

Aus der Klinik für Hämatologie, Onkologie
und Klinische Immunologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Rainer Haas

**Einfluss von myeloischen Blasten
auf gesunde CD34⁺ hämatopoietische
Stamm- und Progenitorzellen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Paul Sebastian Jäger

2019

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: PD Dr. Thomas Schroeder

Zweitgutachter: PD Dr. Hans-Jürgen Laws

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Functional inhibition of mesenchymal stromal cells in acute myeloid leukemia.

Geyh S, Rodríguez-Paredes M, Jäger P, Khandanpour C, Cadeddu RP, Gutekunst J, Wilk CM, Fenk R, Zilkens C, Hermsen D, Germing U, Kobbe G, Lyko F, Haas R, Schroeder T. *Leukemia*. 2016 Mar;30(3):683-91.

Transforming growth factor β 1-mediated functional inhibition of mesenchymal stromal cells in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia.

Geyh S, Rodríguez-Paredes M, Jäger P, Koch A, Bormann F, Gutekunst J, Zilkens C, Germing U, Kobbe G, Lyko F, Haas R, Schroeder T. *Haematologica*. 2018 Sep;103(9):1462-1471.

Zusammenfassung

Deutsch

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine heterogene Gruppe maligner Blutstammzellerkrankungen, bei der es zu einer Akkumulation leukämischer Vorläuferzellen im Knochenmark kommt. Die Hauptsymptome der AML sind einer unzureichenden Fähigkeit der gesunden HSPZ geschuldet, eine bedarfsgerechte Blutbildung aufrecht zu halten.

Ging man vor einigen Jahren noch von einer rein räumlichen „Verdrängung“ der gesunden Hämatopoiese durch die klonale Expansion maligner Vorläuferzellen im Knochenmark (KM) aus, weiß man heute, dass dieser Prozess der Myelosuppression deutlich komplexer ist und über verschiedene funktionelle Mechanismen im Knochenmarkmikromilieu abläuft. So konnte unsere Arbeitsgruppe gemeinsam mit anderen zeigen, dass der hämatopoietischen Insuffizienz zum einen eine funktionelle Hemmung sog. mesenchymaler Stromazellen (MSC) zugrunde liegt. Zum anderen legen einige Arbeiten nahe, dass die malignen Zellen auch einen direkten supprimierenden Einfluss auf die gesunden hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen (HSPZ) ausüben könnten.

Um dieser Hypothese in dieser Arbeit experimentell nachzugehen, haben wir die Situation der Knochenmarksinfiltration experimentell nachgestellt. Dazu wurde der Einfluss von mononukleären Zellen (MNC) und CD34⁺ leukämischen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark von 24 neu diagnostizierten AML-Patienten sowie 3 etablierten AML-Zelllinien (HL-60, THP-1, MV4-11) auf gesunde CD34⁺ HSPZ mittels Zellkulturexperimenten mit konditionierten Medien (CM) untersucht.

Hierbei konnten wir zeigen, dass eine Exposition gegenüber den Überständen von AML-Zelllinien und AML-Zellen von Patienten zu einer signifikanten Verringerung der Proliferation von gesunden CD34⁺ HSPZ und zu einem Zellzyklus-Arrest führten. Darüber hinaus führte eine vorangehende Exposition gegenüber den AML-Zelllinien oder den aus den Patienten gewonnenen AML-Zellen zu einer verminderten Kapazität der gesunden CD34⁺ HSPZ, Kolonien zu bilden und zu differenzieren. Durch einen Vergleich von 5 gepaarten AML-Patientenproben konnten wir nachweisen, dass diese supprimierende Wirkung auf die gesunde Hämatopoiese durch die CD34⁺ leukämische Zellpopulation und nicht durch die MNC-Fraktion ausgelöst wurde. Weiterführende qRT-PCR-Analysen zeigten eine signifikante Überexpression verschiedener negativer Regulatoren der Hämatopoiese, wie zum Beispiel TGF- β 1 und ANGPT1 in der angereicherten CD34⁺ Blastenpopulation.

Zusammengefasst legen diese Daten einen direkten supprimierenden Einfluss der myeloischen Blastenpopulation auf die gesunde CD34⁺ HSPZ bei AML nahe und stellen somit einen weiteren Mechanismus der Myelosuppression bei der AML dar.

Englisch

Acute myeloid leukemia is a heterogeneous malignant bone marrow disease, which is considered to be clonal stem cell disorder arising from genetic alterations of hematopoietic stem- and progenitor cells (HSPC). Hematopoietic insufficiency is the hallmark of AML with cytopenia-related complications such as bleeding and infections representing the major causes of death. Albeit recent experiment evidence pointed towards an important role of the bone marrow (BM) microenvironment, the underlying mechanisms mediating hematopoietic insufficiency are still poorly understood and therefore often mechanistically summarized as marrow replacement by infiltrating leukemic blasts.

Mesenchymal stem- and progenitor cells (MSPC) play an indispensable role for hematopoiesis by regulating and supporting HSPC. It has been reported that MSPC in patients with AML are structurally, genetically and functionally impaired and translated into a significantly diminished ability of those MSC to support CD34⁺ HSPC.

Since the BM of patients with AML is dominated by a leukemic blast population accompanied by a reduction of normal CD34⁺ hematopoietic stem and progenitor cells (HSPC), we reasoned that leukemic cells might also directly suppress normal HSPC.

To experimentally address this hypothesis we modelled the situation of BM infiltration *in vitro* by exposing healthy BM-derived CD34⁺ HSPC to supernatants derived from leukemic cells. Conditioned media (CM) were harvested from 3 AML cell lines (THP-1, HL-60, MV4-11) as well as from a total of 24 newly-diagnosed patients with AML covering all relevant WHO subtypes after 3 days of cultivation. Healthy CD34⁺ HSPC were incubated for 3 days in the presence of leukemic or control media. Subsequently, proliferation, cell cycle behaviour and differentiation of these CD34⁺ HSPC was investigated using cell counting, dye staining with Ki-67 and Hoechst 33342 as well as semisolid clonogenic assays.

Exposure to conditioned media derived from AML cell lines and primary patient samples significantly inhibited proliferation as indicated by a profound reduction of viable healthy CD34⁺ HSPC. Complementary with this, we observed a clear shift of the cell cycle state of healthy CD34⁺ HSPC towards a resting phenotype when cultivated in AML-derived media with the majority of cells being in inactive G₀ phase. Performing semisolid clonogenic assays demonstrated a strikingly lower colony-forming capacity of CD34⁺ HSPC following incubation with AML-derived supernatants.

These inhibitory effects on healthy hematopoiesis were markedly related to the CD34⁺ leukemic cell population, but not to the MNC fraction as indicated by a comparison of paired MNC and immunomagnetically enriched CD34⁺ AML samples.

PCR-screening of well-known negative regulators of hematopoiesis revealed a significant overexpression of TGF- β 1 and ANGPT1 suggesting a potential role of this candidate molecule for suppression of healthy hematopoiesis by leukemic cells.

Overall, these data indicate that leukemic cells mediate direct suppressive effects on important functions of healthy CD34⁺ HSPC thereby contributing to hematopoietic insufficiency in AML.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erläuterung
°C	Grad Celsius
µm	Mikrometer
3d	3 Tage (72 Stunden)
AK	Antikörper
AML	Akute myeloische Leukämie
ANGPT1	Angiopoietin 1
APC	Allophycocyanin
APL	Akute Promyelozyten Leukämie
BFU-E	Burst-Forming-Unit-Erythroid
BM	Bonemarrow
bp	Basenpaar(e)
CARs	Perivaskuläre Retikularzellen
CCL3	Chemokine (C-C Motif) Ligand 3
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	Complementary DNA
CFU	Colony Forming Unit
CFU-E	Colony-Forming-Unit-Erythroid
CFU-G	Colony-Forming-Unit-Granulocyte
CFU-GEMM	Colony-Forming-Unit-Granulocyte-Erythroid-Macrophage-Megakaryocyte
CFU-GM	Colony-Forming-Unit-Granulocyte-Macrophage
CFU-M	Colony-Forming-Unit-Macrophage
CIRS	Cumulative Illnes Rating Scale
c-KIT	Cellular-KIT
CLP	Common Lymphoid Progenitors
cm	Zentimeter
CM	Konditioniertes Medium (Conditioned Medium)
CMP	Common Myeloid Progenitors
CO ²	Kohlenstoffdioxid
CPD	Cumulative Population Doublings
CTD	Cycle of TTreshhold
del()	Chromosomale Deletion
DEPC	Diethyldicarbonat, Diethylpyrocarbonat
dl	Deziliter
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleidacid)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
ECs	Endothelzellen
ECMs	Extracellular Matrix Proteins
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
ELN	European Leukemia Net
EPO	Erythropoietin
FAB	French-American-British
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FBS	Fetales Bovines Serum
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FLT3-L	FMS-related Tyrosine Kinase 3 Ligand
FS	Forward-Scatter
fwd	Forward Primer
g	Gramm
<i>g</i>	Lastvielfache

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GAS6	Growth Arrest Specific 6
GDF-11	Growth Differentiation Factor 11
GMP	Granulocyte Macrophage Progenitors
h	Stunde(n)
H₂O	Wasser
HES1/5	Hairy Enhancer of Split 1/5
HPGM	Hematopoietic Progenitor Growth Medium
HSA	Humanes Serumalbumin
HSPC	Hematopoietic Stem- and Progenitorcells
HSPZ	Hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen
IDH1/2	Isocitrate dehydrogenase 1/2
Ig	Immunglobulin
IL-1-β	Interleukin 1-β
IL-3	Interleukin 3
IL-6	Interleukin 6
inv()	Chromosomale Inversion
kDa	Kilodalton
KM	Knochenmark
l	Liter
LG	Ligand
LIF1	Leukemia Inhibitory Factor 1
LS(M)	Leucocyte Separation (Medium)
LSC	Leukemic stem cell
LT-HSPZC	Long-Term- Hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen
M	Molar
MACS	Magnetic-Activated Cell Sorting
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
Megs	Megakaryozyten
MEP	Megakaryocyte Erythroid Progenitors
mg	Milligramm
MgCl₂	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
ml	Milliliter
MLL	Myeloid/lymphoid or mixed-lineage Leukemia
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MNC	Mononukleäre Zellen (Mononuclear CCells)
M-Phase	Mitose-Phase
MPN	Myeloproliferative Neoplasie
MPP	Multipotente Progenitoren
mRNA	Messenger Ribonucleic acid
MSC	Mesenchymale Stromazellen (Mesenchymal Stromal Cells)
MSPC	Mesenchymal Stem-and Progenitor Cells
MSPZ	Mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen
MW	Mittelwert
ng	Nanogramm
NOS	Not otherwise specified
NPM1	Nucleophosmin 1
O₂	Sauerstoff
OBs	Osteoblasten
P	Passage(n)
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PSG	Penicillin/ Streptomycin/ L-Glutamin
qRT-PCR	Quantitative Realtime-Polymerase Chain Reaction PCR
R	Rezeptor
rev	Reverse Primer

RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleic Acid)
rpm	Rotationen pro Minute
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Chain Reaction
sAML	Sekundäre AML
SCF	Stem Cell Factor
SDF1	Chemokine Stromal-derived Factor 1
RARα	Retinoic Acid Receptor α
sec	Sekunde(n)
SMAD2	Mothers against Decapentaplegic Homolog 2
S-Phase	Synthese-Phase
SS	Side-Scatter
ST-HSPZ	Short-Term- Hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen
t()	Chromosomale Translokation
TBE	Trisbase Borsäure EDTA
TEP	Totale Endoprothese
TGF-β1	Transforming Growth Factor β -1
TGF-β-R1	Transforming Growth Factor β Receptor 1
TIE2	Tyrosinkinase mit Immunglobulin und EGF homologen Domänen-2
TPO	Thrombopoietin
U	Unit(s)
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Protein 1
WHO	World Health Organisation
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
++++	+IL-3, +IL-6,+FLT3-L,+SCF

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Die Hämatopoiese/Hämatopoietische Stammzelle	1
1.2 Das Knochenmarkmikromilieu und die Stammzellnische	3
1.3 Akute myeloische Leukämie	6
1.3.1 Definition	6
1.3.2 Epidemiologie	6
1.3.3 Klinische Präsentation	6
1.3.4 Ätiologie	7
1.3.5 Pathogenese	7
1.3.6 Diagnostik	9
1.3.7 Klassifikation	10
1.3.8 Prognose/Prognosefaktoren	11
1.3.9 Therapie/Supportivtherapie	12
1.4 Pathogenese der hämatopoietischen Insuffizienz / Aktueller Stand der Forschung und Ziele der Arbeit	14
2. Material und Methoden	16
2.1 Allgemeine Methodik	16
2.1.1 Materialien und Geräte	16
2.1.2 Software	17
2.1.3 Probenherkunft, Patientencharakteristik und Ethikvotum	18
2.1.4 AML-Zelllinien	19
2.1.5 Isolation der mononukleären Zellfraktion (MNC) aus dem Knochenmark	19
2.1.6 Isolation von CD34 ⁺ hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen (HSPZ) aus dem Knochenmark	20
2.2 Zellkultur	21
2.2.1 Kultivierungsbedingungen	22
2.2.2 Zellkulturmedien	22
2.2.3 Kultivierung von AML-Suspensionszelllinien	23
2.2.4 Cumulative Population Doublings (CPD)	24
2.3 Zellkulturexperimente	24
2.3.1 Generierung von konditionierten Medien (CM) von AML-Zelllinien	24
2.3.2 Generierung von konditionierten Medien (CM) von Patienten- und Probandenproben	24
2.3.3 Zellkulturexperimente zur Untersuchung des Einflusses leukämischer Zellen auf gesunde CD34 ⁺ HSPZ	25
2.3.4 Genexpressionsanalysen von CD34 ⁺ nach Kultivierung mit konditionierten Medien (CM)	25
2.4 Readout	26
2.4.1 Zellzählung von CD34 ⁺ HSPZ nach 3 Tagen Zellkultur mit konditionierten Medien (CM) mittels Zellzählgerät	26

2.4.2	Durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse von CD34 ⁺ HSPZ nach 3 Tagen Zellkultur mit konditionierten Medien (CM) mittels der Doppelfärbung Ki-67 und Hoechst 33342	26
2.4.3	Analyse des Koloniebildungsverhaltens und der Differenzierungsfähigkeit von CD34 ⁺ HSPZ nach 3 Tagen Zellkultur mit konditionierten Medien (CM) mittels Colony-Forming Unit (CFU)-Assay.	27
2.5	Molekularbiologie	29
2.5.1	RNA-Extraktion nativer Zellen	29
2.5.2	RNA-Extraktion mittels Trizol-Fällung von CD34 ⁺ HSPZ nach Zellkultur mit konditionierten Medien (CM)	29
2.5.3	Messung der RNA/DNA-Konzentration mittels Nanodrop® ND-1000	30
2.5.4	cDNA-Synthese (RT-PCR) von RNA nativer Zellen	30
2.5.5	cDNA-Synthese (RT-PCR) von RNA kultivierter Zellen	31
2.5.6	Quantitative RealTime-PCR (q-RT-PCR)	32
2.5.7	Primer	33
2.6	Statistische Auswertung	34
3.	Ergebnisse	35
3.1	Allgemeiner Versuchsaufbau der Zellkulturexperimente mit konditionierten Medien (CM)	35
3.2	Wachstumskinetik von AML-Zelllinien	36
3.3	Einfluss von AML-Zelllinien auf gesunde CD34⁺ HSPZ	36
3.3.1	Bestimmung der Proliferationsfähigkeit gesunder CD34 ⁺ HSPZ nach 3 Tagen Zellkultur mit konditioniertem Medium (CM) von AML-Zelllinien mittels Zellzahlbestimmung	37
3.3.2	Zellzyklusanalyse der gesunden CD34 ⁺ HSPZ nach 3 Tagen Zellkultur mit konditioniertem Medium (CM) von AML-Zelllinien mittels der Doppelfärbung Ki67 und Hoechst 33343	38
3.3.3	Analyse des Koloniebildungsverhaltens und der Differenzierungsfähigkeit gesunder CD34 ⁺ HSPZ nach 3 Tagen Zellkultur mit konditioniertem Medium (CM) von AML-Zelllinien mittels Colony Forming Unit (CFU)-Assay	40
3.4	Einfluss leukämischer Zellen von AML-Patienten auf gesunde CD34⁺ HSPZ	43
3.4.1	Bestimmung der Proliferationsfähigkeit gesunder CD34 ⁺ HSPZ nach 3 Tagen Zellkultur mit konditioniertem Medium (CM) leukämischer Zellen von AML-Patienten mittels Zellzahlbestimmung	45
3.4.2	Zellzyklusanalyse der gesunden CD34 ⁺ HSPZ nach 3 Tagen Zellkultur mit konditioniertem Medium (CM) leukämischer Zellen von AML-Patienten mittels der Doppelfärbung Ki67 und Hoechst 33343	46
3.4.3	Analyse des Koloniebildungsverhaltens und der Differenzierungsfähigkeit gesunder CD34 ⁺ HSPZ nach 3 Tagen Zellkultur mit konditioniertem Medium (CM) leukämischer Zellen von AML-Patienten mittels Colony Forming Unit (CFU)-Assay	47
3.5	Einfluss unterschiedlicher Zellfraktionen von AML-Patienten (gepaarte Proben) auf gesunde CD34⁺ HSPZ	49
3.5.1	Bestimmung der Proliferationsfähigkeit gesunder CD34 ⁺ HSPZ nach 3 Tagen Zellkultur mit konditioniertem Medium (CM) von MNC und CD34 ⁺ leukämischen Vorläuferzellen von gepaarten AML-Patientenproben mittels Zellzahlbestimmung	50

3.5.2	Zellzyklusanalyse der gesunden CD34 ⁺ HSPZ nach 3 Tagen Zellkultur mit konditioniertem Medium (CM) von MNC und CD34 ⁺ leukämischen Vorläuferzellen von gepaarten AML-Patientenproben mittels der Doppelfärbung Ki67 und Hoechst 33343	52
3.5.3	Analyse des Koloniebildungsverhaltens und der Differenzierungsfähigkeit gesunder CD34 ⁺ HSPZ nach 3 Tagen Zellkultur mit konditioniertem Medium (CM) von MNC und CD34 ⁺ leukämischen Vorläuferzellen von gepaarten AML-Patientenproben mittels Colony Forming Unit (CFU)-Assay	53
3.6	Molekularbiologische Analysen – Genexpressionsanalysen leukämischer Zellen von AML-Patienten mittels quantitativer Real-Time PCR (qRT-PCR)	54
3.6.1	Genexpression des JAGGED-NOTCH Signalwegs	56
3.6.2	Genexpression von KIT-LG (SCF) und des korrespondierenden Rezeptors c-KIT	57
3.6.3	Genexpression von ANGPT1 und des korrespondierenden Rezeptors TIE2	58
3.6.4	Genexpression von TGF- β 1, GDF-11, des Rezeptors TGF- β -R1 und des Zielgens SMAD2	59
3.6.5	Genexpression von IL1- β und CCL3 (MIP1- α)	60
3.6.6	Genexpression von GAS6 und LIF1	61
3.7	Genexpressionsanalysen von MNC und CD34⁺ leukämischen Vorläuferzellen von gepaarten AML-Patienten-Proben mittels quantitativer Real-Time PCR	62
3.8	Funktionelle Genexpressionsanalysen von gesunden CD34⁺ HSPZ nach 3 Tagen Zellkultur mit konditioniertem Medium (CM)	65
4.	Diskussion	67
4.1	Leukämische Zellen induzieren eine funktionelle Hemmung bei gesunden CD34 ⁺ HSPZ	67
4.2	Schlussfolgerung/Ausblick	73
5.	Literatur und Quellenverzeichnis	76
6.	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	84
6.1	Abbildungen	84
6.2	Tabellen	86
7.	Anhang	87
7.1	Einfluss von Leermedium (RPMI++++) auf gesunde CD34 ⁺ HSPZ nach 3 Tagen Zellkultur im Vergleich zu Kontroll-Zellkulturen	87

1. Einleitung

1.1 Die Hämatopoiese/Hämatopoietische Stammzelle

Die Hämatopoiese (griechisch: *haimas* das Blut, *poiesis* die Bildung) nimmt ihren Ausgang von multipotenten hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen (HSPZ) und soll physiologischerweise ein Leben lang die bedarfsgerechte Bereitstellung der zellulären Bestandteile des Blut- und Immunsystems aufrechterhalten (Morrison et al., 1997; Osawa et al., 1996). Der primäre Ort, an dem sich die Blutbildung beim gesunden, erwachsenen Menschen vollzieht, ist vornehmlich das rote Knochenmark der platten und kurzen Knochen wie dem Becken, Sternum oder den Wirbelkörpern. Von dort gelangen die Blutzellen in das periphere Blut, wo sie entweder als Effektorzellen ihre physiologisch zugedachten Aufgaben übernehmen oder zu lymphatischen Organen gelangen, um dort weitere Reifungsprozesse zu durchlaufen (Guidos et al., 2006). Die wesentlichen Aufgaben der Blutzellen sind die Abwehr von Krankheitserregern durch Leukozyten, der Transport von Sauerstoff und Kohlendioxid durch Erythrozyten sowie die Blutstillung durch Thrombozyten. Da diese Zellen eine begrenzte Lebensdauer von wenigen Tagen (5-10 Tagen bei den Thrombozyten) bis zu einigen Jahren haben (bei bestimmten Leukozyten z.B. B-Zellen), müssen täglich 2×10^{11} Erythrozyten, 1×10^{10} Leukozyten und 1×10^{11} Thrombozyten neu gebildet werden. Dadurch kann die Zahl der Blutzellen im Körper konstant gehalten werden (Bryder et al., 2006; Kaushansky et al., 2008).

Die Differenzierung der HSPZ zu den reifen Blutzellen erfolgt dabei stufenweise und nach einer festen Hierarchie über verschiedene Vorläuferzellen (Progenitoren), die aus den HSPZ hervorgehen (Abb. 1). Aus *long-term-HSPZ* (LT-HSPZ) werden über *short-term-HSPZ* (ST-HSPZ) multipotente Progenitoren (MPP) gebildet, deren Potential für das „*self-renewal*“ bereits eingeschränkt ist. Aus diesen MPP entwickeln sich entweder Progenitorzellen der myeloischen Zellreihe, die sogenannten *common myeloid progenitors* (CMP) (Akashi et al., 2000) oder Progenitoren der lymphatischen Zellreihe, sogenannte *common lymphoid progenitors* (CLP) (Kondo et al., 1997). Aus den CLP entwickeln sich über weitere Vorstufen sowie Prägungs- und Reifungsprozessen die Zellen des lymphatischen Systems (B- und T-Lymphozyten, natürliche Killerzellen) (Geiger et al., 2016). Aus den CMP entstehen in einem weiteren Teilungsschritt entweder die sogenannten *megakaryocyte erythroid progenitors* (MEP) oder die sogenannten *granulocyte macrophage progenitors* (GMP). Die MEP bilden die determinierten Progenitoren, aus denen sich Erythrozyten und Thrombozyten entwickeln. Die GMP hingegen bilden die determinierten Progenitoren, aus denen sich Granulozyten und Makrophagen entwickeln (Manz et al., 2002; Weissman et al., 2000).

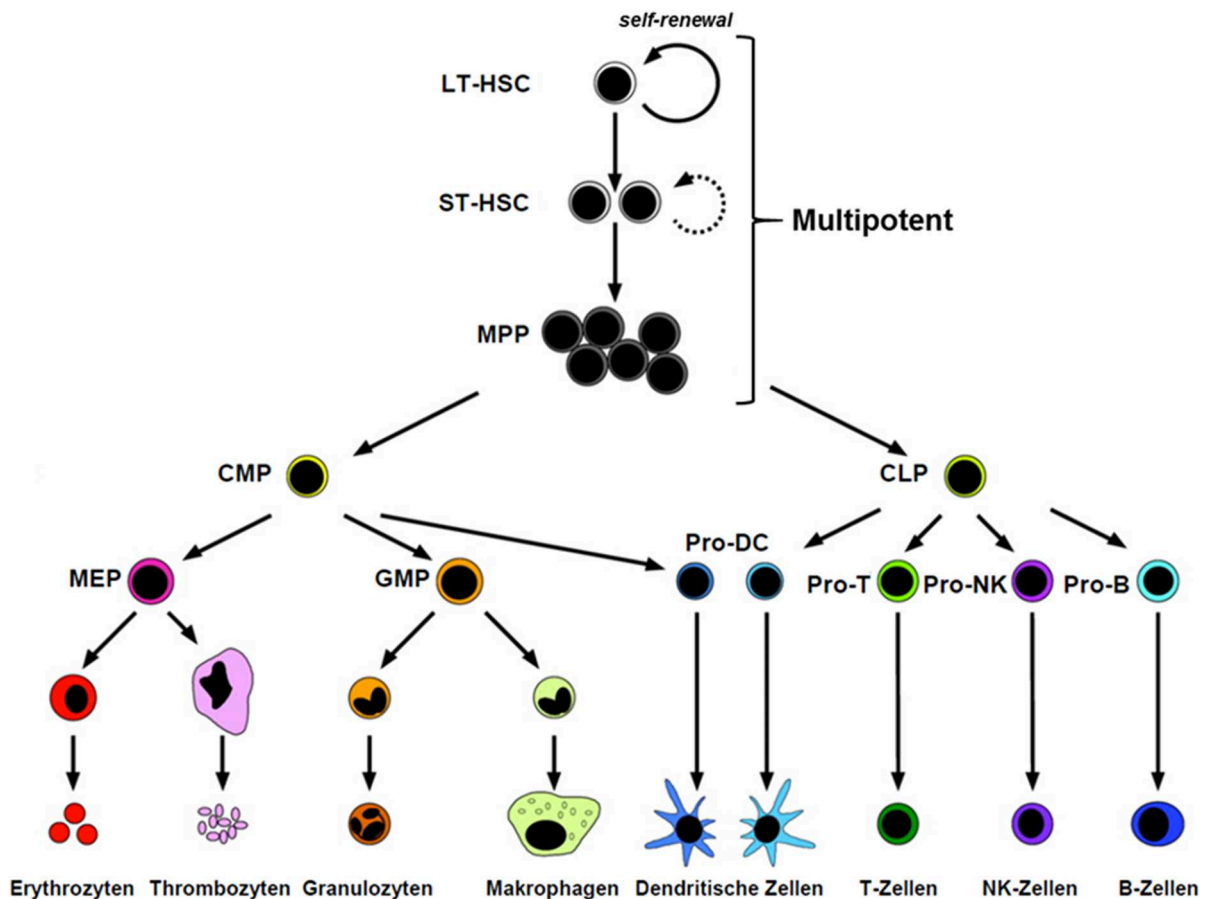


Abb. 1: **Hierarchie der physiologischen Hämatopoiese:** Aus hämatopoietischen Stammzellen (LT-HSPZ, ST-HSPZ) gehen multipotente Vorläuferzellen hervor (MPP), die linienspezifische Progenitorzellen bilden (CMP, CLP). Über weitere Vorläuferzellen werden sämtliche reife Zellen des hämatopoietischen Systems gebildet (modifiziert nach Passegue et al., 2003).

Das Gleichgewicht aus Selbsterneuerung und Differenzierung in die reifen Blutzellen bedarf einer Vielzahl fein abgestimmter Regulationsprozesse, da diese Prozesse zu jeder Zeit dem Bedarf des Organismus angepasst werden müssen (Bsp. Endzündung, Blutverlust). Eine Fehlregulation dieser Mechanismen kann über ein Ungleichgewicht zwischen Selbsterneuerung und Differenzierung zur Entstehung von hämatologischen Neoplasien, wie zum Beispiel akuten und chronischen Leukämien sowie myelodysplastischen und myeloproliferativen Syndromen führen (Becker et al., 2011). Diese Regulation erfolgt zum einen über ein intrinsisches Programm. Das bedeutet, dass in den HSPZ selbst determinierte genetische und epigenetische Mechanismen ablaufen, welche Differenzierung, Proliferation, Selbsterneuerung und Apoptose steuern. Zum anderen können diese intrinsischen Programme durch extrinsische Signale aus dem Knochenmarkmikromilieu, wie zum Beispiel durch humorale Wachstumsfaktoren und Zytokine und durch rezeptorvermittelte Signale in Form von Interaktionen der HSPZ mit Matrixproteinen und anderen im

Knochenmarkmikromilieu vorkommenden Zellen, reguliert werden (Nakamura-Ishizu et al., 2012; Seita et al., 2010).

Die frühen hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen sind charakterisiert durch die Expression spezifischer Oberflächenantigene (Marker) (Civin et al., 1993). Das CD34-Antigen wird auf der Oberfläche von hämatopoietischen Stamm- und liniendeterminierten Vorläuferzellen exprimiert (Simmons et al., 1992). Das CD33-Antigen hingegen wird auf der Oberfläche von Zellen mit myelomonozytärer Differenzierung exprimiert und fehlt auf den frühen hämatopoietischen Stammzellen (Freeman et al., 1995). Diese unterschiedliche Markerexpression haben wir uns bei der Isolation und Untersuchung spezifischer Zellpopulationen zunutze gemacht.

1.2 Das Knochenmarkmikromilieu und die Stammzellnische

Um die lebenslange Blutproduktion aufrecht halten zu können, bedarf es spezifischer räumlicher und funktioneller Strukturen, den sog. Blutstammzellnischen, welche Bestandteil des sog. Knochenmarkmikromilieus sind (Orkin et al., 2008; Schofield et al., 1978).

Dieses Knochenmarkmikromilieu (Abb. 2) besteht zum einen aus verschiedenen Zelltypen wie Megakaryozyten (Meg), Osteoblasten (OB), Osteoklasten, Adipozyten, Endothelzellen (EC), perivaskulären Retikularzellen (CAR), Makrophagen, Nervenzellen und insbesondere mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen (MSPZ, MSC) (Calvi et al., 2003; Zhang et al., 2003). Zum anderen spielen auch azelluläre Bestandteile wie die extrazelluläre Matrix, welche ein Reservoir für Wachstumsfaktoren und Zytokine ist, eine wichtige Rolle (Krause et al., 2013).

Die Zellen des Knochenmarkmikromilieus geben in der jeweiligen Nische Signalmoleküle und Matrixbestandteile ab, welche die HSPZ-Funktion kontrollieren und mit den HSPZ in ständiger Interaktion stehen (Tabelle 1). Faktoren, wie zum Beispiel *stem cell factor* (SCF) (Kent et al., 2008), *transforming growth factor β -1* (TGF- β 1) (Wang et al., 2013; Yamazaki et al., 2011), Angiopoietin 1 (ANGPT1) und Thrombopoietin (TPO) (Arai et al., 2004; Qian et al., 2007) halten die HSPZ in einer Art Ruhezustand. Der *chemokine stromal-derived factor 1* (SDF1) und der *C-X-C chemokine receptor type 4* (CXCR4), Adhäsionsmoleküle wie *vascular cell adhesion protein 1* (VCAM-1) und *extracellular matrix proteins* (ECM) sowie Fibronectin oder Hyaluronsäure, sind wichtige Regulatoren für das *Homing* (Migration ins Knochenmark) und die Verankerung der HSPZ in der Nische (Schepers et al., 2015). Dagegen sind zellgebundene Liganden wie Jagged1/Delta1 (Notch-Liganden) (Lai et al., 2004; Oldershaw et al., 2010) oder lokal ausgeschüttete Zytokine wie Interleukine oder

4

Tabelle 1: Interaktionsmöglichkeiten zwischen HSPZ und Bestandteilen des Knochenmarkmikromilieus in Form von Ligand-Rezeptor-Paaren (modifiziert nach Geyh, 2013)

Rezeptoren	Expression	Beschreibung	Wirkung
c-KIT	Expression durch HSPZ (Ikuta et al., 1992)	Tyrosinkinase Klasse III, spezifischer Rezeptor für KIT-LG (SCF), Aktivierung durch KIT-LG (Kent et al., 2008)	Für Proliferation und Differenzierung von HSPZ (Thoren et al., 2008)
TIE2	Expression durch HSPZ (Arai et al., 2004)	Tyrosinkinase, Aktivierung durch Angiopoietin1. (Arai et al., 2004)	Angiogenese, Hämatopoiese, Adhäsion und Selbsterneuerung der HSPZ. Hält HSPZ in einem physiologischen Ruhezustand (Arai et al., 2004; Takakura et al., 1998)
NOTCH1	Unter anderem exprimiert durch HSPZ (Milner et al., 1994)	Rezeptor für JAGGED1 (Lai et al., 2004; Oldershaw et al., 2010)	Überleben, Entwicklung und Differenzierung verschiedener hämatopoietischer Linien (Bigas et al., 2012)
TGF-β-R1	Unter anderem exprimiert durch HSPZ (Yamazaki et al., 2009; Yamazaki et al., 2011)	Aktivierter TGF-β-R1 phosphoryliert in einem Komplex mit TGF-β-R2 den SMAD-pathway. (Yamazaki et al., 2009)	Hält HSPZ in einen Ruhezustand (Wang et al. 2013; Yamazaki et al., 2011)
Liganden	Expression	Beschreibung	Wirkung
KIT-LG (SCF)	Expression durch endotheliale und perivaskuläre Stromazellen (Broudy et al., 1997)	spezifischer Ligand für c-KIT (Kent et al., 2008)	Für Proliferation und Differenzierung von HSPZ (Thoren et al., 2008)
ANGPT1	Expression durch Osteoblasten und Stromazellen (Arai et al., 2004; Wu et al., 2007)	Angiopoietin-1, Ligand für TIE2 (Arai et al., 2004)	Angiogenese, Hämatopoiese, Adhäsion und Selbsterneuerung der HSPZ. Hält HSPZ in einem physiologischen Ruhezustand (Arai et al., 2004; Takakura et al., 1998)
JAGGED1	Expression durch Osteoblasten und MSPZ (Calvi et al., 2003)	Ligand für Notch1 (Lai et al., 2004; Oldershaw et al., 2010)	Überleben, Entwicklung und Differenzierung verschiedener hämatopoietischer Linien (Bigas et al., 2012)
TGF-β1	Expression durch Zellen des autonomen Nervensystems und Gliazellen (Yamazaki et al., 2011)	Ligand für TGF-β-R1 (Yamazaki et al., 2009)	Hält HSPZ in einem Ruhezustand (Wang et al., 2013; Yamazaki et al., 2011)

1.3 Akute myeloische Leukämie

1.3.1 Definition

Der Begriff Leukämie (griechisch: leukós weiß, haima das Blut) wurde erstmals von Rudolf Virchow im Jahre 1845 geprägt, als dieser bei einem Patienten, der nach heutigem Kenntnisstand an einer chronisch myeloischen Leukämie litt, nach Zentrifugation, eine starke Vermehrung der weißen Blutzellen feststellte (Virchow, 1845 und 1847).

Akute myeloische Leukämien sind eine Gruppe von Blustammzellerkrankungen, bei denen es durch verschiedene Pathomechanismen zu einer malignen Transformation und klonalen Expansion einer myeloischen Stamm- und Progenitorzelle kommt, die zu einer hämatopoietischen Insuffizienz führt (Löwenberg et al., 1999; Rubnitz et al., 2010). Sie sind durch einen raschen und aggressiven Verlauf gekennzeichnet und enden unbehandelt bei allen Patienten innerhalb kurzer Zeit letal.

1.3.2 Epidemiologie

Die akute myeloische Leukämie ist mit 3,7 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner/Jahr die häufigste akute Leukämie im Erwachsenenalter. Sie macht somit 80-90 % der akuten Leukämiefälle bei Erwachsenen und etwa 15-20 % der Fälle im Kindesalter aus (Aoki et al., 1992). Mit steigendem Alter nimmt die Inzidenz weiter zu. Der Altersmedian beträgt etwa 72 Jahre (Juliussen et al., 2009).

1.3.3 Klinische Präsentation

Die Beschwerden der Patienten sind meist unspezifisch und die Anamnese ist in der Regel kurz (in 40 % der Fälle weniger als 1 Monat) (Kern et al., 2003). Die Hauptsymptome der AML sind einer Suppression der physiologischen Hämatopoiese über verschiedene Pathomechanismen geschuldet (Colmone et al., 2008; Shepers et al., 2015). Daraus resultiert, je nachdem wie stark und wie viele Zellreihen betroffen sind, eine Anämie mit Symptomen wie Blässe, Tachykardie, Dyspnoe und Leistungsknick als Ausdruck einer Suppression der „roten Reihe“; eine Neutropenie mit Symptomen wie Fieber und rezidivierenden Infekten als Ausdruck einer Suppression der „weißen Reihe“ und eine Thrombozytopenie mit konsekutiver Blutungsneigung. Je nach Zahl der betroffenen Zellreihen können diese Symptome einzeln oder kombiniert auftreten (Ehninger et al., 2008).

Je nach Subtyp der AML, Leukozytenzahlen und Erkrankungsstadium/Dauer, können weitere Symptome hinzukommen (Bsp. Leukostasesyndrom, durch Hyperviskosität und Verlegung von Kapillaren ausgelöstes Multiorganversagen) (Dutcher et al., 1987). Ebenso können seltenere, weitere extramedulläre Manifestationen auftreten, wie beispielsweise Hautinfiltrationen oder granulozytäre Sarkome (Byrd et al., 1995).

1.3.4 Ätiologie

Die Ätiologie der AML ist in den meisten Fällen nicht bekannt. In etwa 10-20 % der Fälle geht eine oft viele Jahre zurückliegende Strahlen- und/oder Chemotherapie voraus („*therapy-related AML*“). Risiko und Zeitpunkt der Entstehung einer therapieassoziierten AML sind sowohl von den verschiedenen Substanzen und Therapieregimen, als auch von den in den Patienten auffindbaren genetischen Voraussetzungen, abhängig (Leone et al., 2007). Weitere gesicherte Risikofaktoren für das Auftreten einer AML sind eine dosisabhängige Exposition gegenüber Benzol (Hayes et al., 1997) und anderen organischen Lösungsmitteln.

Ein weiterer Teil der AML-Fälle entsteht aus einer anderen hämatologischen Neoplasie, wie zum Beispiel einem myelodysplastischen Syndrom, einer aplastischen Anämie oder einer myeloproliferativen Erkrankung (sekundäre AML, sAML) (Leone et al., 1999). Oftmals haben Patienten mit verschiedenen kongenitalen Erkrankungen und Prädispositionen (z.B. Fanconi-Anämie, Down-Syndrom, kongenitale Neutropenie), aufgrund der Instabilität ihrer Chromosomen ein stark erhöhtes Leukämierisiko (Alter et al., 2014; Magalhaes et al., 2006). Auch gibt es für die AML familiäre Prädispositionen, welche beispielsweise durch Keimbahnmutationen im CEBP α -, DDX41-, RUNX1-, ANKRD26-, ETV6-, GATA2-Gen vermittelt werden (Arber et al., 2016; West et al., 2014).

1.3.5 Pathogenese

Die Transformation von gesunden HSPZ in leukämische Blasten ist ein mehrstufiger Prozess, welcher durch genetische Veränderungen in den gesunden hämatopoietischen Vorläuferzellen verursacht wird. Diese Veränderungen führen zu einer malignen Transformation dieser Zellen mit daraus resultierender klonaler Proliferation, Expansion und Akkumulation (Horton et al., 2012). Für diesen Prozess der malignen Transformation ging man viele Jahre davon aus, dass mindestens zwei genetische Aberrationen benötigt werden (*Two-hit-Hypothese*) (Gilliland et al., 2001; Kelly et al., 2002). Dabei werden zwei Klassen von Mutationen unterschieden. Die Klasse-I-Mutationen bewirken einen Proliferations- und/oder einen Überlebensvorteil der myeloischen hämatopoietischen Stamm- und

Progenitorzellen durch beispielsweise konstitutiv aktive Tyrosinkinasen (FLT-3, RAS, c-KIT). Klasse-II-Mutationen betreffen Transkriptionsfaktoren (RUNX1, RAR α) oder Proteine die an der Regulation der Transkription beteiligt sind (NPM1, TIF2, MLL) und dadurch eine Verminderung der Differenzierung mit verminderter Apoptose auslösen (Gilliland et al., 2001; Kelly et al., 2002; O'Brien et al., 2014).

Heutzutage zeigen systematische Studien der genetischen und epigenetischen Profile von AML-Patienten - wie die Analysen vom *Cancer Genome Atlas Research Network* (TCGO-Research-Network, 2013) - durch *whole-genome sequencing*, *whole-exome sequencing* und RNA und microRNA Sequenzierung sowie durch DNA-Methylierungsanalysen, dass Klasse-I- und Klasse-II-Mutationen nur einen Teil darstellen, der zum komplexen Vorgang der Pathogenese einer AML beiträgt (O'Brien et al., 2014). Denn auch epigenetische Regulatoren (ASXL1, DNMT3A, EZH2, IDH1, IDH2, TET2, UTX) (Shih et al., 2012) müssen bei der Pathogenese der AML, ebenso wie Mutationen von Tumorsuppressorgenen wie p53 und Genen, die für Komponenten des Spliceosoms (SF3B1, SRSF2) kodieren, berücksichtigt werden (Klasse III, IV, V) (Murati et al., 2012). Daher liegen bei der Pathogenese der AML meist mehr als zwei Mutationen vor, welche die AML zu einer genetisch heterogenen Erkrankung machen, die auf dem Boden einer Kombination von Genmutationen in unterschiedlichen zellulären Bereichen/Signalwegen (Tabelle 2, Abb.3) beruht (Döhner et al., 2015).

Tabelle 2: **Funktionelle Kategorien von Genen, die bei AML häufig betroffen sind** (gemäß TCGA-Daten, modifiziert nach Bullinger et al., 2017)

Funktionelle Kategorie	Ausgewählte Gene	Inzidenz in der TCGO-Kohorte (%)
Signalgen Kinasen	(z.B., FLT3, KIT), Phosphatasen (z.B., PTPN11), oder Ras-Familie (z.B., KRAS, NRAS)	59
DNA Methylierung-assoz. Gene	DNMT3A, TET2, IDH1, IDH2	44
Myeloische TF Gene (Fusionen oder Mutationen)	TF Fusionen [t(8;21), inv(16)/t(16;16)] TF Mutationen (RUNX1, CEBPA)	18 22
Chromatin-modifizierende Gene	Mutationen (z.B., ASXL1, EZH2) oder KMT2A Fusionen	30
Nucleophosmin (NPM1) Gen	NPM1	27
Tumorsuppressor Gene	TP53, WT1, PHF6	16
Spliceosomkomplex Gene	SRSF2, SF3B1, U2AF1, ZRSR2	14
Cohesinkomplex Gene	STAG2, RAD21	13

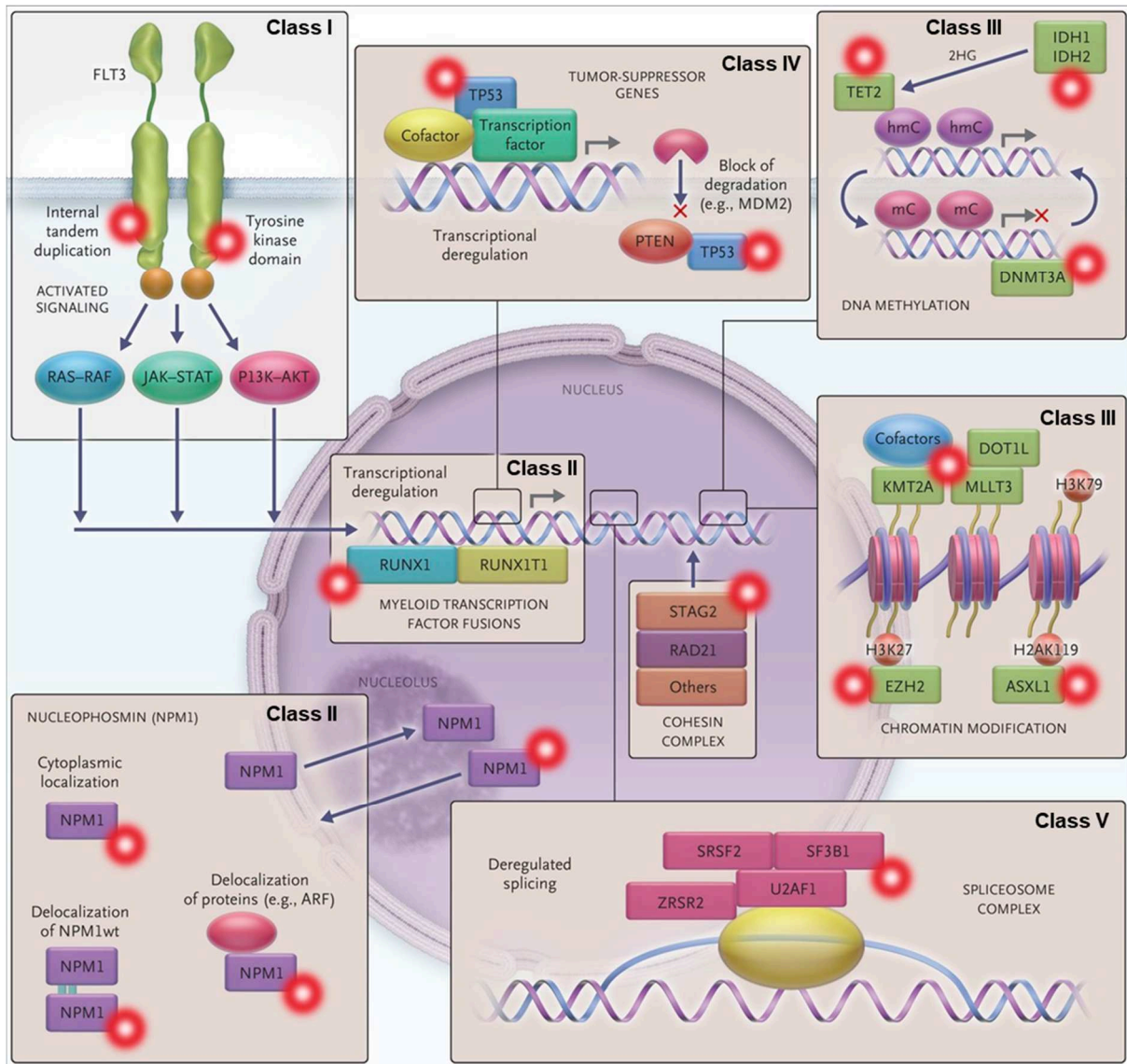


Abb. 3: **Pathogenese der AML:** Die maligne Transformation in eine AML findet durch verschiedene Genmutationen statt. Klasse-I-Mutationen bewirken einen Proliferations- und/oder einen Überlebensvorteil durch beispielsweise konstitutiv aktive Tyrosinkinasen (z.B. FLT-3). Klasse-II-Mutationen betreffen Transkriptionsfaktoren (z.B. RUNX1) oder Proteine, die an der Regulation der Transkription beteiligt sind (z.B. NPM1). Klasse-III-Mutationen betreffen epigenetische Regulatoren (z.B. ASXL1, IDH1). Klasse-IV-Mutationen betreffen Tumorsuppressorgene wie p53 und Klasse-V-Mutationen betreffen Gene, die für Komponenten des Spliceosoms kodieren (z.B. SF3B1). Die AML entsteht daher auf dem Boden einer Kombination von Genmutationen in unterschiedlichen zellulären Bereichen/Pathways (modifiziert nach Döhner et al., 2015).

1.3.6 Diagnostik

Die Diagnose einer akuten myeloischen Leukämie wird anhand des peripheren Blutes und/oder des Knochenmarks gestellt. Hierzu werden neben einer zuvor durchgeführten Anamnese und körperlichen Untersuchung ein Blutbild und ein Differentialblutbild erstellt sowie die Knochenmarkzytologie und -histologie inklusive zytochemischer Färbungen des Knochenmarks beurteilt (Knochenmarkstanze bei *punctio sicca*). Überdies werden sowohl eine Immunphänotypisierung der Blut- und/oder Knochenmarkzellen, als auch

zytogenetische und molekulargenetische Untersuchungen durchgeführt. Im Hinblick auf die weiterführende Therapie sollten der Allgemeinzustand (ECOG Score oder Karnofsky Index) sowie Komorbiditäten des Patienten beurteilt werden.

Nach Definition der WHO (World Health Organisation) liegt die Diagnose einer AML vor, wenn zytomorphologisch der Anteil myeloischer Blasten im peripheren Blut oder Knochenmarkausstrich mehr als 20% beträgt. Liegt eine t(8;21), inv(16), oder t(15;17) vor, kann die Diagnose einer AML auch bei einer Blastenzahl weniger als 20% gestellt werden (Vardiman et al., 2009).

1.3.7 Klassifikation

Bis zur Einführung der WHO-Klassifikation der AML im Jahre 1999, wurde die FAB-Klassifikation der AML verwendet (French-American-British-Klassifikation). Diese basierte auf zytomorphologischen und zytochemischen Merkmalen der leukämischen Blastenpopulation und den Anteilen reifer myeloischer Zellen (Bennett et al., 1976). Später wurde die Klassifikation um immunologische und elektronenmikroskopische Befunde erweitert (Bennett et al., 1985; Bennett et al., 1991). Dabei verdeutlicht die Einteilung in die FAB-Klassen M0 bis M7 verschiedene Ausreifungs- und Differenzierungsformen der AML, die jedoch außer bei der FAB M3 nur wenig über die Prognose und die hiermit einhergehende Therapieentscheidung aussagen.

Daher wurde mit der Identifizierung weiterer molekularer Veränderungen und anderer Prognosefaktoren, wie zum Beispiel spezifischen zytogenetischen Aberrationen und Mutationen, das Vorliegen einer therapieinduzierten AML, einer AML aus einem MDS, die akuten myeloischen Leukämien von der WHO neu klassifiziert (Arber et al., 2016; Jaffe et al., 2001) (Tabelle 3).

Tabelle 3: **WHO 2016 Klassifikation akuter myeloischer Leukämien** (modifiziert nach Arber et al., 2016)

AML mit rekurrenter genetischer Anomalie	AML mit t(8;21)(q22;q22.1); RUNX1-RUNX1T1 AML mit inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); CBFB-MYH11 Akute Promyelozytenleukämie (APL) mit PML-RARA AML mit t(9;11)(p21.3;q23.3); MLLT3-KMT2A AML mit t(6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214 AML mit inv(3)(q21.3;q26.2) oder t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2-MECOM AML (megakaryoblastisch) mit t(1;22)(p13.3;q13.3); RBM15-MKL1 Provisorische Entität: AML mit BCR-ABL1 AML mit mutiertem NPM1 AML mit biallelischer Mutation von CEBPA Provisorische Entität: AML mit mutiertem RUNX1
AML mit Myelodysplasie-assoziierten Veränderungen	
Therapie-assoziierte myeloische Neoplasien	
AML, nicht anderweitig klassifiziert (NOS)	AML mit minimaler Differenzierung (analog FAB M0) AML ohne Ausreifung (analog FAB M1) AML mit Ausreifung (analog FAB M2) Akute myelomonozytäre Leukämie (analog FAB M4) Akute monoblastäre/monozytäre Leukämie (analog FAB M5a-b) Reine Erythroleukämie (analog FAB M6) Akute Megakaryoblastäre Leukämie (analog FAB M7) Akute Basophilen-Leukämie Akute Panmyelose mit Myelofibrose
Myeloisches Sarkom	
Myeloische Down-Syndrom-assoziierte Proliferation	Transient abnorme Myelopoiese (TAM) Myeloische Leukämie mit Down Syndrom
Blastische plasmazytoide dendritische Zell-Neoplasien	
AML unklarer Linienzugehörigkeit	Akute undifferenzierte Leukämie Akute Leukämie mit gemischtem Phänotyp (MPAL) mit t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1 MPAL mit t(v;11q23.3); KMT2A rearrangiert MPAL, B/myeloisch, nicht weiter klassifiziert (NOS) MPAL, T/myeloisch, nicht weiter klassifiziert (NOS)

1.3.8 Prognose/Prognosefaktoren

Die Prognose der AML wird im Wesentlichen durch das zytogenetische/molekulargenetische Risikoprofil und das Alter der Patienten beeinflusst (Juliussen et al., 2012). Die AML wird in 3 Risikogruppen unterteilt (Tabelle 4). Bei Patienten unter 60 Jahren beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate 52% in der Günstig-Risiko-Gruppe, wohingegen in der Ungünstig-Risiko-Gruppe die 5-Jahres-Überlebensrate nur 14% beträgt. Die Überlebensraten in der Intermediärgruppe liegen bei 34% (Röllig et al., 2011).

Die 5-Jahres-Überlebensrate der über 75-Jährigen hingegen beträgt nur noch 2% (Ries et al., 2006). Die schlechte Überlebensrate älterer Patienten ist in der Regel auf eine höhere Anzahl genetischer Aberrationen der Erkrankung zurückzuführen und der Tatsache geschuldet, dass der Allgemeinzustand und Begleiterkrankungen älterer Patienten in den meisten Fällen lediglich eine weniger intensive, prinzipiell nicht kurative Behandlung zulassen (Smith et al., 2004).

Neben den ungünstigen molekularen- und zytogenetischen Merkmalen und dem Alter gehen ebenso eine hohe Leukozytenzahl bei Diagnosestellung, eine sekundäre oder therapieassoziierte Leukämie, ein extramedullärer Befall sowie Blastenpersistenz nach der Induktionstherapie, mit einer schlechteren Prognose einher (Döhner et al., 2015).

Tabelle 4: Molekular-zytogenetische Risikogruppen gemäß der Klassifikation des European LeukemiaNet ELN 2017 (nach Döhner et al., 2016)

ELN Risikogruppe	Aberrationen
günstig	t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1 inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); CBFB-MYH11 Mutiertes NPM1 ohne FLT3-ITD (normaler Karyotyp) oder mit FLT3-ITD ^{niedrig} Biallelisch mutiertes CEBPA (normaler Karyotyp)
intermediär	Mutiertes NPM1 mit FLT3-ITD ^{hoch} (normaler Karyotyp) Wildtyp-NPM1 ohne FLT3-ITD (normaler Karyotyp) oder mit FLT3-ITD ^{niedrig} (mit oder ohne ungünstige genetische Aberrationen) t(9;11)(p22;q23); MLLT3-KMT2A Zytogenetische Aberrationen, die nicht als günstig oder ungünstig eingestuft wurden
ungünstig	t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214 t(v;11)(v;q23); KMT2A-Genumlagerung t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1 inv(3)(q21q26.2) oder t(3;3)(q21;q26.2); GATA2, MECOM (EVI1) -5 oder del(5q); -7; -17/abnl(17p) Komplexer Karyotyp (≥3 Aberrationen) Monosomaler Karyotyp (eine Monosomie, assoziiert mit mindestens einer weiteren Monosomie oder einer anderen strukturellen, chromosomalen Aberration (außer CBF-AML)) Wildtyp-NPM1 mit FLT3-ITD ^{hoch} Mutiertes RUNX1 Mutiertes ASXL1 Mutiertes TP53

1.3.9 Therapie/Supportivtherapie

Bei der Therapieentscheidung muss zunächst berücksichtigt werden, ob der Patient mit intensiven Chemotherapie-Regimen in kurativer Intention oder nur mit niedrig-dosierten

Chemotherapien und damit palliativ behandelt werden kann. Diese Entscheidung beruht heutzutage nicht mehr allein auf dem kalendarischen Alter der Patienten, sondern berücksichtigt darüber hinaus vor allem Komorbiditäten und den Allgemeinzustand. Hilfreich bei einer solchen Einschätzung können verschiedene Scores, wie zum Beispiel der Eastern Cooperative Oncology Group-(ECOG)-Performance Status oder Cumulative Illness Rating Scale (CIRS) oder der AML- und PINA-Score sein (Krug et al., 2010).

Im Falle einer intensiven Chemotherapie erfolgen zunächst 1-2 Zyklen einer Induktionstherapie bestehend aus einem Anthrazyklin und Cytarabin (sog. 7+3 Schema) (Yates et al., 1982), mit dem Ziel, eine komplette Remission zu erreichen.

Im Anschluss daran erfolgt je nach Risikoprofil eine Konsolidierung mit hochdosiertem Cytarabin (Mrozek et al., 2012) oder eine allogene Stammzelltransplantation (Döhner et al., 2015).

Für den Fall, dass Patienten aufgrund eines schlechten Allgemeinzustandes, Alter und Komorbiditäten nicht intensiv behandelt werden können, kann die Krankheitsprogression durch die Gabe von niedrig dosiertem Ara-C (Burnett et al., 2007) oder einer epigenetischen Therapie mit Azacitidin (Dombret et al., 2015) oder Decitabine (Kantarjian et al., 2012) verzögert und insbesondere durch die letztgenannten hypomethylierenden Substanzen die Lebenszeit verlängert werden.

Gleichwohl, ob die Entscheidung auf eine kurative intensive Therapie oder auf eine palliative Therapie fällt, werden die Hauptsymptome der AML durch eine hämatopoietische Insuffizienz hervorgerufen. Hinzu kommt eine durch die Therapie verursachte Verringerung aller Blutzellreihen. Dies erfordert eine umfangreiche Supportivtherapie, um das Überleben der Patienten zu gewährleisten. Bei Blutungszeichen, welche durch eine Thrombozytopenie hervorgerufen werden oder bei Blutungsgefahr wegen niedriger Thrombozytenzahlen (meist $<10.000/\mu\text{l}$), sollten Thrombozytenkonzentrate transfundiert werden (Wandt et al., 2012). Bei einer symptomatischen Anämie werden Transfusionen von Erythrozytenkonzentraten notwendig (Zimmermann et al., 2004). Durch eine Suppression der Bildung der gesunden weißen Blutzellen, wie beispielsweise den Granulozyten, liegt ein großes Infektionsrisiko sowohl für bakterielle Infektionen als auch für Pilzinfektionen, wie beispielsweise durch Aspergillen verursachte Pneumonien vor. Dies erfordert eine antiinfektive Prophylaxe mit Antibiotika und Antimykotika (Freifeld et al., 2006; Mousset et al., 2014), da ein Versterben der Patienten an einer Infektionskomplikation sonst sehr wahrscheinlich wäre. Trotzdem bleiben die durch die insuffiziente Hämatopoiese verursachten Komplikationen weiterhin die Haupttodesursachen bei der AML. Aus diesem Grunde beschäftigt sich diese Arbeit mit der

den zellulären und molekularen Mechanismen der hämatopoietischen Insuffizienz bei Patienten mit AML.

1.4 Pathogenese der hämatopoietischen Insuffizienz / Aktueller Stand der Forschung und Ziele der Arbeit

Eine hämatopoietische Insuffizienz mit daraus resultierenden Zytopenien ist das Hauptmerkmal der akuten myeloischen Leukämie (Löwenberg et al., 1999; Rubnitz et al., 2010). Im Zusammenhang damit stehen Komplikationen wie Blutungen und Infektionen, die auch gleichzeitig die Haupttodesursachen bei AML- und MDS-Patienten darstellen (Nachtkamp et al., 2016; Stalfelt et al., 2001).

Viele Jahrzehnte ging man von einer durch den malignen expandierenden Zellklon verursachten rein räumlichen Verdrängung der gesunden CD34⁺ HSPZ im Knochenmark aus (van Bakkum et al., 1975; van Bakkum et al., 1981).

Heute weiß man, dass dieser Prozess der Myelosuppression deutlich komplexer ist und über verschiedene funktionelle Mechanismen im Knochenmarkmikromilieu abläuft. Unsere Arbeitsgruppe konnte gemeinsam mit anderen zeigen, dass der hämatopoietischen Insuffizienz zum einen eine funktionelle Hemmung sog. mesenchymaler Stromazellen (MSC) zugrunde liegt (Geyh et al., 2016; Schepers et al., 2015; Schroeder et al., 2016). Zum anderen weisen einige Arbeiten darauf hin, dass die malignen Zellen auch einen direkten supprimierenden Einfluss auf die gesunden hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen (HSPZ) ausüben könnten (Cheng und Cheng, 2016; Cheng et al., 2015; Colmone et al., 2008; Hu et al., 2009).

Durch Mutationen in verschiedenen Genen kommt es zu einer malignen Transformation einer gesunden HSPZ im Knochenmark. In der Folge wird das Knochenmark von AML-Patienten von einer klonal expandierenden Blastenpopulation dominiert. Diese hat über verschiedene Mechanismen einen supprimierenden Einfluss auf die mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen (MSPZ). Dabei spielen supprimierende Faktoren in Form von Zytokinen oder Exosomen ebenso wie direkte Zell-Zell-Interaktionen eine Rolle. In Folge dessen sind die MSPZ bei AML-Patienten molekulargenetisch, epigenetisch und funktionell verändert. Dies führt zu einer verminderten Stromaunterstützung der gesunden HSPZ, die dadurch in ihrer Proliferation und Differenzierung gehemmt sind (Geyh et al., 2016). Ebenso besteht die Frage, ob die malignen Zellen auch einen direkten supprimierenden Einfluss auf die gesunden HSPZ haben und wenn ja über welche Mechanismen dies geschieht (Abb.4).

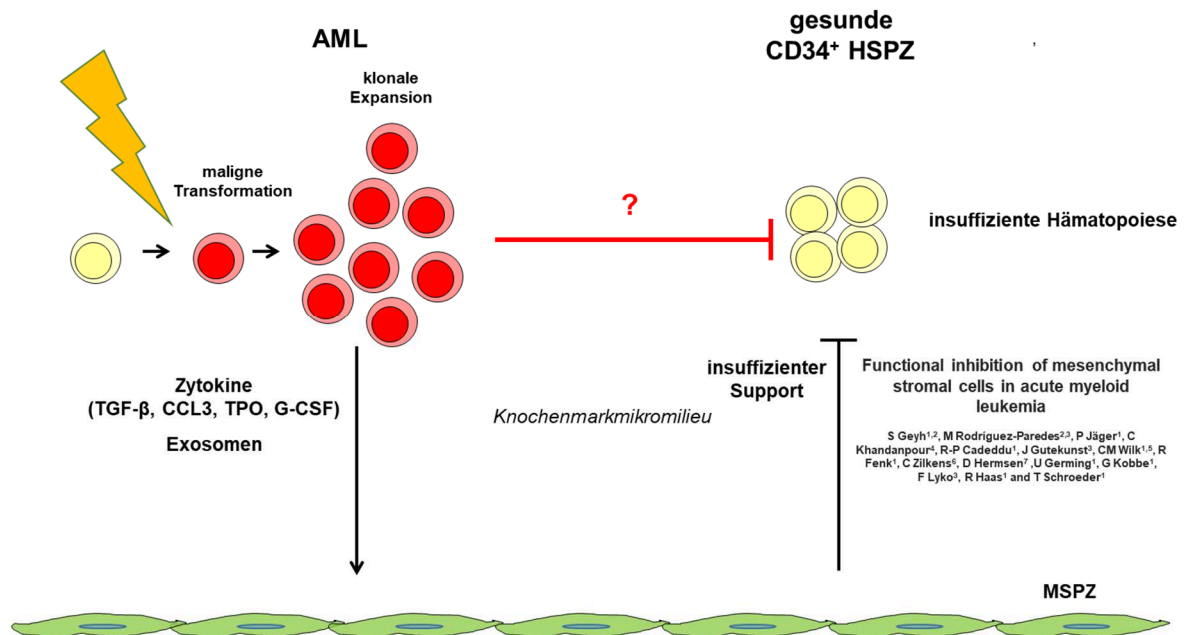


Abb. 4: **Schematisches Modell der Myelosuppression im Knochenmarksmikromilieu:** Durch Mutationen in verschiedenen Genen kommt es zu einer malignen Transformation und klonalen Expansion einer gesunden HSPZ im Knochenmark. Diese Blasten haben einen Einfluss auf die mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen (MSPZ, MSC), welche bei AML strukturell, epigenetisch und funktionell verändert sind. Dies führt zu einer verminderten Unterstützung der gesunden HSPZ (Geyh et al., 2016). Gegenstand dieser Arbeit ist der Hypothese nachzugehen, dass myeloische Blasten auch einen direkten supprimierenden Einfluss auf die gesunden HSPZ haben könnten (modifiziert nach Geyh 2013, Schroeder).

Bei murinen Leukämie-Modellen konnte bisher gezeigt werden, dass die expandierenden Blasten nicht zu einer Verminderung der Anzahl der hämatopoietischen Stammzellen führten, aber dennoch Zytopenien induzierten, indem die Differenzierung der HSPZ verhindert wurde (Miraki-Moud et al., 2013). Andere Arbeitsgruppen konnten während der Progression der Erkrankung im Knochenmark zeigen, dass weiterhin ein konstanter Anteil multipotenter Vorläuferzellen in die S-Phase pro Stunde eintritt, die Gesamtzahl gesunder HSPZ jedoch stark verringert war (Akinduro et al., 2018).

Ziel dieser Arbeit ist, der Hypothese, dass leukämische Blasten auch einen direkten supprimierenden Einfluss auf gesunde HSPZ haben, experimentell nachzugehen. Dazu haben wir die Situation der Knochenmarksinfiltration mit Hilfe von Zellkulturexperimenten mit konditionierten Medien experimentell nachgestellt.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist, mit Hilfe von qRT-PCR Analysen eine Veränderung in der Expression verschiedener Signalmoleküle zu untersuchen, welche Ursächlich für diese supprimierenden Effekte sein könnten.

2. Material und Methoden

2.1 Allgemeine Methodik

2.1.1 Materialien und Geräte

Name	Hersteller
Geräte	
Alphamager™	Alpha Innotech, Oldendorf
Biofuge® fresco Haereus	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Brutschränke/Inkubatoren: Heraeus HERA cell	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Durchflusszytometer: MoFlowXDP	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Eppendorf Mastercycler® gradient	Eppendorf, Hamburg
HERA safe, Haereus	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Megafuge® 1.OR , Haereus	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Mikroskope: ZEISS Axiovert 25	ZEISS, Oberkochen
Nanodrop® ND-1000 Spectrophotomete	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Owl™ EasyCast™ B2	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
PCR-Plattenzentrifuge PerfectSpin P	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
PerfectSpin 24 Zentrifuge	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
Pipetus® akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Pippette: Eppendorf Research® (0,1 – 2,5 µl), (10 – 100 µl), (100 – 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Power Pac 300	Bio-Rad Laboratories, München,
StepOne™ Real-Time PCR System	Invitrogen™ by life technologies, Carlsbad, USA
Vortexer REAX top	Heidolph Instruments, Schwabach
Zellzählgerät: CASY® Cell Counter and Analyser System Model TT	OLS OMNI Life Science GmbH & Co. KG, Bremen
Allgemeine Materialien und Chemikalien	
A. dest. (destilliertes Wasser)	Fresenius Kabi AG, Homburg
Cryo.s™ Einfrier Röhrchen (2ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Eppendorf Tubes (1,5ml, 2ml)	Eppendorf, Hamburg
Falconröhrchen (15ml, 50ml) CELLSTAR®	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Formaldehyd (4%)	Otto Fischer GmbH, Saarbrücken
Formaldehyd (Methanol Free, 10 % UltraPure)	Polysciences Inc., Warrington, PA, USA
PBS (Phosphate buffered saline) pH 7,3	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
SafeSeal-Tips®Premium Line, (10,100,1000µl)	Biozym, Hamburg
Schottflaschen	DURAN Group GmbH, Wertheim
Stripette® Corning® Costar® (5ml/10ml/25ml)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Spezifische Materialien und Chemikalien MNC Isolation & CD34⁺ Selektion	
Biocoll Separating Solution (Ficoll)	Biochrom, Berlin
CD34 ⁺ MicroBead Kit (human)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Direct CD34 Progenitor Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
EDTA (0,5M)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Humanes Serumalbumin HSA (5%)	CSL Behring GmbH, Hattersheim
LSM 1077 Separationsmedium	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Lysepuffer	Zentralapotheke Uniklinik Düsseldorf
MACS® Separation Columns (25 LS Columns)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MidiMACS Magnetischer Zellseparator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Pre-Separation-Filter 0,2 µm	Partec, Münster
Spezifische Materialien und Chemikalien Zellkultur/Konditionierte Medien/CFU-Assay/ Proliferation	
Bottle-Top-Filter (150 ml) Unitear® CorningInc.	Corning Costar NY, USA
Braun Inject 20ml mit Luer-Lock	B.Braun, Melsungen
DMEM (low glucose 1g/L, high glucose 4,5g/L)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Erythropoietin	Roche, Mannheim

FBS (Fetal Bovine Serum), Fetales Kälberser.	Biochrom AG, Berlin
fms-related tyrosine kinase 3 ligand (FLT3-L)	Peprtech, Rocky Hill, NJ, USA
HPGM™(Hematopoietic Prog. GrowthMedium)	Lonza, Köln
Interleukin-3 (IL-3)	Peprtech, Rocky Hill, NJ, USA
Interleukin-6 (IL-6)	Peprtech, Rocky Hill, NJ, USA
Methylzellulose MethoCult H4434 Classic	StemCell Technologies, Vancouver, BC,Kanada
Minisart® Spritzenvorsatzfilter 0,45µm	Sartorius AG, Göttingen
Penicillin/Streptomycin/L-Glutamin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Pumpe KNF LAB	KNF NEUBERGER, Trenton, USA
RPML-1640	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
stem cell factor (SCF, kit-Ig)	Peprtech, Rocky Hill, NJ, USA
Suspensions Zellkulturplatten (6-, 24-well)	Corning Costar, NY, USA
Zellkulturflasche Suspension (T25cm²,T75cm²)	Corning Costar, NY, USA

Spezifische Materialien und Chemikalien Molekularbiologie

(EDTA)Ethylendiamintetraacetat (fest)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
10 mM dNTP Mix	Invitrogen™ by life technologies, Carlsbad, USA
5x First Strand Buffer	Invitrogen™ by life technologies, Carlsbad, USA
5x Phusion® HF React. Buffer (+7,5mM MgCl ₂)	Finnzymes/Thermo Scientific, Schwerte
Agarose	Invitrogen™ by life technologies, Carlsbad, USA
Ambion® DEPC-Treated Water	Invitrogen™ by life technologies, Carlsbad, USA
Borsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Chloroform	Merck, Darmstadt
DNA Leiter (Quick Load 100bp DNA Ladder)	New England Biolabs (Frankfurt a.M.)
DNA Probenp. (Blue/Orange 6x Loading Dye)	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
DTT (0,1M)	Invitrogen™ by life technologies, Carlsbad, USA
Eppendorf PCR-Gefäße 0.2 ml	Eppendorf, Hamburg
Ethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ethanol absolut zur Analyse	Merck, Darmstadt
Ethidimbromid (10mg/ml)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt
MgCl ₂	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Oligo(dT) ₁₂₋₁₈ Primer (50µM)	Invitrogen™ by life technologies, Carlsbad, USA
PCR-Reaktionsplatte (96-well)	Applied Biosystems, Warrington, UK
Phusion® High-Fidelity PCR Kit, Taq DNA Polymerase	Finnzymes/Thermo Scientific, Schwerte
Power SYBR Green PCR Master Mix (2x)	Applied Biosystems Warrington, UK
QIAShredder	Qiagen, Hilden
RNase-Free DNase Set	QIAGEN, Hilden
RNaseOUT™ (40U/µl)	Invitrogen™ by life technologies, Carlsbad, USA
RNeasy Micro Kit	QIAGEN, Hilden
RNeasy Mini Kit	QIAGEN, Hilden
β-Mercaptoethanol (2-Mercaptoethanol)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
SuperScript® II System for RT PCR (200 U/µl)	Invitrogen™ by life technologies, Carlsbad, USA
TRI Reagent® (Trizol)	Invitrogen™ by life technologies, Carlsbad, USA
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

2.1.2 Software

Softwareprogramme	Hersteller
EndNote X7	Thomson Reuters, NYC, USA
Flour Chem	ProteinSimple, San Jose, CA, USA
ND-1000 V 3.5.2	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Office Home & Student 2013 (Word, Excel)	Microsoft, Redmond, USA
Prism 5	GraphPad Software Inc., USA
StepOne Software v2.1	life technologies, Carlsbad, USA
Summit 5.1	Beckman Coulter GmbH, Krefeld

2.1.3 Probenherkunft, Patientencharakteristik und Ethikvotum

Die in dieser Arbeit verwendeten CD34⁺ leukämischen Vorläuferzellen und mononukleären Zellen (MNC) wurden aus dem Knochenmark von unbehandelten AML-Patienten mittels Aspiration gewonnen. Diese hatten zuvor ihr Einverständnis für die Entnahme für Forschungszwecke gegeben (Tabelle 5). Als gesunde Kontrollen und für Interaktionsanalysen im Rahmen von Zellkulturexperimenten mit Überständen dienten CD34⁺ HSPZ und mononukleäre Zellen aus Hüftköpfen von hämatologisch gesunden, altersgepaarten Probanden, die in der hiesigen Orthopädischen Klinik einen Hüftersatz erhielten (Tabelle 5). Das entsprechende Ethikvotum für dieses Forschungsvorhaben wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät erteilt unter der Nummer 4777.

Tabelle 5: **Charakteristika: gesunde Probanden und AML-Patienten.**

Hämatologisch gesunde Probanden Demographie

Anzahl	47	
Medianes Alter (Jahre)	68	
Mittelwert	63	
Spannweite	19-83	
Geschlecht (Anzahl)		
Männlich	21	45%
Weiblich	26	55%

Patienten Demographie und klinische Charakteristik

Anzahl	24	
Medianes Alter (Jahre)	56	
Mittelwert	55	
Spannweite	25-74	
Geschlecht (Anzahl)		
Männlich	9	37,5%
Weiblich	15	62,5%
WHO Diagnose (Anzahl)		
With recurrent genetic abnormalities	10	42%
With MDS-related changes	6	25%
NOS	7	29%
Therapie-related	1	4%
Median Blasten KM (%)	68	
Spannweite	20-93	
Median Leukozytenzahl (Anzahl/μl)	26.000	
Spannweite	1.000-253.000	
Median ANC (Anzahl/μl)	2.515	
Spannweite	90-48.070	
Median Hämoglobin (g/dl)	9,0	
Spannweite	5,5-15,6	
Median Thrombozytenzahl (Anzahl/μl)	45500	
Spannweite	8.000-220.000	

Zytopenien (Anzahl)		
Unilinieäre Zytopenie	3	13%
Bizytopenie	13	54%
Panzytopenie	8	33%

2.1.4 AML-Zelllinien

Die kommerziell erhältlichen immortalisierten AML Suspensionszelllinien HL-60 (akute Promyelozyten Leukämie), THP-1 (akute monozytäre Leukämie) und MV4-11 (akute myelomonozytäre Leukämie) wurden für die Gewinnung von konditionierten Medien verwendet. Die Zelllinien stammten vom Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig. Eine Übersicht über die verwendeten AML-Zelllinien ist in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: **Übersicht über die Herkunft der verwendeten AML-Suspensionszelllinien.** (adaptiert nach Informationen vom Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig)

Zelllinie	Herkunft
HL-60	Isoliert aus peripherem Blut einer 35-jährigen Frau mit akuter Promyelozytenleukämie im Jahre 1976
THP-1	Isoliert aus peripherem Blut eines 1-jährigen Jungen mit akuter Monozytärer Leukämie bei einem Rezidiv im Jahre 1978
MV4-11	Isoliert aus peripherem Blut eines 10-jährigen Jungen mit akuter Monozytärer Leukämie (FAB AML M5)

2.1.5 Isolation der mononukleären Zellfraktion (MNC) aus dem Knochenmark

Für die Isolation der MNC aus dem Knochenmarkaspirat der Patienten oder der hämatologisch gesunden Probanden wurde eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Das Volumen des KM-Aspirats wurde bestimmt und anschließend vorsichtig auf 15 ml Ficoll (Dichte 1.077 g/ml, LSM 1077 Separationsmedium, PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland) geschichtet. Für eine Phasentrennung wurde das Knochenmark ohne Bremse zentrifugiert (835 g/ 20 min/ 20°C). Nach der Zentrifugation setzte sich die mononukleäre Zellfraktion als weißliche schmale Schicht (sogenannte Interphase) unterhalb des Plasmas ab (Abb. 5).

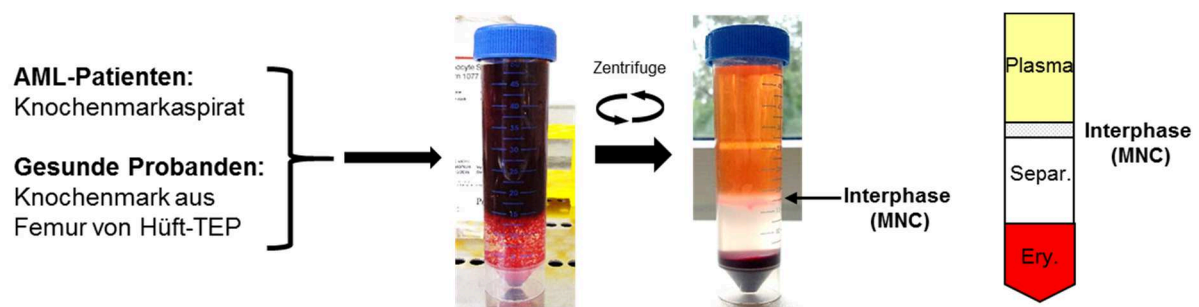


Abb. 5: **Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation:** Das Knochenmark aus den Proben wird auf einen Ficoll (Separationsmedium) geschichtet. Für eine Phasentrennung wird das Knochenmark ohne Bremse zentrifugiert. Nach der Zentrifugation setzt sich die mononukleäre Zellfraktion (MNC) als sogenannte Interphase unterhalb des Plasmas ab. Unterhalb des Separationsmediums (Separ.) lagern sich die Erythrozyten (Ery.) ab.

Die Interphase wurde anschließend mit einer Stripette vorsichtig abgenommen, ohne die Phasen erneut zu vermischen. Die MNC wurden in ein neues Falcon überführt, zweimal mit PBS gewaschen und erneut zentrifugiert (305 g, 10 min, 4°C). Die restlichen Bestandteile des KM und die Überstände der Waschschrte wurden verworfen. Das Zellpellet mit den MNC wurde zur Beseitigung der restlichen Erythrozyten einer Erythrolyse unterzogen. Dazu wurde das Pellet in 10 ml 0,83%-igem Ammoniumchlorid resuspendiert und für 10 min bei 4°C inkubiert. Im Anschluss daran wurde zweimal mit MACS Puffer (500 ml PBS + 1,5 ml HSA (5%) + 1,5 ml EDTA (0,5 M)) gewaschen und die Zellen zentrifugiert (305 g, 10 min, 4°C). Nach einem weiteren Waschschrte wurde die Zellzahl mittels CASY® Zellzähler TTC (OLS OMNI Life Science GmbH & Co. KG, Bremen) bestimmt. Ein Teil der MNC wurde für Experimente verwendet.

2.1.6 Isolation von CD34⁺ hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen (HSPZ) aus dem Knochenmark

Nach Isolation der mononukleären Zellen durch eine Dichtegradientenzentrifugation wurden die Zellen erneut zentrifugiert (305 g, 10 min, 4°C) und der Überstand verworfen. Um die CD34⁺ HSPZ von den anderen MNC zu separieren, wurde nach Färbung mit einem magnetisch konjugierten Antikörper eine magnetische Zellseparation (MACS) durchgeführt (Abb. 6 B). Dazu wurde die Midi MACS Technik (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) nach Herstellerangaben verwendet. Um die Separation durchzuführen, wurden 1×10^8 MNC in 300 µl MACS Puffer aufgenommen und mit 100 µl *Blocking* Reagenz und 100 µl des magnetisch konjugierten Antikörpers versetzt. Anschließend wurden die Zellen 30 min bei

4°C inkubiert. Nach Inkubation wurden die gefärbten Zellen mit 50 ml MACS-Puffer gewaschen und zentrifugiert (305 g, 10 min, 4°C). Die LS-Säule wurde in den Magnethalter (Abb. 6 **A**) eingebracht und mit 3 ml MACS-Puffer äquilibriert. Anschließend wurden die gefärbten MNC in 2 ml MACS-Puffer aufgenommen und auf die LS-Säule überführt. Nach Durchlaufen der Probe wurde die Säule noch zweimal mit 7 ml MACS Puffer gespült und der Durchfluss verworfen. Nach Entfernung der LS-Säule wurde mittels eines Druckkolbens die Probe mit 7 ml MACS-Puffer eluiert. Danach wurde die Zellzahl der gewonnenen CD34⁺ HSPZ mit dem CASY® Zellzähler bestimmt. Die Zellen wurden für verschiedene Experimente verwendet.

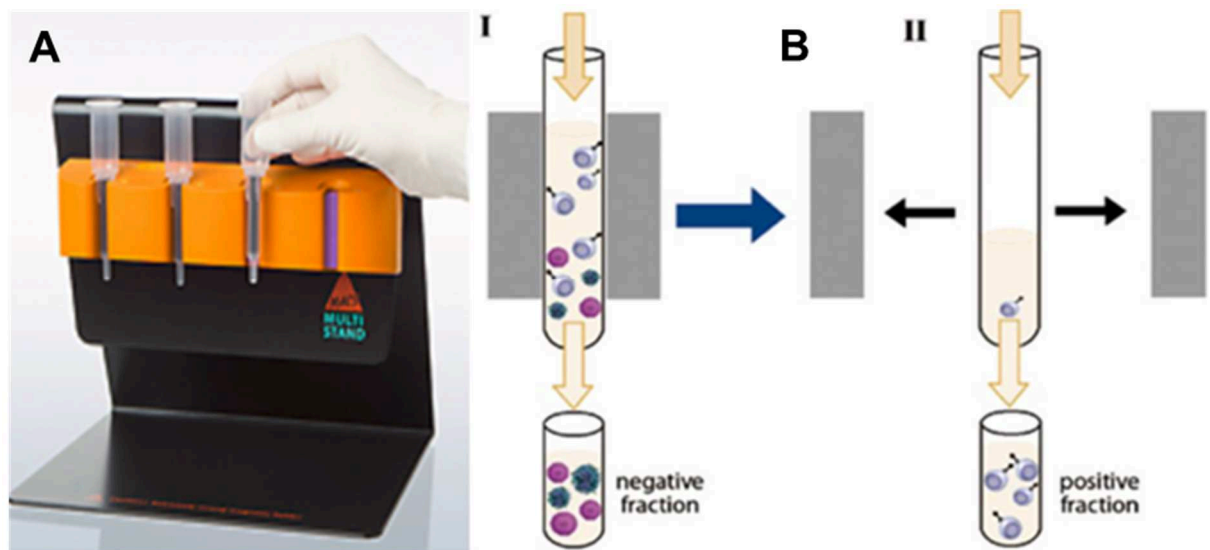


Abb. 6: **Prinzip des Magnetic-Activated Cell Sorting (MACS):** **A** Magnetvorrichtung für die Durchführung eines MACS (MidiMACS Magnetischer Zellseparator, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland). **B** Nach Spülung der sich in dem Magneten befindenden Säule verbleiben nur noch die mit dem *magneto bead* konjugierten Antikörper markierten Zellen in der Säule. Die nicht markierten Zellen (*negative fraction*) werden herausgespült (I). Nachdem die Säule aus dem Magneten herausgenommen wurde, können die markierten Zellen (*positive fraction*) eluiert werden, da keine magnetische Anziehungskraft mehr auf die Zellen wirkt (II). (Werbeabbildung Miltenyi Biotec, Biochemie online Abbildungen 2004)

2.2 Zellkultur

Um die Situation der Knochenmarksinfiltration durch die leukämischen Blasten und deren Einfluss auf die gesunden hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen experimentell nachzustellen, wurden Zellkulturexperimente mit konditionierten Medien durchgeführt.

2.2.1 Kultivierungsbedingungen

Die gesamten Zellkulturexperimente wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Zellen wurden in einem Zellkulturschrank immer unter den gleichen Umgebungsbedingungen kultiviert (37°C, 21% O₂ und 5% CO₂). Die Zellkulturmedien wurden unter sterilen Bedingungen hergestellt.

2.2.2 Zellkulturmedien

Hematopoietic Progenitor Growth Medium +++++ (HPGM++++):

Dieses Medium dient zur Kultivierung primärer CD34⁺ HSPZ (Tabelle 7). Da sich in Vorversuchen herausstellte, dass RPMI++++ -Medium ein nahezu äquivalent gutes Medium für die Kultivierung von CD34⁺ HSPZ darstellt, wurde HPGM mangels Vergleichbarkeit für weitere Experimente nicht mehr verwendet (Abb.7).

Tabelle 7: **Zusammensetzung von 100 ml HPGM++++ -Medium**

HPGM++++ -Medium (100 ml) + 20% FBS + 1 %PSG	
HPGM	78,6 ml
Fetales Kälberserum (FBS)	20 ml
100 U/ml Penicillin/Streptomycin/L-Glutamin	1 ml
10 ng/ml IL-3	100 µl
10 ng/ml IL-6	100 µl
10 ng/ml SCF	100 µl
10 ng/ml FLT-3-L	100 µl

RPMI-1640:

Für die Kultivierung der AML-Zelllinien HL-60, THP-1 und MV4-11 wurde RPMI-1640 Medium mit 10% FBS und 1% PSG verwendet (Tabelle 8). Für die Zellkulturexperimente mit konditionierten Medien gewährleistete die Hinzugabe von Zytokinen zu den generierten Überständen der AML-Zelllinien im Nachhinein eine bessere Vergleichbarkeit. Ohne Zytokine (+++++) proliferierten AML-Zelllinien zwar, nicht aber CD34⁺ HSPZ (Abb. 7).

Tabelle 8: **Zusammensetzung von 100 ml RPMI -Medium**

RPMI-Medium (100 ml) + 10% FBS + 1 %PSG	
RPMI-1640-Medium	89 ml
Fetales Kälberserum (FBS)	10 ml
100 U/ml Penicillin/Streptomycin/L-Glutamin	1 ml

RPMI-1640-Medium ++++ (RPMI++++):

Wir haben aufgrund von Vorversuchen RPMI-1640-Medium versetzt mit Zytokinen, für die Kultivierung von CD34⁺ Zellen verwendet, da dieses Medium die Vergleichbarkeit der Experimente ermöglichte, indem alle Zellen unter den gleichen Bedingungen kultiviert werden konnten (Abb. 7). Für alle weiteren Experimente dieser Dissertationsarbeit wurde daher RPMI-1640++++ verwendet (Tabelle 9).

Tabelle 9: **Zusammensetzung von 100 ml RPMI++++ -Medium**

RPMI++++ -Medium (100 ml) + 10% FBS + 1% PSG	
RPMI-1640-Medium	88,6 ml
Fetales Kälberserum (FBS)	10 ml
100 U/ml Penicillin/Streptomycin/L-Glutamin	1 ml
10 ng/ml IL-3	100 µl
10 ng/ml IL-6	100 µl
10 ng/ml SCF	100 µl
10 ng/ml FLT-3L	100 µl

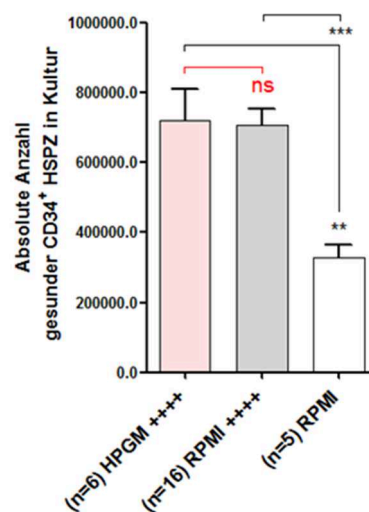


Abb. 7: **Graphische Darstellung des Einflusses verschiedener Zellkulturmedien auf gesunde CD34⁺ HSPZ nach 3 Tagen Zellkultur:** Graphische Darstellung der absoluten Zellzahlen der gesunden CD34⁺ HSPZ nach 3 Tagen Kultivierung (2×10^5 ausplattierte Zellen) in verschiedenen Zellkulturmedien.

2.2.3 Kultivierung von AML-Suspensionszelllinien

Die AML-Zelllinien HL-60 und THP-1 wurden über einen Zeitraum von 113 Tagen (Passage 1-33) in 20 ml RPMI-Medium + 10% FBS + 1% PSG kultiviert. Im Wechsel wurden in dieser

Zeit alle 3 bzw. 4 Tage die Zellen geerntet und gezählt und 2×10^6 Zellen erneut in 20 ml frischem Medium ausplattiert.

2.2.4 Cumulative Population Doublings (CPD)

Um Wachstumskurven zu erstellen konnten mit der konstanten Anzahl von 2×10^6 ausplattierten Zellen zu Beginn jeder Passage die kumulativen Populationsverdopplungen (Cumulative Population Doublings, CPD) der Zelllinien mit folgender Formel berechnet werden:

$$PD = \frac{\log(n_1/n_0)}{\log 2}$$

PD= Population Doublings
(dt. Populationsverdopplungen)

n_0 = Anzahl ausplattierter Zellen

$$CPD = \sum PD$$

n_1 = Anzahl geernteter Zellen

2.3 Zellkulturexperimente

2.3.1 Generierung von konditionierten Medien (CM) von AML-Zelllinien

Für die Gewinnung konditionierter Medien von AML- Zelllinien wurden die Zellen nach 72 Stunden Zellkultur zunächst zentrifugiert (300 *g* / 10 min / 4°C). Die Überstände wurden aufgefangen und anschließend mit einem Spritzenvorsatzfilter (Porengröße 0,45 µm) steril filtriert. Die zellfreien Überstände wurden nach frischer Zugabe von Zytokinen (+++++) für Zellkultur-Experimente als konditionierte Medien verwendet oder bei -20°C gelagert. Zur Weiterkultivierung wurden erneut 2×10^6 Zellen ausplattiert. Die pelletierten Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, erneut zentrifugiert (3.500 rpm / 10 min) und zur RNA-Extraktion für molekularbiologische Analysen verwendet.

2.3.2 Generierung von konditionierten Medien (CM) von Patienten- und Probandenproben

Für Zellkulturexperimente wurden konditionierte Medien sowohl von Patientenproben als auch von Proben gesunder Probanden als Kontrollen gewonnen. Als Standardmedium für die Gewinnung konditionierter Medien wurden die Zellproben in RPMI++++ -Medium (RPMI-

1640-Medium + 10% FBS + 1% PSG, versetzt mit den Zytokinen IL-3, IL-6, FLT3-L und SCF) kultiviert. Dazu wurden 2×10^6 Zellen/Well auf einer 6-Well-Platte in Zellkulturmedium (3ml/Well) in Kultur gebracht. Nach 72 Stunden Kultivierung wurden die Zellen durch Resuspension in ein Falcon überführt. Das Well wurde nochmal mit 2 ml PBS gespült, damit auch die restlichen Zellen aufgenommen werden konnten. Danach wurden die Zellen im Falcon runterzentrifugiert (305 g, 10 min, 4°C). Die Überstände wurden aufgefangen und anschließend ebenfalls mit einem Spritzenvorsatzfilter (Porengröße 0,45 µm) in ein weiteres Falcon steril filtriert. Die nun zellfreien Überstände konnten ebenfalls für Zellkulturexperimente als konditionierte Medien verwendet werden oder bei -20°C gelagert werden. Es wurden dabei sowohl konditionierte Medien von MNC als auch von CD34⁺ HSPZ gewonnen.

2.3.3 Zellkulturexperimente zur Untersuchung des Einflusses leukämischer Zellen auf gesunde CD34⁺ HSPZ

Um einen ersten Eindruck über den Einfluss des malignen AML-Zell-Klons auf die gesunden CD34⁺ HSPZ zu bekommen, wurden Zellkulturexperimente mit konditionierten Medien durchgeführt. Dafür wurden pro Well 2×10^5 frisch isolierte CD34⁺ HSPZ von gesunden Probanden auf einer 6 Well-Platte ausplattiert, jeweils 3 ml der verschiedenen Überstände als konditionierte Medien hinzugegeben und für 72 Stunden kultiviert. Danach wurden die Zellen in ein Falcon überführt. Das Well wurde nochmals mit 2 ml PBS gespült und ebenfalls in das Falcon überführt. Nach erfolgter Zellzählung mittels Casy-Zellzählgerät wurden die Zellen für weiterführende Analysen verwendet. Der genaue Versuchsaufbau ist einleitend im jeweiligen Ergebnisteil dargestellt.

2.3.4 Genexpressionsanalysen von CD34⁺ HSPZ nach Kultivierung mit konditionierten Medien (CM)

Damit der Einfluss der konditionierten Medien auf die Genexpression der kultivierten CD34⁺ HSPZ betrachtet werden konnte, wurden 5×10^5 Zellen wie in Punkt 2.3.3. in Kultur gebracht. Nach 72 Stunden Zellkultur mit konditionierten Medien wurden die Zellen geerntet und die RNA mittels Trizol-Fällung isoliert.

2.4 Readout

2.4.1 Zellzählung von CD34⁺ HSPZ nach 3 Tagen Zellkultur mit konditionierten Medien (CM) mittels Zellzählgerät

Nach 3 Tagen Zellkultur mit konditionierten Medien wurden die CD34⁺ HSPZ resuspendiert und die Zellzahl wurde mittels eines elektronischen Zellzählgerätes CASY® (OLS OMNI Life Science GmbH & Co. KG, Bremen) bestimmt. Die Technik der Zellzahlbestimmung basiert auf der elektrischen Erfassung der Zellen beim Durchtritt durch eine Messpore. Zellen mit intakter Zellmembran schließen den elektrischen Strom aus und generieren ein Signal, das vom Volumen der Zelle abhängt (Electrical Current Exclusion, ECE®). Tote Zellen mit einer geschädigten Zellmembran können den Strom nicht mehr ausschließen und werden mit dem Volumen ihres Zellkerns erfasst (Herstellereklärung, OLS OMNI Life Science GmbH & Co. KG, Bremen).

2.4.2 Durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse von CD34⁺ HSPZ nach 3 Tagen Zellkultur mit konditionierten Medien (CM) mittels der Doppelfärbung Ki-67 und Hoechst 33342

Um eine Aussage über den Zellzyklusstatus der gesunden CD34⁺ HSPZ nach Exposition gegenüber den konditionierten Medien treffen zu können, wurde eine Zellzyklusstatusanalyse mittels Doppelfärbung Ki-67 und Hoechst 33342 durchgeführt (Tabelle 10). Das Antigen Ki-67 ist ein Marker für sich teilende menschliche Zellen. Das Protein ist während der aktiven G₁-, S-, G₂- und M-Phase des Zellzyklus vorhanden, fehlt jedoch in der G₀-Phase von ruhenden Zellen. Der Fluoreszenz-Farbstoff Hoechst 33342 färbt DNA in Zellen an. Gebunden an DNA liegt das Immissionsmaximum bei 355 nm.

Zunächst wurden die CD34⁺ HSPZ aus der Zellkultur zentrifugiert (305 g, 10 min, 4°C) und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 1ml PBS resuspendiert und in FACS-Tubes überführt. Zuvor wurde ca. ¼ der Zellen für Isotypenkontrollen abgenommen und ebenfalls in FACS-Tubes überführt. Die FACS-Tubes wurden zentrifugiert und die Überstände wurden verworfen.

Anschließend wurden in die FACS-Tubes für die Isotypenkontrolle pro Tube 10 µl IgG1 AK-FITC und 10µl IgG1 AK-APC gegeben. In die FACS-Tubes für die Zellzyklusanalyse wurden pro Tube 10 µl Ki-67 AK-FITC, 3 µl CD34⁺ AK-APC und 10 µl Hoechst 33342 (zuvor mit PBS auf 1/100 verdünnt) pipettiert. Die Zellen wurden gevortext und anschließend für 30 min bei 4°C im Dunklen inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 1 ml 0,1% FA fixiert und zentrifugiert

(305 g, 10 min, 4°C). Die Überstände wurden erneut verworfen und anschließend wurden die FACS-Tubes bis zum Konusrand mit 0,1% FA aufgefüllt. Die FACS-Tubes wurden bis zur Messung mindestens 24 h bei 4°C gelagert.

Die Messungen wurden mit einem MoFlo™ XDP-High Speed Cell Sorter (Beckman Coulter, GmbH, Krefeld) unter Verwendung einer Software (Summit 5.1, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) durchgeführt und ausgewertet.

Tabelle 10: **Verwendete Antikörper und Farbstoffe für die Zellzyklusstatusanalyse**

Name	Wirt	Spezifität	Typ	Klon	Firma	Markierung
Isotyp	Maus	Mensch	IgG1	X40	BD Biosciences, San José, CA, USA	FITC/PE (Simultest)
Isotyp	Maus	Mensch	IgG1	MOPC-21	BD Biosciences, San José, CA, USA	APC
CD34	Maus	Mensch	IgG1	8G12 BD	BD Biosciences, San José, CA, USA	APC
Ki67	Maus	Mensch	IgG1	B56	BD Biosciences, San José, CA, USA	FITC
Hoechst 33342	DNA-Farbstoff	DNA-Farbstoff	DNA-Farbstoff	DNA-Farbstoff	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA	DNA-Farbstoff

2.4.3 Analyse des Koloniebildungsverhaltens und der Differenzierungsfähigkeit von CD34⁺ HSPZ nach 3 Tagen Zellkultur mit konditionierten Medien (CM) mittels Colony-Forming Unit (CFU)-Assay

Zur weiteren funktionellen Charakterisierung der CD34⁺ HSPZ nach Exposition gegenüber den konditionierten Medien wurde ein CFU-Assay durchgeführt. Der CFU-Assay beruht auf der Fähigkeit von HSPZ, in einem semisoliden Medium unter Einfluss von Wachstumsfaktoren zu proliferieren und auszudifferenzieren. Diese Progenitorzellen unterschiedlicher Linien und Reifungsgrade unterscheiden sich in ihrer Größe, Farbe und Morphologie und können somit mikroskopisch differenziert werden.

Daraus konnte eine Aussage über die erythroide und myelomonozytäre Differenzierungskapazität der in-vitro manipulierten CD34⁺ HSPZ ermöglicht werden. Dazu wurde ein methylcellulosehaltiges Medium benutzt, welches mit seiner Zytokin- und Wachstumsfaktor-Zusammensetzung selektiv das Wachstum von CD34⁺ HSPZ erlaubt. Anschließend wurde die Anzahl der CFU-E-Kolonien (Colony-Forming-Unit-Erythroid), BFU-E-Kolonien (Burst-Forming-Unit-Erythroid), sowie Kolonien der Weißen Reihe (CFU-G-Kolonie (Colony-Forming-Unit-Granulocyte), CFU-M-Kolonien (Colony-Forming-Unit-Macrophage), CFU-GM-Kolonien (Colony-Forming-Unit-Granulocyte-Macrophage)) und

CFU-GEMM-Kolonien (Colony-Forming-Unit-Granulocyte-Erythroid-Macrophage-Megakaryocyte) unter dem Mikroskop bestimmt (Abb. 8). Die frühesten Progenitoren sind die CFU-GEMM Kolonien bildenden Zellen, da die CFU-GEMM-Zellen in der Lage sind, Zellen sämtlicher myeloischer Linien hervorzubringen. BFU-E-Kolonie-bildende Zellen sind frühe Progenitoren der „roten Reihe“, während CFU-E-Kolonie-bildende Zellen späte Progenitoren der „roten Reihe“ sind. Ebenso sind CFU-GM-Kolonien bildende Zellen frühe Progenitoren der „weißen Reihe“ und CFU-G und CFU-M späte Progenitoren der „weißen Reihe“ (Abb. 8). Es wurde die Gesamtzahl der produzierten Kolonien bestimmt und das Verhältnis zwischen gebildeten Kolonien der „roten Reihe“ und der „weißen Reihe“ berechnet.

Für diesen Versuch wurden 400 CD34⁺ HSPZ von gesunden Probanden aus einer Zellkultur mit konditionierten Medien in 1 ml Methylcellulose (MethoCult H4534, STEMCELL Technologies, Vancouver, Kanada) gegeben und durch Vortexen gemischt. Jeweils 400µl dieser Suspension wurden pro Well in einer 24-Well Platte ausplattiert, wobei in die direkt umliegenden Wells 900 µl PBS gegeben wurden, um eine Austrocknung der Methylcellulose zu verhindern. Nach 14-tägiger Kultivierung wurden die Kolonien unter dem Lichtmikroskop (Axiovert 25, Zeiss, Jena 5x/0.12 Ph0) ausgezählt.

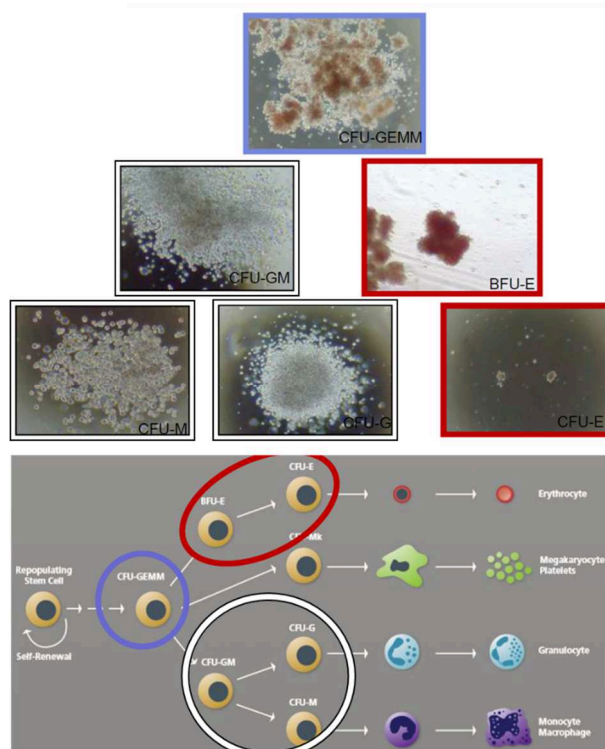


Abb. 8: **Ausreifungsstadien und Differenzierung von Kolonien bei einem CFU-Assay:** Die frühesten Progenitoren stellen CFU-GEMM dar (lila). Diese sind in der Lage, Zellen sämtlicher myeloischer Linien hervorzubringen. BFU-E sind frühe Progenitoren der „roten Reihe“, während CFU-E späte Progenitoren der „roten Reihe“ sind (rot). Ebenso stellen CFU-GM frühe Progenitoren der „weißen Reihe“ und CFU-G- und CFU-M späte Progenitoren der „weißen Reihe“ dar (weiß). (modifizierte Abbildung Stemcell Technologies 2014 und modifizierte Abbildungen R&D-Systems)

2.5 Molekularbiologie

2.5.1 RNA-Extraktion nativer Zellen

Zur Analyse der Genexpression wurde zunächst eine RNA-Isolation durchgeführt. Für die Extraktion der nativen frisch isolierten Zellen zeigte sich die RNA-Extraktion mittels vorgefertigter Kits als Methode mit guter RNA-Ausbeute. Dazu wurden entweder Zellpellets oder in RLT-Puffer (+ β -Mercaptoethanol) befindliche MNC, CD34⁺ HSPZ sowie AML-Zelllinien verwendet. Die RNA-Extraktion erfolgte, je nach Zellzahl, mit dem RNeasy Mini oder Micro Kit (RNeasy Mini Kit ab $0,5 \times 10^6$ Zellen, RNeasy Micro Kit bis $0,5 \times 10^6$ Zellen, QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) nach Anleitung des Herstellers. Der optionale DNase-Verdau wurde eingebaut.

Die RNA wurde je nach Zellzahl in 14 bzw. 30-50 μ l RNase-freiem Wasser eluiert (30-50 μ l bei RNeasy Mini Kit, 14 μ l bei RNeasy Micro Kit). Nach Extraktion wurde die RNA auf Eis gelagert und die Konzentration wurde am Nanodrop® (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) bestimmt. Dann wurde die isolierte RNA entweder direkt weiterverarbeitet oder bei -80 °C gelagert.

2.5.2 RNA-Extraktion mittels Trizol-Fällung von CD34⁺ HSPZ nach Zellkultur mit konditionierten Medien (CM)

Um RNA für Genexpressionsanalysen von mit CM kultivierten CD34⁺ HSPZ zu gewinnen, wurde die RNA-Extraktion mittels Trizolfällung durchgeführt. Aus Erfahrungen von Vorversuchen zeigte sich für diesen Versuchsansatz mit dieser Methode eine höhere RNA-Ausbeute als mit dem sonst verwendeten Kit.

Nach 3-tägiger Zellkultur wurden die Zellen in ein 15 ml Falcon überführt. Das Well wurde anschließend nochmals mit 1 ml PBS gespült und die Spüllösung in das Falcon überführt und auf 15 ml mit PBS aufgefüllt. Nach Zentrifugation (305 g / 10 min) wurde der Überstand verworfen, die Zellen in 1 ml PBS resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Nach erneuter Zentrifugation (3500 rpm / 10 min / 4°C, Biofuge® fresco Haereus Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) wurden die Überstände vorsichtig mit einer 1000 μ l Pipette abgenommen und das Zellpellet in 500 μ l Trizol lysiert. Nach Zugabe von 100 μ l Chloroform und anschließend kräftigem Vortexen wurden die lysierten Zellen für 20 min zentrifugiert (13000 rpm, 4°C). Nach abgeschlossener Zentrifugation wurde die klare Phase, in der sich die RNA befand, vorsichtig abgenommen und in ein neues 1,5 ml

Eppendorfgefäß überführt (Abb. 9). Anschließend wurden 500 µl Isopopropanol zur Fällung hinzugefügt, kurz invertiert und bei -20°C für mindestens 24 h gelagert.

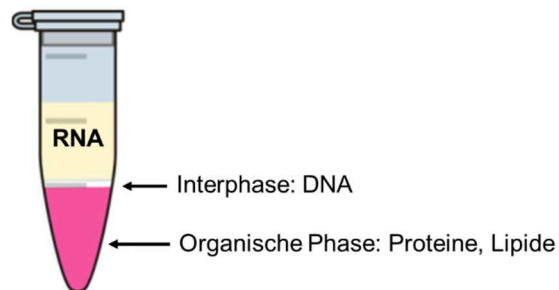


Abb. 9: **Phasen nach Trizolfällung:** Nach Lyse des Zellpellets in Trizol und Zugabe von Chloroform und anschließend kräftigem Vortexen wurde das Lysat zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die klare Phase, in der sich die RNA befand, vorsichtig abgenommen. Die darunter liegenden Phasen wurden verworfen (modifiziert Abbildung von clker free clipart).

Für die RNA-Extraktion wurden die bei -20°C gelagerten Proben zunächst kräftig geschüttelt und anschließend für 15 Minuten zentrifugiert (13000 rpm, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 500 µl 70%-igem Ethanol überschichtet und erneut zentrifugiert (15 min, 13000 rpm, 4°C). Der Überstand wurde ebenfalls verworfen und 500 µl 100%-iges Ethanol hinzugegeben. Nach erneuter Zentrifugation (15 min, 13000 rpm, 4°C) wurde das Pellet unter der Werkbank bei offenem Deckel des Eppendorf-Gefäßes für 10 min getrocknet. Danach wurde die RNA in 20-30 µl DEPC-*treated-water* eluiert und mittels des Nanodrops® die RNA-Konzentration bestimmt.

2.5.3 Messung der RNA/DNA-Konzentration mittels Nanodrop® ND-1000

Die RNA Konzentration und Reinheit wurden mittels spektralphotometrischer Konzentrationsbestimmung mit einem Nanodrop® ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) bei 260 nm (Absorptionsmaximum von RNA) gemessen.

2.5.4 cDNA-Synthese (RT-PCR) von RNA nativer Zellen

Im anschließenden Arbeitsschritt wurden 500 ng der zuvor gewonnenen Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben.

Zunächst wurde die RNA durch eine RNA-abhängige DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase) in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurden Teile der DNA spezifisch vermehrt. Als Primer wurde ein zum poly-A-Ende der mRNA komplementärer Oligo-d(T)-Primer verwendet. Da eine mRNA in Eukaryoten nach ihrer Transkription bereits modifiziert und gespleißt wurden, ist die am Ende des Synthese-Prozesses erhaltene cDNA Intron-frei.

Zu der RNA wurden Oligo(dT), dNTP Mix und DEPC-treated-water (Mix I, Tabelle 11) gegeben. Das sich in dem 0,2 ml PCR-Tube befindliche 12 µl große Volumen wurde kurz zentrifugiert und für 5 min bei 65°C in einen Cycler (Mastercycler® gradient Eppendorf, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Nach kurzer Lagerung auf Eis wurde der Mix II (Tabelle 11) hinzugefügt und erneut in den Cycler für 52 Min bei 42°C inkubiert, bevor eine 15-minütige Inaktivierung bei 72°C erfolgte (Tabelle 11).

Tabelle 11: Protokoll zur cDNA-Synthese (RT-PCR) von RNA nativer Zellen

Mix I	
RNA 500 ng	X µl
Oligo dT (500 µg/ml)	1 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
DEPC-Treated Water	ad 12 µl
Endvolumen Mix I	12 µl
5 min bei 56°C, anschließend 1 min auf Eis lagern	
Mix II	
5xFS Puffer	4 µl
DTT (100 mM)	2 µl
RNaseOUT (40 U/µl)	1 µl
SuperScript II	1 µl
Endvolumen Mix II	8 µl
Endvolumen gesamt	20 µl
52 min bei 42°C	
Inaktivierung 15 min bei 72°C	

2.5.5 cDNA-Synthese (RT-PCR) von RNA kultivierter Zellen

Da bei der Trizol-Fällung, anders als bei der RNA-Isolation mit einem Kit, kein DNase Schritt erfolgte, wurde dieser in einem ersten Schritt durchgeführt.

Dafür wurde die RNA mit DNase (DNase I Amplicication Grade, Invitrogen™ by life technologies, Carlsbad, USA), DNase Puffer und DEPC-treated-water in einem Endvolumen von 10 µl für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 µl EDTA inhibiert und kam für 10 min bei 56°C in den Cycler. Nach Zugabe von Oligo dT und dNTPs kam das jetzt 13 µl messende Volumen für 5 min bei 56°C erneut in

den Cyclor und wurde anschließend 1 min auf Eis gelagert. Im Anschluss daran wurde auch hier ein Mastermix auf Eis vorbereitet und zu dem Gemisch pipetiert. Das weitere Vorgehen verlief analog zu Punkt 2.5.4. Die genauen Mengenangaben sind Tabelle 12 zu entnehmen.

Tabelle 12: Protokoll zur cDNA-Synthese (RT-PCR) von RNA kultivierter Zellen

Mix I	
RNA 500 ng	X µl
DNase	1 µl
DNase Buffer	1 µl
DEPC-Treated Water	ad 10 µl
Endvolumen Mix I	10 µl
15 min bei Raumtemperatur inkubieren	
EDTA (Reaktionsstopp)	1 µl
10 min bei 56°C	
Oligo dT (500µg/ml)	1 µl
dNTPs (10mM)	1 µl
5 min bei 56°C, anschließend auf Eis lagern	
Mix II	
5xFS Puffer	4 µl
DTT (100 mM)	1 µl
RNaseOUT (40 U/µl)	1 µl
SuperScript II	1 µl
Endvolumen Mix II	7 µl
Endvolumen gesamt	20 µl
52 min bei 42°C	
Inaktivierung 15 min bei 72°C	

2.5.6 Quantitative RealTime-PCR (qRT-PCR)

Zur Quantifizierung der Genexpression verschiedener Zielgene wurde die quantitative RealTime-PCR (qRT-PCR) durchgeführt. Das Prinzip beruht auf Fluoreszenz-Messungen, die während eines PCR-Zyklus in Echtzeit erfasst werden („Real Time“). Nach mehreren Zyklen in der die Fluoreszenz proportional ansteigt, geht die Fluoreszenz in eine exponentielle Phase über. In den wenigen Zyklen der exponentiellen Phase ist die korrekte Quantifizierung möglich.

Die qRT-PCR wurde an einem StepOnePlus™ Real-Time PCR Cyclor (Invitrogen™ by life technologies, Carlsbad, USA) durchgeführt. Es wurde der SYBR Green PCR Master Mix von Applied Biosystems verwendet. Der Mastermix wurde nach unten stehendem Protokoll (Tabelle 13) auf Eis gelagert pipettiert und danach zur entsprechenden cDNA ebenfalls auf Eis gelagert hinzupipettiert. Das Haushaltsgen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) diente als Referenzgen. Die relativen Änderungen der Genexpression

wurden mit Hilfe der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode berechnet (StepOne Software v2, life technologies, Carlsbad, USA, Microsoft Excel 2013).

$$\Delta\text{CT} = \text{CTWert}_{\text{GAPDH}} - \text{CTWert}_{\text{Target}} \quad \Delta\Delta\text{CT} = 2^{\Delta\text{CT}}$$

Tabelle 13: **Protokoll Mastermix Quantitative RealTime- PCR**

Mastermix/Well	Volumen
Primermix (1 μl Primer fwd & 1 μl Primer rev)	2 μl
DEPC-treated water	9,5 μl
SYBR Green Mastermix	12,5 μl
cDNA	1 μl
Endvolumen	25 μl

2.5.7 Primer

Für die PCR Analysen wurden einige der Primer von Frau Dr. rer nat. Stefanie Geyh mit Hilfe der Plattformen NCBI, Primer Blast (NCBI- Blast- Tool), Ensembl Genome Browser und Oligo Analyzer-Integrated DNA Technologies selbst „designed“ (Tabelle 14), bei der Firma Firma Biolegio (Nijmegen, Niederlande) bestellt und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Die verwendeten Primer (Tabelle 15) hatten eine Länge von 17-22 Nucleotiden und eine für die quantitative Real-Time-PCR (q-RT-PCR) ideale Schmelztemperatur (abhängig vom GC-Gehalt) von 60°C. Die Spezifität der Primer wurde auf der NCBI-Plattform Primerblast überprüft.

Tabelle 14: **Online-Programme zur Primergestaltung**

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>
<http://www.ensembl.org/index.html>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>
<http://eu.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>

Tabelle 15: Informationen zu den verwendeten Primern

Primerpaar	NM Sequenz	Sequenzen 5' > 3' / Firma	Annealing-temperatur	Größe
JAGGED1	NM_000214.2	fwd: CGCCTGGCCGAGGTCCTATAC rev: CTGCTTCAGCGTCTGCCACTG	60°C	139
NOTCH1	NM_017617.3	fwd: GCTGACGGAGTACAAGTGCCG rev: GCCACACTCGTTGACATCCTGC	60°C	187
HES1	NM_005524	Qiagen		
HES5	NM_001010926.3	fwd: CACAGCAAAGCCTTCGTC rev: TGGTACAGCAGCTTCATCTG		
SCF (KIT-LG)	NM_000899.4	fwd: GGATCTGCAGGAATCGTGTGAC rev: ATCCCGGGGACATATTTGAGGG	60°C	103
c-KIT	NM_000222.2	fwd: GCTCCAATGTGTGGCAGCAG rev: ACATTCAACCGTGCCATTGTGC	60°C	199
ANGPT1	NM_001146.3	fwd: CCGGTGAATATTGGCTGGGGA rev: CAGCACCGTGTAAGATCAGGC	60°C	216
TIE2	NM_000459.3	fwd: CATCCTGGACCTGTGAGACG rev: CCACGTAAGTCTCCCTGGG	60°C	254
TGF-β1	NM_000660	Qiagen		
GDF-11	NM_005811	Qiagen		
TGF-β-R1	NM_001306210.1 NM_001130916.2 NM_004612.3	fwd: GGAACAAAAAGGTACATGGCC rev: TCAACTGATGGGTGAGAAGG		
SMAD2	NM_001003652	Qiagen		
IL1-β	NM_000576	Qiagen		
CCL3	NM_002983	Qiagen	60°C	112
GAS6	NM_000820	Qiagen		
LIF1	NM_002309	Qiagen		
GAPDH	NM_002046.4	fwd: TGCACCACCAACTGCTTAGC rev: ACAGTCTTCTGGGTGGCAGTG	60°C	110

2.6 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurden die Programme Microsoft Excel sowie Graph Pad Prism (GraphPad Software Inc., USA) verwendet. Es wurden der Median, die Mittelwerte und die Standardabweichungen berechnet. Ebenfalls wurden die Signifikanzen mittels eines ungepaarten beidseitigen studentischen T-Tests berechnet und mittels Sternchencodierung (Tabelle 16) in die in Prism erstellten Graphiken eingetragen. Dabei zeigt die Anzahl der Sternchen an, wie hoch die Wahrscheinlichkeit ist, dass das gefundene Ergebnis auf einem Zufall beruht. In den Texten wurden die p-Werte als Zahlenwerte angegeben. Bei einem p-Wert < 0,0001 konnte kein genauer Zahlenwert mehr angegeben werden.

Tabelle 16: Sternchencodierung, statistische Auswertung und Signifikanzen

Sternchencode	P-Werte (p-value)	Wahrscheinlichkeit zufälliges Ergebnis
*	(p < 0,05)	= < 5 %
**	(p < 0,01)	= < 1 %
***	(p < 0,001)	= < 0,1 %
****	(p < 0,0001)	= < 0,01 %

3. Ergebnisse

3.1 Allgemeiner Versuchsaufbau der Zellkulturexperimente mit konditionierten Medien (CM)

Um den Einfluss leukämischer Zellen auf gesunde $CD34^+$ HSPZ zu untersuchen, wurden Zellkulturexperimente durchgeführt, bei denen gesunde $CD34^+$ HSPZ mit sogenannten konditionierten Medien (CM, *conditioned medium*) von AML-Zellen kultiviert wurden. Dafür wurden konditionierte Medien der kommerziellen AML-Zelllinien sowie von AML Patienten (MNC, $CD34^+$ leukämische Vorläuferzellen) generiert. Als Kontrollen wurden $CD34^+$ HSPZ von gesunden Probanden sowohl mit CM von mononukleären Zellen (MNC), als auch mit CM von $CD34^+$ HSPZ gesunder Probanden kultiviert. Durch anschließende Analysen wurden die $CD34^+$ HSPZ hinsichtlich Proliferationsfähigkeit, Zellzyklusstatus und Differenzierungsfähigkeit funktionell untersucht (Abb. 10).

Für die Zellkulturexperimente wurden 2×10^5 $CD34^+$ hämatologisch gesunde HSPZ für 72 Stunden (3 d) sowohl mit CM von Zellen gesunder Probanden, als auch mit CM von leukämischen Zellen kultiviert und in darauf folgenden Analysen untersucht. (Abb. 10).

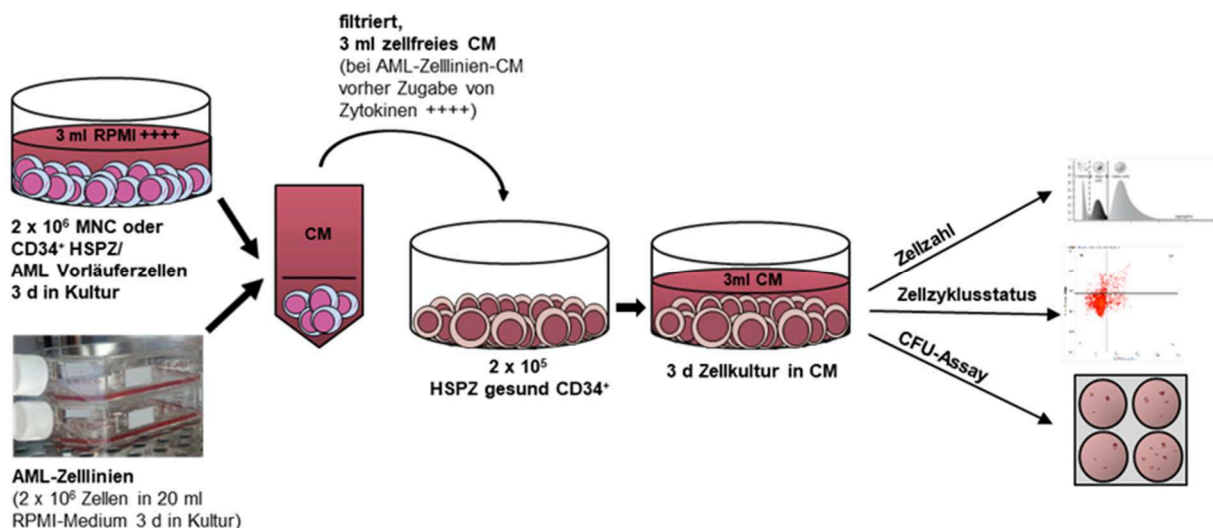


Abb. 10: **Schematische Darstellung der Zellkulturexperimente mit konditionierten Medien und anschließendem Readout nach 3 Tagen Zellkultur:** 2×10^6 frisch isolierte MNC oder $CD34^+$ HSPZ wurden für 3 Tage in Medium (RPMI +++++) kultiviert (ebenso wurden von den AML-Zelllinien 2×10^6 Zellen in 20 ml RPMI-Medium ohne Zytokine 3 Tage kultiviert). Anschließend wurde das Medium filtriert und 3 ml wurden auf 2×10^5 frisch isolierte gesunde $CD34^+$ HSPZ gegeben (bei CM von AML-Zelllinien noch Zugabe von Zytokinen +++++). Nach 3 Tagen Zellkultur mit konditionierten Medien wurden die Zellen geerntet und bezüglich Proliferation, Zellzyklusstatus und Differenzierungsfähigkeit funktionell untersucht.

3.2 Wachstumskinetik von AML-Zelllinien

Für die ersten Zellkulturexperimente mit konditionierten Medien (CM) wurden die AML-Zelllinien HL-60, THP-1 und MV4-11 verwendet. Für die Generierung von CM wurden in jeder Passage konstant 2×10^6 Zellen der Zelllinien HL-60 und THP-1 ausplattiert und über die Kultivierungsdauer die Wachstumskinetik untersucht. Hierfür wurden die kumulativen Populationsverdopplungen (*cumulative population doublings*, CPD) der Zelllinien zu Beginn jeder Passage berechnet. Das konditionierte Medium der Zelllinie MV4-11 stammt aus Vorversuchen. MV4-11 wurde für die Erhebung der CPD nicht erneut in Kultur genommen.

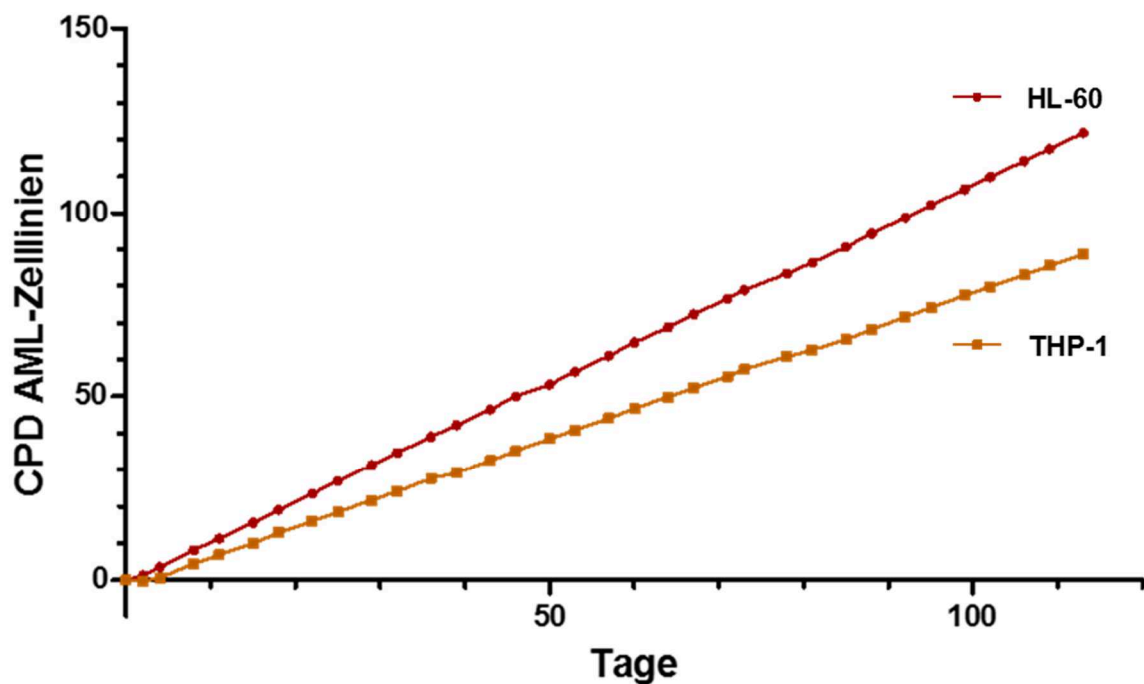


Abb. 11: Exemplarische Darstellung der kumulativen Populationsverdopplungen (CPD) der AML-Zelllinien HL-60 und THP-1 (Wachstumskurve) in Abhängigkeit der Kultivierungstage.

Die AML-Zelllinie HL-60 erreichte nach 113 Tagen eine CPD von 121,8. Die AML-Zelllinie THP-1 hingegen erreichte nach 113 Tagen eine geringere CPD von 88,61 (Abb. 11).

3.3 Einfluss von AML-Zelllinien auf gesunde CD34⁺ HSPZ

Im Folgenden wurde der Einfluss von AML-Zelllinien auf gesunde CD34⁺ HSPZ untersucht. Dazu wurden CD34⁺ HSPZ von 4 gesunden Probanden mit konditioniertem Medium (CM) der AML-Zelllinien HL-60, THP-1 und MV4-11, jeweils aus den Passagen 5, 7, 9 und 14

kultiviert (Abb. 12 **A**, **B**) und nach 3 Tagen (3 d) bezüglich Zellzahl, Proliferation, Zellzyklusstatus, Koloniebildungsverhalten und Differenzierungsfähigkeit untersucht. Als Kontrollen wurden CD34⁺ HSPZ von 6 gesunden Probanden mit CM sowohl von MNC als auch von CD34⁺ HSPZ von gesunden Probanden in Kultur gebracht (Abb. 12 **B**).

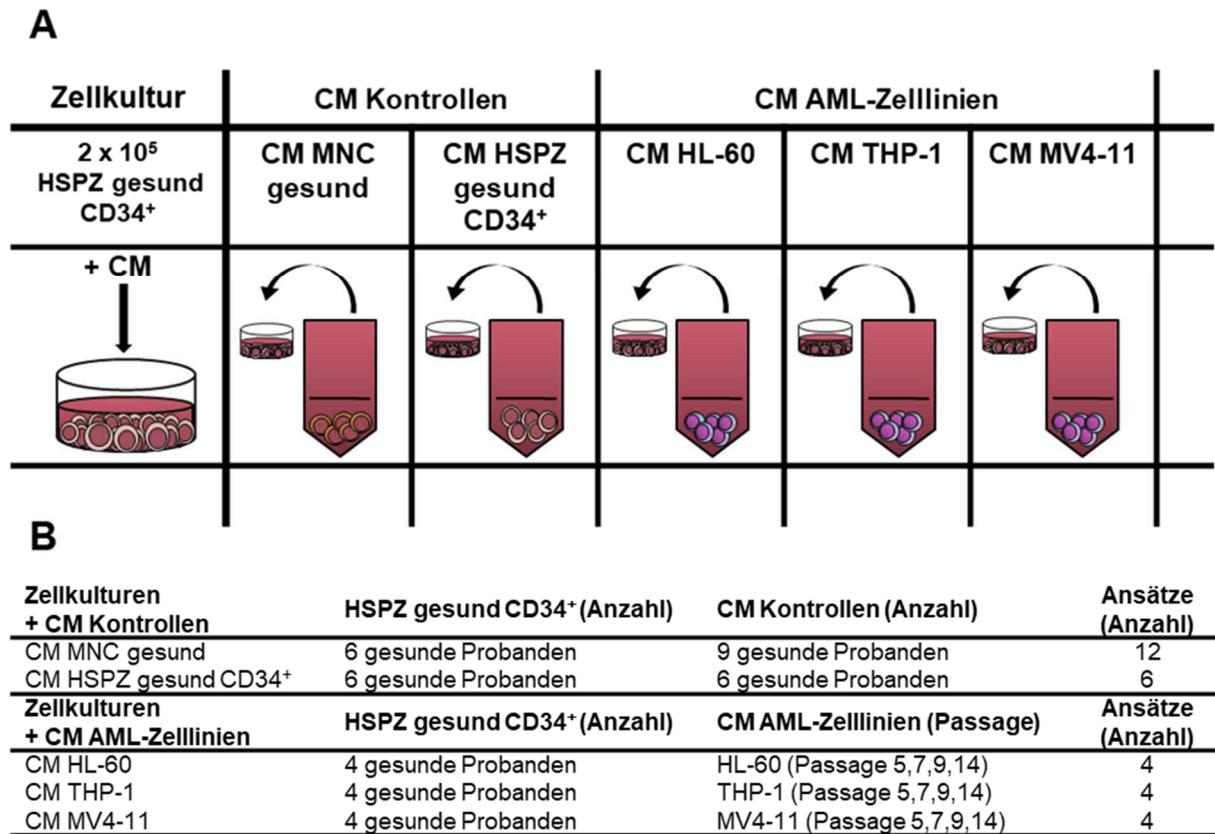


Abb. 12: **Einfluss von AML-Zelllinien auf gesunde CD34⁺ HSPZ:** **A** Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. 2 x 10⁵ CD34⁺ HSPZ von gesunden Probanden wurden mit CM der AML-Zelllinien HL-60, THP-1 und MV4-11 für 3 Tage kultiviert. **B** Tabelle n-Zahlen.

3.3.1. Bestimmung der Proliferationsfähigkeit gesunder CD34⁺ HSPZ nach 3 Tagen Zellkultur mit konditioniertem Medium (CM) von AML-Zelllinien mittels Zellzahlbestimmung

Zunächst wurde die Zellzahl der gesunden CD34⁺ HSPZ nach 3 Tagen Zellkultur mit CM mittels eines Zellzählgeräts CASYTM ermittelt (Abb. 13).

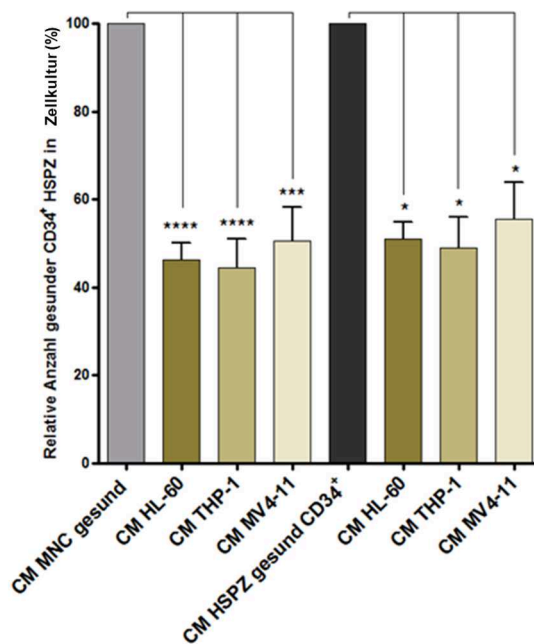


Abb. 13: Graphische Darstellung der relativen Zellzahlen gesunder CD34⁺ HSPZ nach 3 Tagen Zellkultur mit CM der AML-Zelllinien HL-60, THP-1 und MV4-11 bezogen auf die Kontrollen (Kontrolle CM MNC gesund, Kontrolle CM HSPZ gesund CD34⁺; jeweils normiert auf 100%).

Nach 3 Tagen Zellkultur mit CM von AML-Zelllinien zeigte sich die relative Zellzahl (normiert auf 100%) bezogen auf die gesunden CD34⁺ HSPZ der Kontroll-Zellkulturen (100%), je nachdem welche Kontrolle Bezugspunkt war, als hochsignifikant beziehungsweise signifikant verringert. Betrachtet man den suppressiven Effekt auf die Proliferation der gesunden CD34⁺ HSPZ der drei Zelllinien im Einzelnen, ist dieser bei allen stark ausgeprägt. (Abb. 13 Relative Zellzahlen: 46% CM HL-60, $p < 0,0001$ | 45% CM THP-1, $p < 0,0001$ | 50% CM MV4-11, $p = 0,0001$ von 100% CM MNC gesund || 51% CM HL-60, 49% $p = 0,0149$ | CM THP-1, $p = 0,0149$ | 55% CM MV4-11, $p = 0,0302$ von 100% CM HSPZ gesund CD34⁺).

3.3.2 Zellzyklusanalyse der gesunden CD34⁺ HSPZ nach 3 Tagen Zellkultur mit konditioniertem Medium (CM) von AML-Zelllinien mittels der Doppelfärbung Ki67 und Hoechst 33343

Weiterhin wurden die mit CM der AML-Zelllinien kultivierten gesunden CD34⁺ HSPZ bezüglich ihres Zellzyklusstatus untersucht. Dazu wurden die CD34⁺ HSPZ mit den Antikörpern/Farbstoffen Ki67-AK-FITC, Hoechst 33343 und anti-CD34-AK-APC gefärbt und der prozentuale Anteil an nicht proliferierenden Zellen (G₀-Phase) und proliferierenden Zellen

(G₁-Phase, S/G₂/M-Phase) mittels des Hochgeschwindigkeits-Zellsortierers MoFlo™ XDP gemessen und graphisch dargestellt (Abb. 14).

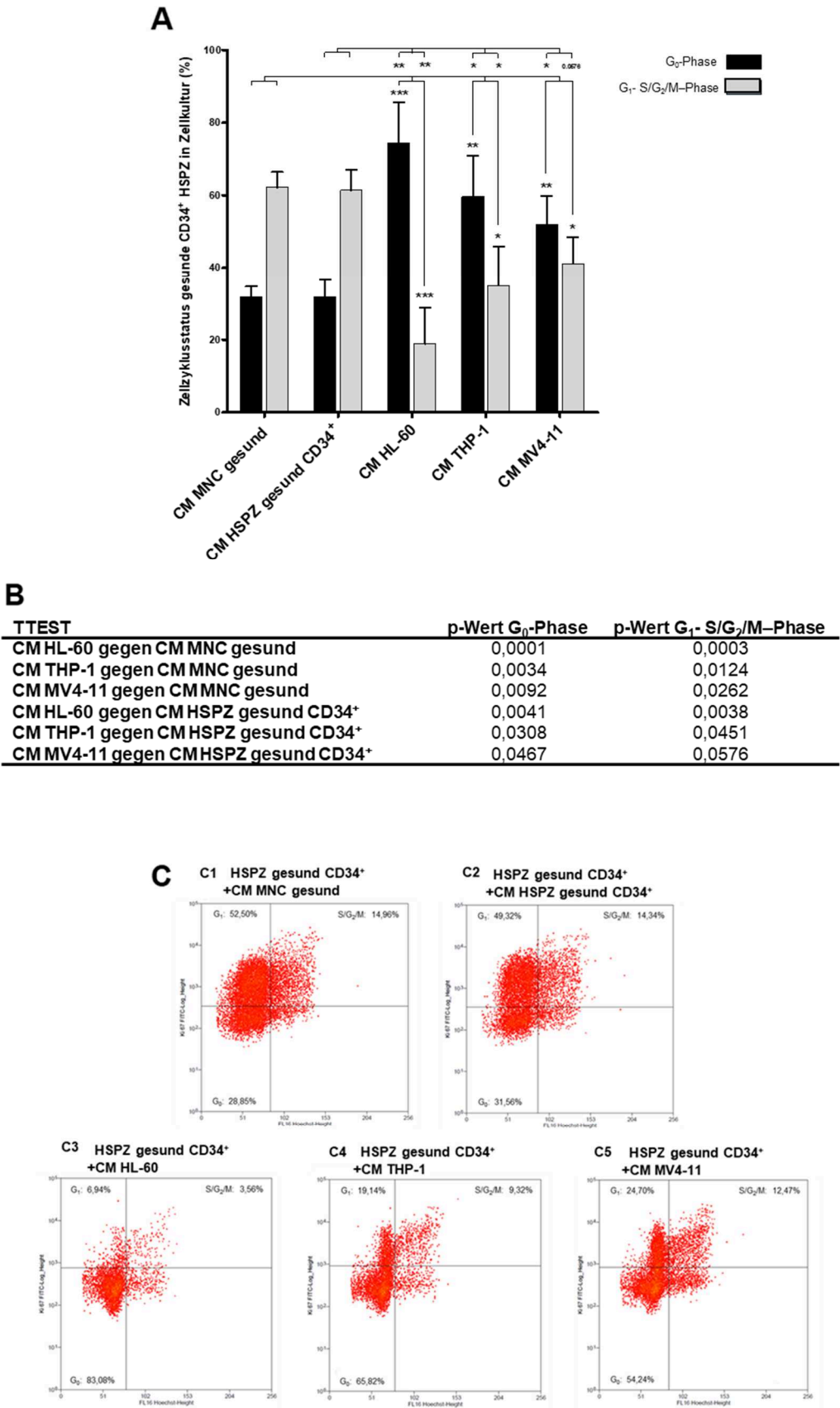


Abb. 14: **Prozentuale Verteilung des Zellzyklusstatus gesunder CD34⁺ HSPZ nach 3 Tagen Zellkultur mit CM von AML-Zelllinien:** **A** Graphische Darstellung der prozentualen Verteilung des Zellzyklusstatus der gesunden CD34⁺ HSPZ nach Proliferationsstatus (**G₁- S/G₂/M-Phase** , **G₀-Phase** ) nach 3 Tagen Zellkultur mit CM der AML-Zelllinien HL-60, THP-1 und MV4-11 und Kontrollen (CM MNC gesund, CM HSPZ gesund CD34⁺). **B** Tabelle p-Werte. **C** Exemplarische FACS-Plots mit Darstellung des prozentualen Anteils von den sich in unterschiedlichen Proliferationsphasen befindenden gesunden CD34⁺ HSPZ, **C1-2** mit CM von Kontrollen, **C3-5** mit CM von AML-Zelllinien.

Nach 3-tägiger Zellkultur mit CM von AML-Zelllinien befand sich der größte Anteil der gesunden CD34⁺ HSPZ, verglichen mit den gesunden CD34⁺ HSPZ aus den Kontroll-Zellkulturen, signifikant in der G₀-Phase. Somit befanden sich diese in einem Zellzyklusarrest.

Die gesunden CD34⁺ HSPZ, die mit konditioniertem Medium der AML-Zelllinie HL-60 kultiviert wurden, gingen gegenüber den Kontroll-Zellkulturen (Abb. 14 **A** CM MNC gesund: G₀-Phase MW 32%, G₁- S/G₂/M-Phase MW 62% | CM HSPZ gesund CD34⁺: G₀-Phase MW 32%, G₁- S/G₂/M-Phase MW 61% || exemplarisch **C1-2**) prozentual am stärksten und weitestgehend hochsignifikant (Abb. 14 **B**) in die G₀-Phase (Zellzyklusarrest) über (Abb. 14 **A** CM HL-60: G₀-Phase MW 74%, G₁- S/G₂/M-Phase MW 19 % | exemplarisch **C3**). Eine etwas schwächere, dennoch signifikante (Abb. 14 **B**) Verschiebung in die G₀-Phase (Zellzyklusarrest), fand bei einer Kultivierung mit CM von THP-1 statt (Abb.14 **A** CM THP-1: G₀-Phase MW 60%, G₁- S/G₂/M-Phase MW 35% | exemplarisch **C4**). Eine Verschiebung in die G₀-Phase (Zellzyklusarrest) war bei Kultivierung der gesunden CD34⁺ HSPZ mit CM der AML-Zelllinie MV4-11 ebenfalls zu beobachten (Abb. 14 **A** CM MV4-11: G₀-Phase MW 52%, G₁- S/G₂/M-Phase MW 41% | exemplarisch **C5**). Die Suppression in die G₀-Phase (Zellzyklusarrest) war auch bei CM der AML-Zelllinie MV4-11 grenzgradig signifikant.

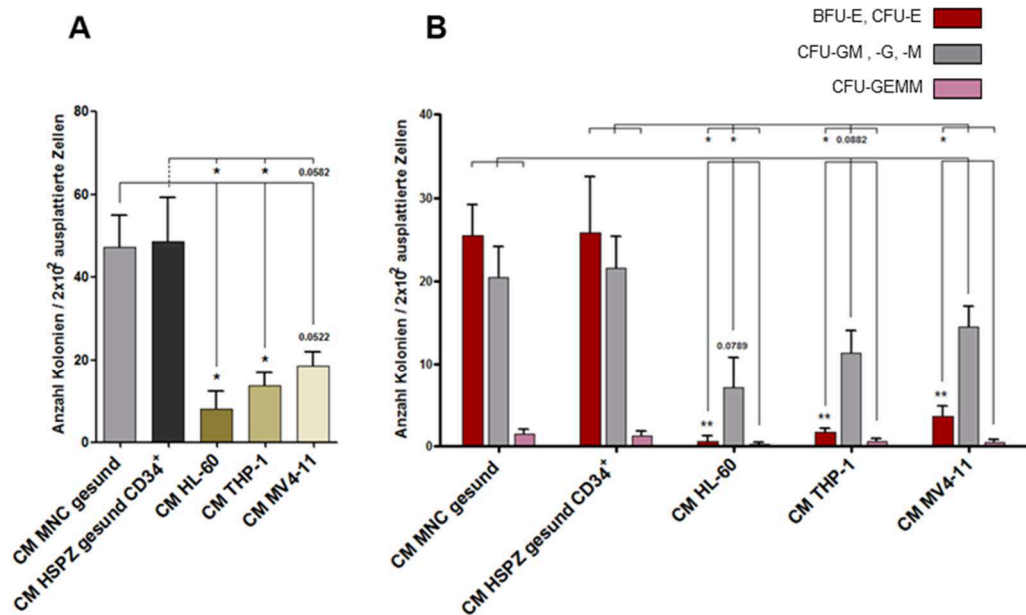
3.3.3 Analyse des Koloniebildungsverhaltens und der Differenzierungsfähigkeit gesunder CD34⁺ HSPZ nach 3 Tagen Zellkultur mit konditioniertem Medium (CM) von AML-Zelllinien mittels Colony Forming Unit (CFU)-Assay

In einem weiteren Schritt wurden die über 3 Tage kultivierten gesunden CD34⁺ HSPZ bezüglich des Einflusses der AML-Zelllinien auf ihre Differenzierungsfähigkeit in einem CFU-Assay untersucht.

Dazu wurden 200 gesunde CD34⁺ HSPZ nach 3-tägiger Zellkultur mit CM von AML-Zelllinien in ein mit Zytokinen versetztes Methylzellulosemedium (MethoCult H4434 Classic) gegeben

und auf einer 24 Well-Platte für 14 Tage kultiviert. Die dabei gebildeten Kolonien wurden unter dem Mikroskop (Axiovert 25, Zeiss, Jena 5x/0.12 Ph0) differenziert und ausgezählt.

In der graphischen Darstellung wurden die Kolonien der „roten Reihe“ aus Gründen der Übersichtlichkeit zusammengefasst dargestellt. Desweiteren wurde das Verhältnis der Suppression der „roten Reihe“ im Verhältnis zur Suppression der „Weißen Reihe“ bestimmt und graphisch dargestellt (Rot/Weiß-Quotient) (Abb. 15).



C

Colony-Forming-Units (CFU) / 200ausplattierte Zellen	CFU-Rot (Anzahl)	CFU-Weiß (Anzahl)	CFU-GEMM (Anzahl)
CM MNC gesund	26	20	2
CM HSPZ gesund CD34 ⁺	26	22	1
CM HL-60	1	7	0
CM THP-1	2	11	1
CM MV4-11	4	15	1
TTEST	p-Wert	p-Wert	p-Wert
CM HL-60 gegen CM MNC gesund	0,0019	0,0789	0,2199
CM THP-1 gegen CM MNC gesund	0,0027	0,2107	0,3825
CM MV4-11 gegen CM MNC Gesund	0,0049	0,4040	0,3192
CM HL-60 gegen CM HSPZ gesund CD34 ⁺	0,0173	0,0330	0,1826
CM THP-1 gegen CM HSPZ gesund CD34 ⁺	0,0211	0,0883	0,3872
CM MV4-11 gegen CM HSPZ gesund CD34 ⁺	0,0306	0,2088	0,2995

D

Colony-Forming-Units (CFU) / 200ausplattierte Zellen	Quotient Rot/Weiß- Verhältnis
CM MNC gesund	1,43
CM HSPZ gesund CD34 ⁺	1,20
CM HL-60	0,06
CM THP-1	0,18
CM MV4-11	0,24
TTEST	p-Wert Rot/Weiß-Verhältnis
CM HL-60 gegen CM MNC gesund	0,0006
CM THP-1 gegen CM MNC gesund	0,0003
CM MV4-11 gegen CM MNC gesund	0,0005
CM HL-60 gegen CM HSPZ gesund CD34 ⁺	0,0151
CM THP-1 gegen CM HSPZ gesund CD34 ⁺	0,0104
CM MV4-11 gegen CM HSPZ gesund CD34 ⁺	0,0152



Abb. 15: Koloniebildungsverhalten und Differenzierungsfähigkeit gesunder CD34⁺ HSPZ nach 3 Tagen Zellkultur mit CM von AML-Zelllinien: Graphische Darstellung des Koloniebildungsverhaltens (**A** Anzahl der Kolonien insgesamt) und der Differenzierungsfähigkeit (**B** CFU-Rote Reihe ■■■, CFU-Weiße Reihe ■■■, CFU-GEMM ■■■) gesunder CD34⁺ HSPZ (200 Zellen ausplattiert) nach 3 Tagen Zellkultur mit CM von AML-Zelllinien (einzeln aufgelistet dargestellt) und Kontrollen (CM MNC gesund, CM HSPZ gesund CD34⁺) mittels Colony forming Unit Assay (CFU-Assay). **C** Tabellarische Darstellung der Mittelwerte und p-Werte. **D** Verhältnis der Suppression (Quotient: „rote Reihe“/„weiße Reihe“, Quotienten tabellarisch aufgelistet). **E** Exemplarische fotografische Darstellung von **E1-2** Kontroll-CFU-Assays, **E3** mit CM von HL-60 (Novex Stereomikroskop RZB 0.65x, Kamera Moticam 2300).

Die gesunden CD34⁺ HSPZ, die mit CM der AML-Zelllinie HL-60 kultiviert wurden, waren im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 15 **A** CM MNC gesund MW: 47 Kolonien, CM HSPZ gesund CD34⁺ MW: 49 Kolonien) bezüglich des Koloniebildungsverhaltens durch das CM am stärksten und statistisch signifikant supprimiert (Abb. 15 **A** CM HL-60 MW: 8 Kolonien, $p=0.0119$ CM MNC gesund, $p=0.0182$ CM HSPZ gesund CD34⁺). Etwas weniger stark ausgeprägt aber dennoch statistisch signifikant, war der supprimierende Effekt bei Kultivierung mit CM der AML-Zelllinie THP-1 (Abb. 15 **A** CM THP-1 MW: 14 Kolonien, $p=0.0261$ CM MNC gesund, $p=0.0327$ CM HSPZ gesund CD34⁺). Nur mit einer Tendenz zur Signifikanz war der supprimierende Effekt bei der Kultivierung der gesunden CD34⁺ HSPZ mit CM der AML-Zelllinie MV4-11 (Abb. 15 **A** CM MV4-11 MW: 19 Kolonien, $p=0.0522$ CM MNC gesund, $p=0.0582$ CM HSPZ gesund CD34⁺).

Hier war der supprimierende Effekt der AML-Zelllinien besonders stark auf die Kolonien der „roten Reihe“. Dabei zeigte HL-60, gefolgt von THP-1 und MV4-11 in absteigender Reihenfolge die stärkste Suppression der Ausdifferenzierung der „roten Reihe“ (Abb. 15 **B**, **C**). In einzelnen Wells waren bei der Auswertung bei einer Kultivierung mit CM der AML-Zelllinie HL-60 (Abb. 15 exemplarisch **E3**) im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 15 exemplarisch **E1-2**) keine Kolonien der „roten Reihe“ mehr auffindbar. Diese, im Verhältnis zur Suppression der „weißen Reihe“ wesentlich stärker ausgeprägte Suppression der „roten Reihe“ (7-8 fach stärker), zeigte sich je nach Kontrolle als Bezugspunkt in einem hochsignifikant beziehungsweise signifikant verringerten Rot/Weiß-Quotienten (Abb. 15 **D**).

3.4 Einfluss leukämischer Zellen von AML-Patienten auf gesunde CD34⁺ HSPZ

In Analogie zu den Zellkulturexperimenten mit den konditionierten Medien (CM) der AML-Zelllinien wurde der Einfluss primärer leukämischer Zellen von AML-Patienten auf gesunde CD34⁺ HSPZ untersucht (Abb. 16 **A**) .

Es wurden CD34⁺ HSPZ von gesunden Probanden mit CM von MNC von AML-Patienten kultiviert. Um auch den Einfluss einer zuvor selektierten CD34⁺ Blasten-Population auf die gesunde CD34⁺ HSPZ zu untersuchen, wurden CD34⁺ HSPZ von gesunden Probanden mit CM von CD34⁺ leukämischen Vorläuferzellen von AML Patienten kultiviert (Abb. 16 **A,B**).

Hierzu wurden 2 x 10⁵ gesunde CD34⁺ HSPZ mit CM der oben genannten Zellfraktionen von AML-Patienten sowie mit CM von Zellen gesunder Probanden als Kontrollen kultiviert. Der Versuchsaufbau und die Anzahl verwendeter Patienten und Probanden sind in Abb. 16 dargestellt. Nach 3-tägiger Kultivierung mit CM wurden die CD34⁺ HSPZ in darauffolgenden Untersuchungen hinsichtlich Zellzahl, Proliferation, Zellzyklusstatus, Koloniebildungsverhalten und Differenzierungsfähigkeit untersucht.

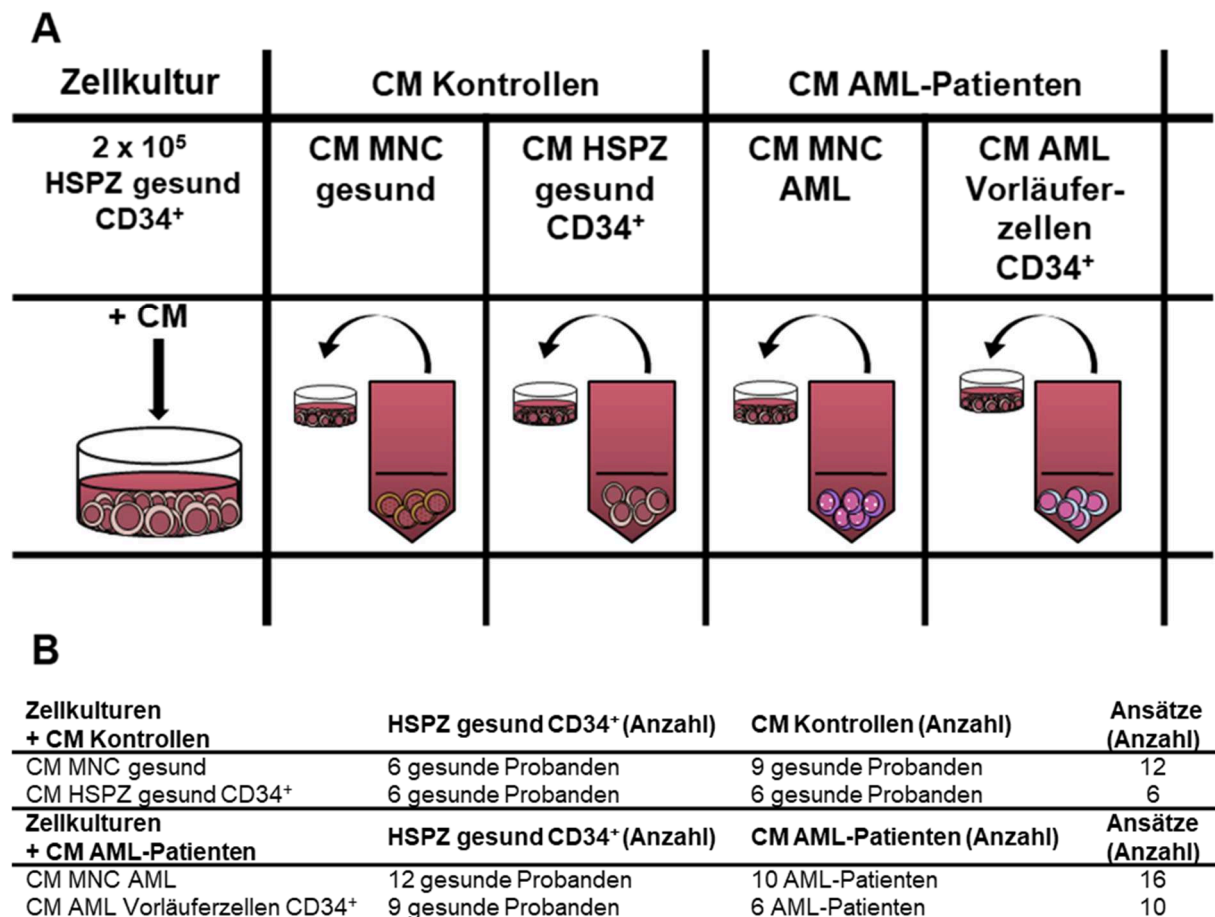


Abb. 16: **Einfluss primärer leukämischer Patientenzellen auf gesunde CD34⁺ HSPZ:** **A** Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. 2 x 10⁵ CD34⁺ HSPZ von gesunden Probanden wurden mit CM leukämischer Zellen von AML-Patienten für 3 Tage kultiviert. **B** Tabelle n-Zahlen.

3.4.1 Bestimmung der Proliferationsfähigkeit gesunder CD34⁺ HSPZ nach 3 Tagen Zellkultur mit konditioniertem Medium (CM) leukämischer Zellen von AML-Patienten mittels Zellzahlbestimmung

In einem ersten Schritt wurde auch hier mittels eines Zellzählgeräts CASYTM von den über 3 Tage mit CM kultivierten gesunden CD34⁺ HSPZ die Zellzahl bestimmt.

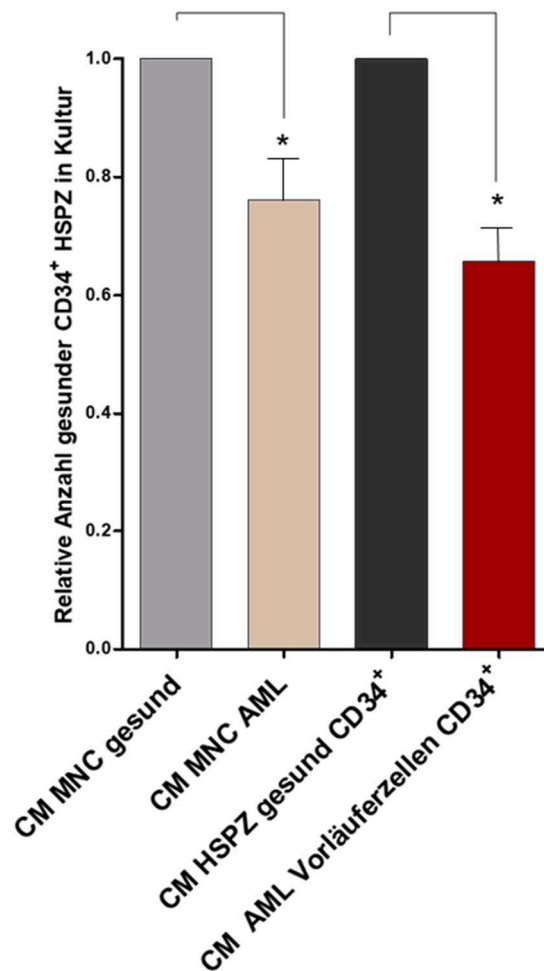


Abb. 17: Graphische Darstellung der relativen Zellzahl der gesunden CD34⁺ HSPZ nach 3 Tagen Zellkultur mit CM von AML-Patientenzellen (MNC AML bezogen auf die Kontrolle CM MNC gesund normiert auf 100%, CM von AML CD34⁺ Vorläuferzellen bezogen auf die Kontrolle CM HSPZ gesund CD34⁺ normiert auf 100%).

Die gesunden CD34⁺ HSPZ waren in ihrer Zellzahl nach 3 Tagen Zellkultur mit CM von MNC von AML-Patienten bezogen auf die Kontrolle (Abb. 17 CM MNC gesund: 100%, absolut MW $0,661 \times 10^6$) signifikant verringert (Abb. 17 CM MNC AML: relativ 76% | absolut MW $0,503 \times 10^6$; $p=0,0102$). Eine etwas stärker ausgeprägte Suppression der relativen Zellzahl der

kultivierten gesunden CD34⁺ HSPZ bezogen auf die Kontrolle (Abb. 17 CM HSPZ gesund CD34⁺: 100%, absolut MW 0,601 x 10⁶) zeigten die Zellen, die mit CM von CD34⁺ leukämischen Vorläuferzellen von AML Patienten kultiviert wurden (Abb. 17 CM AML Vorläuferzellen CD34⁺: relativ 66% | absolut MW 0,395 x 10⁶; p=0,0304).

3.4.2 Zellzyklusanalyse der gesunden CD34⁺ HSPZ nach 3 Tagen Zellkultur mit konditioniertem Medium (CM) leukämischer Zellen von AML-Patienten mittels der Doppelfärbung Ki67 und Hoechst 33343

Die Zellzyklusstatusuntersuchungen von gesunden CD34⁺ HSPZ nach 3 Tagen Kultivierung mit CM leukämischer Zellen von Patientenproben wurden analog zu Punkt 3.3.2 beschrieben, durchgeführt und ausgewertet.

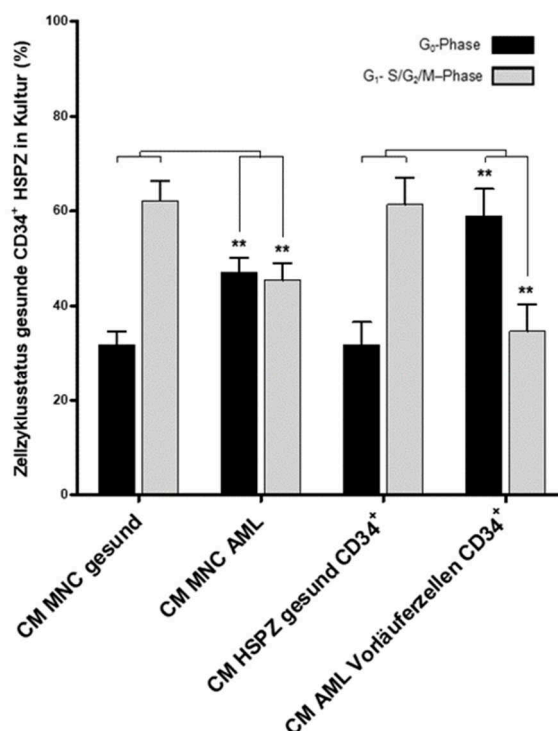


Abb. 18: **Prozentuale Verteilung des Zellzyklusstatus gesunder CD34⁺ HSPZ nach 3 Tagen Zellkultur mit CM leukämischer Zellen von AML-Patienten:** Graphische Darstellung der prozentualen Verteilung des Zellzyklusstatus nach Proliferationsstatus (**G₁-S/G₂/M-Phase** , **G₀-Phase**) der gesunden CD34⁺ HSPZ nach 3 Tagen Zellkultur mit CM leukämischer Zellen von AML-Patienten (CM MNC AML, CM AML Vorläuferzellen CD34⁺) und Kontrollen (CM MNC gesund, CM HSPZ gesund CD34⁺).

Nach 3 Tagen Zellkultur mit CM von MNC von AML-Patienten zeigten die gesunden CD34⁺ HSPZ eine signifikante Verschiebung des Zellzyklusstatus in die G₀-Phase im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 18 CM MNC AML: G₀-Phase MW 47%, p=0,0015; G₁- S/G₂/M-Phase MW 45%, p=0,0052 | CM MNC gesund: G₀-Phase MW 32%; G₁- S/G₂/M-Phase MW 62%). Ebenso zeigte sich eine signifikante Verschiebung in die G₀-Phase (Zellzyklusarrest) im Vergleich zur Kontrolle bei den gesunden CD34⁺ HSPZ, die mit CM von CD34⁺ Vorläuferzellen von AML-Patienten kultiviert wurden (Abb. 18 CM AML Vorläuferzellen CD34⁺: G₀-Phase MW 59%, p=0,0056; G₁- S/G₂/M-Phase MW 35%, p=0,0075 | CM HSPZ gesund CD34⁺: G₀-Phase MW 32%; G₁- S/G₂/M-Phase MW 61%).

3.4.3 Analyse des Koloniebildungsverhaltens und der Differenzierungsfähigkeit gesunder CD34⁺ HSPZ nach 3 Tagen Zellkultur mit konditioniertem Medium (CM) leukämischer Zellen von AML-Patienten mittels Colony Forming Unit (CFU)-Assay

Neben den Zellkulturexperimenten mit AML-Zelllinien wurden die mit CM von leukämischen Zellen von AML-Patienten kultivierten gesunden CD34⁺ HSPZ ebenfalls bezüglich ihrer Fähigkeit untersucht, Kolonien zu bilden und zu differenzieren. Die Methodik, Auswertung und Darstellung erfolgte dabei in Analogie zu Punkt 3.3.3.

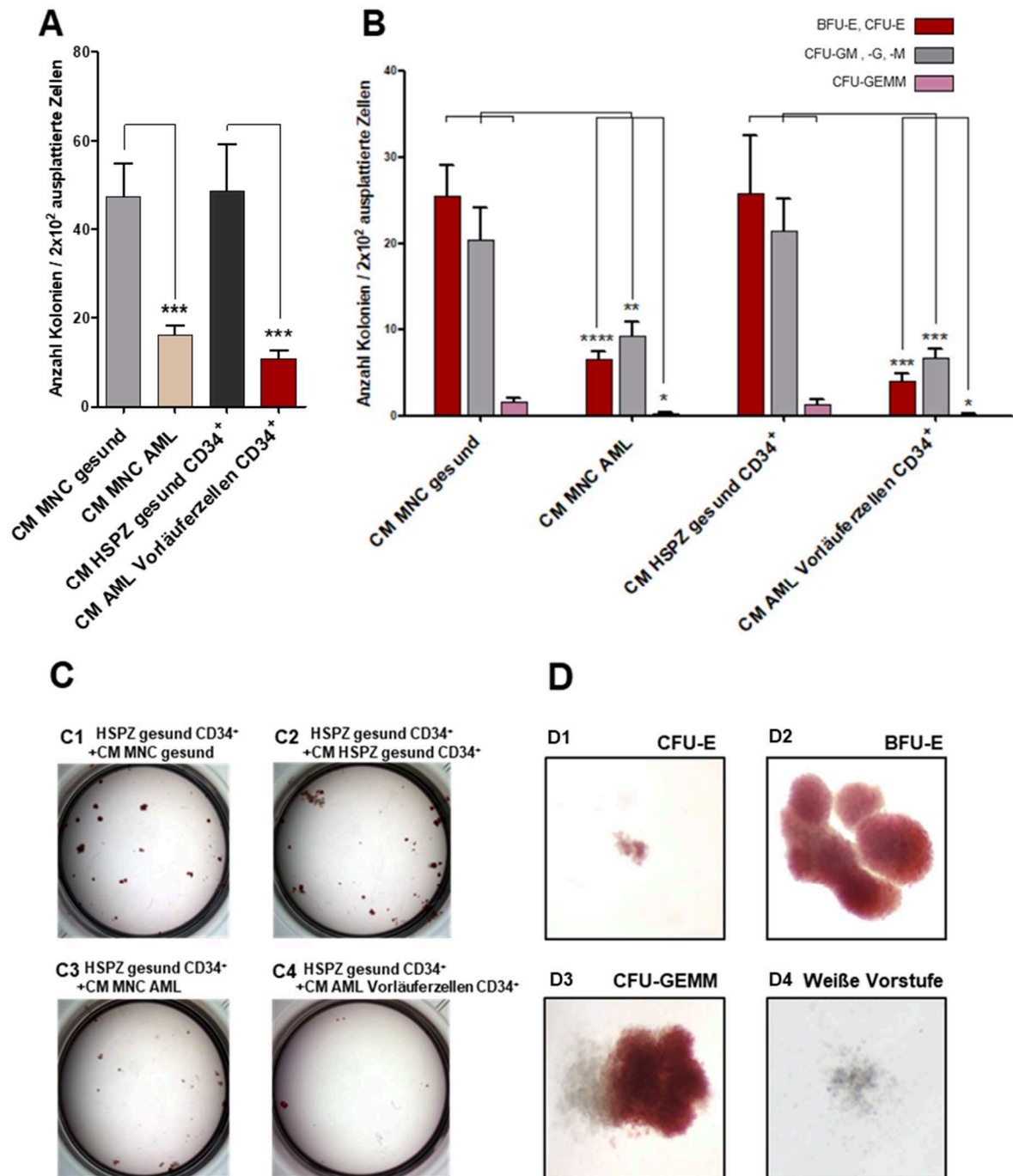


Abb. 19: Koloniebildungsverhalten und Differenzierungsfähigkeit gesunder CD34⁺ HSPZ nach 3 Tagen Zellkultur mit CM leukämischer Zellen von AML-Patienten: Graphische Darstellung des Koloniebildungsverhaltens (**A** Anzahl der Kolonien insgesamt) und der Differenzierungsfähigkeit (**B** CFU-Rote Reihe ■■■, CFU-Weiße Reihe ■■■, CFU-GEMM ■■■) der gesunden CD34⁺ HSPZ (200 Zellen ausplattiert) nach 3 Tagen Zellkultur mit CM leukämischer Zellen von AML-Patienten (CM MNC AML, CM AML Vorläuferzellen CD34⁺) und Kontrollen (Kontrolle CM MNC gesund, Kontrolle CM HSPZ gesund CD34⁺) mittels Colony forming Unit Assay (CFU-Assay). **C** Exemplarische fotografische Darstellungen von **C1-2** Kontroll CFU-Assays, **C3** mit CM von MNC und **C4** mit CM von CD34⁺ leukämischen Vorläuferzellen von AML Patienten (Novex Stereomikroskop RZB 0.65x, Kamera Moticam 2300). **D1-4** Exemplarische lichtmikroskopische Darstellung einzelner Kolonien (Zeiss-Labormikroskop Axiolab mit CCD-Kamera, 40xObjektiv).

Es zeigte sich eine hochsignifikant verringerte Anzahl gebildeter Kolonien im Vergleich zur Kontrolle bei den gesunden CD34⁺ HSPZ, die 3 Tage mit CM von MNC von AML Patienten kultiviert wurden (Abb. 19 **A** Kolonien gesamt: CM MNC AML MW 16 Kolonien vs. CM MNC gesund MW 47 Kolonien, $p=0,0001$). Etwas deutlicher und hochsignifikant supprimiert war die Anzahl der gebildeten Kolonien bei den gesunden CD34⁺ HSPZ, die 3 Tage mit CM von CD34⁺ leukämischen Vorläuferzellen von AML-Patienten in Kultur waren (Abb. 19 **A** Kolonien gesamt: CM AML Vorläuferzellen CD34⁺ MW 11 Kolonien vs CM HSPZ gesund CD34⁺ MW 49 Kolonien, $p=0,0005$).

Insbesondere war die Suppression der Koloniebildung der Zellen der „roten Reihe“ im Vergleich zu den Kontrollen hochsignifikant ausgeprägt (Abb. 19 **B** CFU-Rote Reihe: CM MNC AML MW 7 Kolonien vs. CM MNC gesund MW 26 Kolonien, $p<0,0001$ | CM AML Vorläuferzellen CD34⁺ MW 4 Kolonien vs CM HSPZ gesund CD34⁺ MW 26 Kolonien, $p=0,0009$). Die Suppression der Koloniebildung der „weißen Reihe“ war ebenfalls im Vergleich zu den Kontrollen signifikant ausgeprägt (Abb. 19 **B** CFU-Weiße Reihe: CM MNC AML MW 9 Kolonien vs. CM MNC gesund MW 20 Kolonien, $p=0,0062$ | CM AML Vorläuferzellen CD34⁺ MW 7 Kolonien vs CM HSPZ gesund CD34⁺ MW 22 Kolonien, $p=0,0004$). Auch die in der Hämatopoiese sehr früh einzuordnenden Kolonien waren im Vergleich zu den Kontrollen signifikant vermindert (Abb. 19 **B** CFU-GEMM: CM MNC AML MW 0 Kolonien vs. CM MNC gesund MW 2 Kolonien, $p=0,0183$ | CM AML Vorläuferzellen CD34⁺ MW 0 Kolonien vs CM HSPZ gesund CD34⁺ MW 1 Kolonie, $p=0,0163$).

Diese im Verhältnis zur Suppression der „weißen Reihe“ stärker ausgeprägte Suppression der „roten Reihe“ (2,1 fach stärker) zeigte sich insbesondere bei der Kultivierung mit CD34⁺ leukämischen Vorläuferzellen auch in einem signifikant verringerten Rot/Weiß-Quotienten im Vergleich zur Kontrolle (Quotient: Rote Reihe/Weiße Reihe: CM MNC AML 0,99 vs. CM MNC gesund 1,43, $p=0,1183$ | CM AML Vorläuferzellen CD34⁺ 0,57 vs CM HSPZ gesund CD34⁺ 1,20, $p=0,0079$).

3.5 Einfluss unterschiedlicher Zellfraktionen von AML-Patienten (gepaarte Proben) auf gesunde CD34⁺ HSPZ

Einige der in dieser Arbeit verwendeten Patientenproben trugen auf ihren Blasten das Antigen CD34. Diese erlaubten somit eine Selektion der CD34⁺ Blastenpopulation (CD34⁺ leukämische Vorläuferzellen) aus der Fraktion der Mononukleären Zellen (MNC) mittels magnetischer Zellseparation (MACS). Um den supprimierenden Einfluss der CD34⁺ leukämischen Vorläuferzellen von AML-Patienten (Blasten) im direkten Vergleich zur

Mononukleären Zellfraktion (MNC) derselben AML-Patienten auf die gesunden CD34⁺ HSPZ zu untersuchen, wurden Zellkulturexperimente mit MNC und CD34⁺ leukämischen Vorläuferzellen von 5 gepaarten AML-Patientenproben durchgeführt.

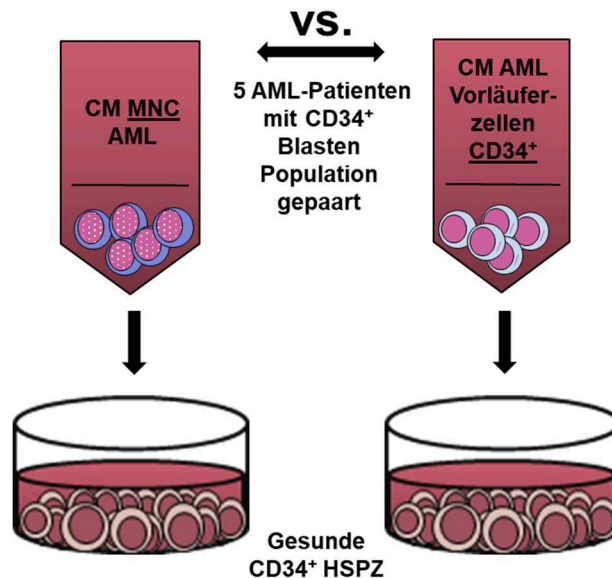


Abb. 20: **Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus: Einfluss von MNC und CD34⁺ leukämischen Vorläuferzellen von gepaarten AML-Patientenproben (n=5) auf die gesunden CD34⁺ HSPZ nach 3 Tagen Zellkultur:** Jeweils 2×10^5 CD34⁺ HSPZ von gesunden Probanden wurden sowohl mit CM von MNC als auch mit CM von CD34⁺ leukämischen Vorläuferzellen derselben AML-Patienten für 3 Tage kultiviert.

Dazu wurden gesunde CD34⁺ HSPZ mit CM von MNC der 5 AML-Patienten, deren Blasten das Antigen CD34 exprimierten, für 3 Tage kultiviert. Auch wurden gesunde CD34⁺ HSPZ mit CM von CD34⁺ leukämischen Vorläuferzellen derselben AML-Patienten für 3 Tage in Kultur gebracht (Abb. 20). Die folgenden Analysen fanden analog zu den zuvor beschriebenen Experimenten (Punkt 3.3) statt.

3.5.1 Bestimmung der Proliferationsfähigkeit gesunder CD34⁺ HSPZ nach 3 Tagen Zellkultur mit konditioniertem Medium (CM) von MNC und CD34⁺ leukämischen Vorläuferzellen von gepaarten AML-Patientenproben mittels Zellzahlbestimmung

Zunächst wurde ebenfalls die Zellzahl der über 3 Tage mit konditioniertem Medium kultivierten gesunden CD34⁺ HSPZ mittels eines Zellzählgerätes CASY[™] bestimmt. Die Untersuchung auf statistische Signifikanz erfolgte mittels eines gepaarten Students-TTEST.

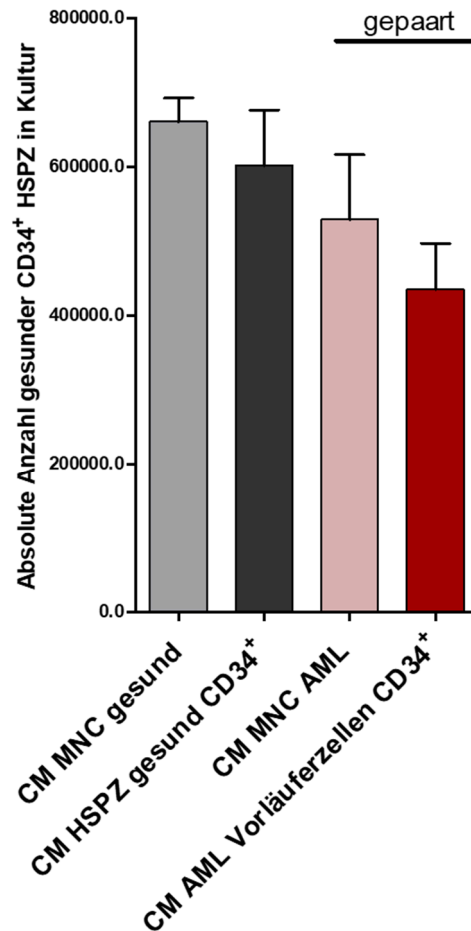


Abb. 21: **Graphische Darstellung der absoluten Zellzahlen gesunder CD34⁺ HSPZ nach 3 Tagen Zellkultur mit CM von MNC und CD34⁺ leukämischen Vorläuferzellen von 5 gepaarten AML-Patientenproben** (Die Untersuchung auf statistische Signifikanz erfolgte mittels eines gepaarten Students-TTEST).

Die Zellzahl der gesunden CD34⁺ HSPZ, die mit CM von CD34⁺ leukämischen Vorläuferzellen von AML-Patienten 3 Tage kultiviert wurden, zeigte sich im Vergleich zu den gesunden CD34⁺ HSPZ, die mit CM von MNC derselben AML-Patienten kultiviert wurden, tendenziell stärker verringert, jedoch war die Reduktion statistisch nicht signifikant (Abb. 21 CM MNC AML MW $5,3 \times 10^5$ vs. CM AML Vorläuferzellen CD34⁺ MW $4,4 \times 10^5$, $p=0,3275$).

3.5.2 Zellzyklusanalyse der gesunden CD34⁺ HSPZ nach 3 Tagen Zellkultur mit konditioniertem Medium (CM) von MNC und CD34⁺ leukämischen Vorläuferzellen von gepaarten AML-Patientenproben mittels der Doppelfärbung Ki67 und Hoechst 33343

Auch hier wurde analog zu den zuvor genannten Versuchsansätzen der Zellzyklusstatus der gesunden CD34⁺ HSPZ, welche mit CM von gepaarten AML-Patientenproben kultiviert wurden, untersucht. Die Methodik, Auswertung und Darstellung erfolgte dabei in gleicher Weise wie in Punkt 3.3.2. Die Untersuchung auf statistische Signifikanz erfolgte mittels eines gepaarten Students-TTEST.

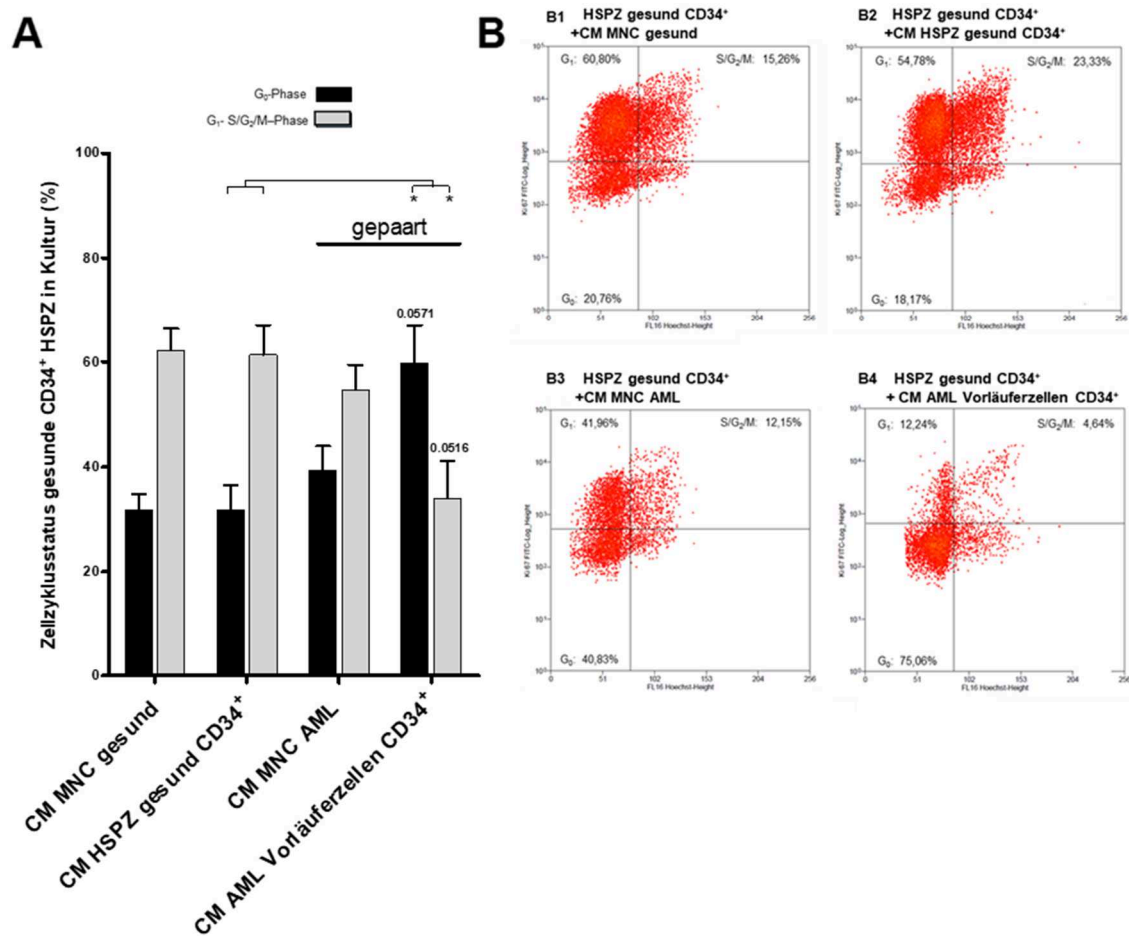


Abb. 22: **Prozentuale Verteilung des Zellzyklusstatus gesunder CD34⁺ HSPZ nach 3 Tagen Zellkultur mit CM von MNC und CD34⁺ leukämischen Vorläuferzellen von 5 gepaarten AML-Patientenproben:** **A** Graphische Darstellung der prozentualen Verteilung des Zellzyklusstatus nach Proliferationsstatus (G₁- S/G₂/M-Phase (grey), G₀-Phase (black)). **B** Exemplarische FACS-Plots mit Darstellung des prozentualen Anteils der sich in unterschiedlichen Proliferationsphasen befindenden gesunden CD34⁺ HSPZ, **B1-2** mit CM von Kontrollen, **B3-4** mit CM von 5 gepaarten AML-Patientenproben (Die Untersuchung auf statistische Signifikanz erfolgte mittels eines gepaarten Students-TTEST).

Bei den gesunden CD34⁺ HSPZ, die mit CM von MNC der gepaarten AML Patienten kultiviert wurden, fand nur eine leichte Verschiebung in die G₀-Phase (Zellzyklusarrest) statt. Eine Verstärkung dieses Effekts konnte beobachtet werden, wenn die gesunden CD34⁺ HSPZ mit CM von CD34⁺ leukämischen Vorläuferzellen derselben AML-Patienten kultiviert wurden. Diese durch die verschiedenen Zellpopulationen der AML-Patienten unterschiedlich stark ausgeprägte Suppression zeigte eine Tendenz zur Signifikanz. (Abb. 22 **A**, CM AML Vorläuferzellen CD34⁺: G₀-Phase MW 60%; G₁- S/G₂/M-Phase MW 34%, exemplarisch **B4** vs. CM MNC AML: G₀-Phase MW 39%; G₁- S/G₂/M-Phase MW 55%, exemplarisch **B3**; G₀-Phase p=0,0571 und G₁- S/G₂/M-Phase p=0,0516).

3.5.3 Analyse des Koloniebildungsverhaltens und der Differenzierungsfähigkeit gesunder CD34⁺ HSPZ nach 3 Tagen Zellkultur mit konditioniertem Medium (CM) von MNC und CD34⁺ leukämischen Vorläuferzellen von gepaarten AML-Patientenproben mittels Colony Forming Unit (CFU)-Assay

Schließlich wurden in Analogie zu den vorherigen Zellkulturexperimenten auch die gesunden CD34⁺ HSPZ, die mit CM von gepaarten AML-Patientenproben kultiviert wurden, bezüglich ihrer Fähigkeit untersucht, Kolonien zu bilden und auszudifferenzieren. Die Methodik, Auswertung und Darstellung erfolgte in gleicher Weise wie in Punkt 3.3.3. Die Untersuchung auf statistische Signifikanz erfolgte mittels eines gepaarten Students-TTEST.

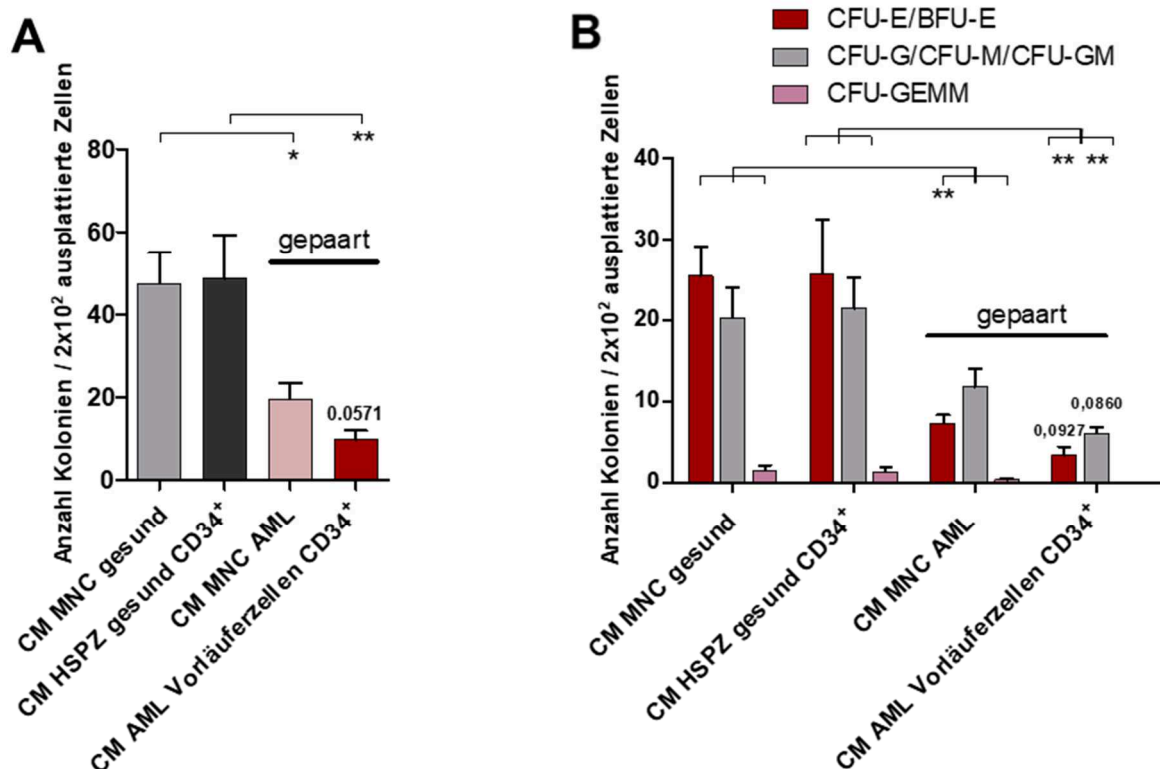


Abb. 23: Koloniebildungsverhalten und Differenzierungsfähigkeit gesunder CD34⁺ HSPZ nach 3 Tagen Zellkultur mit CM von MNC und CD34⁺ leukämischen Vorläuferzellen von 5 gepaarten AML-Patientenproben: Graphische Darstellung des Koloniebildungsverhaltens (**A** Anzahl der Kolonien insgesamt) und der Differenzierungsfähigkeit (**B** CFU-Rote Reihe , CFU-Weiße Reihe , CFU-GEMM ) gesunder CD34⁺ HSPZ (200 Zellen ausplattiert) nach 3 Tagen Zellkultur mit CM von gepaarten AML-Patientenproben mittels Colony forming Unit Assay (CFU-Assay) (Die Untersuchung auf statistische Signifikanz erfolgte mittels eines gepaarten Students-TTEST).

Die Anzahl der gebildeten Kolonien der gesunden CD34⁺ HSPZ, die zuvor 3 Tage mit CM von CD34⁺ leukämischen Vorläuferzellen der gepaarten AML-Patientenproben kultiviert wurden, war stärker verringert als die der gesunden CD34⁺ HSPZ, die mit CM der MNC der gepaarten AML-Patientenproben in Kultur waren. Diese innerhalb der verschiedenen Zellpoulationen der AML-Patienten unterschiedlich starken Suppression auf die Koloniebildung zeigte eine Tendenz zur Signifikanz (Abb. 23 **A** Kolonien gesamt: CM AML Vorläuferzellen CD34⁺ MW 10 Kolonien vs. CM MNC AML MW 20 Kolonien, $p=0,0571$ || **B** Kolonien einzeln: Rote Reihe: CM AML Vorläuferzellen CD34⁺ MW 3 Kolonien vs. CM MNC AML MW 7 Kolonien, $p=0,0927$ | Weiße Reihe: CM AML Vorläuferzellen CD34⁺ MW 6 Kolonien vs. CM MNC AML MW 12 Kolonien, $p=0,0860$ | CFU-GEMM: CM AML Vorläuferzellen CD34⁺ MW 0 Kolonien vs. CM MNC AML MW 0,35 Kolonien, $p=1,403$). Dabei war der supprimierende Effekt auf die Kolonien der „roten Reihe“ durch das CM der CD34⁺ leukämischen Vorläuferzellen der gepaarten AML-Patientenproben stärker (1,7-fach) als das CM der MNC der gepaarten AML-Patientenproben (Quotient: „rote Reihe“/„weiße Reihe“: CM AML Vorläuferzellen CD34⁺ 0,59 vs. CM MNC AML 1,02, ns).

3.6 Molekularbiologische Analysen – Genexpressionsanalysen leukämischer Zellen von AML-Patienten mittels quantitativer Real-Time PCR (qRT-PCR)

CD34⁺ HSPZ stehen durch Ligand-Rezeptor-Bindungen in Wechselwirkung mit den verschiedenen zellulären und azellulären Bestandteilen des Knochenmarkmikromilieus. Diese Interaktionen sind für die Regulation der CD34⁺ HSPZ hinsichtlich Selbsterneuerung, Differenzierung und Proliferation von entscheidender Bedeutung. Dazu exprimieren CD34⁺ HSPZ eine Reihe von Rezeptoren, die durch entsprechende Liganden sowohl von weiteren CD34⁺ HSPZ, als auch von anderen Zellen des Knochenmarkmikromilieus, wie z.B. mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen (MSPZ) für eine Interaktion gebunden werden können.

In den vorherigen Versuchen konnten wir zeigen, dass das konditionierte Medium (CM) der AML-Zellen die gesunde Hämatopoiese supprimiert. Einige Rezeptormoleküle und Faktoren sind bei AML-Zellen dysreguliert und könnten somit als mögliche Faktoren an der Pathogenese der Myelosuppression beteiligt sein.

Des Weiteren gibt es Faktoren, die unter physiologischen Bedingungen die gesunden Stammzellen in einem Ruhezustand halten (Kent et al., 2008; Yamazaki et al., 2011; Wang et al., 2013; Arai et al., 2004; Qian et al., 2007). Im Falle einer Überexpression bei AML-Zellen könnten diese Faktoren myelosuppressiv auf die gesunde Hämatopoiese wirken. Daher wurde in einem nächsten Schritt durch PCR-Analysen einzelner Gene versucht, sich mechanistisch dem in den vorherigen Versuchen gefundenen Phänomen zu nähern.

Im Folgenden wurde die Expression einzelner Gene in MNC und CD34⁺ HSPZ sowohl von gesunden Probanden als auch von AML-Patienten auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR untersucht. Die n-Zahlen sind Tabelle 17 zu entnehmen.

Tabelle 17: n-Zahlen Genexpressionsanalysen

Target	MNC gesund	HSPZ gesund CD34⁺	MNC AML	AML Vorläuferzellen CD34⁺
JAGGED1	7	14	12	10
NOTCH1	7	14	12	10
HES1	7	14	12	10
HES5	7	14	12	10
KIT-LG	7	13	12	10
c-KIT	7	13	12	10
ANGPT1	7	14	12	10
TIE2	7	13	12	10
TGF-β1	8	12	12	10
GDF-11	9	8	8	12
TGF-β-R1	9	8	12	12
SMAD2	9	8	12	11
IL1-β	9	8	8	12
CCL3	8	10	13	10
LIF-1	8	12	12	10
GAS6	8	12	12	10

3.6.1 Genexpression des JAGGED1-NOTCH1-Signalwegs

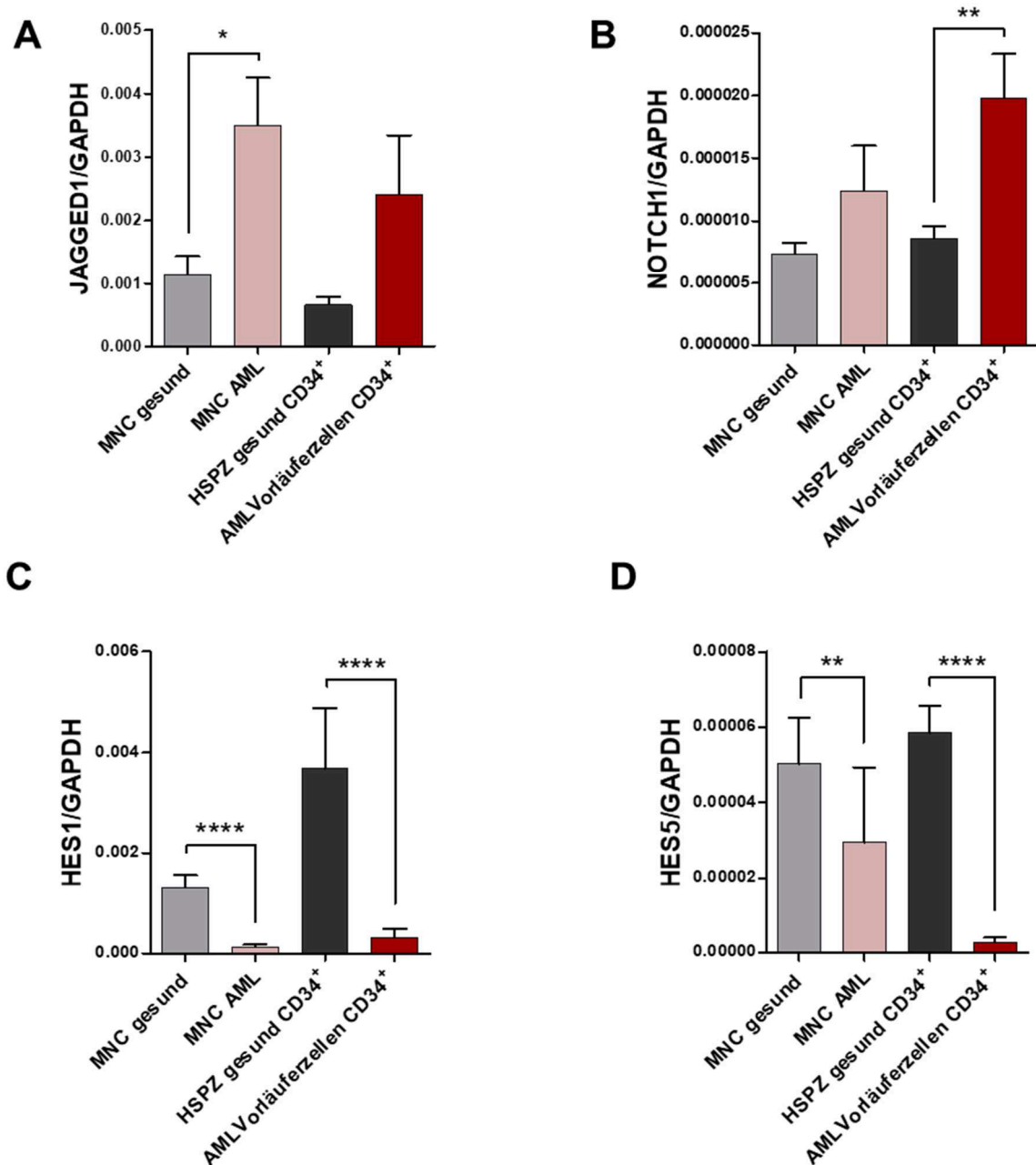


Abb. 24: Genexpression von JAGGED1, NOTCH1, HES1 und HES5 in MNC und CD34⁺ Zellen gesunder Probanden und von AML-Patienten: Graphische Auftragung des Expressionslevels von JAGGED1 **A**, NOTCH1 **B**, HES1 **C** und HES5 **D** auf mRNA-Ebene durch qRT-PCR quantifiziert bezogen auf das Haushaltsgen GAPDH.

Auf mRNA-Ebene zeigte sich in der MNC-Fraktion der AML-Patienten ein signifikant ($p=0,0111$) erhöhtes Expressionsniveau von JAGGED1 im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen (Abb 24 **A**). In den CD34⁺ leukämischen Vorläuferzellen war das Expressionslevel erhöht, jedoch zeigte es lediglich einen Trend..

Für den Rezeptor NOTCH1 zeigte sich in den MNC der AML-Patienten eine nicht signifikant erhöhte Expression. Die Expression in den CD34⁺ leukämischen Vorläuferzellen der AML-Patienten war signifikant ($p=0,0025$) überexprimiert im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 24 **B**).

Die beiden NOTCH-Zielgene HES1 und HES5 (*hairy enhancer of split 1/5*) waren sowohl in den MNC, als auch in den CD34⁺ leukämischen Vorläuferzellen der AML-Patienten hochsignifikant verringert im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen (Abb. 24 **C** HES1: MNC gesund vs. MNC AML, $p<0,0001$ | HSPZ gesund CD34⁺ vs. AML Vorläuferzellen CD34⁺, $p<0,0001$ || **D** HES5: MNC gesund vs. MNC AML, $p<0,0100$ | HSPZ gesund CD34⁺ vs. AML Vorläuferzellen CD34⁺, $p<0,0001$).

3.6.2 Genexpression von KIT-LG (SCF) und des korrespondierenden Rezeptors c-KIT

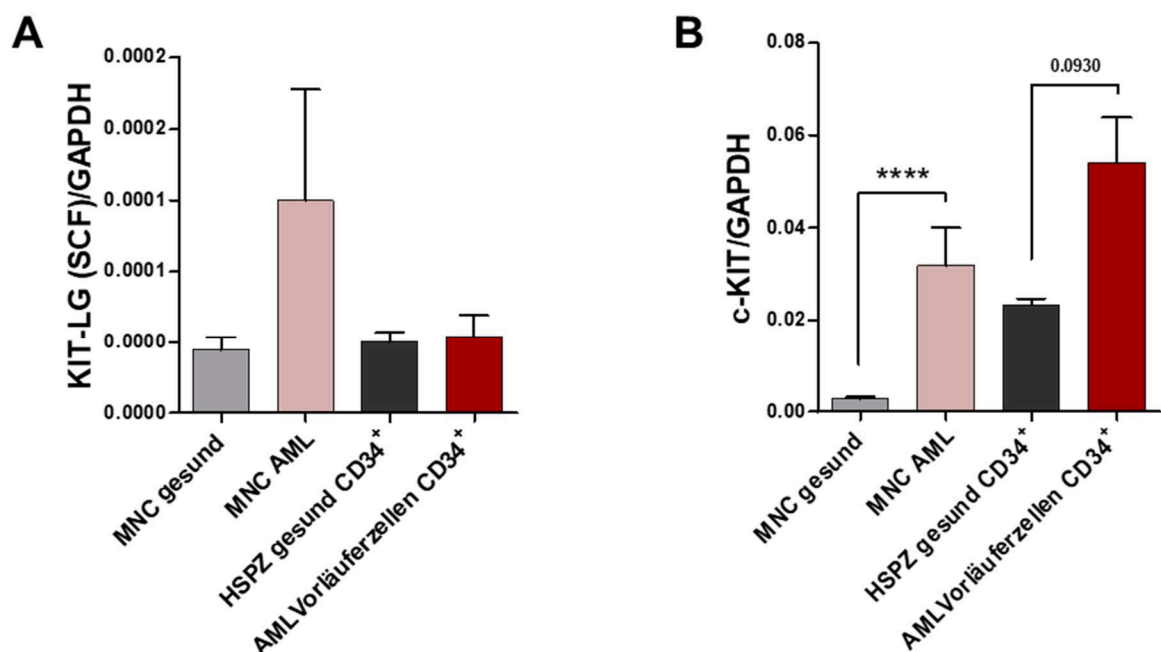


Abb. 25: **Genexpression von KIT-LG (SCF) und c-KIT in MNC und CD34⁺ Zellen gesunder Probanden und von AML-Patienten:** Graphische Auftragung des Expressionslevels von KIT-LG (SCF) **A** und c-KIT **B** auf mRNA-Ebene durch qRT-PCR quantifiziert bezogen auf das Haushaltsgen GAPDH.

KIT-LG (SCF) war in den MNC der AML-Patienten nicht signifikant überexprimiert im Vergleich zu den MNC der gesunden Probanden. Das Expressionslevel von KIT-LG (SCF) in den CD34⁺ leukämischen Vorläuferzellen der AML-Patienten zeigte keinen relevanten Unterschied im Vergleich zu den CD34⁺ HSPZ der gesunden Probanden (Abb. 25 **A**).

Der korrespondierende Rezeptor c-KIT (CD117) war in den MNC der AML-Patienten hochsignifikant ($p < 0,0001$) überexprimiert im Vergleich zur Kontrolle. In den CD34⁺ leukämischen Zellen der AML-Patienten war c-KIT ebenfalls ($p = 0,0930$) überexprimiert im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 25 **B**).

3.6.3 Genexpression von ANGPT1 und des korrespondierenden Rezeptors TIE2

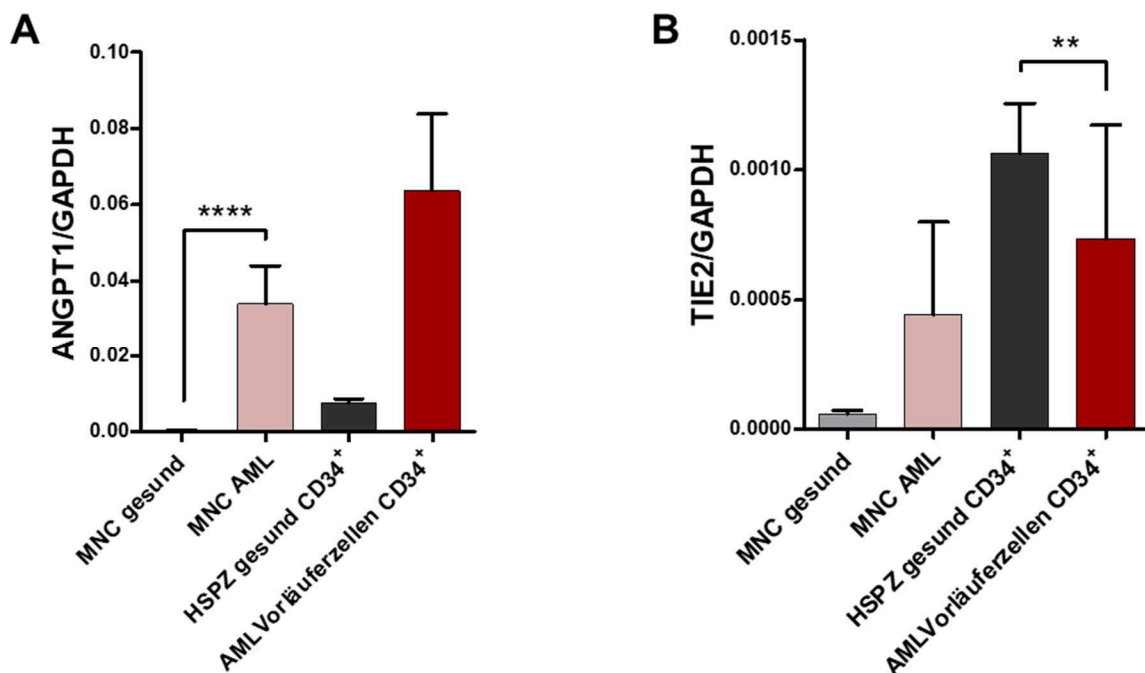


Abb. 26: **Genexpression von ANGPT1 und TIE2 in MNC und CD34⁺ Zellen gesunder Probanden und AML-Patienten:** Graphische Auftragung des Expressionslevels von ANGPT1 **A** und TIE2 **B** auf mRNA-Ebene durch qRT-PCR quantifiziert bezogen auf das Haushaltsgen GAPDH.

Das Expressionslevel von ANGPT1 (Angiopoietin 1) war in den MNC der AML-Patienten auf mRNA-Ebene hochsignifikant ($p < 0,0001$) erhöht im Vergleich zu den MNC der gesunden Probanden. Ebenso zeigte sich eine stark erhöhte Expression von ANGPT1 in den CD34⁺ leukämischen Vorläuferzellen der AML-Patienten (Abb. 26 **A**). Eine Signifikanz konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Der korrespondierende Rezeptor TIE2 war in den MNC der AML-Patienten nicht signifikant überexprimiert, während die Expression in den CD34⁺ leukämischen Vorläuferzellen der AML-Patienten im Vergleich zur Kontrolle signifikant ($p = 0,0021$) verringert war (Abb. 26 **B**).

3.6.4 Genexpression von TGF- β 1, GDF-11, des Rezeptors TGF- β -R1 und des Zielgens SMAD2

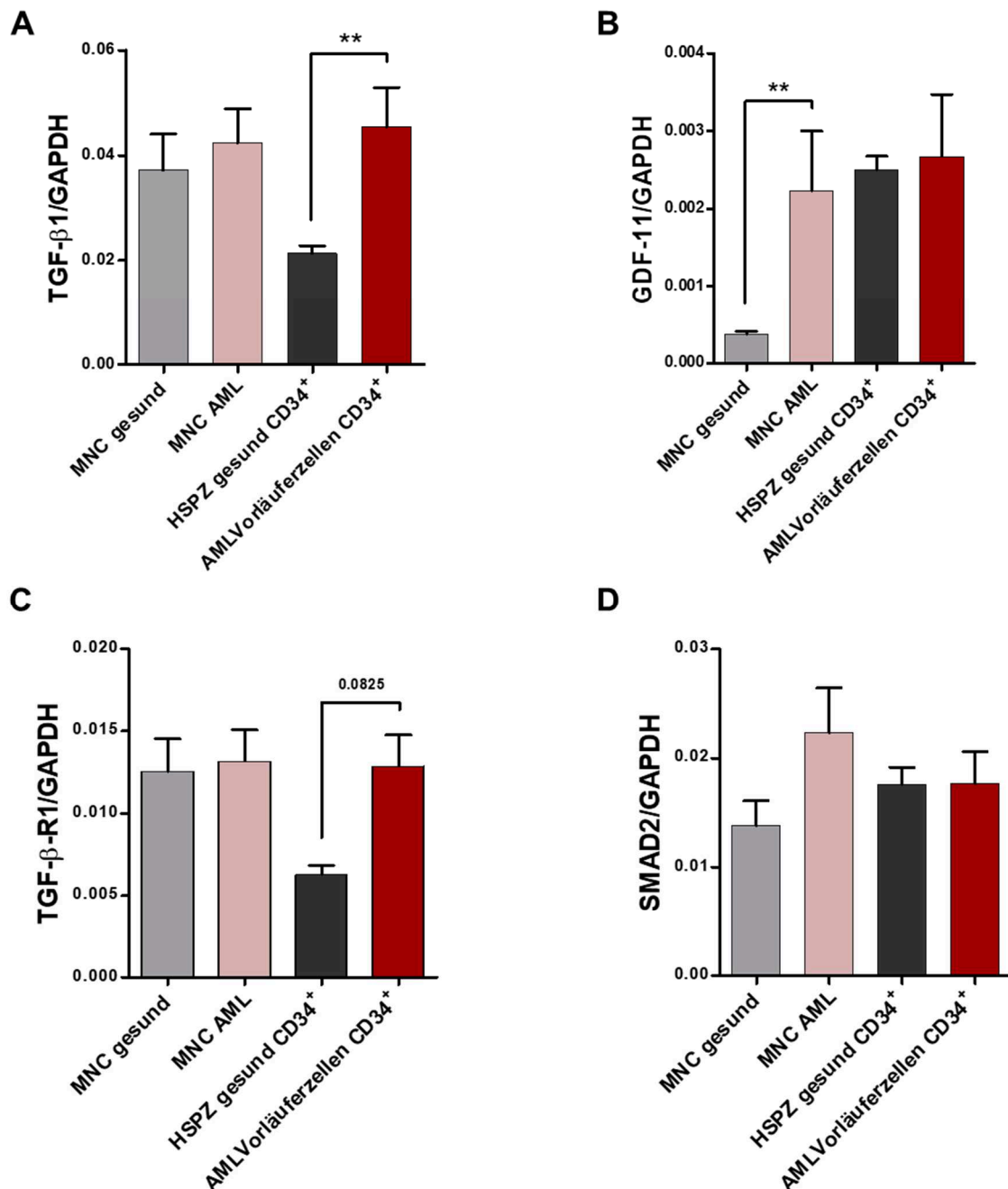


Abb. 27: **Genexpression von TGF- β 1, GDF-11, TGF- β -R1 und SMAD2 in MNC und CD34⁺ Zellen gesunder Probanden und von AML-Patienten:** Graphische Auftragung des Expressionslevels von TGF- β 1 **A**, GDF-11 **B**, TGF- β -R1 **C** und SMAD2 **D** auf mRNA-Ebene durch qRT-PCR quantifiziert bezogen auf das Haushaltsgen GAPDH.

Für TGF- β 1 (*transforming growth factor β 1*) zeigte sich in den MNC bezüglich des Expressionslevels kein relevanter Unterschied zwischen gesunden Probanden und AML-Patienten. In den CD34⁺ leukämischen Vorläuferzellen der AML-Patienten zeigte sich eine

signifikante Überexpression von TGF- β 1 ($p=0,0071$) im Vergleich zu den CD34⁺ HSPZ der gesunden Probanden (Abb. 27 **A**) (publiziert in Geyh et al., 2016 und 2018).

GDF-11 (*growth differentiation factor 11*) war in den MNC der AML-Patienten im Vergleich zu den MNC der gesunden Probanden signifikant ($p=0,0018$) überexprimiert. Das Expressionslevel in den CD34⁺ leukämischen Vorläuferzellen der AML-Patienten war im Vergleich zu den CD34⁺ HSPZ der gesunden Probanden nicht verändert (Abb. 27 **B**).

Die Expression des Rezeptors TGF- β -R1 war tendenziell ($p=0,0825$) in den CD34⁺ leukämischen Vorläuferzellen der AML-Patienten gegenüber den CD34⁺ HSPZ der Kontrollen erhöht. Auf Ebene der MNC zeigte sich kein Unterschied bezüglich des Expressionslevels zwischen den AML-Patienten und gesunden Probanden (Abb. 27 **C**).

Das TGF- β 1 Zielgen SMAD2 (*mothers against decapentaplegic homolog 2*) war auf mRNA Ebene in den MNC der AML-Patienten nicht signifikant überexprimiert im Vergleich zu den MNC der gesunden Probanden. Die CD34⁺ Zellen wiesen keinen relevanten Unterschied im Expressionslevel zwischen gesunden Probanden und AML-Patienten auf (Abb. 27 **D**).

3.6.5 Genexpression von IL1- β und CCL3 (MIP1- α)

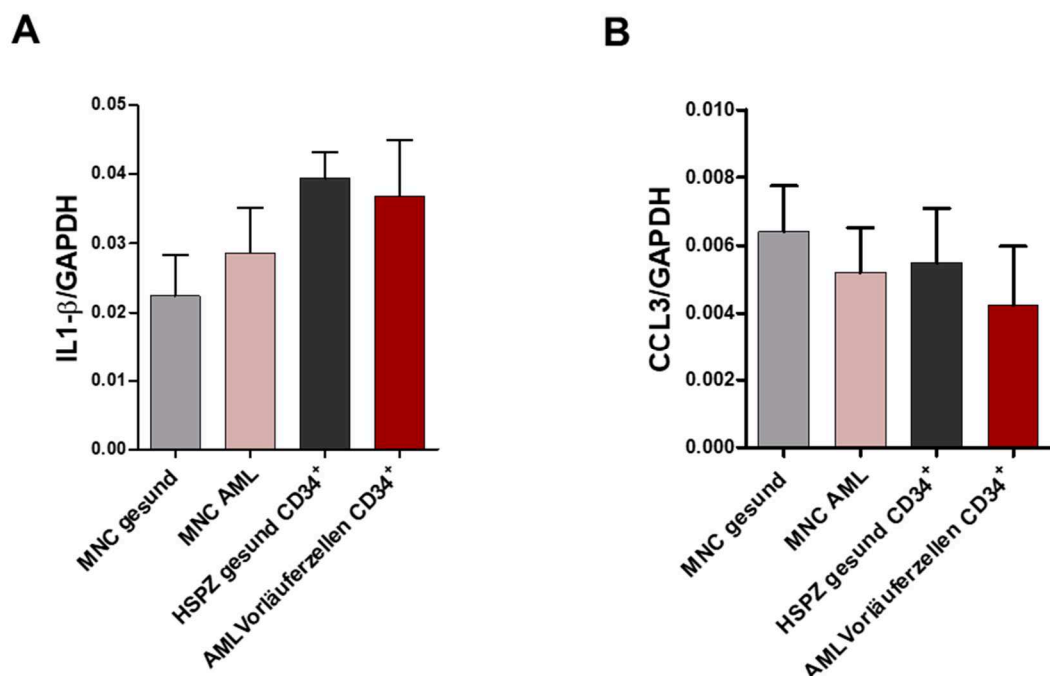


Abb. 28: **Genexpression von IL1- β und CCL3 (MIP1- α) in MNC und CD34⁺ Zellen gesunder Probanden und von AML-Patienten:** Graphische Auftragung des Expressionslevels von IL1- β **A** und CCL3 (MIP1- α) **B** auf mRNA- Ebene durch qRT-PCR quantifiziert bezogen auf das Haushaltsgen GAPDH.

Die Analyse der Genexpression von IL1- β (Interleukin 1- β) und CCL3 ((*chemokine C-C motif ligand 3* / MIP1- α (*macrophage inflammatory protein 1- α*)) auf mRNA-Ebene zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zellfraktionen von AML-Patienten und von gesunden Probanden (Abb. 28 **A, B**).

3.6.6 Genexpression von GAS6 und LIF1

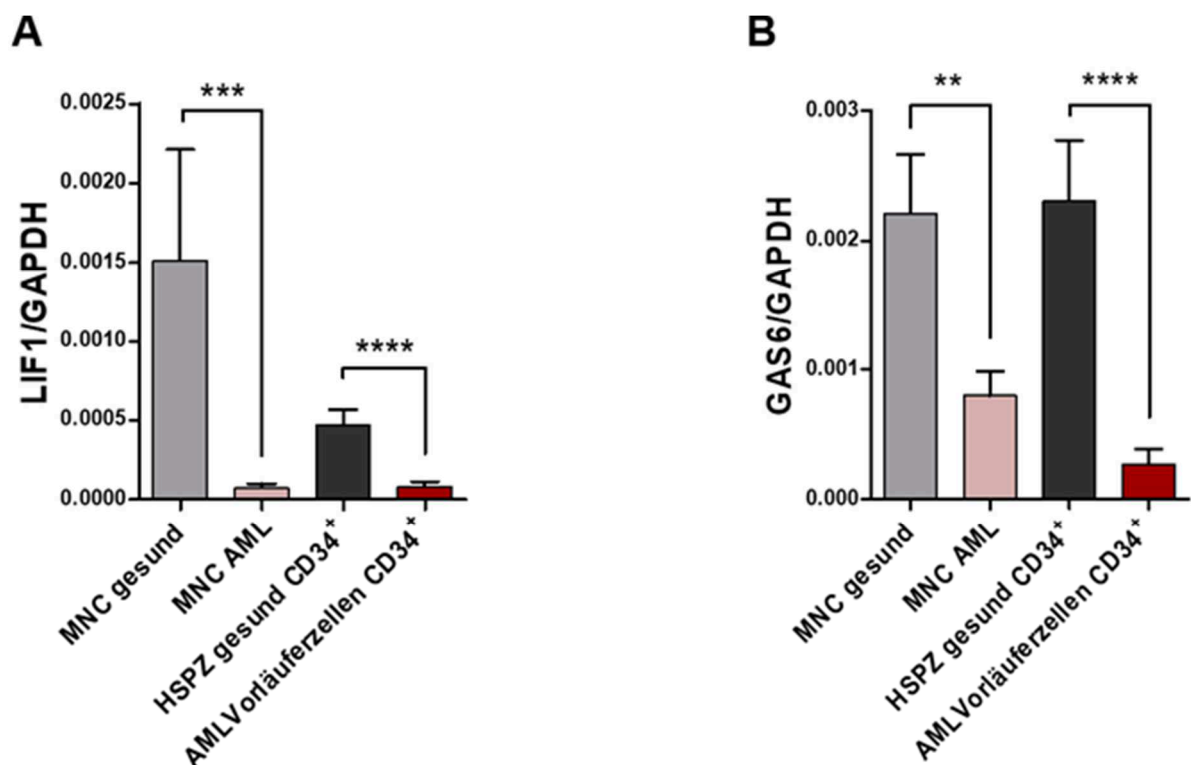


Abb. 29: **Genexpression von GAS6 und LIF1 in MNC und CD34⁺ Zellen gesunder Probanden und von AML-Patienten:** Graphische Auftragung des Expressionslevels von GAS6 **A** und LIF1 **B** auf mRNA-Ebene durch qRT-PCR quantifiziert bezogen auf das Haushaltsgen GAPDH.

Das Expressionslevel auf mRNA-Ebene von GAS6 (*growth arrest specific 6*) und LIF1 (*leucemia inhibitory factor 1*) war sowohl in der MNC als auch in den CD34⁺ leukämischen Vorläuferzellen der AML-Patienten hochsignifikant im Vergleich zu den MNC und CD34⁺ HSPZ der gesunden Probanden verringert (Abb. 29 **A** GAS6: MNC gesund vs. MNC AML, $p=0,0048$ | HSPZ gesund CD34⁺ vs. AML Vorläuferzellen CD34⁺, $p<0,0001$ || **B** LIF1: MNC

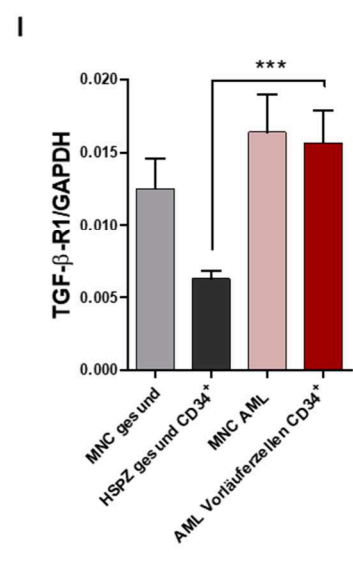
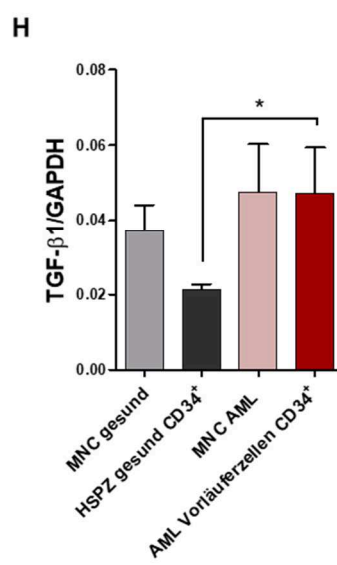
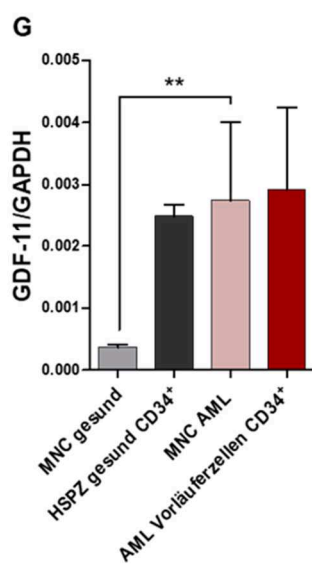
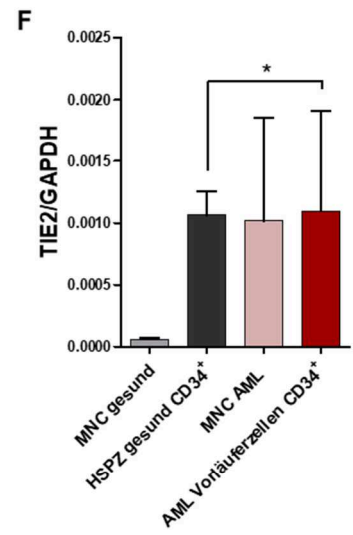
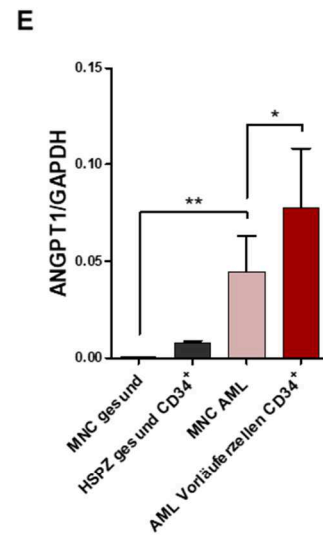
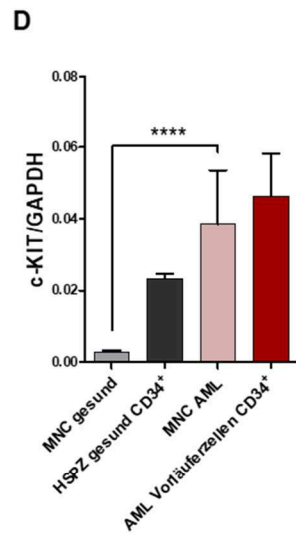
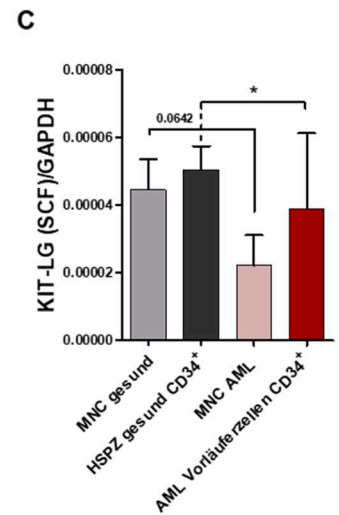
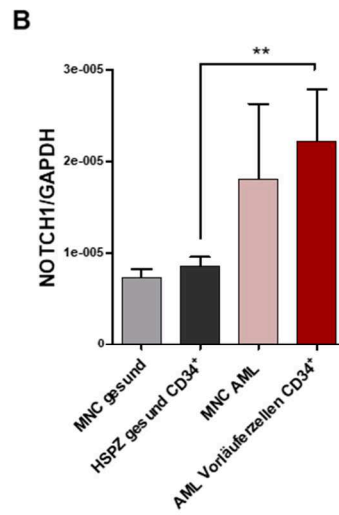
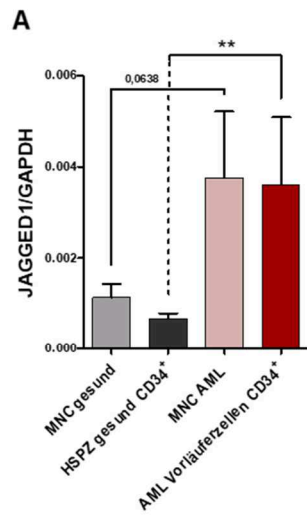
gesund vs. MNC AML, $p=0,0006$ | HSPZ gesund $CD34^+$ vs. AML Vorläuferzellen $CD34^+$, $p<0,0001$).

3.7 Genexpressionsanalysen von MNC und $CD34^+$ leukämischen Vorläuferzellen von gepaarten AML-Patientenproben mittels quantitativer Real-Time PCR

Die Auswertung der Zellkulturexperimente mit dem konditionierten Medium (CM) der gepaarten AML-Patientenproben zeigte einen stärkeren supprimierenden Einfluss auf die gesunden $CD34^+$ HSPZ durch das CM der $CD34^+$ leukämischen Vorläuferzellen der AML-Patienten. Die supprimierenden Effekte durch das CM der MNC derselben AML-Patienten waren hingegen schwächer ausgeprägt. Daher wurden die gepaarten Proben hinsichtlich der Genexpression der aus Punkt 3.6. bekannten Targets untersucht. Der Vollständigkeit halber wurden die Kontrollen aus Punkt 3.6 erneut mit dargestellt. Die n-Zahlen der Kontrollen sind Tabelle 17 zu entnehmen. Für die Analyse der AML-Patientenzellen wurden 5 gepaarte Proben verwendet ($n=5$). Die Untersuchung auf statistische Signifikanz erfolgte mittels eines gepaarten Students-TTEST.

Innerhalb der gepaarten AML-Patientenproben war das Expressionslevel von KIT-LG (SCF) in den $CD34^+$ leukämischen Vorläuferzellen höher als in den MNC, jedoch ohne Nachweis einer Signifikanz (Abb. 30 **C**). Für ANGPT1 war das Expressionslevel in den $CD34^+$ leukämischen Vorläuferzellen der gepaarten AML-Patientenproben signifikant im Vergleich zu den MNC der gepaarten AML-Patientenproben erhöht ($p=0,0367$) (Abb. 30 **E**). Die Expression des Gens für GAS6 war innerhalb der gepaarten AML-Patientenproben in den $CD34^+$ leukämischen Vorläuferzellen der AML-Patienten signifikant ($p=0,0354$) verringert im Vergleich zur Expression in den MNC der AML-Patienten (Abb. 30 **L**). Das Expressionslevel für das Gen von LIF1 war tendenziell ($p=0,0845$) in den $CD34^+$ leukämischen Vorläuferzellen der gepaarten AML-Patientenproben geringer als in den MNC (Abb. 30 **M**).

Es zeigte zeigte sich kein relevanter Unterschied bezüglich des Genexpressionslevels zwischen den MNC und $CD34^+$ leukämischen Vorläuferzellen der gepaarten AML-Patientenproben für die Gene von JAGGED1 **A**, NOTCH1 **B**, c-KIT **D**, TIE2 **F**, TGF- β 1 **G**, GDF-11 **H**, TGF- β -R1 **I**, IL1- β **J** und CCL3 (MIP1- α) **K** (Abb. 30).



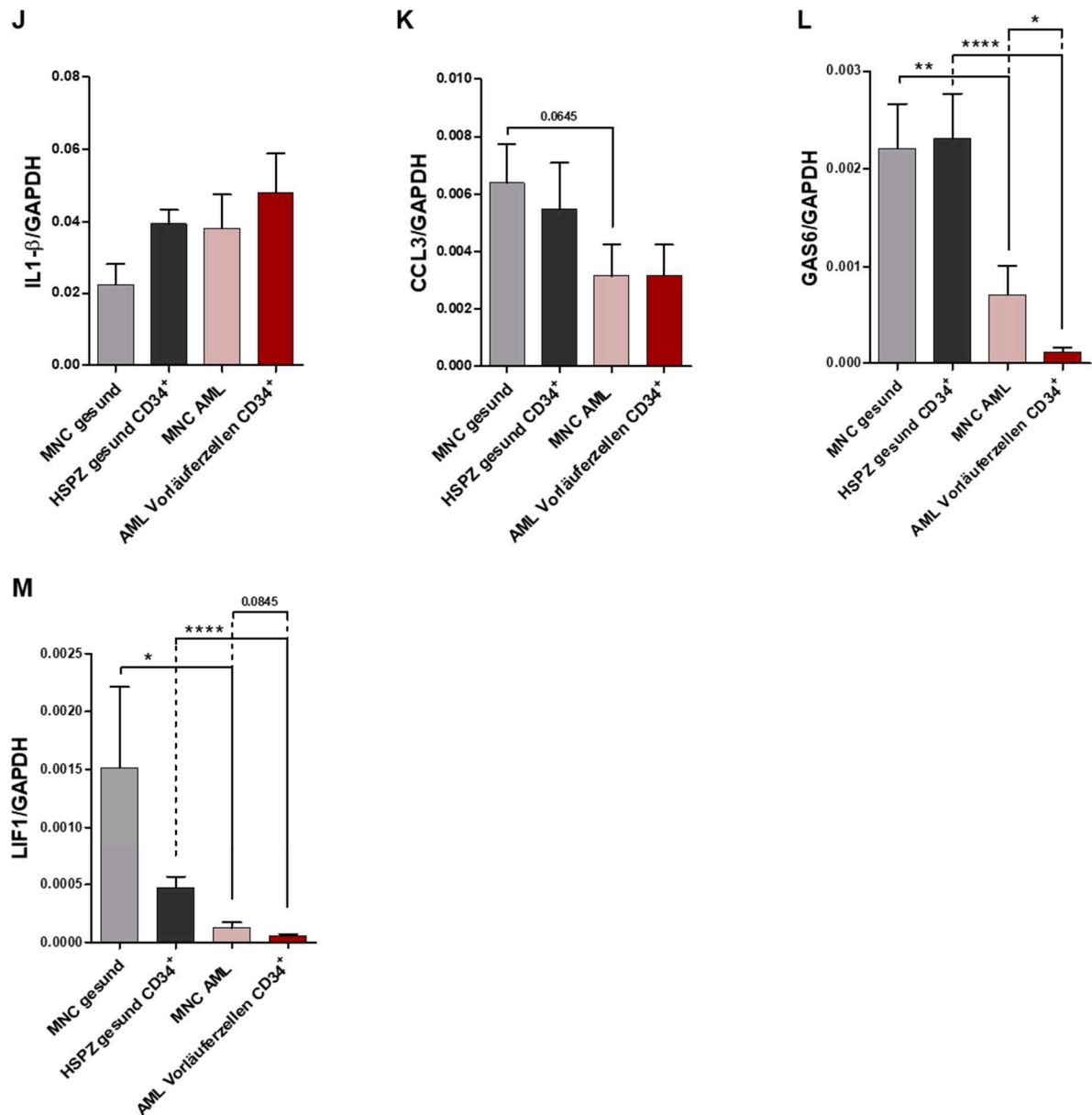


Abb. 30: Genexpression von JAGGED1, NOTCH1, KIT-LG (SCF), c-KIT, ANGPT1, TIE2, GDF-11, TGF-β1, TGF-β-R1, IL1-β, CCL3 (MIP1-α), GAS6 und LIF1 in MNC und CD34⁺ leukämischen Vorläuferzellen von gepaarten AML-Patientenproben. Graphische Auftragung des Expressionslevels von JAGGED1 **A**, NOTCH1 **B**, KIT-LG (SCF) **C**, c-KIT **D**, ANGPT1 **E**, TIE2 **F**, GDF-11 **G**, TGF-β1 **H**, TGF-β-R1 **I**, IL1-β **J**, CCL3 (MIP1-α) **K**, GAS6 **L** und LIF1 **M** auf mRNA-Ebene durch qRT-PCR quantifiziert bezogen auf das Haushaltsgen GAPDH (Die Untersuchung auf statistische Signifikanz erfolgte mittels eines gepaarten Students-TTEST).

3.8 Funktionelle Genexpressionsanalysen von gesunden CD34⁺ HSPZ nach 3 Tagen Zellkultur mit konditioniertem Medium (CM)

Weiterhin wurden CD34⁺ HSPZ von 5 gesunden Probanden mit CM von 3 gepaarten AML-Patientenproben (CM MNC AML und CM AML Vorläuferzellen CD34⁺) und mit CM von 5 gepaarten gesunden Probanden (CM MNC gesund & CM HSPZ gesund CD34⁺) für 3 Tage kultiviert. Anschließend wurden die kultivierten gesunden HSPZ auf mRNA-Ebene funktionell bezüglich des Expressionslevels von ANGPT1 und TGF- β 1 sowie der korrespondierenden Rezeptoren TIE2 und TGF- β -R1 mittels quantitativer Real-Time-PCR untersucht. Mittels dieser Analysen sollten mögliche Induktionen/Suppressionen von Signalwegen durch die malignen Zellen in den kultivierten gesunden CD34⁺ HSPZ untersucht werden.

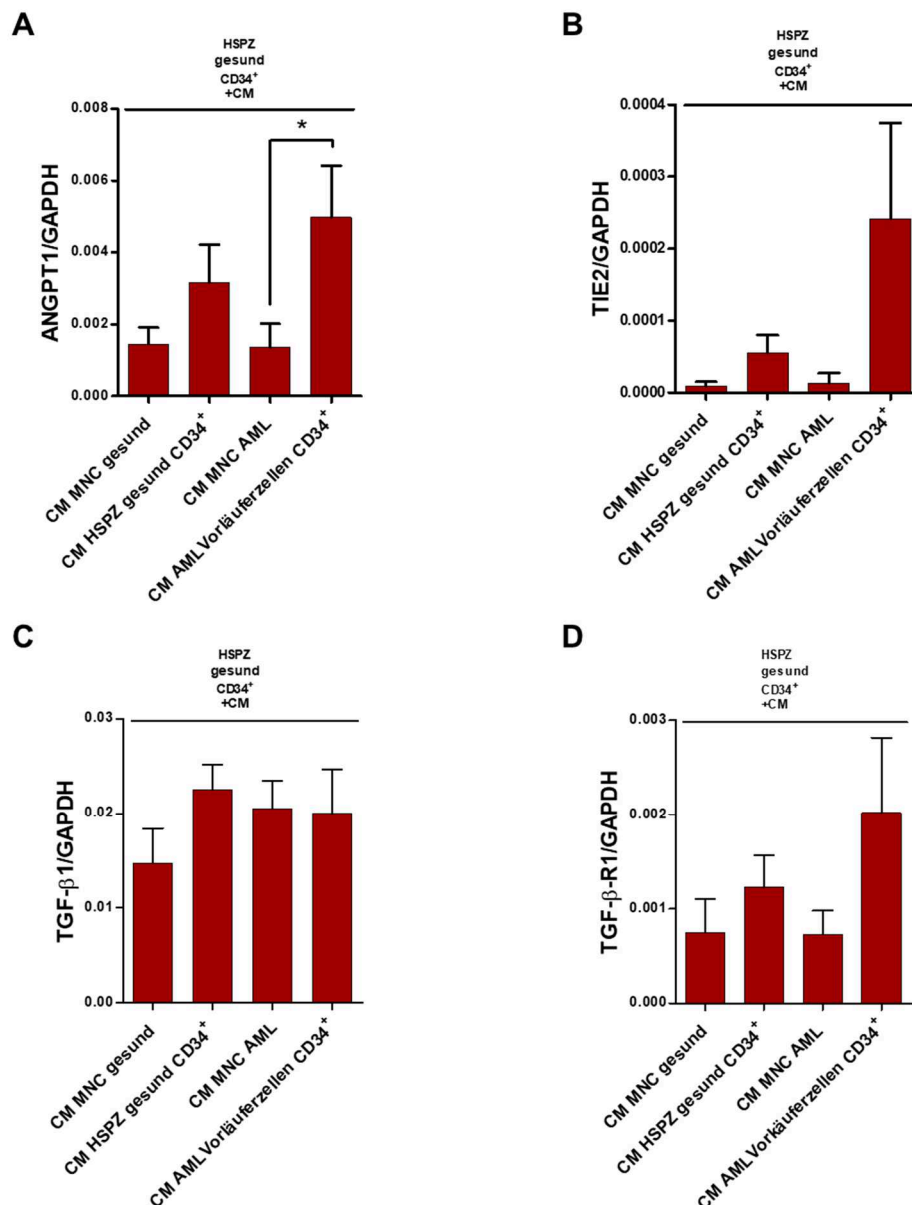


Abb 31: Genexpressionsanalysen von ANGPT1, TIE2, TGF- β 1 und TGF- β -R1 in gesunden CD34⁺ HSPZ nach 3 Tagen Zellkultur mit CM von gepaarten AML-Patientenproben und mit CM von gepaarten Kontrollen: Graphische Auftragung des Expressionslevels von ANGPT1 **A**, TIE2 **B**, TGF- β 1 **C** und TGF- β -R1 **D** auf mRNA- Ebene durch qRT-PCR quantifiziert bezogen auf das Haushaltsgen GAPDH.

In den gesunden CD34⁺ HSPZ, die mit CM von CD34⁺ leukämischen Vorläuferzellen von AML-Patienten kultiviert wurden, zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression von ANGPT1 ($p=0,0421$) im Vergleich zu den gesunden CD34⁺ HSPZ, die mit CM von gesunden CD34⁺ HSPZ kultiviert wurden (Abb. 31 **A**).

Kultivierte man die gesunden CD34⁺ HSPZ mit CM von CD34⁺ leukämischen Vorläuferzellen von AML-Patienten, zeigten diese eine deutlich höhere Expression von TIE2 als bei Kultivierung mit CM von gesunden CD34⁺ HSPZ. Bei Kultivierung mit CM von MNC sowohl von gesunden Probanden, als auch von AML-Patienten war TIE2 geringer exprimiert (Abb. 31 **B**). Diese veränderten Expressionen waren statistisch nicht signifikant.

Das Expressionslevel von TGF- β 1 zeigte keine relevant veränderte Expression nach Zellkultur mit CM (Abb. 31 **C**).

Die Expression von TGF- β -Rezeptor 1 war in den gesunden CD34⁺ HSPZ nicht signifikant höher im Vergleich zu den mit Kontrollmedium kultivierten gesunden CD34⁺ HSPZ, wenn sie mit CM von CD34⁺ leukämischen Vorläuferzellen von AML-Patienten kultiviert wurden. Bei Kultivierung mit CM von MNC von AML-Patienten zeigte sich in den gesunden CD34⁺ HSPZ keine relevante Veränderung der Genexpression im Vergleich zur Kultivierung mit CM von MNC von gesunden Probanden (Abb. 31 **D**).

4. Diskussion

4.1 Leukämische Zellen induzieren eine funktionelle Hemmung bei gesunden CD34⁺ HSPZ

Die hämatopoietische Insuffizienz bei der akuten myeloischen Leukämie führt durch die resultierenden Zytopenien zu Komplikationen wie Blutungen und Infektionen, die auch gleichzeitig die Haupttodesursachen darstellen (Löwenberg et al., 1999; Nachtkamp et al., 2016; Rubnitz et al., 2010). Diese hämatopoietische Insuffizienz erfordert eine umfangreiche Supportivtherapie mit Transfusionen und Antiinfektiva, um ein rasches Versterben der Patienten zu verhindern (Freifeld et al., 2006; Mousset et al., 2014; Wandt et al., 2012; Zimmermann et al., 2004).

Die Hypothese, dass die hämatopoietische Insuffizienz, wie früher vermutet wurde, nur durch eine räumliche Verdrängung der gesunden Stammzellen durch die expandierenden Blasten verursacht wird, konnte durch Ergebnisse der letzten Jahre widerlegt werden (Geyh et al., 2016; Schepers et al., 2015; Schroeder et al., 2016). Neben einer insuffizienten Stromaunterstützung suggerieren einige Arbeiten der letzten Jahre auch einen direkten supprimierenden Einfluss der myeloischen Blasten auf die gesunden CD34⁺ hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen (HSPZ) (Cheng und Cheng, 2016; Cheng et al., 2015; Colmone et al., 2008). Dennoch sind die zugrunde liegenden Mechanismen noch unzureichend verstanden.

Mit den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass leukämische Zellen bei den gesunden CD34⁺ HSPZ eine funktionelle Hemmung induzieren. Sowohl die konditionierten Medien (CM) von AML-Zelllinien als auch von primären Patientenzellen (MNC und CD34⁺ leukämische Vorläuferzellen) führten zu einer Suppression des Zellwachstums der gesunden CD34⁺ HSPZ. Die gesunden CD34⁺ HSPZ befanden sich anschließend vermehrt in einem Zellzyklusarrest (G₀-Phase) und wiesen eine verminderte Kapazität auf Kolonien zu bilden und auszudifferenzieren – vor allem in die Kolonien der „roten Reihe“.

Diese funktionelle Hemmung der gesunden CD34⁺ HSPZ wurde stärker durch das CM der immunomagnetisch angereicherten CD34⁺ leukämischen Vorläuferzellen induziert, wie durch die Experimente mit gepaarten AML-Patientenproben gezeigt werden konnte. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die direkten inhibitorischen Effekte auf die gesunde Hämatopoiese durch die CD34⁺ leukämische Blastenpopulation (CD34⁺ AML Vorläuferzellen: immunomagnetisch angereichert auf 100%) verursacht wird und nicht durch *Bystander*-Zellen (AML MNC-Proben: MW 63% Blasten). Darüber hinaus lassen die Resultate der

Arbeit die Schlussfolgerung zu, dass es sich um einen oder mehrere lösliche Faktoren handeln könnte (Binder et al., 2018).

Um sich den Ursachen für die beobachteten Effekte mechanistisch zu nähern, wurden daher PCR-Analysen von löslichen Faktoren durchgeführt. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf Gene für bekannte negative Regulatoren der Hämatopoiese gelegt.

Angiopoietin 1 (ANGPT1) ist ein negativer Regulator der Hämatopoiese (Arai et al., 2004; Moore et al., 2004; Takakura et al., 1998), der bei den PCR-Analysen dieser Arbeit in den MNC und CD34⁺ leukämischen Vorläuferzellen der AML-Patienten überexprimiert war. Diese Überexpression war in der immunomagnetisch angereicherten CD34⁺ Blastenpopulation der gepaarten AML-Patientenproben signifikant höher als in der MNC-Fraktion derselben Patienten. ANGPT1, welches sonst von Osteoblasten und MSPZ exprimiert wird, stellt den Liganden für die hauptsächlich auf HSPZ exprimierte Tyrosinkinase TIE2 dar (Arai et al., 2004; Wu et al., 2007). Eine Aktivierung von TIE2 durch ANGPT1 ist essentiell für die Angiogenese, Hämatopoiese sowie Adhäsion und Selbsterneuerung der HSPZ. ANGPT1 hält die HSPZ in einem physiologischen Ruhezustand und führt zu einer Verankerung in der Knochenmarknische (Arai et al., 2004; Takakura et al., 1998).

Die Arbeitsgruppe um Ichihara et al. konnte 2011 eine hohe Expression von ANGPT1 bei einer Überexpression des EVI1-Gens (*ecotropic virus integration site 1*, EVI1^{high}) in myeloischen Neoplasien nachweisen. In den EVI1^{high} Zellen führte ANGPT1 in HSPZ zu einer Verhinderung der Zellzyklusprogression durch Verbleiben der HSPZ in der G₀/G₁-Phase mit einhergehender Hochregulation von p18 (CDKN2C, Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor C) (Ichihara et al., 2011).

Cheng et al. konnten 2011 zeigen, dass eine hohe Expression von ANGPT1 bei MDS-Patienten einen unabhängigen Risikofaktor für die Transformation in eine AML darstellt (Cheng et al., 2011). Hatfield et al. konnte bei einer Ko-Kultivierung von AML-Zellen und mesenchymalen Stromazellen einen erhöhten ANGPT1 Spiegel in den Überständen nachweisen (Hatfield et al., 2008). Über ANGPT1 wurde im Stroma die Angiogenese durch Proliferation von mikrovaskulären Zellen stimuliert. Über diese ANGPT1 abhängigen Modifikationen des Knochenmarkmikromilieus kam es zu einer erhöhten AML-Zellproliferation (Hatfield et al., 2009). Die Arbeitsgruppe um Sato et al. konnte 1998 zeigen, dass CD34⁺ Zellen, die TEK exprimierten, eine Tyrosinkinase, die mit TIE2 verwandt ist und ebenfalls Ligand für ANGPT1 ist, in *Colony-Forming-Assays* eine signifikant geringere Anzahl an BFU-E und CFU-Mix bildeten, während die Anzahl von CFU-GM unverändert war (Sato et al., 1998). Diese Erkenntnisse in Zusammenschau mit den Ergebnissen dieser Arbeit, lassen ANGPT1 als einen löslichen Faktor erscheinen, der bei der AML

möglicherweise im Sinne einer Überexpression dysreguliert ist und in den gesunden CD34⁺ HSPZ eine funktionelle Hemmung induziert.

Der *Transforming growth factor beta 1* (TGF- β 1) und andere Faktoren der Superfamilie der *Transforming growth factors beta* - wie zum Beispiel der *growth differentiation factor 11* (GDF-11) - gehören zu den bekanntesten negativen Regulatoren der Hämatopoiese (Batard et al., 2000; Blank et al., 2008; Blank et al., 2015; Dao et al., 2002; Heldin et al., 2016). TGF- β 1 bindet an Rezeptoren der Typ I- (z.B. TGF- β -R1 auf HSPZ exprimiert) und Typ II-Serin/Threonin-Kinasen und löst über Proteine der SMAD-Familie eine Signalkaskade aus. Dadurch wird die Transkription von an der Zellteilung beteiligten Genen inhibiert (Dao et al., 2002; Massague et al., 1998; Yamazaki et al., 2009; Yamazaki et al., 2011) oder durch Hochregulation von CDK-Inhibitoren ein Zellzyklusarrest in hämatopoietischen Stammzellen ausgelöst (Polyak et al., 1993; Scandura et al., 2004). In dieser Arbeit konnte eine Überexpression von TGF- β 1 in den CD34⁺ leukämischen Vorläuferzellen der AML-Patienten gezeigt werden.

Zhou et al. konnten 2008 in CD34⁺ leukämischen Vorläuferzellen von MDS-Patienten eine Überexpression von SMAD2 mit einer Überaktivierung des TGF- β -Signalweges nachweisen. In einem MDS-Mausmodell konnte durch eine Blockade des TGF- β -Signalweges eine bestehende Anämie gemildert und die Hämatopoiese stimuliert werden (Zhou et al., 2008). Bruns et al. konnten 2012 zeigen, dass HSPZ von Patienten mit Multiplem Myelom nach einer Blockade von TGF- β 1 wieder von einem Zellzyklusarrest in einen proliferierenden Phänotyp übergingen und die Hämatopoiese mit besonderem Effekt auf die Restaurierung der „roten Reihe“ wieder in Gang gesetzt wurde (Bruns et al., 2012). Geyh et al. konnten 2018 zeigen, dass mesenchymale Stromazellen, die TGF- β 1 gegenüber exponiert waren funktionell gestört waren und einen Phänotyp ähnlich dem von Leukämie- und MDS-Patienten annahmen. Durch Blockade von TGF- β 1 konnten diese Effekte aufgehoben werden (Geyh et al., 2018).

Das aus der gleichen Superfamilie stammende GDF-11 ist ein negativer Regulator der Erythropoiese (Rochette et al., 2015) und wurde ebenfalls bezüglich der Genexpression in den AML-Zellen untersucht. Dabei konnte in den MNC der AML-Patienten eine signifikant erhöhte Expression von GDF-11 im Vergleich zu den MNC der gesunden Probanden festgestellt werden. Han et al. konnten 2016 in einer Studie bei MDS-Patienten ein erhöhtes GDF-11-Level nachweisen. Dabei korrelierte die Höhe des GDF-11-Levels mit der Schwere der Anämieausprägung (Han et al., 2016). In einem Anämie-/MDS-Mausmodell konnte gezeigt werden, dass bei Blockade von GDF-11 die Ausprägung der Anämie, durch

Unterstützung der späten Vorstufen der Erythropoese, deutlich gemildert wurde (Paulson et al., 2014; Suragani et al., 2014).

Die Ergebnisse der verschiedenen Arbeitsgruppen machen TGF- β 1 und weitere Faktoren aus der TGF- β 1 Superfamilie wie GDF-11 in Zusammenschau mit den Ergebnissen dieser Arbeit ebenfalls zu vielversprechenden Kandidaten, die bei der AML dysreguliert sind und in den gesunden CD34⁺ HSPZ eine funktionelle Hemmung, insbesondere der Erythropoese induzieren. Die Inhibition von Faktoren aus der TGF- β -Superfamilie durch Sotatercept und Luspatercept stellen daher einen vielversprechenden Ansatz zur Linderung einer Anämie bei MDS dar, indem die erythroide Differenzierung stimuliert wird (Mies und Platzbecker, 2017; Platzbecker et al., 2017). Sie befinden sich aktuell bereits in fortgeschrittener klinischer Prüfung und stehen für Patienten mit MDS bereits vor der Zulassung. Basierend unseren Resultaten ist jedoch denkbar, dass dieser Therapieansatz auch eine Option für Patienten mit AML zur Behandlung der hämatopoietischen Insuffizienz darstellen könnte. Darüber hinaus suggerieren sowohl unsere Daten als auch unter anderem die Arbeiten von Bruns et al. und Zhou et al., dass die Inhibition der Hämatopoese durch TGF- β 1 möglicherweise einen übergeordneten Mechanismus der Myelosuppression durch hämatologische Malignome darstellen könnte.

Der *Leukemia inhibitory factor 1* (LIF1) ist ein Zytokin der Interleukin-6-Klasse, welcher seinen Namen durch die Fähigkeit besitzt, das klonogene Wachstum der murinen myeloischen Leukämiezelllinie M1 zu hemmen und die Differenzierung in reife Leukozyten durch Initiierung des JAK-STAT-Signalweges einzuleiten (Fujio et al., 2011; Hilton et al., 1988; Tomida et al., 1984). Die Genexpression von LIF1 war besonders in den immunomagnetisch angereicherten CD34⁺ leukämischen Vorläuferzellen der AML-Patienten stark verringert. Zu einer verminderten LIF1-Expression in AML-Patientenzellen sind in der Literatur noch keine Daten bekannt. Denkbar wäre anhand der vorliegenden Daten, dass LIF1 im Sinne eines pathologischen Feedback Mechanismus in den leukämischen Zellen herunterreguliert wird.

Interleukin 1- β (IL-1- β) ist ein multifunktionelles Zytokin, das vor allem von Monozyten und Makrophagen produziert wird (Roux-Lombard et al., 1998). Es hat verschiedene Effekte bei der Immunabwehr, als Endzündungsmediator und bei der Hämatopoese. Außerdem reguliert es sowohl als positiver als auch als negativer Regulator eine Reihe von Zellfunktionen (Dinarello et al., 1996). Carey et al. konnten 2017 zeigen, dass ein IL-1- β reiches Milieu zu einer Expansion von AML-Progenitoren führte, während die gesunden HSPZ bezüglich Proliferation und Differenzierung supprimiert wurden. Durch Blockierung des IL-1- β -Signalwegs konnten diese Effekte aufgehoben werden (Carey et al., 2017). Patienten

mit abberanter IL-1- β Expression könnten daher von einer therapeutischen Blockierung dieses Signalwegs profitieren. Bei den Genexpressionsanalysen dieser Arbeit gab es keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Genexpressionslevels von IL-1- β , was sowohl methodisch als auch durch die geringe Anzahl der untersuchten Proben bedingt sein kann.

Ein weiterer bekannter negativer Regulator der Hämatopoiese ist das Chemokin CCL3 (*Chemokine macrophage inflammatory protein 3*, *Macrophage inflammatory protein 1 α* , MIP-1 α) (Graham et al., 1990). 2016 konnten Wang et al. zeigen, dass ein hohes CCL3-Level im Knochenmarkplasma eines Leukämiemausmodells und von AML-Patienten speziell zu einer ineffektiven Erythropoiese mit reduzierter Bildung von CFU-E und BFU-E Kolonien führte (Wang et al., 2016). Im Gegensatz zu den bisher publizierten Arbeiten konnten wir keine Überexpression von CCL3 zeigen. Auch dies mag wie beim IL-1- β methodisch oder durch die Anzahl der hier untersuchten Proben bedingt sein.

Andersherum konnten Frisch et al. zeigen, dass die leukämischen Zellen selbst das Knochenmarkmikromilieu verändern. In einem Mausmodell mit Blastenkrise bei chronischer myeloischer Leukämie (CML) waren die Osteoblasten signifikant reduziert und funktionell durch die leukämischen Zellen gehemmt. Diese funktionelle Hemmung wurde hauptsächlich durch das Chemokin CCL3 vermittelt (Frisch et al., 2012).

In weiteren Mausmodellen mit CML in der chronischen Phase konnte gezeigt werden, wie leukämische Zellen direkt umgebene Nischenzellen verändern. Im ersten Mausmodell konnten Zhang et al. 2012 zeigen, dass die Sekretion von G-CSF durch Leukämiezellen zu einer verminderten Expression von CXCL12 durch Stromazellen führte und damit verbunden die HSPZ-Unterstützung vermindert war (Zhang et al., 2012). Im zweiten Mausmodell wurde durch die Sekretion von Thrombopoietin (TPO) und CCL3 durch leukämische Zellen die Expansion von Osteoblasten stimuliert und der Zell-Zell-Kontakt zwischen leukämischen Zellen und mesenchymalen Stromazellen vermittelt. Diese Osteoblasten zeigten eine verminderte Expression von HSPZ-Homing- und Retentions-Faktoren und wiesen dadurch eine verminderte Fähigkeit auf, die gesunde Hämatopoiese zu unterstützen (Schepers et al., 2013).

Neben diesen direkt induzierten Veränderungen in den mesenchymalen Stromazellen, weisen einige Studien auf Nervenzellen als Ziel der leukämischen Zellen hin, über die das Knochenmarkmikromilieu verändert wird. In einem JAK2 V617F Mausmodell und in einem MLL-AF9 AML Transplantationsmodell führte die Invasion von leukämischen Zellen zu einer direkten Schädigung von Nervenzellen, was zu einer funktionellen Hemmung der mesenchymalen Stromazellen führte (Arranz et al., 2014; Hanoun et al., 2014). Dieser Effekt auf sympathische Nervenfasern wurde durch IL-1- β verursacht, welches von malignen Zellen

sekretiert wurde (Arranz et al., 2014). Diese Daten deuten darauf hin, dass die Leukämie induzierte Manipulation von Komponenten des Knochenmarkmikromilieus zu einer Expansion der Leukämiezellen führte und damit verbunden zu einer insuffizienten normalen Hämatopoiese.

Ein ebenfalls diskutierter Mechanismus zur Pathogenese der Myelosuppression ist die Exkretion von suppressiv wirkenden Exosomen. Exosomen sind von Zellen sekretierte Vesikel mit einer Größe von 30-110 nm, die Proteine und RNA zwischen Zellen transferieren (Ratajczak et al., 2006). Diese Exosomen tragen ebenfalls zum komplexen Mechanismus der Zell-Zell-Kommunikation in der Knochenmarknische bei und können regulatorische RNA (miRNA) enthalten (Huan et al., 2013).

Die Arbeitsgruppe um Huan et al. konnte 2015 zeigen, dass Exosomen von AML-Zellen *in vitro* einen direkten suppressierenden Einfluss auf murine c-KIT⁺ Progenitorzellen bezüglich der Fähigkeit haben, Kolonien zu bilden. Analog zu den Ergebnissen der Zellkulturexperimente in dieser Arbeit war der suppressierende Effekt der Exosomen der AML-Zelllinie HL-60 stärker, als der Effekt der primären Patientenzellen. Ebenfalls konnten durch Huan et al. ein direkter suppressierender Effekt der Exosomen der AML-Zelllinie Molm-14, bezüglich der Fähigkeit Kolonien zu bilden, auf die gesunden CD34⁺ HSPZ von Probanden festgestellt werden (Huan et al., 2015).

Zusammenfassend konnten wir mittels der Zellkulturexperimente mit konditionierten Medien zeigen, dass leukämische Zellen in den gesunden CD34⁺ HSPZ eine funktionelle Hemmung bezüglich Proliferation, Zellzyklusstatus und Differenzierungskapazität induzieren.

Wir haben zahlreiche aus der Literatur bekannte Faktoren hinsichtlich ihrer möglichen Beteiligung an den beobachteten Effekten untersucht. Mit den für diese Arbeit zur Verfügung stehenden Methoden konnten TGF- β 1 und ANGPT1, welche in den CD34⁺ leukämischen Vorläuferzellen überexprimiert waren, als mögliche Faktoren für die beobachteten Effekte identifiziert werden. Somit legen die Resultate dieser Arbeit nahe, dass neben inhibitorischen Effekten auf zelluläre Komponenten des Knochenmarkmikromilieus die leukämischen Zellen von Patienten mit AML auch direkt die gesunden CD34⁺ HSPZ funktionell hemmen können.

4.2 Schlussfolgerung/Ausblick

Die akute myeloische Leukämie ist häufig eine Erkrankung des älteren Menschen. Aufgrund von Komorbiditäten ist die AML in vielen Fällen nicht mehr mit einer intensiven Therapie behandelbar. Zudem bleiben die Patienten auch bei einer „milderen“ palliativen Behandlung oft transfusionsbedürftig und immunsupprimiert, was zu einer stark eingeschränkten Lebensqualität führt. Auch bei den intensiv behandelten Patienten stellen Zytopenien ein wesentliches Problem dar, welches eine umfangreiche Supportivtherapie erforderlich macht.

Die Mechanismen, die bei der AML zu einer insuffizienten Hämatopoiese führen sind nicht eindeutig geklärt. Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten einen weiteren Teil zum Verständnis der Pathogenese der Myelosuppression beitragen. Neben den bei der AML alterierten genetischen, epigenetischen und funktionell veränderten MSPZ, die durch einen verminderten Stroma-Support zur Pathogenese der Myelosuppression beitragen (Geyh et al., 2016; Schroeder et al., 2016), induzieren die leukämischen Blasten auch selbst eine funktionelle Hemmung bei den gesunden CD34⁺ HSPZ (Abb. 32). Diese direkte funktionelle Hemmung könnte über die oben diskutierten Mechanismen stattfinden (Punkt 4.1). Dabei konnten durch Genexpressionsanalysen einige mögliche Kandidatengene für potenziell myelosuppressive Faktoren (negative Regulatoren der Hämatopoiese) - speziell in den malignen AML-Zellen ausfindig gemacht werden.

Die Frage ob der indirekte Weg über eine verminderte Stromaaunterstützung oder der direkte Weg - durch Suppression der gesunden HSPZ durch leukämische Zellen - einen stärkeren Einfluss auf die Entstehung einer insuffizienten Hämatopoiese haben, kann nicht abschließend geklärt werden. Eine Theorie wäre, dass primäre Stromaveränderungen vorzugsweise in der Initiations-Phase myeloischer Neoplasien auftreten und diese über inflammatorische Signale bei den HSPZ maligne Veränderungen induzieren. In späteren Phasen der Erkrankung, wenn das Knochenmark von einer malignen Zellpopulation dominiert wird können die malignen Zellen das Knochenmarkmikromilieu verändern, was zu einer Krankheitsprogression führt. Neben den Veränderungen der Knochenmarknische könnten in diesem Stadium der Erkrankung auch die direkten supprimierenden Einflüsse des malignen Zellklons auf die gesunden HSPZ eine Rolle spielen (Schroeder et al., 2016).

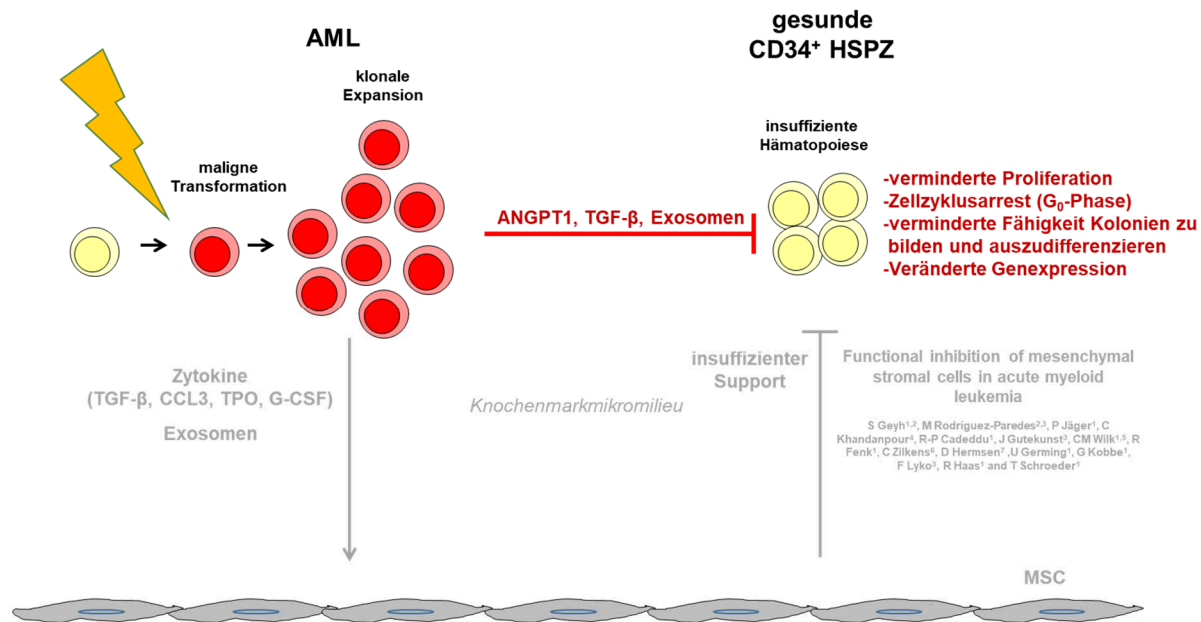


Abb. 32: **Schematische Darstellung der funktionellen Hemmung der gesunden CD34⁺ HSPZ durch leukämische Zellen als Beitrag zur Pathogenese der Myelosuppression im Knochenmarkmikromilieu:** Der direkte Einfluss der leukämischen Blasten auf die gesunden CD34⁺ HSPZ führt bei den gesunden CD34⁺ HSPZ zu einer verminderten Proliferation, einer Verschiebung in die G₀-Phase (Zellzyklusarrest), einer verminderten Fähigkeit Kolonien zu bilden und auszudifferenzieren und einer veränderten Genexpression. Kandidatengene für potenziell myelosuppressive Faktoren (negative Regulatoren der Hämatopoiese) konnten dabei in den AML-Klonen nachgewiesen werden. Weitere Analysen müssen folgen (modifiziert nach Geyh 2013, Schroeder).

Um die für die AML-vermittelte Myelosuppression vollständig zu durchdringen, beabsichtigen wir als Anschlussprojekt dieser Arbeit weiterführende Experimente: So ist ein nächster Schritt die *in vitro* Antagonisierung dieser suppressiven Faktoren (z. B. durch den TGF-β1-Inhibitor SD-208) in weiteren Zellkulturexperimenten, um zu untersuchen, ob sich die beobachteten Effekte aufheben lassen. Als weitere Methoden sind ELISA, Proteomanalysen und Sekretomanalysen der konditionierten Medien geplant, um die der hämatopoietischen Insuffizienz zugrunde liegende Mechanismen zu identifizieren und näher zu charakterisieren.

Ein weiter Ansatz, die Ursache für die beobachteten Effekte aufzuschlüsseln, wäre den Mechanismus retrograd aufzudecken, indem eine RNA-Sequenzierung der mit konditioniertem Medium kultivierten CD34⁺ HSPZ durchgeführt wird. Mit dieser Methode konnte bereits eine molekulare Signatur von Genen in MSPZ entdeckt werden, die bei der AML dysreguliert sind. Dabei wurde durch weiterführende Analysen TGF-β1 als der wahrscheinlichste extrinsische Faktor für diese veränderte Genexpression identifiziert (Geyh et al., 2018).

Zusammenfassend möchten wir mit Hilfe dieser Methoden diesen Fragestellungen nun weiter nachgehen, um Signalwege, die bei der AML dysreguliert sind und über verschiedene Mechanismen zu einer insuffizienten Hämatopoiese führen, durch eine zielgerichtete Therapie zu blockieren.

5. Literatur und Quellenverzeichnis

Akashi K., et al., A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*. **2000** Mar 9;404(6774):193-7.

Akinduro O., et al., Proliferation dynamics of acute myeloid leukaemia and haematopoietic progenitors competing for bone marrow space. *Nat Commun*. **2018** Feb 6;9(1):519.

Alter B. P., et al., Fanconi anemia and the development of leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. **2014** Sep-Dec;27(3-4):214-21.

Angelillo-Scherrer A., et al., Role of Gas6 in erythropoiesis and anemia in mice. *J Clin Invest*. **2008** Feb;118(2):583-96.

Aoki K., et al., Death rates for malignant neoplasm for selected sites by sex and five-year age group in 33 countries. University of Nagoya Press **1992**, 1953-57 to 1983-87.

Arai F., et al., Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell*. **2004** Jul 23;118(2):149-61.

Arber D. A., et al., The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. **2016** May 19;127(20):2391-405.

Arranz L. et al., Neuropathy of haematopoietic stem cell niche is essential for myeloproliferative neoplasms. *Nature*. **2014** Aug 7;512(7512):78-81.

Batard P., et al., TGF-(beta)1 maintains hematopoietic immaturity by a reversible negative control of cell cycle and induces CD34 antigen up-modulation. *J Cell Sci*. **2000** Feb;113 (Pt 3):383-90.

Becker M. W., et al., Leukemia stem cells in 2010: current understanding and future directions. *Blood Rev*. **2011** Mar;25(2):75-81.

Bennett J. M., et al., Criteria for the diagnosis of acute leukemia of megakaryocyte lineage (M7). A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med*. **1985** Sep;103(3):460-2.

Bennett J. M., et al., Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-MO). *Br J Haematol*. **1991** Jul;78(3):325-9.

Bennett J. M., et al., Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol*. **1976** Aug;33(4):451-8.

Bigas A., et al., Hematopoietic stem cells: to be or Notch to be. *Blood*. **2012** Apr 5;119(14):3226-35.

Binder S., et al., The cytokine network in acute myeloid leukemia (AML): A focus on pro- and anti-inflammatory mediators. *Cytokine Growth Factor Rev*. **2018** Oct;43:8-15.

Blank U., et al., Signaling pathways governing stem-cell fate. *Blood*. **2008** Jan 15;111(2):492-503.

Blank U., et al., TGF- β signaling in the control of hematopoietic stem cells. *Blood*. **2015** Jun 4;125(23):3542-50.

Broudy V.C., et al., Stem cell factor and hematopoiesis. *Blood*. **1997** Aug 15;90(4):1345-64.

Bruns I., et al., Multiple myeloma-related deregulation of bone marrow-derived CD34(+) hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. **2012** Sep 27;120(13):2620-30.

Bryder D., et al., Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell. *Am J Pathol*. **2006** Aug;169(2):338-46.

Bullinger L., et al., Genomics of Acute Myeloid Leukemia Diagnosis and Pathways. *J Clin Oncol*. **2017** Mar 20;35(9):934-946.

- Burnett A. K.**, et al., A comparison of low-dose cytarabine and hydroxyurea with or without all-trans retinoic acid for acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome in patients not considered fit for intensive treatment. *Cancer*. **2007** Mar 15;109(6):1114-24.
- Byrd J. C.**, et al., Extramedullary myeloid cell tumors in acute nonlymphocytic leukemia: a clinical review. *J Clin Oncol*. **1995** Jul;13(7):1800-16.
- Calvi L. M.**, et al., Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*. **2003** Oct 23;425(6960):841-6.
- Carey A.**, et al., Identification of Interleukin-1 by Functional Screening as a Key Mediator of Cellular Expansion and Disease Progression in Acute Myeloid Leukemia. *Cell Rep*. **2017** Mar 28;18(13):3204-3218.
- Cheng C.L.**, et al., High bone marrow angiopoietin-1 expression is an independent poor prognostic factor for survival in patients with myelodysplastic syndromes. *Br J Cancer*. **2011** Sep 27;105(7):975-82.
- Cheng H.**, et al., Leukemic marrow infiltration reveals a novel role for Egr3 as a potent inhibitor of normal hematopoietic stem cell proliferation. *Blood*. **2015** Sep 10;126(11):1302-13.
- Cheng H and Cheng T.** 'Waterloo': when normal blood cells meet leukemia. *Curr Opin Hematol*. **2016** Jul;23(4):304-10.
- Civin C. I.**, et al., Antigenic analysis of hematopoiesis: a review. *J Hematother*. **1993** Summer;2(2):137-44.
- Colmone A.**, et al. Leukemic cells create bone marrow niches that disrupt the behavior of normal hematopoietic progenitor cells. *Science*. **2008** Dec 19;322(5909):1861-5.
- Conway O'Brien E.**, et al., The epigenetic landscape of acute myeloid leukemia. *Adv Hematol*. **2014**; 2014: 103175.
- Dao M. A.**, et al., Molecular mechanism of transforming growth factor beta-mediated cell-cycle modulation in primary human CD34(+) progenitors. *mBlood*. **2002** Jan 15;99(2):499-506.
- Dinarello C. A.**, et al., Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*. **1996** Mar 15;87(6):2095-147.
- Döhner H.**, et al., Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. **2015** Sep 17;373(12):1136-52.
- Dombret H.**, et al., International phase 3 study of azacitidine vs conventional care regimens in older patients with newly diagnosed AML with >30% blasts. *Blood*. **2015** Jul 16;126(3):291-9.
- Dormady S. P.**, et al., Hematopoietic progenitor cells grow on 3T3 fibroblast monolayers that overexpress growth arrest-specific gene-6 (GAS6). *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2000** Oct 24;97(22):12260-5.
- Dutcher J. P.**, et al., Hyperleukocytosis in adult acute nonlymphocytic leukemia: impact on remission rate and duration, and survival. *J Clin Oncol*. **1987** Sep;5(9):1364-72.
- Ehninger G.**, et al., Akute myeloische Leukämie: Pathophysiologie, Diagnostik, Therapie, Prognose Deutscher Ärzte Verlag **2008**
- Freeman S. D.**, et al., Characterization of CD33 as a new member of the sialoadhesin family of cellular interaction molecules. *Blood*. **1995** Apr 15;85(8):2005-12.
- Freifeld A. G.**, et al., Antibacterial prophylaxis in patients with cancer and neutropenia. *N Engl J Med*. **2006** Jan 5;354(1):90-4; author reply 90-4.
- Frenette P. S.**, et al., Mesenchymal stem cell: keystone of the hematopoietic stem cell niche and a stepping-stone for regenerative medicine. *Annu Rev Immunol*. **2013**;31:285-316.

- Frisch B. J.**, et al., Functional inhibition of osteoblastic cells in an in vivo mouse model of myeloid leukemia. *Blood*. **2012** Jan 12;119(2):540-50.
- Fujio Y.**, et al., Glycoprotein 130 cytokine signal as a therapeutic target against cardiovascular diseases. *J Pharmacol Sci*. **2011**;117(4):213-22. Epub 2011 Nov 5.
- Geiger T. L.**, et al., Development and maturation of natural killer cells. *Curr Opin Immunol*. **2016** Apr;39:82-9.
- Geyh S.**, et al., Transforming growth factor β 1-mediated functional inhibition of mesenchymal stromal cells in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Haematologica*. **2018** Sep;103(9):1462-1471.
- Geyh S.**, et al., Functional inhibition of mesenchymal stromal cells in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. **2016** Mar;30(3):683-9.
- Geyh S.**, et al., Insufficient stromal support in MDS results from molecular and functional deficits of mesenchymal stromal cells. *Leukemia*. **2013** Sep;27(9):1841-51.
- Geyh S.**, Funktionale und molekulare Analysen von Mesenchymalen Stromazellen und deren Interaktionen mit CD34⁺ Stamm- und Progenitorzellen bei Patienten mit Myelodysplastischen Syndromen. Dissertation HHU **2013**
- Gilliland D. G.**, et al., Hematologic malignancies. *Curr Opin Hematol*. **2001** Jul;8(4):189-91.
- Graham G. J.**, et al., Identification and characterization of an inhibitor of haemopoietic stem cell proliferation. *Nature*. **1990** Mar 29;344(6265):442-4.
- Guidos C.**, et al., Thymus and T-lymphocyte development: what is new in the 21st century? *Immunol Rev*. **2006** Feb;209:5-9.
- Han Y.**, et al., GDF11 level in patients with myelodysplastic syndrome and its clinical significance. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. **2016** Mar 1;96(8):620-4.
- Hanoun M.**, et al., Acute myelogenous leukemia-induced sympathetic neuropathy promotes malignancy in an altered hematopoietic stem cell niche. *Cell Stem Cell*. **2014** Sep 4;15(3):365-375.
- Hatfield K.J.**, et al., Release of angiopoietin-1 by primary human acute myelogenous leukemia cells is associated with mutations of nucleophosmin, increased by bone marrow stromal cells and possibly antagonized by high systemic angiopoietin-2 levels. *Leukemia*. **2008** Feb;22(2):287-93.
- Hatfield K.**, et al., Primary human acute myeloid leukaemia cells increase the proliferation of microvascular endothelial cells through the release of soluble mediators. *Br J Haematol*. **2009** Jan;144(1):53-68.
- Hayes R. B.**, et al., Benzene and the dose-related incidence of hematologic neoplasms in China. Chinese Academy of Preventive Medicine--National Cancer Institute Benzene Study Group. *J Natl Cancer Inst*. **1997** Jul 16;89(14):1065-71.
- Heldin C. H.**, et al., Signaling Receptors for TGF- β Family Members. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. **2016** Aug 1;8(8).
- Hilton D.J.**, et al., Specific binding of murine leukemia inhibitory factor to normal and leukemic monocytic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1988** Aug;85(16):5971-5.
- Horton S.**, et al., Recent advances in acute myeloid leukemia stem cell biology. *Haematologica*. **2012** Jul;97(7):966-74.
- Hu X.**, et al., Kinetics of normal hematopoietic stem and progenitor cells in a Notch1-induced leukemia model. *Blood*. **2009** Oct 29;114(18):3783-92.
- Huan J.**, et al., Coordinate regulation of residual bone marrow function by paracrine trafficking of AML exosomes. *Leukemia*. **2015** Dec;29(12):2285-95.

- Huan J.**, et al., RNA trafficking by acute myelogenous leukemia exosomes. *Cancer Res.* **2013** Jan 15;73(2):918-29.
- Ichihara E.**, et al., Angiopoietin1 contributes to the maintenance of cell quiescence in EVI1(high) leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **2011** Dec 16;416(3-4):239-45.
- Ikuta K.**, et al., Evidence that hematopoietic stem cells express mouse c-kit but do not depend on steel factor for their generation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1992** Feb 15;89(4):1502-6.
- Jaffe E.S.**, et al., World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC Press; **2001**
- Juliusson G.**, et al., Acute myeloid leukemia in the real world: why population-based registries are needed. *Blood.* **2012** Apr 26;119(17):3890-9.
- Juliusson G.**, et al., Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry. *Blood.* **2009** Apr 30;113(18):4179-87.
- Kantarjian H.M.**, et al., Multicenter, randomized, open-label, phase III trial of decitabine versus patient choice, with physician advice, of either supportive care or low-dose cytarabine for the treatment of older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol.* 2012 Jul 20;30(21):2670-7
- Kaushansky K.**, et al., Historical review: megakaryopoiesis and thrombopoiesis. *Blood.* **2008** Feb 1;111(3):981-6.
- Kelly L. M.**, et al., Genetics of myeloid leukemias. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* **2002**;3:179-98.
- Kent D.**, et al., Regulation of hematopoietic stem cells by the steel factor/KIT signaling pathway. *Clin Cancer Res.* **2008** Apr 1;14(7):1926-30.
- Kern W.**, et al., Akute myeloische Leukämie (AML) beim Erwachsenen. *Manual Leukämien* **2003**, Myelodysplastische und Myeloproliferative Syndrome: 17-48
- Kondo M.**, et al., Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell.* **1997** Nov 28;91(5):661-72.
- Krause D. S.**, et al., The hematopoietic stem cell niche--home for friend and foe? *Cytometry B Clin Cytom.* **2013** Jan-Feb;84(1):7-20.
- Krug U.**, et al., Complete remission and early death after intensive chemotherapy in patients aged 60 years or older with acute myeloid leukaemia: a web-based application for prediction of outcomes. *Lancet.* **2010** Dec 11;376(9757):2000-8.
- Lai E.C.**, et al., Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development.* **2004** Mar;131(5):965-73.
- Leone G.**, et al., The incidence of secondary leukemias. *Haematologica.* **1999** Oct;84(10):937-45.
- Leone G.**, et al., Therapy-related leukemia and myelodysplasia: susceptibility and incidence. *Haematologica.* **2007** Oct;92(10):1389-98.
- Löwenberg B.**, et al., Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* **1999** Sep 30;341(14):1051-62.
- Magalhães I. Q.**, et al., GATA1 mutations in acute leukemia in children with Down syndrome. *Cancer Genet Cytogenet.* **2006** Apr 15;166(2):112-6.
- Manz M. G.**, et al., Prospective isolation of human clonogenic common myeloid progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2002** Sep 3;99(18):11872-7.
- Massagué J.**, et al., TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem.* **1998**;67:753-91.

Mies A., Platzbecker U., Increasing the effectiveness of hematopoiesis in myelodysplastic syndromes: erythropoiesis-stimulating agents and transforming growth factor- β superfamily inhibitors. *Semin Hematol.* **2017** Jul;54(3):141-146.

Milner L. A., et al., A human homologue of the *Drosophila* developmental gene, Notch, is expressed in CD34+ hematopoietic precursors. *Blood.* **1994** Apr 15;83(8):2057-62.

Miraki-Moud F., et al., Acute myeloid leukemia does not deplete normal hematopoietic stem cells but induces cytopenias by impeding their differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2013** Aug 13;110(33):13576-81

Moore K.A., et al., "Tie-ing" down the hematopoietic niche. *Cell.* **2004** Jul 23;118(2):139-40.

Morrison S. J., et al., Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors. *Development.* **1997** May;124(10):1929-39.

Mousset S., et al., Treatment of invasive fungal infections in cancer patients-updated recommendations of the Infectious Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society of Hematology and Oncology (DGHO). *Ann Hematol.* **2014** Jan;93(1):13-32.

Mrózek K., et al., Prognostic significance of the European LeukemiaNet standardized system for reporting cytogenetic and molecular alterations in adults with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol.* **2012** Dec 20;30(36):4515-23.

Murati A., et al., Myeloid malignancies: mutations, models and management. *BMC Cancer.* **2012** Jul 23;12:304.

Nachtkamp K., et al., Causes of death in 2877 patients with myelodysplastic syndromes. *Ann Hematol.* **2016** May;95(6):937-44.

Nakamura-Ishizu A., et al., Hematopoietic stem cell niche: an interplay among a repertoire of multiple functional niches. *Biochim Biophys Acta.* **2013** Feb;1830(2):2404-9.

Nishida C., et al., MT1-MMP plays a critical role in hematopoiesis by regulating HIF-mediated chemokine/cytokine gene transcription within niche cells. *Blood.* **2012** Jun 7;119(23):5405-16.

O'Brien E., et al., The epigenetic landscape of acute myeloid leukemia. *Adv Hematol.* **2014**; 2014: 103175.

Oldershaw R. A., et al., Notch signaling during chondrogenesis of human bone marrow stem cells. *Bone.* **2010** Feb;46(2):286-93.

Orkin S. H., et al., Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell.* **2008** Feb 22;132(4):631-44.

Osawa M., et al. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science.* **1996** Jul 12;273(5272):242-5.

Passegué E., et al., Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2003** Sep 30;100 Suppl 1:11842-9.

Paulson R. F., et al., Targeting a new regulator of erythropoiesis to alleviate anemia. *Nat Med.* **2014** Apr;20(4):334-5.

Pietras E.M., et al., Cell cycle regulation in hematopoietic stem cells. *J Cell Biol.* **2011** Nov 28;195(5):709-20.

Platzbecker U., et al., Luspatercept for the treatment of anaemia in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes (PACE-MDS): a multicentre, open-label phase 2 dose-finding study with long-term extension study. *Lancet Oncol.* **2017** Oct;18(10):1338-1347.

Polyak K., et al., p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev.* **1994** Jan;8(1):9-22.

Qian H., et al., Critical role of thrombopoietin in maintaining adult quiescent hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell.* **2007** Dec 13;1(6):671-84.

Raaijmakers M. H., et al., Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia. *Nature.* **2010** Apr 8;464(7290):852-7.

Ratajczak J., et al., Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia.* **2006** May;20(5):847-56.

Ries L.A.G., et al., SEER Cancer Statistics Review 1975-2003. National Cancer Institute, Bethesda **2006**.

Rochette L., et al., Growth and differentiation factor 11 (GDF11): Functions in the regulation of erythropoiesis and cardiac regeneration. *Pharmacol Ther.* **2015** Dec;156:26-33.

Röllig C., et al., Long-term prognosis of acute myeloid leukemia according to the new genetic risk classification of the European LeukemiaNet recommendations: evaluation of the proposed reporting system. *J Clin Oncol.* **2011** Jul 10;29(20):2758-65.

Roux-Lombard P., et al., The interleukin-1 family. *Eur Cytokine Netw.* **1998** Dec;9(4):565-76.

Rubnitz J. E., et al., Acute myeloid leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am.* **2010** Feb;24(1):35-63.

Saller F., et al., Role of the growth arrest-specific gene 6 (gas6) product in thrombus stabilization. *Blood Cells Mol Dis.* **2006** May-Jun;36(3):373-8.

Sato A., et al., Characterization of TEK receptor tyrosine kinase and its ligands, Angiopoietins, in human hematopoietic progenitor cells. *Int Immunol.* **1998** Aug;10(8):1217-27.

Scandura J. M., et al., Transforming growth factor beta-induced cell cycle arrest of human hematopoietic cells requires p57KIP2 up-regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2004** Oct 19;101(42):15231-6.

Schepers K. et al., Myeloproliferative neoplasia remodels the endosteal bone marrow niche into a self-reinforcing leukemic niche. *Cell Stem Cell.* **2013** Sep 5;13(3):285-99.

Schepers K., et al., Normal and leukemic stem cell niches: insights and therapeutic opportunities. *Cell Stem Cell.* **2015** Mar 5;16(3):254-67.

Schofield R., et al., The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells.* **1978**;4(1-2):7-25.

Schroeder T., et al., Mesenchymal stromal cells in myeloid malignancies. *Blood Res.* **2016** Dec;51(4):225-232.

Seita J., et al., Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* **2010** Nov-Dec;2(6):640-53.

Shih A. H., et al., The role of mutations in epigenetic regulators in myeloid malignancies. *Nat Rev Cancer.* **2012** Sep;12(9):599-612.

Sidney L.E., et al., Concise review: evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem Cells.* **2014** Jun;32(6):1380-9.

Simmons D. L., et al., Molecular cloning of a cDNA encoding CD34, a sialomucin of human hematopoietic stem cells. *J Immunol.* **1992** Jan 1;148(1):267-71.

Smith M., et al., Adult acute myeloid leukaemia. *Crit Rev Oncol Hematol.* **2004** Jun;50(3):197-222.

- Stalfelt A. M.**, et al., The final phase in acute myeloid leukaemia (AML): a study of cause of death, place of death and type of care during the last week of life. *Leuk Res.* **2001** Aug;25(8):673-80.
- Stitt T. N.**, et al., The anticoagulation factor protein S and its relative, Gas6, are ligands for the Tyro 3/Axl family of receptor tyrosine kinases. *Cell.* **1995** Feb 24;80(4):661-70.
- Suragani R.N.**, et al., Transforming growth factor- β superfamily ligand trap ACE-536 corrects anemia by promoting late-stage erythropoiesis. *Nat Med.* **2014** Apr;20(4):408-14.
- Takakura N.**, et al., Critical role of the TIE2 endothelial cell receptor in the development of definitive hematopoiesis. *Immunity.* **1998** Nov;9(5):677-86.
- TCGO-Cancer Genome Atlas Research Network**, Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* **2013** May 30;368(22):2059-74.
- Thorén L. A.**, et al., Kit regulates maintenance of quiescent hematopoietic stem cells. *J Immunol.* **2008** Feb 15;180(4):2045-53.
- Tomida M.**, et al., Purification of a factor inducing differentiation of mouse myeloid leukemic M1 cells from conditioned medium of mouse fibroblast L929 cells. *J Biol Chem.* **1984** Sep 10;259(17):10978-82.
- van Bakkum D.W.**, et al., Interaction of AML cells and normal hemopoietic cells: replacement or inhibition? *Bibl Haematol.* **1975** Oct;(43):10-2.
- van Bakkum D.W.**, et al., The mechanism of inhibition of haemopoiesis in acute leukaemia. *Blood Cells.* **1981**;7(1):91-103.
- Vardiman J. W.**, et al., The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood.* **2009** Jul 30;114(5):937-51.
- Virchow R.**, Weißes Blut N. Notiz. Ge. Nat. Heilk., 780 - Weimar, Landes-Industrie-Comptoir, **1845** und **1847**, 4°, Sp.145-160
- Wandt H.**, et al., Therapeutic platelet transfusion versus routine prophylactic transfusion in patients with haematological malignancies: an open-label, multicentre, randomised study. *Lancet.* **2012** Oct 13;380(9850):1309-16.
- Wang H.**, et al., Hierarchical organization and regulation of the hematopoietic stem cell osteoblastic niche. *Crit Rev Oncol Hematol.* **2013** Jan;85(1):1-8.
- Wang Y.**, et al., Leukemia cell infiltration causes defective erythropoiesis partially through MIP-1 α /CCL3. *Leukemia.* **2016** Sep;30(9):1897-908.
- Weissman I. L.**, et al., Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell.* **2000** Jan 7;100(1):157-68.
- West A. H.**, et al., Familial myelodysplastic syndrome/acute leukemia syndromes: a review and utility for translational investigations. *Ann N Y Acad Sci.* **2014** Mar;1310:111-8.
- Wu Y.**, et al., Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells.* **2007** Oct;25(10):2648-59.
- Yamazaki S.**, et al., Nonmyelinating Schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche. *Cell.* **2011** Nov 23;147(5):1146-58.
- Yamazaki S.**, et al., TGF-beta as a candidate bone marrow niche signal to induce hematopoietic stem cell hibernation. *Blood.* **2009** Feb 5;113(6):1250-6.
- Yates J.**, et al., Cytosine arabinoside with daunorubicin or adriamycin for therapy of acute myelocytic leukemia: a CALGB study. *Blood.* **1982** Aug;60(2):454-62.

Zambetti N. A. et al., Mesenchymal Inflammation Drives Genotoxic Stress in Hematopoietic Stem Cells and Predicts Disease Evolution in Human Pre-leukemia. *Cell Stem Cell*. **2016** Nov 3;19(5):613-627.

Zhang B. et al., Altered microenvironmental regulation of leukemic and normal stem cells in chronic myelogenous leukemia. *Cancer Cell*. **2012** Apr 17;21(4):577-92.

Zhang J., et al., Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature*. **2003** Oct 23;425(6960):836-41.

Zhou L., et al., Inhibition of the TGF-beta receptor I kinase promotes hematopoiesis in MDS. *Blood*. **2008** Oct 15;112(8):3434-43.

Zimmermann R., et al., Indikation zur Erythrozytentransfusion. *Med Welt* **2004**, 55, 49-53

6. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

6.1 Abbildungen

Abb. 1:	Hierarchie der physiologischen Hämatopoiese (modifiziert nach Passegue et al., 2003)	2
Abb. 2:	Das Knochenmarkmikromilieu (nach Schepers et al., 2015)	4
Abb. 3:	Pathogenese der AML (modifiziert nach Döhner et al., 2015)	9
Abb. 4:	Schematische Darstellung der Pathogenese der Myelosuppression im Knochenmarkmikromilieu (modifiziert nach Geyh 2013, Schroeder)	15
Abb. 5:	Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation	20
Abb. 6:	Prinzip des Magnetic-Activated Cell Sorting (MACS) (Werbeabbildung Miltenyi Biotec, Biochemie online Abbildungen, 2004)	21
Abb. 7:	Graphische Darstellung des Einflusses verschiedener Zellkulturmedien auf gesunde CD34⁺ HSPZ nach 3 Tagen Zellkultur	23
Abb. 8:	Ausreifungsstadien und Differenzierung von Kolonien bei einem CFU-Assay (modifizierte Abbildung Stemcell Technologies 2014 und modifizierte Abbildungen R&D-Systems)	28
Abb. 9:	Phasen nach Trizolfällung (modifiziert Abbildung von clker free clipart)	30
Abb. 10:	Schematische Darstellung der Zellkulturexperimente mit konditionierten Medien und anschließendem <i>Readout</i> nach 3 Tagen Zellkultur	35
Abb. 11:	Exemplarische Darstellung der kumulativen Populationsverdopplungen (CPD) der AML- Zelllinien HL-60 und THP-1 (Wachstumskurve) in Abhängigkeit der Kultivierungstage	36
Abb. 12:	Einfluss von AML-Zelllinien auf gesunde CD34⁺ HSPZ	37
Abb. 13:	Graphische Darstellung der relativen Zellzahlen gesunder CD34⁺ HSPZ nach 3 Tagen Zellkultur mit CM der AML-Zelllinien HL-60, THP-1 und MV4-11 bezogen auf die Kontrollen	38
Abb. 14:	Prozentuale Verteilung des Zellzyklusstatus gesunder CD34⁺ HSPZ nach 3 Tagen Zellkultur mit CM von AML-Zelllinien	40
Abb. 15:	Koloniebildungsverhalten und Differenzierungsfähigkeit gesunder CD34⁺ HSPZ nach 3 Tagen Zellkultur mit CM von AML-Zelllinien	43
Abb. 16:	Einfluss primärer leukämischer Patientenzellen auf gesunde CD34⁺ HSPZ	44
Abb. 17:	Graphische Darstellung der relativen Zellzahl der gesunden CD34⁺ HSPZ nach 3 Tagen Zellkultur mit CM von AML-Patientenzellen	45
Abb. 18:	Prozentuale Verteilung des Zellzyklusstatus gesunder CD34⁺ HSPZ nach 3 Tagen Zellkultur mit CM leukämischer Zellen von AML-Patienten	46
Abb. 19:	Koloniebildungsverhalten und Differenzierungsfähigkeit gesunder CD34⁺ HSPZ nach 3 Tagen Zellkultur mit CM leukämischer Zellen von AML-Patienten	48

Abb. 20:	Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus: Einfluss von MNC und CD34⁺ leukämischen Vorläuferzellen von gepaarten AML-Patientenproben (n=5) auf die gesunden CD34⁺ HSPZ nach 3 Tagen Zellkultur	50
Abb. 21:	Graphische Darstellung der absoluten Zellzahlen gesunder CD34⁺ HSPZ nach 3 Tagen Zellkultur mit CM von MNC und CD34⁺ leukämischen Vorläuferzellen von 5 gepaarten AML-Patientenproben	51
Abb. 22:	Prozentuale Verteilung des Zellzyklusstatus gesunder CD34⁺ HSPZ nach 3 Tagen Zellkultur mit CM von MNC und CD34⁺ leukämischen Vorläuferzellen von 5 gepaarten AML-Patientenproben	52
Abb. 23:	Koloniebildungsverhalten und Differenzierungsfähigkeit gesunder CD34⁺ HSPZ nach 3 Tagen Zellkultur mit CM von MNC und CD34⁺ leukämischen Vorläuferzellen von 5 gepaarten AML-Patientenproben	54
Abb. 24:	Genexpression von JAGGED1, NOTCH1, HES1 und HES5 in MNC und CD34⁺ Zellen gesunder Probanden und von AML-Patienten	56
Abb. 25:	Genexpression von KIT-LG (SCF) und c-KIT in MNC und CD34⁺ Zellen gesunder Probanden und von AML-Patienten	57
Abb. 26:	Genexpression von ANGPT1 und TIE2 in MNC und CD34⁺ Zellen gesunder Probanden und AML-Patienten	58
Abb. 27:	Genexpression von TGF-β1, GDF-11, TGF-β-R1 und SMAD2 in MNC und CD34⁺ Zellen gesunder Probanden und von AML-Patienten	59
Abb. 28:	Genexpression von IL1-β und CCL3 (MIP1-α) in MNC und CD34⁺ Zellen gesunder Probanden und von AML-Patienten	60
Abb. 29:	Genexpression von GAS6 und LIF1 in MNC und CD34⁺ Zellen gesunder Probanden und von AML-Patienten	61
Abb. 30:	Genexpression von JAGGED1, NOTCH1, KIT-LG (SCF), c-KIT, ANGPT1, TIE2, GDF-11, TGF-β1, TGF-β-R1, IL1-β, CCL3 (MIP1-α), GAS6 und LIF1 in MNC und CD34⁺ leukämischen Vorläuferzellen von gepaarten AML-Patientenproben	64
Abb. 31:	Genexpressionsanalysen von ANGPT1, TIE2, TGF-β1 und TGF-β-R1 in gesunden CD34⁺ HSPZ nach 3 Tagen Zellkultur mit CM von gepaarten AML-Patientenproben und mit CM von gepaarten Kontrollen	66
Abb. 32:	Schematische Darstellung der funktionellen Hemmung der gesunden CD34⁺ HSPZ durch leukämische Zellen als Beitrag zur Pathogenese der Myelosuppression im Knochenmarkmikromilieu (modifiziert nach Geyh 2013, Schroeder)	74

6.2 Tabellen

Tabelle 1:	Interaktionsmöglichkeiten zwischen HSPZ und Bestandteilen des Knochenmarkmikromilieus in Form von Ligand-Rezeptor-Paaren (modifiziert nach Geyh, 2013)	5
Tabelle 2:	Funktionelle Kategorien von Genen, die bei AML häufig betroffen sind (gemäß TCGA-Daten, modifiziert nach Bullinger et al., 2017)	8
Tabelle 3:	WHO 2016 Klassifikation akuter myeloischer Leukämien (modifiziert nach Arber et al., 2016)	11
Tabelle 4:	Molekular-zytogenetische Risikogruppen gemäß der Klassifikation des European LeukemiaNet ELN 2017 (nach Döhner et al., 2016)	12
Tabelle 5:	Charakteristika: Gesunde Probanden und AML-Patienten.	18
Tabelle 6:	Übersicht über die Herkunft der verwendeten AML-Suspensionszelllinien. (adaptiert nach Informationen vom Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig)	19
Tabelle 7:	Zusammensetzung von 100 ml HPGM++++ -Medium	22
Tabelle 8:	Zusammensetzung von 100 ml RPMI -Medium	22
Tabelle 9:	Zusammensetzung von 100 ml RPMI++++ -Medium	23
Tabelle 10:	Verwendete Antikörper und Farbstoffe für die Zellzyklusstatusanalyse	27
Tabelle 11:	Protokoll zur cDNA-Synthese (RT-PCR) von RNA nativer Zellen	31
Tabelle 12:	Protokoll zur cDNA-Synthese (RT-PCR) von RNA kultivierter Zellen	32
Tabelle 13:	Protokoll Mastermix Quantitative RealTime- PCR	33
Tabelle 14:	Online-Programme zur Primergestaltung	33
Tabelle 15:	Informationen zu den verwendeten Primern	34
Tabelle 16:	Sternchencodierung, statistische Auswertung und Signifikanzen	34
Tabelle 17:	n-Zahlen Genexpressionsanalysen	55

7. Anhang

7.1 Einfluss von Leermedium (RPMI++++) auf gesunde CD34⁺ HSPZ nach 3 Tagen Zellkultur im Vergleich zu Kontroll-Zellkulturen

Die konditionierten Medien wurden alle nach 3 Tagen Zellkultur in RPMI Medium versetzt mit Zytokinen (++++, IL3, IL6, SCF, FLT3-L) von Zellen gesunder Probanden und von Zellen von AML-Patienten gewonnen. Um einen Einfluss des Leermediums (RPMI +++) im Vergleich zum Medium der Kontroll-Zellkulturen (CM MNC gesund, CM HSPZ gesund CD34⁺) zu untersuchen, wurden 3 Tage in Leermedium kultivierte gesunde CD34⁺ HSPZ (n=16) ebenfalls dem *Readout* der Zellkulturexperimente aus Punkt 3.3 unterzogen.

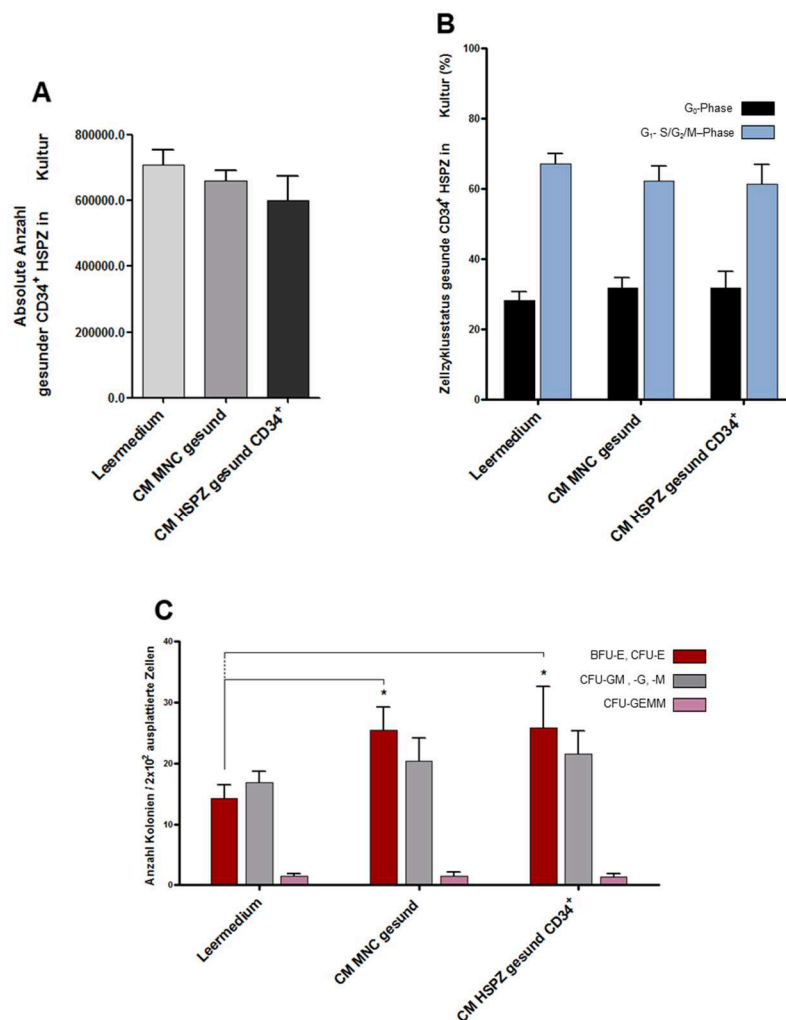


Abb. 1 Anhang: **Einfluss von Leermedium (RPMI++++) auf gesunde CD34⁺ HSPZ nach 3 Tagen Zellkultur vs. 3 Tage Zellkultur mit CM von Kontrollen (CM MNC gesund, CM HSPZ gesund CD34⁺):** **A** Graphische Darstellung der absoluten Zellzahlen, **B** der prozentualen Verteilung des Zellzyklusstatus (G₁-S/G₂/M-Phase ■, G₀-Phase ■), **C** des Koloniebildungsverhaltens und der Differenzierungsfähigkeit (CFU-Rote Reihe ■, CFU-Weiße Reihe ■, CFU-GEMM ■)

Bezüglich Zellzahl und Zellzyklusstatus bestanden zwischen allen drei Zellkultumedien keine signifikanten Unterschiede bei der Kultivierung der gesunden CD34⁺ HSPZ (Abb. 1 Anhang **A**, **B**). Die Anzahl der gebildeten Kolonien war bei den mit Leermedium für 3 Tage kultivierten gesunden CD34⁺ HSPZ gegenüber den über 3 Tage mit Kontrollmedium kultivierten gesunden CD34⁺ HSPZ geringer. Dieser Effekt war bei der Roten Reihe signifikant ausgeprägt (Abb. 1 Anhang **C**).

Danksagung

Zunächst danke ich unserem Klinikdirektor Herrn Univ. Prof. Dr. med. Rainer Haas, der mir überhaupt erst ermöglicht hat, anhand dieses interessanten Themas meine Dissertationssarbeit anzufertigen. Herr Professor Haas stand mir jederzeit motivierend mit konstruktiven Ideen zur Seite. Für diese und für die weiteren Möglichkeiten meiner beruflichen und persönlichen Weiterentwicklung möchte ich mich daher herzlichst bei ihm bedanken.

Im gleichen Zuge möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Thomas Schroeder bedanken, der jederzeit mit innovativen Ideen, großer Hingabe und Hilfsbereitschaft hinter dem Promotionsprojekt stand. Bei ihm hatte ich jederzeit das Gefühl einer exzellenten Betreuung und Förderung. Vielen Dank Thomas für dieses spannende Forschungsprojekt an dem ich teilhaben durfte!

Ein weiterer riesengroßer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Steffie Geyh, die mir sowohl fachlich als auch in allen Laboralltagssituationen immer mit maximaler Hilfsbereitschaft und Kompetenz zur Verfügung stand. Ihre zeitintensive Einarbeitung und Erklärungen ermöglichten mir einen reibungslosen Einstieg in die hämatologische Forschung und erweckten von Anfang an Freude an meinem Promotionsvorhaben. Für die gesamte zeitintensive Betreuung und Beratung möchte ich ihr herzlichst danken.

Auch möchte ich einen großen Dank an Herrn Dr. rer. nat. Ron-Patrick Cadeddu richten, der jederzeit sowohl menschlich als auch fachlich für mich da war. Gerade bei speziellen Fragestellungen war Pätte eine unverzichtbare Hilfe, der in diesen Dingen mir mit großem Fachwissen zur Verfügung stand.

Auch möchte ich Jamina, Caro und Anne danken, die auch jederzeit für Fragen zur Verfügung standen und eine große Bereicherung für den Alltag im Labor waren. Danke für die vielen tollen Tage und Stunden.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Dipl. ing. Katharina Raba aus dem Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika für die Core Flow Cytometry Facility bedanken.

Meinen Eltern Ute und Paul, sowie meinen Großeltern Ulla, Uschi und Werner gilt an dieser Stelle der größte Dank. Denn durch sie wurde mir der Traum von einem Medizinstudium überhaupt erst ermöglicht. Ein weiterer Dank gilt meiner Freundin Janine und meinen Geschwistern Carolin und Tom.

Danke