

Aus der Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und Klinische Immunologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Arndt Borkhardt

Untersuchung neuer Behandlungsstrategien mittels Drugscreening für die  
juvenile myelomonozytäre Leukämie

Dissertation

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

Vorgelegt von  
Lisa-Maria Kuhn

2024

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

gez.:

Dekan/in: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter/in: Prof. Dr. med. Arndt Borkhardt

Zweitgutachter/in: Prof. Dr. med. Thorsten Rosenbaum

Probleme kann man niemals mit derselben Denkweise lösen, durch die sie entstanden sind.

*Albert Einstein*

## Zusammenfassung

Die juvenile myelomonozytäre Leukämie (JMML) ist eine maligne Erkrankung der myeloischen Zellen im jungen Kindesalter mit einem gemischten Bild aus Myeloproliferation und Myelodysplasie. Trotz intensiver Forschung zur Pathogenese und Therapie der JMML ist die allogene Stammzelltransplantation in den meisten Fällen nach wie vor die einzige kurative Therapieoption. Mit einer 5-Jahres Überlebensrate von etwa 50 % ist die Prognose der betroffenen Patienten weiterhin fatal. In 90 % aller JMML-Erkrankungen kann eine Mutation in einem von fünf zugrundeliegenden Genen (*KRAS*, *NRAS*, *PTPN11*, *CBL* und *NF1*) nachgewiesen werden. Diese führt zu einer Überaktivierung des Ras-MAPKinase-Signalwegs, sodass viele Ansätze zur Etablierung neuer zielgerichteter Therapien auf eine Blockade eben dieses Signalwegs abzielen. Unter anderem das Fehlen geeigneter immortalisierter JMML-Zelllinien erschwert die Erforschung der Pathogenese sowie Medikamententestungen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mithilfe von genetisch veränderten *induced pluripotent stem cells* (iPSC) das Wirkstoffansprechen auf verschiedene Inhibitoren untersucht. Hierfür wurden zunächst geeignete Plasmide zur Überexpression (wildtyp, wt bzw. mutiert, mut) oder Herabregulation (*knockdown*, KD) einzelner JMML-spezifischer Gene (*NRAS*, *KRAS*, *PTPN11*, *NF1*) hergestellt und in einem ersten Schritt *human embryonic kidney* (HEK293)-Zellen damit transduziert. Durch ein Hochdurchsatzdrugscreening der HEK293-Zellen war es möglich, eine Vorauswahl geeigneter Inhibitoren zu treffen. Inhibitoren, die in den Untersuchungen von 180 Wirkstoffen vielversprechend erschienen, wurden gezielt in einem zweiten Schritt an transduzierten iPSC getestet.

Zur Herstellung eines JMML-Zelllinienersatzes wurden zunächst kommerziell erhältliche iPSC von einem gesunden Individuum mit den zuvor hergestellten Plasmiden transduziert. Die Expression bzw. Herunterregulation der Gene wurde auf mRNA- und Proteinebene nachgewiesen. Für die KRASmut Zelllinie verglichen mit der KRASwt Zelllinie konnte sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene eine deutlich erhöhte Expression gezeigt werden. Dies impliziert, dass diese Mutation durch Aktivierung bestimmter Gene über die Aktivierung des Ras-MAPKinase-Signalwegs einen Vorteil für zelluläre Proliferation mit sich bringt. Gleichzeitig wurde auf mRNA-Ebene nachgewiesen, dass die transduzierten iPSC auch nach genetischer Manipulation ihr Stammzellprofil exprimieren und sich weiterhin in hämatopoetische Vorläuferzellen differenzieren lassen.

In einem finalen Schritt wurden die erfolgreich manipulierten induzierten pluripotenten Stammzellen auf ihr Ansprechen auf verschiedene Inhibitoren im Vergleich zur gesunden Kontrolle getestet. Für verschiedene getestete Wirkstoffe (Dovitinib, Selumetinib, Erastin, Trametinib, Rapamycin und Ruxolitinib) konnte kein signifikanter Unterschied der IC50 Konzentrationen gemessen werden. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass sowohl iPSC-KRASmut als auch iPSC-NF1KD signifikant niedrigere IC50 Konzentrationen für Azacitidin und Dasatinib hatten als die jeweils entsprechende Wildtyp-Variante.

## Abstract

Juvenile myelomonocytic leukemia is a malignant disease of myeloid cells in infants with a combination of myeloproliferation and myelodysplasia. Despite intensive research on the pathogenesis and therapy of JMML, allogeneic stem cell transplantation remains the only curative therapy in most cases. With a 5-year survival rate of about 50%, the prognosis of affected patients thus remains fatal. In 90 % of all JMML cases, a mutation in one of five underlying genes (*KRAS*, *NRAS*, *PTPN11*, *CBL* and *NF1*) can be detected. This leads to overactivation of the Ras-MAPKinase pathway. Many efforts to establish new targeted therapies are aimed at blocking this certain pathway. Among other things, the lack of suitable immortalized JMML cell lines makes research into pathogenesis and drug testing difficult.

In this work, genetically modified induced pluripotent stem cells (iPSC) were used to investigate the drug response to different inhibitors. For this purpose, suitable plasmids for the overexpression (wildtype, wt or mutation, mut) or downregulation (knockdown, KD) of individual JMML-specific genes (*NRAS*, *KRAS*, *PTPN11*, *NF1*) were produced and, in a first step, human embryonic kidney (HEK293)-293 cells were transfected with them. High-throughput drug screening of HEK293 cells allowed us to pre-select suitable inhibitors. Inhibitors that appeared promising in the screening of 180 drugs were specifically tested in a second step on transduced iPSCs.

To generate a JMML-like cell line, commercially available iPSC from healthy individuals were first transduced with the previously prepared plasmids. Gene expression or downregulation was detected at the mRNA level and protein level. For the *KRAS*mut cellline compared to the *KRAS*wt cellline, significantly increased expression was shown at both the mRNA level and protein level. This implies that this mutation confers an advantage for cell renewal processes by activating specific genes via up-regulation of the Ras-MAPKinase pathway. At the same time, it was demonstrated at the mRNA level that the transduced iPSC continue to express their stem cell profile and differentiate into hematopoietic progenitor cells even after genetic manipulation.

In a final step, the successfully manipulated induced pluripotent stem cells were tested for their response to different inhibitors compared to healthy controls. No significant difference in IC50 concentrations was measured for the most agents tested (dovitinib, selumetinib, erastin, trametinib, rapamycin, and ruxolitinib). Still, it was shown that both iPSC-*KRAS*mut and iPSC-*NF1*KD had significantly lower IC50 concentrations for azacitidine and dasatinib than the respective wild-type variant.

## Abkürzungen

<b>%</b>	Prozent
<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>µg</b>	Mikrogramm
<b>µl</b>	Mikroliter
<b>µm</b>	Mikrometer
<b>µM</b>	Mikromol
<b>ABL</b>	<i>Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
<b>Akt</b>	Proteinkinase B
<b>APC</b>	Allophycocyanin
<b>APS</b>	Ammoniumpersulfat
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>BCR</b>	<i>Breakpoint cluster region</i>
<b>BSA</b>	<i>Bovine Serum Albumin</i>
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	Calciumchlorid
<b>CBL</b>	<i>Casitas b-lineage lymphoma proto-oncogene</i>
<b>CD</b>	<i>clusters of differentiation</i>
<b>cDNA</b>	<i>complementary DNA</i>
<b>c-Kit</b>	Tyrosinkinase KIT
<b>cm<sup>2</sup></b>	Quadratzenimeter
<b>c-Myc/Myc</b>	<i>cellular myelocytomatosis oncogene</i>
<b>CO<sub>2</sub></b>	Kohlenstoffdioxid
<b>CRISPRi</b>	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats interference</i>
<b>Cu</b>	Kupfer
<b>dCas9</b>	deaktiviertes Cas9
<b>dd</b>	<i>double distilled</i>
<b>DDT</b>	Dichlordiphenyltrichlorethan
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>DTT</b>	Dithiothreitol

<b>E. coli</b>	Escherichia coli
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat
<b>EPHA2</b>	Ephrin Typ-A Rezeptor 2
<b>ERK</b>	<i>extracellular signal related kinase</i> ; Synonym zu MAP
<b>EWOG-MDS</b>	<i>European Working Group of Myelodysplastic Syndromes in Childhood</i>
<b>FACS</b>	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
<b>FBS/FCS</b>	<i>fetal bovine serum, fetal calf serum</i>
<b>FGF</b>	<i>fibroblast growth factor</i>
<b>FITC</b>	Fluorescein-5-isothiocyanate
<b>Fyn</b>	Tyrosinkinase Fyn
<b>g</b>	Gramm
<b>GDP</b>	Guanosindiphosphat
<b>GM-CSF</b>	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
<b>GTP</b>	Guanosintriphosphat
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Wasser
<b>HbF</b>	fetales Hämoglobin
<b>HEK293-Zellen</b>	<i>human embryonic kidney Zellen</i>
<b>HLA</b>	<i>human leukocyte antigen</i>
<b>HSC</b>	<i>hematopoietic stem cell</i>
<b>IC50</b>	mittlere inhibitorische Konzentration
<b>IgG</b>	Immunglobulin G
<b>iPSC</b>	<i>induced pluripotent stem cells</i>
<b>iPS-Zellen</b>	induzierte pluripotente Stammzellen
<b>JAK</b>	Januskinase
<b>JMML</b>	juvenile myelomonozytäre Leukämie
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>KD</b>	<i>knockdown</i>
<b>Klf4</b>	<i>krüppel-like factor 4</i>
<b>KRAB</b>	Krüppel assoziierte Box
<b>KRAS</b>	<i>kirsten rat sarcoma</i>
<b>LB-Medium</b>	Luria-Bertani-Medium
<b>Lck</b>	Tyrosinkinase Lck

<b>L</b>	Liter
<b>Lyn</b>	Tyrosinkinase Lyn
<b>M</b>	Mol
<b>mA</b>	Milliampere
<b>MACS</b>	<i>magnetic cell separation</i>
<b>MAPK</b>	<i>mitogen-activated protein kinase</i> ; Synonym zu ERK
<b>MEK</b>	MAP-Kinase-Kinase
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Magnesiumchlorid
<b>ml</b>	Milliliter
<b>mM</b>	Millimol
<b>mRNA</b>	<i>messenger-RNA</i>
<b>MRT</b>	Magnetresonanztomographie
<b>mTOR</b>	<i>mechanistic target of rapamycin</i>
<b>mut</b>	mutiert
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid
<b>NF1</b>	Neurofibromatose Typ 1 (Erkrankung), Neurofibromin 1 (Gen)
<b>NF<sub>κ</sub>b</b>	<i>nuclear factor kappa light chain enhancer of activated b-cells</i>
<b>ng</b>	Nanogramm
<b>nM</b>	Nanomol
<b>NRAS</b>	<i>neuroblastoma RAS</i>
<b>Oct3/4</b>	oktamer-bindender Transkriptionsfaktor 3/4
<b>p53</b>	Protein p53
<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffered saline</i>
<b>PCR</b>	<i>polymerase chain reaction</i>
<b>PDGFR<math>\beta</math></b>	<i>platelet derived growth factor receptor <math>\beta</math></i>
<b>PE</b>	Phycoerythrin
<b>PI3K</b>	Phosphoinositid-3-Kinase
<b>PTPN11</b>	<i>protein tyrosine phosphatase non-receptor type 11</i>
<b>PVDF</b>	Polyvinylidenfluorid
<b>qPCR</b>	quantitative PCR
<b>Raf</b>	<i>rat fibrosarcoma</i>
<b>Ras</b>	<i>rat sarcoma</i>

<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>Rpm</b>	<i>rounds per minute</i>
<b>RTK</b>	Rezeptortyrosinkinase
<b>RT-PCR</b>	<i>realtime polymerase chain reaction</i>
<b>SDS</b>	<i>sodium dodecylsulfate</i>
<b>SDS-PAGE</b>	<i>sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
<b>sg</b>	<i>single guide</i>
<b>Sox2</b>	SRY-Box Transkriptionsfaktor 2
<b>Src</b>	Tyrosinkinase Src
<b>SSEA</b>	<i>stage-specific embryonic antigen</i>
<b>STAT</b>	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
<b>TAE</b>	Tris-Acetat-EDTA
<b>TBS-T</b>	<i>Tris-buffered saline with tween20</i>
<b>TEMED</b>	Tetramethylethyldiamin
<b>TP53</b>	Tumorprotein 53
<b>WHO</b>	<i>World Health Organization</i>
<b>Wt / w/t</b>	wildtyp
<b>Yes</b>	Tyrosinkinase Yes
<b>x g</b>	relative Zentrifugalkraft

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Juvenile myelomonozytäre Leukämie.....	1
1.1.1	Grundlagen der JMML.....	1
1.1.2	Genetische Aberrationen – Der Ras-MAPKinase-Signalweg.....	2
1.1.3	Epigenetische Faktoren bei Patienten mit JMML.....	4
1.1.4	Diagnosekriterien der JMML.....	6
1.1.5	Aktuelle Therapieprinzipien.....	6
1.2	Induzierte pluripotente Stammzellen.....	8
1.2.1	Eigenschaften und Generierung von iPSC.....	8
1.2.2	iPSC zur Generierung immortalisierter JMML-Zelllinien.....	9
1.2.3	iPSC zur Testung einzelner Inhibitoren zur Behandlung der JMML.....	10
1.3	Ziele der Arbeit.....	10
2	Material und Methoden.....	12
2.1	Material.....	12
2.1.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	12
2.1.2	Puffer und Lösungen.....	14
2.1.3	Chemikalien und Kits.....	16
2.1.4	Gele.....	17
2.1.5	Antikörper.....	18
2.1.6	Plasmide.....	19
2.1.7	Primer.....	20
2.1.8	Restriktionsenzyme.....	22
2.1.9	Zelllinien.....	22
2.1.10	Bakterienstämme.....	22
2.1.11	Inhibitoren.....	22
2.1.12	Größenstandards.....	23
2.1.13	Software.....	23
2.2	Methoden.....	24
2.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	24
2.2.2	Zellbiologische Methoden: HEK293-Zellen.....	29
2.2.3	Zellbiologische Methoden: iPSC-Zellen.....	33
2.2.4	Proteinbiochemische Methoden.....	38

2.2.5	Statistik.....	39
3	Ergebnisse.....	40
3.1	Sequenzierung der Plasmide.....	42
3.2	Expression der Zielproteine in HEK293-Zellen .....	43
3.2.1	Expression von <i>KRAS</i> und <i>PTPN11</i> in HEK293-Zellen auf mRNA-Ebene ...	43
3.2.2	Expression von <i>KRAS</i> und <i>PTPN11</i> in HEK293-Zellen auf Proteinebene...	44
3.3	Expression der Zielproteine in iPSC.....	45
3.3.1	Expression von <i>NRAS</i> und <i>KRAS</i> in iPSC auf mRNA-Ebene .....	45
3.3.2	Proteinexpression von <i>NRAS</i> und <i>KRAS</i> in iPSC.....	46
3.3.3	Untersuchung des Ras-MAPKinase-Signalwegs in Ras-überexprimierenden iPSC.....	47
3.4	<i>Knockdown</i> von <i>NF1</i> in iPSC .....	48
3.4.1	Nachweis des <i>NF1-Knockdowns</i> in iPSC auf mRNA-Ebene.....	48
3.4.2	Expression von Stammzell-Markern in <i>NF1-Knockdown</i> -Zellen.....	49
3.4.3	Nachweis der Proteinexpression in <i>NF1-Knockdown</i> -iPSC.....	50
3.5	Hämatopoetische Differenzierung der iPSC .....	51
3.5.1	Mikroskopische Beurteilung der Differenzierung.....	51
3.5.2	Nachweis der CD34 Expression nach erfolgter Differenzierung .....	52
3.6	Drugscreeningergebnisse .....	55
3.6.1	Unterschiedliches Wirkstoffansprechen in transfizierten HEK293-Zellen	55
3.6.2	Wirksamkeit von Dasatinib in manipulierten iPS-Zelllinien.....	58
4	Diskussion .....	61
4.1	Transduzierte iPSC als JMML-Zelllinienersatz.....	61
4.2	<i>Drugscreening</i> der HEK293-Zellen .....	64
4.3	<i>Drugscreening</i> der iPSC.....	64
4.4	Schlussfolgerung und Ausblick .....	69
5	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	71
6	Anhang.....	77
	Liste aller getesteten Inhibitoren im Hochdurchsatz- <i>Drugscreening</i> der HEK293-Zellen.	77

# 1 Einleitung

## 1.1 Juvenile myelomonozytäre Leukämie

### 1.1.1 Grundlagen der JMML

Die juvenile myelomonozytäre Leukämie (JMML) ist eine maligne Erkrankung der myeloischen Zellen im jungen Kindesalter [1]. Die Inzidenz der Erkrankung beträgt jährlich 1,2:1.000.000 mit einem mittleren Erkrankungsalter von zwei Jahren [2-4]. Jungen sind häufiger betroffen [5]. Die JMML ist ein gemischtes Krankheitsbild aus Myeloproliferation und Myelodysplasie. Klassischerweise kann eine geringe Zahl unreifer Vorstufen (Myelozyten, Metamyelozyten, unreife Monozyten, kernhaltige erythropoetische Zellen) im peripheren Blut nachgewiesen werden [6, 7]. Der Blastenanteil im Knochenmark beträgt, im Gegensatz zur häufigen akuten lymphatischen Leukämie, typischerweise weniger als 20 % [7, 8]. Nach wie vor ist die allogene Stammzelltransplantation in den meisten Fällen die einzige kurative Therapieoption [2]. Hierdurch kann jedoch nur eine 5-Jahres Überlebensrate von etwa 50 % erreicht werden [2, 9]. Abhängig vom individuellen Risikoprofil und der zugrundeliegenden genetischen Aberration kann ein geringer Teil der Patienten auch ohne Stammzelltransplantation kurativ therapiert werden [7, 10].

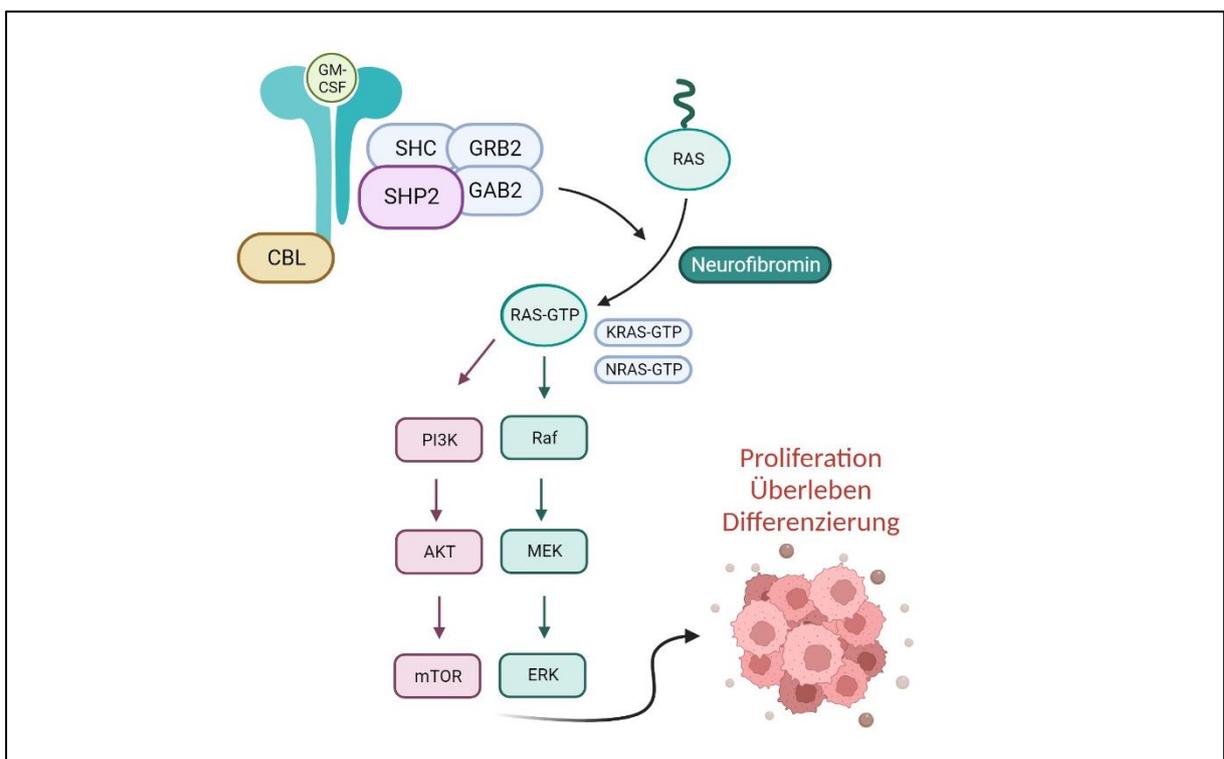
Klinisch präsentieren die Patienten meist eine Splenomegalie, eine Thrombozytopenie mit klinischen Blutungszeichen und eine Leukozytose mit Monozytose [7]. Eine Infiltration von Organen wie der Leber, der Lunge und des Darms ist üblich und kann zu einer respiratorischen und / oder gastrointestinalen Symptomatik führen [2, 11]. Unspezifische Symptome wie Infektanfälligkeit, Gedeihstörung oder Schlappeheit kommen häufig vor [2, 11]. Anders als akute lymphatische oder myeloische Leukämien im Kindesalter, infiltrieren die Blasten der JMML selten das zentralnervöse System [7]. Da die Erkrankung zu einem relevanten Anteil mit zugrundeliegenden Prädispositionssyndromen assoziiert ist (Neurofibromatose Typ 1, CBL-Syndrom), kommen insbesondere auch hiermit assoziierte Stigmata vor [6, 7]. Neurofibrome, Café-au-lait Flecken, faziale Dysmorphien oder angeborene Herzfehler können bei der Diagnosestellung hinweisend sein [6, 7].

Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung können bei den meisten Patienten unreife myeloische Vorläuferzellen sowie ein erhöhter Hämoglobin F Spiegel im peripheren Blut gemessen werden [2, 12]. In 90 % aller JMML-Erkrankungen kann eine Mutation in einem von fünf zugrundeliegenden Genen nachgewiesen werden: *KRAS*, *NRAS*, *PTPN11*, *CBL* und *NF1* [7, 13]. Mutationen in diesen Genen führen zu einer Überaktivierung des Ras-MAPKinase-Signalwegs, welcher die Proliferation, Differenzierung und das Überleben der Zellen positiv beeinflusst [7, 13]. Neben der zugrundeliegenden Ras-MAPKinase-Signalweg Mutation, spielen auch epigenetische Faktoren, wie das Alter der Patienten und der HbF-Spiegel bei Diagnosestellung sowie das DNA-Methylierungsmuster eine wichtige Rolle für die Prognose und die individuellen Therapieentscheidungen [7, 14].

### 1.1.2 Genetische Aberrationen – Der Ras-MAPKinase-Signalweg

Pathobiologisch liegt der JMML eine klonale Myeloproliferation durch eine Überaktivierung des Ras-MAPKinase-Signalwegs zugrunde [13]. In über 90 % der Krankheitsfälle kann ein genetischer Defekt in einem von fünf Genen nachgewiesen werden: *KRAS*, *NRAS*, *PTPN11*, *CBL* und *NF1* [13]. Diese Mutationen sind entweder somatisch in den hämatopoetischen Vorläuferzellen oder als Keimbahnmutationen vorhanden [14]. Die zugrundeliegende Mutation sowie ihr Vorkommen spielen sowohl für die Therapieentscheidung als auch für die Prognose eine entscheidende Rolle [7].

Allen Mutationen gemeinsam ist schlussendlich die übermäßige Aktivierung des Ras-MAPKinase-Signalwegs (siehe Abbildung 1) [6]. Dieser ist eine Signaltransduktionskaskade zwischen Intra- und Extrazellularraum und nimmt so Einfluss auf die Differenzierung, das Wachstum und die Proliferation von Zellen [6].



**Abb. 1: Schematische Darstellung des Einflusses der JMML-assoziierten Mutationen auf die Ras Signalkaskade**

Mutationen in *NF1* (codiert für Neurofibromin) und *CBL*, die den Ras-MAPKinase-Signalweg aktivieren, sind mit einem Funktionsverlust der Proteine assoziiert. Dahingegen handelt es sich bei *NRAS*-, *KRAS*- und *PTPN11*-Mutationen um einen Funktionsgewinn der Proteine. Insgesamt kommt es zu einer Aktivierung des inaktiven Ras-GDP zur aktiven Form Ras-GTP. Hierdurch wird die Phosphorylierung und somit Aktivierung weiterer Kinasen des Signalwegs ausgelöst. Die Abbildung wurde mit BioRender.com kreiert. [1, 6, 13, 15]

Die Signalkaskade beginnt mit der Phosphorylierung der inaktiven GDP-gebundenen Ras-Form zur aktiven GTP-gebundenen Form [6, 15]. Die natürliche Regulation des Ras Signalwegs erfolgt unter anderem durch die Ras Phosphatase, die das aktivierte GTP-Ras wieder in die inaktive GDP Form dephosphoryliert [6, 15]. Bei Patienten mit einer JMML ist diese Ras-GTP-GDP Schleife fehlerhaft, sodass es zu einer übermäßigen Aktivierung von Ras kommt [6]. Hierdurch

wird die Phosphorylierung und somit Aktivierung weiterer Kinasen (Raf, MEK, MAP) des Signalwegs ausgelöst [6]. Im Weiteren werden unter anderem die Transkriptionsfaktoren Jun und Fos aktiviert [6, 15].

Somatische *NRAS*-Mutationen zeigen eine ausgeprägte Varianz in ihrem klinischen Bild und in der Prognose [7]. Insbesondere hier spielen epigenetische Faktoren und individuelle Risikofaktoren der Patienten eine entscheidende Rolle [7]. Hohe HbF-Spiegel, niedrige Thrombozytenwerte und ein höheres Alter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung sind mit einem schweren Verlauf und einem hohen Rezidivrisiko nach Stammzelltransplantation assoziiert [7]. Dahingegen kann bei sehr jungen Patienten ohne weitere Risikofaktoren ein milder Verlauf mit einer spontanen Regression erwartet werden [7]. Diese Patienten profitieren von einem abwartenden Verhalten mit engmaschigen Kontrollen (*Watch-and-Wait*-Strategie) [7].

Im Gegensatz hierzu sind Erkrankungen mit einer pathogenen somatischen *KRAS* Mutation fast immer mit einem aggressiven Verlauf assoziiert [7]. Durch eine frühzeitige Therapie mit Azacitidin kann allerdings möglicherweise das Behandlungsergebnis nach einer Stammzelltransplantation verbessert werden [16]. Niemeyer et al. konnten bereits zeigen, dass eine Monotherapie mit Azacitidin zu einem guten Ansprechen bei Hochrisikopatienten führt [16]. Die Patienten zeigen einen signifikant geringeren Thrombozytentransfusionsbedarf, Splenomegalien sind klinisch und radiologisch rasch rückläufig und die Therapie wird insgesamt gut vertragen [16].

Mit 35 % sind pathogene somatische *PTPN11* Mutationen die häufigsten nachgewiesenen Mutationen bei Patienten mit JMML [7]. Gleichzeitig gehen sie mit einem aggressiven Verlauf und einer hohen Mortalität einher [7]. Azacitidin im initialen Therapieregime und eine rasche Stammzelltransplantation sind für die Patienten dieser Gruppe unentbehrlich [16]. Eine Keimbahnmutation muss bei Nachweis einer *PTPN11* Mutation zwingend ausgeschlossen werden [12]. Patienten mit einer *PTPN11* Keimbahnmutation zeigen das klinische Bild des häufig vorkommenden Noonan-Syndroms mit Kleinwuchs, fazialen Dysmorphien, kongenitalen Herzfehlern, Skelettanomalien, Flügelnacken und mentaler Retardierung [13]. Diese Patienten können bereits in der Säuglingszeit an einer polyklonalen myeloproliferativen Erkrankung leiden [17]. Auch wenn diese der JMML klinisch und hämatologisch sehr ähnlich sein kann, ist die Erkrankung in der Regel selbstlimitierend und bedarf keiner Therapie [17].

Neurofibromatose Typ 1 ist eine häufige hereditäre neurokutane Erkrankung. Klinisch weisen die Patienten initial oft nur Café-au-lait Flecken auf [18]. Im Verlauf entwickeln sie typische Neurofibrome [18]. NF1 prädisponiert aber auch für andere benigne und maligne Tumore [19]. In Abbildung 2 sind klassische Manifestationen bei Neurofibromatose Typ 1 dargestellt. Die Erkrankung wird durch Keimbahnmutationen im Tumorsuppressorgen *NF1* ausgelöst [18]. *NF1* kodiert für Neurofibromin, welches seinerseits wiederum ein Suppressor der Ras-Aktivierung ist [18]. Es konnte gezeigt werden, dass ein großer Teil der NF1 assoziierten JMML Fälle durch einen *Loss of Heterozygosity* oder eine zweite unabhängige Mutation ausgelöst wird [20]. Die Patienten sind zum Zeitpunkt der Diagnosestellung häufig älter, die Prognose ist ähnlich schlecht wie bei der somatischen *PTPN11* Mutation [7]. Auch hier wird nach aktuellen

Standards die initiale Therapie mit Azacitidin begonnen und im Anschluss eine Stammzelltransplantation durchgeführt [7].



**Abb. 2: Klassische Manifestationen bei Neurofibromatose Typ 1**

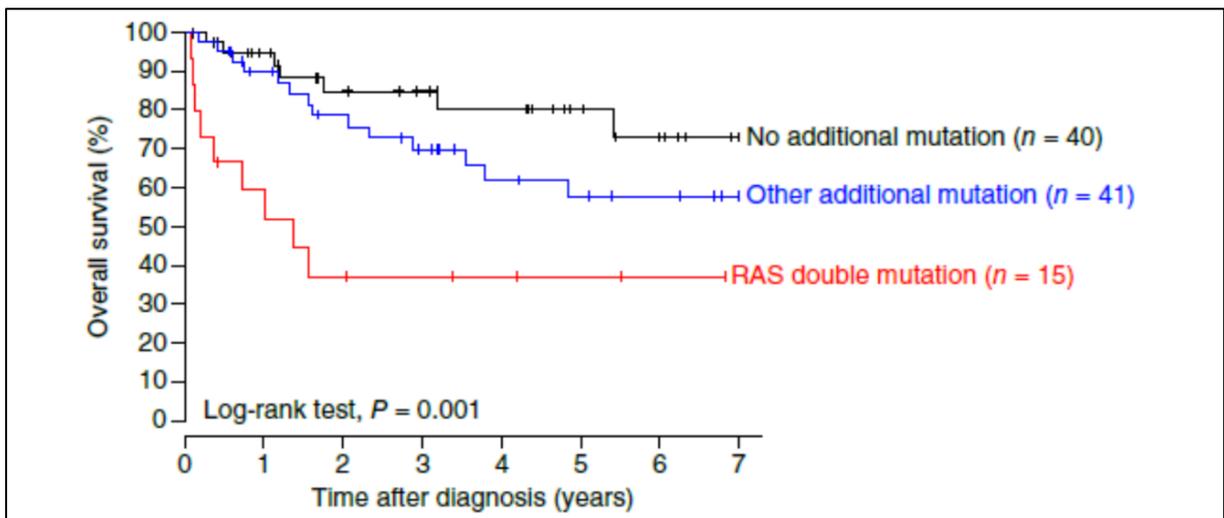
Auf dem linken Bild sind typische Café-au-lait Flecken am Stamm eines Patienten mit NF1 zu sehen. Auf dem mittleren Bild präsentiert sich ein plexiformes Neurofibrom am Rücken einer Patientin mit NF1. Rechts ist eine MRT-Untersuchung des Gehirns eines Patienten mit Optikusgliom beidseits im Rahmen einer NF1 Erkrankung dargestellt. Die Bilder wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. T. Rosenbaum.

Viele Patienten mit einer Keimbahn *CBL* Mutation und JMML zeigen syndromale Rasopathie Merkmale wie faziale Dysmorphien und Kleinwuchs [7]. Typisch sind autoimmune Begleitphänomene und ausgeprägte Organomegalien [7]. In der Regel können Patienten mit einer *CBL*-Keimbahnmutation und einer JMML klinisch engmaschig mit einer *watch-and-wait* Strategie überwacht werden und bedürfen keiner zytotoxischen Therapie [7].

### 1.1.3 Epigenetische Faktoren bei Patienten mit JMML

Alter, Geschlecht, Thrombozytenzahl und HbF-Spiegel sind lange bekannte prognostische Marker der JMML [5]. Nichtsdestotrotz korrelieren sie nur wenig mit der zugrundeliegenden genetischen Variante [14]. Andere Faktoren wie Sekundärmutationen [21] und das DNA Methylierungsprofil [22] scheinen ebenso entscheidende Rollen zu spielen.

Caye et al. konnten in einer retrospektiven Studie mit 118 JMML-Patienten zeigen, dass in etwa der Hälfte aller Erkrankungen Sekundärmutationen vorkommen [23]. Diese betreffen häufig ebenfalls den Ras-MAP-Kinase-Signalweg, klassische Onkogene oder Tumorsuppressorgene [23]. Eine Korrelation zwischen dem klinischen Behandlungsergebnis und dem Vorliegen von Sekundärmutationen konnte dargestellt werden [23] und wird in Abbildung 3 anhand einer Kaplan-Meier-Kurve visualisiert. Die schlechteste Prognose haben JMML-Patienten mit einer *Ras double mutation*, also einer Sekundärmutation, die ebenfalls den Ras Signalweg aktiviert [23]. Die häufigste beschriebene aktivierende Mutationskombination ist die *NF1* Haploinsuffizienz als Keimbahnmutation in JMML-Fällen mit zugrundeliegender somatischer *PTPN11* Mutation [23]. Eine Monosomie des Chromosoms 7 war in etwa der Hälfte aller JMML-Fälle mit *KRAS*-Mutation nachzuweisen [23].



**Abb. 3: Überlebensraten von 96 Patienten mit JMML in Abhängigkeit von vorhandenen Sekundärmutationen über eine Follow-Up Zeit von sieben Jahren [23]**

Kaplan-Meier-Kurve von 96 Patienten mit JMML dargestellt nach dem Vorkommen von Sekundärmutationen. Es erfolgte eine Aufteilung nach Patienten ohne Sekundärmutationen (schwarz), nach *Ras double mutations* (rot) und anderen Sekundärmutationen (blau). Das Vorkommen von Sekundärmutationen, insbesondere Zweitmutationen im Ras-MAPKinase-Signalweg, ist signifikant mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Darstellung mit freundlicher Genehmigung von *Springer Nature* (Lizenznummer: 5544170671511).

Mit einer massenspektrometrischen Untersuchung von 127 JMML Fällen konnten Olk-Batz et al. 2011 erstmalig zeigen, dass eine Hypermethylierung von CpG Inseln auch bei der JMML nachzuweisen ist [22]. Sie stellten zudem dar, dass mit zunehmender Methylierung das Überleben schlechter ist und das Rezidivrisiko nach einer Stammzelltransplantation steigt [22]. Die DNA Methylierung ist eine epigenetische Modifikation, welche die Genexpression und somit Zellproliferation und -differenzierung beeinflusst [24]. DNA-Methyltransferasen sind verantwortlich für den Methylierungsstatus der DNA und werden unter anderem durch Karzinogene und genetische Mutationen beeinflusst [24]. Eine Veränderung des DNA-Methylierungsstatus kann bei nahezu allen humanen Tumorerkrankungen nachgewiesen werden [25]. Eine Aktivierung des Ras-Raf-MAPKinase-Signalwegs beeinflusst über die Regulierung der DNA-Methyltransferasen die Methylierung der CpG-Inseln [26]. Möglicherweise spielen auch Sekundärmutationen eine Rolle bei der Aktivierung der DNA-Methyltransferasen [26]. 2017 differenzierte die European Working Group of Myelodysplastic Syndromes in Childhood (EWOG-MDS) anhand von Methylierungsprofilen von 167 Patienten drei Methylierungsgruppen [26]. Übereinstimmend mit bereits bekannten Risikofaktoren, wie einem höheren Alter (> 2 Jahre) oder dem Vorhandensein von somatischen *PTPN11* Mutationen, haben jene Patienten auch den höchsten Hypermethylierungsstatus und sind entsprechend mit der schlechtesten Prognose assoziiert [26]. In der intermediären Gruppe der Hypermethylierung sind hauptsächlich Patienten mit somatischen *KRAS*-Mutationen und / oder einer Monosomie 7 zu finden [26]. Die geringste Methylierung assoziiert mit der besten Prognose haben Patienten mit einer *CBL*-Mutation oder junge Patienten mit somatischen *NRAS*-Mutationen [26].

### 1.1.4 Diagnosekriterien der JMML

Das klinische Bild, die zugrundeliegenden genetischen Aberrationen und epigenetischen Kriterien sowie die damit einhergehenden Therapieentscheidungen und die Prognose sind multifaktoriell und variieren stark zwischen den einzelnen Individuen [1, 14]. Umso wichtiger ist die rasche und genaue Diagnosestellung [1]. Molekulare Testmethoden spielen in der aktuellen Diagnosefindung eine immer größere Rolle [1]. In ihrer Revision der Diagnosekriterien der JMML von 2016 hat die WHO die Bedeutung der molekularen Marker präzisiert [8]. Eine Darstellung der aktuellen Diagnosekriterien ist in Tabelle 1 dargestellt.

JMML Diagnosekriterien
<b>1. Klinische und hämatologische Merkmale (alle vier obligatorisch)</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Monozytenzahl (im peripheren Blut) &gt; 1 x 10<sup>9</sup> /L</li><li>▪ Blastenzahl im peripheren Blut und Knochenmark &lt; 20 %</li><li>▪ Splenomegalie</li><li>▪ Kein Nachweis des Philadelphia-Chromosoms (BCR::ABL1 Umlagerung)</li></ul>
<b>2. Genetische Untersuchungen (eine Übereinstimmung hinreichend)</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Somatische Mutation in <i>PTPN11</i>, <i>KRAS</i> oder <i>NRAS</i></li><li>▪ Klinische Diagnose einer NF1 oder Nachweis einer <i>NF1</i> Mutation</li><li>▪ Keimbahnmutation von <i>CBL</i> und Nachweis des Verlustes der Heterozygotie</li></ul>
<b>3. Bei Fehlen der genetischen Merkmale (aus 2.) müssen folgende Kriterien erfüllt sein:</b>
Monosomie 7 oder andere chromosomale Aberrationen oder mindestens zwei der nachfolgenden Kriterien: <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Altersentsprechend erhöhter HbF-Spiegel</li><li>▪ Myeloische oder erythrozytäre Vorläuferzellen im peripheren Blutaussstrich</li><li>▪ GM-CSF Hypersensitivität in Zellkulturversuchen</li><li>▪ Hyperphosphorylierung von STAT5</li></ul>

**Tabelle 1: WHO-Kriterien zur Diagnosestellung der JMML (modifiziert nach Arber, D.A., et al. [8])**

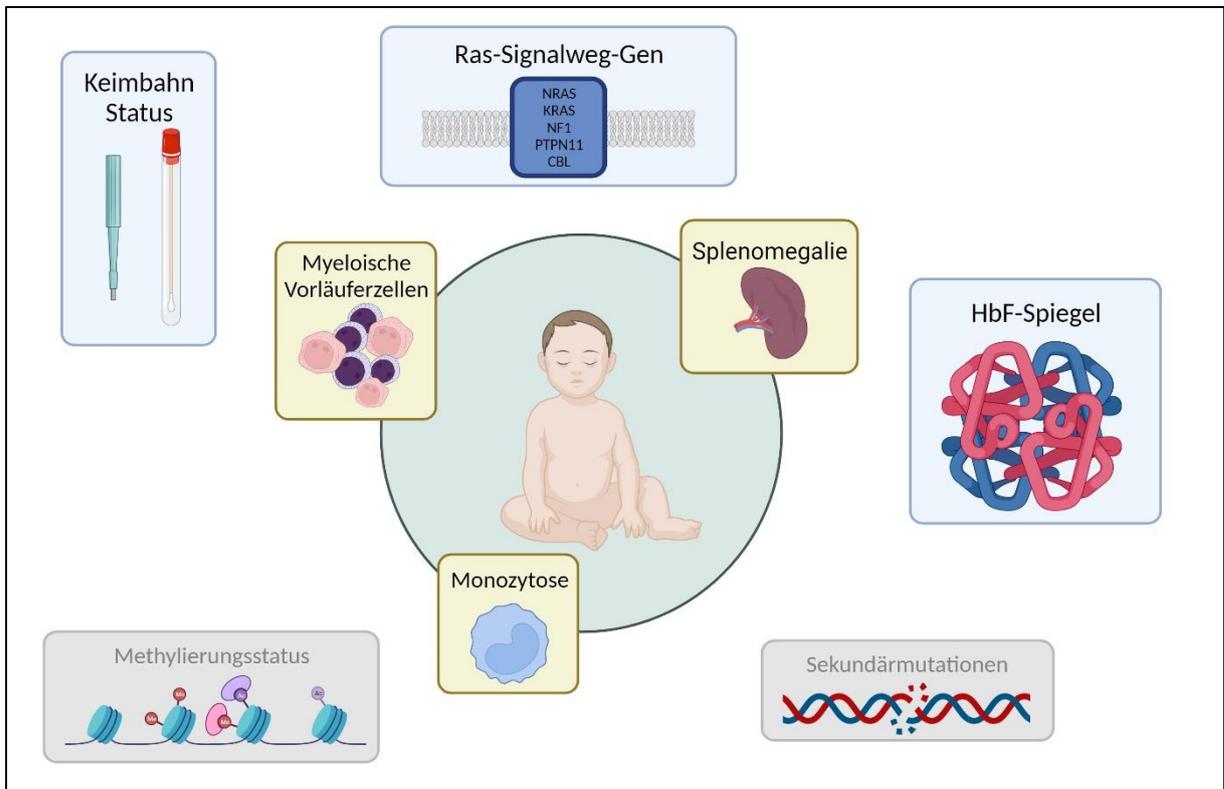
Darstellung der Diagnosekriterien der JMML der WHO nach ihrer Revision 2016.

Neben den vier obligatorischen klinischen und hämatologischen Merkmalen muss zur Diagnosestellung entweder eine der fünf klassischen Mutationen nachgewiesen werden oder es müssen weitere JMML typische Kriterien erfüllt werden (z. B. Nachweis von Monosomie 7 oder ein erhöhter HbF-Spiegel) [8]. Dies veranschaulicht erneut, wie relevant die zugrundeliegende genetische Veränderung für die Diagnose, Therapie und Prognose der JMML ist.

### 1.1.5 Aktuelle Therapieprinzipien

In Anbetracht der sehr unterschiedlichen zugrundeliegenden pathogenetischen Veränderungen und den damit einhergehenden differenten Risikoprofilen und Prognosen gibt es keine Universaltherapie für Patienten mit einer JMML [7]. In einer aktuellen Übersichtsarbeit aus 2021 schlagen Mayerhofer et al. den Einbezug einiger diagnostischer Informationen in die Therapieentscheidungen vor [7]. Abbildung 4 gibt eine Übersicht über die relevanten diagnos-

tischen Informationen. Mayerhofer et al. halten dabei insbesondere die zugrundeliegende genetische Aberration, den Keimbahnstatus und den HbF-Spiegel für klinisch und therapeutisch relevant [7]. Der Nachweis von Sekundärmutationen und die DNA Methylierungsklasse soll zudem – wenn vorhanden – in die Therapieentscheidungen einfließen [7].



**Abb. 4: Diagnostischer Ansatz bei Kindern mit JMML (modifiziert nach Mayerhofer et al., 2021 [7])**

Das klinische Bild wird dominiert von einer Splenomegalie, einer Monozytose und dem Nachweis von myeloischen und erythrozytären Vorläuferzellen im Blut. Am entscheidendsten für die weitere Therapieplanung sind die zugrundeliegende Mutation des Ras-Signalwegs, der fetale Hämoglobin (HbF)-Spiegel sowie der Keimbahnstatus des Kindes. Der Methylierungsstatus und der Nachweis von Sekundärmutationen können zudem wichtige zusätzliche Prädiktoren sein. Die Abbildung wurde mit BioRender.com kreiert.

Ziel ist es, die grundlegenden Therapieentscheidungen anhand des individuellen Risikokonzeptes des Patienten zu treffen [7]. Bei Patienten mit *CBL*-Keimbahnmutation oder mit einer somatischen *NRAS*-Mutation mit altersentsprechend normalen HbF-Spiegeln und einer normwertigen Thrombozytenzahl kann damit in der Regel zunächst auf die hämatopoetische Stammzelltransplantation verzichtet und eine *watch-and-wait* Strategie angewandt werden [10]. Patienten, die somatische *KRAS*- oder *PTPN11*-Mutationen, *NF1*-Keimbahnmutationen oder somatische *NRAS*-Mutationen mit weiteren Risikofaktoren tragen, sollten unmittelbar und zeitnah eine hämatopoetische Stammzelltransplantation erhalten [9, 10]. Als Stammzellspender kommen hier HLA-idente verwandte oder unverwandte Spender in Betracht [9]. Die Induktion besteht aus einer kombinierten zytotoxischen Therapie mit Busulfan, Melphalan und Cyclophosphamid [9]. Hiermit kann eine 5-Jahres Überlebensrate von etwa 50 % erreicht werden; die Hauptursache für ein Therapieversagen bleibt nach wie vor die Rezidivkrankung [9]. Bei Hochrisikopatienten (*PTPN11* oder *NF1* Mutationen, Lebensalter > 2 Jahre, hohe DNA Hypermethylierung) wird eine Therapie mit Azacitidin nach Transplantation empfohlen [7].

Der *Graft-versus-leukemia*-Effekt gilt als prognoserelevant, sodass die Immunsuppression so zurückhaltend wie möglich durchgeführt werden sollte [7].

Mit dem Wissen über die genetischen und epigenetischen Hintergründe der JMML ergeben sich Möglichkeiten für neue zielgerichtete Therapiekonzepte. Nichtsdestotrotz konnte bislang keine zielgerichtete Therapie für die JMML etabliert werden. Eine aktuell laufende Phase 2 Studie der *Children's Oncology Group* (NCT03190915) untersucht den Benefit des MEK-Inhibitors Trametinib bei Patienten mit einer Rezidiv- oder therapierefraktären Erkrankung. Untersuchungen an JMML-iPSC zeigten ein selektives Ansprechen auf Trametinib, insbesondere von *PTPN11* mutierten JMML-Zellen [27]. Verschiedene *in vitro* Untersuchungen zeigen das Potenzial von JAK-Inhibitoren (z. B. Ruxolitinib), PI3Kinase-Inhibitoren und mTOR-Inhibitoren (Rapamycin) [27, 28]. Bunda et al. konnten 2013 zeigen, dass die Inhibition der Src Kinase mit dem Multikinaseinhibitor Dasatinib die übermäßige Proliferation von Monozyten in *CBL* mutierten JMML-Zellen hemmen kann [29]. Bislang konnten allerdings nicht ausreichend *in vivo* Daten gesammelt werden, um eine Überlegenheit der zielgerichteten Therapien anzunehmen. Aktuell veröffentlichte Daten aus der ersten Phase 2 Studie (NCT02447666) zur Monotherapie mit Azacitidin vor Stammzelltransplantation bei neu diagnostizierten JMML-Patienten zeigen ein großes Potenzial bei niedrigem Nebenwirkungsprofil [16]. Dennoch bleiben die Langzeitwirkungen und -nebenwirkungen noch abzuwarten [16]. Es ist zusammen zu fassen, dass die Möglichkeiten und Ideen für zielgerichtete Therapien zur Behandlung der JMML schier endlos erscheinen, bislang aber kein Therapiekonzept zu einer signifikanten Verbesserung der Prognose der Patienten geführt hat.

## 1.2 Induzierte pluripotente Stammzellen

### 1.2.1 Eigenschaften und Generierung von iPSC

Induzierte pluripotente Stammzellen sind synthetisch, durch Transfektion von differenzierten Zellen, hergestellte primäre, pluripotente, immortalisierte Zellen, die die Fähigkeit besitzen in Zellen aller drei Keimblätter zu differenzieren [30-32]. 2007 gelang es Takahashi et al. humane Hautfibroblasten mit retroviraler Transduktion der vier Transkriptionsfaktoren Oct3/4, Sox2, Klf4 und c-Myc in pluripotente Stammzellen zu reprogrammieren [30]. Diese Zellen zeigen eine ähnliche Morphologie, Proliferation, Telomeraseaktivität und Antigenexpression sowie Genexpression wie humane embryonale Zellen [30, 31]. Sie können in Zellen aller drei Keimblätter differenzieren [30].

Heutzutage kann die Reprogrammierung von iPSC in integrative (retroviral, lentiviral, piggyBac Transposon) und nicht-integrative (Adenovirus DNA, Episome) Systeme unterschieden werden [33]. Die Reprogrammierung der Zellen mithilfe eines Sendavirus ist eine der aktuellen Methoden und wird häufig angewandt, da das einsträngige RNA-Virus nicht mit der Wirt-DNA interagiert [34]. Große Vorteile der Herstellung und Nutzung von iPSC, insbesondere im Vergleich zu embryonalen Stammzellen, liegen in der Einfachheit der Materialgewinnung und in der Vermeidung des ethischen Disputs über die Embryonenforschung [35]. Im Laufe der Zeit wurde die Herstellung und Kultivierung sowie Differenzierung der iPSC kommerzialisiert, so dass heute die regelhafte Nutzung der iPSC in vielen biomedizinischen Laboren gelingt [35].

Ein signifikanter Vorteil der iPSC ist die Möglichkeit pluripotente Stammzellen aus differenzierten Zellen erkrankter Menschen herzustellen [35]. Diese iPSC tragen alle genetischen Aberrationen, die ebenfalls bei dem jeweiligen Patienten zu finden sind [35]. Hierdurch bieten iPSC vielversprechende Möglichkeiten sowohl in der Forschung zur Krankheitsentstehung sowie zur Implementierung zielgerichteter Medikamente als auch zur Herstellung individueller zellbasierter Therapien [36]. Um einzelne genetische Veränderungen ohne den Einfluss interindividueller epigenetischer Faktoren zu untersuchen, können entweder iPSC von erkrankten Patienten durch biomedizinische Methoden gentechnisch korrigiert oder Wildtyp iPSC mit einem krankheitsrelevanten Allel verändert werden [35]. Die jeweils unveränderte „gesunde“ und genetisch manipulierte „erkrankte“ Zelllinie können dann hinsichtlich des Einflusses einer einzelnen genetischen Veränderung untersucht und verglichen werden [35]. Da einige Erkrankungen – wie auch die JMML – auf die grundlegende Veränderung einiger weniger genetischer Informationen zurückzuführen sind, ist dies eine fortgeschrittene Methode Krankheitsentstehung und Therapiemöglichkeiten auf dem Boden von genetischen Veränderungen zu untersuchen [32]. Zellmodelle mit iPSC sind insbesondere für die Untersuchungen von monogenetischen Erkrankungen mit einer hohen Penetranz und einem frühen Erkrankungsbeginn geeignet [32]. Da es sich bei iPSC um immortalisierte Zellen handelt, eignen sie sich zur Durchführung von Medikamentenscreens [32]. Hierfür wird in der Regel eine große Zahl an Zellen benötigt. Diese kann häufig bei der Kultivierung von Patientenproben nicht erreicht werden [34]. Induzierte pluripotente Zellen hingegen können vervielfältigt und zum Screening eingesetzt werden.

### 1.2.2 iPSC zur Generierung immortalisierter JMML-Zelllinien

Die juvenile myelomonozytäre Leukämie ist eine relativ seltene Erkrankung mit einer Inzidenz von 1,2:1.000.000 Fällen pro Jahr [4]. Dies – sowie ihr ausschließliches Vorkommen in pädiatrischen Patienten – macht es insgesamt schwierig, eine suffiziente Menge an geeigneten primären Zellen für biomedizinische Untersuchungen zu erhalten [34]. Der charakteristische fehlende Reifungsblock der JMML-Zellen erschwert zudem die Herstellung von immortalisierten Zelllinien [3, 34]. Bisher ist es nicht gelungen, eine immortalisierte, kommerziell verfügbare JMML-Zelllinie zu kultivieren [34]. Demnach sind gentechnisch veränderte Mausmodelle (Xenografts) eine Alternative für biomedizinische Versuche an JMML-Zellen [34]. Limitierend sind hier allerdings – je nach eingebrachter genetischer Veränderung – die embryonale Letalität, eine fehlende hämatologische Expression der genetischen Variante oder die Bildung von Lymphomen in den Tieren [34]. Xenografts bieten viele verschiedene Untersuchungsmöglichkeiten wie epigenetische Untersuchungen, Medikamententestungen u.ä., allerdings sind sie aufwändig, teuer und schwierig einheitlich zu reproduzieren [34]. Mithilfe von Xenografts konnte in der Therapieforschung der JMML der überlegene Effekt des Antimetaboliten Azacitidin im Vergleich zu Cytarabin *in vivo* demonstriert werden [37].

Mit der Etablierung von iPSC – pluripotenten, immortalisierten Zellen – die die Fähigkeit besitzen in Zellen aller drei Keimblätter zu differenzieren, gelang demnach die Grundlage zur Herstellung von JMML-Zelllinien [31, 34]. 2013 konnten Gandre-Babbe et al. erstmalig iPSC-Zellen aus Knochenmarkzellen von JMML-Patienten mit somatischen *PTPN11* Mutationen generieren [38]. Sie legten dar, dass diese Zellen im Vergleich zur gesunden Kontrollzelllinie eine

gesteigerte Proliferation zeigten, sensibler auf die Stimulation mit GM-CSF reagierten, eine erhöhte STAT5/ERK Phosphorylierung aufwiesen und damit typische Charakteristika der JMML nachahmten [38]. Seitdem gab es einige Arbeiten, die sich mit der Herstellung von JMML-iPSC befassten und insbesondere iPSC mit *PTPN11* oder *CBL*-Mutationen untersuchten [27, 39, 40]. Aktuell fehlt es jedoch noch an Untersuchungen der anderen genetischen Veränderungen, die bei JMML vorkommen können: *KRAS*, *NRAS* und *NF1* [34].

### 1.2.3 iPSC zur Testung einzelner Inhibitoren zur Behandlung der JMML

Zur Testung von Inhibitoren für die Behandlung einzelner Erkrankungen ist in der Regel eine hohe Anzahl an teilungsfähigen und kultivierbaren Zellen notwendig. Die Nichtverfügbarkeit von geeigneten Zelllinien der JMML stellt hierbei ein entscheidendes Problem dar [34]. Die Implementierung von JMML-abgeleiteten iPSC bedeutete einen großen Fortschritt [27, 38]. In ihrer ersten, 2013 veröffentlichten Arbeit zu iPSC von JMML-Patienten stellten Gandre-Babbe et al. neben dem *proof-of-principle* auch dar, dass die JMML-abgeleiteten iPSC sensibler auf MEK-Inhibitoren (PD901) und Ruxolitinib reagierten als die gesunde Kontrolle [38]. Tasian et al. testeten 2017 verschiedene Kinaseinhibitoren an *PTPN11*- und *CBL*-mutierten iPSC und konnten ebenfalls eine erhöhte Sensitivität für MEK-Inhibitoren (PD901 und Trametinib) bei *PTPN11* mutierten iPSC zeigen [27]. Zudem ergab ihre Studie Hinweise auf die Effektivität von mTOR-Inhibitoren (Rapamycin) sowie dem PI3Kinase delta Inhibitor Idelalisib zur Behandlung der JMML [27].

Anhand einer Proteomanalyse von myeloischen Zellen, die durch die Differenzierung induzierter pluripotenter Stammzellen von Patienten mit Noonansyndrom mit *PTPN11*-Mutationen generiert wurden, konnten Pearson et al. 2020 TP53 und NF $\kappa$ b als potenzielle Inhibitortargets identifizieren [40]. Sie testeten u.a. CBL0137 und den Myc-Inhibitor JQ1 [40]. CBL0137 gehört zur Gruppe der Curaxine, *small molecules*, die TP53 aktivieren und NF $\kappa$ b inhibieren [41]. Eine Kombination der beiden Inhibitoren hatte in dieser Studie eine additive Wirkung und den größten zytotoxischen Effekt [40]. Trotz alledem ist es bislang nicht gelungen, zielgerichtete Therapien in die Behandlung der JMML zu integrieren und so einen Überlebensvorteil für die Patienten zu erreichen.

## 1.3 Ziele der Arbeit

Die juvenile myelomonozytäre Leukämie ist eine seltene, maligne Erkrankung des Kindesalters, die auch heute noch mit einer hohen Morbidität und Mortalität einhergeht [1]. Nach wie vor ist die allogene Stammzelltransplantation in vielen Fällen die einzige kurative Therapieoption [1]. JMML ist eine monogenetische Erkrankung, die in 90 % der Fälle durch eine Mutation in einem von fünf Genen ausgelöst wird (*NF1*, *KRAS*, *NRAS*, *PTPN11*, *CBL*) [7]. Obwohl dies ideale Bedingungen zur Implementierung zielgerichteter Therapien zu sein scheinen, ist es bis heute weitestgehend nicht gelungen, neue, effektive und zielgerichtete Behandlungsmethoden zu etablieren [7]. Begründet liegt dies unter anderem in dem Fehlen geeigneter immortalisierter JMML-Zelllinien [34], sodass Medikamententestungen bislang hauptsächlich auf Tiermodelle oder Patientenstudien beschränkt waren. Der Einsatz von immortalisierten und kultivierbaren iPSC ermöglichte neue Methoden und Teststrategien [27, 38, 40].

Das übergeordnete Ziel dieser Forschungsarbeit war die Herstellung und Testung geeigneter Zellmodelle für die JMML sowie die exemplarische Testung einzelner Wirkstoffe. Hierfür sollten zunächst geeignete Plasmide zur Überexpression einzelner JMML-spezifischer Gene (*NRAS*, *KRAS*, *PTPN11*) oder zur Herabregulation von *NF1* hergestellt und zunächst HEK293-Zellen damit transfiziert werden. Das Ziel eines *Drugscreenings* der HEK293-Zellen war es, die Methode zu etablieren und Konstrukte zu testen. Inhibitoren, die in den Untersuchungen von 180 Wirkstoffen vielversprechend erschienen, sollten gezielt in einem zweiten Schritt an transduzierten iPSC getestet werden.

Hierfür sollten zunächst kommerziell erhältliche iPSC von gesunden Individuen mit den zuvor hergestellten Plasmiden erfolgreich transduziert werden. Basis hierfür bildete die Etablierung der Zellkulturmethoden. Die Expression bzw. Herunterregulation der Gene sollte auf mRNA-Ebene und Proteinebene nachgewiesen werden. Gleichzeitig sollte auf mRNA-Ebene überprüft werden, dass die transduzierten iPSC auch nach genetischer Manipulation ihr Stammzellprofil exprimieren. Nachfolgend sollte außerdem nachgewiesen werden, dass sich die manipulierten iPSC weiterhin in hämatopoetische Vorläuferzellen differenzieren lassen.

In einem finalen Schritt sollten die erfolgreich manipulierten induzierten pluripotenten Stammzellen hinsichtlich ihres Ansprechens auf verschiedene Inhibitoren im Vergleich zur gesunden Kontrolle getestet werden. Die Auswahl der Inhibitoren sollte sich dabei einerseits an bereits etablierten und publizierten Wirkstoffen zur Behandlung der JMML orientieren sowie andererseits an dem Ergebnis des vorab durchgeführten *Drugscreens* der manipulierten HEK293-Zellen und an aktuell in der Literatur diskutierten zielgerichteten Wirkstoffen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

In den folgenden Kapiteln sind die verwendeten Materialien detailliert mit den jeweiligen Herstellerangaben aufgeführt. Alle hier nicht aufgeführten Materialien wurden, sofern nicht anders erwähnt, von Thermo Scientific (Rockford, IL, USA), Corning (New York, NY, USA) und Sigma Aldrich (Darmstadt, Deutschland) erworben. Für verwendete Puffer, Lösungen und Gele sind die genauen Zusammensetzungen angegeben.

#### 2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerät	Hersteller
ABI 3130 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Waltham, MA, USA
Bakterien-Inkubator	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Centromat BS-T Incubation Shaker	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
CFX Connect Real-Time System	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
CFX384 Touch TM Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Clean Bench Holten LaminAir	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
CO <sub>2</sub> -Inkubator (Thermo Forma)	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
D300e Digital Dispenser	TECAN, Männedorf, Schweiz
Flow Cytometer, CytoFlex	Beckmann Coulter, Brea, USA
Freezing container	Nalgene (Sigma Aldrich), Darmstadt, Deutschland
Gel Imaging System	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
GeneAmp PCR System 2700	Applied Biosystems, Waltham, MA, USA
Heraeus Multifuge 4KR	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
HERAfreeze Ultratiefkühlschrank	ThermoFischer, Waltham, USA
Herolab UVT 2035 Transilluminator 302nm	Herolab GmbH Laborgeräte, Wiesloch, Deutschland
Image Reader LAS-3000 mini	Fujifilm, Minato, Japan
IncuCyte S3 Live-Cell Analysis System	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
J2-HS Zentrifuge	Beckman Coulter, Brea, USA
Megafuge 1.0R	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Milli-Q-Plus-Reinstwasseranlage	Merck Millipore, Burlington, MA, USA
Mini-Sub cell GT electrophoresis cell	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Multidrop Combi Reagenzien-Dispenser	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Nano Drop ND-1000 Spectrophotometer	Peqlab, Erlangen, Deutschland

Orbital Shaker Rotamax 120	Heidolph, Schwabach, Deutschland
P25 Standard Power Pack	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Rolling Shaker SRT6	Stuart Equipments, Staffordshire, UK
SPARK 10M Multimode Microplate Reader	TECAN, Männedorf, Schweiz
The Mini-PROTEAN Tetra cell	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Thermal Shaker (Thermomixer comfort)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vi-CELL XR Cell Viability Analyzer	Beckman Coulter, Brea, USA
Vortex Mixer – Genie 2	Scientific Industries, Boheimia, NY, USA
ZEISS Axiovert 200 Mikroskop	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Zentrifuge	Neolab, Heidelberg, Deutschland

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller</b>
1536-Well Assay Platten, Flat Bottom	Corning, New York, NY, USA
384-Well Assay Platten, Flat Bottom	Corning, New York, NY, USA
384-Well PCR Plates	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
96-Well PCR Plates	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Cell Culture Dishes	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Cell Culture Flasks	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Cell Culture Multiwell Plates	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Cell Culture Multiwell Plates	Corning, New York, NY, USA
Conical Centrifuge Tube HIGH Speed, 40 ml	SPL Life Sciences, Naechon-Myeon, Korea
Cryogenic Vials	Corning, New York, NY, USA
D4 + Dispensehead Cassette	HP Inc., Palo Alto, CA, USA
EASYSTRAINER 40 µM	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Falcon 70µm Cell Strainer	Corning, New York, NY, USA
Falcons	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Immobilon-P PVDF Membrane	Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Injekt 20 ml, Luer-Ansatz	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Micro-Amp Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems, Waltham, MA, USA
Mini-PROTEAN TGX Gels (8-16 %)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Minisart High Flow Syringe Filter Polyethersulfone (0.22 µm und 0,45 µm)	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Parafilm M All-Purpose Laboratory Film	Bemis Company, Oshkosh, WI, USA
Pipette Tips	StarLab, Hamburg, Deutschland
Reaction Tubes	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Stripetten	Corning, New York, NY, USA
T8+ Dispensehead Cassettes	HP Inc., Palo Alto, CA, USA
Thermo Scientific Nalgene Rapid-Flow Sterile Einweg-Filtrationsgeräte mit SFCA-Membran (0,2 µm und 0,45 µm)	ThermoFischer, Waltham, USA
Vi-CELL XR Sample Vials	Beckman Coulter, Brea, USA
Whatman TM Gel Blotting Paper	GE Healthcare Life Sciences, Chalfont St. Giles, UK

### 2.1.2 Puffer und Lösungen

<b>Puffer / Lösung</b>	<b>Hersteller / Zusammensetzung</b>
0,05 % Trypsin-EDTA	Gibco by Life technologies, Carlsbad, USA
10 x Blotpuffer	30,1 g Tris-Base 144 g Glycin  Für 1 l 1x Blotting Puffer 100 ml 10x Blotpuffer 700 ml H <sub>2</sub> O 200 ml Methanol
10 x Lauf-Puffer	30,1 g Tris-Base 144 g Glycerin 10 g SDS  Für 1 l 1x Laufpuffer 100 ml 10x Laufpuffer 900 ml H <sub>2</sub> O
10 x TBS-T	24 g Tris-Base 88 g NaCl pH 7,6  Für 1 l 1x TBS-T 100 ml 10x TBS-T 900 ml H <sub>2</sub> O 0,5 ml Tween 20
50 x TAE Puffer	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
6 x Lämmli Puffer	1,2 g SDS Spatelspitze Bromphenol Blau 4,7 ml Glycerol 1 ml 1M Tris (pH 6,8)

	2,3 ml ddH <sub>2</sub> O 1 ml 0,5M DTT
Attractene Transfections Reagent	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing RR-100	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Blocking Solution	5 % BSA in 1x TBS-T
Cut Smart Puffer	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
DMEM	Gibco by Life technologies, Carlsbad, USA
DMEM/F-12	Gibco by Life technologies, Carlsbad, USA
FACS FLOW	Beckman Coulter, Brea, USA
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco by Life technologies, Carlsbad, USA
Fetal Bovine Serum (FBS)	Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Gel Loading Dye Purple (6x)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
GoTaq qPCR Master Mix	Promega, Fitchburg, USA
Hi-Di Formamide	Applied Biosystems, Waltham, MA, USA
Lyse-Puffer	RIPA Lysis and Extraction Buffer 25x Proteaseinhibitor 1000x DDT 0,5 M 100x Phosphatase Inhibitor
mFreSR	STEMCELL Technologies, Vancouver, B.C., Kanada
mTeSR1 Complete Kit (Basal Medium und Supplement)	STEMCELL Technologies, Vancouver, B.C., Kanada
NE-Puffer 2.1	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
PBS	Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland
PBS +CaCl <sub>2</sub> +MgCl <sub>2</sub>	Gibco by Life technologies, Carlsbad, USA
Penicillin-Streptomycin P4333	Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Phusion High-Fidelity PCR Master Mix	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Polyethylimin (PEI)	Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland
RIPA Lysis and Extraction Buffer	ThermoFischer, Waltham, USA
TrypLE Express (ohne Phenol Red)	Gibco by Life technologies, Carlsbad, USA
Versene Solution	Gibco by Life technologies, Carlsbad, USA

### 2.1.3 Chemikalien und Kits

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
Acryl/Bis Solution 30 %	VWR, Radnor, USA
Ammonium Persulfat (APS)	Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Ampicillin	Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Biozym LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Bovine Serum Albumin (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenol Blau	Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland
DTT 0,5M (1,4-Dithiothreitol)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Endotoxin-free TE Puffer	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Ethanol	VWR, Radnor, USA
Ethidium Bromid Solution	Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Glycerol	Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Halt Phosphatase Inhibitor, 100x	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Human recombinant Laminin-521 (LN521)	BioLamina AB, Sundbyberg, Schweden
Hydrogen Peroxide Solution	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Isopropanol	VWR, Radnor, USA
LB-Agar (Lennox)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
LB-Medium (Lennox)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	VWR, Radnor, USA
NaCl	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Nuclease-free Water	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Protease Inhibitor	Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz
Puromycin	Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland
SDS Pellets	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	MERCK, Darmstadt, Deutschland
Triton X-100	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trizma Base	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Tween 20	MERCK, Darmstadt, Deutschland

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>
Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Cellartis DEF-CS 100 Culture System	Takara Bio Europe AB, Göteborg, Schweden
Cellartis DEF-CS 500 Culture System	Takara Bio Europe AB, Göteborg, Schweden

CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay	Promega, Fitchburg, USA
Dye Ex 2.0 Spin Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Lenti-X Concentrator	Takara Bio Europe AB, Göteborg, Schweden
M-MLV Reverse Transcriptase (Enzym und Buffer Pack)	Promega, Fitchburg, USA
Monarch DNA Gel Extraction Kit	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
Monarch Plasmid Miniprep Kit	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
Pierce BCA Protein Assay	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Plasmid DNA Purification Nucleo Bond Xtra Maxi	Machery-Nagel, Düren, Deutschland
Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QuantiTect Reverse Transcription	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Rapid DNA Ligation Kit	Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz
RNEasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
STEMdiff Hematopoietic Kit	STEMCELL Technologies, Vancouver, B.C., Kanada
SYBR Green PCR Master Mix	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Vi-CELL Quad Pack Reagent Kit	Beckman Coulter, Brea, USA

#### 2.1.4 Gele

Gel	Verwendung	Zusammensetzung
Agarosegel	Kontrolle von PCR-Produkten	0,5 g Agarose 50 ml TAE Puffer 5 µl Ethidium Bromid Solution
Sammelgel	Western Blot	2,08 ml H <sub>2</sub> O 910 µl Tris (0,5 M) 467 µl Acrylamid (30 %) 35 µl APS 7,8 µl TEMED
12 % Trenngel	Western Blot (Ras)	3,3 ml H <sub>2</sub> O 2,5 ml Tris (0,5 M) 4 ml Acrylamid (30 %) 100 µl APS 4 µl TEMED

7,5 % Trenngel	Western Blot (NF1)	4,41 ml H <sub>2</sub> O 2,34 ml Tris (0,5 M) 2,25 ml Acrylamid (30 %) 90 µl APS 20 µl TEMED
----------------	--------------------	--

### 2.1.5 Antikörper

Primäre humane Antikörper	Isotyp	Molekulargewicht [kDa] des Targetproteins	Verdünnung	Hersteller
Anti-Ras	Kaninchen, IgG	21	1:1000	Cell Signaling, Cambridge, UK
Anti-MAPK p44/42 (ERK1/2)	Kaninchen, IgG	42, 44	1:1000	Cell Signaling, Cambridge, UK
Anti-MAP Kinase, aktiviert (Phospho-ERK1/2)	Maus, IgG	42, 44	1:1000	Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Anti-MEK1/2	Maus, IgG	45	1:1000	Cell Signaling, Cambridge, UK
Anti-Phospho-MEK1/2 (Ser217/221)	Kaninchen, IgG	45	1:1000	Cell Signaling, Cambridge, UK
Anti-Akt	Maus, IgG	60	1:1000	Cell Signaling, Cambridge, UK
Anti-Phospho-Akt (Ser 473)	Kaninchen, IgG	60	1:1000	Cell Signaling, Cambridge, UK
Anti-eEF2	Kaninchen, IgG	95	1:1000	Cell Signaling, Cambridge, UK
Anti-β-Actin	Maus, IgG	42	1:10.000	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Anti-KRAS (F234)	Maus, IgG	25	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA
Anti-NRAS (F155)	Maus, IgG	25	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA
Anti-SH-PTP2 (B-1) (PTPN11)	Maus, IgG	70	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA

Anti-Neurofibromin 1	Kaninchen, IgG	320	1:1000	Cell Signaling, Cambridge, UK
----------------------	----------------	-----	--------	-------------------------------

Sekundäre Antikörper	Kopplung	Verdünnung	Hersteller
Anti-Mouse	IgG, HRP-gekoppelter Antikörper	1:2000	Cell Signaling, Cambridge, UK
Anti-Rabbit	IgG, HRP-gekoppelter Antikörper	1:2000	Cell Signaling, Cambridge, UK

FACS-Antikörper	Konjugiertes Fluoreszenzmolekül	Hersteller
CD45	Chrome Orange	Beckmann Coulter, Brea, USA
SSEA-3 anti-human/mouse	FITC	BioLegend, San Diego, CA, USA
SSEA-4 anti-human	PE	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD34	APC	BioLegend, San Diego, CA, USA

#### 2.1.6 Plasmide

hUBC-dCas9-KRAB-T2a-puro	pLV hU6-sgRNA hUBC-dCas9-KRAB-T2a-Puro wurde von Charles Gersbach zur Verfügung gestellt (Addgene plasmid #71236) [42]
NF1-KRAB	NF1-KRAB wurde von Nan Qin (Pädiatrische Neuroonkologie, Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und Klinische Immunologie, Universitätsklinikum Düsseldorf) zur Verfügung gestellt
pMDLg/pRRE (125)	pMDLg/pRRE wurde von Didier Trono zur Verfügung gestellt (Addgene plasmid #12251) [43]
RSV-Rev (126)	pRSV-Rev wurde von Didier Trono zur Verfügung gestellt (Addgene plasmid #12253) [43]
pMD2.G (127)	pMD2.G wurde von Didier Trono zur Verfügung gestellt (Addgene plasmid #12259)
pCDH-CMV-MCS-EF1 $\alpha$ -Puro	System Biosciences, LLC, Palo Alto, CA, USA

## 2.1.7 Primer

<b>Primer – Klonierung</b>	<b>Sequenz (5' → 3')</b>	<b>Hersteller</b>
PTPN11_For	TAAGCAGCTAGCGCCACCAT- GACATCGCGGAGATGGTTTC	Eurofins Genomics Germany GmbH, Ebersberg, Deutschland
PTPN11_Rev	TAAGCAGGATCCTCT- GAAACTTTTCTGCTGTTGC	Eurofins Genomics Germany GmbH, Ebersberg, Deutschland
PTPN11_T73I_For	AAATTTGCCATTTTGGCT- GAGTTG	Eurofins Genomics Germany GmbH, Ebersberg, Deutschland
PTPN11_T73I_Rev	CTCCCCTCCATACAGGTC	Eurofins Genomics Germany GmbH, Ebersberg, Deutschland
NRAS_For	TAAGCAGCTAGCGCCACCAT- GACTGAG- TACAAACTGGTGGTG	Eurofins Genomics Germany GmbH, Ebersberg, Deutschland
NRAS_Rev	TAAGCAGGATCCCATCACCA- CACATGGCAATCC	Eurofins Genomics Germany GmbH, Ebersberg, Deutschland
nras mut g13d for	GGAGCAGGTGATGTTGG- GAAA	Eurofins Genomics Germany GmbH, Ebersberg, Deutschland
nras mut g13d rev	AACCACCACCAGTTTGTAC	Eurofins Genomics Germany GmbH, Ebersberg, Deutschland
KRAS_For	TAAGCAGCTAGCGCCACCAT- GACTGAATATAAACTTGTGG- TAGTTG	Eurofins Genomics Germany GmbH, Ebersberg, Deutschland
KRAS_Rev	TAAGCAGGATCCCATAATTA- CACACTTTGTCTTTGACTTC	Eurofins Genomics Germany GmbH, Ebersberg, Deutschland
kras mut g12d for	GTTGGAGCTGATGGCG- TAGGC	Eurofins Genomics Germany GmbH, Ebersberg, Deutschland
kras mut g12d rev	TACCACAAGTTTATATTCA- GTCATGGTG	Eurofins Genomics Germany GmbH, Ebersberg, Deutschland
EF1 for	CTCCACGCTTTGCCTGAC- CCTGCTT	Eurofins Genomics Germany GmbH, Ebersberg, Deutschland
wpre rev	CATAGCGTAAAAG- GAGCAACA	Eurofins Genomics Germany GmbH, Ebersberg, Deutschland
PTPN seq 2f	ATACCACTTTTCGGACCTGGC	Eurofins Genomics Germany GmbH, Ebersberg, Deutschland
PTPN seq 1f	CAAAGGGGAGAGCAAT- GACG	Eurofins Genomics Germany GmbH, Ebersberg, Deutschland
gNF1-3-fw	CACCGCGCGGCCAT- GTCCTCCCCG	Benchling, San Francisco, CA, USA
gNF1-3-rv	AAACCGGGGAGGACAT- GGCCGCGC	Benchling, San Francisco, CA, USA

<b>Primer – qPCR</b>	<b>Sequenz (5' → 3') / Bestellnummer</b>	<b>Hersteller</b>
Hs_NF1_1_SG	QuantiTect Primer Assay QT00065016	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Hs_KRAS_1_SG	QuantiTect Primer Assay QT00083622	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Hs_NRAS_1_SG	QuantiTect Primer Assay QT00076874	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Hs_PTPN11_1_SG	QuantiTect Primer Assay QT00070336	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Hs_B2M_1_SG	QuantiTect Primer Assay QT00088935	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Hs_GapDH_1_SG	QuantiTect Primer Assay QT00079247	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
hSLC7A11-1F	GCGTGGGCATGTCTCTGAC	Integrated DNA Technologies (IDT), Coralville, IA, USA
hSLC7A11-1R	GCTGGTAATGGACCA- AAGACTTC	Integrated DNA Technologies (IDT), Coralville, IA, USA
KLF4-f	CGATCAGAT- GCAGCCGCAAGTC	Integrated DNA Technologies (IDT), Coralville, IA, USA
KLF4-r	TGTG- TAAGGCGAGGTGGTCCGA	Integrated DNA Technologies (IDT), Coralville, IA, USA
OCT4-f	GTTGATCCTCGGAC- CTGGCTA	Integrated DNA Technologies (IDT), Coralville, IA, USA
OCT4-r	GGTTGCCTCTCACTCGGTTCT	Integrated DNA Technologies (IDT), Coralville, IA, USA
SOX2-f	GCCGAGTGGAAACTTTT- GTCG	Integrated DNA Technologies (IDT), Coralville, IA, USA
SOX2-r	GCAGCGTGTACTTATCCTT- CTT	Integrated DNA Technologies (IDT), Coralville, IA, USA
NANOG-f	GTCTTCTGCTGAGATGCCT- CACA	Integrated DNA Technologies (IDT), Coralville, IA, USA
NANOG-r	CTTCTGCGTCACACCATT- GCTAT	Integrated DNA Technologies (IDT), Coralville, IA, USA
hmox-f	CCCACGCCTACACCCGCTAC	Integrated DNA Technologies (IDT), Coralville, IA, USA
hmox-r	GGTGGCACTGGCAATGTTGG	Integrated DNA Technologies (IDT), Coralville, IA, USA
nqo1-f	GGGCAAGTCCATCCCAACTG	Integrated DNA Technologies (IDT), Coralville, IA, USA

nqo1-r	GCAAGTCAGG- GAAGCCTGGA	Integrated DNA Technologies (IDT), Coralville, IA, USA
Puro-f	CGCGCAGCAACAGATG- GAAG	Eurofins Genomics Germany GmbH, Ebersberg, Deutschland
Puro-r	GAAGCCGAGCCGCTCGTAG	Eurofins Genomics Germany GmbH, Ebersberg, Deutschland

### 2.1.8 Restriktionsenzyme

Enzym	Hersteller
<i>Nhe I</i>	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
<i>BamH I</i>	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
<i>BamH I HF</i>	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland

### 2.1.9 Zelllinien

Zelllinie	Zelltyp	Medium
HEK 293	Humane embryonische Nierenzellen	DMEM + 10 % FBS, 1 % Pen-Strep
HEK 293-T	Humane embryonische Nierenzellen	DMEM + 10 % FBS, 1 % Pen-Strep
CHiPSC12 (Cellartis Human iPS Cell Line 12)	Humane induzierte pluripotente Zellen	mTeSR 1
CHiPSC7 (Cellartis Human iPS Cell Line 7)	Humane induzierte pluripotente Zellen	mTeSR 1

Die HEK293-Zelllinien wurden von der Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH und die humanen induzierten pluripotenten Zelllinien (CHiPSC7 und CHiPSC12) von Takara Bio Europe AB, Göteborg, Schweden erworben. Die Zellen der Zelllinie CHiPSC7 wurden aus Hautfibroblasten einer 20-jährigen gesunden europäisch/nordafrikanischen Frau reprogrammiert. Zur Herstellung der Zelllinie CHiPSC12 wurden Hautfibroblasten eines gesunden 24-jährigen europäisch/nordafrikanischen Mannes genutzt.

### 2.1.10 Bakterienstämme

Der *Stb13 Chemically Competent E. coli*-Stamm wurde erworben bei der Firma Invitrogen, Karlsbad, CA, USA.

### 2.1.11 Inhibitoren

Im Folgenden sind ausschließlich Inhibitoren aufgeführt, deren Ansprechen für die iPSC getestet wurde. Eine Auflistung sämtlicher genutzter Inhibitoren ist im Anhang dieser Arbeit zu finden.

<b>Inhibitor</b>	<b>Hersteller</b>
5-Azacidin	MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ, USA
Dasatinib	MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ, USA
Dovitinib	MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ, USA
Rapamycin	MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ, USA
Ruxolitinib	MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ, USA
Selumetinib	MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ, USA
Trametinib	MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ, USA

Durch eine Verdünnung mit DMSO wurden alle Inhibitoren auf eine Ausgangskonzentration von 10 mM gebracht.

#### 2.1.12 Größenstandards

<b>Bezeichnung</b>	<b>Verwendungszweck</b>	<b>Hersteller</b>
Gene Ruler 100 bp Plus DNA Ladder	DNA-Größenstandard	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
PageRuler Prestained Protein Ladder	Protein Größenstandard 10-180 kDa	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Spectra Multicolor High Range Protein Ladder	Protein Größenstandard 40-300 kDa	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA

#### 2.1.13 Software

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
ApE (A plasmid Editor)	Freie Lizenz
CFX Manager Software	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Cytexpert	Beckmann Coulter, Brea, USA
D300e Control	HP Inc., Palo Alto, CA, USA
D300e Merge	HP Inc., Palo Alto, CA, USA
FILLit for Multidrop Combi 1.2.1	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, San Diego, CA, USA
Office	Microsoft, Redmond, WA, USA
R	Freie Lizenz
SPARKCONTROL Dashboard	TECAN, Männedorf, Schweiz
Zellcounter VI-CELL XR 2.03	Beckmann Coulter, Brea, USA
bioRender Student Plan	bioRender, Toronto, Kanada

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Isolation von RNA und Synthese von cDNA

Zur Kontrolle der Expression von Genen mittels *qPCR* oder zur Gewinnung von bestimmten DNA-Fragmenten aus HEK293-Zellen für die Klonierung neuer Plasmide wurde aus den Zellen zunächst RNA isoliert und diese in cDNA umgeschrieben. In Vorbereitung auf die Isolation von RNA wurden Zellpellets, wie in den Kapiteln 2.2.2.3 und 2.2.3.3 beschrieben, hergestellt. Anschließend wurde die RNA mit Hilfe des RNEasy Mini Kits (Qiagen) gemäß der Herstellerangaben isoliert und ihre Konzentration mit dem Nano Drop ND-1000 Spectrophotometer (PepqLab) ermittelt. Bei nicht sofortiger Verwendung wurde die RNA bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Anschließend wurden  $1\ \mu\text{g}$  (Qiagen) oder  $2\ \mu\text{g}$  (Promega) RNA mit dem QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) oder dem M-MLV Reverse Transcriptase Kit (Promega) nach Herstellerangaben umgeschrieben. Die cDNA wurde im Falle einer nicht sofortigen Verwendung einige Tage bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 2.2.1.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifizierung eines durch Primerpaare definierten DNA-Fragments wird die Methode der PCR genutzt. So können schließlich bestimmte Genregionen in einem Agarosegel nachgewiesen werden oder diese Abschnitte können mittels der Sangermethode sequenziert werden.

Abhängig von der Weiterverwendung der DNA-Fragmente wurden verschiedene PCR-Reaktionen angesetzt und verschiedene PCR-Programme genutzt. Der Ansatz und das Programm für die PCR vor der Sanger-Sequenzierung werden in Kapitel 2.2.1.8 detaillierter erläutert. Für die Amplifikation von Genregionen für die Klonierung (*KRAS*, *NRAS* und *PTPN11*) oder zur Überprüfung im Agarosegel wurde folgende Reaktion angesetzt:

cDNA	1 $\mu\text{l}$
Nukleasefreies $\text{H}_2\text{O}$	22 $\mu\text{l}$
Phusion High-Fidelity PCR Master Mix	25 $\mu\text{l}$
Primer 3'	1 $\mu\text{l}$
Primer 5'	1 $\mu\text{l}$

**Tabelle 2: Ansatz für die PCR die Amplifikation von Genregionen für die Klonierung oder zur Überprüfung im Agarosegel**

Für die Amplifikation von Genregionen für die Klonierung (*KRAS*, *NRAS* und *PTPN11*) oder zur Überprüfung im Agarosegel wurde die in Tabelle 2 aufgeführte Reaktion angesetzt.

Die Amplifizierung erfolgte in einem GeneAmp PCR System 2700 Thermocycler unter folgenden Bedingungen:

Temperatur [°C]	Zeit
98	5 Minuten
98	30 Sekunden
70	30 Sekunden
72	40 (60) Sekunden
98	30 Sekunden
58	30 Sekunden
72	40 (60) Sekunden
4	∞

}

32 Zyklen

}

14 Zyklen

}

**Tabelle 3: Programm für die PCR die Amplifikation von Genregionen für die Klonierung oder zur Überprüfung im Agarosegel**

Die Amplifizierung erfolgte in einem GeneAmp PCR System 2700 Thermocycler unter den in Tabelle 3 aufgeführten Bedingungen.

Zur Kontrolle der amplifizierten Fragmente wurden die PCR-Produkte auf ein Agarosegel geladen und aus diesem anschließend aufgereinigt. Zuweilen wurde nur ein Teil des Produktes im Agarosegel überprüft und das verbliebene PCR-Produkt nach Herstellerangaben mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt, um die im PCR-Puffer enthaltenen Salze zu entfernen. Die Konzentration und Reinheit der DNA wurden mit Hilfe des Nanodrops bestimmt.

### 2.2.1.3 Agarose-Gelelektrophorese und DNA-Gelextraktion

Durch eine Gelelektrophorese können die erzeugten PCR-Fragmente oder nach einem Restriktionsverdau entstandene DNA-Fragmente ihrer Größe entsprechend aufgetrennt werden. So kann anhand der Größe der Banden einerseits der Erfolg der Vorbehandlung (Restriktionsverdau, PCR) beurteilt werden und andererseits können entstandene DNA-Fragmente einer definierten Größe gezielt ausgeschnitten und eluiert werden.

Zunächst wurden einprozentige Agarosegele hergestellt, indem 0,5 g Agarose in 50 ml TAE Puffer gelöst und erhitzt wurden. Die anschließende Zugabe von 5 µl des Fluoreszenzfarbstoffs Ethidiumbromid ermöglicht eine spätere Sichtbarmachung der DNA durch Anregung mit UV-Licht, da es in die DNA interkaliert. Die Probe wurde mit Loading Dye (New England Biolabs) gemischt und es wurden je 10 µl der Probe in eine Geltasche gegeben. Außerdem wurde die Gene Ruler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific) als Größenstandard auf das Gel geladen. Die Auftrennung erfolgte bei 100 mA für 30 bis 60 Minuten. Anschließend wurden die aufgetrennten DNA-Fragmente mit Hilfe eines UV-Transilluminators (Gel Imaging System, Intas) visualisiert und analysiert. Sollten DNA-Fragmente aus dem Gel extrahiert werden, wurden die Banden in dem Herolab UVT 2035 Transilluminator sichtbar gemacht und ausgeschnitten. Für die Klonierung der Plasmide mit der gewünschten Ziel-Genregion wurden für *KRAS* und *NRAS* DNA-Fragmente mit einer Größe von 500 Basenpaaren und für *PTPN11* DNA-Fragmente mit einer Größe von 1800 Basenpaaren ausgeschnitten. Die Extraktion der DNA aus dem Gel erfolgte entsprechend der Herstellerangaben mit dem Monarch DNA Gel Extraction Kit (New England Biolabs). Konzentration und Reinheit der DNA wurden anschließend mit dem Nanodrop-Spectrophotometer bestimmt.

#### 2.2.1.4 Restriktionsendonuklease-Verdau

Für diese Arbeit sollten die Zielgene *KRAS*, *NRAS* und *PTPN11* in einen puromycinresistenten Vektor (pCDH-Empty-Puro-Vektor) eingebracht werden. Um die PCR-Produkte von *KRAS* und *NRAS* sowie den Vektor zu schneiden, wurde folgender Ansatz zum Restriktionsverdau angesetzt und zu einem Volumen von 50 µl mit nukleasefreiem H<sub>2</sub>O normalisiert:

DNA	1 µg
Cut Smart Puffer	5 µl
<i>Nhe I</i>	1 µl
<i>BamH I HF</i>	2 µl

**Tabelle 4: Ansatz für den Restriktionsverdau der PCR-Produkte von *KRAS* und *NRAS***

Der Ansatz wurde genutzt, um die PCR-Produkte von *KRAS* und *NRAS* und den Vektor zu schneiden. Es wurde mit nukleasefreiem Wasser auf 50 µl normalisiert.

Um eine frühzeitige und unspezifische Aktivität der Enzyme zu verhindern, wurde stets auf Eis gearbeitet. Das Reaktionsgemisch wurde für 15 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend zur Überprüfung auf ein Agarosegel geladen. Hieraus wurden die geschnittenen DNA-Fragmente extrahiert und in einer Ligationsreaktion zu den entsprechenden Zielplasmiden verbunden.

Zum Restriktionsverdau von *PTPN11* und dem Vektor wurde folgendes Reaktionsgemisch auf Eis angesetzt und durch die Zugabe von nukleasefreiem H<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 50 µl gebracht:

DNA	1 µg
NE-Puffer 2.1	5 µl
<i>Nhe I</i>	1 µl

**Tabelle 5: Ansatz für den Restriktionsverdau der PCR-Produkte von *PTPN11***

Der Ansatz wurde genutzt, um die PCR-Produkte von *PTPN11* und den Vektor zu schneiden. Es wurde mit nukleasefreiem Wasser auf 50 µl normalisiert.

Das Gemisch wurde für 15 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend durch Zugabe von 0,5 µl 5M NaCl-Lösung der Salzgehalt im Puffer für das folgende Enzym angepasst. Es wurde 1 µl des Enzyms BamH I dazugegeben, das Reaktionsgemisch wurde gemischt und erneut für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Überprüfung der Fragmente erfolgte über ein Agarosegel. Anschließend wurden die DNA-Fragmente aus dem Gel extrahiert und in einer Ligationsreaktion zu dem entsprechenden Zielplasmid verbunden.

#### 2.2.1.5 Ligation

Nach dem Verdau des Vektors und der zu inserierenden DNA mit Hilfe von Restriktionsenzymen, wurden die DNA Fragmente durch eine Ligase verbunden. Der Vektor und das PCR-Produkt wurden in einem molaren Verhältnis von 1:3 eingesetzt. Die Ligationsreaktion wurde mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kits (Hoffmann-La Roche) entsprechend der Angaben des Herstellers durchgeführt. Die entstandenen Plasmide wurden anschließend per Transformation

in Bakterien eingebracht und so vervielfältigt. Nach der Isolation aus den Bakterien wurde die Sequenz des Plasmids durch eine Sanger-Sequenzierung auf Korrektheit überprüft. Die so hergestellten Plasmide konnten zur Expression des jeweiligen Wildtyp-Gens sowohl in den HEK293-Zellen als auch in den iPS-Zellen verwendet werden.

#### 2.2.1.6 Mutagenese

Um nicht bloß eine Wildtyp-Variante, sondern auch eine spezifische mutierte Variante der jeweiligen Gene herzustellen, wurden die hergestellten Plasmide mit Hilfe einer Mutagenesereaktion verändert. Es wurden jeweils 25 ng der Plasmid-DNA mit Hilfe des Q5 Site-Directed Mutagenesis Kits (New England Biolabs) nach Herstellerangaben mit den, die Mutation beinhaltenden Primern und den weiteren Reagenzien gemischt. Die PCR wurde den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt. In einem zweiten Schritt wurde die nicht-mutierte Ausgangs-DNA mit Hilfe des Restriktionsenzym DpnI zerschnitten und so eliminiert. Das Reaktionsgemisch für diesen Schritt wurde ebenfalls den Herstellerangaben entsprechend hergestellt und inkubiert. Anschließend wurden 5 µl der entstandenen mutierten Plasmid-DNA mittels Transformation in Bakterien eingebracht und vervielfältigt. Das Vorliegen der Mutation wurde nach der Isolierung der DNA aus den Bakterien mit Hilfe einer Sanger-Sequenzierung verifiziert. Die so hergestellten Plasmide wurden verwendet, um die mutierte Genvariante sowohl in 293-HEK-Zellen als auch in iPS-Zellen zu exprimieren.

#### 2.2.1.7 Transformation

Die Transformation chemokompetenter Bakterien ist eine etablierte Methode, um exogene DNA in Bakterien einzubringen. Hierfür wurden zunächst Agar-Platten vorbereitet. LB-Agar wurde entsprechend der Herstellerangaben in 1000 ml Wasser gelöst und anschließend autoklaviert. Nach Abkühlen auf etwa 50°C wurde das Antibiotikum (100 µg/ml Ampicillin) hinzugefügt und Petrischalen mit Agar beschichtet. Die Platten wurden bis zur Nutzung bei 4°C gelagert.

Vor der Transformation wurden die *Stb13 Chemically Competent E. coli* Bakterien 30 Minuten auf Eis aufgetaut und die Agarplatten auf Raumtemperatur erwärmt. Anschließend wurden etwa 100 ng DNA zu 100 bis 200 µl der Bakterienlösung in einem 2 ml Reaktionsgefäß gegeben. Die Lösung wurde vorsichtig vermischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 45 Sekunden bei 42°C in einem Thermomixer (Eppendorf). Die Proben wurden zwei Minuten auf Eis heruntergekühlt und schließlich 45 Minuten bei 37°C und 220 rpm in 1 ml antibiotikafreiem LB-Medium in einem Thermomixer inkubiert. Dieser Wachstumsschritt stellt sicher, dass die Bakterien ausreichend Zeit haben, Proteine zur Antibiotikaresistenz zu generieren. So sind sie in der Lage, auf einer antibiotikahaltigen Platte unmittelbar zu wachsen. Ein Viertel bis ein Drittel der Menge (250 bis 300 µl) wurde auf einer antibiotikahaltigen Agar-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C wachsen gelassen. Die antibiotikahaltige Platte stellt sicher, dass sich nur Kolonien formen können, die erfolgreich mit dem die Antibiotikaresistenz codierenden Plasmid transformiert wurden.

Mehrere Einzelkolonien wurden schließlich von der Platte mit Hilfe einer Mikropipettierspitze geerntet und in je ein 15 ml-Röhrchen mit 5 ml antibiotikahaltigem LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) überführt. Diese Kolonien wurden erneut etwa zehn bis zwölf Stunden bei 37°C

und 220 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA gemäß Herstellerangaben mit dem Monarch Plasmid Miniprep Kit (New England Biolabs) isoliert und sequenziert. Zur Vervielfältigung der Kolonien und damit auch der Plasmid-DNA wurde ein Milliliter der gewachsenen Kolonie erneut in einem sterilen Kolben mit 200 ml antibiotikahaltigem Medium über Nacht bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde dann gemäß Herstellerangaben mit Hilfe des Plasmid DNA Purification Nucleo Bond Xtra Maxi Kits (Machery-Nagel) isoliert und aufgereinigt. Die DNA-Konzentration und Reinheit wurden mit Hilfe des Nano Drop ND-1000 Spectrophotometer (Peqlab) ermittelt.

### 2.2.1.8 Sanger-Sequenzierung

Sollte die Basenabfolge der amplifizierten DNA-Fragmente durch eine Sanger-Sequenzierung überprüft werden, wurden zunächst folgende PCR-Ansätze mit den Primern EF1 for und wpre rev und für die *PTPN11*-Plasmide zusätzlich mit den Primern PTPN11 seq 2f und PTPN11 seq 1f zur Kettenabbruchsynthese hergestellt:

Big Dye Terminator	4 µl
Primer	0,5 µl
DNA	0,5 µl
Nukleasefreies H <sub>2</sub> O	15 µl

**Tabelle 6: Ansatz für die PCR die Amplifikation von Genregionen für die Sanger-Sequenzierung**

PCR-Ansätze zur Kettenabbruchsynthese mit den Primern EF1 for und wpre rev und für die *PTPN11*-Plasmide zusätzlich mit den Primern PTPN11 seq 2f und PTPN11 seq 1f.

Mit Hilfe eines Thermocyclers wurde die Amplifikation unter den nachfolgend genannten Bedingungen durchgeführt:

Temperatur [°C]	Zeit
96	1 Minute
96	10 Sekunden
55	50 Sekunden
60	4 Minuten
4	∞

26 Zyklen

**Tabelle 7: Programm für die PCR die Amplifikation von Genregionen für die Sanger-Sequenzierung**

Bedingungen für die Amplifikation für die Sanger-Sequenzierung im Thermocycler.

Anschließend wurde das PCR-Produkt mit Hilfe des Dye Ex 2.0 Spin Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt und in einem Volumenverhältnis von 1:1 mit Hi-Di gemischt. Hi-Di verhindert eine erneute Bildung von Doppelsträngen. Der Reaktionsmix wurde in Micro-Amp Optical 96-Well Reaction Plates geladen und die Sanger-Sequenzierung mit Hilfe des ABI 3130 Genetic Analyzer (beides Applied Biosystems) durchgeführt. Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden anschließend mit Hilfe der ApE-Software überprüft.

### 2.2.1.9 Quantitative Echtzeit Polymerasekettenreaktion (qPCR)

Bei der qPCR (auch *Realtime-PCR*) ist neben der Amplifizierung eines DNA-Fragmentes durch Zugabe von z. B. *BRYT Green Dye* (GoTaq qPCR Master Mix, Promega) auch eine Quantifizierung der DNA-Abschnitte möglich. Es wurden folgende Reaktionsgemische je nach Größe der gewählten Platte angesetzt:

Reagenzien	Menge 96-Well Platte	Menge 384-Well Platte
GoTaq qPCR Master Mix	12,5 µl	5 µl
Primer (3' und 5')	2,5 µl	1 µl
Nukleasefreies H <sub>2</sub> O	9 µl	3 µl
DNA	1 µl	1 µl

**Tabelle 8: Ansatz für die qPCR die Amplifikation sowie Quantifizierung von DNA-Abschnitten**

Reaktionsgemische je nach Größe der ausgewählten Platte (96-Well oder 384-Well Platte).

Die Reaktionsgemische wurden in eine 96-Well oder 384-Well PCR Platte gegeben und mit Hilfe des CFX Connect Real-Time Systems oder des CFX384 Touch TM Real-Time PCR Detection Systems sowie der CFX Manager Software (alles Bio-Rad Laboratories) analysiert und ausgewertet.

## 2.2.2 Zellbiologische Methoden: HEK293-Zellen

### 2.2.2.1 Zellkultur

Um Kontaminationen mit Bakterien oder Pilzen zu vermeiden, erfolgte die Kultivierung der Zellen unter sterilen Bedingungen. Alle Arbeiten wurden an speziellen Sterilbänken durchgeführt und es wurden ausschließlich sterile Zellkulturmaterialien verwendet. Die verwendeten Zelllinien wurden in einem Inkubator bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> Konzentration kultiviert. Es wurde DMEM-Medium mit 10 % FCS-Anteil und 1 % Penicillin-Streptomycin-Anteil genutzt. Alle Zellkulturmaterialien wurden vor der Benutzung auf Raumtemperatur erwärmt.

Die HEK293-Zelllinien wurden in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen kultiviert und wenn sie ca. 90 % adhärent waren, geteilt. Für die Teilung wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 5 ml PBS vorsichtig gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml 0,05 % Trypsin-EDTA gelöst. Das erfolgreiche Lösen der adhärent wachsenden Zellen wurde mikroskopisch überprüft. Nach erfolgter fünf-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen mit 4 ml Medium ab gespült, um die Protease-Funktion des Trypsins zu inhibieren und ein geeignetes Volumen für das Passagieren der Zellen zu erreichen. Zum Separieren der Zellen wurde die Suspension mehrfach mit einer geeigneten Stripette resuspendiert. Zur Weiterkultivierung wurde eine Volumenmenge von 1/15 bis 1/30 der Zellsuspension in eine neue Zellkulturflasche überführt und diese mit der geeigneten Menge Medium (15 ml / 75 cm<sup>2</sup> Flasche) aufgefüllt. Nach erfolgter Transfektion wurden Puromycin-resistente Zelllinien mit 2 µg Puromycin / ml Medium behandelt.

#### 2.2.2.2 Kryokonservierung

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen wie im vorherigen Kapitel beschrieben von dem Boden der Zellkulturflasche gelöst. Die gelöste Zellsuspension wurde in ein 15 ml-Röhrchen überführt und fünf Minuten bei 500 x g zentrifugiert, um eine Sedimentation der Zellen herbeizuführen. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet in 2 ml FCS mit 10 % DMSO aufgenommen. Jeweils 1 ml der Zellsuspension wurde in ein Kryokonservierungsröhrchen überführt. Diese wurden in einem Gefrierbehälter mit Isopropanol, „Mr. Frosty“, 24 Stunden bei -80°C gelagert. Der Gefrierbehälter stellt sicher, dass die Zellsuspension mit einer Geschwindigkeit von 1°C pro Minute herunterkühlt und verhindert so eine Kristallisierung und Ruptur der Zellen. Für eine Kurzzeitlagerung wurden die Zellen in einem -80°C Kühlschrank gelagert. Die langfristige Lagerung erfolgte bei -196°C in flüssigem Stickstoff.

Zum Auftauen der Zellen wurden diese in ein 37°C Wasserbad gegeben und anschließend in ein 15 ml-Röhrchen mit vorgelegtem Medium überführt. Nach einer fünf-minütigen Zentrifugation bei 500 x g konnte nach der Sedimentation der Zellen der DMSO-haltige Überstand abgenommen werden. Das entstandene Zellpellet wurde in frischem Medium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche überführt.

#### 2.2.2.3 Herstellung und Lagerung von Zellpellets

Zur Herstellung von Zellpellets wurden die Zellen wie zuvor beschrieben von dem Boden der Zellkulturflasche gelöst. Anschließend wurden 2 ml der Zellsuspension in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Zellsuspension wurde fünf Minuten bei 500 x g zentrifugiert, um eine Sedimentation der Zellen herbeizuführen. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet wurde bei -80°C gelagert. Zur Gewinnung von RNA aus dem Zellpellet wurde das Pellet vor der Lagerung bereits in einer nach Herstellerangaben geeigneten Menge RLT-Lyse-Puffer aus dem RNEasy Mini Kit (Qiagen) aufgenommen.

#### 2.2.2.4 Transfektion

Zur stabilen Transfektion der HEK293-Zellen wurde eine *Fast-Forward* Transfektion mit Attractene in einer *Microwell*-Platte mit sechs *Wells* (Schalen) durchgeführt. In einem Reaktionsgefäß wurden hierzu 0,4 µg der jeweiligen Plasmid-DNA mit DMEM ohne FCS und Antibiotikum zu einer 60 µl Lösung vermischt. Die verwendeten Plasmide trugen ein Puromycinresistenzgen. Dieser Lösung wurden 1,5 µl Attractene zugegeben und der Mix wurde gevortext, um eine gute Vermischung der Reagenzien sicherzustellen. Zur Bildung der Transfektions-Komplexe wurde das Reaktionsgemisch 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubationszeit wurden die Zellen von dem Boden der Zellkulturflaschen gelöst und in vollständigem Medium (mit FCS und Antibiotika) aufgenommen. Die Zellzahl der Suspension wurde mit Hilfe des Zellzählers Vi-CELL XR Cell Viability Analyzer bestimmt und die Zelldichte auf  $2 \times 10^5$  Zellen / ml Medium eingestellt. Pro *Well* wurden 2 ml der Zellsuspension ausplattiert und mit der hinzugegebenen Transfektions-Lösung vermischt. Anschließend wurden die Zellen 24 Stunden bei 37°C in einem Zellkulturinkubator inkubiert. In einem nächsten Schritt wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 2 ml PBS gewaschen und 1 ml 0,05 % Trypsin + EDTA hinzugefügt. Nach einer fünf-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Pro-

tease-Reaktion mit 2 ml Medium gestoppt und die Zellsuspension in ein 15 ml-Röhrchen überführt. Zur Sedimentation der Zellen wurde die Suspension für fünf Minuten bei 500 x g zentrifugiert und anschließend der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wurde in 2 ml frischem Medium mit 2 µg / ml Puromycin aufgenommen und in 6-Well Platten ausplattiert. So sollte eine Selektionierung von transfizierten Zellen erfolgen und damit eine stabile Transfektion gewährleistet werden. Die optimale Puromycinkonzentration wurde zuvor durch eine Puromycin-Verdünnungsreihe (0 bis 20 µg / ml Medium) mit nicht transfizierten 293-HEK-Zellen bestimmt. Zur Überprüfung der gelungenen Transfektion wurde eine quantitative *Realtime*-PCR für die Expression der Zielgene durchgeführt. Anschließend wurde zudem die Expression der Proteine mit Hilfe eines Western Blots beurteilt.

#### 2.2.2.5 Virusproduktion

Für die Produktion von Viruspartikeln zur Transduktion der iPS-Zelllinien wurden 293T-HEK-Zellen in 15 cm Zellkulturplatten ausgesät, sodass sie am folgenden Tag eine Konfluenz von 50 % erreichten. Zur Vorbereitung auf die Transfektion mit den Verpackungsplasmiden pMDLg/pRRE, RSV-Rev, pMD.G sowie dem jeweiligen Zielplasmid wurden folgende Lösungen (pro zu transfizierende Platte) hergestellt:

Lösung A	2 ml DMEM (- / -) 1 µl Polyethylimin (PEI)
Lösung B	2 ml DMEM (- / -) 14 µg pMDLg/pRRE 5,5 µg RSV-Rev 3 µg pMD2.G 14 µg Zielplasmid

**Tabelle 9: Transfektionsmischung für eine zu transfizierende Platte (15 cm)**

Zur Vorbereitung auf die Transfektion mit den Verpackungsplasmiden pMDLg/pRRE, RSV-Rev, pMD.G sowie dem jeweiligen Zielplasmid wurden die Lösungen A und B (pro zu transfizierende Platte) hergestellt.

Lösung A wurde zu Lösung B gegeben und die Mischung nachfolgend für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 7 ml DMEM mit 15 % FCS und 1 % Penicillin-Streptomycin zu der Lösung gegeben. Das Medium wurde von den Zellkulturplatten abgenommen und die Transfektionsmischung vorsichtig auf die Zellen gegeben. Nach 16 bis 24 Stunden wurde das Medium gewechselt.

Die Konzentrierung des hergestellten Virus erfolgte auf zwei unterschiedliche Weisen:

1. Bei der Herstellung von Viren für die Wildtyp- und Mutationsvarianten von *KRAS*, *NRAS* und *PTPN11* sowie von der Kontrolle wurde der virusenthaltende Mediumüberstand 72 Stunden nach der Transfektion gesammelt und durch einen 0,45 µm Filter gegeben. Anschließend wurde der Überstand in ein Ultrazentrifugations-Röhrchen überführt und bei 4°C mit 11.000 rpm für 120 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das entstandene Viruspellet sehr vorsichtig mit PBS abgespült. Anschließend wurde das Viruspellet in einem Milliliter mTeSR 1 aufgenommen und je 300 µl Viruslösung wurden für die Transduktion eines *Wells* (6-Well-Platte) auf die Zellen gegeben.

- Um die Viren für den *Knockdown* von *NF1* und die KRAB-Kontrolle zu konzentrieren, wurde der virusenthaltende Mediumüberstand 48 Stunden nach der Transfektion gesammelt und durch einen 0,45 µm Filter gegeben. Die Platte wurde erneut mit 10 ml frischem Medium versehen. Der virusenthaltende Mediumüberstand wurde 72 Stunden nach der Transfektion gesammelt und ebenfalls durch einen 0,45 µm Filter gegeben. Die gefilterten Überstände wurden in einem 50 ml-Röhrchen gepoolt und in einem Volumenverhältnis von 3:1 mit Lenti-X Konzentrator durch Schwenken des Röhrchens gemischt. Die Mixtur wurde eine Stunde bei 4°C inkubiert und anschließend 45 Minuten bei 4°C mit 1.500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und das entstandene Viruspellet sehr vorsichtig mit einem Milliliter PBS gewaschen, ohne dabei das Pellet zu resuspendieren. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 4°C mit 1.500 x g für zehn Minuten, um den verbliebenen Überstand anschließend erneut abnehmen zu können. Das Pellet wurde in 200 µl PBS resuspendiert. Das zu transduzierende Volumen pro *Well* wurde dem Zielplasmid angepasst und betrug 80 µl. Erfolgte die Transduktion nicht unmittelbar, wurde der Virus in ein Kryokonservierungsröhrchen überführt und bei -80°C gelagert.

#### 2.2.2.6 Hochdurchsatzmedikamentenscreening

Das Wirkstoff-Ansprechen der transfizierten HEK293-Zellen wurde mit Hilfe einer Hochdurchsatz-*Drugscreening* Plattform getestet [44]. Eine Liste aller getesteten Wirkstoffe kann dem Anhang der Arbeit entnommen werden. Die Wirkstoffe wurden zunächst mit dem D300e Digital Dispenser entsprechend der Betriebsanleitung auf 1536-*Well*-Platten ausgegeben. Die dafür genutzte Vorlage wurde zuvor mit der D300e Control Software gestaltet. Der Konzentrationsverlauf zwischen 5 nM und 25 µM erfolgte logarithmisch und alle Wirkstoffkonzentrationen wurden mit DMSO volumennormalisiert. Nach erfolgter Ausgabe der Wirkstoffe auf die Platten wurden diese mit Parafilm steril verschlossen und bei -80°C bis zur Benutzung gelagert.

Die Platte mit den Wirkstoffen wurde vor der Benutzung etwa eine Stunde bei Raumtemperatur erwärmt. In dieser Zeit wurden die Zellen mit Trypsin gelöst und die Zellzahl mit Hilfe des Zellzählers (Vi-CELL XR Cell Viability Analyzer) bestimmt. Es wurde eine Suspension mit einem Volumen von 20 ml Medium mit einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen / ml hergestellt. Mit Hilfe des Multidrop Combi Reagenzien-Dispensers mit der FILLit for Multidrop Combi 1.2.1 Software wurde die gewünschte Menge an Zellen (4000 Zellen in 4 µl Medium pro *Well*) auf die Platte gegeben. Die Zellen wurden anschließend 72 Stunden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> in einem Inkubator mit den Wirkstoffen inkubiert.

Um die Anzahl viabler Zellen zu ermitteln, wurde nach erfolgter Inkubation das vorhandene ATP mit Hilfe des CellTiterGlo Luminescent Cell Viability Assay (Promega) quantifiziert. Das CellTiterGlo Reagenz wurde nach Herstellerangaben vorbereitet. Etwa 30 Minuten vor der Durchführung des CellTiterGlo Luminescent Cell Viability Assays wurden die Zellen bei Raumtemperatur inkubiert, um Kondensationsvorgänge beim Mischen der Zellsuspension mit dem kälteren Reagenz zu vermeiden. Das vorbereitete CellTiterGlo Reagenz wurde mit Hilfe des Multidrop Combi Reagenzien-Dispenser zu je 4 µl pro *Well* auf die Platte gegeben. Es folgte eine lichtabgeschirmte Inkubationszeit von 12 Minuten bei Raumtemperatur, um ein stetiges

Lumineszenz-Signal sicherzustellen. Das Lumineszenz-Signal wurde mit dem SPARK 10M Multimode Microplate Reader (TECAN) gemessen und mit dem SPARKCONTROL Dashboard (TECAN) ausgewertet.

### 2.2.3 Zellbiologische Methoden: iPS-Zellen

Die erworbenen iPS-Zelllinien (Takara Bio Europe) wurden zunächst nach Herstellerprotokoll aufgetaut, in DEF-CS Medium auf DEF-CS COAT1 kultiviert und mit TrypLE gelöst. Nach zwei bis drei Passagen wurden die Zellen auf eine Kultivierung mit mTeSR 1 und einer Laminin-521 Beschichtung umgestellt und mit Versene Solution gelöst.

#### 2.2.3.1 iPS-Zellkultur

Die Kultivierung der Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen an speziellen Sterilbänken mit sterilen Zellkulturmaterialien, um Kontaminationen mit Bakterien oder Pilzen zu vermeiden. Die verwendeten Zelllinien wurden in einem Inkubator bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Zur Kultivierung wurde das Medium mTeSR 1 (STEMCELL Technologies) genutzt, welches aus dem Basalmedium und Zusätzen besteht. Nach dem Mischen beider Bestandteile wurde das Medium durch eine Porengröße von 0,2 µm filtriert, um durch absolute Sterilität auf die Zugabe von Antibiotika verzichten zu können. Alle Zellkulturmaterialien wurden vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur erwärmt.

Routinemäßig wurden die Zellen in einer *6-Well*-Platte kultiviert und alle vier bis sechs Tage geteilt. Tägliche Medium-Wechsel wurden durchgeführt. Um den optimalen Zeitpunkt zur Teilung festzustellen, wurden die Zellen täglich im Mikroskop kontrolliert. Sowohl eine zu häufige Teilung als auch ein Überwachsen der Kolonien führen bei induzierten pluripotenten Zellen zu einem erhöhten Zellstress. Dieser geht mit einer erhöhten Differenzierungsrate der Kolonien und einer niedrigeren Ertragsrate der Zellen nach der Teilung einher. Sobald die Kolonien groß waren und sich im Zentrum verdichtet hatten, wurden die Zellen geteilt.

Mindestens zwölf Stunden vor der Zellteilung wurden geeignete Mengen an Zellkulturplatten mit der Protein-Matrix Laminin-521 (BioLamina) beschichtet. Dafür wurde das Protein-Gemisch zu einer Konzentration von 5 µg / ml mit PBS +CaCl<sub>2</sub> + MgCl<sub>2</sub> verdünnt. Von der Lösung wurde je 1 ml in ein *Well* gegeben und durch leichtes Schwenken der Platte gleichmäßig verteilt. Anschließend wurden die Platten mit Parafilm verschlossen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach einer zwölfstündigen Inkubation wurden die Platten entweder direkt verwendet oder für höchstens vier Wochen bei 4°C gelagert. Um die Platten für das Teilen der Zellen vorzubereiten, wurde der PBS-Überstand zunächst abgenommen. Anschließend wurde die passende Menge Medium (meist zwei Milliliter) in jedes zu verwendende *Well* vorgelegt.

Für die Teilung der Zellen wurde das Medium abgesaugt und jedes *Well* mit einem Milliliter PBS gewaschen. Anschließend wurde je ein Milliliter des Chelatbildners Versene (EDTA-Lösung) auf die Zellen gegeben. Nach einer fünf-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die Versene Lösung abgenommen und die Zellen mit einem Milliliter Komplett-Medium durch vorsichtiges Abspülen mechanisch gelöst. Hierbei galt es möglichst wenig zu resuspendieren, um Zellsphären zu erhalten und eine Einzelzellbildung zu vermeiden. Anschließend wurde das passende Volumen Zellsuspension je nach *Well*-Größe in bereits vorbereitete *Wells*

überführt. Zumeist wurden die Zellen in einem Volumenverhältnis von 1/10 bis 1/20 geteilt. Bei einer hohen Differenzierungsrate in der Zellpopulation wurden höhere Teilungsverhältnisse von 1/20 bis 1/30 bevorzugt.

#### 2.2.3.2 Kryokonservierung

Die Zellen wurden kryokonserviert, sobald der Zeitpunkt zum Teilen der Zellen erreicht wurde. Aus je einem *Well* wurde ein Kryokonservierungsröhrchen mit einem Milliliter Zellsuspension hergestellt. Die Zellen wurden dafür wie zuvor beschrieben gewaschen und mit Versene behandelt. Nach der Inkubation mit der Versene Lösung wurde diese wieder entfernt und die Zellen wurden mit 90 % FCS + 10 % DMSO abgespült und in die Röhrchen überführt. Um eine serumfreie Zellkultur zu gewährleisten und damit Differenzierungsprozesse zu vermeiden, wurde im Laufe der Arbeit das Einfriermedium aus FCS und DMSO durch mFreSR (STEMCELL Technologies) ersetzt. Das Vorgehen zur Kryokonservierung erfolgte identisch.

Nach der Überführung in die Kryokonservierungsröhrchen wurden die Zellen in einem Gefrierbehälter mit Isopropanol („*Mr. Frosty*“) für 24 Stunden bei -80°C gelagert. Für eine Kurzzeitlagerung wurden die Zellen in einem -80°C Kühlschrank gelagert. Die langfristige Lagerung erfolgte bei -196°C in flüssigem Stickstoff.

Die Zellsuspension wurde durch Wärmen in den behandschuhten Händen zügig aufgetaut und in ein 15 ml-Röhrchen mit vorgelegtem Medium überführt. Es erfolgte eine fünf-minütige Zentrifugation bei 300 x g. Während der Zentrifugation wurden frische, mit Laminin-521 beschichtete Platten vorbereitet. Der Überstand wurde nach der Zentrifugation abgenommen und das entstandene Zellpellet in frischem Medium aufgenommen und in vorbereitete Platten überführt.

#### 2.2.3.3 Herstellung und Lagerung von Zellpellets

Zur Herstellung von Zellpellets wurden die Zellen mit Versene gelöst. Anstelle des Mediums wurde PBS zum Abspülen der Zellen verwendet. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Zellsuspension wurde für fünf Minuten bei 400 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet bei -80°C gelagert. Zur Gewinnung von RNA aus dem Zellpellet wurde das Pellet vor der Lagerung bereits in einer geeigneten Menge (350 µl) RLT-Lyse-Puffer aus dem RNEasy Mini Kit (Qiagen) aufgenommen.

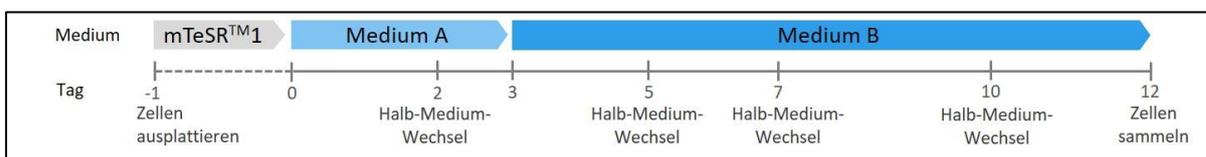
#### 2.2.3.4 Lentivirale Transduktion

Die lentivirale Transduktion wurde nur für die Zelllinie CHiPSC7 durchgeführt. Wie bereits in Kapitel 2.2.2.5 beschrieben, wurde der Virus nach der Aufkonzentrierung zur Infektion auf die Zellen gegeben. Idealerweise wurden die iPS-Zellen zwei bis drei Tage zuvor ausgesät, sodass die Konfluenz etwa 50 % betrug. Die Viruslösung wurde dann auf die Zellen pipettiert und die Platte vorsichtig geschwenkt, um die Verteilung des Virus zu gewährleisten. Nach 16 bis 24 Stunden Inkubation wurde das Medium mit dem Virus entfernt und durch Medium mit einer Puromycinkonzentration von 0,5 µg / ml ersetzt. In den folgenden Tagen wurden die Zellen mindestens einmal in Puromycin-haltigem Medium geteilt (Teilungsverhältnis 1/5 bis 1/10), um eine Selektionierung von transduzierten Zellen zu gewährleisten. Dabei wurde stets auch

ein *Well* mit Kontrollzellen behandelt, um die Zelltodrate nicht transduzierter Zellen zu monitoren. Die optimale Puromycinkonzentration wurde zuvor durch eine Puromycin-Verdünnungsreihe (0 bis 4 µg / ml Medium) mit nicht transduzierten iPSC bestimmt. Zur Überprüfung der gelungenen Transduktion wurde eine quantitative Echtzeit PCR für die Expression der Zielgene durchgeführt. Anschließend wurde zudem die Expression der Proteine mit Hilfe eines Western Blots beurteilt.

### 2.2.3.5 Differenzierung der iPSC zu hämatopoetischen Stammzellen

Induzierte pluripotente Stammzellen besitzen die Fähigkeit in Zellen aller drei Keimblätter zu differenzieren. Durch die Zugabe verschiedenen Wachstumsfaktoren und Botenstoffe ist es möglich iPSC-Zellen gezielt in verschiedene Zelltypen zu differenzieren. Diese Arbeit fokussierte sich auf die Differenzierung von iPSC zu hämatopoetischen Stammzellen. Hierzu wurde ein Differenzierungs-Kit (STEMCELL Technologies) genutzt und das Protokoll auf die etablierten Zellkulturbedingungen angepasst. In Abbildung 5 ist der Ablauf des Protokolls zur hämatopoetischen Differenzierung von iPSC schematisch dargestellt.



**Abb. 5: Protokoll-Diagramm hämatopoetische Differenzierung von iPSC (nach STEMCELL Technologies)**

An Tag -1 werden die iPSC als kleine Sphären in mTeSR 1 ausgesät. Ab Tag 0 wird Medium A hinzugegeben und an Tag 2 erfolgt ein Halb-Medium-Wechsel. An Tag 3 wird Medium A durch Medium B ersetzt und Halb-Medium-Wechsel werden an den Tagen 5, 7 und 12 durchgeführt. An Tag 12 können hämatopoetische Vorläuferzellen im Überstand gesammelt werden.

Für den Differenzierungsprozess wurden zunächst *6-Well*-Platten mit Laminin beschichtet. Das Differenzierungsmedium wurde nach Protokoll gemischt, in geeignete Mengen aliquotiert und bis zur Benutzung bei -20°C gelagert. Nach erneutem Auftauen wurde das Medium für die Zeit der durchgeführten Differenzierung bei 4°C gelagert und anschließend verworfen. Bevor Mediumwechsel erfolgten, wurde das Medium auf Raumtemperatur erwärmt.

Die Zellen wurden ein bis drei Tage vor Beginn der Differenzierung mit Versene abgelöst und eine geeignete Menge an Zellen auf der vorbereiteten Matrix ausplattiert. Täglich wurde das Medium (mTeSR 1) gewechselt und die Koloniegröße und -form im Mikroskop beurteilt. Wenn drei bis sechs Kolonien pro cm<sup>2</sup> gewachsen waren, konnte mTeSR 1 durch Medium A (2 ml pro *Well*) des Differenzierungskits getauscht werden (Tag 0). Die Zellen wurden während der gesamten Differenzierung bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Es erfolgten tägliche Beurteilungen der Differenzierung im Mikroskop. An Tag 2 erfolgte ein Halb-Medium-Wechsel, indem sehr vorsichtig 1 ml Medium pro *Well* abgenommen und verworfen wurde und 1 ml frisches Medium vorsichtig an den Rand des *Wells* pipettiert wurde. An Tag 3 erfolgte ein vollständiger Wechsel des Mediums von Medium A auf Medium B. Hierzu wurde das Medium A komplett entfernt, ohne dabei die Kolonien zu beschädigen. Anschließend wurden 2 ml frisches Medium B vorsichtig an den Rand des *Wells* pipettiert. An Tag 5, 7 und 10 erfolgten erneut Halb-Medium-Wechsel von Medium B. An Tag 12 hatten die Kolonien ihre maximale Größe erreicht

und viele runde, hämatopoetische Zellen befanden sich in Suspension. Nach erfolgter Differenzierung wurde an Tag 12 der Überstand zur weiteren Analyse (Durchflusszytometrie) gewonnen. Hierfür wurde der Überstand abgenommen und in einem 15 ml-Röhrchen gesammelt. Anschließend wurde jedes *Well* zweimal mit je einem Milliliter DMEM/F-12 stark abgespült, um die noch anheftenden hämatopoetischen Zellen zu lösen. Die Suspension wurde ebenfalls in dem 15 ml-Röhrchen gesammelt. Der gesamte Überstand wurde bei 300 x g fünf Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das entstandene Zellpellet in 50 bis 200 µl PBS resuspendiert.

#### 2.2.3.6 Durchflusszytometrie

Das Verfahren der Durchflusszytometrie kam zum Einsatz, um einerseits die pluripotente Qualität undifferenzierter iPSC-Zellen mittels der Oberflächen-Antigene SSEA-3 und SSEA-4 zu überprüfen und um andererseits die kontrollierte Differenzierung zu CD34 und CD45 positiven hämatopoetischen Vorläuferzellen nachzuweisen. Zum Nachweis der Antigene wurden fluoreszenzmarkierte Antikörper genutzt.

Die Oberflächen-Antigene Stage-Specific Embryonic Antigen (SSEA)-3 und SSEA-4 sind auf induzierten pluripotenten Stammzellen exprimiert. Zur Qualitätskontrolle der iPSC wurde ein Teil der Zellen in ein Reaktionsgefäß überführt und für fünf Minuten bei 400 x g herunterzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in 50 µl PBS resuspendiert. Je 5 µl der fluoreszenzmarkierten Antikörper gegen SSEA-3 und SSEA-4 wurden hinzugegeben und die Mischung gevortext. Das Reaktionsgemisch wurde 15 Minuten bei 4°C inkubiert und anschließend mit 500 µl PBS verdünnt. 250 µl der Mischung wurden in eine *96-Multiwell*-Platte überführt und mit Hilfe eines Durchflusszytometers analysiert (Flow Cytometer, CytoFlex; Software: Cytexpert).

Um CD34 und CD45 positive hämatopoetische Stammzellen nach einer kontrollierten Differenzierung der iPSC-Zellen nachzuweisen, wurde am Ende des Differenzierungsprozess der Überstand gewonnen und in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die heterogene Zellpopulation wurde mittels fünf-minütiger Zentrifugation bei 300 x g sedimentiert und anschließend in 50-200 µl PBS resuspendiert. Die Menge des PBS war abhängig von der aus der Differenzierung entstandenen Zellzahl. Es wurden je 5 µl der fluoreszenzmarkierten Antikörper gegen CD 34 und CD 45 sowie je 5 µl der Antikörper gegen SSEA-3 und SSEA-4 als Negativkontrolle hinzugegeben. Die Mischung wurde 15 Minuten bei 4°C inkubiert und anschließend auf 500 µl Volumen mit PBS verdünnt. 250 µl der Mischung wurden in eine *96-Multiwell*-Platte überführt und mit Hilfe eines Durchflusszytometers analysiert (Flow Cytometer, CytoFlex; Software: Cytexpert).

#### 2.2.3.7 Behandlung von iPSC mit Inhibitoren

Essenziell für die Verwertbarkeit der Ergebnisse für das Ansprechen auf einen Wirkstoff ist das Aussäen einer passenden Zellzahl pro *Well*. Eine passende Zellzahl definiert sich dadurch, dass es weder zu Apoptose durch zu starkes Vereinzeln der Zellen noch zu einem Überwachsen der Zellen während der 72-stündigen Inkubation kommt. Für die Aussaat der iPSC ist die passende Zellzahl zudem von großer Bedeutung, da sowohl starkes Vereinzeln als auch eine zu hohe Zellzahl zu Differenzierungsprozessen in den Kolonien führen können. Um für die Behandlung

mit den verschiedenen Inhibitoren eine ideale Zellzahl zu ermitteln, musste zunächst eine Verdünnungsreihe angefertigt werden. Hierfür wurde eine 384-Well-Platte verwendet. Jedes zu nutzende *Well* wurde mit jeweils 30 µl verdünntem Laminin-521 beschichtet. Die Platte wurde mit Parafilm verschlossen, um Verdunstung zu vermeiden und 12 Stunden bei 4°C inkubiert. Vor der Aussaat der Zellen wurde der PBS-Überstand der Beschichtung auf einem sauberen Zellstoff-Tuch abgeklopft. Die Zellen wurden mit Versene gelöst und mit 1 ml Medium abgespült. Die vorhandene Zellzahl wurde mit dem Zellzähler ermittelt und durch Hinzufügen von Medium auf die jeweils benötigte Zellzahl in einem Volumen von 30 µl Medium pro *Well* eingestellt. Es wurden fünf verschiedene Konzentrationen (4000, 3000, 2000, 1000 und 500 Zellen pro *Well*) in vier Replikaten getestet. Die Zellen wurden mit einer Mikropipette in die *Wells* gegeben. Um Verdunstung zu minimieren, wurden anschließend die zwei umliegenden Reihen der *Wells* mit je 50 µl PBS gefüllt. Die Zellen wurden 72 Stunden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Etwa 30 Minuten vor der Durchführung des CellTiterGlo Luminescent Cell Viability Assays wurden die Zellen bei Raumtemperatur inkubiert. Um die Anzahl an metabolisch aktiven Zellen zu ermitteln, wurden 30 µl des vorbereiteten CellTiterGlo-Reagenzes mit Hilfe einer Mikropipette in jedes *Well* gegeben. Es folgte eine lichtabgeschirmte Inkubationszeit von 12 Minuten bei Raumtemperatur, um ein stetiges Lumineszenz-Signal sicher zu stellen. Das Lumineszenz-Signal wurde mit dem SPARK 10M Multimode Microplate Reader (TECAN) gemessen und mit dem SPARKCONTROL Dashboard (TECAN) ausgewertet. Mit Hilfe von Microsoft Excel wurden Wachstumskurven erstellt. Es wurde diejenige Zellzahl ausgewählt, bei der 150.000 *Reads* gemessen wurden.

Es wurde das Ansprechen der Zellen auf die Wirkstoffe 5-Azacytidine, Dovitinib, Selumetinib, Erastin, Trametinib, Rapamycin, Dasatinib und Ruxolitinib getestet. Um signifikante Ergebnisse zu erhalten, wurden jeweils Triplikate von neun verschiedenen Konzentrationen zwischen 5 nM und 25 µM getestet. Des Weiteren wurden für jede Zelllinie DMSO-Kontrollen sowie komplett unbehandelte Kontrollen getestet. Der Versuch wurde auf einer 384-Well-Platte durchgeführt.

Zunächst wurde die Platte vollständig mit Laminin-521 beschichtet. Zum Ausgeben des Laminins wurde der Multidrop Combi Reagenzien-Dispenser mit der FILLit for Multidrop Combi 1.2.1 Software genutzt. Die Zellen wurden abgelöst, die Zellzahl mit dem Zellzähler bestimmt und es wurde eine Lösung aus 20 ml Medium mit 2x10<sup>6</sup> Zellen / ml bzw. 1,5x10<sup>6</sup> Zellen / ml in einem 50 ml-Röhrchen hergestellt. Diese Konzentration resultierte schließlich in einer Menge von 2000/3000 Zellen in einem Volumen von 30 µl Medium pro *Well*. Mit Hilfe des Multidrop Combi Reagenzien-Dispenser mit der FILLit for Multidrop Combi 1.2.1 Software wurde die gewünschte Menge an Zellen auf die Platte gegeben. Die Zellen wurden für die Anheftung zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die zu testenden Wirkstoffe mit Hilfe des D300e Digital Dispenser, nach derselben Methode wie bereits in Kapitel 2.2.2.6 beschrieben, ausgegeben.

Die Zellen wurden mit den Wirkstoffen 72 Stunden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach Abkühlung der Platte auf Raumtemperatur erfolgte anschließend eine Auswertung der Zellviabilität mit Hilfe des CellTiterGlo Luminescent Cell Viability Assays. Das vorbereitete CellTiterGlo Reagenz wurde mit Hilfe des Multidrop Combi Reagenzien-Dispenser zu je 30 µl pro *Well* auf die Platte gegeben. Anschließend erfolgte die lichtabgeschirmte Inkubation von 12 Minuten, die Messung mit dem SPARK 10M Multimode Microplate Reader (TECAN) und die Auswertung mit der SPARKCONTROL Dashboard Software (TECAN).

## 2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

### 2.2.4.1 Aufbereitung von Zelllysaten und Quantifizierung der Proteinkonzentration

Um Proteine zu isolieren, wurde das hergestellte Zellpellet zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit 500 x g fünf Minuten zentrifugiert. Zur Analyse zytoplasmatischer Proteine wurden die Zellen mit einem RIPA-Lyse-Puffer lysiert. Die Zellmembran wird permeabilisiert, sodass lösliche Proteine des Zytoplasmas nach außen gelangen. Die Zellen wurden in einer geeigneten Menge (100 bis 1000 µl) Lyse-Puffer gelöst und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine 15- bis 20-minütige Zentrifugation des Lysats bei 16.000 x g bei 4°C. Der Überstand, der die lösliche Fraktion enthält, wurde in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Um die Proteinmenge in dem gewonnenen Lysat zu quantifizieren, wurde das Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) genutzt. Von jeder Probe wurden Triplikate gemessen, um den Einfluss von Pipettierfehlern zu minimieren. Bei jedem Versuch wurde außerdem eine Standardkurve als Referenz erstellt, indem ein Konzentrationsbereich von 125 bis 2000 ng / ml Bovine Serum Albumin (BSA) gemessen wurde. Zur Durchführung der Messung wurden die beiden Reagenzien A und B in einem Volumenverhältnis von 50:1 gemischt. 200 µl der Lösung wurden dann mit jeweils 10 µl jeder zu messenden Probe in je einem *Well* einer 96-*Well*-Platte (*Flat Bottom*) gemischt. Die Platte wurde 30 Minuten bei 37°C inkubiert, um anschließend die Absorbierung bei 562 nm mit dem SPARK 10M Multimode Microplate Reader zu messen. Die Proteinkonzentration wurde aus den Mittelwerten der Triplikate und den Werten der Standardkurve ermittelt. Durch Verdünnung mit Lysepuffer wurde das gleiche Konzentrations- und Volumenverhältnis in allen Proben eingestellt.

### 2.2.4.2 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Das Proteinlysate wurde zunächst in einem Volumenverhältnis von 6:1 mit Lämmli-Puffer vermischt und bei 95°C für 10 Minuten erhitzt. Für die Gelelektrophorese wurden entweder vorgefertigte Gele genutzt oder selbst Gele hergestellt. Die Gele wurden in dem Mini-PROTEAN Tetra cell System (BioRad Laboratories) befestigt und mit Laufpuffer bedeckt. Es wurden 10 bis 20 µg der Proben sowie 10 µl eines vorgefärbten Proteingrößenstandards auf die Gele geladen. Der Größenstandard diente einerseits zur Molekulargewichtbestimmung der detektierten Proteine und andererseits zur visuellen Kontrolle der Methoden (Gelelektrophorese und Transfer). Es wurde eine Spannung von 30 mA pro Gel für 60 bis 90 Minuten angelegt.

#### 2.2.4.3 Western Blot und Protein Detektion

Nach dem Separieren der Proteine über die Gelelektrophorese wurden die Proteine durch ein *Tank-Blot* System elektrophoretisch auf eine proteinbindende PVDF-Membran übertragen. Durch eine einminütige Inkubation mit Methanol wurde die Membran aktiviert und schließlich kurz mit Wasser gewaschen. Anschließend wurde die Membran zusammen mit dem, die aufgetrennten Proteine enthaltenden Gel zwischen zwei 3 mm Papieren (Whatman) und zwei Schwämmen in einer Haltekassette befestigt. Der Zusammenbau dieser Kassette erfolgte in Transferpuffer. Diese Haltekassette wurde dann, mit der Gel-Seite zur Kathode gerichtet, in die mit Transferpuffer gefüllte Blotkammer (BioRad Laboratories) eingehängt. Der Transfer erfolgte auf Eis bei einer Spannung von 200 mA pro Gel für 90 Minuten.

Nach dem erfolgten Transfer wurde die PVDF-Membran in 5 % BSA in TBST für 60 Minuten unter leichtem Schwenken blockiert, um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu vermeiden. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran in dem Primärantikörper über Nacht bei 4°C auf einem Rollen-Mixer. Der Primärantikörper war gelöst in 10 ml 5 % BSA in TBST. Nach erfolgter Inkubation wurde die Membran dreimal für zehn Minuten in TBST gewaschen und für eine Stunde bei Raumtemperatur in Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugiertem Sekundärantikörper auf einem Roller-Mixer inkubiert. Der Sekundärantikörper wurde ebenfalls in 10 ml 5 % BSA in TBST gelöst. Anschließend wurde erneut dreimal für zehn Minuten in TBST gewaschen, um die Membran schließlich eine Minute in dem Detektionsreagenz zu inkubieren. Die Visualisierung der chemilumineszierenden Proteinbanden auf der Membran erfolgte mit Hilfe des Image Reader LAS-3000 mini (Fujifilm).

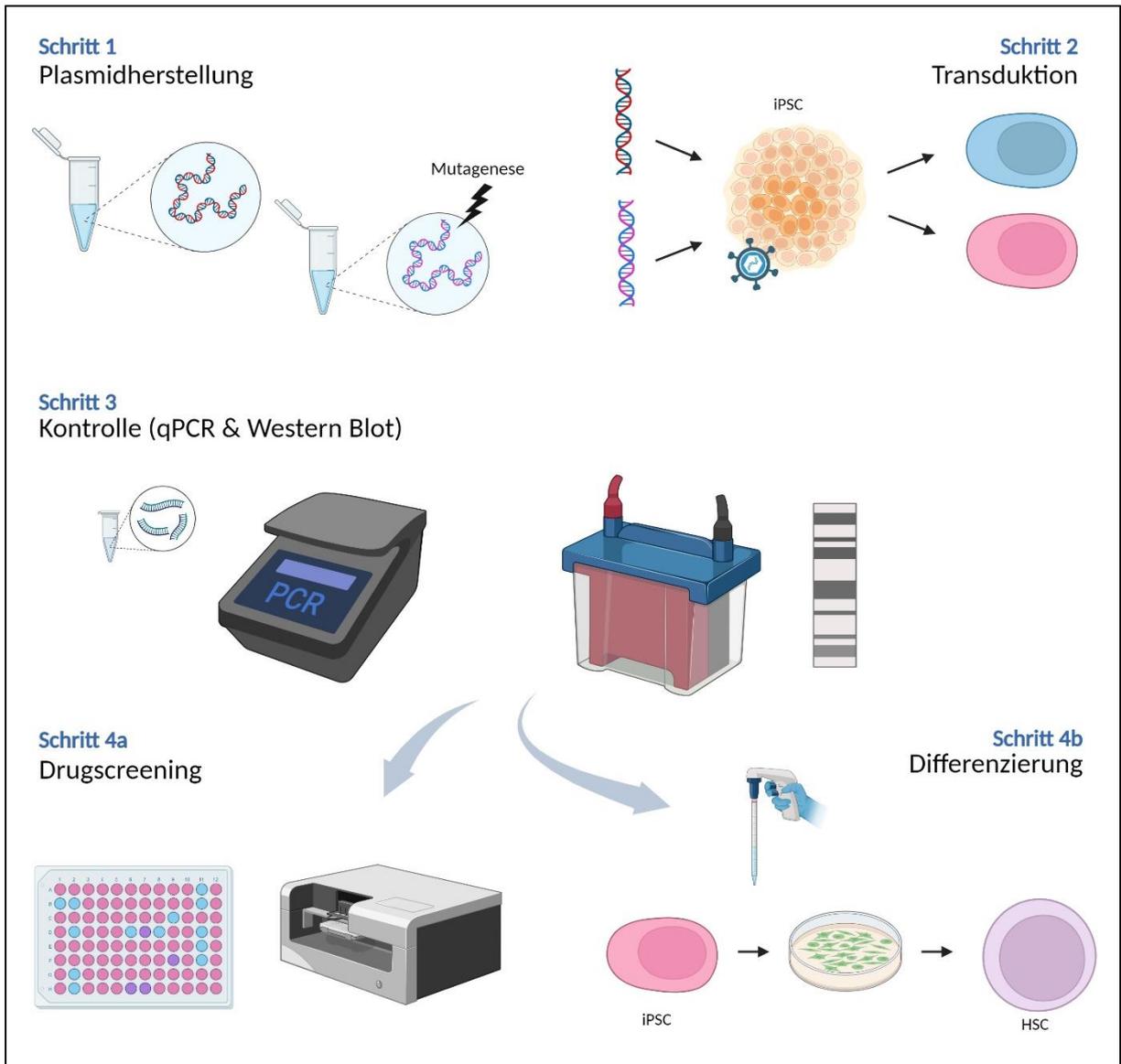
#### 2.2.5 Statistik

Die statistischen Analysen der Expression der mRNA der Zielgene in den transduzierten Zellen erfolgte mittels GraphPad Prism 5. Die Expression der verschiedenen Zelllinien wurde mit Hilfe eines t-Tests verglichen. Die Messung erfolgte in Triplikaten.

Die IC50 Werte, also diejenigen Konzentrationen, bei denen 50 % des maximalen Effektes erreicht wurde, wurden mit einer nicht-linearen Regressionsanalyse mit GraphPad Prism 5 bestimmt. Zur Bestimmung der Signifikanz erfolgte jeweils ein t-Test der ausgewählten IC50 Werte. Die Messung erfolgte in Triplikaten.

### 3 Ergebnisse

Für diese Arbeit wurden zunächst Plasmide der Zielgene mit ihren entsprechenden Wildtyp- und mutierten Varianten hergestellt und in die Zellen (iPSC und HEK293-Zellen) eingebracht. Sowohl für die iPSC als auch für die HEK293-Zellen erfolgte im Anschluss ein *Drugscreening*. Die transduzierten iPSC wurden außerdem in hämatopoetische Stammzellen differenziert. Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der Versuche dargestellt. Abbildung 6 dient als Übersicht über den allgemeinen Ablauf der Forschungsarbeit.



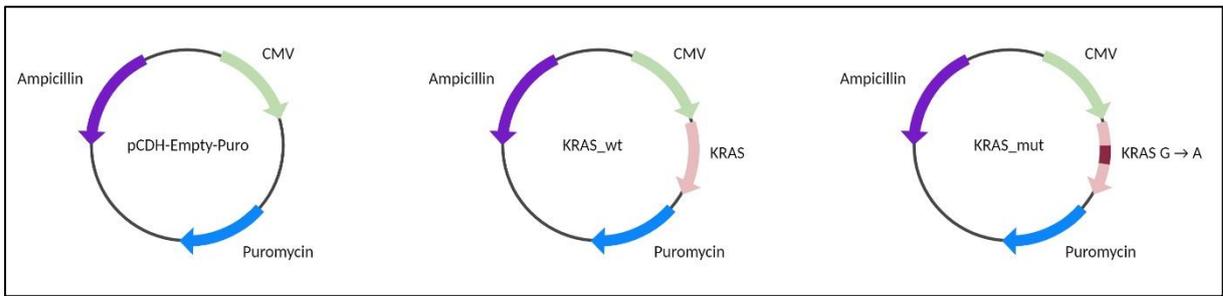
**Abb. 6: Überblick über den allgemeinen Ablauf der Forschungsarbeit**

Zunächst wurden Plasmide der Zielgene inklusive der mutierten Varianten hergestellt. Anschließend wurden diese mittels lentiviraler Transduktion in die Zielzellen (induzierte pluripotente Zellen, iPSC) eingebracht. Diese Zellen wurden dann entweder zu hämatopoetischen Stammzellen (HSC) differenziert oder es wurden verschiedene Inhibitoren per *Drugscreening* getestet. Schritte 1 bis 4a wurden ebenfalls für die HEK293-Zellen durchgeführt. Das Einbringen der Plasmide erfolgte hierfür mittels Transfektion. Die Abbildung wurde kreiert mit BioRender.com.

Um die Effekte verschiedener Mutationen im Ras-MAPKinase-Signalweg in verschiedenen Zelllinien zu untersuchen und insbesondere die Unterschiede im Ansprechen auf verschiedene Inhibitoren darzustellen, wurden sechs Plasmide mit verschiedenen Varianten (*KRAS*wt, *KRAS*mut, *NRAS*wt, *NRAS*mut, *PTPN11*wt, *PTPN11*mut) hergestellt. Das hierzu verwendete pCDH Empty-Puromycin-Plasmid wurde von System Biosciences erworben. In Abbildung 7 sind die Plasmidkonstrukte pCDH-Empty-Puro, *KRAS*wt und *KRAS*mut schematisch abgebildet. Um einen stabilen *Knockdown* von *NF1* in den iPSC zu induzieren, wurde ein Ctrl\_KRAB-Plasmid und ein *NF1*-KD Plasmid von Dr. Nan Qin (Pädiatrische Neuroonkologie, Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und Klinische Immunologie, Universitätsklinikum Düsseldorf) hergestellt und zur Verfügung gestellt [45]. hUbc-dCas9-KRAB-T2a-Puro wurde als Ctrl\_KRAB-Plasmid genutzt. Die sgRNA (*NF1*) wurde über Benchling erworben. Beide Plasmide sind im Folgenden schematisch abgebildet (Abb. 8).

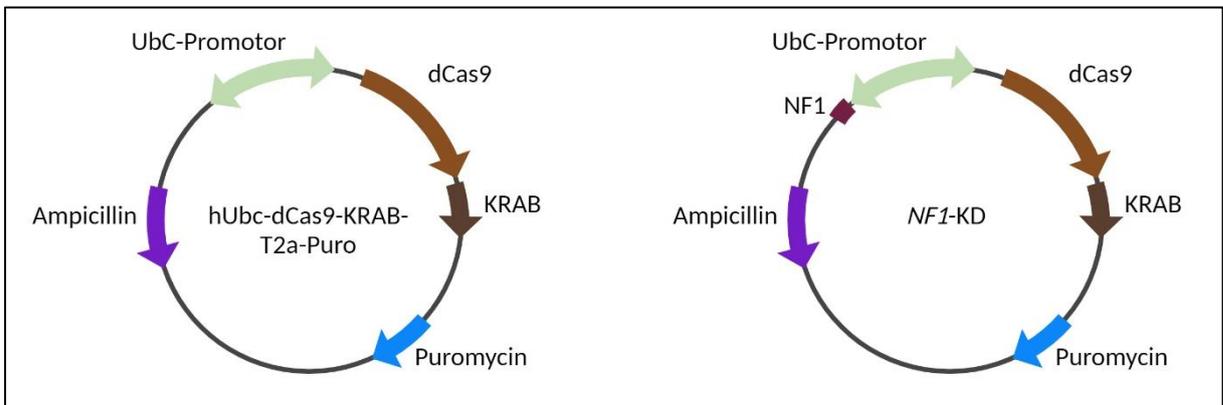
Zur Gewinnung bestimmter DNA-Fragmente aus HEK293-Zellen für die Klonierung neuer Plasmide wurde aus den Zellen zunächst RNA isoliert und diese in cDNA umgeschrieben. Die durch Primerpaare definierten DNA-Fragmente (*KRAS*, *NRAS* und *PTPN11*) wurden mittels PCR amplifiziert. Die PCR beinhaltet in einem ersten Schritt das Auftrennen der DNA in ihre beiden Einzelstränge durch Erhitzen. In einem zweiten Schritt lagern Primer an bestimmten Abschnitten der DNA an und dienen DNA-Polymerasen als Bindungsstelle zur Elongation; also der Synthese eines komplementären Einzelstrangs. Dieser Zyklus kann beliebig oft wiederholt werden, sodass es zu einer Amplifikation des DNA-Abschnitts kommt, der durch das Primerpaar definiert wird. Dieser Abschnitt wurde mithilfe einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und isoliert. Durch einen Restriktionsverdau mit nachfolgender Ligationsreaktion wurden die PCR-Produkte (*KRAS*, *NRAS* und *PTPN11*) gezielt in den Vektor (pCDH-Empty-Puro-Vektor) eingebracht. Durch die Restriktionsenzyme wird sowohl die Vektor-DNA als auch das einzubringende PCR-Produkt so geschnitten, dass jeweils komplementäre, überhängende Enden (*sticky ends*) entstehen. Diese kompatiblen Enden hybridisieren und können in einer nachfolgenden Ligationsreaktion miteinander kovalent verbunden werden, sodass das PCR-Produkt gezielt in den Vektor eingebracht werden kann.

Zur Herstellung von Plasmiden, die eine mutierte Genvariante exprimieren, wurden die hergestellten Wildtypplasmide mit Hilfe einer Mutagenese-Reaktion verändert. Für *KRAS* und *NRAS* wurden jeweils die Missensemutationen p. G12D (*KRAS*) und p. G13D (*NRAS*) kloniert. In das *PTPN11*-Plasmid wurde die Missensemutation p. T73I eingefügt. Die ausgewählten Mutationen sind häufig als Keimbahn- und somatische Mutationen in JMML-Patienten vorzufinden [14]. Die nicht-mutierte Ausgangs-DNA wurde mit Hilfe des Restriktionsenzym DpnI zerschnitten und hierdurch eliminiert. DpnI schneidet spezifisch die nicht-mutierte Ausgangs-DNA, da es die Methylierung von Adenin in der Sequenz GATC erkennt. In der neu synthetisierten mutierten DNA ist Adenin nicht methyliert, sodass diese nicht geschnitten wird. Des Weiteren wird die DNA durch die Zugabe von Ligasen und Kinasen effizient phosphoryliert und ligiert.



**Abb. 7: Plasmidkonstrukte pCDH-Empty-Puro, KRAS<sub>wt</sub> und KRAS<sub>mut</sub>**

Beispielhafte Darstellung der Plasmidkonstrukte nach erfolgter Ligation (KRAS<sub>wt</sub>) und Mutagenese (KRAS<sub>mut</sub>). Als Promotor dient CMV und kontrolliert die Expression von KRAS. Ampicillin und Puromycin codieren für die entsprechenden Resistenzen, sodass die Bakterien oder Zellen selektioniert werden können. Nach Zugabe von Ampicillin (Bakterien) oder Puromycin (Zellen) werden nur jene Produkte weiter kultiviert, die über die entsprechende Resistenz verfügen. Entsprechend der hier dargestellten Vorlage wurden ebenfalls die Plasmide PTPN11<sub>wt</sub>, PTPN11<sub>mut</sub>, NRAS<sub>wt</sub> sowie NRAS<sub>mut</sub> hergestellt. Die Abbildung wurde kreiert mit BioRender.com.



**Abb. 8: Plasmidkonstrukte Ctrl\_KRAB und NF1-Knockdown**

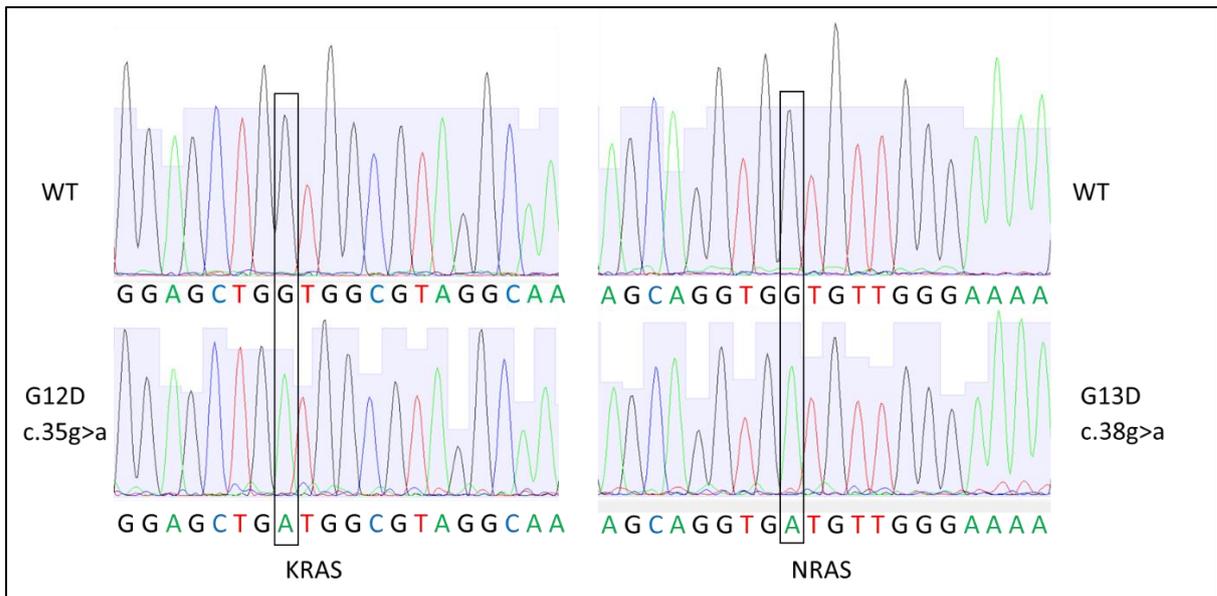
Darstellung der Plasmidkonstrukte. Der UbC-Promotor kontrolliert die Expression von NF1. Ampicillin und Puromycin codieren für die entsprechenden Resistenzen, sodass die Bakterien oder Zellen selektioniert werden können. Nach Zugabe von Ampicillin (Bakterien) oder Puromycin (Zellen) werden nur jene Produkte weiter kultiviert, die über die entsprechende Resistenz verfügen. Die deaktivierte Version von Cas9 (dCas9) mit fehlender Endonuklease-aktivität bindet an die Promotorregion von NF1 und sorgt für einen Abbruch der Transkription. Durch die Krüppel-assoziierte Box (KRAB) wird eine Verstärkung der transkriptionshemmenden Wirkung erreicht. Das NF1-Knockdown Plasmid wurde von Dr. Nan Qin (Pädiatrische Neuroonkologie, Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und Klinische Immunologie, Universitätsklinikum Düsseldorf) hergestellt und zur Verfügung gestellt. Die Abbildung wurde mit BioRender.com kreiert.

Alle entstandenen Plasmide wurden anschließend per Transformation in Bakterien eingebracht und so vervielfältigt. Die so hergestellten Plasmide wurden genutzt, um das jeweilige Wildtyp-Gen sowie die mutierte Variante sowohl in den 293-HEK-Zellen als auch in den iPSC-Zellen zu exprimieren.

### 3.1 Sequenzierung der Plasmide

Nach der Isolation aus den Bakterien wurde die Sequenz des Plasmids sowie das Vorliegen der Mutation durch eine Sanger-Sequenzierung auf Korrektheit überprüft. Im Folgenden darge-

stellt werden die Sequenzen für *KRAS* und *NRAS* (Abb. 9). Auch für das *PTPN11*-Wildtyp Plasmid sowie die mutierte Variante wurde eine Sanger Sequenzierung durchgeführt und die Sequenz validiert.



**Abb. 9: Sanger Sequenzierung der Plasmide mit der *KRAS*- bzw. *NRAS*-codierenden Wildtyp-Genvariante sowie der jeweiligen Mutation nach erfolgreicher Mutagenese**

Die DNA-Basen-Abfolge (A: Adenin (grün), T: Thymin (rot), G: Guanin (schwarz), C: Cytosin (blau)) wird durch die Sanger Sequenzierung ermittelt. Schwarz eingerahmt ist jeweils die Mutation dargestellt: die Base Guanin wurde in beiden Fällen durch Adenin ersetzt. Auf der linken Seite ist oben ein Teil der DNA-Sequenz des *KRAS*-wildtyp Plasmids (WT) abgebildet, links unten befindet sich die Sequenz des *KRAS*-Plasmids nach Induktion der Missensemutation p. G12D. Auf der rechten Seite ist oben ein Teil der DNA-Sequenz des *NRAS*-wildtyp Plasmids (WT) abgebildet, rechts unten befindet sich die Sequenz des *NRAS*-Plasmids nach Induktion der Missensemutation p. G13D.

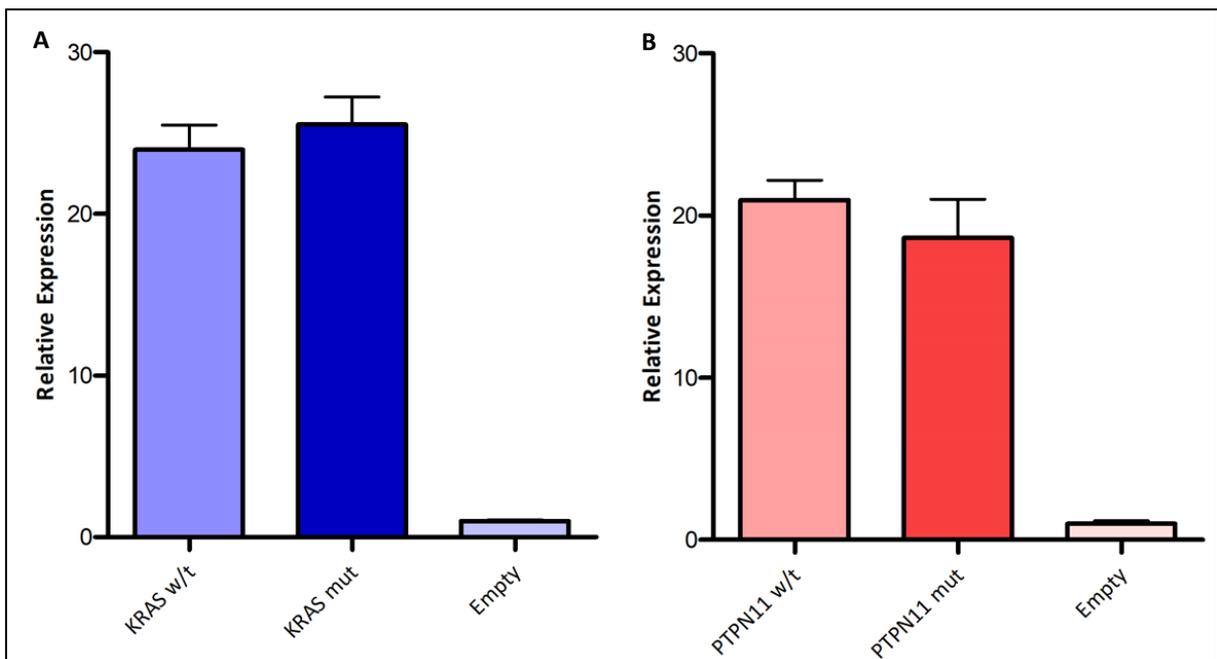
### 3.2 Expression der Zielproteine in HEK293-Zellen

Zur stabilen Expression der Zielproteine der HEK293-Zellen erfolgte eine *Fast-Forward* Transfektion mit Attractene. Anschließend wurden die transfizierten HEK293-Zellen durch Zugabe von Puromycin selektioniert. Die transfizierten HEK293-Zellen wurden genutzt, um ein Hochdurchsatz-*Drugscreening* durchzuführen. Die Überexpression von *KRAS* und *PTPN11* konnte sowohl auf RNA-Ebene als auch auf Proteinebene nachgewiesen werden. Die Überexpression von *NRAS* wurde nach erfolgreicher Erprobung der Methode in HEK293-Zellen nur für die iPSC durchgeführt.

#### 3.2.1 Expression von *KRAS* und *PTPN11* in HEK293-Zellen auf mRNA-Ebene

Zur Überprüfung der Transfektion der HEK293-Zellen wurde eine PCR für die Expression der Zielgene durchgeführt. Hierfür wurde cDNA aus der RNA transkribiert. Bei der qPCR (auch *Realtime-PCR*) ist neben der Amplifizierung eines DNA-Fragmentes durch Zugabe von z. B. *BRYT Green Dye* (GoTaq qPCR Master Mix, Promega) auch eine Quantifizierung der DNA-Abschnitte möglich. Durch die stöchiometrische Bindung von *BRYT Green Dye* an DNA-Doppelstränge wird das Fluoreszenzsignal freigesetzt. Indem die Fluoreszenzintensität bestimmt wird, kann

die Menge der DNA gemessen werden. Die Auswertung der qPCR-Ergebnisse erfolgte mit GraphPad Prism 5. Die Messung erfolgte in Triplikaten.



**Abb. 10: Nachweis der Überexpression der Zielgene (*KRAS* Wildtyp (w/t), *KRAS* G12D (mut), *PTPN11* Wildtyp (w/t), *PTPN11* T73I (mut), HEK293 Empty) in HEK293-Zellen**

Im Vergleich zur Mock-transfizierten Kontrolle („Empty“) sind die Transkripte der Gene *KRAS* (A) und *PTPN11* (B) in den mit den *KRAS*- bzw. *PTPN11*-Wildtyp-Plasmiden (w/t) bzw. den *KRAS*-G12D- bzw. *PTPN11*-T73I-Mutanten (mut) deutlich erhöht. Die Transkripte wurden mit Hilfe von qPCR bestimmt und die Auswertung der Mittelwerte von Triplikaten erfolgte mittels GraphPad Prism 5. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

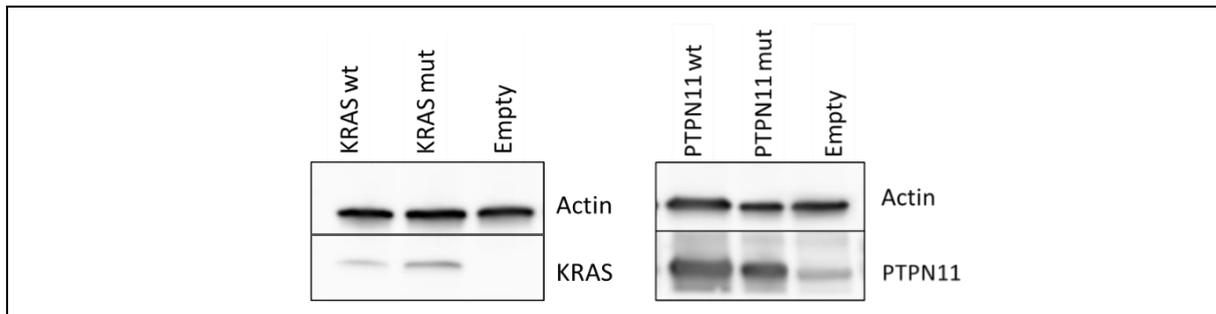
Abbildung 10 zeigt, dass sowohl die Wildtyp-Zellen (*KRAS* w/t, *PTPN11* w/t) als auch die Zelllinien mit den mutierten Varianten (*KRAS* mut, *PTPN11* mut) das jeweils transfizierte Gen (*KRAS* und *PTPN11*) deutlich überexprimieren. Als Negativkontrolle dient eine HEK293-Zelllinie (HEK293 Empty), die ausschließlich mit dem Vektor (pCDH-Empty-Puro-Vektor) transfiziert wurde. Hierdurch sollen Effekte, die allein der Transfektion geschuldet sind, ausgeglichen werden. Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Genexpression zwischen den Wildtypvarianten und den mutierten Varianten festgestellt werden.

### 3.2.2 Expression von KRAS und PTPN11 in HEK293-Zellen auf Proteinebene

Die Überexpression der Proteine KRAS und PTPN11 nach Transfektion wurde mit Hilfe eines Western Blots beurteilt (siehe Abb. 11). Hierfür wurden Proteine aus Zelllysaten der transfizierten HEK293-Zellen isoliert und gleichmäßig konzentriert. Um die Proteinmenge in dem gewonnenen Lysat zu quantifizieren, wurde das Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) genutzt. Dabei kommt es zu einem Wechsel der Farbe der Lösung von hellgrün zu lila. Höhere Proteinkonzentrationen gehen mit einer intensiveren lila Färbung der Lösung einher. Die Intensivität der Färbung kann kolorimetrisch bei 562 nm detektiert werden.

Es wurden jeweils 20 µg Protein auf die SDS-Page aufgebracht. Durch die SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese können Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt und so analysiert werden.

Das Anlegen einer Spannung führt dazu, dass die Proteine in Abhängigkeit von ihrer Molekülmasse mit unterschiedlicher Geschwindigkeit zur Anode wandern. Für ihre Auftrennung müssen die Proteine vollständig denaturiert sein. Nach dem Separieren der Proteine über die Gelelektrophorese wurden die Proteine elektrophoretisch auf eine proteinbindende PVDF-Membran übertragen. Die Visualisierung der chemilumineszierenden Proteinbanden auf der Membran erfolgte nach Inkubation mit den Antikörpern Anti-KRAS (F234) und Anti-SH-PTP2 (B-1) (PTPN11).



**Abb. 11: Nachweis der Überexpression von KRAS bzw. PTPN11 in transduzierten HEK293-Zellen auf Proteinebene**

Es wurden Proteinlysate aus HEK293-Zellen mit wildtypischen (wt), mutierten (mut) KRAS bzw. PTPN11 und ohne (Empty) KRAS bzw. PTPN11 isoliert und anschließend mittels Western Blot analysiert. Es wurden jeweils 20 µg Protein aufgetragen. Die Detektion erfolgte über einen polyklonalen KRAS Antikörper bzw. einen polyklonalen PTPN11 Antikörper. Ein β-Actin Antikörper diente als Ladekontrolle.

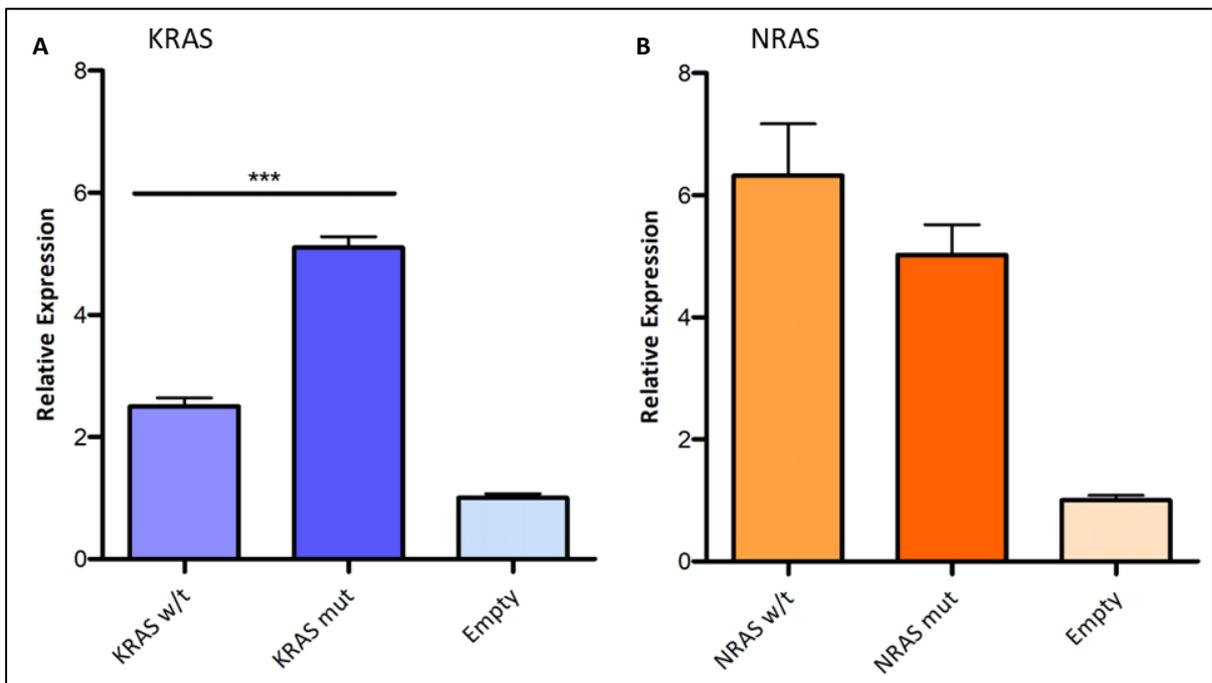
KRAS (25 kDa) konnte für die Zelllinie HEK293 KRASwt und HEK293 KRASmut detektiert werden. HEK293 Empty (Ras wt) zeigte keine Expression für KRAS. Eine Überexpression für PTPN11 (70 kDa) konnte für die Zelllinien HEK293 PTPN11wt und HEK293 PTPNmut verglichen mit der Zelllinie HEK293 Empty gezeigt werden. Als Ladekontrolle diente in beiden Fällen ein β-Actin Antikörper (42 kDa).

### 3.3 Expression der Zielproteine in iPSC

Die lentivirale Transduktion von Wildtyp und mutierten Varianten von *KRAS* und *NRAS* wurde für die Zelllinie CHiPSC7 durchgeführt. Die Selektion der transduzierten iPSC-Zellen erfolgte ebenfalls durch Zugabe von Puromycin, sodass eine stabile Transduktion gewährleistet werden konnte. Zur Qualitätskontrolle der iPSC wurden die Oberflächen-Antigene SSEA-3 und SSEA-4 nach erfolgter Transduktion gemessen. Die transduzierten iPSC-Zellen wurden genutzt, um sowohl die Differenzierung in hämatopoetische Progenitorzellen als auch ein Drugscreening durchzuführen. Die Überexpression von *KRAS* und *NRAS* konnte sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene gezeigt werden.

#### 3.3.1 Expression von *NRAS* und *KRAS* in iPSC auf mRNA-Ebene

Zur Überprüfung des Erfolgs der Transduktion wurde eine quantitative *Realtime*-PCR für die Expression der Zielgene (*NRAS*, *KRAS*) durchgeführt (siehe Abb. 12). Hierfür wurde RNA aus den zuvor transduzierten iPSC isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die Auswertung der qPCR-Ergebnisse erfolgte mit GraphPad Prism 5. Es wurden Triplikate gemessen.



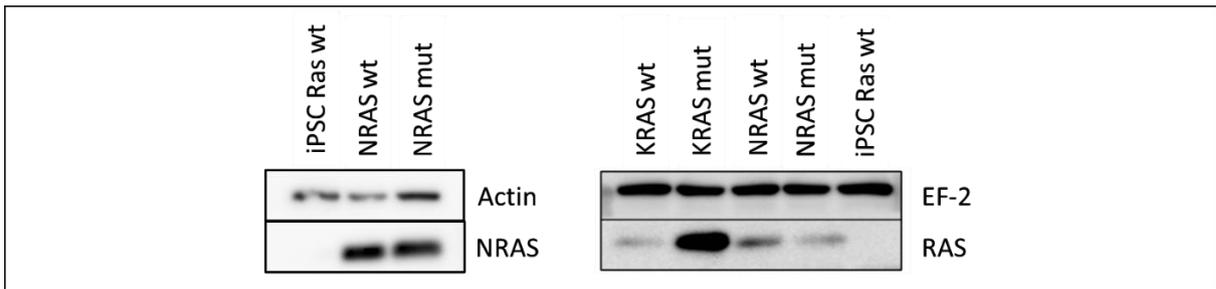
**Abb. 12: Nachweis der Überexpression der Zielgene (*KRAS* wildtyp (w/t), *KRAS* G12D (mut), *NRAS* wildtyp (w/t), *NRAS* G13D (mut), iPSC 7 wildtyp (Empty))**

Die *KRAS* (A) bzw. *NRAS* (B) RNA-Menge ist deutlich erhöht in den transduzierten Zelllinien verglichen mit der *KRAS* bzw. *NRAS* RNA-Menge in den mit dem Empty-Plasmid transduzierten Wildtyp iPSC (Empty). Die Expression der verschiedenen Zelllinien wurde mit Hilfe eines t-Tests verglichen. Die RNA-Menge von *KRAS*mut (mutiert) ist im Vergleich zur RNA-Menge von *KRAS*wt (wildtyp) zudem ebenfalls deutlich erhöht ( $p$ -Wert: 0,0003). Die RNA-Menge wurde mit Hilfe einer qPCR bestimmt und die Auswertung ist mittels GraphPad Prism 5 erfolgt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Sowohl die Wildtyp-Zellen (*KRAS*wt, *NRAS*wt) als auch die Zelllinien mit den mutierten Varianten (*KRAS*mut, *NRAS*mut) exprimieren das transfizierte Gen (*KRAS* und *NRAS*). Als Negativkontrolle diente hier eine CHiPSC7-Zelllinie (7 wt *NRAS*/*KRAS*), die nur mit dem Vektor (pCDH-Empty-Puro-Vektor) transduziert wurde. Während für *NRAS* kein signifikanter Unterschied in der Genexpression zwischen der wildtypischen und der mutierten Variante festgestellt werden konnte, war die Expression von *KRAS* in der Zelllinie mit der mutierten Variante etwa doppelt so hoch wie in der Zelllinie mit der Wildtypvariante.

### 3.3.2 Proteinexpression von *NRAS* und *KRAS* in iPSC

Um die Überexpression der Proteine mit Hilfe eines Western Blots beurteilen zu können, wurden Proteine aus Zelllysaten der transduzierten iPSC isoliert, auf die SDS-Page aufgebracht und über die Gelelektrophorese separiert. Anschließend erfolgte die Übertragung auf eine proteinbindende PVDF-Membran sowie die Darstellung der chemilumineszierenden Proteinbanden nach Inkubation mit den Antikörpern Anti-*NRAS* (F155) und Anti-Pan-Ras. Als Ladekontrolle dienten ein  $\beta$ -Actin Antikörper (42 kD) und ein EF2 Antikörper (95 kD).



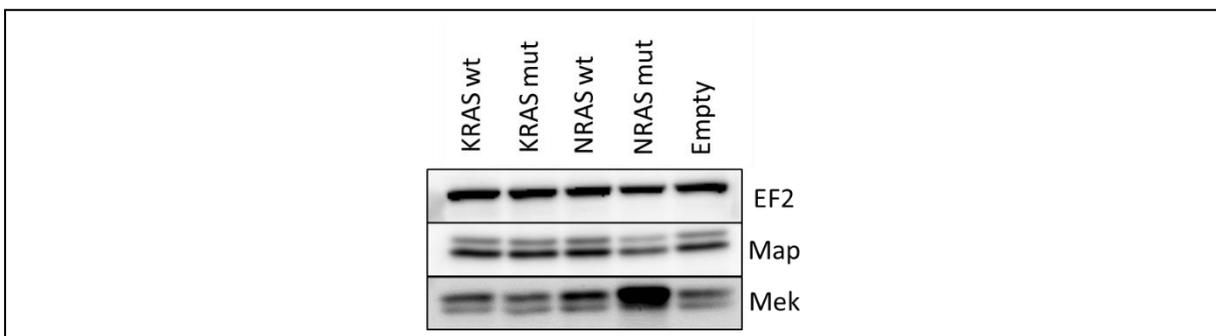
**Abb. 13: Nachweis der Überexpression von Pan-Ras bzw. NRAS in transduzierten iPS-Zellen auf Proteinebene**

Es wurden Proteinlysate aus iPS-Zellen mit wildtypischen (wt), mutierten (mut) KRAS bzw. NRAS und ohne KRAS bzw. NRAS (Empty) isoliert und anschließend mittels Western Blot analysiert. Es wurden jeweils 20 µg Protein aufgetragen. Die Detektion erfolgte über einen polyklonalen Pan-Ras Antikörper bzw. einen polyklonalen NRAS Antikörper. Ein EF2 Antikörper bzw. ein β-Actin Antikörper diente als Ladekontrolle.

Abbildung 13 zeigt eine Überexpression für NRAS (25 kD) und RAS (21 kD) in den Zelllinien NRAS w/t und NRAS mut verglichen mit der iPSC Ras wt Zelllinie. Für KRAS w/t und KRAS mut konnten ebenfalls Überexpressionen von RAS nachgewiesen werden. Hier zeigt sich zudem, dass die Expression von RAS in der KRAS mut Zelllinie deutlich höher ist als in der Wildtypvariante. Dies spricht gemeinsam mit der auf RNA-Ebene ebenfalls gesteigerten Expression dafür, dass der Hinzugewinn der Mutation in dieser Zelllinie zu einem gesteigerten Ras-MAP-Kinase-Signalweg führt.

### 3.3.3 Untersuchung des Ras-MAPKinase-Signalwegs in Ras-überexprimierenden iPSC

Um zu untersuchen, ob die Transduktion in den Zelllinien neben der erhöhten direkten Gen- und Proteinexpression auch zu einer gesteigerten Aktivierung des Ras-MAP-Kinase-Signalwegs führt, wurde die Proteinmenge von unterschiedlichen Zwischenstufen der Signalkaskade bestimmt. Die Proteingewinnung und Aufbereitung erfolgten konform zu den in Kapitel 3.3.2 bereits beschriebenen Schritten. Es wurden Antikörper für (phosphorylierte) MAP-Kinase (42, 44 kDa) und MEK-Kinase (45 kDa) genutzt.



**Abb. 14: Nachweis der Expression von MAPK und MEK in transduzierten iPS-Zellen auf Proteinebene**

Es wurden Proteinlysate aus iPS-Zellen mit wildtypischen, mutierten KRAS bzw. NRAS und ohne KRAS bzw. NRAS isoliert und anschließend mittels Western Blot analysiert. Es wurden jeweils 20 µg Protein aufgetragen. Die Detektion erfolgte über einen polyklonalen MAPK bzw. MEK Antikörper. Ein EF2 Antikörper diente als Ladekontrolle.

Abbildung 14 zeigt exemplarisch die Expression für MAP-Kinase und MEK-Kinase in allen transduzierten Zellreihen. Es wurden verschiedene Antikörper für MAP (phosphoryliert, unphosphoryliert) getestet. Außerdem erfolgte in verschiedenen Versuchen die Initiierung von Zellstress mittels Hypoxie und *Starving*-Methoden. Insgesamt konnte für die meisten Zelllinien keine erhöhte Expression für Gesamt- und phosphorylierte MAP- und MEK-Kinase festgestellt werden. Ausschließlich für die *NRASmut*-Zelllinie zeigte sich eine deutlich erhöhte Expression von Mek.

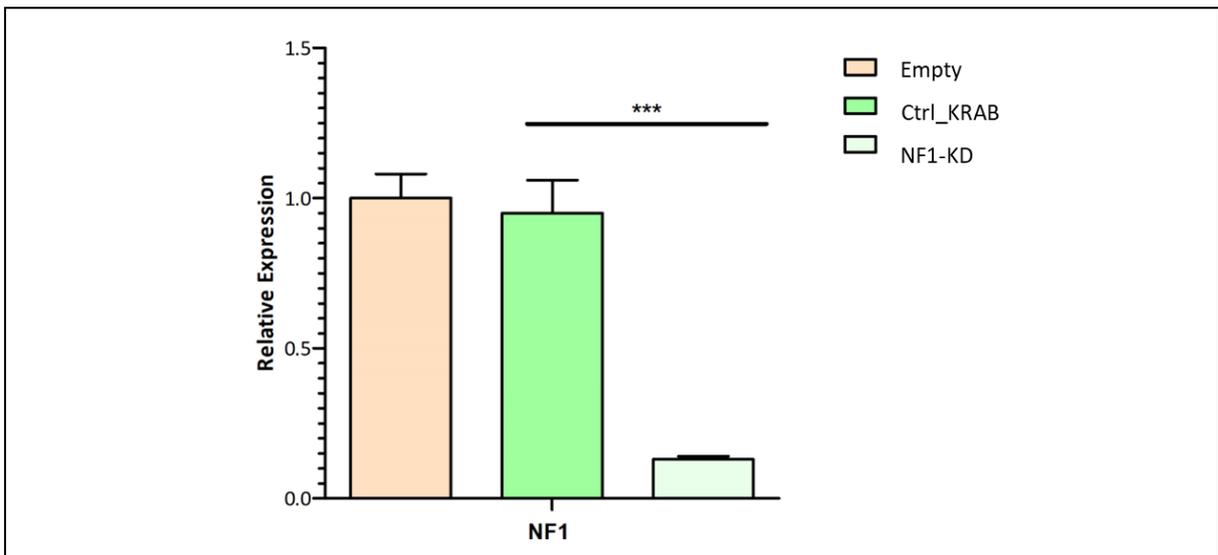
### 3.4 Knockdown von *NF1* in iPSC

Für den *Knockdown* von *NF1* in iPSC wurde die CRISPRi Methode verwendet. CRISPRi ist eine Methode zur Hemmung der Genexpression durch eine gestörte Transkription des Zielgens [46]. Hierfür wird eine deaktivierte Version von Cas9 (dCas9) mit einer fehlenden Endonukleaseaktivität genutzt [46]. Es kommt nicht zu einer spezifischen Mutation des Zielgens, sondern zu einem Abbruch der Transkription, indem dCas9 an die Promotorregion eines spezifischen Gens bindet [46]. So wird die natürliche Transkription unterbrochen und das entsprechende Gen nicht abgelesen [46]. Die Vorgabe der Promotorregion erfolgt über die Kombination der dCas9 mit einer zu der Zielregion komplementären sg (single guide) RNA [47]. Indem die dCas9 mit einer Krüppel-assoziierten Box (KRAB) fusioniert wird, kann eine Verstärkung der transkriptionshemmenden Wirkung erreicht werden [48].

Die lentivirale Transduktion des *NF1*-KD Plasmids und des Ctrl\_KRAB-Plasmids wurde mittels CRISPRi Methode für die Zelllinie CHiPSC7 durchgeführt. Die Selektion der transduzierten iPSC-Zellen erfolgte durch Zugabe von Puromycin, sodass eine stabile Transduktion gewährleistet werden konnte. Zur Qualitätskontrolle der iPSC wurden die Oberflächen-Antigene SSEA-3 und SSEA-4 nach erfolgter Transduktion gemessen. Es zeigte sich eine persistierend hohe Expression der Marker. Die transduzierten iPSC-Zellen wurden zur Durchführung eines *Drugscreenings* verwendet. Die verminderte Expression von *NF1* konnte auf RNA-Ebene und auf Proteinebene gezeigt werden.

#### 3.4.1 Nachweis des *NF1*-Knockdowns in iPSC auf mRNA-Ebene

Zwecks Nachweises einer erfolgreichen Transduktion mit nachfolgender verminderter Expression von *NF1* wurde eine quantitative Echtzeit PCR für die Expression des Zielgens *NF1* durchgeführt. Hierfür wurde RNA aus den zuvor transduzierten iPSC isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die Auswertung der qPCR-Ergebnisse (Triplikate) erfolgte mit GraphPad Prism 5.



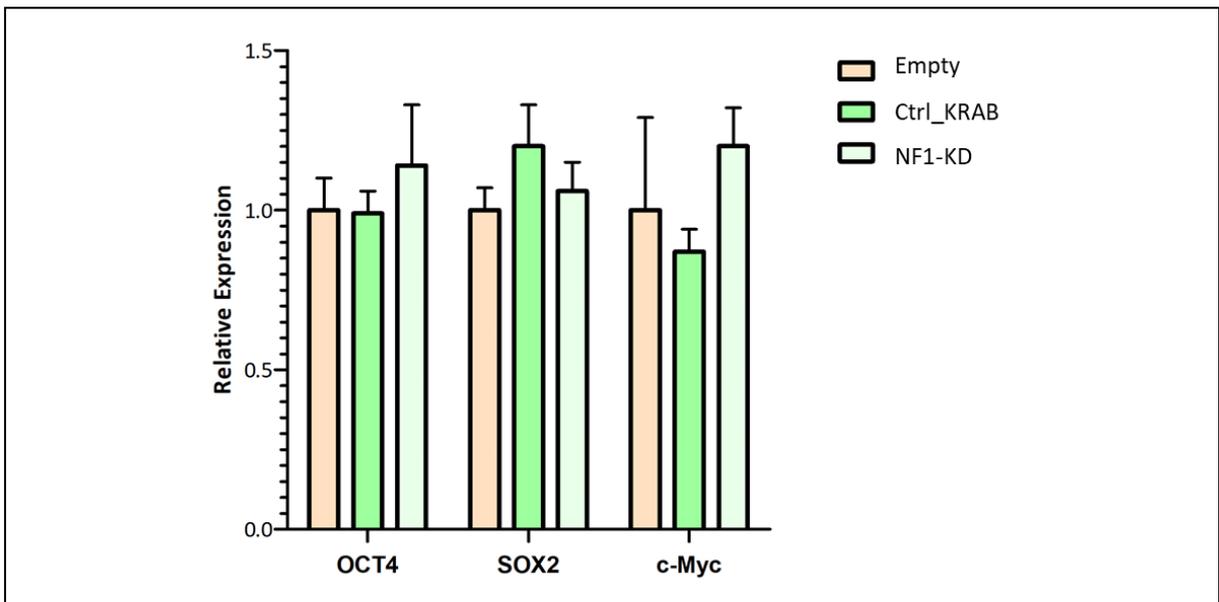
**Abb. 15: Nachweis der verminderten Expression des Zielgens *NF1* in transduzierten iPSC, in iPSC mit einem Kontrollplasmid und in untransduzierten iPSC**

Die *NF1* RNA-Menge ist signifikant erniedrigt in der mit dem *NF1*-KD-Plasmid (*Knockdown*) transduzierten Zelle verglichen mit der *NF1* Menge in den Ctrl-KRAB iPSC ( $p$ -Wert 0,0002 für Ctrl-KRAB iPSC verglichen mit der *NF1*-*Knockdown* Zelle) und den nicht transduzierten Wildtyp iPSC (Empty). Die RNA-Menge wurde mit Hilfe einer qPCR bestimmt und die Auswertung ist mit GraphPad Prism 5 erfolgt. Die Expression der verschiedenen Zelllinien wurde mit Hilfe eines t-Tests verglichen. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Abbildung 15 zeigt, dass die Zelllinie mit dem *NF1*-*Knockdown* eine um 82 % geringere Expression für *NF1* aufweist als die Zelllinie mit dem Kontrollplasmid (Ctrl-KRAB) und eine um 87 % geringere Expression als die nicht transduzierte iPSC-Zelllinie. Ein vollständiger *Knockout* ist mit der CRISPRi Methode jedoch nicht möglich, da die Transkription lediglich gehemmt und nicht vollständig verhindert wird.

### 3.4.2 Expression von Stammzell-Markern in *NF1*-*Knockdown*-Zellen

Um zu prüfen, ob die stressanfälligen, induzierten pluripotenten Stammzellen auch nach erfolgter Manipulierung und Selektionierung noch ihren stammzellartigen Charakter besitzen und nicht unkontrolliert differenzieren, erfolgte eine quantitative Echtzeit PCR für die Expression von typischen Stammzellmarkern. Hierfür wurden die Stammzellmarker *OCT4*, *SOX2* und *cMyc* verwendet.



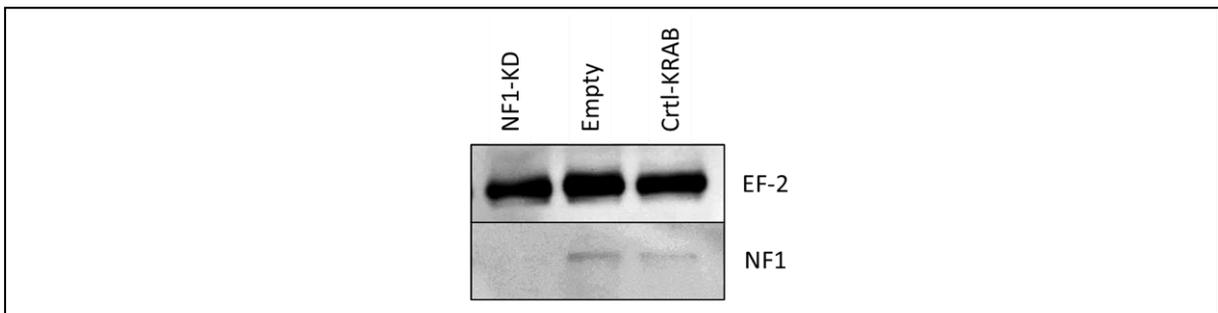
**Abb. 16: Nachweis der gleichmäßigen Expression verschiedener Stammzellmarker nach Transduktion der iPSC mit dem *NF1*-KD Plasmid und mit dem Kontrollplasmid sowie in untransduzierten iPSC**

Die RNA-Menge der stammzelltypischen Gene (OCT4, SOX2 & c-Myc) ist in den transduzierten Zelllinien (Ctrl\_KRAB, NF1-KD) genauso hoch wie in den nicht transduzierten Wildtyp iPSC (Empty). Die RNA-Menge wurde mit Hilfe einer qPCR bestimmt und die Auswertung ist mit GraphPad Prism 5 erfolgt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Abbildung 16 zeigt die Expression der stammzelltypischen Gene in den mittels CRISPRi transduzierten iPSC und in nicht transduzierten iPSC. Es konnte kein Unterschied in der Expression der Stammzellgene nachgewiesen werden. Es kann daher angenommen werden, dass die iPSC auch nach erfolgter Transduktion trotz Veränderung der Genexpression nicht unkontrolliert differenzieren, sondern ihre Pluripotenz behalten.

### 3.4.3 Nachweis der Proteinexpression in *NF1*-Knockdown-iPSC

Um die verminderte Expression von Neurofibromin auch auf Proteinebene nachzuweisen, wurden Proteine aus Zelllysaten der transduzierten iPSC isoliert und mittels Western Blot untersucht. Jeweils 20 µg Protein wurden auf die SDS-Page aufgebracht und über die Gelelektrophorese separiert. Anschließend erfolgte die elektrophoretische Übertragung auf eine proteinbindende PVDF-Membran. Die chemilumineszierenden Proteinbanden auf der Membran konnten nach Inkubation mit einem Antikörper gegen Neurofibromin 1 visualisiert werden.



**Abb. 17: Nachweis der verminderten Expression von Neurofibromin in transduzierten iPS-Zellen auf Proteinebene**

Es wurden Proteinlysate aus iPS-Zellen ohne Transduktion (Empty), mit *NF1-KD* (*Knockdown*) und mit dem Kontroll-Plasmid (Ctrl\_KRAB) isoliert und anschließend mittels Western Blot analysiert. Es wurden jeweils 20 µg Protein aufgetragen. Die Detektion erfolgte über einen polyklonalen Neurofibromin Antikörper (NF1). Ein EF2 Antikörper (95 kDa) diente als Ladekontrolle.

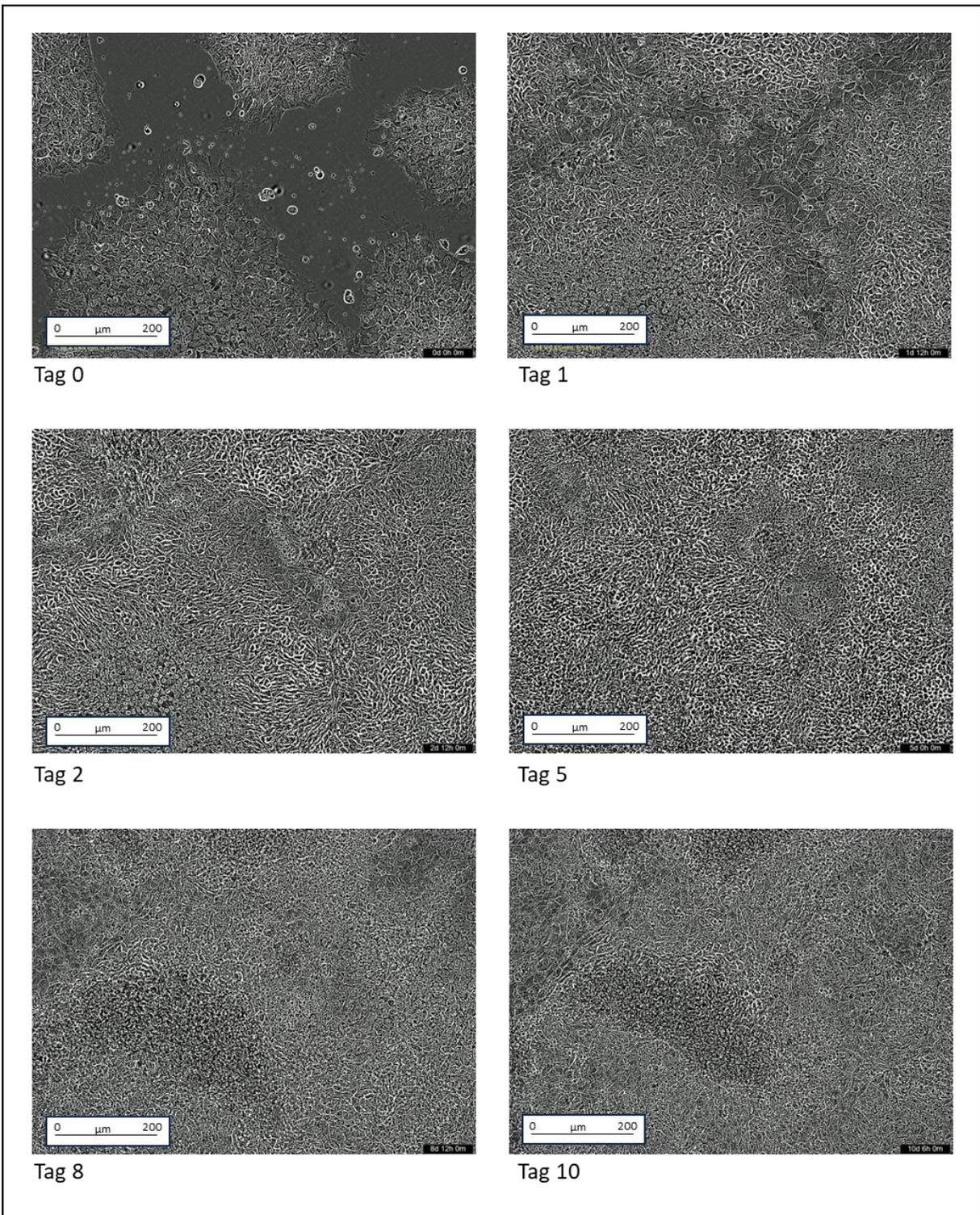
Neurofibromin (320 kDa) konnte für die Zelllinie mit dem Kontrollplasmid und für die nicht transduzierte Zelllinie detektiert werden (siehe Abb. 17). Die *NF1-KD* Zelllinie zeigte keine nachweisbare Expression für Neurofibromin (siehe Abb. 17).

### 3.5 Hämatopoetische Differenzierung der iPSC

Induzierte pluripotente Stammzellen können in Zellen aller drei Keimblätter differenzieren. Eine gezielte Differenzierung in verschiedene Zelltypen kann durch die Zugabe verschiedener Wachstumsfaktoren und Botenstoffe erreicht werden. In dieser Arbeit erfolgte die Differenzierung von iPSC zu hämatopoetischen Stammzellen mithilfe eines Differenzierungs-Kit (STEMCELL Technologies). Vor Beginn der Differenzierung wurde mit der Durchflusszytometrie die pluripotente Qualität der undifferenzierten iPS-Zellen mit den Oberflächen-Antigenen SSEA-3 und SSEA-4 nachgewiesen. Es erfolgten tägliche Beurteilungen der Differenzierung im Mikroskop. Nach abgeschlossener Differenzierung wurde am Tag zwölf der Überstand mit hämatopoetischen Vorläuferzellen zur weiteren Analyse (Durchflusszytometrie) gewonnen. Eine weitere Separation mittels MACS oder FACS und Kultivierung der hämatopoetischen Stammzellen gelang unter den gegebenen Bedingungen nicht.

#### 3.5.1 Mikroskopische Beurteilung der Differenzierung

Es erfolgte eine tägliche mikroskopische Beurteilung der Differenzierung. Mesodermale Zellen, die sich am Rand der Kolonien nach außen erstrecken, konnten ab Tag zwei mikroskopisch gesehen werden. In den Tagen drei bis acht formte sich das mesodermale Stroma weiter aus und unterstützte die Differenzierung zu runden hämatopoetischen Vorläuferzellen, die ab Tag acht als Suspensionszellen sichtbar wurden. Am zwölften Tag hatten die Kolonien ihre maximale Größe erreicht, viele runde, hämatopoetische Zellen befanden sich in Suspension und konnten zur weiteren Analyse gewonnen werden. Zur Darstellung der mikroskopischen Beurteilung der Differenzierung von iPSC in hämatopoetische Vorläuferzellen dient Abbildung 18.



**Abb. 18: Mikroskopische Beurteilung der Differenzierung von iPSC in hämatopoetische Vorläuferzellen**

Die iPSC-Zellen wurden vor der Differenzierung ausplattiert. Zunächst formten sich in den ersten drei Tagen mesodermale Zellen, die das mesodermale Stroma bildeten. Dieses Stroma formte sich weiter aus und unterstützte die Bildung der hämatopoetischen Stammzellen. Diese waren ab Tag acht bis zehn in der Suspension nachweisbar, sind in der Abbildung allerdings nicht zu sehen. Die hier dargestellten Bilder wurden mit dem IncuCyte S3 Live-Cell Analysis System erstellt.

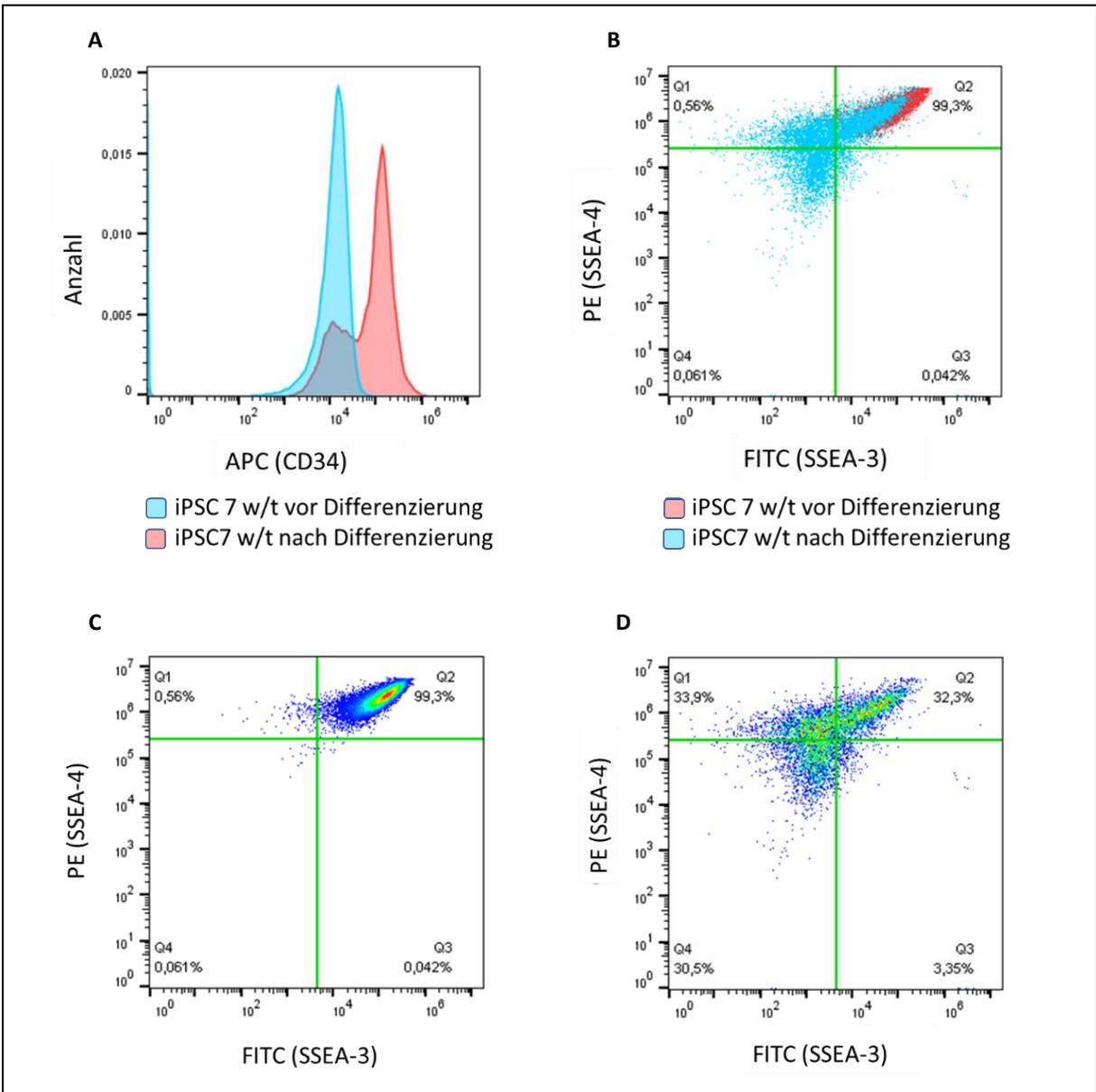
### 3.5.2 Nachweis der CD34 Expression nach erfolgter Differenzierung

Nach erfolgter Differenzierung wurde an Tag zwölf der Überstand mit hämatopoetischen Vorläuferzellen zur weiteren Analyse gewonnen. Es wurden Antikörper gegen CD34 und CD45 als

Nachweis für hämatopoetische Stammzellen sowie Antikörper gegen SSEA-3 und SSEA-4 als Negativkontrolle genutzt. Die Oberflächen-Antigene SSEA-3 und SSEA-4 sind auf verschiedenen Zelllinien wie Teratom-Zellen, embryonalen Stammzellen und induzierten pluripotenten Stammzellen exprimiert. Die Expression von SSEA-3 wird während Differenzierungsprozessen herunterreguliert. Die Zellen aus dem Überstand der erfolgten Differenzierung wurden mit undifferenzierten induzierten pluripotenten Zellen verglichen. Um den Verlust insbesondere von SSEA-3 während der Differenzierung nachzuweisen, wurden die Zellen vor und nach Differenzierung in ihrer Expression von SSEA-3 und -4 verglichen. Hierzu wurden die Quadranten der Kontrolle so gewählt, dass von den undifferenzierten (pluripotenten) Zellen 99,3 % im oberen rechten Quadranten liegen (doppelt positiv) (siehe nachfolgende Abbildung 19). In Abbildung 19 wird außerdem dargestellt, dass 64,4 % der Zellen nach erfolgter Differenzierung eine Herunterregulation von SSEA-3 aufweisen. Insgesamt 30,5 % zeigen sich doppelt negativ für SSEA-3 und -4 als Nachweis einer fehlenden Pluripotenz der differenzierten Zellpopulation. In der Abbildung ebenfalls dargestellt wird der Hinzugewinn des CD34 Oberflächenmarkers nach erfolgter Differenzierung als Marker für hämatopoetische Stammzellen. Insgesamt konnten im Überstand nach wiederholten Differenzierungsprozessen maximal 60 % CD34+ Zellen gemessen werden.

Mikroskopisch waren nach durchschnittlich acht bis zehn Tagen hämatopoetische Vorläuferzellen als Suspensionszellen sichtbar. Durchflusszytometrisch konnten ab Tag zehn CD34 und CD45 positive Zellen gemessen werden. Es erfolgte ebenfalls die durchflusszytometrische Analyse der adhärennten mesodermalen Zellen. Diese zeigte keine Expression der Oberflächenmarker CD34 und CD45.

Die Differenzierung von pluripotenten induzierten Stammzellen zu hämatopoetischen Vorläuferzellen wurde sowohl für nicht transduzierten Zellen als auch für *NRAS* und *KRAS* transduzierte Zelllinien durchgeführt. Diese ließen sich ähnlich wie die nicht transduzierten Zellen differenzieren.



**Abb. 19: FACS-Analyse der Differenzierung von iPSC in hämatopoetische Vorläuferzellen**

iPS-Zellen vor und nach der Differenzierung wurden mit Antikörpern für CD34 und SSEA-3 und -4 gefärbt. In (A) wird die CD34 Expression von wildtypischen (w/t) iPS-Zellen (blau) mit Zellen aus dem Überstand nach der erfolgten Differenzierung (rot) verglichen. In (B) wird die Expression der stammzelltypischen Oberflächenmarker SSEA-3 und -4 von wildtypischen (w/t) iPS-Zellen (rot) mit den Zellen aus dem Überstand nach der erfolgten Differenzierung (blau) verglichen. (C) zeigt die Expression von SSEA-3 und -4 in undifferenzierten induzierten pluripotenten Stammzellen, während (D) die Expression der Marker nach erfolgter Differenzierung abbildet.

## 3.6 Drugscreeningergebnisse

### 3.6.1 Unterschiedliches Wirkstoffansprechen in transfizierten HEK293-Zellen

Das Wirkstoff-Ansprechen der transfizierten HEK293-Zellen wurde mit Hilfe einer Hochdurchsatz-*Drugscreening* Plattform getestet. Es wurden 180 verschiedene Wirkstoffe getestet. Hierbei handelte es sich sowohl um etablierte Zystostatika als auch um neue, zielgerichtete Wirkstoffe. Die Wirkstoffe wurden randomisiert auf die Platte gegeben, um einen lokalisierungsbedingten Fehler zu vermeiden, der z. B. durch Verdunstungsprozesse auftreten kann. Die äußeren vier Reihen der Platte wurden aufgrund von Verdunstungsvorgängen nicht mit Wirkstoffen gefüllt und in der Auswertung entsprechend nicht betrachtet. Die Zellen wurden mit den Wirkstoffen 72 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte eine Auswertung der Zellviabilität (über Messung der ATP-Menge) mit Hilfe des CellTiterGlo Luminescent Cell Viability Assays. ATP ist ein Marker für das Vorhandensein metabolisch aktiver Zellen. Durch Zugabe des CellTiterGlo Reagenzes kommt es zur Zelllyse und damit zur Generierung eines Lumineszenz-Signals, das proportional zur vorhandenen ATP-Menge und damit unmittelbar proportional zur Anzahl metabolisch aktiver Zellen ist [49]. Die IC<sub>50</sub> Werte, also diejenigen Konzentrationen, bei denen 50 % des maximalen Effektes erreicht wurden, wurden durch eine nicht-lineare Regressionsanalyse mit R bestimmt. Die Darstellung der IC<sub>50</sub> Werte erfolgte zur einfacheren Visualisierung mithilfe einer *Heatmap* (siehe Abb. 20).

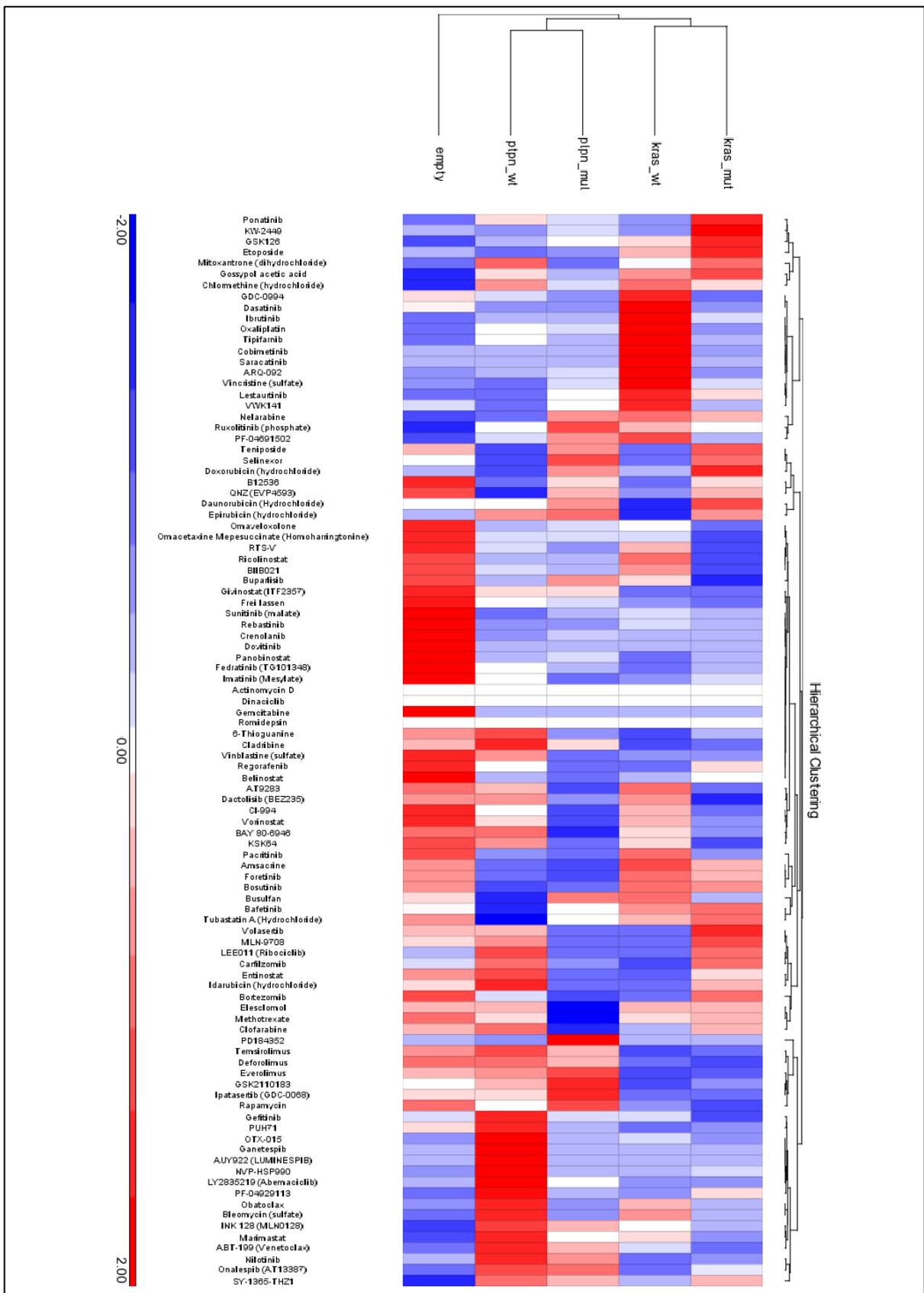
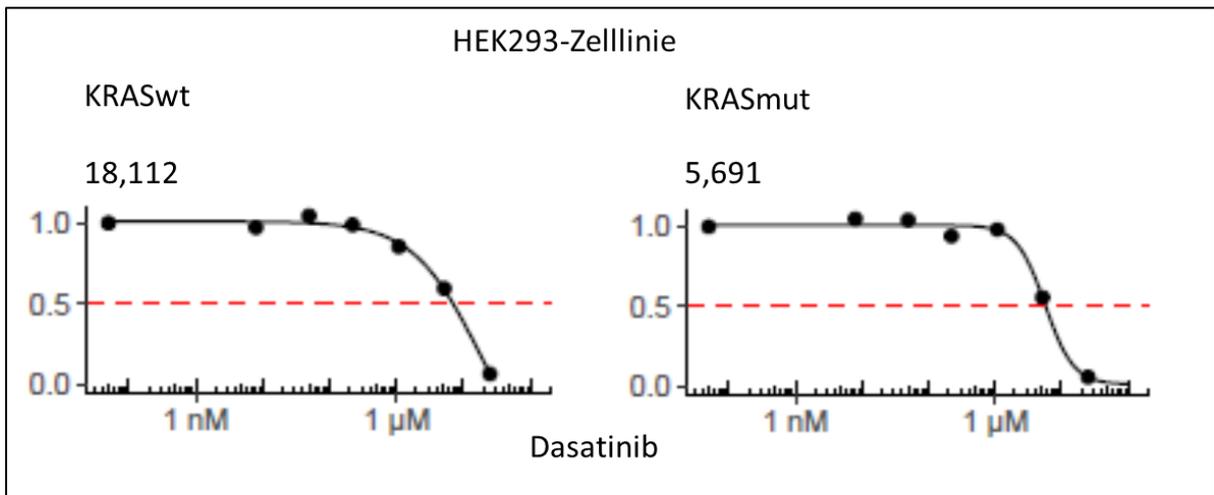


Abb. 20: Darstellung des Ansprechens von Wildtyp (Empty), KRAS- und PTPN11 HEK293-Zellen auf getestete Wirkstoffe anhand einer Heatmap

Die IC50 Werte, also diejenigen Konzentrationen, bei denen 50 % des maximalen Effektes erreicht wurden, sind in rot und blau dargestellt. Hohe IC50 Werte sind in rot dargestellt, während niedrige IC50 Werte in blau darge-

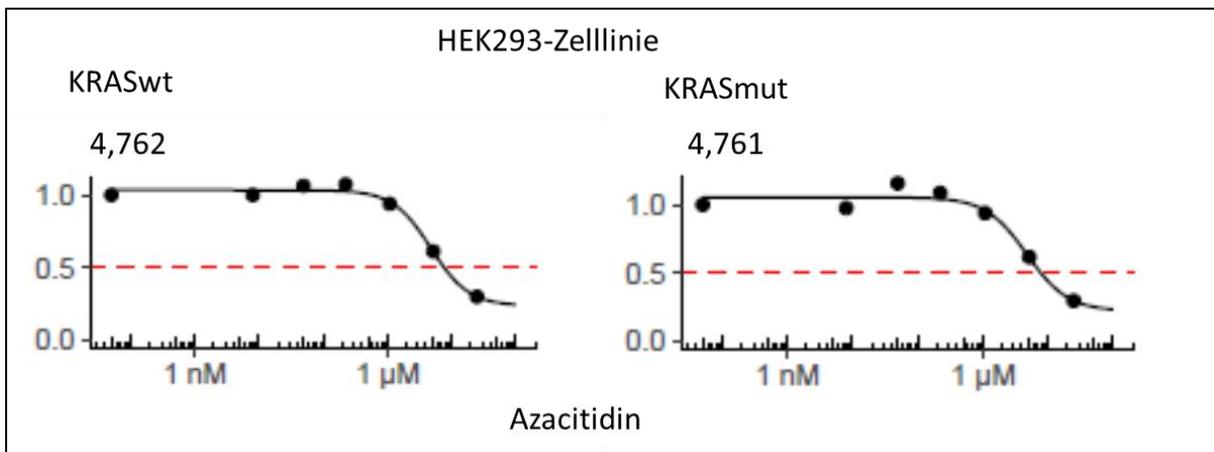
stellt werden. Mut: mutiert, wt: wildtyp. Die Darstellung erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Daniel Picard (Pädiatrische Neuroonkologie, Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und Klinische Immunologie, Universitätsklinikum Düsseldorf).

Es konnte gezeigt werden, dass sich die HEK293-Zellen, die mit einem Ras-aktivierenden Plasmid transfiziert wurden, jeweils im Vergleich zu der HEK293-Zelllinie mit dem transfizierten Empty-Plasmid in ihrem Wirkstoffansprechen unterscheiden. Auch konnte ein unterschiedliches Ansprechen der jeweils gesunden Kontrolle und der mutierten Variante für einige Wirkstoffe dargestellt werden.



**Abb. 21: Darstellung des Ansprechens von KRASwt und KRASmut-HEK293-Zellen auf Dasatinib**

Die KRASmut-Zelllinie (IC<sub>50</sub> 5,691 µM) hat ein niedrigeres IC<sub>50</sub> für Dasatinib als die Kontroll-Zelllinie (IC<sub>50</sub> 18,112 µM). Die IC<sub>50</sub> Werte wurden mit einer nicht-linearen Regressionsanalyse mit R bestimmt.

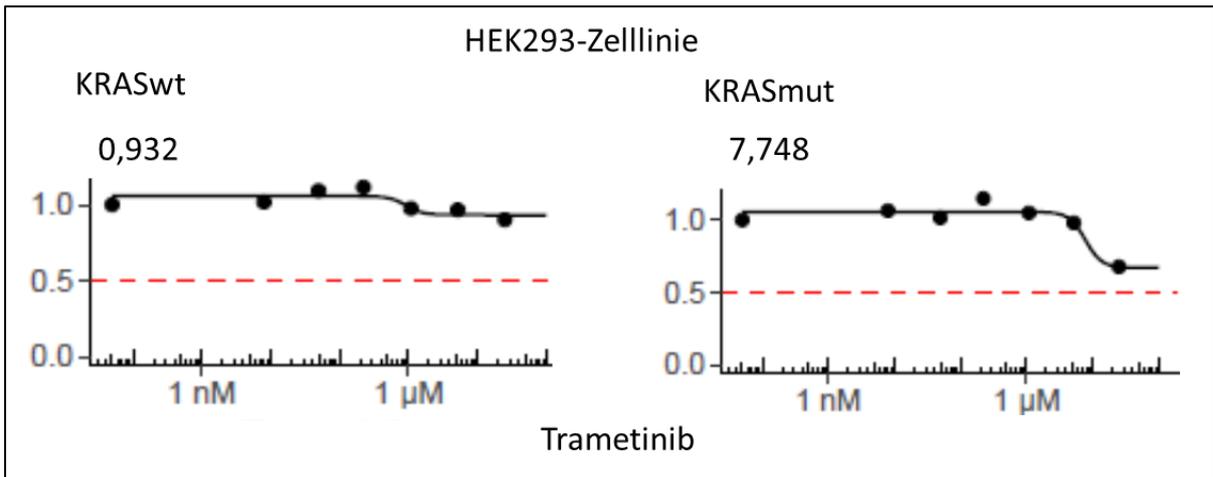


**Abb. 22: Darstellung des Ansprechens von KRASwt und KRASmut-HEK293-Zellen auf Azacitidin**

Die KRASmut-Zelllinie (IC<sub>50</sub> 4,761 µM) hat ein ähnliches IC<sub>50</sub> für Azacitidin wie die Kontroll-Zelllinie (IC<sub>50</sub> 4,762 µM). Die IC<sub>50</sub> Werte wurden mit einer nicht-linearen Regressionsanalyse mit R bestimmt.

In Abbildung 21 ist dargestellt, dass HEK293-KRASmut niedrigere IC<sub>50</sub>-Konzentrationen für Dasatinib haben als die jeweils entsprechende Wildtyp-Variante. Dies ist konform mit den erhobenen Daten der iPSC. Aufgrund dieses Ergebnisses wurde auch Dasatinib in dem *Drug-screen* für die iPSC getestet. Ein Unterschied im Ansprechen auf Azacitidin konnte für die HEK293-Zellen nicht signifikant gemessen werden (siehe Abb. 22). Ähnlich wie bei den iPSC-

Zelllinien zeigen auch die HEK-Zelllinien kein adäquates Ansprechen auf die getesteten Konzentrationen von Trametinib (siehe Abb. 23).

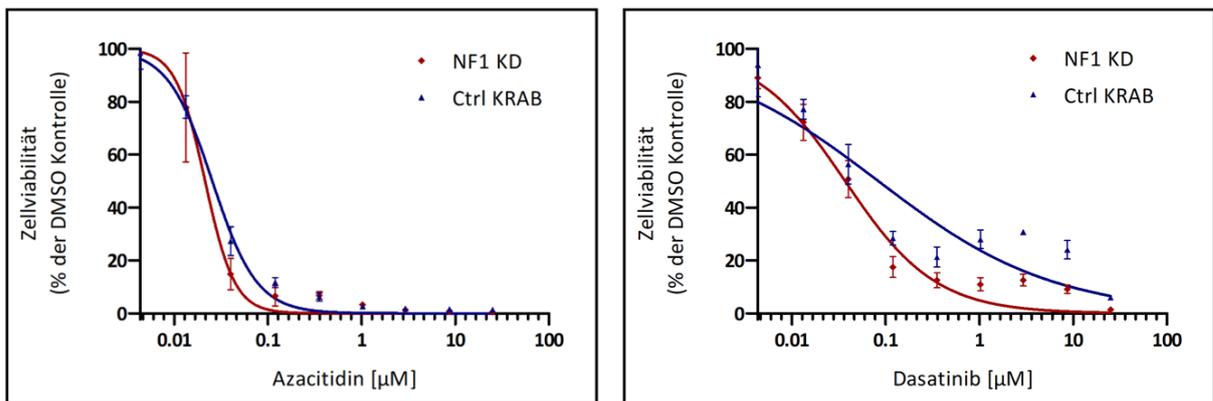


**Abb. 23: Darstellung des Ansprechens von KRASwt und KRASmut-HEK293-Zellen auf Trametinib**

Beide Zelllinien zeigen kein adäquates Ansprechen auf die getesteten Konzentrationen von Trametinib. Die IC50 Werte wurden mit einer nicht-linearen Regressionsanalyse mit R bestimmt.

### 3.6.2 Wirksamkeit von Dasatinib in manipulierten iPS-Zelllinien

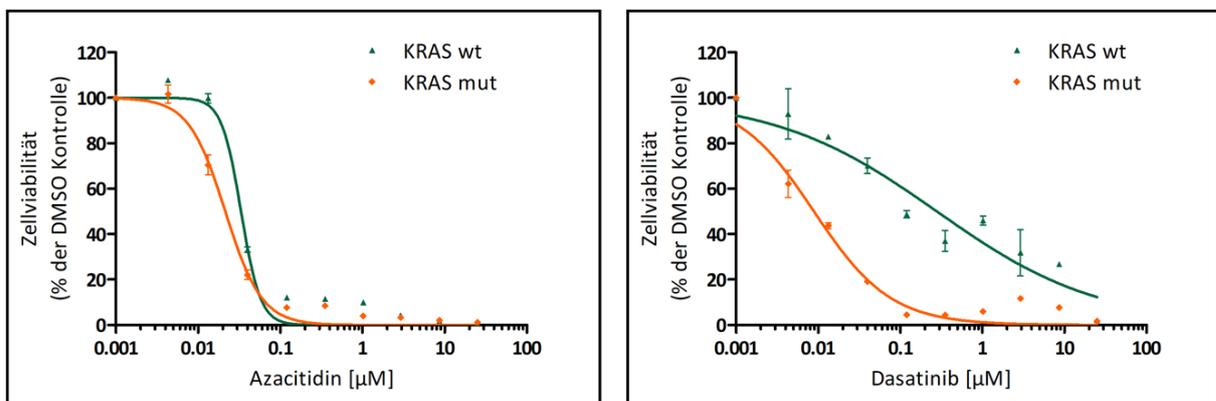
Es wurde das Ansprechen der Zellen auf die Wirkstoffe 5-Azazytidine, Dovitinib, Selumetinib, Erastin, Trametinib, Rapamycin, Dasatinib und Ruxolitinib getestet. Die Auswahl der Wirkstoffe erfolgte teilweise nach bereits etablierten Wirkstoffen (5-Azazytidine) sowie auch anhand des bereits an HEK293-Zellen durchgeführten Screens (Dasatinib, Dovitinib). Außerdem wurden zielgerichtete Wirkstoffe ausgewählt, die sich aktuell in Zulassungsstudien zur Behandlung der JMML (Trametinib) befinden bzw. zur Behandlung von plexiformen Neurofibromen bei NF1 (Selumetinib) zugelassen sind. Die Zellen wurden mit den Wirkstoffen 72 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte eine Auswertung der Zellviabilität mit Hilfe des CellTiterGlo Luminescent Cell Viability Assays. Die IC50 Werte wurden mit einer nicht-linearen Regressionsanalyse mit GraphPad Prism 5 bestimmt. Zur Bestimmung der Signifikanz erfolgte jeweils ein t-Test der ausgewählten IC50 Werte.



**Abb. 24: Darstellung des Ansprechens von *NF1-Knockdown*-iPS-Zellen (NF1 KD) auf Azacitidin und auf Dasatinib jeweils verglichen mit der Control-KRAB iPS-Zelllinie (Ctrl KRAB)**

Es konnte gezeigt werden, dass die *NF1-Knockdown*-Zelllinie eine signifikant niedrigere IC<sub>50</sub>-Konzentration für Azacitidin hat als die Kontroll-Zelllinie (p-Wert: 0,03; IC<sub>50</sub> Ctrl KRAB 0,025  $\mu\text{M}$ , IC<sub>50</sub> NF1 KD 0,021  $\mu\text{M}$ ). Dasselbe konnte für den Tyrosinkinaseinhibitor Dasatinib gezeigt werden (IC<sub>50</sub> Ctrl KRAB 0,084  $\mu\text{M}$ , IC<sub>50</sub> NF1 KD 0,037  $\mu\text{M}$ ). Hier beträgt der p-Wert 0,005. Die IC<sub>50</sub> Werte wurden mit einer nicht-linearen Regressionsanalyse mit GraphPad Prism 5 bestimmt. Zur Bestimmung der Signifikanz erfolgte jeweils ein t-Test der ausgewählten IC<sub>50</sub> Werte.

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl iPSC-KRASmut als auch iPSC-NF1KD signifikant niedrigere IC<sub>50</sub>-Konzentrationen für Azacitidin und Dasatinib hatten als die jeweils entsprechende Wildtyp-Variante (siehe Abb. 24 und Abb. 25). Azacitidin ist ein herkömmliches Zystostatikum aus der Gruppe der Nukleosidanaloga, das bereits standardmäßig in der Therapie der JMML eingesetzt wird [16]. Dasatinib ist ein Tyrosinkinase-Inhibitor, der für die Therapie der Philadelphia-chromosom positiven CML des Erwachsenenalters zugelassen ist [50].

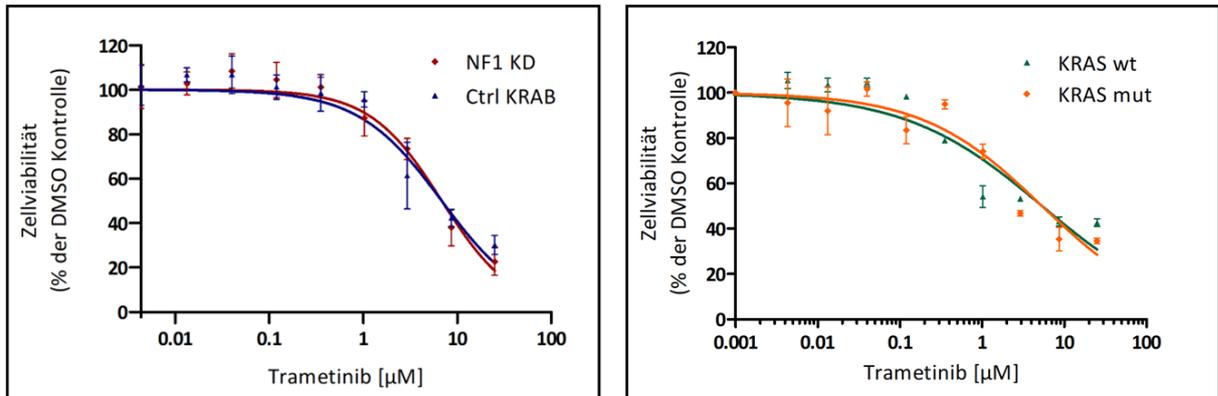


**Abb. 25: Darstellung des Ansprechens der *KRAS* mutierten iPS-Zellen (KRAS mut) auf Azacitidin und auf Dasatinib jeweils verglichen mit der *KRAS* Wildtyp-Zelllinie (KRAS wt)**

Die iPS-Zellen, die die mutierte *KRAS*-Variante tragen, sprechen signifikant besser auf Azacitidin an als die Wildtyp-Variante (p-Wert: 0,0001; IC<sub>50</sub> KRAS wt 0,033  $\mu\text{M}$ , IC<sub>50</sub> KRAS mut 0,021  $\mu\text{M}$ ). Auch für Dasatinib zeigte sich ein signifikant niedrigerer IC<sub>50</sub>-Wert für die mutierte *KRAS*-Variante als für die Wildtyp-Zelllinie (p-Wert: 0,0001; IC<sub>50</sub> KRAS wt 0,28  $\mu\text{M}$ , IC<sub>50</sub> KRAS mut 0,01  $\mu\text{M}$ ). Die IC<sub>50</sub> Werte wurden mit einer nicht-linearen Regressionsanalyse mit GraphPad Prism 5 bestimmt. Zur Bestimmung der Signifikanz erfolgte jeweils ein t-Test der ausgewählten IC<sub>50</sub> Werte.

Für die übrigen getesteten Wirkstoffe konnte kein signifikanter Unterschied der IC<sub>50</sub>-Konzentrationen gemessen werden. Dargestellt in Abbildung 26 ist beispielhaft der MEK-Inhibitor

Trametinib. Trametinib wird bereits in therapierefraktären Rezidiven der JMML in einer aktuell laufenden Phase 2 Studie der *Children's Oncology Group* (NCT03190915) untersucht. In den hier durchgeführten Tests konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der jeweils mutierten Variante und der gesunden Kontrolle gemessen werden.



**Abb. 26: Ansprechen der Zelllinien auf Trametinib**

Für den MEK-Inhibitor Trametinib gab es weder in den *NF1-Knockdown*-Zellen (NF1 KD) noch in den *KRAS*-Mutanten (KRAS mut) ein besseres Ansprechen als in den jeweils gesunden Kontrollen (Ctrl KRAB, KRAS wt). Die errechneten IC50-Werte unterschieden sich nicht signifikant. Die IC50 Werte wurden mit einer nicht-linearen Regressionsanalyse mit GraphPad Prism 5 bestimmt. Zur Bestimmung der Signifikanz erfolgte jeweils ein t-Test der ausgewählten IC50 Werte.

## 4 Diskussion

Die juvenile myelomonozytäre Leukämie ist eine seltene, maligne pädiatrische Erkrankung, die in vielen Fällen nur durch eine allogenen Stammzelltransplantation geheilt werden kann [1]. In 90 % der Fälle wird die Erkrankung durch eine Mutation in einem von fünf Genen ausgelöst (*NF1*, *KRAS*, *NRAS*, *PTPN11*, *CBL*) [7]. Dies schafft vermeintlich ideale Bedingungen zur Implementierung zielgerichteter Therapien. Dennoch ist es bislang nicht gelungen, neue effektive und zielgerichtete Behandlungsmethoden zu etablieren. Unter anderem das Fehlen geeigneter immortalisierter JMML-Zelllinien [34] erschwert die Erforschung der Pathogenese sowie Medikamententestungen. Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit war es, geeignete Zellmodelle zu generieren und mithilfe dieser genetisch veränderten iPSC das Wirkstoffansprechen auf verschiedene Inhibitoren zu untersuchen und so grundlegende Erkenntnisse für weitere Therapietestungen zu erlangen.

### 4.1 Transduzierte iPSC als JMML-Zelllinienersatz

Um grundlegende und ausführliche Medikamententestungen durchführen zu können, ist in der Regel eine große Anzahl an teilungsfähigen und kultivierbaren Zellen erforderlich. Die Rarität der Erkrankung, ihr ausschließliches Vorkommen im Kindesalter und der fehlende Reifungsblock der JMML-Zellen hat es bislang nicht möglich gemacht, Zelllinien zu immortalisieren und über einen längeren Zeitraum zu kultivieren [3, 34]. In den vergangenen Jahren entstand deshalb die Idee, durch die Herstellung geeigneter iPSC-Zelllinien Charakteristika und Verhaltensweisen von JMML-Zellen nachzustellen und diese für Forschungszwecke zu nutzen [27, 38, 40]. Hierzu können iPSC entweder aus Material von erkrankten Personen generiert und dann auch gentechnisch verändert werden oder aus Material von gesunden Menschen gewonnen und anschließend mit einer pathogenen Variante manipuliert werden [35]. Aufgrund der Seltenheit der Erkrankung sowie der geringen Blastenzahl in Patientenmaterial wurde für diese Arbeit entschieden, kommerziell erhältliche iPSC von gesunden Probanden zu nutzen und diese durch das Einbringen JMML-typischer Mutationen genetisch zu verändern. Dies bietet den Vorteil der potenziell unendlichen Reproduzierbarkeit der Methode. Auf der anderen Seite werden auf diese Weise im Wesentlichen monogenetische Veränderungen untersucht. Epigenetische Veränderungen wie Geschlecht und Alter, die bei der Krankheitsentstehung wahrscheinlich eine große Rolle spielen [5, 21, 22], werden durch diese Methode außer Acht gelassen. Gleichzeitig kann nicht ausgeschlossen werden, dass gewisse *Memory*-Effekte der iPSC der gesunden Probanden ebenfalls Einfluss auf die Ergebnisse nehmen. Diese Effekte entstehen durch somatische epigenetische Veränderungen der Ursprungszelle und können insbesondere das Differenzierungspotenzial beeinflussen [51]. Auch wenn iPSC aus Hautfibroblasten von gesunden Probanden gewonnen wurden, können weitere genetische Veränderungen prinzipiell nicht ausgeschlossen werden. Der Hersteller der hier verwendeten iPSC (Takara Bio Europe AB, Göteborg, Schweden) überprüft zwar den Karyotypen der generierten iPSC, analysiert aber nicht das gesamte Genom der Probanden nach potenziell einflussnehmenden genetischen Veränderungen.

Voraussetzung für die Etablierung eines JMML-Zellmodells auf der Basis von iPSC gesunder Probanden war die stabile Expression der mutierten Zielgene. Hierfür erfolgte die Herstellung

geeigneter Plasmide und die lentivirale Transduktion der iPSC mit KRASwt-, KRASmut-, NRASwt- und NRASmut-Konstrukten. Zur Initiierung eines stabilen *Knockdowns* von *NF1* in den iPSC erfolgte die lentivirale Transduktion des *NF1-KD* Plasmids und des Ctrl\_KRAB-Plasmids mit der CRISPRi Methode. Die Überexpression von *NRAS* und *KRAS* und der *NF1-Knockdown* konnten sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene gezeigt werden (siehe Kapitel 3.3.1, 3.3.2, 3.4.1 und 3.4.3). Zur Qualitätskontrolle der iPSC wurden die Oberflächen-Antigene SSEA-3 und SSEA-4 nach erfolgter Transduktion gemessen. Somit konnte die Pluripotenz auch nach erfolgter Transduktion nachgewiesen werden. Für die *NF1-Knockdown* Zellen wurde zudem die Expression der Transkriptionsfaktoren *OCT4*, *SOX2* und *cMyc* mit den Zellen mit dem Kontrollplasmid sowie mit nicht transduzierten iPSC verglichen. Hier zeigte sich ein unverändertes Expressionsmuster der Stammzellmarker, sodass die Pluripotenz weiterhin angenommen werden kann.

Interessanterweise konnte für die KRASmut-Zelllinie verglichen mit der KRASwt-Zelllinie sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene eine deutlich erhöhte Expression gezeigt werden (siehe Abbildung 12 (A) und Abbildung 13). Dieses Ergebnis konnte jedoch nicht in den Analysen der *NRAS*-iPS-Zelllinien beobachtet werden. Auch für die Expression von *KRAS* in den HEK293-Zellen konnte dies nicht nachgewiesen werden. Es impliziert einen positiven Effekt der Hochregulation des Ras-MAP-Kinase-Signalwegs durch Induktion der Missensemutation *KRAS* p. G12D. Dies könnte u.a. darin begründet liegen, dass die *KRAS* G12D Mutation für iPSC einen zellbiologischen Vorteil bringt. In einer Studie aus 2018 konnte gezeigt werden, dass die *KRAS* Mutation G13C mit einer Hochregulation von *KRAS* und einer damit einhergehenden Aktivierung des Ras-MAP-Kinase-Signalwegs einen positiven Einfluss auf die Zellerneuerung von iPSC hat [52]. Kubara et al. führten dies auf eine Hochregulation verschiedener Gene, wie *NANOG* und *OCT4* zurück [52]. Die Expression dieser Gene ist mit Zellerneuerungsprozessen in undifferenzierten Zellen assoziiert [52]. Sie wurden in den mutierten Zellen stärker exprimiert als in den Wildtyp Zellen [52]. Gleichzeitig fanden sie, dass *KRAS* G13C die neuronale Differenzierung inhibiert [52]. Überträgt man diese Ergebnisse auf die hier aufgeführten Resultate, kann angenommen werden, dass ähnliche Prozesse für die *KRAS* G12D Mutation eine Rolle spielen. Mutmaßlich könnte diese Mutation ebenfalls durch Aktivierung bestimmter Gene über die Hochregulation des Ras-MAP-Kinase-Signalwegs einen deutlichen Vorteil für Zellerneuerungsprozesse in Stammzellen bringen.

Um zu untersuchen, ob die Transduktion in den Zelllinien neben der erhöhten direkten Gen- und Proteinexpression auch zu einer gesteigerten Aktivierung des Ras-MAP-Kinase-Signalwegs führt, wurde die Proteinmenge von unterschiedlichen Zwischenstufen der Signalkaskade bestimmt. Letztendlich konnte – bis auf *NRASmut* – keine erhöhte Expression für MAP- und MEK-Kinase festgestellt werden, sodass es nicht gelungen ist, eine Aktivierung des Ras-MAP-Kinase-Signalwegs durch die Transduktionen sicher nachzuweisen. Auch nach Initiierung von Zellstress durch Hypoxie bzw. *Starvation* gelang mit den traditionellen Methoden kein Nachweis einer erhöhten Proteinmenge im Vergleich zur nicht transduzierten Zelllinie. Zum Vergleich lag für diese Methoden allerdings keine Positivkontrolle vor. Letztendlich bleibt kritisch zu hinterfragen, ob die Messung von Proteinmengen, die am besten geeignete Methode zum

Nachweis einer Überaktivierung des Signalwegs ist. Viele Untersuchungen belegen mittlerweile, dass eine 1:1 Übertragung zwischen Transkription, Translation und Proteom nicht möglich ist. Für verschiedene onkogene Tyrosinkinasen, die in der Pathogenese verschiedener Leukämien entscheidende Rollen spielen, konnte gezeigt werden, dass die Hauptveränderungen posttranslational entstehen [53]. So fanden Pierce et al. durch Transkriptom- und Proteomanalysen des Zytoplasmas und des Nukleolus heraus, dass das onkogene Potenzial der Tyrosinkinasen auch ohne eine veränderte mRNA oder Proteinexpression zum Tragen kommt [53]. Aus diesem Grund nutzten Pearson et al. in ihren Untersuchungen von *PTPN11* mutierten iPSC die Proteomanalyse, um neue potenzielle Therapietargets aufzudecken [40]. Dies impliziert, dass der fehlende Nachweis einer erhöhten Proteinmenge der Tyrosinkinasen mittels Westernblot eine Aktivierung des Ras-MAP-Kinase-Signalwegs in den transduzierten Zellen nicht ausschließt. Weitere Untersuchungen beispielsweise mittels Proteom- und Transkriptomanalyse hätten gegebenenfalls die Aktivierung des Ras-MAP-Kinase-Signalwegs in den transduzierten Zelllinien nachweisen können.

Ein großer Vorteil von iPSC liegt darin, dass sie gezielt in Zellen aller drei Keimblätter differenziert werden können [30]. Für diese Arbeit spielte insbesondere die Fähigkeit der Differenzierung in hämatopoetische Stammzellen eine Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass auch sekundär genetisch veränderte iPSC sowohl mit einer *KRAS*- und *NRAS*-Überexpression als auch mit einem *NF1-Knockdown* noch in der Lage sind, sich gleichermaßen in hämatopoetische Stammzellen zu differenzieren. In ihrer Studie zu iPS-Zellen von JMML-Patienten mit somatischen *PTPN11* Mutationen zeigten Gandre-Babbe et al., dass diese Zellen im Vergleich zur gesunden Kontrolle eine gesteigerte Proliferation aufwiesen, sensibler auf die Stimulation mit GM-CSF reagierten und damit typische Charakteristika der JMML nachahmten [38]. Dahingegen fanden Larribere et al. 2015 heraus, dass eine Ras-aktivierende *NF1*-Mutation eine zelluläre Seneszenz während des Differenzierungsprozesses zu Melanozyten induzierte [54]. Dies steht im Kontrast zu der Annahme, dass eine Herabregulierung eines Tumorsuppressorgens eher zu einer gesteigerten Proliferation und Differenzierung führen sollte. Es legt den unterschiedlichen Einfluss der einzelnen Mutationen auf verschiedene Differenzierungsprozesse nahe, der bislang nicht in seiner Vollständigkeit verstanden scheint. Letztendlich wären quantitative Untersuchungen der hämatopoetischen Differenzierung der verschiedenen iPS-Zelllinien hilfreich, um den Einfluss der einzelnen Mutationen näher untersuchen zu können. In dieser Arbeit erfolgte zunächst der *proof-of-principle*, dass eine sekundäre gentechnische Veränderung von iPSC das Potenzial zur hämatologischen Differenzierung nicht verringert und sie sich so als Modell zur Erforschung der JMML eignen. Weitere quantitative Untersuchungen konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden. Da die zugrundeliegenden Mutationen nicht nur bei der Entstehung der JMML eine entscheidende Rolle spielen, bergen die generierten iPS-Zelllinien zudem das Potenzial, die Pathogenese anderer Erkrankungen und den Einfluss der Mutationen auf weitere Differenzierungsprozesse näher zu untersuchen. Beispielsweise könnte der Einfluss einer *NF1*-Mutation auf die neuronale Differenzierung untersucht werden. Mazuelas et al. differenzierten 2022 gentechnisch veränderte *NF1* (-/-) *Knockout*-iPSC zu Schwanzzellen, stellten hieraus zusammen mit *NF1* (+/-) *Knockdown*-Fibroblasten Neurofibrom-Sphäroide her und konnten so ein *in vitro/in vivo* 3D-Modell für plexiforme Neurofibrome herstellen [55]. So können unter anderem die Expressionsmarker der Entwicklung von

Neurofibromen untersucht werden [55]. Auch das Risiko an einem Hirntumor zu erkranken, insbesondere niedrigmaligne Tumoren entlang des Sehnervens, ist bei NF1-Patienten fünffach erhöht [18, 56]. Dies macht Medikamententestungen von iPSC mit einem *NF1-Knockdown* auch für diese Krankheitsentitäten interessant.

## 4.2 *Drugscreening* der HEK293-Zellen

Das Wirkstoff-Ansprechen der transfizierten HEK293-Zellen wurde mit Hilfe einer roboterassistierten Hochdurchsatz-*Drug-Screening*-Plattform für 180 verschiedene Wirkstoffe getestet. Es handelte sich sowohl um etablierte Zystostatika als auch neue zielgerichtete Wirkstoffe. Das Hochdurchsatz-*Drugscreening*, mit der Möglichkeit viele Inhibitoren mit verhältnismäßig wenig Ressourcen zu untersuchen, hat die Entdeckung und Entwicklung neuer Wirkstoffe in den vergangenen Jahrzehnten erheblich vereinfacht [57]. HEK293-Zellen sind aufgrund ihrer zellbiologischen und genetischen Eigenschaften als Modell für das Verhalten von JMML-Zellen jedoch nur sehr bedingt geeignet. Andererseits sind sie sehr leicht zu kultivieren und zu transfizieren. Für diese Arbeit sollte zunächst eine Vorauswahl aus 180 Wirkstoffen getroffen werden, um eine geringere Anzahl an Wirkstoffen an den iPSC testen zu können. Unter der Annahme, dass die eingebrachten Plasmide und Mutationen das Wirkstoffansprechen auch in HEK293-Zellen verändern würde, führten wir daher zunächst das Hochdurchsatz-*Drugscreening* durch.

Es konnte gezeigt werden, dass sich die HEK293-Zellen, die mit einem Ras-aktivierenden Plasmid transfiziert wurden, im Vergleich zu der HEK293-Zelllinie mit dem transfizierten Empty-Plasmid in ihrem Wirkstoffansprechen unterscheiden. Auch konnte ein unterschiedliches Ansprechen der jeweils gesunden Kontrolle und der mutierten Variante für einige Wirkstoffe dargestellt werden. Dies unterstützt die Annahme, dass die eingebrachten Plasmide und Mutationen das Wirkstoffansprechen in HEK293-Zellen verändern. Aufgrund des Formates der Untersuchungen wären jedoch weitere Versuche mit den transfizierten HEK293-Zellen erforderlich, um die entsprechenden Unterschiede im Ansprechen auf die Komponenten vollends darzulegen. Da die HEK293-Zellen aufgrund ihrer zellbiologischen und genetischen Eigenschaften als Modell für die JMML nur sehr bedingt geeignet sind, erfolgten mit diesen Zellen keine weiteren Versuche. Stattdessen fokussierte sich die weitere Arbeit auf die Experimente mit den iPSC-Zellen.

Die transfizierten Zellen zeigten für herkömmliche Chemotherapeutika relevant niedrigere IC<sub>50</sub>-Werte als die nicht transfizierten HEK293-Zellen. Interessanterweise konnte auch in dem Screen an den HEK293-Zellen bereits gezeigt werden, dass die mutierte *KRAS*-Variante für Dasatinib einen niedrigeren IC<sub>50</sub> Wert als die Wildtyp-Zelllinie zeigte. Dies ist konsistent zu den Ergebnissen, die für Dasatinib mit den *KRAS* transduzierten iPSC erhoben werden konnten (vgl. Kapitel 3.6.2).

## 4.3 *Drugscreening* der iPSC

Als immortalisierte Zelllinien eignen iPSC sich gut zur Durchführung von Medikamentenscreens [32]. Die benötigte Menge an Zellen kann häufig bei der Kultivierung von Patienten-

proben nicht erreicht werden [3, 34]. Induzierte pluripotente Zellen hingegen können vervielfältigt und zum Screening eingesetzt werden. Eine Testung auf Stammzellebene erscheint zudem klinisch sehr relevant, da nach aktuellem Wissensstand die leukämischen Stammzellen zwar nur einen geringen Prozentsatz der Tumorzellen ausmachen, aber sehr robust zu sein scheinen und ein hohes Potenzial an Proliferation und Regeneration bergen [58]. Dies impliziert, dass Behandlungsmethoden insbesondere auch auf die leukämischen Stammzellen und nicht einzig auf die einzelnen weiter differenzierten Subpopulationen abzielen sollten [58].

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es nicht, das Hochdurchsatz-*Drugscreening* mit 180 Wirkstoffen für die iPSC bzw. die differenzierten hämatopoetischen Stammzellen durchzuführen. Zunächst war es nicht möglich, die CD34 positiven Zellen mittels MACS oder FACS von undifferenzierten Zellen im Überstand aufzutrennen. Dies liegt am ehesten daran, dass die Experimente aufgrund ihres Aufwandes und der Wirtschaftlichkeit im kleinen Format durchgeführt wurden und so die absolute Anzahl an differenzierten Zellen gering war. Außerdem zeigten sich diese Zellen in unseren Versuchen nicht längerfristig kultivierbar. Ein Screen der unselektierten Zellen im Überstand nach erfolgter Differenzierung ergab unplausible Ergebnisse. Auch ist anzunehmen, dass undifferenzierte iPSC zu stressanfällig für die Durchführung eines Hochdurchsatz-*Drugscreens* auf 1536-*Well*-Platten sind [59]. Daher wurde die Medikamententestungen an den iPSC für eine begrenzte Anzahl an Wirkstoffen durchgeführt. Die Auswahl der Wirkstoffe erfolgte teilweise nach bereits etablierten Wirkstoffen wie Azacitidin. Ebenfalls wurden anhand des an HEK293-Zellen durchgeführten Hochdurchsatz-*Drugscreens* potenzielle Kandidaten ermittelt. Hier zeigte sowohl Azacitidin als auch Dasatinib und Dovitinib ein vielversprechendes Ansprechen. Außerdem wurden zielgerichtete Wirkstoffe ausgewählt, die sich aktuell in Zulassungsstudien zur Behandlung der JMML (Trametinib) befinden bzw. zur Therapie von plexiformen Neurofibromen bei NF1 zugelassen sind (Selumetinib). Eine Literaturrecherche ergab, dass *in vitro* Untersuchungen bereits ein Potenzial für JAK-Inhibitoren wie z. B. Ruxolitinib und mTOR-Inhibitoren wie Rapamycin zur Behandlung der JMML zeigten [27, 28]. Aus diesem Grund erfolgte ebenfalls eine Untersuchung des Ansprechens der iPSC für diese beiden Inhibitoren.

In den durchgeführten Versuchen konnte gezeigt werden, dass das Wirkstoffansprechen von Azacitidin in den transduzierten iPSC mit der jeweiligen mutierten Variante für *KRAS* bzw. *NF1* stärker ist als in den Zellen mit der entsprechenden Wildtyp Variante (vgl. Abbildung 24 und Abbildung 25). Dies ist konform mit aktuellen Untersuchungen, die zeigen, dass Azacitidin bei der Behandlung der JMML effektiv zu sein scheint [37, 60, 61]. Eine aktuelle Phase 2 Studie (NCT02447666) zur Monotherapie mit Azacitidin vor Stammzelltransplantation bei neu diagnostizierten JMML-Patienten zeigt zudem ein großes Potenzial des Wirkstoffs [16]. Die genaue antineoplastische Wirkweise von Azacitidin ist bislang nicht vollständig verstanden [37]. Krombholz et al. konnten an Xenograftmodellen zeigen, dass Azacitidin die DNA-Methyltransferasen in JMML-Zellen blockiert und so die Hypermethylierung der CpG Inseln auf ein normales Methylierungslevel bringt [37]. 2021 konnte dieser Effekt ebenfalls an JMML-Patienten nachgewiesen werden [16]. Auch wenn diese Ergebnisse vielversprechend erscheinen, wird angenommen, dass Azacitidin nicht als Monotherapie ausreichen würde [61]. Auch in den hier

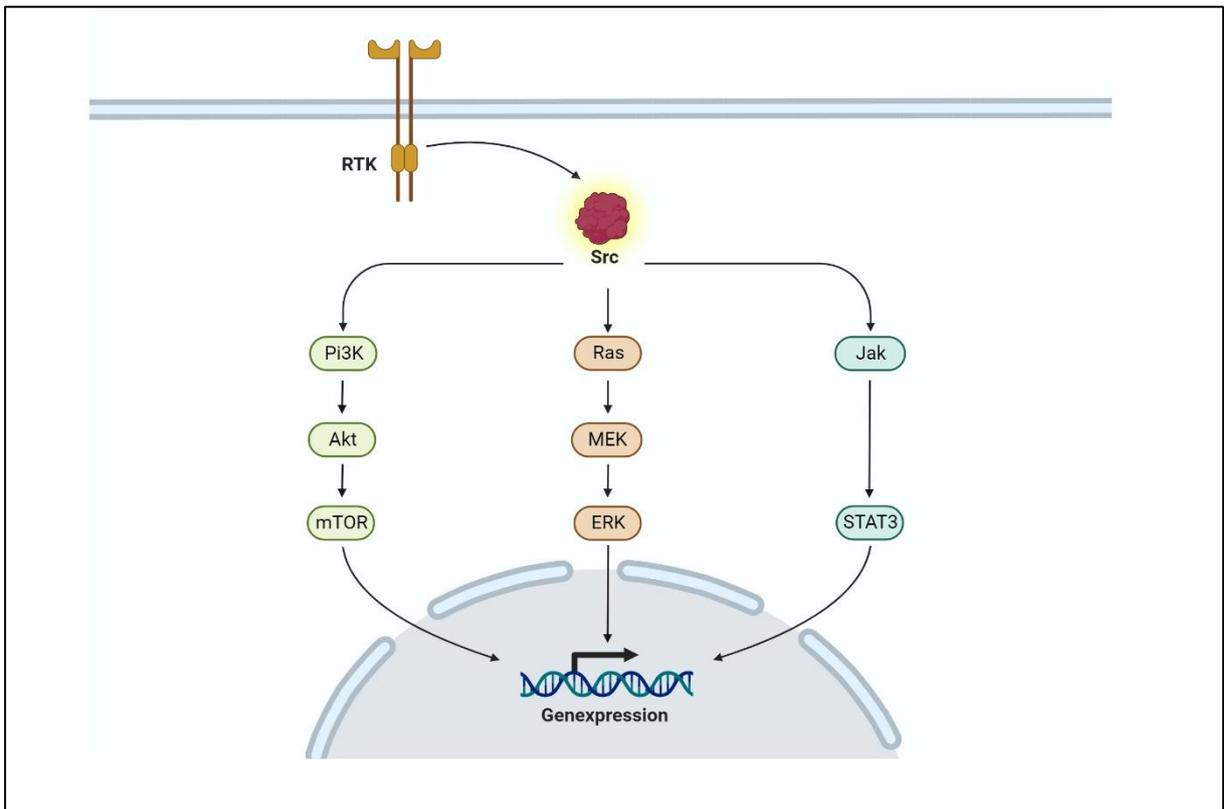
durchgeführten Untersuchungen konnte zwar ein signifikanter Unterschied in den IC50-Konzentrationen gemessen werden, allerdings weichen die Konzentrationen trotzdem nur geringfügig voneinander ab (vgl. Abbildung 24 und Abbildung 25).

Für den MEK-Inhibitor Trametinib konnte in den durchgeführten Untersuchungen kein verstärktes Ansprechen für die mutierten Zelllinien gezeigt werden (vgl. Abbildung 26). Trametinib wird in therapierefraktären Rezidiven der JMML in einer aktuell laufenden Phase 2 Studie der *Children's Oncology Group* (NCT03190915) untersucht. Daher wurde initial erwartet, dass auch für die hier untersuchten Zelllinien ein verbessertes Ansprechen vorliegen müsste. In Untersuchungen an JMML iPSC konnte insbesondere für *PTPN11* mutierten JMML-Zellen ein selektives Ansprechen auf Trametinib gezeigt werden [27]. Da es sich in dieser Arbeit um Untersuchungen an *KRAS*- und *NF1*-veränderten Zellen handelt, könnte die unterschiedliche zugrunde liegende Mutation eine Begründung für das fehlende Ansprechen der Zellen sein. Wie in Kapitel 3.3 dargestellt und in Kapitel 4.1 bereits diskutiert, konnten für die transduzierten iPSC keine Hochregulation des Ras-MAP-Kinase-Signalwegs auf Proteinebene (MEK, MAP) nachgewiesen werden. So ist es ebenfalls möglich, dass die hochregulierenden Prozesse in den transduzierten iPSC nicht unbedingt auf der Ebene des MEK-Signalwegs stattfinden. Mit ihrer Proteomanalyse aus 2020 konnten Pearson et al. für *PTPN11* mutierte JMML-iPSC beispielsweise zeigen, dass es zu posttranslationalen Veränderungen der p53- und NFκb-Signalwege kommt [40]. Sie postulieren, dass diese beiden Signalwege somit geeignete Therapieziele darstellen könnten [40]. Auch Feedback-Mechanismen, die mit einer Aktivierung des PI3K-Signalwegs einhergehen, sobald singulär mit MEK-Inhibitoren blockiert wird, sind als Ursache für das fehlende Ansprechen möglich [62]. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um zu zeigen über welche Signalwege das onkogene Potenzial der *KRAS*- und *NF1*-mutierten iPSC zum Tragen kommt. Diese Untersuchungen waren im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich.

Es wurde außerdem ein verstärktes Ansprechen der Zellen zunächst für Selumetinib angenommen, konnte aber in den Untersuchungen nicht nachgewiesen werden. Selumetinib ist der einzige zugelassene MEK-Inhibitor im angloamerikanischen und europäischen Raum zur Therapie von inoperablen plexiformen Neurofibromen bei NF1 [63]. In einer 2020 veröffentlichten Phase 2 Studie konnte gezeigt werden, dass Selumetinib wesentlich zur (teilweise langfristigen) Tumorreduktion beiträgt, sowie das klinische Behandlungsergebnis der Patienten verbessern kann [64]. Eine mögliche Erklärung für das fehlende Ansprechen von Selumetinib und Trametinib auf die mutierten iPSC kann den Untersuchungen von Lyubynska et al. entnommen werden. Die Autoren konnten zwar zeigen, dass der MEK-Inhibitor Mirdametininib die peripheren hämatoonkologischen Symptome in *KRAS* G12D mutierten Mäusen reduzieren kann, die Mutation aber auf molekularer Ebene weiterhin in den Xenografts persistiert [65]. Diese Daten implizieren, dass der Nutzen der verschiedenen MEK-Inhibitoren insbesondere darin bestehen könnte, den klinischen Allgemeinzustand vor einer möglichen Stammzelltransplantation zu verbessern [65]. Für eine kurative Therapie wird jedoch weiterhin die Elimination der leukämischen Stammzellen notwendig sein [65]. Aufgrund von Voruntersuchungen, die zeigten, dass neben dem MEK/ERK-Signalweg auch der JAK/STAT-Signalweg für die Proliferation und Differenzierung von *NRAS* G12D mutierten hämatopoetischen Stammzellen relevant zu sein

scheint [66], untersuchten Kong et al. 2014 den Effekt einer kombinierten Therapie aus einem MEK-Inhibitor und einem JAK-Inhibitor [67]. Sie konnten zunächst zeigen, dass Selumetinib als Monotherapie – ähnliche wie Mirdametinib – bereits das Überleben von *NRAS* G12D mutierten Mäusen signifikant verlängert [67]. In der Kombination mit dem JAK-Inhibitor AZD1480 konnte dieser Effekt noch verstärkt werden, indem u.a. die Proliferation der hämatopoetischen Vorläuferzellen reduziert wurde [67]. Weitere Untersuchungen zur kombinierten Therapie mit zielgerichteten Inhibitoren erscheinen daher sinnvoll und könnten in zukünftigen Experimenten mit der hier dargestellten Methode an modifizierten iPSC durchgeführt werden.

Dasatinib ist ein oral verfügbarer Inhibitor mehrerer Tyrosinkinase. Er gehört zur zweiten Generation der Tyrosinkinase-Inhibitoren und ist in Deutschland zur Therapie der Philadelphia-Chromosom-positiven CML und ALL bei Kindern und Erwachsenen zugelassen. In den Untersuchungen, die für diese Arbeit durchgeführt wurden, konnte ein signifikant besseres Ansprechen auf Dasatinib sowohl bei *KRAS*-mutierten HEK293-Zellen als auch bei *KRAS*- und *NF1*-mutierten iPSC verglichen mit der jeweiligen Wildtyp-Variante nachgewiesen werden. Mit einer ausschließlichen Aktivierung des Ras-MAP-Kinase-Signalwegs sind diese Effekte nicht ausreichend zu erklären. Daher stellt sich die Frage, auf welchen molekularen Wirkweisen der Effekt von Dasatinib begründet liegt. Möglicherweise sind diese Effekte auf die Aktivierung der Src-Kinase durch Ras zurückzuführen. Ras-MAP-Kinase-Signalwegmutationen führen zu einer Aktivierung von Src [68] und greifen somit auch durch Aktivierung anderer Signalwege (bspw. Akt/PI3-K-Signalweg) in die zellulären Prozesse ein. Bunda et al. konnten bereits 2013 zeigen, dass Dasatinib möglicherweise über diesen Weg das hypersensible Wachstum von leukämischen Zellen von JMML-Patienten mit *CBL*-Mutationen signifikant hemmt [29]. Der Tyrosinkinase-Inhibitor der ersten Generation Imatinib, der Src nicht beeinflusst, zeigte diesen Effekt nicht [29]. Auch für andere Ras-mutierte JMML-Zelllinien konnte der hemmende Effekt von Dasatinib auf die hämatopoetische Proliferation gezeigt werden [29]. Nichtsdestotrotz erwarten die Autoren, dass eine zielgerichtete Inhibition von Src effektiver sein würde als ein Multikinase-Inhibitor wie Dasatinib [29]. Ein Inhibitor, der ausschließlich die Src-Kinase inhibiert, ist jedoch nach aktuellem Stand nicht verfügbar [29]. Eine Überaktivierung von Src bei *CBL*-mutierten Zellen konnte auch in weiteren Untersuchungen nachgewiesen werden [69, 70]. Interessanterweise fanden Belizaire et al. in ihren mutierten *CBL*-Zelllinien eher eine Aktivierung von Lyn (Src-Signalweg) sowie vom PI3K-Signalweg als eine Aktivierung des MAPK-Signalwegs [70]. Dies untermauert die Hypothese, dass Ras-MAP-Kinase-Signalwegmutationen nicht ausschließlich auf den MAPK-Signalweg wirken, sondern je nach Zelltyp und Bedingungen multiple Zellsignalwege beeinflussen [70].



**Abb. 27: Der Einfluss von Src auf verschiedene Zellzyklus-Signalwege (nach Hsu et al., 2020 [71])**

Abgebildet ist eine vereinfachte Darstellung der verschiedenen Wirkweisen von Src in der Zelle. Src nimmt Einfluss auf verschiedene Signalwege in einer Zelle. Src wird u.a. durch RTK (Rezeptortyrosinkinasen) aktiviert und aktiviert dann seinerseits den MAPK-Signalweg und den PI3K-Signalweg. Die Abbildung wurde mit BioRender.com kreiert.

Eine weitere – ergänzende oder alternative – Begründung für die Wirkweise von Dasatinib in den Ras-überaktiven Zelllinien geben die Feedbackmechanismen zwischen dem Ras-Raf-MAPK-Signalweg und dem Akt-PI3K-Signalweg. Für viele verschiedene Tumorarten mit einer Überexpression des Ras-MAP-Kinase-Signalwegs durch verschiedenste zugrundeliegende Mutationen konnte bereits gezeigt werden, dass der Akt-PI3K-Signalweg hochreguliert wird, wenn der MAPK-Signalweg durch singuläre MEK-Inhibitoren blockiert wird [62, 72, 73]. Umgekehrt ist ebenfalls die Aktivierung des MAPK-Signalwegs möglich, wenn der PI3K-Signalweg inhibiert wird [74]. Yuen et al. beschreiben eine Verstärkung des Effektes durch zugrundeliegende *KRAS*-Mutationen [74]. Aus diesem Grund gibt es bereits insbesondere bei soliden Tumoren Untersuchungen zur kombinierten Therapie von PI3K-Inhibitoren und MEK-Inhibitoren [72, 74]. Eine aktuelle Untersuchung von Saturno et al. aus 2021 zeigt ebenfalls positive *in vitro* und *in vivo* Ergebnisse für einen kombinierten panRas- und Src-Inhibitor bei der Behandlung von *KRAS*-mutierten soliden Tumoren [75]. Dies unterstützt die Annahme, dass Multi-kinaseinhibitoren aufgrund von – bekannten und noch unbekanntem – Feedbackmechanismen in den Tumorzellen effektiver erscheinen als die singuläre Inhibition einzelner Kinasen / Signalwege [75].

Weitere Untersuchungen zur Wirkweise von Dasatinib in Ras-mutierten iPSC sind zwingend notwendig und bergen nicht nur das Potenzial zelluläre Prozesse noch genauer zu verstehen,

sondern auch mögliche neue Therapieziele zu ermitteln. Aufgrund seiner oralen Verfügbarkeit, seiner Zulassung für Erwachsene und Kinder und den bisherigen Erfahrungswerten erscheint Dasatinib außerdem als ein leicht zu implementierendes Medikament zur Ergänzung der herkömmlichen zytotoxischen Therapie.

#### 4.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Das Ziel dieser Arbeit war es, mithilfe von genetisch veränderten iPSC das Wirkstoffansprechen auf verschiedene Inhibitoren zu untersuchen und so möglicherweise grundlegende Erkenntnisse für weitere Therapietestungen zu erlangen. Es ist gelungen, genetisch veränderte iPSC stabil herzustellen und diese längerfristig zu kultivieren sowie gezielt in hämatopoetische Vorläuferzellen zu differenzieren. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um den Einfluss der Mutationen auf die verschiedenen Differenzierungsprozesse zu untersuchen. So scheint es insbesondere interessant, *NF1-Knockdown* iPSC in neuronale Zellen zu differenzieren, um so ein mögliches Erkrankungsmodell für verschiedene NF1-assoziierte Tumoren zu erstellen. Auch *KRAS*-Mutationen spielen für viele solide Tumore eine wichtige Rolle. Differenzierungen in alle Arten von Gewebe erscheint daher ein mögliches Modell für unterschiedlichste Tumorerkrankungen. Umgekehrt lassen sich durch die Untersuchung von iPSC als Stammzellen die Ergebnisse aus Medikamententestungen möglicherweise erkrankungsübergreifend transferieren. Außerdem könnten die Versuche auch an iPSC anderer Spender wiederholt werden, um mögliche epigenetische Einflüsse der Spender aus den Ergebnissen eliminieren zu können.

Mit dem Ansprechen auf Dasatinib konnte ein bislang noch nicht bekannter Inhibitor als mögliche Therapieoption identifiziert werden. Weitere Testungen von Inhibitoren erscheinen zielführend, um die erbrachten Ergebnisse zu verifizieren und weiter zu untersuchen. Eine Ergänzung des *Drugscreenings* um Kombinationen von Inhibitoren sollte erfolgen, um so möglicherweise die Resistenzmethoden – wie beispielsweise Feedback-Mechanismen bei singulärer MEK-Inhibition – der Zellen zu umgehen. Hier ist nach aktuellem Kenntnisstand insbesondere die Testung von MEK-Inhibitoren in Kombination mit PI3K-Inhibitoren oder Src-Inhibitoren sinnvoll. Auch die Testung weiterer Multikinaseinhibitoren erscheint aufgrund des guten Ansprechens auf Dasatinib vielversprechend.

Des Weiteren wäre es interessant, den Effekt verschiedener Inhibitoren auf den Differenzierungsprozess zu untersuchen. Hierzu könnten die mutierten iPSC differenziert und gleichzeitig mit Inhibitoren in verschiedener Dosierung behandelt werden. Dies verspricht einen Erkenntnisgewinn über die Aktivierung unterschiedlicher Signalwege in Abhängigkeit der aktuellen Zellbiologie. So erscheint es interessant zu untersuchen, ob verschiedene Inhibitoren ausschließlich über die Hemmung von Differenzierungsprozessen oder über die Elimination bestimmter Entwicklungsstufen wirken. Dies eröffnet weitere Einblicke in die Möglichkeiten der Kombinationstherapie, um therapeutisch auch die leukämische Stammzelle auszuschalten und damit möglichst einen bleibenden Therapieerfolg zu generieren.

Letztendlich könnten außerdem iPSC von JMML-Patienten hergestellt werden. Eine Medikamententestung dieser Zellen sowie geeigneter Xenografts ist nach wie vor der Goldstandard, um neue Therapieprinzipien untersuchen zu können. Bei Patienten-generierten iPSC werden

nicht nur monogenetische Veränderungen untersucht, sondern auch der Einfluss von epigenetischen Faktoren berücksichtigt. So können die hier erhobenen Ergebnisse an Patientenmodellen verifiziert und fundiert untersucht werden.

## 5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Locatelli, F., et al., *Novel approaches to diagnosis and treatment of Juvenile Myelomonocytic Leukemia*. Expert Rev Hematol, 2018. **11**(2): p. 129-143.
2. Chang, T.Y., C.C. Dvorak, und M.L. Loh, *Bedside to bench in juvenile myelomonocytic leukemia: insights into leukemogenesis from a rare pediatric leukemia*. Blood, 2014. **124**(16): p. 2487-97.
3. Chan, R.J., et al., *Juvenile myelomonocytic leukemia: a report from the 2nd International JMML Symposium*. Leuk Res, 2009. **33**(3): p. 355-62.
4. Hasle H, W.L., Massing BG, McBride M, Schultz KR. , *A population-based study of childhood myelodysplastic syndrome in British Columbia, Canada*. Br J Haematol, 1999. **106**(4): p. 1027-1032.
5. C.M. Niemeyer, M.A., G. Basso et. al. , *Chronic Myelomonocytic Leukemia in Childhood: A Retrospective Analysis of 110 Cases*. Blood, 1997. **89**(10): p. 3534-3543.
6. Tidyman, W.E. und K.A. Rauen, *The RASopathies: developmental syndromes of Ras/MAPK pathway dysregulation*. Curr Opin Genet Dev, 2009. **19**(3): p. 230-6.
7. Mayerhofer, C., C.M. Niemeyer, und C. Flotho, *Current Treatment of Juvenile Myelomonocytic Leukemia*. J Clin Med, 2021. **10**(14).
8. Arber, D.A., et al., *The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia*. Blood, 2016. **127**(20): p. 2391-405.
9. Locatelli, F., et al., *Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in children with juvenile myelomonocytic leukemia (JMML): results of the EWOG-MDS/EBMT trial*. Blood, 2005. **105**(1): p. 410-9.
10. Locatelli, F. und C.M. Niemeyer, *How I treat juvenile myelomonocytic leukemia*. Blood, 2015. **125**(7): p. 1083-90.
11. Aricò, M., A. Biondi, und C.-H. Pui, *Juvenile Myelomonocytic Leukemia*. Blood, 1997. **90**(2): p. 479-488.
12. Niemeyer, C.M. und C.P. Kratz, *Paediatric myelodysplastic syndromes and juvenile myelomonocytic leukaemia: molecular classification and treatment options*. Br J Haematol, 2008. **140**(6): p. 610-24.
13. Niemeyer, C.M., *RAS diseases in children*. Haematologica, 2014. **99**(11): p. 1653-62.
14. Niemeyer, C.M. und C. Flotho, *Juvenile myelomonocytic leukemia: who's the driver at the wheel?* Blood, 2019. **133**(10): p. 1060-1070.
15. Stephen, A.G., et al., *Dragging ras back in the ring*. Cancer Cell, 2014. **25**(3): p. 272-81.

16. Niemeyer, C.M., et al., *Response to upfront azacitidine in juvenile myelomonocytic leukemia in the AZA-JMML-001 trial*. Blood Adv, 2021. **5**(14): p. 2901-2908.
17. Niemeyer, C.M., *JMML genomics and decisions*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2018. **2018**((1)): p. 307-312.
18. Rosenbaum, T. und K. Wimmer, *Neurofibromatosis type 1 (NF1) and associated tumors*. Klin Padiatr, 2014. **226**(6-7): p. 309-15.
19. Seminog, O.O. und M.J. Goldacre, *Risk of benign tumours of nervous system, and of malignant neoplasms, in people with neurofibromatosis: population-based record-linkage study*. Br J Cancer, 2013. **108**(1): p. 193-8.
20. Steinemann, D., et al., *Mitotic recombination and compound-heterozygous mutations are predominant NF1-inactivating mechanisms in children with juvenile myelomonocytic leukemia and neurofibromatosis type 1*. Haematologica, 2010. **95**(2): p. 320-3.
21. Sakaguchi, H., et al., *Exome sequencing identifies secondary mutations of SETBP1 and JAK3 in juvenile myelomonocytic leukemia*. Nat Genet, 2013. **45**(8): p. 937-41.
22. Christiane Olk-Batz, e.a., *Aberrant DNA methylation characterizes juvenile myelomonocytic leukemia with poor outcome*. Blood, 2011. **117**(18): p. 4871-4880.
23. Caye, A., et al., *Juvenile myelomonocytic leukemia displays mutations in components of the RAS pathway and the PRC2 network*. Nat Genet, 2015. **47**(11): p. 1334-40.
24. Bhootra, S., et al., *DNA methylation and cancer: transcriptional regulation, prognostic, and therapeutic perspective*. Med Oncol, 2023. **40**(2): p. 71.
25. Jones, P.A. und S.B. Baylin, *The fundamental role of epigenetic events in cancer*. Nat Rev Genet, 2002. **3**(6): p. 415-28.
26. Lipka, D.B., et al., *RAS-pathway mutation patterns define epigenetic subclasses in juvenile myelomonocytic leukemia*. Nat Commun, 2017. **8**(1): p. 2126.
27. Tasian, S.K., et al., *Mutation-specific signaling profiles and kinase inhibitor sensitivities of juvenile myelomonocytic leukemia revealed by induced pluripotent stem cells*. Leukemia, 2019. **33**(1): p. 181-190.
28. Liu, W., et al., *Inhibition of the Gab2/PI3K/mTOR signaling ameliorates myeloid malignancy caused by Ptpn11 (Shp2) gain-of-function mutations*. Leukemia, 2017. **31**(6): p. 1415-1422.
29. Bunda, S., et al., *Inhibition of SRC corrects GM-CSF hypersensitivity that underlies juvenile myelomonocytic leukemia*. Cancer Res, 2013. **73**(8): p. 2540-50.

30. Takahashi, K., et al., *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*. Cell, 2007. **131**(5): p. 861-72.
31. Takahashi, K. und S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. Cell, 2006. **126**(4): p. 663-76.
32. Avior, Y., I. Sagi, und N. Benvenisty, *Pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2016. **17**(3): p. 170-82.
33. Malik, N. und M.S. Rao, *A review of the methods for human iPSC derivation*. Methods Mol Biol, 2013. **997**: p. 23-33.
34. Wehbe, Z., F. Ghanjati, und C. Flotho, *Induced Pluripotent Stem Cells to Model Juvenile Myelomonocytic Leukemia: New Perspectives for Preclinical Research*. Cells, 2021. **10**(9).
35. Hockemeyer, D. und R. Jaenisch, *Induced Pluripotent Stem Cells Meet Genome Editing*. Cell Stem Cell, 2016. **18**(5): p. 573-86.
36. Aboul-Soud, M.A.M., A.J. Alzahrani, und A. Mahmoud, *Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs)-Roles in Regenerative Therapies, Disease Modelling and Drug Screening*. Cells, 2021. **10**(9).
37. Krombholz, C.F., L. Gallego-Villar, und S.S. Sahoo, *Azacitidine is effective for targeting leukemia-initiating cells in juvenile myelomonocytic leukemia*. Leukemia, 2019. **33**(7): p. 1805–1810.
38. Gandre-Babbe, S., et al., *Patient-derived induced pluripotent stem cells recapitulate hematopoietic abnormalities of juvenile myelomonocytic leukemia*. Blood, 2013. **121**(24): p. 4925-9.
39. Shigemura, T., et al., *Essential role of PTPN11 mutation in enhanced haematopoietic differentiation potential of induced pluripotent stem cells of juvenile myelomonocytic leukaemia*. Br J Haematol, 2019. **187**(2): p. 163-173.
40. Pearson, S., et al., *Proteomic Analysis of an Induced Pluripotent Stem Cell Model Reveals Strategies to Treat Juvenile Myelomonocytic Leukemia*. J Proteome Res, 2020. **19**(1): p. 194-203.
41. Gasparian, A.V., et al., *Curaxins: anticancer compounds that simultaneously suppress NF-kappaB and activate p53 by targeting FACT*. Sci Transl Med, 2011. **3**(95): p. 95ra74.
42. Thakore, P.I., et al., *Highly specific epigenome editing by CRISPR-Cas9 repressors for silencing of distal regulatory elements*. Nat Methods, 2015. **12**(12): p. 1143-9.

43. Dull T, Z.R., Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, Naldini L. , *A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system*. J Virol, 1998. **72**(11): p. 8463-71.
44. Marquardt, V., et al., *Tacedinaline (CI-994), a class I HDAC inhibitor, targets intrinsic tumor growth and leptomeningeal dissemination in MYC-driven medulloblastoma while making them susceptible to anti-CD47-induced macrophage phagocytosis via NF- $\kappa$ B-TGM2 driven tumor inflammation*. J Immunother Cancer, 2023. **11**(1).
45. Qin, N., et al., *Intratumoral heterogeneity of MYC drives medulloblastoma metastasis and angiogenesis*. Neuro Oncol, 2022. **24**(9): p. 1509-1523.
46. Qi, L.S., et al., *Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression*. Cell, 2013. **152**(5): p. 1173-83.
47. Jinek M, C.K., Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E, *A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity*. Science, 2012. **337**(6096): p. 816-21.
48. Gilbert, L.A., et al., *CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes*. Cell, 2013. **154**(2): p. 442-51.
49. Crouch SP, K.R., Slater KJ, Fletcher J, *The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity*. J Immunol Methods, 1993. **160**(1): p. 81-8.
50. Jabbour, E. und H. Kantarjian, *Chronic myeloid leukemia: 2020 update on diagnosis, therapy and monitoring*. Am J Hematol, 2020. **95**(6): p. 691-709.
51. Keller, A., et al., *Genetic and epigenetic factors which modulate differentiation propensity in human pluripotent stem cells*. Hum Reprod Update, 2018. **24**(2): p. 162-175.
52. Kubara, K., et al., *Status of KRAS in iPSCs Impacts upon Self-Renewal and Differentiation Propensity*. Stem Cell Reports, 2018. **11**(2): p. 380-394.
53. Pierce, A., et al., *Identification of nuclear protein targets for six leukemogenic tyrosine kinases governed by post-translational regulation*. PLoS One, 2012. **7**(6): p. e38928.
54. Larribere, L., et al., *NF1 loss induces senescence during human melanocyte differentiation in an iPSC-based model*. Pigment Cell Melanoma Res, 2015. **28**(4): p. 407-16.
55. Mazuelas, H., et al., *Modeling iPSC-derived human neurofibroma-like tumors in mice uncovers the heterogeneity of Schwann cells within plexiform neurofibromas*. Cell Rep, 2022. **38**(7): p. 110385.

56. Rasmussen SA, Y.Q., Friedman JM, *Mortality in neurofibromatosis 1: an analysis using U.S. death certificates*. Am J Hum Genet, 2001. **68**(5): p. 1110-8.
57. Kainkaryam RM, W.P., *Pooling in high-throughput drug screening*. Curr Opin Drug Discov Devel, 2009. **12** (3): p. 339-50.
58. Lee, A.Q., et al., *A distinct subpopulation of leukemia initiating cells in acute precursor B lymphoblastic leukemia: quiescent phenotype and unique transcriptomic profile*. Front Oncol, 2022. **12**: p. 972323.
59. Engle, S.J., L. Blaha, und R.J. Kleiman, *Best Practices for Translational Disease Modeling Using Human iPSC-Derived Neurons*. Neuron, 2018. **100**(4): p. 783-797.
60. Cseh A, N.C., Yoshimi A, Dworzak M, Hasle H, van den Heuvel-Eibrink MM, Locatelli F, Masetti R, Schmutz M, Groß-Wieltsch U, Candás A, Kulozik AE, Olcay L, Suttorp M, Furlan I, Strahm B, Flotho C., *Bridging to transplant with azacitidine in juvenile myelomonocytic leukemia: a retrospective analysis of the EWOG-MDS study group*. Blood, 2015. **125**(14): p. 2311-3.
61. Flotho, C., S. Sommer, und M. Lubbert, *DNA-hypomethylating agents as epigenetic therapy before and after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in myelodysplastic syndromes and juvenile myelomonocytic leukemia*. Semin Cancer Biol, 2018. **51**: p. 68-79.
62. Turke, A.B., et al., *MEK inhibition leads to PI3K/AKT activation by relieving a negative feedback on ERBB receptors*. Cancer Res, 2012. **72**(13): p. 3228-37.
63. de Blank, P.M.K., et al., *MEK inhibitors for neurofibromatosis type 1 manifestations: Clinical evidence and consensus*. Neuro-Oncology, 2022. **24**(11): p. 1845-1856.
64. Gross, A.M., et al., *Selumetinib in Children with Inoperable Plexiform Neurofibromas*. N Engl J Med, 2020. **382**(15): p. 1430-1442.
65. Lyubynska, N., et al., *A MEK inhibitor abrogates myeloproliferative disease in Kras mutant mice*. Sci Transl Med, 2011. **3**(76): p. 76ra27.
66. Li, Q., et al., *Oncogenic Nras has bimodal effects on stem cells that sustainably increase competitiveness*. Nature, 2013. **504**(7478): p. 143-147.
67. Kong, G., et al., *Combined MEK and JAK inhibition abrogates murine myeloproliferative neoplasm*. J Clin Invest, 2014. **124**(6): p. 2762-73.
68. Chan, P.C. und H.C. Chen, *p120RasGAP-mediated activation of c-Src is critical for oncogenic Ras to induce tumor invasion*. Cancer Res, 2012. **72**(9): p. 2405-15.

69. Bunda, S., et al., *Juvenile myelomonocytic leukaemia-associated mutation in Cbl promotes resistance to apoptosis via the Lyn-PI3K/AKT pathway*. *Oncogene*, 2015. **34**(6): p. 789-97.
70. Belizaire R, K.S., Udeshi ND, Vedder A, Sun L, Svinkina T, Hartigan C, McConkey M, Kovalcik V, Bizuayehu A, Stanclift C, Schenone M, Carr SA, Padron E, Ebert BL, *CBL mutations drive PI3K/AKT signaling via increased interaction with LYN and PIK3R1*. *Blood*, 2021. **137**(16): p. 2209-2220.
71. Hsu, P.C., et al., *The Crosstalk between Src and Hippo/YAP Signaling Pathways in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC)*. *Cancers (Basel)*, 2020. **12**(6).
72. Sato, H., et al., *Combined inhibition of MEK and PI3K pathways overcomes acquired resistance to EGFR-TKIs in non-small cell lung cancer*. *Cancer Sci*, 2018. **109**(10): p. 3183-3196.
73. Mirzoeva, O.K., et al., *Basal subtype and MAPK/ERK kinase (MEK)-phosphoinositide 3-kinase feedback signaling determine susceptibility of breast cancer cells to MEK inhibition*. *Cancer Res*, 2009. **69**(2): p. 565-72.
74. Yuen, H.F., et al., *Impact of oncogenic driver mutations on feedback between the PI3K and MEK pathways in cancer cells*. *Biosci Rep*, 2012. **32**(4): p. 413-22.
75. Saturno, G., et al., *The paradox-breaking panRAF plus SRC family kinase inhibitor, CCT3833, is effective in mutant KRAS-driven cancers*. *Ann Oncol*, 2021. **32**(2): p. 269-278.

## 6 Anhang

Liste aller getesteten Inhibitoren im Hochdurchsatz-*Drugscreening* der HEK293-Zellen

5-Azacytidine	Mitoxantrone (dihydrochloride)
5-Fluorouracil	Teniposide
6-Mercaptopurine	Daunorubicin (hydrochloride)
6-Thioguanine	Doxorubicin (hydrochloride)
Clofarabine	Cabozantinib (S-malate)
Cytarabine	Erlotinib
Dacarbazine	Gefitinib
Fludarabine (phosphate)	Sunitinib (malate)
Gemcitabine	Axitinib
Nelarabine	Belinostat
Cladribine	CI-994
Methotrexate	Panobinostat
Pentostatin	Romidepsin
Vinblastine (sulfate)	Tubastatin A (hydrochloride)
Vincristine (sulfate)	Valproic acid (sodium salt)
Busulfan	KSK64
Carmustine	Ricolinostat
Cisplatin	Vorinostat
Cyclophosphamide (Clafen)	Entinostat
Lomustine	Givinostat (ITF2357)
Oxaliplatin	Bortezomib
Thio-TEPA	MLN-9708
Procarbazine (Hydrochloride)	Carfilzomib
Temozolomide	RTS-V
Chlorambucil	Ganetespib
Epirubicin (hydrochloride)	PUH71
Etoposide	AUY922 (LUMINESPIB)
Idarubicin (hydrochloride)	NVP-HSP990
Onalespib (AT13387)	Perifosine
VWK141	ARQ-092
Elesclomol	GSK2110183
PF-04929113	SY-1365-THZ1
BIIB021	LEE011 (Ribociclib)
Alisertib	LY2835219 (Abemaciclib)

Aurora A Inhibitor I	Palbociclib
MLN8054	Dinaciclib
MK-5108 (VX-689)	Pexidartinib
Danusertib	Dovitinib
GSK 525762A	GDC-0994
OTX-015	Quizartinib
JQ1	KW-2449
EPZ-6438	Pacritinib
GSK126	BMS-911543
GSK343	AT9283
GSK2879552	Baricitinib (phosphate)
ORY-1001 RG6016	CYT387 (Momelotinib)
Decitabine	Ruxolitinib (phosphate)
LY3039478	Tofacitinib (citrate)
RO4929097	Midostaurin
MK-0752	Lestaurtinib
LY411575	Fedratinib (TG101348)
Semagacestat	Crenolanib
Imatinib (Mesylate)	Ipatasertib (GDC-0068)
Radotinib	Barasertib
Nilotinib	Buparlisib
Ponatinib	Dactolisib (BEZ235)
Bosutinib	Saracatinib
Dasatinib	Gandotinib
Rebastinib	AT9283
B12536	Prednisolone
Foretinib	Dexamethasone
Cobimetinib	ABT-199 (Venetoclax)
MEK162 (Binimetinib)	Obatoclax
Selumetinib	Gossypol acetic acid
Trametinib	QNZ (EVP4593)
PD0325901	Omaveloxolone
PD184352	SC75741
Pimasertib	Tipifarnib
Deforolimus	SHP099
Everolimus	SCH772984
Rapamycin	Enasidenib

Temsirolimus	Ivosidenib
PF-04691502	FT-2102
INK 128 (MLN0128)	Birinapant
Losmapimod	Ibrutinib
BAY 80-6946	Actinomycin D
Idelalisib	Tariquidar
Pictilisib	Enzastaurin
Dabrafenib (Mesylate)	Marimastat
Sorafenib (Tosylate)	Mechlorethamine hydrochloride
LGX818 (Encorafenib)	Selinexor
Regorafenib	Amsacrine
Vemurafenib	Cycloctidine HCL
Volasertib	Bendamustine (hydrochloride)
Bafetinib	Bleomycin (sulfate)
BMN-673 (8R,9S)	Chlormethine (hydrochloride)
BSI-201 (Iniparib)	Omacetaxine Mepesuccinate
Olaparib	Veliparib (dihydrochloride)
Rucaparib (phosphate)	Honokiol
Prednisolone	Gilteritinib

## Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle bei allen beteiligten Personen danken, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Großer Dank gebührt zuerst meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Borkhardt für die ausgesprochene Unterstützung bei der Umsetzung der Arbeit sowie die Inspiration, klinische und wissenschaftliche Arbeit in der Kinderonkologie zu verbinden.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Rosenbaum bedanken, der mich auf meinem Weg u.a. mit positiven Anregungen und produktiven Gesprächen begleitet hat. Ich möchte mich auch für das zur Verfügung stellen vieler Veröffentlichungen sowie Abbildungen zur NF1 ganz herzlich bedanken.

Besonders danken möchte ich Frau Dr. Ute Fischer für die ausgezeichnete und stets optimistische und motivierende Betreuung über die Jahre sowie die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens. Die gemeinsame Arbeit hat mir immer viel Freude bereitet und ich schätze ihre wertvollen Ratschläge und ihre sehr guten Ideen.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Cyrill Schipp, Bianca Killing und Dr. Daniel Hein für die wissenschaftliche Zusammenarbeit in dem Projekt. Die Arbeit war stets geprägt von einer angenehmen und humorvollen Atmosphäre und gegenseitiger Unterstützung. Auch allen weiteren Kollegen aus dem KMT-Labor möchte ich für die angenehme und hilfreiche Zusammenarbeit danken. Insbesondere Frau Dr. Nan Qin danke ich u.a. für das zur Verfügung stellen der Plasmide für die *NF1-Knockdown* Untersuchungen. Den Arbeitsgruppen Prof. Dr. Marc Remke und Dr. Sanil Bhatia möchte ich für die fachliche Unterstützung und die praktische Hilfe bei der Durchführung der *Drugscreening* Versuche danken.

Für die finanzielle Unterstützung im Rahmen meines Stipendiums und den wertvollen fachlichen und interdisziplinären Austausch danke ich der Düsseldorf *School of Oncology*. Der *American Society of Hematology* danke ich für die Möglichkeit einer Posterpräsentation meiner Arbeit auf dem ASH-Meeting 2019 in Orlando und für die Verleihung des *ASH Abstract Achievement Awards*.

Meinem Partner Nils danke ich von Herzen für seine uneingeschränkte Unterstützung und liebevolle Motivation. Meinen Eltern, meinen Großeltern und meinem Bruder möchte ich ganz besonders „Danke“ sagen für die vielseitige Unterstützung während des Verfassens dieser Arbeit und während meines gesamten Studiums.

Schlussendlich hinaus gilt mein Dank natürlich auch allen Freunden und Verwandten, die mich auch in herausfordernden Zeiten bestärkt haben und immer wieder auf ihre individuellen Arten aufgeheitert haben. Dies war stets ein großer Rückhalt für mich.