, 4011-4020.
- Tsuji, K., Lyman, S. D., Sudo, T., Clark, S. C., and Ogawa, M. (1992). Enhancement of murine hematopoiesis by synergistic interactions between steel factor (ligand for c-kit), interleukin-11, and other early acting factors in culture. *Blood* *79*, 2855-2860.

- Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* *10*, 789-799.
- Vosshenrich, C. A., Cumano, A., Muller, W., Di Santo, J. P., and Vieira, P. (2003). Thymic stromal-derived lymphopoietin distinguishes fetal from adult B cell development. *Nat Immunol* *4*, 773-779.
- Wang, H., Lee, C. H., Qi, C., Taylor, P., Feng, J., Abbasi, S., Atsumi, T., and Morse, H. C., 3rd (2008). IRF8 regulates B-cell lineage specification, commitment, and differentiation. *Blood* *112*, 4028-4038.
- Warner, J. K., Wang, J. C., Hope, K. J., Jin, L., and Dick, J. E. (2004). Concepts of human leukemic development. *Oncogene* *23*, 7164-7177.
- Waskow, C., and Rodewald, H. R. (2002). Lymphocyte development in neonatal and adult c-Kit-deficient (c-Kit<sup>W/W</sup>) mice. *Adv Exp Med Biol* *512*, 1-10.
- Wei, J., Wunderlich, M., Fox, C., Alvarez, S., Cigudosa, J. C., Wilhelm, J. S., Zheng, Y., Cancelas, J. A., Gu, Y., Jansen, M., *et al.* (2008). Microenvironment Determines Lineage Fate in a Human Model of MLL-AF9 Leukemia. *Cancer Cell* *13*, 483-495.
- Wellmann, S., Moderegger, E., Zelmer, A., Bettkober, M., von Stackelberg, A., Henze, G., and Seeger, K. (2005). FLT3 mutations in childhood acute lymphoblastic leukemia at first relapse. *Leukemia* *19*, 467-468.
- Willerford, D. M., Chen, J., Ferry, J. A., Davidson, L., Ma, A., and Alt, F. W. (1995). Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. *Immunity* *3*, 521-530.
- Yang, L., Bryder, D., Adolfsson, J., Nygren, J., Mansson, R., Sigvardsson, M., and Jacobsen, S. E. (2005). Identification of Lin(-)Sca1(+)kit(+)CD34(+)Flt3- short-term hematopoietic stem cells capable of rapidly reconstituting and rescuing myeloablated transplant recipients. *Blood* *105*, 2717-2723.
- Yao, Z., Cui, Y., Watford, W. T., Bream, J. H., Yamaoka, K., Hissong, B. D., Li, D., Durum, S. K., Jiang, Q., Bhandoola, A., *et al.* (2006). Stat5a/b are essential for normal lymphoid development and differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *103*, 1000-1005.
- Ye, M., and Graf, T. (2007). Early decisions in lymphoid development. *Curr Opin Immunol* *19*, 123-128.
- Zhang, S., Qian, X., Redman, C., Bliskovski, V., Ramsay, E. S., Lowy, D. R., and Mock, B. A. (2003). p16 INK4a gene promoter variation and differential binding of a repressor, the ras-responsive zinc-finger transcription factor, RREB. *Oncogene* *22*, 2285-2295.
- Zhang, S., Ramsay, E. S., and Mock, B. A. (1998). Cdkn2a, the cyclin-dependent kinase inhibitor encoding p16INK4a and p19ARF, is a candidate for the plasmacytoma susceptibility locus, Pctr1. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 2429-2434.

## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ	Mikro
AML	Akute myeloische Leukämie
ALL	Akute lymphatische Leukämie
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Cluster of Differentiation
C/EBPα	CCAAT-Enhancer Binding Protein alpha
cpm	englisch: <i>Counts per Minute</i>
D	Dalton
DMEM	Dulbecco's MEM
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	englisch: <i>Desoxyribonucleic Acid</i>
dNTPs	Desoxyribonukleotidtriphosphate
DTT	Dithioerythritol
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
ECL	englisch: <i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Äthanol
FACS	englisch: <i>Fluorescent Activated Cell Sorter</i>
FCS	englisch: <i>Fetal Calf Serum</i>
FLT3	englisch: <i>FMS-like Tyrosine Kinase 3</i>
g	Gramm
Gy	Gray
<i>gag</i>	gruppenspezifische Antigene
xg	-fache Erdbeschleunigung
GFP	grün fluoreszierendes Protein
h	human
HBSS	<i>Hanks' Balanced Salts w/o Calcium + Magnesium</i>
HEPES	N-(2-Hydroxymethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonat
HRP	englisch: <i>Horse Raddish Peroxidase</i>
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LTR	englisch: <i>Long Terminal Repeat</i>
m	murin
min	Minute(n)
mM	Millimolar



NOD/ <i>scid</i>	englisch: <i>Non-obese diabetic severe combined immunodeficiency</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	englisch: <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	englisch: <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PE	R-Phycoerythrin
PenStrep	Penicillin-Streptomycin
PIPES	Piperazin-1,4-bis[2-Ethansulfonsäure]
Pol	Polymerase
PRE	englisch: <i>Posttranscriptional Regulatory Element</i>
SCF	englisch: <i>Stem Cell Factor</i>
SDS	englisch: <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
sec	Sekunde
SFEM	englisch: <i>Serum Free Expansion Medium</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCA	Trichloracetat
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TPO	Thrombopoetin
(w/v)	Masse pro Volumen
U	englisch: <i>Unit</i>

## Danksagungen

Mein besonderer Dank geht an Frau Dr. Carol Stocking und Herrn Professor Klaus Harbers, die es mir ermöglicht haben, an diesen spannenden Projekten zu arbeiten. Vielen Dank für Eure unermüdliche Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Herrn Professor Hans-Peter Mühlbach danke ich dafür, dass er sich ohne Zögern als Dissertationsgutachter zur Verfügung gestellt und mir die Durchführung dieser Arbeit dadurch ermöglicht hat.

Dem gesamten Team der Molekularen Pathologie möchte ich ganz herzlich für die freundschaftliche Zusammenarbeit während meiner Zeit am Heinrich-Pette-Institut danken.

Bei Herrn Dr. Jürgen Löhler bedanke ich mich für die Unterstützung bei der Auswertung der histologischen Befunde.

Ein ganz großes Dankeschön geht an meine Familie und meine Freunde. Mit Euch zusammen habe ich diese Zeit als etwas ganz Besonderes erlebt.