Aus dem Institut für Tierzucht
Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie
der Tierärztlichen Fakultät
(Prof. Dr. med. vet. Eckhard Wolf)
und der Medizinischen Klinik und Poliklinik III des Klinikums Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München
(Prof. Dr. med. Wolfgang Hiddemann)
angefertigt unter der Leitung von PD Dr. med. Christian Buske

Die gemeinsame Expression des Fusionsgens AML1-ETO und einer FLT3 Längenmutation induziert akute Leukämien im Mausmodell

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Christina Scheßl
aus
Mainburg

München 2005

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. A. Stolle
Referent:	Univ.-Prof. Dr. E. Wolf
Korreferent:	Univ.-Prof. Dr. W. Hermanns

Tag der Promotion: 15. Juli 2005

Meinen Eltern

und Henry und Jakob

Inhaltsverzeichnis

1	**EINLEITUNG**	**1**
2	**SCHRIFTTUM**	**2**
2.1	**Physiologische Hämatopoese**	**2**
2.2	**Leukämien**	**4**
2.2.1	**Akute myeloische Leukämie (AML)**	**4**
2.2.1.1	**Einteilung der akuten myeloischen Leukämien**	**5**
2.2.1.2	**Genetische Veränderungen**	**6**
	Normaler Karyotyp	7
	Balancierte chromosomale Veränderungen	7
	Komplexe chromosomale Veränderungen	7
	Das Mehrschrittmodell der Leukämogenese	8
2.2.2	**Akute lymphatische Leukämie (ALL)**	**9**
2.2.2.1	**Einteilung der akuten lymphatischen Leukämien**	**9**
2.2.2.2	**Genetische Veränderungen**	**10**
2.3	**AML1**	**10**
2.4	**AML1-ETO**	**13**
2.5	**FLT3**	**20**
2.6	**FLT3-Längenmutation (FLT3-LM)**	**21**
3.	**EIGENE UNTERSUCHUNGEN**	**25**
3.1	**Material und Methoden**	**25**
3.1.1	**Zellinien**	**25**
	293 T	25
	NIH 3T3	25
	GP+ E86	25
3.1.2	**cDNA Konstrukte und retrovirale Vektoren**	**26**
3.1.3	**Transiente Transfektion**	**28**
3.1.4	**Herstellung einer stabilen Verpackungszellline**	**28**
3.1.5	**Kontrolle des Titers**	**29**

3.1.6	**Tiere und Tierhaltung**	**29**
	Spendermäuse	29
	Empfängermäuse	29
	Tierhaltung	29
3.1.7	**Colony -Forming Unit Spleen Assay (CFU-S)**	**30**
3.1.8	**Transplantationsmodell**	**31**
3.1.9	**Blutgewinnung**	**33**
3.1.10	**Knochenmarkpunktion**	**34**
3.1.11	**Töten der Tiere**	**34**
3.1.12	**Sektion**	**34**
3.1.13	**Durchflusszytometrische Immunphänotypisierung**	**34**
3.1.14	**Polymerase-Ketten-Reaktion**	**35**
3.1.15	**Elektrophorese und Dokumentation**	**37**
3.1.16	**Western Blot**	**38**
3.1.17	**Southern Blot**	**38**
3.2	**Ergebnisse**	**40**
3.2.1	**AML1-ETO tritt bei AML Patienten häufig zusammen mit aktivierenden Mutationen auf, die den Signaltransduktionsweg betreffen**	**40**
3.2.2	**Generierung von Mäusen mit Mutationen**	**42**
3.2.3	**Proteinnachweis mittels Western Blot**	**43**
3.2.4	**Southern Blot**	**44**
3.2.5	**CFU-S Assay**	**45**
3.2.6	**Repopulation der Mäuse**	**47**
3.2.7	**Überleben der Mäuse**	**48**
3.2.8	**Nachweis der Repopulation**	**49**
	Nachweis mittels Durchflusszytometrie	**49**
	Nachweis mittels PCR	**50**
3.2.9	**Die durch Kombination von AML1-ETO und FLT3-LM verursachte Krankheit ist retransplantierbar**	**51**
3.2.10	**Leukozyten- und Erythrozytenzahl**	**52**

3.2.11	**Milzgewicht und Milzgröße**	**54**
3.2.12	**Die Koexpression von AML1-ETO und FLT3-LM verursacht sowohl eine akute myeloische als auch eine akute lymphatische Leukämie**	**55**
	Morphologie	55
	Durchflusszytometrie	58
3.2.13	**Koexpression myeloischer mit lymphatischen Antigenen**	**60**
3.2.14	**Histopathologie**	**61**
4.	**DISKUSSION**	**64**
4.1.	**Die Expression von AML1-ETO alleine ist nicht in der Lage eine Leukämie auszulösen**	**64**
4.2.	**Aktivierende Mutationen in Signaltransduktions-wegen als zusätzliche genetische Veränderung**	**65**
4.3	**Wahl des Mausmodells**	**66**
4.4	**CFU-S Versuch**	**66**
4.5	**Entwicklung verschiedener leukämischer Phänotypen und Koexpression myeloischer und lymphatischer Antigene**	**68**
4.6	**Prognose der Leukämien mit AML1-ETO und FLT3-LM**	**69**
4.7	**Ausblick**	**70**
5.	**ZUSAMMENFASSUNG**	**72**
6.	**SUMMARY**	**74**
7.	**LITERATURVERZEICHNIS**	**75**

8.	**ANHANG**	**85**
8.1	**Verzeichnis der verwendeten Geräte**	**85**
8.2	**Verzeichnis der Lösungen und Puffer**	**85**
8.3	**Verzeichnis der verwendeten Materialien**	**87**
8.4	**Herstellung von Lösungen**	**88**
8.5	**Programme**	**89**
8.6	**Abkürzungsverzeichnis**	**90**
9.	**DANKSAGUNG**	**93**
10.	**LEBENSLAUF**	**95**

1. EINLEITUNG

In der Humanmedizin wurden in den letzten Jahren in der Erforschung der Pathogenese von Leukämien enorme Fortschritte gemacht. Dies ist vor allem der Erfindung und dem Einsatz moderner Techniken zu verdanken, die eine gezielte molekulare Charakterisierung der unterschiedlichen Leukämieformen ermöglichen. So weiß man heute, dass die Leukämien als eine heterogene Gruppe von Krankheiten aufzufassen sind, die spezifische pathobiologische Charakteristika aufweisen. So kann man zwischen akuten und chronischen sowie myeloischen und lymphatischen Leukämien unterscheiden. Diese differieren stark hinsichtlich ihrer Biologie, Epidemiologie, ihres Verlaufs und auch der Prognose. Zu den Ursachen der Erkrankung zählen virale Faktoren, karzinogene Chemikalien, wie Benzol und ionisierende Strahlung. Auch erbliche Vorbelastungen, wie u. a. Trisomie 21 oder die Fanconi-Anämie sind zu nennen.

In Leukämiezellen sind regelmäßig genetische Veränderungen wie Mutationen oder chromosomale Translokationen nachweisbar, die zu kritischen Abweichungen in der normalen Expression oder Funktion der beteiligten Gene führen und die Pathobiologie der unterschiedlichen Formen der Leukämie bestimmen. Wesentliches Ziel der Forschung muss es daher sein, diese genetischen Veränderungen aufzuspüren und ihre Auswirkungen zu erforschen, um die Pathogenese zu verstehen und dadurch mögliche Therapieansätze zu schaffen.

Bei der genaueren Erforschung der Funktionen von Genen und der Auswirkungen von Mutationen sind inzwischen Tierversuche unverzichtbar, die als Modell für den Menschen dienen sollen und schon viel zum Fortschritt des Kenntnisstandes beigetragen haben. In der vorliegenden Arbeit soll an Hand eines solchen Modells die Frage geklärt werden, ob die Mutationen AML1-ETO (Fusionsprotein des Transkriptionsfaktors AML1 mit ETO) und FLT3-ITD (Längenmutation der Rezeptortyrosinkinase FLT3), die bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) beim Menschen gefunden werden können, in der Lage sind im Zusammenspiel eine Leukämie auszulösen.

2. SCHRIFTTUM

2.1 Physiologische Hämatopoese

Hämatopoese ist der Prozess der Bildung und Reifung von Blutzellen und findet beim Erwachsenen größtenteils im Knochenmark statt.

Hierbei entwickeln sich aus hämatopoetischen Stammzellen über verschiedene Zwischenstufen unter dem Einfluss von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten. Hämatopoetische Wachstumsfaktoren sind Moleküle, die die Bildung, Ausreifung, Differenzierung und Überlebenszeit von unreifen Vorläuferzellen im Knochenmark bis hin zu reifen Effektorzellen im Blut steuern. Beispielsweise zu nennen wäre der Stammzellfaktor SCF (Stem Cell Factor), der erste Differenzierungsschritte der Stammzelle entweder in Richtung der myeloischen Progenitorzelle CFU-GEMM (Colony forming unit granulocyte erythrocyte monocyte macrophage) oder zur lymphatischen Stammzelle bewirkt. Unter dem Einfluss anderer hämatopoetischer Wachstumsfaktoren wie Interleukin-3 (IL-3), Erythropoetin (EPO), Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), Granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) und Thrombopoetin (TPO) reifen innerhalb von einem bis zehn Tagen Erythrozyten, Makrophagen, Granulozyten und Thrombozyten heran. Nach Abschluss dieses Prozesses wandern die Blutzellen in die Blutbahn und die verschiedenen Körpergewebe. Die lymphatische Stammzelle differenziert sich unter dem Einfluss verschiedener Interleukine zu B- und T-Lymphozyten (Reya et al., 2001; Speck and Gilliland, 2002).

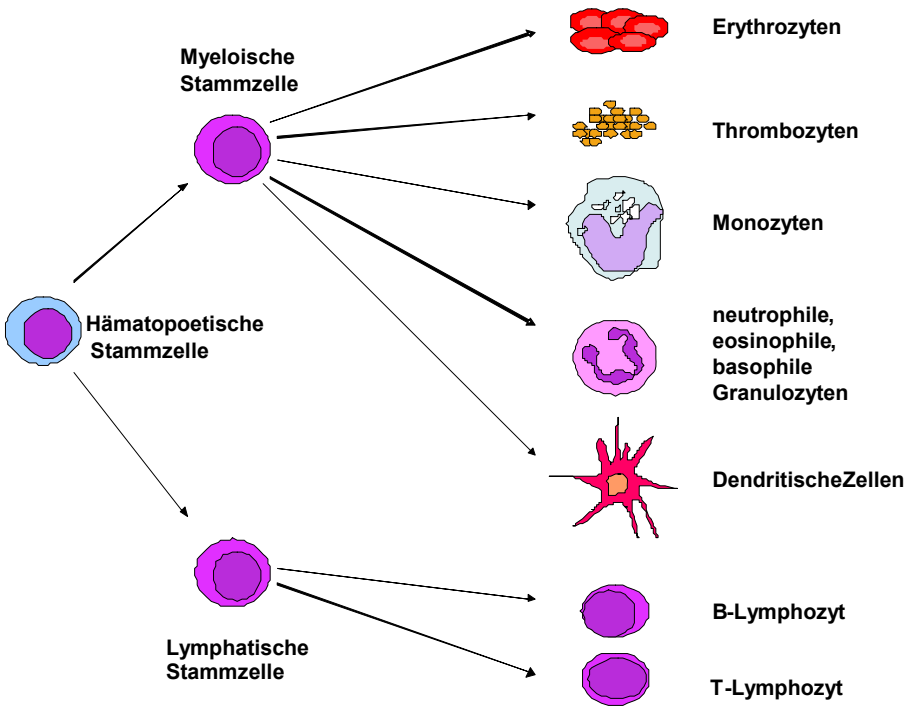


Abbildung 1: Schema der physiologischen Hämatopoese (nach Tenen, 2003 und Speck and Gilliland, 2002)

2.2 Leukämien

Leukämien sind eine sehr heterogene Gruppe von Krankheiten, deren genaue diagnostische Unterteilung vor allem für die Prognose und spätere Therapie sehr wichtig ist. Hierfür stehen inzwischen viele Methoden zur Verfügung, wie z. B. die Zytomorphologie (lichtmikroskopische Beurteilung von Blut– und Knochenmarkausstrichen nach geeigneter Färbung), Zytochemie, Histologie von Knochenmarkbiopsien, Immunphänotypisierung (Färbung mit Antikörpern), aber auch genetische Methoden wie FISH (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung) und 24-Farben-FISH, PCR und andere (Haferlach and Schoch, 2002).
Durch diese Methoden und auch nach dem klinischen Verlauf können die Leukämien in akute und chronische, myeloische und lymphatische Leukämien unterteilt werden. In dieser Arbeit soll auf Grund der besonderen Fragestellung nur auf die akuten Leukämien eingegangen werden.
Eine akute Leukämie liegt nach den Richtlinien der FAB-Gruppe (French, American and British census conference of hematologists) vor, wenn folgende Kriterien erfüllt sind (Bennett et al., 1976):
- ≥ 30% der kernhaltigen Zellen im peripheren Blut und/oder im Knochenmark (KM) sind Blasten.
- bei Prädominanz von roten Vorstufen im KM von ≥ 50% aller kernhaltigen Zellen muss der Blastenanteil im KM ≥ 30% der nicht erythroblastären Zellen betragen.
- im KM besteht ein myelodysplastisches Syndrom (MDS) mit ≤ 30% Blasten, aber im peripheren Blut beträgt der Anteil der Blasten ≥ 30%
Im Gegensatz dazu verlangt die WHO (World Health Organisation) nur einen Blastenanteil von ≥ 20% aller kernhaltigen Zellen (Harris et al., 2000).

2.2.1 Akute myeloische Leukämie (AML)

Die akute myeloische Leukämie (AML) tritt mit einer Häufigkeit von 2-3 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner und Jahr bei einem starken Anstieg der Inzidenz im höheren Alter (> 15 Erkrankungen/100.000 Einwohner/ Jahr) auf. Der Altersmedian liegt bei 60 Jahren (Lowenberg et al., 1999).

Die AML ist eine klonale Stammzellerkrankung, die durch einen Reifungsarrest mit Expansion meist unreifer myeloischer Zellen (Blasten) charakterisiert ist (Ailles et al., 1997; Haase et al., 1995; Mehrotra et al., 1995). Klinisch führt die AML zur Unterdrückung der normalen Hämatopoese und somit zu den Symptomen der Anämie, Infektanfälligkeit und Blutungsneigung.

2.2.1.1 Einteilung der akuten myeloischen Leukämien

Im Moment gibt es zwei parallel verwendete Klassifikationssysteme, die eine Unterteilung der AML in verschiedene Subtypen ermöglichen. Zum einen die FAB-Klassifikation (Tabelle 1) von 1981, die sich vor allem an Morphologie, Enzymhistochemie und Immunologie orientiert (Bennett et al., 1976), und zum anderen die Richtlinien der WHO, die seit 1999 zusätzlich klinische Daten und genetische Merkmale zur Beurteilung heranziehen (Harris et al., 1999).

French-American-British (FAB) Klassifikation der akuten myeloischen Leukämie

M0	Weitgehend undifferenziert
M1	Granulozytäre Leukämie ohne Ausreifung
M2	Granulozytäre Leukämie mit Ausreifung von mindestens 10% der leukämischen Zellen zu Promyelozyten, Myelozyten oder noch reiferen Zellen, kann in M2 mit und ohne t(8;21) eingeteilt werden (Tenen, 2003).
M3	Hypergranuläre Promyelozytenleukämie
M4	Leukämie mit einer granulozytären und einer monozytären Blastenkomponente
$M4_{EO}$	Wie M4 mit Knochenmarkseosinophilie
M5a	Monoblastenleukämie
M5b	Monozytenleukämie
M6	Erythroleukämie mit mindestens 50% Erythroblasten, unter den anderen Zellen >30% Blasten
M7	Megakaryoblastenleukämie

Tabelle 1, Seite 5: FAB Klassifikation der akuten myeloischen Leukämie, modifiziert nach Haferlach und Schoch, 2002

Kategorie	**Merkmale**
Akute myeloische Leukämie mit wiederkehrenden zytogenetischen Aberrationen	t(8;21)(q22;q22); t(15;17)(q22;q21) inv16 (p13;q22); v;IIq23)
t(8;21)(q22;q22); t(15;17)(q22;q21) inv 16 (p13;q22); v;IIq23)	AML mit vorangegangenem MDS; AML mit multil. Dysplasie ohne MDS
Akute myeloische Leukämie, therapieassoziert	Assoziation mit Alkylantientherapie Assoziation mit Topoisomerase Typ-II
Akute myeloische Leukämie, nicht anderweitig spezifiziert	z.B. AML minimal differenziert, AML ohne Ausreifung (M1), AML mit Ausreifung (M2)

Tabelle 2: WHO Klassifikation der akuten myeloischen Leukämie

2.2.1.2 Genetische Veränderungen

Die akute myeloische Leukämie ist eine heterogene Gruppe von Erkrankungen. Allen Subtypen
der AML gemeinsam ist, dass sie klonale Erkrankungen darstellen und es genetische Erkrankungen sind. Die zytogenetischen Veränderungen sind mit einer unterschiedlichen Prognose verbunden.

Normaler Karyotyp

Bei etwa der Hälfte der Patienten mit AML sind mittels klassischer Zytogenetik keine chromosomalen Veränderungen detektierbar. Durch weiterführende molekulare Untersuchungen dieser Patienten sind aber häufig andere Veränderungen zu finden, wie vor allem eine konstitutiv aktivierende FLT3-Längen- oder Punktmutation (Schnittger et al., 2002). Patienten, bei denen keine chromsomale Veränderung diagnostiziert werden kann, weisen eine intermediäre Prognose auf.

Balancierte chromosomale Veränderungen

Etwa 20% aller Fälle von AML weisen balancierte chromosomale Veränderungen auf. Dies bedeutet im Wesentlichen die Entstehung von Fusionsproteinen, die die normale Expression und/oder Funktion der beteiligten Gene entscheidend beeinflussen. Beispiele für balancierte chromosomale Veränderungen sind die t(8;21) mit dem Fusionsgen AML1-ETO oder die t(15;17) mit dem Fusionsgen PML-RARα (Kelly et al., 2002a; Licht, 2001; Nucifora and Rowley, 1995). Vor allem die t(15;17) PML-RARα positive Leukämie weist eine günstige Prognose auf.

Komplexe chromosomale Veränderungen

Laut Definition muss eine AML drei oder mehr nicht-verwandte zytogenetische Veränderungen in einem Klon aufweisen, damit der Karyotyp als komplex bezeichnet werden darf. Dies können z.B. Deletionen oder Trisomien sein. Bei den Patienten mit komplexen Veränderungen findet sich die schlechteste Prognose. Trotz zahlreicher Fortschritte in der Behandlung der Erkrankung sterben noch immer 60-70% aller Patienten. Ein verbessertes Verständnis der Pathogenese der Erkrankung ist daher für die Entwicklung innovativer therapeutischer Strategien von besonderer Bedeutung.

Das Mehrschrittmodell der Leukämogenese

Viele Autoren stellen im Laufe ihrer experimentellen Untersuchungen im humanen und murinen System fest, dass viele der genannten Mutationen für sich alleine nicht in der Lage sind Leukämie zu induzieren (Fenske et al., 2004a; Kelly et al., 2002b; Yuan et al., 2001). So ist es äußerst wahrscheinlich, dass für die Entstehung der akuten Leukämien mindestens 2 kritische genetische Veränderungen notwendig sind, welche man in 2 Klassen unterteilen kann. Klasse I Mutationen, wie z.B. aktivierende Mutationen in Rezeptortyrosinkinasen (z.B. FLT3 oder c-KIT), die einen Proliferations- und/oder Überlebensvorteil für hämatopoetische Vorläuferzellen bieten und Klasse II Mutationen (wie z.B. AML1-ETO oder PML/RARα), die hämatopoetische Transkriptionsfaktoren betreffen und primär die Reifung der Zellen und die Apoptose stören (siehe Abb.2). Beide Veränderungen zusammen führen zu Störung von Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen und schließlich zur Entstehung einer akuten Leukämie (Gilliland, 2002). Die genaue Kenntnis des Pathomechanismus der AML kann zur Entwicklung gezielter biologischer Therapieansätze führen. So kann der Differenzierungblock bei der Promyelozytenleukämie (PML) durch die Gabe von All-Trans-Retinolsäure (ATRA) überwunden werden (Kelly et al., 2002a). Gleichermaßen sind Phosphotyrosinkinaseinhibitoren entwickelt worden, die die konstitutive Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen blockieren, welche durch Mutationen des FLT3 Signaltransduktionsweges entstehen (Abb. 2).

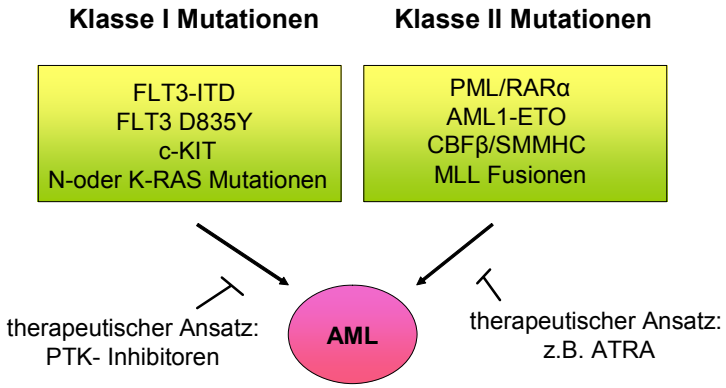


Abbildung 2, Seite 8: Modell der Zusammenarbeit von aktivierenden Mutationen und Mutationen, die die hämatopoetischen Transkriptionsfaktoren betreffen, nach Gilliland and Griffin, 2002b
PTK: Phosphotyrosinkinasen, ATRA: All-Trans-Retinolsäure

2.2.2 Akute lymphatische Leukämie (ALL)

Akute lymphatische Leukämien sind die häufigsten Leukämien des Kindesalters (80% aller Leukämien), jedoch können sie auch im fortgeschrittenen Erwachsenenalter auftreten. Die Gesamtinzidenz liegt bei 1,1 Fällen/100.000 Einwohnern/Jahr (Feuring-Buske et al., 2002; Lowenberg et al., 1999). Sie sind klonale Neoplasien der lymphatischen Stammzellen mit expansiver Verdrängung der intramedullären Hämatopoese. Meist zeigen die Patienten Symptome wie Anämie, Thrombopenie und Leukozytose, „aleukämische" Verläufe mit peripherer Zytopenie sind jedoch möglich (Mitrou and Länger, 2001).

2.2.2.1 Einteilung der akuten lymphatischen Leukämien

Auch bei den akuten lymphatischen Leukämien gibt es zwei Einteilungssysteme. Wieder hat zunächst die FAB-Gruppe eine Unterteilung entwickelt (Tabelle 3), die sich an der Morphologie der Zellen orientiert, während die neue WHO (Tabelle 4) vor allem immunphänotypische Merkmale zur Beurteilung heranzieht. Die FAB-Einteilung gilt seit der Einführung der WHO Richtlinien als weitgehend überholt und wird von manchen Autoren als irrelevant eingestuft, kann aber immer noch für die Darstellung des morphologischen Spektrums hilfreich sein.

Kategorie	Merkmale
L1	Kleine Blasten mit schmalem Zytoplasma, mittlere Basophilie, runde Kerne ohne auffallende Nukleolen, v.a. bei Kindern
L2	Große Blasten mit wechselnd breitem Plasma, sehr pleomorphe Kerne, prominente Nucleolen, v.a. bei Erwachsenen
L3	Große monotone Blasten, Plasma tiefblau und vakuolisiert, prominente Nucleolen, meist B-Zell Immunphänotyp

Tabelle 3: FAB Klassifikation der akuten lymphatischen Leukämien

Kategorie	Merkmale
Akute B-Zell lymphatische Leukämie	Expression von B-Zell Markern (CD19, CD20, u. a.)
Akute T-Zell lymphatische Leukämie	Meist Expression von T-Zell Markern (CD1-CD5, CD7, CD8)
Burkitt-Zell-Lymphom	Expression B-Zell Markern (CD 19,20,22, 79a), fehlende Expression von CD 5

Tabelle 4: WHO Klassifikation der akuten lymphatischen Leukämien

2.2.2.2 Genetische Veränderungen

Bei ca. 75% aller Fälle von ALL sind klonale, chromosomale Veränderungen zu finden. Drei Viertel davon sind chromosomale Translokationen (durch DNA-Schädigung entstandene Chromosomenfragmente, die sich falsch wieder zusammenfügen) wie z.B. t(12; 21), t(9; 22) und t(4; 11) (Secker-Walker et al., 1997).

Neben den Translokationen gibt es auch eine Reihe struktureller Veränderungen, die in der Regel zum Verlust von genetischem Material führen (z.B. 9p-,6q-,12p-Aberationen) (Feuring-Buske et al., 2002).

2.3. AML1

Das *AML1*-Gen (akute myeloische Leukämie Gen1), gelegen auf Chromosom 21 (Synonyme: RUNX1, PEBP2αB und CBFα2) gehört zu einer Klasse von hämatopoetischen Transkriptionsfaktoren, die entscheidend für die Regulation der frühen Hämatopoese und häufig Ziel von Mutationen und Gen-Neuordnungen sind (Speck and Gilliland, 2002).

Unter physiologischen Umständen wird AML1 in nahezu allen humanen Geweben außer Herz und Gehirn exprimiert (Miyoshi et al., 1991).

AML1 ist Mitglied der Familie der Runt ähnlichen Transkriptionsfaktoren, so genannt nach dem Runt- Protein, das die Segmentierung während der Drosophila Embryogenese steuert. Die hoch konservierte Runt Homologie Domäne (RHD) ist das DNA bindende Motiv in dieser Gen-Familie (Zhang et al., 1996). Die Möglichkeit, an die DNA zu binden, ist essentiell für die Funktion des Proteins.

Das AML1 Protein kann eine Vielzahl von Genen beeinflussen, die die hämatopoetische Differenzierung regulieren (Era et al., 1995; Song et al., 1999), so z.B. Zytokine wie IL3, und Granulozytenproteine wie Myeloperoxidase (Okuda et al., 1996) oder TNFα (Tumor Nekrose Faktor α) (Downing, 1999). Verschiedene Studien zeigen, dass AML1 als Aktivator allerdings ineffektiv ist, solange keine Ko-Faktoren vorhanden sind (Lowenberg et al., 1999). So interagiert z. B. MEF (myeloid ELF1-like Faktor) mit AML1 um den IL3-Promotor zu aktivieren, und Myeloperoxidase kann nur transaktiviert werden, wenn AML1 zusammen mit x-myb exprimiert wird (Britos-Bray and Friedman, 1997).

Um normal zu arbeiten, muss AML1 zusammen mit CBFβ einen Funktionskomplex bilden, wobei CBFβ auch an der Runt Domäne von AML1 bindet, selber aber keine Verbindung zur DNA oder wichtigen Ko-Faktoren eingeht (Licht, 2001) (Abb.3). CBFβ defiziente Mäuse zeigen den gleichen Phänotyp wie AML1 defiziente Tiere (Sasaki et al., 1996; Wang et al., 1996). Bisherige Untersuchungen zeigen, dass der AML1/CBFβ Komplex eines der häufigsten Ziele von Genmutationen bei der humanen AML ist (Downing, 1999; Downing et al., 2000; Friedman, 1999; Speck et al., 1999).

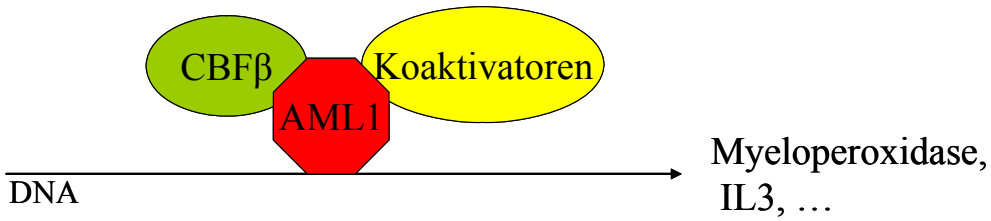


Abbildung 3: Schema des AML1-CBFβ Komplexes

AML1 $^{-/-}$ (Knock-out) Mäuse zeigen eine embryonale Sterblichkeit auf Grund der kompletten Unterbindung der Hämatopoese während der Embryogenese (fötale Leberhämatopoese) (Okuda et al., 1996).

Während der Embryogenese findet zunächst die primitive Erythropoese (Abbildung 4) statt: primitive Erythrozyten differenzieren im Dottersack ab dem Tag 7,5 aus einer bipotenten Zelle, dem Hämangioblast. Für dieses Entwicklungsstadium sind AML1 und CBFβ nicht notwendig.

Abbildung 4: primitive Hämatopoese

Ab dem Tag 12,5-13,5 beginnt die definitive Hämatopoese (fötale Leberhämatopoese) (Abb. 5). Hierbei differenziert eine hämatopoetische Stammzelle aus einem „hämogenen Endothel“. Dies besteht aus Endothelzellen, die die Dottersack- und Nabelarterien und die ventrale Portion der Aorta/Gonaden/Mesonephros Region umgeben und im Dottersack verstreut liegen. Hierfür ist AML1 erforderlich. Ohne das Gen wird die definitive Hämatopoese völlig blockiert, keine hämatopoetische Stammzelle kann entstehen, der Fötus stirbt.

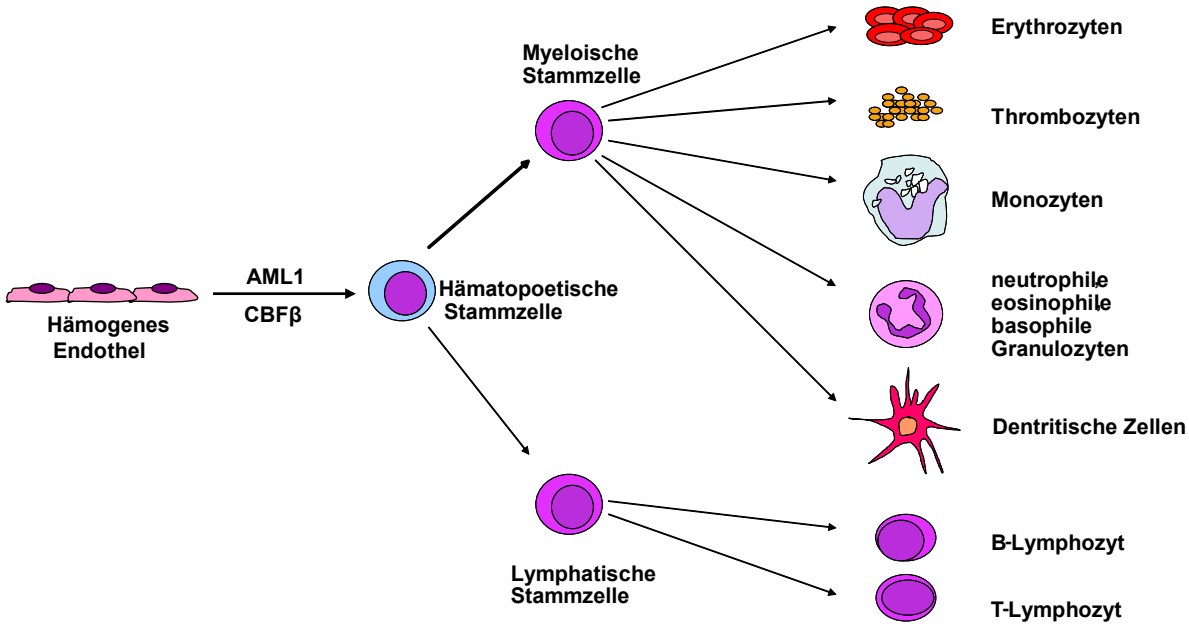


Abbildung 5: definitive Hämatopoese (nach Speck and Gilliland, 2002)

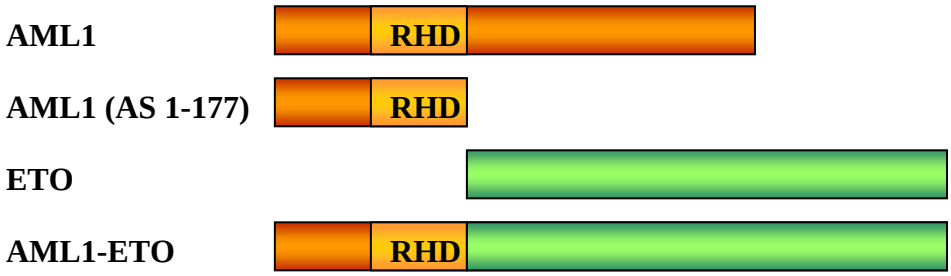
Ichikawa et al. untersuchten die Auswirkung einer Ausschaltung von AML1 in adulten Mäusen. Sie fanden, dass AML1 für die Reifung von Megakaryozyten und die Differenzierung von T- und B-Zellen essentiell ist, aber nicht für die Erhaltung von hämatopoetischen Stammzellen in der Hämatopoese von Erwachsenen (Ichikawa et al., 2004).

2.4 AML1-ETO

Das AML1-ETO Protein ist das Ergebnis der Translokation t(8;21). Hier fusionieren das AML1 Gen von Chromosom 21 und das ETO-MTG8 Gen von Chromosom 8 (ETO für

„eight twenty one“ in Anlehnung an die Chromosomen 8 und 21). Es werden dabei die ersten 177 Aminosäuren des AML1 an ETO Sequenzen gebunden (Miyoshi et al., 1991) (Abb.6 a und b).

A



B

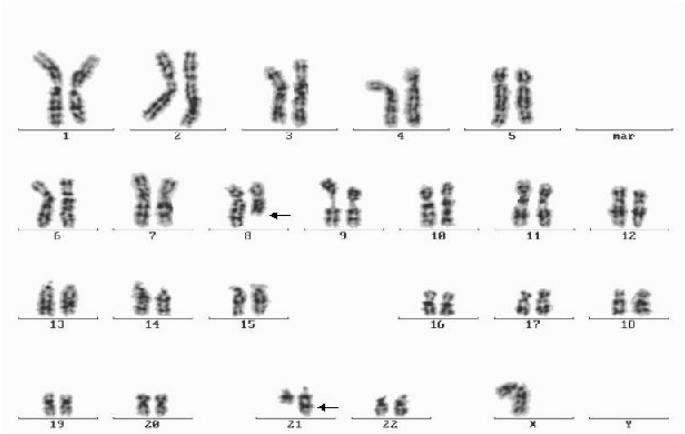


Abbildung 6 A und B: Translokation (8;21), A: Konstruktschema, B: Karyogramm, die entsprechenden Bereiche auf den Chromosomen 8 und 21 sind mit Pfeilen markiert (Schoch, 2004)

Das ETO-Protein gehört zur ETO Familie, die ETO (MTG8), ETO2 (MTG16), und MTGR1 umfasst (Calabi and Cilli, 1998). Alle drei Mitglieder dieser Familie haben vier evolutionär konservierte Domänen, die NHRs (nervy homology regions). Diese basieren auf ihrer Homologie zum Drosophila-Protein Nervy, das an der neuronalen Entwicklung während der Segmentation von Drosophila-Embryonen beteiligt ist. Diese Domänen zeichnen sich unter anderem durch zwei Zink-Finger-Motive aus, die bei der Protein-Protein Interaktion von ETO wichtig sind (Erickson et al., 1994; Gross and McGinnis, 1996). ETO wurde erst im Zusammenhang mit AML1-ETO entdeckt und als erstes Protein, das mit ETO interagiert, wurde 1998 das Familienmitglied MTGR1 gefunden

(Kitabayashi et al., 1998). Es wurden noch weitere Partnerproteine isoliert, wobei alle diese Interaktionen über die NHR-Domänen stattfinden. Wichtige zu nennende Partnerproteine sind vor allem NCoR (nuclear receptor corepressor) und SMRT (silencing mediator for retinoid and thyroid receptors) die an die NHR4 Zinkfinger Domäne von ETO binden (Gelmetti et al., 1998; Lutterbach et al., 1998; Wang et al., 1998). NCoR und SMRT sind nukleare Hormon-Korepressoren, die von Hormonrezeptoren in den Zellkernen sezerniert werden und transkriptionelle Aktivierung erlauben. Diese Ko-Repressor-Proteine sind dafür bekannt, sich mit anderen Proteinen, die an transkriptionaler Repression beteiligt sind, zu assoziieren. Dies sind vor allem mSin3a und die Histon Deacetylase (HDAC)-Familie (Chen and Evans, 1996; Shibata et al., 1997). Daher kann AML1-ETO über NCoR und SMRT einen Transkripionsrepressor-Komplex aufbauen und die Expression von AML1 Zielgenen negativ regulieren (Amann et al., 2001).

AML1-ETO ist eine der häufigsten chromosomalen Aberrationen in der akuten myeloischen Leukämie. Diese genetische Alteration wird in bis zu 40% der AML M2 gefunden und in 12-15% aller AML Fälle insgesamt (Downing, 1999; Nucifora and Rowley, 1995). Die AML1-ETO positiven Leukämien sind besonders charakterisiert durch Auer-Stäbchen (azurophile Stäbchen im Zytoplasma) in den leukämischen Blasten, hohe Expressionslevel von CD 34 und CD19 sowie niedrige Level von CD33 (Andrieu et al., 1996; Nishii et al., 2003).

AML1-ETO Transkripte sind in einer Fraktion von Stammzellen, in Monozyten und B-Zellen in Remissionsknochenmark und in einem Anteil von B-Zellen im leukämischen Knochenmark, aber nicht in T-Zellen detektiert worden (Mulloy et al., 2002).

Da bei der Fusion der Gene die DNA bindende Domäne des AML1 erhalten bleibt, kann auch das Fusionsprodukt AML1-ETO an DNA binden. Eine Tetramerisierung von AML1-ETO steigert die Affinität zur DNA, daher gibt es einen kompetitiven Vorteil gegenüber Wildtyp AML1 (Bushweller et al., 2003).

Bei AML1-ETO Mäusen konnte in allen Fällen der gleiche Phänotyp (s.o.) wie bei AML1 Knock-out Mäusen gefunden werden: embryonale Sterblichkeit durch Fehlen der definitiven Hämatopoese. Dies ist ein starker Hinweis darauf, dass AML1-ETO eine Unterbrechung der normalen Funktion von AML1 verursacht, es wirkt als potenter dominant-negativer Inhibitor von AML1 (Abb. 7) (Speck and Gilliland, 2002).

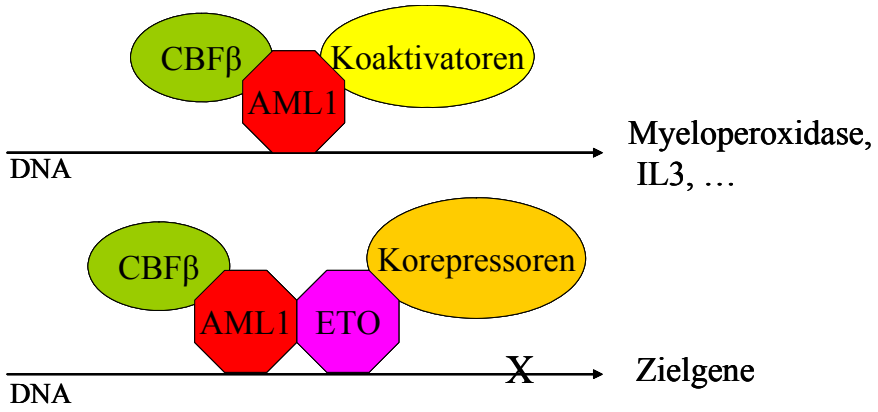


Abbildung 7: Das Fusionsprotein AML1-ETO unterbindet die Expression von Zielgenen

Unter den Zielgenen, die durch die Expression von AML1-ETO unterdrückt werden, sind zusätzlich zu den oben genannten auch Gene, die in der Regulation des Zellzyklus wichtig sind, wie Cyclin D3 und CDK4. Die zelluläre Konsequenz der fehlenden Exprimierung dieser Gene ist eine Beeinträchtigung im Übergang von der G1 zur S-Phase des Zellzyklus und eine langsamere Proliferation der Zellen (Hess and Hug, 2004).

Um die genauen Auswirkungen von AML1-ETO vor allem im Hinblick auf die große Anzahl der humanen Patienten mit AML1-ETO positiver AML zu untersuchen, wurden viele Experimente sowohl im humanen als auch im murinen Bereich durchgeführt.

C/EBPα (CCAAT/enhancer binding protein α), ein Protein, das wesentlich für die Differenzierung von Granulozyten ist, scheint auch eine Schlüsselfunktion bei der Leukämogenese von Leukämien mit der Translokation t(8;21) zu haben. Hier fand die Gruppe um Pabst et al., dass AML1-ETO positive AML Blasten einen 8-fach niedrigeren *CEBPA* RNA Spiegel und nicht detektierbares C/EBPα Protein verglichen mit AML Patienten ohne t(8;21) haben. AML1-ETO scheint die C/EBPα-Expression indirekt durch Verhinderung der Autoregulation des CEBPA Promotors zu unterdrücken. Wird aber

C/EBPα konditional in AML1-ETO positiven Kasumi-1 Zellen exprimiert, findet eine neutrophile Differenzierung statt (Pabst et al., 2001).

AML1-ETO wurde im Rahmen einer Studie von Mulloy et al. in humane $CD34^+$ Zellen, also sehr frühe Vorläuferzellen retroviral integriert, und es zeigte sich, dass multipotente aber zytokinabhängige hämatopoetische Kulturen mit einer Langzeitselbsterneuerungskapazität und der Fähigkeit sich in myeloische und lymphatische Richtungen zu differenzieren entstanden (Mulloy et al., 2003). Diese Kulturen konnten bis zu 8 Monate erhalten werden. Wurden die Zellen allerdings in NOD-SCID Mäuse transplantiert, konnten sie keine Leukämie auslösen. Die Gruppe um Hug stellte auch fest, dass AML1-ETO auf Wachstum und Differenzierung von primären Progenitorzellen im murinen Knochenmark Einfluss hat und weiterhin, dass der gemeinsame Verlust der NHR2 und NHR4 Domänen diesen Effekt von AML1-ETO eliminiert (Hug et al., 2002).

Um die letale Wirkung der Translokation bei Mäusen zu umgehen, kreierten verschiedene Gruppen induzierbare Modelle, bei denen AML1-ETO erst nach der kritischen Phase exprimiert wird. So etablierten z.B. Rhoades et al. ein durch Tetrazyklin induzierbares System (tet-off system), bei dem die Mäuse von der Zeugung bis zum Absetzen durch die Mutter und später so lange wie gewünscht durch Trinkwasser mit Tetrazyklin versorgt wurden und erst nach dem Absetzen des Wirkstoffs AML1-ETO exprimiert wurde (Rhoades et al., 2000). Hier konnte *in vivo* keine abnormale Hämatopoese festgestellt werden, und auch keine Tendenz Leukämie zu entwickeln. *In vitro* fand die gleiche Gruppe einen Unterschied in der Fähigkeit von AML1-ETO positiven Zellen zu differenzieren und zu proliferieren: ihre CFC Versuche (colony forming cells) deuten darauf hin, dass AML1-ETO positive Progenitorzellen einen Block in der myeloischen Differenzierung aufweisen. Nach der Zugabe von Tetrazyklin, wurde AML1-ETO wieder unterdrückt und die Zellen konnten ausdifferenzieren.

Yuan et al. entwickelten ein anderes induzierbares System, bei dem die Expression von AML1-ETO an MRP8 gekoppelt ist, einem kalziumbindenden Protein, das nur von myeloischen Zellen (neutrophile und monozytische Reihe), nicht aber von frühen hämatopoetische Zellen exprimiert wird. Sie fanden im murinen Modell auch keine auffällige Störung der Hämatopoese *in vivo*. Bei ihren Experimenten (CFC, FACS) zeigten sich auch *in vitro* keine Abweichungen zu den Kontrollmäusen. Sie behandelten

daraufhin Mäuse, die AML1-ETO exprimierten, mit ENU (N-ethyl-N-nitrosourea, mutagenetische Dosierung 50 mg/kg), einem DNA alkylierenden Wirkstoff, mit einer Dosierung von 300mg/kg. 55% dieser Mäuse entwickelten eine AML, die anderen 45% und alle auch mit ENU behandelten Kontrollmäuse bekamen entweder ein Lymphom oder eine ALL. Von vorhergehenden Experimenten ist bekannt, dass die ALL auch durch ENU alleine induzierbar (Frei and Lawley, 1980) ist. Yuan et al. folgerten, dass für die Entwicklung von akuter myeloischer Leukämie AML1-ETO alleine nicht ausreicht, sondern zusätzliche, in diesem Fall durch ENU induzierte Mutationen erforderlich sind (Yuan et al., 2001).

Auch die Gruppe um Higuchi et al. konnte ähnliche Ergebnisse finden: keine signifikanten Abnormalitäten *in vivo* bei AML1-ETO Mäusen. Auch sie behandelten Mäuse mit ENU und sahen bei AML1-ETO positiven Tieren zwei Arten von hämatopoetischen Neubildungen. Einerseits wieder eine T-ALL und andererseits ein granulozytisches Sarkom, das in ähnlicher Ausprägung mit einer relativ hohen Inzidenz auch bei t(8;21) AML beobachtet werden kann (Higuchi et al., 2002). Sie kommen zu demselben Schluss, dass es eine oder mehrere zusätzliche Mutationen geben muss, um akute myeloische Leukämie zu induzieren.

Schwieger et al. verwendeten das syngene Transplantationsmodell. Sie injizierten mit AML1-ETO infizierte Zellen in letal bestrahlte Mäuse und fanden im Gegensatz zu den anderen Forschungsgruppen, dass AML1-ETO direkt die Granulozytopoese stimuliert, die Erythrozytopoese unterdrückt und die Reifung von myeloischen, B und T lymphatischen Zellen *in vivo* hemmt. Um weiter zu studieren, wie zusätzliche genetische Alterationen die Experimente beeinflussen können, arbeiteten sie mit ICSBP, einem Interferon Regulationsfaktor, der als Tumorsuppressor in myeloischen Leukämien wirkt und in AML Blasten in 66% der Fälle herabreguliert ist.

Sie sahen, dass eine ICSBP Defizienz mit der Expression von AML1-ETO zusammenarbeitet und bei Mäusen, in denen beide Mutationen ausgeprägt waren, eine myeloische Tumorgenese auftrat. Diese war gekennzeichnet durch durchschnittlich 25% Blasten mit abnormer Morphologie im Knochenmark und granulozytische, sarkomartige Tumoren im knochennahen Gewebe, was auch relativ häufig bei der t(8;21) positiven AML vorkommt. Sie folgerten, wie die anderen Gruppen, dass es zusätzlicher Mutationen bedarf, um Leukämie zu induzieren (Schwieger et al., 2002).

Entgegen aller bisherigen Untersuchungen, die keine Krankheit bei AML1-ETO positiven Mäusen fanden, konnte vor kurzem bei einem Modell, in dem AML1-ETO gezielt in hämatopoetischen Stammzellen exprimiert wurde, ein Myelodysplastisches Syndrom diagnostiziert werden, aber wiederum keine Leukämie (Fenske et al., 2004a).

Bei einer anderen Forschungsgruppe, die nach additiven Mutationen zu AML1-ETO suchte, trat in einer AML1-ETO Kontrollmaus nach 14 Wochen eine AML auf (Yan et al., 2004). Genauere Untersuchungen ergaben, dass hier innerhalb von AML1-ETO eine weitere Mutation stattgefunden hatte: das C-terminale Ende des Fusionsgens war auf Grund einer Punktmutation, die ein frühzeitiges Stopkodon einführte, nicht exprimiert: ein trunkiertes Protein entstand. Es wird postuliert, dass im trunkierten AML1-ETO auf Grund fehlender Bindungsstellen für Korepressoren die Aktivität von AML1-ETO reduziert und es dadurch in der Onkogenität optimiert wird. Unterstützt wird die Leukämogenese außerdem dadurch, dass nicht wie bei AML1-ETO in den Zellzyklus eingegriffen wird. Alle anderen AML1-ETO Mäuse in diesem Experiment (n > 30) entwickelten wie erwartet keine Leukämie (Hess and Hug, 2004; Yan et al., 2004).

Erste konkrete Versuche, ob AML1-ETO mit Tyrosinkinase- Mutationen zusammenarbeiten kann um Leukämien auszulösen, unternahmen Grisolano et al. 2003. Sie kombinierten AML1-ETO mit einer Mutation der Rezeptortyrosinkinase PDGFβ (Platelet Derived Growth Factor). Durch die t(5;12) wird das *TEL* Gen zum *PDGFβ* Gen fusioniert. Das daraus resultierende Fusionsprotein TEL/PDGFβ (TP) aktiviert die Tyrosinkinase.

Sie sahen, dass die Mäuse mit TP alleine sehr schnell eine myeloproliverative Krankheit mit Splenomegalie, Anämie, Thrombozytopenie und einer Anhäufung von reifen neutrophilen Granulozyten in verschiedenen Organen und im Blut entwickelten. In Mäusen, die sowohl TP als auch AML1-ETO exprimierten, konnte nach ca. zwei Monaten schon eine tödliche AML mit einer vorherrschenden Blastenpopulation im Knochenmark (20-60%) und eine massive Organinfiltration festgestellt werden. Weiterhin untersuchten sie noch eine AML1-ETO Variation mit Punktmutation der DNA bindenden Stelle und stellten fest, dass diese funktionsfähig sein muss, um in diesem Modell Leukämie auszulösen (Grisolano et al., 2003).

2.5 FLT3

FLT3 (Fms-like tyrosine kinase 3), Synonyme sind FLK-2 und STK-1, ist eine Protein-Rezeptortyrosinkinase (RTK) der Klasse III, die wichtig für die normale Entwicklung von Stammzellen und des Immunsystems ist. Sie ist auf dem Chromosom 13q12 lokalisiert (Gilliland and Griffin, 2002a), das Gen kodiert für ein 1000 und 993 Aminosäuren großes, murines respektive humanes Protein (Rosnet et al., 1993). FLT3 wird von unreifen hämatopoetischen Zellen (CD34 positive Zellen mit hohen Expressionsleveln von c-Kit), Plazenta, Gonaden und dem Gehirn exprimiert. Klasse III RTKs setzen sich aus einer glykosilierten, extrazellulären Domäne bestehend aus fünf immunglobulinähnlichen Domänen und einem zytoplasmatischen Anteil bestehend aus einer juxtamembranösen (JM) Domäne, zwei Protein-Tyrosinkinase (PTK)-Domänen und einer Interkinase-Domäne zusammen.

Der extrazelluläre Anteil der verschiedenen RTK ist für die Ligandenbindung verantwortlich (van der Geer, 1994). Nach der Bindung mit dem entsprechenden Liganden (FLT3-Ligand, FL), einem hämatopoetischen Wachstumsfaktor, kommt es zur Aktivierung der Tyrosinkinase, also zur Rezeptordimerisation, Autophosphorylierung und der darauf folgenden Phosphorylierung von zytoplasmatischen Substraten (Abb. 8). Diese wiederum unterstützen die Regulation der Proliferation von pluripotenten Stammzellen, frühen Vorläuferzellen und unreifen Lymphozyten über bestimmte nachgeschaltete Signalwege zum Beispiel über die Aktivierung von STAT5 *(signal transducer and activator of transcription 5)* und MAPK *(mitogen-activated protein kinase)* (Lyman and Williams, 1995).

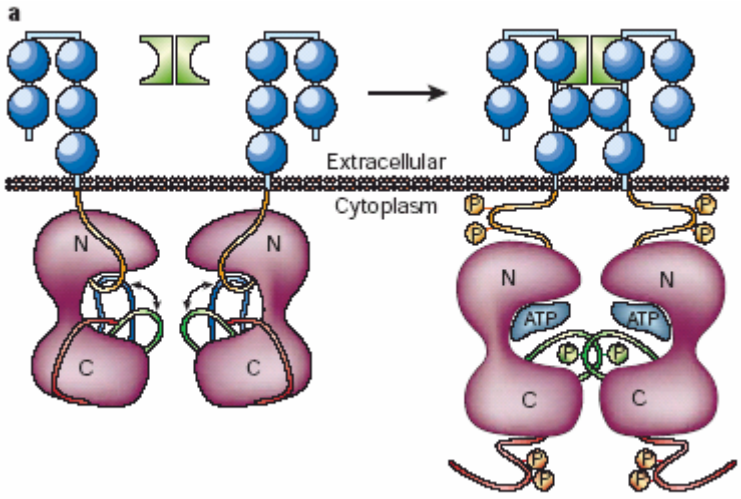


Abbildung 8, Seite 20: Aktivierungsmechanismus der Rezeptortyrosinkinasen (Blume-Jensen and Hunter, 2001), links: inaktive Form, rechts: Liganden induzierte Dimerisierung und Autophosphorylierung

Die gezielte Ausschaltung von FLT3 im Tierversuch resultiert in gesunden erwachsenen Mäusen mit normalen reifen hämatopoetischen Populationen. Jedoch gibt es erhebliche Defizienzen in primitiven B-lymphatischen Progenitoren und ein KM Transplantations-Experiment zeigt eine verminderte Fähigkeit der Stammzellen, T- und myeloische Zellen zu rekonstituieren (Mackarehtschian et al., 1995). Diese Daten weisen auf eine wichtige Rolle für FLT3 für die Entwicklung von multipotenten Stamm- und B-Zellen hin.
In 70 -100% von AML- und in vielen ALL Fällen wird FLT3 überexprimiert (Drexler, 1996). Diese Überexpression und die Stimulation mit dem FLT3-Liganden führt zur Proliferation der Zellen und inhibiert zusätzlich über eine Induktion von BCL-2 (B-Cell leukemia/lymphoma 2) die Apoptose (Lisovsky et al., 1996). In verschiedenen Versuchen hat man gesehen, dass die Stimulation von FLT3 durch den Liganden die Proliferation und das Überleben von leukämischen Blasten erhöht (Minden et al., 1996) und dass der Ligand zusammen mit anderen Wachstumsfaktoren die Proliferation von FLT3 exprimierenden primären AML- und ALL Zellen stimuliert (Dehmel et al., 1996; Drexler, 1996).
In 30-35% aller AML Fälle können Mutationen im Bereich von FLT3 nachgewiesen werden (Kottaridis et al., 2003). Diese Mutationen sind vor allem interne Tandem Duplikationen im Bereich der juxtamembranösen Domäne, auf die nachfolgend noch näher eingegangen werden soll, und Punktmutationen, die hauptsächlich im Bereich der Aktivierungsschleife vorkommen (Spiekermann et al., 2002). Die Auswirkung solcher Mutationen besteht im Wesentlichen in einer ligandenunabhängigen Aktivierung des Rezeptors.

2.6 FLT3-Längenmutation (FLT3-LM)

FLT3 Längenmutationen (FLT3-LM), wie zum Beispiel durch Interne Tandem Duplikation (ITD) in der juxtamembranösen (JM) Domäne von FLT3 stellen die häufigsten genetischen Alterationen bei der AML dar (Reilly, 2003). Es handelt sich bei

den ITDs um verschieden lange Aminosäuresequenzen, die verdoppelt werden, wodurch die JM-Region des Proteins verlängert wird (Abb. 9 und 10) FLT3-LM wurden in allen FAB AML-Subtypen gefunden, aber nicht in normalen hämatopoetischen Zellen, inklusive Nabelschnurblut und Knochenmark, bei denen eine hohe Expression von Wildtyp FLT3 gefunden werden kann (Gilliland and Griffin, 2002b). Eine bemerkenswerte Tatsache ist die Verschiedenheit sowohl in Größe als auch in der Lokalisation der ITDs. Die Länge der Duplikation variiert zwischen 12 und 204 bp, es wurden aber auch schon so kurze wie 3 bp und so lange wie > 400 bp gefunden (Schnittger et al., 2002). Die meisten ITDs geschehen am 5´ Ende der Juxtamembranösen Domäne in Exon 14 (Abb. 9), aber sie unterscheiden sich in der genauen Sequenz, die dupliziert wird, und ihrem Startpunkt. Es treten bei manchen Patienten Längenmutationen auf einem Allel auf, aber Studien berichten auch von Mutationen auf beiden Allelen. Weiterhin gibt es Patienten, bei denen das verbleibende Wildtyp Allel verloren gegangen ist (Kelly and Gilliland, 2002). In verschiedenen Studien konnte nachgewiesen werden, dass akute myeloische Leukämien mit Mutationen von FLT3 mit einer negativen Prognose einhergehen, es besteht eine erhöhte Rezidivrate und ein schlechteres Überleben (Kottaridis et al., 2001).

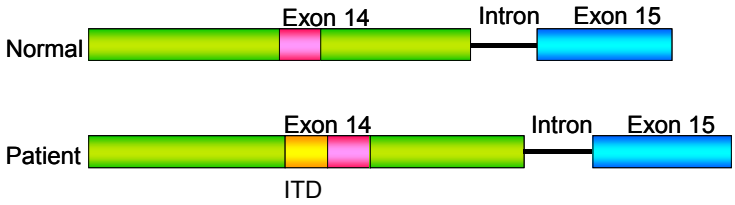


Abbildung 9: Interne Tandem Duplikation in FLT3, nach Stirewalt and Radich, 2003

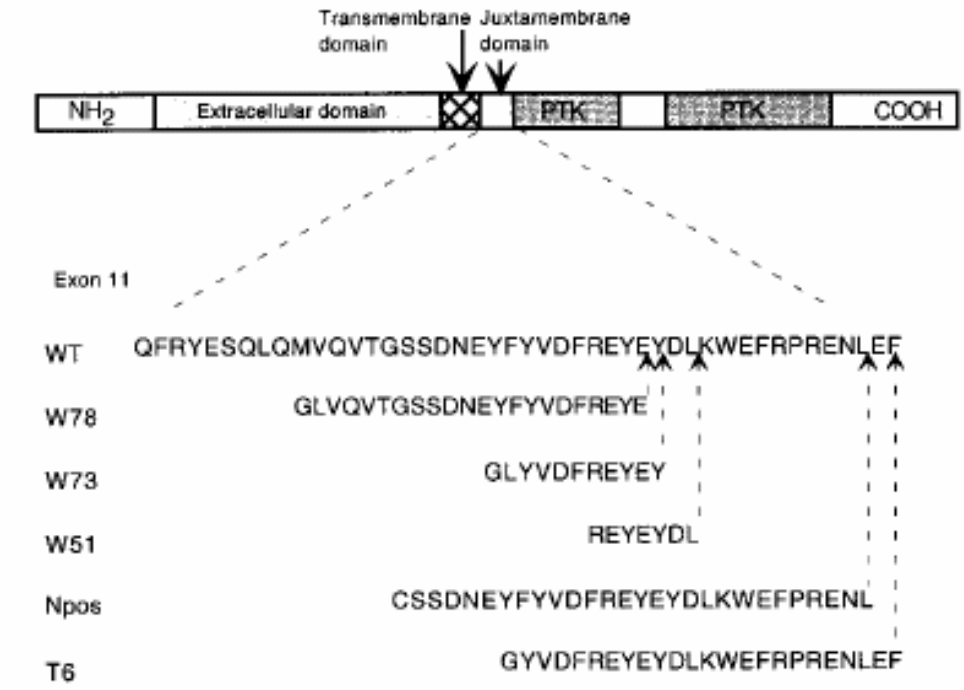


Abbildung 10, Seite 21: schematisches Diagramm der FLT3 Rezeptortyrosinkinase, Pfeile deuten auf die trans- und juxtamebranösen Domänen. Die Aminosäuresequenz, die die juxtamembranöse Sequenz kodiert, wird darunter gezeigt. WT ist die Wildtyp Sequenz, W78, W73, W51, Npos und T6 sind FLT3-Längenmutationen , die duplizierten Bereiche sind dargestellt und die Pfeile zeigen die Position der Duplikation im Vergleich zum Wildtyp; NH2 ist das aminoterminale Ende, COOH das carboxyterminale Ende; PTK: Phosphotyrosinkinase- Kinase Domänen (Kelly et al., 2002b)

Um die genauen Auswirkungen der FLT3-LM zu untersuchen, wurden seit der Entdeckung im Jahre 1996 (Nakao et al., 1996) viele Studien durchgeführt. In sehr vielen Experimenten mit Patientenproben wurde das Verhalten der Zellen und die Wirkung von Inhibitoren *in vitro* getestet. Yamamoto et al. sahen in ihren Versuchen, dass die Mutation zur ligandenunabhängigen Aktivierung der Tyrosinkinase führt und zum Beispiel in ansonsten IL-3 abhängigen Zellen ein faktorunabhängiges Wachstum induziert werden kann (Yamamoto et al., 2001). Mizuki et al. fanden, dass LM Rezeptormutationen ein Transkriptionsprogramm induzieren, das einer Aktivierung des IL3 Rezeptors ähnelt, dass

einige Gene von FLT3-LM aber nicht vom Wildtyp reguliert werden (Gene, die an Zellwachstum und Differenzierung beteiligt sind) und dass die ITD Mutation die Expression und Funktion von Transkriptionsfaktoren unterdrückt, welche wichtig für die myeloische Differenzierung sind (Mizuki et al., 2003).

Zheng et al. fanden weiter, dass die FLT3-LM in einer myeloischen Vorläuferzelllinie einen Block in der G-CSF (*Granulocyte colony stimulating factor*, einem Wachstumsfaktor) gesteuerten granulozytären Differenzierung verursacht und außerdem die Induktion von C/EBPα inhibiert, welches ein Schlüsselregulator in der Granulopoese ist. Dieser Effekt kann durch den Tyrosinkinaseinhibitor CEP-701 aufgehoben werden (Zheng et al., 2004).

Weiterhin gibt es auch einige Untersuchungen im Mausmodell, auf die im Folgenden näher eingegangen werden soll. So wurde von Kelly et al. gesehen, dass die Expression von FLT3-LM, aber nicht vom Wildtyp eine transformierende Fähigkeit in Knochenmarkzellen von BALB/c Mäusen besitzt. Es entwickelt sich eine Myeloproliferation mit Leukozytose (hauptsächlich reife Zellen) und Splenomegalie, sowie eine extramedulläre Hämatopoese in der Milz und in der Leber. Die Krankheit entwickelte sich innerhalb von 40 bis 60 Tagen und ist oligoklonal. Da sich aber keine Leukämien entwickelten, wurde geschlussfolgert, dass hierzu noch weitere Mutationen nötig seien (Kelly et al., 2002b). Die gleiche Gruppe wählte daraufhin eine zusätzliche Mutation für das nächstes Projekt, sie kombinierten das Fusionsgen PML/RARα (Promyelocytic Leukemia/ Retinoic Acid Receptor α) mit der FLT3-Längenmutation, was auch bei 35% der Patienten mit t(15; 17) positiver AML gemeinsam exprimiert wird.

Das Fusionsgen alleine verursacht in Mäusen ein nicht tödliches myeloproliferatives Syndrom, ca.15% dieser Kontrollgruppe entwickelte nach langer Zeit eine akute Promyelozyten Leukämie (APL), vermutlich durch zusätzliche, in der Dauer der Zeit stattgefundene Mutationen. Dies wiederum spricht für das Mehrschrittmodell der AML. Es entwickelte sich in Mäusen mit beiden Mutationen binnen kürzester Zeit eine APL ähnliche, retransplantierbare Krankheit. Ein Behandlungsversuch mit ATRA (All-trans-Retinolsäure) war erfolgreich. Interessanterweise entwickelte sich in diesem Mausmodell bei dem die Forschungsgruppe mit B6/C3H Mäusen arbeitete, in der FLT3-LM Kontrollgruppe keine Myeloproliferation, wie bei BALB/c Mäusen, sondern eine Lymphom- ähnliche Krankheit mit langer Entstehungsdauer (Kelly et al., 2002a).

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3. 1 Material und Methoden

3.1.1 Zelllinien

Alle verwendeten Zelllinien wurden in einem Inkubator (Binder, Tuttlingen) mit feuchtem Klima bei 37° C und 5% CO_2 kultiviert. Als Medium wurde DMEM (Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium, 4,5 g/l Glukose, GIBCO, Karlsruhe) mit 10 % fötalem Kälberserum (FBS) (Cell Systems, St. Katharinen) verwendet. Es wurden 500 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin (Gibco, Karlsruhe) hinzugefügt. Alle Zelllinien haben eine sehr schnelle Verdoppelungsrate (<1 Tag) und werden ca. alle 3 Tage in einer Verdünnung von 1:10-1:20 aufgeteilt. Die Zellen wachsen adhärent und werden mit Trypsin EDTA gelöst um wieder eine Einzelzellsuspension zu erhalten. Nach einmaligem Waschen mit PBS (Phosphate buffered saline)(GIBCO, Karlsruhe) werden sie wieder in Medium aufgenommen und replatiert.

293 T

Die humane embryonale Nierenzelllinie wurde verwendet, um mit transienter Transfektion Virus enthaltendes Medium (VCM) zu produzieren.

NIH 3T3

Die adhärente Mausfibroblastenzelllinie NIH 3T3 wurde verwendet, um den bei der transienten Transfektion erhaltenen viralen Überstand zu titrieren.

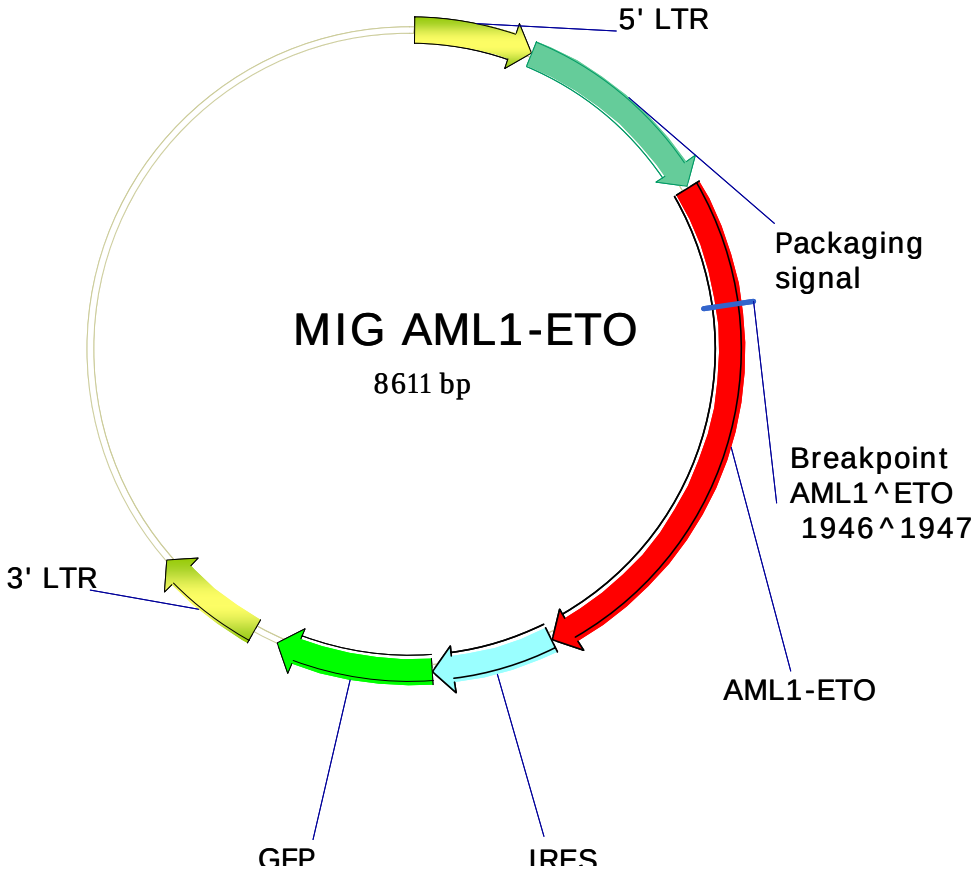
GP^{+}E86

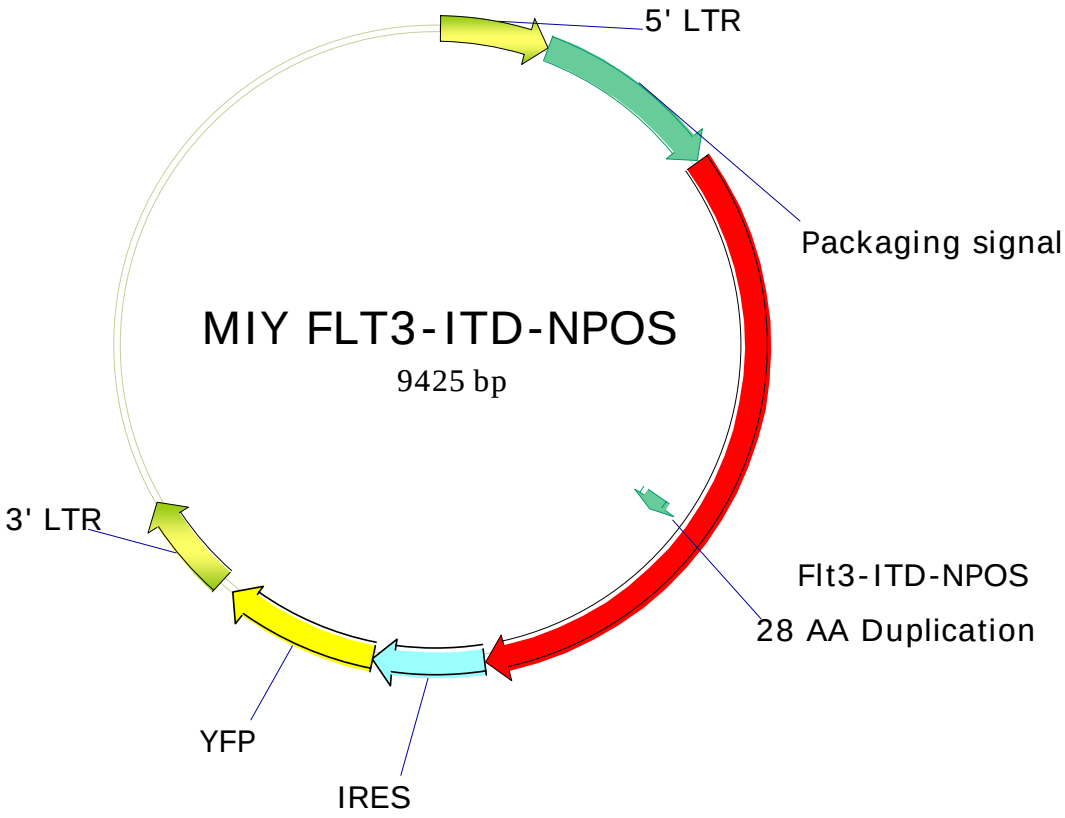
Die adhärente, ecotrope Mausfibroblastenzelllinie GP^{+} E86 wurde benutzt, um durch eine Transduktion Retroviren mit den entsprechenden Mutationen zu produzieren.

3.1.2 cDNA Konstrukte und retrovirale Vektoren

Für den retroviralen Gentransfer in primäre Knochenmarkzellen wurde die *AML1-ETO* und *FLT3-LM* cDNA in die multiple cloning site des modifizierten murinen Stammzellvirus (MSCV) 2.1 Vektors stromaufwärts des grünen fluoreszierenden Proteins (*enhanced green fluorescent protein*; EGFP), respektive gelben fluoreszierenden Proteins (*enhanced yellow fluorescent protein;* YFP) und der internal ribosomal entry site (IRES) einkloniert (Abb.11). Flankiert werden die Konstrukte von den LTRs (long terminal repeats), die wichtige regulatorische Kontrollsequenzen darstellen. Stromabwärts des 5' LTR, der Promotorfunktion besitzt, liegt die so genannte Verpackungssignalsequenz, die zur Verpackung der viralen RNA in die Viruskapside notwendig ist (Gutjahr, 2000). Als Kontrolle wurde ein MSCV Vektor benutzt, der nur die IRES-EGFP Kassette trägt. Die cDNA von *FLT3-ITD (FLT3-ITD NPOS)* wurde freundlicherweise von D.G. Gilliland (Division of Hematology-Oncology, Harvard Medical School, Boston, USA) und K. Spiekermann (Medizinische Klinik III, Klinikum Großhadern, München, Deutschland) zur Verfügung gestellt und beinhaltet eine duplizierte Sequenz von 28 Aminosäuren (CSSDNEYFYVDFREYEYDLKWEFPRENL), die zwischen den Aminosäuren 610 und 611 liegt. Die cDNA des Fusionsgens *AML1-ETO* wurde von S.W. Hiebert (Department of Biochemistry, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, Tennessee, USA) und K. Spiekermann zur Verfügung gestellt.

Abbildung 11, nächste Seite: Plasmidkarten von AML1-ETO in MIG (MSCV-IRES GFP) und FLT3-ITD in MIY (MSCV-IRES-YFP); LTR: long terminal repeat; IRES: internal ribosomal entry site; GFP: green flourescent protein; YFP: yellow flourescent protein; bp: Basenpaar


5' LTR
Packaging signal
MIG AML1-ETO
8611 bp
Breakpoint
AML1^ETO
1946^1947
3' LTR
AML1-ETO
GFP
IRES


5' LTR
Packaging signal
MIY FLT3-ITD-NPOS
9425 bp
3' LTR
Flt3-ITD-NPOS
28 AA Duplication
YFP
IRES

3.1.3 Transiente Transfektion

Die transiente, also vorübergehende Transfektion dient dazu, durch Einbringen von fremder DNA in 293 T Zellen, Virus enthaltendes Medium (*engl. virus containing medium*, VCM) zu produzieren, womit man später GP^+ E86 Zellen oder primäre Knochenmarkzellen transfizieren kann.
Dazu werden am Tag 0 ca 1,2-1,5 x 10^7 293 T Zellen in eine 15 cm Kulturschale für adhärente Zellen (Corning) platiert. Am Tag 1 sollen diese Zellen ca 70 % konfluent sein.
Ca. 4 Stunden vor der Transfektion wird an Tag 1 gegen Mittag das Medium vorsichtig gewechselt ohne dabei die Zellen zu stören. Am Abend beginnt die eigentliche Transfektion. Hierzu wird in ein steriles 2 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) 1 ml HBS pipettiert. In ein anderes Reaktionsgefäß werden 1ml endotoxinfreies, steriles H_20 (Sigma), 30 µg der entsprechenden cDNA, 30 µg Ecopack (retrovirales Verpackungsgen in Sigma Wasser, Clontech) verbracht und vorsichtig gemischt. Dann werden noch 100 µl 2M $CaCl_2$ (Sigma-Aldrich GmbH) dazugegeben, vorsichtig gemischt und eine Minute inkubiert. Im Anschluss wird diese Mischung tropfenweise zu dem H_2O gegeben, gemischt und wiederum 3-4 Minuten inkubiert. Diese Mischung wird dann vorsichtig auf die 293 T Zellen getropft, ohne die Zellen oder die Platte zu irritieren.
Am Tag 2 wird früh am Morgen das Medium vorsichtig gewechselt, um die Kalziumkristalle zu entfernen. Am Tag 3 wird morgens das VCM vorsichtig abpipettiert, mit einem 0.45 µm Filter (Millipore) filtriert, um Zellreste zu entfernen und bei –80 °C bis zum Gebrauch eingefroren. Die Platte mit den Zellen wird mit frischem Medium versorgt. Dasselbe wird am Abend wiederholt und auch am nächsten Tag kann noch 2x VCM geerntet werden.

3.1.4 Herstellung einer stabilen Verpackungszelllinie

Um eine stabile Verpackungszellinie zu erhalten, werden zunächst am Tag 0 je 5 x 10^4 GP^+E86 Zellen pro Vertiefung einer 6-well Platte in 6 Vertiefungen platiert.
Am Tag 1, wenn die Zellen adhärent gewachsen sind, wird das Medium entfernt und 1-2 ml filtriertes VCM mit Protaminsulfat (5 µg/ml)(Sigma) auf die Zellen gegeben. Am Abend desselben Tages sowie am nächsten Morgen wird die Transduktion mit frischem

VCM und Protaminsulfat wiederholt. Am Tag 4 können die Zellen geerntet, in FACS Puffer (PBS + 2% FBS + 1/1000 Propidiumjodid) aufgenommen und per FACS (Fluorescence activated cell sorting in GFP/YFP positive und nicht transduzierten Zellen getrennt werden. Die positiven Zellen werden anschließend in normalem Medium wieder kultiviert. Wenn sie sich entsprechend vermehrt haben, kann noch ein zweiter Sortiergang angeschlossen werden um die Reinheit zu erhöhen.

3.1.5 Kontrolle des Titers

Um zu kontrollieren, ob und in welchem Umfang die stabilen Verpackungszelllinien Virus produzieren, werden an Tag 0 in einer 6-well Platte (Corning) NIH-3T3 Zellen ausgesät. Am folgenden Tag, wenn die Zellen zu ca 90% konfluent gewachsen sind, wird das Medium entfernt, 500 µl VCM mit 5 µg/ml Protaminsulfat vorsichtig auf die Zellen gegeben und diese wieder inkubiert. Nach 4 Stunden werden noch 2,5 ml Medium dazupipettiert, um den Zellen genug Nahrung zu geben und die Zellen weiter inkubiert. Am Tag 3 kann am FACSCalibur zwischen transduzierten und nicht-transduzierten Zellen unterschieden werden. Die stabilen Verpackungszelllinien können als gut im Sinne einer guten Virusproduktion angesehen werden, wenn 50% oder mehr der NIH 3T3 Zellen transfiziert sind. Sind deutlich weniger grün bzw. gelb fluoreszierend, kann man eine Einzelzellsortierung anschließen, wobei in jede Vertiefung einer 96-well Platte eine Zelle sortiert wird. Wenn diese Zellen sich entsprechend vermehrt haben, kann wiederum ein Test mit NIH 3T3 angeschlossen werden und auf diese Weise ein guter Klon gefunden werden.

3.1.6 Tiere und Tierhaltung

Spendermäuse

Als Spendermäuse wurden gesunde, acht bis zwölf Wochen alte weibliche und männliche (C57Bl/6Ly-Pep3b x C3H/HeJ) F1 (PepC3) verwendet.

Empfängermäuse

Als Empfängermäuse wurden gesunde, acht bis zwölf Wochen alte weibliche und männliche (C57Bl/6J x C3H/HeJ) F1 (B6C3) verwendet.

Tierhaltung

Alle Tiere wurden im Tierstall der GSF Großhadern gezüchtet und unter standardisierten Bedingungen gehalten. Die Raumtemperatur betrug 22± 2°C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50-60% und einem hell-dunkel-Zyklus von 12 Stunden.
Die Empfängermäuse wurden nach Geschlechtern getrennt, bis vier Wochen nach Versuchsbeginn in eine spezielle IVC (*engl. internal ventriculation cage*) Anlage mit sterilem Futter, sowie Ciprofloxacin (Ciprobay 400, Bayer, 20 mg/ 400 ml Trinkwasser) im ebenfalls autoklavierten Wasser verbracht, um das Infektionsrisiko so gering wie möglich zu halten. Nach vier Wochen wurden alle Mäuse in Typ 2 Makrolon Käfigen (26cm x20 cm x14 cm) gehalten und das Ciprobay abgesetzt. Die Besatzdichte lag bei 1 bis 5 Mäusen pro Käfig.

3.1.7 Colony-Forming Unit Spleen Assay (CFU-S)

Um den Effekt von AML1-ETO, FLT3-LM und der Kombination der beiden Mutationen auf primitive hämatopoetische Stammzellen zu testen, kann der Colony-Forming Unit Spleen Assay (CFU-S) herangezogen werden.
Zunächst wurde ca 4 Wochen alten Spendermäusen per i.v. Injektion 5 Flourouracil (5FU, medac, 150 mg/kg) verabreicht. 5 FU soll sich schnell teilende Zellen eliminieren und dadurch die Population der primitivsten hämatopoetischen Progenitorzellen vergrößern (Randall and Weissman, 1997). Das dadurch mit Progenitorzellen angereicherte Knochenmark der Spendermäuse wurde mit AML1-ETO und/oder FLT3-LM oder EGFP transfiziert, per FACS hoch gereinigt und definierte Anzahlen in letal bestrahlte Mäuse injiziert (Abb. 12). Nach 12 Tagen wurden diese Mäuse getötet und die Milz in Telleyesnickzkys Lösung gegeben. Anschließend wurden die makroskopisch sichtbaren Kolonien gezählt.

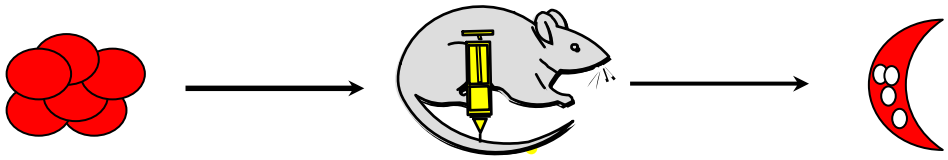


Abbildung 12: Der CFU-S Assay

3.1.8 Transplantationsmodell

Am Tag 0 wurde den Spendermäusen 5-FU (5 Flourouracil medac, 150 mg/kg) i.v. injiziert. Dadurch werden sich schnell teilende Zellen abgetötet und die Anzahl der frühen Vorläuferzellen erhöht (Randall and Weissman, 1997). Diese Mäuse wurden am Tag 4 getötet und das Knochenmark aus den langen Röhrenknochen gespült. Anschließend wurden die Zellen für 2 Tage in speziellem Medium (DMEM +15% FBS, P/S, 6ng/ml IL3, 10ng/ml IL6 und 100 ng/ml murines SCF) bei 37° C und 5% CO_2 kultiviert. In diesem Zeitraum werden die Stammzellen prästimuliert, um in den Zellzyklus zu kommen. Dies ist zum einen essentiell, weil sie sich teilen müssen, um bei den Empfängermäusen die Hämatopoese zu aktivieren und zum anderen, weil das Virus nicht in Zellen im Ruhezustand eindringen kann.

Am Tag 5 wurden die GP^+ E86 AML1-ETO und FLT3-LM Feeder Zellen bestrahlt. (4000 cgr mit ^{137}Cs γ-Strahlen). Je nach Titer wurden die einzelnen Zelllinien dabei anteilig gemischt (meist 30 % E86 AML1-ETO und 70 % FLT3-LM). Bei schlechtem Virustiter der E86 FLT3-LM wurde ganz auf diese Zellen verzichtet. In diesen Fällen wurden 100 % E86 AML1-ETO mit VCM von FLT3-LM (Virus containing medium, aus transienter Transfektion mit 293 T Zellen) kombiniert.

Am Tag 6 wurden die Knochenmarkzellen geerntet und zusammen mit frischem Medium, bzw. VCM auf die Feederzellen verbracht und gemeinsam mit diesen wieder inkubiert. Es wurde Protaminsulfat dazugegeben (Sigma, 5 µg/ml) was eine Verklumpung der viralen Partikel verhindert und dadurch die Effizienz der Transduktion erhöht.

Nach 2 Tagen auf dem Feeder wurden die Knochenmarkzellen am Tag 8 vorsichtig geerntet und wiederum 2 Tage in frischem Medium in Kultur gehalten, um den Zellen Zeit zu geben, das GFP respektive YFP zu exprimieren. Am Tag 10 wurden die Zellen wiederum geerntet und in speziellem FACS-Puffer zum Sortieren mit einem FACSVantage (Becton Dickinson, San Jose, USA) gebracht. Nach dem Sortieren nach GFP oder YFP positiv bzw. doppelt positiv oder negativ wurden die positiven Zellen oder eine definierte Mischung aus positiven und negativen Zellen in die mit 800 cgr bestrahlten Rezipienten Mäuse injiziert. Da eine gewisse Menge an Zellen (ca. 4x 10^5) nötig ist, um das Überleben der letal bestrahlen Mäuse zu gewährleisten, oft aber durch geringe Transduktionseffizienz nicht so viele positive Zellen sortiert werden können, werden nicht transduzierte Trägerzellen dazugemischt, um die Gesamtzahl an injizierten Zellen zu erhöhen. In diesen Experimenten wurden für AML1-ETO zwischen $3x10^5$ und $5x10^5$ GFP^+ Zellen injiziert und für FLT3-LM zwischen $7x10^4$ und $2x10^5$ nach YFP sortierte Zellen zusammen mit $3x10^5$ bis $1x10^6$ nicht transduzierten Trägerzellen. Um Mäuse zu erhalten, die beide Mutationen exprimieren, wurden Empfängertiere mit einer Mischung aus GFP^+/YFP^+ Zellen (von $4{,}4x10^4$ bis $5{,}5x10^4$) und nicht transduzierten Trägerzellen gespritzt. Die Empfängermäuse wurden wie unter 3.2.5.3 beschrieben im Tierstall der GSF Großhadern gehalten.

Ab Woche 8 wurden in ca. 4 wöchentlichem Abstand Blut und Knochenmark untersucht. Bei Nachweis einer Repopulation der Mäuse durch transduzierte Spenderzellen wurden mit dem erhaltenen Material *ex vivo* Versuche unternommen. Wenn die Mäuse krank wurden, wurden sie wie unter Punkt 3.2.10 getötet und Blut, Knochenmark und andere Organe wie unter Punkt 3.2.11 entnommen.

Diese Materialien wurden auch in ex vivo Versuchen eingesetzt, oder für einen späteren Zeitpunkt in flüssigem Stickstoff eingefroren.

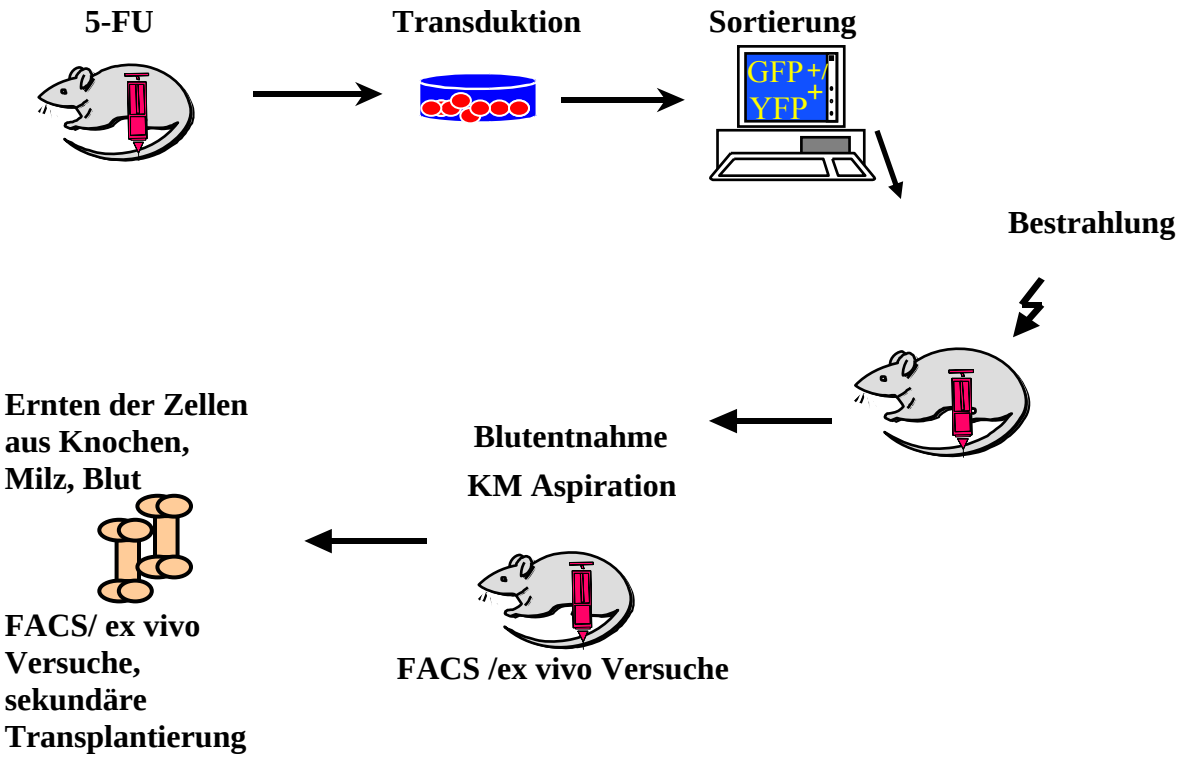


Abbildung 13: murines Knochenmarktransplantationsmodell

3.1.9 Blutgewinnung

Allen Mäusen im Versuch wurde in regelmäßigem Abstand von vier Wochen Vollblut entnommen, um das Engraftment zu kontrollieren, sowie den Gehalt an Leukozyten und Erythrozyten zu bestimmen. Es wurden Blutausstriche angefertigt, um die Leukozyten zu differenzieren und die Morphologie genauer zu betrachten.

Dazu wurden die Tiere in einer speziellen Vorrichtung fixiert und über einer der beiden Lateralvenen am Schwanz mit einer Skalpellklinge (Feather) geritzt. Das Blut wurde mit einer Heparinmikrovette (Sarstedt) aufgefange

3.1.10 Knochenmarkpunktion

In den Wochen 8, 12 und 16 nach Versuchsbeginn und teilweise noch weitere Male mit je vier Wochen Pause wurden den Versuchsmäusen Knochenmarkzellen entnommen. Dazu wurden die Tiere durch eine intraperitoneale Injektion (BD Microlance, 27 G) mit Avertin (2-2-2 Tribromoethanol, Aldrich, 0,4-0,75mg/g, zubereitet nach Anleitung des Herstellers) anästhesiert. Nach Eintreten der Toleranzphase wurde mittels einer 3 ml Spritze (Tyco Healthcare) und einer Kanüle (BD Microlance, 24G) aus einem Femur Knochenmark durch Unterdruck entnommen, sogleich in 3 ml DMEM mit 15% FBS gegeben und bis zur Verarbeitung auf Eis gelagert.

3.1.11 Töten der Tiere

Kranke Mäuse wurden mit CO_2 (Linde) getötet. Dabei wurde in einem kleinen Behälter mit Deckel zuerst das Gas angeflutet, damit sich eine Schicht CO_2 am Boden bilden konnte. Anschließend wurden die Tiere hineingesetzt und der Tod abgewartet.

3.1.12 Sektion

Zunächst wurde bei der soeben getöteten Maus mit einer heparinisierten Spritze das Blut direkt nach Eröffnung der Brusthöhle aus dem Herzen entnommen. Dann wurden die Organe genauer untersucht und Auffälligkeiten vermerkt, sowie ein Teil der Milz und das Knochenmark aus den langen Röhrenknochen für verschiedene Versuche entnommen. Andere Organe wie Nieren, Lymphknoten, Gehirn, Herz, sowie Anteile von Milz, Darm, Leber und Lunge wurden in Formalin fixiert und zur histologischen Untersuchung in das Pathologische Institut der GSF nach Neuherberg gesandt.

3.1.13 Durchflusszytometrische Immunphänotypisierung

Immunphänotypische Analysen von Einzelzellsuspensionen aus Zellen von Knochenmark, Milz und Blut wurden mittels Durchflusszytometrie angefertigt. Mit dieser Methode können Einzelzellen, die mit fluorochrommarkierten monoklonalen Antikörpern gefärbt

worden sind, identifiziert und die Expression von Antigenen untersucht werden. Dazu wurde ein FACSCalibur Zytometer (Becton Dickinson) verwendet. Die speziellen Photodioden des Gerätes registrieren das Streulicht und die Intensität der fluorochrommarkierten Zelle, die im konstanten Fluss durch eine Kanüle geführt und dort von einem Laserstrahl angeregt werden. Dadurch kann die Größe und Granularität der Zelle und die Oberflächenexpression von Antigenen bestimmt werden.
Die Zellen wurden wie folgt für die Analyse vorbereitet: ca 1x 10^5 Zellen wurden in ein spezielles FACS Röhrchen (BD, Falcon) verbracht. Die vorher nach Anleitung des Herstellers (BD Pharmingen) mit PBS (+ 2% FBS) verdünnten Antikörper wurden dazupipettiert und der Ansatz für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 2 x mit PBS +2% FBS gewaschen und schließlich in FACS Puffer (PBS +FBS2%+ Propidiumjodid 0,1%) aufgenommen und gemessen. Das Propidiumjodid (PJ) im FACS Puffer färbt tote Zellen an, so dass diese beim Messen ausgegrenzt werden können.
Es wurden Phycoerythrin (PE) markierte Sca-1, Gr-1, Ter-119, CD4 und Allophycocyanin (APC) markierte Mac-1, c-Kit, B220, CD8 Antikörper (alle Pharmingen) verwendet. PE liegt im Absorptionsbereich von 488nm und hat ein Emissionsmaximum bei 585nm, APC im Absorptionsbereich von 633nm bei einem Emissionsmaximum von 660nm.

3.1.14 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Expression von AML1-ETO und FLT3-LM in stabilen Verpackungszelllinien sowie Knochenmark, Milz und Blut wurde durch Polymerase-Ketten-Reaktion (*engl. Polymerase chain reaction,* PCR) nachgewiesen. Dafür wurde zunächst mit Trizol (GIBCO BRL) die RNA aus den Zellen isoliert und mit DNAse I behandelt, um die darin noch enthaltene genomische DNA zu entfernen. Dann wurde mit dem thermoScript RT-PCR System (alle Reagenzien Invitrogen) cDNA aus der RNA synthetisiert. Die AML1-ETO Primer wurden aus einer früheren Publikation übernommen (Elsasser et al., 2003). Sie sind so gewählt, dass der forward Primer in AML1 liegt und der reverse Primer in der Bruchpunkt Region des AML1-ETO. Die FLT3-LM Primer wurden so gewählt, dass die bei der ITD wiederholte Sequenz umschlossen wurde. Der Wildtyp kann nicht amplifiziert

werden, weil humanes und murines FLT3 nicht identisch sind. β2M wurde als Housekeeping Gen bei jeder Probe mitbestimmt. Die Alle Primersequenzen sind in Tabelle 5 aufgeführt. Die PCR Bedingungen sind der Tabelle 6 zu entnehmen.

Alle Primer wurden von Metabion AG, Martinsried, Deutschland synthetisiert.

Primer	Primersequenz
AML1-ETO primer forward	5'-ATG ACC TCA GGT TTG TCG GTC G-3'
AML1-ETO primer reverse	5'-TGA ACT GGT TCT TGG AGC CTC CT-3
FLT3-LM primer forward	5'GCA ATT TAG GTA TGA AAG CCA GC3'
FLT3-LM primer reverse	5'CTT TCA GCA TTT TGA CGG CAA CC3'
β2 M Primer forward	5'TGC TAT CCA GAA AAC CCC TC3'
β2 M Primer reverse	5'CGG CCA TAC TGT CAT GCT TA3'

Tabelle 5: Primersequenzen

	PCR Bedingungen A-E und FLT3-LM	PCR Bedingungen β2 M
Initiale Denaturierung	94°C 5`	94°C 5`
Denaturierung	94°C 1`	94°C 45“
Annealing	57°C 45“	57°C 30“
Elongation	72°C 1`	72°C 45“
Termination	72°C 5`, dann 4° C bis zur Entnahme der Probe	72°C 5`, dann 4° C bis zur Entnahme der Probe
Zyklen	35	25

Tabelle 6: PCR Bedingungen

3.1.15 Elektrophorese und Dokumentation

Um die DNA im Anschluss an die PCR sichtbar zu machen, wurde sie mittels Gelelektrophorese im elektrischen Feld aufgetrennt. Für die Durchführung wurde zunächst ein 1.5%iges Agarosegel mit Ethidiumbromid (Sigma) hergestellt. Dafür wurde die Agarose (Sigma) in 1x TAE Puffer durch Kochen in der Mikrowelle gelöst. Anschließend wurde in die etwas abgekühlte Flüssigkeit Ethidiumbromid gegeben und alles in eine mit einem entsprechenden Kamm versehene Elektrophoresekammer (PEQLAB GmbH) gegossen. Nach der Aushärtung des Gels wurde der Kamm entfernt und die Kammer mit TAE Puffer gefüllt, so dass das Gel komplett bedeckt war. Danach konnten die durch den Kamm gebildeten Geltaschen mit dem PCR Produkt befüllt werden. Als DNA Standard wurden 8 ml einer 100 bp DNA-Leiter (New England Biolabs) aufgetragen. Es wurde eine Spannung von 120 V angelegt und die Reaktionsansätze wurden in 60-80 Minuten

aufgetrennt. Nach Abschluss der Gelelektrophorese wurden die DNA Banden in einer UV Kammer sichtbar gemacht. Ethidiumbromid bindet an die DNA und kann nach deren Auftrennung die einzelnen Banden im UV-Licht sichtbar machen. Die Ergebnisse wurden fotografiert und dokumentiert.

3.1.16 Western Blot

Die Protein-Expression von AML1-ETO und FLT3-LM wurden durch Western Blot dokumentiert. Es wurde mit einem Standard Protokoll gearbeitet (Rawat et al. 2004). Zelluläres Protein aus je ca 5 x10^6 NIH 3T3 mit FLT3-LM und GP^+E86 Zellen mit AML1-ETO wurde mit 150µl RIPA Lysispuffer mit frisch hinzugefügten Proteaseinhibitoren extrahiert. Die Zellen mit RIPA Puffer wurden in ein Eppendorf-Hütchen transferiert und bei 4°C 30 Minuten durch Schwenken gemischt. Nach der Homogenisierung wurde die Probe bei 14000 UPM für 30 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand in ein neues Eppendorf Hütchen verbracht und entweder bei -80°C eingefroren oder sofort weiterverarbeitet.
Die Zelllysate wurden auf 12%igem SDS-page Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Membranen wurden mit einem anti-ETO Antikörper für AML1-ETO und mit einem anti-FLT3 Antikörper für FLT3-LM (beide Santa Cruz) versehen, um die Expression zu sehen. Danach wurden die Membranen mit Merrettich-Peroxidase markiertem anti-Kaninchen Antikörper inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Proteine nach Anleitung des Herstellers mittels eines ECL Kits visualisiert.

3.1.17 Southern Blot

Um die Integration der Mutationen in die DNA zu beweisen, wurden Southern Blots durchgeführt. Hierzu wurde genomische DNA aus Knochenmark und Milzen von kranken Mäusen nach Anleitung des Herstellers (Invitrogen, Karlsruhe) mit DNAzol Reagenz gewonnen. Der Southern Blot wurde nach Standard Protokollen durchgeführt (Sauvageau et al., 1997). DNA wurde mit *EcoRi* verdaut, das die provirale DNA einmal schneidet um ein Fragment zu erhalten, das spezifisch für die provirale Integration ist. Um die

vollständige Integration zu überprüfen, wurde die DNA mit *Nhe I* verdaut, das in den LTRs (Long Terminal Repeats) schneidet um das provirale Genom freizuschneiden. Nach der Verdauung wurde die DNA auf ein 0,7% Agarosegel mit 0,5% Ethidiumbromid geladen.

Nach der Elektrophorese wurde das Gel in 0,2% HCL getaucht um die DNA zu depurinieren und anschließend 45 Minuten in Denaturierungspuffer gegeben. Anschließend wurde die DNA durch Kapillarreaktion mittels 10x Transferpuffer auf eine zeta-Probe GT Membran transferiert. Die DNA wurde in einem UV linker bei 150 mjoule mit der Membran crossgelinkt. Als Probe wurde ein 700 bp GFP Fragment verwendet, das aus dem pEGFP-C1 Plasmid herausverdaut und mit α-^{32}P cCTP mit dem Megaprime DNA Markierungssystem markiert worden war. Die Probe wurde mit Microspin S-300 HR Säulen gereinigt. Die Hybridisierung mit dem α-^{32}P GFP fand über Nacht bei 62° C statt.

3.2 Ergebnisse

3.2.1 AML1-ETO tritt bei AML Patienten häufig zusammen mit aktivierenden Mutationen auf, die den Signaltransduktionsweg betreffen

Um genetische Veränderungen, welche gemeinsam mit dem *AML1-ETO* Fusionsgen in AML auftreten zu charakterisieren, analysierte das Leukämielabor des Universitätsklinikums der LMU München in Großhadern 135 AML1-ETO positive Patienten (93 männlich, 42 weiblich, Altersmedian 50,9 Jahre (15,8-89,1)) und suchte nach aktivierenden Mutationen, sowohl in den Rezeptortyrosinkinasen FLT3 und KIT, als auch in NRAS (Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog) (*KITD816, N-RAS* codon 12/13/61). Innerhalb der 135 Patienten waren 122 mit neu diagnostizierter AML, 4 mit erstem Rückfall und 13 von 135 waren klassifiziert als sekundäre AML nach Therapie von anderen Krankheiten. Bei 38 der Patienten (28,5%) wurden aktivierende Mutationen gefunden: Mutationen in den Rezeptortyrosinkinasen FLT3 oder c-KIT (zusammen 25 Patienten) oder in NRAS (13 Patienten). Im Gegensatz dazu wurden bei 87 untersuchten Proben keine MLL-PTD (Mixed Lineage Leukemia – Partial Tandem Duplication) Mutationen gefunden, welche für Klasse II Mutationen stehen würden und beispielhaft für Transkriptionsregulierung wären (Tabelle 7).

	Anzahl der analysierten Patienten	**Anzahl der Patienten mit Mutationen**
***FLT3*-LM**	135	11 (8.1 %)
***FLT3* D835**	135	3 (2.2 %)
C-KIT D816	135	11 (8.1 %)
NRAS codon 12/13/61	135	13 (9.6 %)
***FLT3*, KIT or NRAS**	135	38 (28.1%)
MLL-PTD	87	0

Tabelle 7: Genetische Veränderungen bei AML Patienten

3.2.2 Generierung von Mäusen mit Mutationen

Zunächst wurden durch transiente Transfektion von 293-T Zellen oder durch die Herstellung von stabilen Verpackungszelllinien ($GP^{+}E86$) als Grundlage der folgenden Experimente Viren produziert, die die entsprechenden Mutationen (AML1-ETO, FLT3-LM bzw. GFP zur Kontrolle) auf primäre Mauszellen übertragen sollen (siehe Material und Methoden). Mit diesen Viren wurden im Anschluss Knochenmarkzellen von mit 5-FU vorbehandelten Donormäusen transduziert, und diese schließlich in letal bestrahlte Empfängermäuse injiziert.

Die Empfängermäuse wurden wie unter 3.2.5.3 beschrieben im Tierstall der GSF Großhadern gehalten.

Nach 4 Wochen konnte zum ersten Mal Blut genommen werden (siehe 3.1.9), nach 8 Wochen zusätzlich Knochenmark (siehe 3.1.10). In den erhaltenen Zellen wurde per Durchflusszytometrie nach den gewünschten Mutationen, bzw. den sie repräsentierenden fluoreszierenden Proteinen gesucht. Als positive Mäuse gingen nach genauer Analyse durch FACS insgesamt 42 Mäuse in die Versuche ein. Es waren dies 12 Mäuse die nur GFP exprimierten und als Kontrolle dienten, 9 Mäuse die AML1-ETO exprimierten, 6 Mäuse mit der FLT3-Längenmutation, 10 Mäuse die beide Mutationen repräsentierten sowie 5 sekundär transplantierte Mäuse, die mit Zellen von primär erkrankten Mäusen injiziert worden waren.

3.2.3 Proteinnachweis mittels Western Blot

Um nachzuweisen, dass in den transduzierten Zellen die jeweiligen Mutationen nicht nur im Genom liegen, sondern auch als Proteine exprimiert werden, wurden Western Blots durchgeführt. Wie der Abbildung 14 zu entnehmen ist, konnten die Mutationen nachgewiesen werden: Im Fall der FLT3-Längenmutation (linke Seite) sind zwei Banden zu sehen, da FLT3 immer in einer glykosylierten und einer nicht glykosylierten Form vorliegt. Die als Kontrolle verwendeten $GP^{+}E86$ Zellen haben keine entsprechende Bande. Bei der Expression von AML1-ETO ist klar eine, dem Protein entsprechende Bande bei 94 kD zu erkennen, die nicht in der negativ Kontrolle vorhanden ist.

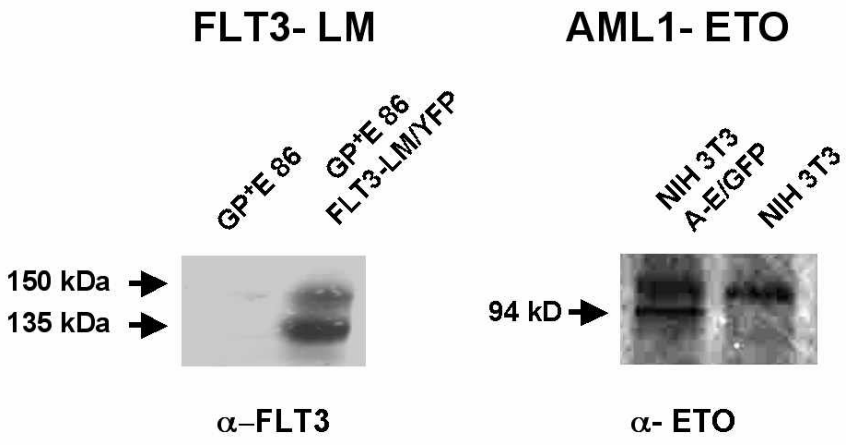


Abbildung 14: Western Blot von Extrakten aus NIH 3T3 und $GP^{+}E86$ Zellen mit den jeweiligen Mutationen; das Molekulargewicht und die verwendeten Antikörper sind angezeigt

3.2.4 Southern Blot

Die Analyse der Klonalität der Krankheit durch Analyse der genomischen DNA mittels Southern Blot zeigt verschiedene Intensitäten und Muster von proviralen Signalen in Knochenmark und Milz und weist folgerichtig auf die Oligoklonalität der Krankheit hin (Abb. 15).

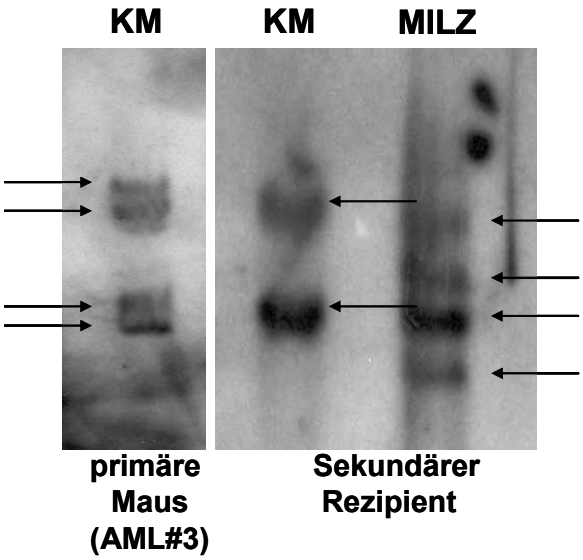


Abbildung 15: Southern Blot der DNA (Knochenmark) von Maus AML#3 (links) und eines sekundären Rezipienten (Knochenmark und Milz); Beispiele von Signalen mit unterschiedlicher Intensität sind durch Pfeile gekennzeichnet

3.2.5 CFU-S Assay

Zunächst wurde der CFU-S Assay (Colony forming Units Spleen) durchgeführt. Hier zeigte sich, dass die konstitutive Expression von FLT3-LM (n=14) in diesem Versuch keinen Effekt auf die kurzzeit-repopulierenden Stammzellen hatte, keine Kolonien waren sichtbar. Im Gegensatz dazu erhöhte AML1-ETO (n=9) das CFU-S Aufkommen um das 3-fache im Vergleich zur GFP Kontrolle (n=8) ($p<0,008$). Die gemeinsame Expression von AML1-ETO und FLT3-LM (n=4) induzierte einen 10, 9 -fachen Anstieg der gezählten Kolonien im Vergleich zur GFP Kontrolle ($p<0,0004$) und sogar einen 18 -fachen Anstieg verglichen mit den Milzen von FLT3-LM Mäusen ($p<0,00001$). Im Vergleich von doppelt positiven Zellen zu AML1-ETO alleine exprimierenden Zellen ist ein 3,6 –facher Anstieg der Kolonien zu verzeichnen ($p< 0,003$) (Abb. 16 und 17).

Abbildung 16: von links nach rechts: Milz einer FLT3-LM Maus (150000 Zellen injiziert, ohne Kolonien), Milz einer AML1-ETO Maus (5000 Zellen injiziert, 3 Kolonien sichtbar), Milz einer doppelt positiven Maus (2500 Zellen injiziert, 5 Kolonien sichtbar)

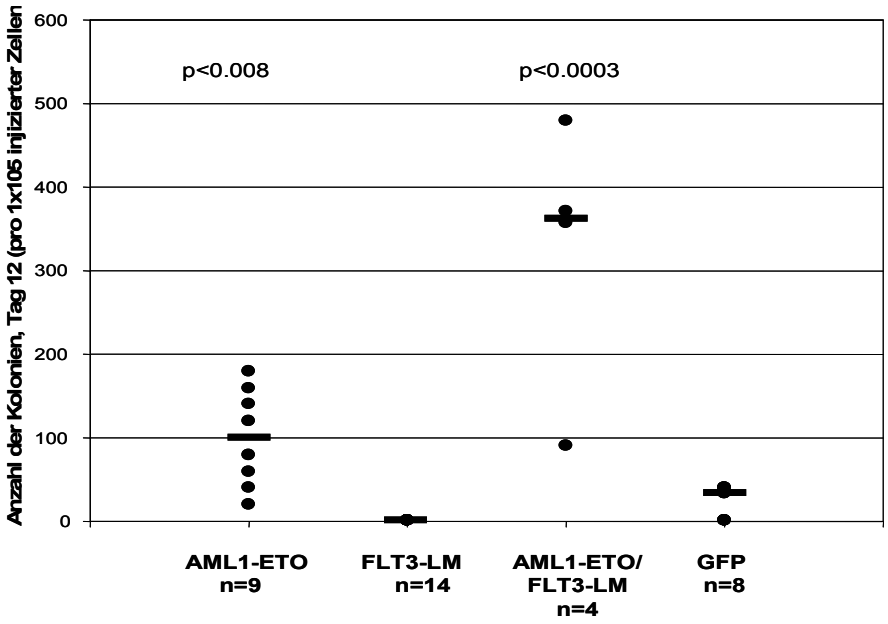


Abbildung 17: CFU-S Häufigkeit pro $1x10^5$ ursprünglicher, mit den einzelnen retroviralen Konstrukten infizierter KM Zellen. Der Median ist als Linie dargestellt. p nimmt Bezug auf GFP

3.2.6 Repopulation der Mäuse

Um zu ermitteln, ob AML1-ETO auch *in vivo* zusammen mit FLT3-LM einen Effekt zeigt, wurde murines Knochenmarkt retroviral transduziert und in letal bestrahlte Empfängermäuse injiziert (siehe Material und Methoden).

Nach 8 und 12 Wochen wurde den Mäusen unter Narkose Blut und Knochenmark entnommen. Bei den gewonnenen Proben wurde zunächst die Repopulation kontrolliert, also wie viel Prozent der kernhaltigen Zellen das per FACS detektierbare GFP oder YFP tragen. Dabei konnte man feststellen, dass die Mäuse, die nur mit AML1-ETO oder mit dem leeren GFP Vektor infiziert waren, bei beiden Zeitpunkten eine ähnliche Repopulation zeigten (Abb. 18). Die mit der FLT3-LM infizierten Mäuse waren insgesamt schlechter repopuliert, nach 12 Wochen sogar wieder schlechter (Median=2,11) als nach 8 Wochen (Median=9,8). Im Vergleich zu diesen Daten war interessant, dass die Mäuse, bei denen beide Mutationen integriert waren, bei Woche 8 zunächst nur eine mäßige Repopulation zeigten (Median=29,1), während sie 4 Wochen später einen sehr hohen Prozentsatz von GFP/YFP positiven Zellen aufwiesen (Median = 84).

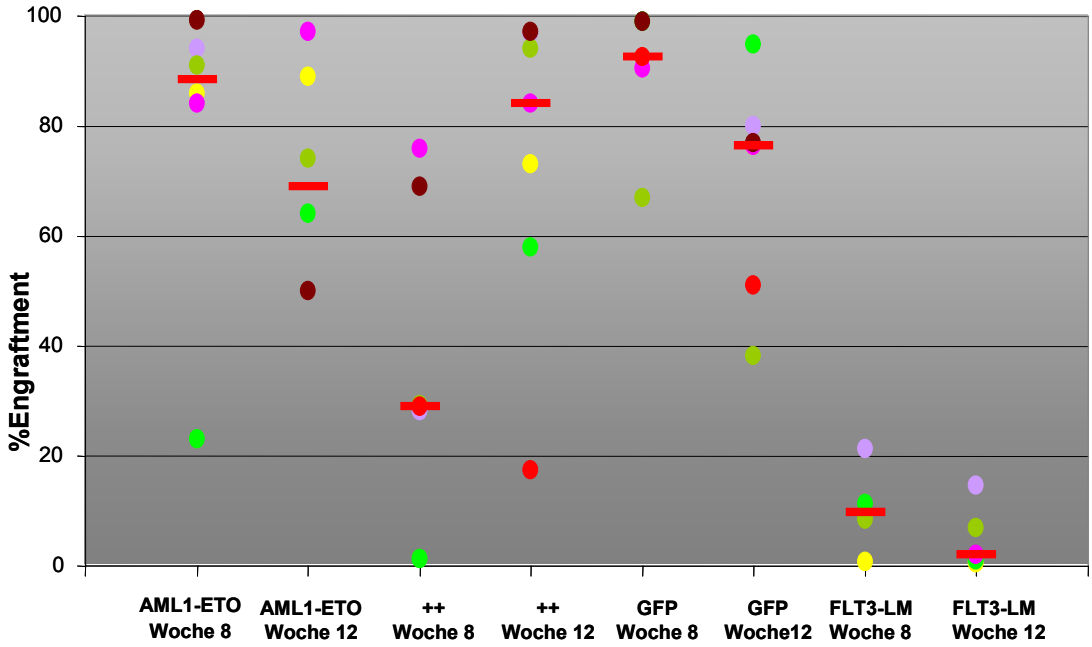


Abbildung 18: Repopulation der Versuchsmäuse im Knochenmark nach 8 und 12 Wochen.

3.2.7 Überleben der Mäuse

Bei allen Mäusen im Versuch wurde der Todestag notiert und die Lebensdauer vom Tage der Injektion mit modifizierten Zellen bis zum Tod errechnet. Der Tod wurde in den meisten Fällen durch Euthanasie herbeigeführt, wenn deutliche Anzeichen einer Erkrankung (Abmagerung, Bewegungsunlust, Dyspnoe) zu sehen waren. Nur in vereinzelten Fällen trat der Tod natürlich ein.

Wie in der Abbildung 19 zu sehen ist, waren bei den Kontrollmäusen (AML1-ETO(n=9), FLT3-LM (n=6) und EGFP (n=12) alleine) im Beobachtungszeitraum (maximal 20,6 Monate) keine Fälle von Leukämie aufgetreten. Im Vergleich dazu sind alle repopulierten Mäuse, die mit beiden Mutationen transplantiert worden waren (n=10) an Leukämie erkrankt und in einem Zeitraum von 84 bis 612 Tagen verstorben (Median =167).

Die mit Knochenmarkzellen von Maus AML#3 (n=3) und Maus AML#4 (n=2) sekundär transplantieren Mäuse starben an AML in einem Zeitraum von 57 bis 106 Tagen (Median = 68).

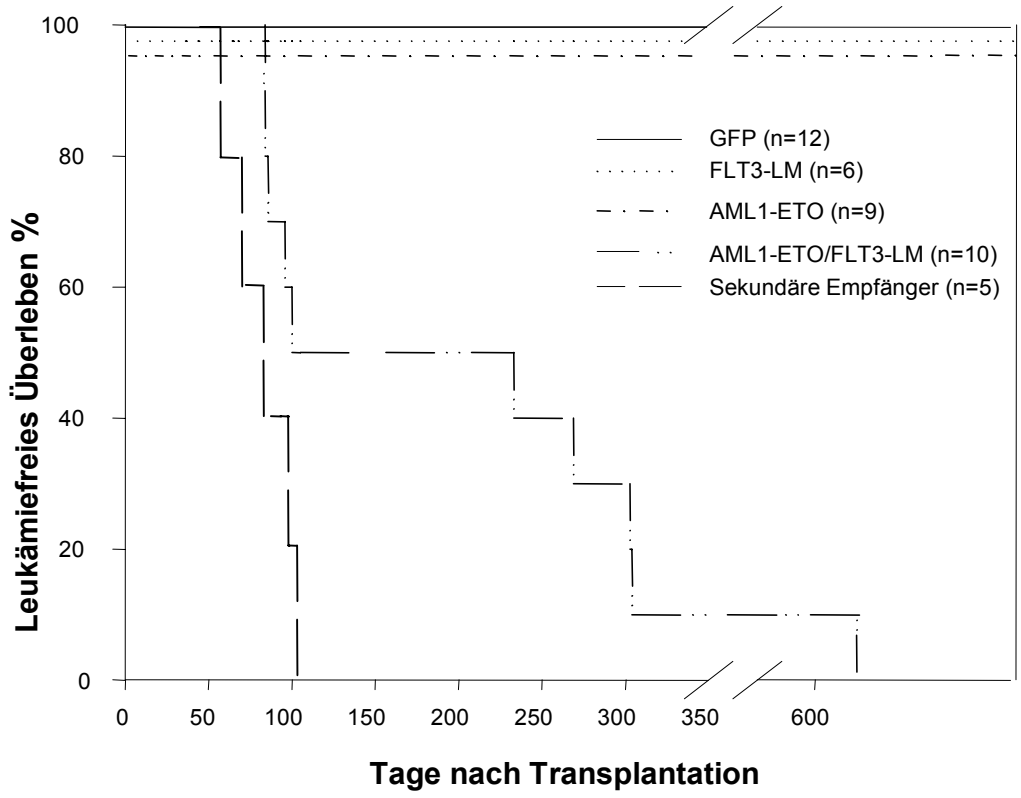


Abbildung 19: Überlebenskurve der Versuchsmäuse

3.2.8 Nachweis der Repopulation

Nachweis der Repopulation per Durchflusszytometrie

Um zu sehen, ob die aus den Mäusen gewonnenen Zellen die Mutationen tragen, wurden sie mit Propidiumjodid gefärbt und anschließend am FACSCalibur oder FACSVantage (beide Becton Dickinson, San Jose, USA) analysiert.
Der FACSCalibur kann nicht zwischen gelber und grüner Fluoreszenz unterscheiden, alle negativen Zellen fallen in den linken unteren Bereich, die GFP und/oder YFP positiven Zellen fallen in den unteren, rechten Bereich (Abbildung 20). Beim FACSVantage zeigen sich nicht transduzierte Zellen auch in der linken unteren Ecke, Zellen die AML1-ETO (mit GFP gekoppelt) exprimieren in der rechten unteren Ecke, Zellen, die FLT3-LM tragen (mit YFP gekoppelt) in der linken oberen und Zellen die beide Mutationen tragen im rechten oberen Bereich (Abbildung 21). So zeigte sich bei Analysen ex vivo in Blut, Knochenmarkaspiraten oder nach dem Tod zusätzlich bei Milzzellen, dass alle in die Statistik eingehenden Mäuse Zellen hatten, die die Mutationen trugen. Beispielhaft sollen die Abbildungen 20 (Maus ALL #1) und 21 (Maus AML #2) sein.

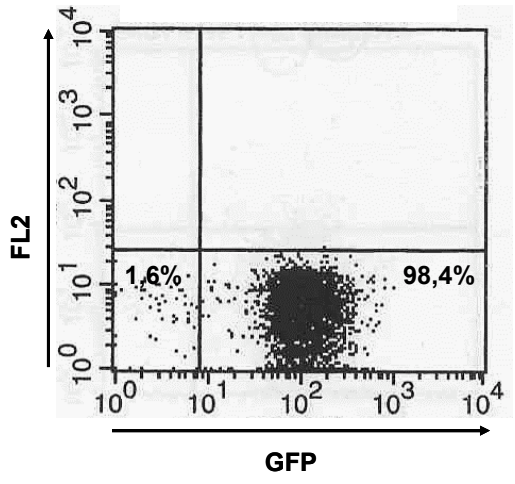


Abbildung 20: Knochenmarkzellen von Maus ALL#1, analysiert am FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, USA) transduzierte Zellen zeigen sich rechts der vertikalen Linie

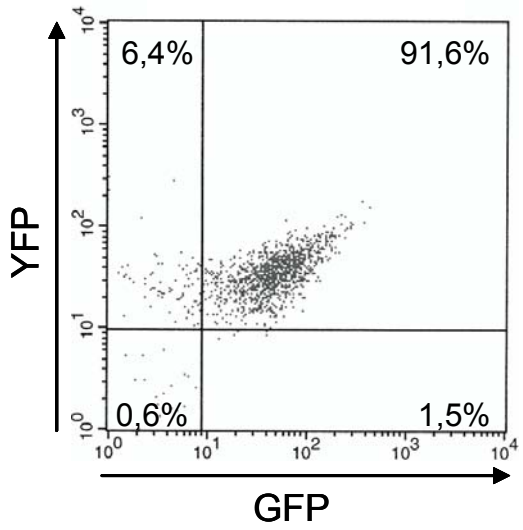


Abbildung 21: Knochenmarkzellen von Maus AML#2, analysiert am FACSVantage (Becton Dickinson, San Jose, USA); transduzierte Zellen zeigen sich rechts und oberhalb der vertikalen und horizontalen Linien

Nachweis der Repopulation durch PCR

Eine zusätzliche Methode, um das Vorhandensein der Mutationen in Mäusezellen zu überprüfen, stellt die Polymerasekettenreaktion dar. In der Abbildung 22 ist es am Beispiel von Maus AML#1 dargestellt: in der linken Abbildung wurde eine PCR mit Primern für AML1-ETO durchgeführt, rechts für FLT3-LM. Zu sehen sind jeweils Milz, Knochenmark und Blut (PB), sowie positiv Kontrollen (GP^+ E86 mit der entsprechenden Mutation sowie die Plasmide) und negativ Kontrollen (GP^+ E86 mit der jeweils anderen Mutation und eine Wasserkontrolle). Die Zellen aus den einzelnen Mausgeweben tragen offensichtlich die entsprechenden Mutationen, wie die Banden zeigen, die entsprechend der jeweils links aufgetragenen Leiter die richtigen Größen aufweisen.

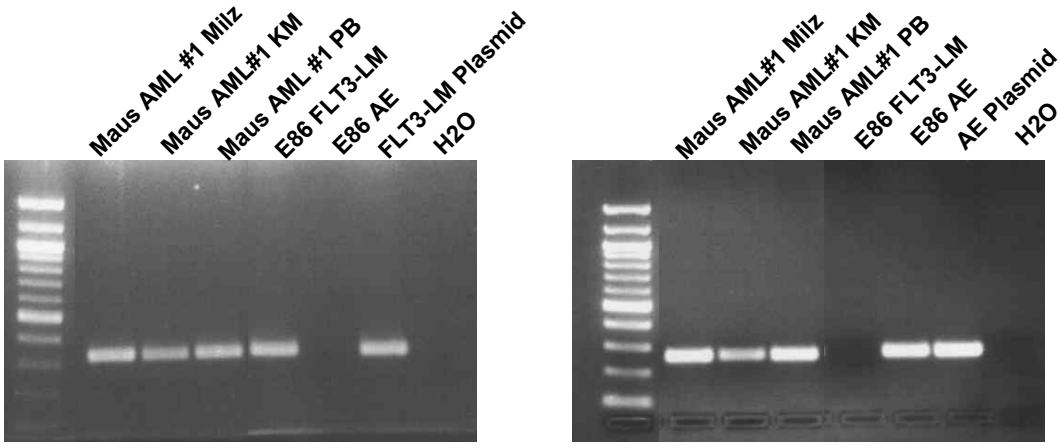


Abbildung 22: PCR von Maus AML#1. Km: Knochenmark; PB: periphäres Blut;

3.2.9 Die durch Kombination von AML1-ETO und FLT3-ITD verursachte Krankheit ist retransplantierbar

Knochenmarkzellen von Maus AML#3 (AML mit Mastzellbeteiligung) und AML#4 wurden in letal bestrahlte Empfängermäuse injiziert. Nach 57 bis 106 Tagen verstarben diese Mäuse (n= 5) mit den Symptomen Dyspnoe, Apathie und Lethargie (Abb.19). Genauere Untersuchungen mittels Durchflusszytometrie und morphologischer Analyse am Mikroskop zeigten, dass diese Mäuse die Genmutationen exprimierten und an akuter Leukämie (im Fall von Donormaus AML#3 auch wieder mit Mastzellbeteiligung) erkrankt waren.

3.2.10 Leukozyten- und Erythrozytenzahl

Bei allen erkrankten Tieren (n=10) und den Kontrollmäusen wurden in den Wochen 8, 12, 16 und zum Zeitpunkt des Todes, weiße (white blood cell count, WBC) und rote Blutkörperchen (red blood cell count, RBC) gezählt (Tabelle 8). Bezüglich der Erythrozyten kann gesagt werden, dass sowohl die Mäuse mit AML1-ETO (n=9) alleine als auch die Mäuse mit FLT3-LM (n=6) alleine keine Abweichung zu den GFP Kontrollmäusen (n= 12) zeigen. Bei den Mäusen mit beiden Mutationen zeigt sich im finalen Stadium der Krankheit eine gering ausgeprägte Anämie mit einer 43%igen Reduktion der Erythrozyten im Vergleich zur GFP Kontrolle. Bei 4 der 10 erkrankten Mäuse konnte eine ausgeprägte Leukozytose mit bis zu 430 x 10^6 Zellen/ml (23 -430 x 10^6; Median:4,33 x 10^7) im Vergleich zur GFP Kontrolle festgestellt werden (Median: 6,3 x 10^6) (p= 0,17). Bei den anderen erkrankten Mäusen liegen 4 im Normbereich (wenn auch teilweise an der oberen bzw. unteren Grenze) und 2 zeigen Leukozytopenie (Tab. 8).

	RBC/ml	WBC
	x 109	x 106
GFP	4,8	7,6
GFP	6,4	8,1
GFP	7	5
GFP	5,4	9
GFP	5,6	4,5
GFP	7,25	3,5
AML1-ETO	6	13
AML1-ETO	3,1	15
AML1-ETO	5,7	6,9
AML1-ETO	5	7,6
AML1-ETO	5,9	7,5
FLT3-LM	4,5	10
FLT3-LM	4,25	13
FLT3-LM	6,6	8,3
AML #1	n	23
AML #2	0,85	26,5
AML #3	1,7	12,5
AML #4	4	2
AML #5	2,6	10
AML #6	2,6	2,5
ALL #1	n	430
ALL #2	4,4	3,3
ALL #3	7,7	7,2
ALL #4	3,8	60

Tabelle 8, Seite 51: RBC (red blood cell count) und WBC (white blood cell count), bei GFP, AML1-ETO und FLT3-LM aus Woche 12 nach der Transplantation, bei den erkrankten Tieren am Todestag

3.2.11 Milzgewicht und Milzgröße

Bei Kontrolltieren sowie bei leukämischen Tieren (n=10) wurden die nach dem Tod entnommenen Milzen gewogen und vermessen (Tabelle 9). Bei AML1-ETO Tieren (n=5) wurden diese Untersuchungen nach dem natürlichen Tod vorgenommen, je eine Maus mit GFP und FLT3-LM wurde in der Woche 12 nach der Transplantation getötet, um Vergleichswerte zu den in der Woche 12 gestorbenen leukämischen Mäusen zu erhalten.
Anhand der Daten ist zu sehen, dass 9 der erkrankten Tiere ein höheres Milzgewicht hatten (Median 455mg) als die AML1-ETO Kontrolltiere (Median 82mg) (p= 0,012). Bei einer Maus wurde die Milz nicht gewogen. Auch die Ausmaße der Organe waren bei den entsprechenden leukämischen Mäusen erhöht (Tabelle 9 und Abb. 23)

	Milzgröße	**Milzgewicht**
	(mm)	**(mg)**
GFP	14x4	51
AML1-ETO	13x3,5	63
AML1-ETO	14x4	60
AML1-ETO	14x4	82
AML1-ETO	13x4	65
AML1-ETO	16x5	117
FLT3-LM	15x4	95
AML #1	27x7	600
AML#2	19x6	166
AML#3	14x4	118
AML#4	28x9	650
AML#5	15x3	200
AML#6	28x10	1400
ALL#1	24x9	572
ALL#2	21x7	270
ALL#3	12x4	na
ALL#4	21x6	310

Tabelle 9: Milzgröße und Milzgewicht von Versuchsmäusen; na: nicht analysiert

a

b

Abbildung 23 a: Milz einer GFP Kontrollmaus, Woche 44 nach Versuchsbeginn,
b: Milz von Maus AML#4

3.2.12 Die Koexpression von AML1-ETO und FLT3-LM verursacht sowohl eine akute myeloische als auch eine akute lymphatische Leukämie

Morphologie

Morphologische Analysen von Blutausstrichen kranker Mäuse zeigten zirkulierende Blasten bei allen Tieren. Vier der 10 erkrankten Tiere zeigten eine lymphatische Morphologie dieser Zellen (Abb. 24 a und b), während das Bild bei sechs Mäusen durch myeloische Blasten charakterisiert wurde (Tabelle 10, Abb. 24c). Der Anteil der zirkulierenden Blasten an den gesamten weißen Blutkörperchen war in den Mäusen mit akuter lymphatischer Leukämie sehr hoch mit 60 bis 95%, und bei Tieren die an akuter myeloischer Leukämie litten, 20 bis 75%.
In zwei der sechs Mäuse mit AML (Maus AML#2 und #3) war die Blastenpopulation von

einer einer Mastzellpopulation mit feiner metachromatischer Granulation begleitet (24c und d). Das Knochenmark und die Milz waren mit bis zu 80 % Blasten in AML Mäusen infiltriert und mit bis zu 85 bzw 95% in ALL Mäusen (Tabelle 10 und Abb. 24).

Mäuse	%Blasten im Knochenmark	% Blasten in Milz	% Blasten in Blut
GFP	1	0	0
GFP	0	0	0
GFP	2	0	0
AML1-ETO	8	0	0
AML1-ETO	11	0	0
AML1-ETO	2	0	0
AML1-ETO	14	0	0
FLT3-LM	4	0	0
FLT3-LM	2	0	0
FLT3-LM	1	0	0
AML#1	80	52	20
AML#2	48	80	75
AML#3	20	50	25
AML#4	38	62	30
AML#5	24	76	38
AML#6	27	55	78
ALL#1	80	22	60
ALL#2	85	43	62
ALL#3	85	20	*95*
ALL#4	40	95	60

Tabelle 10: Prozentsatz der mikroskopisch gezählten Blasten innerhalb der kompletten Zellpopulation

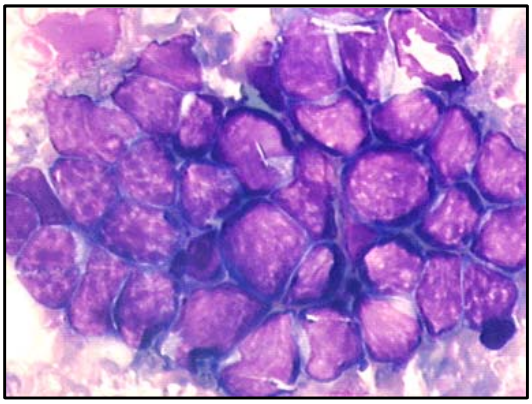


Abbildung 24a: Cytospin Blut, Maus ALL#4, T-Zellleukämie, lymphatische Blasten; 1000 x

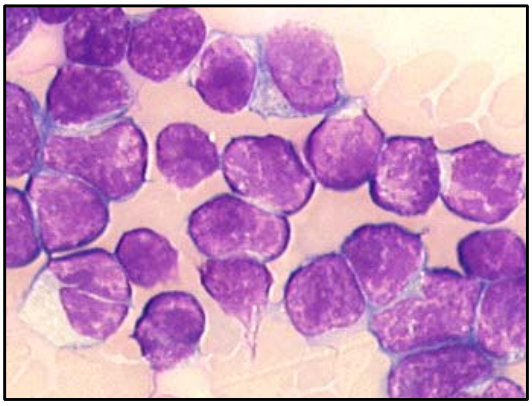


Abbildung 24b: Blutausstrich, Maus ALL#1, B-Zellleukämie, lymphatische Blasten in der Fahne des Ausstriches; 1000 x

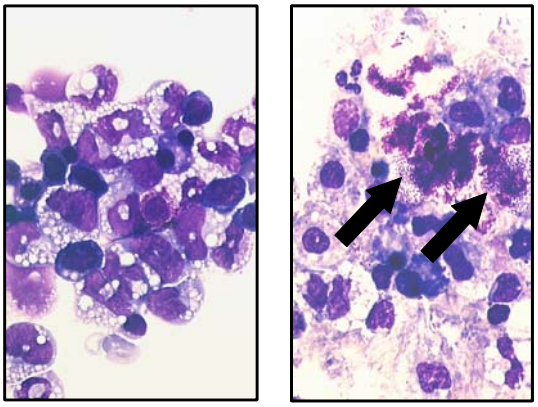


Abbildung 24c links: Cytospin Knochenmark Maus AML#14, AML mit Mastzellbeteiligung; 630 x

rechts: Cytospin Blut Maus AML#2, AML mit Mastzellbeteiligung, Mastzellen mit Pfeilen markiert; 630 x

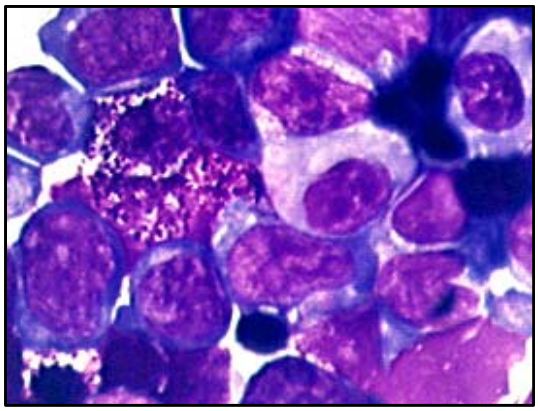


Abbildung 24d: Cytospin Milz Maus AML#13, AML mit Mastzellbeteiligung; 1300x

Durchflusszytometrie

Um den Immunphänotyp der leukämischen Population genauer zu charakterisieren, wurden durchflusszytometrische Analysen durchgeführt. Sechs Tiere litten an AML mit Gr1 und Mac1 (Marker für differenzierte myeloische Zellen) positiven Populationen im transduzierten Anteil der Zellen (Mediane 41,1 respektive 26,7%), die auch Sca1 (20,5-72,9%, Median 56%), einen Marker für sehr frühe Zellen, koexprimierten. Drei Mäuse litten an ALL mit 90,4% (85-97%) Zellen, die B220, ein Antigen, das B-Zellen tragen, exprimierten. Diesen fehlten fast völlig die myeloischen Antigene (Gr1: 1,5% (0,4-2,3%); Mac1: 1,7% (1,4-1-9%)). Eine Maus entwickelte eine T-Zellleukämie mit einer Koexpression innerhalb der transduzierten Zellen der T-Zellmarker CD4 (Antigen auf Helferzellen) und CD8 (Antigen auf zytotoxischen T-Zellen) (99% $CD8^+$ und 86% $CD4^+$) mit Sca-1 in 76% aller Zellen (Abb 25). Auch hier waren keine myeloischen Antigene vorhanden.

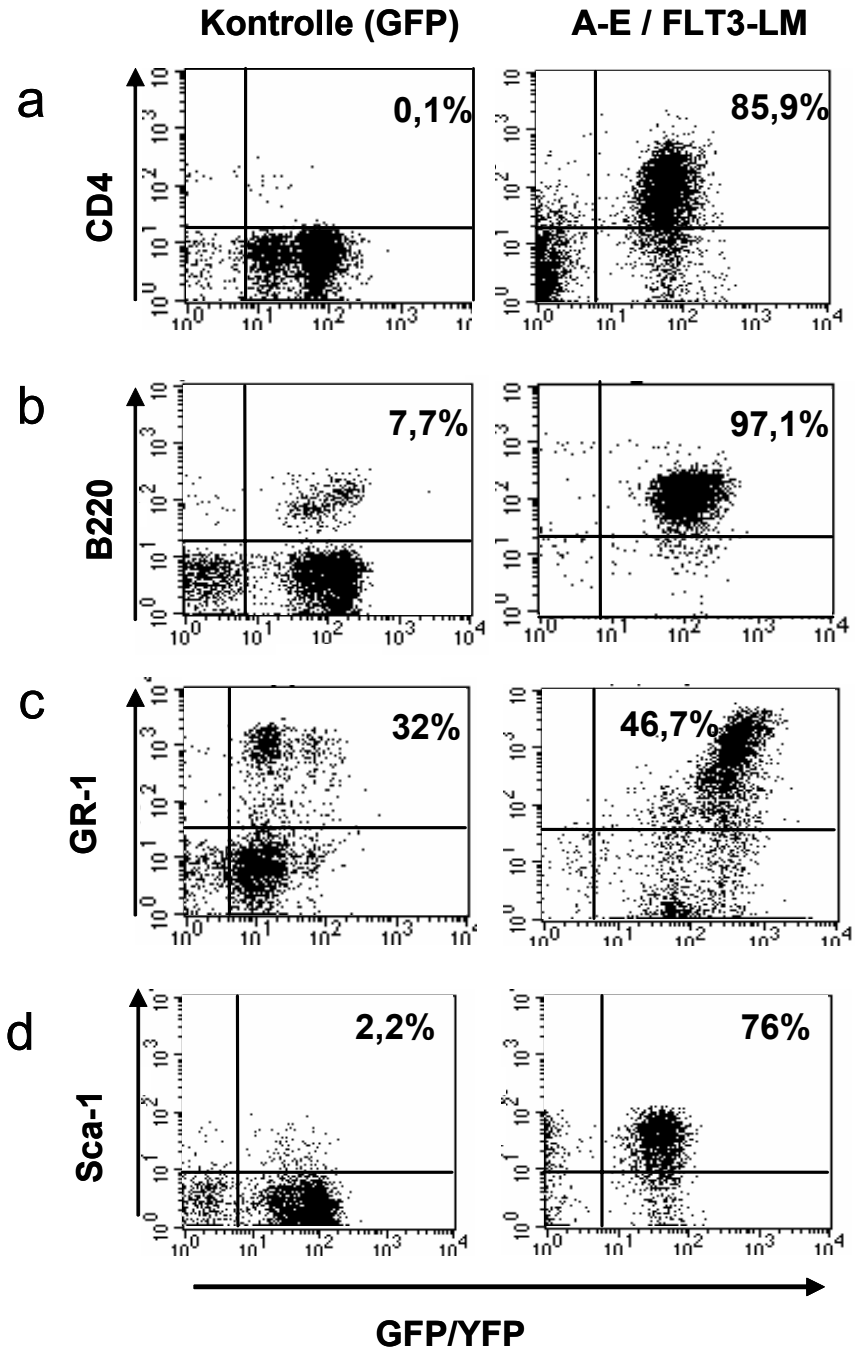


Abbildung 25: Immunphänotypische Analyse mit myeloischen (GR-1), lymphatischen (B220, CD4) und Stammzellen markierenden Antikörpern: Repräsentative FACS-Profile von Knochenmarkzellen aus leukämischen Mäusen im Vergleich mit GFP Kontrolltieren. Der Prozentsatz an Zellen, die für GFP/YFP und den entsprechenden Antikörper positiv sind, ist eingetragen. (a: Maus ALL#4; b: Maus ALL#1; c: Maus AML#1; d: Maus ALL#4)

3.2.13 Koexpression myeloischer mit lymphatischen Antigenen

Interessanterweise konnte in 4 der sechs Tiere mit AML eine Koexpression der myeloischen Antigene mit CD4 gefunden werden (20,6-31,9%, Median 29,1%). Eine Analyse von humanen AML1-ETO positiven AML Proben, durchgeführt durch das Leukämielabor des Universitätsklinikums der LMU München in Großhadern, zeigte, dass auch hier regelmäßig lymphatische Antigene koexprimiert werden : 17 von 52 Patienten (32,7%) waren positiv für CD4 und 39 von 59 Patienten (78%) waren positiv für CD3 (T-Zellmarker). Weiterhin exprimierten 59 % den NK Zell-Marker CD56, 31 von 52 Patienten (59.6 %) das B-Zellantigen CD19 und die B-Zell-Marker cyCD22 und cyCD79a wurden von 27 von 52 Patienten (51.9 %) und 38 von 39 Patienten (97.4 %) respektive exprimiert (Abbildung 26).

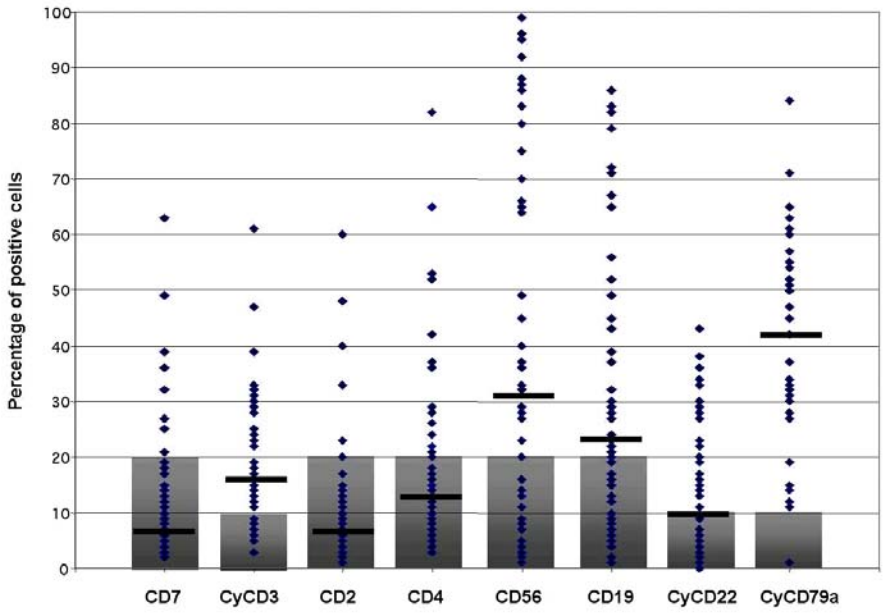


Abbildung 26: durch Immunphänotypisierung bestimmte Expression von lymphatischen Antigenen auf 52 *AML1-ETO* positiven AML Patientenproben. Die Proben wurden als negativ für zytoplasmatische Antigene definiert, wenn weniger als 10 % der Zellen mit Antikörper gefärbt werden konnten und als negativ für die Expression von Oberflächenantigenen, wenn weniger als 20 % der Zellen mit Antikörper gefärbt wurden (schattierte Bereiche).

3.2.14 Histopathologie

Von Organen dreier verschiedener Mäuse mit AML wurden nach Fixierung in Formalin histologische Gewebsschnitte angefertigt und mit diversen Antikörpern gefärbt.
In Abbildung 27 sind Leber und Milzgewebe von Maus AML#1 zu sehen. Die normale Architektur der Milz ist aufgrund einer Anhäufung von neoplastischen Infiltrationen gestört, was hauptsächlich die rote Pulpa betrifft. Die Hämatoxylin-Eosin Färbung zeigt, dass die Infiltrationen vor allem aus unreifen Zellen mit großen, rund bis unregelmäßig geformten Zellkernen, blastärem, offenem Chromatin und ein bis drei Nucleoli bestehen. Zwischen diesen Zellen sind reife Granulozyten, Megakaryozyten und erythrozytäre Zellen in allen Reifungsstadien zu finden. Die weiße Pulpa ist unauffällig.
Die Leber ist hauptsächlich in den Portalfeldern infiltriert, jedoch gibt es auch sinusoidale Infiltration. Es wurden auch in der Milz verschiedene immunhistochemische Analysen durchgeführt: der B220 Antikörper zeigt eine B-Zellpopulation, eine Färbung mit CD3 zeigt, dass praktisch keine T-Zellen in der Milz vorhanden sind (ohne Abbildung). Die Färbung mit Myeloperoxidase (MPO) zeigt in Milz und Leber viele positive Zellen, was auf myeloische Infiltration hinweist. Die Naphthol-AS-D-Chlorazetatesterase (CAE) Färbung verdeutlicht, dass es sich bei den unreifen Zellen um Myeloblasten gemischt mit myeloischen Vorläuferzellen in verschiedenen Reifestadien handelt.
Bei Abbildung 28 handelt es sich um histologische Bilder von Maus AML#3 (a-f) und einer sekundär mit Zellen von dieser Primärmaus retransplantierten Maus (g-i).
Auch hier ist eine Vielzahl der Zellen MPO positiv (ohne Abb.). Die Giemsa Färbung (c, f, i) zeigt die Anwesenheit von metachromatischen Granula (markiert durch einen Pfeil) ähnlich solcher wie sie in Mastzellen oder basophilen Zellen vorkommen. Um diese Zellen genauer zu charakterisieren, wurden Schnitte mit Mastzelltryptase und CD117 gefärbt. In beiden Mäusen war die Färbung für Mastzelltryptase deutlich positiv in allen Geweben.
Auch Maus AML#2 wurde untersucht, hier ergaben sich ähnliche Befunde wie bei Maus AML#1, zusätzlich waren Darm und Lymphknoten eingeschickt worden, auch sie waren infiltriert durch leukämische Zellen (ohne Abb.)

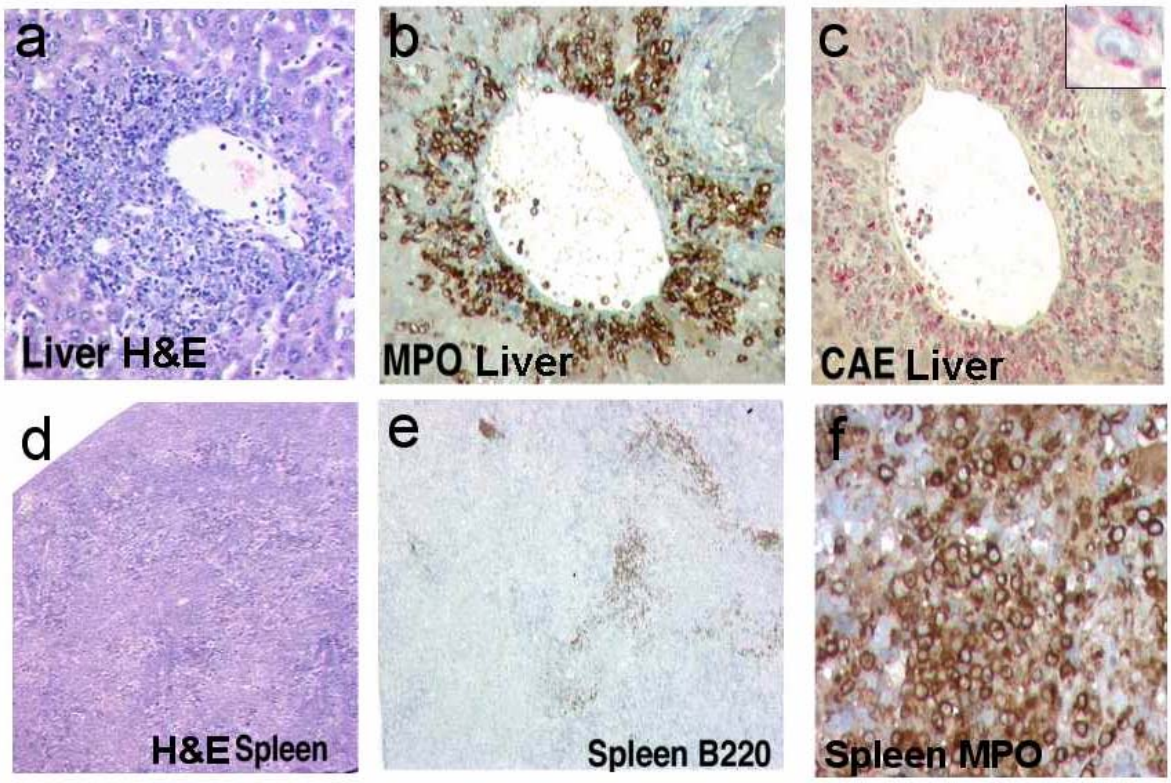


Abbildung 27: histologische Bilder von Maus AML#1; Vergrösserungen: a-c: 200 x, (Einfügung in c: 1000 x); d, e: 25 x; f: 400 x. MPO: Myeloperoxydase; CAE: Naphthol-AS-D-Chlorazetatesterase

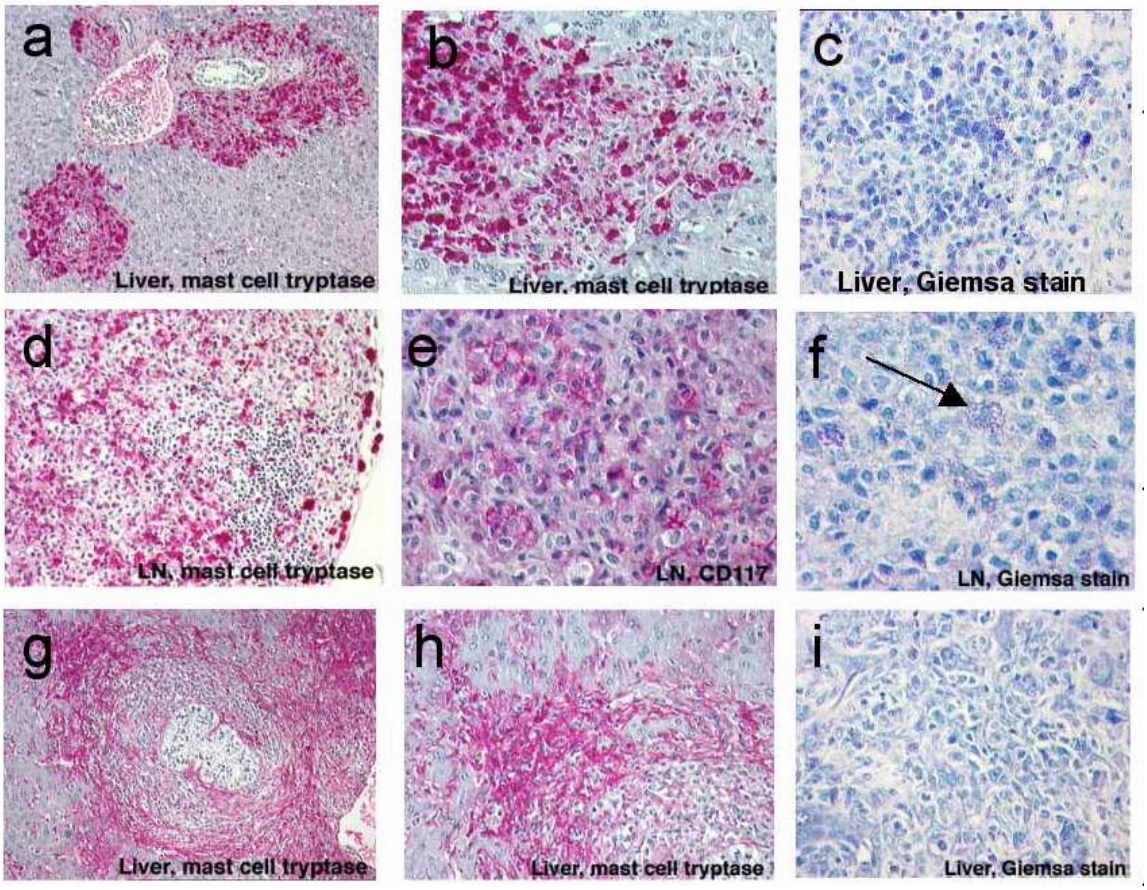


Abbildung 28: histologische Bilder von Maus AML#3 (AML mit dominanter Mastzell Population) (a-f) und einer sekundären Maus (g-i); Vergrößerungen: a, g: 100 x; b, d, h: 200 x; c, e, i: 400 x; f: 600 x; Mastzelle mit metachromatischer Granulation in f mit Pfeil markiert. M PO: Myeloperoxydase; CAE: Naphthol-AS-D-Chlorazetatesterase

4. DISKUSSION

4.1. Die Expression von AML1-ETO alleine ist nicht in der Lage Leukämie auszulösen

Die Translokation t(8;21) (q22; q22), aus der das Fusionsgen AML1-ETO hervorgeht, ist eine der häufigsten chromosomalen Translokationen, die in 12% aller AML Fälle und in bis zu 40% der FAB-M2 AML vorkommt (Downing, 1999). Die Translokation betrifft AML1 (RUNX1), ein Mitglied der RUNX Familie, welche sich durch eine DNA bindende Domäne (Runt Domäne am aminoterminalen Ende) auszeichnet, die auch im Fusionsgen vorhanden ist (Peterson and Zhang, 2004). Diese Domäne ist wichtig, um an die DNA zu binden und AML1 mit CBFβ, der nicht DNA bindenden Untereinheit des Komplexes zu heterodimerisieren. Zudem konnte gezeigt werden, dass der AML1/CBFβ Komplex ein Schlüsselregulator der definitiven Hämatopoese ist und der Verlust eines dieser Gene mit dem kompletten Verlust der definitiven hämatopoetischen Stammzellen einhergeht (Wang et al., 1996).

Obwohl die genauen Mechanismen der AML1-ETO induzierten Leukämie noch nicht völlig geklärt sind, ist bekannt, dass einer der Schlüsselmechanismen die Unterdrückung der AML1-C/EBPα abhängigen Aktivierung von Genen, die für die myeloische Entwicklung zuständig sind, ist (Licht, 2001; Pabst et al., 2001). Die Störung der Hämatopoese durch Expression von AML1-ETO wurde *in vitro* durch einen Anstieg der Replatierungskapazität von murinen klonogenen Vorläuferzellen und im Wachstum von primitiven humanen Vorläuferzellen gezeigt (Higuchi et al., 2002; Mulloy et al., 2002). Weiterhin zeigten *in vivo* oder *ex vivo* Analysen Veränderungen im Differenzierungsmuster und in der Proliferationskapazität von murinen hämatopoetischen Zellen, die das Fusionsgen exprimieren (de Guzman et al., 2002; Fenske et al., 2004b; Rhoades et al., 2000; Schwieger et al., 2002).

Jedoch haben eine Vielzahl von murinen *in vivo* Modellen gezeigt, dass AML1-ETO alleine nicht in der Lage ist, Leukämie zu induzieren (Fenske et al., 2004; Higuchi et al., 2002; Rhoades et al., 2000; Schwieger et al., 2002; Yuan et al., 2001). Die Beobachtung,

dass AML1-ETO als ein einzelner Faktor nicht Leukämie auslösend ist, sondern zusätzliche Mutationen nötig sind, wird weiterhin durch die Tatsache unterstützt, dass nicht leukämische, AML1-ETO exprimierende Progenitorzellen sowohl in gesunden Individuen als auch bei AML Patienten in Remission gefunden werden können (Miyamoto et al., 2000; Nucifora et al., 1993; Reya et al., 2001).

Die Bedeutung von additiven genetischen Veränderungen in der Pathogenese von AML1-ETO positiven Leukämien wurde tatsächlich auch schon in verschiedenen Mausmodellen gezeigt: nur AML1-ETO Mäuse, die mit ENU behandelt worden waren, entwickelten AML oder ein T-Zell Lymphom (Higuchi et al., 2002; Yuan et al., 2001). Weiterhin induzierte retroviral exprimiertes AML1-ETO nur im Zusammenspiel mit der Defizienz eines Interferon regulierenden Faktors (ICSBP) eine myeloblastische Transformation *in vivo* (Schwieger et al., 2002). All diese Daten geben eindeutige Hinweise auf die Bedeutung von zusätzlichen Mutationen in der Pathogenese der AML1-ETO positiven Leukämien.

4.2. Aktivierende Mutationen in Signaltransduktionswegen als zusätzliche genetische Veränderung

Um potentielle genetische Veränderungen, die hierfür in Frage kommen aufzuspüren und zu charakterisieren, wurden 135 humane Patienten mit AML1-ETO positiver AML mit speziellem Augenmerk auf aktivierende Mutationen, die die Signaltransduktionswege betreffen, genauer untersucht. Es konnten keine MLL-PTD Mutationen gefunden werden, die beispielhaft für genetische Veränderungen der Transkriptionsregulation wären. Andererseits waren 28 % aller untersuchten Fälle positiv für aktivierende Mutationen, wie zum Beispiel FLT3-LM, FLT3D835, KITD816 oder NRAS. Bei allen diesen gefundenen aktivierenden Mutationen ist bekannt, dass sie alleine auch nicht in der Lage sind Leukämie zu induzieren. Die häufige Koexistenz solcher Mutationen mit AML1-ETO passt aber sehr gut in das Mehrschrittmodell der Leukämogenese, in dem zwei Klassen von genetischen Veränderungen nötig sind: eine bei mit hämatopoetischer Differenzierung

vergesellschafteten Transkriptionsfaktoren, die andere bei mit Zellproliferation assoziierten Signaltransduktionswegen (Gilliland and Tallman, 2002).

Durch das in dieser Arbeit verwendete Mausmodell konnten direkte Hinweise für eine funktionelle Zusammenarbeit von AML1-ETO mit FLT3-LM gegeben werden, wodurch die oben genannte These zur Leukämogenese unterstützt wird. Weiterhin zeigen diese Daten die Kollaboration von zwei der häufigsten genetischen Veränderungen in der AML, und erlauben damit einen Einblick in die Pathogenese der beiden häufigsten molekularen Untergruppen der AML.

4.3 Wahl des Mausmodells

Das Mausmodell bietet eine Reihe von Vorteilen gegenüber anderen Tiermodellen und Versuchen *in vitro*. Dieses, auch in anderen Untersuchungen schon verwendete Modell (Rawat et al., 2004) ist gut charakterisiert, und die kurze Generationszeit und unkomplizierte Haltung und Handhabung der Mäuse vereinfachen die Planung der Experimente. Ein weiterer Vorteil liegt in der genetischen Manipulierbarkeit der Maus. Mit den beschriebenen Methoden ist es nicht allzu schwer, verschiedenste Mutationen in das Genom der Maus zu integrieren und entsprechende Schlüsse zu ziehen. *In vitro* Versuche sind natürlich für sich betrachtet ein sehr hoch zu bewertendes Verfahren um zum Beispiel durch Zellkultur aussagekräftige Daten zu erhalten, jedoch alleine nicht ausreichend, um tatsächliche Auswirkungen von Genmutationen auf Lebewesen zu studieren.

4.4 CFU-S Versuch

Der Colony Forming Units Spleen Versuch (CFU-S) wurde durchgeführt, um den individuellen Einfluss der Exprimierung von AML1-ETO und FLT3-LM auf einzelne primitive hämatopoetische Vorläuferzellen zu testen. Hierbei wird die Fähigkeit der einzelnen Zellen geprüft, durch Teilung Kolonien in der Milz zu bilden, indem transduzierte, hochrein sortierte Knochenmarkzellen in letal bestrahlte Mäuse injiziert

werden und die daraus resultierenden Kolonien auf den Milzen an Tag 12, nach Tötung der Maus makroskopisch gezählt werden. Es zeigt sich, dass die konstitutive Expression von FLT3-LM keinen Effekt hatte, keine Kolonien waren sichtbar. Dies mag im Widerspruch zu den Untersuchungen von Kelly et al. stehen, die in ihren Transplantationsversuchen eine myeloproliferative Erkrankung sahen (Kelly et al., 2002b), was sich auch bei einem CFU-S Versuch unter Umständen in einer erhöhten Anzahl an Kolonien auf der Milz widerspiegeln sollte. Bei diesen Studien wurden allerdings BALB/C Mäuse verwendet. Bei einer zweiten Veröffentlichung der gleichen Gruppe wurde FLT3-ITD in B6/C3H transplantiert, einem anderen Mausstamm mit dem gleichen genetischen Hintergrund wie die Mäuse, die in dieser Arbeit verwendet wurden, woraus sich keine myeloproliferative Erkrankung entwickelte. Hier entstand eine Lymphom ähnliche Erkrankung, die erst nach längerer Zeit auftrat (Kelly et al., 2002a). Man kann also hier sehr gut erkennen, dass der genetische Hintergrund der Versuchstiere eine große Rolle zu spielen scheint.

Im Gegensatz dazu erhöhte AML1-ETO das CFU-S Aufkommen um das 3-fache im Vergleich zur GFP Kontrolle. Dies ist nicht verwunderlich, wenn man die AML1-ETO Studien anderer Gruppen betrachtet, die herausfanden, dass AML1-ETO positive Progenitorzellen ein erhöhtes Proliferationspotential besitzen und das Fusionsgen selbst den Stammzellenpool vergrößern kann (Hug et al., 2002; Rhoades et al., 2000). Die gemeinsame Expression von AML1-ETO und FLT3-LM induzierte einen 10 bis 11-fachen Anstieg der gezählten Kolonien im Vergleich zur GFP Kontrolle und sogar einen 18-fachen Anstieg verglichen mit den Milzen von FLT3-LM Mäusen. Im Vergleich von doppelt positiven Zellen zu AML1-ETO alleine exprimierenden Zellen ist ein 3,6 –facher Anstieg der Kolonienzahl zu verzeichnen. Diese Daten unterstützen die Annahme, dass AML1-ETO und FLT3-LM bei gemeinsamer Expression kooperieren und hämatopoetische Vorläuferzellen entstehen, deren Proliferation und Differenzierung empfindlich gestört ist (Gilliland, 2002).

4.5 Entwicklung verschiedener leukämischer Phänotypen und Koexpression myeloischer und lymphatischer Antigene

Es entstanden in diesem Modell sowohl myeloische, als auch lymphatische Leukämien vom B- und T-Zelltyp. Weiterhin hatten vier von sechs murinen AML Fällen eine zusätzliche Expression des T-Zell Antigens CD4. Der Mechanismus, dem die Koexpression von myeloischen und lymphatischen Antigenen in AML1-ETO positiven Leukämien bei der Maus zu Grunde liegt, ist nicht völlig klar. Eine Möglichkeit könnte sein, dass in dieser AML Untergruppe eine frühe, noch nicht in eine myeloische oder lymphatische Richtung entwickelte Vorläuferzelle mit einem gemischten Phänotyp, wie sie auch von Miyamoto et al. beschrieben wird (Miyamoto et al., 2002), die Zielzelle der leukämischen Transformation ist. Darüber hinaus wurde kürzlich gezeigt, dass sich in AML1-ETO positiven Leukämien dieser gemischte Phänotyp nicht auf die Expression von zytoplasmatischen oder Oberflächenantigenen beschränkt, sondern sich auch im Transkriptom findet. So wird PAX5, ein Transkriptionsfaktor, der eine Schlüsselrolle in der Entwicklung von hämatopoetischen Vorläuferzellen in die B- lymphatische Richtung spielt, bei einem Drittel von t(8;21) AMLs exprimiert, im Gegensatz zu allen anderen zytogenetisch definierten AML Subtypen (Tiacci et al., 2004).

In einem konditionellen murinen AML1-ETO Modell entwickelten Mäuse, die zusätzlich mit ENU behandelt worden waren, AML und auch ein T-Zell lymphoblastisches Lymphom (Higuchi et al., 2002). Ähnliche Beobachtungen waren auch bei einem hMRP8-AML1-ETO transgenen Mausmodell gemacht worden, wo auch nach ENU Behandlung AML und T-ALL/Lymphom aufgetreten waren (Yuan et al., 2001). Zwar weiß man in diesen Fällen nicht genau, welche und wie viele zusätzlichen Mutationen durch ENU ausgelöst worden waren, aber offensichtlich waren auch hier zusätzliche genetische Alterationen aufgetreten, die im Zusammenspiel mit AML1-ETO verschiedene Arten von Leukämien und hämatopoetischen Erkrankungen auslösen können.

Eine alternative Möglichkeit für das Auftreten von verschiedenen leukämischen Phänotypen wäre, dass das transformierende Ereignis in verschieden Differenzierungsstadien stattfindet, die sich jeweils schon in eine Linie entwickelt haben.

Dies könnte in verschiedenen Mäusen in einer AML oder ALL resultieren, bzw. im Auftreten von sowohl myeloischen als auch lymphatischen Antigenen in derselben Maus.

Zusätzlich könnte die Expression von einer FLT3-LM in unserem Modell zum lymphatischen Phänotyp der Leukämien beitragen, da gezeigt wurde, dass FLT3-LM in der Lage ist, eine sich spät entwickelnde, T-Zell Lymphom ähnliche Erkrankung in Mäusen mit B6/C3H Hintergrund, der auch in diesem Modell verwendet wurde, zu induzieren (Kelly et al., 2002a). In einer aktuellen Veröffentlichung wurde auch festgestellt, dass die Expression on FLT3-LM zu einer Unterdrückung von sowohl C/EBPα (CCAAT/enhancer binding protein α) (wie schon von Zheng et al. gezeigt) als auch SPI1 (spleen focus forming (SPFV) proviral integration oncogene 1) führt, welches beide myeloische Transkriptionsfaktoren sind (Choudhary et al., 2005). Dadurch mag der Weg in Richtung eines lymphatischen Phänotyps erleichtert werden.
Interessanterweise wird die Überexprimierung von FLT3 auch oft in bei Patienten mit ALL gefunden. Dies ist vor allem in ALL Fällen mit Hyperdiploidie oder MLL (Mixed-Lineage-Leukemia)- Veränderungen der Fall, die durch einen primitiven B-Zell– oder einen gemischten lymphatisch-myeloischem Phänotyp charakterisiert sind (Armstrong et al., 2004; Armstrong et al., 2002; Taketani et al., 2004).

Die Beobachtung der Entwicklung von Leukämien unterschiedlichen Phänotyps bei gemeinsamer Expression von AML1-ETO mit der FLT3 Längenmutation unterscheiden sich von einer anderen Studie, bei der *ETV6-PDGFβR,* ein Fusionsgen, das schon bei alleiniger Expression in transplantierten Mäusen ein letales myeloproliferatives Syndrom verursacht, zusammen mit AML1-ETO ausschließlich eine myeloische Leukämie induziert (Grisolano et al., 2003). Auch dies mag ein Hinweis darauf sein, dass die Entwicklung lymphatischer Leukämien in dieser Arbeit, durch die Expression von FLT3-LM begünstigt wurde.

4.6 Prognose der Leukämien mit AML1-ETO und FLT3-Längenmutation

Generell können Leukämien in drei Gruppen eingeteilt werden: in solche mit günstiger (favourable), mit intermediärer (intermediate) oder ungünstiger (poor risk) Prognose.

Sowohl AML1-ETO, als auch die FLT3-Längenmutationen kommen in vielen Fällen von akuter Leukämie vor. Hierbei können AML1-ETO positive AMLs in die Gruppe der günstigen Prognose eingeordnet werden (Mrozek et al., 2004), während in verschiedenen Studien nachgewiesen werden konnte, dass mit FLT3 Mutationen in Leukämien eine intermediäre Prognose einhergeht, es besteht eine erhöhte Rezidivrate und ein schlechteres Überleben (Kottaridis et al., 2001; Schnittger et al., 2002).

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse unterstützen kürzlich gewonnene Erkenntnisse über die funktionale Relevanz von aktivierenden Mutationen bei RTKs in Patienten mit AML1-ETO positiven Leukämien. Es gibt hier ein signifikant verkürztes Überleben für Leukämien mit aktivierenden Mutationen, insbesondere in der Rezeptortyrosinkinase c-KIT, (von *Kit*ten, da zuerst im HZ4-Katzensarkom-Virus nachgewiesen) verglichen mit denen ohne diese Mutationen (S. Schnittger, unveröffentlichte Daten).

4.7. Ausblick

In der Medizin zeigt sich mehr und mehr, wie wichtig eine detaillierte und profunde Analyse der Krankheiten ist, um genau angepasste und wirkungsvolle Therapiemöglichkeiten zu finden. Am Beispiel der Leukämie muss das Ziel für die Zukunft sein, durch eine detaillierte Analyse genetischer und funktioneller Veränderungen der leukämischen Blasten spezifische Therapiemöglichkeiten für die verschiedenen Leukämie-Subtypen zu entwickeln. Bei der akuten Promyelozyten-Leukämie ist dieser entscheidende Schritt durch die Einführung der all-trans-Retinsäure (ATRA) in die Therapie bereits gelungen. Hierdurch konnten die Heilungschancen um fast 30% verbessert werden (Kelly et al., 2002a). Bei der chronischen myeloischen Leukämie, die durch die Expression eines Fusionsproteins (BCR-ABL) hervorgerufen wird, konnten ebenfalls durch die genaue Kenntnis der Pathogenese spezielle Tyrosinkinaseinhibitoren wie STI571/Gleevec entwickelt werden, die die Heilungschancen von betroffenen Patienten entscheidend verbessern (Peschel et al., 2003). Die Beobachtungen der vorliegenden Arbeit ermutigen zum systematischen Screening nach aktivierenden

Mutationen in RTKs bei Patienten mit AML1-ETO positiven Leukämien um vernünftige Strategien zur Behandlung zu finden, die auf den Signaltransduktionsapparat in diesen Leukämie-Subtypen zielen, wie z.B. durch Tyrosinkinaseinhibitoren wie PKC 412.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die meisten genetischen Abweichungen, die bei humanen akuten Leukämien gefunden werden können, lassen sich in zwei Klassen einteilen: Klasse I Mutationen, wie z.B. aktivierende Mutationen in Rezeptortyrosinkinasen (z.B. FLT3 oder c-KIT), die einen Proliferations- und/oder Überlebensvorteil für hämatopoetische Vorläuferzellen bieten und Klasse II Mutationen (wie z.B. AML1-ETO oder PML/RARα), die hämatopoetische Transkriptionsfaktoren betreffen und primär die Reifung der Zellen und die Apoptose unterbinden. Im Zusammenspiel entstehen hämatopoetische Vorläuferzellen, deren Proliferation und Differenzierung empfindlich gestört ist (Gilliland, 2002), was die Ursache für Leukämien sein kann.

In dieser Arbeit wurden zwei genetische Alterationen untersucht, die den zwei verschiedenen Klassen entstammen: eine Längenmutation der Rezeptortyrosinkinase FLT3 und das Fusionsgen aus AML1 und ETO, AML1-ETO. Es wurde die Frage gestellt, ob diese Mutationen, die auch gemeinsam in humanen AML Patienten gefunden werden (Care et al., 2003), im Zusammenspiel Leukämie auslösen können. Ein murines Knochenmarktransplantationsmodell wurde etabliert, bei dem Knochenmarkzellen, die entweder AML1-ETO, FLT3-LM, beide Mutationen zusammen, oder GFP alleine exprimierten, in Mäuse injiziert wurden. Die Kontrollmäuse entwickelten keine Erkrankung, wohingegen die Mäuse, die AML1-ETO und FLT3-LM zusammen exprimierten, an aggressiver Leukämie erkrankten. Interessanterweise gab es unterschiedliche Phänotypen: es entstanden sowohl myeloische als auch lymphatische (B- und T-Zell) Leukämien. Alle Leukämien wurden durch FACS und Zytologie, teilweise auch durch Histopathologie bestätigt.

Es kann durch die vorliegenden Daten bestätigt werden, dass weder AML1-ETO noch FLT3-LM alleine in der Lage sind Leukämie auszulösen. FLT3-LM stellt aber einen sehr potenten Kooperationspartner dar, um gemeinsam mit AML1-ETO eine Leukämie zu induzieren.

Diese Arbeit kann zum Verständnis der Pathophysiologie von akuten Leukämien beitragen, was die Grundvorausetzung zur Entwicklung von Heilmethoden ist. Der nächste Schritt sollte sein, verschiedene Substanzen, wie zum Beispiel

Tyrosinkinaseinhibitoren zu testen, um bei entsprechender Wirkung die Prognose für Patienten mit AML1-ETO positiven Leukämien zu verbessern.

6. SUMMARY

Co-Expression of the fusion gene AML1-ETO and a FLT3 length Mutation induces acute Leukemia in a mouse model

Most genetic aberrations which can be found in human acute leukemias can be divided into two different subgroups: class I mutations as for example mutations in receptor tyrosine kinases (e.g. FLT3 or c-KIT), which provide a proliferation and/or survival advantage for hematopoietic progenitor cells and class II mutations (e.g. AML1-ETO and PML/RAR α) which occur in transcription factors and affect the differentiation and apoptosis of the cells. If both classes work together, malignant transformations in hematopoietic progenitor cells occur, which lead to leukemia.

In this thesis the functional consequence of the co expression of two representatives of the two classes of mutations, which can also be found together in human patients with acute myeloid leukemia, are studied: a length mutation in the receptor tyrosine kinase FLT3 for the class I and the fusion gene AML1-ETO for class II mutations. The question was raised, whether these mutations can induce acute leukemia in a mouse model. A murine bone marrow transplantation model was set up with mice transplanted with both genetic alterations and mice with only one mutation or the empty vector as a control. The control mice did not develop any disease, whereas the mice expressing AML1-ETO and FLT3-LM together showed aggressive leukemia. Of note, both myeloid as well as lymphoid leukemias of B – and T-cell type developed in this model of AML1-ETO and FLT3-LM co-operation. All leukemias were confirmed by FACS staining and cytology and some by histopathology in addition.

The data in this thesis confirms that neither AML1-ETO nor FLT3-LM alone can cause leukemia, but that FLT3-LM is a very potent collaborating partner to induce the disease together with AML1-ETO.

These data contribute to the understanding of the pathobiology of two of the most frequent AML subtypes in humans and provide the rationale to test innovative therapies such as FLT3 kinase inhibitors in patients with AML1-ETO positive leukemia.

7. LITERATURVERZEICHNIS

Ailles, L. E., Gerhard, B., and Hogge, D. E. (1997). Detection and characterization of primitive malignant and normal progenitors in patients with acute myelogenous leukemia using long-term coculture with supportive feeder layers and cytokines. Blood *90*, 2555-2564.

Amann, J. M., Nip, J., Strom, D. K., Lutterbach, B., Harada, H., Lenny, N., Downing, J. R., Meyers, S., and Hiebert, S. W. (2001). ETO, a target of t(8;21) in acute leukemia, makes distinct contacts with multiple histone deacetylases and binds mSin3A through its oligomerization domain. Mol Cell Biol *21*, 6470-6483.

Andrieu, V., Radford-Weiss, I., Troussard X, Chane C, Valensi F, Guesnu M, Haddad E, Viguier F, Dreyfus F, Varet B*, et al.* (1996). Molecular detection of t(8;21)/AML1-ETO in AML M1/M2: correlation with cytogenetics, morphology and immunophenotype. Br J Haematol *92*, 855-865.

Armstrong, S. A., Mabon, M. E., Silverman, L. B., Li, A., Gribben, J. G., Fox, E. A., Sallan, S. E., and Korsmeyer, S. J. (2004). FLT3 mutations in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood *103*, 3544-3546.

Armstrong, S. A., Staunton, J. E., Silverman, L. B., Pieters, R., den Boer, M. L., Minden, M. D., Sallan, S. E., Lander, E. S., Golub, T. R., and Korsmeyer, S. J. (2002). MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. Nat Genet *30*, 41-47.

Bennett, J. M., Catovsky, D., Daniel, M. T., Flandrin, G., Galton, D. A., Gralnick, H. R., and Sultan, C. (1976). Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. Br J Haematol *33*, 451-458.

Blume-Jensen, P., and Hunter, T. (2001). Oncogenic kinase signalling. Nature *411*, 355-365.

Britos-Bray, M., and Friedman, A. D. (1997). Core binding factor cannot synergistically activate the myeloperoxidase proximal enhancer in immature myeloid cells without c-Myb. Mol Cell Biol *17*, 5127-5135.

Bushweller, J. H., Liu Y, Chruszcz M, Minor W, Speck NA (2003). Structural and functional basis of the dominant negative phenotype of AML1-ETO, product of the t(8;21). Blood abstract *104 (11 supp)*.

Calabi, F., and Cilli, V. (1998). CBFA2T1, a gene rearranged in human leukemia, is a member of a multigene familyGenomics *52*, 332-341.

Care, R. S., Valk, P. J., Goodeve, A. C., Abu-Duhier, F. M., Geertsma-Kleinekoort, W. M., Wilson, G. A., Gari, M. A., Peake, I. R., Lowenberg, B., and Reilly, J. T. (2003). Incidence and prognosis of c-KIT and FLT3 mutations in core binding factor (CBF) acute myeloid leukaemias. Br J Haematol *121*, 775-777.

Chen, J.D. and Evans R. M. (1996). A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. Nature Oct 5; 377 (6548): 454-7

Choudhary, C., Schwable, J., Brandts, C., Tickenbrock, L., Sargin, B., Kindler, T., Fischer, T., Berdel, W.E., Muller-Tidow, C. and Serve, H. (2005). AML-associated Flt3 kinase domain mutations show signal transduction differences in comparison to Flt3 ITD mutations. Blood *07*.

de Guzman, C. G., Warren, A. J., Zhang, Z., Gartland, L., Erickson, P., Drabkin, H., Hiebert, S. W., and Klug, C. A. (2002). Hematopoietic stem cell expansion and distinct myeloid developmental abnormalities in a murine model of the AML1-ETO translocation. Mol Cell Biol *22*, 5506-5517.

Dehmel, U., Zaborski, M., Meierhoff, G., Rosnet, O., Birnbaum, D., Ludwig, W. D., Quentmeier, H., and Drexler, H. G. (1996). Effects of FLT3 ligand on human leukemia cells. I. Proliferative response of myeloid leukemia cells. Leukemia *10*, 261-270.

Downing, J. R. (1999). The AML1-ETO chimaeric transcription factor in acute myeloid leukaemia: biology and clinical significance. Br J Haematol *106*, 296-308.

Downing, J. R., Higuchi, M., Lenny, N., and Yeoh, A. E. (2000). Alterations of the AML1 transcription factor in human leukemia. Semin Cell Dev Biol *11*, 347-360.

Drexler, H. G. (1996). Expression of FLT3 receptor and response to FLT3 ligand by leukemic cells. Leukemia *10*, 588-599.

Elsasser, A., Franzen, M., Kohlmann, A., Weisser, M., Schnittger, S., Schoch, C., Reddy, V. A., Burel, S., Zhang, D. E., Ueffing, M*., et al.* (2003). The fusion protein AML1-ETO in acute myeloid leukemia with translocation t(8;21) induces c-jun protein expression via the proximal AP-1 site of the c-jun promoter in an indirect, JNK-dependent manner. Oncogene *22*, 5646-5657.

Era, T., Asou, N., Kunisada, T., Yamasaki, H., Asou, H., Kamada, N., Nishikawa, S., Yamaguchi, K., and Takatsuki, K. (1995). Identification of two transcripts of AML1/ETO-fused gene in t(8;21) leukemic cells and expression of wild-type ETO gene in hematopoietic cells. Genes Chromosomes Cancer *13*, 25-33.

Erickson, P. F., Robinson, M., Owens, G., and Drabkin, H. A. (1994). The ETO portion of acute myeloid leukemia t(8;21) fusion transcript encodes a highly evolutionarily conserved, putative transcription factor. Cancer Res *54*, 1782-1786.

Fenske, T. S., Pengue, G., Mathews, V., Hanson, P. T., Hamm, S. E., Riaz, N., and Graubert, T. A. (2004a). Stem cell expression of the AML1/ETO fusion protein induces a myeloproliferative disorder in mice. Proc Natl Acad Sci U S A *101*, 15184-15189.

Feuring-Buske, M., Hiddemann, W., and Buske, C. (2002). [Pathogenesis and biology of leukemias]. Internist (Berl) *43*, 1179-1189.

Frei, J. V., and Lawley, P. D. (1980). Thymomas induced by simple alkylating agents in C57BL/Cbi mice: kinetics of the dose response. J Natl Cancer Inst *64*, 845-856.

Friedman, A. D. (1999). Leukemogenesis by CBF oncoproteins. Leukemia *13*, 1932-1942.

Gelmetti, V., Zhang, J., Fanelli, M., Minucci, S., Pelicci, P. G., and Lazar, M. A. (1998). Aberrant recruitment of the nuclear receptor corepressor-histone deacetylase complex by the acute myeloid leukemia fusion partner ETO. Mol Cell Biol *18*, 7185-7191.

Gilliland, D. G. (2002). Molecular genetics of human leukemias: new insights into therapy. Semin Hematol *39*, 6-11.

Gilliland, D. G., and Griffin, J. D. (2002a). Role of FLT3 in leukemia. Curr Opin Hematol *9*, 274-281.

Gilliland, D. G., and Griffin, J. D. (2002b). The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. Blood *100*, 1532-1542.

Gilliland, D. G., and Tallman, M. S. (2002). Focus on acute leukemias. Cancer Cell *1*, 417-420.

Grisolano, J. L., O'Neal, J., Cain, J., and Tomasson, M. H. (2003). An activated receptor tyrosine kinase, TEL/PDGFbetaR, cooperates with AML1/ETO to induce acute myeloid leukemia in mice. Proc Natl Acad Sci U S A *100*, 9506-9511.

Gross, C. T., and McGinnis, W. (1996). DEAF-1, a novel protein that binds an essential region in a Deformed response element. Embo J *15*, 1961-1970.

Gutjahr, T.S.(2000). Neuartige retrovirale Vektorsysteme für die Gentherapie: Entwicklung in suspension wachsender Verpackungszellinien. Dissertation, Geo- und Biowissenschaftliche Fakultät, Universität Stuttgart

Haase, D., Feuring-Buske, M., Konemann, S., Fonatsch, C., Troff, C., Verbeek, W., Pekrun, A., Hiddemann, W., and Wormann, B. (1995). Evidence for malignant transformation in acute myeloid leukemia at the level of early hematopoietic stem cells by cytogenetic analysis of CD34+ subpopulations. Blood *86*, 2906-2912.

Haferlach, T., and Schoch, C. (2002). [Modern techniques in leukemia diagnosis]. Internist (Berl) *43*, 1190, 1193-1196, 1199-1202.

Harris, N. L., Jaffe, E. S., Diebold, J., Flandrin, G., Muller-Hermelink, H. K., Vardiman, J., Lister, T. A., and Bloomfield, C. D. (1999). The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. Report of the Clinical Advisory Committee meeting, Airlie House, Virginia, November, 1997. Ann Oncol *10*, 1419-1432.

Harris, N. L., Jaffe, E. S., Diebold, J., Flandrin, G., Muller-Hermelink, H. K., Vardiman, J., Lister, T. A., and Bloomfield, C. D. (2000). The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the haematopoietic and lymphoid tissues: Report of the Clinical Advisory Committee Meeting, Airlie House, Virginia, November 1997. Histopathology *36*, 69-86.

Hess, J. L., and Hug, B. A. (2004). Fusion-protein truncation provides new insights into leukemogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A *101*, 16985-16986.

Higuchi, M., O'Brien, D., Kumaravelu, P., Lenny, N., Yeoh, E. J., and Downing, J. R. (2002). Expression of a conditional AML1-ETO oncogene bypasses embryonic lethality and establishes a murine model of human t(8;21) acute myeloid leukemia. Cancer Cell *1*, 63-74.

Hug, B. A., Lee, S. Y., Kinsler, E. L., Zhang, J., and Lazar, M. A. (2002). Cooperative function of Aml1-ETO corepressor recruitment domains in the expansion of primary bone marrow cells. Cancer Res *62*, 2906-2912.

Ichikawa, M., Asai, T., Saito, T., Yamamoto, G., Seo, S., Yamazaki, I., Yamagata, T., Mitani, K., Chiba, S., Hirai, H*., et al.* (2004). AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. Nat Med *10*, 299-304.

Kelly, L. M., and Gilliland, D. G. (2002). Genetics of myeloid leukemias. Annu Rev Genomics Hum Genet *3*, 179-198.

Kelly, L. M., Kutok, J. L., Williams, I. R., Boulton, C. L., Amaral, S. M., Curley, D. P., Ley, T. J., and Gilliland, D. G. (2002a). PML/RARalpha and FLT3-ITD induce an APL-like disease in a mouse model. Proc Natl Acad Sci U S A *99*, 8283-8288.

Kelly, L. M., Liu, Q., Kutok, J. L., Williams, I. R., Boulton, C. L., and Gilliland, D. G. (2002b). FLT3 internal tandem duplication mutations associated with human acute myeloid leukemias induce myeloproliferative disease in a murine bone marrow transplant model. Blood *99*, 310-318.

Kitabayashi, I., Ida, K., Morohoshi, F., Yokoyama, A., Mitsuhashi, N., Shimizu, K., Nomura, N., Hayashi, Y., and Ohki, M. (1998). The AML1-MTG8 leukemic fusion protein forms a complex with a novel member of the MTG8(ETO/CDR) family, MTGR1. Mol Cell Biol *18*, 846-858.

Kottaridis, P. D., Gale, R. E., Frew, M. E., Harrison, G., Langabeer, S. E., Belton, A. A., Walker, H., Wheatley, K., Bowen, D. T., Burnett, A. K.*, et al.* (2001). The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. Blood *98*, 1752-1759.

Kottaridis, P. D., Gale, R. E., and Linch, D. C. (2003). Flt3 mutations and leukaemia. Br J Haematol *122*, 523-538.

Licht, J. D. (2001). AML1 and the AML1-ETO fusion protein in the pathogenesis of t(8;21) AML. Oncogene *20*, 5660-5679.

Lisovsky, M., Estrov, Z., Zhang, X., Consoli, U., Sanchez-Williams, G., Snell, V., Munker, R., Goodacre, A., Savchenko, V., and Andreeff, M. (1996). Flt3 ligand stimulates proliferation and inhibits apoptosis of acute myeloid leukemia cells: regulation of Bcl-2 and Bax. Blood *88*, 3987-3997.

Lowenberg, B., Downing, J. R., and Burnett, A. (1999). Acute myeloid leukemia. N Engl J Med *341*, 1051-1062.

Lutterbach, B., Westendorf, J. J., Linggi, B., Patten, A., Moniwa, M., Davie, J. R., Huynh, K. D., Bardwell, V. J., Lavinsky, R. M., Rosenfeld, M. G.*, et al.* (1998). ETO, a target of t(8;21) in acute leukemia, interacts with the N-CoR and mSin3 corepressors. Mol Cell Biol *18*, 7176-7184.

Lyman, S. D., and Williams, D. E. (1995). Biology and potential clinical applications of flt3 ligand. Curr Opin Hematol *2*, 177-181.

Mackarehtschian, K., Hardin, J. D., Moore, K. A., Boast, S., Goff, S. P., and Lemischka, I. R. (1995). Targeted disruption of the flk2/flt3 gene leads to deficiencies in primitive hematopoietic progenitors. Immunity *3*, 147-161.

Mehrotra, B., George, T. I., Kavanau, K., Avet-Loiseau, H., Moore, D., 2nd, Willman, C. L., Slovak, M. L., Atwater, S., Head, D. R., and Pallavicini, M. G. (1995). Cytogenetically aberrant cells in the stem cell compartment (CD34+lin-) in acute myeloid leukemia. Blood *86*, 1139-1147.

Minden, M., Imrie, K., and Keating, A. (1996). Acute leukemia in adults. Curr Opin Hematol *3*, 259-265.

Mitrou, P. S., and Länger, F. (2001). Akute lymphatische Leukämie. Atlas der Hämatologie und hämatologischen Onkologie, 68.

Miyamoto, T., Iwasaki, H., Reizis, B., Ye, M., Graf, T., Weissman, I. L., and Akashi, K. (2002). Myeloid or lymphoid promiscuity as a critical step in hematopoietic lineage commitment. Dev Cell *3*, 137-147.

Miyamoto, T., Weissman, I. L., and Akashi, K. (2000). AML1/ETO-expressing nonleukemic stem cells in acute myelogenous leukemia with 8;21 chromosomal translocation. Proc Natl Acad Sci U S A *97*, 7521-7526.

Miyoshi, H., Shimizu, K., Kozu, T., Maseki, N., Kaneko, Y., and Ohki, M. (1991). t(8;21) breakpoints on chromosome 21 in acute myeloid leukemia are clustered within a limited region of a single gene, AML1. Proc Natl Acad Sci U S A *88*, 10431-10434.

Mizuki, M., Ueda, S., Matsumura, I., Ishiko, J., Schwable, J., Serve, H., and Kanakura, Y. (2003). Oncogenic receptor tyrosine kinase in leukemia. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) *49*, 907-922.

Mrozek, K., Heerema, N., and Bloomfield, C. (2004). Cytogenetice in acute leukemia. Blood Reviews *18*, 115-136.

Mulloy, J. C., Cammenga, J., Berguido, F. J., Wu, K., Zhou, P., Comenzo, R. L., Jhanwar, S., Moore, M. A., and Nimer, S. D. (2003). Maintaining the self-renewal and differentiation potential of human CD34+ hematopoietic cells using a single genetic element. Blood *102*, 4369-4376.

Mulloy, J. C., Cammenga, J., MacKenzie, K. L., Berguido, F. J., Moore, M. A., and Nimer, S. D. (2002). The AML1-ETO fusion protein promotes the expansion of human hematopoietic stem cells. Blood *99*, 15-23.

Nakao, M., Yokota, S., Iwai, T., Kaneko, H., Horiike, S., Kashima, K., Sonoda, Y., Fujimoto, T., and Misawa, S. (1996). Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia. Leukemia *10*, 1911-1918.

Nishii, K., Usui, E., Katayama, N., and Lorenzo, V. (2003). Characteristics of t(8;21) acute myeloid leukemia (AML) with additional chromosomal abnormality: concomitant trisomy 4 may constitute a distinctive sybtype of t(8;21) AML. Leukemia *17*, 731-737.

Nucifora, G., Larson, R. A., and Rowley, J. D. (1993). Persistence of the 8;21 translocation in patients with acute myeloid leukemia type M2 in long-term remission. Blood *82*, 712-715.

Nucifora, G., and Rowley, J. D. (1995). AML1 and the 8;21 and 3;21 translocations in acute and chronic myeloid leukemia. Blood *86*, 1-14.

Okuda, T., van Deursen, J., Hiebert, S. W., Grosveld, G., and Downing, J. R. (1996). AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. Cell *84*, 321-330.

Pabst, T., Mueller, B. U., Harakawa, N., Schoch, C., Haferlach, T., Behre, G., Hiddemann, W., Zhang, D. E., and Tenen, D. G. (2001). AML1-ETO downregulates the granulocytic differentiation factor C/EBPalpha in t(8;21) myeloid leukemia. Nat Med *7*, 444-451.

Peschel, C., Duyster, J., Günther, C., Kolb, H.-J., Muth, A., and Schneller, F. (2003). Chronische myeloische Leukämie (CML). Manual, Tumorzentrum München, Leukämien, myelodysplastische und myeloproliferative Syndrome *2*, 115-130.

Peterson, L. F., and Zhang, D. E. (2004). The 8;21 translocation in leukemogenesis. Oncogene *23*, 4255-4262.

Randall, T. D., and Weissman, I. L. (1997). Phenotypic and functional changes induced at the clonal level in hematopoietic stem cells after 5-fluorouracil treatment. Blood *89*, 3596-3606.

Rawat, V. P., Cusan, M., Deshpande, A., Hiddemann, W., Quintanilla-Martinez, L., Humphries, R. K., Bohlander, S. K., Feuring-Buske, M., and Buske, C. (2004). Ectopic expression of the homeobox gene Cdx2 is the transforming event in a mouse model of t(12;13)(p13;q12) acute myeloid leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A *101*, 817-822.

Reilly, J. T. (2003). Receptor Tyrosine Kinases in normal and malignant haematopoiesis. Blood Rev *17*, 241-248.

Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., and Weissman, I. L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. Nature *414*, 105-111.

Rhoades, K. L., Hetherington, C. J., Harakawa, N., Yergeau, D. A., Zhou, L., Liu, L. Q., Little, M. T., Tenen, D. G., and Zhang, D. E. (2000). Analysis of the role of AML1-ETO in leukemogenesis, using an inducible transgenic mouse model. Blood *96*, 2108-2115.

Rosnet, O. S. c., Pebusque MJ et al. (1993). cDNA cloning and expression in hematopoietic cells. Blood *82*, 1110-1119.

Sasaki, K., Yagi, H., Bronson, R. T., Tominaga, K., Matsunashi, T., Deguchi, K., Tani, Y., Kishimoto, T., and Komori, T. (1996). Absence of fetal liver hematopoiesis in mice deficient in transcriptional coactivator core binding factor beta. Proc Natl Acad Sci U S A *93*, 12359-12363.

Sauvageau, G., Thorsteinsdottir, U., Hough, M. R., Hugo, P., Lawrence, H. J., Largman, C., and Humphries, R. K. (1997). Overexpression of HOXB3 in hematopoietic cells causes defective lymphoid development and progressive myeloproliferation. Immunity *6*, 13-22.

Schnittger, S., Schoch, C., Dugas, M., Kern, W., Staib, P., Wuchter, C., Loffler, H., Sauerland, C. M., Serve, H., Buchner, T.*, et al.* (2002). Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. Blood *100*, 59-66.

Schoch, C. (2004). http://knm1.ibe.med.uni-muenchen.de/tumorzytogenetik/index.html.

Schwieger, M., Lohler, J., Friel, J., Scheller, M., Horak, I., and Stocking, C. (2002). AML1-ETO inhibits maturation of multiple lymphohematopoietic lineages and induces myeloblast transformation in synergy with ICSBP deficiency. J Exp Med *196*, 1227-1240.

Secker-Walker, L. M., Prentice, H. G., Durrant, J., Richards, S., Hall, E., and Harrison, G. (1997). Cytogenetics adds independent prognostic information in adults with acute lymphoblastic leukaemia on MRC trial UKALL XA. MRC Adult Leukaemia Working Party. Br J Haematol *96*, 601-610.

Shibata, H., Spencer, T. E., Onate, S. A., Jenster, G., Tsai, S. Y., Tsai, M. J., and O'Malley, B. W. (1997). Role of co-activators and co-repressors in the mechanism of steroid/thyroid receptor action. Recent Prog Horm Res *52*, 141-164; discussion 164-145.

Song, W. J., Sullivan, M. G., Legare, R. D., Hutchings, S., Tan, X., Kufrin, D., Ratajczak, J., Resende, I. C., Haworth, C., Hock, R.*, et al.* (1999). Haploinsufficiency of CBFA2 causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia. Nat Genet *23*, 166-175.

Speck, N. A., and Gilliland, D. G. (2002). Core-binding factors in haematopoiesis and leukaemia. Nat Rev Cancer *2*, 502-513.

Speck, N. A., Stacy, T., Wang, Q., North, T., Gu, T. L., Miller, J., Binder, M., and Marin-Padilla, M. (1999). Core-binding factor: a central player in hematopoiesis and leukemia. Cancer Res *59*, 1789s-1793s.

Spiekermann, K., Bagrintseva, K., Schoch, C., Haferlach, T., Hiddemann, W., and Schnittger, S. (2002). A new and recurrent activating length mutation in exon 20 of the FLT3 gene in acute myeloid leukemia. Blood *100*, 3423-3425.

Stirewalt, D. L., and Radich, J. P. (2003). The role of FLT3 in haematopoietic malignancies. Nat Rev Cancer *3*, 650-665.

Taketani, T., Taki, T., Sugita, K., Furuichi, Y., Ishii, E., Hanada, R., Tsuchida, M., Ida, K., and Hayashi, Y. (2004). FLT3 mutations in the activation loop of tyrosine kinase domain are frequently found in infant ALL with MLL rearrangements and pediatric ALL with hyperdiploidy. Blood *103*, 1085-1088.

Tenen, D. G. (2003). Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way. Nat Rev Cancer *3*, 89-101.

Tiacci, E., Pileri, S., Orleth, A., Pacini, R., Tabarrini, A., Frenguelli, F., Liso, A., Diverio, D., Lo-Coco, F., and Falini, B. (2004). PAX5 expression in acute leukemias: higher B-lineage specificity than CD79a and selective association with t(8;21)-acute myelogenous leukemia. Cancer Res *64*, 7399-7404.

van der Geer, P., Hunter, T & Lindberg, R.A. (1994). Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. Annu Rev Cell Biol, 251-337.

Wang, J., Hoshino, T., Redner, R. L., Kajigaya, S., and Liu, J. M. (1998). ETO, fusion partner in t(8;21) acute myeloid leukemia, represses transcription by interaction with the human N-CoR/mSin3/HDAC1 complex. Proc Natl Acad Sci U S A *95*, 10860-10865.

Wang, Q., Stacy, T., Binder, M., Marin-Padilla, M., Sharpe, A. H., and Speck, N. A. (1996). Disruption of the Cbfa2 gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis. Proc Natl Acad Sci U S A *93*, 3444-3449.

Yamamoto, Y., Kiyoi, H., Nakano, Y., Suzuki, R., Kodera, Y., Miyawaki, S., Asou, N., Kuriyama, K., Yagasaki, F., Shimazaki, C*., et al.* (2001). Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. Blood *97*, 2434-2439.

Yan, M., Burel, S. A., Peterson, L. F., Kanbe, E., Iwasaki, H., Boyapati, A., Hines, R., Akashi, K., and Zhang, D. E. (2004). Deletion of an AML1-ETO C-terminal NcoR/SMRT-interacting region strongly induces leukemia development. Proc Natl Acad Sci U S A.

Yuan, Y., Zhou, L., Miyamoto, T., Iwasaki, H., Harakawa, N., Hetherington, C. J., Burel, S. A., Lagasse, E., Weissman, I. L., Akashi, K., and Zhang, D. E. (2001). AML1-ETO expression is directly involved in the development of acute myeloid leukemia in the presence of additional mutations. Proc Natl Acad Sci U S A *98*, 10398-10403.

Zhang, D. E., Hohaus, S., Voso, M. T., Chen, H. M., Smith, L. T., Hetherington, C. J., and Tenen, D. G. (1996). Function of PU.1 (Spi-1), C/EBP, and AML1 in early myelopoiesis: regulation of multiple myeloid CSF receptor promoters. Curr Top Microbiol Immunol *211*, 137-147.

Zheng, R., Friedman, A. D., Levis, M., Li, L., Weir, E. G., and Small, D. (2004). Internal tandem duplication mutation of FLT3 blocks myeloid differentiation through suppression of C/EBPalpha expression. Blood *103*, 1883-1890.

8. ANHANG

8.1. Verzeichnis der verwendeten Geräte

ABI Prism 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Foster City, USA
Bestrahlungsanlage	Atomic Energy of Canada Limited, Canada
Elektrophoresekammer	PEQLAB GmbH, Erlangen
Cyclone 25	PEQLAB GmbH, Erlangen
FACSVantage	Becton Dickinson, San Jose, USA
FACSCalibur	Becton Dickinson, San Jose, USA
Inkubator	Binder, Tuttlingen
IVC Käfige und Halterung	Technoplast, Varese, Italien
Laminar-Flow-Sterilbank	BDK Luft- und Reinraumtechnik, Deutschland
Leitz Diavert Inverses Mikroskop	Ernst Leitz Wetzlar GmbH, Wetzlar
Pipetus Accu	Hirschmann, Deutschland
Zentrifugen, Rotanta 46 RC	Hettich, Tuttlingen
Zytospin Apparat	Thermo Electron corporation, USA

8.2 Verzeichnis der verwendeten Reagenzien und Lösungen

Agarose	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Acetic Acid	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Ammoniumchlorid 0, 8%	Cell Systems, St. Katharinen
Anti Eto Antikörper	Santa Cruz, California, USA
Anti FLT3 Antikörper	Santa Cruz, California, USA
Avertin	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
$CaCl_2$	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Ciprofloxacin (Cipro)	Bayer, Leverkusen
DMEM	GIBCO BRL, Karlsruhe
DMSO	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen

DNA Leiter für PCR	New England Biolabs
DNAzol	GIBCO BRL, Karlsruhe
DNase I	Invitrogen, Karlsruhe
dNTP Mix	Invitrogen, Karlsruhe
ECL Western blotting analysis System	Amersham, Freiburg
Ecopac	Cell Genesys, Foster City, USA
Ethanol, 70%	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
FBS (Foetal Bovine Serum)	Cell Systems, St. Katharinen
Formalin	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
5 FU	medac, Wedel
Giemsa	Merck, Darmstadt
GFX PCR DNA gel band elution	Amersham HBS, Freiburg
IL3	Tebu-bio GmbH, Offenbach
IL6	Tebu-bio GmbH, Offenbach
IL7	Tebu-bio GmbH, Offenbach
Isopropanol	Merck, Darmstadt
m-SCF	Tebu-bio GmbH, Offenbach
Methocult GF 3434	Cell Systems, St. Katharinen
Methocult 3630	Cell Systems, St. Katharinen
May-Grünwald	Merck, Darmstadt
Megaprime DNA labeling system	Amersham, Freiburg
Microspin S-300 HR columns	Amersham, Freiburg
Natrium Chlorid	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Natriumdodecylsulphat	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Natrium Hydroxid	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Penicillin/Streptomycin	GIBCO BRL, Karlsruhe
Sca-1	BD PharMingen, Heidelberg
c-Kit	BD PharMingen, Heidelberg
Gr-1	BD PharMingen, Heidelberg

Mac-1	BD PharMingen, Heidelberg
Ter119	BD PharMingen, Heidelberg
B220	BD PharMingen, Heidelberg
CD4	BD PharMingen, Heidelberg
CD8	BD PharMingen, Heidelberg
PBS (Phosphate buffered saline)	GIBCO BRL, Karlsruhe
Protaminsulfat (Salamine)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Platinum Taq DNA Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Sigma Wasser	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Skimed milk	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Telleyesnickzky's solution	selbst hergestellt, s.u.
ThermoScript RT-PCR	Invitrogen, Karlsruhe
Trizma base	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Trizol	GIBCO BRL, Karlsruhe
Trypan blau	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Trypsin-EDTA	GIBCO BRL, Karlsruhe

8.3 Verzeichnis der verwendeten Materialien

ECL Western Blotting Analyse System	Amersham, Freiburg
FACS Röhrchen	BD Falcon, Heidelberg
Filter (0,22 und 0,45 µm)	Millipore, Schwalbach
Heparinmikrovette (CB 300)	Sarstedt, Numbrecht
Kanülen 0.5 x 25 mm	BD Microlanc, Heidelberg
Kanülen 0.55 x 25	BD Microlanc, Heidelberg
Kanülen 16 x 1.5 inch	Stem Cell Technologies,
Microspin S-300 HR Säulen	Amersham, Freiburg
Megaprime DNA labeling System	Amersham, Freiburg
Objektträger	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Pipetten mit Spitzen	Gielson, Villiers-le-Bel, Frankreich
Pipetten1x (5, 10 und 25 ml)	Corning, Schubert und Weiss, München

Reagiergefäße	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Spritzen 3ml, Kendall Monoject	Tyco Healthcare, GB
Spritzen 1ml	BD Bioscience, Heidelberg
Zellkulturschalen 10, 15cm	Corning, Schubert und Weiss, München
Zellkulturschalen (96-, 24-, 6-well)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturschalen, Susp. Zellen 10 cm	BD Falcon, Heidelberg
Zellsiebe, 40µm	BD Bioscience, Heidelberg
Zellschaber, 25 cm	Sarstedt, Nümbrecht
Zytospin Filterkarten 5991022	Histocom AG, Zug, Schweiz

8.4 Herstellung von Lösungen

Telleyesnickzky's Lösung: 450ml EtOH + 25ml Eisessig + 25ml Formaldehyde

Avertin: Eine Basislösung wurde hergestellt indem 15,5 ml ter-amyl Alkohol zu 25 Gramm Avertin gegeben und über Nacht aufgelöst wurde. Als Arbeitslösung wurde 0,5 ml der Basislösung zu 39,5 ml PBS gegeben und über Nacht mit einem Magnetrührer vermischt.

5-Fluoruracil: Als Ausgangslösung wurde eine 50 mg/ml Lösung von Medac verwendet. Für die Injektionslösung wurden kurz vor der Injektion die Ausgangslösung mit 4 ml PBS gemischt und bis zur Injektion dunkel gelagert.

Prähybridisierungslösung: 0,2 g Magermilchpulver und 2,0 g Dextransulphat werden in 17 ml Wasser gelöst und 6 ml 20x SSC, 2 ml Formamid, 1 ml 20 % SDS und 80 µl 500mM EDTA dazu pipetiert.

Denaturierungslösung für Southern Blot: Eine Lösung aus 1,5M NaCl, 0,5 N NaOH in Wasser

20 x SSC: 175,3 Natriumchlorid und 88,2 g Natriumcitrat werden in 800 ml deionisiertem Wasser gelöst und der PH auf 7,0 eingestellt, dann auf 1 Liter mit Wasser aufgefüllt.

$CaCl_2$: für die Transfektion 2.5M $CaCl_2$ in Wasser

8.5 Programme

Durchflusszytometrie und FACS	CellQuest Version 3,1 (BD Biosciences, San Jose, USA)
Berechnung der Überlebenskurve	Sigma Plot 2001 Version 7 (SPSS Inc. Chicago, IL)
Photografie	Openlab software 3.0.8 (Improvision Deutschland, Tuebingen,)
Primerdesign	Primer3 program, Whitehead Institute, Massachusetts Institute for Technology, USA (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi
Tabellenkalkulation	Microsoft Excel, Redmond, WA, USA

8.6 Abkürzungsverzeichnis

α	Anti
As	Aminosäure
Abb	Abbildung
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myelozytische Leukämie
AML1	Akutes myeloisches Leukämie Gen 1
APL	Akute promyelozytische Leukämie
ATRA	All-Trans-Retinoic-Acid
bp	Basenpaare
bzw	beziehungsweise
ca	circa
$CaCl_2$	Kalziumchlorid
CAE	Naphthol-AS-D-Chlorazetatesterase
CBF	Core Binding Factor
CD	Cluster of Differentiation
CEBP α	CCAAT/enhancer binding protein α
CFU-S	Colony Forming Units-Spleen
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	*engl. desoxyribonucleic acid* Desoxyribonukleinsäure
ENU	N-Ethyl-N-Nitrosourea
EPO	Erythropoetin
ETO	*engl. eight-twenty-one,* 8;21 in Anlehnung an die Chromosomen 8 und 21
FAB	French-American-British
FBS	*engl. fetal bovine serum*, Fötales Kälberserum
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
FLT3	Fms-like tyrosine kinase 3

GFP	*engl. Green Fluorescent Protein,* grünes fluoreszierendes Protein
G-CSF	Granulocyte colony stimulating factor
HDAC	Histon Deazetylase
IL	Interleukin
IRES	Internal ribosomal entry site
ITD	interne Tandemduplikation
JMD	juxtamembranöse Domäne
Kg	Kilogramm
KM	Knochenmark
LTR	Long terminal repeat
LM	Längenmutation
MEF	myeloischer ETS Faktor
MIG	MSCV-IRES-EGFP
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mg	Milligramm
MSCV	*engl. Murine Stem Cell Virus*; muriner Stammzellvirus
MIY	MSCV-IRES-EYFP
NcoR	*engl nuclear receptor corepressor*
NHR	Nervy Homology Region
PB	periphäres Blut
PBS	*engl.phosphate buffered saline;* Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	*engl. Polymerase Chain Reaction* Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PTD	partielle Tandemduplikation
PTK	Phosphotyrosinkinase
RBC	*engl. red blood cell count,* Erythrozyten

RHD	Runt Homologie Domäne
RNA	*engl. ribonucleid acid*, Ribonucleinsäure
SMRT	Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid receptors
s.o	siehe oben
SPI1	spleen focus forming (SPFV) proviral integration oncogene 1
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
t	Translokation
TP	TEL/PDGF
UPM	Umdrehungen pro Minute
v.a.	vor allem
VCM	*virus containing medium;* Virus enthaltendes Medium
WBC	*engl. white blood cell count,* Leukozyten
WHO	World Health Organisation
YFP	*engl. Yellow Fluorescent Protein*, gelbes fluoreszierendes Protein
z.B.	zum Beispiel

9. DANKSAGUNG

Herrn Professor Dr. Eckhard Wolf danke ich herzlich für seine nette, unkomplizierte Art und die Übernahme der Arbeit.
Herzlich danken möchte ich Herrn Dr. Habil. Christian Buske und Frau Dr. Habil. Michaela Feuring-Buske für die Überlassung des interessanten Themas und die allzeit gewährte Unterstützung bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit.
Den Mitarbeitern des Tierstalls im Hämatologikum der GSF möchte ich danken für die exzellente Betreuung der Mäuse und die stets gute Zusammenarbeit.
Für die pathohistologischen Untersuchungen bedanke ich mich bei Frau Dr. Habil. Letitia Quintanilla-Fend und für die Auswertung und Bereitstellung von Daten von humanen Leukämiepatienten bei allen Mitarbeitern des Leukämielabors des Klinikums Großhadern.
Für die cDNA von *FLT3-LM (FLT3-ITD NPOS)* möchte ich mich bei D.G. Gilliland (Division of Hematology-Oncology, Harvard Medical School, Boston, USA), und K. Spiekermann (Medizinische Klinik III, Klinikum Großhadern, München, Deutschland) und für die cDNA des Fusionsgens *AML1-ETO* bei S.W. Hiebert (Department of Biochemistry, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, Tennessee, USA) und wiederum K. Spiekermann bedanken.
Mein ganz besonders herzlicher Dank gilt meinen Eltern, Geschwistern und Freunden, die mich während des Studiums und der Promotion überaus großzügig, sowohl emotional als auch anderweitig (danke für die Kommas Eva!!) unterstützt haben. Herzlichen Dank an Christian, der große Geduld bewiesen hat!
Vielen Dank an alle meine Kollegen in der KKG Leukämie, ohne deren Motivation, Hilfe und vor allem Freundschaft diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Vor allem und ohne spezielle Reihenfolge sind dies: Aniruddha Deshpande für Diskussionen über Mäuse, Katzen, Gott und die Welt, Natalia Arseni und Monica Cusan für die Italienischlektionen und das Urlaubsfeeling im Labor, Konstantin Petropoulos und den Sportfreunden für die musikalische Untermalung und die Möglichkeit, dann und wann zu telefonieren, Vijay Rawat vor allem für die tatkräftige Hilfe bei den Southern Blots, Vegi Mahalakshmi Naidu für unschätzbare Hindikenntnisse, Farid Ahmed für unendliche Geduld und Perfektionismus bei PCRs, Bianka Ksienziek vor allem für die Zellsortierung, Jeremias Gromotka, Nicole Behm, Jasmin Jonas und nicht zu vergessen: Tobias Kohl und Marc

Weinkauf für wertvolle Ablenkung beim Schreiben dieser Arbeit.

Für eine ganz besondere Begleitung durch Studium, Promotion und Leben: Dank an Henry, Jakob, Oskar und Clooney!

10. LEBENSLAUF

Name:	Christina Gerlinde Scheßl
Geburtsdatum:	04.04.1972
Geburtsort:	Mainburg
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig
Adresse:	Würzstr. 6
	81371 München
	tina@schessl.de
1978-1982	Grundschule Au/Hallertau
1982-1983	Hauptschule Au/Hallertau
1983-1992	Gabelsberger Gymnasium Mainburg
Schulabschluss:	Allgemeine Hochschulreife
9/1992- 7/1994	Ausbildung zur Tierarzthelferin in der tierärztlichen Praxis Dr. Irmgard Rieger, Pegnitzstr. 5, München Berufsschule für Arzthelferinnen, München
11/1994-10/1996	Arbeit als Technische Angestellte im Labor der chirurgischen und ersten medizinischen Tierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität, Veterinärstr. 13, München
10/1996-3/2002	Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
5/2002-2005	Promotion an der Ludwig-Maximilians-Universität München (Institut für Tierzucht, Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie der Tierärztlichen Fakultät, Prof. Dr. E. Wolf, und Medizinische und Poliklinik III des Klinikums Großhadern, Prof. Dr. W. Hiddemann), mit dem Titel: „Die gemeinsame Expression des Fusionsgens AML1-ETO und einer FLT3 Längenmutation induziert akute Leukämien im Mausmodell“.