

Untersuchung des Zusammenwirkens von RUNX1-Mutanten und aktivierten Tyrosinkinase in akuten Leukämien unter Verwendung von Mausmodellen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereiches Chemie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und
Naturwissenschaften der Universität Hamburg

vorgelegt von

Katrin Schulz

aus Lübeck

Hamburg 2010

1. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Deppert

2. Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Hahn

Tag der Disputation: 03.12.2010

Prüfungskommission:

Prof. Dr. Wolfgang Deppert

Prof. Dr. Peter Heisig

Dr. Ilka Haase

Die vorliegende Arbeit wurde in der Forschungsgruppe Molekulare Pathologie am Heinrich-Pette-Institut unter der Anleitung von Frau Ph.D. Carol Stocking und der Betreuung von Prof. Dr. Deppert angefertigt.

Frau Ph.D. Carol Stocking danke ich sehr herzlich für die Überlassung einer spannenden Thematik und Ihre Unterstützung bei der Durchführung meiner Arbeit in Ihrer Gruppe.

Herrn Prof. Dr. Deppert gilt mein Dank für die sehr gute Betreuung und Unterstützung während meiner Arbeit.

Herrn Prof. Hahn danke ich sehr herzlich für das Interesse an meiner Arbeit und dafür, dass er sich als Dissertationsgutachter zur Verfügung gestellt hat.

Zusammenfassung

Die Kontrolle von Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Zellen ist im lebenden Organismus streng reguliert. Eine Fehlregulation von wichtigen Faktoren im hierarchischen System der Blutzellentwicklung kann zur Entstehung einer Leukämie führen. Die Erforschung der grundlegenden Prozesse der Pathogenese ist hierbei eine wichtige Voraussetzung für das Verständnis der Erkrankung sowie für die Entwicklung therapeutischer Strategien.

Ein häufig von Aberrationen betroffener Transkriptionsfaktor ist RUNX1, welcher in der embryonalen Hämatopoese eine essentielle und im adulten Stadium eine noch nicht vollständige erforschte, aber für die Differenzierung einzelner Reifungslinien entscheidende Rolle einnimmt. Neben chromosomalen Translokationen sind auch mono- und biallelische Mutationen des *RUNX1*-Gens beschrieben, welche mit einer hohen Inzidenz von 24% bei einer AML mit minimalen Zeichen der Differenzierung (Subtyp M0) auftreten. Diese Mutationen können zu 1) einem Nullallel, 2) einem Protein mit fehlender Transaktivierungsfunktion oder 3) einer DNA-Bindungsmutante (DBM) führen. Die zuletzt genannte Mutationsform ist die in AML-Patienten am häufigsten beschriebene und soll dominant-negativ agieren. Intragenetische *RUNX1*-Mutationen sind mit einer Frequenz von bis zu 65% mit einer Mutation von FLT3 assoziiert. Dabei handelt es sich um eine Rezeptortyrosinkinase, welche bei der Differenzierung, Zellteilung sowie dem Überleben der hämatopoetischen Zellen von Bedeutung ist.

In vorherigen Analysen konnte gezeigt werden, dass die funktionelle Inaktivierung von *Runx1* zum Auftreten eines myeloproliferativen Phänotyps *in vivo* führte und ebenso wie eine ectrope Expression einer RUNX1-DBM myeloiden Vorläuferzellen die Kapazität zur Selbsterneuerung *in vitro* vermittelte. Ausgehend davon kann vermutet werden, dass diese Mutationen bestimmte Funktionen aufweisen, die eine Ansammlung weiterer Mutationen, wie z.B. FLT3-ITD, und die Entstehung einer Leukämie ermöglichen. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden im Rahmen dieser Arbeit die konstitutiv aktivierte Tyrosinkinase FLT3-ITD allein oder im Kombination mit einer RUNX1-DBM in hämatopoetischen Vorläuferzellen des Typs *Runx1^{fl/fl}-Mx1Cre* sowie im heterozygoten und Wildtyphintergrund exprimiert.

Die ectrope Expression von FLT3-ITD führte vorwiegend zur Entwicklung eines Thymoms, bei welchem sich eine Runx1-Expression als vorteilhaft erwies und auf eine Selektion Runx1-exprimierender T-Zellen aufgrund der Notwendigkeit dieses Transkriptionsfaktors für die T-Zellentwicklung zurückzuführen war. Die Kombination aus *Runx1*-Inaktivierung und FLT3-ITD führte hingegen zur Entwicklung einer Myeloproliferation, was für einen kooperierenden, nicht aber synergistischen Effekt

spricht. Durch das Zusammenwirken der konstitutiv aktivierten Tyrosinkinase und der RUNX1-DBM in *Runx1*-defizienten Zellen kam es zum Auftreten einer myeloiden Neoplasie, welche durch eine linksverschobene Myelopoese mit einem erhöhten Blastenanteil, einer Hepatosplenomegalie und massiven Infiltration der peripheren Organe gekennzeichnet war. Retransplantations- und Repopulierungsversuche *in vitro* ließen darauf schließen, dass diese monoklonale Erkrankung nur eine geringe Anzahl an Zellen mit einer Selbsterneuerungsfähigkeit hervorbrachte. Diese Ergebnisse deuten einen Funktionsgewinn und nicht eine dominant-negative Wirkungsweise der RUNX1-DBM an, deren Expression mit einer Inaktivierung von *Runx1* bei der Progression der myeloiden Erkrankung einherging. Dies unterstreicht die Bedeutung von biallelischen Mutationen in akuten Leukämien.

Summary

The control of cell proliferation and differentiation in hematopoiesis is tightly regulated. Disruption of this control, which is mediated by several factors and at multiple levels, can lead to leukemogenesis. The analysis and understanding of the basic processes of pathogenesis are important to develop new therapeutic strategies.

The disruption of the *RUNX1* gene is one of the most common aberrations found in AML. This transcription factor is essential during embryonic hematopoiesis, whereas its role in definitive hematopoiesis is not totally explored. In addition to chromosomal translocations involving the *RUNX1* gene, mono- and biallelic intragenetic mutations are found at high incidence (24%) in AML with minimal differentiation (subtype M0). These mutations can generate: 1) a null allele, 2) a protein lacking transactivating function, or 3) a DNA-binding mutant (DBM). The latter type of mutation is the most common in AML, and it has been hypothesized that these mutants act in a dominant negative manner. *RUNX1* intragenetic mutations are associated with a high frequency (up to 65%) of mutations of *FLT3*, a receptor tyrosine kinase that contributes to the differentiation, proliferation and survival of hematopoietic cells.

Earlier studies have shown that both functional inactivation of the *Runx1* gene or ecotropic RUNX1-DBM expression led to increased self-renewal capacity of myeloid progenitors *in vitro*, but only the former caused expansion of the myeloid compartment *in vivo*, suggesting that the mutations have distinct functions that permit the accumulation of secondary mutations (e.g. *FLT3* activation) and the outgrowth of an overt leukemia. In studies to test this hypothesis, constitutively active *FLT3*-ITD, alone or together with a RUNX1-DBM, was introduced into hematopoietic progenitors of *Runx1^{fl/fl}-Mx1Cre*, heterozygous or wild type mice.

Ecotropic expression of *FLT3*-ITD alone primarily induced a T-cell thymoma, in which the *Runx1* expression seemed to be advantageous for disease development. The retention of a functional *Runx1* allele is most likely due to selective pressure for T-cells expressing *Runx1*, reflecting its importance in T-cell development. In combination with *Runx1* inactivation, *FLT3*-ITD also led to a myeloproliferative phenotype, suggesting a cooperative but not synergistic action of these two events. In a *Runx1* wild type background, coexpression of RUNX1-DBM was not able to shift the disease spectrum to a myeloid disorder. But together, *FLT3*-ITD, *Runx1* deficiency and RUNX1-DBM, led to a rapid and fatal myeloid neoplasia with left-shifted myelopoiesis and increased numbers of blasts, hepatosplenomegaly and massive infiltration of the periphery by myeloid progenitors. Although this monoclonal disease was retransplantable, the frequency of repopulating cells seemed to be low. These results support a gain-of-function – and not a dominant negative function – for RUNX1-DBM, which cooperates

with loss of wild type Runx1 in disease progression. Taken together, they underline the importance of the biallelic mutations found in acute leukemia.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Blutbildung der Säugetiere	1
1.1.1	Embryonales Blutsystem	2
1.1.2	Adulte Hämatopoese	3
1.1.2.1	Myeloide Zellentwicklung	5
1.1.2.2	Lymphoide Zellentwicklung	6
1.2	Regulation der Hämatopoese durch Transkriptionsfaktoren und Zytokine	9
1.3	Leukämie	13
1.3.1	Akute Leukämien	13
1.3.2	Entstehung einer Leukämie	16
1.3.2.1	FLT3 in der Hämatopoese	18
1.3.2.2	FLT3-Mutationen in Leukämien	21
1.3.2.3	Bedeutung von RUNX1 in der Hämatopoese	22
1.3.2.4	RUNX1-Mutationen in Leukämien	25
1.4	Fragestellung	35
2	Material und Methoden	37
2.1	Verbrauchsmaterialien und Chemikalien	37
2.2	Restriktionsenzyme	37
2.3	Nukleinsäuren	37
2.4	Bakterienstämme und Kulturmedien	38
2.5	Zellen und Kulturmedien	39
2.6	Versuchstiere	40
2.7	Puffer- und Stammlösungen	41
2.8	Antikörper für die Durchflusszytometrie	42
2.9	Software	42
2.10	Zellbiologische Methoden	43
2.11	Tierexperimentelle Methoden	46
2.12	Histologische Methoden	53
2.13	Molekularbiologische Methoden	55
3	Ergebnisse	59
3.1	Allgemeiner Ablauf der Experimente	59
3.1.1	Spendermäuse	60
3.1.2	Gamma-retrovirale Vektoren	60
3.1.3	Transduktion der hämatopoetischen Vorläuferzellen	61
3.1.4	Transplantation der transduzierten Vorläuferzellen	62
3.1.5	Induktion der Cre-Rekombinaseaktivität <i>in vivo</i>	63
3.1.6	Beobachtung der Tiere auf Krankheitssymptome	65
3.2	Untersuchung des Zusammenwirkens von FLT3-ITD und der <i>Runx1</i> -Inaktivierung <i>in vivo</i>	66
3.2.1	Lymphoide Erkrankungen induziert durch FLT3-ITD bei gleichzeitiger <i>Runx1</i> -Expression	69
3.2.1.1	Entstehung des Thymoms	69
3.2.1.2	Entstehung einer B-Zellerkrankung	75
3.2.2	Myeloide Erkrankungen induziert durch FLT3-ITD bei gleichzeitiger <i>Runx1</i> -Inaktivierung	77
3.2.2.1	Alleinige Wirkung der <i>Runx1</i> -Inaktivierung <i>in vivo</i>	77
3.2.2.2	Auftreten einer beschleunigten Myeloproliferation bei einer Expression von FLT3-ITD	80
3.2.2.3	Entwicklung einer monozytären Neoplasie im heterozygoten Knochenmarkhintergrund	84

3.3 Untersuchung des Zusammenwirkens von FLT3-ITD und RUNX1-DBM bei gleichzeitiger <i>Runx1</i> -Inaktivierung.....	87
3.3.1 Entwicklung einer myeloiden Neoplasie	89
3.3.2 Erkrankungen des lymphoiden Kompartiments	95
3.4 Einfluss der RUNX1-DNA-Bindungsmutante auf die Myelopoese <i>in vivo</i>	97
3.5 Retransplantierbarkeit der beschriebenen Erkrankungen.....	101
3.5.1 Retransplantation der myeloiden Neoplasie.....	101
3.5.2 Retransplantation des Thymoms	104
3.6 Analyse der Selbsterneuerungskapazität der neoplastischen Zellen mittels Methylcelluloseklonierung.....	107
3.7 Untersuchung der Klonalität der entstandenen Erkrankungen.....	111
4 Diskussion	115
4.1 Etablierung eines Mausmodells	115
4.1.1 Spendermäuse und Aktivierung der Cre-Rekombinase <i>in vivo</i>	116
4.1.2 Retrovirale Vektoren und Transduktionsraten	117
4.1.3 Transplantation der transduzierten Vorläuferzellen.....	118
4.2 Induktion einer T-Zellerkrankung durch FLT3-ITD bei gleichzeitiger <i>Runx1</i> -Expression	119
4.3 Auftreten einer beschleunigten Myeloproliferation bei der Kooperation von FLT3-ITD und einer <i>Runx1</i> -Defizienz	123
4.4 Entwicklung einer myeloiden Neoplasie durch eine synergistische Wirkung von FLT3-ITD, RUNX1-DBM und <i>Runx1</i> -Defizienz.....	125
4.5 Bedeutung von RUNX1-Mutationen und RUNX1-DNA-Bindungsmutanten in akuten Leukämien.....	129
4.6 Wie passen die Ergebnisse dieser Arbeit in das vorgestellte Modell zur Leukämieentstehung?.....	132
4.7 Bedeutung der Ergebnisse dieser Arbeit	135
5 Literatur	138
6 Anhang	156

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/v)	Masse pro Volumen
°C	Grad Celsius
µL	Mikroliter
1x	einfach
AGM-Region	Aorta/Gonaden/Mesonephros-Region
ALL	akute lymphoide Leukämie
AML	akute myeloide Leukämie
APC	Allophycocyanin
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
BZR	B-Zellrezeptor
bzw.	beziehungsweise
C/EBP	<i>CCAAT-Enhancer Binding Protein</i>
CBF	<i>Core Binding Factor</i>
CBFβ-SMMHC	<i>Core Binding Factor beta - Smooth Muscle Myosin Heavy Chain</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	komplementäre DNA
CLP	<i>Common Lymphoid Progenitor</i>
cm	Zentimeter
CMP	<i>Common Myeloid Progenitor</i>
cpm	<i>Counts per minute</i>
Cre	Cre-Rekombinase
C-terminal	Carboxy-terminal
d.h.	das heißt
dCTP	2'-Desoxycytosin-5'-triphosphat
DMEM	<i>Dulbeccos Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	doppelt-negativ
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i>
DP	doppelt-positiv
EBF	<i>Early B-Cell Factor</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ETO	<i>Eight Twenty One Oncogene</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FLT3	<i>FMS-like Tyrosine Kinase 3</i>
FPD/AML	<i>Familial Platelet Disorder with predisposition to AML</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
GMP	<i>Granulocytic/Monocytic Progenitor</i>
h	Stunde
HCl	Chlorwasserstoff (Salzsäure)
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HSC	<i>Hematopoietic Stem Cells</i>
IL	Interleukin
IMDM	<i>Iscoves Modified Dulbeccos Medium</i>
IRF8	<i>Interferon-Regulatory Factor 8</i>
ITD	interne Tandem-Duplikation

kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
L	Liter
LB	Luria-Bertami
M	mol pro L
M-CSF	<i>Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
min	Minute
mL	Milliliter
MLL	<i>Mixed Lineage Leukemia</i>
Mx1	<i>Myxovirus (influenza virus) Resistance 1</i>
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
n.b.	nicht bestimmt
ng	Nanogramm
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
nm	Nanometer
N-terminal	Amino-terminal
OD	optische Dichte
PAS	<i>Periodic Acid-Schiff reaction</i>
PAX5	<i>Paired Box Gene 5</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PE	Phycoerythrin
pH	pH-Wert
pIpC	<i>polyinosinic:polycytidylic acid</i>
PML	akute Promyelozytenleukämie
RAR α	<i>Retinoic Acid Receptor α</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RUNX1	<i>Runt-related Transcription Factor 1</i>
RUNX1-DBM	RUNX1-DNA-Bindungsmutante
SDF-1	<i>Stromal cell-Derived Factor 1</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
sec	Sekunde
SFEM	<i>Serum Free Expansion Medium</i>
s.o.	siehe oben
t(8;21)	Translokation die Chromosomen 8 und 21 betreffend
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEC	<i>Thymic Epithelial Cells</i>
TKD	Tyrosinkinasedomäne (FLT3-TKD = Bezeichnung der Mutationsform)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TZR	T-Zellrezeptor
u.a.	unter anderem
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
V	Volt
WHO	<i>World Health Organization</i>
x g	-fache Erdbeschleunigung
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

1 Einleitung

Die Kontrolle von Wachstum und Differenzierung einer einzelnen Zelle spielt eine wichtige Rolle im lebenden Organismus. Eine Störung dieser Regulation kann zu einem Ungleichgewicht bis hin zu einer krankhaften Veränderung und somit zu der ungehemmten Expansion dieser Zelle führen. Bei einer Fehlregulation im hämatopoetischen System kann es dadurch zur Entstehung einer Leukämie kommen.

1.1 Blutbildung der Säugetiere

Die Hämatopoese bezeichnet den hierarchischen und komplexen Prozess der Bildung der Blutzellen aus multipotenten Stammzellen. Diese Blutzellen bilden den korpuskulären Anteil des Blutes als flüssiges Organ, welches das Blutplasma als zweiten Hauptbestandteil besitzt. Die Funktion des Blutes besteht in erster Linie im Transport von Sauerstoff und Kohlendioxid, Elektrolyten, Wasser, Wärme sowie Hormonen und Nährstoffen. Ferner ist das Blut für die Abwehr von Krankheitserregern sowie für die Blutstillung und Gerinnung verantwortlich.

Im peripheren Blut unterscheidet man die für den Sauerstoff- und Kohlendioxidtransport verantwortlichen roten Blutkörperchen (Erythrozyten), die für die Bildung des hämostatischen Pfropfes und für der Aktivierung der plasmatischen Gerinnung notwendigen Blutplättchen (Thrombozyten) sowie die weißen Blutkörperchen (Leukozyten), welche noch weiter unterteilt werden. Leukozyten sind im Allgemeinen durch die Eigenschaften der Phagozytose, Migration, Diapedese und Chemotaxis charakterisiert, womit ihre wichtigsten Aufgaben in der Abwehr von Erregern sowie in der Ausbildung und im Aufrechterhalten der Immunabwehr bestehen. Bei den Granulozyten unterscheidet man neutrophile und eosinophile, welche phagozytotisch aktiv sind, sowie basophile Zellen. Letztere sind für die Aufnahme und den Transport von Histamin sowie Heparin verantwortlich. Lymphozyten werden in B-, T- und Natürliche Killer- (NK-) Zellen unterteilt. Die wichtige Aufgabe der B-Zellen besteht in der Produktion von Antikörpern, welche sich spezifisch an Krankheitserreger binden und diese dadurch markieren. Nach dem Erkennen dieser Markierung von T- und NK-Zellen wird der Erreger oder die erkrankte Zelle getötet.

Die Entwicklung der Blutzellen erfolgt im roten Knochenmark, wobei sich die weitere Entwicklung der Lymphozyten außerdem noch auf Milz, Lymphknoten und vereinzelt auf die Lymphfollikel des Knochenmarks erstreckt. Die reifen Blutzellen haben eine relativ beschränkte Lebensdauer, so dass die Aufrechterhaltung der korrekten Blutzusammensetzung die zentrale Aufgabe der adulten Hämatopoese ist. Der Abbau der Blutzellen erfolgt im retikulo-histiozytären bzw. retikulo-endothelialen System, d.h. vorwiegend in Milz, Leber und Knochenmark.

1.1.1 Embryonales Blutssystem

Während der embryonalen Phase durchläuft das Blut mehrere Stufen der Entwicklung an verschiedenen Orten des Embryos (Tavian und Peault, 2005; Mikkola und Orkin, 2006). Zu Beginn der embryonalen Entwicklung wandern wenige Tage nach Ausbildung des Dottersacks spezialisierte mesodermale Vorläuferzellen (Hämangioblasten) in diesen aus und bilden sogenannte Blutinseln. Diese Vorläuferzellen reifen über die hämatopoetischen Stammzellen und Angioblasten vorwiegend zu den für den Sauerstofftransport verantwortlichen Erythrozyten und den Kapillarbildenden Endothelzellen aus (Moore, 2002). Während der Entwicklung des Herzens sowie der großen Arterien und Venen wandert der Ort der Blutbildung in den Embryo hinein und siedelt sich in der Region um die Aorta an. Diese als AGM-Region (Aorta/Gonaden/Mesonephros-Region) bezeichneter Bereich beinhaltet eine Vielzahl von Zellen, die zu Gonaden, Nieren und Teilen der Lunge ausreifen. In diesem heterogenen Zellverbund der AGM-Region gebildete Zellen können nicht nur zu Erythrozyten, sondern auch zu den meisten anderen Blutzellen ausreifen. Diese Region wurde daher als Entstehungsort der ersten hämatopoetischen Stammzellen beschrieben, welche das gesamte Blutssystem aufrechterhalten können (Muller et al., 1994; Cumano et al., 1996; Medvinsky und Dzierzak, 1996; Godin und Cumano, 2002; de Bruijn et al., 2002; Robin et al., 2003). Zusätzlich kommt es zur Bildung von Stammzellen in den umbilicalen und vitellinen Arterien, welche aber auf die Entwicklung von myeloiden und erythroiden Zellen beschränkt sind (de Bruijn et al., 2000), sowie direkt aus endothelialen Zellen in der ventralen Aorta (Boisett et al., 2010). Bei der aktiven Auswanderung dieser Blutstammzellen in die ausgebildete fötale Leber bleibt die Frage offen, ob nicht nur Stammzellen der AGM-Region, sondern auch diejenigen des Dottersacks in die Leber einwandern und ebenfalls zur Hämatopoese beitragen (Hirsch et al., 1996; Samokhvalov et al., 2007). Zusammen mit der später einsetzenden Blutbildung und Ausreifung in Milz und Thymus erfolgt die erste vollständige Ausbildung aller reifen Blutzellen, die auch im adulten Organismus zu finden sind. Im letzten Schritt der embryonalen Blutbildung wandern die hämatopoetischen Stammzellen aus der Leber in das Knochenmark, welches den Ort der adulten Hämatopoese darstellt (Akashi und Weissman, 2001; McGrath und Palis, 2005; Orkin und Zon, 2008).

1.1.2 Adulte Hämatopoese

Die adulte Hämatopoese stellt die gesunde, physiologisch auftretende und während der gesamten Lebensdauer des Organismus erfolgende Bildung der Blutzellen dar. Diese findet in einer streng regulierten und schrittweisen Abfolge statt, so dass in einem gesunden Organismus nur die erforderliche Menge an Blutzellen gebildet wird, welche sich aus dem Verlust durch Apoptose oder Abbau in der Peripherie ergibt. Die Regulation dieses Prozesses wird durch ein Zusammenspiel der Zelltyp-spezifischen Expression von Transkriptionsfaktoren und extrazellulären Signalen, wie Zell-Zell-Interaktionen und Wachstumsfaktoren oder anderen Informations-übermittelnden Molekülen, die an entsprechende Rezeptoren auf der Oberfläche von Zellen binden, gewährleistet.

Die Blutbildung findet im Knochenmark der großen Knochen statt. Die dort befindlichen Stammzellen besitzen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und zur Differenzierung in jede der verschiedenen Blutzellen (sogenannte Multipotenz) (Weissman und Shizuru, 2008). Im Zustand der Homöostase befinden sich die meisten hämatopoetischen Stammzellen in einer ruhenden Phase und teilen sich nur selten zur Erhaltung des Reservoirs und der differenzierten Zellen (Cheshier et al., 1999). Die Stammzellen liegen in spezialisierten Bereichen, den sogenannten Nischen vor, wobei zwei Bereiche unterschieden werden. Innerhalb der Bindegewebshaut, welche den Knochen auskleidet und vom inneren Markbereich abgrenzt, liegen Osteoblasten, die nach Mineralisierung für die Knochenbildung verantwortlich sind und wie die im Bereich der Blutkapillaren vorliegenden Epithelzellen der Kapillarwände für die Anhaftung der Stammzellen wichtig sind. Die Wechselwirkung zwischen den hämatopoetischen und denjenigen Zellen, welche innerhalb der Nische liegen, ist für die Erhaltung und Proliferation des Stammzellreservoirs von großer Bedeutung (Orkin und Zon, 2008). Hierbei ist besonders die Interaktion zwischen SDF-1 (*Stromal cell-Derived Factor 1*), der von Zellen der Nischen gebildet und sezerniert wird, und dessen Rezeptor CXCR4 (*CXC chemokine receptor 4*) auf den hämatopoetischen Stammzellen hervorzuheben (Huang et al., 2007). In Abbildung 1.1 ist das hierarchische Schema der Hämatopoese ausgehend von der Stammzelle darstellt. Bei dem Vorgang der Differenzierung über mehrere Zwischenschritte entstehen die verschiedenen Arten an reifen Blutzellen.

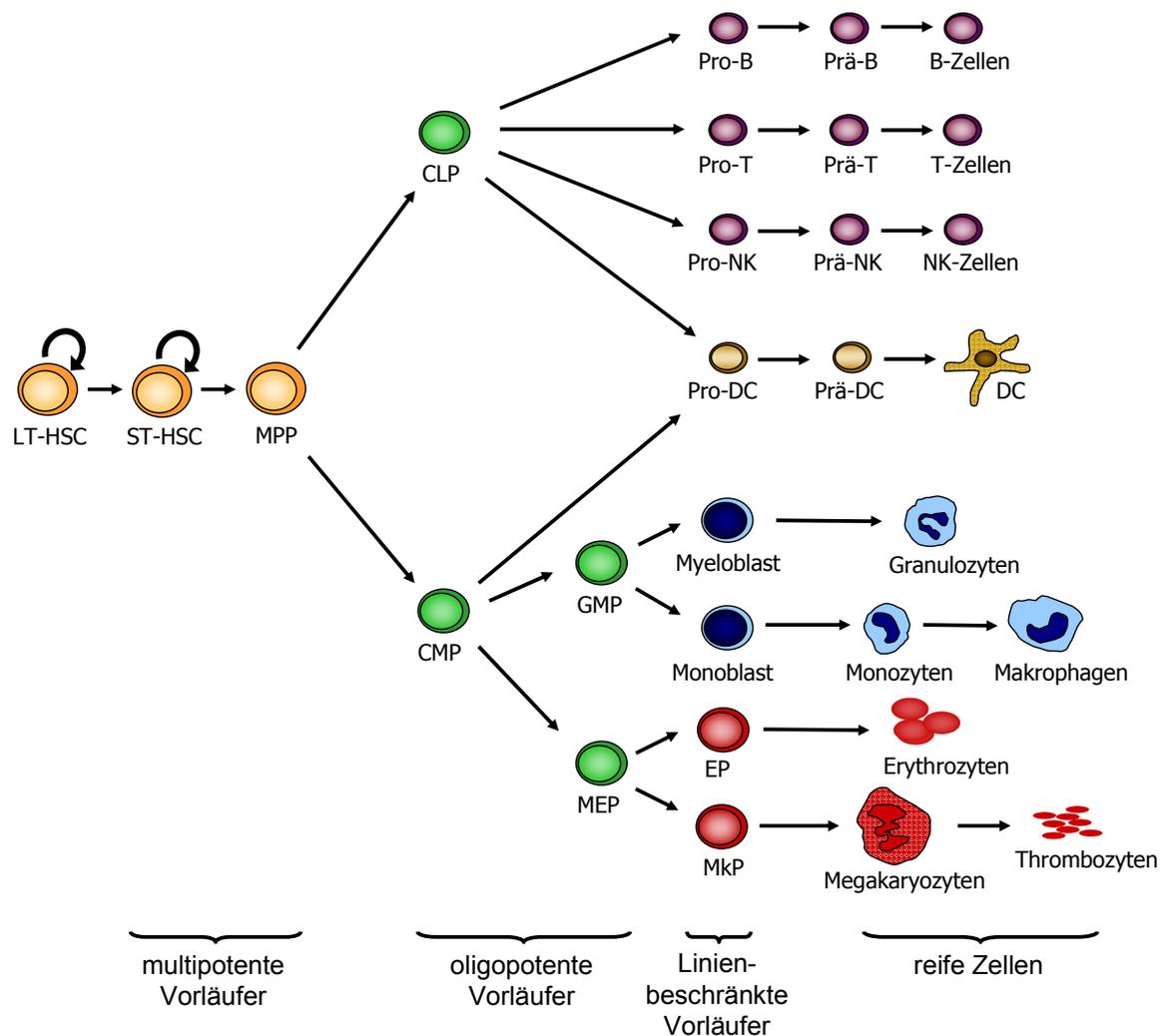


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Hämatopoese

Die Aufrechterhaltung der zellulären Blutzusammensetzung erfolgt durch die hämatopoetischen Stammzellen. Über mehrere Reifungsstufen entstehen die ausdifferenzierten Zellen, welche in der Peripherie des Organismus zu finden sind.

(LT-HSC = hämatopoetische Langzeit-Stammzelle; ST-HSC = Kurzzeit-Stammzelle; CMP = gemeinsame myeloide Vorläuferzelle; CLP = gemeinsame lymphoide Vorläuferzelle; Pro/Prä-B, -T, -NK, -DC = Vorläuferzelle der jeweiligen reifen Zellen; GMP = Granulozyten/Monozyten-Vorläuferzelle; MEP = Megakaryozyten/Erythrozyten-Vorläuferzelle; MkP = Megakaryozyten-Vorläuferzelle; EP = Erythrozyten-Vorläuferzelle)

(modifiziert nach Weissman und Shizuru, 2008)

Anhand von Retransplantationsversuchen im Maussystem können zwei verschiedene Typen an hämatopoetischen Stammzellen charakterisiert werden. Man unterscheidet die Langzeit-Stammzellen (LT-HSC, *Long Term-Hematopoietic Stem Cells*), welche in der Lage sind, sich selbst zu erneuern und das hämatopoetische System in Mäusen nach einer letalen Bestrahlung vollständig zu rekonstituieren, sowie die Kurzzeit-Stammzellen (ST-HSC, *Short Term-Hematopoietic Stem Cells*), bei denen die Fähigkeit der Rekonstruktion und des Selbsterhalts zeitlich begrenzt bzw. nur noch eingeschränkt vorhanden ist (Morrison und Weissman, 1994). Die Differenzierung der LT-HSC über die ST-HSC erfolgt hin zu den multipotenten Vorläuferzellen (MPP, *Multi-*

Potent Progenitor), deren Fähigkeit zur Selbsterneuerung stark eingeschränkt ist (Morrison et al., 1997). Mit jedem Schritt der Differenzierung in der normalen Hämatopoese wird die einzelne Zelle in ihrem Entwicklungspotenzial immer stärker begrenzt und verliert einen Teil ihrer Multipotenz durch irreversible Reifungsvorgänge, was sich in einer stark veränderten, für den jeweiligen Zelltyp spezifischen Genexpression zeigt (Miyamoto et al., 2002). Aus den MPP bilden sich einerseits die gemeinsamen myeloiden Vorläuferzellen (CMP, *Common Myeloid Progenitor*) und andererseits die gemeinsamen lymphoiden Vorläuferzellen (CLP, *Common Lymphoid Progenitor*) (Kondo et al., 1997; Akashi et al., 2000). Das Differenzierungspotential dieser Vorläuferzellen ist bereits stark auf die jeweiligen Linien begrenzt (Weissman 2000). Aus den CMP entwickeln sich Vorläuferzellen der Megakaryozyten und Erythrozyten (MEP, *Megakaryocytic/Erythroid Progenitor*), welche in der weiteren Differenzierung zu Megakaryozyten, welche die Thrombozyten als Bruchstücke ihres Kerns freisetzen, und Erythrozyten ausreifen (Nakorn et al., 2003; Forsberg et al., 2006; Pronk et al., 2007). Ferner entstehen Vorläuferzellen der Granulozyten und Monozyten (GMP, *Granulocytic/Monocytic Progenitor*), welche wie zuvor erwähnt bei der unspezifischen bzw. angeborenen Immunantwort eine große Rolle spielen. In der lymphoiden Linie entwickeln sich aus den CLP über einige unreife Zwischenstadien (Pro- und Prä-Form) B- und T-Lymphozyten sowie NK-Zellen, welche für die spezifische Immunantwort notwendig sind (Galy et al., 1995; Karsunky et al., 2008). Sowohl aus CMP als auch CLP können sich dendritische Zellen (DC) entwickeln, welche zu den Antigen-präsentierenden Zellen des Immunsystems zählen und mit B-, T- sowie NK-Zellen interagieren (Lucas et al., 2007; Weissman und Shizuru, 2008). Das dargestellte hierarchische Modell der Hämatopoese entspricht der gängigen Lehrmeinung (Passegue et al., 2003), wobei aber immer neue Erkenntnisse durch die Erforschung des Blutsystems erhalten werden, die zu Veränderungen des hier dargestellten Grundsystems führen (Allman et al., 2003; Adolfsson et al., 2005; Bhandoola und Sambandam, 2006; Weissman und Shizuru, 2008; Kawamoto und Katsura, 2009; Geissmann et al., 2010).

1.1.2.1 Myeloide Zellentwicklung

Die myeloide Zellreifung umfasst die Entwicklung der Granulozyten sowie der Makrophagen über die Zwischenstufe der Monozyten. Ferner gehen dendritische Zellen, welche z.T. der lymphoiden und der myeloiden Zellreihe zugerechnet werden, aus der gemeinsamen Vorläuferzelle hervor. Auf die Entwicklung dieser Zellen sowie auf die Erythro- und Megakaryopoese soll in diesem Zusammenhang nicht näher eingegangen werden.

Die Granulopoese findet im Knochenmark statt und verläuft ausgehend von der GMP über den Myeloblast, der keine Granula besitzt, und den Promyelozyten als größte Zelle dieser Entwicklungsreihe, ausgestattet mit relativ grober Granula, hin zu dem Myelozyten. In dieser Reifungsstufe erfolgt die Unterscheidung zwischen Zellen mit neutrophiler, eosinophiler und basophiler Granula, welche anschließend ohne Mitosen über die Stufen des Metamyelozyten, stab- und segmentkernigen Granulozyten ausreifen, wobei es zur Verkleinerung und Verdichtung sowie zu Segment-artigen Abschnürungen des Kerns kommt. Der größte Teil der Granulozyten verbleibt als Reserve im Knochenmark. Die Zellen, welche in die Peripherie freigesetzt werden, können die zuvor genannten Funktionen ausüben, haben hierbei aber nur eine relativ kurze Gesamtlebensdauer von etwa zehn Tagen.

Die Entwicklung der monozytären Zelllinie erfolgt ebenfalls im Knochenmark ausgehend von der GMP über Monoblast und Promonozyten zum Monozyten, der für 20-40 Stunden in das periphere Blut ausgeschleust wird. Nach der Auswanderung in das Gewebe reifen Monozyten zu Gewebsmakrophagen heran, die ihre Aufgabe der Makrophagie und Antigenpräsentation aufnehmen, wobei diese Zellen eine Lebensdauer von mehreren Monaten oder Jahren haben können.

1.1.2.2 Lymphoide Zellentwicklung

Bei Menschen und Mäusen erfolgt der Differenzierungsvorgang der T- und B-Zellen in einer fest geregelten Reihenfolge, wobei Antigenrezeptorgene entsprechend umgeordnet und ihre Proteine exprimiert werden. Ferner ändert sich die Expression anderer Proteine auf der Zelloberfläche sowie innerhalb der Zelle, die mit Hilfe von spezifischen Antikörpern in der Durchflusszytometrie nachgewiesen werden können. Für eine erfolgreiche Entwicklung von reifen B- und T-Zellen im Knochenmark bzw. Thymus sind spezialisierte Stromazellen erforderlich, die über sezernierte Wachstumsfaktoren sowie Zelloberflächenmarker mit den Lymphozyten interagieren. Die Antigenpezifität eines Lymphozyten wird durch die Kombination der V-, D- und J-Gensegmente festgelegt, wobei die umgeordneten V-Gene die variablen Regionen des Antigenrezeptors kodieren. Nach der Umlagerung von zwei verschiedenen Genloci entstehen die schweren und leichten Immunglobulinketten bei den B-Zellen sowie die α - und β - bzw. γ - und δ -Ketten des T-Zellrezeptors (TZR). Wenn die Gene hierbei nicht erfolgreich umgeordnet wurden, gehen diese Lymphozyten durch Apoptose zugrunde. Durch die Rekombination der Immunglobulinketten wird die große Antikörpervielfalt gewährleistet, welche für die spezifische Immunabwehr von entscheidender Bedeutung ist.

T-Zellentwicklung

Die Entwicklung der für die spezifische Immunabwehr erforderlichen T-Lymphozyten erfolgt nach der Auswanderung früher lymphoider Vorläuferzellen aus dem Knochenmark im Thymus. Hierbei kommt es zu einer wechselseitigen Interaktion mit den Stromazellen, welche für die Entwicklung und Selektion der T-Zellen sowie auch für die architektonische Ausbildung des Thymus eine entscheidende Rolle spielen (Shores et al., 1991; van Ewijk et al., 1994). Nur rund 1-3% der T-Zellen überleben die Reifung im Thymus und werden anschließend aus diesem ausgeschleust, um ihren Aufgaben im Körper nachzukommen (Scollay et al., 1980; Egerton et al., 1990; Goldrath und Bevan 1999).

Die Besiedlung des Thymus mit lymphoiden Vorläuferzellen aus dem Knochenmark erfolgt in Mäusen am Tag 11.5 der embryonalen Entwicklung, beim Menschen in der achten Woche der Schwangerschaft (Owen und Ritter, 1969; Haynes und Heinly, 1995), wobei verschiedene Chemokine beteiligt zu sein scheinen (Bleul und Boehm, 2000; Wurbel et al., 2001; Ara et al., 2003; Liu et al., 2005). Dieser Eintritt der Zellen in den Thymus ist weder in der Embryonalphase noch später im adulten Dasein ein kontinuierlicher Prozess, sondern findet in Intervallen statt (Le Douarin und Jotereau, 1975; Havran und Allison, 1988; Fossa et al., 2001).

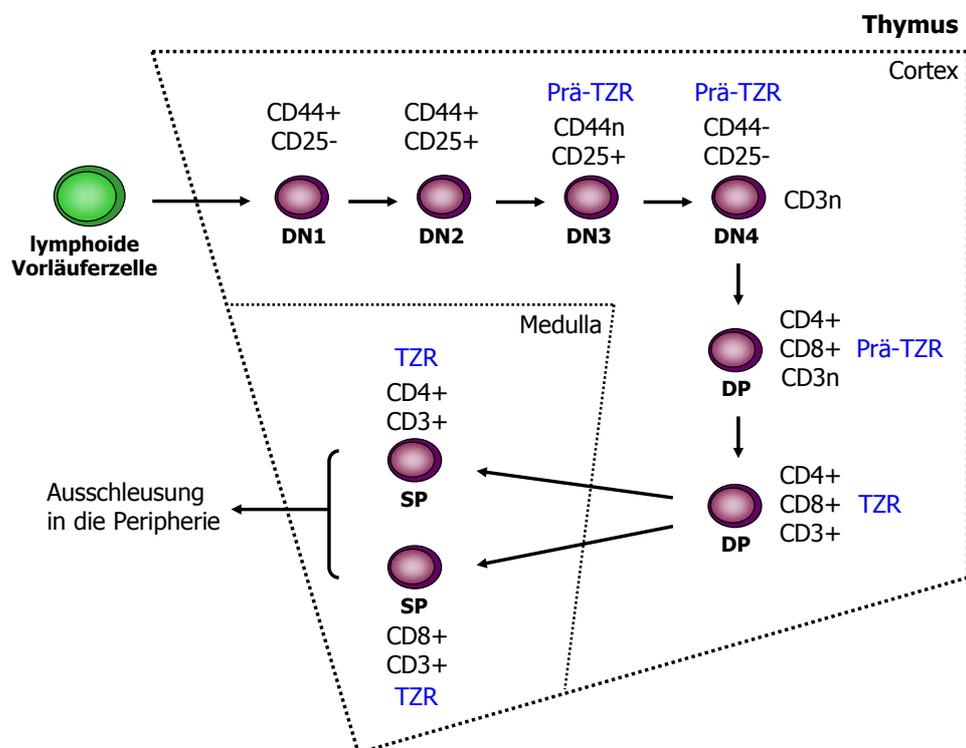


Abbildung 1.2: Übersicht zur T-Zellentwicklung im Thymus

Aus dem Knochenmark stammenden Vorläuferzellen migrieren in den Thymus. Die im Cortex befindlichen frühen T-Zellen weisen keine Expression des TZR, von CD4 oder CD8 auf und werden daher als doppelt-negativ (DN) bezeichnet, wobei eine weitere Unterteilung durch den Nachweis von CD44 und CD25 erfolgen kann. Beim Durchlaufen der Differenzierungsstadien DN2 bis DN4 ist der Prä-TZR nachweisbar. Bei einer erfolgreichen Signaltransduktion des

Prä-TZR kann der Übergang in das Stadium der doppelt-positiven (DP) T-Zellen stattfinden, in welchem die finale Ausbildung des TZR erfolgt. Durch die Interaktion mit epithelialen Zellen des Cortex wird die Selektion der DP-T-Zellen vermittelt. An diesem Punkt erfolgt ferner die Differenzierung in CD4- oder CD8-positive (einfach-positive, SP) Zellen, die anschließend aus der Medulla in die Peripherie exportiert werden.

(n = niedrige Expression)

(modifiziert nach Germain, 2002; Takahama, 2006)

Die Entwicklung lymphoider Vorläuferzellen zu reifen T-Zellen, wie sie in Abbildung 1.2 dargestellt ist, verläuft zunächst über verschiedene Stadien, von denen die ersten mittels der Expression von CD25 und CD44 identifiziert werden können, bis zu dem Kontrollpunkt, an welchem die Zellen CD25 exprimieren, aber für CD44 sowie für CD4 und CD8 negativ sind (*double-negative 3*, DN3). An diesem Punkt wird das erfolgreiche Umlagern der Gene für die β -Kette des TZR überprüft (Pearse et al., 1989; Shinkai et al., 1992; Godfrey et al., 1993; Zuniga-Pflücker, 2004). Die notwendige Wechselwirkung der T-Zellen mit den epithelialen Zellen des Thymus (*Thymic Epithelial Cells*, TEC) zeigt sich u.a. darin, dass die TEC in einem unreifen Stadium verharren, wenn in Mäusen die T-Zellentwicklung über das DN1-Stadium hinaus blockiert ist (Klug et al., 1998). Das Erscheinen des Prä-TZR-Komplexes auf der Zelloberfläche, bestehend aus der β -Kette sowie einer Prä- α -Kette, stellt das Signal für eine weiterführende Differenzierung zum doppelt-positiven (*double-positive*, DP) Stadium mit der Expression der α - und β -Kette des TZR dar (Raulet et al., 1985; von Boehmer und Fehling, 1997; Irving et al., 1998). An diesem Punkt der Entwicklung erfolgt die Selektion der T-Zellen, die mittels ihres TZR mit den Peptid-beladenen MHC- (*Major Histocompatibility Complex*) Liganden der Stromazellen, wie TEC, und dendritischen Zellen im Cortex des Thymus interagieren (Bouso et al., 2002). Nur in Folge einer schwachen Interaktion werden die T-Zellen der weiteren Differenzierung in einfach-positive (*single-positive*, SP) Zellen zugeführt, was als positive Selektion bezeichnet wird. Diese Zellen dienen in der Peripherie zur Erkennung fremder Antigene, eine Reaktion auf körpereigene Antigene wird hierdurch verhindert. Denn ein hohes Maß an Interaktion endet in einer Deletion der betroffenen Zellen, wobei der programmierte Zelltod als Mittel zur negativen Selektion beschrieben wurde. Wie zuvor erwähnt, führt auch ein fehlendes Signal über den TZR zur Apoptose. Verschiedene mit dem Prä-TZR assoziierte Proteine (CD3/ ζ -Komplex) sind an dieser Signaltransduktion beteiligt (van Oers et al., 1995). Nur 3-5% der T-Zellen überstehen diese Phase der Kontrolle (Kisielow et al., 1988; Egerton et al., 1990; Jameson et al., 1995; Goldrath und Bevan 1999). Die entweder CD4- oder CD8-positiven Zellen verbleiben bis zu ihrer Ausschleusung weitere zwölf Tage in der Medulla des Thymus, wo sie einer weiteren Selektion zur Vermeidung einer Autoimmunität unterworfen sind (Egerton et al., 1990; Kyewski und Derbinski, 2004) und die Produktion regulatorischer T-Zellen seinen Ursprung zu haben scheint

(Sakaguchi, 2004; Fontenot et al., 2005; Watanabe et al., 2005). Die reifen T-Zellen werden anschließend aus dem Thymus über den Blut- und Lymphweg in die Peripherie entlassen (Ushiki, 1986; Kato, 1997).

B-Zellentwicklung

Die B-Zellentwicklung ist ein wichtiger Prozess für die spezifische Immunantwort, da der B-Zellrezeptor (BZR) die Prozessierung von Antigenen vermittelt, welche T-Zellen präsentiert werden, wodurch eine vollständige Aktivierung der B-Zellen ermöglicht wird (Niiron und Clark, 2002). Zu Beginn der Entwicklung zum vollständig funktionsfähigen BZR wird zunächst der Prä-BZR gebildet, der aus einer schweren Immunglobulinkette und einer für die leichte Kette als Ersatz gebildeten Kette besteht. Nach der Kontrolle der Funktionalität des Oberflächen-exprimierten Prä-BZR erfolgt eine klonale Expansion der Prä-B-Zellen, wobei die Gene des Locus der leichten Immunglobulinkette des BZR rekombiniert werden. Bei fehlender Funktionalität leitet die entsprechende Zellen den programmierten Zelltod ein (Holmes et al., 2006; Fuxa und Skok 2007). Für die anfängliche Ausreifung der B-Lymphozyten ist die Umgebung im Knochenmark erforderlich, wohingegen die endgültige Differenzierung der B-Zellen in den peripheren lymphoiden Organen wie der Milz stattfindet, bei der es nach einer Selektion in Bezug auf die Selbsttoleranz zur einer Aktivierung der Zellen bei Kontakt mit dem entsprechenden Fremdantigen und zur Ausreifung zur Plasma- oder Gedächtniszelle kommt.

1.2 Regulation der Hämatopoese durch Transkriptionsfaktoren und Zytokine

Die Entscheidung bezüglich Proliferation und/oder Differenzierung einer Stammzelle wird durch ein Zusammenspiel und die Veränderungen der Expression verschiedener innerer und äußerer Faktoren sowie die Aktivierung bzw. die Inaktivierung von Signalkaskaden zur Informationsvermittlung, -weitergabe und -umsetzung streng reguliert. Diese Signalwege und die beteiligten Faktoren, deren Wirkung auf die Blutzellen sowohl während der embryonalen als auch adulten Hämatopoese wichtig ist, werden im Folgenden dargestellt.

Die Regulation der Hämatopoese erfolgt in der embryonalen Entwicklungsphase durch essentielle Transkriptionsfaktoren, welche für die Organausbildung notwendig sind. Ein Fehlen sowie eine Funktionsstörung dieser Faktoren führen zu einer embryonal letalen Störung der Blutbildung. Für die Bildung der HSC aus Zellen des Mesoderms spielen die Faktoren SCL (*Stem Cell Leukemia Hematopoietic Transcription Factor*) und RUNX1 (*Runt-related Transcription Factor 1*) eine entscheidende Rolle, wohingegen sie für den Erhalt der adulten Hämatopoese nicht erforderlich, aber für die Differenzierung und Ausreifung der Zellreihen von Bedeutung sind (Mikkola et al., 2003; Ichikawa et al.,

2004). Ein Fehlen von SCL verhindert die Aktivität der ersten hämatopoetischen Zellen in den Blutinseln des Dottersacks sowie die Etablierung der zur Blutbildung befähigten endothelialen Zellpopulation. RUNX1 ist hierbei für Entwicklung definierter hämatopoetischer Zellen aus dieser endothelialen Population erforderlich. Für die Ausbildung und Aufrechterhaltung der Proliferationsaktivität der in Leber, Milz und Knochenmark einwandernden Stammzellen ist neben RUNX1 auch GATA2 (*GATA Binding Protein 2*) notwendig, da ein Fehlen dieser Faktoren eine rudimentäre Hämatopoese bedingt, die weder Stammzellen aus der AGM-Region aufweist noch zu einer Besiedelung von Leber und Knochenmark führt (Tsai et al., 1994; Shivdasani et al., 1995; Porcher et al., 1996; Okuda et al., 1996; Wang et al., 1996; Lancrin et al., 2009). Der als ebenfalls essentiell beschriebene Transkriptionsfaktor ETV6 (*ETS Variant Gene 6*) sorgt dafür, dass die aus der Leber auswandernden Stammzellen in der Lage sind, das Knochenmark zu besiedeln und dort zu proliferieren (Wang et al., 1998). Weitere Faktoren wie JunB, IKAROS und Myc (*Myelocytomatosis Oncogene*) sind ebenfalls entscheidend (Passegue et al., 2001; Johansen et al., 2001; Yoshida et al., 2006).

Für die Einstellung des Gleichgewichts zwischen Erhaltung und Proliferation sowie Differenzierung der Stammzellen in der adulten Hämatopoese sind Transkriptionsfaktoren wie Bmi1, Notch1, HoxB4 (*Homeobox Protein 4*) und Proteine der Wnt- (*Wingless-Type MMTV Integration Site Family*) Signalkaskade von Bedeutung (Sauvageau et al., 1995; Yano et al., 1997; Varnum-Finney et al., 2000; Park et al., 2003; Staal und Clevers, 2005). Ferner wird für C/EBP α (*CCAAT-Enhancer Binding Protein α*) eine Kontrollfunktion auf der Ebene der HSC angenommen (Zhang et al., 2004). Eine Reihe verschiedener Zytokine, wie Thrombopoetin, IL11 und SCF, unterstützen die Aufrechterhaltung des Stammzellcharakters (Petzer et al., 1996; Nakauchi et al., 2001). Bei der Differenzierung einer Stammzelle entscheidet im Weiteren neben dem Vorhandensein von Zytokinen die Expression von Reifungslinien-spezifischen Transkriptionsfaktoren darüber, ob eine MPP die myeloide oder lymphoide Richtung einschlägt.

Die Kombination von myeloiden Faktoren wie PU.1, C/EBP α , C/EBP β sowie C/EBP ϵ , ferner GFI1 (*Growth-Factor Independent 1*) und IRF8 (*Interferon-Regulatory Factor 8*) bewirkt die Differenzierung der MPP hin zur CMP. Wichtige Zytokine sind hierbei IL3 sowie GM-CSF (*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*). Bei der Reifung anderer Zellreihen ist die Expression dieser Faktoren daher unterdrückt (Laiosa et al., 2006). Studien in Mäusen zu Pu.1 ergeben, dass CMP, die eine Pu.1-Expression zeigen, das Potential zur Entwicklung myeloider Zellen besitzen, wohingegen auf die erythroide Linie festgelegte Zellen keine Pu.1-Expression aufweisen (Nutt et al., 2005; Back et al., 2005). Pu.1-defiziente Mäuse zeigen zum einen eine fehlende Bildung von

CLP und CMP, zum anderen eine Beeinflussung der Repopulierungskapazität von HSC (Scott et al., 1997; Dakic et al., 2005; Iwasaki et al., 2005). Gegenspieler von PU.1 ist GATA1, welcher bei der Reifung der megakaryozytären und erythroiden Linie von Bedeutung ist (Stopka et al., 2005; Rosenbauer und Tenen, 2007). Weitere Faktoren, welche in der Myelopoese eine Rolle spielen, sind RAR (*Retinoic Acid Receptor*), c-Myb (*Myeloblastosis Oncogene*) und CBF (*Core Binding Factor*). Die Rolle von RUNX1 als α -Komponente im CBF-Komplex, wird in diesem Abschnitt nicht, sondern im Zusammenhang mit der Pathogenese von leukämischen Erkrankungen in Abschnitt 1.3.2.3 näher erläutert. In der weiteren Ausdifferenzierung der CMP zu GMP sowie zu Granulozyten ist die kombinatorische Wirkung von C/EBP α und G-CSF (*Granulocyte Colony-Stimulating Factor*) von Bedeutung (Zhang et al., 1997 und 2004), wohingegen die Wirkung von PU.1 und das Vorhandensein der Zytokine GM-CSF und M-CSF (*Macrophage Colony-Stimulating Factor*) die Bildung von Makrophagen vermittelt (DeKoter und Singh, 2000; Dahl et al., 2003; Rosenbauer et al., 2004). Für die finale neutrophile Differenzierung sind Sp1 (*Specificity Protein 1*), CDP (*CCAAT Displacement Protein*) und HoxA10 zusätzlich zu den Transkriptionsfaktoren PU.1 und C/EBP ϵ erforderlich. Dahingegen wird die Entwicklung der Monozyten und Makrophagen durch die Faktoren MafB (*Musculoaponeurotic Fibrosarcoma Oncogene*), c-Jun und Egr1 (*Early Growth Response 1*) sowie IRF8 induziert (Friedman, 2002). Deletionen entscheidender Transkriptionsfaktoren führen im Mausversuch zu myeloiden Defekten, da sie die Expression von vielen myeloiden Genen, wie solche zur Kodierung der Rezeptoren für M-CSF, G-CSF sowie GM-CSF und für Granulakomponenten wie Lactoferrin und Neutrophilengelatinase, regulieren (Tenen et al., 1997; Tenen, 2003; Rosenbauer und Tenen 2007).

Ebenso spielen in der lymphoiden Zellreifung Transkriptionsfaktoren eine wichtige Rolle, wobei IKAROS und PU.1 die Entwicklung der B-lymphoiden Vorläuferzellen durch die Regulation der Expression von Signalrezeptoren wie FLT3 (*FMS-like Tyrosine Kinase 3*) und c-KIT sowie des IL7-Rezeptors kontrollieren (Medina und Singh, 2005; Nutt und Kee, 2007; Fuxa und Skok, 2007; Hardy et al., 2007). Flt3-defiziente Mäuse zeigen daher einen Defekt in der Bildung von CLP (Sitnicka et al., 2002). Im Verlauf der B-Zellentwicklung wird die FLT3-Expression durch PAX5 (*Paired Box Gene 5*) ausgeschaltet (Holmes et al., 2006). PAX5 verhindert auch die Expression anderer Gene, welche innerhalb der B-lymphoiden Reifung nicht erforderlich sind, und aktiviert die Expression von notwendigen Signalmolekülen. Der IL7-Rezeptor ist aufgrund der Induktion von wichtigen Transkriptionsfaktoren wie EBF (*Early B-Cell Factor*) für die Entwicklung der frühen B-Zellen von Bedeutung (Kikuchi et al., 2005). Ein Zusammenwirken der durch FLT3 und den IL7-Rezeptor vermittelten Signalwege ist anzunehmen, da bei einem Fehlen beider Rezeptoren ein schwerwiegenderer Phänotyp

bezüglich der lymphoiden Entwicklung zu verzeichnen ist als bei einer Defizienz nur eines Faktors (Sitnicka et al., 2003 und 2007). Neben diesen für den komplexen Regulationsmechanismus der B-Zelldifferenzierung verantwortlichen Faktoren ist das von den Stromazellen abstammende Chemokin SDF-1 für die Proliferation der frühen Stadien der B-Zellentwicklung und den Eintritt in die Differenzierung erforderlich, während das sezernierte Zytokin IL7 für die spätere Ausreifung notwendig ist. Bei einem Fehlen des *SDF-1*-Gens bleibt die B-Zellbildung im Mausmodell aus (Nagasawa et al., 1996; Ma et al., 1998). Die Inaktivierung der IL7-Signalgebung führt zu einer Blockierung der B-Zelldifferenzierung (Peschon et al., 1994; von Freeden-Jeffry et al., 1995). Während der Entwicklung der frühen B-lymphoiden Vorläuferzellen aktivieren die Faktoren E2A und EBF das erforderliche Genexpressionsprofil und veranlassen das Rearrangement der schweren Immunglobulinketten. Für die weiteren Entwicklungsschritte sind IRF4 und IRF8 erforderlich, da bei einem Fehlen der beiden Faktoren in der Prä-B-Zelle die Expression des Prä-BZR nicht beendet werden und somit die Ausbildung des reifen BZR nicht erfolgen kann (Taniguchi et al., 2001; Lu et al., 2003). Ferner wird Runx1 eine Rolle bei der CLP-Produktion sowie der Ausreifung der B-Zellen zugesprochen, da ein Fehlen dieses Faktors zu einer Verminderung der Prä- und Pro-Vorstufen sowie der reifen Zellen führt (Gowney et al., 2005).

Die T-Zellentwicklung wird durch verschiedene Transkriptionsfaktoren wie RUNX-Proteine und GATA3, Notch1 sowie IL7 vermittelt (Prosser et al., 1992; Radtke et al., 2004). Ein fehlendes oder reduziertes Notch1-Signal, welches durch die Expression PAX5 unterdrückt wird, führt zu einer Reduktion früher T-Vorläuferzellen (Souabni et al., 2002; Sambandam et al., 2005; Tan et al., 2005). Nach der Auswanderung von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark in den Thymus erfolgt die Ausreifung der Zellen, die ihr Potential zur B- und NK-Zellentwicklung verlieren, zu T-lymphoiden Zellen (Radtke et al., 1999; Pui et al., 1999; Michie et al., 2000; Wilson et al., 2001). Dabei sind Chemokine und die Wechselwirkung mit den Stromazellen von Bedeutung (siehe Abschnitt 1.1.2.2). Die Expression von Rag1 (*Recombination-Activating Gene 1*) vermittelt die Ausbildung des Prä-TZR (Shinkai et al., 1993), dessen erfolgreiche Signaltransduktion für die weitere T-Zellreifung unerlässlich ist. Mutationen, welche eine Signalweiterleitung verhindern oder stören, bedingen einen Differenzierungsstopp auf der DN3-Stufe (Negishi et al., 1995; van Oers et al., 1996; Clements et al., 1998). Durch das Zusammenwirken von RUNX1, RUNX3 und Th-POK (*T-helper-inducing POZ/Kruppel-like factor*) erfolgt die Regulation des TZR sowie die Festlegung der Entwicklung der doppelt-positiven T-Zellen in CD4- oder CD8-positive. Ferner scheinen GATA3 und TOK (*Thymocyte Selection-associated High-Mobility Group Box*) eine wichtige Rolle in dieser Entwicklungsstufe zu spielen (Collins et al., 2009). Die Herunterregulation der PU.1-Expression in T-Zellen ist zur Ausreifung notwendig, da

eine anhaltende Expression dieses Transkriptionsfaktors zu einem Differenzierungsblock sowie einer malignen Transformation der Zellen führt (Anderson et al., 2002; Rosenbauer et al., 2006).

Störungen der regulativen Prozesse der Hämatopoese auf verschiedenen Ebenen können die äußeren und inneren Bedingungen der sich entwickelnden Zelle verändern. Mit den Auswirkungen der gestörten Regulation durch Transkriptionsfaktoren, dem Auftreten neuer Faktoren und dem daraus folgenden Krankheitsbild der Leukämie befasst sich der nachfolgende Abschnitt.

1.3 Leukämie

Leukämie bedeutet weißes Blut und ist als eine generalisierte, maligne Wucherung des blutbildenden Gewebes definiert, die zur frühzeitigen hämatogenen Metastasierung neigt und durch zunehmende Verdrängung der normalen Blutbildung unbehandelt zum Tod führt. Sie ist von der reaktiven Leukozytose aufgrund von Infekten oder Intoxikationen abzugrenzen. Die Zahl der weißen Blutzellen ist meist erhöht, wobei es aber auch sub- oder aleukämische Verlaufsformen gibt, bei denen die Leukozytenzahl normal oder vermindert ist. Nach der Herkunft der malignen Erkrankung unterscheidet man zwischen myeloiden und lymphoiden, nach ihrer Entstehungsweise und Verlaufsform zwischen chronischen und akuten Leukämien. Chronische Leukämien können in einem großen Zeitfenster verlaufen, bis sie in die akute Phase eintreten, während die akuten Leukämien dagegen sehr schnell verlaufen. Sie führen unbehandelt innerhalb von Tagen oder wenigen Wochen zum Tod des Patienten.

1.3.1 Akute Leukämien

Charakteristisch bei akuten Leukämien ist die auftretende Differenzierungsblockade einer hämatopoetischen Stammzelle, so dass sich die myeloiden oder lymphoiden Vorläuferzellen ansammeln und nicht ausreifen können. Die Folge dieser klonalen Proliferation und Akkumulation neoplastischer Zellen ist die Verdrängung der physiologischen Blutbildung. Akute myeloide Leukämien (AML) können entweder ohne eine Vorerkrankung entstehen (*de novo*) oder sich aufgrund einer assoziierten Störung der Hämatopoese oder einer erfolgten Chemotherapie entwickeln (sekundäre AML). Die Diagnose einer akuten Leukämie wird anhand von Blut- und Knochenmarkuntersuchungen gestellt, wobei das Auftreten einer unreifen leukämischen Zellpopulation nachgewiesen werden muss.

An einer akuten lymphoiden Leukämie (ALL) erkranken ein bis zwei Menschen pro 100000 und Jahr, wobei ein erster Altergipfel unter 15 Jahre liegt und die Inzidenz nach dem 50. Lebensjahr wieder ansteigt. Bei einer AML beträgt die jährliche Inzidenz im Alter unter 40 Jahre bei einer Erkrankung pro 100000 und steigt mit zunehmenden

Alter deutlich an, wobei der Median bei einem Lebensalter von 67 liegt und Männer etwas häufiger erkranken als Frauen. Im Allgemeinen nimmt man an, dass bei Kindern in über 80% der Fälle eine mittlerweile gut therapierbare ALL und nur in etwa 15-20% der Erkrankungen eine AML vorliegt. Bei an einer akuten Leukämie erkrankten Erwachsenen ist das Verhältnis umgekehrt. Mit 80-90% ist die AML die häufigste Form aller akuten Leukämien und tritt meistens sporadisch auf (Hellenbrecht et al., 2003, Kompetenznetz Leukämie). Allerdings gehen Syndrome wie Fanconi, Down, Kostmann und Diamond-Blackfan sowie myeloproliferative und myelodysplastische Erkrankungen, ferner die paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie mit einem erhöhten Risiko der Entwicklung einer AML einher. Einen weiteren Ursprung kann eine AML in einer Chemotherapie, Chemikalien oder ionisierter Strahlung nehmen.

Mittels der FAB-Klassifikation (*French-American-British Working Group of Leukemia*; Bennett et al., 1976, 1985 und 1991) werden akute Leukämien nach morphologischen und zytochemischen Kriterien unterteilt, wobei sowohl die Blastenpopulation als auch der Anteil an ausgereiften Zellen betrachtet werden. Die neuere WHO-Klassifikation (*World Health Organization*; Jaffe et al., 2001) kombiniert die Kriterien der FAB-Klassifikation mit zyto- und molekulargenetischen sowie immunologischen Erkenntnissen, wodurch eine Leukämie anhand der genetischen Veränderungen der betroffenen Zellen wie Translokationen oder Punktmutationen und der daraus abgeleiteten Prognoseabschätzung unterteilt werden kann. Diese für die Wahl der optimalen Therapie wichtigen Einteilung der AML anhand der FAB- sowie der WHO-Klassifikation ist in der nachfolgenden Tabelle 1.1. dargestellt (Bennett et al., 1976, 1985 und 1991; Jaffe et al., 2001; Zipursky et al., 1994 und 1999).

Tabelle 1.1: Einteilung der akuten myeloiden Leukämien

In dieser Tabelle sind die verschiedenen AML-Formen unter Verwendung der FAB- und WHO-Klassifikation zusammengefasst und mit weiteren Angaben ergänzt (Rosenbauer und Tenen, 2007).

(MPO = Myeloperoxidase; t(8;21) = Translokation die Chromosomen 8 und 21 betreffend; ANAE = α -Naphthylacetatesterase; KM = Knochenmark)

Nomenklatur		Morphologische Definition für alle Subtypen (FAB: \geq 30% Blasten; WHO: \geq 20% Blasten)	Mutationen und Effekte
FAB	WHO		
M0	AML mit minimaler myeloider Differenzierung	< 3% MPO-positiv Blasten; Nachweis CD13, CD33, CD117 bzw. CD14	RUNX1, häufig biallelisch in der Runt-Domäne
M1	AML ohne Ausreifung	90% Blasten, davon \geq 3% MPO-positiv; \leq 10% ausreifende Granulopoese (Promyelozyten bis Segmentkernige) mit oder ohne Monozytenanteil	C/EBPa
M2	AML mit Ausreifung bzw. mit t(8;21)	bis 89% Blasten, davon \geq 3% MPO-positiv; > 10% ausreifende Granulopoese (Promyelozyten bis Segmentkernige) mit oder ohne Monozytenanteil (< 20%)	RUNX1-ETO, Herunterregulation von PU.1, C/EBPa und RUNX1; C/EBPa, N-terminal dominant-negativ
M3	akute Promyelozytenleukämie	Blasten und abnorme, hypergranulierte (Auerstäbchen); Promyelozyten, davon \geq 3% MPO-positiv	
M3V	AML mit t(15;17)	wie M3, jedoch Promyelozyten mit feinerer Granula bzw. agranulär; auffällige, lobulierte Kernformen	PML-RAR α , Blockierung von PU.1 und C/EBPa
M4	akute myelomonozytäre Leukämie	\geq 20% granulozytär (Myeloblasten bis Segmentkernige) und \geq 20% monozytär (Monoblasten, Promonozyten bis Monozyten); ANAE-positiv; erhöhte Konzentration an Lysozym in Urin oder Serum	selten C/EBPa; selten PU.1
M4Eo	AML mit inv16 oder t(16;16)	wie M4, > 5% atypische Eosinophilen im KM	CBF β -SMMHC
M5A	akute Monoblastenleukämie	\geq 80% Monoblasten; < 20% MPO-positiv; > 80% unspezifische Esterase-positiv	
M5B	akute Monozytenleukämie	\geq 80% monozytär, davon < 80% Monoblasten	selten PU.1
M6	akute Erythroleukämie	Erythropoese von \geq 50% der nukleären Zellen im KM; \geq 30% (bzw. \geq 20%) Blasten (M6B: Erythroblastenanteil > 80%)	
M7	akute Megakaryoblastenleukämie	MPO-negativ; Nachweis von CD41, CD61; \geq 50% megakaryozytäre Blasten (WHO)	GATA1, fast zu 100% mit dem Down-Syndrom assoziiert

Die FAB-Klassifikation unterteilt die ALL anhand von morphologischen und zytochemischen Kriterien in drei Untergruppen. Allerdings haben sich immunologische Kriterien als relevanter erwiesen, so dass sich innerhalb der WHO-Klassifikation drei Gruppen (B-ALL, T-ALL und andere) sowie weitere Untergruppen unterscheiden lassen, die bezüglich Klinik, Verlauf, Prognose und Therapie von Bedeutung sind (Armstrong et al., 2004; Pui et al., 2004; Armstrong und Look, 2005).

1.3.2 Entstehung einer Leukämie

Die Tumorgenese und somit der Übergang einer normalen Zelle in eine Tumorzelle, welcher als Transformation bezeichnet wird, beginnt mit der Schädigung der DNA einer einzelnen Zelle. Für die Tumoringenese sind Mutationen in Protoonkogenen oder inaktivierende Veränderungen von Tumorsuppressorgenen von Bedeutung, wobei man davon ausgeht, dass bis zu der Entstehung von malignen Tumoren mehrere Mutationen dieser Gene auftreten (Vogelstein und Kinzler, 1993). Für die Entwicklung einer akuten Leukämie ist dies in einem einfachen Modell zusammengefasst worden, welches in Abbildung 1.3 dargestellt ist.

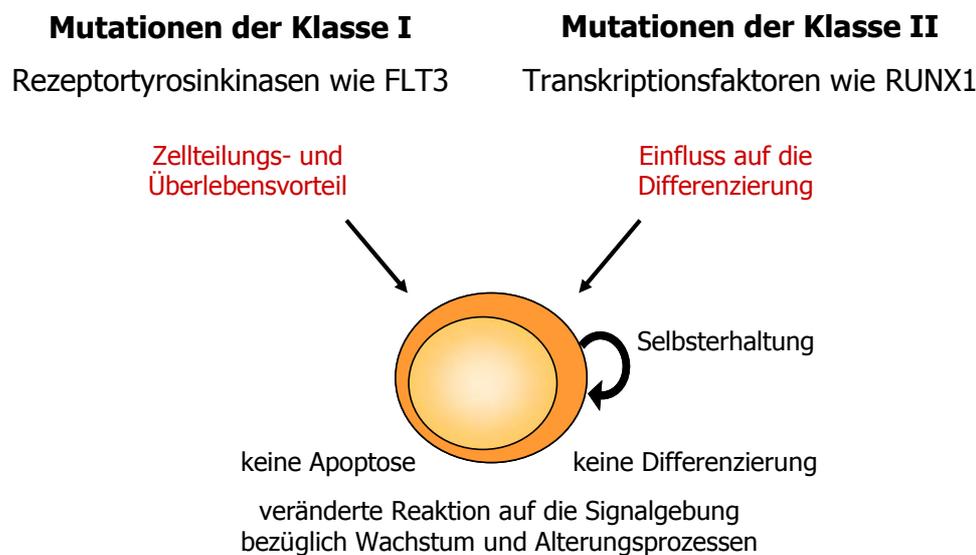


Abbildung 1.3: Darstellung der Hypothese zur Leukämieentstehung

Durch das Zusammenwirken einer Mutation der Klasse I, welche einen Proliferations- und Überlebensvorteil für die neoplastische Zelle bietet, und einer Mutation der Klasse II, welche das Differenzierungspotential der betroffenen Zelle beeinflusst, kommt es zur Entstehung einer akuten Leukämie.
(modifiziert nach Dash und Gilliland, 2001; Gilliland und Tallman, 2002)

Durch Mutationen der Klasse II, die eine Blockierung der Differenzierung bedingen, erfolgt eine Ansammlung von Zellen eines unreifen myeloiden oder lymphoiden Stadiums, die nicht zur funktionalen Zelle der entsprechenden Linie ausreifen können. Die betroffene Zellen erlangt durch Mutationen der Klasse I die Fähigkeit zur Proliferation und Selbsterneuerung, wobei sie in der Lage sind, sich ohne Verkürzung der Telomere unkontrolliert zu teilen (Warner et al., 2004). Ferner führt eine gestörte Signaltransduktion in einer transformierten Zelle zu einer fehlenden Eliminierung mittels Apoptose. Aus diesem Modell ergibt sich daher die Hypothese, dass mehrere Mutationen für die Entwicklung des Phänotyps einer akuten Leukämie erforderlich sind. *In vitro*- und *in vivo*-Versuche deuten an, dass das Auftreten einer Mutation allein nicht ausreicht, um eine Leukämie zu induzieren (Dash und Gilliland, 2001; Gilliland und Tallman, 2002).

Bisher beschriebene Mutationen der Klasse I, die einen Zellteilungs- und Überlebensvorteil an die neoplastischen myeloiden Vorläuferzellen vermitteln, umfassen sowohl Veränderungen von Rezeptortyrosinkinasen wie FLT3 oder c-KIT, welche zu einer konstitutiven, d.h. Liganden-unabhängigen, Aktivierung des Rezeptors führen, als auch Mutationen von RAS, einer Familie von kleinen G-Proteinen (Guaninnukleotid-bindendes Protein), NF1 (Neurofibromatose Typ 1) und SHP-2 (*Src Homology Region 2 Domain-containing Phosphatase-2*). Als Konsequenz daraus ergibt sich eine veränderte Aktivierung der Signaltransduktion, die zu einem Proliferationsvorteil führt (Gilliland und Tallmann 2002; Gilliland et al., 2004). Mutationen von c-KIT und RAS treten in 5% bzw. 20% aller AML-Patienten auf, wobei Veränderungen von c-KIT häufig mit einer RUNX1-ETO- (*Eight Twenty One Oncogene*) Translokation assoziiert sind (Warner et al., 2004; Renneville et al., 2008). Mutationen von FLT3 sind mit einem Anteil von 30-35% innerhalb der AML vertreten (Small, 2006). In ALL-Patienten werden auch Veränderungen von FLT3 sowie aktivierende Mutationen der Janus-Kinasen JAK1-3 gefunden, welche in der Kinase- oder Pseudokinasedomäne liegende konservierte Aminosäurereste betreffen und zu einer konstitutiven Aktivierung des JAK-STAT- (*Signal Transducers and Activators of Transcription Protein*) Signalwegs führen. Diese Mutationen sind bei 10% der pädiatrischer ALL-Patienten ohne eine BCR-ABL-Translokation beschrieben, wobei ihr Auftreten mit IKAROS-Veränderungen assoziiert zu sein scheint (Mullighan et al., 2009a). Ferner können JAK2-Mutationen bei Kindern mit einem Down-Syndrom identifiziert werden (Bercovich et al., 2008).

In akuten Leukämien betreffen Mutationen der Klasse II vor allem für Transkriptionsfaktoren kodierende Gene, wobei es zu einer quantitativen oder qualitativen Veränderung der Funktion und Expression des jeweiligen Faktors kommt. Diese Transkriptionsfaktoren sind für die normale Differenzierung von hämatopoetischen Zellen von Bedeutung (Tenen 2003). Eine veränderte Expression kann durch vermehrte chromosomale Kopien des Gens (z.B. Trisomie 21) oder durch Amplifikation einzelner Genbereiche (z.B. c-Myc) bedingt werden. Punktmutationen und Translokationen sowie Deletionen und Insertionen können zu einer Störung der Funktion des Transkriptionsfaktors an sich oder dessen Regulation führen (Vradii et al., 2005). Beispiele für die Hemmung der normalen Wirkung des Transkriptionsfaktors aufgrund einer zu einem Fusionsprotein führenden Translokation sind RUNX1- und RAR α -Fusionen (Crans und Sakamoto, 2001). Von Translokationen sind ebenfalls Mitglieder der Hox- und ETS-Familien sowie als Coaktivatoren dienende Proteine wie CBP (*Creb-Binding Protein*), p300, MOZ (*Monocytic Leukemia Zinc Finger Protein*), TIF2 (*Transcriptional Mediators/ Intermediary Factor 2*) und MLL (*Mixed-Lineage Leukemia*) betroffen (Kelly und Gilliland, 2002). Eine in AML-Patienten häufig

auftretende Translokation zwischen den Chromosomen 8 und 21 führt zu dem Fusionsprotein RUNX1-ETO, welches eine frühe Blockade der myeloiden Entwicklung bedingt (Speck und Gilliland, 2002; Schwieger et al., 2002; Ko et al., 2008). Punktmutationen von Transkriptionsfaktoren wie RUNX1, GATA1, C/EBP α und PU.1, die zu einem Funktionsverlust führen, spielen ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der Leukämogenese (Gilliland et al., 2004). Mutationen der Klasse II, die vorwiegend bei ALL-Patienten zu finden sind, betreffen die Transkriptionsfaktoren PAX5 und IKAROS und sind in den meisten Fällen mit einem B-lymphoiden Phänotyp assoziiert (Mullighan et al., 2009a,b). Dabei treten Deletionen und im Falle von PAX5 ferner Punktmutationen und Translokationen auf (Kawamata et al., 2008; Santoro et al., 2009; Nebral et al., 2009). Deletionen von PAX5 sind bei Leukämiepatienten während eines Rückfalls nicht nachzuweisen, wohingegen Deletionen und Mutationen, die IKAROS betreffen, verstärkt im Zeitraum des Rückfalls vorkommen bzw. erhalten bleiben und mit einer schlechteren Prognose sowie Überlebensrate assoziiert sind (Kuiper et al., 2010).

Basierend auf diesem einfachen Modell ergibt sich die Annahme, dass eine Mutation, die einen Proliferations- und Überlebensvorteil für die betroffene Zelle vermittelt in Kombination mit einer Mutation, welche die Differenzierung der jeweiligen Zelle beeinflusst, eine akute Leukämie auslösen kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Zusammenwirken von RUNX1-Mutanten und FLT3-ITD als Mutationen der Klasse I und II untersucht, welche in AML-M0-Patienten mit einer Häufigkeit von bis 65% kombiniert auftreten (Tang et al., 2009). Daher wird in den nachfolgenden Abschnitten die Rolle dieser Faktoren in der normalen Hämatopoese sowie in akuten Leukämien eingehender erläutert.

1.3.2.1 FLT3 in der Hämatopoese

FLT3 ist eine Rezeptortyrosinkinase der Klasse III, zu der noch weitere Rezeptoren gehören, die eine hohe Ähnlichkeit zu FLT3 aufweisen. Dazu zählen die Rezeptoren für c-KIT, PDGFR α/β (*Platelet Derived Growth Factor alpha/beta*) und M-CSF (Small, 2006; Parcells et al., 2006). Das humane FLT3-Gen besteht aus 24 Exons, die auf Chromosom 13 (13q12) lokalisiert sind und für ein Protein bestehend aus 993 Aminosäuren kodieren. Das Protein liegt entweder als unglykosylierte und nicht Membran-gebundene oder als N-terminal glykosylierte Form vor (Lyman et al., 1993; Rosnet et al., 1993; Abu-Duhier et al., 2001). FLT3 spielt eine entscheidende Rolle beim Überleben, der Proliferation sowie der Differenzierung von hämatopoetischen Zellen (Small, 2006). Die in Abbildung 1.4 dargestellte Rezeptortyrosinkinase FLT3 weist fünf extrazelluläre Immunglobulin-ähnliche Domänen auf, welche für die Bindung des FLT3-Liganden verantwortlich sind. Diesen Domänen, die alle

Rezeptortyrosinkinase der Klasse III aufweisen, schließen sich die Membrandurchspannende Transmembrandomäne (TMD) sowie die Juxtamembrandomäne (JMD) an. Im Zytoplasma befinden sich zwei weitere für die Signaltransduktion wichtige Tyrosinkinasedomänen (TKD), welche sich der JMD anschließen und die durch eine Interkinasedomäne voneinander getrennt sind (Agnes et al., 1994; Lyman, 1995; Grassot et al., 2003).

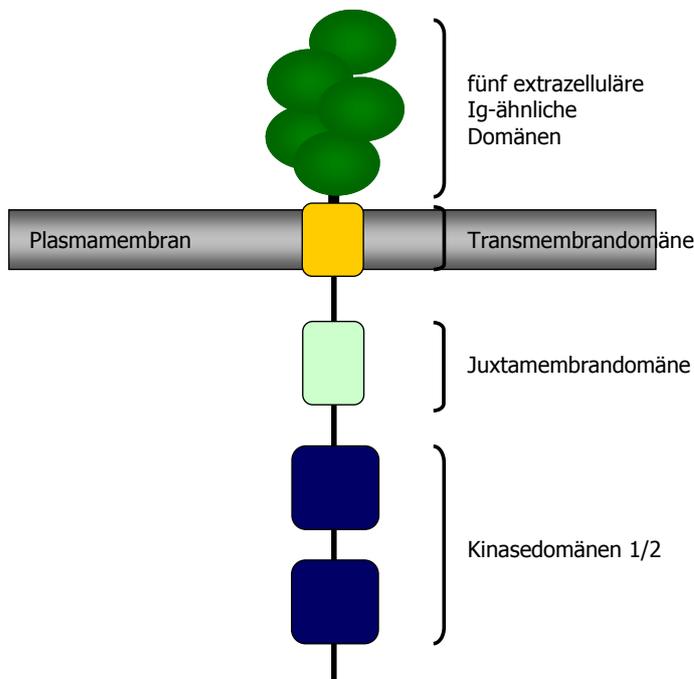


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der FLT3-Rezeptortyrosinkinase

Der Rezeptor besteht aus fünf extrazellulären Immunglobulin (Ig)-ähnlichen Domänen zur Ligandenbindung, einer Transmembrandomäne, einer Juxtamembrandomäne und zwei Kinasedomänen für die Signalweiterleitung. (modifiziert nach Small, 2006)

Im inaktiven FLT3-Rezeptor werden sowohl die TKD als auch die JMD stabil in der Konformation gehalten, bei welcher der Zugriff der Kinasedomäne auf ATP und Peptidsubstrate blockiert ist und der Status der Autoinhibition unterstützt wird (Huse und Kuriyan, 2002). Durch die Bindung des Liganden an die extrazellulären Domänen bildet FLT3 ein Homodimer aus, wobei die spezifischen Tyrosinreste 589 und 591 durch die Transphosphorylierung in der JMD von einem intrazellulären Bereich des einen Rezeptors auf den anderen Rezeptor des Dimers übertragen werden. Die Tyrosinreste dienen gleichzeitig als Bindungsstellen für verschiedene Adaptermoleküle, die eine SH2- (*Src Homology 2*) Domäne oder eine Phosphotyrosinbindedomäne aufweisen. Diese Adaptermoleküle rekrutieren und aktivieren durch Tyrosin- oder Serinphosphorylierungen stromabwärts von FLT3 gelegene Effektormoleküle der Signalwege, die STAT5, RAS/MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*), Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und NF- κ B (*Nuclear Factor κ -Light-Chain-Enhancer of*

Activated B cells) betreffen (Hayakawa et al., 2000; Levis und Small, 2003; Parcells et al., 2006). Die Signalwege von RAS/MAPK und PI3K können in einem onkogenen Prozess eine wichtige Rolle spielen, wenn deren Regulation z.B. durch die konstitutive Aktivierung der Rezeptortyrosinkinase außer Kontrolle gerät, da diese intrazellulären Wege an der Regulation von Metabolismus, Zellzyklus, Proliferation und Apoptose sowie der Polarität von Zellen und des Vesikeltransfers beteiligt sind.

Untersuchungen zur Expression von FLT3 ergeben, dass diese Rezeptortyrosinkinase vorwiegend in frühen Reifestadien des hämatopoetischen Systems wie ST-HSC, MPP und CLP sowie im humanen System zusätzlich in CMP und GMP zu erfassen ist. Analysen in humanen Zellen aus Knochenmark und Nabelvenenblut zeigen, dass dort auch LT-HSC FLT3 exprimieren (Kikushige et al., 2008). Weiterhin wird mit der Beschreibung des LMPP (*Lymphoid-primed Multi-Potent Progenitor*) eine FLT3-exprimierende Vorläuferzelle erfasst, welche das Potential zur lymphoiden und myeloiden Entwicklung besitzt, aber nur im reduzierten Maße zur Bildung von Megakaryozyten und Erythrozyten befähigt ist. Dies deutet eine Rolle von FLT3 als Indikator für die Beschränkung der Differenzierungsmöglichkeiten an. Die Abschaltung der FLT3-Expression im Laufe der Differenzierung erfolgt vermutlich schrittweise, wobei dendritische Zellen eine Ausnahme bilden, da sie in ausgereifter Form die FLT3-Expression beibehalten (Christensen and Weissman, 2001; D'Amico und Wu, 2003; Adolfsson et al., 2005; Karsunky et al., 2008; Kikushige et al., 2008). Bei der Reifungslinie der B-Zellen ist das Beenden der FLT3-Expression im Pro-B-Zellstadium durch das Auftreten des Transkriptionsfaktors PAX5 entscheidend, weil dadurch eine Bildung des Prä-B-Zellrezeptors und die weitere Differenzierung der B-Lymphozyten erst möglich ist (Holmes et al., 2006 und 2007; Fazio et al., 2008). Eine Abschaltung der Flt3-Expression im murinen System geht mit einem Verlust der Selbsterneuerungskapazität einher (Adolfsson et al., 2001). Trotz des Expressionsmusters dieser Rezeptortyrosinkinase in den hämatopoetischen Vorläuferzellen zeigen *Flt3*-defiziente Mäuse in Übereinstimmung mit den für Flt3-Liganden defizienten Versuchstieren eine weitgehend normale Blutzellentwicklung, wobei allerdings eine reduzierte Anzahl an NK- und dendritischen Zellen sowie eine Verminderung der B-Vorläuferzellen zu verzeichnen ist (Mackarehtschian et al., 1995; McKenna et al., 2000; Small, 2006).

1.3.2.2 FLT3-Mutationen in Leukämien

Eine der häufigsten somatischen Veränderungen in AML-Patienten ist eine Mutation des *FLT3*-Gens, die in 30-35% aller Fälle, vorwiegend bei dem Subtyp M3, seltener bei M2 nachzuweisen ist. Diese Mutation tritt aber auch zu 5-10% in MDS- sowie selten in ALL-Patienten auf und ist in den meisten Fällen mit einer schlechten Prognose assoziiert. Die in *FLT3* am häufigsten identifizierten Mutationen sind einerseits Punktmutationen, die meist an der Aminosäureposition D835 in der zweiten Tyrosinkinasedomäne auftreten (TKD, betrifft 8-12% der AML-Patienten), und andererseits die Insertion einer internen Tandem-Duplikation, welche in der Größe von einigen wenigen bis über 50 Aminosäuren variiert, wobei das Leseraster erhalten bleibt (ITD, betrifft etwa 20-25% der AML-Patienten) (Kelly und Gilliland, 2002; Gilliland et al., 2004; Litzow, 2005). Statistiken der Patienten mit *FLT3*-Mutationen zeigen, dass eine Mutation in den Kinasedomänen vorwiegend mit dem Krankheitsbild einer ALL besonders im Kindesalter, eine *FLT3*-ITD-Mutation hingegen mit einer AML assoziiert ist (Taketani et al., 2004; Armstrong et al., 2004). Im Falle einer sekundär auftretenden AML zeigen 15% der Patienten eine *FLT3*-ITD-Mutation, welche bei dem Voranschreiten der Erkrankung sowie einem Rückfall eine wichtige Rolle zu spielen scheint (Horiike et al., 1997; Nakano et al., 1999). Jedoch sind die genannten Mutationsformen nicht exklusiv in nur einer Leukämieform zu finden. Es werden auch *FLT3*-ITD-Mutationen bei ALL-Patienten im Kindes- wie auch im Erwachsenenalter nachgewiesen (Yokota et al., 1997, Nakao et al., 1996; Xu et al., 1999 und 2000; Brown und Small 2004).

Beide beschriebenen Mutationsformen führen zur konstitutiven Aktivierung des Rezeptors, aber die stromabwärts von *FLT3* gelegene Signaltransduktion und die resultierende Erkrankung im Mausmodell erweisen sich als unterschiedlich (Choudhary et al., 2005; Grundler et al., 2005). Ferner zeigen Mutationen in der TKD im Allgemeinen ein schwächeres Transformationspotential als *FLT3*-ITD-Mutationen (Reindl et al., 2006). Die Transformation der Zellen könnte von der intrazellulären Lokalisation von *FLT3*-ITD abhängig sein, da *FLT3*-ITD als Mannose-gebundener Vorläufer intrazellulär an das Endoplasmatische Retikulum bindet, dort gespeichert wird und die *STAT5*-Aktivierungskapazität erhält, welche für die Transformation *in vitro* und *in vivo* von Bedeutung ist. Die transformierende Aktivität der TKD-Punktmutation an der Position D835 wird hingegen durch das Binden an das Endoplasmatische Retikulum unterdrückt (Schmidt-Arras et al., 2009). Der genaue molekulare Mechanismus der Rezeptoraktivierung durch die beiden Mutationen ist bisher nicht bekannt. Bei den TKD-Punktmutationen wird angenommen, dass sie die Aktivierungsschleife destabilisieren und diese so in eine offene Konformation bringen, wobei die Signaltransduktion mit der Liganden-stimulierten Form übereinzustimmen

scheint (Griffith et al., 2004; Choudhary et al., 2005, Schmidt-Arras et al., 2009). Durch die FLT3-ITD-Mutation scheint der autoinhibitorische Effekt der JMD auf die TKD gestört zu sein. Die durch die ITD hervorgerufene Konformationsänderung vermittelt eine irreversible Öffnung der Phosphorylaketorseite in der TKD, so dass ATP und Peptidsubstrate stetig an die Kinasedomäne binden können (Kiyoi et al., 2002).

Die Expression der konstitutiv aktivierten Rezeptortyrosinkinase FLT3-ITD in 32D- und Ba/F3-Zellen führt zu einem Wachstumsfaktor-unabhängigen Wachstum, was dafür spricht, dass durch diese Mutation der Klasse I ein transformierendes Ereignis erfolgt, welches der betroffenen Zelle ein Proliferations- und Überlebensvorteil vermittelt (Hayakawa et al., 2000; Mizuki et al., 2000). Die Transplantation dieser Ba/F3-Zellen in Mäuse führt zur Entwicklung eines leukämischen Phänotyps (Levis et al., 2001; Naoe et al., 2001; Tse et al. 2001). Hingegen kommt es bei der retroviralen Expression von FLT3-ITD in hämatopoetischen Vorläuferzellen in einem murinen Knochenmarkstransplantationsversuch zur Entwicklung einer myeloproliferativen Erkrankung und nicht zu dem Auftreten einer AML. Weiterhin kann dieser Phänotyp nicht retransplantiert werden, da den Zellen durch die Transformation nicht die Fähigkeit zur Selbsterneuerung vermittelt wird. Dies deutet an, dass FLT3-ITD als alleinige Mutation *in vivo* keine Leukämie induzieren kann, während bei einer Kombination mit Mutationen der Klasse II eine Leukämogenese möglich ist (Kelly et al., 2002a,b). *Knock-in*-Versuche, bei denen eine ITD-Mutation in die JMD des murinen Flt3 eingebracht wird, führen ebenfalls nur zu der Entwicklung eines myeloproliferativen Phänotyps (Li et al., 2008). Eine Wechselwirkung von FLT3-Mutationen mit bei der Hämatopoese wichtigen Transkriptionsfaktoren zeigt sich auch darin, dass FLT3-ITD die Expression von C/EBP α und PU.1 herunterreguliert sowie aufgrund einer Phosphorylierung von Serin 21 von C/EBP α die Proteininaktivierung erhöht (Mizuki et al., 2003; Zheng et al., 2004; Radomska et al., 2006).

1.3.2.3 Bedeutung von RUNX1 in der Hämatopoese

RUNX1 ist eines von drei hoch konservierten *RUNX*-Genen mit großen strukturellen Ähnlichkeiten (*RUNX1-3*), die aufgrund ihrer Reifungslinien-spezifischen Expression in verschiedene wichtige Entwicklungswege eingebunden sind. *In vivo*-Versuche zeigen die Bedeutung von Runx1 in der Hämatopoese, auf die nachfolgend näher eingegangen wird, sowie von Runx2 in der Osteogenese und von Runx3 in der neuronalen und T-Zellentwicklung sowie ferner in der Zellproliferation und Apoptose des Magenepithels (Levanon und Groner, 2004).

RUNX1 (auch als AML1 oder CBF α bezeichnet) gehört zu der Familie der CBF-Proteine und wurde zuerst als Transkriptionsfaktor beschrieben, der an spezifische virale *Enhancer*-Regionen bindet (Wang und Speck, 1992). Das *RUNX1*-Gen, lokalisiert auf

Chromosom 21 im Abschnitt q22, besteht aus zehn Exons (1-6, 7A, 7B, 7C und 8) und zwei Promotorregionen, denen das Startcodon in Exon 1 und Exon 3 folgt (Osato, 2004). Drei Spleiß-Formen sind beschrieben (RUNX1a-c), wobei RUNX1b die transkriptionell aktive ist (Miyoshi et al., 1995).

RUNX1 bildet die α -Untereinheit des nach Dimerisierung mit CBF β gebildeten stabilen und damit aktiven CBF-Komplexes, wie es in Abbildung 1.5 gezeigt ist. Diese Heterodimerisierung verstärkt die DNA-Bindungskapazität und dient dem Schutz vor proteolytischer Degradation. In diesem Komplex vermittelt die hoch konservierte Runt-Homologiedomäne von RUNX1, welche die Exons 3-5 umfasst, die DNA-Bindung an *Enhancer*- und Promotorsequenzen, wodurch eine Regulation der Transkription einer Vielzahl hämatopoetischer Gene erfolgt, die Reifungslinien-spezifisch ist und von der jeweiligen Entwicklungsstufe der Zelle abhängt (Hsiang et al., 1993; Suzow und Friedman, 1993; Cameron et al., 1994; Zhang et al., 1994; Frank et al., 1995; Huang et al., 2001).

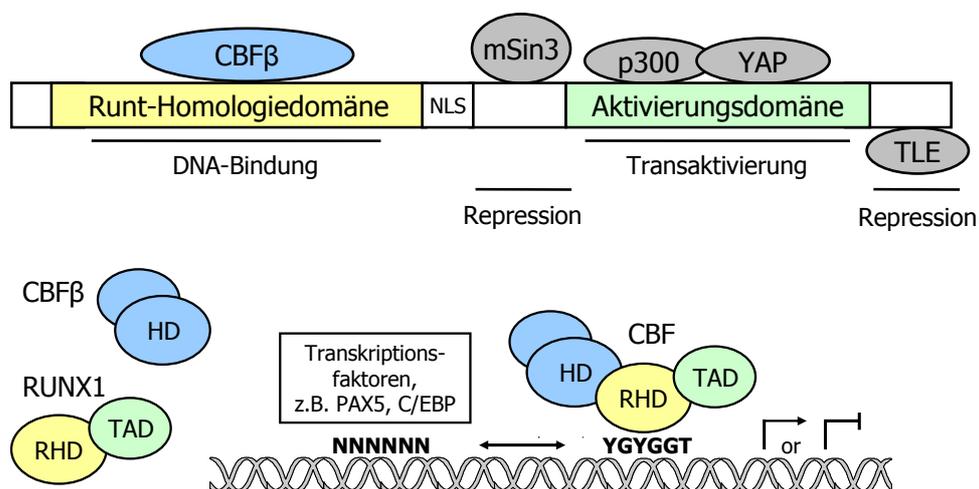


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung des RUNX1-Proteins und seine Funktion als α -Untereinheit im CBF-Komplex

Das RUNX1-Protein enthält eine Runt-Homologiedomäne (RHD) zur DNA-Bindung und Heterodimerisierung mit CBF β sowie Domänen zur Transaktivierung (TAD) und Repression, wobei alle Strukturen für die Funktion des Proteins erforderlich sind. Cofaktoren wie mSin3, p300, YAP (*Yes-Associated Protein*) und TLE (*Transducin-Like Enhancer of Split*) binden an die verschiedenen Domänen. Aufgrund der Dimerisierung von RUNX1 und CBF β ist eine Bindung des Komplexes an die DNA und eine Regulation der Transkription verschiedener hämatopoetischer Gene möglich.

(modifiziert nach Blyth et al., 2005; Mikhail et al., 2006; Niebuhr et al., 2008)

In dem Schema des RUNX1-Proteins in Abbildung 1.5 ist die sowohl für die Interaktion mit der β -Untereinheit des CBF-Komplexes als auch für die Bindung an die DNA notwendige N-terminal gelegene Runt-Homologiedomäne, bestehend aus 128 hoch konservierten Aminosäuren, dargestellt (Kagoshima et al., 1993 und 1996). An der C-terminal gelegenen Transaktivierungsdomäne werden verschiedene aktivierende Cofaktoren gebunden (Ito, 1999). Weiterhin befinden sich am äußeren C-terminalen

Ende wie auch C-terminal der Runt-Domäne Repressor- sowie Corepressorbindungsstellen (Kanno et al., 1998; Lutterbach und Hiebert, 2000). Man vermutet, dass die von RUNX1 gebildete α -Untereinheit des CBF-Komplexes nicht vorrangig eine direkte transkriptionelle Wirkung hat, sondern bei der Rekrutierung von anderen Reifungslinien-spezifischen Transkriptionsfaktoren zu deren Promotoren eine architektonisch organisierende. Erst durch die RUNX1-vermittelte, korrekte Ausbildung des CBF-Komplexes wird eine adäquate transkriptionelle Antwort durch Aktivierung oder Inhibition ermöglicht. So ist dieser Transkriptionsfaktor bei der Regulation von GM-CSF, IL3, Myeloperoxidase, Neutrophilenelelastase, M-CSF-Rezeptor und TZR von Bedeutung (Dash und Gilliland, 2001; Friedmann, 2002; North et al., 2004).

In der frühen embryonalen Entwicklung nimmt Runx1 eine entscheidende Rolle ein, da eine Defizienz eine letale Wirkung zur Folge hat. Bei dem Fehlen von Runx1 bilden sich während der embryonalen Phase keine Stammzellen in der AGM-Region sowie keine hämatopoetischen Vorläuferzellen aus der endothelialen Zellpopulation, so dass die nachfolgende Entwicklung der Hämatopoese unterbleibt (Okuda et al., 1996; Niki et al., 1997; Mukoyama et al., 2000; Chen et al., 2009). In heterozygoten Embryos (*Runx1^{+/-}*) kann im Vergleich zu Wildtypmäusen eine geringere Anzahl an HSC in der AGM-Region, aber nicht im Dottersack sowie der Plazenta festgestellt werden (Robin et al., 2006).

In Bezug auf die adulte Hämatopoese ist gezeigt, dass Runx1 in vielen verschiedenen hämatopoetischen Zellen exprimiert wird. Konditionale *Knock-out*-Versuche bezüglich *Runx1* ergeben Defekte in der lymphoiden Zellentwicklung sowie der Megakaryozytenreifung und in der myeloiden Zellreihe. Eine *Runx1*-Defizienz (*Runx1^{+Δ}*, *Runx1^{Δ/Δ}*) führt in adulten Mäusen zu einem Anstieg myeloider und anderer Vorläuferzellen, welcher durch eine Veränderung des Proliferationsvermögens und/oder der Selbsterneuerungskapazität oder alternativ durch einen partiellen Differenzierungsblock bedingt sein könnte. Weiterhin ist eine geringe Anzahl an CD4-positiven T-Zellen und Thrombozyten zu verzeichnen, was darauf zurückzuführen ist, dass Runx-Proteine im Allgemeinen bei der T-lymphoiden Entwicklung eine entscheidende Rolle spielen (Taniuchi et al., 2002). *In vitro*-Versuche weisen die Notwendigkeit von RUNX1 bei der Festlegung der megakaryozytären Reifungsreihe und die Divergenz von dem erythroiden Entwicklungsweg auf. Während die Zellen von FPD/AML- (*Familial Platelet Disorder with predisposition to AML*) Patienten (siehe Abschnitt 1.3.2.4) eine verminderte megakaryozytäre Koloniebildung zeigen, führen heterozygote und konditional biallelische Deletionen von *Runx1* in Mäusen zu einer Erhöhung der Megakaryopoese mit einem partiellen Differenzierungsblock. Ferner beruht das Auftreten einer Myeloproliferation bzw. Myelodysplasie *in vivo* auf einer *Runx1*-Defizienz (Hayashi et al., 2000; Woolf et al., 2003; Sun und Downing, 2004; Lorsbach

et al., 2004; Ichikawa et al., 2004; Gowney et al., 2005; Putz et al., 2006; Heller, 2008). Weitere Studien liefern Erkenntnisse über den Beitrag von Runx1 zur Homöostase der HSC. So kann eine vergrößerte Population an ruhenden HSC im Knochenmark von *Runx1*-defizienten Mäusen verzeichnet werden, wodurch eine negative Regulation der ruhenden Stammzellen durch Runx1 angedeutet wird (Ichikawa et al., 2008).

1.3.2.4 RUNX1-Mutationen in Leukämien

RUNX1 ist eines von den in Leukämien am häufigsten deregulierten Genen und gehört zu derjenigen Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die von verschiedenen chromosomalen Abberationen wie Translokationen, Mutationen und Amplifikationen betroffen ist (Blyth et al., 2005; Mikhail et al., 2006). Balancierte Translokationen machen dabei einen Großteil der Aberrationen aus und kommen zu 20-25% in AML- sowie zu 25% in pädiatrischen ALL-Patienten vor (Dash und Gilliland, 2001; Speck und Gilliland, 2002). Translokationen, welche den CBF-Transkriptionskomplex betreffen, sind beispielsweise t(8;21) (RUNX1-ETO), t(3;21) (RUNX1-EVI1; *Ecotropic Viral Integration Site 1*) und t(12;21) (ETV6-RUNX1) sowie inv(16) (CBF β -SMMHC; *Smooth Muscle Myosin Heavy Chain*). ETV6-RUNX1 tritt in 20% bei Pro-B-ALL bei Kindern auf und scheint dominant-negativ zu agieren (Golub et al., 1995; Romana et al., 1995a,b; Hiebert et al., 1996; Zelent et al., 2004; Fischer et al., 2005). Der ETO-Anteil vom Fusionsprotein RUNX1-ETO, welches in 10-20% aller AML-Fälle auftritt und in 30% mit dem Subtyp M2 der AML assoziiert ist, rekrutiert ebenso wie ETV6 nukleäre Corepressorkomplexe zu den CBF-Promotoren und inhibiert dadurch die Transkription des Wildtypallels (Miyoshi et al., 1991; Gelmetti et al., 1998; Westendorf et al., 1998; Mrozek et al., 2004). Weitere Aberrationen, die zu dominant-negativen Fusionsproteinen führen, sind die in AML des Subtyps M4Eo vorwiegend vorliegende Formen inv(16) und t(16;16) (Durst und Hiebert, 2004). Gemeinsam ist diesen Fusionsprodukten daher die dominant-negative Inhibition des Wildtypproteins in akuten Leukämien. *Knock-in*-Versuche von RUNX1-ETO und CBF β -SMMHC ergeben den gleichen Phänotyp wie *Runx1*- und *Cbfb*-*Knock-out*-Modelle, welcher sich als kompletten Verlust der definierten Hämatopoese zeigt (Castilla et al., 1996; Wang et al., 1996; Yergeau et al., 1997; Okuda et al., 1998). Diese Genaberrationen von CBF spielen bei der Pathogenese eine wichtige Rolle, sind aber alleinig nicht ausreichend, um eine AML zu induzieren. So führt beispielsweise die Expression von RUNX1-ETO in hämatopoetischen Vorläuferzellen *in vivo* zunächst nicht zu einer AML, erst nach der Einführung von Zweitmutationen erfolgt eine Leukämogenese. Allerdings kann eine Expansion der Zellen des myeloiden Kompartiments *in vivo* erfasst werden. Bei *in vitro*-Versuchen ist die Immortalisierung von Vorläuferzellen durch die Expression

von RUNX1-ETO möglich, wobei die Frage offen bleibt, ob dieses Fusionsprotein ein Transkriptionsprogramm induziert, welches für den immortalisierten Phänotyp *in vitro* verantwortlich ist, oder ob der Phänotyp durch einen Differenzierungsblock auf der Stufe der HSC, die zur Selbsterneuerung befähigt sind, bedingt ist (Higuchi et al., 2002; Mulloy et al., 2002; de Guzman et al., 2002; Schwieger et al., 2002; Tonks et al., 2003; Fenske et al., 2004).

Neben der Analyse von Translokationen ergeben weitreichende Untersuchungen von Patienten mit einer leukämischen Erkrankung in Hinblick auf *RUNX1* weitere Aberrationen wie Punktmutationen und Gendelektionen. Diese sind allerdings nicht nur in akuten Leukämien, die *de novo* entstanden sind, sondern auch bei vorangegangenen Erkrankungen wie dem myelodysplastischen Syndrom (MDS) und der FPD zu verzeichnen. Die nachfolgende Tabelle 1.2 bietet eine Übersicht über die Patientenstudien, welche diese *RUNX1*-Mutationen in hämatopoetischen Erkrankungen untersuchten, wobei der Schwerpunkt auf die Auswertung der Daten bezüglich Mutationen in AML- und MDS-Patienten liegt, da diese Mutationen bei anderen Krankheitsbildern ein eher seltenes Ereignis zu sein scheinen. Unterschieden wird bei der Auflistung zwischen den zu einem Aminosäureaustausch führenden Punktmutationen der N- (a) oder C-terminalen Region (c) und Mutationen, die zum Auftreten eines vorzeitigen Stoppcodons, zur Verschiebung des Leserasters oder zu Insertionen und Deletionen unter Erhalt des Leserasters führen (b = N-terminal, d = C-terminal). Während in der Runt-Domäne lokalisierte Mutationen meist einen Aminosäureaustausch oder das Auftreten eines Stoppcodons bedingen, verursachen C-terminale Mutationen selten einen Aminosäureaustausch. Eine Verschiebung des Leserasters im C-terminalen Bereich führt allerdings häufig nicht zu einer Verkürzung des Proteins mit einer kurzen Sequenz außerhalb des Leserasters, sondern zu einer Ausweitung dieser neu entstandenen Sequenz auf eine Länge von bis zu 200-350 Aminosäuren. In der Abbildung 1.6 ist eine schematische Übersicht der verschiedenen *RUNX1*-Mutanten und ihrer biologischen Wirkung dargestellt.

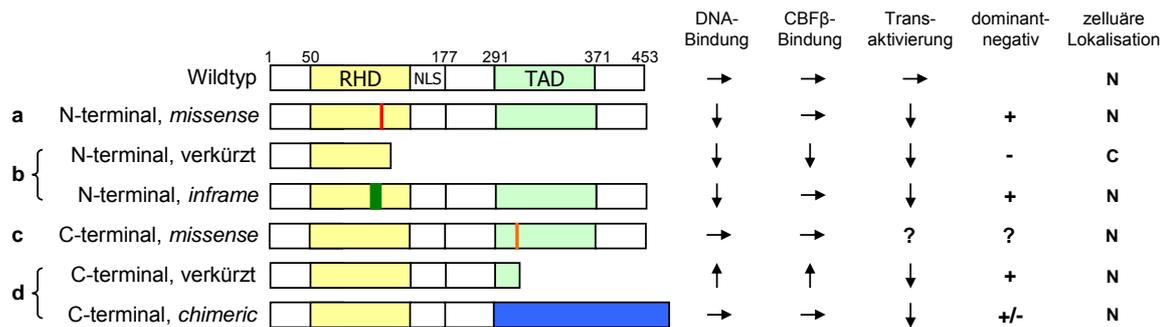


Abbildung 1.6: Struktur und biologische Funktion der verschiedenen RUNX1-Mutanten

Diese Abbildung bietet einen Überblick über verschiedene, zuvor beschriebene RUNX1-Mutanten und ihre Funktionalität sowie der zellulären Lokalisation.

(RHD = Runt-Homologiedomäne; NLS = nukleäre Lokalisationssequenz; TAD = Transaktivierungsdomäne; *missense* = zu einem Aminosäureaustausch führende Punktmutation; *inframe* = Mutation unter Erhalt des Leserasters; *chimeric* = chimäres Protein mit einer verlängerten Sequenz außerhalb des Leserasters)

(modifiziert nach Harada und Harada, 2009)

In der Runt-Homologiedomäne lokalisierte Punktmutationen resultieren in einem Aminosäureaustausch und damit verbundenen Funktionsdefekt, häufig die DNA-Bindungskapazität, aber nicht die Heterodimerisierung mit CBFβ betreffend. Untersuchungen dieser RUNX1-DNA-Bindungsmutanten (RUNX1-DBM) lassen vermuten, dass bei diesen aufgrund der gestörten DNA-Bindung, aber der noch vorhandenen Interaktion mit CBFβ die Stabilität dieses Komplexes erhöht und die Affinität der RUNX1-DBM verstärkt ist. Eine antagonisierende Wirkung gegenüber dem Runx1-Wildtypprotein wird durch die nachgewiesene Inhibition der Transkriptionsaktivität der Wildtypform von Runx1 bestätigt (Osato et al., 1999; Imai et al., 2000; Tahirov et al., 2001; Michaud et al., 2002). Die Bestätigung des onkogenen Potentials erfolgt durch *in vivo*-Versuche, wobei allerdings eine für die jeweilige Mutation charakteristische klinische Symptomatik dadurch nicht erklärt werden kann, was für einen unterschiedlichen molekularen Mechanismus spricht (Watanabe-Okochi et al., 2008). Erst die Expression von RUNX1-Mutaten in humanen CD34-positiven Zellen führt zu einem für die jeweilige Mutante charakteristischen MDS/AML-Phänotyp (Ding et al., 2009; Harada und Harada, 2009). Zwar können andere *in vivo*-Versuche im murinen Modell die Antagonisierung der Aktivität des Wildtypproteins durch eine andere RUNX1-DBM nicht nachweisen, aber es zeigt sich eine Beeinflussung der Ausreifung des erythroiden Kompartiments, in welchem Runx1 normalerweise herunterreguliert ist. Ferner weisen Vorläuferzellen des Knochenmarks, welche diese RUNX1-DBM exprimieren, *in vitro* ein erhöhtes Replattierungsvermögen auf, welches durch das Auftreten von Myeloblasten und dysplastischen Vorläuferzellen gekennzeichnet ist und von einer Interaktion mit CBFβ unabhängig zu sein scheint (Cammenga et al., 2007).

C-terminal verkürzte Formen weisen vermutlich eine dominant-negative Wirkung auf die Transaktivierungsaktivität auf, die auf einer onkogenen Wirkung aufgrund des Verlusts der normalen Funktion beruht. Bezüglich der C-terminalen RUNX1-Mutanten wird eine verstärkte DNA-Bindung aufgrund des Fehlens der inhibitorisch wirkenden Domäne sowie wiederum eine starke Interaktion mit CFB β nachgewiesen (Harada et al., 2004). Das Auftreten N- und C-terminal verkürzter Proteinformen *in vivo* ist allerdings nicht eindeutig geklärt. Es wird vermutet, dass eine zu einem frühzeitigen Stoppcodon führende Punktmutation ein Nullallel, d.h. den kompletten Verlust der Genfunktion aufgrund des Fehlens des Genprodukts oder der Expression eines nicht funktionalen Genprodukts, zur Folge hat (Matheny et al., 2007; Harada und Harada, 2009). In einigen der in Tabelle 1.2 aufgeführten Patientenstudien wurden nur Mutationen der Runt-Domäne einbezogen (wie z.B. Preudhomme et al., 2000), so dass C-terminale Mutationen nicht in dem Ausmaß erfasst werden konnten, in welchem sie eventuell vorkommen. Allerdings zeigen Untersuchungen bezüglich C-terminaler RUNX1-Mutationen, dass diese in AML-Patienten selten auftreten und eher auf MDS-Patienten beschränkt zu sein scheinen (Harada et al., 2004).

Tabelle 1.2: Übersicht ausgewählter Patientenstudien zu RUNX1-Mutationen

Die beschriebenen RUNX1-Mutationen werden eingeteilt in Punktmutationen in der N- (a) oder C-terminalen Region (c), die zu einem Aminosäureaustausch führen, und Mutationen, welche eine andere Veränderung des RUNX1-Proteins bedingen (N-terminal = b; C-terminal = d). Zu letzteren werden das Auftreten eines vorzeitigen Stoppcodons, die Verschiebung des Leserasters sowie Insertionen und Deletionen unter Erhalt des Leserasters gezählt.

(M0 = AML-Subtyp M0; CML = chronisch myeloide Leukämie; still = Punktmutation, die zu keinem Aminosäureaustausch führt; ET = essentielle Thrombozytopenie; n.b. = nicht bestimmt; +21 = Trisomie 21; k.A. = keine Angabe möglich; CMML = chronisch myelomonozytäre Leukämie; MPS = myeloproliferatives Syndrom)

¹inklusive Patienten mit sekundärer AML

²inklusive Patienten mit sekundärem MDS, z.T. Überlebende der A-Bombe (Hiroshima; im Umkreis von 3 km)

Anzahl der Patienten	Patienten mit <i>RUNX1</i> -Mutation	Mutation und Frequenz	Auftreten von <i>RUNX1</i> -Mutationen	Referenz
160, davon: 109 AML (9 M0) 37 ALL 8 CML 6 MDS	6 AML (3 M0)	a (4 von 6; 1 still) b (2 von 6)	monoallelisch (4 von 4) biallelisch (2 von 2)	Osato et al., 1999
	1 ALL	a (1 von 1; still)	monoallelisch	
	1 CML	a (1 von 1)	monoallelisch	
300, davon: 131 AML (41 M0) 41 ALL 31 CML 3 ET 94 MDS	9 AML-M0	a (3 von 9) b (5 von 9) a und b (1 von 9)	biallelisch (8 von 9; 1 n.b.)	Preudhomme et al., 2000
	3 AML (+21), 1 ET/AML (+21), 1 CML (+21)	a (3 von 5) b (2 von 5)	monoallelisch (4 von 5)	
37 MDS	1 MDS/AML 1 CMML	a (1 von 2) b (1 von 2)	monoallelisch	Imai et al., 2000
k.A.	8 AML-M0	a (2 von 8) b (3 von 8) d (3 von 8)	monoallelisch (7 von 8)	Yeoh et al., 2000 (aus Roumier et al., 2003a)
61 AML (41 M0)	6 AML-M0	a (3 von 6) b (3 von 6)	monoallelisch (5 von 6)	Langabeer et al., 2002
	1 AML-M7	b (1 von 1)	monoallelisch	
96, davon: 27 AML-M0 15 AML-M7 8 myeloid (+21) 16 MDS 18 ET 12 CML	8 AML-M0	a (3 von 8) b (5 von 8)	biallelisch	Roumier et al., 2003a
	1 MF/AML	a (1 von 1)	monoallelisch	
	1 CML/AML	a (1 von 1)	monoallelisch	
18 AML (17 M0)	6 AML-M0	a (1 von 6) b (1 von 6) Deletionen (4 von 6)	biallelisch (4 von 6)	Silva et al., 2003
	1 AML-M1 (+21)	a (1 von 1)	monoallelisch	
59 AML-M0	16 AML-M0	a (5 von 16) b (10 von 16) a und b (1 von 16)	biallelisch (15 von 16)	Roumier et al., 2003b
241, davon: 100 AML (4 M0) 30 MDS 5 CML 106 ALL	6 AML (2 M0)	a (4 von 6; 1 still) b (2 von 6)	monoallelisch (5 von 6)	Taketani et al., 2003
	1 ALL	a (1 von 1; still)	monoallelisch	
51 AML-M0	8 AML-M0	a (1 von 8) b (7 von 8)	monoallelisch (6 von 8)	Matsuno et al., 2003
354, davon: 115 AML ¹ 160 MDS ² 51 MPS 23 CML 28 ALL	1 AML-M0	b (1 von 1)	n.b.	Harada et al., 2003; Harada et al., 2004
	4 sekundäre AML	a (2 von 4) b (2 von 4)	monoallelisch (2 von 4; 2 n.b.)	
	15 MDS	a (3 von 15; 1 still) b (4 von 15) d (8 von 15)	n.b.	

Fortsetzung der **Tabelle 1.2:**

Anzahl der Patienten	Patienten mit <i>RUNX1</i> -Mutation	Mutation und Frequenz	Auftreten von <i>RUNX1</i> -Mutationen	Referenz
354	12 sekundäre MDS	a (9 von 12; 2 still) b (2 von 12) d (1 von 12)	monoallelisch (4 von 12; 8 n.b.)	Harada et al., 2003; Harada et al., 2004
170, davon: 74 AML 85 MDS	1 AML 4 MDS	b (1 von 1) a (1 von 4; still) b (3 von 4)	monoallelisch monoallelisch (4 von 4)	Nakao et al., 2004
1740, davon: 619 AML (185 M0) 362 MDS 227 ALL 122 CML 54 MPS (24 ET) 358 weitere	53 AML (39 AML-M0) 33 MDS 3 ALL 2 CML 1 ET 10 weitere	a oder b (93 von 102) c oder d (11 von 102)	biallelisch (27 von 102)	
140, davon: 51 sekundäre AML 89 sekundäre MDS	22 AML bzw. MDS	a (7 von 22) b (6 von 22) c (2 von 22) d (7 von 22)	monoallelisch (22 von 22)	Christiansen et al., 2004
52 MDS	5 MDS	a (3 von 5) b (2 von 5)	monoallelisch (4 von 5)	Steensma et al., 2005
5 sekundäre MDS	1 MDS	d (1 von 1)	monoallelisch	Klymenko et al., 2005
45 AML1-M0	12 AML-M0	a (4 von 12) b (7 von 12) a und b (1 von 12)	biallelisch (12 von 12)	Roumier et al., 2006
52 AML-M0	16 AML-M0 (+13, 7 von 16)	a (4 von 16) b (3 von 16) a oder b (9 von 16)	biallelisch (4 von 4) monoallelisch (2 von 3) n.b.	Silva et al., 2007
132 MDS	16 MDS	a (4 von 16) b (5 von 16) c (3 von 16) d (4 von 16)	monoallelisch (15 von 16)	Chen et al., 2007
	2 MDS/AML	d (2 von 2)	monoallelisch	
35 AML-M0	13 AML-M0	a (6 von 13) b (3 von 13) d (1 von 13) Deletion (3 von 13)	biallelisch (5 von 6) biallelisch (3 von 3) monoallelisch (1 von 1) biallelisch (3 von 3)	Silva et al., 2009
470 AML (ohne M3)	62 AML (4 M0)	a (17 von 62) b (10 von 62) c (4 von 62) d (26 von 62) a und b (2 von 62) a und d (3 von 62)	monoallelisch (13 von 17) monoallelisch (10 von 10) monoallelisch (4 von 4) monoallelisch (26 von 26) biallelisch (2 von 2) biallelisch (2 von 3)	Tang et al., 2009
269 MDS	26 MDS	k.A.	k.A.	Dicker et al., 2010

Aus den zusammengefassten Daten ergibt sich, dass Mutationen von *RUNX1* in den untersuchten AML1-Patienten, welche den Subtyp M0 aufweisen, zu 24% auftreten und fast ausschließlich in der Runt-Homologiedomäne lokalisiert sind. 36% der N-terminal gelegenden Mutationen resultieren in einem Aminosäureaustausch und damit verbundenen die DNA-Bindungs Kapazität betreffenden Funktionsdefekt (RUNX1-DBM). Die übrigen Mutationen bedingen einen Funktionsverlust der Runt-Domäne durch eine Insertion oder Deletion, einen Leserasterschub oder das vorzeitige Auftreten eines Stoppcodons. Ein Nukleotidaustausch, welcher nicht zu einem Aminosäureaustausch führt (stille Mutation), kann für ein abnormales Spleißen und einen Funktionsverlust des Proteins verantwortlich sein (Roumier et al., 2003a; Osato, 2004). C-terminale Mutationen bei AML1-M0-Patienten werden insgesamt nur in vier Fällen erfasst, wobei dies allerdings auf die Durchführung der einzelnen Studien zurückzuführen sein könnte (s.o.). *RUNX1*-Mutationen in AML1-M0-Patienten treten mit einer Frequenz von 67% biallelisch auf. Hierbei werden sowohl homozygote als auch heterozygote biallelische Mutationen beschrieben, wobei bei letzteren auf dem zweiten Allel häufig eine Deletion von *RUNX1* zu verzeichnen war. So zeigen innerhalb der untersuchten AML-M0-Fälle 6 von 9 (Preudhomme et al., 2000) und 10 von 16 (Roumier et al., 2003b) sowie 10 von 12 Patienten (Roumier et al., 2006) eine solche Deletion und somit eine vollständige Inaktivierung der normalen RUNX1-Funktion.

Eine Studie, welche sich vorwiegend mit dem Krankheitsbild MDS mit Progression zur AML (MDS/AML) beschäftigt, ergibt, dass in primären MDS Mutationen von *RUNX1* zu 8%, in sekundären MDS hingegen zu 45% nachgewiesen werden können, wobei eine solche Mutation mit einer schlechteren Prognose einhergeht (Harada et al., 2004). MDS gehören einer Gruppe heterogener klonaler Erkrankungen des hämatopoetischen Systems an, bei der aufgrund einer ineffektiven Blutbildung im peripheren Blut eine Zytopenie und im Knochenmark meist eine Hyperzellularität zu verzeichnen ist. Eine Einteilung dieser heterogenen Gruppe von Erkrankungen erfolgt nach der WHO-Klassifikation (Harris et al., 1999; Vardiman et al., 2003). MDS sind zu 90% eine primäre Erkrankung, können aber auch als Folge einer Chemo- und/oder Strahlentherapie oder nach Exposition mit bestimmten Umweltgiften auftreten, wobei eine Progression in eine AML häufig ist. Diese Stammzellerkrankung kann zu einer Klonalität sowohl der myeloiden und/oder lymphoiden Reifungsreihe als auch nur in granulozytären und monozytären Zellen führen. Initial ist vorwiegend die Erythropoese betroffen, wodurch es zum Auftreten einer Symptomatik kommt (Fenaux et al., 1996a,b). Bei MDS-Patienten werden neben den *RUNX1*-Mutationen strukturelle und numerische Veränderungen beschrieben, die z.T. auch für den Phänotyp der AML charakteristisch sind, z.B. Monosomie 5 und 7 oder Translokation t(1;3) (de Greef und Hagemeijer, 1996; Kelly und Gilliland, 2002). Der Grund für die neoplastische

Transformation der betroffenen Stammzelle ist allerdings nicht klar zu benennen, obwohl intensiv nach einem klassischen Tumorsuppressorgen in den beschriebenen Bereichen gesucht wurde. Vermutet wird, dass die Entstehung eines MDS durch die Ansammlung altersbedingter Defekte wie Mutationen von FLT3, N-RAS (*Neuroblastoma RAS*), Inaktivierung von p53 oder Defekte der DNA-Reparaturenzyme bedingt ist. Ferner wird ein Mechanismus der Haploinsuffizienz für einen bestimmten Genlocus in Betracht gezogen (Hirai et al., 1988; Nakagawa et al., 1991; Ludwig et al., 1992; Kelly und Gilliland, 2002; Niimi et al., 2006; Harada und Harada, 2009). Insgesamt ergeben die aufgeführten Studien für *RUNX1*-Mutationen in MDS-Patienten eine Frequenz von 9%, wobei dies in der Auswahl der untersuchten Fälle begründet sein kann. Für MDS/AML-Patienten wird eine Inzidenz von 10-20% angegeben (Harada und Harada, 2009). Neben Mutationen in der Runt-Homologiedomäne (64%) werden in Fällen von MDS eine größere Anzahl an C-terminalen Mutationen beschrieben, die mit dem sporadischen Auftreten der Erkrankung assoziiert zu sein scheinen. Eine Verschiebung des Leserasters im C-terminalen Bereich führt bei etwa der Hälfte der untersuchten MDS-Fälle zu einer Ausweitung dieser neu entstandenen Sequenz (*chimeric*, siehe Abbildung 1.6). Im Gegensatz zu den in den aufgeführten Studien untersuchten AML-M0-Fällen treten *RUNX1*-Mutationen in MDS-Patienten, bei welchen eine Aussage diesbezüglich getroffen werden kann, zu 93% in nur einem Allel auf. Dies lässt eine ähnliche Progression der Erkrankung, die in eine AML münden kann, wie bei der Erkrankung FPD/AML vermuten, bei welcher der Status der Haploinsuffizienz als präleukämischer Zustand angesehen wird.

Die FPD/AML ist eine seltene autosomal-dominant vererbte Erkrankung, welche durch die heterozygote Mutation von *RUNX1* bedingt und bei 28 Familien beschrieben ist, in denen Frauen und Männer gleichermaßen betroffen sind. In einer Familie kann das Auftreten der FPD/AML nicht auf eine *RUNX1*-Mutation zurückgeführt werden, allerdings sind eine Monosomie 7 sowie eine Trisomie 8 nachzuweisen (Minelli et al., 2004). Charakteristika dieser Erkrankung sind eine milde Thrombozytopenie sowie -pathie bei normaler Größe und Morphologie, aber mit einer erhöhten Blutungsneigung und das lebenslange Risiko des Auftretens eines MDS und verschiedener Subtypen einer AML (M1, M2, M4 und M5). Die Ausprägung der Symptomatik ist sehr heterogen, ferner werden Fälle ohne Auffälligkeiten bezüglich der Thrombozyten beschrieben (Owen et al., 2008). Verminderte Expressionslevels des Thrombopoetin-MP1-Rezeptors werden mit den niedrigen Thrombozytenzahlen in Verbindung gebracht (Heller et al., 2005). Die Frequenz einer Leukämogenese ist in Familien mit einer vermeintlich dominant-negativ wirkenden Punktmutation in der Runt-Domäne wesentlich höher als bei jenen mit einem kompletten *RUNX1*-Verlust (Osato, 2004). In vier Fällen ist das Auftreten einer T-ALL beschrieben, der sich bei einem Patienten eine

AML anschloss (Owen et al., 2008; Preudhomme et al., 2009; Nishimoto et al., 2010). Dies spiegelt die Bedeutung von RUNX1 in der myeloiden sowie lymphoiden Zellentwicklung und -differenzierung wider. Die Rate der myeloiden Erkrankungen innerhalb der Familien liegt zwischen 20% und 65%, die Inzidenz insgesamt für die Entwicklung eines MDS bzw. einer AML beträgt 35%. Das mittlere Alter der Leukämogenese liegt bei 33 Jahren, wobei sich der Zeitraum einer beschriebenen Erkrankung aber von 5-75 Jahren erstreckt (Heller, 2008; Jongmans et al., 2010). Die nachfolgende Tabelle 1.3 gibt eine Übersicht der auf einem Allel auftretenden *RUNX1*-Mutationen der Keimbahn, welche in den FPD/AML-Patienten beschrieben und meist einzigartig sind.

Tabelle 1.3: Übersicht der beschriebenen FPD/AML-Fälle

Beschriebene *RUNX1*-Mutationen umfassen Mutationen, die zu einem Aminosäureaustausch in der N-terminalen Region (a) führen und die aufgrund eines vorzeitigen Stoppcodons oder einer Leserasterverschiebung zu einer Veränderung des RUNX1-Proteins führen (N-terminal = b; C-terminal = d). Weiterhin wurden intragenetische Deletionen nachgewiesen, von denen *RUNX1* betroffen war.

(* = als vererbte Thrombozytopenie diagnostiziert)

Mutation und Frequenz (Anzahl der betroffenen von den untersuchten Familien bzw. Anzahl der Patienten)	Referenz
Chromosom 21q22 betroffen (1 von 1)	Downton et al., 1985; Ho et al., 1996
Chromosom 21q22 betroffen (1 von 1)	Arepally et al., 1998
Deletion von <i>RUNX1</i> (1 von 6) b (3 von 6) a (2 von 6)	Song et al., 1999
a (1 von 1)	Buijs et al., 2001
a (1 von 3) b (1 von 3) d (1 von 3)	Michaud et al., 2002
a (1 von 1)	Walker et al., 2002*
b (1 von 1)	Sun et al., 2004*
d (1 von 1)	Heller et al., 2005
d (1 von 1)	Kirito et al., 2008
b (1 von 2) Deletion in Chromosom 21q22, inklusive <i>RUNX1</i> (1 von 2)	Beri-Dexheimer et al., 2008
Deletionen in Chromosom 21q22.12, <i>RUNX1</i> umfassend (3 Patienten)	Shinawi et al., 2008*
d (2 von 5) b (2 von 5) a (1 von 5)	Owen et al., 2008
a (2 von 4) d (1 von 4) Deletion von <i>RUNX1</i> (1 von 4)	Preudhomme et al., 2009
intragenetische Duplikation, die Exons 2-6 und somit die Runt-Domäne umfassend (1 von 2) Deletion unter Erhalt des Leserasters, Exon 5 und somit die Runt-Domäne betreffend (1 von 2)	Jongmans et al., 2010
b (1 von 1)	Nishimoto et al., 2010

Insgesamt können bei 19 von 28 Familien Mutationen erfasst werden, welche die Runt-Homologiedomäne betreffen und daher zu einer Beeinflussung der DNA-Bindungskapazität sowie der Heterodimerisierung mit CBF β führen können. Weiterhin werden Mutationen der C-terminalen Region, welche die Transaktivierungsdomäne beinhaltet, und Deletionen von *RUNX1* sowie auch benachbarter Gene auf dem

Chromosom 21 beschrieben. Die Analyse von Zellen des Knochenmarks und des peripheren Blutes von Patienten ergibt eine verminderte Fähigkeit zur Bildung megakaryozytärer Kolonien und zeigt so die Dosisabhängigkeit der Megakaryopoese von der *RUNX1*-Expression. Eine der beschriebenen *RUNX1*-Deletionen scheint im Zusammenhang mit angeborener Thrombozytopenie in Verbindung mit mentaler Retardierung und Entwicklungsverzögerung zu stehen (Song et al., 1999; Beridexheimer et al., 2008; Heller, 2008; Owen et al., 2008). Obwohl diese Patienten eine *RUNX1*-Mutation der Keimbahn tragen, entwickeln sie nur im höheren Alter eine Leukämie, wobei erworbene zytogenetische Abnormalitäten in Knochenmarkszellen festgestellt werden, welche für die Pathogenese notwendig zu sein scheinen. Solche Abnormalitäten, die in Patienten beschrieben sind, die eine myeloide Neoplasie entwickelt haben, umfassen Deletionen von 5q, 7 bzw. 7q, 11q und 20q sowie Trisomie 8 und 21, ferner 11q23-Änderungen. Weiterhin werden bei einer Studie von acht FPD/AML-Patienten in sechs Fällen im verbliebenen *RUNX1*-Allel zusätzliche Mutationen wie Punktmutationen (67%), aber auch Duplikationen des veränderten *RUNX1*-Allels durch eine erworbene Trisomie 21 gefunden (Preudhomme et al., 2009). Dies lässt vermuten, dass eine Progression zur AML durch sekundäre Mutationen, die ebenfalls *RUNX1* betreffen, gefördert wird. Ähnliches wird auch für C/EBP α als wichtigen Transkriptionsfaktor in der Hämatopoese beschrieben (Pabst et al., 2008). Dies unterstreicht die Bedeutung von biallelischen Mutationen von wichtigen Transkriptionsfaktoren in der Hämatopoese bei der Entwicklung einer akuten Leukämie.

Mit Hinblick auf *RUNX1*-Mutanten liegt die Vermutung nahe, dass eine durch Mutationen bedingte Haploinsuffizienz für eine Prädisposition zur Leukämogenese verantwortlich ist. Es zeigte sich allerdings, dass in FPD/AML-Familien mit einer vermeintlich dominant-negativen *RUNX1*-DBM eine leukämische Erkrankung mit einer deutlich höheren Frequenz auftritt als bei Familien mit einer kompletten Deletion von *RUNX1*, was auf dem Funktionsgewinn dieser Mutante beruhen könnte (Osato, 2004). Die Hypothese eines Funktionsgewinns wird ebenfalls bezüglich der Wirkung von *RUNX1*-DBM und den CBF-Komplex betreffenden Fusionsproteinen aufgestellt (Cammenga et al., 2007; Hyde und Liu, 2010). Zusammenfassend ist zur Rolle von *RUNX1* in AML zu sagen, dass der Verlust der *RUNX1*-Funktion in der Prädisposition zur Entwicklung einer akuten Leukämie bedeutend ist, zusätzliche zytogenetische Abnormalitäten aber erforderlich zu sein scheinen. Ein biallelischer Verlust von *RUNX1*, der in AML1-M0-Patienten häufig beschrieben ist, trägt zur Progression und Schwere der Erkrankung bei.

1.4 Fragestellung

Die Kontrolle von Wachstum und Differenzierung einer einzelnen Zelle ist in einem lebenden Organismus streng reguliert. Bei einer Fehlregulation von Faktoren, die im hierarchischen hämatopoetischen System eine entscheidende Rolle spielen, kann dies zur Entstehung einer Leukämie führen. Die Erforschung der grundlegenden Prozesse der Pathogenese hierbei ist eine wichtige Voraussetzung für das Verständnis der Erkrankung sowie für die Entwicklung therapeutischer Ansätze.

Aberrationen in AML-Patienten betreffen häufig RUNX1 als einen streng regulierten Transkriptionsfaktor, welcher in der embryonalen Hämatopoese eine essentielle und im adulten Stadium eine noch nicht vollständige entschlüsselte, aber für die Differenzierung einzelner Reifungslinien entscheidende Rolle einnimmt. Neben chromosomalen Translokationen sind auch mono- und biallelische Mutationen des Gens beschrieben, welche mit einer hohen Inzidenz bei einer AML mit minimalen Zeichen der Differenzierung (Subtyp M0) auftreten und häufig mit einer Mutation des FLT3-Rezeptors assoziiert sind. FLT3 kodiert für eine Rezeptortyrosinkinase, welche in der Hämatopoese bei der Differenzierung, Zellteilung sowie Apoptose von entscheidender Bedeutung ist. Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein Mausmodell entwickelt werden, welches die Untersuchung des Zusammenwirkens von RUNX1-Mutationen und einer aktivierten Tyrosinkinase wie FLT3-ITD in akuten Leukämien ermöglichte.

Zur Klärung der Frage, ob die Expression von FLT3-ITD in *Runx1*-defizienten hämatopoetischen Zellen für die Entwicklung einer leukämischen Erkrankung ausreichend ist, sollte FLT3-ITD mittels des retroviralen Gentransfers in hämatopoetische Vorläuferzellen eingebracht werden. Nach der Transplantation in letal bestrahlte Empfängermäuse sollten diese transduzierten Zellen die Hämatopoese in den Tieren ausbilden, während eine Expression von FLT3-ITD erfolgte. Neben *Runx1^{fl/fl}-Mx1Cre*-Zellen wurden als Kontrolle hämatopoetische Vorläuferzellen mit einer Wildtypexpression von *Runx1* sowie heterozygote Zellen verwendet, wobei letztere einen Zustand der Haploinsuffizienz von *Runx1* darstellen sollten. Zusätzlich zur alleinigen Expression von FLT3-ITD sollte eine in AML-Patienten beschriebene RUNX1-Mutante, welche die DNA-Bindung dieses Transkriptionsfaktors beeinflusst, zusammen mit der konstitutiv aktivierten Tyrosinkinase in *Runx1^{fl/fl}-Mx1Cre*-Zellen sowie in *Runx1*-exprimierende hämatopoetische Vorläuferzellen eingebracht werden. Zum einen sollten hierbei die synergistischen Effekte *in vivo* untersucht werden, zum anderen sollte geklärt werden, ob die verwendeten RUNX1-DBM eine dominant-negative Wirkung gegenüber der Wildtypform von *Runx1* aufweist oder ob sich Rückschlüsse auf einen Funktionsgewinn dieser Mutante ziehen lassen. Zur Absicherung der Rolle der RUNX1-DBM bei der Entwicklung einer leukämischen

Erkrankung sollte diese ohne FLT3-ITD in *Runx1^{fl/fl}-Mx1Cre*- sowie in *Runx1*-exprimierende Zellen eingebracht und die Wirkungsweise *in vivo*, im Besonderen den Einfluss auf die Myelopoese, analysiert werden.

Innerhalb eines Beobachtungszeitraums von maximal 200 Tagen sollten die auftretenden Erkrankungen der Versuchstiere makro- und mikroskopisch untersucht werden. Mittels durchflusszytometrischer Analysen sollte erfasst werden, in welchen Reifungsreihen es durch die eingebrachten Mutanten zu unkontrollierter Zellteilung und gestörter Differenzierung kam, so dass eine Einordnung der auftretenden Phänotypen möglich war. Die hämatopoetischen Organe nicht erkrankter Versuchstiere und der Kontrollen sollten ebenfalls einer Untersuchung unterzogen werden. Ferner sollten Retransplantationsversuche sowie *in vitro*-Experimente zur Ermittlung der Repopulierungsfähigkeiten und Proliferationskapazität unter Selbsterhalt der entnommenen leukämischen Zellen angestrebt werden. Klonalitätsanalysen sollten Aufschluss darüber geben, ob es sich bei den entstandenen Erkrankungen um mono- oder polyklonale Ereignisse handelte und ob kooperierende Mutationen einen Einfluss auf die Pathogenese hatten.

2 Material und Methoden

2.1 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

Die verwendeten Plastikwaren stammten von den Firmen Sarstedt (Nümbrecht), Greiner (Solingen), TPP (Trasadingen, Schweiz), Eppendorf (Hamburg), Biozym (Hessisch Oldendorf) und Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA). Spritzen und Kanülen für die tierexperimentellen Methoden wurden von der Firma Braun (Melsungen) geliefert.

Sofern nicht gesondert aufgeführt, wurden die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien von den Firmen Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Merck (Darmstadt) sowie Roth (Karlsruhe) bezogen.

2.2 Restriktionsenzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme sowie deren Puffer wurden von den Firmen Fermentas (St. Leon-Rot) und New England Biolabs (Ipswich, England) bezogen. Die Reaktionsbedingungen wurden gemäß Herstellerangaben eingestellt.

2.3 Nukleinsäuren

2.3.1 DNA-Oligonukleotide

Die folgenden Oligonukleotide dienten bei einer PCR-Analyse zum Nachweis der Deletion des Exons 5 von *Runx1* sowie der *loxP*-flankierten Gensequenz und des Vorhandenseins des *Mx1Cre*-Gens unter Verwendung von genomischer DNA aus Mausorganen. Eine detaillierte Erläuterung liefert die Abbildung 3.4.

cs507 (p2) 5'-gccgggtgcaatattaagtc-3'
cs508 (p1) 5'-tagggagtgctgcttgctct-3'
cs509 (p3) 5'-ctctgggaaaccaggagtg-3'
cs282 5'-ggtgaacgtgcaaacaggctcta-3'
cs283 5'-gcttgcatgatctccggtattgaa-3'

2.3.2 Plasmide und retrovirale Vektoren

Die nachfolgend aufgelisteten Konstrukte wurden bei den experimentellen Arbeiten eingesetzt. Dabei wird zwischen im Labor hergestellten Vektoren (R) und aus anderen Quellen bezogenen Plasmide (#) unterschieden.

Helferplasmide für die Virusproduktion

- #522 pEcoenv-I-puro; Expressionsplasmid für das ecotrope *env*-Gen (*envelope*) unter Kontrolle des EF1 α -Promotors (Morita et al., 2000)
- R690 pSV40-gag-pol; Expressionsplasmid für die *gag*- (*group-specific antigens*) und *pol*- (*polymerase*) Gene des Moloney-Maus-Leukämie-Virus unter Kontrolle des SV40-Promotors (Beyer et al., 2002)

Retrovirale Konstrukte

Nähere Erläuterungen zu diesen gamma-retroviralen Vektoren werden im Abschnitt 3.1.2 vorgenommen.

- R1050 pSF91-RUNX1-R135G-i-GFP (Schwieger et al., 2002; Cammenga et al., 2007)
- R1172 pRMys-FLT3-ITD-i-RUNX1-R135G (unveröffentlichte Ergebnisse von B. Niebuhr und A. Werk)
- R1331 pRMys-i-Venus (Kitamura et al., 2003)
- R1332 pRMys-FLT3-ITD-N676K-i-Venus
- R1465 pRMys-FLT3-ITD-N676K-i-RUNX1-R135G

Bei der verwendeten RUNX1-DBM lag eine aus Patientenproben isolierte Punktmutation an Position 135 vor, die einen Austausch der Aminosäure Arginin, welche in direkten Kontakt mit der DNA bei deren Bindung steht, gegen Glycin bedingte. Diese Mutante wurde bei AML- und FPD/AML-Patienten beschrieben (Preudhomme et al., 2000; Speck und Gilliland, 2002).

Bei den Versuchen fanden eine FLT3-ITD-Sequenz, welche eine Duplikation von zehn Aminosäuren (587-596) umfasste, sowie eine Mutante der FLT3-ITD-Sequenz Anwendung, die eine in Patienten beschriebene Punktmutation in der FLT3-Kinasedomäne enthielt, welche zum Austausch der Aminosäure Asparagin an Position 676 gegen Lysin führte (Heidel et al., 2006). Diese Mutation wurde als Grund für die Resistenz der leukämischen Zellen bei einer Chemotherapie mit PKC412 angesehen. Da keine Unterschiede dieser beiden Typen von FLT3-Mutationen in der Induktion von Erkrankungen *in vivo* festgestellt werden konnten, sind die Daten zusammengefasst dargestellt.

2.4 Bakterienstämme und Kulturmedien

Für die vorliegende Arbeit wurde ausschließlich der *Escherichia coli*-Laborstamm XL10-GOLD (Stratagene, La Jolla, USA) verwendet. Die Lagerung, Kultivierung und Herstellung Transformations-kompetenter Bakterien nach der Calciumchlorid-Methode erfolgten nach Standardmethoden (Sambrook und Russel, 2001).

Die Bakterien wurden in Luria-Bertani (LB)-Medium mit einem pH-Wert von 7,5 angezüchtet, welches sich aus 1% (w/v) Bacto-Trypton (Sparks, USA), 0,5% (w/v)

Bacto-Hefeextrakt (Sparks, USA) und 0,5% (w/v) NaCl zusammensetzte. Zur Herstellung von festen bakteriellen Nährmedien in Petrischalen wurde das LB-Medium mit 1,5% Bacto-Agar (Sparks, USA) versetzt. Zur Selektion transformierter Bakterien wurde dem jeweiligen Medium Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/mL zugesetzt.

2.5 Zellen und Kulturmedien

2.5.1 Zelllinien

- 293T Derivat der humanen embryonalen Nierenzelllinie 293, in welche das Temperatur-sensitive Gen für das *SV40 (simian virus 40) large T antigen* eingebracht wurde (ATCC)
- SC-1 aus Mausembryofibroblasten gewonnene Zelllinie (ATCC)

2.5.2 Primäre Zellen

Die Gewinnung und Kultivierung von primären Zellen aus murinem Knochenmark erfolgte für Transplantationen, wie es in Abschnitt 2.11.2 und 2.11.10 beschrieben ist, und für Methylcelluloseklonierungen sowie Flüssigkulturen (siehe Abschnitt 2.10.4).

2.5.3 Zellkulturmedien

- DMEM-Medium DMEM (PAA, Pasching, Österreich)
 10% (v/v) Serum (siehe Abschnitt 2.10.1)
 4 mM Glutamin
 1 mM Natriumpyruvat
- Basalmedium IMDM (als Trockensubstanz, Invitrogen, Karlsruhe)
 5% (v/v) fötales Kälberserum (FCS) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
 1% (v/v) PenStrep (5000 U/mL Penicillin, 5000 µg/mL
 Streptomycin, Invitrogen, Karlsruhe)
 4 mM Glutamin
- SFEM-Medium *Serum Free Expansion Medium* (StemCell Technologies, Köln)
 4 mM Glutamin
 1% (v/v) PenStrep
 50 ng/mL muriner Stammzellfaktor (Peprotech, Hamburg)
 100 ng/mL humanes IL11 (Peprotech, Hamburg)
 100 ng/mL humaner FLT3-Ligand (Peprotech, Hamburg)
 10 ng/mL murines IL3 (Strathmann, Hamburg)

2.6 Versuchstiere

Die Hausmaus (*Mus musculus*, Linnaeus 1758) ist eine zu den Altweltmäusen (*Murinae*) zählende Langschwanzmaus (*Murida*) und gilt seit Beginn der systematischen Forschung als einer der wichtigsten Säugetiermodellorganismen. Die C57BL-Maus wurde 1921 von C.C. Little entwickelt, 1937 kam es zur Unterteilung in die Stämme 6 und 10. C57BL/6 ist als Inzuchtstamm klassifiziert, welcher durch die Kreuzung von nicht weniger als 20 konsekutiven Geschwisterverpaarungen entstanden ist. Dies ermöglicht eine genetische und phänotypische Uniformität der Nachkommen, mit denen sowohl Untersuchungen im Bereich der Säugetierentwicklung als auch Krankheits-bezogene Entdeckungen gemacht wurden, die auf den Menschen übertragen werden konnten. Ferner kann seit der Möglichkeit der Herstellung gezielt gentechnisch veränderter Mäuse die Auswirkung einzelner Gene auf den Gesamtorganismus untersucht werden. Die Entwicklung von zwei für das Zelloberflächenmolekül Ly5 (CD45) kongenetischer C57BL/6-Mausstämme ermöglicht die Unterscheidung von Spender- und Empfängerzellen bei Knochenmarkstransplantationsversuchen (Shen et al., 1986). An dem Modellorganismus der C57BL/6J-Maus sollte im Rahmen dieser Arbeit das Zusammenwirken von RUNX1-Mutationen und aktivierten Tyrosinkinase im hämatopoetischen System eines gesunden Organismus in Bezug auf die Entwicklung einer akuten Leukämie untersucht werden.

2.6.1 Spendermäuse

Als Spendermäuse dienten in dieser Arbeit konditionale *Knock-out*-Tiere einer Züchtung aus *Runx1^{fl/fl}* oder *Runx1^{fl/wt}* und *Mx1Cre* (Putz et al., 2006; Kuhn et al., 1995), welche in den Hintergrund des Stammes C57BL/6J mit der Antigenvariante Ly5.2 (*Ptprc^b*) (Jackson Laboratory, Maine, USA) zurückgekreuzt waren. Bei diesen Kreuzungen wurden heterozygote Weibchen mit homozygoten Männchen oder nur heterozygote Tiere miteinander verpaart, weil *Runx1^{fl/fl}-Mx1Cre*-Weibchen häufig Probleme bei der Geburt zeigten. Die Züchtung sowie Genotypisierung der Mäuse unter Verwendung von Schwanzbiopsien wurden von U. Müller (Molekulare Pathologie, Heinrich-Pette-Institut) durchgeführt. Vor Versuchsbeginn wurde der Genotyp durch eine erneute Analyse des entnommenen peripheren Blutes bestätigt.

Für die Experimente wurden somit einerseits transgene Mäuse verwendet, bei denen sowohl ein mit *loxP*-Sequenzen flankiertes *Runx1*-Gen auf einem oder beiden Allelen als auch das *Mx1Cre*-Gen vorhanden waren (*Runx1^{fl/fl}-Mx1Cre* bzw. *Runx1^{fl/wt}-Mx1Cre*). In diesen Tieren konnte mittels der Aktivierung des *Cre/loxP*-Systems (siehe Abschnitt 2.11.5) das Exon 5 von *Runx1*, welches für die Runt-Homologiedomäne kodiert, deletiert und somit *Runx1* inaktiviert werden. Andererseits standen

Wurfgeschwister (sogenannte *Littermates*) ohne Veränderung des *Runx1*-Gens (*Runx1^{wt/wt}-Mx1Cre*) zur Verfügung. Die verwendeten Spendertiere waren je nach Versuch 2-5 Monate alt.

2.6.2 Empfängerermäuse

Als Empfängerermäuse für die Transplantation der transduzierten Vorläuferzellen wurden ausschließlich Weibchen des C57BL/6J-Stammes (Jackson Laboratory, Maine, USA) im Alter von 3-6 Monaten verwendet, die im Gegensatz zu den Spendertieren die Antigenvariante Ly5.1 (SJL-Mäuse, *Ptprc^a*) trugen. So war eine Unterscheidung von Spender- und Empfängerzellen durch eine durchflusszytometrische Analyse unter Verwendung von spezifischen Antikörpern möglich.

2.7 Puffer- und Stammlösungen

Zellbiologie

1x PBS	140 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4 mit Salzsäure einstellen
Trypsinlösung	10x Konzentrat Trypsin/EDTA (Biochrom, Berlin) in Wasser

Gelelektrophorese

1x TAE-Puffer	40 mM Tris/HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA, 20 mM Essigsäure
1x TAE-Puffer (modifiziert)	40 mM Trisacetat (pH 8,0), 0,1 mM EDTA

Isolierung genomischer DNA aus Organen oder Zellen

Puffer 1	75 mM NaCl, 25 mM EDTA (pH 8)
Puffer 2	10 mM Tris/HCl (pH 8), 10 mM NaCl, 10 mM EDTA (pH 8), 1% (v/v) SDS

Southernblot-Analyse

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

2.8 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Die in der folgenden Tabelle aufgeführten Antikörper wurden gemäß den Herstellerangaben zur Färbung von murinen Zellen eingesetzt.

Antikörper	Fluorochrom	Hersteller	Klon	Katalognummer
zur Kompensation				
CD45 LCA	FITC	BioLegend	30-F11	#103108
CD45 LCA	PE	BioLegend	30-F11	#103106
CD45 LCA	APC	BioLegend	30-F11	#103112
als Isotypkontrolle				
IgG1κ	PE	BioLegend	RTK2071	#400408
IgG1κ	APC	BioLegend	RTK2071	#400412
zur Analyse				
B220	PE	BioLegend	RA3-6B2	#103208
B220	APC	BioLegend	RA3-6B2	#103212
CD3e	APC	BioLegend	145-2C11	#100312
CD4	APC	BioLegend	RM5-4	#100516
CD8	PE	Becton Dickinson	53-6.7	#553033
CD11b	PE	BioLegend	M1/70	#101208
CD19	PE	BioLegend	6D5	#115508
CD19	APC	BioLegend	6D5	#115512
CD43	APC	BioLegend	1B11	#121214
CD90.2	PE	Becton Dickinson	53-2.1	#553006
CD117	PE	Becton Dickinson	2B8	#553355
CD117	APC	BioLegend	2B8	#105812
Gr1	APC	BioLegend	RB6-8C5	#108412
IgM	PE	BioLegend	RMM-1	#406508
Ly5.1	PE	BioLegend	A20	#110708
Ly5.2	FITC	BioLegend	104	#109806
Ly5.2	APC	BioLegend	104	#109814
Ly5.2	Biotin	Becton Dickinson	104	#553771
Ter119	PE	BioLegend	Ter-119	#116208
Ter119	APC	BioLegend	Ter-119	#116212
Zweitantikörper				
Streptavidin (SA)	APC	BioLegend	-	#405207

2.9 Software

DNASar Lasergene (DNASar, Madison, USA) für DNA- und Proteinsequenzanalysen

FACSDiva (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) für die Auswertung durchflusszytometrischer Analysen

Image Access Enterprise 5 (Image Bildverarbeitung AG, Glattburg, Schweiz) für das Universalmikroskop AxioPlan 2 imaging (Carl Zeiss, Oberkochen) mit der Kamera AxioCam MRm (Carl Zeiss, Oberkochen)

SigmaPlot 10 (Systat Software Inc, San Jose, USA) für Überlebenskurven nach der Kaplan-Meier-Methode, graphische Darstellungen und statistische Auswertungen

2.10 Zellbiologische Methoden

2.10.1 Stammhaltung und Vermehrung

Die adhärennten 293T-Zellen sowie SC-1-Zellen wurden in beschichteten Zellkulturschalen bzw. -flaschen in DMEM-Medium subkonfluent gehalten. Dabei benötigten 293T-Zellen Serum Supreme oder FBS (Lonza, Basel, Schweiz), wohingegen dem Medium für die Mausfibroblasten FCS (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) zugesetzt wurde. Mediumwechsel und Subkultivierung der Zellen erfolgte im 2-2-3-Tage-Rhythmus.

2.10.2 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Die Zellen wurden in einer Dichte von $0,5-3 \times 10^6$ Zellen/mL in einer Mischung aus 90% (v/v) FCS und 10% (v/v) DMSO in einem gekühlten Einfriercontainer (Nalgene Cryo 1°C Freezing Container, Rochester, USA) in Schraubdeckelröhrchen (Nunc Cryotube, Thermo Fischer Scientific, Roskilde, Dänemark) bei -70°C eingefroren und zur Langzeitkonservierung in flüssigen Stickstoff überführt.

Die im flüssigen Stickstoff gelagerten Zellen wurden im Wasserbad (37°C) aufgetaut, in 10 mL des jeweiligen Mediums überführt und bei $300 \times g$ für 5 min zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurden die Zellen in einer entsprechenden Menge Medium aufgenommen und in Trockenbrutschränken (Heraeus, Hanau) bei 37°C in einer 5%-igen CO_2 -Atmosphäre kultiviert.

2.10.3 Zellzählung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte unter Verwendung von unverdünnten sowie verdünnten Einzelzellsuspensionen in einer Neubauer-Zählkammer.

2.10.4 Kultivierung von primären Zellen

2.10.4.1 Methylcelluloseklonierung

Die *in vitro* durchgeführte Methylcelluloseklonierung erfolgte mit Knochenmarkzellen, die entweder aus einer präparierten Maus isoliert wurden (siehe Abschnitt 2.11.6) oder zuvor eingefroren waren (siehe Abschnitt 2.10.2). Die Kultivierung der Knochenmarkzellen erfolgte für 7-14 Tage in Triplikaten in einer Zelldichte von 4×10^4 in 1 mL des semisoliden Methylcellulose-basierten Mediums (MethoCult, StemCell Technologies, Köln), welches sich in 35 mm-Schalen befand. Dafür wurde eine Zellsuspension mit einer Dichte von $4 \times 10^5/\text{mL}$ in IMDM mit 2% FCS hergestellt, von welcher 300 μL auf 3 mL des verwendeten MethoCult-Mediums gegeben wurden. Die Auswertung des Kolonienwachstums erfolgte per Auszählung sowie morphologisch am Mikroskop. Bei einer ausreichenden Koloniebildung nach der entsprechenden Kulturdauer wurden die Zellen mit 1x PBS aus den Schalen gelöst, gezählt und erneut

in der gleichen Zelldichte ausgesät. Ferner wurden Zellen für die Herstellung von Cytospins (siehe Abschnitt 2.11.9) verwendet sowie einer durchflusszytometrischen Analyse (siehe Abschnitt 2.10.7) zugeführt. Es wurden bei diesen Versuchen zwei verschiedene Medien verwendet, wobei MethoCult M3534 gebrauchsfertig war, wohingegen MethoCult M3231 vor Gebrauch 100 ng/mL muriner Stammzellfaktor (mSCF) (PeproTech, Hamburg) und 10 ng/mL murines IL3 (mIL3) (Strathmann, Hamburg) zugesetzt wurde.

2.10.4.2 Flüssigkulturen

Neben der zuvor dargestellten Methylcelluloseklonierung in einem semisoliden Medium wurde eine Kultivierung von frischen bzw. eingefrorenen Knochenmarkzellen in SFEM-Medium sowie IMDM-Medium vorgenommen, wobei letzterem zusätzlich 100 ng/mL mSCF (PeproTech, Hamburg) und 10 ng/mL mIL3 (Strathmann, Hamburg) zugesetzt wurde.

2.10.5 Herstellung retroviraler Pseudotypen

Zur transienten Produktion der viralen Partikel, welche für die Transduktion der isolierten Knochenmarkzellen verwendet werden konnten, wurden epitheliale Zellen der Verpackungszelllinie 293T mit den für die viralen Proteine kodierenden Plasmiden (*gag*, *pol* und *ecoenv*) und dem Plasmid mit der einzubringenden cDNA (siehe Abschnitt 2.3.2) transfiziert. Nach Transkription der Plasmide, intrazellulärer Translation und Assemblierung der viralen Proteine zu infektiösen Partikeln wurden diese in das Kulturmedium sezerniert, welches als Virusüberstand abgenommen werden konnte. Da die verwendeten viralen Partikel Hüllproteine trugen, die nicht von dem Ursprungsvirus stammen, spricht man virologisch von sogenannten Pseudotypen. Durch den Hüllprotein-vermittelten Tropismus konnte man mit den hergestellten Pseudotypen gezielt die Infektiösität auf bestimmte Zelltypen, hier murine hämatopoetische Vorläuferzellen, ausnutzen. Die Viruskonzentration im abgenommenen Überstand der transfizierten 293T-Zellkultur wurde durch die Anzahl der erfolgreich transduzierten und Reporter-gen-exprimierenden SC-1-Zellen ermittelt (siehe Abschnitt 2.10.6).

Das Einbringen der Expressionsplasmide in die Verpackungszellen erfolgte nach der Calcium-Phosphat-Methode (Pear et al., 1993) unter Verwendung der Reagenzien des *Profection Mammalian Transfection System Calcium Phosphate Kit* (Promega, Madison, USA). Hierfür wurden $3,5 \cdot 10^6$ 293T-Zellen in einer 9 cm-Zellkulturschale in 10 mL DMEM-Medium ausgesät, so dass am darauffolgenden Tag eine Konfluenz von 70% erreicht war. Das verbrauchte Medium wurde durch 10 mL frisches DMEM-Medium, welches 25 μ M Chloroquin enthielt, ersetzt. Aus 5 μ g der retroviralen

Plasmid-DNA, 10 µg der *gag-pol*-Plasmid-DNA sowie 3 µg der *ecoenv*-Plasmid-DNA und mit 0,25 mM Calciumchlorid wurde in einem Gesamtvolumen von 500 µL ein Gemisch mit Nuklease-freiem Wasser hergestellt. Anschließend wurde dieses Gemisch unter Luftzufuhr zur Oberflächenvergrößerung in 500 µL Präzipitationspuffer getropft. Das entstandene Calciumphosphat bildete innerhalb von 30 min mit der DNA unlösliche Präzipitate, welche nach Zugabe zu den Zellen durch Endozytose von diesen aufgenommen wurden. Nach 6-8 h Inkubationszeit wurde das Medium verworfen. Es erfolgte die Zugabe von 6 mL frischem DMEM-Medium, welchem 20 mM Hepes (Invitrogen, Karlsruhe) zugesetzt war. Am nachfolgenden Tag wurde der erste Virusüberstand abgenommen und filtriert (Millex-GP-Filter mit 0,22 µm, Millipore, Schwalbach). Für die notwendige Virustiterbestimmung wurden etwa 300 µL des Überstandes abgenommen und getrennt eingefroren. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung bei -70°C. Nach Zugabe von frischem DMEM-Medium mit 20 mM Hepes (Invitrogen, Karlsruhe) konnte nach 8 h ein weiterer Virusüberstand abgenommen werden. Dieses Vorgehen wurde am darauffolgenden Tag wiederholt, so dass insgesamt fünf Virusüberstände abgenommen wurden.

2.10.6 Bestimmung der Virustiter

Der sogenannte Virustiter als Anhaltspunkt für die Transduktionseffizienz der viralen Überstände konnte mit Hilfe von SC-1-Zellen bestimmt werden, indem pro Vertiefung einer 24-Lochschale 5×10^4 Zellen in 500 µL DMEM-Medium ausgesät, mit Polybrene (8 µg/µL; Sigma-Aldrich, Taufkirchen) in einer Verdünnung von 1:1000 sowie dem zuvor hergestellten Virusüberstand versetzt und für 1 h bei 37°C und 700 x g zentrifugiert wurden. Dabei wurden verschiedene Mengen an Überstand getestet, in den meisten Fällen handelte es um 20 µL und 100 µL. Am nachfolgenden Tag wurde das Medium der Zellen gewechselt. Nach vollständiger Konfluenz der Zellen konnten die Transduktionsraten am Durchflusszytometer bestimmt werden. Anhand der Menge des eingesetzten Virusüberstandes, der ausgesäten Zellzahl sowie der Zellen, welche das Reportergen (z.B. GFP, *Green Fluorescent Protein*) exprimierten, konnten die GFP-Transfereinheiten pro Milliliter (GTE/mL), der Virustiter, berechnet werden.

2.10.7 Analyse von Zellen im Durchflusszytometer

Die Fluoreszenz-aktivierte durchflusszytometrische Messung (FACS, *Fluorescence Activated Cell Sorting*) von Zellen ermöglicht es, eine Einzelzellsuspension mittels verschiedener Laser zu vermessen, wobei es durch die in einem Flüssigkeitsstrom hintereinander angeordneten Zellen zu einer detektierbaren Streuung eines Teils des Lichts kommt. Die Menge des gestreuten Lichts korreliert mit Größe und Komplexität der Zelle. Das Vorwärtsstreulicht (FSC = *Forward Scatter*) als Maß für die

Lichtbeugung im flachen Winkel ist vom Zellvolumen abhängig. Die als Seitwärtsstreulicht (SSC = *Sidewards Scatter*) bezeichnete Lichtbrechung im rechten Winkel wird von Granularität, Größe und Struktur des Zellkerns sowie des Auftretens von Vesikeln in einer Zelle beeinflusst. Dadurch lassen sich hämatopoetische Zellen im Durchflusszytometer unterscheiden. Außerdem können Fluoreszenzfarbstoffe, entweder von Reportergenen wie GFP gebildet oder über spezifische Antikörper an die Oberflächemarker von Zellen gekoppelt, für die Beurteilung von Zellen verwendet werden. Bei der Anwendung mehrerer Fluoreszenzfarbstoffe muss eine Kompensation stattfinden, mit Hilfe derer die Überlappung der Emissionsspektren der vorliegenden Fluorochrome berechnet wird und diese bei den durchgeführten Analysen unberücksichtigt lässt.

Zur durchflusszytometrischen Beurteilung der Zellen in dieser Arbeit wurde ein FACSCanto (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) sowie die dazugehörige Software FACSDiva zur Datenerfassung und -auswertung verwendet. Die zur Messung notwendige Vorbereitung der Proben ist Abschnitt 2.11.8 zu entnehmen. Das Messvolumen betrug bei den verschiedenen Analysen jeweils 300 µL. Ferner stand für die Analysen ein FACS Aria (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) mit zusätzlicher Vierfachsortierfunktion zur Verfügung, welcher von Dipl.-Ing. A. Düsedau (Heinrich-Pette-Institut) bedient wurde.

2.11 Tierexperimentelle Methoden

Alle die Mausversuche betreffenden Maßnahmen erfolgten gemäß der Bestimmungen zu gentechnologischen Arbeiten an Tieren in der Tierhaltung des Heinrich-Pette-Instituts (Hamburg) und wurden nach den Richtlinien des Tierschutzgesetzes, Fassung vom 18.05.06 (BGBl.I.S.1207) mit den Tierversuchsgenehmigungsnummern FI87/04 sowie 79/08 durchgeführt. Die Versuchsmäuse wurden unter speziellen pathogenfreien Bedingungen gehalten und in der Serologie auf Viren als negativ getestet.

2.11.1 5-Fluorouracil-Behandlung der Spendermäuse

Bei der Verwendung von 5-Fluorouracil im Rahmen von Mausversuchen wird die induzierte Proliferation der HSC genutzt. Proliferierende Zellen sind für die Wirkung von 5-Fluorouracil sensibel, ruhende HSC hingegen nicht, so dass in gesunden Mäusen nach der Behandlung eine Aktivierung dieser ruhenden Stammzellen erfolgt, die daraufhin in den Zellzyklus eintreten und die Homöostase wiederherstellen (Radley und Scurfield, 1979; Spangrude et al., 1988; Lerner und Harrison, 1990; Wilson et al., 2008; Watanabe-Okochi et al., 2008; Ichikawa et al., 2008).

Dieser Uracil- bzw. Thyminantagonist wird als antiproliferatives Medikament bei der Chemotherapie maligner Tumore des Menschen eingesetzt und führt zu einer

Blockierung der Thymidilatsynthetase und damit der Methylierung von Desoxyuridylsäure zu Thymidylsäure, so dass es eine Hemmung der DNA-Synthese erfolgt.

Zur Anreicherung der hämatopoetischen Vorläuferzellen im Knochenmark wurde den Spendermäusen einmalig 150 µg 5-Fluorouracil (GRY-Pharma GmbH, Kirchzarten) pro g Körpergewicht intraperitoneal verabreicht. Die Knochenmarkszellen konnten nach drei Tagen isoliert und für eine retrovirale Transduktion kultiviert werden.

2.11.2 Entnahme und Kultivierung von Vorläuferzellen

Die mit 5-Fluorouracil behandelten Spendermäuse wurden nach einer Ethernarkose durch cervikale Dislokation getötet und in 80%-igem Ethanol semisteril gehalten. Unter einer Sterilwerkbank wurden beide Ober- und Unterschenkel entnommen und mittels einer Spritze mit Kanüle unter Verwendung des Basalmediums für Mauszellen gespült. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 300 x g erfolgte die Erylyse mittels eines Lysepuffers (Pharmalyse, 10x, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA). Die zentrifugierten Zellen wurde in einem definierten Volumen des Basalmediums gezählt und anschließend in einer Dichte von $2-4 \times 10^6$ Zellen in 1 mL SFEM-Medium aufgenommen. Die Kultivierung erfolgte für 24 h, bevor es zu der in Abschnitt 2.11.3 beschriebenen Transduktion der isolierten hämatopoetischen Vorläuferzellen mit retroviralen Pseudotypen kam.

2.11.3 Transduktion isolierter und kultivierter Vorläuferzellen

Zur Transduktion der zuvor isolierten und kultivierten hämatopoetischen Vorläuferzellen mit gamma-retroviralen Vektoren wurden zunächst unbehandelte 6-Lochplatten mit $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Retronectin (48 µg/mL, TaKaRa, Cambrex Bioscience, Verviers, Belgien) je Vertiefung beschichtet, wobei die Inkubation entweder für 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C erfolgen konnte. Die Retronectinlösung wurde anschließend entfernt und zwecks Wiederverwendung bei -20°C gelagert. Nach Inkubation der Platte mit je 2 mL einer Lösung bestehend aus 1x PBS und 2% (v/v) BSA (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) für 30 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Platten mit 3 mL HBSS (Invitrogen, Karlsruhe), welchem 25 mM HEPES (Invitrogen, Karlsruhe) zusetzt war, gewaschen. Zur Beschichtung der Platten mit Viruspartikeln, welche an das Retronectin binden konnten, wurden nach dem Auftauen der bei -70°C gelagerten Überstände je Vertiefung 1,5 mL des Überstandes auf die Platten gegeben. Nach einer Zentrifugation für 30 min bei 4°C und 700 x g wurde der Virusüberstand entfernt und frischer Überstand in die Vertiefungen der Platte gegeben. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Anschließend wurden pro Loch 2×10^6 Vorläuferzellen in 1,5 mL SFEM-Medium ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte eine

weitere Virusbeschichtung nach dem gleichen Schema, so dass die kultivierten Vorläuferzellen auf diese neu beschichtete Platte umgesetzt werden konnten. Nach zwei Tagen Transduktionsdauer wurden die Zellen gezählt und für die Transplantation in letal bestrahlte Empfängertiere verwendet.

2.11.4 Transplantation transduzierter Vorläuferzellen

Da das Anwachsen der zu transplantierenden Vorläuferzellen zunächst durch eine Zerstörung des Knochenmarks der Empfängermäuse ermöglicht werden musste, wurden diese Tiere letal, d.h. mit einer Dosis von 9 Gray, in einer offenen Cäsium-137-Strahlungsquelle (Heinrich-Pette-Institut) für einen Zeitraum von 24 min bestrahlt. Die Transplantation erfolgte frühestens 2 h, spätestens 6 h nach der Bestrahlung über die Schwanzvene, wobei eine Zellsuspension aus minimal 9×10^5 und maximal $1,5 \times 10^6$ der transduzierten Vorläuferzellen sowie 5×10^4 Milzzellen einer C57BL/6J-Ly5.1-Maus in 300 μ L IMDM ohne Zusätze injiziert wurde.

Für die nachfolgenden 21 Tage wurde dem Trinkwasser der transplantierten Mäuse zur Infektionsprophylaxe Baytril (Wirkstoff Enrofloxacin, Bayer Health Care, Leverkusen) in einer Konzentration von 0,1 mg/mL zugesetzt.

2.11.5 Induktion der Cre-Rekombinaseaktivität *in vivo*

Eine Strategie für einen konditionalen *Knock-out* von Zielgenen ist die Verwendung des sogenannten Cre/*loxP*-Systems, welches in Abbildung 2.1 gezeigt ist. Hierbei wird ein *loxP*-flankiertes Zielgen durch die Cre-Rekombinase unter Erhaltung einer *loxP*-Sequenz deletiert, wobei das Rekombinasesystem der Bakteriophage P1 genutzt wird. Die Genaktivierung kann *in vivo* auf bestimmte Zellreihen beschränkt werden, indem die Mäuse, welche das *loxP*-flankierte Gen tragen, mit Tieren eines transgenen Stamm gekreuzt werden, bei welchem die Cre-Rekombinaseexpression einem Zelltypspezifischen Promotor unterliegt (Sternberg und Hamilton, 1981; Sauer und Henderson, 1988; Gu et al., 1994).

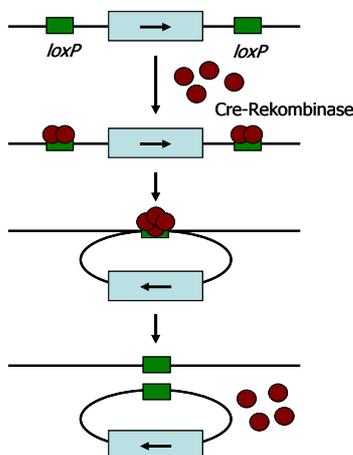


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des Cre/*loxP*-Systems

Dieser Darstellung ist zu entnehmen, dass die *loxP*-flankierten durch die Cre-Rekombinase erkannt werden, wobei die flankierte Sequenz durch das aktivierte Enzym unter Erhalt einer *loxP*-Sequenz deletiert wird. (modifiziert nach Cvetkovic und Sigmund, 2000)

Bei den verwendeten Mäusen wird die Cre-Rekombinaseexpression durch den induzierbaren Promotor des murinen *Mx1*-Gens kontrolliert (Kuhn et al., 1995). *Mx1* ist wichtig bei der Abwehr von Virusinfektionen und daher in gesunden Mäusen inaktiv. Der Promotor kann in vielen Geweben durch die Applikation von Interferon- α , Interferon- β oder das synthetische Polymer pIpC (*polyinosinic:polycytidylic acid*), das strukturell einer Doppelstrang-RNA gleicht und die Interferonfreisetzung induziert, transient aktiviert werden (de Clercq, 1980; Staeheli et al., 1986; Chang et al., 1990; Williams, 1991; Finkelman et al., 1991; Sen und Ransohoff, 1993).

Zur Exzision des Exons 5 des *Runx1*-Gens in den isolierten und transduzierten Vorläuferzellen des verwendeten Mausstammes (*Runx1^{fl/fl}-Mx1Cre* und *Runx1^{fl/wt}-Mx1Cre*) wurden den transplantierten Mäusen nach Ablauf eines Monats jeweils 300 μ g pIpC (Sigma-Aldrich, Taufkirchen; Produktnummer P1530) in einem Zweitagesintervall intraperitoneal injiziert. Die Dosierung wurde der Veröffentlichung Putz et al., 2006 entnommen.

Es ist beschrieben, dass eine Deletion des Exons 5 von *Runx1* (*Runx1 Δ/Δ*) ebenso wie eine vollständige Deletion von *Runx1* embryonal letal wirkt, wohingegen sich Mäuse mit *loxP*-Sequenzen flankierten *Runx1*-Allelen (sowohl *Runx1^{fl/fl}* als auch *Runx1^{fl/\Delta}*) normal entwickeln, da die Expression des *loxP*-flankierten Gens derjenigen des Wildtypgens entspricht (Ichikawa et al., 2004).

Da pIpC als synthetische Doppelstrang-RNA eine Virusinfektion imitiert, traten nach der Behandlung bei einigen Mäusen Grippe-ähnliche Symptome auf, welche die meisten Mäuse gut überstanden (siehe Tabelle 6.1 im Anhang).

Kürzlich wurde bekannt, dass hämatopoetische Stammzellen und frühe Vorläuferzellen durch Interferon- α zur Proliferation stimuliert werden können. Da auch ruhende Stammzellen von dieser Induktion betroffen sind, werden diese anfällig gegenüber einer Eliminierung durch antiproliferativ wirkende Chemotherapeutika (Essers et al., 2009). Dies spricht für einen *Feedback*-Mechanismus zwischen dem Immunsystem und der Proliferation von hämatopoetischen Stammzellen, welcher für eine neue Strategie bei der Leukämiebehandlung genutzt werden könnte (Passague und Ernst, 2009). Außerdem dient dies als Erklärung für die hohe Effektivität des Cre/*loxP*-Systems, welches u.a. durch Interferon- α aktiviert werden kann und folglich auch in ruhenden Stammzellen, welche zu einem Eintritt in den Zellzyklus stimuliert werden, aktiv ist.

2.11.6 Blutabnahme und Organentnahme

Zur Blutabnahme wurde die jeweilige Maus in einer Ethergasphase betäubt und mittels einer Lanzette (Accu-Chek, Roche, Mannheim) an der Mandibularvene punktiert. Wenn die zu untersuchende Maus anschließend weiterhin im Versuch bleiben sollte, wurden

nur wenige Tropfen Blut in ein EDTA-Röhrchen (Kapillarblutentnahmesystem, Kabe Labortechnik, Nümbrecht-Eisenroth) überführt. Im Fall einer anliegenden Analyse der Maus wurde dieser für alle nachfolgenden Analysen ausreichend Blut abgenommen. Anschließend wurde diese Maus nach erneuter Betäubung durch eine cervikale Dislokation getötet.

Die Präparation der mit 80%-igem Ethanol semisterilisierten Maus begann mit einem doppelten Y-Schnitt der Haut und der Freilegung von Cervix, Thorax und Abdomen, wodurch eine Betrachtung der freigelegten peripheren, axialen und cervikalen Lymphknoten ermöglicht wurde, welche bei einer Vergrößerung für weitere Analysen entnommen wurden. Die peripheren Lymphknoten wurden in jedem Fall für eine durchflusszytometrische Analyse (siehe Abschnitt 2.11.8), der DNA-Isolierung (siehe Abschnitt 2.11.11) sowie die Fixierung in 4%-iger Formaldehydlösung (siehe Abschnitt 2.12) verwendet. Nach der Öffnung des Peritoneums konnten Auffälligkeiten an Darm und mesenterialen Lymphknoten ermittelt werden. Die Milz wurde nach der Entnahme gewogen und gedrittelt, wobei je ein Teil des Organs der FACS-Analyse, der Fixierung in Formaldehydlösung und der DNA-Isolierung zugeführt wurde. Bei starker Vergrößerung des Organs wurden zusätzlich Zellen eingefroren, die für spätere Analysen oder eventuelle Retransplantationen verwendet werden konnten. Von der Leber, deren Größe makroskopisch erfasst wurde, wurden einzelne Organstücke ebenfalls der FACS-Analyse, der Fixierung in Formaldehydlösung sowie der DNA-Isolierung zugeführt. Durch die Eröffnung des Thorax konnten Herz, Lunge und Thymus sowie die mediastinalen und Thymus-assoziierten Lymphknoten betrachtet werden. Bei Vergrößerung des Thymus wurde dieser möglichst komplett entnommen, gewogen und für FACS-Analyse, Fixierung und DNA-Isolierung aufgeteilt. Eine Niere, Herz, Lunge und bei eventueller Vergrößerung die lumbalen Lymphknoten wurden in die Formaldehydlösung überführt. Ferner wurde das Sternum in Calfix (ProTaq, Quartett, Berlin) fixiert und somit einer histologischen Aufarbeitung zugänglich gemacht. Bei dem Vorliegen einer Parese wurde zusätzlich die Wirbelsäule präpariert, wobei der betroffene Bereich in Fragmente geteilt und ebenfalls in Calfix überführt wurde.

Zur Knochenmarkisolierung wurden beide Ober- und Unterschenkel entnommen und mittels einer Spritze mit Kanüle gespült. Anschließend konnte ein Teil dieser Einzelzellsuspension direkt für die weitere Aufarbeitung der FACS-Analyse und für die Herstellung von Cytospins sowie für die DNA-Isolierung verwendet werden. Der nicht verwendete Anteil der Zellen wurde für weitere Analysen sowie Retransplantationen eingefroren.

Die Kadaver der Mäuse wurden zentral entsorgt.

2.11.7 Blutanalyse

2.11.7.1 Herstellung von Blutaussstrichen

Für eine morphologische Bewertung des peripheren Blutes wurden von allen Mäusen Blutaussstriche erstellt. Dazu wurden 2 µL des abgenommenen Blutes mittels eines Objektträgers (Roth, Karlsruhe; Thermo Scientific, Braunschweig) auf einem zweiten unter Einhaltung eines Winkels von etwa 45° ausgestrichen. Nach vollständiger Trocknung an der Luft erfolgte eine Pappheimfärbung (siehe Abschnitt 2.12.1.1).

2.11.7.2 Bestimmung des Hämatokrits

Die Bestimmung des Hämatokrits als Anteil der Erythrozyten am peripheren Blut erfolgte nach dem Befüllen und Verschließen einer heparinisierten Hämatokritkapillare (Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt; Verschlusskit, Brand, Wertheim) durch eine Zentrifugation für 10 min bei 11000 Upm (Biofuge haemo, Heraeus Instruments, Hanau). Unter Verwendung einer speziellen Schablone war die Ablesung des Wertes möglich, wobei der unterste Punkt der Blutsäule gleich 0% und das oberste Ende der Plasmasäule gleich 100% gesetzt wurde.

2.11.7.3 Leukozytenzählung

Zur Bestimmung der Leukozytenzahl wurden die Erythrozyten des abgenommenen Blutes durch die Zugabe von 3%-iger Essigsäure lysiert. Diese 1:20-verdünnte Zellsuspension wurde in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

2.11.7.4 Messung der Blutparameter am Hemavet

Für die Bestimmung der Blutparameter mit Hilfe des Hemavet 950FS (Drew Scientific Inc., Oxford, Connecticut) wurden 20 µL Blut benötigt. Vor der Analyse erfolgte die Messung des Leerwertes sowie eines von der Firma bereit gestellten Kontrollblutes. Dieses Gerät stand nicht für den gesamten Zeitraum der Arbeit zur Verfügung, so dass nicht bei allen Mäusen, welche in die Auswertungen eingeflossen sind, diese automatisierte Analyse der Blutparameter möglich war.

2.11.8 Vorbereitung der Organe für die durchflusszytometrische Analyse

Einer FACS-Analyse konnten nur Einzelzellsuspensionen zugeführt werden, so dass die entnommenen Organe wie nachfolgend beschrieben aufgearbeitet werden mussten.

Knochenmark

Die Knochenmarkzellen wurden, wie unter Abschnitt 2.11.6 beschrieben, aus Femur und Tibia der Empfängermäuse isoliert und lagen somit bereits als Einzelzellsuspension vor.

Blut

Von dem abgenommenen Blut wurden 50-200 μL in 1 mL des nach Herstellerangaben verdünnten Lysepuffers (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) aufgenommen, wodurch die Erythrozyten nach einer Inkubationszeit von maximal 5 min lysiert wurden. Nach einer Zentrifugation für 4 min bei 1000-4000 $\times g$ konnten die im Sediment befindlichen Zellen der Färbung zugeführt werden.

Milz, Thymus, Leber und Lymphknoten

Die entnommenen Organe wurden zunächst in IMDM ohne Zusätze bei 4°C gelagert und zur weiteren Aufarbeitung mit Hilfe eines Spritzenstempels durch ein Drahtsieb mit einer Maschenweite von 160 μm gepresst. Nach Resuspension der vereinzelt Zellen in IMDM ohne Zusätze oder PBS wurden die Zellen für 4 min bei 1000-4000 $\times g$ abzentrifugiert. Die Milzzellsuspension wurde zusätzlich der zuvor beschriebenen Erythrozytenlyse unterzogen.

Die anschließende Färbung der Zellen mit spezifischen, gegen die Oberflächenmarker gerichteten Antikörpern erfolgte in 50-100 μL PBS nach Herstellerangaben.

2.11.9 Herstellung von Cytospins

Für eine weitere morphologische Beurteilung der hergestellten Einzelzellsuspensionen (siehe Abschnitt 2.11.8) wurden je Zelltyp zwei Cytospins mit jeweils 1×10^5 Zellen in 300 μL PBS hergestellt. Mittels einer Zentrifugation für 5 min und 500 Upm in der Cytospinzentrifuge (Cytospin 3, Shandon, Frankfurt am Main) wurden die Zellen auf einen Objektträger gebracht und anschließend nach Pappenheim gefärbt (siehe Abschnitt 2.12.1.1).

2.11.10 Retransplantation von Knochenmarkzellen erkrankter Tiere

Zur Ermittlung der Retransplantierbarkeit der transformierten Zellen der erkrankten Mäuse wurden eingefrorene Knochenmarkzellen aufgetaut und im Basalmedium für Mauszellen aufgenommen. Nach der Zellzählung und der Aufnahme der benötigten Zellmenge in IMDM ohne Zusätze erfolgte eine Transplantation von 5×10^5 (in Fall der myeloiden Neoplasie) bzw. 1×10^6 (in Fall des Thymoms) Zellen intravenös in Empfängermäuse, die zuvor mit einer Dosis von 4,5 Gray (entspricht einer Zeitdauer von 12 min) bestrahlt wurden.

2.11.11 Isolierung genomischer DNA aus Organen oder Zellen

2.11.11.1 Aufarbeitung für eine Polymerase-Kettenreaktion

Hierbei wurde die DNA-Isolierung mit Hilfe des *innu-PREP DNA Mini Kit* (Analytic Jena AG, Jena) nach Herstellerangaben durchgeführt. Es standen verschiedene Komponenten und Protokolle für die DNA-Isolierung aus Blut sowie aus Gewebestücken und Zellen zur Verfügung.

2.11.11.2 Aufarbeitung für Southernblot-Analysen

Die genomische DNA für Southernblot-Analysen (siehe Abschnitt 2.13.6) wurde aus bei -70°C gelagerten Organstücken isoliert, indem zunächst eine Homogenisierung in einem Glas-Homogenisator unter Verwendung von 500-1000 µL Puffer 1 (je nach Materialmenge) erfolgte. Nach Zugabe eines gleichen Volumens an Puffer 2 und von Proteinase K in einer Konzentration von 200 µg/mL zur Eliminierung der vorhandenen Proteine wurden die durchmischten Proben bei 37°C im Wasserbad über Nacht inkubiert. Bei der anschließenden Phenol/Chloroform-Extraktion wurde die DNA-Suspension zunächst für 10 min auf 60°C erwärmt und nach Abkühlung auf Raumtemperatur mit einem Volumenanteil an Phenol versetzt, gut gemischt und 5 min bei 1040 x g zentrifugiert. Nach der Überführung der wässrigen, DNA-haltigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß erfolgte eine zweimalige Extraktion der DNA mit einem Gemisch aus Phenol und Chloroform. Zum Entfernen der Phenolreste wurde abschließend die wässrige Phase nach Zentrifugation mit einem Volumen Chloroform versetzt. Zur Fällung der DNA wurde die wässrige Phase mit dem gleichen Volumen an Isopropanol sowie 1/20 des Volumens an 5 M NaCl vorsichtig gemischt. Die kondensierte DNA konnte daraufhin mit Hilfe eines Glashakens aufgewickelt und mit 70%-igem Ethanol gereinigt werden. Je nach DNA-Menge wurde diese nach Trocknung in 100-250 µL destilliertem Wasser aufgenommen und über Nacht im Wasserbad bei 37°C gelöst. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte am Photometer oder NanoDrop (siehe Abschnitt 2.13.2). Bis zur weiteren Verwendung wurde die DNA bei 4°C gelagert.

2.12 Histologische Methoden

Die Aufarbeitung sowie Färbung der histologischen Proben wurde freundlicherweise von G. Pilnitz-Stolze (Abteilung Tumorvirologie, Heinrich-Pette-Institut) durchgeführt. Die für histologische Untersuchungen entnommenen Sterna der transplantierten Mäuse wurden zunächst in Calfix (ProTaqS, Quartett GmbH, Berlin) fixiert und vor der Einbettung in Paraffin durch Calless (ProTaqS, Quartett GmbH, Berlin) dekalzifiziert. Die präparierten Organe wurden in 4%-iger Formaldehydlösung fixiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert. Die in Einbettkassetten (DiaPath, München)

überführten Proben wurden zunächst gewässert und in 55%-igem Ethanol inkubiert. Nach der automatisierten Entwässerung der Proben (Vakuumgewebeeinfiltrationsautomat Leica ASP300, Nussloch) erfolgte deren Einbettung in Paraffin (Paraffin-ausgießstation Leica EG1160, Nussloch). Aus den angefertigten Paraffinblöcken wurden die histologischen Schnitte einer Dicke von 3-4 µm gefertigt, welche nach Deparaffinierung im Brutschrank für 25 min bei 56°C zunächst viermal in Ottix Plus (Xylol-Ersatz; Diapath, München) für jeweils 5 min inkubiert und anschließend für 5 min in Ottix Shaper (Alkohol-Ersatz, Diapath, München) überführt wurden. Nachdem die Objektträger (SuperFrost/Plus, Assistent, Sodenheim) je zehnmal wiederum in Ottix Shaper und nachfolgend in destilliertes Wasser getaucht wurden, konnten die Schnitte mit den in Abschnitt 2.12.1 beschriebenen Methoden gefärbt werden.

2.12.1 Färbungen

2.12.1.1 Pappenheimfärbung

Nach einer mindestens 24-stündigen Lufttrocknung wurden die Blutausstriche und Cytospins unter Verwendung von gebrauchsfertigen May-Grünwald- und Giemsa-Farblösungen (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) nach Pappenheim gefärbt. Zunächst wurden die Präparate für 5 min mit konzentrierter May-Grünwald-Lösung bedeckt und somit gleichzeitig fixiert. Nach einem gründlichen Abspülen mit destilliertem Wasser dauerte die Überschichtung der Objektträger mit verdünnter Giemsa-Lösung (1:20 in destilliertem Wasser) 20 min an. Die mit destilliertem Wasser gespülten Präparate mussten anschließend an der Luft trocknen und konnten nach einer Entfernung der Farbreste mit Eukitt (O. Kindler, Freiburg) eingedeckt werden. Bei dieser panoptischen Färbung wurden die Zellkerne rötlich bis violett, die Nukleoli dunkelviolet bis blau und das Zytoplasma hellblau dargestellt.

2.12.1.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Im Anschluss an die zuvor beschriebene Aufarbeitung der fixierten Organe wurden die in destilliertem Wasser befindlichen Präparate für die Kernfärbung für 4 min in filtriertem Hämatoxylin nach Shandon (Thermo Scientific, Braunschweig) überführt. Nach dem Abspülen mit Wasser erfolgte eine kurze Differenzierung in 1%-igem Salzsäure-Alkohol und ein sofortiges Spülen in Wasser. Mittels warmen Leitungswassers wurden die Präparate für 5 min gebläut. Anschließend wurde die Färbung aller anderen Strukturen in Eosin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) für 25 sec durchgeführt. Die Präparate konnten nach dem Durchlaufen einer aufsteigenden Alkoholreihe (unter Verwendung von Ottix Shaper) mit Hilfe von Ottix Plus bzw. Xylol (Baker, Deventer, Holland) und Eukitt eingedeckt werden.

2.12.1.3 Perjodsäure-Leukofuchsin-Färbung

Bei der PAS-Reaktion (*Periodic Acid-Schiff reaction*) wurden Polysaccharide, neutrale Mucopolysaccharide, Muco- und Glykoproteide sowie Glyko- und Phospholipide violett angefärbt. Die Zellkerne zeigten sich als mittelblau, das Zytoplasma als rötlich-violett bis purpurrot gefärbt. Nach der zuvor beschriebenen Aufarbeitung der fixierten Organe wurden die in destilliertem Wasser befindlichen Präparate für 10 min in Perjodsäure (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) gegeben. Vor der 20-minütigen Inkubation in Schiff-Reagenz (Leukofuchsin, fuchschweifelige Säure; Sigma-Aldrich, Taufkirchen) erfolgte ein Spülen in destilliertem Wasser für 4-5 min. Im Anschluss an die fließende Wässerung für 5 min konnten die Zellkerne für 1 min mit Hämatoxylin nach Shandon gefärbt werden. Nach dem Bläuen in Leitungswasser wurde die Eindeckung mit Hilfe von Ottix Plus bzw. Xylol sowie Eukitt vorgenommen.

Die Auswertung der hergestellten Präparate erfolgte am Mikroskop, die fotografischen Aufnahmen in dieser Arbeit wurden mit Hilfe von Dr. J. Löhler und Dr. M. Fischer (Molekulare Pathologie, Heinrich-Pette-Institut) erstellt.

2.13 Molekularbiologische Methoden

2.13.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Für die Präparation der Plasmid-DNA aus dem *Escherichia coli*-Laborstamm XL10-GOLD (Stratagene, La Jolla, USA) im Mini-, Midi- oder Maximaßstab nach dem Prinzip der alkalischen Lyse wurde das jeweilige Plasmid-Präparationskit (Qiagen, Hilden) genutzt. Je nach benötigter DNA-Menge wurden die transformierten Bakterien in 2 mL, 100 mL oder 200 mL LB-Medium mit Ampicillin angezogen. Die Reinheit und Konzentration der isolierten Plasmid-DNA wurden durch photometrische Messung der Extinktion bei 260 nm bzw. 280 nm (siehe Abschnitt 2.13.2) bestimmt. Die Überprüfung der DNA erfolgte durch verschiedene Restriktionen und eine anschließende Gelelektrophorese.

2.13.2 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von DNA erfolgte durch die Messung der Extinktion im Spektralphotometer (Smart Spec 3000, BioRad, München; BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg; NanoDrop Spectrophotometer ND-1000, Peqlab, Erlangen). Es wurde die Absorption der verdünnten Proben bei 260 nm und bei 280 nm ermittelt. Aus den Extinktionswerten bei 260 nm konnten, ausgehend vom Lambert-Beerschen-Gesetz und unter Berücksichtigung der spezifischen Absorptionskonstanten ($1 \text{ OD}_{260\text{nm}} = 50 \mu\text{g/mL}$ Doppelstrang-DNA), die Nukleinsäurekonzentrationen berechnet werden.

Das Verhältnis der Extinktionen 260 nm/280 nm erlaubte zudem die Beurteilung der Nukleinsäureproben hinsichtlich ihrer Verunreinigung mit Protein.

2.13.3 Enzymreaktionen an Nukleinsäuren

2.13.3.1 Restriktion von DNA

Bei der Restriktion von DNA richteten sich die Reaktionsbedingungen, insbesondere Temperatur und Dauer der Reaktion sowie die verwendete Puffersubstanz, nach dem eingesetzten Restriktionsenzym und wurden somit nach den Angaben des Herstellers eingestellt. In der Regel wurde 1 μL der Plasmid-DNA in einem Ansatz von 20 μL mit 1x Puffer und einer ausreichenden Menge an Enzym bei 37°C inkubiert.

2.13.3.2 Polymerase-Kettenreaktion

Für die PCR zum Nachweis der Deletion des Exons 5 von *Runx1* bzw. der *loxP*-flankierten Gensequenz und der Wildtypsequenz sowie des Vorhandenseins des *Mx1Cre*-Gens wurden die unter Abschnitt 2.3.1 aufgeführten Oligonukleotide und das *Taq-PCR Core Kit* (Qiagen, Hilden) verwendet. Die Durchführung erfolgte in PCR-Strips (Biozym, Hessisch Oldendorf) im Eppendorf Mastercycler gradient (Hamburg), wobei je nach DNA-Gehalt 5-10 μL der isolierten genomischen Organ-DNA verwendet und mit einer *Annealing*-Temperatur von 55°C gearbeitet wurde.

2.13.4 DNA-Agarosegele

Die Größentrennung von DNA-Fragmenten in der horizontalen Gelelektrophorese erfolgte unter Verwendung von 0,8-1,5% (w/v) Agarose (LE, Biozym, Hessisch Oldendorf), 1x TAE-Puffer sowie Ethidiumbromid (10 mg/mL). Vor dem Gellauf wurden die DNA-Proben mit 6x DNA-Ladepuffer (Fermentas, St. Leon-Rot) versetzt. Als Längenstandard diente der *Gene Ruler DNA Ladder Mix* (Fermentas, St. Leon-Rot), von welchem 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ eingesetzt wurden. Die Elektrophorese wurde in Gelkammern (Peqlab, Erlangen) bei 80-120 V betrieben (Power Supply Consort E835 und E815, Rhys Scientific, Chorley, Großbritannien). Die aufgrund des interkalierten Ethidiumbromids bei 312 nm fluoreszierenden DNA-Banden konnten auf einem Transilluminator sichtbar gemacht und zur Dokumentation fotografiert werden (BioDocAnalyse, Biometra, Göttingen).

2.13.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde mit Hilfe der *Ultrafree-DNA Centrifugal Filter Unit* (Millipore, Schwalbach) nach Herstellerangaben durchgeführt, wobei für das Gel sowie die anschließende Elektrophorese ein modifizierter 1x TAE-Puffer (Millipore, Schwalbach) verwendet wurde. Nach der

Zentrifugation konnte die isolierte DNA bis zur weiteren Verwendung bei 4°C oder -20°C gelagert werden.

2.13.6 Southernblot-Analyse

Eine Southernblot-Analyse ermöglicht die Bestimmung der Klonalität von Tumoren, wobei zwischen monoklonalen (die transformierten Zellen gehen aus einer Ursprungszelle hervor) und oligo- bzw. polyklonalen (ein Auswachsen mehrerer mutierter Zellen erfolgt) Tumoren unterschieden wird. Dabei wird die geschnittene genomische DNA nach Größe getrennt, auf eine Membran transferiert und mit einer radioaktiv markierten Sonde hybridisiert. Nach einer Filmentwicklung kann das entstandene Bandenmuster ausgewertet werden.

Herstellung des radioaktiv markierten Größenstandards

Zur Herstellung des notwendigen Markers zur Bestimmung der Bandengröße wurden 2 µg einer λ-DNA (Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet, welche mit Hilfe von HindIII geschnitten wurde. Nach Überprüfung des Erfolg der Restriktion mittels Agarosegelelektrophorese erfolgte die radioaktive Markierung mittels des *DecaLab Kit* (Fermentas, St. Leon-Rot) nach Herstellerangaben unter Zugabe von 5 µL ³²P-markierten dCTP (1,85 MBq; Hartmann Analytic, Braunschweig). Bei der Gelelektrophorese wurden 6 µL des Markers auf die beiden äußeren Geltaschen unterschiedlich verteilt aufgetragen.

Herstellung der radioaktiv markierten Sonde

Die als Sonden verwendeten DNA-Fragmente wurden aus den entsprechenden Vektoren herausgeschnitten und mittels einer Agarosegelelektrophorese aufgereinigt. Die radioaktive Markierung wurde unter Verwendung des *DecaLab Kit* (Fermentas, St. Leon-Rot) nach Herstellerangaben und von 5 µL ³²P-markierten dCTP (1,85 MBq; Hartmann Analytic, Braunschweig) vorgenommen. Nach einer Inkubation des Reaktionsansatzes für 30 min bei 37°C erfolgte die Trennung der radioaktiv markierten von nicht markierten DNA-Fragmenten mittels einer Sephacryl-Säule (Mobi Spon S300, MoBiTec, Göttingen). Nach Zentrifugation dieser Säule für 2 min bei 800 x g wurde der Säulendurchfluss im Szintillator (Top Count NXT, Microplate Scintillation and Luminiscence Counter, Packard, Meriden, Connecticut) gemessen (angestrebt war eine Sondenaktivität von etwa 40000 cpm/µL) und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert. Vor der Zugabe zu der Membran wurde die radioaktiv markierte Sonde für 5 min auf 95°C erhitzt.

Herstellung und Hybridisierung der Southernblotmembran

Nach Restriktion der verwendeten genomischen DNA mit verschiedenen Enzymen wurde eine Größentrennung der Fragmente mittels eines 0,8%-igen Agarosegels durchgeführt, wobei die Gelelektrophorese zunächst für 30 min bei 120 V und

anschließend über Nacht bei 25 V erfolgte. Nach der Dokumentation des Gellaufs fand eine Denaturierung für 30 min in Lösung I und anschließend nach kurzem Schwenken in destilliertem Wasser für 30 min in Lösung II zur Neutralisation statt. Der DNA-Transfer erfolgte durch die Ausnutzung von Kapillarkräften, wobei über Nacht bei Raumtemperatur 10x SSC-Puffer durch Whatman-Papier, das darauf befindliche Gel und die aufliegende Membran (Biodyne B, Nylon, 0,45 µm, Pall Gelman Laboratory, Dreieich) in einen Stapel Papiertücher gesogen wurde. Dem Schwenken der Membran am nachfolgenden Tag in Lösung I und Lösung IIB für je 30 sec folgte eine Inkubation für 2 h bei 80°C zur Vernetzung der DNA auf der Membran. Die Prähybridisierung der Membran erfolgte mit 10 mL Hybridisierungspuffer für 1 h bei 56°C in einem Rotator (Perfect Blot, Peqlab, Erlangen). Nach Zugabe der Sonde wurde die Membran über Nacht bei 56°C belassen und am darauf folgenden Tag nach einem kurzen Spülen mit 2x SSC bei 68°C im Wasserbad mit Waschlösung gewaschen. Der in Frischhaltefolie verpackten Membran wurde ein Blaufilm (CEA RP New, Christiansen GmbH, Husum) aufgelegt, welcher nach einer Inkubation bei -70°C zu unterschiedlichen Zeitpunkten, je nach Sondenaktivität, entwickelt wurde. Die Filmentwicklung erfolgte in der Dunkelkammer des Heinrich-Pette-Instituts mit dem Classic E.O.S. Filmentwickler (AGFA, Köln).

3 Ergebnisse

Mutationen des *RUNX1*-Gens sind eine der häufigsten Abberationen in Patienten mit einer AML, wobei neben chromosomalen Translokationen auch mono- und biallelische Mutationen des Gens beschrieben sind. Diese Mutationen treten mit einer hohen Inzidenz von 24% bei einer AML mit minimalen Differenzierungszeichen (Subtyp M0) auf und sind häufig mit einer Mutation des FLT3-Rezeptors assoziiert.

Zur Untersuchung des Zusammenwirkens einer aktivierten Tyrosinkinase wie FLT3-ITD und RUNX1-Mutationen war es notwendig ein geeignetes *in vivo*-Modell zu entwickeln. Der nachfolgende Abschnitt gibt einen kurzen Überblick über das in dieser Arbeit etablierte und verwendete Mausmodell.

3.1 Allgemeiner Ablauf der Experimente

In diesem Mausmodell wurden die zu untersuchenden Mutanten (FLT3-ITD und RUNX1-DBM) mittels retroviraler Vektoren in hämatopoetische Vorläuferzellen transduziert, in denen ein stabiler Einbau der kodierenden Sequenz der Mutanten in das Genom erfolgte. Zunächst wurden Spendermäuse für einen Zeitraum von drei Tagen mit 5-Fluorouracil zur Anreicherung der hämatopoetischen Vorläuferzellen im Knochenmark behandelt. Nach Entnahme der Knochenmarkzellen der Spendertiere konnten diese kultiviert und transduziert werden. Die anschließend in letal bestrahlte Empfängermäuse transplantierten Zellen waren in der Lage, in diesen Mäusen ein vollständiges Blutsystem auszubilden, wobei eine Expression der eingebrachten cDNA erfolgte. Die anschließende Analyse der Versuchstiere beinhaltete eine Erfassung der Krankheitsausprägung an den Organen (Blut- und Knochenmarksbefund, Beurteilung von Milz und Thymus, Zustand der peripheren Organe) sowie die Molekularbiologie des Phänotyps (*Runx1*-Status, Zellproliferationskapazität, Klonalität). In Abbildung 3.1 ist der allgemeine Ablauf der in Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Mausexperimente dargestellt, die einzelnen Versuchsschritte werden in den nachfolgenden Abschnitten näher erläutert.

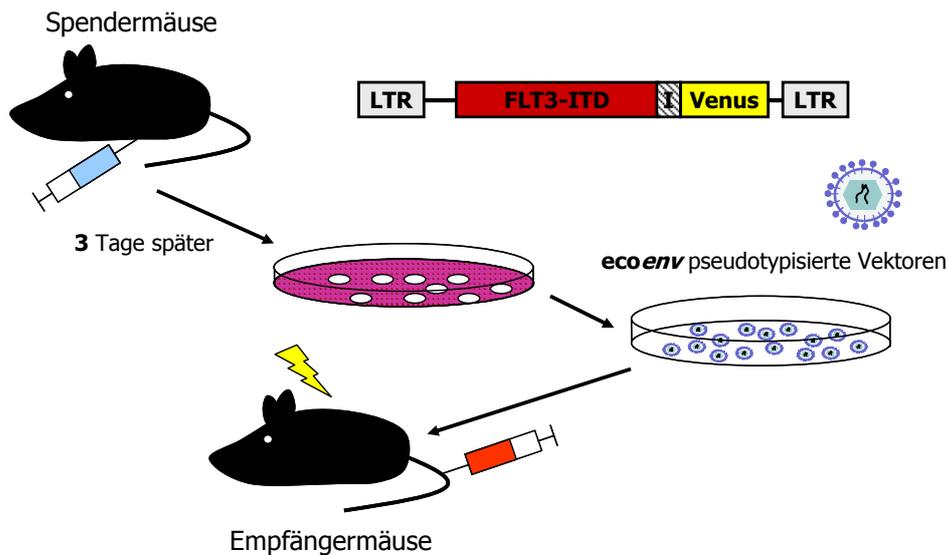


Abbildung 3.1: Schema zum Ablauf der Mausexperimente

Diese Übersicht zeigt den allgemeinen Ablauf der Mausexperimente und umfasst die 5-Fluorouracil-Behandlung der Spendermäuse (blaue Spritze), die Knochenmarkentnahme nach drei Tagen, die Kultivierung und Transduktion der angereicherten hämatopoetischen Vorläuferzellen mit retroviralen Vektoren (als Beispiel der FLT3-ITD-Vektor) in mit Retronectin beschichteten Schalen sowie die Transplantation dieser Zellen in letal bestrahlte (gelber Pfeil) Empfängertiere (rote Spritze).

3.1.1 Spendermäuse

Für die Experimente wurden zum einen transgene Mäuse verwendet, bei denen sowohl das *loxP*-flankierte *Runx1*-Gen als auch das *Mx1Cre*-Gen vorhanden waren (*Runx1^{fl/fl}-Mx1Cre* bzw. *Runx1^{fl/wt}-Mx1Cre*). In diesen Tieren konnte nach dem Prinzip eines konditionalen *Knock-out*-Modells mittels der Aktivierung des *Cre/loxP*-Systems unter der Kontrolle des *Mx1*-Promotors das Exon 5 von *Runx1*, welches zusammen mit Exon 3 und Exon 4 die Runt-Domäne kodiert, deletiert und somit *Runx1* inaktiviert werden. Zum anderen standen Wurfgeschwister mit einer *Runx1*-Wildtypexpression (*Runx1^{wt/wt}-Mx1Cre*) zur Verfügung.

3.1.2 Gamma-retrovirale Vektoren

Für die Expression von FLT3-ITD und der RUNX1-DBM wurden retrovirale Vektoren benötigt, durch welche ein Gentransfer in die verwendeten hämatopoetischen Zellen möglich war. Die in Abbildung 3.2 gezeigten Vektoren sind auf die Transduktion früher hämatopoetischer Zellen optimiert (Stocking et al., 1993; Baum et al., 1995; Kitamura et al., 2003).

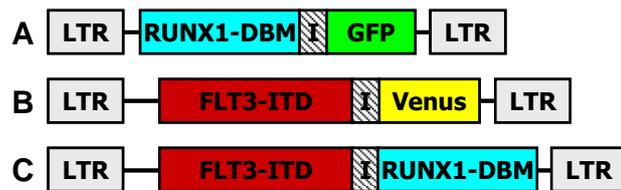


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der verwendeten retroviralen Vektoren

Die gezeigten Vektoren exprimierten über eine interne Ribosomeneintrittsstelle (I) zusätzlich zur kodierenden Sequenz (FLT3-ITD) entweder ein fluoreszierendes Protein (GFP oder Venus) oder die RUNX1-DBM als zweite zu untersuchende Mutante. Als Kontrollvektor wurde das gleiche Expressionskonstrukt ohne die cDNA-Sequenz, aber mit Venus als Reporterprotein eingesetzt (nicht aufgeführt).

A Expressionsvektor für die RUNX1-DBM mit GFP als Marker

B Expressionsvektor für FLT3-ITD mit Venus als Marker

C Doppelvektor zur Expression von FLT3-ITD und RUNX1-DBM, ohne Marker

Das Element LTR (*Long-Terminal Repeat*) diente der Kontrolle der Transkription des Vektors, welcher die kodierende Sequenz eines zu untersuchenden Gens exprimierte (Hildinger et al., 1999). Die Translation von den Markerproteinen GFP bzw. Venus (Variante von YFP, *Yellow Fluorescent Protein*) wurde aufgrund einer internen Ribosomeneintrittsstelle (IRES, *Internal Ribosomal Entry Site*) ermöglicht. In den sogenannten Doppelvektoren diente die IRES zur Expression einer weiteren cDNA im Konstrukt. Die Detektion der transduzierten Zellen konnte bei dem Vorhandensein eines Markerproteins in der FACS-Analyse erfolgen, wobei GFP nach einer Anregung grünes und Venus gelbes Licht emittierte.

3.1.3 Transduktion der hämatopoetischen Vorläuferzellen

Anhand einer durchflusszytometrischen Analyse wurde die Transduktionseffizienz der aus Femur und Tibia der jeweiligen Spendermäuse isolierten und kultivierten Vorläuferzellen ermittelt. Dabei konnten für den Kontrollvektor Werte von 10-43% erreicht werden, wohingegen die Werte der anderen Vektoren bei 35% für RUNX1-DBM und bei 3-15% für FLT3-ITD lagen. Bei den sogenannten Doppelvektoren, die zeitgleich eine Expression der aktivierten Tyrosinkinase und RUNX1-DBM ermöglichten, aber keinen Marker aufwiesen, konnte die Transduktionsrate nicht bestimmt werden. Hierbei wurde aufgrund des gleichen Aufbaus der Vektoren von einer vergleichbaren Effizienz ausgegangen. Als Beispiel für die Transduktionsrate bei den Mausexperimenten sind in Abbildung 3.3 die FACS-Analysen von Vorläuferzellen nach der ersten und zweiten Transduktion dargestellt.

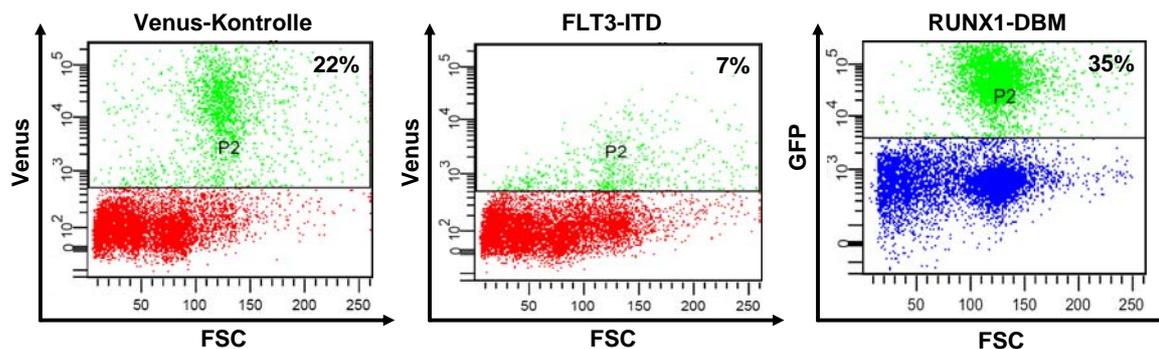


Abbildung 3.3: Ermittlung der Transduktionseffizienz der kultivierten Vorläuferzellen

In dieser Abbildung ist die Venus-Expression des Kontroll- sowie des FLT3-ITD-Vektors nach der ersten und des RUNX1-DBM-Vektors nach der zweiten Transduktion dargestellt. Die Prozentzahlen kennzeichnen den Anteil der erfolgreich transduzierten hämatopoetischen Vorläuferzellen.

Der Venus-Kontrollvektor sowie die RUNX1-DBM zeigten in der Analyse eine höhere Expression des Reporterproteins als der retrovirale Vektor mit FLT3-ITD. Dies ist zum einen durch die unterschiedliche Vektorgroße, bedingt durch die in dem Vektor befindlichen kodierenden Sequenz, zu erklären, da es durch den Einbau einer relativ langen Sequenz zu einer Verminderung der Expressionsstärke des Markers kommen konnte. Zum anderen kann der Grund für diese unterschiedliche Transduktionseffizienz in der schädlichen bzw. störenden Auswirkung der Expression der Mutante in den hämatopoetischen Vorläuferzellen liegen.

3.1.4 Transplantation der transduzierten Vorläuferzellen

Die zuvor isolierten, kultivierten und transduzierten Vorläuferzellen der Spendermäuse wurden ohne weitere Selektion auf Expression, die durch eine FACS-Analyse mit Sortierfunktion möglich wäre, der Transplantation zugeführt, so dass eine Suspension aus erfolgreich und nicht transduzierten Zellen verwendet wurde. Es wurde davon ausgegangen, dass die Zellen, welche durch die Expression der jeweiligen Mutante einen Proliferationsvorteil erhalten und/oder ein transformierendes Ereignis erfahren, sich vermehren und teilen werden, wodurch die Entwicklung einer Erkrankung und dadurch bedingten Symptomatik erfolgen konnte.

Zur Ermöglichung des Anwachsens der in die Schwanzvene injizierten Vorläuferzellen wurden die Empfängermause des Stammes C57BL/6J-Ly5.1 zunächst mit Hilfe einer offenen Cäsium-137-Strahlenquelle letal bestrahlt. Die somit zerstörten Knochenmarkzellen konnten durch die transplantierten Zellen ersetzt werden, welche zur Ausbildung einer voll funktionstüchtigen Hämatopoese fähig waren und dabei die zu untersuchende Mutante exprimierten. Da der Zeitraum zwischen Bestrahlung und Anwachsen der transplantierten Zellen sowie der vollständigen Wiederherstellung des Blutsystems zu lange war, als dass nur die Vorläuferzellen allein dafür ausreichten,

wurden zur Unterstützung Milzzellen mit der Antigenvariante der Empfängermäuse transplantiert. In dieser Milzzellsuspension befanden sich nur wenige Vorläuferzellen, die ebenfalls im Knochenmark anwachsen und an der Ausbildung der Hämatopoese beteiligt sein konnten. Es waren aber ausreichend Zellen mit einer unterschiedlichen Lebensdauer, im Besonderen erythroide Zellen, vorhanden, welche der Überbrückung des notwendigen Zeitraums dienten. Die durchgeführten Transplantationen verliefen alle erfolgreich, kein Empfängertier verstarb innerhalb der Zeit, welche für bestrahlte, aber nicht transplantierte Bestrahlungskontrollen im Durchschnitt (12-19 Tage) angenommen wurde.

3.1.5 Induktion der Cre-Rekombinaseaktivität *in vivo*

Bei Empfängermäusen, denen aus Spendertieren des Stammes *Runx1^{fl/fl}-Mx1Cre* oder *Runx1^{fl/wt}-Mx1Cre* isolierte und anschließend transduzierte Vorläuferzellen transplantiert wurden, erfolgte nach einem Monat die Aufteilung in zwei Kohorten. Eine Gruppe erhielt eine pIpC-Injektion, während die zweite Gruppe unbehandelt blieb, welche so eine Kontrollgruppe für die Wildtypexpression von Runx1 darstellen sollte. Innerhalb des gewählten Zeitraums war eine annähernd vollständige Rekonstituierung der Hämatopoese zu erwarten, so dass eine durch die Injektion von pIpC hervorgerufene Symptomatik nicht zu einem Problem werden sollte (siehe Abschnitt 2.11.5). Trotzdem verstarben bei einem der Versuche im Verlauf der Behandlung drei Mäuse (siehe Tabelle 6.1 im Anhang). Dies war wahrscheinlich auf die pIpC-Injektion zurückzuführen, da weder in der Kontrollgruppe dieses Versuchs noch in anderen Experimenten Tiere in diesem Zeitraum verstarben.

Der Grund für die Entscheidung, erst nach der Transplantation eine Deletion des Exons 5 von *Runx1* zu induzieren, lag darin, dass *Runx1*-defiziente Mäuse neben einer Störung der lymphoiden Zellentwicklung eine Beeinflussung der myeloiden Differenzierung sowie Veränderungen in der Megakaryopoese und des Stammzellkompartiments zeigten (Ichikawa et al., 2004; Sun und Downing, 2004; Gowney et al., 2005; Putz et al., 2006). Durch die Verwendung von Runx1-exprimierenden hämatopoetischen Vorläuferzellen sollte die Möglichkeit gegeben werden, dass sich in den Empfängertieren Blutzellen aller Linien entwickeln konnten und nicht von Beginn an eine Beschränkung des Anwachsens der Zellen in den transplantierten Mäusen und der Repopulierungs- sowie Differenzierungskapazität bestand. Erst durch die nachfolgende pIpC-Injektion sollte gezeigt werden, welche Folgen und somit Erkrankungen sich aus der Inaktivierung von *Runx1 in vivo* ergaben.

Durch die Aktivierung des Cre/*loxP*-Systems *in vivo* erfolgte die Exzision des Exons 5 von *Runx1* des einen oder beider Allele und somit die Inaktivierung von *Runx1* (*Runx1^{Δ/Δ}* bzw. *Runx1^{Δ/wt}*). Der Nachweis der Exzision und der *loxP*-flankierten

Gensequenz, wenn keine Deletion stattgefunden hat, sowie des Wildtypallels erfolgte mittels einer PCR-Analyse, wie es in Abbildung 3.4 dargestellt ist.

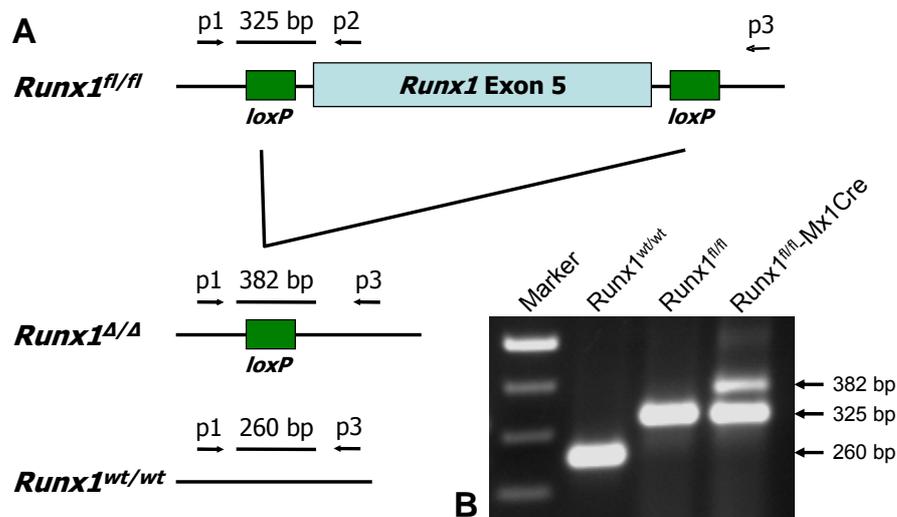


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung der Nachweises der Exzision von Exon 5 des *Runx1*-Gens und der *loxP*-flankierten Sequenz sowie eine PCR-Analyse verwendeter Kontrollen

A Diesem Schema ist zu entnehmen, dass es durch die Kombination von drei Primern (p1, p2 und p3) möglich war, den Status von *Runx1* von Mäusen mit einer *loxP*-flankierten Sequenz in einem oder beiden Allelen zu ermitteln. In der PCR-Analyse gab eine Bande von 325 bp die flankierte Gensequenz an, wohingegen eine Bande von 382 bp die Deletion des Exons 5 von *Runx1* widerspielte. Die Wildtypsequenz von *Runx1* zeigte sich in einer Bande von 260 bp.

B In diesem Bild eines 1,5%-igen Agarosegels sind die Kontrollen *Runx1*^{wt/wt} (C57BL/6J-Maus), *Runx1*^{fl/fl} und *Runx1*^{fl/fl}-*Mx1Cre* (nicht induziert) gezeigt.

Für eine PCR-Analyse wurde den Versuchsmäusen etwa 2-3 Wochen nach der pIpC-Injektion Blut abgenommen, welches so aufgearbeitet wurde, dass die genomische DNA aus den kernhaltigen Blutzellen für die Analyse zur Verfügung stand. In Abbildung 3.5 ist das Agarosegel einer solchen PCR-Analyse dargestellt, welches beispielhaft die bei den Kontrollen (s.o.) schon zu erfassende Problematik des Interferon-induzierbaren Systems des *Mx1Cre*-Stammes aufzeigte. Es handelte sich um Tiere, welche mit FLT3-ITD transduzierte Vorläuferzellen des Typs *Runx1*^{fl/fl}-*Mx1Cre* erhalten haben. Bei Mäusen ohne vorherige Injektion von pIpC zeigte sich eine Exzision des Exons 5 von *Runx1*. Das bedeutete, dass eine Inaktivierung von *Runx1* unabhängig einer Induktion durch pIpC erfolgen konnte. Ein ähnliches Bild wurde auch bei den Mäusen gefunden, denen mit dem Venus-Kontrollvektor transduzierte Vorläuferzellen transplantiert wurden (Daten nicht gezeigt). So konnte eine durch die aktivierte Tyrosinkinase bedingte Selektion auf *Runx1*^{Δ/Δ}-*Mx1Cre*-Zellen als Grund für dieses Ergebnis im peripheren Blut ausgeschlossen werden.

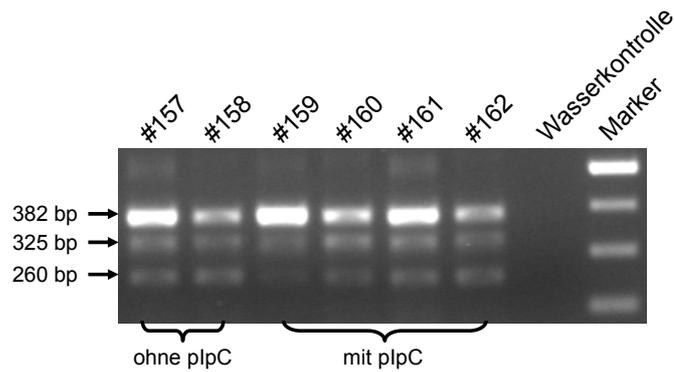


Abbildung 3.5: Agarosegel der PCR-Analyse der Blutproben von Empfängermäusen

Dieses 1,5%-ige Agarosegel zeigte die Ergebnisse einer PCR-Analyse nach Blutabnahme bei Mäusen, denen Vorläuferzellen des Typs *Runx1^{fl/fl}-Mx1Cre* transplantiert wurden. Die Bande von 325 bp repräsentierte die *loxP*-flankierte Sequenz. Bei einer Deletion des Exons 5 von *Runx1* ergab sich eine Bande von 382 bp. Ferner zeigte sich die Wildtypbande von 260 bp. In der Abbildung ist gekennzeichnet, welche Mäuse pIpC erhalten haben.

Der Aspekt, dass ohne die Behandlung mit Interferon- α oder - β bzw. pIpC zu einer Aktivierung des *Mx1*-Promotors *in vivo* erfolgt, wird als Hintergrundrekombination bezeichnet, wobei der Grad der Deletion des Zielgens vom Gewebetyp abhängt und auf das Vorhandensein von Interferon-sensiblen Zellen sowie der Verfügbarkeit von Interferon in dem jeweiligen Organ zurückzuführen ist (Jackson Laboratory, Maine, USA). Bei der Genotypisierung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Mäuse traten bei der Analyse von Schwanzbiopsien vereinzelt Deletionen des Exons 5 von *Runx1* ohne vorherige Induktion auf, wobei es sich in keinem Fall um eine vollständige Exzision handelte. Die aufgeführte nicht induzierte Kontrolle *Runx1^{fl/fl}-Mx1Cre* zeigte eine partielle Exzision, die eventuell auf eine durch die 5-Fluorouracil-Injektion bedingte Interferonfreisetzung zurückzuführen war (siehe Abbildung 3.4). Weiterhin beschreiben auch andere Arbeiten mit dem *Mx1Cre*-Mausstamm eine Cre-Expression ohne vorherige Induktion, so dass dieses System als *leaky* („undicht“) bezeichnet werden muss (Isakoff et al., 2005; Lazorchak et al., 2005). Aufgrund dieser ersten Ergebnisse wurden die Kohorten mit und ohne pIpC-Behandlung zwar als solche gesondert geführt, in den nachfolgenden Darstellungen des kumulativen Überlebens aber zusammengefasst. Bei einer erforderlichen Aussage dazu, ob eine Induktion erfolgte, ist dies jeweils angemerkt.

3.1.6 Beobachtung der Tiere auf Krankheitssymptome

Die im Versuchsverlauf durchgeführten Blutabnahmen wurden neben der Ermittlung des *Runx1*-Status in den Empfängertieren für die Erstellung eines Blutbildes sowie für eine durchflusszytometrische Analyse genutzt. Einerseits konnte überprüft werden, ob die transduzierten Vorläuferzellen im Knochenmark der Mäuse angewachsen sind und differenzierten. Andererseits gab die FACS-Analyse Aufschluss darüber, wie hoch im

Falle des Vorhandenseins eines Markerproteins die Expression der in das Genom der Zellen integrierten Mutante im peripheren Blut war und ob es zu der Entwicklung einer Erkrankung kam. Dabei konnte der Anteil an transplantierten Ly5.2-positiven Zellen im Vergleich zu den das Ly5.1-Antigen aufweisenden Zellen der Empfängermaus festgestellt werden. Eine Ausnahme bilden allerdings reife Erythrozyten, die Ly5 nicht exprimieren.

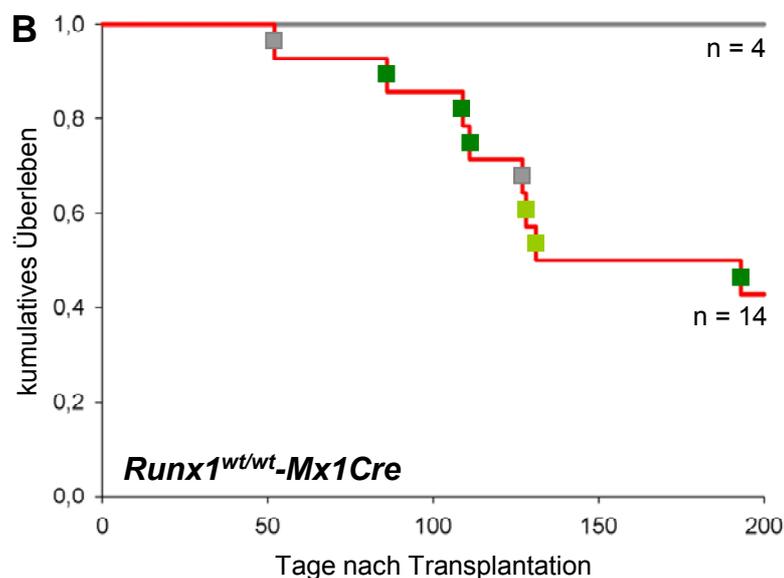
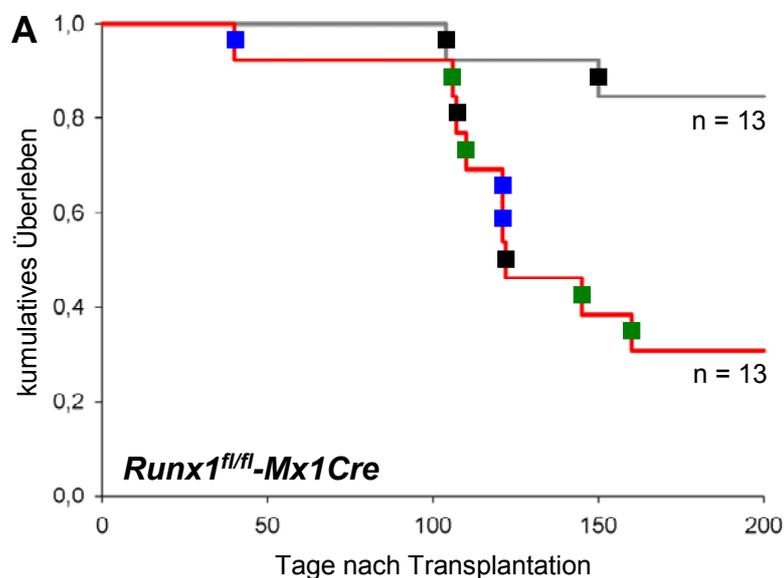
Die transplantierten Tiere wurden regelmäßig hinsichtlich klinischer Symptome untersucht, wobei sowohl auf das Auftreten von Merkmalen einer leukämischen Erkrankung wie Blässe, Apathie, Gewichtsverlust, unphysiologische Körperhaltung und Vergrößerung von Organen und/oder Lymphknoten als auch auf weitere Auffälligkeiten wie Atemprobleme, verminderte oder beeinträchtigte Beweglichkeit sowie verminderte Fellpflege geachtet wurde. Das klinische Erscheinungsbild der in diesem Mausmodell auftretenden Erkrankungen war charakteristisch und wird in den jeweiligen Abschnitten beschrieben. Im Falle einer Symptomatik wurde die jeweilige Maus analysiert, wobei Blut, Knochenmark sowie Milz und Thymus als die wichtigsten Quellen für Informationen über die Erkrankung anzusehen waren. Leber, Lunge, Niere und Lymphknoten gaben Aufschluss über den Verbreitungsgrad der transformierten Zellen *in vivo*. Die entnommenen Organe wurden hinsichtlich ihrer Größe und Morphologie sowie zytologisch und histologisch untersucht. Außerdem wurde von einzelnen Organen die genomische DNA isoliert, welche im Anschluss der PCR-Analyse zum Nachweis des *Runx1*-Zustandes zugeführt wurde. Dies konnte Aufschluss darüber geben, ob es bei der Entwicklung einer Erkrankung zu kooperierenden Effekten zwischen der Expression von FLT3-ITD und/oder RUNX1-DBM sowie der Inaktivierung von *Runx1* kam. Beim Fehlen von krankheitsrelevanten Merkmalen und Veränderungen des Gesamtzustandes erfolgte nach Ablauf des Versuchs eine Analyse der Mäuse.

3.2 Untersuchung des Zusammenwirkens von FLT3-ITD und der *Runx1*-Inaktivierung *in vivo*

In diesem ersten Teil der Arbeit sollte die Frage geklärt werden, ob die Expression von FLT3-ITD in *Runx1*-defizienten hämatopoetischen Zellen für die Entwicklung einer leukämischen Erkrankung ausreichend war. Da in Leukämiepatienten *RUNX1*-betreffende Mutationen der Klasse II häufig mit einer Mutation der Klasse I wie FLT3-ITD assoziiert sind und beschrieben ist, dass FLT3-ITD im Mausmodell zu einer myeloiden Erkrankung führt (Kelly et al., 2002a,b), wurde erwartet, dass es bei diesem Ansatz im Mausversuch zu der Entwicklung einer myeloiden Erkrankung bzw. einer Leukämie kommen konnte. Weiterhin erfolgte die Transduktion heterozygoter Vorläuferzellen (*Runx1^{fl/wt}-Mx1Cre*) mit FLT3-ITD und eine anschließende Inaktivierung

von *Runx1*, da neben dem biallelischen Auftreten von *RUNX1*-Mutationen das Auftreten einer Mutation auf nur einem Allel des Gens bekannt sind. Zur Untersuchung der alleinigen Wirkung von FLT3-ITD in diesem Mausmodell wurden außerdem Vorläuferzellen des Typs *Runx1^{wt/wt}-Mx1Cre* verwendet.

In der nachfolgenden Graphik zum kumulativen Überleben der transplantierten Mäusen ist gezeigt, dass durch die Expression von FLT3-ITD im jeweiligen Knochenmarkhintergrund verschiedene Phänotypen aufgetreten sind, auf welche in den anschließenden Abschnitten näher eingegangen wird. Eine Korrelation zwischen dem Auftreten der jeweiligen Erkrankung und einer erfolgten oder nicht durchgeführten pIpC-Behandlung konnte nicht erfasst werden, so dass auf einen Vermerk diesbezüglich in den Überlebenskurven verzichtet wurde.



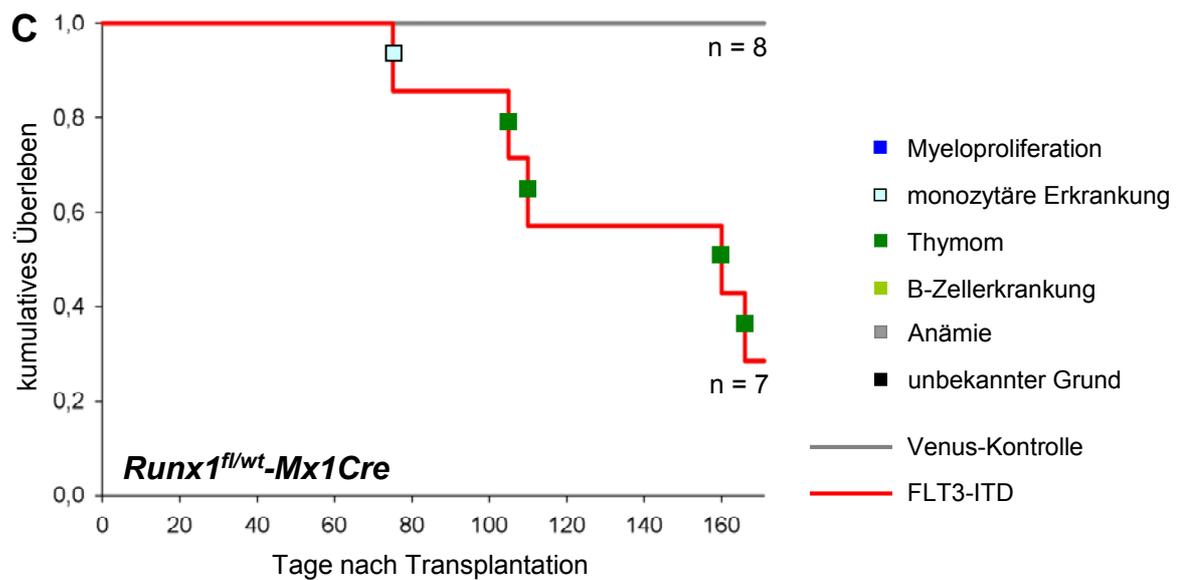


Abbildung 3.6: Darstellung des kumulativen Überlebens der Empfängermäuse der mit FLT3-ITD transduzierten hämatopoetischen Vorläuferzellen

In dieser Graphik zum kumulativen Überlebens ist gezeigt, dass die Empfängermäuse, denen mit FLT3-ITD transduzierte Vorläuferzellen des Typs *Runx1^{fl/fl}-Mx1Cre* (A), *Runx1^{wt/wt}-Mx1Cre* (B) oder *Runx1^{fl/wt}-Mx1Cre* (C) transplantiert wurden, verschiedene Erkrankungen aufwiesen. Die bei den einzelnen Tieren vorliegende Erkrankung ist mit einem farbigen Quadrat markiert (Erläuterung siehe Legende in der Graphik C).

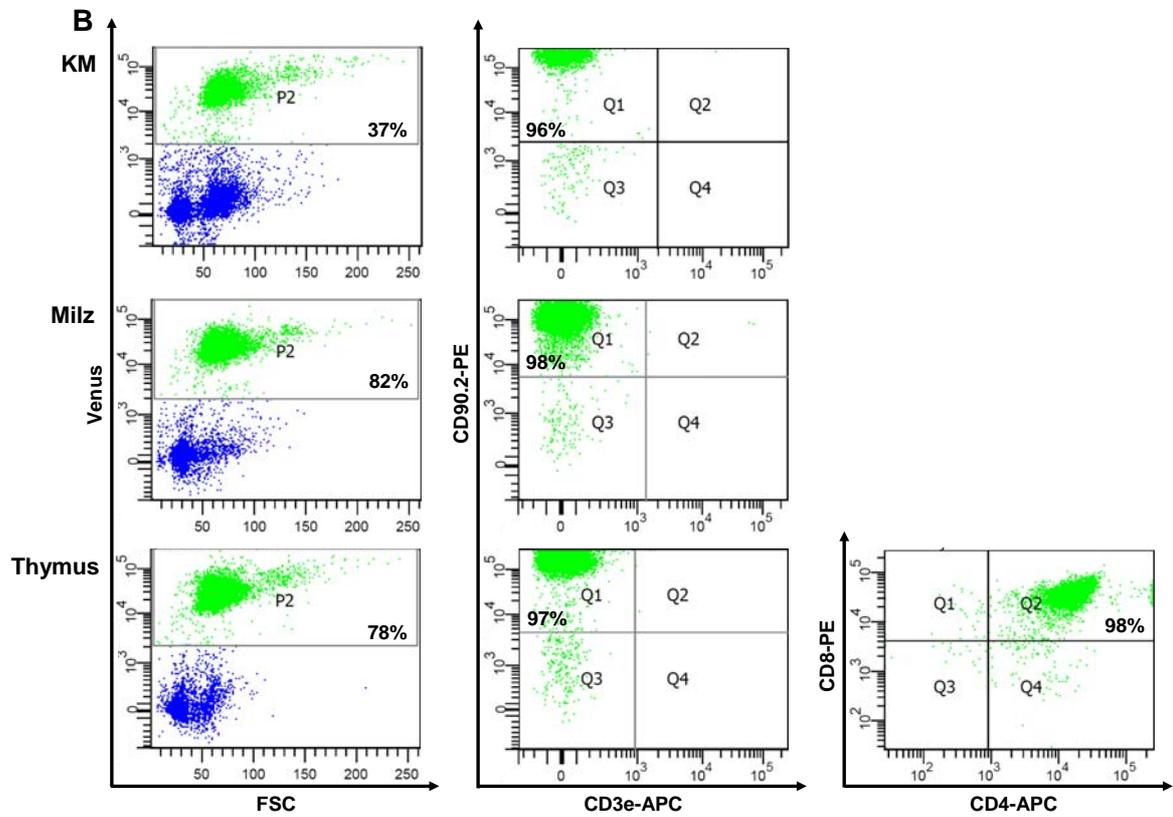
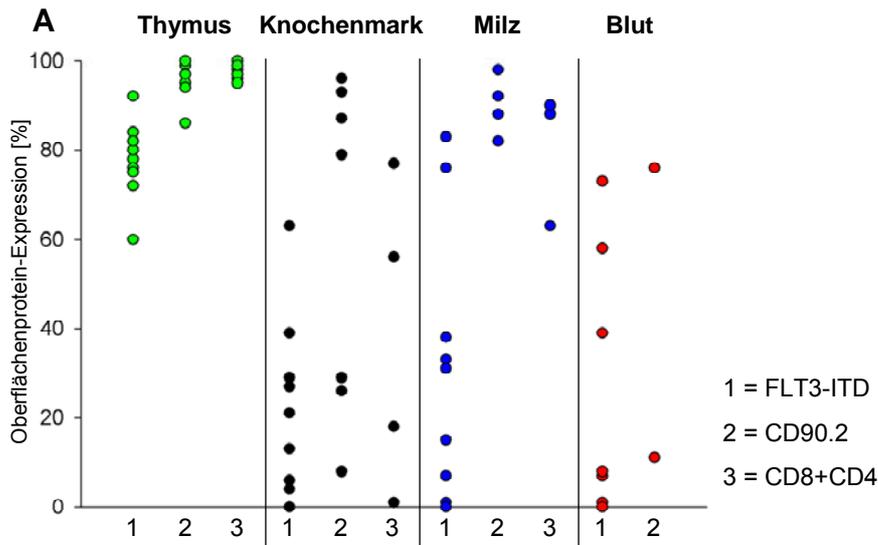
Der Abbildung 3.6 ist zu entnehmen, dass bei der Transplantation transduzierter hämatopoetischer Zellen des Typs *Runx1^{fl/fl}-Mx1Cre* (Graphik A) 44% der Tiere an einem Thymom und 33% an einer Myeloproliferation erkrankten, während zwei Mäuse aus unbekanntem Grund verstarben. Bei der Transduktion und Transplantation von *Runx1^{wt/wt}-Mx1Cre*-Zellen (Graphik B) wiesen 50% wiederum ein Thymom und 25% eine B-Zellerkrankung auf. Das Auftreten myeloider Phänotypen konnte nicht verzeichnet werden. Weiterhin zeigten zwei Empfängertiere (entspricht 25%) einen anämischen Zustand, welcher die Analyse bedingte. Neben dieser Symptomatik konnten keine weiteren Gründe für den Erkrankungszustand der Mäuse gefunden werden. Diese Entwicklung einer Anämie könnte zum einen durch eine nicht vollständige Rekonstituierung der Hämatopoese bedingt gewesen sein, wobei die längere Latenzzeit von 127 Tagen dagegen spricht. Zum anderen ist es möglich, dass die Expression von FLT3-ITD zu einer Beeinflussung der Entwicklung der erythroiden Zellreihe führte. Bei der Verwendung der heterozygoten Vorläuferzellen (Graphik C) kam es in nur einem Fall zum Auftreten einer monozytären Neoplasie (20%), wohingegen 80% der im Versuchsverlauf analysierten Mäuse ein Thymom aufwiesen.

3.2.1 Lymphoide Erkrankungen induziert durch FLT3-ITD bei gleichzeitiger Runx1-Expression

Die Expression der konstitutiv aktivierten Tyrosinkinase FLT3-ITD führte nach Transduktion aller drei Typen an hämatopoetischen Vorläuferzellen in den jeweiligen Empfängertieren zu einer Entwicklung lymphoider Erkrankungen, welche in den nachfolgenden Abschnitten näher erläutert werden. Dabei werden die Daten der an einem Thymom erkrankten Mäuse (12 Tiere) zusammengefasst dargestellt, da die Analyse der Erkrankung ein übereinstimmendes Bild dahingehend lieferte, dass zur Entwicklung der T-Zellerkrankung eine Runx1-Expression von Vorteil war.

3.2.1.1 Entstehung des Thymoms

Bei der Expression von FLT3-ITD in allen drei verwendeten Typen von Vorläuferzellen erfolgte die Entwicklung eines Thymoms mit einem von der jeweiligen Maus abhängigen Schweregrad der Erkrankung und einer mittleren Latenzzeit von 130 Tagen. Die Daten der einzelnen Tiere sind der Tabelle 6.2 im Anhang zu entnehmen. Als klinische Symptomatik wiesen diese Mäuse eine deutlich gesteigerte Atemfrequenz sowie Atemprobleme auf. Ferner konnten eine Gewichtsreduktion, eine unphysiologische Körperhaltung und struppiges Fell festgestellt werden. Die Blutanalysen zeigten in Bezug auf Hämatokrit vorwiegend Werte im Normbereich, nur vereinzelt war ein anämischer Zustand zu verzeichnen. Bei zwei Tieren wurde ein deutlich erhöhter Wert von 55% bzw. 58% gefunden. Die Leukozytenzahl hingegen war entweder erniedrigt (bei fünf Tieren unter $2 \times 10^6/\text{mL}$) oder erhöht (bei zwei Tieren über $20 \times 10^6/\text{mL}$) und lag bei fünf Tieren im unteren Normbereich ($2,0\text{-}5,8 \times 10^6/\text{mL}$). Aus diesen Befunden und der jeweiligen Krankheitsausprägung kann gefolgert werden, dass sich zu Beginn der Erkrankung ein leukopenischer Zustand einstellte, wohingegen es mit verstärkter Ausbreitung der Erkrankung zur Ausschwemmung der transformierten T-Zellen über den Blut- sowie Lymphweg in die Peripherie erfolgte, welche die Leukozytose und die Infiltration der anderen Organe erklärte. Die Auswertung der Blutausrichungen ergab, dass bei einem höheren Schweregrad vermehrt lymphoblastische Zellen sowie Erythrozytenvorläufer und Howell-Jolly-Körperchen zu finden waren. Die nachfolgend in Abbildung 3.7 dargestellten Ergebnisse der FACS-Analyse zeigten zum einen FLT3-ITD-Expression in den einzelnen Organen sowie mittels spezifischer Antikörpern den Differenzierungsstatus der Venus-positiven Zellen. Anhand eines Beispiels ist die expandierte Zellpopulation im Thymus dargestellt, welche zur Entwicklung des Thymoms führte und beim Fortschreiten der Erkrankung andere Organe ausgeschwemmt wurde.



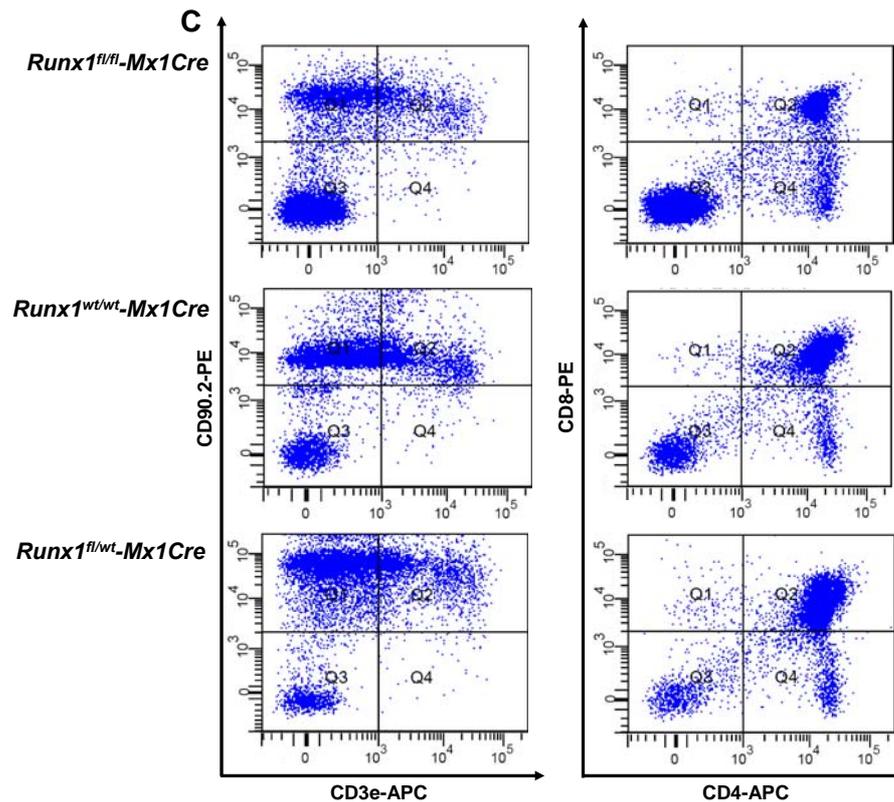


Abbildung 3.7: Zusammenfassung der Daten zum Phänotyp des Thymoms

A In dieser Graphik ist die Expression von FLT3-ITD im Thymus, Knochenmark, Milz und Blut gezeigt. Je nach Ausbreitungsgrad der T-lymphoiden Zellen waren die übrigen Organe mehr oder weniger stark infiltriert.

B Der Darstellung der FACS-Analyse der an dem Thymom erkrankten Maus #107 ist zu entnehmen, dass die im Thymus expandierte Population positiv für die Marker CD90.2, CD4 und CD8 war. Diese Zellen waren auch in Knochenmark und Milz nachzuweisen.

C Diese FACS-Analysen zeigten, dass es unabhängig von den verwendeten Vorläuferzellen normalerweise im Thymus gesunder Tiere zu einem Auftreten von Zellen kam, welche für CD3e sowie CD4 und CD8 einfach-positiv waren.

Die Auswertung dieser Daten ergab, dass es sich um eine Erkrankung der lymphoiden Zellreihe mit einer Störung im T-Zellkompartiments handelte, welche zu der Ausbreitung von im Thymus befindlichen T-Zellen führte. Diese Zellen exprimierten die Oberflächenmarker CD90.2, CD4 und CD8, wobei es aber noch nicht zu der vollständigen Expression des T-Zellrezeptors gekommen war, da die Zellen für die akzessorische Kette CD3e negativ waren. Die Darstellung der Markerexpression im Thymus von gesunden Empfängertieren zeigte, dass es bei allen Typen von transplantierten Zellen normalerweise zu einer Expression von CD3e kam und CD4- sowie CD8-positive neben der doppelt-positiven Population zu finden waren. Bei der Expression der T-Zell-spezifischen Markern bei den erkrankten Mäusen konnten daher im Vergleich zu den Kontrolltieren deutliche Unterschiede erfasst werden. Daraus ließ sich schließen, dass die Expression von FLT3-ITD in den T-Zellen zu einem Reifungsstopp und einer abnormalen Expansion der beschriebenen Zellpopulation führte. Je nach Schweregrad und Ausbreitung dieser lymphoiden Zellen erfolgte eine

Infiltration von Knochenmark, Milz und der peripheren Organe sowie der Lymphknoten. In Abbildung 3.7 ist die Unterschiedlichkeit der Ausbreitung des Thymoms zu erfassen. Wenn das periphere Blut von den CD90.2-, CD4- und CD8-positiven Zellen überschwemmt wurde, war eine Leukozytose mit einem Übergang des Thymoms in eine T-ALL anzunehmen. Bei Versuchstieren mit einer verminderten Ausbreitung des Thymoms war die Verteilung der Reifungslinien in Knochenmark, Milz und Blut mit Hinblick auf die für den jeweiligen Versuch verwendeten Vorläuferzellen normal, erst bei einer Infiltration erfolgte eine Verdrängung der normalen Blutbildung. Das Auftreten von CD90.2-positiven Zellen in diesen hämatopoetischen Organen ist normalerweise gering und konnte bei den Kontrollen im erwarteten Maß erfasst werden. Mit Hilfe von weiteren durchflusszytometrischen Analysen konnte ferner eine Infiltration von Leber und Lymphknoten nachgewiesen werden, wobei sich ebenfalls weit gestreute Werte ergaben, welche bei der Leber zwischen 1% und 55%, bei den Lymphknoten zwischen 1% und 63% für FLT3-ITD-exprimierende Zellen lagen. Diese Befunde konnten durch die histologischen Analysen bestätigt werden, wobei sich unabhängig vom betrachteten Knochenmarkhintergrund ein übereinstimmendes Bild ergab, welches exemplarisch an den Schnitten der Maus #107 in den Abbildungen 3.8 und 3.9 dargestellt ist. Im präparierten Thymus wurde jeweils eine monomorphe Population von mononukleären Blasten gefunden, welche so stark expandierte, dass eine Unterscheidung von Medulla und Cortex nicht mehr möglich war und normale Thymozyten fast völlig fehlten. Bedingt durch die Hyperplasie kam es zur Infiltration des retrosternalen Fettgewebes sowie bei weiterem Fortschreiten der Erkrankung zur Ausschwemmung der transformierten T-Zellen über den Lymphweg und das Blut. Davon waren im Verlauf zunächst Milz und Knochenmark und final die peripheren Organe betroffen. In den Organen konnte eine autonome Proliferation dieser ausgewanderten T-lymphoiden Blasten erfolgen, was zur Verdrängung der normalen Blutbildung im Knochenmark sowie einer dadurch bedingten kompensatorischen Erythropoese in der Milz führte. In der Milz war eine hyperplastische T-Zellzone in der weißen Pulpa, eine Verdrängung der Bereiche der B-Zellreifung sowie der roten Pulpa zu verzeichnen, was eine Strukturauflösung dieses Organs zur Folge hatte. Ferner konnten bei einem Versuchstier histiozytäre Zellelemente in Knochenmark und Milz erfasst werden, so dass dieses für Replantationsversuche ausgewählt wurde (siehe Abschnitt 3.5.2).

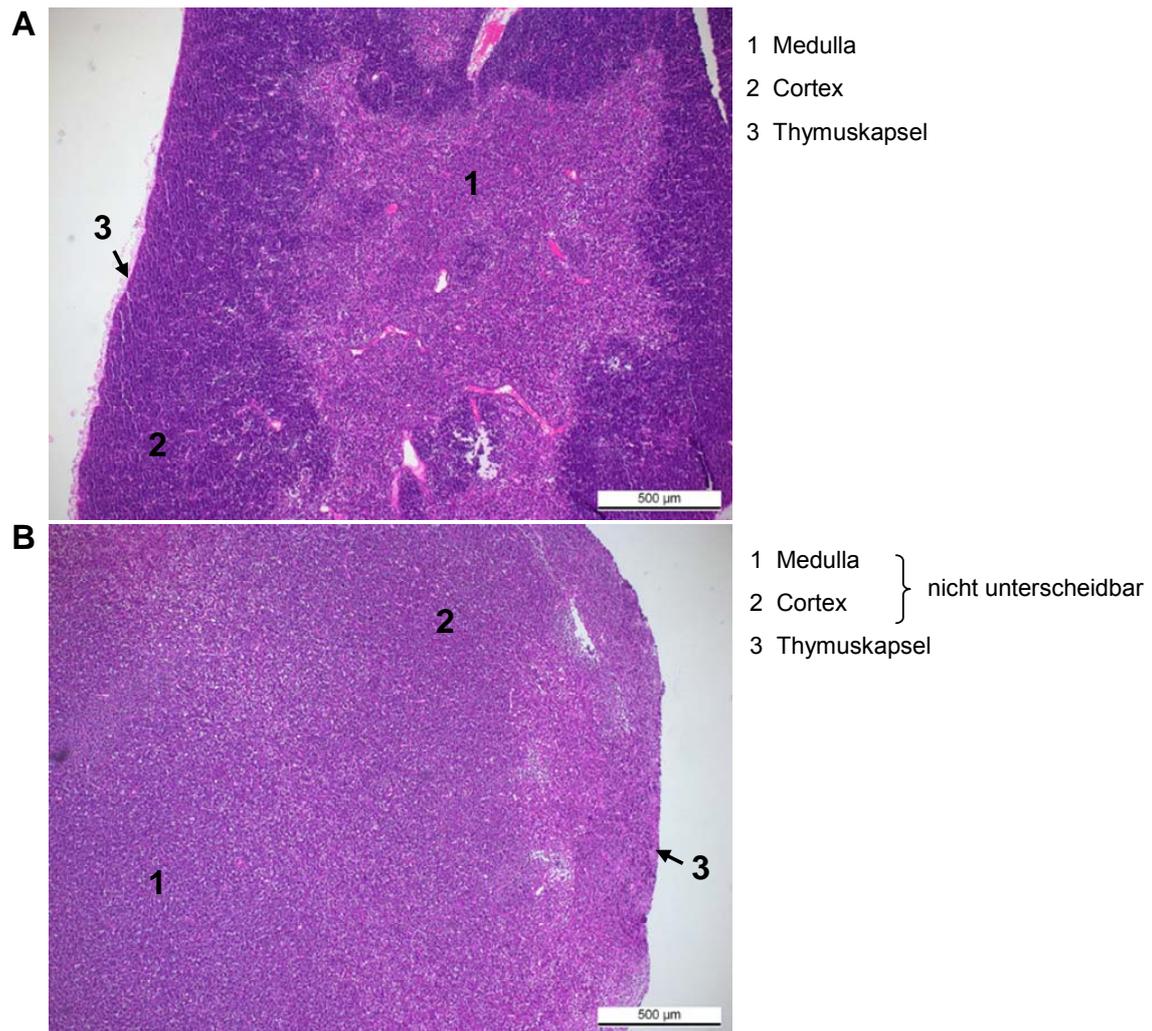


Abbildung 3.8: Darstellung des Thymus der Maus #107 im Vergleich zu einer C57BL/6J-Kontrollmaus

Im Vergleich des Thymus einer an einem Thymom erkrankten Versuchsmaus (B) mit dem einer nicht transplantierten C57BL/6J-Maus (A) ist in der fünffachen Vergrößerung der HE-Schnitte deutlich die Auflösung der Architektur des Organs sowie der Expansion einer monomorphen und mononukleären Zellpopulation zu erkennen. Dadurch war eine Unterscheidung von Medulla (1) und Cortex (2) des Thymusparenchyms nicht mehr möglich.

Wie zuvor erwähnt, kam es je nach Ausbreitung der Erkrankung zur Beteiligung der peripheren Organe Leber, Lunge und Niere, wobei die Leber vorwiegend betroffen und bei einer stärkeren Infiltration ein vermehrtes Auftreten von aktivierten Kupfferschen Sternzellen zu verzeichnen war. Ferner kam es bei zwei von fünf untersuchten Tieren zu einer vermutlich kompensatorischen Erythropoese ähnlich dem fötalen Stadium der Leber, welche durch die fast vollständige Verdrängung der Erythropoese in Knochenmark und Milz aufgrund der Expansion der T-lymphoblastischen Zellpopulation bedingt war.

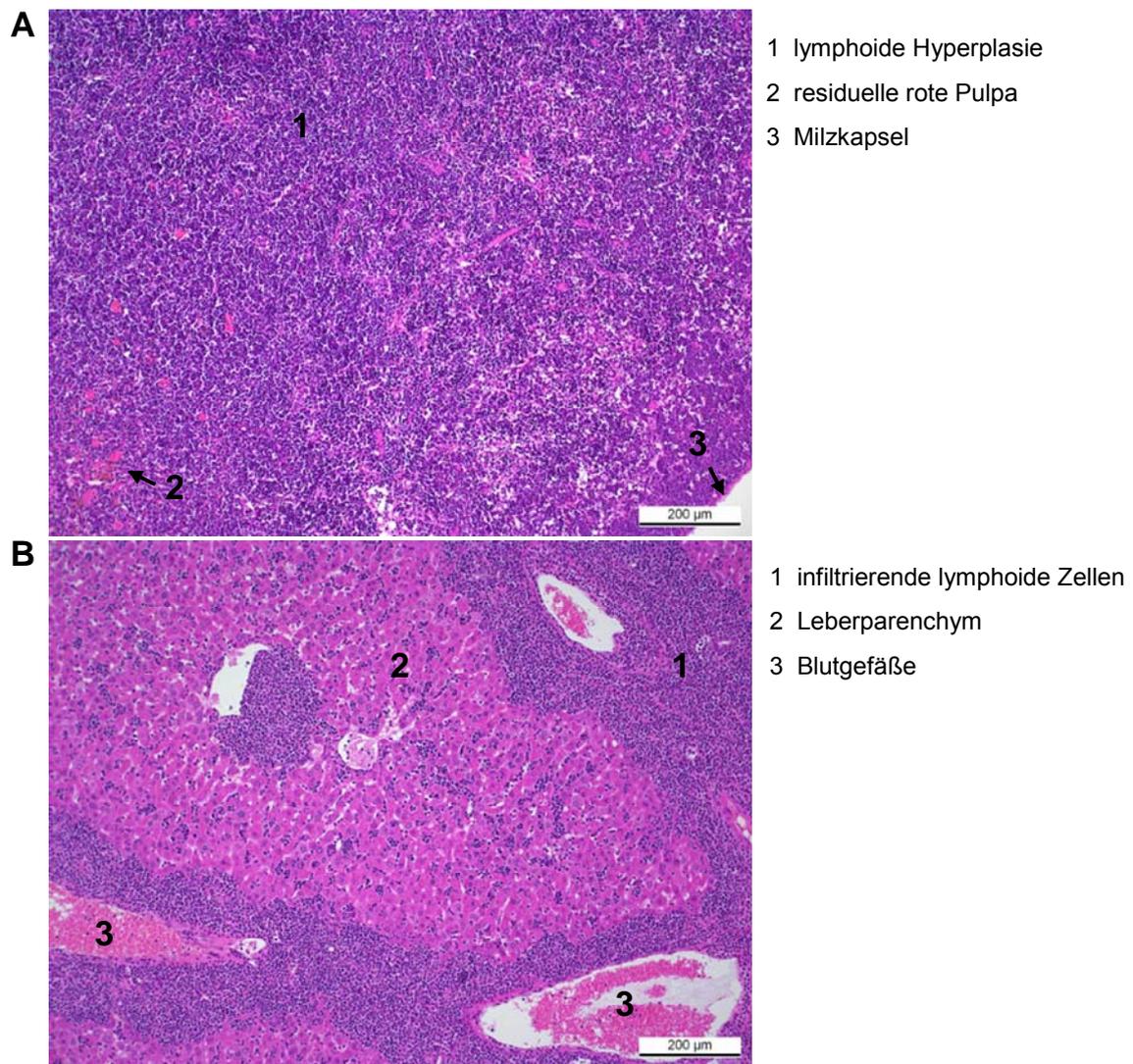


Abbildung 3.9: Histologische Befunde von Milz und Leber der Maus #107 als Beispiel für die Ausbreitung des Thymoms

A Anhand des zehnfach vergrößerten HE-Schnittes konnte erfasst werden, dass die Struktur der Milz, bestehend aus weißer und roter Pulpa (2), aufgrund der Infiltration und Expansion der T-lymphoiden Zellpopulation aufgelöst wurde. Es kam in diesem Fall zu einer vollständigen Verdrängung der normalen Blutbildung.

B Der HE-gefärbte Leberschnitt zeigte in einer zehnfachen Vergrößerung das Ausmaß der Infiltration der peripheren Organe durch die T-lymphoiden Zellen in dieser Maus.

Bei den Mäusen, denen transduzierte *Runx1^{fl/fl}-Mx1Cre-* oder *Runx1^{fl/wt}-Mx1Cre-*Zellen transplantiert wurden, erfolgte eine PCR-Analyse zum Nachweis der Exzision oder des Vorhandenseins von Exon 5 von *Runx1*. In Abbildung 3.10 ist je Knochenmark-hintergrund beispielhaft ein Agarosegel einer solchen Analyse gezeigt.

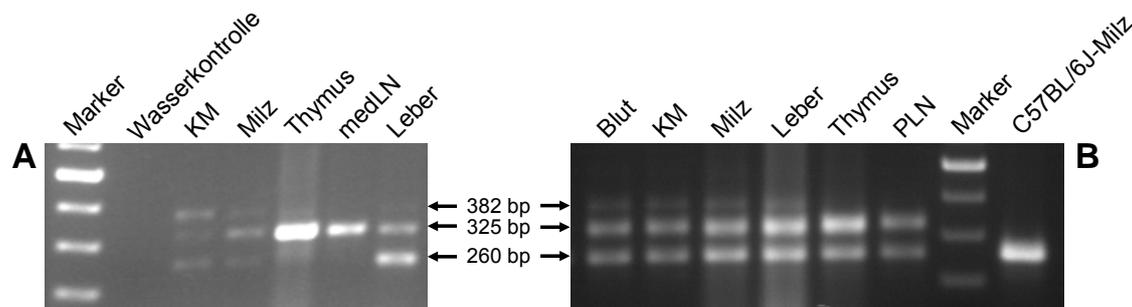


Abbildung 3.10: 1,5%-iges Agarosegel der PCR-Analyse von den Tieren #106 und #276

Bei dieser PCR-Analyse der entnommenen Organe der Versuchstiere #106 (A) und #276 (B), denen mit FLT3-ITD transduzierte Vorläuferzellen des Typs *Runx1^{fl/fl}-Mx1Cre* (A) bzw. *Runx1^{fl/wt}-Mx1Cre* (B) transplantiert wurden, repräsentierte die Bande von 382 bp die Deletion des Exons 5 von *Runx1*, wohingegen die Bande von 325 bp das Vorhandensein der *loxP*-flankierten Gensequenz anzeigt. Ferner war die Wildtypbande von 260 bp zu erfassen.

Diesen Daten war zu entnehmen, dass zwar es in einigen Organen zu einer Inaktivierung von *Runx1* durch die Exzision des Exons 5 kam, im Thymus aber eine Selektion auf *Runx1*-exprimierende Zellen stattgefunden hat. Zusammenfassend ist daher zu sagen, dass die Expression der konstitutiv aktivierten Tyrosinkinase in diesen transplantierten Mäusen ein Thymom auslöste, bei dem eine *Runx1*-Expression vorteilhaft war und eine sehr starke Expansion zu einer T-ALL führen konnte.

3.2.1.2 Entstehung einer B-Zellerkrankung

Aus der Graphik B zum kumulativen Überleben der transplantierten Mäuse (Abbildung 3.6) ist abzulesen, dass es nur bei der Expression von FLT3-ITD im *Runx1^{wt/wt}-Mx1Cre*-Hintergrund in 25% der Fälle zu der Entwicklung einer B-Zellerkrankung mit einer Latenzzeit von 128 bzw. 131 Tagen kam. Klinisch wiesen diese Mäuse einen verminderten Bewegungsdrang mit unphysiologischer Körperhaltung und struppiges Fell auf. Die Blutanalyse zeigte sehr gegensätzliche Ergebnisse, da die zuerst erkrankte Maus (#122) einen leicht erniedrigten Hämatokrit von 33% und eine deutliche Leukozytose mit 52×10^6 Leukozyten/mL zeigte, wohingegen die zweite Maus (#123) anämisch (Hämatokrit von 10%) und leicht leukopenisch ($1,4 \times 10^6$ Leukozyten/mL) war. Bei der Präparation der Mäuse war auffällig, dass es bei #122 zu einer starken Vergrößerung der Milz kam (718 mg), wohingegen bei #123 das Milzgewicht zwar ebenfalls deutlich erhöht war (406 mg), aber zusätzlich eine Infiltration aller untersuchten Lymphknoten erfolgte (6-35% FLT3-ITD-Expression). Der Thymus zeigte bei beiden Mäusen eine normale Größe, war aber ebenfalls infiltriert (26%). Die Auswertung der angefertigten Blutausrichte zeigte im Falle von #122 das Vorkommen von lymphoiden Blasten sowie allgemeine Leukämiezeichen wie eine große Anzahl an Howell-Jolly-Körperchen und polychromatische, auffällig geformte Erythrozyten. Durch nachfolgende histologische

Untersuchungen von Knochenmark, Milz und Leber als infiltrierte peripheres Organ konnte die Expansion von lymphoiden Blasten bestätigt werden. In der Milz zeigte sich, dass durch den Blastentumor die weiße Pulpa zersetzt und die rote Pulpa zurückgedrängt wurde. Die Expansion der Blasten im Knochenmark war bei der Maus #122 so weit vorangeschritten, dass es ausgehend von der Knochenmarkhöhle zu einer Infiltration der das Sternum umgebenden intercostalen Muskulatur über das Foramen nutritivum kam. Die in Tabelle 3.1 zusammengefasste FACS-Analyse gab Aufschluss über die FLT3-ITD-Expression in den einzelnen Organen sowie über den Differenzierungsstatus der lymphoiden Zellen.

Tabelle 3.1: Zusammenfassung der FACS-Analyse der erkrankten Mäuse

Nach der Präparation der Mäuse wurden die entnommenen Organe mittels einer FACS-Analyse in Bezug auf die Venus-Expression sowie das Vorhandensein von Linien-spezifischen Markern in den FLT3-ITD-exprimierenden Zellen getestet.

		Knochenmark		Milz		Blut	
		#122	#123	#122	#123	#122	#123
Venus		50%	60%	28%	67%	86%	59%
Antikörper							
B220		94%	54%	84%	6%	97%	n.b.
davon	B220+CD43	48%	49%	47%	5%	58%	n.b.
	B220+CD19	84%	46%	67%	5%	71%	n.b.
CD43		2%	40%	4%	92%	0%	n.b.
davon	CD43+CD19	n.b.	n.b.	n.b.	62%	n.b.	n.b.

Die durchflusszytometrische Analyse ergab, dass die in diesen Versuchsmäusen expandierten Lymphoblasten der B-Zellreifungsreihe angehörten und vorwiegend B220 exprimierten. Dieser Marker konnte im Knochenmark von Kontrollmäusen nur zu 9% nachgewiesen werden, während in Milz und Blut eine höhere Expression (42% bzw. 24%) zu verzeichnen war. Neben B220 waren die lymphoblastischen Zellen für CD43 und CD19 positiv, was auf ein Vorkommen von unreifen Vorläuferzellen und von bis zum Prä-B-Zellstadium ausgereiften Zellen schließen ließ. Die weitere Reifung der B-Zellen war blockiert, da nur wenige IgM-positive Zellen erfasst werden konnten (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich zu dieser Zellpopulation war bei Maus #123 ein weiterer unreiferer Zelltyp zu verzeichnen, welcher nur CD43 als Oberflächenmarker aufwies. In Knochenmark und Blut von der Maus #123 waren beide Zellpopulationen ähnlich stark vertreten, in Milz hingegen überwogen die unreiferen Zellen, während in Thymus und Lymphknoten fast ausschließlich reifere Zellen zu finden waren. Die starke Expansion des B-Zellkompartiments im Knochenmark führte zu einem Zurückdrängen der myeloiden sowie bei einem stärkeren Fortschreiten auch der erythroiden Zellentwicklung, wie es an dem anämischen Zustand der später erkrankten Maus sowie durch weitere FACS-Analysen festzustellen war.

Die Expression von FLT3-ITD löste in diesen transplantierten Mäusen eine Blastenleukämie mit einer Ausreifungsstörung der B-Zellen aus. Ein solches

Erscheinungsbild einer Prä-B-Zellleukämie bei dem Vorhandensein der konstitutiv aktivierten Tyrosinkinase FLT3-ITD sowie eine genaue Analyse des Reifungsblocks und der bedingten Störung der Signaltransduktion wurden im Rahmen eines C57BL/6J-Mausmodells von B. Niebuhr und A. Werk beschrieben. Daher wurde die Analyse dieses Phänotyps in dieser Arbeit nicht weiter verfolgt.

3.2.2 Myeloide Erkrankungen induziert durch FLT3-ITD bei gleichzeitiger *Runx1*-Inaktivierung

In den hämatopoetischen Zellen, in denen eine *Runx1*-Inaktivierung möglich war, führte die Expression von FLT3-ITD in den jeweiligen Empfängertieren zur Entwicklung myeloider Phänotypen, welche nachfolgend näher beschrieben werden. Zunächst werden allerdings die Folgen der *Runx1*-Inaktivierung erläutert, welche durch die Analyse der mitgeführten Kontrolltiere erfasst werden konnten.

3.2.2.1 Alleinige Wirkung der *Runx1*-Inaktivierung *in vivo*

Bezüglich einer *Runx1*-Defizienz im konditionalen *Knock-out*-Mausmodell ist, wie zuvor erwähnt, bekannt, dass es zu einer Beeinflussung der Ausreifung verschiedener Zellreihen der Hämatopoese kommt. Weiterhin wurde die Entwicklung eines myeloproliferativen Phänotyps beschrieben, welcher als ein präleukämischer Zustand aufgefasst wird und durch das Auftreten weiterer Mutationen in eine Leukämie münden könnte (Ichikawa et al., 2004; Sun und Downing, 2004; Gowney et al., 2005; Putz et al., 2006). Es wurde aufgrund der vorherigen Studien erwartet, dass durch die mögliche Inaktivierung von *Runx1* unabhängig von einer pIpC-Injektion bei den Kontrolltieren, denen Vorläuferzellen des Typs *Runx1^{fl/fl}-Mx1Cre* oder *Runx1^{fl/wt}-Mx1Cre* transplantiert wurden, Auffälligkeiten der hämatopoetischen Reifungsreihen zeigen konnten. Bei einer Wildtypexpression von *Runx1* wurden hingegen keine Veränderungen erwartet.

Zwei Kontrollen, die mit dem Venus-Vektor transduzierte Vorläuferzellen des Typs *Runx1^{fl/fl}-Mx1Cre* erhalten haben, verstarben innerhalb des Versuchszeitraums von 200 Tagen. Eine Analyse konnte nicht durchgeführt und damit keine Begründung für das plötzliche Versterben ermittelt werden. Dies könnte auf die nachfolgend beschriebenen Veränderungen des myeloiden Kompartiments und einer damit verbundenen Verminderung der Lebenserwartung der Tiere zurückzuführen sein. Erkrankungen von Kontrolltieren konnten innerhalb des Beobachtungszeitraums nicht festgestellt werden. Die erhobenen Daten der Venus-Kontrolltiere sind den Tabellen 6.5 und 6.6 im Anhang zu entnehmen.

Neben Tieren, denen mit dem Venus-Kontrollvektor transduzierte Zellen transplantiert wurden, standen Versuchsmäuse zur Verfügung, die kultivierte, aber nicht

transduzierte Vorläuferzellen des Typs *Runx1^{fl/fl}-Mx1Cre* (#232 und #233) oder *Runx1^{wt/wt}-Mx1Cre* (#244-#247) erhalten haben (siehe Tabelle 6.4 im Anhang). Diese dienten ebenfalls der Anfertigung von Kontrollanalysen. Die Kontrollmaus #233 zeigte bei der Analyse nach 122 Tagen ohne vorangegangene Symptomatik eine beginnende Myeloproliferation in Knochenmark und Milz, welche auf die Inaktivierung von *Runx1* zurückzuführen war. Die Histologie der normal großen Milz von Maus #233 im Vergleich zu einem C57BL/6J-Tier sowie die Ergebnisse der FACS- und PCR-Analyse sind in den Abbildungen 3.11 und 3.12 zusammengefasst.

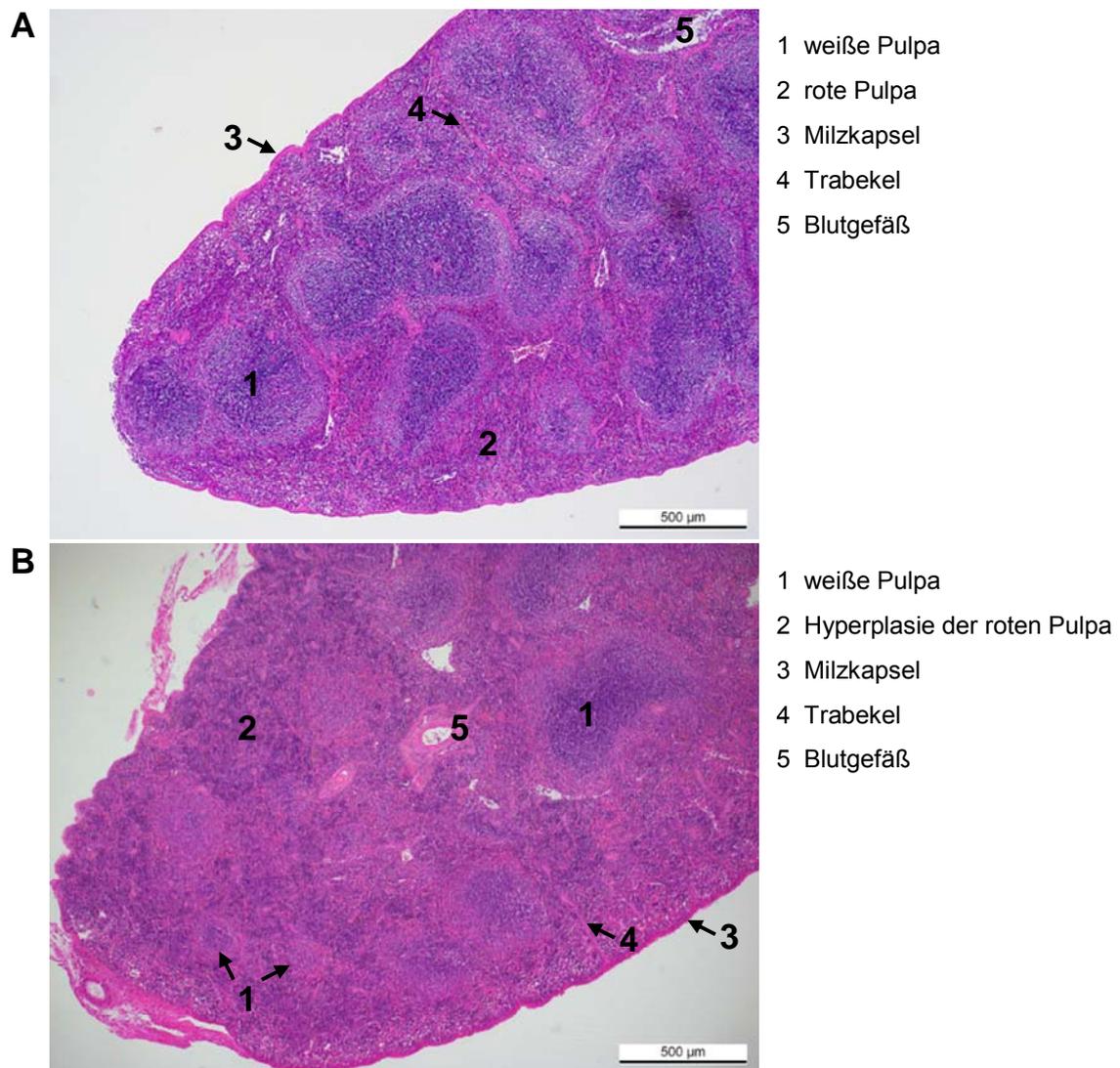


Abbildung 3.11: Darstellung der Befunde zu der Maus #233

In dem histologischen, HE-gefärbten Schnitt der Milz des Versuchstiers #233 (B) zeigte sich im Vergleich zu der Milz einer nicht transplantierten C57BL/6J-Maus (A; jeweils fünffache Vergrößerung) eine Verschiebung des Verhältnisses der weißen (1) und roten Pulpa (2) zugunsten der roten Pulpa, welche durch die Proliferation myeloider Zellen bedingt war, aber nicht zu einer Organvergrößerung sowie keiner Symptomatik führte.

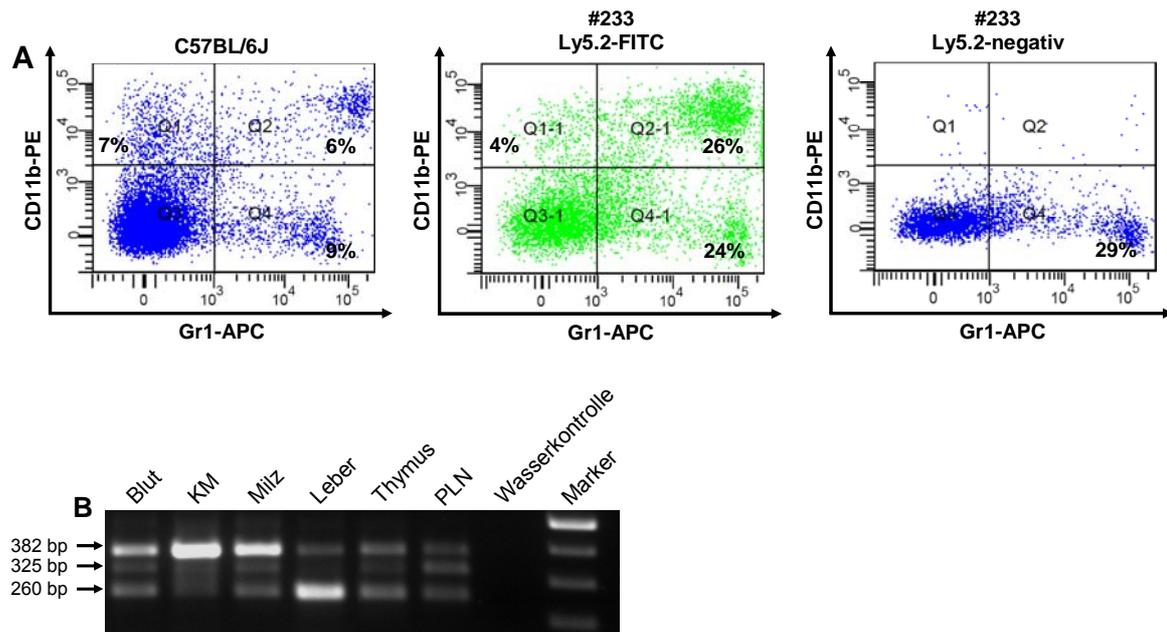


Abbildung 3.12: FACS-Analyse der Milz sowie PCR-Analyse der Organe der Maus #233

A Der Vergleich der FACS-Analyse der Milz des Versuchstiers #233 mit derjenigen einer C57BL/6J-Maus gleichen Alters ergab eine vergrößerte myeloide Population, welche durch die Marker CD11b und/oder Gr1 gekennzeichnet war. Der Antikörper Ly5.2 diente dem Nachweis der transplantierten Zellen.

B In der PCR-Analyse der Organe der Maus #233 konnte eine Deletion des Exons 5 von *Runx1* erfasst werden, welche durch das Auftreten der Bande von 382 bp angezeigt wurde. Weiterhin war die Bande der *loxP*-flankierten Gensequenz (325 bp) sowie die Wildtypbande von 260 bp zu erfassen. Dabei war das Auftreten der Wildtypbande auf das Vorkommen residueller Zellen der Empfängermaus selbst oder langlebiger T-Zellen der transplantierten Milzzellen zurückzuführen.

Dem Vergleich einer C57BL/6J-Kontrolle mit dem Versuchstier #233 ist bezüglich der FACS-Analyse zu entnehmen, dass es aufgrund der Inaktivierung von *Runx1* zu einem vermehrten Vorkommen myeloider Zellen in der Milz kam. Ähnliches konnte für das Knochenmark festgestellt werden, wobei hierbei eine Zunahme der Zellpopulation erfolgte, welche CD11b und Gr1 exprimierten (Daten nicht gezeigt). Hingegen zeigte sich in der Milz eine Vermehrung der CD11b- und Gr1-positiven sowie nur Gr1-positiver Zellen.

Dieser myeloproliferative Phänotyp, bedingt durch die Inaktivierung von *Runx1*, war ebenfalls bei Venus-Kontrolltieren festzustellen, die erst nach Ablauf von 200 Tagen zu unterschiedlichen Zeitpunkten analysiert wurden. Die histologische Untersuchung von fünf Mäusen (#93, #94, #98, #102 und #150) ergab, dass bei zwei Tieren mit einem erhöhten Milzgewicht dieses auf eine Myeloproliferation zurückzuführen war. Beispielhaft sind die Ergebnisse für die Maus #150 in Abbildung 6.3 im Anhang dargestellt. Die stärkere Ausprägung des Phänotyps war vermutlich durch das höhere Alter der Tiere bei der Präparation bedingt. Ein vermindertes Thymusgewicht sowie eine erniedrigte Thrombozytenzahl bei einigen Kontrolltieren, denen Zellen des Typs *Runx1^{fl/fl}-Mx1Cre* transplantiert wurden, gingen ebenfalls mit der Inaktivierung von *Runx1* einher, wie es in der Literatur beschrieben ist (Ichikawa et al., 2004;

Growney et al., 2005; Putz et al., 2006). So zeigte sich bei der Maus #150 nicht nur der histologisch erfasste myeloproliferative Phänotyp, sondern auch ein besonders niedriger Thrombozytenwert. Die Ergebnisse der analysierten Venus-Kontrolltiere wurden mit nicht transplantierten C57BL/6J-Kontrollmäusen sowie transplantierten Kontrolltieren (s.o.) in Bezug auf Milz- und Thymusgröße, ferner hinsichtlich der Blutparameter verglichen. Die erhobenen Daten sind den Tabellen 6.3 bis 6.6 und der Abbildung 6.2 im Anhang zu entnehmen.

Für heterozygote Mäuse ist beschrieben, dass Veränderungen des Stammzellkompartiments und eine Verminderung der CD4-positiven T-Zellen sowie Thrombozyten festzustellen sind (Sun und Downing, 2004). In dem Modell dieser Arbeit wurde allerdings bei Venus-Kontrollmäusen, denen Vorläuferzellen des Typs *Runx1^{fl/wt}-Mx1Cre* transplantiert wurden, in denen eine Exzision des Exons 5 von *Runx1* erfolgte, zusätzliche Auffälligkeiten erfasst. Die Tiere zeigten erhöhte Leukozytenwerte sowie eine Verschiebung des Differentialblutbildes mit einem höheren Anteil an Lymphozyten und einem niedrigeren an Neutrophilen.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass aufgrund der Verwendung des *Mx1Cre*-Stammes, welcher als *leaky* bezeichnet werden muss, auch in nicht induzierten Kontrolltieren zu einer Inaktivierung von *Runx1* kommen konnte. Diese äußerte sich bei einigen Mäusen, welchen Zellen des Typs *Runx1^{fl/fl}-Mx1Cre* transplantiert wurden in Form einer myeloproliferativen Phänotyp sowie einer pathologischen Veränderung der Megakaryozytenreifung, wie es in der Literatur beschrieben ist (Growney et al., 2005; Putz et al., 2006). Allerdings führten diese Veränderungen innerhalb des Beobachtungszeitraums von 200 Tagen nicht zu einer Erkrankung der Mäuse, wobei dies bei den zwei verstorbenen Tieren nicht auszuschließen ist. Die histologisch untersuchten Venus-Kontrollmäuse wurden erst längere Zeit nach Ablauf des Versuchs analysiert. Bei den heterozygoten Venus-Kontrolltieren gab es die erwähnten, bei den *Runx1^{wt/wt}-Mx1Cre*-Kontrollen keine Auffälligkeiten.

3.2.2.2 Auftreten einer beschleunigten Myeloproliferation bei einer Expression von FLT3-ITD

Während die Venus-Kontrolltiere innerhalb des Beobachtungszeitraums nicht aufgrund der durch die *Runx1*-Defizienz bedingten Myeloproliferation erkrankten und analysiert werden mussten, erlagen drei Tiere, denen mit FLT3-ITD transduzierte Vorläuferzellen des Typs *Runx1^{fl/fl}-Mx1Cre* transplantiert wurden, in diesem Zeitraum einer histologisch diagnostizierten Myeloproliferation. Diese Erkrankung trat in einem Fall mit 40 Tagen Latenzzeit recht früh im Versuchsverlauf auf, wohingegen die anderen Tiere erst nach 121 Tage Auffälligkeiten zeigten. In der klinischen Symptomatik wiesen alle Mäuse eine deutliche Gewichtsreduktion innerhalb kurzer Zeit, ein

struppiges Fell sowie eine unphysiologische Körperhaltung in Form eines aufgekrümmten Rückens auf. Bei der Blutanalyse wurde jeweils ein Hämatokrit im Normbereich sowie bei den zuletzt erkrankten Mäusen eine niedrige Leukozytenzahl festgestellt. Die Auswertung der angefertigten Blutausrichte ergab einen pathologischen Befund, welcher sich bei der früh erkrankten Maus als eine nur im Ausstrich zu erfassenden Leukopenie mit leichter myeloider Linksverschiebung und polychromatischen Erythrozyten sowie das vermehrte Auftreten von Howell-Jolly-Körperchen äußerte. Dadurch wurde eine Störung der myeloiden Zellreifungsreihe sowie eine Fehlfunktion der Milz angedeutet. Die beiden anderen Tiere wiesen neben einer Leukopenie nur wenige Anhaltspunkte im peripheren Blut für eine solche Störung auf. Bezüglich Milz und Thymus war festzustellen, dass allein die zuerst erkrankte Maus ein erhöhtes Milzgewicht zeigte. Alle Daten dieser Versuchstiere sind der Tabelle 6.7 im Anhang zu entnehmen. Die durchgeführten FACS-Analysen der Zellsuspensionen der verschiedenen Organe gab zum einen Aufschluss darüber, wie hoch die Venus- und somit FLT3-ITD-Expression war, und zum anderen konnte mit Hilfe von spezifischen und gegen die Oberflächenmarker der Zellen gerichteten Antikörpern der Differenzierungsstatus der negativen sowie auch Venus-positiven Zellen ermittelt werden. In Tabelle 3.2 sind die Ergebnisse der FLT3-ITD-exprimierenden Zellen zusammengefasst.

Tabelle 3.2: Zusammenfassung der durchflusszytometrischen Analyse der erkrankten Versuchstiere

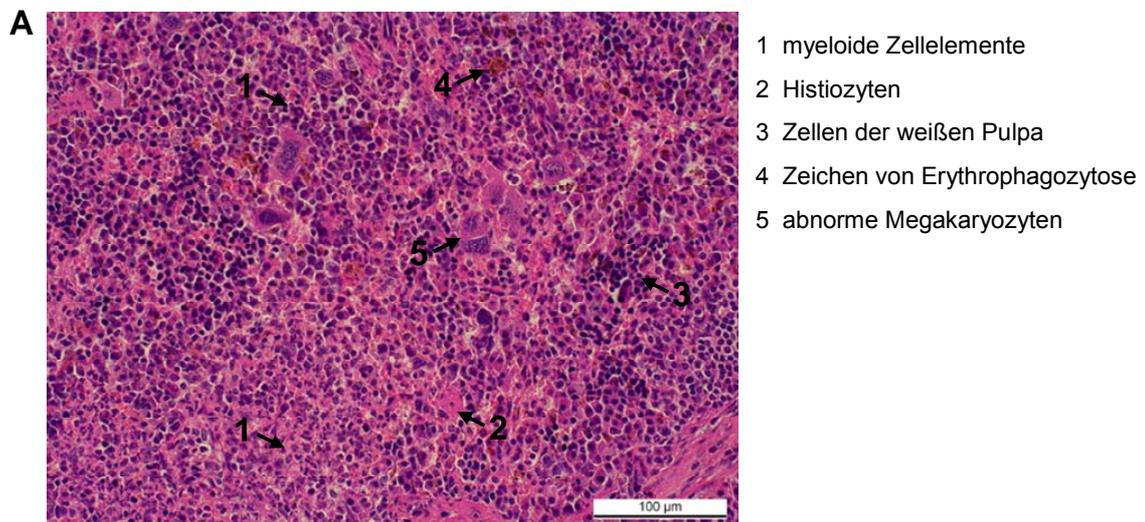
Nach der Präparation der Mäuse wurden Einzellsuspensionen der entnommenen Organe mittels einer FACS-Analyse in Bezug auf die Venus-Expression sowie das Vorhandensein von Reifungslinien-spezifischen Markern auf den FLT3-ITD-exprimierenden Zellen untersucht.

	Knochenmark			Milz			Blut		
Maus	#155	#156	#158	#155	#156	#158	#155	#156	#158
Venus	29%	8%	28%	43%	9%	14%	37%	6%	37%
Antikörper									
CD11b	2%	9%	5%	1%	5%	12%	n.b.	n.b.	n.b.
CD11b+Gr1	28%	61%	67%	9%	54%	35%	n.b.	n.b.	n.b.
Gr1	6%	4%	3%	10%	14%	14%	n.b.	n.b.	n.b.
B220	12%	5%	3%	3%	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
CD90.2, CD3e	12%	5%	4%	3%	24%	14%	n.b.	n.b.	n.b.
Ter119	45%	n.b.	n.b.	71%	5%	4%	n.b.	n.b.	n.b.

Den dargestellten Daten war zu entnehmen, dass bei den spät erkrankten Tieren ein Großteil der FLT3-ITD-positiven Zellen in Knochenmark und Milz myeloiden Ursprungs war und CD11b sowie Gr1 exprimierten. Hingegen zeigte die Maus #155 ein vermehrtes Auftreten erythroider Zellen (Ter119-positiv). Durch die Vergrößerung des myeloiden Kompartiments kam es zur Verdrängung der lymphoiden Zellpopulation, welche zu einem geringeren Prozentsatz erfasst werden konnten (B220-positive B-Zellen, CD90.2- sowie CD90.2- und CD3e-positive T-Zellen). Eine Ausschwemmung der FLT3-ITD-exprimierenden Zellen in periphere Organe und Lymphknoten wurde

nicht verzeichnet. Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, war auch bei Venus-Kontrolltieren nach Ablauf des Versuchs ein myeloproliferativer Phänotyp zu verzeichnen. Beispielsweise konnte bei der Maus #150, die eine deutliche Ausprägung zeigte, einen Anteil an CD11b- und Gr1-positiven Zellen von 38% im Knochenmark und 47% in der Milz festgestellt werden. Erythroide Zellen wurden zu 25% im Knochenmark erfasst.

In Bezug auf alle drei erkrankten Mäuse wurde bei der histologischen Analyse festgestellt, dass in dem normo- bis hyperzellulären Knochenmark die Megakaryopoese reduziert und eine myeloide Hyperplasie zu verzeichnen war. Bei den beiden spät erkrankten Tieren wurde zusätzlich eine Verminderung der Erythropoese erfasst. Während das zuerst analysierte Tier auch unreifere myeloide Zellen zeigte, wiesen die beiden anderen Tiere insgesamt eine verstärkte Granulopoese mit einer weitreichenden Differenzierung der Zellen bis zum Granulozyten auf. Dieser pathologische Befund des Knochenmarks setzte sich in der Milz fort und zeigte sich durch eine verstärkte Myeloproliferation in der roten Pulpa, wie es in Abbildung 3.13 dargestellt ist. Ferner kam es aufgrund dieser Hyperplasie zu einem Zurückdrängen der lymphoiden Reifungszonen innerhalb der weißen Pulpa, wobei diese bei den später erkrankten Mäusen zusätzlich als dysplastisch anzusehen war. Neben dem Befund der Myeloproliferation wurde bei der Maus #158 eine Histiozytose diagnostiziert, welche mit einer Makrophagen- sowie Plasmazellhyperplasie assoziiert war. Die Veränderung der Megakaryopoese war bei der Maus #156 auch in der Milz festzustellen.



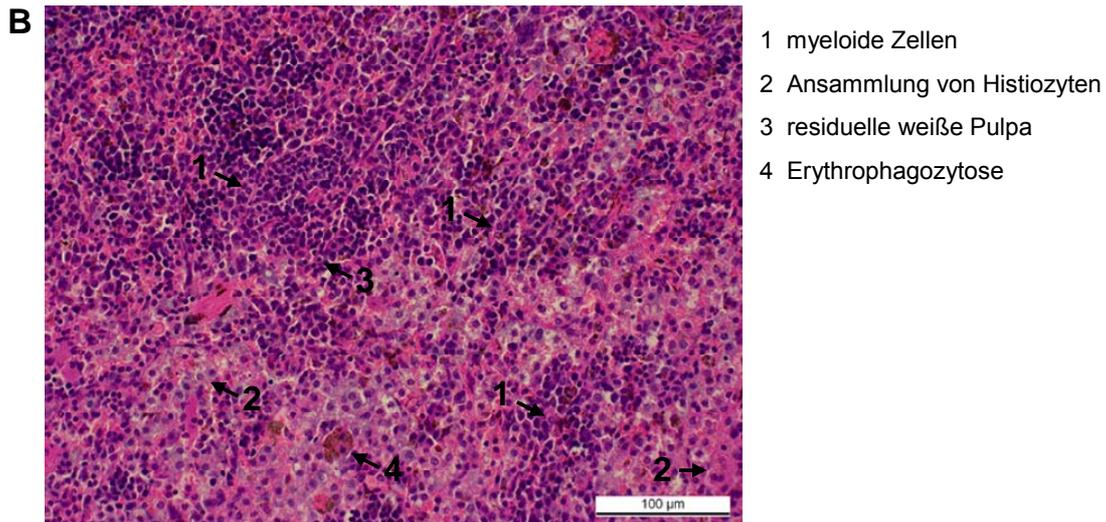


Abbildung 3.13: Histologische Befunde der Milzen von den Tieren #156 und #158

In den HE-gefärbten Milzschnitten von den Mäusen #156 (A) und #158 (B) konnten in der 25-fachen Vergrößerung (unter Verwendung von Immersionsöl) die massiven Veränderungen der roten und weißen Pulpa (3) dargestellt werden. Neben der durch myeloide (1) und histiozytäre Zellelementen (2) bedingten Hyperplasie der roten Pulpa wurden Störungen der Megakaryopoese (5) und die verstärkte Phagozytose von Erythrozyten (4) erfasst.

Mittels einer in Abbildung 3.14 gezeigten PCR-Analyse zum Nachweis der Exzision und/oder des Vorhandenseins des Exons 5 von *Runx1* sollte geklärt werden, ob kooperierende Effekte der FLT3-ITD-Expression und der Inaktivierung von *Runx1* zu dem Krankheitsbild der beschleunigten Myeloproliferation geführt haben oder ob allein die Expression der konstitutiv aktivierten Tyrosinkinase bei einem gleichzeitigen Vorhandensein von *Runx1* für die Entwicklung ausreichte.

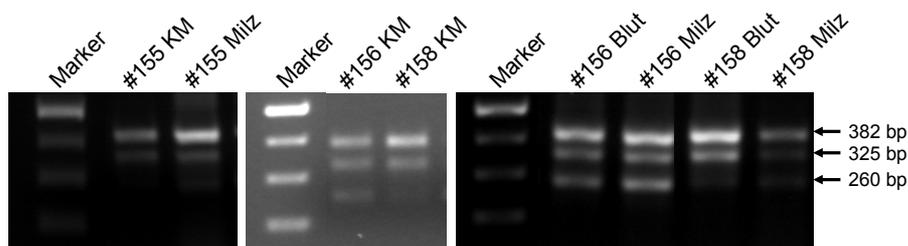


Abbildung 3.14: 1,5%-iges Agarosegel der PCR-Analysen der erkrankten Mäuse

Die PCR-Analyse der entnommenen Organe zeigte zum einen die Bande von 382 bp, welche die Deletion des Exons 5 von *Runx1* repräsentierte, und zum anderen die Bande von 325 bp für das Vorhandensein der *loxP*-flankierten Gensequenz. Ferner war die Wildtypbande von 260 bp zu verzeichnen.

Wie in der Abbildung 3.14 zu erkennen ist, zeigte sich in Knochenmark, Milz und Blut jeweils nur eine partielle Exzision, wobei die Inaktivierung von *Runx1* in der Milz stärker zum Tragen gekommen zu sein scheint. Neben den Banden zum Nachweis der Exzision des Exons 5 (382 bp) sowie derjenigen beim Vorhandensein beider *loxP*-Sequenzen (325 bp) war bei der Maus #156 auch die Wildtypbande (260 bp)

vorhanden, welche auf Ly5.1-positive Zellen der Empfängermaus selbst oder den transplantierten Milzzellen einer C57BL/6J-Maus zurückgeführt werden konnte. Anhand dieser Auswertung ist zu erkennen, dass die Expression von FLT3-ITD bei gleichzeitiger Inaktivierung von *Runx1* die Entwicklung einer Myeloproliferation beschleunigte, so dass diese innerhalb des Beobachtungszeitraums zu einer Erkrankung der Versuchstiere führte. Die Tatsache, dass bei einer Expression von FLT3-ITD im *Runx1^{wt/wt}-Mx1Cre*-Hintergrund dieses Krankheitsbild bei keiner der Versuchsmäuse auftrat, spricht dafür, dass dieses mit einer Inaktivierung von *Runx1* in den Zellen von Knochenmark, Blut und Milz korrelierte und es sich dabei um einen kooperierenden Effekt von FLT3-ITD und der *Runx1*-Defizienz handelte.

3.2.2.3 Entwicklung einer monozytären Neoplasie im heterozygoten Knochenmarkhintergrund

Die Expression von FLT3-ITD im heterozygoten *Runx1*-Hintergrund führte bei einem Tier zu einer monozytären Erkrankung mit einer Latenzzeit von 75 Tagen. Als klinische Symptome zeigte die Maus eine deutliche Gewichtsreduktion innerhalb kurzer Zeit, ein struppiges Fell, einen aufgekrümmten Rücken sowie eine partielle Parese der Hinterläufe. Bei der Blutanalyse wurden bezüglich des Hämatokrit ein Wert im Normbereich von 40% sowie eine Leukozytenzahl von $10 \times 10^6/\text{mL}$ ermittelt, welche im oberen Normbereich lag. Die Auswertung des Blutausrichs ergab eine Monozytose, wobei alle Reifungsstufen der monozytären Reihe vorhanden waren, aber die unreifen Vorläuferzellen überwogen. Ferner zeigten die Erythrozyten pathologische Auffälligkeiten wie Polychromasie und Howell-Jolly-Körperchen, die auf eine dysplastische Veränderung dieser Zellreihe hinwiesen. Während der Präparation zeigte allein die Milz eine deutliche Vergrößerung (278 mg), wohingegen Thymus und Leber als normal eingestuft wurden. Die durchflusszytometrische Analyse ergab allerdings eine histologisch bestätigte Infiltration von Leber (12%) und den peripheren Lymphknoten (3%). Der Thymus war ebenfalls betroffen, wobei es sich bei den Großteil der Zellen aber um frühe T-Zellen handelte, welche den Oberflächenmarker CD90.2, nicht aber CD3e exprimierten und somit den in Abschnitt 3.2.1.1 beschriebenen Zellen des Thymoms ähnelten. Die Analyse der übrigen Zellsuspensionen in Bezug auf die FLT3-ITD-Expression sowie den Differenzierungsstatus der Venus-positiven Zellen ist in Tabelle 3.3 dargestellt.

Tabelle 3.3: Zusammenfassung der FACS-Analyse von Maus #277

Nach der Präparation wurden die entnommenen Organe mittels einer FACS-Analyse in Bezug auf die Venus-Expression sowie das Vorhandensein von Reifungslinien-spezifischen Markern auf den FLT3-ITD-exprimierenden Zellen getestet.

	Knochenmark	Milz	Blut	Thymus
Venus	57%	39%	25%	7%
Antikörper				
CD11b	54%	76%	50%	n.b.
CD11b+Gr1	45%	20%	45%	n.b.
Gr1	1%	1%	1%	n.b.
B220+CD19	0%	4%	3%	n.b.
CD90.2	0%	1%	0%	92%
CD90.2+CD3e	0%	1%	2%	4%
CD3e	1%	1%	0%	1%

Anhand der FACS-Daten wurde festgestellt, dass im myeloiden Zellkompartiment insbesondere der Anteil an monozytären Zellen, welcher durch die alleinige Expression von CD11b repräsentiert wurde, stark vergrößert war. Dies ist in Abbildung 3.16 in Form der FACS-Analyse des Knochenmarks gezeigt. Eine CD11b-Population war in den Kontrollen nur zu einem geringen Maße in den hämatologischen Organen zu verzeichnen. Die Expansion dieser Zellpopulation war in der erkrankten Maus so groß, dass es im Sternum zu einem Ausbruch der Zellen, ähnlich wie bei der myeloiden Neoplasie (siehe Abschnitt 3.3.1), aus der Knochenmarkhöhle in das umgebende Gewebe erfolgte. In Abbildung 3.15 ist als Grund für das Auftreten der Parese im Bereich der Lendenwirbelsäule die Ausweitung der entarteten Zellen im peripheren Nervensystem bis hin zur Dura mater spinalis sowie deren Eindringen in den Subarachnoidalraum zu erkennen. Das anormale Vorkommen der Zellen führte vermutlich zu einer Einengung der vom Rückenmark abgehenden Nervenfasern, wobei die resultierende Störung der Reizleitung die Funktionsfähigkeit der hinteren Extremitäten einschränkte. Diese monozytären Zellen, deren Anteil, bestehend aus unreifen und ausgereiften Zellen, histologisch gesehen etwa 80% im Knochenmark betrug, verdrängten die lymphoide Entwicklung in Bezug auf die B-Zellen vollständig, da keine B-Zellmarker tragende Population zu erfassen war. T-Lymphozyten waren hingegen unter den Venus-negativen Zellen des Knochenmarks zu finden. Eine vollständige Blockierung der Differenzierung der stark proliferierenden monozytären Zellen erfolgte nicht, weil ausgereifte Makrophagen erfasst werden konnten. Da der Blastenanteil unter 5% lag, wurde diese Erkrankung in die Gruppe der Neoplasien und nicht in die der akuten Leukämien eingeordnet. Neben dem Auftreten von unreifen Zellen der Granulopoese war eine Reduktion der Erythropoese sowie eine Erythrophagozytose zu verzeichnen. Histologisch konnte eine extramedulläre Erythropoese zur Kompensation in der Milz erfasst werden, so dass diese Zellpopulation neben der monozytären, wie in Abbildung 3.15 gezeigt, prominent war.

Weiterhin zeigte sich in der Milz eine verbliebene lymphoide Zellentwicklung, welche aber als zurückgedrängt angesehen wurde.

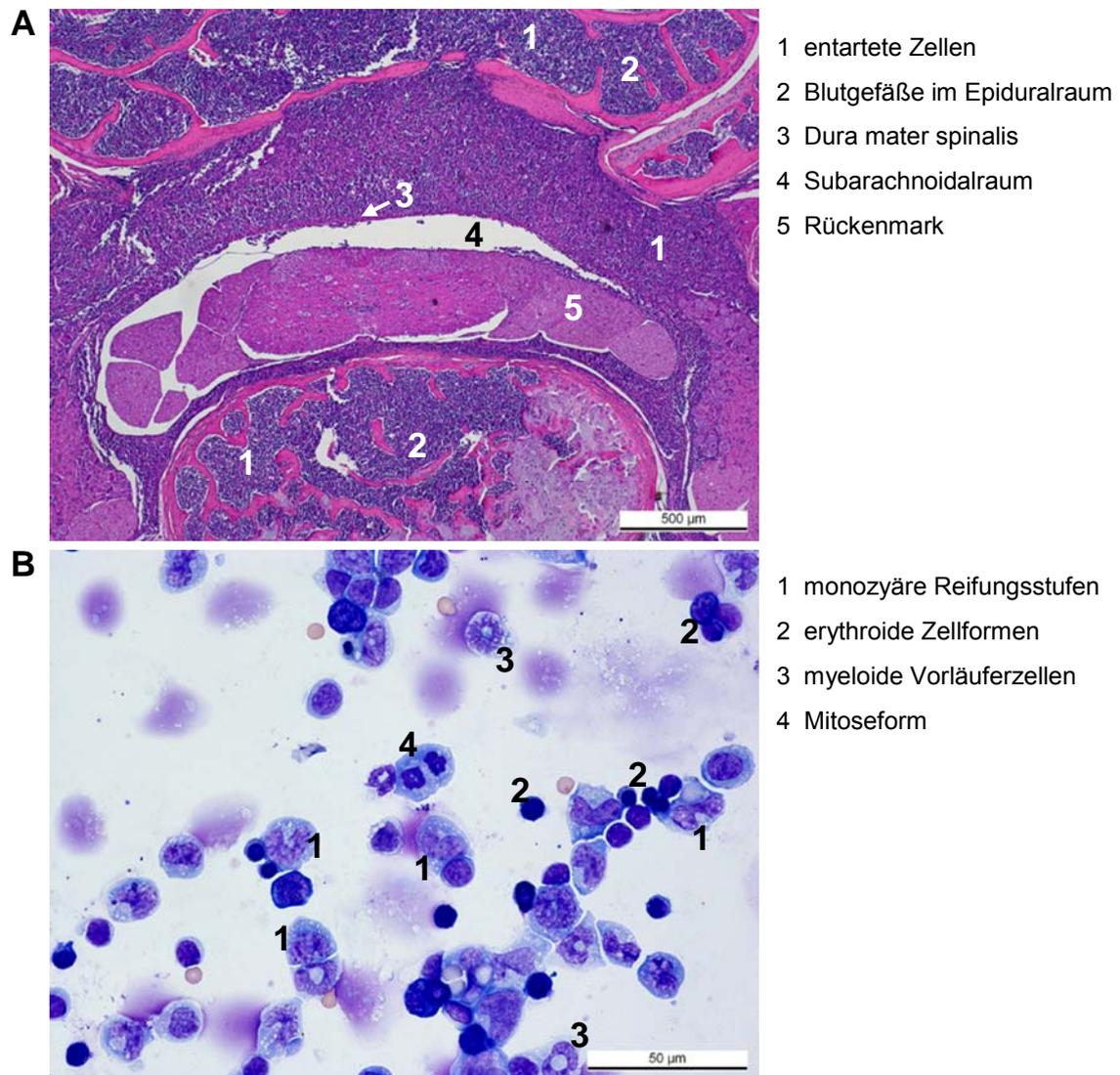


Abbildung 3.15: Querschnitt des Wirbelkanals und Milz-Cytospin von Maus #277

A Anhand des fünffach vergrößerten und PAS-gefärbten Querschnitts durch den Wirbelkanal war die Expansion der entarteten Zellen (1) aus den Blutgefäßen des Epiduralraums (2) bis hin zur Dura mater spinalis (3) sowie in den Subarachnoidalraum (4) zu erkennen. Dies führte vermutlich zur Beeinträchtigung der vom Rückenmark (5) abgehenden Nervenfasern.

B Nach erfolgter Pappenheimfärbung zeigte der Cytospin in einer 63-fachen Vergrößerung (unter Verwendung von Immersionsöl) einen Überblick über die verschiedenen Zellformen in der Milz. Neben verschiedenen monozytären Reifungsstufen (1) sind erythroide (2) und myeloide (3) Zellformen zu verzeichnen.

Der in Abbildung 3.16 gezeigten PCR-Analyse der entnommenen Organe war zu entnehmen, dass es in allen hämatopoetischen Organen zu einer Inaktivierung von *Runx1* durch die Exzision von Exon 5 auf dem *loxP*-flankierten Allel kam.

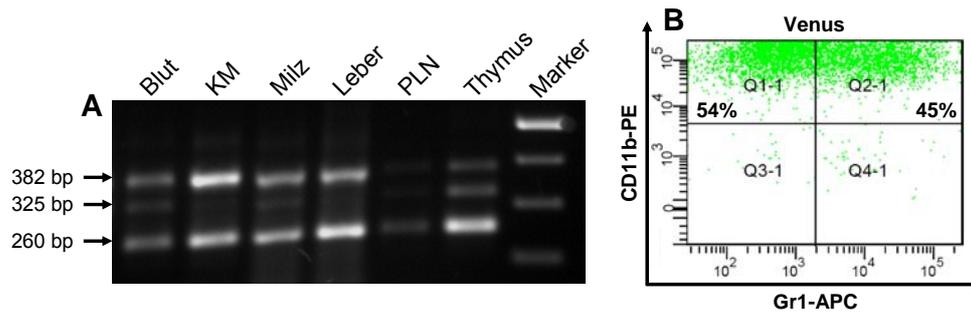


Abbildung 3.16: 1,5%-iges Agarosegel der PCR-Analyse sowie FACS-Analyse des Knochenmarks von Maus #277

A Dieses 1,5%ige Agarosegel zeigte die Ergebnisse einer PCR-Analyse der entnommenen Organe von der Maus #277, welche an einer monozytären Neoplasie erkrankt war. Die Bande von 382 bp repräsentierte die Deletion des Exons 5 von *Runx1*, wohingegen die Bande von 325 bp das Vorhandensein der *loxP*-flankierten Gensequenz anzeigte. Ferner war die Wildtypbande von 260 bp zu verzeichnen.

B Als ein Beispiel ist die FACS-Analyse der Venus-positiven Zellen des Knochenmarks unter Verwendung der myeloiden Antikörper CD11b und Gr1 gezeigt.

In Knochenmark und Milz zeigte sich eine ausgeprägte Inaktivierung von *Runx1*, wohingegen im peripheren Blut sowie in den lymphoiden Organen Thymus und PLN neben der Bande zum Nachweis der Exzision des Exons 5 (382 bp) diejenige der *loxP*-flankierten Sequenz (325 bp) zu erfassen war. Ferner konnte die Infiltration der Leber durch *Runx1*-defiziente Zellen festgestellt werden. Dies bestätigte die anhand von FACS-Analyse und Histologie ermittelten Befunde, dass es in dieser Empfängermaus aufgrund des Zusammenwirkens von FLT3-ITD und *Runx1^{Δ/wt}-Mx1Cre* zu einer Ausreifungsstörung der myeloiden Reifungslinie mit der daraus resultierenden Entwicklung einer monozytären Neoplasie kam.

3.3 Untersuchung des Zusammenwirkens von FLT3-ITD und RUNX1-DBM bei gleichzeitiger *Runx1*-Inaktivierung

In diesem Teil der Arbeit wurde analysiert, ob durch die gleichzeitige Expression einer konstitutiv aktivierten Tyrosinkinase wie FLT3-ITD und einer RUNX1-DBM die Entstehung einer Leukämie induziert werden kann. Die Expression des verwendeten Doppelvektors erfolgte zum einem im *Runx1^{fl/fl}-Mx1Cre*- und zum anderen im *Runx1^{wt/wt}-Mx1Cre*-Hintergrund, so dass es möglich war, die Effekte beider transferierten Mutanten bei einer *Runx1*-Inaktivierung sowie im Wildtyphintergrund zu studieren. Den Graphiken zum kumulativen Überleben der Empfängermause in Abbildung 3.17 konnte entnommen werden, dass durch die Expression beider Doppelvektoren im jeweiligen Knochenmarkhintergrund verschiedene Erkrankungen auftraten, auf welche in den anschließenden Abschnitten näher eingegangen wird.

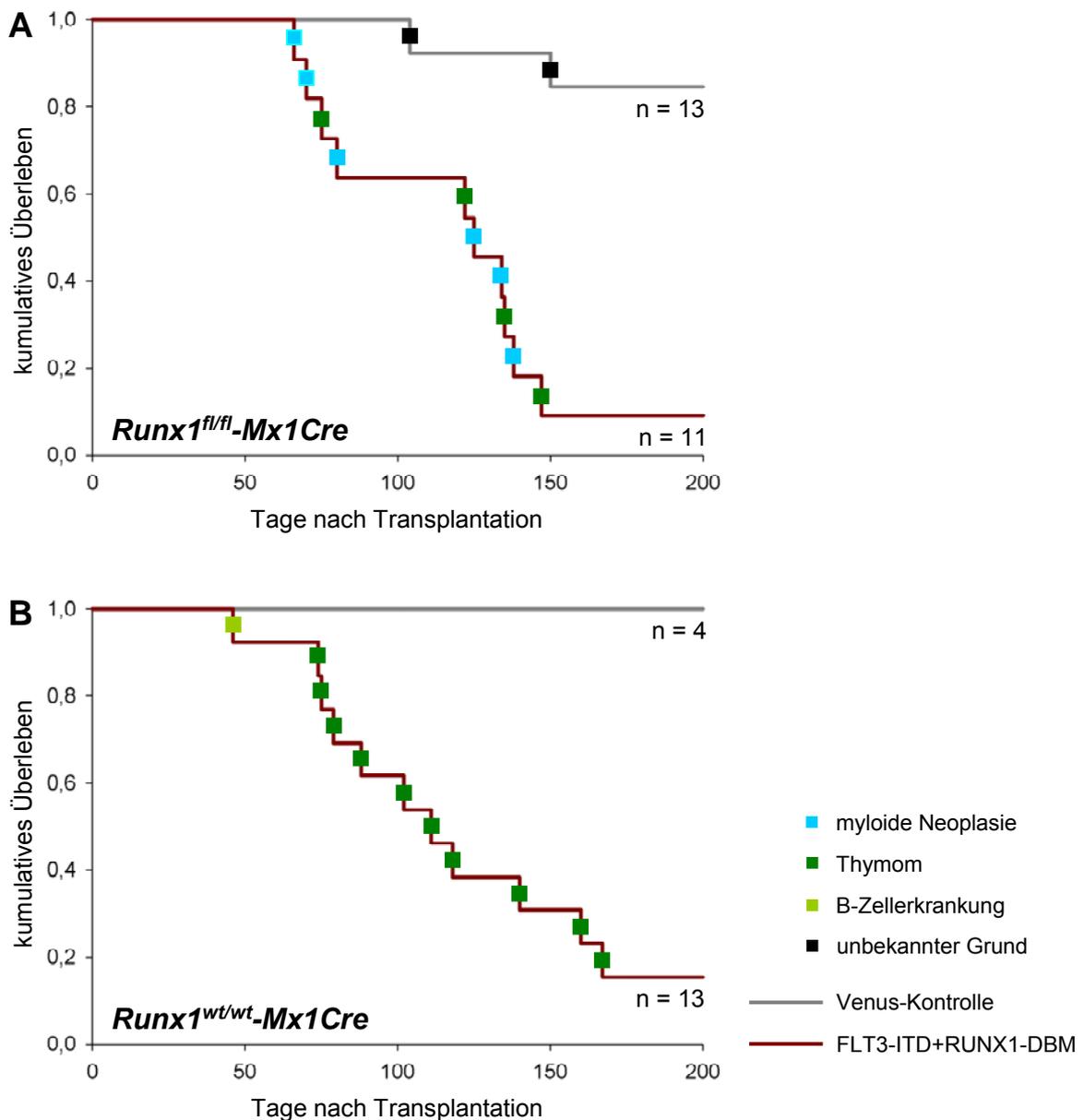


Abbildung 3.17: Darstellung des kumulativen Überlebens der Empfängermause der mit dem Doppelvektor transduzierten hämatopoetischen Vorläuferzellen

Dieser graphischen Darstellung des kumulativen Überlebens war zu entnehmen, dass die Empfängermause, welche mit dem Doppelvektor transduzierte Vorläuferzellen des Typs *Runx1^{fl/fl}-Mx1Cre* (A) und *Runx1^{wt/wt}-Mx1Cre* (B) erhalten haben, aufgrund einer myeloiden Neoplasie oder einer lymphoiden Erkrankung analysiert werden mussten. Die bei den einzelnen Tieren vorliegende Erkrankung ist mit einem farbigen Quadrat markiert (Erläuterung siehe Legende der Graphik B).

Es kam bei den Mäusen, welche transduzierte Vorläuferzellen des Typs *Runx1^{fl/fl}-Mx1Cre* erhalten haben, in 60% der Fälle zum Auftreten einer myeloiden Neoplasie sowie wiederum zur Entwicklung eines Thymoms bei 40% der Tiere. Dies erfolgte unabhängig von einer erfolgten oder nicht durchgeführten pIpC-Behandlung. Dahingegen traten bei der Verwendung der Vorläuferzellen des Typs *Runx1^{wt/wt}-Mx1Cre* ausschließlich lymphoide Erkrankungen auf, wobei 9% der Fälle auf die

Entwicklung einer B-Zellerkrankung entfielen und 91% der Versuchstiere aufgrund eines auftretenden Thymoms analysiert werden mussten. Als Kontrolle ist in der jeweiligen Überlebenskurve eine Mauskohorte aufgeführt, der mit einem Venus-Kontrollvektor transduzierte Vorläuferzellen transplantiert wurden.

3.3.1 Entwicklung einer myeloiden Neoplasie

In der Graphik zum kumulativen Überleben der transplantierten Mäuse (Abbildung 3.17) ist dargestellt, dass sechs der Empfängertiere an einer zytologisch und histologisch diagnostizierten myeloiden Neoplasie mit einer Latenzzeit von 66-138 Tagen erkrankten. In der klinischen Symptomatik zeigten alle Mäuse eine Gewichtsreduktion innerhalb kurzer Zeit, ein struppiges Fell sowie eine unphysiologische Körperhaltung in Form eines aufgekrümmten Rückens. Bei zwei Tieren (#163 und #234) war ferner eine partielle Parese der Hinterläufe zu verzeichnen. Im Vergleich der Daten der erkrankten Mäuse, welche der Tabelle 6.9 im Anhang entnommen werden können, war festzustellen, dass zwei der Versuchsmäuse leicht anämisch waren und die Leukozytenzahlen zwischen Werten im Normbereich und einer leukämischen Ausschwemmung an neoplastischen Zellen in das periphere Blut schwankten. Dies hing mit dem Schweregrad der Erkrankung und dem ersten Auftreten einer Symptomatik bei den verschiedenen Tieren zusammen. Die Ausprägung der Splenomegalie ließ ebenfalls Rückschlüsse auf den Ausbreitungsgrad der Erkrankung zu, denn die Maus #168 mit dem geringsten Schweregrad der myeloiden Neoplasie zeigte das niedrigste Milzgewicht von 113 mg. Der Thymus war nur bei dem Tier #234 auffällig, wobei anhand der FACS-Analyse in diesem Fall festgestellt wurde, dass dieses Organ von myeloiden Zellen infiltriert war. Die durchgeführte FACS-Analyse der Zellsuspensionen der verschiedenen Organe unter Verwendung von spezifischen und gegen die Oberflächenmarker der Zellen gerichteten Antikörpern ergab den Differenzierungsstatus der untersuchten Zellen. In Abbildung 3.18 sind diese Daten zusammengefasst.

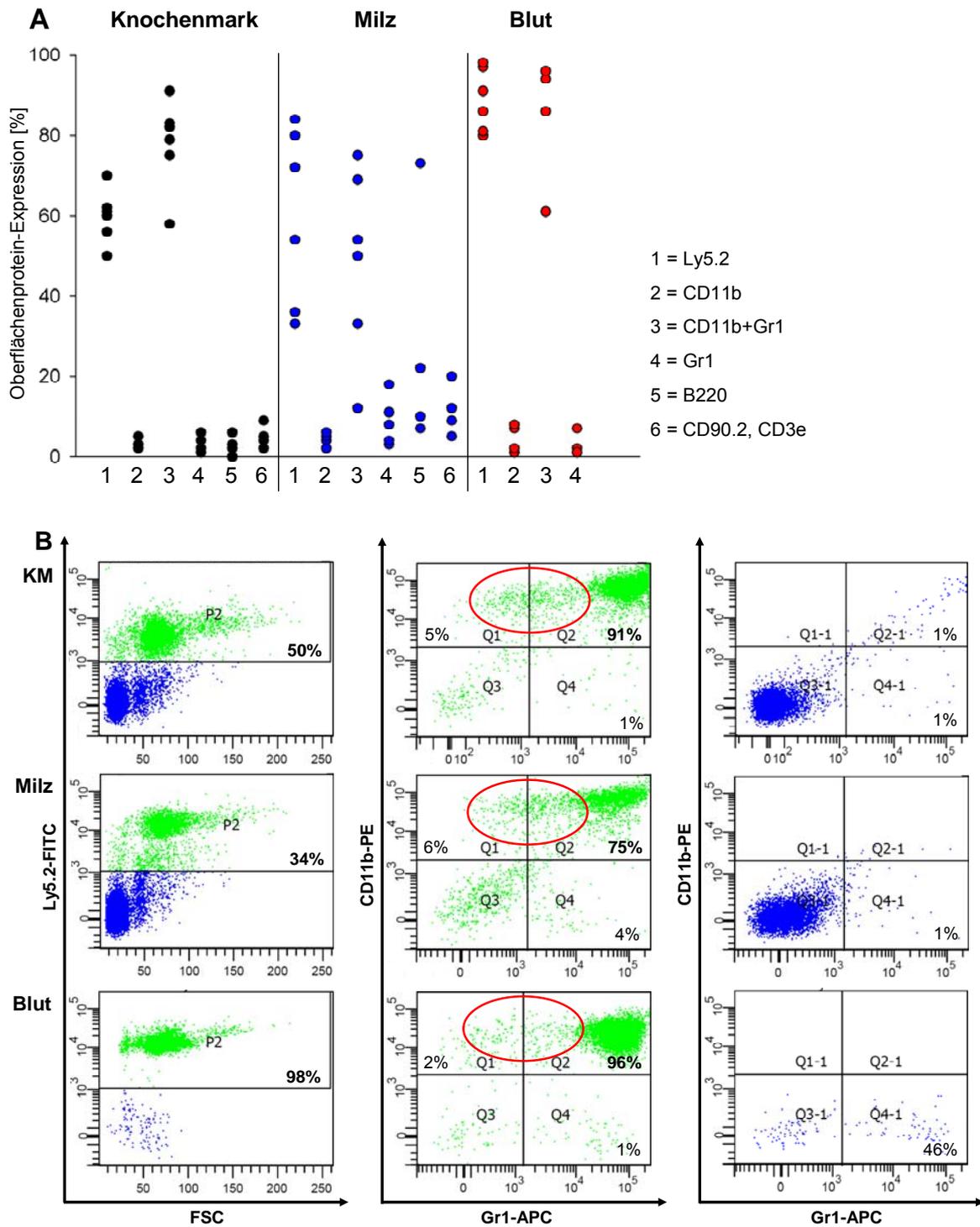


Abbildung 3.18: Zusammenfassung der Daten der an einer myeloiden Neoplasie erkrankten Versuchstiere

A In dieser Graphik sind die Ergebnisse der FACS-Analysen aller erkrankten Mäuse in Bezug auf die Ly5.2-Expression als Marker für die transplantierten Zellen sowie das Vorhandensein von Reifungslinien-spezifischen Markern auf diesen Zellen dargestellt.

B Unter Verwendung der Marker CD11b und Gr1 konnte bei der hier beispielhaft gezeigten FACS-Analyse der Zellsuspensionen der hämatopoetischen Organe von der Maus #167 die Expansion einer myeloiden Zellpopulation erfasst werden. Die roten Ovale markieren die Lage der auftretenden Myeloblasten in der Graphik.

Die Auswertung der vorliegenden Daten der Durchflusszytometrie ergab, dass es sich bei der expandierenden Zellpopulation um myeloide Zellen handelte, welche die Marker CD11b und Gr1 exprimierten. Aufgrund der Expansion dieser Zellen kam es zur Verdrängung der lymphoiden Reifungsreihe, so dass Zellen mit B- oder T-Zell-spezifischen Markern wie B220, CD90.2 und CD3e nur in einem geringeren Maße zu erfassen waren. Die einzige Ausnahme bildete dabei die Maus #168, bei der es in der Milz, wie zuvor erwähnt, nicht zu einer Hyperplasie und massiven Ausbreitung der myeloiden Zellen kam, so dass bei dieser FACS-Analyse ein recht hoher Anteil an B-Zellen (73%) in der Milz festgestellt wurde. Weiterhin konnte den Analysen unter Verwendung von Linien-spezifischen Antikörpern entnommen werden, dass der größte Teil der Ly5.2-negativen Zellen für den erythroiden Marker Ter119 positiv waren. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse konnten durch histologische Befunde bestätigt werden, wobei bei den einzelnen Mäusen, wie zuvor erwähnt, ein unterschiedlicher Schweregrad der myeloiden Neoplasie zu verzeichnen war. Bei dem Versuchstier #163 zeigte sich die stärkste Ausprägung der Erkrankung mit einer massiven Beteiligung aller Organe. Eine nur leichte myeloide Neoplasie mit einem höheren Ausreifungsgrad der Zellen konnte bei der Maus #168 festgestellt werden, welche sich nur in geringem Maß im Blut zeigte. Knochenmark und Milz waren hingegen ebenfalls deutlich betroffen, wobei es zu keiner Infiltration der peripheren Organe kam. Die Tiere #165, #167 und #214 wiesen einen intermediären Krankheitsverlauf mit einer Hyperproliferation der myeloiden Zellen, welche außerhalb der Knochenmarkhöhle des Sternums sowie in den peripheren Organen zu einer beginnenden Infiltration führte, wobei der Blastenanteil unter 20% blieb. Die Versuchsmaus #234 wurde nicht histologisch untersucht, zeigte aber nach der Auswertung der FACS-Analyse den gleichen Phänotyp einer myeloiden Erkrankung. In den nachfolgenden Abbildungen 3.19 und 3.20 verdeutlichen der Blutausschmear sowie der Cytospin vom Knochenmark, ferner der histologische Schnitt des Sternums und der Milz von Maus #163 beispielhaft die Charakteristika der vorliegenden myeloiden Neoplasie. Die histologische Bewertung ergab für den höchsten Ausprägungsgrad der Erkrankung eine massive Leukozytose im peripheren Blut, welche durch das Vorkommen aller Reifungsstufen der myeloiden Linie geprägt war, wobei der Anteil an Vorstufen überwog, der Blastenanteil aber trotzdem unter 20% blieb. Im Knochenmark bestätigte sich dieser Befund in Form einer massiven Hyperproliferation myeloider Zellen. Eine Ausreifung dieser Vorläuferzellen bis zur Stufe der jugendlichen Granulozyten war festzustellen, wobei der Blastenanteil höher als im peripheren Blut war und über 20% lag.

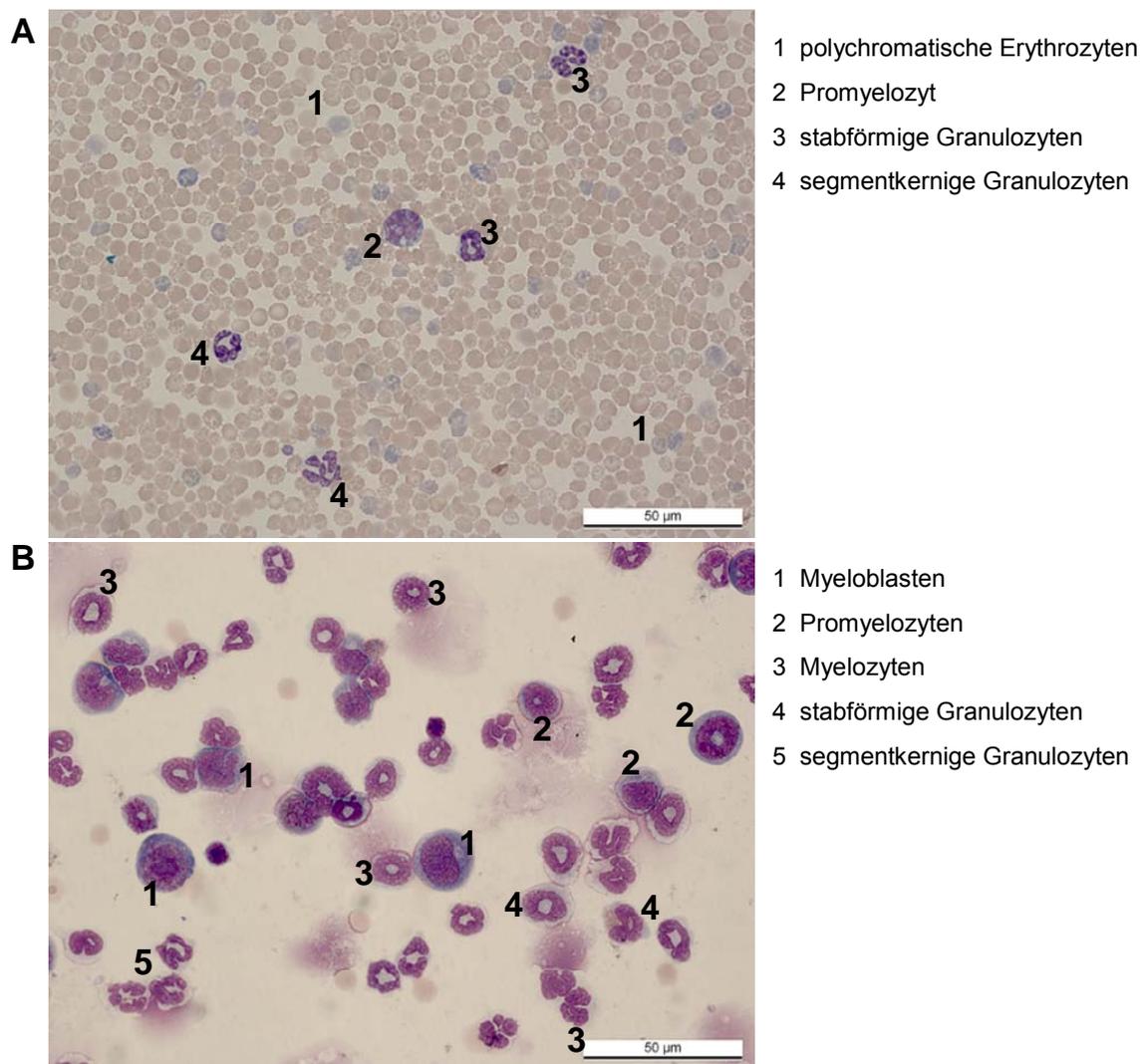


Abbildung 3.19: Blutausstrich und Knochenmark-Cytospin von Maus #163

A Bei der Analyse des nach Pappenheim gefärbten und 63-fach (unter Verwendung von Immersionsöl) vergrößerten Blutausstrichs konnte eine massive Leukozytose mit myeloiden Zellen (2-4) sowie Verformungen der polychromatischen Erythrozyten (1) festgestellt werden.

B Nach erfolgter Pappenheimfärbung zeigte der Cytospin in einer 63-fachen Vergrößerung (unter Verwendung von Immersionsöl) einen Überblick über die verschiedenen Zellformen der myeloiden Reifungsreihe (1-5) im Knochenmark der erkrankten Maus.

Aufgrund dieser Hyperplasie mit myeloiden, aber auch histiozytären Zellen kam es zur Verdrängung von Erythro- und Megakaryopoese sowie von Zellen der lymphoiden Reifungsreihe. Die Expansion dieser Zellen war so weitreichend, dass ausgehend von der Knochenmarkhöhle im Sternum eine Infiltration der umgebenden Interkostalmuskulatur sowie des nodulären Fettgewebes über das Foramen nutritivum erfolgte. Ferner wurde eine beginnende Rarifizierung der Spongiosa erfasst. Neben diesem Befund konnte bei Maus #163 bei einem Schnitt durch die Lendenwirbelsäule im Epiduralraum eine starke Infiltration durch myeloide und histiozytäre Zellen ausgehend von der Markhöhle festgestellt werden. Diese war im Bereich des Spinalganglions so weit fortgeschritten, dass es zu einer mechanischen Kompression

des peripheren Nervensystems kam, welche die partielle Parese der Hinterläufe erklärte.

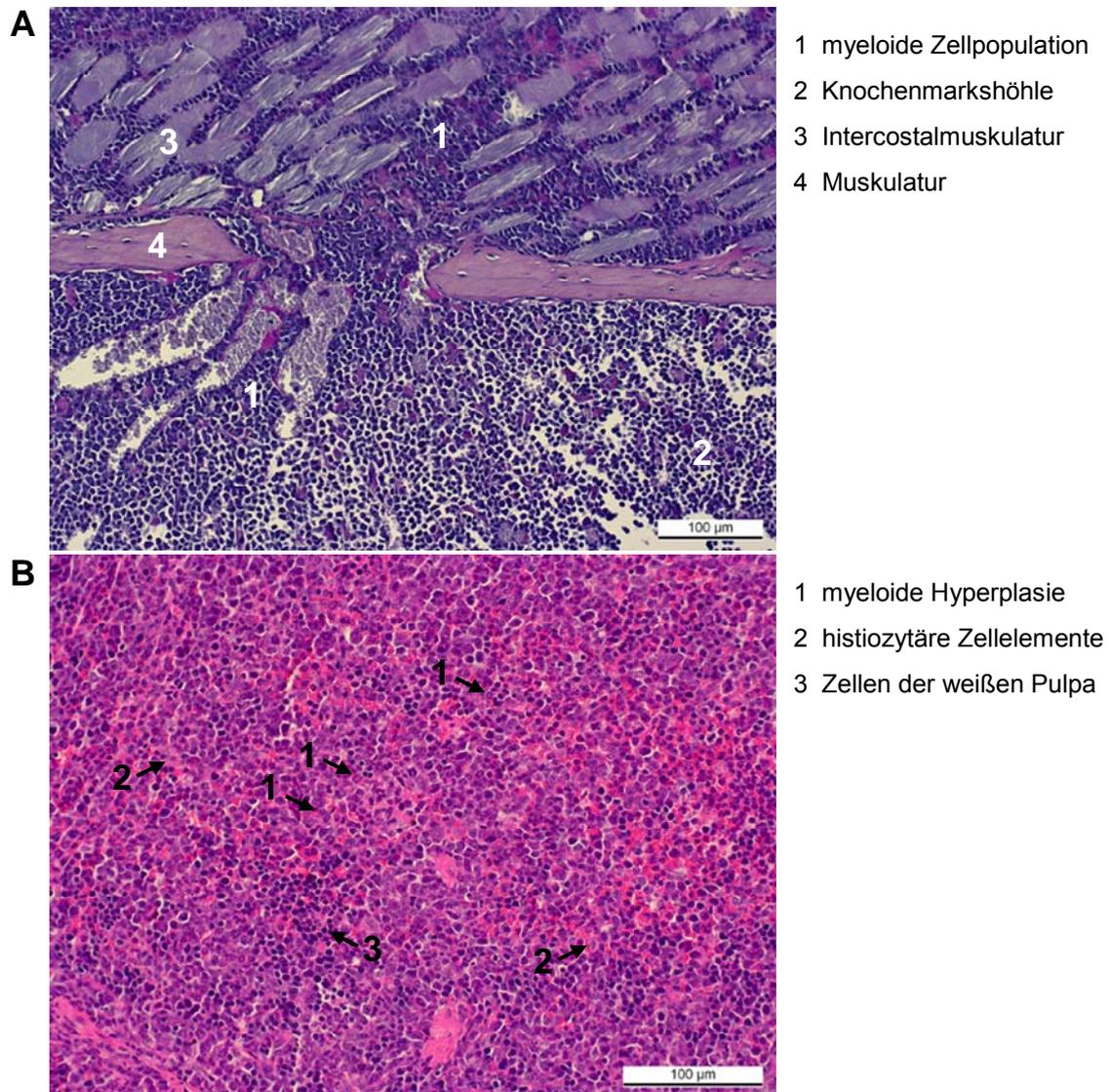


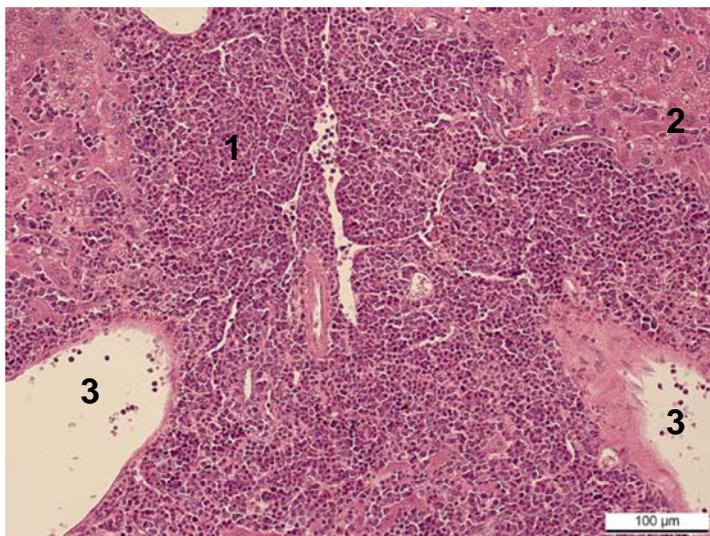
Abbildung 3.20: Übersichtsfärbung eines Schnitts von Sternum und Milz der Maus #163

A Anhand des 20-fach vergrößerten und PAS-gefärbten Schnitts durch das Sternum war die Expansion der myeloiden Zellen (1) aus der Knochenmarkshöhle (2) in die umgebende Interkostalmuskulatur (3) nachweisbar.

B Nach erfolgter Übersichtsfärbung zeigte der Milzschnitt in einer 25-fachen Vergrößerung (unter Verwendung von Immersionsöl) die Veränderungen bezüglich roter und weißer (3) Pulpa mit einer massiven Hyperplasie der Myelopoese und einer Infiltration der T-Zellzone durch myeloide (1) und histiozytäre Zellelemente (2).

Die bei allen Versuchstieren, mit Ausnahme von Maus #168, auftretende Splenomegalie war in einer gesteigerten Myelopoese sowie einer kompensatorischen und somit ebenfalls gesteigerten Erythropoese begründet, welche zu einer Auflösung der Architektur der Milz führte. Bei einer massiven myeloiden Hyperplasie wie bei der Maus #163 erfolgte eine Verdrängung der kompensatorischen Erythropoese. In der

roten Pulpa war das gesamte Spektrum der myeloiden Reifungsreihe zu finden, wobei unreife Zellelemente, bei Maus #163 mit einem Blastenanteil von über 20%, überwogen und ebenfalls vermehrt Histozyten vorlagen. Weiterhin konnten zahlreiche Makrophagen mit Erythrophagozytose, aber kaum Megakaryozyten erfasst werden. In der weißen Pulpa, in welcher nur residuelles lymphoides Gewebe erfasst wurde, infiltrierten die myeloiden Zellen zusätzlich die T-Zellzone, während B-Zellareale davon nicht betroffen waren. Ferner konnte eine Infiltration der peripheren Organe wie Leber (31-56%) und Lunge sowie von Lymphknoten (24-46% im PLN) erfasst werden. Als Beispiel ist ein histologischer Schnitt der Leber von Maus #163 in Abbildung 3.21 gezeigt. Durch die massive periportale, perivenöse und (intra)lobuläre Infiltration des Leberparenchyms durch z.T. unreife, aber auch ausgereifte myeloide Zellen kam es zu einer Verdrängung des Leberparenchyms. Dem folgten außerdem eine massive Nekrose sowie einer deutliche reaktive Leberzellverfettung. Diese Organbeteiligung war bei den anderen Versuchstieren mit diesem Krankheitsbild nicht so weitreichend wie bei der Maus #163, konnte aber auch bei diesen festgestellt werden. Hingegen wies die Lunge in den meisten Fällen nur eine leichte interstitielle myeloide Infiltration auf.



- 1 infiltrierende myeloide Zellen
- 2 Leberparenchym
- 3 Blutgefäße

Abbildung 3.21: Übersichtsfärbung eines Leberschnittes von Maus #163

Der 20-fach vergrößerte und HE-gefärbte Schnitt der Leber zeigte die massive Infiltration dieses Organs. Der größte Teil des in diesem Ausschnitt dargestellten Leberparenchyms (2) war durch die myeloiden Zellen (1) verdrängt.

Mittels einer PCR-Analyse zum Nachweis der Exzision und/oder des Vorhandenseins des Exons 5 von *Runx1* sollte geklärt werden, ob bei dieser myeloiden Neoplasie eine Expression von Runx1 erfolgte oder die Inaktivierung dieses Transkriptionsfaktors für die Entstehung vorteilhaft war. In Abbildung 3.22 ist beispielhaft das Ergebnis von zwei Empfängermäusen dargestellt.

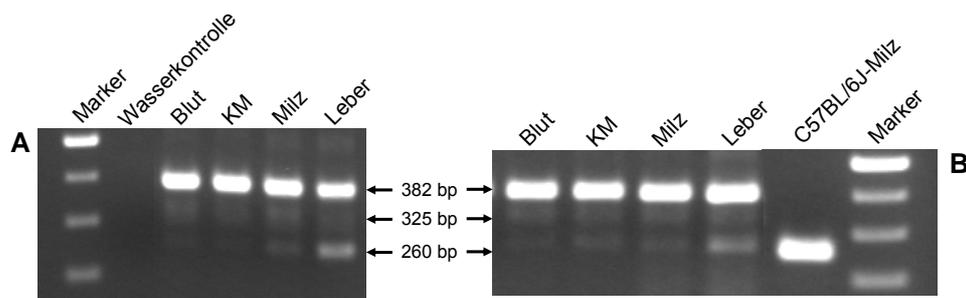


Abbildung 3.22: 1,5%-iges Agarosegel der PCR-Analyse der Mäuse #163 und #167

Bei dieser PCR-Analyse der entnommenen Organe der Versuchstiere #163 (A) und #167 (B) repräsentierte die Bande von 382 bp die Deletion des Exons 5 von *Runx1*, wohingegen die Bande von 325 bp das Vorhandensein der *loxP*-flankierten Gensequenz anzeigte. Ferner war die Wildtypbande von 260 bp zu erfassen.

In Knochenmark, Blut und Milz zeigte sich bei allen Tieren eine deutliche Exzision des Exons 5 von *Runx1* (Bande von 382 bp) unter nur geringem Erhalt der *loxP*-flankierten Sequenz (Bande von 325 bp), was für eine Selektion auf Zellen mit einer *Runx1*-Defizienz spricht. Der Nachweis der *Runx1*-Inaktivierung in der Leber spiegelte den hohen Grad an Infiltration dieses Organs wider. Zusammengefasst ist anhand dieser Befunde festzustellen, dass es aufgrund der Expression von FLT3-ITD und RUNX1-DBM in den transplantierten Versuchstieren zu der Entwicklung einer myeloiden Neoplasie kam, bei welcher *Runx1* inaktiviert war. Weder in den *Runx1^{fl/fl}-Mx1Cre*-Kontrolltieren, die z.T. einen myeloproliferativen Phänotyp aufwiesen, noch bei der alleinigen Expression von FLT3-ITD in *Runx1*-defizienten Zellen, welche das Auftreten einer beschleunigten Myeloproliferation induzierte, kam es zu einer so massiven Expansion des myeloiden Kompartiments mit einem erhöhten Blastenanteil, die zu einer Leukämie-ähnlichen Erkrankung mit der Beteiligung aller Organe führte. Die Schwere, Progression und Latenzzeit dieses Krankheitsbildes sprechen für einen synergistischen Effekt zwischen der Expression von FLT3-ITD und der RUNX1-DBM in *Runx1*-defizienten Zellen.

3.3.2 Erkrankungen des lymphoiden Kompartiments

Die aufgrund der Expression des Doppelvektors entstandenen Erkrankungen des lymphoiden Kompartiments (siehe Abbildung 3.17) wiesen den gleichen Phänotyp der in Abschnitt 3.2.1 beschriebene T- bzw. B-Zellerkrankung auf. Daher werden nur kurz die Besonderheiten der Erscheinungsbilder bei der Verwendung des Doppelvektors aufgeführt. Eine Zusammenfassung der FACS-Analysen bei den an einem Thymom erkrankten Versuchstieren bietet die Abbildung 3.23. Alle weiteren Daten sind der Auflistung der betroffenen Mäuse in Tabelle 6.10 im Anhang zu entnehmen.

Die Expression des verwendeten Doppelvektors im *Runx1^{fl/fl}-Mx1Cre*-Hintergrund führte nicht nur zu der Entwicklung einer myeloiden Neoplasie, sondern auch zu dem

bereits beschriebenen Krankheitsbild des Thymoms. Diese Erkrankung trat mit einer Latenzzeit von 75-147 Tagen im *Runx1^{fl/fl}-Mx1Cre*- sowie von 74-167 Tagen im *Runx1^{wt/wt}-Mx1Cre*-Knochenmarkhintergrund auf und war ebenfalls durch die in Abschnitt 3.2.1.1 beschriebenen Symptome gekennzeichnet. Diese Erkrankung der T-Zellreihe in diesem Experiment zeigte wiederum eine Ausbreitung von im Thymus befindlichen T-Zellen einer frühen Reifungsstufe, welche durch die Expression der Oberflächenmarker CD90.2, CD4 sowie CD8 und einem Fehlen von CD3e identifiziert werden konnten.

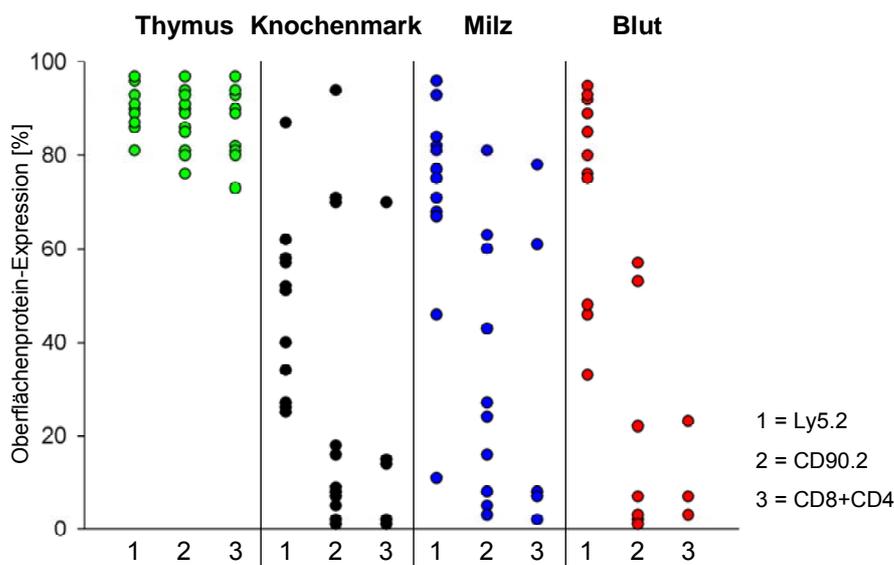


Abbildung 3.23: Zusammenfassung der durchflusszytometrischen Daten der Mäuse, die eine T-Zellerkrankung entwickelten

In dieser Darstellung sind die Ergebnisse der FACS-Analysen aller erkrankten Mäuse in Bezug auf die Ly5.2-Expression als Marker für die transplantierten Zellen sowie das Vorhandensein der für das Thymom spezifischen Marker in den untersuchten Organen gezeigt.

Eine interessante Beobachtung konnte bei den Versuchstieren, welche mit dem Doppelvektor transduzierte Vorläuferzellen des Typ *Runx1^{fl/fl}-Mx1Cre* erhalten haben, gemacht werden. Bei der PCR-Analyse zum Nachweis der Exzision oder des Vorhandenseins von Exon 5 von *Runx1* zeigte sich nicht nur die zuvor beschriebene Selektion auf *Runx1*-exprimierende Zellen im Thymus, sondern auch das in Abbildung 3.24 dargestellte Auftreten einer deutlichen Inaktivierung von *Runx1* in Knochenmark, Blut und Milz am Beispiel der Maus #235. Dieses Ergebnis spiegelte sich in dem erhöhten Anteil an myeloiden Zellen in der Ly5.2-exprimierenden Zellpopulation in der FACS-Analyse wider und ließ sich durch die Untersuchung der anderen Mäuse dieses Experiments bestätigen.

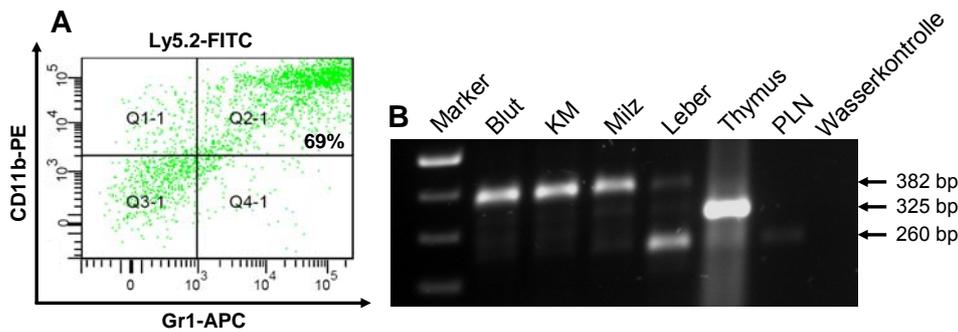


Abbildung 3.24: FACS-Analyse des Knochenmarks und 1,5%-iges Agarosegel der PCR-Analyse der Maus #235, welche aufgrund eines Thymoms analysiert werden musste

A Anhand der Darstellung der Knochenmarkszellen dieser an einem Thymom erkrankten Maus, welche mit Ly5.2 als Marker für die transplantierten Zellen sowie mit den myeloiden Markern CD11b und Gr1 gefärbt wurden, konnte erfasst werden, dass ein Großteil der Ly5.2-positiven Zellen des Knochenmarks der myeloiden Reifungsreihe angehörten.

B Bei dieser PCR-Analyse der entnommenen Organe von Maus #235 zeigte die Bande von 382 bp die Deletion des Exons 5 von *Runx1*, die Bande von 325 bp hingegen das Vorhandensein der *loxP*-flankierten Gensequenz an. Weiterhin war die Wildtypbande von 260 bp zu erfassen.

Der Graphik zum kumulativen Überleben der transplantierten Mäuse (Abbildung 3.17) war ferner zu entnehmen, dass es bei einem Empfängertier bei der Expression des Doppelvektors im *Runx1^{wt/wt}-Mx1Cre*-Hintergrund zu der Entwicklung einer lymphoiden Erkrankung mit einer Latenzzeit von 46 Tagen und einer starken Expansion des B-Zellkompartiments kam. Diese Blastenleukämie zeigte wiederum den in Abschnitt 3.2.1.2 dargestellten Phänotyp mit einer Ansammlung von Zellen, welche B220, CD43 sowie CD19, nicht aber IgM exprimierten, was auf eine Blockierung der B-Zelldifferenzierung schließen ließ.

Diese Daten lassen die Aufstellung der Hypothese zu, dass es bei einer Expression des Doppelvektors im *Runx1^{fl/fl}-Mx1Cre*-Hintergrund entweder zu der Entwicklung einer myeloiden Neoplasie im Knochenmark oder zu der Entstehung eines Thymoms kommen konnte. Entscheidend könnte hierbei die Progression und Schnelligkeit der Erkrankung sein. Daraus lässt sich ein synergistischer Effekt zwischen der *Runx1*-Inaktivierung sowie der Expression von FLT3-ITD und RUNX1-DBM ableiten. Die alleinige Expression von FLT3-ITD im *Runx1^{Δ/Δ}-Mx1Cre*-Hintergrund führte, wie es in Abschnitt 3.2.2.2 dargelegt ist, nur zu der Entwicklung einer Myeloproliferation. Gefestigt wird diese Annahme dadurch, dass bei der Expression des Doppelvektors im *Runx1^{wt/wt}-Mx1Cre*-Hintergrund nur lymphoide Erkrankungen auftraten.

3.4 Einfluss der RUNX1-DNA-Bindungsmutante auf die Myelopoese *in vivo*

Neben den Ergebnissen aus Mausmodellen, wie sie zuvor erwähnt wurden, lieferten Studien zu *RUNX1*-Mutationen von Patienten mit einer myeloiden Erkrankung weitere Erkenntnisse. So liegen die meisten bisher beschriebenen Punktmutationen von *RUNX1* in der Runt-Homologiedomäne und resultieren in einer Störung der DNA-

Bindung, wobei eine Assoziation mit der β -Untereinheit noch möglich ist. Durch die Störung des Gleichgewichts zwischen von der DNA-Bindungs-abhängigen sowie unabhängigen Signalwegen sind möglicherweise die Effekte von RUNX1-DBM bedingt (Imai et al., 2000; Michaud et al., 2002; Cammenga et al., 2007). Die Expression der in dieser Arbeit verwendeten RUNX1-DBM zeigte im C57BL/6J-Hintergrund keine Symptomatik. Allerdings wiesen *in vitro*-Versuche darauf hin, dass die RUNX1-DBM-exprimierenden Zellen eine erhöhte Selbsterneuerungsfähigkeit besitzen (Cammenga et al., 2007). Daher sollte in diesem Teil der Arbeit analysiert werden, ob die Expression einer RUNX1-DBM bei gleichzeitiger oder fehlender Expression von Runx1 einen Einfluss auf die Hämatopoese, im Besonderen auf die Myelopoese, im Mausmodell zeigte.

In den transplantierten Mäusen traten innerhalb von 164 Tagen nach der Transplantation keine klinischen Symptome auf, so dass die Mäuse nach 165 sowie 197 Tagen analysiert wurden. Die Daten sind in der Tabelle 6.12 im Anhang zusammengefasst. Im Verlauf des Versuchs sowie vor der finalen Analyse wurde den Mäusen Blut abgenommen, um zunächst das Anwachsen der transplantierten Zellen zu verfolgen. Weiterhin war es auf diese Weise möglich, Auffälligkeiten in der Verteilung der Reifungslinien im Blut, die auf einen präleukämischen Status hinweisen könnten, sowie die Expression der RUNX1-DBM zu überprüfen. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in der Tabelle 6.13 im Anhang dargestellt. Anhand dieser Blutwerte im Versuchsverlauf war zu erkennen, dass es zur vollständigen Rekonstituierung der Hämatopoese der bestrahlten Empfängermäuse durch die transplantierten Vorläuferzellen kam und die pIpC-Behandlung keinen Einfluss darauf nahm. Sowohl Hämatokrit als auch Leukozytenzahl und die Betrachtung der Reifungslinien-spezifischen Zellen ergaben keine Abweichungen gegenüber den Kontrollen. Ein erhöhter Anteil der Neutrophilen zu Ungunsten der Lymphozyten im Differentialblutbild war auf den Knochenmarkhintergrund *Runx1^{fl/fl}-Mx1Cre* zurückzuführen. Durchflusszytometrische Analysen im Verlauf und nach der Präparation der Tiere ergaben im Vergleich zur Ausgangsexpression der transplantierten Vorläuferzellen von 35% eher niedrigere GFP-Raten. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 3.25 zusammengefasst.

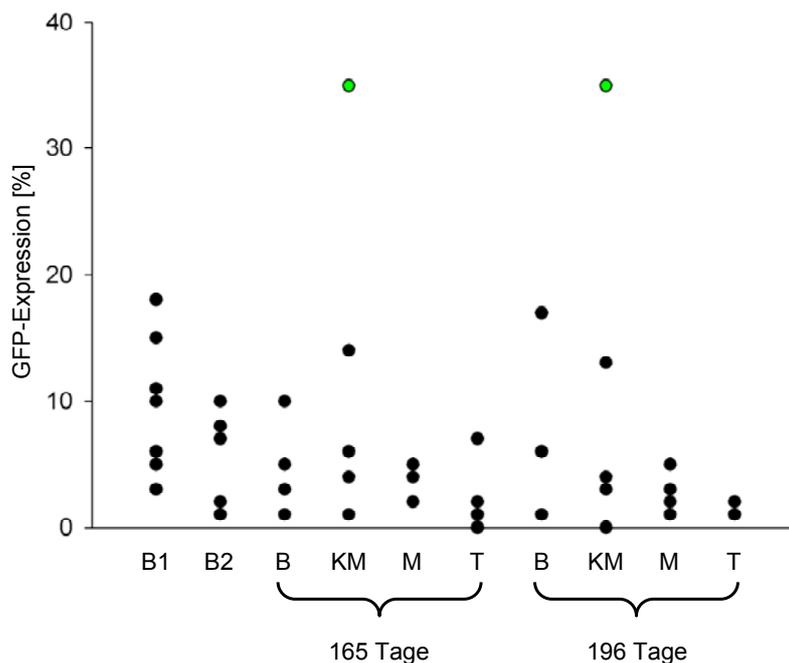


Abbildung 3.25: Graphische Darstellung der RUNX1-DBM-Expression im peripheren Blut und in den analysierten Organen der Versuchsmäuse

In dieser Graphik sind die Ergebnisse der GFP-Expression des Blutes bei der Abnahme nach 55/87 Tagen (B1) sowie nach 137 Tagen (B2) dargestellt. Ferner sind die Expressionswerte der untersuchten Organe Blut (B), Knochenmark (KM), Milz (M) und Thymus (T) nach 165 bzw. 196 Tagen im Vergleich zur Ausgangstransduktionseffizienz der transplantierten Vorläuferzellen (grüne Punkte) dargestellt.

Bei der nach der Präparation der Mäuse durchgeführten FACS-Analyse zur Bestimmung der Expression von RUNX1-DBM wurde ferner der Differenzierungsstatus der Zellen bestimmt, wobei verschiedene Oberflächenmarker in Kombination zur Einordnung bei der Blutlinienanalyse verwendet wurden. Zusammenfassend ist zu diesem Aspekt zu sagen, dass unabhängig von einer pIpC-Behandlung ein Großteil der GFP-positiven Zellen in Knochenmark und Blut (soweit eine Bewertung vorgenommen werden konnte) die Marker CD11b und Gr1 aufwiesen und daher der myeloiden Reifungsreihe angehörten. Ferner waren im Knochenmark Zellen der erythroiden Reihe zu verzeichnen, welche für Ter119 positiv waren. In der Milz waren zusätzlich B-Zellen durch die Antikörper B220 und CD19 sowie T-Zellen, welche für CD90.2 und CD3e positiv waren, zu erfassen. Eine ausführliche Aufstellung der FACS-Ergebnisse in Bezug auf die GFP-positiven Zellen unter Verwendung der myeloiden Marker ist der Tabelle 6.14 im Anhang zu entnehmen. Eine Beeinflussung der Ausreifung der hämatopoetischen Zellen konnte bei dieser Auswertung nicht erfasst werden.

Die PCR-Analyse der entnommenen Organe der Versuchsmäuse zeigte unabhängig von der pIpC-Behandlung mit den Kontrollen vergleichbare Ergebnisse. Zusätzlich wurden die Knochenmark- und Milzzellen von vier präparierten Mäusen unter

Verwendung des FACSaria auf myeloide (CD11b-positive), T- (CD3e-positive) sowie B-Zellen (B220-positive) sortiert. Die nachfolgende PCR-Analyse sollte darlegen, ob es in den Zellkompartimenten unterschiedlich stark zu einer Inaktivierung von *Runx1* kam. In Abbildung 3.26 sind die Ergebnisse dieser Analysen an einem Beispiel verdeutlicht.

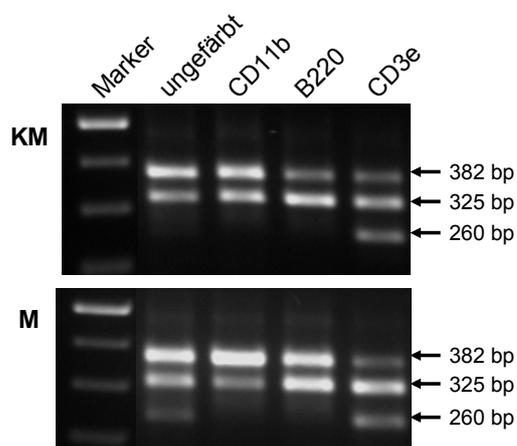


Abbildung 3.26: Beispiel einer PCR-Analyse der sortierten Knochenmark- sowie Milzzellen der Maus #199

Im oberen Teil der Abbildung ist die PCR-Analyse der Knochenmarkszellen (KM), im unteren Abschnitt jene der Milzzellen (M) dargestellt. Dabei werden die Proben der sortierten Zellen in Hinblick auf den Anteil an myeloiden (CD11b), B- (B220) und T-Zellen (CD3e) unterschieden. Die Probe „ungefärbt“ repräsentiert die Zellen, die für keinen Marker als positiv bewertet und getrennt gesammelt wurden.

Anhand dieser PCR-Analyse von sortierten Zellen des Knochenmarks sowie der Milz wurde festgestellt, dass es in allen untersuchten Zellkompartimenten unabhängig von der pIpC-Behandlung zu einer Inaktivierung von *Runx1* kam. Diese war aber nur partiell, da neben der Bande von 382 bp, welche die Exzision des Exons 5 von *Runx1* repräsentierte, auch die Bande der *loxP*-flankierten Sequenz (325 bp) zu erfassen war. Interessant hierbei war die Tatsache, dass in der Fraktion der lymphoiden Zellen eine Inaktivierung von *Runx1* erfolgte, obwohl eine Notwendigkeit von Runx1 für die Entwicklung dieser Population beschrieben ist (Ichikawa et al., 2004). Vermutlich erfolgte diese erst in ausgereiften Zellen, welche den kritischen Punkt der Differenzierung, bei dem Runx1 erforderlich ist, überschritten haben. Weiterhin muss angemerkt werden, dass in der T-Zellpopulation zusätzlich die Wildtypbande von 260 bp zu verzeichnen war. Dies findet seine Begründung in der langen Lebensdauer einiger T-Zellen, welche vermutlich der Empfängermaus selbst oder den transplantierten Milzzellen einer C57BL/6J-Maus zur Überbrückung des Zeitraums bis zum Anwachsen der injizierten hämatopoetischen Vorläuferzellen entstammten. Zusammenfassend kann man sagen, dass die RUNX1-DBM sowohl bei gleichzeitiger Expression von Runx1 als auch beim Fehlen dieses Transkriptionsfaktors keinen Einfluss auf die Myelopoese sowie der anderen hämatopoetischen Linien *in vivo* hatte

und keine dominant-negativen Effekte der Bindungsmutante gegenüber der Wildtypform erfasst werden konnten. Das Vorkommen kooperierender Effekte zwischen der Expression einer RUNX1-DBM und der *Runx1*-Inaktivierung wurde als möglich angesehen, da sowohl *Runx1*^{Δ/Δ}- als auch RUNX1-DBM-exprimierende Zellen ein erhöhtes Replattierungsvermögen zeigten (Cammenga et al., 2007). Solche Effekte konnten in diesem Versuch allerdings nicht verzeichnet werden.

3.5 Retransplantierbarkeit der beschriebenen Erkrankungen

Eine Retransplantation von Zellen kann Aufschluss darüber geben, ob diese eine Proliferationsfähigkeit unter Selbsterhalt besitzen, wie es für leukämische Zellen beschrieben ist. Dies zeigt den Unterschied zwischen Zellen einer myeloproliferativen Erkrankung, die als nicht retransplantierbar beschrieben werden, und neoplastischen Zellen, welchen diese Eigenschaft besitzen. Zur Ermittlung der Retransplantierbarkeit der transformierten Zellen, welche aus erkrankten Mäusen entnommen wurden, erfolgte die intravenöse Transplantation von zuvor eingefrorenen Knochenmarkzellen (5×10^5 in Fall der myeloiden Neoplasie bzw. 1×10^6 in Fall des Thymoms) in subletal bestrahlte Empfängermäuse. Neben der Repopulationsfähigkeit, d.h. ob es zum Anwachsen der transformierten Zellen in einem subletalen Tier kam, konnte auch die Reklonierungskapazität, d.h. ob und wie viele Langzeit- oder Kurzzeit-repopulierende Zellen in der transplantierten Zellsuspension vorhanden waren, ermittelt werden. Dadurch waren Rückschlüsse auf das Vorkommen von sogenannten leukämischen Stammzellen in der Spendermaus möglich.

3.5.1 Retransplantation der myeloiden Neoplasie

Für die Retransplantationsexperimente bezüglich der myeloiden Neoplasie wurde eine Strategie gewählt, bei der jeweils drei subletal bestrahlten Empfängermäusen 5×10^5 Knochenmarkzellen von drei verschiedenen Mäusen (#163, #167 sowie #168) transplantiert wurden (Darstellung in Abbildung 6.4 im Anhang). Die Wahl fiel dabei auf die Zellen dieser Tiere, weil diese im Versuchsverlauf zwar ähnliche Latenzzeiten von 66, 70 und 80 Tagen aufwiesen, aber bei einem gleichen Phänotyp eine unterschiedliche Ausprägung des Krankheitsbildes zeigten.

Bei einer Blutabnahme nach 47 Tagen Versuchsdauer wurden bei den Empfängertieren keine Auffälligkeiten in Bezug auf Hämatokrit und Leukozytenwert festgestellt. Allerdings wiesen die Mäuse #224 und #229 einen erhöhten Anteil an neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut auf. Dieser Befund konnte durch eine FACS-Analyse auf myeloide Marker im Falle der Maus #224 bestätigt werden, da der Anteil an Ly5.2-positiven Zellen von 15%, welcher die retransplantierten Zellen repräsentierte, zu 21% positiv für CD11b und zu 74% CD11b sowie Gr1 war. Hingegen zeigte sich bei

den anderen Tieren nur ein Ly5.2-Anteil von 2-4% im peripheren Blut, wobei diese Zellen ebenfalls vorwiegend für die myeloiden Marker positiv waren und sich die prozentualen Anteile fast gleichmäßig auf nur CD11b-positiv und beide Marker aufweisend verteilte. Zwei Tieren konnte bei der ersten Kontrolluntersuchung kein Blut abgenommen werden, so dass erst nach 81 Tagen eine Blutanalyse erfolgte. Der Befund von #223 entsprach dem von Maus #224, wobei der Ly5.2-Anteil 31% betrug und 93% dieser Zellen sowohl CD11b als auch Gr1 exprimierten. Die Ergebnisse von #226 waren mit denen der anderen Mäuse vergleichbar, da dieses Tier ebenfalls nur einen geringen Anteil an Ly5.2-positiven Zellen aufwies. Nach 131 Tagen sank dieser Anteil an retransplantierten Zellen bis auf 1% und weniger ab. Allein bei Maus #223 waren noch 5% Ly5.2-positive Zellen zu erfassen, welche zu 93% CD11b und Gr1 exprimierten. Wie Tabelle 3.4 zu entnehmen ist, zeigte nur Maus #224 während des Versuchsverlaufs auf die retransplantierte Erkrankung bezogene Auffälligkeiten. Die anderen Tiere blieben, bis auf eine Ausnahme, für den Verlauf des Versuchs unauffällig und wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten analysiert. Eine Tier (#227) entwickelte ein für Versuchsmäuse typisches Lymphom, welchem eine spontane Tumorgenese und nicht die Transplantation der Knochenmarkzellen zugrunde lag, da die Zellen von Blut, Knochenmark, Milz, Thymus und Lymphknoten in der FACS-Analyse als Oberflächenmarker nur das Empfängermaus zugehörige Ly5.1-Antigen aufwiesen (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 3.4: Zusammenfassung der Retransplantationsergebnisse zur myeloiden Neoplasie

Die Analyse der Versuchstiere, welchen Knochenmarkzellen von drei an einer myeloiden Neoplasie erkrankten Mäusen transplantiert wurden, erfolgte zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Die Bestimmung von Hämatokrit (Hk), Leukozytenzahl (Leuko) und des Anteils der retransplantierten Zellen (Ly5.2) in Knochenmark (KM) und Milz sowie das Gewicht der Milz sollte Aufschluss darüber geben, ob die myeloide Neoplasie retransplantierbar war.

Maus	transplantierte Zellen	Überlebensdauer [Tage]	Hk [%]	Leuko [$\times 10^6$ /mL]	Milz [mg]	Ly5.2	
						KM	Milz
#223	#163	166	41,1	7,90	146	3%	1%
#224	#163	115	43,3	12,10	240	34%	22%
#225	#163	166	39,0	9,06	151	2%	2%
#226	#167	166	40,8	7,14	109	2%	1%
#228	#167	166	38,7	7,74	141	2%	2%
#229	#168	149	42,0	4,36	127	5%	5%
#230	#168	165	39,2	4,82	154	<1%	2%
#231	#168	165	41,9	6,14	100	1%	<1%

Das Versuchstier #224, welches Knochenmarkzellen der Maus mit der stärksten Ausprägung der Erkrankung erhalten hatte, musste wegen anhaltender Automutilation in Form von Aufkratzen der Haut einer Analyse unterworfen werden. Bei der Präparation stellte sich heraus, dass sowohl die Milz deutlich vergrößert war als auch ein in der Muskulatur eines der Vorderbeine liegender vergrößerter Lymphknoten zu finden war. Die FACS-Analyse der entnommenen Organe zeigte eine Ly5.2-positive,

d.h. als retransplantierte Zellen erfassbare Population, welche vorwiegend der myeloiden Reifungsreihe mit einer Expression der Marker CD11b und Gr1 zuzuordnen war. Weiterhin konnten 50% der Ly5.2-negativen Population im Knochenmark der erythroiden Zellreihe (Ter119-positiv) zugeordnet werden. Die Ergebnisse der Ly5.2-positiven Zellen sind in der nachfolgenden Tabelle 3.5 zusammengefasst. Im Gegensatz dazu konnten bei den anderen präparierten Tieren nur wenige Ly5.2- positive Zellen detektiert werden.

Tabelle 3.5: Zusammenfassung der FACS-Analyse von Maus #224

Nach der Präparation der Maus #224 wurden die entnommenen Organe mittels einer FACS-Analyse auf das Vorhandensein der retransplantierten Zellen unter Verwendung eines Ly5.2-Antikörpers sowie die Expression von Linien-spezifischen Markern getestet.

Antikörper		Knochenmark	Milz	Blut
Ly5.2		34%	22%	56%
davon	CD11b	3%	3%	1%
	CD11b+Gr1	90%	91%	99%
	Gr1	2%	3%	0%

Histologisch ließen sich die Ergebnisse der FACS-Analyse bestätigen, da es in Knochenmark und Milz zu einer starken Expansion der retransplantierten myeloiden Zellen kam, die zu einer Verdrängung der normalen Blutbildung im Knochenmark sowie der weißen Pulpa in der Milz führte. Mikroskopisch beurteilt schien es sich dabei um ein klonales Wachstum zu handeln. Im Sternum war eine beginnende Infiltration der umgebenden Muskulatur durch das Foramen nutritivum und des retrosternalen Fettgewebes festzustellen. Zusätzlich waren auffällige Megakaryozyten zu finden. Diese unreifen myeloiden Zelltypen waren auch im peripheren Blut nachzuweisen, wobei der Blastenanteil allerdings geringer als im Knochenmark war. Diese Befunde stimmten mit denen der Spendermaus #163 überein. Die in Abbildung 3.27 dargestellte PCR-Analyse der einzelnen Organe von Maus #224 zeigte, dass neben der von der Empfängermaus stammenden Wildtypbande in allen getesteten Organen eine Inaktivierung von *Runx1* erfasst werden konnte. Hingegen war bei den anderen Mäusen dieses Retransplantationsversuchs bei der finalen Analyse keine Bande von 382 bp als Hinweis auf die retransplantierten Zellen zu finden. Bei den Kontrollblutabnahmen war dies bei der Maus #223 noch der Fall.

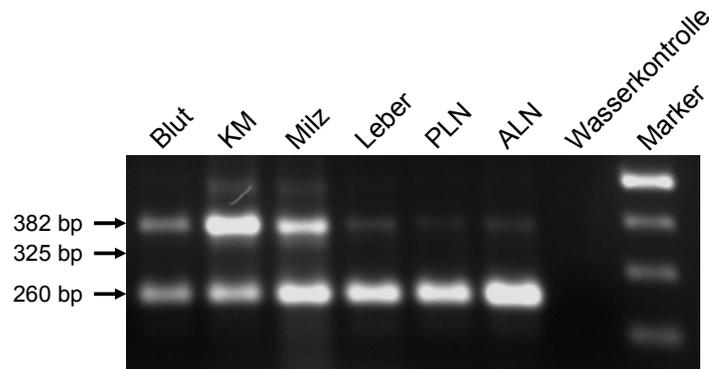


Abbildung 3.27: 1,5%-iges Agarosegel der PCR-Analyse der Maus #224

Dieses 1,5%ige Agarosegel zeigt die Ergebnisse einer PCR-Analyse der entnommenen Organe der Maus #224, welcher Knochenmarkzellen des Versuchstiers #163 retransplantiert wurden, nachdem dieses an einer myeloiden Neoplasie erkrankt war. Die Bande von 382 bp repräsentiert die Deletion des Exons 5 von *Runx1*. Ferner zeigte sich die Wildtypbande von 260 bp.

Es ist festzustellen, dass eine Retransplantation der Zellen der myeloiden Neoplasie grundsätzlich möglich war. Allerdings schien die Proliferationsfähigkeit unter Selbsterhalt bei den unreifen myeloiden Zellen, welche bei dieser Erkrankung expandierten, eingeschränkt zu sein, so dass es nach einer Retransplantation zur Ausreifung und somit zum Verlust der Zellen in den Empfängermäusen kam. Das lässt ferner darauf schließen, dass die Frequenz, mit welcher proliferierende Vorläuferzellen mit der Fähigkeit zur Selbsterneuerung in dieser myeloiden Neoplasie auftraten, gering zu sein schien. Diese Erkenntnisse gehen einher mit den Daten, die mit Hilfe der in Abschnitt 3.6 präsentierten Methylcelluloseklonierung erhalten wurden.

3.5.2 Retransplantation des Thymoms

Zur Überprüfung der Retransplantierbarkeit der beschriebenen T-Zellerkrankung wurden die 1×10^6 Knochenmarkzellen von zwei verschiedenen Mäusen mit einem Thymom (#180 und #181) ausgewählt, wobei es sich um Tiere aus einem Versuch handelte, denen mit FLT3-ITD transduzierte *Runx1^{wt/wt}-Mx1Cre*-Vorläuferzellen transplantiert wurden. Es erfolgte eine Transplantation von Knochenmark- statt Thymuszellen, weil eines der beiden Tiere neben dem Befund des Thymoms histologisch eine Plasmozytom-artige Veränderung im Knochenmark aufwies. So sollte in einem Versuch ferner die Möglichkeit der Retransplantation eines solchen Phänotyps nachgewiesen werden. Der Erfolg dieses Versuchs konnte mittels einer durchflusszytometrischen Analyse aufgrund der Venus-Expression des verwendeten retroviralen Vektors erfasst werden.

Bei einer analytischen Blutabnahme nach 32 Tagen konnte bei keinem der Versuchstiere Auffälligkeiten in Bezug auf Hämatokrit und Leukozytenwert sowie das Differentialblutbild vermerkt werden. Die Bestimmung der transplantierten Zellen

durch den Nachweis des Ly5.2-Antigens auf der Zelloberfläche ergab ein Anteil von 11-21% im peripheren Blut, wobei keine Venus- und somit FLT3-ITD-Expression erfasst werden konnte. Dieser Anteil sank bei sieben von acht Mäusen nach 76 Tagen auf unter 2%. Allein die Maus #254 erkrankte während der Versuchsdauer an dem retransplantierten Thymom, wohingegen alle anderen Mäuse unabhängig von den Ausgangszellen keine Auffälligkeiten zeigten und zu unterschiedlichen Zeitpunkten zur Kontrolle analysiert wurden. Die Untersuchungen ergaben, dass es bei den sieben Mäusen weder zu einem Anwachsen der transplantierten Zellen noch zu der Entwicklung einer Erkrankung bedingt durch die Expression von FLT3-ITD kam. In der nachfolgenden Tabelle 3.6 sind die Ergebnisse der Retransplantationsversuche zusammengefasst.

Tabelle 3.6: Daten zur Retransplantation der beschriebenen T-Zellerkrankung

Die Analyse der Tiere, welchen FLT3-ITD-exprimierende Knochenmarkzellen von zwei an einem Thymom erkrankten Mäusen transplantiert wurden, erfolgte zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Die Bestimmung von Hämatokrit (Hk) und Leukozytenzahl (Leuko) sowie des Gewichts von Milz und Thymus, ferner eine FACS-Analyse (Daten nicht gezeigt) sollte Aufschluss darüber geben, ob die T-Zellerkrankung retransplantierbar war.

Maus	transplantierte Zellen	Überlebensdauer [Tage]	Hk [%]	Leuko [$\times 10^6$ /mL]	Milz [mg]	Thymus [mg]
#248	#180	110	40,7	2,36	75	48
#249	#180	109	43,6	9,92	102	104
#250	#180	76	37,1	4,78	98	92
#251	#180	114	40,7	5,08	94	65
#252	#181	116	41,0	10,08	87	67
#253	#181	116	40,4	7,70	86	61
#254	#181	76	35,3	56,30	671	170
#255	#181	109	38,8	10,64	155	64

Die Analyse der Maus #254 ergab eine deutliche Vergrößerung von Milz und Thymus, wobei diejenige des Thymus nicht so stark ausgeprägt war, wie es hätte erwartet werden können. Die FLT3-ITD-Expression in den hämatopoetischen Organen war mit 89% im Knochenmark, 77% in der Milz und 85% im Blut sehr hoch, während im Thymus ein Anteil von 68% erfasst werden konnte. Diese Zellen wiesen zu 90% und mehr mit CD90.2, CD4 und CD8 die gleichen Oberflächenmarker auf, wie sie bei dem Ausgangstier ermittelt wurden. Das in Abbildung 3.28 dargestellte Sternum wies ein hyperzelluläres Knochenmark auf, in welchem Erythro- sowie Myelopoese nicht mehr nachweisbar waren und es zu einer massiven Ausweitung der einheitlichen lymphoblastischen T-Zellpopulation kam. Neben einer Rarifizierung der Spongiosa konnte ein Ausbrechen dieser Zellen aus der Knochenmarkhöhle in die umgebende Interkostalmuskulatur und eine dortige Proliferation ohne große Nekrosen erfasst werden. Diese hoch malignen Charakteristika wurden zudem in dem Fehlen der normalen Milzarchitektur und der Verdrängung der subkapsulären Myelopoese widerspiegelt. Während die Struktur der weißen Pulpa als solche nicht mehr

auszumachen war, konnte eine kompensatorische Erythropoese in der verbliebenen roten Pulpa festgestellt werden. Ferner kam es zu einer starken Infiltration peripherer Organe wie Leber und Lymphknoten, die zu einer Zerstörung der normalen Gewebestruktur führte. Die periportale, perivenöse sowie intrasinusoidale Infiltration der Leber durch den lymphoblastischen Zelltyp ist ebenfalls in Abbildung 3.28 dargestellt.

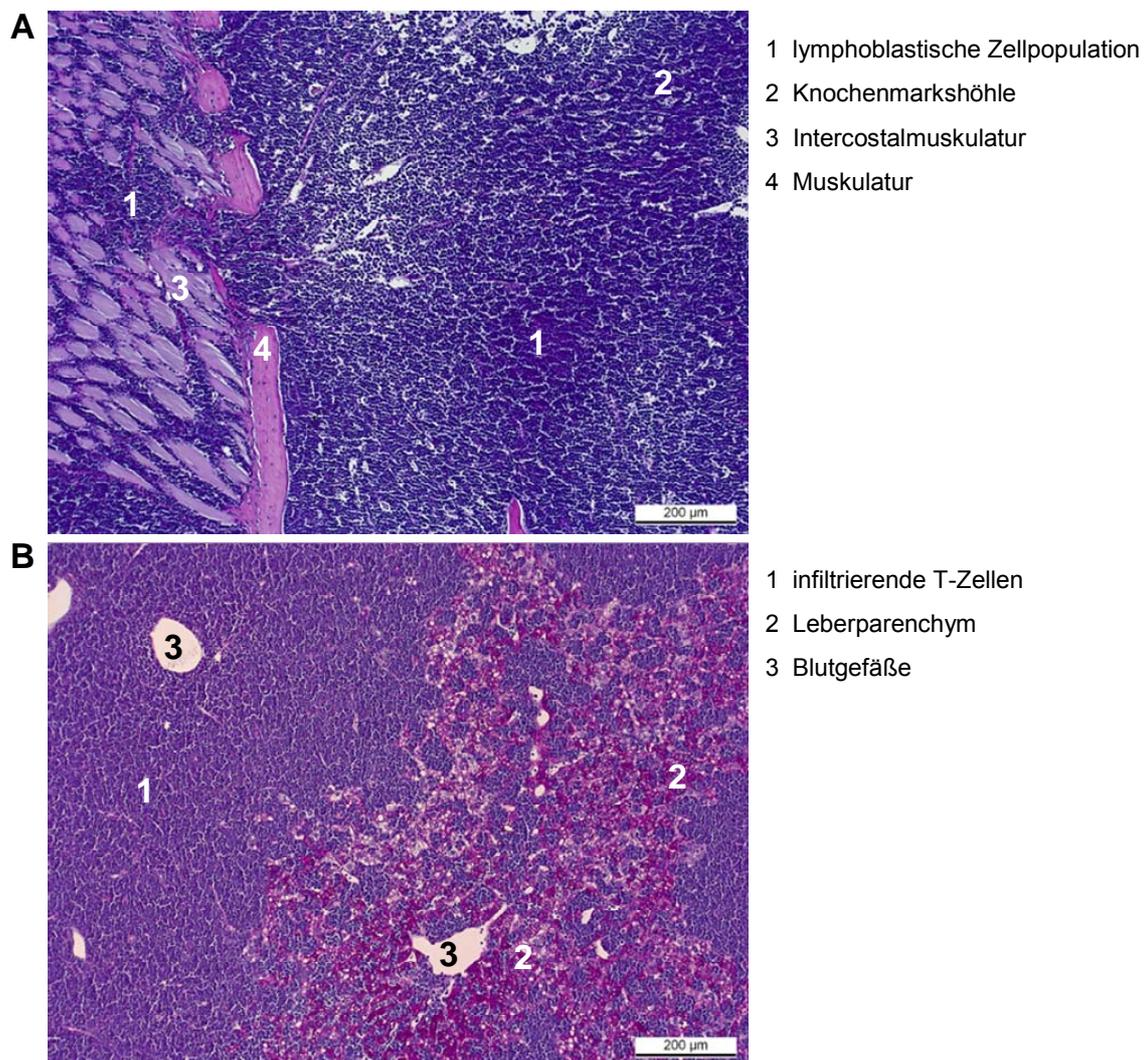


Abbildung 3.28: Darstellung der massiven Infiltration von Knochenmark und Leber der Maus #254

A Anhand des zehnfach vergrößerten und PAS-gefärbten Schnitts durch das Sternum war die Expansion der lymphoblastischen T-Zellpopulation (1) aus der Knochenmarkshöhle (2) bis in die Interkostalmuskulatur (3) sowie eine Verminderung der Spongiosa erfassbar.

B In dem zehnfach vergrößerten und PAS-gefärbten Leberschnitt zeigte sich die massive Infiltration dieses Organs durch retransplantierten T-Zellen (1), wodurch es zu einer Zerstörung des Leberparenchyms (2) und zu einem damit verbundenen Funktionsverlust kam.

Die starke Expansion der transplantierten Zellen im Knochenmark sowie die geringere Ansiedlung im Thymus der Empfängermaus deutet einen sogenannten *Homing*-Effekt an, welcher besagt, dass transplantierte Zellen bevorzugt das Ursprungsgewebe

besiedeln. Dies ist für transplantierte hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen beschrieben (Srouf et al., 2001). Ergebnisse, die einen solchen Effekt ebenfalls andeuteten, wurden bei Retransplantationen von Milz- und Lymphknotenzellen im Rahmen von anderen Mausexperimenten eines Teilprojekts dieser Promotionsarbeit erzielt. Hierbei führten retransplantierte Tumorzellen aus der Milz in den Empfängertieren zu einer stärkeren Splenomegalie als Tumorzellen der Lymphknoten, welche hingegen zu einer deutlichen Vergrößerung der Lymphknoten verursachten (unveröffentlichte Ergebnisse).

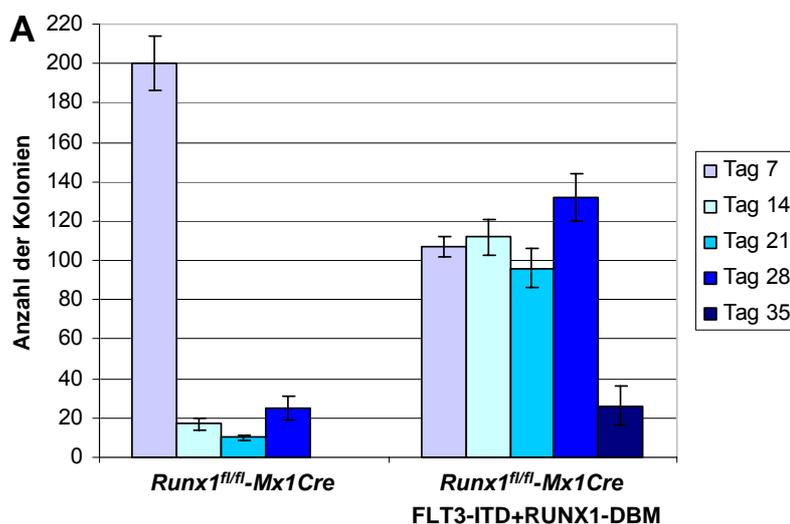
Diese Ergebnisse sowie die im nachfolgenden Abschnitt 3.7 zur Klonalität der Erkrankung durchgeführten Southernblot-Analyse zeigten, dass eine Retransplantation des Thymoms möglich war. Da dies allerdings nur bei einer von acht Mäusen erfolgreich war, kann man daraus schließen, dass zwar repopulierende Zellen mit der Fähigkeit zur Thymomentwicklung transplantiert wurden, deren Auftreten im Knochenmark aber eher selten ist. Zur genaueren Berechnung der Frequenz dieser unter Selbsterhalt proliferierenden Vorläuferzellen wäre die Transplantation von Zellen des Thymoms in serieller Verdünnung in eine größere Anzahl von Mäusen erforderlich.

3.6 Analyse der Selbsterneuerungskapazität der neoplastischen Zellen mittels Methylcelluloseklonierung

Zur Analyse, ob die in den Mäusen mit einer myeloiden Neoplasie beobachtete Linksverschiebung der myeloiden Reifungsreihe mit einer verstärkten Klonierungskapazität und somit einem Proliferationsvermögen unter Selbsterhalt einherging, wurden Methylcelluloseklonierungen mit Knochenmarkzellen einer erkrankten Maus (#214) durchgeführt. Als Kontrolle wurden Zellen eines Versuchstiers mitgeführt, dem *Runx1^{fl/fl}-Mx1Cre*-Zellen transplantiert wurden, wobei *in vivo* keine pIpC-Behandlung erfolgte, aber eine partielle Inaktivierung von *Runx1* in den hämatopoetischen Organen nachgewiesen werden konnte. Zum einem wurde eine gebrauchsfertige Methylcellulose für die Kultivierung von murinen hämatopoetischen Vorläuferzellen in Knochenmark verwendet, welches für das Wachstum von myeloiden Vorläuferzellen der Granulozyten und Makrophagen optimiert war (M3534). Zum anderen stand ein semisolid Medium ohne Zytokine zur Verfügung, das mit mSCF sowie mIL3 ergänzt wurde (M3231). Die Kultivierung wurde in Triplikaten über einen Zeitraum von jeweils sieben Tagen durchgeführt, wobei im Anschluss an die mikroskopische Auswertung der Kolonien eine Replattierung der Zellen erfolgte. Nur in einem Fall wurden die Zellen für eine Zeit von 14 Tagen in demselben Medium belassen, da eine Replattierung aufgrund der geringen Zellzahl noch nicht möglich war.

Bei dem Vergleich der myeloiden neoplastischen Knochenmarkzellen mit dem Kontrollansatz, welcher in Abbildung 3.29 gezeigt ist, konnte nach sieben Tagen

Kulturdauer in dem gebrauchsfertigen Medium eine erhöhte Kolonienanzahl für die Kontrolle festgestellt werden. Diese erhöhte, aber limitierte Proliferationskapazität war auf die Selektion auf *Runx1^{Δ/Δ}-Mx1Cre*-Zellen zurückzuführen (Cammenga et al., 2007). Mittels einer PCR-Analyse konnte das alleinige Auftreten von Kontrollzellen, in denen das Exon 5 von *Runx1* deletiert war, bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz zur Kontrolle zeigte sich in den Ansätzen der myeloiden Vorläuferzellen eine zunächst gleichbleibende Proliferation, welche nach 35 Tagen Kulturdauer ebenfalls ein Minimum fand. Anhand der Auswertung angefertigter Cytospins, wie sie beispielhaft in Abbildung 3.29 gezeigt sind, konnte nachgewiesen werden, dass es bei den Kontrollansätzen zu einem früheren Ausdifferenzieren der Zellen kam, so dass vor allem Makrophagen und eosinophile Granulozyten als eine besonders langlebige Population bei der Koloniebildung zu beobachten waren. Die Kolonien der neoplastischen Zellen waren jedoch noch ein größerer Anteil myeloider Vorläuferzellen in einem nicht terminal ausgereiften Stadium zu verzeichnen. Ein Auszählen von 500 Zellen des jeweiligen Cytospins nach sieben Tagen Kulturdauer konnte dieses Ergebnis bestätigen (siehe Abbildung 6.5 im Anhang). Nach einer Kulturdauer von 28 Tagen wurde anhand der Cytospins ein fast vollständiges Ausdifferenzieren der Zellen in beiden Ansätzen festgestellt, wobei Makrophagen im Kontrollansatz dominierend waren und nur wenige eosinophile Granulozyten vorlagen. Im Versuchsansatz der kultivierten myeloiden Vorläuferzellen war hingegen ein größerer Anteil an eosinophilen Granulozyten zu verzeichnen.



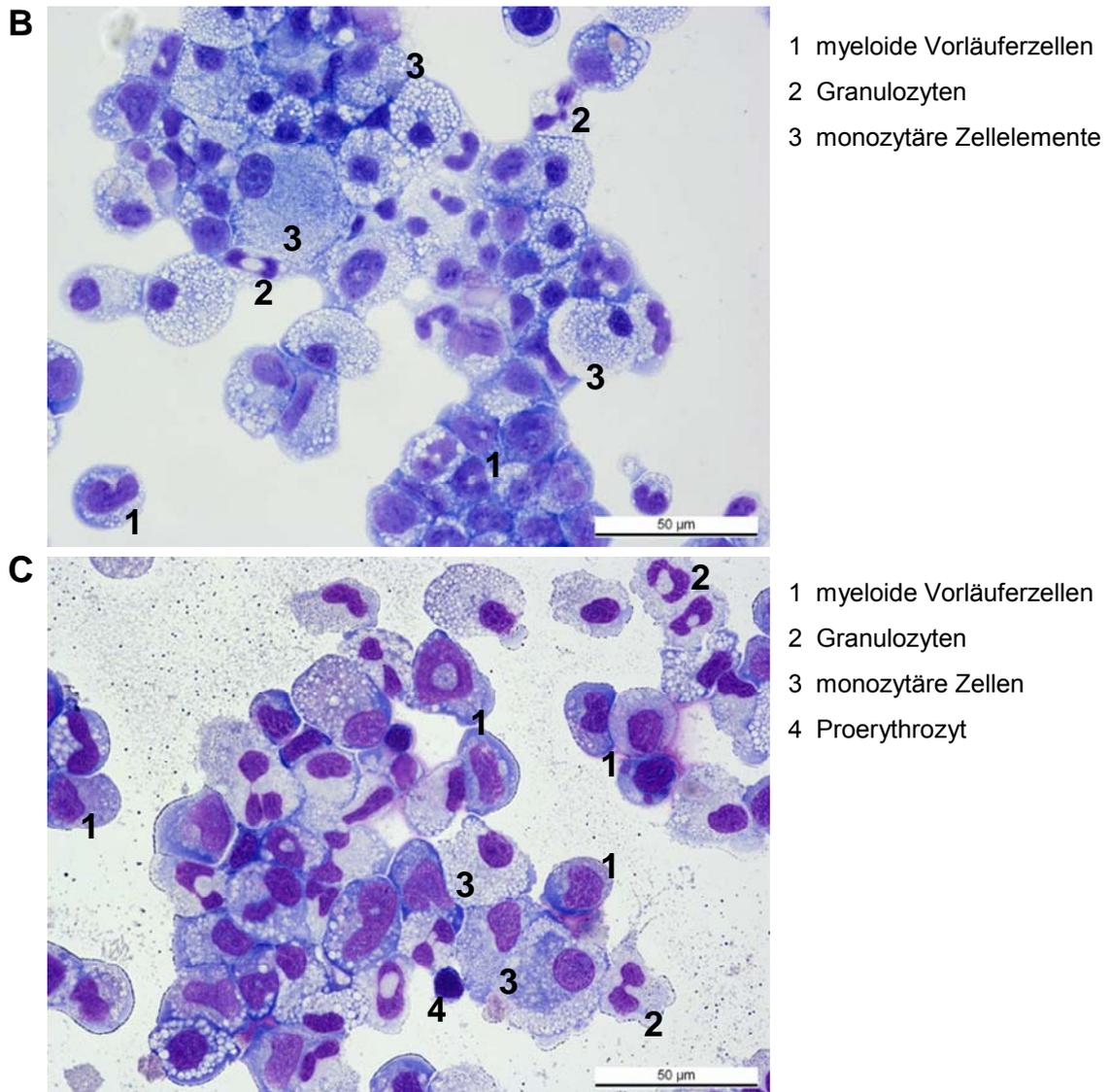


Abbildung 3.29: Kultivierung der myeloiden neoplastischen Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen sowie Cytospins beider Versuchsansätze

Die Knochenmarkzellen einer Maus, die eine myeloide Neoplasie als Phänotyp aufwies, sowie einer Kontrollmaus wurden in einem semisoliden Medium kultiviert, welches für das Wachstum myeloider Vorläuferzellen optimiert war (A). Nach sieben Tagen wurden Zellen der Kontrolle (B) sowie des Versuchsansatzes bezüglich der myeloiden Neoplasie (C) auf Objektträger zentrifugiert, um diese mikroskopisch beurteilen zu können.

Durch die Verwendung des gebrauchsfertigen sowie des noch zu komplettierenden Mediums konnte eine IL3-Abhängigkeit der myeloiden Vorläuferzellen festgestellt werden. In Abbildung 3.30 ist gezeigt, dass eine Kultivierung dieser Zellen im Zytokin-haltigen Medium, welches für die Kultivierung von myeloiden Vorläuferzellen optimal war, über einen Zeitraum von vier Wochen erfolgen konnte, wohingegen die Koloniebildung der Zellen in dem Medium, das mit mSCF und mIL3 ergänzt werden musste, zunächst leicht erhöht, aber dann vermindert war. Ersteres ist vermutlich auf den höheren Anteil an mSCF zurückzuführen, während letzterem vermutlich das Fehlen weiterer Zytokine in diesem Medium zugrunde lag. So konnte nach 21 Tagen

keine Replattierung erfolgen, weil zu wenige Zellen zur Verfügung standen. In Abwesenheit von mIL3 war keine Kultivierung der neoplastischen Zellen möglich, da es nur zu einer minimalen Kolonienbildung kam, wobei diese vorwiegend aus terminal differenzierten Zellen bestand.

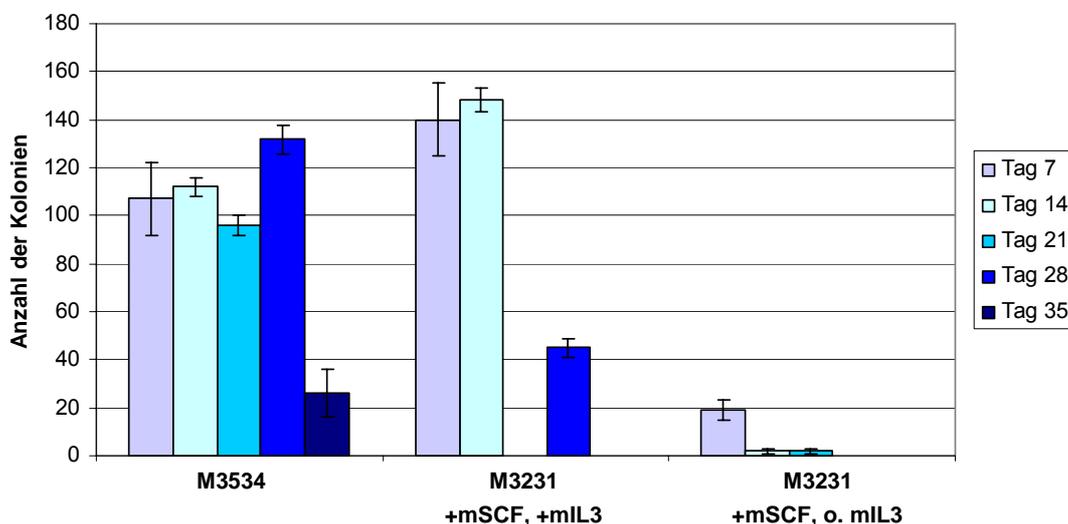


Abbildung 3.30: Replattierungsvermögen der myeloiden neoplastischen Zellen in den verschiedenen verwendeten Medien

Die entnommenen Knochenmarkszellen einer Maus, die an einer myeloiden Neoplasie erkrankte, wurden in einem Medium kultiviert, welches für myeloide Vorläuferzellen optimiert war (M3534). Weiterhin wurde ein Medium ohne Zytokinzusatz (M3231) verwendet, dem einerseits mSCF und mIL3, andererseits nur mSCF zugefügt wurde. (o. = ohne)

Weiterhin sollte unter Verwendung des Inhibitors PKC412 (Roche) in einer Endkonzentration von 100 nM sowie von DMSO als Kontrolle eine Kolonienbildung gehemmt werden, da die FLT3-ITD-Expression für die verstärkte Proliferation der myeloiden Vorläuferzellen im Knochenmark als verantwortlich angesehen wurde. Zwischen den Versuchsansätzen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden, da es gleichermaßen zu einer Differenzierung und resultierenden Granulozyten- und Makrophagenbildung kam, so dass eine Abhängigkeit des Replattierungsvermögens von der Expression der aktivierten Tyrosinkinase nicht untersucht werden konnte (siehe Abbildung 6.6 im Anhang).

Zusätzlich zu diesen zellbiologischen Experimenten unter Verwendung von Methylcellulose wurde eine Kultivierung von entnommenen murinen Knochenmarkszellen in Serum-freiem Medium, welches mit Zytokinen versetzt war, getestet. Dabei wurden Zellen einer Maus verwendet, welche aufgrund der Expression des Doppelvektors eine myeloide Neoplasie entwickelte. Als Kontrolle diente das Knochenmark einer Maus, welcher *Runx1^{fl/fl}-Mx1Cre*-Zellen transplantiert wurden. Eine Erhaltung der Zellen gelang nur bis zu einem gewissen Grad, da es innerhalb von

14 Tagen Kulturdauer zu einer Differenzierung und zum Absterben der Knochenmarkzellen kam. Dies zeigte sich an einem heterogenen Zellbild der vorher einheitlichen Population sowie der Ausbildung von adhärenenten Zellen und konnte durch die Analyse von angefertigten Cytospins, welche Makrophagen als vorherrschende Zellen aufwiesen, bestätigt werden. Eine Kultivierung der Knochenmarkzellen in einer Flüssigkultur konnte daher nicht erfolgreich durchgeführt werden.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass eine Kultivierung der Knochenmarkzellen einer Maus, die an einer myeloiden Neoplasie erkrankte, nur im semisoliden Medium erfolgen konnte, wobei der Zusatz von Zytokinen unerlässlich war. Die transformierten myeloiden Vorläuferzellen zeigten zwar ein erhöhtes Replattierungsvermögen und somit eine verstärkte Proliferationskapazität, unterlagen aber final der Differenzierung, so dass es zur Kolonienbildung bestehend aus Makrophagen und eosinophilen Granulozyten kam. Dies stimmte mit den Ergebnissen der Reimplantationsversuche zur myeloiden Neoplasie (siehe Abschnitt 3.5.1) überein.

3.7 Untersuchung der Klonalität der entstandenen Erkrankungen

Mit Hilfe einer Southernblot-Analyse der retroviralen Integrationsstellen ist es möglich, die Klonalität von Tumoren festzustellen, d.h. ob die transformierten Zellen aus einer Ursprungszelle hervorgegangen sind (monoklonal) oder es zum parallelen Auswachsen mehrerer mutierter Zellen gekommen ist und sich somit verschiedene Zellklone gebildet haben (oligo- bzw. polyklonal). Für die Analyse der Klonalität der zuvor beschriebenen Phänotypen der myeloiden Neoplasie sowie des Thymoms wurde aus Milz oder Thymus der erkrankten Mäuse die genomische DNA isoliert und aufgereinigt. Die Verwendung von verschiedenen Restriktionsenzymen diente dem Erstellen reproduzierbarer DNA-Fragmente, welche zur Größenauftrennung einer Agarosegelelektrophorese unterzogen und anschließend auf eine Membran transferiert wurden. Diese Membran wurde mit den aus den verwendeten retroviralen Vektoren hergestellten und radioaktiv markierten Sonden hybridisiert, die sowohl endogene als auch durch die Integration der retroviralen DNA neu entstandene Banden erfassen konnten. In der nachfolgenden Abbildung 3.31 ist die Southernblot-Analyse der Milz-DNA von fünf an der myeloiden Neoplasie erkrankten Mäuse sowie das Ergebnis einer Reimplantation dargestellt. Die hierbei angewendete Restriktion mit SacI gab Aufschluss über das Vorhandensein und die Anzahl der Proviren in den analysierten Milzzellen, wohingegen die Restriktion mit EcoRI durch die Anzahl der entstandenen Banden einen Anhaltspunkt in Bezug auf die Häufigkeit der Integration bzw. auf die Klonalität der vorliegenden Erkrankung lieferte.

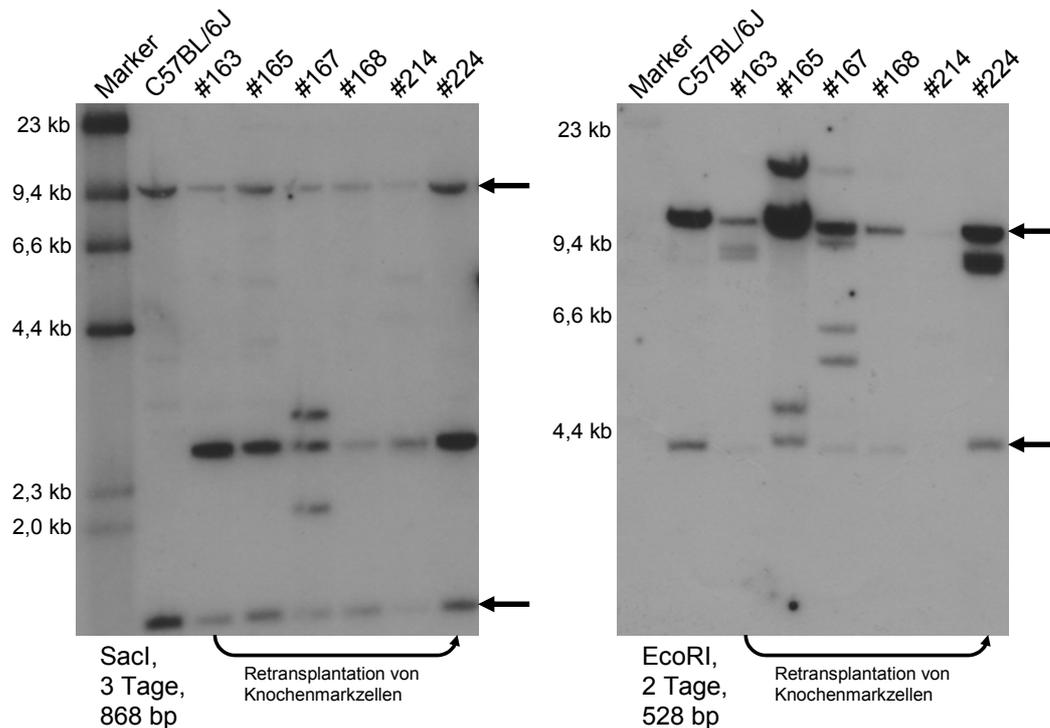


Abbildung 3.31: Southernblot-Analyse der an der myeloiden Neoplasie erkrankten Mäuse sowie einer Retransplantation dieser Erkrankung

Die isolierte und aufgereinigte Milz-DNA wurde mit den Restriktionsenzymen SacI (links) sowie EcoRI (rechts) geschnitten. Als Sonde diente ein ^{32}P -markiertes EcoRV-SmaI-Fragment (868 bp) bzw. SphI-HindIII-Fragment (528 bp) aus dem verwendeten retroviralen Vektor, mit welchem drei und zwei Tage bei -70°C hybridisiert wurde. Aufgetragen wurden der HindIII-geschnittene λ -Marker (Fermentas), als Kontrolle die Milz-DNA einer C57BL/6J-Maus sowie die Proben der Mäuse #163, #165, #167, #168 und #214 sowie der retransplantierten Maus #224. In der Kontrolle zeigten sich die Maus-eigenen Allele als endogene Banden (durch Pfeile markiert).

Der linksseitigen Southernblot-Analyse war zu entnehmen, dass es bei der Entwicklung einer myeloiden Neoplasie zu dem Auswachsen eines dominanten Zellklons kam, neben dem nur in geringem Maße weitere Zellklone zu verzeichnen waren. Dies zeigte sich bei den Proben #165 und #214 durch das Auftreten einer starken Bande bei 2,6 kb sowie wenigen schwachen Banden unterschiedlicher Größe im linken Teil der Abbildung 3.31. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass bei den Milzzellen der Mäuse #163, #165 und #214 pro Zelle mehrere Proviren vorhanden waren, da die Bande von 2,6 kb etwa vierfach stärker als die endogene Bande im oberen und unteren Bereich der Abbildung war. Dies zeigte sich ebenfalls bei der Milzprobe von Maus #224, welcher Knochenmarkzellen der Maus #163 retransplantiert wurden. Bei der Probe #168 zeigten alle Banden eine ähnliche Intensität. Bei der Maus #167 kam es vermutlich zu einem Rearrangement des Provirus, welches sich in dem Vorhandensein der 2,6 kb-Bande sowie zwei weiteren etwas größer bzw. kleineren Banden zeigte. Anhand der rechts dargestellten Southernblot-Analyse konnte die Klonalität der myeloiden Neoplasie erfasst werden. Mit Ausnahme des Tiers #165 kam es bei dieser Erkrankung zum Auswachsen eines dominanten Klons mit zwei oder

mehreren Integrationsstellen. Diese Monoklonalität zeigte sich durch das Auftreten mehrerer Banden gleicher Intensität. Von den Proben #168 und #214 wurde nur wenig DNA aufgetragen, so dass das vorhandene Bandenmuster nur schwach zu erkennen war. Die unterschiedlich intensiven Banden der Maus #165 ließen den Schluss zu, dass hierbei zwei unabhängige Zellklone auftraten und Grund für die somit oligoklonale Erkrankung waren. Weiterhin konnte anhand dieser Analyse gezeigt werden, dass nach der Retransplantation der Knochenmarkzellen der Maus #163, das Integrationsmuster und somit die Monoklonalität erhalten blieb.

Bei der in Abbildung 3.32 gezeigten Southernblot-Analyse wurden die Proben der zu unterschiedlichen Zeitpunkten an einem Thymom erkrankten Mäuse verwendet.

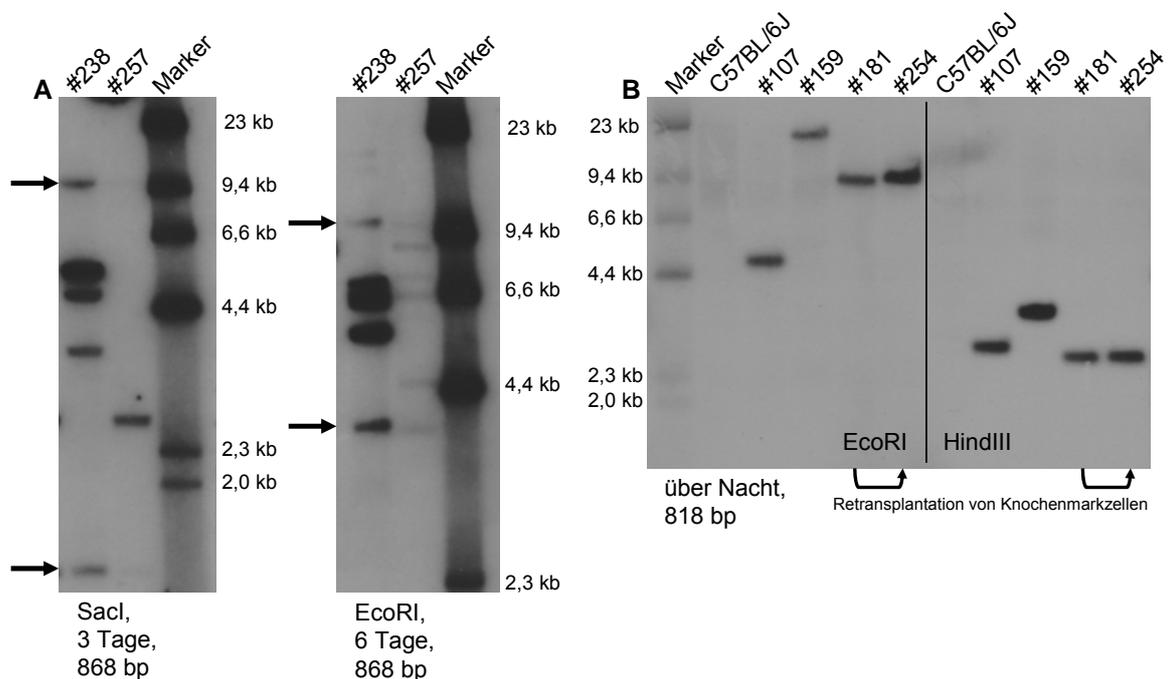


Abbildung 3.32: Southernblot-Analyse der zu verschiedenen Zeitpunkten am Thymom erkrankten Mäuse sowie einer Retransplantation dieser Erkrankung

A Die verwendete Thymus-DNA wurde mit den Restriktionsenzymen SacI (links) sowie EcoRI (rechts) geschnitten. Als Sonde diente ein ³²P-markiertes EcoRV-SmaI-Fragment (868 bp) aus dem entsprechenden retroviralen Vektor, mit dem die Hybridisierung für drei und sechs Tage bei -70°C erfolgte. Gezeigt sind der HindIII-geschnittene λ-Marker (Fermentas), als Kontrolle die Milz-DNA einer C57BL/6J-Maus sowie die Proben der Mäuse #238 und #257. In der Kontrolle zeigten sich die Maus-eigenen Allele als endogene Banden (durch Pfeile markiert).

B Die mittels EcoRI- (linker Teil) bzw. HindIII-geschnittene (rechter Teil) Thymus-DNA konnte mit der ³²P-markierten Venus-Sonde (NcoI-EcoRV-Fragment des Venus-Kontrollvektors, 818 bp) nach einer Inkubation über Nacht bei -70°C erfasst werden. Aufgetragen wurden der HindIII-geschnittene λ-Marker (Fermentas), als Kontrolle die Milz-DNA einer C57BL/6J-Maus sowie die Proben der Mäuse #107, #159, #181 sowie der retransplantierten Maus #254. Wie erwartet zeigte die Kontrolle kein Bandenmuster.

In der links dargestellten Analyse zeigte sich, dass es bei der Maus #238 zu einer Veränderung des Provirus gekommen war. Nach Betrachtung der Bandengröße wurde vermutlich eine Schnittstelle in der IRES zerstört. Bei der Milzprobe des Tiers #257 zeigte sich hingegen die erwartete 2,6 kb-Bande nach der SacI-Restriktion, welche

wiederum eine deutlich stärkere Intensität im Vergleich zu den endogenen Banden aufwies, d.h. pro Zelle mehrere Proviren vorhanden waren. Mittels der EcoRI-Restriktion konnte die Klonalität der beiden Thymome bestimmt werden. In beiden Fällen handelte es sich um monoklonale Ereignisse mit mehreren, in beiden Fällen vier, Integrationsstellen. Dafür spricht die ähnliche Intensität aller Banden, da es bei einem oligoklonalen Tumor zum Auftreten von mehreren unterschiedlich starken Banden bei einer solchen Southernblot-Analyse gekommen wäre. Die zweite in Abbildung 3.32 aufgeführte Analyse ermöglicht die Feststellung, dass die drei getesteten Mäuse eine monoklonale T-Zellerkrankung mit nur einem Provirus pro Zelle entwickelt haben. Ferner zeigte sich, dass die retransplantierten FLT3-ITD-exprimierenden Knochenmarkzellen der Maus #181 wiederum zu der Entwicklung einer T-Zellerkrankung unter Erhalt des Integrationsmusters sowie der Monoklonalität in der Maus #254 führte.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass es sich bei dem Krankheitsbild des Thymoms um eine monoklonale Erkrankung handelte, wobei im Falle von FLT3-ITD nur eine Integration, hingegen bei Verwendung des Doppelvektors mehrere Integrationen zu verzeichnen waren. Bei der myeloiden Neoplasie kam es ebenfalls zum Auftreten eines vorwiegend monoklonalen Ereignisses mit mehreren Integrationsstellen. In den jeweiligen Retransplantationen zeigte sich ein wiederkehrendes Bandenmuster, welches die Klonalität der Erkrankungen bestätigte.

4 Diskussion

Der Transkriptionsfaktor RUNX1 nimmt in der Hämatopoese eine entscheidende Rolle ein und unterliegt daher einer strengen Kontrolle. Eine Fehlregulation dieses Faktors kann zur Entstehung einer Leukämie beitragen. Die Erforschung der grundlegenden Prozesse der Pathogenese dient dem Verständnis der Erkrankung sowie der Entwicklung therapeutischer Ansätze. Sowohl chromosomale Translokationen als auch mono- und biallelische Mutationen des *RUNX1*-Gens sind beschrieben, wobei letztere häufig mit einer Mutation des FLT3-Rezeptors assoziiert auftreten. FLT3 ist als Rezeptortyrosinkinase für die Differenzierung, Zellteilung sowie Apoptose hämatopoetischer Zellen von entscheidender Bedeutung.

In dieser Arbeit wurde ein Mausmodell entwickelt, welches die Untersuchung des Zusammenwirkens von RUNX1-Mutationen und einer aktivierten Tyrosinkinase wie FLT3-ITD in akuten Leukämien ermöglichte. Nachfolgend wird zum einen dieses Modell sowie die konstatierten Erkrankungen diskutiert, zum anderen wird die Bedeutung der Ergebnisse in Bezug auf vorherige Studien und weiterführende Forschungsprojekte sowie hinsichtlich des Modells zur Leukämieentstehung erläutert.

4.1 Etablierung eines Mausmodells

Zur Untersuchung einer konstitutiv aktivierten Rezeptortyrosinkinase wie FLT3-ITD sowie deren Zusammenwirken mit RUNX1-Mutanten in der hämatopoetischen Entwicklung wurde das Modell einer Knochenmarkstransplantation gewählt. Mit Hilfe des retroviralen Gentransfers konnten die zu untersuchenden Mutanten in zuvor isolierte hämatopoetische Vorläuferzellen eingebracht und in letal bestrahlte Empfängermause transplantiert werden, in denen die transduzierten Zellen die Hämatopoese ausbildeten. Die auftretenden Erkrankungen der Versuchstiere wurden in Bezug auf ausgewählte Aspekte untersucht.

Die Maus ist ein wertvolles, seit Jahren genutztes Modellsystem, um die Entstehung von Erkrankungen des hämatopoetischen Systems, insbesondere von Leukämien, *in vivo* experimentell analysieren zu können. Hierbei wird ein Einblick in kooperierende Ereignisse, wie z.B. Mutationen, und kausale Zusammenhänge gewährt. Allerdings unterliegt das biologische System unterschiedlichen Einflüssen, die nicht vollständig verstanden und daher schwer zu kontrollieren sind. Zunächst werden daher einige Aspekte dieses Mausmodells näher betrachtet.

4.1.1 Spendermäuse und Aktivierung der Cre-Rekombinase *in vivo*

Runx1-defiziente Mäuse weisen neben einer Störung der lymphoiden und myeloiden Zellentwicklung Veränderungen in der Megakaryopoese und des Stammzellkompartiments auf (Ichikawa et al., 2004; Sun und Downing, 2004; Gowney et al., 2005; Putz et al., 2006). Die Effekte bezüglich der myeloiden Differenzierung sollten bei der Untersuchung der Wirkung in Gegenwart der konstitutiv aktivierten Rezeptortyrosinkinase FLT3-ITD bei der Entstehung einer Leukämie ausgenutzt werden. Allerdings wurden für die Knochenmarkstransplantationsversuche *Runx1*-exprimierende hämatopoetische Vorläuferzellen verwendet, so dass sich in den Empfänger-mäusen Blutzellen aller Linien entwickeln konnten und nicht von Beginn an eine Beschränkung des Anwachsens der Zellen in den transplantierten Mäusen und der Repopulierungs- sowie Differenzierungskapazität bestand. Durch eine pIpC-Injektion erst nach der Transplantation sollte gezeigt werden, welche Folgen und somit Erkrankungen sich durch die Inaktivierung von *Runx1 in vivo* ergaben.

Bei der Verwendung des *Mx1Cre*-Stammes konnte es, unabhängig einer Induktion durch pIpC, zu einer Inaktivierung von *Runx1* kommen, welche vermutlich auf der Interferonfreisetzung aufgrund von Injektionen, Blutabnahmen oder ähnlichen invasiven Maßnahmen beruhte. Dabei handelte es sich allerdings nicht um eine vollständige Inaktivierung von *Runx1*, so dass von einer Beschränkung der transplantierten Zellen nicht auszugehen war. Eine veränderte oder verminderte Fähigkeit der Zellen hinsichtlich Repopulierung und Differenzierung wurde nicht erfasst. Eine Berücksichtigung dieses Aspekts war bei der Auswertung der Ergebnisse, besonders mit Hinblick auf die Kontrollen, erforderlich. Allerdings erwies sich es sich als vorteilhaft diesen Stamm, der als *leaky* bezeichnet werden muss, für die Mausversuche zu verwenden, da dieser das Auftreten myeloider und lymphoider Erkrankungen in Gegenwart des jeweils vorteilhaften *Runx1*-Genotyps ermöglichte.

Neben dem *Mx1Cre*-Stamm empfehlen sich andere auch Cre-Mausstämme zur Erforschung von *Runx1* und seiner Rolle in der Hämatopoese. Bei der Expression der Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des *Vav1*-Promoters kann eine Inaktivierung von *Runx1* schon in der frühen Blutzellentwicklung untersucht werden, da *Vav1* als eines der ersten hämatologischen Gene in HSC exprimiert wird (de Boer et al., 2003; Chen et al., 2009). Die Notwendigkeit für *Runx1* zeigte sich nur bei der Etablierung der HSC des Embryo und nicht im fötalen oder adulten Stadium (Chen et al., 2009), wobei eine Haploinsuffizienz die zeitliche und räumliche Bildung von HSC im Mausembryo beeinflusste (Mukoyama et al., 2000). Allerdings konnte in vergleichenden Studien homo- und heterozygoter Versuchstiere (*Runx1*^{+/+} und *Runx1*^{+/-}) ein Dosis-abhängiger Effekt von *Runx1* auf HSC und Vorläuferzellen nachgewiesen werden. So resultierte der Verlust eines einzelnen Allels in einer 50%-igen Reduktion der repopulierenden

LT-HSC und einer Erhöhung der multipotenten Vorläuferzellen (Sun und Downing, 2004). Im Gegensatz dazu wurde bei einer homozygoten *Runx1*-Inaktivierung ein Anstieg an HSC festgestellt, wobei *Runx1* für die Erhaltung des HSC-Kompartiments erforderlich zu sein schien. Dieses *Runx1*-defiziente Knochenmark zeigte in Versuchen zur Langzeit-Repopulierungsaktivität eine reduzierte kompetitive Repopulierungskapazität (Gowney et al., 2005). Weiterhin wiesen homozygote *Runx1*-defiziente Mäuse eine vergrößerte Population an ruhenden HSC auf, wodurch eine negative Regulation der ruhenden Stammzellen durch *Runx1* angedeutet wird (Ichikawa et al., 2008). Daher müsste vor der Nutzung des *Vav1Cre*-Stammes überprüft werden, ob sich dieser für Knochenmarkstransplantationsversuche, wie die hier präsentierten, eignet oder Beschränkungen im Anwachsen der Zellen in den transplantierten Mäusen und in der Repopulierungs- sowie Differenzierungsfähigkeit auftreten könnten.

4.1.2 Retrovirale Vektoren und Transduktionsraten

Zur Expression der zu untersuchenden Mutanten von FLT3 und RUNX1 in den hämatopoetischen Vorläuferzellen wurden gamma-retrovirale Vektoren verwendet, welche für die Transduktion früher hämatopoetischer Zellen optimiert sind (Stocking et al., 1993; Baum et al., 1995; Kitamura et al., 2003). Die transduzierten Zellen konnten bei dem Vorhandensein eines Markerproteins in der FACS-Analyse verfolgt werden. Die verwendeten Doppelvektoren waren allerdings aufgrund der kodierenden Sequenzen von zwei Mutanten ohne einen solchen Marker konzipiert, da eine Vergrößerung des Vektors um eine Reportersequenz die Transduktionsrate der hämatopoetischen Zellen erheblich verschlechtert hätte.

Die Varianz der Transduktionsraten der verschiedenen Vektoren lässt sich zum einem durch die zuvor erwähnte unterschiedliche Größe und Wirkungsweise in den hämatopoetischen Vorläuferzellen erklären (siehe Abschnitt 3.1.3). Zum anderen erfolgte innerhalb dieser Arbeit eine fortwährende Optimierung der technischen Durchführung der einzelnen Versuchsschritte.

Im Rahmen von Experimenten, auf welche in dieser Arbeit nicht eingegangen wurde, erfolgte eine Untersuchung weiterer Möglichkeiten zum gleichzeitigen Einbringen von zwei Mutanten in die hämatopoetischen Zellen. Hierfür wurden zwei gamma-retrovirale Vektoren des beschriebenen Aufbaus zur Expression jeweils einer Mutante verwendet, wobei GFP und Venus bzw. YFP als Markerproteine eine Unterscheidung der Vektoren in der Durchflusszytometrie gestattete. Der Vorteil hierbei ist die Nachweisbarkeit und Unterscheidung der Expression der Vektoren in den entnommenen Zellen einer transplantierten Maus. Der Nachteil dieser Strategie zeigte sich *in vivo*, denn trotz einer ausreichenden hohen Anzahl an jeweils einfach- und doppelt-positiven Zellen konnten in den Versuchstieren bei einer Analyse nur in

einigen wenigen Fällen doppelt-positive Zellen erfasst werden. Vorwiegend kam es zur Expression nur eines Vektors (sowohl bei den Kontrollvektoren als auch jenen mit einer kodierenden Sequenz), so dass die Untersuchung eines Zusammenwirkens verschiedener Mutanten mittels dieser Strategie nicht möglich war.

4.1.3 Transplantation der transduzierten Vorläuferzellen

Es wurde entschieden, die kultivierten und transduzierten Vorläuferzellen der Spendermäuse ohne vorherige Selektion auf Expression durch beispielsweise eine FACS-Analyse mit Sortierfunktion zu transplantieren. Es wurde davon ausgegangen, dass die Zellen durch die Expression der jeweiligen Mutante einen Proliferationsvorteil erhalten und/oder ein transformierendes Ereignis erfahren, was zur Entwicklung einer Erkrankung führte. Diese Methodik wird dadurch bestätigt, dass auch Versuchstiere, welchen Zellen mit niedrigeren Transduktionsraten transplantiert wurden, eine Erkrankung des gleichen Phänotyps entwickelten. Ferner ist beschrieben, dass die Transduktionsrate nicht für den Krankheitsverlauf, aber vermutlich für die Latenzzeit entscheidend ist, wobei es zur Entstehung einer Erkrankung einer kritischen Anzahl transduzierter Zellen bedarf (Grundler et al., 2005). Aufgrund der z.T. niedrigeren Transduktionsraten und der für die Zellen belastenden Prozedur der Sortierung hätten dabei nur ein Teil der Zellen der Transplantation zugeführt werden können. Auf diese Weise wurde vermieden, mit einer größeren Anzahl an Spendermäusen arbeiten zu müssen, um nach einer Transduktion und Sortierung der Vorläuferzellen eine ausreichende Anzahl an Zellen für die Transplantation zur Verfügung zu haben.

Zur Überbrückung des Zeitraums zwischen der Bestrahlung und dem Anwachsen der transplantierten Vorläuferzellen sowie der vollständigen Wiederherstellung des Blutsystems wurden Milzzellen mit der Antigenvariante der Empfängermause transplantiert. Zwar enthält eine Milz nur wenige hämatopoetische Vorläuferzellen, die sich ebenfalls im Knochenmark ansiedeln können, aber gerade bestimmte Subtypen lymphoider Zellen sind besonders langlebig und können daher in der Empfängermaus verbleiben. Eine Problematik bei den Analysen ergab sich daraus allerdings nicht. Das Auftreten einer Wildtypbande bei den PCR-Analysen kann auf diese langlebigen Zellen, aber auch auf nach der Bestrahlung verbleibende Zellen der Empfängermaus zurückgeführt werden. Bei dieser Variante der Injektion von Milzzellen überwogen die Vorteile gegenüber der Transplantation von Knochenmarkzellen zur Unterstützung. Denn diese führen häufig zu einem sogenannten Überwachsen der transplantierten Vorläuferzellen, da die Knochenmarkzellen frisch entnommen sind und daher leichter anwachsen sowie proliferieren können.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass dieses Mausmodell sich für die Untersuchung des Zusammenwirkens von verschiedenen Mutanten mit Hinblick auf die Entstehung akuter Leukämien sowie weiterführender Analysen als geeignet erwies. Die Ergebnisse aus Mausversuchen lassen sich zwar nicht uneingeschränkt auf das humane System übertragen, aber die Verwendung muriner Modelle ermöglicht die zum Verständnis und zur Heilung hämatopoetischer Erkrankung notwendigen Studien.

4.2 Induktion einer T-Zellerkrankung durch FLT3-ITD bei gleichzeitiger Runx1-Expression

Bei der Expression von FLT3-ITD in den drei verschiedenen Typen von hämatopoetischen Vorläuferzellen (*Runx1^{fl/fl}*-/*Runx1^{wt/wt}*-/*Runx1^{fl/wt}*-*Mx1Cre*) kam es jeweils zum Auftreten einer T-Zellerkrankung ausgehend vom Thymus mit Infiltration der hämatopoetischen und peripheren Organe vermutlich über den Blut- und Lymphweg. In den Organen konnte eine autonome Proliferation der ausgewanderten T-lymphoiden Blasten erfolgen. Im Thymus war eine Selektion auf Runx1-exprimierende Zellen nachzuweisen, so dass ein Vorteil der Expression des Transkriptionsfaktors für die Entwicklung dieser Erkrankung gefolgert werden konnte. Diese monoklonale Erkrankung war unter Verwendung von Knochenmarkzellen retransplantierbar, wobei die Frequenz der unter Selbsterhalt repopulierenden Zellen als gering angesehen wurde.

Neben diesem Thymom konnte ferner bei einigen wenigen Versuchstieren eine B-Zellerkrankung verzeichnet werden, auf die an dieser Stelle nicht näher eingegangen wird.

Die Analysen des Thymoms ergaben, dass es zu einer Ansammlung unreifer T-Zellen im Thymus kam, die neben CD90.2 als allgemeinen T-Zellmarker CD4 und CD8 zeitgleich exprimierten, allerdings für CD3e negativ waren. Da CD3e eine akzessorische Kette des reifen TZR ist, war davon auszugehen, dass eine vollständige Ausbildung des TZR nicht erfolgte bzw. erfolgen konnte. Normalerweise werden T-Zellen, deren TZR-Signaltransduktion verändert ist, der Apoptose zugeführt. Der Schutz der Zellen vor dem programmierten Zelltod, die dadurch ermöglichte weiter bestehende Proliferation sowie die Blockierung der vollständigen Differenzierung scheinen im konstitutiv aktivierten Signal der Tyrosinkinase FLT3-ITD begründet zu sein. Die nachfolgende Abbildung 4.1 beinhaltet ein Modell zur Entstehung dieser vom Thymus ausgehenden T-Zellerkrankung, bei welcher es bei dem Übergang der Pro-T- in eine Prä-T-Zelle zu einer Blockierung der Reifung auf der Stufe der doppelt-positiven T-Zellen kam.

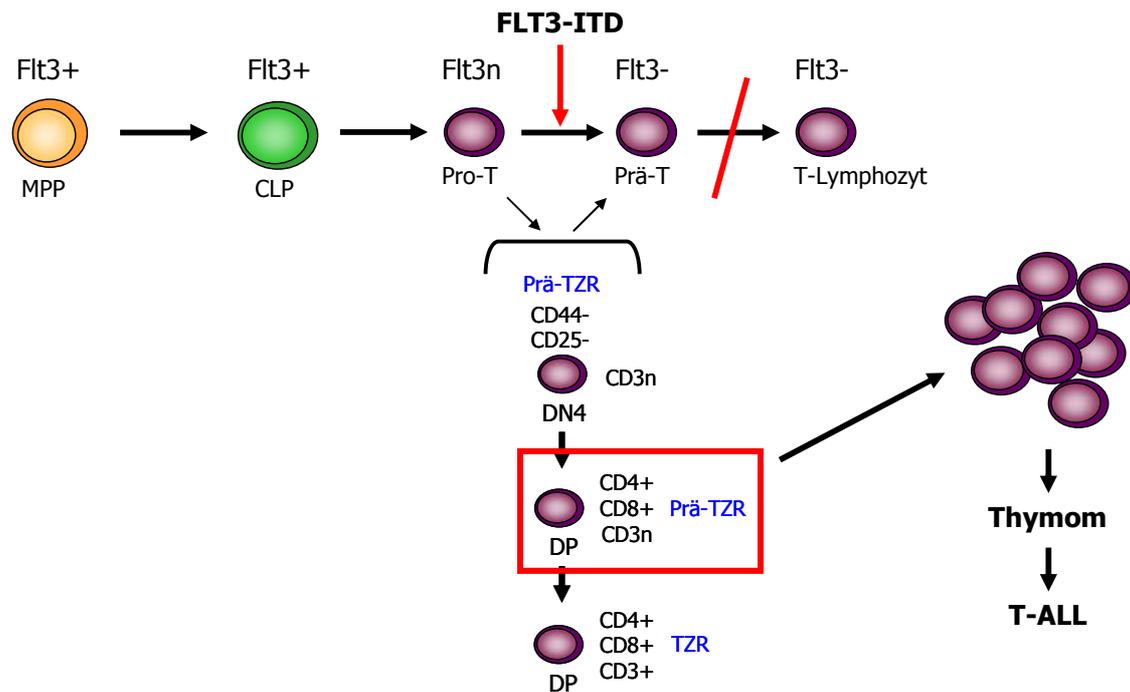


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung zur Entstehung des Thymoms

In diesem Modell ist die mögliche Entstehungsweise der beschriebenen T-Zellerkrankung erläutert. Die normale Expression von Flt3 auf den murinen Zellen ist ebenfalls dargestellt (D'Amico und Wu, 2003; Kikushige et al., 2008).

(n = niedrige Expression; DN = doppelt-negativ; DP = doppelt-positiv)

Die Begründung für den Vorteil der Expression des Transkriptionsfaktors Runx1 für die Entwicklung dieser T-Zellerkrankung lässt sich in dessen Bedeutung für die T-Zelldifferenzierung finden. So spielt Runx1 in der Ausbildung des TZR sowie bei der Regulation des Übergangs von doppelt-negativen zu doppelt-positiven T-Zellen eine wichtige Rolle. Ferner sind die funktionellen Domänen von Runx1 für die CD4-Repression notwendig (Egawa et al., 2007). Bei der Verwendung konditionaler *Knock-out*-Stämme wurde festgestellt, dass eine *Runx1*-Defizienz eine Blockierung der T-Zellreifung im Stadium der doppelt-negativen Zellen bedingt, wobei in Abhängigkeit vom vorliegenden Mausstamm unterschiedliche Übergänge (DN2-DN3 bzw. DN3-DN4) betroffen waren (Taniuchi et al., 2002; Ichikawa et al., 2004). Es liegt die Vermutung nahe, dass im Thymus eine Selektion auf Runx1-exprimierende Zellen stattgefunden hat, da eine *Runx1*-Inaktivierung einen Nachteil für die lymphoide Entwicklung darstellt und nur bei Expression des Transkriptionsfaktors ein Übergang von doppelt-negativen in doppelt-positive Zellen sowie eine weitere Differenzierung der T-Zellen möglich war. Allerdings ließ die Expression von FLT3-ITD eine vollständige Ausreifung der lymphoiden Zellen nicht zu. Es wurde beschrieben, dass bei einer Verwendung des *Mx1Cre*-Stammes die Exzision im Thymus geringer als im Knochenmark ist (Growney et al., 2005), wodurch die Selektion vermutlich noch begünstigt wurde. Weiterhin scheint in diesem Modell die Funktionalität nur eines *Runx1*-Allels nicht ausreichend zu

sein, da bei der Verwendung heterozygoter Vorläuferzellen ebenfalls eine Selektion auf eine vollständige Runx1-Expression (*Runx1^{fl/wt}-Mx1Cre*) erfolgte.

Es stellt sich allerdings die Frage, warum eine auf die *Runx1*-Defizienz zurückzuführende lymphoide Erkrankung nicht erfasst werden konnte, wie sie allein durch die *Runx1*-Inaktivierung (Putz et al., 2006) oder in Kombination mit einer ENU- (N-Ethyl-N-Nitrosourea) Behandlung zur Induktion weiterer Mutationen (Kundu et al., 2005) beschrieben ist. Bei der Analyse der Kontrolltiere konnte zwar die beschriebene Dosiswirkung von Runx1 bei der T-Zellentwicklung erfasst werden (Sun und Downing, 2004; Growney et al., 2005). So wiesen heterozygote und homozygote Tiere, in welchen eine *Runx1*-Inaktivierung stattfinden konnte, eine Reduktion der doppelt-positiven T-Zellen auf, wobei diese im Vergleich zu C57BL/6J-Kontrollen bei den homozygoten Tieren fast doppelt so stark war wie bei den heterozygoten. Aber es war keine krankhafte Expansion der doppelt-negativen (Putz et al., 2006) oder der doppelt- und CD3e-positiven T-Zellen (Kundu et al., 2005) bei gleichzeitiger *Runx1*-Inaktivierung zu verzeichnen. Dies könnte darauf zurückgeführt werden, dass nicht die Analyse *Runx1*-defizienter Mäuse erfolgte, sondern Zellen eines konditionalen *Knock-out*-Stammes transplantiert und anschließend die Empfängertiere analysiert wurden. Möglicherweise besitzen *Runx1*-defiziente T-Zellen aber auch einen Proliferationsnachteil und konnten daher in dem Mausmodell dieser Arbeit nicht zu einem Phänotyp führen.

Der genaue Mechanismus der Blockierung der T-Zellentwicklung durch die Expression von FLT3-ITD bei gleichzeitiger Expression von Runx1 konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht ermittelt werden. Dafür müssten weitere Analysen durchgeführt werden, die Aufschluss über das Vorhandensein und Funktionalität des Prä- sowie reifen TZR, über die Art der Beeinflussung der Zellreifung durch FLT3-ITD und die damit verbundene Signaltransduktion geben. Die Selektion auf Runx1-exprimierende lymphoide Zellen bei diesem Phänotyp eines Thymoms deutet an, dass die konstitutiv aktivierte Tyrosinkinase FLT3-ITD in Signalwege involviert ist, die Runx1-abhängig sind. Beispielsweise ist gezeigt, dass RUNX1 von ERK1 und ERK2 (*Extracellular signal-Related Kinases*) als Bestandteile des RAS/MAPK-Signalweges, in welchen auch FLT3 eingreift, in der Transaktivierungsdomäne phosphoryliert wird (Wang et al., 2009). Dabei erhöht die Phosphorylierung durch ERK2 die RUNX1-vermittelte Transaktivierung. Weiterhin scheint nicht nur FLT3, sondern auch RUNX1 in den PI3K-Signalweg eingebunden zu sein (Stirewalt und Radich, 2003; Edwards et al., 2009), so dass Zusammenhänge in der Signaltransduktion bezüglich beider Faktoren gefunden werden könnten.

Im Rahmen von vorherigen Knochenmarkstransplantationsversuchen (Kelly et al., 2002a,b; Grundler et al., 2005) sowie unter Verwendung von transgenen Mäusen (Lee

et al., 2005 und 2007; Li et al., 2008) wurde die Bedeutung von Mutationen wie FLT3-ITD untersucht. Sowohl bei der einen sowie auch der anderen Methodik wurden unterschiedliche Ergebnisse erzielt, wobei überwiegend myeloide Phänotypen, aber auch Lymphome beschrieben wurden. In einigen Studien führte die Expression von FLT3-ITD allein allerdings zu keiner Erkrankung, sondern zeigte erst in Kombination mit einer die Differenzierung betreffende Mutation der Klasse II einen Effekt (Ono et al., 2005; Schessl et al., 2005; Small, 2006; Kim et al., 2008; Stubbs et al., 2008). Daraus ergab sich die Annahme, dass FLT3-ITD für die Auslösung einer myeloproliferativen oder lymphoiden Erkrankung, nicht aber zu einer akuten Leukämie führt. Ferner spricht die z.T. lange Latenzzeit sowie die Oligoklonalität der in diesen Modellen auftretenden Erkrankungen dafür, dass neben FLT3-ITD noch weitere Mutationen, z.T. auch bedingt durch die retrovirale Integration, bei der Krankheitsentstehung eine Rolle spielen.

Die Expression von FLT3-ITD in Gegenwart von Runx1 in dem Mausmodell dieser Arbeit führte zur Entwicklung eines retransplantierbaren Thymoms mit einer Tendenz zur Progression in eine T-ALL. Die Monoklonalität der Erkrankung der untersuchten Mäuse, welche diese T-Zellerkrankung aufwiesen, ließ vermuten, dass ebenfalls kooperierende Mutationen auftraten, die näher untersucht werden könnten.

In Bezug auf die Verwendung von Mausmodellen kann zusammenfassend festgestellt werden, dass für das Auftreten eines Phänotyps neben den Versuchsbedingungen (Zeitpunkt der Knochenmarkentnahme nach 5-Fluorouracil-Behandlung, Serum- und Zytokinzusatz) und dem Expressionssystem für die jeweilige FLT3-Mutation der verwendete Mausstamm eine entscheidende Rolle spielt (Szymanska et al., 1999). So konnte bei der Verwendung von BALB/c-, nicht aber von C57BL/6-Tieren ein myeloproliferativer Phänotyp erfasst werden, dessen Entwicklung durch die funktionelle Veränderung des Tumorsuppressorgens *Cdkn2a* im BALB/c-Mausstamm begünstigt worden sein könnte (Zhang et al., 1998 und 2003; Kelly et al., 2002a; Grundler et al., 2005). Eine solche Varianz der Parameter in der Durchführung der Studien macht einen Vergleich schwierig. Konstatiert werden kann aber, dass FLT3-ITD sowohl in der Entwicklung einer myeloiden als auch einer lymphoiden Erkrankung involviert sein kann, aber allein für die Entwicklung einer leukämischen Symptomatik nicht ausreichend ist.

Dies spiegelt sich auch die Situation im Menschen wider, da Mutationen des *FLT3*-Gens eine der häufigsten somatischen Veränderungen in AML-Patienten sind, wobei ein Großteil auf FLT3-ITD-Mutationen entfallen. Allerdings zeigen auch ALL-Patienten diese Mutationen (Kelly und Gilliland, 2002; Gilliland et al., 2004; Litzow, 2005). Aktivierende FLT3-Mutationen werden häufig in pädiatrischen Patienten mit einer Prä-B-ALL gefunden, wobei eine Assoziation mit einer Hyperdiploidie und MLL-

Translokationen vorzuliegen scheint (Armstrong und Look, 2005; Armstrong et al., 2004; Paulsson et al., 2008; Taketani et al., 2004). Weiterhin wurde in ALL-Proben ohne FLT3-Mutationen eine durch Veränderungen der Genregulation erhöhte FLT3-Expression erfasst (Birg et al., 1992; Carow et al., 1996; Brown et al., 2005). Dies unterstreicht die Bedeutung von Mausmodellen in der Erforschung der Leukämogenese.

4.3 Auftreten einer beschleunigten Myeloproliferation bei der Kooperation von FLT3-ITD und einer *Runx1*-Defizienz

Der Transkriptionsfaktors RUNX1 nimmt in der adulten Hämatopoese eine wichtige, aber noch nicht vollständig erforschte Rolle ein. Verschiedene Studien unter Verwendung von konditionalen *Knock-out*-Modellen gaben Aufschluss über die Bedeutung von Runx1 in der Entwicklung der Reifungsreihen der Hämatopoese. In der myeloiden Differenzierung führte eine *Runx1*-Defizienz zur Verminderung der Thrombozyten sowie zur Ausbildung eines myeloproliferativen Phänotyps (Hayashi et al., 2000; Woolf et al., 2003; Ichikawa et al., 2004; Gowney et al., 2005; Putz et al., 2006). Charakterisiert wurde die Myeloproliferation durch eine Erhöhung der peripheren Neutrophilen sowie der myeloiden Vorläuferzellen und durch eine extramedulläre Hämatopoese in Milz und Leber (Gowney et al., 2005), die zu einer Splenomegalie sowie dem vermehrten Auftreten von Howell-Jolly-Körperchen als Merkmal für eine Fehlfunktion der Milz führen konnte (Putz et al., 2006).

Mit Hinblick auf diese Ergebnisse ist festzustellen, dass bei dem in dieser Arbeit verwendeten Knochenmarkstransplantationsmodell bei der Untersuchung der transplantierten Kontrollmäuse (*Runx1^{fl/fl}-Mx1Cre*) z.T. ähnliche Defekte der Reifung der Megakaryozyten und myeloiden Zellen erfasst werden konnten. Trotz des Abfalls an Thrombozyten im peripheren Blut kam es, wie zuvor beschrieben (Gowney et al., 2005), nicht zu Blutungserscheinungen, allerdings kann eine Verminderung der Lebenserwartung der Versuchstiere nicht ausgeschlossen werden. Die Störungen der Zelldifferenzierung traten unabhängig von einer pIpC-Injektion aufgrund der zuvor beschriebenen Problematik des verwendeten *Mx1Cre*-Stammes auf. Veränderungen des Stammzell- und Vorläuferkompartiments in den Kontrollmäusen wurde nicht analysiert. Entscheidend für die durchgeführten Versuche war die Tatsache, dass der Phänotyp der *Runx1*-Defizienz bei der Untersuchung der Entwicklung einer akuten Leukämie durch das Zusammenwirken mit einer aktivierten Tyrosinkinase ausgenutzt werden sollte, aber die Mäuse nicht an einer Myeloproliferation oder einem MDS erkrankten, welches allein auf die Inaktivierung von *Runx1* zurückzuführen war.

Zusätzlich zu den bisherigen Studien bezüglich heterozygoter Tiere konnten im Rahmen dieser Arbeit neben der Verminderung an Thrombozyten im peripheren Blut

eine Erhöhung der Lymphozyten auf Kosten der Neutrophilen erfasst werden. Dies könnte durch die Dosis-abhängigen Runx1-Effekte erklärt werden (Sun und Downing, 2004) oder darauf zurückzuführen sein, dass es sich hierbei um einen Knochenmarks-transplantationsversuch und nicht die direkte Untersuchung heterozygoter Mäuse handelte.

Die Expression von FLT3-ITD in hämatopoetischen Vorläuferzellen des Typs *Runx1^{fl/fl}-Mx1Cre* führte in drei transplantierten Versuchstieren zu der Entwicklung einer beschleunigten Myeloproliferation. In keinem der Tiere konnten Leukämie-ähnliche Symptome verzeichnet werden. Die durchgeführten PCR-Analysen bestätigten, dass bei den erkrankten Mäusen eine partielle *Runx1*-Inaktivierung in den hämatopoetischen Organen vorlag. Interessanterweise handelte es sich bei allen drei Mäusen um solche Tiere, die nicht mit pIpC behandelt wurden. Dabei stellt sich die Frage, warum nicht auch bei pIpC-behandelten Tieren ein myeloproliferativer Phänotyp auftrat. Spekulativ könnte eine Erklärung in der durch die pIpC-Injektion ausgelöste und gegen die transformierten Zellen gerichtete Immunantwort oder in einer Inhibition der FLT3-ITD-vermittelten Proliferation durch Interferon gefunden werden.

Das Auftreten einer Störung des myeloiden Kompartiments war nicht bei Tieren festzustellen, welche FLT3-ITD-exprimierende Zellen mit einer Wildtypexpression von *Runx1* erhalten haben. Dies lässt die Annahme zu, dass in diesem Mausmodell FLT3-ITD allein nicht zu einer Myeloproliferation führt, sondern erst die Kombination mit einer *Runx1*-Defizienz dies ermöglichte, wobei der kooperierende Effekt beider Mutationen nicht für die Entwicklung einer Leukämie ausreichend war. Dieser Effekt der *Runx1*-Inaktivierung und der FLT3-ITD-Expression ist in der nachfolgenden Abbildung 4.2 anhand eines schematischen Überblicks zur Entstehung des Krankheitsbild der beschleunigten Myeloproliferation in diesem Mausmodell dargestellt, die durch eine gesteigerte Myelopoese mit einer leichten Linksverschiebung gekennzeichnet war.

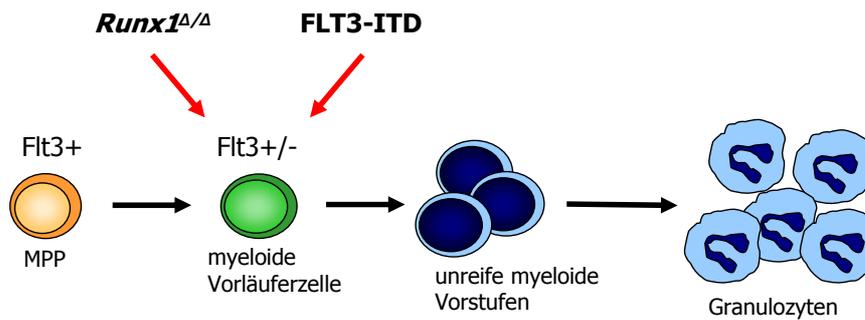


Abbildung 4.2: Schema zur Entstehung einer beschleunigten Myeloproliferation

Dieser Überblick zeigt, dass es in diesem Mausmodell durch die *Runx1*-Defizienz und die Expression von FLT3-ITD zu einer Steigerung der Myelopoese kam. Aufgeführt ist ferner die normale Expression von Flt3 auf den murinen Zellen (D'Amico und Wu, 2003; Kikushige et al., 2008).

Bei der Verwendung von heterozygoten hämatopoetischen Vorläuferzellen (*Runx1*^{fl/wt}-*Mx1Cre*) zeigte sich interessanterweise, dass in diesem Knochenmarkhintergrund die Expression von FLT3-ITD bei gleichzeitiger Inaktivierung von *Runx1* auf nur einem Allel zu einer monozytären Neoplasie führte. Dieser Phänotyp ähnelte sehr stark dem in Abschnitt 4.4 diskutierten Krankheitsbild der myeloiden Neoplasie. Allerdings trat diese Erkrankung nur bei einem Versuchstier auf, die übrigen Mäuse erkrankten aufgrund einer lymphoiden Störung der Differenzierung. Daher wären weitere Versuche zur Bestätigung dieses Phänotyps erforderlich.

4.4 Entwicklung einer myeloiden Neoplasie durch eine synergistische Wirkung von FLT3-ITD, RUNX1-DBM und *Runx1*-Defizienz

Während die alleinige Expression von FLT3-ITD in *Runx1*-defizienten Zellen den Phänotyp einer beschleunigten Myeloproliferation bedingte, führte die gleichzeitige Expression der aktivierten Tyrosinkinase und einer RUNX1-DBM bei einer *Runx1*-Inaktivierung zu der Entwicklung einer myeloiden Neoplasie *in vivo*. Hierbei war eine kürzere Latenzzeit bei pIpC-behandelten Tieren von durchschnittlich 87 Tagen im Gegensatz zu 117 Tagen ohne Behandlung festzustellen, so dass eine Förderung der Progression durch die *Runx1*-Defizienz angenommen werden konnte. Die Versuchsmäuse zeigten eine Leukämie-ähnliche Symptomatik, welche durch das Auftreten aller Reifungsstufen der myeloiden Reihe und einen erhöhten Blastenanteil gekennzeichnet war. Ausgehend vom Knochenmark waren neben den hämatopoetischen auch die peripheren Organe, abhängig von dem Grad der Erkrankung, involviert. Die Entstehungsweise der Erkrankung ist in der nachfolgenden Abbildung 4.3 schematisch dargestellt.

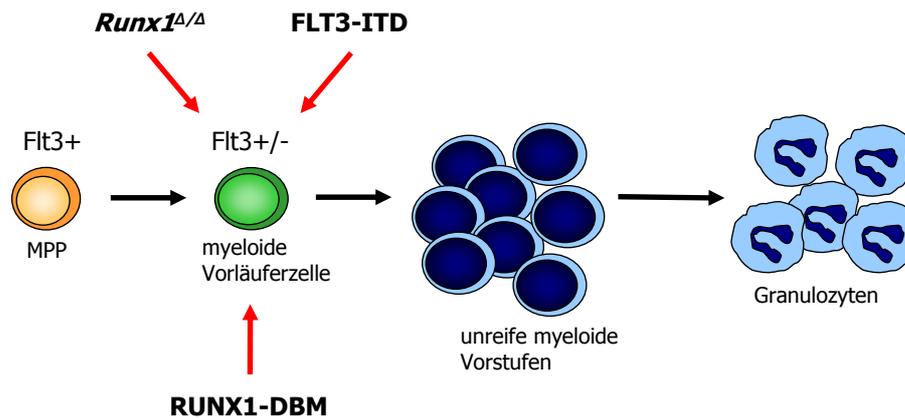


Abbildung 4.3: Schema zur Entstehung einer myeloiden Neoplasie

Durch das Zusammenwirken der konstitutiv aktivierten Tyrosinkinase FLT3-ITD, der RUNX1-DBM und *Runx1*-Defizienz erfolgte in den Empfängertiere die Ausbildung einer myeloiden Neoplasie, die durch eine massive Ansammlung unreifer myeloider Zellen gekennzeichnet war. Der Blastenanteil lag in Abhängigkeit von der Krankheitsausprägung über oder unter 20%. Die normale Flt3-Expression der murinen Zellen ist ebenfalls vermerkt (D'Amico und Wu, 2003; Kikushige et al., 2008).

Nur in Kombination aller drei Mutationen entstand der Phänotyp einer myeloiden Neoplasie, wohingegen eine Expression von FLT3-ITD und RUNX1-DBM in Zellen mit einer *Runx1*-Wildtypexpression nur zur Entwicklung lymphoider Erkrankungen führte. Das Erscheinungsbild des Thymoms in diesem Versuch entsprach dem unter Abschnitt 4.2 dargestellten Phänotyp, wobei interessanterweise in den hämatopoetischen Organen der erkrankten Tiere eine *Runx1*-Defizienz nachzuweisen war. Die Ergebnisse der Mausversuche sprechen dafür, dass es bei der Expression von FLT3-ITD in Kombination mit der RUNX1-DBM in hämatopoetischen Zellen entweder zur Entwicklung einer myeloiden Neoplasie oder eines Thymoms kommen konnte, wobei die Progression der jeweiligen Erkrankung entscheidend zu sein schien. Während sich für die Entwicklung der T-Zellerkrankung die Expression von *Runx1* als vorteilhaft erwies, kam es bei der myeloiden Neoplasie zu einer Selektion auf Zellen, in denen *Runx1* inaktiviert war.

Allerdings sollte bei dieser Beschreibung der myeloiden Neoplasie die zuvor erwähnte monozytäre Erkrankung nicht außer Acht gelassen werden, die durch eine FLT3-ITD-Expression im heterozygoten *Runx1*-Hintergrund induziert wurde (siehe Abschnitt 4.3). Da der jeweilige Phänotyp große Ähnlichkeiten auswies, könnte vermutet werden, dass sich hier ein Dosis-abhängiger, aber DNA-Bindungs-unabhängiger Effekt von *Runx1* zeigte, auf den im nachfolgenden Abschnitt 4.5 näher eingegangen werden soll. Allerdings wären auch spontane Mutationen in kooperierenden Genen eine weitere Erklärungsmöglichkeit für das Auftreten der monozytären Neoplasie *in vivo*.

Nähere Analysen der myeloiden Neoplasie ergaben, dass es sich hierbei um eine vorwiegend monoklonale Erkrankung mit mehreren Integrationsstellen handelte. Die

Bestimmung der Integrationsstellen in den murinen Zellen erfolgte mittels einer LM-PCR (*Ligation-Mediated PCR*), welche nicht im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass die provirale DNA von LTR flankiert wird, an die Oligonukleotide binden können, so dass eine Amplifikation und Sequenzierung dieser genomischen DNA möglich ist. So kann festgestellt werden, wo sich die retrovirale Integration befindet und ob es sich dabei um eine CIS (*Common Integration Site*) handelt. Eine CIS ist ein Genlocus, von dem die provirale Integration von zwei oder mehreren voneinander unabhängigen Tumoren beschrieben ist (Uren et al., 2005). Bei einer großen Anzahl an Integrationsstellen im Genom ist die Wahrscheinlichkeit eher gering, dass zwei Integrationsstellen zufällig den gleichen Genlocus betreffen und in voneinander unabhängigen Tumoren zu finden sind. So wird angenommen, dass die Integrationsstellen durch ihren Einfluss auf die Genexpression einen selektiven Vorteil für die betroffenen Zellen haben können und somit zur Expansion eines leukämischen Klons beitragen. Bei der Untersuchung der vorhandenen Integrationsstellen konnte keine Genorte verzeichnet werden, die auf einen kooperierenden Effekt mit der Expression von FLT3-ITD und der RUNX1-DBM hinwiesen. Weiterhin konnte keine Integration in *Evi1* nachgewiesen werden, welche bei einer anderen *in vivo*-Studie maßgeblich zu der Entstehung des Phänotyps eines MDS mit einer Progression zur AML beigetragen hat (Watanabe-Okochi et al., 2008). Weiterhin war es möglich, die myeloide Neoplasie in subletal bestrahlte Empfängertiere zu transplantieren, wobei allerdings nur bei einer Maus die Bestätigung des Phänotyps gelang. Bei den übrigen Tieren kam es vermutlich zu einer Differenzierung und Ausreifung der transplantierten Zellen, so dass diese nicht mehr nachweisbar waren. Diese Annahme bestätigend zeigten auch die Untersuchung des Proliferationsvermögens unter Selbsterhalt durch Methylcelluloseklonierungen, dass es zu einer Ausreifung der neoplastischen Zellen *in vitro* kam, so dass bei Beendigung der Replattierungsversuche nur Granulozyten und Makrophagen als terminal differenzierte Zellen erfasst werden konnten. Dies deutet an, dass die myeloiden Vorläuferzellen der erkrankten Mäuse zumindest unter Kulturbedingungen und nach Retransplantation nur eine geringe Kapazität zur Proliferation und Selbsterneuerung besaßen.

Während das Zusammenwirken von FLT3-ITD und Mutationen von Transkriptionsfaktoren wie beispielweise PML-RAR α und CBF β -SMMHC schon *in vivo* untersucht wurden (Kelly et al., 2002b; Kim et al., 2008), erfolgte bisher noch keine Analyse der kooperierenden Effekte einer aktivierten Tyrosinkinase mit einer RUNX1-DBM. Dies stellt daher eine erste Studie diesbezüglich dar. Zusammenfassend zu dem Erscheinungsbild der myeloiden Neoplasie ist zu sagen, dass es durch den Einfluss der RUNX1-DBM bei einer gleichzeitigen Selektion auf *Runx1*-defiziente Zellen und einem

bestehenden Signal durch die konstitutiv aktivierte Tyrosinkinase FLT3-ITD zu der Entwicklung der myeloiden Neoplasie als eine Leukämie-ähnliche Erkrankung kam. In der nachfolgenden Abbildung 4.4 sind die Ergebnisse der in dem Mausmodell dieser Arbeit auftretenden lymphoiden und myeloiden Erkrankungen unter Verwendung von homozygoten hämatopoetischen Vorläuferzellen zusammengefasst dargestellt.

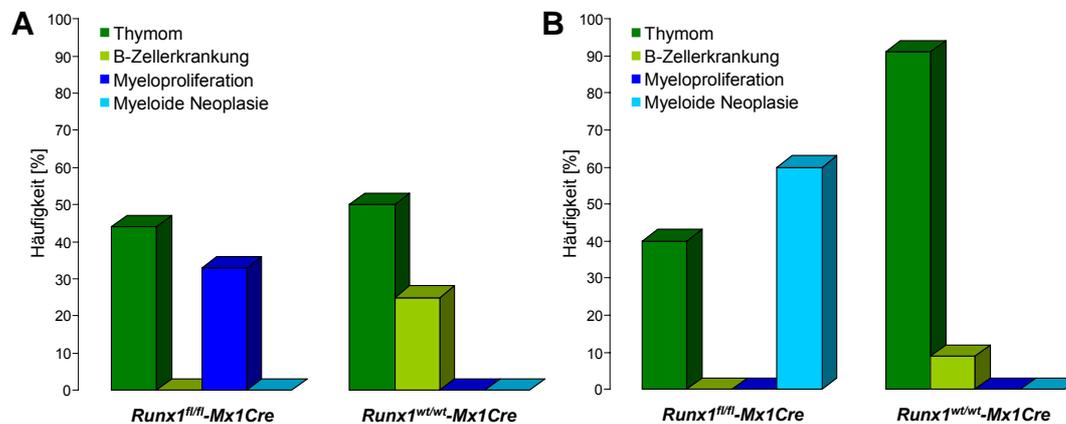


Abbildung 4.4: Zusammenfassung der Erkrankungen in diesem Mausmodell

Bei der Verwendung homozygoter hämatopoetischer Vorläuferzellen (*Runx1^{fl/fl}-Mx1Cre* und *Runx1^{wt/wt}-Mx1Cre*) konnten durch die alleinige Expression von FLT3-ITD (Graphik A) und in Kombination mit der RUNX1-DBM (Graphik B) lymphoide und myeloide Erkrankungen induziert werden.

Eine Runx1-Wildtypexpression begünstigte sowohl bei der alleinigen Expression von FLT3-ITD (Graphik A) als auch bei der kombinierten mit der RUNX1-DBM (Graphik B) das Auftreten von Erkrankungen des lymphoiden Kompartiments. Wohingegen es im *Runx1*-defizienten Knochenmarkhintergrund zur Entwicklung myeloider Erkrankungen kam. Die zusätzliche Expression der RUNX1-DBM induzierte dabei die Verschiebung des myeloiden Phänotyps von einer beschleunigten Myeloproliferation hin zu einem Leukämie-ähnlichen Erkrankung. Allerdings konnte nicht das Auftreten eines Subtyps AML-M0, d.h. das Auftreten nur minimaler Differenzierungszeichen, wie in AML-Patienten verzeichnet werden, da es den transformierten Zellen *in vivo* als auch *in vitro* möglich war partiell auszureifen. Dies ist vermutlich auf die unterschiedlichen Bedingungen im murinen System, wie die retrovirale Integration sowie Unterschiede in der Genexpression oder die Notwendigkeit von weiteren kooperierenden Mutationen zurückzuführen (Schwieger et al., 2004; Cattoglio et al., 2007).

4.5 Bedeutung von RUNX1-Mutationen und RUNX1-DNA-Bindungsmutanten in akuten Leukämien

In der Einleitung (siehe Abschnitt 1.3.2.4) wurde bereits dargelegt, dass *RUNX1* nicht nur in Fällen von *de novo*-AML des Subtyps M0, sondern auch in MDS- und FPD/AML-Patienten mit einer deutlichen Frequenz mutiert ist. Diese Mutationen sind vorwiegend in der Runt-Homologiedomäne lokalisiert und bedingen einen Aminosäureaustausch, welcher zu einem Funktionsdefekt des Transkriptionsfaktors führt. Dabei ist häufig die DNA-Bindungs Kapazität, aber nicht die Heterodimerisierung mit CBF β betroffen. Bezüglich dieser RUNX1-DBM wird vermutet, dass aufgrund der gestörten DNA-Bindung, aber der noch vorhandenen Interaktion mit CBF β die Stabilität dieses Komplexes erhöht und die Affinität der RUNX1-DBM verstärkt ist. Diese antagonisierende Wirkung gegenüber dem Runx1-Wildtypprotein wurde durch die nachgewiesene Inhibition der Transkriptionsaktivität der Wildtypform von Runx1 bestätigt (Osato et al., 1999; Imai et al., 2000; Tahirov et al., 2001; Michaud et al., 2002). Allerdings wurde mittlerweile gezeigt, dass einige Mutationen (R135G, R80C, A107P und D171Y) nicht nur die DNA-Bindungs-fähigkeit minimieren, sondern auch die CBF β -Bindung zu beeinflussen scheinen. Hingegen ist bei anderen Mutationen (K83N, K83E, G138D, R139Q, R174Q, R177Q) nur die Bindung an die DNA betroffen (Matheny et al., 2007). Obwohl festgestellt wurde, dass eine nicht-DNA-gebundene Runt-Domäne eine niedrigere Affinität, CBF β zu binden, als eine DNA-gebundene Runt-Domäne aufweist (Tang et al., 2000), konnte dies für einen Teil der Mutationen nicht erfasst werden. Der Mutation R139G wurde z.B. neben der dominant-negativen Wirkung eine erhöhte Bindung von CBF β bei fehlender DNA-Bindung nachgewiesen (Imai et al., 2000).

Bei *in vivo*-Versuchen zur Untersuchung der Effekte der RUNX1-DBM wurden unterschiedliche Ergebnisse erzielt, was eine größere Komplexität der RUNX1-Mutationen und ihrer Auswirkung andeutet. Bezüglich der in dieser Arbeit verwendeten RUNX1-DBM mit der Punktmutation R135G, bei welcher ein DNA-kontaktierender Aminosäurerest der Runt-Domäne betroffen ist, konnte in einer vorherigen *in vivo*-Studie unter Verwendung von C57BL/6-Tieren der Nachweis einer möglichen antagonisierenden Wirkung der Mutante nicht erbracht werden. Allerdings wurden eine Beeinflussung des erythroiden Kompartiments, in welchem Runx1 normalerweise herunterreguliert ist, und eine erhöhte Replattierungskapazität, gekennzeichnet durch das Auftreten von Myeloblasten und dysplastischen Vorläuferzellen, festgestellt. Dabei schien letzteres von einer Interaktion mit CBF β unabhängig zu sein (Cammenga et al., 2007). Bei der Analyse des Einflusses der verwendeten RUNX1-DBM auf die Myelopoese *in vivo* im Rahmen dieser Arbeit konnten keine Auffälligkeiten erfasst werden. Die RUNX1-Mutante zeigte sowohl bei gleichzeitiger Expression von Runx1 als

auch bei einem Fehlen dieses Transkriptionsfaktors keinen Einfluss auf die Myelopoese sowie der anderen hämatopoetischen Linien *in vivo*. Daher konnten keine dominant-negative Effekte der Bindungsmutante gegenüber der Runx1-Wildtypform bei der Differenzierung myeloider Zellen nachgewiesen werden. Kooperierende Effekte zwischen der Expression einer RUNX1-DBM und der *Runx1*-Inaktivierung waren ebenfalls nicht zu verzeichnen.

Bei der Untersuchung der Mutation R174Q in heterozygoten transgenen Mäusen, welche wiederum einen DNA-kontaktierenden Aminosäurerest betrifft, konnte nur eine schwach dominant-negative Wirkung der Mutante erfasst werden (Matheny et al., 2007). In einem anderen Knochenmarkstransplantationsversuch kam es hingegen aufgrund der Expression von RUNX1-Mutanten zur Entwicklung einer MDS- und MDS/AML-ähnlichen Symptomatik innerhalb von 4-13 Monaten. Nachweislich kooperierte die Integrationsstelle *Evi1* mit der RUNX1-DBM D171N bei der Entstehung des Phänotyps eines MDS/AML. Eine C-terminal verkürzte Mutationsform (S291fsX300) induzierte in diesem *in vivo*-Modell eine Panzytopenie mit einer erythroiden Dysplasie und Progression zum MDS und MDS/AML (Watanabe-Okochi et al., 2008). Die Expression der RUNX1-Mutaten D171N und S291fsX300 in humanen CD34-positiven Zellen führten zu einem für die jeweilige Mutante charakteristischen, in Patienten beschriebene MDS/AML-Phänotyp. Dabei blockierte die S291fsX300-Mutante die Zelldifferenzierung in den humanen Zellen, erhöhte aber zeitgleich die Proliferation und Selbsterneuerungskapazität, wodurch den Zellen ein leukämisches Potential zuteil wurde. Währenddessen führte die Expression der D171N-Mutante zwar auch zur Blockierung der Differenzierung und einer leichten Erhöhung der Selbsterneuerungskapazität, aber inhibierte die Proliferation der Zellen, so dass hierbei eine zweite Mutation zur AML-Entwicklung erforderlich zu sein schien (Ding et al., 2009; Harada und Harada, 2009).

Die Unterschiede dieser Ergebnisse können vermutlich durch die experimentellen Bedingungen des jeweiligen Systems (Transplantations- oder transgenes Modell, Mausstamm, Art der Anreicherung der hämatopoetischen Vorläuferzellen, Serum- und Zytokinzusatz) erklärt werden. Allerdings scheinen die Ergebnisse bezüglich der Mutanten R135G und D171N nicht nur darin begründet zu sein, da unter ähnlichen Bedingungen (C57BL/6-Tiere, retrovirale Vektoren, ausreichend hohe Transduktionsraten) gearbeitet wurde. Zum einen könnten daher kooperierende Mutationen sich für das Auftreten eines Phänotyps als entscheidend erwiesen haben, zum anderen kann aber auch die Art der RUNX1-Mutation von Bedeutung sein. So wurde schon zuvor erwähnt, dass in der Runx-Homologiedomäne gelegenen Mutationen nicht nur die DNA-Bindungskapazität, sondern auch die Heterodimerisierung mit CBF β beeinflussen können. Zwar konnten bisher keine Punktmutationen, welche allein die CBF β -Bindung

verändern, in hämatologischen Erkrankungen nachgewiesen werden (Matheny et al., 2007), aber die Rolle von CBF β bleibt kontrovers diskutiert. So wurde einerseits eine Interaktion von CBF β und RUNX1-ETO als nicht notwendig beschrieben (Kwok et al., 2009), andererseits wurde diesem Faktor eine entscheidende Bedeutung bei der Wirkung der Fusionsproteine RUNX1-ETO und ETV6-RUNX1 nachgesagt (Roudaia et al., 2009). Möglicherweise ist die Interaktion mit der β -Untereinheit des CBF-Komplexes auch bei der Wirkung bestimmter RUNX1-DBM wichtig.

Die dominant-negativen Effekte der RUNX1-DBM beruhen theoretisch darauf, dass diese eine erhöhte Affinität gegenüber CBF β aufweisen oder aufgrund einer erhöhten Proteinstabilität (normalerweise CBF β -vermittelt) oder Transkription/Translation in größerer Menge zur Verfügung stehen (Osato et al., 1999; Imai et al., 2000; Huang et al., 2001; Michaud et al., 2002). Eine negative Beeinflussung der CBF β -Bindung, wie es bei R135G der Fall ist, spricht daher dafür, dass hierbei nicht unbedingt eine antagonisierende Wirkung der Mutante vorliegt. Dies geht einher mit den Ergebnissen der *in vivo*-Studien.

Schon zuvor wurde die Hypothese aufgestellt, dass RUNX1-DBM ein Funktionsgewinn zuteil wird, da sie aufgrund der Mutation in der Lage sind, nur noch bestimmte RUNX1-Funktionen wahrnehmen zu können (Cammenga et al., 2007). So ist in diesen Mutanten die Tumorsuppressoraktivität inaktiviert, während ein onkogenes Potential durch den Verlust DNA-Bindungs-abhängiger, aber unter Beibehaltung DNA-Bindungs-unabhängiger Funktionen, wie z.B. die Wechselwirkung mit hämatopoetischen Transkriptionsfaktoren (PU.1, c-Jun, GATA1) (Westendorf et al., 1998; Petrovick et al., 1998; Hess et al., 2001; Elagib et al., 2003), vermittelt wird. Ferner könnte die Interaktion von Proteinen in den Aktivierungs- und Repressordomänen von RUNX1 von Bedeutung sein (Bruhn et al., 1997; Levanon et al., 1998; Yagi et al., 1999). Die Tatsache, dass in FPD/AML-Familien mit einer vermeintlich dominant-negativen RUNX1-DBM eine leukämische Erkrankung mit einer deutlich höheren Frequenz auftritt als bei Familien mit einer kompletten Deletion von RUNX1, deutet ebenfalls einen Funktionsgewinn dieser Mutanten an (Osato, 2004). Weiterhin wird die Hypothese des Funktionsgewinns der RUNX1-Mutanten durch Erkenntnisse in Hinblick auf Fusionsproteine, in welchen die CBF-Komponenten involviert sind, unterstützt. So scheint bei CBF β -SMMHC und RUNX1-ETO nicht (nur) der dominant-negative Effekt gegenüber der RUNX1-Wildtypform die entscheidende Rolle bei der onkogenen Aktivität zu spielen, sondern der Gewinn zusätzlicher Funktionen (Hyde und Liu, 2010).

Die Induktion einer Neoplasie in diesem Mausmodell, einerseits bei der Expression von FLT3-ITD im heterozygoten *Runx1*-defizienten Knochenmarkhintergrund (*Runx1* ^{Δ /wt}-*Mx1Cre*) und andererseits bei der Kombination aus FLT3-ITD, RUNX1-DBM und einer

Selektion auf *Runx1*-defiziente Zellen (*Runx1^{Δ/Δ}-Mx1Cre*), deutet an, dass für die Entwicklung dieser Erkrankung bestimmte, vermutlich DNA-Bindungs-unabhängige *Runx1*-Funktionen von entscheidender Bedeutung sind. Dabei könnten ferner Dosis-abhängige Effekte von *Runx1* involviert sein. Die Frage nach dem anscheinend komplexen, molekularen Mechanismus der Aktivität der *RUNX1*-DBM bleibt jedoch ebenso wie jene nach der Bedeutung der Haploinsuffizienz und damit verbundener Dosis-effekte durch *RUNX1* bei der Leukämogenese weiter ungeklärt.

4.6 Wie passen die Ergebnisse dieser Arbeit in das vorgestellte Modell zur Leukämieentstehung?

Schon früh wurde ein Modell zur Kanzerogenese postuliert, welches besagte, dass Krebs aufgrund von zwei Mutationen entsteht, wobei die erste in der Keimbahn oder somatisch vorliegt, die zweite hingegen immer somatisch ist (Knudson et al., 1975). Diese Hypothese wurde im Laufe der Zeit weiterentwickelt, so dass ein einfaches Modell der Leukämieentstehung beschrieben werden konnte, welches in Abschnitt 1.3.2 erläutert wurde. Dabei spielen zwei Klassen von Mutationen eine Rolle. Durch Mutationen der Klasse II, welche die Differenzierung hämatopoetischer Zellen beeinflussen, ist eine Ansammlung von unreifen Zellen bedingt, die nicht vollständig ausreifen können. Mutationen der Klasse I vermitteln einer Zelle, die Fähigkeit zur Proliferation und Selbsterneuerung sowie einen Schutz vor Apoptose. Bisher durchgeführte Studien deuten an, dass das Auftreten einer Mutation allein nicht ausreicht, um eine Leukämie zu induzieren (Land et al., 1983; Kahn et al., 1986; Dash und Gilliland, 2001; Gilliland und Tallman, 2002).

Diese Kooperativität der zwei Klassen an Mutationen wurde beispielsweise durch eine Patientenstudie bestätigt, bei der ein MDS-Patient mit normalen Karyotyp zum Zeitpunkt der Diagnose untersucht wurde, welcher nach sechs Monaten eine AML entwickelte. Zum Zeitpunkt der Transformation wurde ein Nachweis von *AML1*-*ETO* sowie des Auswachsens eines *FLT3*-*ITD*-positiven Klons erbracht (Pinheiro et al., 2006). Ebenso zeigten zwei direkt verwandte Patienten mit einer heterozygoten Keimbahnmutation von *RUNX1* (*RUNX1*-Arg174X) bei der Diagnose zwar den gleichen Phänotyp eines MDS, aber aufgrund von unterschiedlichen sekundären Mutationen einen anderen klinischen Verlauf (Ripperger et al., 2009). Weiterhin konnten in einer Studie zur Analyse kooperierender Mutationen der Klasse I und II in *de novo*-AML-Patienten Mutationen von *FLT3*, *c-KIT*, *N-RAS*, *C/EBP α* , *RUNX1*, *MLL*, *NPM1* und *TP53* in 144 Patienten erfasst werden. 103 der 165 identifizierten Mutationen kamen mit weiteren Mutationen kombiniert vor, wobei vorwiegend Überlappungen von Mutationen der Klasse I und II gefunden wurden. Dabei wiesen die Patienten vorwiegend nur eine Mutation einer Klasse auf. Zwei Mutationen innerhalb einer Klasse scheinen ein eher

seltenes Ereignis zu sein und beruhen vermutlich auf der Anhäufung von Mutationen im Verlauf einer Leukämie nach dem gemeinsamen Auftreten einer Mutation der Klasse I sowie einer der Klasse II (Ishikawa et al., 2009).

Mutationen der Rezeptortyrosinkinase FLT3 sind in AML-M0-Patienten mit einer Inzidenz von bis zu 65% mit *RUNX1*-Mutationen assoziiert (Matsuno et al., 2003; Silva et al., 2009; Tang et al., 2009). Dabei entfallen 45% auf FLT3-ITD- und 20% auf FLT3-TKD-Mutationen (Tang et al., 2009). In einer weiteren Studie wurde eine Assoziation von *RUNX1*-Mutationen mit dem Auftreten einer Trisomie 13 in AML-M0-Patienten zu 88% gezeigt, wodurch eine gegenüber den Kontrollen vierfach erhöhte FLT3-Expression bedingt war (Silva et al., 2007). Diese Ergebnisse deuten an, dass das kombinierte Auftreten von Mutationen von *RUNX1* und eine verstärkte Aktivierung von FLT3 für die Entstehung einer Leukämie verantwortlich sein könnten, so wie es durch das erwähnte einfache Modell beschrieben wird.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit konnte in anderen Studien unter Verwendung von Knochenmarkstransplantationsversuchen die Hypothese dahingehend bestätigt werden, dass beispielsweise bei einer alleinigen Expression von FLT3-ITD als eine Mutation der Klasse I keine Erkrankung hervorgerufen werden konnte, die Kombination mit einer Mutation der Klasse II wie *RUNX1-ETO* oder *CBF β -SMMHC* zu der Entwicklung eines Leukämie-ähnlichen Phänotyps führte (Schessl et al., 2005; Kim et al., 2008).

Allerdings handelt es sich bei diesem Modell zur Leukämieentstehung um eine vereinfachte Darstellung der Gegebenheiten. Einer strengen Einordnung von FLT3- und *RUNX1*-Mutationen in nur eine Klasse von Mutationen widersprechen die nachfolgend aufgeführten Aspekte. Zwar führte die Expression von FLT3-ITD in 32D- und Ba/F3-Zellen zur Vermittlung eines ein Proliferations- und Überlebensvorteil in Form von Wachstumsfaktor-unabhängigen Wachstum und erhöhte in humanen CD34-positiven Zellen die Proliferationsfähigkeit sowie auch die Selbsterneuerungskapazität *in vitro* (Hayakawa et al., 2000; Mizuki et al., 2000; Chung et al., 2005), was beides einer Mutation der Klasse I entspricht. Allerdings spielt FLT3 nicht nur in der Proliferation und Apoptose hämatopoetischer Zellen eine Rolle, sondern ist auch in die Differenzierung von myeloiden und lymphoiden Zellen eingebunden, so dass FLT3-Mutationen diese miteinander verknüpften Vorgänge stören (Kiyoi et al., 1998; Hayakawa et al., 2000; Mizuki et al., 2000; Zheng et al., 2002; Stirewalt und Radich, 2003). So zeigten *Flt3*-defiziente Mäuse, ebenso wie Versuchstiere, denen der *Flt3*-Ligand fehlte, eine reduzierte Anzahl an NK- und dendritischen Zellen sowie eine Verminderung B-Vorläuferzellen (Mackaretschian et al., 1995; McKenna et al., 2000; Small, 2006). Vermutlich ist eine einzelne Mutation nicht in der Lage, einen kompletten Signalweg, wie beispielsweise den RAS/MAPK- oder PI3K-Signalweg, zu

verändern, aber eventuell spielen Dosierungseffekte eine entscheidende Rolle (Stirewalt und Radich, 2003). Eine Wechselwirkung von FLT3-Mutationen mit Transkriptionsfaktoren, welche in der Differenzierung der hämatopoetischen Zellen von Bedeutung sind, wurde für C/EBP α und PU.1 beschrieben. Zum einen reguliert FLT3-ITD die Expression dieser Faktoren herunter, zum anderen erhöht es aufgrund einer Phosphorylierung von Serin 21 von C/EBP α die Proteininaktivierung (Mizuki et al., 2003; Zheng et al., 2004; Radomska et al., 2006). Außerdem gelang es, durch die Expression der aktivierten Tyrosinkinase FLT3-ITD im C57BL/6J-Modell eine ALL mit einer Blockierung der Differenzierung auf der Stufe der frühen Prä-B-Zellen zu induzieren, wobei vermutlich sekundäre Mutationen eine wichtige Rolle gespielt haben (B. Niebuhr). Ebenso weisen die Ergebnisse dieser Arbeit in Bezug auf die Entwicklung einer monoklonalen, retransplantierbaren T-Zellerkrankung, welche bei einem hohen Ausprägungsgrad in eine T-ALL mit einer autonomen Proliferation der Blasten in Knochenmark und Milz übergehen konnte, darauf hin, dass es nicht auszuschließen ist, dass durch eine FLT3-ITD-Expression sowohl zur Vermittlung einer Proliferations- und Selbsterneuerungskapazität im Sinne einer Mutation der Klasse I, aber auch zur Störung von Differenzierungsvorgängen, entsprechend einer Mutation der Klasse II, kommen kann.

In Bezug auf RUNX1 konnte gezeigt werden, dass dieser Transkriptionsfaktor in vielen verschiedenen hämatopoetischen Zellen exprimiert wird und in der myeloiden sowie lymphoiden Zellentwicklung erforderlich ist. So führte eine *Runx1*-Defizienz (*Runx1*^{+/-}, *Runx1*^{Δ/Δ}) in adulten Mäusen zu einem Anstieg myeloider und anderer Vorläuferzellen, welcher durch eine Veränderung des Proliferationsvermögens und/oder der Selbsterneuerungskapazität oder alternativ durch eine partielle Blockierung der Differenzierung bedingt sein könnte (Hayashi et al., 2000; Woolf et al., 2003; Sun und Downing, 2004; Lorsbach et al., 2004; Ichikawa et al., 2004; Gowney et al., 2005; Putz et al., 2006). Das Auftreten einer vergrößerten Population an ruhenden Stammzellen in homozygoten *Runx1*-defizienten Mäusen, durch die eine negative Regulation dieser Zellen durch Runx1 angedeutet wird, scheint allerdings nicht in einer Kompensation des auftretenden Differenzierungsblock begründet zu sein, sondern ergibt sich als Konsequenz aus einer Veränderung der durch Runx1 regulierten transkriptionellen Mechanismen (Ichikawa et al., 2008). Die Balance zwischen der RUNX1-vermittelter Differenzierung und Proliferation scheint entscheidend zu sein, wobei eine Störung dieses Gleichgewichts zu der Entstehung einer Leukämie führen kann (Michaud et al., 2008; Friedman, 2009). Bisherige Studien geben Hinweise auf die molekularen Mechanismen der RUNX1-Wirkungsweise. Eine Einordnung der *RUNX1*-Mutationen in nur eine Klasse der im Modell angegebenen Mutationen ist scheint daher eine vereinfachte Darstellung der Gegebenheiten zu sein.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass zwar die Ergebnisse dieser und vorheriger Studien andeuten, dass die Entwicklung einer Leukämie nicht auf so einfache Zusammenhänge zurückzuführen ist, wie es das Modell vermuten lässt, dass aber eine Kombination von mehreren Mutationen, wie beispielsweise von *RUNX1* und *FLT3*, eine Leukämogenese induzieren kann. Die Ergebnisse von Mausversuchen sind zwar nicht uneingeschränkt auf das humane System übertragbar, da die Genexpressionsmuster von regulierenden Faktoren in der Hämatopoese teilweise unterschiedlich sind (Schwieger et al., 2004; Payne und Crooks, 2007; Niebuhr et al., 2008). Aber die Erforschung von hämatopoetischen Erkrankungen im murinen System kann zum Verständnis der Pathogenese beim Menschen beitragen.

4.7 Bedeutung der Ergebnisse dieser Arbeit

Die Bedeutung von *RUNX1*-Mutationen bei der Entwicklung hämatopoetischer Erkrankungen wurde bisher schon in vielen Studien, so wie auch in dieser, untersucht, konnte aber noch nicht entschlüsselt werden, wobei auch die Rolle von *RUNX1* als Tumorsuppressor diskutiert bleibt. Eine biallelische Inaktivierung dieses Transkriptionsfaktors sowie die Bildung dominant-negativer Fusionsproteine, deren Wirkung in Mausmodellen bestätigt werden konnte, passt zur Rolle eines klassischen Tumorsuppressors. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten aber eher an, dass *RUNX1* neben seiner Funktion als Tumorsuppressor, dessen kompletter Verlust bei der Entstehung leukämischer Erkrankungen von Vorteil ist, auch eine onkogene Wirkung zeigt, auf welche der zusätzliche Effekt der Expression der *RUNX1*-DBM *in vivo* zurückzuführen ist. Dies liefert außerdem eine Erklärung für die leukämische Wirkung einer Haploinsuffizienz von *RUNX1*, wobei der molekulare Mechanismus noch gefunden werden muss. Weitere Studien, wie z.B. die zur Rolle von *RUNX1* in der p53-Regulation (Linggi et al., 2002; Silva et al., 2003) und von *RUNX1*-ETO bei der Expression von Genen der DNA-Reparatur (Krejci et al., 2008), deuten ebenfalls onkogene Aktivitäten an. Ferner lassen die Assoziation des Auftretens einer Trisomie 21 und der Entwicklung einer AML des Subtyps M7 sowie die Bedeutung eines zusätzlichen Chromosoms 21 mit einem deletierten oder mutierten *RUNX1*-Allel auf ein onkogenes Potential von *RUNX1* schließen (Zipursky et al., 1992; Creutzig et al., 1996; Hasle et al., 2000; Shinawi et al., 2008; Preudhomme et al., 2009). Allerdings mag bei dem zuletzt genannten Fall nicht nur der Dosiseffekt von mutiertem und Wildtyp-*RUNX1* von Bedeutung sein, sondern auch andere auf Chromosom 21 lokalisierte Gene.

Die genaue Einordnung der in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse hinsichtlich *RUNX1* und seiner Rolle als Tumorsuppressor oder Faktor mit onkogenem Potential ist nicht möglich, da hierfür molekular-mechanistische Analysen angeschlossen werden

müssten. Neben der Etablierung des *in vivo*-Systems wurden im Verlauf dieser Arbeit proteomische Studien angestrebt, durch die ein Vergleich mutierter RUNX1-Proteine und der Wildtypform ermöglicht werden sollte, um Aufschluss darüber zu gewinnen, ob sich unterschiedliche Eigenschaften der Proteine sowie verschiedene Bindungspartner in einer Zelle erfasst werden können. Daraus sollten Hinweise zur Wirkungsweise der RUNX1-Mutanten erhalten werden, welche bei dem Verständnis der molekularen Mechanismen helfen sollten. Möglicherweise kann man dadurch aber auch neue Erkenntnisse bezüglich der RUNX1-Wildtypfunktion erlangen. Diese Studien werden in der Arbeitsgruppe am Heinrich-Pette-Institut fortgeführt.

Durch die weitere Erforschung von RUNX1 ist es vermutlich möglich, Erkenntnisse über weitere Transkriptionsfaktoren wie z.B. PU.1 zu gewinnen. Denn dieser Faktor spielt bei der myeloiden Zellentwicklung ebenfalls eine wichtige Rolle, so dass die myeloiden Zellen von Pu.1-defizienten Mäusen im frühesten Stadium der Entwicklung, ähnlich der Blasten in AML-Patienten, blockiert sind. Bei einer Studien zu PU.1-Mutationen in AML-Patienten zeigte sich, dass diese heterozygot sind, wobei Deletionen, die DNA-Bindungsdomäne betreffend, und Punktmutationen in der DNA-Bindungsdomäne, der PEST- und der Transaktivierungsdomäne erfasst werden konnten (Mueller et al., 2002). Die Möglichkeit ähnlicher Mechanismen wie bei RUNX1 ist daher gegeben.

Da nicht nur *RUNX1*-Mutationen mit einem kürzeren Krankheits-freien und Gesamtüberleben sowie einer niedrigeren kompletten Remissionsrate, sondern auch FLT3-Mutationen mit einer schlechten Prognose assoziiert sind, ist eine Erforschung der Mechanismen der Wirkungsweise dieser Mutationen für das Verständnis der Leukämieentstehung im Allgemeinen und für die Behandlung von Patienten von größter Wichtigkeit. Weiterhin können diese Mutationen aber nicht nur bei Diagnose, sondern auch als erworbene Mutation bei einer Progression der Leukämie (*RUNX1*) bzw. als weiterbestehende Mutation bei einem Rückfall (FLT3) erfasst werden (Shih et al., 2002; Chen et al., 2007; Tang et al., 2009). Ferner zeigen MDS- und AML-Patienten, die eine heterozygote *RUNX1*-Mutation aufweisen, welche die DNA-Bindungskapazität beeinflusst, im Vergleich zu Patienten ohne eine *RUNX1*-Expression eine signifikant kürzere Überlebenszeit (Christiansen et al., 2004). Daraus ergibt sich ferner die Notwendigkeit des Studiums dieser Mutationen, um das Fortschreiten von Erkrankungen sowie das Auftreten von Rezidiven verstehen zu können. In dieser Arbeit wurde ein Modellsystem geschaffen, das Untersuchungen von FLT3- und *RUNX1*-Mutationen sowie ihre Bedeutung bei der Leukämogenese *in vivo* erlauben. Dadurch wurden weitere Einblicke in die Mechanismen sowie in das Zusammenwirken von Mutationen ermöglicht, aber auch gezeigt, dass die Entstehung einer Leukämie *in vivo* weitaus komplizierter ist, als sie durch ein einfaches Modell dargestellt werden

kann. Neben der Erforschung der Erkrankungen an sich sowie der ihnen zugrunde liegenden molekularen Mechanismen kann dieses *in vivo*-Modell außerdem zur Analyse und Weiterentwicklung von Chemotherapeutika, wie Tyrosinkinaseinhibitoren, und der Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze durch die Beschreibung neuer Angriffsmöglichkeiten und prognostischer Marker dienen. Weiterhin ist es möglich, Resistenzmechanismen und deren Verhinderung zu studieren. Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Etablierung dieses Mausmodells eine Vielzahl an Möglichkeiten zur Nutzung und weiteren Erforschung bietet, so dass neue Erkenntnisse zum Verständnis der Leukämieentstehung gewonnen werden können, welche den von einer hämatologischen Erkrankung betroffenen Patienten zugute kommen.

5 Literatur

Bücher:

Baake M, Gilles A. Hämatologie – Theorie und Praxis für medizinische Assistenzberufe. GIT Verlag, 1994, ISBN 3-928865-16-1

Begemann M. Praktische Hämatologie – Klinik, Therapie, Methodik, 11. Auflage. Georg Thieme Verlag, 1999, ISBN 3-13-306211-5

Ehninger G, Link H, Berdel WE. Akute myeloische Leukämie – Pathophysiologie, Diagnostik, Therapie, Prognose. Deutscher Ärzte-Verlag, 2008, ISBN 978-3-7691-0528-5

Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. Immunologie, 5. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, 2002, ISBN 3-8274-1079-7

Dissertationen:

Birte Niebuhr – Untersuchungen zur Rolle der mutierten Rezeptor-Tyrosinkinase FLT3 bei der Leukämogenese mit Hilfe humaner und muriner Transplantationsmodelle [*Mus musculus* (Linnaeus, 1758)], April 2009, Hamburg

Anneke Nina Werk – Untersuchung der Rolle von FLT3 Mutanten in der akuten lymphoblastischen Leukämie mit Hilfe eines *in vivo* Modells in *Mus musculus* (Linnaeus, 1758), Oktober 2009, Hamburg

Veröffentlichungen:

Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA, Care RS, Peake IR, Reilly JT. Identification of novel FLT-3 Asp835 mutations in adult acute myeloid leukaemia. *Brit J Haemat* 113:983-988, 2001.

Adolfsson J, Borge OJ, Bryder D, Theilgaard-Monch K, Astrand-Grundstrom I, Sitnicka E, Sasaki Y, Jacobsen SE. Upregulation of Flt3 expression within the bone marrow Lin(-)Sca1(+)-kit(+) stem cell compartment is accompanied by loss of self-renewal capacity. *Immunity* 15:659-669, 2001.

Adolfsson J, Mansson R, Buza-Vidas N, Hultquist A, Liuba K, Jensen CT, Bryder D, Yang L, Borge OJ, Thoren LA, Anderson K, Sitnicka E, Sasaki Y, Sigvardsson M, Jacobsen SE. Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell* 121(2):295-306, 2005.

Agnes F, Shamooin B, Dinac A, Rosnet O, Birnbaum D, Galibert F. Genomic structure of the downstream part of the human FLT3 gene: Exon/Intron structure conservation among genes encoding receptor tyrosine kinases (RTK) of subclass III. *Gene* 145:283-288, 1994.

Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404:193-197, 2000.

Akashi K, **Weissman** I. Stem cells and hematolymphoid development. Zon L (editor), Hematopoiesis: A developmental approach, Oxford University Press, Oxford, Seiten 15-34, 2001.

Allman D, Sambandam A, Kim S, Miller JP, Pagan A, Well D, Meraz A, Bhandoola A. Thymopoiesis independent of common lymphoid progenitors. *Nat Immunol* 4:168-174, 2003.

Anderson MK, Weiss AH, Hernandez-Hoyos G, Dionne CJ, Rothenberg EV. Constitutive expression of PU.1 in fetal hematopoietic progenitors blocks T cell development at the pro-T cell stage. *Immunity* 16(2):285-296, 2002.

Ara T, Itoi M, Kawabata K, Egawa T, Tokoyoda K, Sugiyama T, Fujii N, Amagai T, Nagasawa T. A role of CXC chemokine ligand 12/stromal cell-derived factor-1/pre-B cell growth stimulating factor and its receptor CXCR4 in fetal and adult T cell development in vivo. *J Immunol* 170(9):4649-4655, 2003.

Arepally G, Rebbeck TR, Song W, Gilliland G, Maris JM, Poncz M. Evidence for genetic homogeneity in a familial platelet disorder with predisposition to acute myelogenous leukemia (FPD/AML). *Blood* 92(7):2600-2602, 1998.

Armstrong SA, **Look** AT. Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 23:6306-6315, 2005.

- Armstrong SA**, Mabon ME, Silverman LB, Li A, Gribben JG, Fox EA, Sallan SE, Korsmeyer SJ. FLT3 mutations in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 103:3544-3546, 2004.
- Back J**, Allman D, Chan S, Kastner P. Visualizing PU.1 activity during hematopoiesis. *Exp Hematol* 33(4):395-402, 2005.
- Baum C**, Hegewisch-Becker S, Eckert H, Stocking C, Ostertag W. Novel retroviral vectors for efficient expression of the multidrug resistance (mdr-1) gene in early hematopoietic cells. *J Virol* 69:7541-7547, 1995.
- Bennett JM**, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. Criteria for the diagnosis of acute leukemia of megakaryocyte lineage (M7). A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 103(3):460-462, 1985.
- Bennett JM**, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-M0). *Brit J Haematol* 78(3):458-459, 1991.
- Bennett JM**, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Brit J Haematol* 33:451-458, 1976.
- Bercovich D**, Ganmore I, Scott LM, Wainreb G, Birger Y, Elimelech A, Shochat C, Cazzaniga G, Biondi A, Basso G, Cario G, Schrappe M, Stanulla M, Strehl S, Haas OA, Mann G, Binder V, Borkhardt A, Kempinski H, Trka J, Bielorei B, Avigad S, Stark B, Smith O, Dastugue N, Bourquin JP, Tal NB, Green AR, Izraeli S. Mutations of JAK2 in acute lymphoblastic leukaemias associated with Down's syndrome. *Lancet* 372(9648):1448-1450, 2008.
- Beri-Dexheimer M**, Latger-Cannard V, Philippe C, Bonnet C, Chambon P, Roth V, Gregoire MJ, Bordigoni P, Lecompte T, Leheup B, Jonveaux P. Clinical phenotype of germline RUNX1 haploinsufficiency: from point mutations to large genomic deletions. *Eur J Hum Genet* 16(8):1014-1018, 2008.
- Beyer WR**, Westphal M, Ostertag W, von Laer D. Oncoretrovirus and lentivirus vectors pseudotyped with lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein: generation, concentration, and broad host range. *J Virol* 76:1488-1495, 2002.
- Bhandoola A**, **Sambandam A**. From stem cell to T cell: one route or many? *Nat Rev Immunol* 6(2):117-126, 2006.
- Birg F**, Courcou M, Rosnet O, Bardin F, Pebusque MJ, Marchetto S, Tabilio A, Mannoni P, Birnbaum D. Expression of the FMS/KIT-like gene FLT3 in human acute leukemias of the myeloid and lymphoid lineages. *Blood* 80(10):2584-2593, 1992.
- Bleul CC**, **Boehm T**. Chemokines define distinct microenvironments in the developing thymus. *Eur J Immunol* 30:3371-3379, 2000.
- Blyth K**, Cameron E, Neil J. The RUNX genes: gain or loss of function in cancer. *Nat Rev Cancer* 5:376-387, 2005.
- Boisett JC**, van Cappellen W, Andrieu-Soler C, Galjart N, Dzierzak E, Robin C. In vivo imaging of haematopoietic cells emerging from the mouse aortic endothelium. *Nature* 464:116-120, 2010.
- Bousso P**, Bhakta NR, Lewis RS, Robey E. Dynamics of thymocyte-stromal cell interactions visualized by two-photon microscopy. *Science* 296:1876-1880, 2002.
- Brown P**, Levis M, Shurtleff S, Campana D, Downing J, Small D. FLT3 inhibition selectively kills childhood acute lymphoblastic leukemia cells with high levels of FLT3 expression. *Blood* 105(2):812-820, 2005.
- Brown P**, **Small D**. FLT3 inhibitors: a paradigm for the development of targeted therapeutics for paediatric cancer. *Eur J Cancer* 40(5):707-721, 2004.
- Bruhn L**, Munneryn A, Grosschedl R. ALY, a context dependent coactivator of LEF-1 and AML-1, is required for TCRa enhancer function. *Genes Dev* 11:640-653, 1997.
- Buijs A**, Poddighe P, van Wijk R, van Solinge W, Borst E, Verdonck L, Hagenbeek A, Pearson P, Lokhorst H. A novel CBFA2 single-nucleotide mutation in familial platelet disorder with propensity to develop myeloid malignancies. *Blood* 98:2856-2858, 2001.
- Cameron S**, Taylor D, TePas E, Speck N, Mathey-Prevot B. Identification of a critical regulatory site in the human interleukin-3 promoter by in vivo footprinting. *Blood* 83:2851-2859, 1994.
- Cammenga J**, Niebuhr B, Horn S, Bergholz U, Putz G, Buchholz F, Löhler J, Stocking C. RUNX1 DNA-binding mutants, associated with minimally differentiated acute myelogenous leukemia, disrupt myeloid differentiation. *Cancer Res* 67(2):537-545, 2007.
- Carow CE**, Levenstein M, Kaufmann SH, Chen J, Amin S, Rockwell P, Witte L, Borowitz MJ, Civin CI, Small D. Expression of the hematopoietic growth factor receptor FLT3 (STK-1/Flk2) in human leukemias. *Blood* 87(3):1089-1096, 1996.
- Castilla LH**, Wijmenga C, Wang Q, Stacy T, Speck NA, Eckhaus M, Marin-Padilla M, Collins FS, Wynshaw-Boris A, Liu PP. Failure of embryonic hematopoiesis and lethal hemorrhages in mouse embryos heterozygous for a knocked-in leukemia gene CFBF-MYH11. *Cell* 87:687-696, 1996.

- Cattoglio C**, Facchini G, Sartori D, Antonelli A, Miccio A, Cassani B, Schmidt M, von Kalle C, Howe S, Thrasher AJ, Aiuti A, Ferrari G, Recchia A, Mavilio F. Hot spots of retroviral integration in human CD34+ hematopoietic cells. *Blood* 110:1770-1778, 2007.
- Chang KC**, Goldspink G, Lida J. Studies in the in vivo expression of the influenza resistance gene Mx by in-situ hybridisation. *Arch Virol* 110(3-4):151-164, 1990.
- Chen CY**, Lin LI, Tang JL, Ko BS, Tsay W, Chou WC, Yao M, Wu SJ, Tseng MH, Tien HF. RUNX1 gene mutation in primary myelodysplastic syndrome – the mutation can be detected early at diagnosis or acquired during disease progression and is associated with poor outcome. *Br J Haematol* 139(3):405-414, 2007.
- Chen MJ**, Yokomizo T, Zeigler BM, Dzierzak E, Speck NA. Runx1 is required for the endothelial to haematopoietic cell transition but not thereafter. *Nature* 457:887-891, 2009.
- Cheshier SH**, Morrison SJ, Liao X, Weissman IL. In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:3120-3125, 1999.
- Choudhary C**, Müller-Tidow C, Berdel WE, Serve H. Signal transduction of oncogenic Flt3. *Int J Hematol* 82(2):93-99, 2005.
- Christensen JL**, **Weissman IL**. Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells. *Proc Nat Acad Sci* 98:14541-14546, 2001.
- Christiansen DH**, Andersen MK, Pedersen-Bjergaard J. Mutations of AML1 are common in therapy-related myelodysplasia following therapy with alkylating agents and are significantly associated with deletion or loss of chromosome arm 7q and with subsequent leukemic transformation. *Blood* 104(5):1474-1481, 2004.
- Chung KY**, Morrone G, Schuringa JJ, Wong B, Dorn DC, Moore MAS. Enforced expression of an Flt3 internal tandem duplication in human CD34+ cells confers properties of self-renewal and enhanced erythropoiesis *Blood* 105:77-84, 2005.
- Clements JL**, Yang B, Ross-Barta SE, Eliason SL, Hrstka RF, Williamson RA, Koretzky GA. Requirement for the leukocyte-specific adapter protein SLP-76 for normal T cell development. *Science* 281(5375):416-419, 1998.
- Collins A**, Littman DR, Taniuchi I. RUNX proteins in transcription factor networks that regulate T-cell lineage choice. *Nat Rev Immunol* 9(2):106-115, 2009.
- Crans H**, **Sakamoto K**. Transcription factors and translocations in leukemia. *Leukemia* 15:313-331, 2001.
- Creutzig U**, Ritter J, Vormoor J, Ludwig WD, Niemeyer C, Reinisch I, Stollmann-Gibbels B, Zimmermann M, Harbott J. Myelodysplasia and acute myelogenous leukemia in Down's syndrome. A report of 40 children of the AML-BFM Study Group. *Leukemia* 10(11):1677-1686, 1996.
- Cumano A**, Dieterlen-Lievre F, Godin I. Lymphoid potential, probed before circulation in mouse, is restricted to caudal intraembryonic splanchnopleura. *Cell* 86:907-916, 1996.
- Cvetkovic B**, **Sigmund CD**. Understanding hypertension through genetic manipulation in mice. *Kidney Int* 57(3):863-874, 2000.
- Dahl R**, Walsh JC, Lancki D, Laslo P, Iyer SR, Singh H, Simon MC. Regulation of macrophage and neutrophil cell fates by the PU.1:C/EBPalpha ratio and granulocyte colony-stimulating factor. *Nat Immunol* 4(10):1029-1036, 2003.
- Dakic A**, Metcalf D, Di Rago L, Mifsud S, Wu L, Nutt SL. PU.1 regulates the commitment of adult hematopoietic progenitors and restricts granulopoiesis. *J Exp Med* 201(9):1487-1502, 2005.
- D'Amico A**, **Wu L**. The early progenitors of mouse dendritic cells and plasmacytoid predendritic cells are within the bone marrow hemopoietic precursors expressing Flt3. *J Exp Med* 198(2):293-303, 2003.
- Dash A**, **Gilliland DG**. Molecular genetics of acute myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 14(1):49-64, 2001.
- de Boer J**, Williams A, Skavdis G, Harker N, Coles M, Tolaini M, Norton T, Williams K, Roderick K, Potocnik AJ, Kioussis D. Transgenic mice with hematopoietic and lymphoid specific expression of Cre. *Eur J Immunol* 33(2):314-325, 2003.
- de Bruijn MF**, Ma X, Robin C, Ottersbach K, Sanchez M, Dzierzak E. Hematopoietic stem cells localize to the endothelial cell layer in the midgestation mouse aorta. *Immunity* 16:673-683, 2002.
- de Bruijn MF**, Speck NA, Peeters MC, Dzierzak E. Definitive hematopoietic stem cells first develop within the major arterial regions of the mouse embryo. *EMBO J* 19(11):2465-2474, 2000.
- de Clercq E**. Interferon inducers. *Antibiot Chemother* 27:251-287, 1980.
- de Greef GE**, **Hagemeijer A**. Molecular and cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukaemia and myelodysplastic syndromes. *Baillieres Clin Haematol* 9(1):1-18, 1996.
- de Guzman CG**, Warren AJ, Zhang Z, Gartland L, Erickson P, Drabkin H, Hiebert SW, Klug CA. Hematopoietic stem cell expansion and distinct myeloid developmental abnormalities in a murine model of the AML1-ETO translocation. *Mol Cell Biol* 22(15):5506-5517, 2002.

- DeKoter RP, Singh H.** Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU.1. *Science* 288(5470):1439-1441, 2000.
- Dicker F, Haferlach C, Sundermann J, Wendland N, Weiss T, Kern W, Haferlach T, Schnittger S.** Mutation analysis for RUNX1, MLL-PTD, FLT3-ITD, NPM1 and NRAS in 269 patients with MDS or secondary AML. *Leukemia* 24(8):1528-1532, 2010.
- Ding Y, Harada Y, Imagawa J, Kimura A, Harada H.** AML1/RUNX1 point mutation possibly promotes leukemic transformation in myeloproliferative neoplasms. *Blood* 114(25):5201-5205, 2009.
- Dowton SB, Beardsley D, Jamison D, Blattner S, Li FP.** Studies of a familial platelet disorder. *Blood* 65(3):557-563, 1985.
- Durst K, Hiebert S.** Role of RUNX family members in transcriptional repression and gene silencing. *Oncogene* 23:4220-4224, 2004.
- Edwards H, Xie C, LaFiura KM, Dombkowski AA, Buck SA, Boerner JL, Taub JW, Matherly LH, Ge Y.** RUNX1 regulates phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway: role in chemotherapy sensitivity in acute megakaryocytic leukemia. *Blood* 114(13):2744-2752, 2009.
- Egawa T, Tillman RE, Naoe Y, Taniuchi I, Littman DR.** The role of the Runx transcription factors in thymocyte differentiation and in homeostasis of naive T cells. *J Exp Med* 204:1945-1957, 2007.
- Egerton M, Scollay R, Shortman K.** Kinetics of mature T-cell development in the thymus. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:2579-2582, 1990.
- Elagib KE, Racke FK, Mogass M, Khetawat R, Delehanty LL, Goldfarb AN.** RUNX1 and GATA-1 coexpression and cooperation in megakaryocytic differentiation. *Blood* 101(11):4333-4341, 2003.
- Essers MA, Offner S, Blanco-Bose WE, Waibler Z, Kalinke U, Duchosal MA, Trumpp A.** IFN α activates dormant haematopoietic stem cells in vivo. *Nature* 458(7240):904-908, 2009.
- Fazio G, Palmi C, Rolink A, Biondi A, Cazzaniga G.** PAX5/TEL acts as a transcriptional repressor causing down-modulation of CD19, enhances migration to CXCL12, and confers survival advantage in pre-BI cells. *Cancer Res* 68(1):181-189, 2008.
- Fenaux P, Morel P, Lai JL.** Cytogenetics of myelodysplastic syndromes. *Semin Hematol* 33(2):127-138, 1996. (a)
- Fenaux P.** Myelodysplastic syndromes. *Hematol Cell Ther* 38(5):363-380, 1996. (b)
- Fenske TS, Pengue G, Mathews V, Hanson PT, Hamm SE, Riaz N, Graubert TA.** Stem cell expression of the AML1/ETO fusion protein induces a myeloproliferative disorder in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(42):15184-15189, 2004.
- Finkelman FD, Svetic A, Gresser I, Snapper C, Holmes J, Trotta PP, Katona IM, Gause WC.** Regulation by interferon alpha of immunoglobulin isotype selection and lymphokine production in mice. *J Exp Med* 174(5):1179-1188, 1991.
- Fischer M, Schwieger M, Horn S, Niebuhr B, Ford A, Roscher S, Bergholz U, Greaves M, Löhler J, Stocking C.** Defining the oncogenic function of the TEL/AML1 (ETV6/RUNX1) fusion protein in a mouse model. *Oncogene* 24(51):7579-7591, 2005.
- Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY.** Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity* 22(3):329-341, 2005.
- Forsberg EC, Serwold T, Kogan S, Weissman IL, Passegue E.** New evidence supporting megakaryocyte-erythrocyte potential of flk2/flt3+ multipotent hematopoietic progenitors. *Cell* 126:415-426, 2006.
- Fossa DL, Donskoya E, Goldschneider I.** The importation of hematogenous precursors by the thymus is a gated phenomenon in normal adult mice. *J Exp Med* 193:365-374, 2001.
- Frank R, Zhang J, Uchida H, Meyers S, Hiebert S, Nimer S.** The AML1/ETO fusion protein blocks transactivation of the GM-CSF promoter by AML1B. *Oncogene* 11:2667-2674, 1995.
- Friedman AD.** Cell cycle and developmental control of hematopoiesis by Runx1. *J Cell Physiol* 219(3):520-524, 2009.
- Friedman AD.** Transcriptional regulation of granulocyte and monocyte development. *Oncogene* 21:3377-3390, 2002.
- Fuxa M, Skok JA.** Transcriptional regulation in early B cell development. *Curr Opin Immunol* 19:129-136, 2007.
- Galy A, Travis M, Cen D, Chen B.** Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity* 3:459-473, 1995.
- Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K.** Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 327(5966):656-661, 2010.
- Gelmetti V, Zhang J, Fanelli M, Minucci S, Pelicci PG, Lazar MA.** Aberrant recruitment of the nuclear receptor corepressor-histone deacetylase complex by the acute myeloid leukemia fusion partner ETO. *Mol Cell Biol* 18(12):7185-7191, 1998.
- Germain RN.** T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol* 2(5):309-322, 2002.

- Gilliland** DG, Jordan CT, Felix CA. The molecular basis of leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 80-97, 2004.
- Gilliland** DG, **Tallman** MS. Focus on acute leukemias. *Cancer Cell* 1:417-420, 2002.
- Godfrey** DI, Kennedy J, Suda T, Zlotnik A. A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8- triplenegative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. *J Immunol* 150:4244-4252, 1993.
- Godin** I, **Cumano** A. The hare and the tortoise: an embryonic haematopoietic race. *Nat Rev Immunol* 2(8):593-604, 2002.
- Goldrath** AW, **Bevan** MJ. Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature* 402:255-262, 1999.
- Golub** TR, Barker GF, Bohlander SK, Hiebert SW, Ward DC, Bray-Ward P, Morgan E, Raimondi SC, Rowley JD, Gilliland DG. Fusion of the TEL gene on 12p13 to the AML1 gene on 21q22 in acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 92(11):4917-4921, 1995.
- Grassot** J, Mouchiroud G, Pierrere G. RTKdb: database of Receptor Tyrosine Kinase. *Nucleic Acids Res* 31(1):352-358, 2003.
- Griffith** J, Black J, Faerman C, Swenson L, Wynn M, Lu F, Lippke J, Saxena K. The structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain. *Mol Cell* 13(2):169-178, 2004.
- Growney** JD, Shigematsu H, Li Z, Lee BH, Adelsperger J, Rowan R, Curley DP, Kutok JL, Akashi K, Williams IR, Speck NA, Gilliland DG. Loss of Runx1 perturbs adult hematopoiesis and is associated with a myeloproliferative phenotype. *Blood* 106(2):494-504, 2005.
- Grundler** R, Miething C, Thiede C, Peschel C, Duyster J. Flt3-ITD and tyrosine kinase domain mutants induce 2 distinct phenotypes in a murine bone marrow transplantation model. *Blood* 105:4792-4299, 2005.
- Gu** H, Marth JD, Orban PC, Mossmann H, Rajewsky K. Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* 265(5168):103-106, 1994.
- Harada** H, Harada Y, Niimi H, Kyo T, Kimura A, Inaba T. High incidence of somatic mutations in the AML1/RUNX1 gene in myelodysplastic syndrome and low blast percentage myeloid leukemia with myelodysplasia. *Blood* 103(6):2316-2324, 2004.
- Harada** H, Harada Y, Tanaka H, Kimura A, Inaba T. Implications of somatic mutations in the AML1 gene in radiation-associated and therapy-related myelodysplastic syndrome/acute myeloid leukemia. *Blood* 101:673-680, 2003.
- Harada** Y, **Harada** H. Molecular pathways mediating MDS/AML with focus on AML1/RUNX1 point mutations. *J Cell Physiol* 220(1):16-20, 2009.
- Hardy** RR, Kincade PW, Dorshkind K. The Protean Nature of Cells in the B Lymphocyte Lineage. *Immunity* 26:703-714, 2007.
- Harris** NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Müller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD. World Health Organisation of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the clinical advisory committee meeting. *J Clin Oncol* 17:3835-3849, 1999.
- Hasle** H, Clemmensen IH, Mikkelsen M. Risks of leukaemia and solid tumours in individuals with Down's syndrome. *Lancet* 355:165-169, 2000.
- Havran** WL, **Allison** JP. Developmentally ordered appearance of thymocytes expressing different T-cell antigen receptors. *Nature* 335:443-445, 1988.
- Hayakawa** F, Towatari M, Kiyoi H, Tanimoto M, Kitamura T, Saito H, Naoe T. Tandem-duplicated Flt3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines. *Oncogene* 19(5):624-631, 2000.
- Hayashi** K, Natsume W, Watanabe T, Abe N, Iwai N, Okada H, Ito Y, Asano M, Iwakura Y, Habu S, Takahama Y, Satake M. Diminution of the AML1 transcription factor function causes differential effects on the fates of CD4 and CD8 single-positive T cells. *J Immunol* 165(12):6816-6824, 2000.
- Haynes** BF, **Heinly** CS. Early human T cell development: analysis of the human thymus at the time of initial entry of hematopoietic stem cells into the fetal thymic microenvironment. *J Exp Med* 181:1445-1458, 1995.
- Heidel** F, Solem FK, Breitenbuecher F, Lipka DB, Kasper S, Thiede MH, Brandts C, Serve H, Roesel J, Giles F, Feldman E, Ehninger G, Schiller GJ, Nimer S, Stone RM, Wang Y, Kindler T, Cohen PS, Huber C, Fischer T. Clinical resistance to the kinase inhibitor PKC412 in acute myeloid leukemia by mutation of Asn-676 in the FLT3 tyrosine kinase domain. *Blood* 107(1):293-300, 2006.
- Hellenbrecht** A. Epidemiologische Daten zu Krebserkrankungen in Deutschland (www.kompetenznetz-leukaemie.de), 2003.
- Heller** PG, Glembotsky AC, Gandhi MJ, Cummings CL, Pirola CJ, Marta RF, Kornblihtt LI, Drachman JG, Molinas FC. Low Mpl receptor expression in a pedigree with familial platelet disorder with predisposition to acute myelogenous leukemia and a novel AML1 mutation. *Blood* 105(12):4664-4670, 2005.

- Heller** PG. Familial platelet disorder with predisposition to acute myelogenous leukemia (FPD/AML). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*, 2008.
- Hess** J, Porte D, Munz C, Angel P. AP-1 and Cbfa/Runt physically interact and regulate parathyroid hormone-dependent MMP13 expression in osteoblasts through a new osteoblast-specific element 2/AP-1 composite element. *J Biol Chem* 276:20029-20038, 2001.
- Hiebert** SW, Sun W, Davis JN, Golub T, Shurtleff S, Buijs A, Downing JR, Grosveld G, Russell MF, Gilliland DG, Lenny N, Meyers S. The t(12;21) translocation converts AML-1B from an activator to a repressor of transcription. *Mol Cell Biol* 16(4):1349-1355, 1996.
- Higuchi** M, O'Brien D, Kumaravelu P, Lenny N, Yeoh EJ, Downing JR. Expression of a conditional AML1-ETO oncogene bypasses embryonic lethality and establishes a murine model of human t(8;21) acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* 1:63-74, 2002.
- Hildinger** M, Abel K, Ostertag W, Baum C. Design of 5' untranslated sequences in retroviral vectors developed for medical use. *J Virol* 73:4083-4089, 1999.
- Hirai** H, Okada M, Mizoguchi H, Mano H, Kabayshi Y, Nishida J, Takaku F. Relationship between an activated N-ras oncogene and chromosomal abnormality during leukemic progression from myelodysplastic syndrome. *Blood* 71:256-258, 1988.
- Hirsch** E, Iglesias A, Potocnik A, Hartmann U, Fassler R. Impaired migration but not differentiation of haematopoietic stem cells in the absence of beta1 integrins. *Nature* 380:171-175, 1996.
- Ho** CY, Otterud B, Legare RD, Varvil T, Saxena R, DeHart DB, Kohler SE, Aster JC, Dowton SB, Li FP, Leppert M, Gilliland DG. Linkage of a familial platelet disorder with a propensity to develop myeloid malignancies to human chromosome 21q22.1-22.2. *Blood* 87(12):5218-5224, 1996.
- Holmes** ML, Carotta S, Corcoran LM, Nutt SL. Repression of Flt3 by Pax5 is crucial for B-cell lineage commitment. *Genes Dev* 20:933-938, 2006.
- Holmes** ML, Pridans C, Nutt SL. The regulation of the B-cell gene expression programme by Pax5. *Immunol Cell Biol* 86(1):47-53, 2007.
- Horiike** S, Yokota S, Nakao M, Iwai T, Sasai Y, Kaneko H, Taniwaki M, Kashima K, Fujii H, Abe T, Misawa S. Tandem duplications of the FLT3 receptor gene are associated with leukemic transformation of myelodysplasia. *Leukemia* 11(9):1442-1446, 1997.
- Hsiang** Y, Spencer D, Wang S, Speck NA, Raulet D. The role of the viral enhancer core motif-related sequences in regulating T cell receptor and gene expression. *J Immunol* 150:3905-3916, 1993.
- Huang** G, Shigesada K, Ito K, Wee H, Yokomizo T, Ito Y. Dimerization with PEBP2B protects RUNX1/AML1 from ubiquitin-proteasome-mediated degradation. *EMBO J* 20:723-733, 2001.
- Huang** X, Cho S, Spangrude GJ. Hematopoietic stem cells: generation and self-renewal. *Cell Death Differ* 14:1851-1859, 2007.
- Huse** M, **Kuriyan** J. The conformational plasticity of protein kinases. *Cell* 109(3):275-282, 2002.
- Hyde** RK, **Liu** PP. RUNX1 repression-independent mechanisms of leukemogenesis by fusion genes CBFb-MYH11 and AML1-ETO (RUNX1-RUNX1T1). *J Cell Biochem* 110(5):1039-1045, 2010.
- Ichikawa** M, Asai T, Saito T, Seo S, Yamazaki I, Yamagata T, Mitani K, Chiba S, Ogawa S, Kurokawa M, Hirai H. AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. *Nat Med* 10(3):299-304, 2004.
- Ichikawa** M, Goyama S, Asai T, Kawazu M, Nakagawa M, Takeshita M, Chiba S, Ogawa S, Kurokawa M. AML1/Runx1 negatively regulates quiescent hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. *J Immunol* 180(7):4402-4408, 2008.
- Imai** Y, Kurokawa M, Izutsu K, Hangaishi A, Takeuchi K, Maki K, Ogawa S, Chiba S, Mitani K, Hirai H. Mutations of the AML1 gene in myelodysplastic syndrome and their functional implications in leukemogenesis. *Blood* 96(9):3154-3160, 2000.
- Irving** BA, Alt FW, Killeen N. Thymocyte development in the absence of pre-T cell receptor extracellular immunoglobulin domains. *Science* 280:905-908, 1998.
- Isakoff** MS, Sansam CG, Tamayo P, Subramanian A, Evans JA, Fillmore CM, Wang X, Biegel JA, Pomeroy SL, Mesirov JP, Roberts CW. Inactivation of the Snf5 tumor suppressor stimulates cell cycle progression and cooperates with p53 loss in oncogenic transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(49):17745-17750, 2005.
- Ishikawa** Y, Kiyoi H, Tsujimura A, Miyawaki S, Miyazaki Y, Kuriyama K, Tomonaga M, Naoe T. Comprehensive analysis of cooperative gene mutations between class I and class II in de novo acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol* 83(2):90-98, 2009.
- Ito** Y. Molecular basis of tissue-specific gene expression mediated by the runt domain transcription factor PEBP2/CBF. *Genes Cell* 4:685-696, 1999.

- Iwasaki** H, Somoza C, Shigematsu H, Duprez EA, Iwasaki-Arai J, Mizuno S, Arinobu Y, Geary K, Zhang P, Dayaram T, Fenyus ML, Elf S, Chan S, Kastner P, Huettner CS, Murray R, Tenen DG, Akashi K. Distinctive and indispensable roles of PU.1 in maintenance of hematopoietic stem cells and their differentiation. *Blood* 106(5):1590-1600, 2005.
- Jaffe** ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. IARC Press, Lyon, 2001.
- Jameson** SC, Hogquist KA, Bevan MJ. Positive selection of thymocytes. *Annu Rev Immunol* 13:93-126, 1995.
- Johansen** LM, Iwama A, Lodie TA, Sasaki K, Felsher DW, Golub TR, Tenen DG. c-Myc is a critical target for c/EBPalpha in granulopoiesis. *Mol Cell Biol* 21(11):3789-3806, 2001.
- Jongmans** MC, Kuiper RP, Carmichael CL, Wilkins EJ, Dors N, Carmagnac A, Schouten-van Meeteren AY, Li X, Stankovic M, Kamping E, Bengtsson H, Schoenmakers EF, van Kessel AG, Hoogerbrugge PM, Hahn CN, Brons PP, Scott HS, Hoogerbrugge N. Novel RUNX1 mutations in familial platelet disorder with enhanced risk for acute myeloid leukemia: clues for improved identification of the FPD/AML syndrome. *Leukemia* 24(1):242-246, 2010.
- Kagoshima** H, Akamatsu Y, Ito Y, Shigesada K. Functional dissection of the alpha and beta subunits of transcription factor PEBP2 and the redox susceptibility of its DNA binding activity. *J Biol Chem* 271:33074-33082, 1996.
- Kagoshima** H, Shigesada K, Satake M, Ito Y, Miyoshi H, Ohki M, Pepling M, Gergen P. The Runt domain identifies a new family of heteromeric transcriptional regulators. *Trends Genet* 9:338-341, 1993.
- Kahn** P, Frykberg L, Brady C, Stanley I, Beug H, Vennström B, Graf T. v-erbA cooperates with sarcoma oncogenes in leukemic cell transformation. *Cell* 45(3):349-356, 1986.
- Kanno** T, Kanno Y, Chen L, Ogawa E, Kim W, Ito Y. Intrinsic transcriptional activation-inhibition domains of the polyomavirus enhancer binding protein2/core binding factor alpha subunit revealed in the presence of the beta subunit. *Mol Cell Biol* 18:2444-2454, 1998.
- Karsunky** H, Inlay MA, Serwold T, Bhattacharya D, Weissman IL. Flk2+ common lymphoid progenitors possess equivalent differentiation potential for the B and T lineages. *Blood* 111:5562-5570, 2008.
- Kato** S. Thymic microvascular system. *Microscopy Res Tech* 38:287-299, 1997.
- Kawamata** N, Ogawa S, Zimmermann M, Niebuhr B, Stocking C, Sanada M, Hemminki K, Yamatomo G, Nannya Y, Koehler R, Flohr T, Miller CW, Harbott J, Ludwig WD, Stanulla M, Schrappe M, Bartram CR, Koeffler HP. Cloning of genes involved in chromosomal translocations by high-resolution single nucleotide polymorphism genomic microarray. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(33):11921-11926, 2008.
- Kawamoto** H, Katsura Y. A new paradigm for hematopoietic cell lineages: revision of the classical concept of the myeloid-lymphoid dichotomy. *Trends Immunol* 30(5):193-200, 2009.
- Kelly** LM, **Gilliland** DG. Genetics of myeloid leukemias. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 3:179-198, 2002.
- Kelly** LM, Kutok JL, Williams IR, Boulton CL, Amaral SM, Curley DP, Ley TJ, Gilliland DG. PML/RARalpha and FLT3-ITD induce an APL-like disease in a mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(12):8283-8288, 2002. (b)
- Kelly** LM, Liu Q, Kutok JL, Williams IR, Boulton CL, Gilliland DG. 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, 2002. (a)
- Kikuchi** K, Lai AY, Hsu CL, Kondo M. IL-7 receptor signaling is necessary for stage transition in human B cell development through up-regulation of EBF. *J Exp Med* 210(8):1197-1203, 2005.
- Kikushige** Y, Yoshimoto G, Miyamoto T, Iino T, Mori Y, Iwasaki H, Niino H, Takenaka K, Nagafuji K, Harada M, Ishikawa F, Akashi K. Human Flt3 is expressed at the hematopoietic stem cell and the granulocyte/macrophage progenitor stages to maintain cell survival. *J Immunol* 180(11):7358-7367, 2008.
- Kim** HG, Kojima K, Swindle CS, Cotta CV, Huo Y, Reddy V, Klug CA. FLT3-ITD cooperates with inv(16) to promote progression to acute myeloid leukemia. *Blood* 111:1567-1574, 2008.
- Kirito** K, Sakoe K, Shinoda D, Takiyama Y, Kaushansky K, Komatsu N. A novel RUNX1 mutation in familial platelet disorder with propensity to develop myeloid malignancies. *Haematologica* 93:155-156, 2008.
- Kisielow** P, Teh HS, Bluthmann H, von Boehmer H. Positive selection of antigen-specific T cells in thymus by restricting MHC molecules. *Nature* 335:730-733, 1988.
- Kitamura** T, Koshino Y, Shibata F, Oki T, Nakajima H, Nosaka T, Kumagai H. Retrovirus-mediated gene transfer and expression cloning: powerful tools in functional genomics. *Exp Hematol* 31:1007-1014, 2003.
- Kiyoi** H, Ohno R, Ueda R, Saito H, Naoe T. Mechanism of konstitutiv activation of FLT3 with internal tandem duplication in the juxtamembran domain. *Oncogene* 21:2555-2563, 2002.

- Kiyoi H**, Towatari M, Yokota S, Hamaguchi M, Ohno R, Saito H, Naoe T. Internal tandem duplication of the FLT3 gene is a novel modality of elongation mutation which causes constitutive activation of the product. *Leukemia* 12(9):1333-1337, 1998.
- Klug DB**, Carter C, Crouch E, Roop D, Conti CJ, Richie ER. Interdependence of cortical thymic epithelial cell differentiation and T-lineage commitment. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(20):11822-11827, 1998.
- Klymenko S**, Trott K, Atkinson M, Bink K, Bebeshko V, Bazyka D, Dmytrenko I, Abramenko I, Bilous N, Misurin A, Zitzelsberger H, Rosemann M. Aml1 gene rearrangements and mutations in radiation-associated acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *J Radiat Res* 46(2):249-255, 2005.
- Knudson AG Jr**, Hethcote HW, Brown BW. Mutation and childhood cancer: a probabilistic model for the incidence of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 72:5116-5120, 1975.
- Ko RM**, Kim HG, Wolff L, Klug CA. Roles of p15Ink4b and p16Ink4a in myeloid differentiation and RUNX1-ETO-associated acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 32(7):1101-1111, 2008.
- Kondo M**, Weissman IL, Akashi K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 91:661-672, 1997.
- Krejci O**, Wunderlich M, Geiger H, Chou F-S, Schleimer D, Jansen M, Andreassen PR, Mulloy JC. p53 signaling in response to increased DNA damage sensitizes AML1-ETO cells to stress-induced death. *Blood* 111:2190-2199, 2008.
- Kuhn R**, Schwenk F, Aguet M, Rajewsky K. Inducible gene targeting in mice. *Science* 269(5229):1427-1429, 1995.
- Kuiper RP**, Waanders E, van der Velden VHJ, van Reijmersdal SV, Venkatachalam R, Scheijen B, Sonneveld E, van Dongen JJM, Veerman AJP, van Leeuwen FN, Geurts van Kessel A, Hoogerbrugge PM. IKZF1 deletions predict relapse in uniformly treated pediatric precursor B-ALL. *Leukemia* 24:1258-1264, 2010.
- Kundu M**, Compton S, Garrett-Beal L, Stacy T, Starost MF, Eckhaus M, Speck NA, Liu PP. Runx1 deficiency predisposes mice to T-lymphoblastic lymphoma. *Blood* 106(10):3621-3624, 2005.
- Kwok C**, Zeisig BB, Qiu J, Dong S, So CW. Transforming activity of AML1-ETO is independent of CBFbeta and ETO interaction but requires formation of homo-oligomeric complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(8):2853-2858, 2009.
- Kyewski B**, **Derbinski J**. Self-representation in the thymus: an extended view. *Nature Rev Immunol* 4:688-698, 2004.
- Laiosa CV**, Stadtfeld M, Xie H, de Andres-Aguayo L, Graf T. Reprogramming of committed T cell progenitors to macrophages and dendritic cells by C/EBP alpha and PU.1 transcription factors. *Immunity* 25:731-744, 2006.
- Lancrin C**, Sroczynska P, Stephenson C, Allen T, Kouskoff V, Lacaud G. The haemangioblast generates haematopoietic cells through a haemogenic endothelium stage. *Nature* 457:892-895, 2009.
- Land H**, Parada LF, Weinberg RA. Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* 304:596-602, 1983.
- Langabeer SE**, Gale RE, Rollinson SJ, Morgan GJ, Linch DC. Mutations of the AML1 gene in acute myeloid leukemia of FAB types M0 and M7. *Genes Chromosomes Cancer* 34(1):24-32, 2002.
- Lazorchak AS**, Wojciechowski J, Dai M, Zhuang Y. E2A promotes the survival of precursor and mature B lymphocytes. *J Immunol* 177(4):2495-2504, 2006.
- Le Douarin NM**, **Jotereau FV**. Tracing of cells of the avian thymus through embryonic life in interspecific chimeras. *J Exp Med* 142:17-40, 1975.
- Lee BH**, Tothova Z, Levine RL, Anderson K, Buza-Vidas N, Cullen DE, McDowell EP, Adelsperger J, Fröhling S, Huntly BJ, Beran M, Jacobsen SE, Gilliland DG. FLT3 mutations confer enhanced proliferation and survival properties to multipotent progenitors in a murine model of chronic myelomonocytic leukemia. *Cancer Cell* 12(4):367-380, 2007.
- Lee BH**, Williams IR, Anastasiadou E, Boulton CL, Joseph SW, Amaral SM, Curley DP, Duclos N, Huntly BJ, Fabbro D, Griffin JD, Gilliland DG. FLT3 internal tandem duplication mutations induce myeloproliferative or lymphoid disease in a transgenic mouse model. *Oncogene* 24(53):7882-7892, 2005.
- Lerner C**, **Harrison DE**. 5-Fluorouracil spares hemopoietic stem cells responsible for long-term repopulation. *Exp Hematol* 18(2):114-118, 1990.
- Levanon D**, Goldstein RE, Bernstein Y, Tang H, Goldenberg D, Stifani S, Paroush Z, Groner Y. Transcriptional repression by AML1 and LEF-1 is mediated by the TLE/Groucho corepressors. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(20):11590-11595, 1998.
- Levanon D**, **Groner Y**. Structure and regulated expression of mammalian RUNX genes. *Oncogene* 23(24):4211-4219, 2004.
- Levis M**, **Small D**. FLT3: ITDoes matter in leukemia. *Leukemia* 17:1738-1752, 2003.

- Levis MJ**, Allebach J, Tse KF, Zheng R, Baldwin BR, Smith BD, Jones-Bolin S, Ruggeri B, Dionne C, Small D. FLT3-targeted inhibitors kill FLT3-dependent modeled cells, leukemia-derived cell lines, and primary AML blasts in vitro and in vivo. *Blood* 89:721a, 2001.
- Li L**, Piloto O, Nguyen HB, Greenberg K, Takamiya K, Racke F, Huso D, Small D. Knock-in of an internal tandem duplication mutation into murine FLT3 confers myeloproliferative disease in a mouse model. *Blood* 111:3849-3858, 2008.
- Linggi B**, Müller-Tidow C, van de Locht L, Hu M, Nip J, Serve H, Berdel WE, van der Reijden B, Quelle DE, Rowley JD, Cleveland J, Jansen JH, Pandolfi PP, Hiebert SW. The t(8;21) fusion protein, AML1 ETO, specifically represses the transcription of the p14(ARF) tumor suppressor in acute myeloid leukemia. *Nat Med* 8(7):743-750, 2002.
- Litzow MR**. More flitting about FLT3. *Blood* 106:3331-3332, 2005.
- Liu C**, Ueno T, Kuse S, Saito F, Nitta T, Piali L, Nakano H, Kakiuchi T, Lipp M, Hollander GA, Takahama Y. The role of CCL21 in recruitment of T-precursor cells to fetal thymi. *Blood* 105(1):31-9, 2005.
- Lorsbach R**, Moore J, Ang S, Sun WF, Lenny N, Downing J. Role of RUNX1 in adult hematopoiesis: analysis of RUNX-IRES-GFP knock-in mice reveals differential lineage expression. *Blood* 103:2522-2529, 2004.
- Lu R**, Medina K, Lancki D, Singh H. IRF-4,8 orchestrate the pre-B-to-B transition in lymphocyte development. *Genes and Development* 17:1703-1708, 2003.
- Lucas M**, Schachterle W, Oberle K, Aichele P, Diefenbach A. Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15. *Immunity* 26(4):503-517, 2007.
- Ludwig L**, Schulz AS, Janssen JWG, Grünwald K, Bartram CR. p53 mutations in myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 6:1302-1304, 1992.
- Lutterbach B**, **Hiebert S**. Role of the transcription factor AML1 in acute leukemia and hematopoietic differentiation. *Gene* 245:223-235, 2000.
- Lyman SD**, James L, Vanden Bos T, de Vries P, Brasel K, Gliniak B, Hollingsworth LT, Picha KS, McKenna HJ, Splett RR, Fletcher FA, Maraskovsky E, Farrah T, Foxworthe D, Williams DE, Beckmann MP. Molecular cloning of a ligand for the flt3/flk-2 tyrosine kinase receptor: a proliferative factor for primitive hematopoietic cells. *Cell* 75(6):1157-1167, 1993.
- Lyman SD**. Biology of flt3 ligand and receptor. *Int J Hematol* 62:63-73, 1995.
- Ma Q**, Jones D, Borghesani PR, Segal RA, Nagasawa T, Kishimoto T, Bronson RT, Springer TA. Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:9448-9453, 1998.
- Mackarechtschian K**, Hardin JD, Moore KA, Boast S, Goff SP, Lemischka IR. Targeted disruption of the flk2/flt3 gene leads to deficiencies in primitive hematopoietic progenitors. *Immunity* 3(1):147-161, 1995.
- Matheny CJ**, Speck ME, Cushing PR, Zhou Y, Corpora T, Regan M, Newman M, Roudaia L, Speck CL, Gu TL, Griffey SM, Bushweller JH, Speck NA. Disease mutations in RUNX1 and RUNX2 create nonfunctional, dominant-negative, or hypomorphic alleles. *EMBO J* 26(4):1163-1175, 2007.
- Matsuno N**, Osato M, Yamashita N, Yanagida M, Nanri T, Fukushima T, Motoji T, Kusumoto S, Towatari M, Suzuki R, Naoe T, Nishii K, Shigesada K, Ohno R, Mitsuya H, Ito Y, Asou N. Dual mutations in the AML1 and FLT3 genes are associated with leukemogenesis in acute myeloblastic leukemia of the M0 subtype. *Leukemia* 17(12):2492-2499, 2003.
- McGrath K**, **Palis J**. Hematopoiesis in the yolk sac: more than meets the eye. *Exp Hematol* 33:1021-1028, 2005.
- McKenna HJ**, Stocking KL, Miller RE, Brasel K, De Smedt T, Maraskovsky E, Maliszewski CR, Lynch DH, Smith J, Pulendran B, Roux ER, Teepe M, Lyman SD, Peschon JJ. Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood* 95(11):3489-3497, 2000.
- Medina KL**, **Singh H**. Genetic networks that regulate B-lymphopoiesis. *Curr Opin Hematol* 12:202-209, 2005.
- Medvinsky A**, **Dzierzak E**. Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell* 86(6):897-906, 1996.
- Michaud J**, Simpson KM, Escher R, Buchet-Poyau K, Beissbarth T, Carmichael C, Ritchie ME, Schütz F, Cannon P, Liu M, Shen X, Ito Y, Raskind WH, Horwitz MS, Osato M, Turner DR, Speed TP, Kavallaris M, Smyth GK, Scott HS. Integrative analysis of RUNX1 downstream pathways and target genes. *BMC Genomics* 9:363, 2008.
- Michaud J**, Wu F, Osato M, Cottles GM, Yanagida M, Asou N, Shigesada K, Ito Y, Benson KF, Raskind WH, Rossier C, Antonarakis SE, Israels S, McNicol A, Weiss H, Horwitz M, Scott HS. In vitro analyses of known and novel RUNX1/AML1 mutations in dominant familial platelet disorder with predisposition to acute myelogenous leukemia: implications for mechanisms of pathogenesis. *Blood* 99(4):1364-1372, 2002.

- Michie** AM, Carlyle JR, Schmitt TM, Ljutic B, Cho SK, Fong Q, Zuniga-Pflucker JC. Clonal characterization of a bipotent T cell and NK cell progenitor in the mouse fetal thymus. *J Immunol* 164(4):1730-1733, 2000.
- Mikhail** F, Sinha K, Sauntharajah Y, Nucifora G. Normal and transforming functions of RUNX1: a perspective. *J Cell Physiol* 207:582-593, 2006.
- Mikkola** HK, Klintman J, Yang H, Hock H, Schlaeger TM, Fujiwara Y, Orkin SH. Haematopoietic stem cells retain long-term repopulating activity and multipotency in the absence of stem-cell leukaemia SCL/tal-1 gene. *Nature* 421:547-551, 2003.
- Mikkola** HK, **Orkin** SH. The journey of developing hematopoietic stem cells. *Development* 133(19):3733-3744, 2006.
- Minelli** A, Maserati E, Rossi G, Bernardo ME, De Stefano P, Cecchini MP, Valli R, Albano V, Pierani P, Leszl A, Sainati L, Lo Curto F, Danesino C, Locatelli F, Pasquali F. Familial platelet disorder with propensity to acute myelogenous leukemia: genetic heterogeneity and progression to leukemia via acquisition of clonal chromosome anomalies. *Genes Chromosomes Cancer* 40(3):165-171, 2004.
- Miyamoto** T, Iwasaki H, Reizis B, Ye M, Graf T, Weissman IL, Akashi K. Myeloid or lymphoid promiscuity as a critical step in hematopoietic lineage commitment. *Dev Cell* 3:137-147, 2002.
- Miyoshi** H, Ohira M, Shimizu K, Mitani K, Hirai H, Imai T, Yokoyama K, Soeda E, Ohki M. Alternative splicing and genomic structure of the AML1 gene involved in acute myeloid leukemia. *Nucleic Acids Res* 23(14):2762-2769, 1995.
- Miyoshi** H, Shimizu K, Kozu T, Maseki N, Kaneko Y, Ohki M. t(8;21) breakpoints on chromosome 21 in acute myeloid leukemia are clustered within a limited region of a single gene, AML1. *Proc Natl Acad Sci USA* 88(23):10431-10434, 1991.
- Mizuki** M, Fenski R, Halfter H, Matsumura I, Schmidt R, Müller C, Grüning W, Kratz-Albers K, Serve S, Steur C, Büchner T, Kienast J, Kanakura Y, Berdel WE, Serve H. Flt3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways. *Blood* 96(12):3907-3914, 2000.
- Mizuki** M, Schwable J, Steur C, Choudhary C, Agrawal S, Sargin B, Steffen B, Matsumura I, Kanakura Y, Böhmer FD, Müller-Tidow C, Berdel WE, Serve H. Suppression of myeloid transcription factors and induction of STAT response genes by AML-specific Flt3 mutations. *Blood* 101(8):3164-3173, 2003.
- Moore** MA. Putting the neo into neoangiogenesis. *J Clin Invest* 109:313-315, 2002.
- Morita** S, Kojima T, Kitamura T. Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. *Gene Ther* 7:1063-1066, 2000.
- Morrison** SJ, Wandycz AM, Hemmati HD, Wright DE, Weissman IL. Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors. *Development* 124:1929-1939, 1997.
- Morrison** SJ, **Weissman** IL. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity* 1:661-673, 1994.
- Mrozek** K, Heerema NA, Bloomfield CD. Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Rev* 18:115-136, 2004.
- Mueller** BU, Pabst T, Osato M, Asou N, Johansen LM, Minden MD, Behre G, Hiddemann W, Ito Y, Tenen DG. Heterozygous PU.1 mutations are associated with acute myeloid leukemia. *Blood* 100(3):998-1007, 2002.
- Mukouyama** Y, Chiba N, Hara T, Okada H, Ito Y, Kanamaru R, Miyajima A, Satake M, Watanabe T. The AML1 transcription factor functions to develop and maintain hematogenic precursor cells in the embryonic aorta-gonad-mesonephros region. *Dev Biol* 220:27-36, 2000.
- Muller** AM, Medvinsky A, Strouboulis J, Grosveld F, Dzierzak E. Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo. *Immunity* 1:291-301, 1994.
- Mullighan** CG, Su X, Zhang J, Radtke I, Phillips LA, Miller CB, Ma J, Liu W, Cheng C, Schulman BA, Harvey RC, Chen IM, Clifford RJ, Carroll WL, Reaman G, Bowman WP, Devidas M, Gerhard DS, Yang W, Relling MV, Shurtleff SA, Campana D, Borowitz MJ, Pui CH, Smith M, Hunger SP, Willman CL, Downing JR; Children's Oncology Group. Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 360(5):470-480, 2009. (b)
- Mullighan** CG, Zhang J, Harvey RC, Collins-Underwood JR, Schulman BA, Phillips LA, Tasian SK, Loh ML, Su X, Liu W, Devidas M, Atlas SR, Chen IM, Clifford RJ, Gerhard DS, Carroll WL, Reaman GH, Smith M, Downing JR, Hunger SP, Willman CL. JAK mutations in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(23):9414-9418, 2009. (a)
- Mulloy** JC, Cammenga J, MacKenzie KL, Berguido FJ, Moore MA, Nimer SD. The AML1-ETO fusion protein promotes the expansion of human hematopoietic stem cells. *Blood* 99(1):15-23, 2002.
- Nagasawa** T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa S, Kitamura Y, Yoshida N, Kikutani H, Kishimoto T. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature* 382:635-638, 1996.

- Nakagawa T**, Saitoh S, Imoto S, Ito M, Tsutsumi M, Hikiji K, Nakao Y, Fujita T. Loss of multiple point mutations of ras genes associated with acquisition of chromosomal abnormalities during disease progression in myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol* 77:250-252, 1991.
- Nakano Y**, Kiyoi H, Miyawaki S, Asou N, Ohno R, Saito H, Naoe T. Molecular evolution of acute myeloid leukaemia in relapse: unstable N-ras and FLT3 genes compared with p53 gene. *Br J Haematol* 104(4):659-664, 1999.
- Nakao M**, Horiike S, Fukushima-Nakase Y, Nishimura M, Fujita Y, Taniwaki M, Okuda T. Novel loss-of-function mutations of the haematopoiesis-related transcription factor, acute myeloid leukaemia 1/runt-related transcription factor 1, detected in acute myeloblastic leukaemia and myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol* 125(6):709-719, 2004.
- Nakao M**, Yokota S, Iwai T, Kaneko H, Horiike S, Kashima K, Sonoda Y, Fujimoto T, Misawa S. Internal tandem duplication of the *flt3* gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 12:1911-1918, 1996.
- Nakauchi H**, Sudo K, Ema H. Quantitative assessment of the stem cell selfrenewal capacity. *Ann N Y Acad Sci* 938:18-24, 2001.
- Nakorn TN**, Miyamoto T, Weissman IL. Characterization of mouse clonogenic megakaryocyte progenitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:205-210, 2003.
- Naoe T**, Kiyoe H, Yamamoto Y, Minami Y, Yamamoto K, Ueda R, Saito H. FLT3 tyrosine kinase as a target molecule for selective antileukemia therapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 48 Suppl 1:S27-30, 2001.
- Nebral K**, Denk D, Attarbaschi A, König M, Mann G, Haas OA, Strehl S. Incidence and diversity of PAX5 fusion genes in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1:134-143, 2009.
- Negishi I**, Motoyama N, Nakayama K, Nakayama K, Senju S, Hatakeyama S, Zhang Q, Chan AC, Loh DY. Essential role for ZAP-70 in both positive and negative selection of thymocytes. *Nature* 376(6539):435-438, 1995.
- Niebuhr B**, Fischer M, Täger M, Cammenga J, Stocking C. Gatekeeper function of the RUNX1 transcription factor in acute leukemia. *Blood Cells Mol Dis* 40(2):211-218, 2008.
- Niimi H**, Harada H, Harada Y, Ding Y, Imagawa J, Inaba T, Kyo T, Kimura A. Hyperactivation of the RAS signaling pathway in myelodysplastic syndrome with AML1/RUNX1 point mutations. *Leukemia* 20(4):635-644, 2006.
- Niïro H**, Clark EA. Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nat Rev Immunol* 2:945-956, 2002.
- Niki M**, Okada H, Takano H, Kuno J, Tani K, Hibino H, Asano S, Ito Y, Satake M, Noda T. Hematopoiesis in the fetal liver is impaired by targeted mutagenesis of a gene encoding a non-DNA binding subunit of the transcription factor, polyomavirus enhancer binding protein 2/core binding factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:5697-5702, 1997.
- Nishimoto N**, Imai Y, Ueda K, Nakagawa M, Shinohara A, Ichikawa M, Nannya Y, Kurokawa M. T cell acute lymphoblastic leukemia arising from familial platelet disorder. *Int J Hematol* 92(1):194-197, 2010.
- North T**, Stacy T, Matheny C, Speck N, de Bruijn M. Runx1 is expressed in adult mouse hematopoietic stem cells and differentiating myeloid and lymphoid cells, but not in maturing erythroid cells. *Stem Cells* 22:158-168, 2004.
- Nutt SL**, Kee BL. The transcriptional regulation of B cell lineage commitment. *Immunity* 26(6):715-725, 2007.
- Nutt SL**, Metcalf D, D'Amico A, Polli M, Wu L. Dynamic regulation of PU.1 expression in multipotent hematopoietic progenitors. *J Exp Med* 201:221-231, 2005.
- Okuda T**, Cai Z, Yang S, Lenny N, Lyu CJ, van Deursen JM, Harada H, Downing JR. Expression of a knocked-in AML1-ETO leukemia gene inhibits the establishment of normal definitive hematopoiesis and directly generates dysplastic hematopoietic progenitors. *Blood* 91(9):3134-3143, 1998.
- Okuda T**, van Deursen J, Hiebert SW, Grosveld G, Downing JR. AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell* 84:321-330, 1996.
- Ono R**, Nakajima H, Ozaki K, Kumagai H, Kawashima T, Taki T, Kitamura T, Hayashi Y, Nosaka T. Dimerization of MLL fusion proteins and FLT3 activation synergize to induce multiple-lineage leukemogenesis. *J Clin Invest* 115:919-929, 2005.
- Orkin SH**, Zon LI. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* 132(4):631-644, 2008.
- Osato M**, Asou N, Abdalla E, Hoshino K, Yamasaki H, Okubo T, Suzushima H, Takatsuki K, Kanno T, Shigesada K, Ito Y. Biallelic and heterozygous point mutations in the runt domain of the AML1/PEBP2alphaB gene associated with myeloblastic leukemias. *Blood* 93(6):1817-1824, 1999.
- Osato M**. Point mutations in the RUNX1/AML1 gene: another actor in RUNX leukemia. *Oncogene* 23(24):4284-4296, 2004.

- Owen** CJ, Toze CL, Koochin A, Forrest DL, Smith CA, Stevens JM, Jackson SC, Poon MC, Sinclair GD, Leber B, Johnson PR, Macheta A, Yin JA, Barnett MJ, Lister TA, Fitzgibbon J. Five new pedigrees with inherited RUNX1 mutations causing familial platelet disorder with propensity to myeloid malignancy. *Blood* 112(12):4639-4645, 2008.
- Owen** JJ, **Ritter** MA. Tissue interaction in the development of thymus lymphocytes. *J Exp Med* 129:431-442, 1969.
- Pabst** T, Eyholzer M, Haefliger S, Schardt J, Mueller BU. Somatic CEBPA mutations are a frequent second event in families with germline CEBPA mutations and familial acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 26(31):5088-5093, 2008.
- Parcells** BW, Ikeda AK, Simms-Waldreip T, Moore TW, Sakamoto KN. FMS-like tyrosine kinase 3 in normal hematopoiesis and acute myeloid leukemia. *Stem cells* 24:10174-11184, 2006.
- Park** I, Qian D, Kiel M, Becker M, Pihalja M, Weissman I, Morrison S, Clarke M. Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature* 423:302-305, 2003.
- Passegue** E, **Ernst** P. IFN-alpha wakes up sleeping hematopoietic stem cells. *Nat Med* 15(6):612-613, 2009.
- Passegue** E, Jamieson CH, Ailles LE, Weissman IL. Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc Natl Acad Sci USA* 100 Suppl 1:11842-11849, 2003.
- Passegue** E, Jochum W, Schorpp-Kistner M, Möhle-Steinlein U, Wagner EF. Chronic myeloid leukemia with increased granulocyte progenitors in mice lacking junB expression in the myeloid lineage. *Cell* 104(1):21-32, 2001.
- Paulsson** K, Horvat A, Strömbeck B, Nilsson F, Heldrup J, Behrendtz M, Forestier E, Andersson A, Fioretos T, Johansson B. Mutations of FLT3, NRAS, KRAS, and PTPN11 are frequent and possibly mutually exclusive in high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 47(1):26-33, 2008.
- Payne** KJ, **Crooks** GM. Immune-cell lineage commitment: translation from mice to humans. *Immunity* 26(6):674-677, 2007.
- Pear** W, Nolan G, Scott M, Baltimore D. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:8392-8396, 1993.
- Pearse** M, Wu L, Egerton M, Wilson A, Shortman K, Scollay R. A murine early thymocyte developmental sequence is marked by transient expression of the interleukin 2 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 86(5):1614-1618, 1989.
- Peschon** JJ, Morrissey PJ, Grabstein KH, Ramsdell FJ, Maraskovsky E, Gliniak BC, Park LS, Ziegler SF, Williams DE, Ware CB, Meyer JD, Davison BL. Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J Exp Med* 180(5):1955-1960, 1994.
- Petrovick** MS, Hiebert SW, Friedman AD, Hetherington CJ, Tenen DG, Zhang DE. Multiple functional domains of AML1: PU.1 and C/EBPalpha synergize with different regions of AML1. *Mol Cell Biol* 18(7):3915-3925, 1998.
- Petzer** A, Zandstra P, Piret J, Eaves CJ. Differential cytokine effects on primitive (CD34+CD38-) human hematopoietic cells: novel responses to Flt3-ligand and thrombopoietin. *J Exp Med* 183:2551-2558, 1996.
- Pinheiro** RF, Moreira Ede S, Silva MR, Greggio B, Alberto FL, Chauffaille Mde L. FLT3 mutation and AML/ETO in a case of Myelodysplastic syndrome in transformation corroborates the two hit model of leukemogenesis. *Leuk Res* 31(7):1015-1018, 2007.
- Porcher** C, Swat W, Rockwell K, Fujiwara Y, Alt F, Orkin S. The T cell leukemia oncoprotein SCL/tal-1 is essential for development of all hematopoietic lineages. *Cell* 86:47-57, 1996.
- Preudhomme** C, Renneville A, Bourdon V, Philippe N, Roche-Lestienne C, Boissel N, Dhedin N, Andre JM, Cornillet-Lefebvre P, Baruchel A, Mozziconacci MJ, Sobol H. High frequency of RUNX1 biallelic alteration in acute myeloid leukemia secondary to familial platelet disorder. *Blood* 113:5583-5587, 2009.
- Preudhomme** C, Warot-Loze D, Roumier C, Gardel-Duflos N, Garand R, Lai JL, Dastugue N, Macintyre E, Denis C, Bauters F, Kerckaert JP, Cosson A, Fenaux P. High incidence of biallelic point mutations in the Runt domain of the AML1/PEBP2 alpha B gene in Mo acute myeloid leukemia and in myeloid malignancies with acquired trisomy 21. *Blood* 96(8):2862-2869, 2000.
- Pronk** CJ, Rossi DJ, Mansson R, Attema JL, Norddahl GL, Chan CK, Sigvardsson M, Weissman IL, Bryder D. Elucidation of the phenotypic, functional, and molecular topography of a myeloerythroid progenitor cell hierarchy. *Cell Stem Cell* 1(4):428-442, 2007.
- Prosser** HM, Wotton D, Gegonne A, Ghysdael J, Wang S, Speck NA, Owen MJ. A phorbol ester response element within the human T-cell receptor beta-chain enhancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 89(20):9934-9938, 1992.
- Pui** CH, Relling MV, Downing JR. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 350:1535-1548, 2004.

- Pui** JC, Allman D, Xu L, DeRocco S, Karnell FG, Bakkour S, Lee JY, Kadesch T, Hardy RR, Aster JC, Pear WS. Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination. *Immunity* 11(3):299-308, 1999.
- Putz** G, Rosner A, Nuesslein I, Schmitz N, Buchholz F. AML1 deletion in adult mice causes splenomegaly and lymphomas. *Oncogene* 25(6):929-939, 2006.
- Radley** JM, **Scurfield** G. Effects of 5-fluorouracil on mouse bone marrow. *Br J Haematol* 43(3):341-351, 1979.
- Radomska** HS, Basseres DS, Zheng R, Zhang P, Dayaram T, Yamamoto Y, Sternberg DW, Lokker N, Giese NA, Bohlander SK, Schnittger S, Delmotte MH, Davis RJ, Small D, Hiddemann W, Gilliland DG, Tenen DG. Block of C/EBP alpha function by phosphorylation in acute myeloid leukemia with FLT3 activating mutations. *J Exp Med* 203(2):371-381, 2006.
- Radtke** F, Wilson A, Mancini S, MacDonald H. Notch regulation of lymphocyte development and function. *Nat Immunol* 5:247-253, 2004.
- Radtke** F, Wilson A, Stark G, Bauer M, van Meerwijk J, MacDonald HR, Aguet M. Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity* 10(5):547-558, 1999.
- Raulet** DH, Garman RD, Saito H, Tonegawa S. Developmental regulation of T-cell receptor gene expression. *Nature* 314:103-107, 1985.
- Reindl** C, Bagrintseva K, Vempati S, Schnittger S, Ellwart JW, Wenig K, Hopfner KP, Hiddemann W, Spiekermann K. Point mutations in the juxtamembrane domain of FLT3 define a new class of activating mutations in AML. *Blood* 107:3700-3707, 2006.
- Renneville** A, Roumier C, Biggio V, Nibourel O, Boissel N, Fenaux P, Preudhomme C. Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: A review of the literature. *Leukemia* 22, 915-931, 2008.
- Ripperger** T, Steinemann D, Göhring G, Finke J, Niemeyer CM, Strahm B, Schlegelberger B. A novel pedigree with heterozygous germline RUNX1 mutation causing familial MDS-related AML: can these families serve as a multistep model for leukemic transformation? *Leukemia* 23(7):1364-1366, 2009.
- Robin** C, Ottersbach K, de Bruijn M, Ma X, van der Horn K, Dzierzak E. Developmental origins of hematopoietic stem cells. *Oncol Res* 13:315-321, 2003.
- Robin** C, Ottersbach K, Durand C, Peeters M, Vanes L, Tybulewicz V, Dzierzak E. An unexpected role for IL-3 in the embryonic development of hematopoietic stem cells. *Dev Cell* 11:171-180, 2006.
- Romana** SP, Mauchauffe M, Le Coniat M, Chumakov I, Le Paslier D, Berger R, Bernard OA. The t(12;21) of acute lymphoblastic leukemia results in a tel-AML1 gene fusion. *Blood* 85(12):3662-3670, 1995. (a)
- Romana** SP, Poirel H, Leconiat M, Flexor MA, Mauchauffe M, Jonveaux P, Macintyre EA, Berger R, Bernard OA. High frequency of t(12;21) in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 86(11):4263-4269, 1995. (b)
- Rosenbauer** F, Owens BM, Yu L, Tumang JR, Steidl U, Kutok JL, Clayton LK, Wagner K, Scheller M, Iwasaki H, Liu C, Hackanson B, Akashi K, Leutz A, Rothstein TL, Plass C, Tenen DG. Lymphoid cell growth and transformation are suppressed by a key regulatory element of the gene encoding PU.1. *Nat Genet* 38(1):27-37, 2006.
- Rosenbauer** F, **Tenen** DG. Transcription factors in myeloid development: balancing differentiation with transformation. *Nat Rev Immunol* 7(2):105-117, 2007.
- Rosenbauer** F, Wagner K, Kutok JL, Iwasaki H, Le Beau MM, Okuno Y, Akashi K, Fiering S, Tenen DG. Acute myeloid leukemia induced by graded reduction of a lineage-specific transcription factor, PU.1. *Nat Genet* 36(6):624-630, 2004.
- Rosnet** O, Schiff C, Pebusque MJ, Marchetto S, Tonnelles C, Toiron Y, Birg F, Birnbaum D. Human FLT3/FLK2 gene: cDNA cloning and expression in hematopoietic cells. *Blood* 82(4):1110-1119, 1993.
- Roudaia** L, Cheney MD, Manuylova E, Chen W, Morrow M, Park S, Lee CT, Kaur P, Williams O, Bushweller JH, Speck NA. CBFbeta is critical for AML1-ETO and TEL-AML1 activity. *Blood* 113(13):3070-3079, 2009.
- Roumier** C, Eclache V, Imbert M, Davi F, MacIntyre E, Garand R, Talmant P, Lepelley P, Lai JL, Casasnovas O, Maynadie M, Mugneret F, Bilhou-Naberra C, Valensi F, Radford I, Mozziconacci MJ, Arnoulet C, Duchayne E, Dastugue N, Cornillet P, Daliphard S, Garnache F, Boudjerra N, Jouault H, Fenneteau O, Pedron B, Berger R, Flandrin G, Fenaux P, Preudhomme C; Groupe Francais de Cytogenetique Hematologique (GFCH); Groupe Français d'Hematologie Cellulaire (GFHC). M0 AML, clinical and biologic features of the disease, including AML1 gene mutations: a report of 59 cases by the Groupe Francais d'Hematologie Cellulaire (GFHC) and the Groupe Francais de Cytogenetique Hematologique (GFCH). *Blood* 101(4):1277-1283, 2003. (b)
- Roumier** C, Fenaux P, Lafage M, Imbert M, Eclache V, Preudhomme C. New mechanisms of AML1 gene alteration in hematological malignancies. *Leukemia* 17(1):9-16, 2003. (a)

- Roumier C**, Lejeune-Dumoulin S, Renneville A, Goethgeluck AS, Philippe N, Fenaux P, Preudhomme C. Cooperation of activating Ras/rtk signal transduction pathway mutations and inactivating myeloid differentiation gene mutations in M0 AML: a study of 45 patients. *Leukemia* 20(3):433-436, 2006.
- Sakaguchi S**. Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Ann Rev Immunol* 22:531-562, 2004.
- Sambandam A**, Maillard I, Zediak VP, Xu L, Gerstein RM, Aster JC, Pear WS, Bhandoola A. Notch signaling controls the generation and differentiation of early T lineage progenitors. *Nat Immunol* 6(7):663-70, 2005.
- Sambrook J**, **Russell DW**. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001.
- Samokhvalov IM**, Samokhvalova NI, Nishikawa S. Cell tracing shows the contribution of the yolk sac to adult haematopoiesis. *Nature* 446:1056-1061, 2007.
- Santoro A**, Bica MG, Dagnino L, Agueli C, Salemi D, Cannella S, Veltroni M, Cetica V, Giarin E, Fabbiano F, Basso G, Arico M. Altered mRNA expression of PAX5 is a common event in acute lymphoblastic leukemia. *Br J Hematol* 146(6):686-689, 2009.
- Sauer B**, **Henderson N**. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci USA* 85(14):5166-5170, 1988.
- Sauvageau G**, Thorsteinsdottir U, Eaves C, Lawrence H, Largman C, Lansdorp P, Humphries R. Overexpression of HOXB4 in hematopoietic cells causes the selective expansion of more primitive populations in vitro and in vivo. *Genes Dev* 9:1753-1765, 1995.
- Schessl C**, Rawat VP, Cusan M, Deshpande A, Kohl TM, Rosten PM, Spiekermann K, Humphries RK, Schnittger S, Kern W, Hiddemann W, Quintanilla-Martinez L, Bohlander SK, Feuring-Buske M, Buske C. The AML1-ETO fusion gene and the FLT3 length mutation collaborate in inducing acute leukemia in mice. *J Clin Invest* 115(8):2159-2168, 2005.
- Schmidt-Arras D**, Böhmer SA, Koch S, Müller JP, Blei L, Cornils H, Bauer R, Korasikha S, Thiede C, Böhmer FD. Anchoring of FLT3 in the endoplasmic reticulum alters signaling quality. *Blood* 113(15):3568-3576, 2009.
- Schwieger M**, Lohler J, Fischer M, Herwig U, Tenen DG, Stocking C. 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, 2004.
- Schwieger M**, Lohler J, Friel J, Scheller M, Horak I, Stocking C. AML-ETO inhibits maturation of multiple lymphohematopoietic lineages and induces myeloblast transformation in synergy with ICSPB deficiency. *J Exp Med* 196:1227-1240, 2002.
- Scollay RG**, Butcher EC, Weissman IL. Thymus cell migration. Quantitative aspects of cellular traffic from the thymus to the periphery in mice. *Eur J Immunol* 10:210-218, 1980.
- Scott EW**, Fisher RC, Olson MC, Kehrl EW, Simon MC, Singh H. PU.1 functions in a cell-autonomous manner to control the differentiation of multipotential lymphoid-myeloid progenitors. *Immunity* 6(4):437-447, 1997.
- Sen GC**, **Ransohoff RM**. Interferon-induced antiviral actions and their regulation. *Adv Virus Res* 42:57-102, 1993.
- Shen FW**, Tung JS, Boyse EA. Further definition of the Ly-5 system. *Immunogenetics* 24:146-149, 1986.
- Shih LY**, Huang CF, Wu JH, Lin TL, Dunn P, Wang PN, Kuo MC, Lai CL, Hsu HC. 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(7):2387-2392, 2002.
- Shinawi M**, Erez A, Shardy DL, Lee B, Naeem R, Weissenberger G, Chinault AC, Cheung SW, Plon SE. Syndromic thrombocytopenia and predisposition to acute myelogenous leukemia caused by constitutional microdeletions on chromosome 21q. *Blood* 112(4):1042-1047, 2008.
- Shinkai Y**, Koyasu S, Nakayama K, Murphy KM, Loh DY, Reinherz EL, Alt FW. Restoration of T cell development in RAG-2-deficient mice by functional TCR transgenes. *Science* 259(5096):822-825, 1993.
- Shinkai Y**, Rathbun G, Lam KP, Oltz EM, Stewart V, Mendelsohn M, Charron J, Datta M, Young F, Stall AM, Alt FW. RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 68(5):855-867, 1992.
- Shivdasani RA**, Mayer EL, Orkin SH. Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncogene tal-1/SCL. *Nature* 373:432-434, 1995.
- Shores EW**, van Ewijk W, Singer A. Disorganization and restoration of thymic medullary epithelial cells in T cell receptor-negative scid mice: evidence that receptor-bearing lymphocytes influence maturation of the thymic microenvironment. *Eur J Immunol* 21:1657-1661, 1991.
- Silva FP**, Lind A, Brouwer-Mandema G, Valk PJ, Giphart-Gassler M. Trisomy 13 correlates with RUNX1 mutation and increased FLT3 expression in AML-M0 patients. *Haematologica* 92(8):1123-1126, 2007.

- Silva** FP, Morolli B, Storlazzi CT, Anelli L, Wessels H, Bezrookove V, Kluin-Nelemans HC, Giphart-Gassler M. Identification of RUNX1/AML1 as a classical tumor suppressor gene. *Oncogene* 22(4):538-547, 2003.
- Silva** FP, Swagemakers SM, Erpelinck-Verschueren C, Wouters BJ, Delwel R, Vrieling H, van der Spek P, Valk PJ, Giphart-Gassler M. Gene expression profiling of minimally differentiated acute myeloid leukemia: M0 is a distinct entity subdivided by RUNX1 mutation status. *Blood* 114(14):3001-3007, 2009.
- Sitnicka** E, Bryder D, Theilgaard-Monch K, Buza-Vidas N, Adolfosson J, Jacobsen SE. 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, 2002.
- Sitnicka** E, Buza-Vidas N, Ahlenius H, Cilio CM, Gekas C, Nygren JM, Mansson R, Cheng M, Jensen CT, Svensson M, Leandersson K, Agace WW, Sigvardsson M, Jacobsen SE. Critical role of FLT3 ligand in IL-7 receptor independent T lymphopoiesis and regulation of lymphoid-primed multipotent progenitors. *Blood* 110(8):2955-2964, 2007.
- Sitnicka** E, Buza-Vidas N, Larsson S, Nygren JM, Liuba K, Jacobsen SE. 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, 2003.
- Small** D. FLT3 mutations: biology and treatment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 178-184, 2006.
- Song** WJ, Sullivan MG, Legare RD, Hutchings S, Tan X, Kufrin D, Ratajczak J, Resende IC, Haworth C, Hock R, Loh M, Felix C, Roy DC, Busque L, Kurnit D, Willman C, Gewirtz AM, Speck NA, Bushweller JH, Li FP, Gardiner K, Poncz M, Maris JM, Gilliland DG. Haploinsufficiency of CBFA2 causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia. *Nat Genet* 23(2):166-175, 1999.
- Souabni** A, Cobaleda C, Schebesta M, Busslinger M. Pax5 promotes B lymphopoiesis and blocks T cell development by repressing Notch1. *Immunity* 17(6):781-793, 2002.
- Spangrude** GJ, Heimfeld S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 241(4861):58-62, 1988.
- Speck** NA, **Gilliland** DG. Core-binding factors in haematopoiesis and leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2(7):502-513, 2002.
- Srour** EF, Jetmore A, Wolber FM, Plett PA, Abonour R, Yoder MC, Orschell-Traycoff CM. Homing, cell cycle kinetics and fate of transplanted hematopoietic stem cells. *Leukemia* 15(11):1681-1684, 2001.
- Staal** F, **Clevers** H. WNT signalling and haematopoiesis: aWNT-WNT situation. *Nat Rev Immunol* 5:21-30, 2005.
- Staheli** P, Danielson P, Haller O, Sutcliffe JG. Transcriptional activation of the mouse Mx gene by type I interferon. *Mol Cell Biol* 6(12):4770-4774, 1986.
- Steensma** DP, Gibbons RJ, Mesa RA, Tefferi A, Higgs DR. Somatic point mutations in RUNX1/CBFA2/AML1 are common in high-risk myelodysplastic syndrome, but not in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Eur J Haematol* 74(1):47-53, 2005.
- Sternberg** N, **Hamilton** D. Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J Mol Biol* 150(4):467-486, 1981.
- Stirewalt** DL, **Radich** JP. The role of FLT3 in haematopoietic malignancies. *Nat Rev Cancer* 3(9):650-665, 2003.
- Stocking** C, Grez M, Ostertag W. Regulation of retrovirus infection and expression in embryonic and hematopoietic stem cells. In Doerfler und Boehm (Herausgeber), *Virus Strategies*, Seiten 433-455, VCH-Verlag, Heidelberg, 1993.
- Stopka** T, Amanatullah DF, Papetti M, Skoultschi AI. PU.1 inhibits the erythroid program by binding to GATA-1 on DNA and creating a repressive chromatin structure. *EMBO J* 24(21):3712-3723, 2005.
- Stubbs** MC, Kim YM, Krivtsov AV, Wright RD, Feng Z, Agarwal J, Kung AL, Armstrong SA. MLL-AF9 and FLT3 cooperation in acute myelogenous leukemia: development of a model for rapid therapeutic assessment. *Leukemia* 22:66-77, 2008.
- Sun** L, Mao G, Rao AK. Association of CBFA2 mutation with decreased platelet PKC-theta and impaired receptor-mediated activation of GPIIb-IIIa and pleckstrin phosphorylation: proteins regulated by CBFA2 play a role in GPIIb-IIIa activation. *Blood* 103:948-954, 2004.
- Sun** W, **Downing** J. Haploinsufficiency of AML1 results in a decrease in the number of LTR-HSCs while simultaneously inducing an increase in more mature progenitors. *Blood* 104:3565-3572, 2004.
- Suzow** J, **Friedman** A. The murine myeloperoxidase promoter contains several functional elements, one of which binds a cell type-restricted transcription factor, myeloid nuclear factor1 (myfn1). *Mol Cell Biol* 13:2141-2151, 1993.

- Szymanska** H, Sitarz M, Krysiak E, Piskorowska J, Czarnomska A, Skurzak H, Hart AA, de Jong D, Demant P. Genetics of susceptibility to radiation-induced lymphomas, leukemias and lung tumors studied in recombinant congenic strains. *Int J Cancer* 83:674-678, 1999.
- Tahirov** TH, Inoue-Bungo T, Morii H, Fujikawa A, Sasaki M, Kimura K, Shiina M, Sato K, Kumasaka T, Yamamoto M, Ishii S, Ogata K. Structural analyses of DNA recognition by the AML1/Runx-1 Runt domain and its allosteric control by CBFbeta. *Cell* 104(5):755-767, 2001.
- Takahama** Y. Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat Rev Immunol* 6(2):127-135, 2006.
- Taketani** T, Taki T, Sugita K, Furuichi Y, Ishii E, Hanada R, Tsuchida M, Ida K, Hayashi Y. 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(3):1085-1088, 2004.
- Taketani** T, Taki T, Takita J, Tsuchida M, Hanada R, Hongo T, Kaneko T, Manabe A, Ida K, Hayashi Y. AML1/RUNX1 mutations are infrequent, but related to AML-M0, acquired trisomy 21, and leukemic transformation in pediatric hematologic malignancies. *Genes Chromosomes Cancer* 38(1):1-7, 2003.
- Tan** JB, Visan I, Yuan JS, Guidos CJ. Requirement for Notch1 signals at sequential early stages of intrathymic T cell development. *Nat Immunol* 6(7):671-679, 2005.
- Tang** JL, Hou HA, Chen CY, Liu CY, Chou WC, Tseng MH, Huang CF, Lee FY, Liu MC, Yao M, Huang SY, Ko BS, Hsu SC, Wu SJ, Tsay W, Chen YC, Lin LI, Tien HF. AML1/RUNX1 mutations in 470 adult patients with de novo acute myeloid leukemia: prognostic implication and interaction with other gene alterations. *Blood* 114(26):5352-5361, 2009.
- Tang** YY, Crute BE, Kelley JJ, Huang X, Yan J, Shi J, Hartman KL, Laue TM, Speck NA, Bushweller JH. Biophysical characterization of interactions between the core binding factor a and b subunits and DNA. *FEBS Lett* 470:167-172, 2000.
- Taniguchi** T, Ogasawara K, Takaoka A, Tanaka N. IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annu Rev Immunol* 19:632-655, 2001.
- Taniuchi** I, Osato M, Egawa T, Sunshine MJ, Bae SC, Komori T, Ito Y, Littman DR. Differential requirements for Runx proteins in CD4 repression and epigenetic silencing during T lymphocyte development. *Cell* 111:621-633, 2002.
- Tavian** M, **Peault** B. The changing cellular environments of hematopoiesis in human development in utero. *Exp Hematol* 33:1062-1069, 2005.
- Tenen** DG, Hromas R, Licht JD, Zhang DE. Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia. *Blood* 90(2):489-519, 1997.
- Tenen** DG. Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way. *Nat Rev Cancer* 3(2):89-101, 2003.
- Tonks** A, Pearn L, Tonks AJ, Pearce L, Hoy T, Phillips S, Fisher J, Downing JR, Burnett AK, Darley RL. The AML1-ETO fusion gene promotes extensive self-renewal of human primary erythroid cells. *Blood* 101(2):624-632, 2003.
- Tsai** F, Keller G, Kuo F, Weiss M, Chen J, Rosenblatt M, Alt F, Orkin S. An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature* 371:221-226, 1994.
- Tse** KF, Novelli E, Civin CI, Bohmer FD, Small D. Inhibition of FLT3-mediated transformation by use of a tyrosine kinase inhibitor. *Leukemia* 15:1001-1010, 2001.
- Uren** AG, Kool J, Berns A, van Lohuizen M. Retroviral insertional mutagenesis: past, present and future. *Oncogene* 24(52):7656-72, 2005.
- Ushiki** T. A scanning electron-microscopic study of the rat thymus with special reference to cell types and migration of lymphocytes into the general circulation. *Cell Tissue Res* 244:285-298, 1986.
- van Ewijk** W, Shores EW, Singer A. Crosstalk in the mouse thymus. *Immunol Today* 15:214-217, 1994.
- van Oers** NS, Lowin-Kropf B, Finlay D, Connolly K, Weiss A. $\alpha\beta$ T-cell development is abolished in mice lacking both Lck and Fyn protein tyrosine kinases. *Immunity* 5:429-436, 1996.
- van Oers** NS, von Boehmer H, Weiss A. The pre-T-cell receptor (TCR) complex is functionally coupled to the TCR- ζ subunit. *J Exp Med* 182:1585-1590, 1995.
- Vardiman** JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the neoplasms. *Blood* 101:2895-2896, 2003.
- Varnum-Finney** B, Xu L, Brashem-Stein C, Nourigat C, Flowers D, Bakkour S, Pear W, Bernstein I. Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling. *Nat Med* 6:1278-1281, 2000.
- Vogelstein** B, Kinzler K. The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 9:138-141, 1993.
- von Boehmer** H, **Fehling** HJ. Structure and function of the pre-T cell receptor. *Annu Rev Immunol* 15:433-452, 1997.
- von Freuden-Jeffry** U, Vieira P, Lucian LA, McNeil T, Burdach SE, Murray R. Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J Exp Med* 181:1519-1526, 1995.

- Vradii D**, Zaidi S, Lian J, van Wijnen A, Stein J, Stein G. Point mutation in AML1 disrupts subnuclear targeting, prevents myeloid differentiation, and effects a transformation-like phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102:7174-7179, 2005.
- Walker LC**, Stevens J, Campbell H, Corbett R, Spearing R, Heaton D, Macdonald DH, Morris CM, Ganly P. A novel inherited mutation of the transcription factor RUNX1 causes thrombocytopenia and may predispose to acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 117(4):878-881, 2002.
- Wang L**, Huang G, Zhao X, Hatlen MA, Vu L, Liu F, Nimer SD. Post-translational modifications of Runx1 regulate its activity in the cell. *Blood Cells Mol Dis* 43(1):30-34, 2009.
- Wang L**, **Speck NA**. Purification of core-binding factor, a protein that binds the conserved core site in murine leukemia virus enhancers. *Mol Cell Biol* 12:89-102, 1992.
- Wang L**, Swat W, Fujiwara Y, Davidson L, Visvader J, Kuo F, Alt F, Gilliland D, Golub T, Orkin S. The TEL/ETV6 gene is required specifically for hematopoiesis in the bone marrow. *Genes Dev* 12:2392-2402, 1998.
- Wang Q**, Stacy T, Miller J, Lewis A, Gu T, Huang X, Bushweller J, Bories J, Alt F, Liu GRP, Wynshaw-Boris A, Binder M, Marin-Padilla M, Sharpe A, Speck NA. The CBFbeta subunit is essential for CBFalpha2 (AML1) function in vivo. *Cell* 87:697-708, 1996.
- Warner JK**, Wang JC, Hope KJ, Jin L, Dick JE. Concepts of human leukemic development. *Oncogene* 23(43):7164-7177, 2004.
- Watanabe N**, Wang YH, Lee HK, Ito T, Wang YH, Cao W, Liu YJ. Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus. *Nature* 436(7054):1181-1185, 2005.
- Watanabe-Okochi N**, Kitaura J, Ono R, Harada H, Harada Y, Komeno Y, Nakajima H, Nosaka T, Inaba T, Kitamura T. AML1 mutations induced MDS and MDS/AML in a mouse BMT model. *Blood* 111(8):4297-4308, 2008.
- Weissman IL**, **Shizuru JA**. The origins of the identification and isolation of hematopoietic stem cells, and their capability to induce donor-specific transplantation tolerance and treat autoimmune diseases. *Blood* 112(9):3543-3553, 2008.
- Weissman IL**. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 100:157-168, 2000.
- Westendorf JJ**, Yamamoto CM, Lenny N, Downing JR, Selsted ME, Hiebert SW. The t(8;21) fusion product, AML-1-ETO, associates with C/EBP-alpha, inhibits C/EBP-alpha-dependent transcription, and blocks granulocytic differentiation. *Mol Cell Biol* 18(1):322-333, 1998.
- Williams BR**. Transcriptional regulation of interferon-stimulated genes. *Eur J Biochem* 200(1):1-11, 1991.
- Wilson A**, Laurenti E, Oser G, van der Wath RC, Blanco-Bose W, Jaworski M, Offner S, Dunant CF, Eshkind L, Bockamp E, Lio P, Macdonald HR, Trumpp A. Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell* 135(6):1118-1129, 2008.
- Wilson A**, Macdonald HR, Radtke F. Notch-1-deficient common lymphoid precursors adopt a B-cell fate in the thymus. *J Exp Med* 194:1003-1012, 2001.
- Wolf E**, Xiao C, Fainaru O, Lotem J, Rosen D, Negreanu V, Bernstein Y, Goldenberg D, Brenner O, Berke G, Levanon D, Groner Y. Runx3 and Runx1 are required for CD8 T cell development during thymopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(13):7731-7736, 2003.
- Wurbel MA**, Malissen M, Guy-Grand D, Meffre E, Nussenzweig MC, Richelme M, Carrier A, Malissen B. Mice lacking the CCR9 CC-chemokine receptor show a mild impairment of early T- and B-cell development and a reduction in T-cell receptor gamma delta(+) gut intraepithelial lymphocytes. *Blood* 98(9):2626-2632, 2001.
- Xu F**, Taki T, Eguchi M, Kamada N, Ishii E, Endo M, Hayashi Y. Tandem duplication of the FLT3 gene is infrequent in infant acute leukemia. Japan Infant Leukemia Study Group. *Leukemia* 5:945-947, 2000.
- Xu F**, Taki T, Yang HW, Hanada R, Hongo T, Ohnishi H, Kobayashi M, Bessho F, Yanagisawa M, Hayashi Y. Tandem duplication of the FLT3 gene is found in acute lymphoblastic leukaemia as well as acute myeloid leukaemia but not in myelodysplastic syndrome or juvenile chronic myelogenous leukaemia in children. *Br J Haematol* 105(1):155-162, 1999.
- Yagi R**, Chen L, Shigesada K, Murakami Y, Ito Y. A WW domain-containing yes-associated protein (YAP) is a novel transcriptional co-activator. *EMBO J* 18:2551-2562, 1999.
- Yano M**, Iwama A, Nishio H, Suda J, Takada G, Suda T. Expression and function of murine receptor tyrosine kinases, TIE and TEK, in hematopoietic stem cells. *Blood* 89:4317-4326, 1997.
- Yeoh A**, Williams K, Behm F, Lenny N, Shih L, Harada Y, Gilliland G, Downing J. Somatic mutations of the AML1 gene are frequent in acute myeloid leukemia with FAB M0 morphology. *Blood* 96:(Abstr. 389), 2000.
- Yergeau DA**, Hetherington CJ, Wang Q, Zhang P, Sharpe AH, Binder M, Marín-Padilla M, Tenen DG, Speck NA, Zhang DE. Embryonic lethality and impairment of haematopoiesis in mice heterozygous for an AML1-ETO fusion gene. *Nat Genet* 15(3):303-306, 1997.

- Yokota S**, Kiyoi H, Nakao M, Iwai T, Misawa S, Okuda T, Sonoda Y, Abe T, Kahsima K, Matsuo Y, Naoe T. Internal tandem duplication of the FLT3 gene is preferentially seen in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome among various hematological malignancies. A study on a large series of patients and cell lines. *Leukemia* 10:1605-1609, 1997.
- Yoshida T**, Ng SY, Zuniga-Pflucker JC, Georgopoulos K. Early hematopoietic lineage restrictions directed by Ikaros. *Nat Immunol* 7(4):382-391, 2006.
- Zelent A**, Greaves M, Enver T. Role of the TEL-AML1 fusion gene in the molecular pathogenesis of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Oncogene* 23:4275-4283, 2004.
- Zhang DE**, Fujioka K, Hetherington C, Shapiro L, Chen H, Look A, Tenen D. Identification of a region which directs the monocytic activity of the colonystimulating factor 1 (macrophage colony-stimulating factor) receptor promoter and binds PEBP2/CBF (AML1). *Mol Cell Biol* 14:8085-8095, 1994.
- Zhang DE**, Zhang P, Wang ND, Hetherington CJ, Darlington GJ, Tenen DG. Absence of granulocyte colony-stimulating factor signaling and neutrophil development in CCAAT enhancer binding protein alpha-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(2):569-574, 1997.
- Zhang P**, Iwasaki-Arai J, Iwasaki H, Fenyus ML, Dayaram T, Owens BM, Shigematsu H, Levantini E, Huettner CS, Lekstrom-Himes JA, Akashi K, Tenen DG. Enhancement of hematopoietic stem cell repopulating capacity and self-renewal in the absence of the transcription factor C/EBP alpha. *Immunity* 21(6):853-863, 2004.
- Zhang S**, Qian X, Redman C, Bliskovski V, Ramsay ES, Lowy DR, Mock BA. p16 INK4a gene promoter variation and differential binding of a repressor, the ras-responsive zinc-finger transcription factor, RREB. *Oncogene* 22:2285-2295, 2003.
- Zhang S**, Ramsay ES, Mock BA. Cdkn2a, the cyclin-dependent kinase inhibitor encoding p16INK4a and p19ARF, is a candidate for the plasmacytoma susceptibility locus, Pctr1. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:2429-2434, 1998.
- Zheng R**, Friedman AD, Levis M, Li L, Weir EG, Small D. Internal tandem duplication mutation of FLT3 blocks myeloid differentiation through suppression of C/EBPalpha expression. *Blood* 103(5):1883-1890, 2004.
- Zheng R**, Friedman AD, Small D. Targeted inhibition of FLT3 overcomes the block to myeloid differentiation in 32Dcl3 cells caused by expression of FLT3/ITD mutations. *Blood* 100:4154-4161, 2002.
- Zipursky A**, Brown EJ, Christensen H, Doyle J. Transient myeloproliferative disorder (transient leukemia) and hematologic manifestations of Down syndrome. *Clin Lab Med* 19(1):157-167, 1999.
- Zipursky A**, Poon A, Doyle J. Leukemia in Down syndrome: a review. *Pediatr Hematol Oncol* 9:139-149, 1992.
- Zipursky A**, Thorner P, De Harven E, Christensen H, Doyle J. Myelodysplasia and acute megakaryoblastic leukemia in Down's syndrome. *Leuk Res* 18(3):163-171, 1994.
- Zuniga-Pflücker JC**. T-cell development made simple. *Nature Rev. Immunol* 4:67-72, 2004.

6 Anhang

Hinweise zu Versuchsmäusen:

Versuchsmäuse können innerhalb ihres Daseins Erkrankungen entwickeln, die ohne Bezug zu den eingebrachten retroviralen Vektoren stehen. Dazu gehören u.a. Entzündungen und Magen-Darm-Erkrankungen, wobei letztere zu einem ungeklärten Gewichtsverlust führen können. Ein Immundefekt kann zwar durch die Transplantation bedingt sein, hat in diesem Fall aber keinen allzu langen Zeitverlauf. Tiere mit diesen Symptomen wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

Als Kontrollwerte für Hämatokrit (Hk) und Leukozytenzahl (Leuko) werden bei Versuchsmäusen im Allgemeinen Werte von 40-48% sowie $2-9 \times 10^6/\text{mL}$ angenommen.

Tabelle 6.1: Zusammenfassung der Mäuse, die aufgrund der pIpC-Behandlung oder einer Blutabnahme verstorben sind

Nach der pIpC-Behandlung (1) traten bei einigen Mäusen Grippe-ähnliche Symptome auf. Ferner stellten die zur Blutabnahme notwendige Betäubung sowie die Abnahme selbst (2) invasive Maßnahmen dar, aufgrund welcher Versuchstiere verstarben.

Maus	Vorläuferzellen	Vektor	Überlebensdauer [Tage]	Grund
#92	<i>Runx1^{fl/fl}-Mx1Cre</i>	Venus-Kontrolle	35	1
#95	<i>Runx1^{fl/fl}-Mx1Cre</i>	FLT3-ITD	35	1
#96	<i>Runx1^{fl/fl}-Mx1Cre</i>	FLT3-ITD	37	1
#99	<i>Runx1^{fl/fl}-Mx1Cre</i>	Venus-Kontrolle	47	2
#109	<i>Runx1^{fl/fl}-Mx1Cre</i>	FLT3-ITD	54	2
#111	<i>Runx1^{wt/wt}-Mx1Cre</i>	Venus-Kontrolle	48	2

Abbildung 6.1: Übersicht über die Verteilung der hämatopoetischen Linien in den Organen von C57BL/6J-Tieren

Diese durchflusszytometrische Analyse lieferte einen Überblick über die Anteil der verschiedenen Zellen der myeloiden und lymphoiden Reifungsreihen in Knochenmark, Milz, Blut und Thymus nicht transplantierten C57BL/6J-Mäusen.

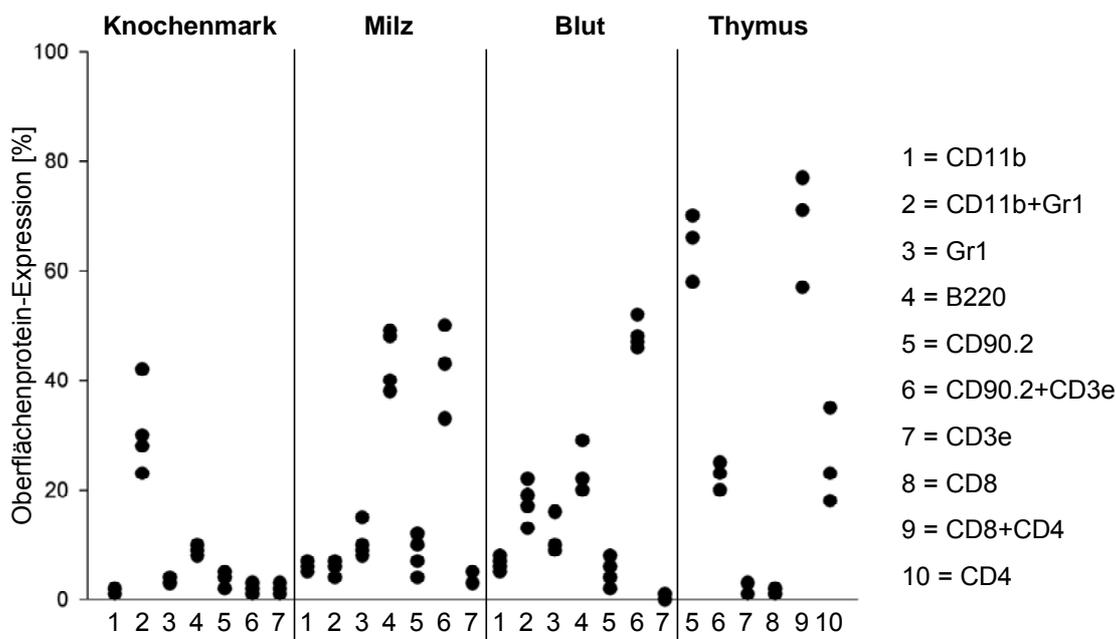


Tabelle 6.2: Übersicht der Mäuse, denen mit FLT3-ITD transduzierte Vorläuferzellen transplantiert wurden und die aufgrund einer lymphoiden Erkrankung analysiert werden mussten

In dieser Tabelle sind die Ergebnisse der Versuchsmäuse zusammengefasst, die eine lymphoiden Erkrankung wie das Thymom oder einer Prä-B-ALL (*) aufwiesen. Den Tieren wurden hämatopoetische Vorläuferzellen (VZ) des Typs *Runx1^{fl/fl}-Mx1Cre* (A), *Runx1^{wt/wt}-Mx1Cre* (B) oder *Runx1^{fl/wt}-Mx1Cre* (C) transplantiert.

(N = Neutrophile; L = Lymphozyten; M = Monozyten; Ery = Erythrozyten; Hb = Hämoglobin; Thrombo = Thrombozyten)

Maus	VZ	pIpC	Überlebensdauer [Tage]	Milz [mg]	Thymus [mg]	Leuko [$\times 10^6$ /mL]	N [%]	L [%]	M [%]	Hk [%]	Ery [$\times 10^9$ /mL]	Hb [g/dL]	Thrombo [$\times 10^6$ /mL]
#106	A	ja	160	84	568	0,6	n.b.	n.b.	n.b.	43	n.b.	n.b.	n.b.
#107	A	nein	110	292	539	22,4	n.b.	n.b.	n.b.	41	n.b.	n.b.	n.b.
#108	A	nein	106	70	312	0,8	n.b.	n.b.	n.b.	40	n.b.	n.b.	n.b.
#159	A	ja	145	142	499	2,0	n.b.	n.b.	n.b.	33	n.b.	n.b.	n.b.
#115	B	nein	111	78	104	1,8	n.b.	n.b.	n.b.	6	n.b.	n.b.	n.b.
#122*	B	nein	128	718	42	52	n.b.	n.b.	n.b.	33	n.b.	n.b.	n.b.
#123*	B	nein	131	406	78	1,4	n.b.	n.b.	n.b.	10	n.b.	n.b.	n.b.
#174	B	nein	193	32	432	1,70	78,31	20,10	1,31	32,7	7,94	11,6	748
#180	B	nein	86	89	247	0,8	n.b.	n.b.	n.b.	55	n.b.	n.b.	n.b.
#181	B	nein	109	182	403	2,55	n.b.	n.b.	n.b.	44	n.b.	n.b.	n.b.
#273	C	ja	166	160	572	3,22	46,79	41,32	3,97	47,0	10,94	12,5	524
#275	C	ja	110	106	330	3,26	30,25	59,48	9,72	58,0	14,80	17,5	788
#276	C	nein	105	666	480	72,28	45,12	37,99	13,16	33,8	9,08	9,1	441
#279	C	nein	160	172	557	5,78	51,43	39,96	3,65	41,9	8,33	10,9	325

Tabelle 6.3: Übersicht der Daten zu den nicht transplantierten C57BL/6J-Kontrollmäusen

Diese Mäuse wurden ohne vorherige Behandlung analysiert, wobei hämatopoetische und periphere Organe für Kontrollanalysen entnommen wurden.

Maus	Überlebensdauer [Tage]	Milz [mg]	Thymus [mg]	Leuko [$\times 10^6$ /mL]	N [%]	L [%]	M [%]	Hk [%]	Ery [$\times 10^9$ /mL]	Hb [g/dL]	Thrombo [$\times 10^6$ /mL]
#D	n.b.	74	n.b.	9,2	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
#H	n.b.	74	51	5,2	n.b.	n.b.	n.b.	42	n.b.	n.b.	n.b.
#J	103	80	n.b.	6,0	n.b.	n.b.	n.b.	45	n.b.	n.b.	n.b.
#N	110	n.b.	n.b.	5,62	22,49	66,69	10,74	43,2	10,45	11,7	912
#O	123	90	67	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
#Q	122	88	81	5,20	22,80	69,19	7,80	42,6	10,88	13,2	861
#R	132	93	69	6,74	30,75	57,24	11,79	43,2	10,36	11,1	894
#S	132	118	96	3,82	31,33	52,10	16,12	40,1	9,93	11,0	840

Tabelle 6.4: Zusammenfassung der Kontrollmäuse, denen hämatopoetische Vorläuferzellen transplantiert wurden, welche ebenfalls kultiviert, aber nicht transduziert wurden

Eine Untersuchung dieser Mäuse, die Vorläuferzellen (VZ) des Typs *Runx1^{fl/fl}-Mx1Cre* (A) oder *Runx1^{wt/wt}-Mx1Cre* (B) erfolgte zu unterschiedlichen Zeitpunkten, um in Bezug auf Blut, Knochenmark, Milz und Thymus sowie andere Organe Kontrollwerte für transplantierte Mäuse ohne die Expression eines retroviralen Vektors zu erhalten.

Maus	VZ	Überlebensdauer [Tage]	Milz [mg]	Thymus [mg]	Leuko [$\times 10^6$ /mL]	N [%]	L [%]	M [%]	Hk [%]	Ery [$\times 10^9$ /mL]	Hb [g/dL]	Thrombo [$\times 10^6$ /mL]
#232	A	48	87	18	2,28	50,01	38,93	10,98	39,8	10,03	11,6	183
#233	A	122	77	18	2,34	38,90	47,47	8,48	36,5	9,28	9,7	309
#244	B	94	104	65	9,80	14,33	77,11	6,96	43,2	9,46	11,4	349
#245	B	127	68	37	4,82	35,77	47,66	4,22	40,7	9,73	11,3	518
#246	B	138	120	96	7,88	30,72	60,89	7,99	40,6	9,42	10,8	675
#247	B	138	88	47	5,42	34,54	49,17	7,71	42,3	10,05	11,2	870

Tabelle 6.5: Darstellung der Ergebnisse der Mäusen, denen mit dem Venus-Kontrollvektor transduzierte Vorläuferzellen des Typs *Runx1^{fl/wt}-Mx1Cre* transplantiert wurden

Diese Mäuse zeigten innerhalb des Beobachtungszeitraums vom 172 Tagen keine Auffälligkeiten und wurden anschließend analysiert, wobei Blut, Knochenmark, Milz und Thymus sowie andere Organe entnommen wurden.

Maus	pIpC	Überlebensdauer [Tage]	Milz [mg]	Thymus [mg]	Leuko [$\times 10^6$ /mL]	N [%]	L [%]	M [%]	Hk [%]	Ery [$\times 10^9$ /mL]	Hb [g/dL]	Thrombo [$\times 10^6$ /mL]
#264	ja	173	108	74	7,98	8,87	86,05	4,80	39,2	10,19	10,9	678
#265	ja	173	111	39	9,20	16,63	79,23	4,10	36,7	9,55	10,6	579
#266	ja	173	141	47	10,84	11,88	82,25	5,31	37,6	9,40	10,2	848
#267	ja	173	116	72	12,54	9,64	83,99	6,04	37,0	9,35	10,2	978
#268	nein	172	213	58	10,66	22,01	70,78	5,94	37,3	7,75	9,9	281
#269	nein	172	128	73	10,46	20,26	73,25	5,77	41,3	9,75	11,0	688
#270	nein	172	131	45	9,56	23,16	70,80	5,98	34,9	8,32	10,0	851
#271	nein	172	121	50	8,90	23,60	68,98	6,48	37,7	9,52	11,0	793

Tabelle 6.6: Übersicht der Ergebnisse der Mäuse, denen mit dem Venus-Kontrollvektor transduzierte Vorläuferzellen transplantiert wurden

Diese Mäuse, welche hämatopoetische Vorläuferzellen (VZ) des Typs *Runx1^{fl/fl}-Mx1Cre* (A) oder *Runx1^{wt/wt}-Mx1Cre* (B) erhalten haben, waren bis auf zwei Ausnahmen innerhalb des Beobachtungszeitraums vom 200 Tagen gesund und wurden nach Ablauf des jeweiligen Versuchs zu unterschiedlichen Zeitpunkten analysiert. Es wurden Blut, Knochenmark, Milz und Thymus sowie andere Organe entnommen, wobei eine Venus-Expression von 2-92% (im Mittel von 55%) im Knochenmark, von 9-81% (48%) in der Milz und von 3-89% (59%) im Blut festgestellt wurde. Die Maus #151 hat den Beobachtungszeitraum überlebt, musste aber aufgrund eines Rectumprolaps oder eines Geschwürs aus dem Versuch genommen werden, so dass die Daten dieser Maus unter Vorbehalt zu betrachten sind.

Maus	VZ	pIpC	Überlebensdauer [Tage]	Milz [mg]	Thymus [mg]	Leuko [x10 ⁶ /mL]	N [%]	L [%]	M [%]	Hk [%]	Ery [x10 ⁹ /mL]	Hb [g/dL]	Thrombo [x10 ⁶ /mL]
#93	A	ja	319	57	81	3,6	n.b.	n.b.	n.b.	39	n.b.	n.b.	n.b.
#94	A	ja	314	32	36	0,7	n.b.	n.b.	n.b.	40	n.b.	n.b.	n.b.
#98	A	ja	319	93	74	5,4	n.b.	n.b.	n.b.	46	n.b.	n.b.	n.b.
#100	A	ja	260	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
#101	A	nein	282	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
#102	A	nein	235	288	n.b.	8,86	12,83	73,32	13,68	24,3	5,76	8,7	708
#147	A	nein	150	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
#148	A	nein	104	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
#150	A	nein	237	180	20	4,26	40,41	48,24	9,30	36,8	8,25	9,1	65
#151	A	ja	214	317	25	6,92	21,82	52,71	25,13	17,9	4,32	4,8	227
#152	A	ja	225	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
#153	A	ja	239	97	45	2,66	39,83	50,02	6,26	35,6	9,11	8,6	282
#154	A	ja	239	276	23	4,90	19,17	77,78	2,99	24,2	5,27	4,7	667
#110	B	nein	205	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
#112	B	nein	329	178	n.b.	9,14	35,74	55,07	4,00	20,3	4,50	6,1	811
#171	B	nein	240	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
#172	B	nein	240	89	36	5,12	27,20	58,73	12,47	36,8	8,98	9,9	758

Tabelle 6.7: Zusammenfassung der Mäuse, die an einer Myeloproliferation erkrankt sind

Diese Mäuse, welche mit FLT3-ITD transduzierte Vorläuferzellen des Typs *Runx1^{fl/fl}-Mx1Cre* erhalten haben, zeigten innerhalb des Beobachtungszeitraums von 200 Tagen einen myeloproliferativen Phänotyp, so dass die hämatopoetischen und peripheren Organe analysiert wurden.

Maus	pIpC	Überlebensdauer [Tage]	Milz [mg]	Thymus [mg]	Leuko [$\times 10^6$ /mL]	N [%]	L [%]	M [%]	Hk [%]	Ery [$\times 10^9$ /mL]	Hb [g/dL]	Thrombo [$\times 10^6$ /mL]
#155	nein	40	272	n.b.	7,86	27,19	53,72	18,55	31,2	9,68	11,4	361
#156	nein	121	81	27	1,5	n.b.	n.b.	n.b.	46	n.b.	n.b.	n.b.
#158	nein	121	70	35	2,4	n.b.	n.b.	n.b.	37	n.b.	n.b.	n.b.

Tabelle 6.8: Darstellung des Versuchstiers, welches eine monozytäre Erkrankung aufwies

Diese Maus, welcher mit FLT3-ITD transduzierte Vorläuferzellen des Typs *Runx1^{fl/wt}-Mx1Cre* transplantiert wurde, erlag innerhalb des Beobachtungszeitraums von 172 Tagen an einer monozytären Erkrankung und musste analysiert werden.

Maus	pIpC	Überlebensdauer [Tage]	Milz [mg]	Thymus [mg]	Leuko [$\times 10^6$ /mL]	N [%]	L [%]	M [%]	Hk [%]	Ery [$\times 10^9$ /mL]	Hb [g/dL]	Thrombo [$\times 10^6$ /mL]
#277	nein	75	278	44	9,98	44,25	45,40	5,92	39,8	10,17	12,3	465

Tabelle 6.9: Übersicht der an einer myeloiden Neoplasie erkrankten Versuchsmäuse

Diese Mäuse, denen mit dem Doppelvektor transduzierte Vorläuferzellen des Typs *Runx1^{fl/fl}-Mx1Cre* transplantiert wurden, erkrankten innerhalb des Beobachtungszeitraums von 200 Tagen einer myeloiden Neoplasie, so dass die hämatopoetischen und peripheren Organe untersucht wurden. Die blaue Mausnummer gibt das Versuchstier an, welches den Doppelvektor mit einer Punktmutation im FLT3-ITD erhalten hat.

Maus	pIpC	Überlebensdauer [Tage]	Milz [mg]	Thymus [mg]	Leuko [$\times 10^6$ /mL]	N [%]	L [%]	M [%]	Hk [%]	Ery [$\times 10^9$ /mL]	Hb [g/dL]	Thrombo [$\times 10^6$ /mL]
#163	nein	80	558	<10	207	n.b.	n.b.	n.b.	53	n.b.	n.b.	n.b.
#165	nein	138	442	<10	8,3	n.b.	n.b.	n.b.	20	n.b.	n.b.	n.b.
#167	ja	66	900	14	300	n.b.	n.b.	n.b.	48	n.b.	n.b.	n.b.
#168	ja	70	113	48	2,55	n.b.	n.b.	n.b.	37	n.b.	n.b.	n.b.
#214	ja	125	450	22	7,26	38,95	56,76	3,80	20,9	3,98	6,5	162
#234	nein	134	856	214	23,46	67,77	19,43	8,23	33,2	8,36	8,9	259

Tabelle 6.10: Zusammenfassung der Mäuse, die mit dem Doppelvektor transduzierte hämatopoetische Vorläuferzellen erhalten haben und einer lymphoiden Erkrankung erlegen sind

Übersicht über die Daten der Versuchsmäuse, denen mit dem Doppelvektor transduzierte Vorläuferzellen des Typs *Runx1^{fl/fl}-Mx1Cre* (A) oder *Runx1^{wt/wt}-Mx1Cre* (B) transplantiert wurden und die das Auftreten einer lymphoiden Erkrankung wie das Thymom oder einer Prä-B-ALL (*) zeigten. Die blauen Mausnummern geben an, welche Tiere den Doppelvektor erhalten haben, der eine Punktmutation der FLT3-ITD-Sequenz besitzt. In der Tabelle sind Überlebensdauer und Organgewichte, ferner die erfassten Blutparameter dargestellt. Bei der Maus #261 konnte neben einem Thymom, welches eine Symptomatik verursachte und daher den Grund für die Analyse darstellte, ferner eine Vermehrung von B-lymphoiden Vorläuferzellen im Knochenmark festgestellt werden.

Maus	VZ	pIpC	Überlebensdauer [Tage]	Milz [mg]	Thymus [mg]	Leuko [$\times 10^6$ /mL]	N [%]	L [%]	M [%]	Hk [%]	Ery [$\times 10^9$ /mL]	Hb [g/dL]	Thrombo [$\times 10^6$ /mL]
#212	A	ja	135	117	560	3,28	63,00	28,44	8,16	38,0	9,83	13,1	640
#235	A	nein	147	182	474	2,08	64,57	26,86	4,20	48,2	10,97	12,2	236
#236	A	ja	122	320	382	8,82	68,71	26,76	3,84	41,6	9,46	11,5	497
#238	A	ja	75	93	256	3,10	51,36	37,15	5,41	37,1	9,69	10,1	504
#239	B	nein	88	331	336	95,94	28,08	53,24	16,95	39,5	9,54	11,5	370
#240	B	nein	111	63	386	0,62	64,62	30,84	4,02	45,8	11,69	16,0	740
#241	B	nein	160	107	263	0,96	33,88	44,94	10,23	35,9	6,90	9,2	247
#242	B	nein	167	103	487	2,26	28,58	67,92	3,36	36,0	8,06	9,9	767
#256	B	nein	74	199	442	13,66	20,37	76,54	3,05	39,0	9,22	11,3	518
#257	B	nein	79	214	487	6,26	58,31	36,28	4,42	36,3	7,95	9,4	276
#258	B	nein	102	108	553	1,46	36,35	56,83	6,48	45,8	10,32	12,8	626
#259	B	nein	118	113	396	7,02	13,95	81,24	4,33	38,7	8,59	10,0	222
#260*	B	nein	46	248	67	16,78	40,98	45,67	10,61	41,6	9,87	12,1	533
#261	B	nein	75	88	438	1,74	32,29	63,30	4,33	40,2	9,38	12,0	793
#263	B	nein	140	92	631	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.

Tabelle 6.11: Zusammenfassung der Mäuse, die transduzierte hämatopoetische Vorläuferzellen erhalten haben und nicht in den vorherigen Tabellen aufgeführt sind

Übersicht über die Daten der Versuchsmäuse, die transduzierte Vorläuferzellen des Typs *Runx1^{fl/fl}-Mx1Cre* (A), *Runx1^{wt/wt}-Mx1Cre* (B) oder *Runx1^{fl/wt}-Mx1Cre* (C) transplantiert wurden, die aber während des Versuchverlaufs keine Symptomatik zeigten oder nicht einer Analyse zugeführt werden konnten. Bei den verwendeten Vektoren (V) handelte es sich um FLT3-ITD (1) und den Doppelvektor (2). Die blauen Mausnummern geben an, welche Tiere den Doppelvektor erhalten haben, der eine Punktmutation der FLT3-ITD-Sequenz besitzt. Weiterhin sind in dieser Tabelle die Daten der Mäuse zusammengefasst, die das Krankheitsbild Anämie aufwiesen (*). Bei den Mäusen #121 und #161 konnte nach Ablauf des Versuchs der Phänotyp eines Thymoms (T) festgestellt werden.

Maus	VZ	V	pIpC	Überlebensdauer [Tage]	Milz [mg]	Thymus [mg]	Leuko [$\times 10^6$ /mL]	N [%]	L [%]	M [%]	Hk [%]	Ery [$\times 10^9$ /mL]	Hb [g/dL]	Thrombo [$\times 10^6$ /mL]
#97	A	1	ja	122	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
#104	A	1	ja	303	32	<10	2,0	n.b.	n.b.	n.b.	41	n.b.	n.b.	n.b.
#105	A	1	ja	266	72	108	4,06	n.b.	n.b.	n.b.	51	n.b.	n.b.	n.b.
#113*	B	1	nein	127	115	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
#114*	B	1	nein	52	143	23	0,5	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
#120	B	1	nein	360	106	n.b.	0,76	13,62	74,81	10,97	9,4	1,24	2,5	63
#121 ^T	B	1	nein	295	120	300	0,5	n.b.	n.b.	n.b.	40	n.b.	n.b.	n.b.
#124	B	1	nein	381	175	31	6,14	16,43	78,15	5,23	21,7	2,71	5,6	1025
#160	A	1	ja	107	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
#161 ^T	A	1	ja	240	117	247	0,8	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
#162	A	1	ja	240	66	26	1,90	37,04	52,60	6,51	34,2	7,88	8,7	812
#166	A	2	nein	205	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
#175	B	1	nein	239	55	91	3,28	31,11	61,42	7,41	35,4	8,61	9,6	609
#176	B	1	nein	237	46	25	2,40	51,87	41,99	5,71	35,7	8,16	9,4	1302
#182	B	1	nein	240	62	12	8,70	18,40	73,58	6,29	38,2	7,77	9,7	665
#237	A	2	ja	219	107	46	2,22	44,50	46,61	8,67	40,6	9,78	10,6	553
#243	B	2	nein	219	119	59	3,32	25,87	62,76	11,59	34,7	7,70	9,3	1495
#272	C	1	ja	173	95	65	4,22	11,46	86,66	1,85	36,5	9,36	10,1	681
#278	C	1	nein	173	111	86	2,36	26,05	68,99	4,88	34,7	9,12	10,2	766

Tabelle 6.12: Übersicht der Daten zu den Mäusen, denen mit der RUNX1-DBM transduzierte Vorläuferzellen des Typs *Runx1^{fl/fl}-Mx1Cre* transplantiert wurden

Diese Mäuse zeigten innerhalb des Beobachtungszeitraums von 165 Tagen keine Auffälligkeiten und wurden anschließend zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten analysiert. In dieser Tabelle sind nur die Ergebnisse für Blut, Milz und Thymus aufgeführt.

Maus	pIpC	Überlebensdauer [Tage]	Milz [mg]	Thymus [mg]	Leuko [$\times 10^6$ /mL]	N [%]	L [%]	M [%]	Hk [%]	Ery [$\times 10^9$ /mL]	Hb [g/dL]	Thrombo [$\times 10^6$ /mL]
#195	nein	197	91	35	3,26	41,89	50,55	7,25	40,2	10,74	11,6	664
#196	nein	197	132	52	4,50	53,94	41,26	4,45	37,9	9,86	10,5	440
#198	nein	165	111	39	3,10	24,40	70,49	4,92	36,9	9,96	11,0	411
#199	nein	165	105	18	4,40	29,91	65,17	4,23	40,3	10,06	10,7	350
#200	ja	197	151	70	2,74	45,89	43,10	10,95	37,4	9,84	9,9	516
#201	ja	165	67	12	1,22	48,77	44,41	6,29	35,4	9,78	10,1	120
#202	ja	197	91	44	2,02	42,25	42,80	14,60	37,7	10,45	9,9	400
#204	ja	165	144	56	2,98	37,50	48,96	6,93	38,0	9,55	10,9	242

Tabelle 6.13: Zusammenfassung der Ergebnisse der Blutanalysen der Mäuse, denen mit der RUNX1-DBM transduzierte Vorläuferzellen des Typs *Runx1^{fl/fl}-Mx1Cre* transplantiert wurden

Den Versuchstieren, welche mit der RUNX1-DBM transduzierte Vorläuferzellen erhalten haben, wurde zu verschiedenen Zeitpunkten vor der Präparation Blut abgenommen, so dass Hämatokrit und Leukozytenzahl sowie die prozentualen Anteil an Neutrophilen, Lymphozyten und Monozyten bestimmt werden konnten. Die blau markierten Leukozytenwerte wurden erst nach 87 Tagen aufgenommen, weil den Mäusen zum ersten Termin kein Blut abgenommen werden konnte. Die grau unterlegten Mäuse wurden nach 197 Tagen präpariert, wohingegen die anderen vier schon nach 165 Tagen einer Analyse zugeführt wurden.

Maus	pIpC	nach 55/87 Tagen					nach 137 Tagen					nach 165/197 Tagen				
		Hk [%]	Leuko [$\times 10^6$ /mL]	N [%]	L [%]	M [%]	Hk [%]	Leuko [$\times 10^6$ /mL]	N [%]	L [%]	M [%]	Hk [%]	Leuko [$\times 10^6$ /mL]	N [%]	L [%]	M [%]
#195	nein	39,2	4,8	47,55	40,76	11,48	41	3,76	50,81	43,88	4,89	40,2	3,26	41,89	50,55	7,25
#196	nein	n.b.	5,8	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	3,3	n.b.	n.b.	n.b.	37,9	4,5	53,94	41,26	4,45
#198	nein	44,5	5,54	41,71	49,81	8,24	42	5,64	31,52	57,89	10,49	36,9	3,1	24,40	70,49	4,92
#199	nein	38,8	5,48	47,09	47,38	5,50	40	7,3	29,85	63,64	6,42	40,3	4,4	29,91	65,17	4,23
#200	ja	n.b.	5,2	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	37,4	2,74	45,89	43,10	10,95
#201	ja	41,7	5,9	47,03	44,82	7,55	40,5	3,46	54,00	39,58	6,15	35,4	1,22	48,77	44,41	6,29
#202	ja	39,8	3,5	51,23	39,34	9,15	40,7	5,16	42,77	52,97	4,10	37,7	2,02	42,25	42,80	14,60
#204	ja	43	3,58	54,03	36,12	9,39	39,2	3,68	40,54	51,06	7,90	38	2,98	37,50	48,96	6,93

Tabelle 6.14: Zusammenfassung der FACS-Daten der Versuchstiere, denen mit der RUNX1-DBM transduzierte Vorläuferzellen des Typs *Runx1^{fl/fl}-Mx1Cre* transplantiert wurden

Diese Mäusen zeigten innerhalb des Beobachtungszeitraums von 165 Tagen keine Auffälligkeiten und wurden anschließend zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten analysiert. Unter Verwendung von linienspezifischen FACS-Antikörpern erfolgte eine Analyse des Differenzierungsstatus der GFP-positiven Zellen aus Blut, Knochenmark und Milz.

(n.a. = nicht angegeben, weil die GFP-Expression zu niedrig war (unter 5%), um eine Aussage über die Verteilung treffen zu können)

Maus	Überlebensdauer [Tage]	Knochenmark [%]				Milz [%]				Blut [%]			
		GFP	CD11b	Gr1	CD11b+Gr1	GFP	CD11b	Gr1	CD11b+Gr1	GFP	CD11b	Gr1	CD11b+Gr1
#195	197	0	n.a.	n.a.	n.a.	1	n.a.	n.a.	n.a.	1	n.a.	n.a.	n.a.
#196	197	4	n.a.	n.a.	n.a.	4	n.a.	n.a.	n.a.	6	11	7	62
#198	165	14	2	5	46	5	4	4	84	10	16	1	38
#199	165	6	3	4	22	4	n.a.	n.a.	n.a.	3	n.a.	n.a.	n.a.
#200	197	3	n.a.	n.a.	n.a.	2	n.a.	n.a.	n.a.	6	7	39	18
#201	165	1	n.a.	n.a.	n.a.	2	n.a.	n.a.	n.a.	1	n.a.	n.a.	n.a.
#202	197	13	4	4	74	5	11	6	58	17	17	6	59
#204	165	4	n.a.	n.a.	n.a.	4	n.a.	n.a.	n.a.	5	16	5	51

Abbildung 6.2: Vergleich der transplantierten Kontrollmäuse mit C57BL/6J-Tieren in Bezug auf Milz- und Thymusgröße sowie auf die Blutparameter

Die erhobenen Daten für diesen Vergleich sind den Tabellen 6.3-6.6 zu entnehmen. Hierbei gilt:

- 1 = C57BL/6J, nicht transplantiert
- 2 = *Runx1^{fl/fl}-Mx1Cre*, nicht transduziert
- 3 = *Runx1^{wt/wt}-Mx1Cre*, nicht transduziert
- 4 = *Runx1^{fl/fl}-Mx1Cre*, transduziert mit dem Venus-Kontrollvektor
- 5 = *Runx1^{wt/wt}-Mx1Cre*, transduziert mit dem Venus-Kontrollvektor
- 6 = *Runx1^{fl/wt}-Mx1Cre*, transduziert mit dem Venus-Kontrollvektor

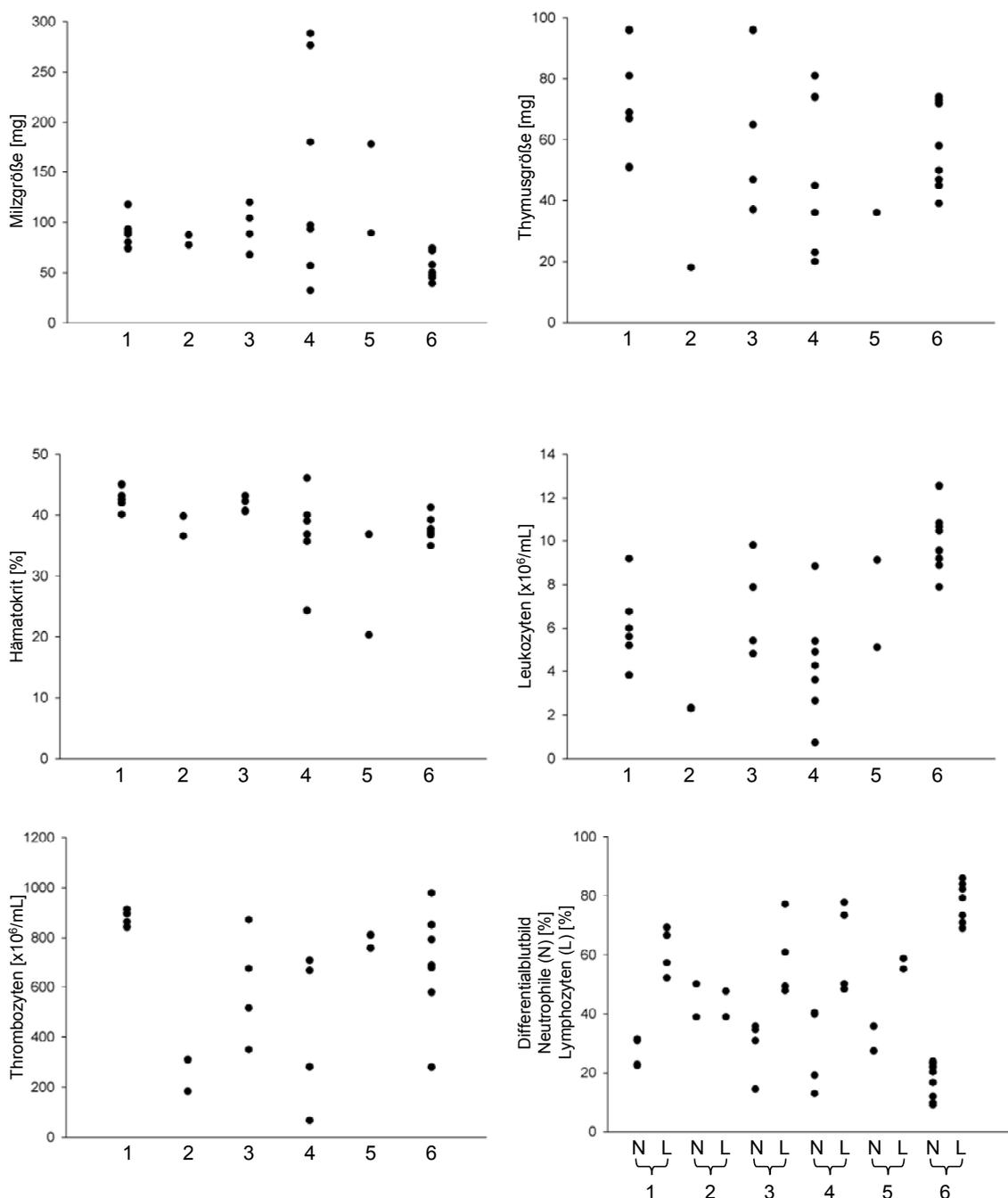
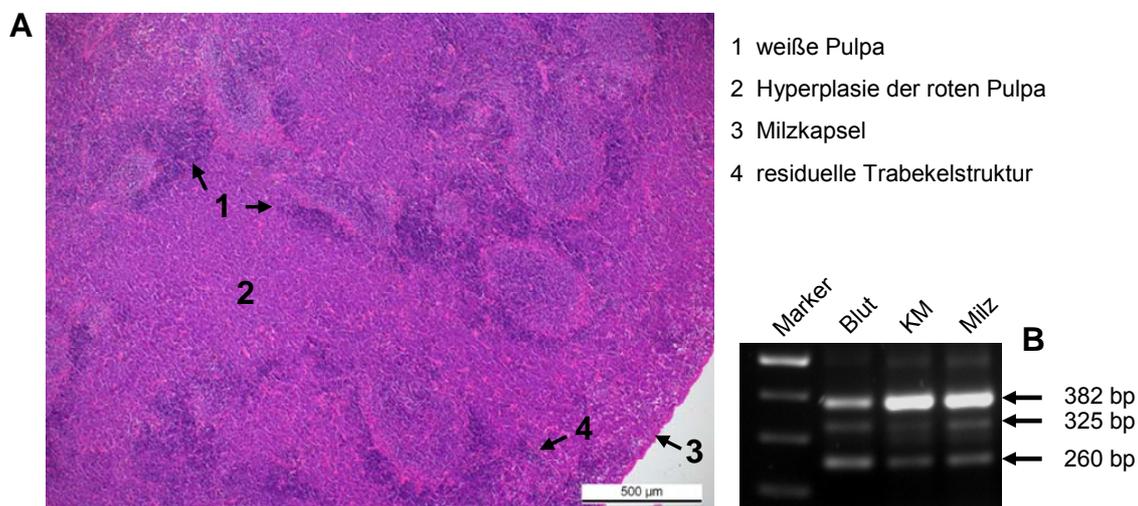


Abbildung 6.3: Darstellung der Befunde zu der Maus #150

A In dem HE-gefärbten Schnitt (fünffache Vergrößerung) der Milz des Venus-Kontrolltiers zeigte sich eine Verschiebung des Verhältnisses der weißen und roten Pulpa zugunsten der roten Pulpa, welche durch die Proliferation myeloider Zellen bedingt war und eine Organvergrößerung bedingte.

B In der PCR-Analyse der hämatopoetischen Organe der Maus #150 konnte eine Deletion des Exons 5 von *Runx1* (382 bp) sowie das Auftreten der *loxP*-flankierten Gensequenz (325 bp) und der Wildtypbande von 260 bp nachgewiesen werden.

**Abbildung 6.4: Schema zur Retransplantation der myeloiden Neoplasie**

Zum Nachweis der Retransplantierbarkeit der myeloiden Neoplasie wurden Knochenmarkszellen von drei Mäusen mit unterschiedlicher Krankheitsausprägung in jeweils drei subletal bestrahlte Empfängertiere intravenös transplantiert.

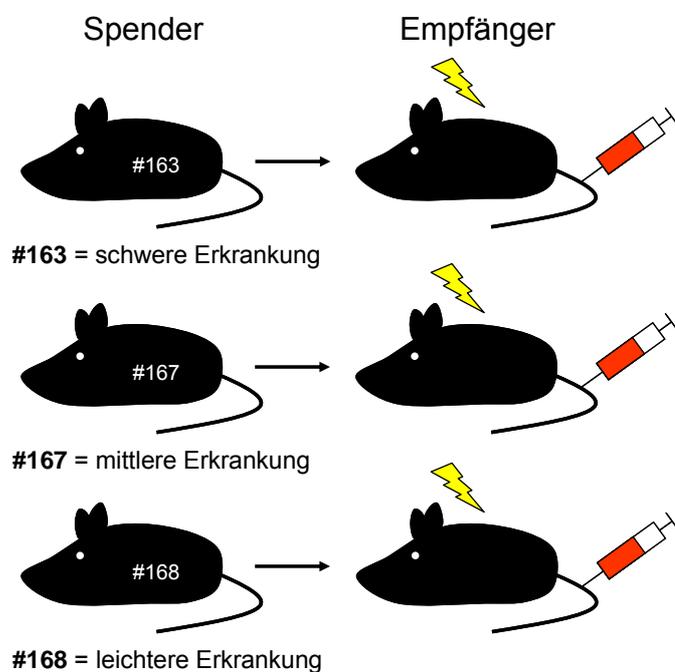
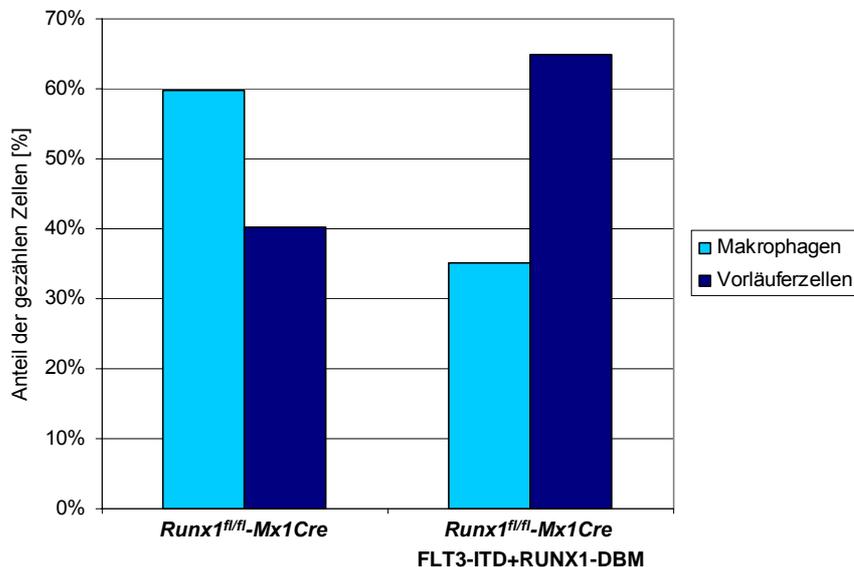
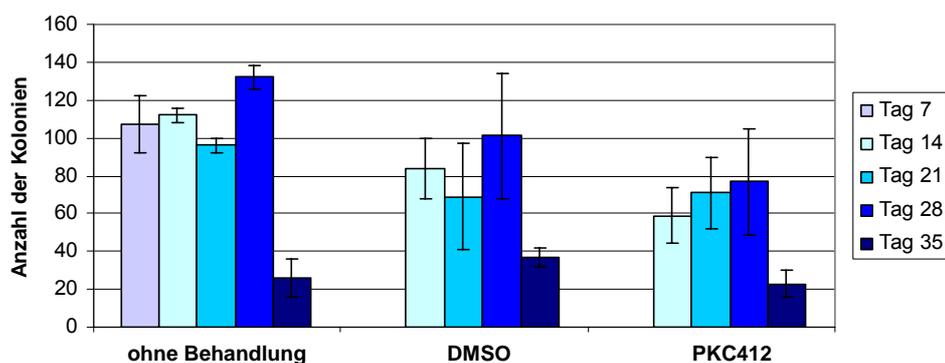


Abbildung 6.5: Ergebnis der Auszählung von Zellen der Methylcelluloseklonierung

Bei der Kultivierung der myeloiden neoplastischen Zellen und der Kontrollzellen ergab sich unterschiedliches Bild der Differenzierung. Die Kolonien der neoplastischen Zellen schien ein größerer Anteil myeloider Vorläuferzellen in einem nicht terminal ausgereiften Stadium vorhanden zu sein. Ein Auszählen von 500 Zellen des jeweiligen Cytospins nach sieben Tagen Kulturdauer bestätigte diesen Eindruck.

**Abbildung 6.6: Kultivierung der myeloiden neoplastischen Zellen in Gegenwart von PKC412 zur Inhibition von FLT3-ITD**

Die Knochenmarkzellen einer Maus, die eine myeloide Neoplasie als Phänotyp aufwies, wurden in einem semisoliden Medium kultiviert, dem 100 nM PKC412 zur Inhibition von FLT3-ITD oder DMSO als Kontrolle zugesetzt war. Zum Vergleich ist ferner das Ergebnis der Kultivierung ohne Zusatz aufgeführt, aus welcher die Zellen für den Versuch entnommen wurden.



Liste der verwendeten Gefahrenstoffe

Gefahrenstoff	Gefahrensymbol	R-Sätze	S-Sätze
5-Fluorouracil	T	R 21/22-36/37/38-46-60-61	S 24-26-36/37/39-45-46-53
Ampicillin	Xn	R 36/37/38-42/43	S 22-26-36/37
Chloroform	Xn	R 22-38-40-48/20/22	S 1/2-36/37-46
Chloroquin	Xn	R 22	S 22-24/25
Diethylether	F+, Xn	R 12-19-22-66-67	S 2-9-16-29-33
Dimethylsulfoxid	Xi	R 20/22-36/37/38	S 23-26-36/37/39
Eosin-Farblösung	Xi	R 36	S 26
Essigsäure	C	R 10-35	S 1/2-23-26-36/37/39-45
Ethanol	F	R 11	S 2-7-16
Ethidiumbromid	T+	R 20-22-26-36/37/38-40-68	S 1/2-20/21-26-28-36/37-45-63
Ethylendiamintetraessigsäure	Xi	R 36/38-52/53	S 2-26-61
Eukitt	Xn	R 10-20/21-38	S 24-25-36/37-51-60
flüssiger Stickstoff	-	-	S 9-36/37/39-51
Formaldehydlösung	T	R 23/24/25-34-40-43	S 1/2-26-36/37/39-45-51
Formamid	T	R 61	S 53-45
fuchsinschweflige Säure	T	R 23-34-40	S 1/2-9-26-36/37/39-45
Giemsa-Farblösung	Xi	R 41	S 26-39
Guanidinthiocyanat	Xn	R 20/21/22-32	S 13-26-37/38
Hämatoxylin-Farblösung	Xi	R 36/37/38	S 26-36
Isopropanol	F, Xi	R 11-36-67	S 7-16-23-24/25/26-51
May-Grünwald-Farblösung	Xn	22-41-52/53	S 26-29-61
Natriumdodecylsulfat	F, Xn	R 11-21/22-36/37/38	S 26-36/37
Natriumhydroxid	C	R 35	S 1/2-26-37/39-45
Penicillin	Xi	R 42/43	S 36/37/38-45
Perjodsäure	C, O	R 8-34	S 26-36/37/39-45
Phenol	T, C	R 23/24/25-34-48/20/21/22-68	S 1/2-24/25-26-28-36/37/39-45
pIpC	-	R 20/21/22-36/37-38	S 22-24/25-28-36/37/39
Polyvinylpyrrolidon	Xi	R 38	S 2-22-24/25-46
Proteinase K	Xi	R 36/37/38-42	S 22-24-26-37/38
RNase A	-	R 42/43	S 23-24-26-36/37
Salzsäure 37%	C	R 34-37	S 1/2-26-36/37/39-45
Streptomycin	Xi	R 42/43	S 36/37/38
Xylol	Xn	R 10-20/21-38-65	S 2-9-16-24/25-36/37-61-62