

**Die Rolle des Transkriptionsfaktors "Lymphoid
Enhancer Factor 1" (Lef-1) in der normalen und
malignen Hämatopoese**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Konstantin Petropoulos

München, Mai 2007

| | |
|-----------------------------|-------------------------|
| Dissertation eingereicht am | 21.05.2007 |
| Erstgutachter | Prof. Dr. Dirk Eick |
| Zweitgutachter | Prof. Dr. Thomas Cremer |
| Tag der mündlichen Prüfung | 28.11.2007 |

Für meine Eltern

Ehrenwörtliche Versicherung

Ich versichere Hiermit ehrenwörtlich, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt wurde.

München, im Mai 2007

Konstantin Petropoulos

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 12 der Promotionsordnung von Herrn Prof. Dr. Dirk Eick betreut. Ich erkläre hiermit, dass ich mich nicht anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg unterzogen habe.

München, im Mai 2007

Konstantin Petropoulos

Die Ergebnisse wurden zum Teil in folgenden Präsentationen veröffentlicht oder werden in Kürze zur Publikation eingereicht:

Petropoulos K, Ahmed F, Schessl C, Arseni N, Deshpande A, Hiddemann W, Grosschedl R, Feuring-Buske M, Buske C.

“Constitutive Expression of the ‘Lymphoid Enhancer Factor 1’ (Lef-1) perturbs early hematopoietic development and induces a lethal myeloproliferative syndrome in a subset of transplanted mice”, ASH 2005 Supplementary Blood, 106 (11), Nov. 2005

Petropoulos K, Arseni N, Schessl C, Stadler C, Rawat VPS, Deshpande A, Hiddemann W, Quintanilla-Martinez L, Bohlander SK, Feuring-Buske M, Buske C.

“A hitherto undiscovered role of Lef-1, a central transcription mediator of Wnt signalling, in leukemogenesis” (*in review*)

Antoine de Saint-Exupéry

Wenn ich euch dieses nebensächliche Drum und Dran über den Planeten B612 erzähle und euch sogar seine Nummer anvertraue, so geschieht das der großen Leute wegen. Die großen Leute haben eine Vorliebe für Zahlen...so auch, wenn ihr ihnen sagt: der Beweis dafür, dass es den kleinen Prinzen wirklich gegeben hat, besteht darin, dass er entzückend war, dass er lachte und dass er ein Schaf haben wollte; denn wenn man sich ein Schaf wünscht, ist es doch ein Beweis dafür, dass man lebt – dann werden sie die Achseln zucken und euch als Kinder behandeln. Aber wenn ihr ihnen sagt: Der Planet, von dem er kam, ist der Planet B612, dann werden sie überzeugt sein und euch mit ihren Fragen in Ruhe lassen...Viel lieber hätte ich diese Geschichte begonnen wie ein Märchen. Am liebsten hätte ich so angefangen:

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------|--|
| α | Anti |
| ad | auffüllen auf |
| ALL | akute lymphoblastische Leukämie |
| AML | akute myeloische Leukämie |
| APC | Allophycocyanin |
| AS | Aminosäure |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| bp | Basenpaare |
| CA | engl. <u>c</u> onstitutive <u>a</u> ctive |
| CAE | Naphthol-AS-D-Chlorazetatesterase |
| CD | engl. <u>c</u> luster of <u>d</u> ifferentiation |
| CML | chronische myeloische Leukämie |
| CLL | chronische lymphatische Leukämie |
| CLP | engl. <u>c</u> ommon <u>l</u> ymphoid <u>p</u> rogenitor |
| CMP | engl. <u>c</u> ommon <u>m</u> yeloid <u>p</u> rogenitor |
| CSC | engl. <u>c</u> ancer <u>s</u> tem <u>c</u> ell |
| DMEM | engl. <u>D</u> ulbecco's <u>M</u> odified <u>E</u> agle <u>M</u> edium |
| DN | dominant negativ |
| DNA | engl. <u>d</u> esoxyribon <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid |
| dNTP | Desoxynukleosidtriphosphat |
| ECL | engl. <u>e</u> nhanced <u>c</u> hemo <u>l</u> uminescence |
| FAB | engl. <u>F</u> rench- <u>A</u> merican- <u>B</u> ritish |
| FACS | engl. <u>f</u> luorescence <u>a</u> ctivated <u>c</u> ell <u>s</u> orter |
| FBS | engl. <u>f</u> etale <u>b</u> ovine <u>s</u> erum, |
| GFP | engl. <u>g</u> reen <u>f</u> luorescent <u>p</u> rotein |
| GMP | engl. <u>G</u> ranulocyte- <u>m</u> acrophage- <u>p</u> rogenitor |
| H&E | Hämatoxylin-Eosin |
| HBS | engl. <u>h</u> epes- <u>b</u> uffered- <u>s</u> aline solution |
| HRP | engl. <u>h</u> orseradish <u>p</u> eroxidase |
| HSC | engl. <u>h</u> ematopoietic <u>s</u> tem <u>c</u> ell |
| IL | Interleukin |
| IRES | engl. <u>i</u> nternal <u>r</u> ibosomal <u>e</u> ntry <u>s</u> ite |
| iv | intravenös |

| | |
|------------|---|
| IVC | engl. <u>i</u> nternal <u>v</u> entriculation <u>c</u> age |
| kb | Kilobasenpaar |
| kDa | Kilodalton |
| kg | Kilogramm |
| KM | Knochenmark |
| l | Liter |
| LB | Luria Bertani |
| LSC | engl. <u>l</u> eukemic <u>s</u> tem <u>c</u> ell |
| LTR | engl. <u>l</u> ong <u>t</u> erminal <u>r</u> ep <u>e</u> at |
| M | Molar (mol / l) |
| MEP | engl. <u>M</u> egakaryocytic- <u>e</u> rythroid- <u>p</u> rogenitor |
| mg | Milligramm |
| MIG | <u>M</u> SCV- <u>I</u> HRES- <u>E</u> GFP |
| ml | Milliliter |
| µl | Mikroliter |
| MPD | engl. <u>m</u> yeloproliferative <u>d</u> isease |
| MPO | Myeloperoxidase |
| MPP | engl. <u>m</u> ultipotent <u>p</u> rogenitor |
| MSCV | engl. <u>m</u> urine <u>s</u> tem <u>c</u> ell <u>v</u> irus |
| NK | engl. <u>n</u> atural <u>k</u> iller cell |
| NOD / SCID | engl. <u>N</u> on- <u>o</u> bese <u>d</u> iabetic / <u>s</u> evere <u>c</u> ombined <u>i</u> mmunodeficient |
| PB | Peripheres Blut |
| PCR | engl. <u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> ea <u>ct</u> ion |
| PE | Phycoerythrin |
| P / S | Penicillin (50 U/ml) / Streptomycin (50 µg/ml) |
| RNA | engl. <u>r</u> ibonucleic <u>a</u> cid |
| RT | Raumtemperatur |
| SCF | engl. <u>s</u> tem <u>c</u> ell <u>f</u> actor |
| TdT | engl. <u>t</u> erminal <u>d</u> eoxynucleotidyl <u>t</u> ransferase |
| U | engl. <u>u</u> nit |
| UPM | Umdrehungen pro Minute |
| UV | ultraviolett |
| VCM | engl. <u>v</u> irus <u>c</u> ontaining <u>m</u> edium |
| WHO | engl. <u>W</u> orld <u>H</u> ealth <u>O</u> rganization |
| WT | Wildtyp |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-----------|---|----|
| 1 | Einleitung..... | 1 |
| 1.1 | Hämatopoese..... | 1 |
| 1.1.1 | Einführung..... | 1 |
| 1.1.2 | Hierarchie der normalen Hämatopoese | 1 |
| 1.2 | Wnt-Signaling..... | 3 |
| 1.2.1 | Lymphoid Enhancer Factor 1 (Lef-1) | 5 |
| 1.2.2 | Wnt-Signaling in der Hämatopoese | 6 |
| 1.2.3 | Lef-1 in der Hämatopoese | 8 |
| 1.3 | Die maligne Hämatopoese..... | 9 |
| 1.3.1 | Klassifizierung der Leukämien | 10 |
| 1.3.2 | Stammzellen, leukämische Stammzellen und das Krebs- Stammzellen-Modell | 12 |
| 1.3.3 | Wnt-Signaling in Leukämien | 17 |
| 1.3.4 | Lef-1 in Leukämien | 19 |
| 1.4 | Zielsetzung der Arbeit | 21 |
| 2 | Material und Methoden..... | 22 |
| 2.1 | Materialien | 22 |
| 2.1.1 | Laborausstattung | 22 |
| 2.1.2 | Verwendete Verbrauchsmaterialien | 23 |
| 2.1.3 | Zelllinien | 23 |
| 2.1.4 | DNA-Konstrukte | 24 |
| 2.1.5 | Oligonukleotide | 24 |
| 2.1.6 | Antikörper..... | 25 |
| 2.1.7 | Chemikalien, Enzyme, Zytokine, Lösungen | 26 |
| 2.1.7.1 | Chemikalien | 26 |
| 2.1.7.2 | Enzyme | 28 |
| 2.1.7.3 | Zytokine..... | 29 |
| 2.1.7.4 | Lösungen | 29 |
| 2.1.8 | Kits | 31 |
| 2.1.9 | Software..... | 31 |
| 2.2 | Methoden | 32 |
| 2.2.1 | Klonieren der Konstrukte | 32 |
| 2.2.2 | Bakterienkultur | 33 |
| 2.2.2.1 | Transformation der kompetenten <i>E. coli</i> Bakterien | 33 |
| 2.2.2.2 | Präparation der Plasmid-DNA..... | 33 |
| 2.2.2.2.a | Mini-Präparation..... | 33 |
| 2.2.2.2.b | Maxi-Präparation..... | 33 |
| 2.2.3 | Zellkultur | 34 |
| 2.2.3.1 | Transiente Transfektion | 34 |
| 2.2.3.2 | Herstellung einer stabilen Verpackungszelllinie | 35 |
| 2.2.3.3 | Test auf Virusproduktion | 36 |

| | | |
|---------|--|----|
| 2.2.4 | Tiere und Tierhaltung..... | 36 |
| 2.2.4.1 | Donormäuse..... | 36 |
| 2.2.4.2 | Rezeptormäuse..... | 36 |
| 2.2.4.3 | Haltung der Tiere | 37 |
| 2.2.5 | Knochenmarktransplantationsmodell..... | 37 |
| 2.2.5.1 | Überblick | 37 |
| 2.2.5.2 | Blutentnahme | 39 |
| 2.2.5.3 | Knochenmarkpunktion | 39 |
| 2.2.5.4 | Tötung..... | 40 |
| 2.2.5.5 | Sektion | 40 |
| 2.2.5.6 | Durchflusszytometrische Immunphänotypisierung..... | 41 |
| 2.2.6 | Zellbasierte Assays..... | 41 |
| 2.2.6.1 | <i>Ex vivo</i> Proliferation | 41 |
| 2.2.6.2 | 'Colony Forming Unit Spleen' Assay (CFU-S)..... | 42 |
| 2.2.7 | Molekularbiologische Methoden | 42 |
| 2.2.7.1 | DNA-Verdau mittels Restriktionsenzymen | 42 |
| 2.2.7.2 | Ligation von DNA-Fragmenten..... | 43 |
| 2.2.7.3 | Isolierung von mRNA aus Zellen..... | 43 |
| 2.2.7.4 | Reverse Transkription: Synthese von cDNA..... | 43 |
| 2.2.7.5 | Isolierung von genomischer DNA aus Zellen | 44 |
| 2.2.7.6 | Polymerase-Kettenreaktion (PCR)..... | 44 |
| 2.2.7.7 | Agarose-Gelelektrophorese | 45 |
| 2.2.7.8 | Southern-Blot | 45 |
| 2.2.8 | Proteinbiochemische Methoden..... | 46 |
| 2.2.8.1 | Präparation von Proteinlysaten | 46 |
| 2.2.8.2 | Bestimmung von Proteinkonzentrationen mittels des Bradford-Assays..... | 46 |
| 2.2.8.3 | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese..... | 47 |
| 2.2.8.4 | Western Blot..... | 47 |
| 2.2.8.5 | Strippen der Nitrocellulose-Membran..... | 48 |
| 3 | Ergebnisse | 49 |
| 3.1 | Lef-1 wird in der Hämatopoese sowohl in myeloischen und lymphatischen als auch in frühen hämatopoetischen Stammzellen exprimiert | 49 |
| 3.2 | Nachweis der Proteinexpression der Konstrukte Lef-1 WT und Lef-1 CA..... | 49 |
| 3.3 | Transduktion von 5-FU behandeltem murinem Knochenmark..... | 50 |
| 3.4 | Die Überexpression von Lef-1 in hämatopoetischen Vorläuferzellen erhöht die Frequenz an kurzzeitrepopulierenden Stammzellen <i>in vitro</i> | 52 |
| 3.5 | Konstitutiv aktives Lef-1 zeigt ein verstärktes Potential hämatopoetischer Vorläuferzellen zur Rekonstitution des Knochenmarks <i>in vivo</i> | 53 |
| 3.6 | Überexpression von Lef-1 WT und Lef-1 CA führt zu einer schwerwiegenden Störung der normalen Hämatopoese <i>in vivo</i> | 54 |
| 3.6.1 | Überexpression von Lef-1 WT und Lef-1 CA erhöht den Anteil myeloischer Vorläuferzellen in peripherem Blut..... | 54 |
| 3.6.2 | Überexpression von Lef-1 WT und Lef-1 CA reduziert den Anteil an <i>Sca1</i> ⁺ -Zellen in peripheren Blut | 55 |
| 3.6.3 | Überexpression von Lef-1 WT und Lef-1 CA reduziert den Anteil an lymphatischen Zellen in peripheren Blut | 56 |

| | | |
|---------|---|----|
| 3.6.3.1 | Der Anteil an B-Zellen ist in Lef-1 WT und Lef-1 CA transduzierten Tieren erheblich verringert | 56 |
| 3.6.3.2 | Die Bildung der T-Zellen ist in Lef-1 WT transduzierten Mäusen gestört und in Lef-1 CA transduzierten Tieren nahezu eliminiert | 57 |
| 3.7 | Überexpression von Lef-1 WT und Lef-1 CA führt zu einer Inversion des Verhältnisses von lymphatischen und myeloischen Zellen in peripherem Blut..... | 58 |
| 3.8 | Die Expression von Lef-1 WT und Lef-1 CA verursacht hämatologische Erkrankungen in einem Großteil der transduzierten Tiere | 59 |
| 3.8.1 | Erkrankte Tiere weisen Leukozytose und Anämie auf..... | 61 |
| 3.8.2 | Ein Teil der erkrankten Tiere zeigt eine Splenomegalie..... | 62 |
| 3.8.3 | Leukämische Blasten erkrankter Lef-1 WT- und Lef-1 CA-Mäuse infiltrieren in verschiedene Organe | 63 |
| 3.9 | Detaillierte Untersuchungen identifizieren sowohl akute lymphatische als auch myeloische Leukämien..... | 64 |
| 3.9.1 | Morphologische Analyse..... | 64 |
| 3.9.2 | Durchflusszytometrische Charakterisierung..... | 66 |
| 3.9.3 | Histopathologische Auswertung..... | 68 |
| 3.10 | Durch Lef-1 hervorgerufene Leukämien sind monoklonalen Ursprungs..... | 70 |
| 3.11 | Die Analyse der leukämischen Blasten weist auf eine Hierarchie innerhalb der malignen Zellpopulation hin | 71 |
| 3.11.1 | Leukämische Blasten der Lef-1 transduzierten Mäuse zeigen teilweise die Koexpression von lymphatischen und myeloischen Markern..... | 71 |
| 3.11.2 | Zellen erkrankter Mäuse proliferieren <i>ex vivo</i> unter Zugabe von IL3..... | 73 |
| 3.11.3 | Das proliferative Potential ist in der B220 ⁺ Mac1 ⁻ Gr1 ⁻ Population erhöht | 74 |
| 3.11.4 | Das Vermögen für die dauerhafte Proliferation auf der Einzelzellebene ist bei der B220 ⁺ Mac1 ⁻ Gr1 ⁻ Population deutlich gesteigert | 75 |
| 3.11.5 | B220 ⁺ Mac1 ⁻ Zellen regenerieren alle drei Subpopulationen (B ⁺ M ⁻ , BM ⁺⁺ , B ⁻ M ⁺) <i>ex vivo</i> | 76 |
| 3.11.6 | Diese Subpopulationen weisen klonale DJ _H Rearrangements auf | 78 |
| 3.11.7 | DJ _H Rearrangements können auch in myeloischen Zellen leukämischer Mäuse nachgewiesen werden | 79 |
| 3.11.8 | Leukämische Zellen exprimieren weitere charakteristische Oberflächenmarker für frühe B-Zell-Vorläuferzellen | 81 |
| 3.11.9 | Der Transkriptionsfaktor C/ebp α ist in den Subpopulationen B ⁺ MG ⁻ , BMG ⁺⁺⁺ und B ⁻ MG ⁺ erkrankter Tiere exprimiert | 82 |
| 3.11.10 | Das Transkriptionsprofil von Blastenzellen erkrankter Mäuse mit unterschiedlicher Diagnose zeigt Charakteristika sowohl lymphatischer als auch myeloischer Ausrichtung auf | 83 |
| 3.11.11 | B220 ⁺ Mac1 ⁻ Gr1 ⁻ Zellen weisen morphologisch einen unreifen Phänotyp auf und zeigen die höchste Frequenz an leukämischen Stammzellen in vivo..... | 85 |
| 4 | Diskussion..... | 88 |
| 4.1 | Lef-1 wird in der frühen Hämatopoese exprimiert und beeinflusst die Frequenz kurzzeitpopulierender Stammzellen | 88 |
| 4.2 | Überexpression von Lef-1 führt zu einer erheblichen Störung der normalen Hämatopoese und induziert verschiedene hämatologische Erkrankungen | 90 |

| | | |
|-----|--|-----|
| 4.3 | Die von Lef-1 induzierten Krankheiten sind monoklonalen Ursprungs | 93 |
| 4.4 | Maligne Zellen der durch Lef-1 hervorgerufenen Erkrankungen weisen biphänotypische Charakteristika auf und könnten durch eine Trans- differenzierung lymphatischer Zellen in myeloische Zellen entstanden sein | 94 |
| 5 | Ausblick..... | 100 |
| 6 | Zusammenfassung..... | 103 |
| 7 | Abstract..... | 105 |
| 8 | Literaturverzeichnis | 106 |
| 9 | Danksagung | 116 |
| 10 | Curriculum vitae | 118 |

1 Einleitung

1.1 Hämatopoese

1.1.1 Einführung

Hämatopoese ist ein äußerst komplexer Prozess, in dem die Bildung, Reifung und Differenzierung von Blutzellen unter Zuhilfenahme verschiedener spezifischer Transkriptions- und Wachstumsfaktoren sowie deren Rezeptoren gesteuert wird. Abstammend aus dem Mesoderm, findet die Hämatopoese embryonal im Dottersack und in der Leber, im adulten Menschen schließlich hauptsächlich im Knochenmark statt. Das in der Hämatopoese gebildete Blut wird in zwei Klassen von Zellen unterteilt, die lymphatischen und die myeloischen Blutzellen, beide mit verschiedensten spezifischen Funktionen und Morphologien, die essentiell für das Überleben des Individuums sind. Zu den lymphatischen Zellen werden T-, B- und NK-Zellen gerechnet, deren Hauptaufgabe das Erkennen, Memorieren und Entfernen körperfremder und auch entarteter körpereigener Stoffe und Zellen ist. Myeloische Zellen umfassen rote Blutkörperchen (Erythrozyten), welche die Sauerstoffversorgung regeln, Leukozyten (Granulozyten und Makrophagen) für das angeborene Immunsystem sowie Blutplättchen (Thrombozyten) für eine intakte Blutgerinnung. Ähnlich unterschiedlich wie die Aufgaben ist auch die Lebensdauer der verschiedenen Zelltypen: Während bestimmte T-Zellpopulationen über Jahre im Körper verweilen können, bleiben Erythrozyten bis zu 120 Tage am Leben, bevor sie vor allem in der Milz und teilweise in der Leber abgebaut werden. Leukozyten hingegen überleben in der Regel 8-12 Tage, einige neutrophile Granulozyten lediglich 6-8 Stunden. Somit ist die Hämatopoese ein komplexes regulatorisches System, in dem jede Minute über 100 Millionen Zellen neu gebildet und abgebaut werden. Um dieses Gleichgewicht, welches durch Blutungen, Infektionen oder Wunden zwar verändert, aber nicht außer Kontrolle geraten darf, aufrecht zu erhalten, bedarf es eines perfekt abgestimmten Systems, welches nur durch konzertierte und streng regulierte Prozesse einwandfrei abläuft.

1.1.2 Hierarchie der normalen Hämatopoese

Sämtliche Blutzellen des hämatopetischen Systems entstammen einer kleinen Zellpopulation, den hämatopoetischen Stammzellen ('hematopoietic stem cells', HSC). Diese HSCs versorgen den Organismus lebenslang mit sämtlichen Blutzellen durch die Fähigkeit des so genannten 'self-renewal', d.h. dem Vermögen, sich unbegrenzt zu teilen

und vermehren, sowie der Fähigkeit, sich in jegliche hämatopoetische Zelltypen zu differenzieren (Osawa, 1996). Die Differenzierung erfolgt dabei stufenweise und hierarchisch über verschiedene Vorläuferzellen, die aus den HSCs gebildet werden. Aus langzeit-repopulierenden Stammzellen ('long-term-HSC', LT-HSC) werden über kurzzeit-repopulierende Stammzellen ('short-term-HSC', ST-HSC) multipotente Vorläuferzellen (MPP) gebildet, deren Potential für das 'self-renewal' bereits eingeschränkt ist. Diese MPPs generieren Progenitorzellen der beiden Klassen, so genannte CMPs ('common myeloid progenitor', myeloische Vorläuferzelle) und CLPs ('common lymphoid progenitor', lymphatische Vorläuferzelle), welche bereits auf die jeweiligen Linien (myeloische Zellen/lymphatische Zellen) begrenzt sind, und deren Differenzierungspotential somit eingeschränkt ist. Diese Zellen bilden ihrerseits noch unreife, aber schon weitgehend determinierte Zellen, aus welchen in einem letzten Schritt ausgereifte, vollständig differenzierte funktionsfähige Zellen entstehen (Weissman, 2000). Einen Überblick über den Ablauf und die Hierarchie der normalen Hämatopoese gibt Abbildung 1.1.

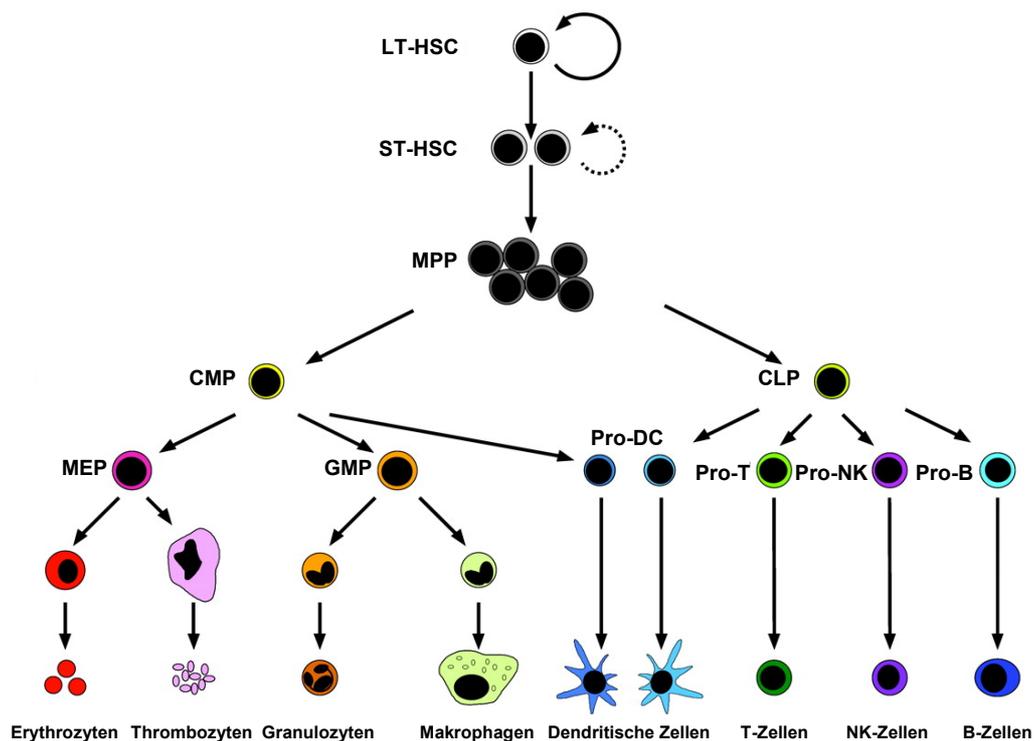


Abb. 1.1: Hierarchie der physiologischen Hämatopoese: Aus hämatopoetischen Stammzellen (LT-HSCs, ST-HSCs) gehen multipotente Vorläuferzellen hervor (MPPs), die linienspezifische Progenitorzellen bilden (CMPs, CLPs). Über weitere Vorläuferzellen werden sämtliche reife Zellen des hämatopoetischen Systems gebildet (abgeleitet aus (Passegue, 2003)).

Mit jedem Schritt der Differenzierung verlieren die Zellen in der normalen Hämatopoese einen Teil ihrer Pluripotenz durch irreversible Reifungsvorgänge, die sich auch in stark veränderten, für den jeweiligen Zelltypus spezifischen Genexpressionsmustern ausdrücken (Miyamoto, 2002). Diese veränderten Genexpressionsmuster sind das Ergebnis eines komplexen Zusammenspiels verschiedener Signaltransduktionskaskaden, die je nach Zelltyp unterschiedlich aktiviert werden. Diese Kaskaden entscheiden über das Schicksal der Zelle und steuern dabei u.a. Ruhephasen, Proliferation, Differenzierung oder den programmierten Zelltod ('Apoptose'). Einige der bisher erforschten Signalwege, darunter der Wnt-, Notch- und Hedgehog-Signalweg, haben auch in der Embryogenese bedeutende Funktionen und zeigen beispielhaft Ähnlichkeiten in der Entwicklung der verschiedenen Klassen von Stammzellen und deren fortschreitender Differenzierung auf. Das hämatopoetische System gehört dabei zu den experimentell am besten zugänglichen Modellen und gilt aufgrund großer Fortschritte in der Charakterisierung der einzelnen Stufen der hämatopoetischen Ontogenese als das bisher am genauesten studierte System (Huntly und Gilliland, 2005a).

1.2 Wnt-Signaling

Signaltransduktionskaskaden dienen der Zelle unter anderem zur Kommunikation mit dem umliegenden Gewebe. Bestimmte Signale werden aus dem extrazellulären Raum über die Membran ins Zellinnere und weiter in den Zellkern übertragen und führen zur Aktivierung oder Repression bestimmter Gene und damit zu einer 'Antwort' der Zelle. Der in der Evolution hochkonservierte Wnt-Signalweg ist einer der wichtigsten und am häufigsten genutzte Weg zur Übertragung von Informationen in das Zellinnere (Nusse, 2005). Dabei spielt er eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung vieler Organsysteme sowie bei verschiedenen zellulären Vorgängen wie Proliferation, Differenzierung, Apoptose, Zellpolarität und Zellbeweglichkeit (He, 2003, Staal und Clevers, 2005).

Bei Abwesenheit der aus der Familie der sezernierten Glykoproteine stammenden WNT-Proteine ist einer der zentralen Schaltstellen, das Protein β -catenin, für die Degradation vorbestimmt. Dies geschieht durch einen Multiprotein-Zerstörungskomplex, der zumindest aus den Proteinen AXIN, APC sowie den Serin/Threonin-Kinasen CK1 und GSK3 β besteht. Dieser Komplex bindet und phosphoryliert β -catenin an Serin- und Threoninresten im N-Terminus, was zur Erkennung und zur Ubiquitinierung von β -catenin durch das Protein β -TRCP führt. Die Folge dieser Ubiquitinierung ist der anschließende Abbau von β -catenin im Proteasom. Im Zellkern sind unterdessen die Transkriptionsfaktoren der

LEF/TCF-Familie an Repressoren der Groucho-Proteinfamilie gebunden und daher inaktiv.

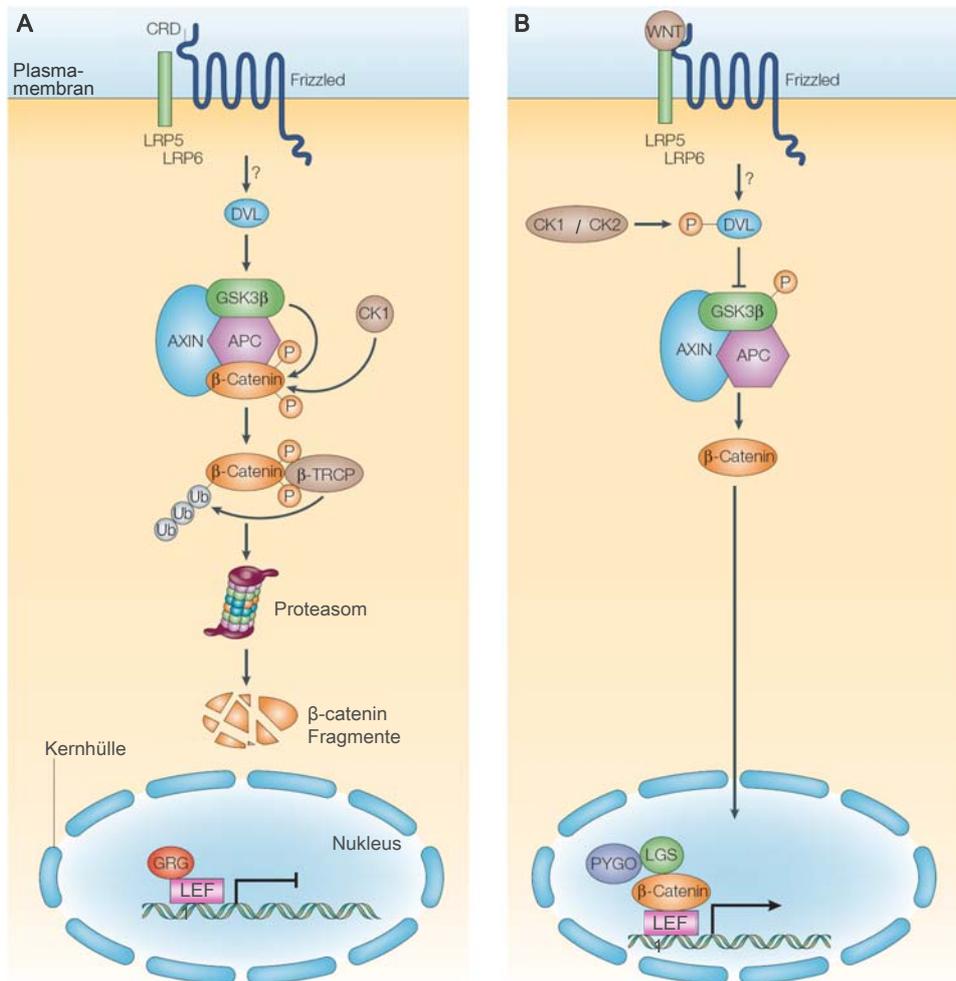


Abb. 1.2: Überblick über den Wnt Signalweg: A) 'Off-State': Bei Abwesenheit von WNT Proteinen verbindet sich β -catenin mit einem Multiprotein-Zerstörungskomplex, der unter anderem aus den Proteinen AXIN (Axis Inhibitor), APC (Adenomatous Poliposis Coli) sowie den Serin/Threonin Kinasen CK1 (Casein Kinase 1) und GSK3 β (Glykogen-Synthase-Kinase 3 β) besteht. β -catenin wird durch CK1 und GSK3 β phosphoryliert und dadurch von β -TRCP (β -Transducin-Repeat-Containing Protein) erkannt, was zur Ubiquitinierung und damit zur Degradierung im Proteasom führt. Mitglieder der Lef (Lymphoid Enhancer Factor) / Tcf (T-Cell Factor) Familie binden unterdessen an Repressoren aus der Familie der Groucho Proteine und sind daher inaktiv. B) 'On-State': WNT-Proteine binden an Frizzled Rezeptoren sowie an Korezeptoren aus der Familie der LRP (Low-Density-Lipoprotein-Receptor-Related)-Proteine. Diese Bindung bewirkt eine Inaktivierung von GSK3 β durch DVL (Dishevelled). Daraufhin wandert β -catenin- vermutlich in unphosphorylierter Form- in den Nukleus, bindet an LEF/TCF Proteine, um Zielgene zu aktivieren (modifiziert nach Staal und Clevers, 2005).

Eine Aktivierung des Signalweges findet statt, wenn eines der 19 bisher beschriebenen WNT-Proteine an Rezeptoren der Frizzled-Proteinfamilie sowie an deren Korezeptoren LRP5/6 aus der Familie der LDL-('Low Density Lipoprotein') Rezeptorfamilie bindet. Die anschließende Inaktivierung des Zerstörungskomplexes ist ein bisher nur teilweise verstandener Vorgang, an dem eine direkte Interaktion von AXIN und LRP5/6 und / oder eine Inaktivierung von GSK3 β mit Hilfe des Proteins Dishevelled beteiligt ist (Reya und Clevers, 2005). Durch diese Inaktivierung wird β -catenin nicht phosphoryliert, reichert sich aufgrund dieser Stabilisierung im Zytoplasma an und wandert anschließend in den Zellkern. Dort verdrängt es die Groucho-Proteine, bindet an den N-terminalen Bereich der LEF/TCF-Proteine und kann so mit diesen Transkriptionsfaktoren Aktivierungskomplexe bilden (Staal und Clevers, 2005). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass durch eines der WNT-Signalproteine eine vorübergehende Transkription von LEF/TCF Zielgenen ausgelöst wird. Einen Überblick über das Wnt-Signaling zeigt Abbildung 1.2.

1.2.1 Lymphoid Enhancer Factor 1 (Lef-1)

Der Transkriptionsfaktor 'Lymphoid Enhancer Factor 1' (Lef-1) ist ein 54 kDa großes Protein der Lef/Tcf-Proteinfamilie, ihrerseits eine Unterfamilie der High-Mobility-Group (HMG) Proteine. Diese HMG-Proteine haben alle eine in der Evolution hochkonservierte DNA-Bindungsdomäne mit dem Sequenzmotiv CTTTG^A_T^A_T gemein, der so genannten HMG-Domäne (Giese, 1991). Neben Lef-1 bilden T-Zell Faktor 1, 3 und 4 die übrigen Mitglieder der Lef/Tcf Familie. Lef-1 ist in der Maus auf Chromosom 3 und im Menschen auf Chromosom 4 lokalisiert und mit einer Homologie von 98 % zwischen beiden Proteinen hochkonserviert. Bisher konnten vier Domänen des Lef-1 Proteins funktionell charakterisiert werden. Mit Hilfe der C-terminalen HMG-Domäne bindet Lef-1 sequenzspezifisch an die DNA. Ebenfalls C-terminal liegt das Signal für den Transport in den Zellkern ('nuclear localization signal', NLS). Am N-Terminus befindet sich die β -catenin Bindungsdomäne, die β -catenin bindet. Dabei entsteht ein aktivierender Proteinkomplex, der Zielgene wie etwa c-myc hochreguliert (He, 1998). Dazwischen liegt eine kontextabhängige Aktivierungs- oder Repressionsdomäne, über die bisher – mit Ausnahme der mögliche Bindung des Groucho-Proteins – noch wenig bekannt ist (Giese und Grosschedl, 1993, Waterman, 2004). Eine Übersicht über die Primärstruktur von Lef-1 zeigt Abbildung 1.3.

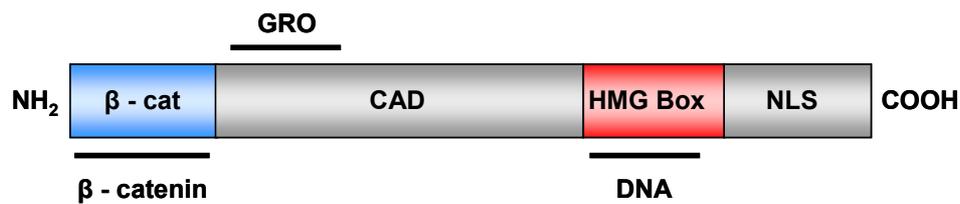


Abb. 1.3: Primärstruktur des Proteins Lef-1: β-cat: β-catenin-Bindungsdomäne, GRO: Groucho-Interaktionsdomäne, CAD: kontextabhängige Aktivierungsdomäne, HMG Box: DNA-Bindungsdomäne, NLS: 'nuclear localization signal' (Signal zum Einschleusen in den Zellkern).

Lef-1 wird oft auch als Transkriptionsmediator bezeichnet, da es abhängig von den Bindungspartnern sowohl als Repressor als auch als Aktivator auftreten kann (Bienz, 1998). Lef-1 wirkt dabei als 'Architekt' der DNA, indem es eine starke Krümmung der kleinen Furche der DNA bis zu 90° verursachen kann. So steuert Lef-1 sowohl Repression als auch Aktivierung von Zielgenen, indem es die DNA an angrenzenden Regionen mehr oder weniger zugänglich für andere Transkriptionsfaktoren macht (Giese, 1992).

Lef-1 wurde erstmals in lymphatischem Gewebe nachgewiesen (Travis, 1991, Waterman, 1991). Daneben spielt Lef-1 eine bedeutende Rolle in der Embryogenese, wo es in verschiedenen Geweben exprimiert wird, später jedoch in vielen Geweben nach der Ausdifferenzierung abgeschaltet wird. Lef-1 'Knock-out' Mäuse sterben postnatal durch schwere Störungen in der Organbildung (van Genderen, 1994). Interessanterweise ist Lef-1 in adulten Lebewesen in vielen Geweben exprimiert, in denen stetes Zellwachstum durch adulte Stammzellen benötigt wird, unter anderem im Knochenmark (Porfiri, 1997, Reya, 2000, Zhou, 1995).

1.2.2 Wnt-Signaling in der Hämatopoese

Hämatopoetische Stammzellen, die die Fähigkeit besitzen, sich in sämtliche Blutzellen zu differenzieren, sind die mit am genauesten und intensivsten erforschten Stammzellen sowohl im murinen als auch im humanen System. Bis zu einer funktionell eindeutigen Charakterisierung dieser Zellen ist es jedoch noch ein weiter Weg. Der Wnt-Signalweg, der wie unter 1.2 erwähnt eine bedeutende Rolle in der Embryogenese spielt, galt lange als in der frühen Hämatopoese unbeteiligt. In der späteren Differenzierung, vor allem in lymphatischen Geweben, konnten jedoch bereits einige Funktionen festgestellt werden. So zeigen Tcf-1 'Knock-out' Mäuse eine erhebliche Reduktion an Thymuszellen verschiedener Reifegrade, die jedoch nicht durch eine Blockierung, sondern durch eine verringerte

Proliferation von Vorläuferzellen der T-Lymphozyten stattfindet (Schilham, 1998, Verbeek, 1995).

Das Protein β -catenin scheint ebenfalls eine Rolle in der lymphatischen Entwicklung zu spielen, jedoch gibt es hier widersprüchliche Ergebnisse. Während Xu et al. eine Beeinträchtigung der T-Zell-Entwicklung bei einer Deletion von β -catenin nachweisen konnten (Xu, 2003), zeigte eine Cre-loxP vermittelte Inaktivierung von β -catenin in Knochenmark-Vorläuferzellen keine Veränderungen, weder der normalen Hämatopoese noch der Lymphopoese (Cobas, 2004).

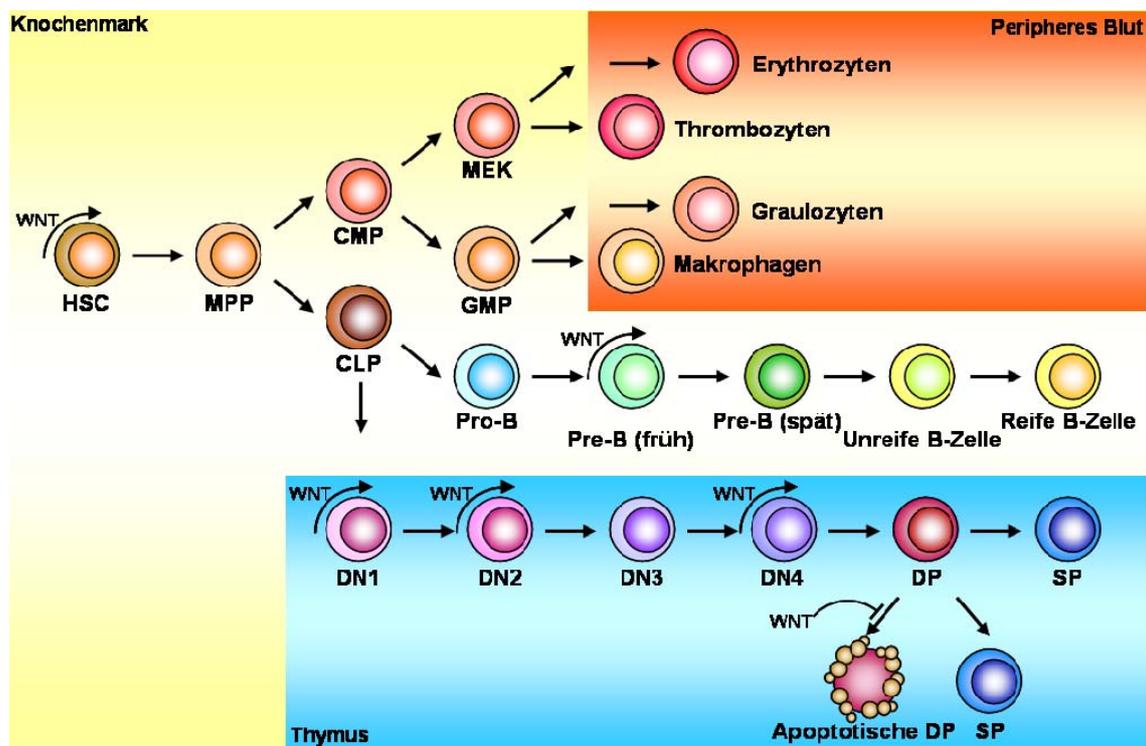


Abb. 1.4: Wnt-Signaling in der Hämatopoese: runde Pfeile stehen für eine Aktivierung, runde Linien mit flachem Ende stehen für eine Inhibition; HSC: Hämatopoetische Stammzelle; MPP: Multipotenter Progenitor; CLP: Common Lymphoid Progenitor; CMP: Common Myeloid Progenitor; MEK: Megakaryozyten-Erythrozyten-Progenitor; GMP: Granulozyten-Makrophagen-Progenitor; Pro/Pre-B: Vorläufer B-Zellen (Pro-B: $B220^+CD43^+$; Pre-B: $B220^+CD43^-$) DN1/2/3/4: T-Zell-Vorläuferzellen, angelehnt an ihre Färbung auf die Vorläufer-T-Zell spezifischen Antikörper CD44 und CD25 (DN1: $CD44^+CD25^-$; DN2: $CD44^+CD25^+$; DN3: $CD44^-CD25^+$; DN4: $CD44^-CD25^-$); DP: Doppelt positive Vorläufer T-Zelle ($CD4^+CD8^+$); SP: einfach positive reife T-Zelle ($CD4^+$ oder $CD8^+$; abgeleitet aus Staal und Clevers, 2005).

Wnt-Proteine werden im Thymus vor allem von den Epithelzellen sezerniert und sind ihrerseits essentiell für die Bildung reifer T-Zellen (Pongracz, 2003, Staal, 2001). Wenige Informationen sind über den Einfluss des Wnt-Signaling in der B-Zell-Entwicklung bekannt. Außer der Rolle von Lef-1 (siehe 1.2.3) konnte bisher lediglich eine reduzierte Anzahl an B-Zell-Progenitoren in Frizzled-9 'Knock-out' Mäusen aufgezeigt werden (Ranheim, 2005). Über die Rolle des Wnt-Signaling in der Myelopoese ist bisher nichts bekannt.

Reya et al. konnte jedoch 2003 zeigen, dass Wnt-Signaling im 'self-renewal' hämatopoetischer Zellen eine direkte Rolle spielt (Reya, 2003). Die Überexpression von konstitutiv aktivem β -catenin führte in murinen hämatopoetischen Stammzellen zu einem erhöhten 'self-renewal', während die Anwesenheit von Wnt-Signaling Inhibitoren sowohl das Stammzellwachstum *in vitro* als auch die Rekonstitution von HSCs *in vivo* reduzierte. Ebenfalls wurden durch die Expression von konstitutiv aktivem β -catenin bereits für das 'self-renewal' wichtige bekannte Gene wie HoxB4 und Notch1 hochreguliert.

Zuvor konnten bereits andere Gruppen nachweisen, dass Wnt-Proteine die Proliferation hämatopoetischer Progenitorzellen / Stammzellen anregen, ohne dabei die Differenzierung zu intensivieren (Austin, 1997, Murdoch, 2003, Van Den Berg, 1998). Diese Ergebnisse belegen eindeutig, dass das Wnt-Signaling essentiell sowohl für die Regulierung der frühen Hämatopoese als auch für die Differenzierung in reife Blutzellen ist. Abbildung 1.4 gibt einen Überblick über die bisher bekannten Funktionen des Wnt-Signaling in der Hämatopoese.

1.2.3 Lef-1 in der Hämatopoese

Auch über die Funktionen von Lef-1 in der Hämatopoese ist bisher nicht viel bekannt. Erstmals berichteten Travis und Kollegen 1991 über eine Rolle dieses Transkriptionsfaktors in lymphatischem Gewebe (Travis, 1991). Dabei konnten sie eine Expression in transformierten Pre-B Zelllinien und T-Lymphozyten nachweisen. Des Weiteren zeigten sie, dass Lef-1 ein TCR α -Verstärkerelement binden und regulieren kann und somit eine Bedeutung in der T-Zell Differenzierung hat.

Ein Lef-1 'Knock-out' Mausmodell ist postnatal aufgrund drastischer Störungen in der Bildung verschiedener Organe letal, zeigt allerdings keinerlei ersichtliche Defekte in der Lymphopoese und eine normale TCR α Expression (van Genderen, 1994). Die Ursache liegt hierbei höchst wahrscheinlich in einer ausgeprägten Redundanz zwischen den stark homologen Transkriptionsfaktoren Lef-1 und Tcf-1 in der T-Zell Entwicklung. Doppel-Mutations-Studien von Lef-1 und Tcf-1 zeigen diese Redundanz sowohl in der Entwicklung

von T-Zellen als auch in der Zelldifferenzierung natürlicher Killerzellen ('NK-Zellen'; Held, 2003, Okamura, 1998). In der B-Zell Entwicklung wurde nachgewiesen, dass Lef-1 in einem frühen Stadium, den Pro-B Zellen, aber nicht in späteren Stufen der B-Lymphopoese auf mRNA Ebene exprimiert wird. Ferner konnte durch die Untersuchung von Lef-1 defizienten Pro-B Zellen gezeigt werden, dass Lef-1 essentiell für die Proliferation und das Überleben, nicht jedoch für die Differenzierung dieser Zellen ist (Reya, 2000).

Über die Rolle von Lef-1 in der Myelopoese gibt es bis heute noch keine publizierten Daten. Erste Hinweise lieferte J. Skokowa auf dem letzten jährlichen Kongress der Amerikanischen Gesellschaft für Hämatologie (ASH), wo sie eine Expression von Lef-1 in Pro- und Metamyelozyten postulierte (Skokowa, ASH 2005).

1.3 Die maligne Hämatopoese

Leukämien sind Erkrankungen des blutbildenden Systems, die durch Veränderung und Deregulation verschiedener Signaltransduktionskaskaden in hämatopoetischen Zellen entstehen und meist durch Anämie, Thrombozytopenie und Leukozytopenie gekennzeichnet sind. Wenn das fein abgestimmte Gleichgewicht zwischen 'self-renewal' und Differenzierung in der normalen Hämatopoese aus den Fugen gerät, können Leukämien entstehen, welche stets durch eine klonale Anreicherung unreifer Blastenzellen charakterisiert sind, denen die Fähigkeit zur terminalen Differenzierung in funktionelle Zellen abhanden gekommen ist (McCulloch, 1979, Passegue, 2003, Warner, 2004). Trotz eines sehr heterogenen Erscheinungsbildes von Leukämien ist dem malignen Klon der unterschiedlichen Leukämieformen eine gesteigerte oder wiedererlangte Fähigkeit des 'self-renewals', eine verstärkte Proliferation, ein verlängertes Zellüberleben, eine Blockierung der Differenzierung, Erhaltung der telomeren DNA sowie eine höhere Resistenz gegenüber Apoptose gemeinsam. Wie in den meisten Krebserkrankungen ist die Entstehung der malignen Zellen in Leukämien ein mehrstufiger Prozess, dem der Erwerb verschiedener genetischer Veränderungen von Punktmutationen einzelner Gene bis hin zu Chromosomentranslokationen und Deletionen ganzer Chromosomenabschnitte vorausgeht. Diese Veränderungen haben meist gemein, dass sie mehr als einen der oben genannten Mechanismen stören (Hanahan und Weinberg, 2000). So ist eine Störung des Differenzierungsprozesses zwar ein Schlüsselereignis in der Leukämogenese, reicht aber nicht aus, um den Phänotyp einer Leukämie zu induzieren. Dazu bedarf es eines weiteren Ereignisses, welches den leukämischen Klon mit einem proliferativen Vorteil gegenüber

gesunden hämatopoetischen Zellen ausstattet. Diese Hypothese des so genannten 'Two-Hit'-Modells (Dash und Gilliland, 2001) wurde in verschiedenen transgenen oder Transplantations-Mausmodellen bestätigt. Während für die Störung der Differenzierung oft ein Fusionsgen unter Beteiligung eines Transkriptionsfaktors (z.B. AML1/ETO oder PML/RAR α) verantwortlich ist (de Guzman, 2002, Grisolano, 1997), ist der proliferative Effekt häufig auf aktivierende Mutationen in Signalproteinen (z.B. FLT3 oder RAS) zurückzuführen (Kelly, 2002b). Beide Veränderungen für sich ergeben lediglich eine geringe Beeinträchtigung der normalen Hämatopoese, kombiniert verursachen sie jedoch das Auftreten akuter Leukämien (Kelly, 2002a, Schessl, 2005).

1.3.1 Klassifizierung der Leukämien

Leukämien sind eine äußerst heterogene Gruppe von Erkrankungen und deren Einteilung erfolgt nach verschiedenen Kriterien. Je nach Verlauf ist eine grobe Unterteilung in chronische und akute Leukämien gängig, welche wiederum je nach beteiligten Zelltypen in myeloische und lymphatische Leukämien unterteilt werden. Während chronische Leukämien im Anfangsstadium über mehrere Jahre oft keine oder nur geringe Symptome aufweisen, sind akute Leukämien lebensbedrohlich und unbehandelt in sehr kurzer Zeit, von wenigen Tagen bis zu einigen Monaten, tödlich.

Eine erste Klassifizierung findet mittels zytomorphologischer und zytochemischer Analyse statt. In den letzten Jahren wird jedoch zusätzlich eine zytogenetische und molekularbiologische Analyse durchgeführt, um den Subtyp der Erkrankung genauer zu definieren und somit Therapieansätze zu spezifizieren und Überlebenschancen erhöhen zu können. Die akute myeloische Leukämie (AML) wird mittels der FAB (French-American-British)-Klassifizierung diagnostiziert, welche AML aufgrund der Stufe der Differenzierung, des Reifegrads und der hämatopoetischen Zellzugehörigkeit in acht verschiedene Subtypen (M0 bis M7, siehe Abb. 1.5 A) unterteilt (Bennett, 1985). Die FAB-Klassifizierung wurde in die neue WHO-Klassifizierung integriert, welche eine akute Leukämie bei einem Blastenanteil von über 20 % im Knochenmark prognostiziert und neben der Zellmorphologie auch den Immunphänotyp und die Zytogenetik integriert (Brunner, 2003, Harris, 1999). Es werden vier Kategorien der AML unterschieden, welche in Abbildung 1.5 B wiedergegeben sind. Neben den akuten myeloischen Leukämien existieren noch drei weitere Hauptgruppen myeloischer Erkrankungen, zu denen myeloproliferative Erkrankungen und Myelodysplasien gerechnet werden (Abb. 1.5 C).

| (A) FAB-Klassifikation der AML | |
|---------------------------------------|---|
| Kategorie | Subtyp |
| M0 | AML ohne Ausreifung |
| M1 | AML mit minimaler Ausreifung |
| M2 | AML mit Ausreifung |
| M3 | Akute Promyelozytenleukämie |
| M4 | Akute myelomonozytäre Leukämie |
| M4Eo | Akute myelomonozytäre Leukämie mit Eosinophilie |
| M5a | Akute Monoblastenleukämie |
| M5b | Akute Monozytenleukämie |
| M6 | Akute Erythroleukämie |
| M7 | Akute Megakaryoblastenleukämie |

| (B) WHO-Klassifikation der AML | |
|--|---|
| Kategorie | Charakteristika |
| AML mit typischen genetischen Aberrationen | AML1 / ETO (t(8;21)(q22;q22)) CBFβ / MYH11 (inv(16)(p13q22)) PML / RARα (t(15;17)(q22;q12)) MLL / XX Rearrangiert (11q23 Aberration) |
| AML mit einer Mehrliniendysplasie | AML ohne vorhergehendes MDS AML nach MDS |
| AML & MDS therapieassoziiert | AML nach Alkylantien AML nach Topoisomeraseinhibitoren Typ II |
| AML, in den o.g. Gruppen nicht kategorisiert | Klassifizierung nach FAB M0-M7 |

| (C) WHO-Klassifikation anderer myeloischer Erkrankungen | |
|--|--|
| Kategorie | Charakteristika |
| Myeloproliferative Erkrankungen (MPD) | Chronische myeloische Leukämie (CML), Philadelphia-Chromosom positiv (BCR / ABL; (t(9;22)(q34;q11)) Chronische neutrophile Leukämie Hypereosinophiles Syndrom Osteomyelofibrose Polyzythämia vera Essentielle Thrombozythämie Myeloproliferation, nicht anders klassifiziert |
| Myelodysplastische / myeloproliferative Erkrankungen | Chronische myelomonocytäre Leukämie Atypische chronische myeloische Leukämie Juvenile myelomonozytäre Leukämie |
| Myelodysplasien (MDS) | Refraktäre Anämien Refraktäre Zytopenie 5q-Deletionen Myelodysplastisches Syndrom, nicht anders klassifiziert |

Abb. 1.5: Einteilung der myeloischen Erkrankungen: A) akute myeloische Leukämie nach FAB; B) akute myeloische Leukämie nach WHO; C) weitere myeloische Erkrankungen nach WHO.

Bei der Klassifizierung lymphatischer Erkrankungen spielt die Zytomorphologie nur eine untergeordnete Rolle, hier ist die vor allem eine Anordnung nach immunphänotypischen, zytogenetischen und prognostischen Faktoren für die Zuordnung des jeweiligen Subtyps

verantwortlich. Die FAB-Klassifikation akuter lymphatischer Leukämien (ALL), die hier zwischen drei verschiedenen Morphologien (L1-L3, L3 ist gleichbedeutend mit dem Burkitt-Lymphom und wird als solches diagnostiziert) unterscheidet, spielt heute nur noch eine untergeordnete Rolle, die Kategorisierung lymphatischer Neoplasien erfolgt meist nach den WHO-Richtlinien in Vorläufer B-Zell- und T/NK-Zell-Neoplasien sowie den Hodgkin-Lymphomen. Eine Unterteilung der akuten lymphatischen Leukämien wird vor allem aufgrund der Expression von Oberflächenmarkern der leukämischen Blasten vorgenommen (Abb. 1.6 A; Harris, 1999). Ebenso kann eine Einteilung aufgrund von Zellreihe und Reifungsstadium der leukämischen Blasten erfolgen (Abb. 1.6 B). Von allen an ALL erkrankten Patienten können heute zwischen 30-40 % geheilt werden, bei an ALL erkrankten Kindern liegt die Heilungsrate bei über 70 %.

| (A) WHO-Klassifikation ALL | |
|--|---|
| Kategorie | Expression der Oberflächenmarker |
| Akute B-Zell lymphoblastische Leukämie | B-Zell Marker z.B. CD19, CD20 |
| Akute T-Zell lymphoblastische Leukämie | T-Zell Marker CD1-CD5, CD7, CD8 |
| Burkitt's Lymphom | B-Zell Marker CD19, CD20, CD21, CD79a Fehlende Expression von CD5 |

| (B) Klassifikation der ALL nach Zellreihe und Reifegrad | | |
|--|-----------------------------|-----------------------------|
| Reifungszustand | B-Zell Lymphoblasten | T-Zell Lymphoblasten |
| unreif | Pro-B ALL | Pro-T ALL |
| reif | Prä-B ALL | Prä-T ALL |
| | Reife B-ALL | Reife T-ALL |

Abb. 1.6: Klassifizierung akuter lymphatischer Leukämien: A) WHO-Klassifikation; B) Klassifikation aufgrund des Reifestadiums.

1.3.2 Stammzellen, leukämische Stammzellen und das Krebs-Stammzellen-Modell

Stammzellen werden durch zwei entscheidende Charakteristika definiert: ihre Fähigkeit, sich unbegrenzt zu teilen ('self-renewal') sowie die Möglichkeit der Differenzierung in verschiedenste Zelltypen. Generell unterscheidet man zwischen embryonalen und adulten Stammzellen. Während aus embryonalen Stammzellen praktisch alle Zellen eines Organismus hervorgehen können (so genannte totipotente Stammzellen), sind adulte Stammzellen meist organspezifisch und bilden die jeweils für das Organ notwendigen

Zellen (pluripotente Stammzellen). Erste Hinweise auf die Existenz von Stammzellen in der Hämatopoese gehen auf Experimente von Till und McCulloch zurück, die zeigen konnten, dass klonogene Knochenmarkzellen myelo-erythroide Kolonien in den Milzen letal bestrahlter Mäuse bilden. Einige Zellen dieser Kolonien hatten die Fähigkeit, in sekundär transplantierten Rezipiententieren das Immunsystem zu regenerieren (Till und Mc Culloch, 1961). Erst einige Jahrzehnte später gelang es schließlich, diese äußerst seltenen Zellen mittels Expression bestimmter Zelloberflächenmoleküle zu charakterisieren und mit Hilfe fluoreszenzaktivierter Zellsortierung aus murinem Knochenmark zu extrahieren (Spangrude, 1988).

Stammzellen können sich, je nach Bedarf, symmetrisch oder asymmetrisch teilen. Unter der symmetrischen Teilung versteht man die Bildung zweier identischer Tochterzellen mit den gleichen Stammzellcharakteristika. Bei einer asymmetrischen Teilung kommt es zu einer ungleichen Bildung von Tochterzellen, aus der neben einer Stammzelle eine Vorläuferzelle gebildet wird, welche im Gegensatz zu den meist ruhenden Stammzellen eine erhöhte Proliferationsrate aufweist und aus der in weiteren Differenzierungsstufen eine Vielzahl an reifen Zellen entstehen kann (siehe 1.1.2). Während der normalen Hämatopoese teilen sich HSCs meist asymmetrisch, und halten so das empfindliche Gleichgewicht der Homöostase aufrecht. Nur unter bestimmten Umständen, wie etwa einer Stammzelltransplantation, teilen sich HSCs symmetrisch, um den Stammzellvorrat rasch wieder herzustellen (Dick, 2003). Die Teilung von HSCs ist selten und streng reguliert, um die Zellen möglichst effektiv vor oxidativem Stress oder anderen zellschädigenden Stoffen zu schützen. Bei einer erhöhten Teilungsrate kann es daher auch zu einem Verlust des Stammzellpools kommen (Cheng, 2000). Über die biologischen Kontrollmechanismen und Aufenthaltsorte von ruhenden Stammzellen ist bisher wenig bekannt, jedoch ist man sich heute einig, dass ruhende HSCs vermehrt in so genannten 'Stammzellnischen' zu finden sind und eben dort vor Auszehrung und unkontrollierter Proliferation geschützt sind (Scadden, 2006). Diese Nischen sind meist nahe der endostealen Region des Knochenmarks gelegen und zeigen intensive Interaktionen zwischen Stammzellen und mesenchymalen Osteoklasten. Erste Untersuchungen zeigen auch hier eine Rolle schon bekannter Stammzell-relevanter Signalkaskaden wie dem Notch-Signaling, eine Beteiligung anderer wie Hedgehog- und Wnt-Signaling wird vermutet (Adams, 2006, Nilsson, 2001, Rattis, 2004).

Es ist inzwischen mehrfach belegt, dass verschiedene Tumore durch eine geringe Anzahl an Krebs-Stammzellen nachhaltig gebildet werden, welche, ähnlich den normalen (adulten) Stammzellen in den jeweiligen Geweben, für die Bildung, Erhaltung und Ausbreitung des Gewebes, respektive des Tumors, notwendig sind. Erstmals konnten

diese Krebs-Stammzellen in der AML identifiziert werden (Bonnet und Dick, 1997), in den letzten Jahren konnten diese Zellen jedoch vermehrt auch in anderen soliden Tumoren wie Brustkrebs, Dickdarmkrebs oder in Gehirntumoren nachgewiesen werden (Al-Hajj, 2003, O'Brien, 2006, Prince, 2007, Singh, 2003, Singh 2004). Diese so genannten 'cancer stem cells' (Krebs-Stammzellen, CSC) – in der malignen Hämatopoese 'leukemic stem cells' (leukämische Stammzellen, LSC) genannt – haben also ebenso wie normale Stammzellen die Fähigkeit, sich ohne weitergehende Differenzierung unbegrenzt zu teilen (Passegue, 2006). Zeitgleich können sie mittels asymmetrischer Teilung eine sehr hohe Anzahl an unreifen heterogenen Tumor-Blastenzellen bilden, welche zwar einerseits nicht mehr der unbegrenzten Teilung fähig sind, andererseits aber auch in der Differenzierung blockiert sind und aufgrund hoher Proliferationsraten den größten Anteil der Tumormasse bilden. So entsteht ähnlich der normalen Differenzierung aus einer gesunden Stammzelle eine Hierarchie maligner Tumorzellen (Abb. 1.7).

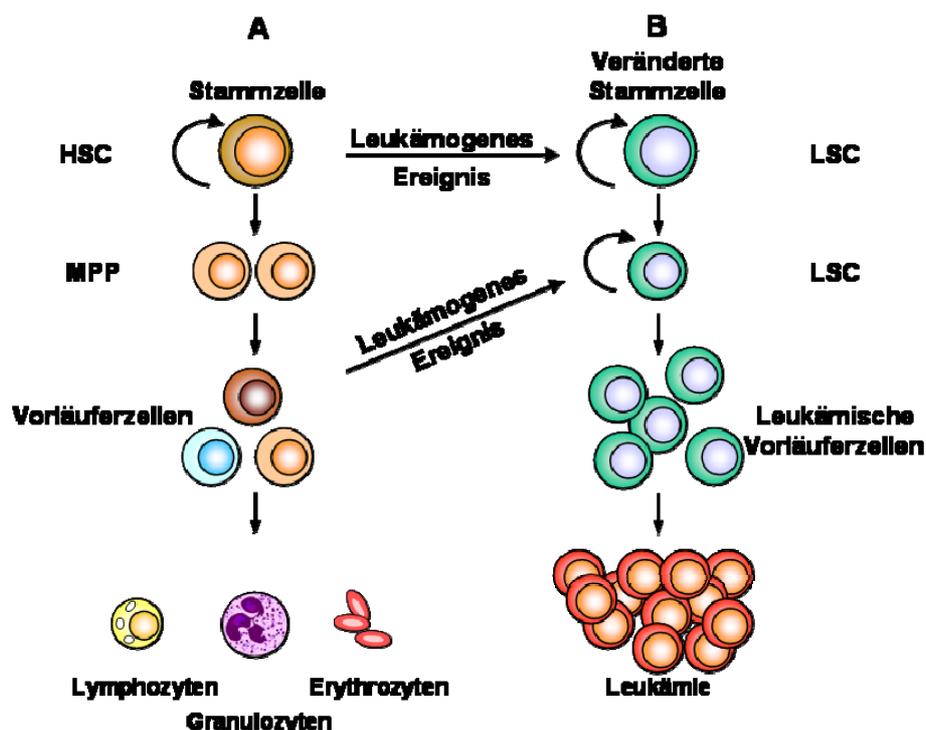


Abb. 1.7: Modell der Hierarchie in der A) gesunden und B) malignen Hämatopoese: Normale als auch leukämische Stammzellen weisen sowohl funktionelle als auch phänotypische Ähnlichkeiten auf. Gesunde hämatopoetische Stammzellen differenzieren über verschiedene Zwischenstufen in funktionelle reife Zellen, leukämische Stammzellen hingegen differenzieren ebenfalls über die Zwischenstufe klonogener leukämischer Vorläuferzellen in unreife Blastenzellen, welche den Löwenanteil der akuten Leukämie bilden (verändert nach Bonnet und Dick, 1997).

Da CSCs aber wie Stammzellen in Ruhephasen eintreten können, ist es eine der zurzeit größten Herausforderungen, diese CSCs genauer definieren und charakterisieren zu können. Die Krebs-Stammzell-Hypothese hat bedeutende Auswirkungen auf die Therapie von Tumoren und erklärt, dass oft nach erfolgreicher Therapie und Erreichen einer kompletten Remission dennoch häufig nach einer Weile ein Rezidiv eintritt (Huntly und Gilliland, 2005b). Vor allem für eine langfristig erfolgreiche Therapie ist es daher notwendig, diese CSCs vollständig zu eliminieren. Da jedoch die meisten der heute angewandten Therapien auf die Zerstörung von Zellen mit einer hohen Proliferationsrate abzielen, ist es mit den gängigen Therapien kaum möglich, die ruhenden Krebs-Stammzellen auszulöschen. Für eine erfolgreiche Therapie müssen daher Behandlungsstrategien entwickelt werden, welche auf die CSCs abzielen und weniger die breite Tumormasse als Hauptziel angreifen (Abb. 1.8).

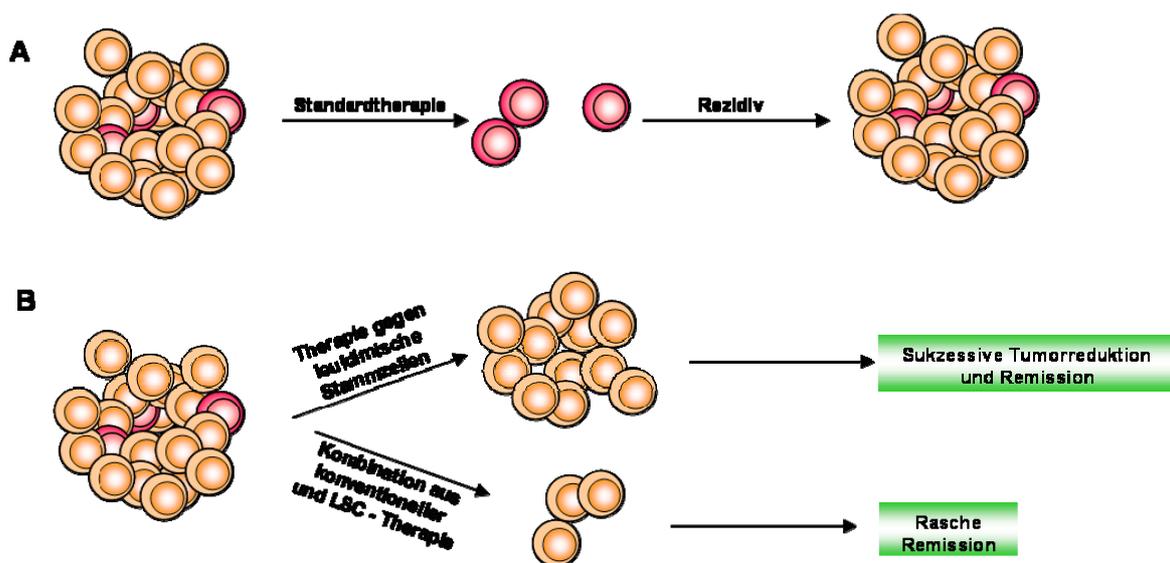


Abb. 1.8: Krebs-Therapie heute und morgen?: A) gängige Therapien reduzieren Tumorgöße, können jedoch nicht die CSCs eliminieren; B) spezifische Therapeutika erkennen und eliminieren die CSCs, dem Tumor wird die Wachstumsgrundlage genommen, ergänzende Chemotherapie verringert gleichzeitig die Tumorgöße (adaptiert nach Huntly und Gilliland, 2005a).

Vieles spricht dafür, dass LSCs primär aus normalen HSCs hervorgehen, indem sich Mutationen anhäufen und die Zelle transformieren. Das liegt zum einen an in normalen Stammzellen schon aktivierten Programmen, die für das 'self-renewal' notwendig sind, so dass für eine maligne Veränderungen nur wenige Mutationen benötigt werden, während im Gegenzug in differenzierten Zellen das Genexpressionsmuster großflächig geändert

werden müsste. Zudem bieten die langlebigen Stammzellen über einen viel längeren Zeitraum die Möglichkeit, Mutationen zu erhalten, während differenzierte Zellen nach meist sehr kurzer Zeit sterben (Reya, 2001). Dass dies tatsächlich häufig der Fall ist, konnte in bestimmten Subgruppen der AML und CML gezeigt werden. In den meisten Fällen von AML ist es eine den normalen HSCs ähnliche Zellpopulation von CD34⁺CD38⁻ Zellen, welche in einem Xenograftmodell mit NOD/SCID-Mäusen Leukämie induziert, während die reiferen CD34⁺CD38⁺ Zellen keine Leukämie induzieren (Blair, 1997, Bonnet und Dick, 1997). Eine andere Studie konnte in HSCs von Patienten, die an t(8;21) AML1/ETO-positiver AML erkrankt waren und sich in Remission befanden, Fusionsgentranskripte nachweisen. Diese HSCs und daraus gebildete Vorläuferzellen hatten die volle Fähigkeit zur Differenzierung *in vitro* und induzierten keine Leukämie im Mausmodell. Somit ist die Translokation ursprünglich in HSCs aufgetreten, es bedarf aber noch weiterer Mutationen in diesen HSCs oder daraus resultierenden Vorläuferzellen, um eine Leukämie zu induzieren (Miyamoto, 2000).

Einige kürzlich veröffentlichte Studien belegen jedoch, dass LSCs nicht ausschließlich aus HSCs hervorgehen müssen. Mausmodelle, in denen die in humanen Leukämien vorkommenden Fusionsgene MLL/ENL und MOZ/TIF2 retroviral in myeloische Vorläuferzellen transduziert wurden, entwickeln eine akute myeloische Leukämie (Cozzio, 2003, Huntly, 2004). Krivtsov et al. bestätigten dies kürzlich und zeigten darüber hinaus, dass der Immunphänotyp und die Genexpression der Leukämie-induzierenden Vorläuferzellen den normalen Progenitorzellen mehr ähnelt als den normalen HSCs, und nur die Veränderung einer kleinen Gruppe von Genen, darunter Gene der Hox-Cluster sowie des Wnt-Signaling, ausreicht, transformierendes Potential zu erlangen (Krivtsov, 2006).

Auch im humanen System konnte die Regeneration von 'self-renewal' Charakteristika in myeloischen Vorläuferzellen (GMPs) von CML-Patienten beobachtet werden. Diese malignen Vorläuferzellen zeigen aktiviertes Wnt-Signaling mit einer Akkumulation von β -catenin im Nucleus, und bei Inhibition von β -catenin durch den Wnt-Antagonisten Axin verlieren die Zellen die Fähigkeit der Replazierbarkeit *in vitro*. Ebenso wiesen nicht transformierte GMPs bei Überexpression von β -catenin eine erhöhte Replazierfähigkeit *in vitro* auf (Jamieson, 2004). Diese Studie unterstreicht im Gegensatz zu der Arbeit um Krivtsov die Ansicht, dass Vorläuferzellen stammzellähnliche Merkmale adaptieren müssen, um 'self-renewal' zu ermöglichen und zeigt, dass der Wnt-Signalweg hier eine bedeutende Rolle spielen kann.

1.3.3 Wnt-Signaling in Leukämien

Mehr und mehr kristallisiert sich der Wnt-Signalweg als ein kritisches Regulationselement sowohl embryonaler als auch adulter Stammzellen heraus. Bezeichnenderweise ist eine fehlgesteuerte Aktivierung dieses Signalweges in vielen Geweben mit malignen Erkrankungen assoziiert. Auch in der Hämatopoese wird die Deregulierung wnt-assoziiierter Gene mit einer Vielzahl von Leukämien in Verbindung gebracht.

Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie weisen gegenüber normalen B-Zellen eine Überexpression an Wnt- und Frizzled Proteinen auf, was zu einer erhöhten Resistenz gegen die Apoptose, der vermuteten biologischen Ursache der chronischen Leukämie, führen könnte (Lu, 2004). In der für die Translokation t(1;19) positiven Prä-B-Zell ALL wird WNT16 direkt durch das Fusionsgen E2A/PBX1 aktiviert (McWhirter, 1999) und trägt so zur Entstehung der Leukämie bei. Die direkte Inaktivierung einer Isoform von WNT16 (WNT16b) führt zu einer vermehrten Apoptose in t(1;19) positiven Zelllinien, ein Hinweis auf die essentielle Rolle dieses Proteins in der Steuerung der Apoptose (Mazieres, 2005). Dagegen wirkt Wnt5a, in anderen Geweben als Protoonkogen aktiv, in hämatopoetischem Gewebe als Tumorsuppressor. Die reduzierte Expression dieses Proteins führt im Mausmodell zu myeloischen und lymphatischen Leukämien und die Expression ist auch in humanen akuten Leukämien verringert. Dieser Effekt ist jedoch nicht auf das klassische Wnt-Signaling zurückzuführen, sondern auf einen alternativen Signalweg – das Ca²⁺-abhängige Wnt-Signaling (Liang, 2003). Innerhalb dieses Signalweges stimulieren Wnt-Proteine, die nicht mit dem klassischen Wnt-Signaling in Verbindung gebracht werden, eine intrazelluläre Freisetzung von Ca²⁺-Ionen, die ihrerseits in einer G-Protein-abhängigen Reaktion die Kinasen CamKII und PKC aktivieren (Kuehl, 2000).

β-catenin ist ebenfalls häufig mit der Entstehung von hämatopoetischen Erkrankungen assoziiert. So wurden sowohl in Zelllinien des multiplen Myeloms als auch in primären Zellen von an multiplem Myelom erkrankten Patienten hohe Raten an β-catenin nachgewiesen, ohne Hinweise auf aktivierende Mutationen in β-catenin selbst oder dem Protein APC. Die Inhibition des Wnt-Signalweges führte zu einer reduzierten Proliferation dieser Zellen (Derksen, 2004). Dagegen wurde in Patienten, die an multiplem Myelom erkrankt waren und zu der Gruppe mit Knochenläsionen gehörten, eine erhöhte Rate des Wnt-Antagonisten Dickkopf 1 (DKK1) gefunden. Weitergehende Untersuchungen zeigten, dass dieses Protein von den malignen Zellen sezerniert wurde und so die Differenzierung von Vorläuferzellen der Osteoblasten verhinderte (Tian, 2003). Diese beiden Studien mögen widersprüchlich erscheinen, könnten jedoch darauf hinweisen, dass DKK1 ein Zielgen des Wnt-Signaling in Myelomzellen ist, da verschiedene Zielgene diesen

Signalweg negativ regulieren können. Ferner besteht auch hier die Möglichkeit, dass verschiedene Subpopulationen der Myelomzellen betroffen sind und Wnt-Signaling auch hier zelltypspezifisch aktiviert oder inhibiert wird.

Eine ebenfalls essentielle Rolle scheint β -catenin in T-ALLs einzunehmen. Zelllinien dieses Subtyps, in denen β -catenin exprimiert wird, zeigen bei einer Inhibition des β -catenin-signaling eine verringerte Proliferation sowie eine erhöhte Apoptose. Somit könnte β -catenin auch hier ein bedeutendes Signal für das Überleben und eine erhöhte Resistenz gegenüber dem programmierten Zelltod vermitteln (Chung, 2002). Wie unter 1.3.2 beschrieben konnte die Gruppe um Weissman aktiviertes Wnt-Signaling in der Phase der Blastenkrise von CML Patienten nachweisen. Ebenso zeigten sie, dass diese Aktivierung ein notwendiger Mechanismus in der Leukämogenese der CML ist, und die Inhibition der β -catenin regulierten Aktivierung des Lef/Tcf Komplexes die Fähigkeit zur unbegrenzten Teilung reduziert (Jamieson, 2004).

Eines der häufigsten Merkmale der AML ist das Vorkommen von Fusionsgenen, die durch balancierte Chromosomentranslokationen entstehen. Drei der am häufigsten auftretenden, t(8;21), t(15;17) und t(11;17) codieren für die Fusionsprodukte AML1/ETO, PML/RAR α und PLZF/RAR α . Diese Fusionsproteine können direkt über ein dem β -catenin sehr homologes Protein, γ -catenin, Wnt-Signaling aktivieren. Diese Wnt-Aktivierung ist ein häufiges Merkmal in AMLs mit diesen Translokationen und trägt entscheidend zur Aufrechterhaltung des leukämogenen Potentials bei (Muller-Tidow, 2004, Zheng, 2004). 30 % aller AML-Patienten weisen zudem eine Längenmutation in der Tyrosinkinase FLT3 (FLT3-ITD) auf. Diese Mutation führt zur konstitutiven Autophosphorylierung der FLT3-Kinase und zur Aktivierung spezifischer Signalwege, darunter der STAT5- ('signal transducer and activator of transcription 5') und der MAPK- ('mitogen-activated protein kinase') Signalweg. Kürzlich wurde beschrieben, dass FLT3-ITDs mit dem Wnt-Signaling in der Leukämogenese kooperieren. Mehr als 70 % der AML-Patienten mit FLT3-ITD zeigen im Vergleich zu FLT3-ITD-negativen Patienten oder gesunden Probanden zugleich eine erhöhte β -catenin Expression. Wnt-Zielgene wie c-myc waren ebenfalls aktiviert, dagegen reduzierte die Inhibition mit einer dominant-negativen Form des Transkriptionsfaktors TCF4 die Koloniebildung FLT3-ITD transduzierter myeloischer Zelllinien, ein Hinweis auf die Abhängigkeit des transformierenden Potentials der FLT-ITDs vom Wnt-Signaling (Tickenbrock, 2005).

1.3.4 Lef-1 in Leukämien

Neben anderen essentiellen Faktoren des Wnt-Signaling ist auch Lef-1 in verschiedenen Subtypen der Leukämien anormal exprimiert. Lu et al. zeigten nicht nur die verstärkte Expression von sezernierten WNT-Proteinen und deren Rezeptor Frizzled 3 in Patientenproben mit chronischer lymphatischer Leukämie, sondern auch erhöhte Raten von LEF-1 (Lu, 2004). Interessant ist hier vor allem auch die Beobachtung, dass dies der einzige Transkriptionsfaktor der Lef / Tcf Gruppe ist, der hochreguliert ist. Während die Expression von TCF1 und TCF3 mit der normaler B-Zellen vergleichbar war, wurde TCF4 in geringeren Dosen exprimiert, ein Hinweis auf das komplexe Zusammenspiel dieser Transkriptionsfaktoren bei der Regulation der B-Zell-Entwicklung. Als 'downstream-target' des Wnt-Signaling im allgemeinen und β -catenin im speziellen sollte bei erhöhten Raten dieses Proteins auch eine höhere Lef-1 Expression mit zeitgleicher Aktivierung beobachtet werden. So zeigen in der Studie um Jamieson (siehe 1.3.2; 1.3.3) die transformierten myeloischen Vorläuferzellen (GMPs) von CML-Patienten in der Blastenkrise auch erhöhte Raten an LEF-1. Auch in AML-Patientenproben wurden abweichende Expressionsmuster der beiden Proteine β -catenin und LEF-1 gefunden (Simon, 2005). Andererseits ist auch die Verminderung oder der Ausfall der Expression von LEF-1 in den Verlauf maligner Erkrankungen des hämatopoetischen Systems involviert. Eine Studie von Dorfman et al. zeigte, dass LEF-1 äußerst spezifisch in einem Subtyp des peripheren T-Zell Lymphoms komplett abgeschaltet ist. So zeigen der Großteil der T-ALLs sowohl eine Expression von TCF-1 als auch LEF-1. Dies ist auch in der Untergruppe der peripheren T-ALL Th1 der Fall, wo ebenfalls beide Faktoren koordiniert exprimiert werden, in der Subgruppe Th2 jedoch, deren Unterscheidung über die Oberflächenmoleküle CD30, CD 69 und CD 134 sowie über die Expression der Chemokinrezeptoren CXCR3 und CXCR4 erfolgt (Th1: CXCR3⁺CD9⁺CD134⁺CXCR4⁻CD30⁻; Th2: CXCR3⁻CD9⁻CD134⁻CXCR4⁺CD30⁺), war die Expression von TCF-1 und LEF-1 vollständig eliminiert (Dorfman, 2003).

Zuletzt gab es Hinweise auf eine Rolle von LEF-1 in der myeloischen Hämatopoese (siehe 1.2.3). Gemeinsam mit Expressionsstudien in myeloischen Subpopulationen wurde in dieser Studie ebenfalls eine signifikante Reduzierung von LEF-1 in myeloischen Vorläuferzellen aus Patienten mit angeborener Neutropenie berichtet (Skokowa, 2006).

Zusammenfassend kann man sagen, dass zunehmend Daten existieren, die auf eine fundamentale Bedeutung des Wnt-Signaling in der normalen und malignen Hämatopoese hinweisen. Dabei sind die bisher am besten beschriebenen Proteine unter anderem die sezernierten Wnt-Proteine, sowie β -catenin als Schaltstelle zwischen Zytoplasma und Zellkern. Am Ende der Signaltransduktionskaskade befindet sich im Zellkern die Gruppe

der Lef/Tcf-Transkriptionsfaktoren, die endgültige Entscheidungen über aktivierende oder reprimierende Expressionsprogramme steuern. Dabei scheint Lef-1 in der Hämatopoese eine entscheidende Funktion zuzukommen.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Transkriptionsfaktoren sind bedeutende Regulatoren einer Vielfalt zellspezifischer Funktionen und tragen bei aberranter Expression häufig zur Transformation gesunder Zellen und damit verbundener Entstehung maligner Erkrankungen bei. Wnt-Signaling ist eine der Schlüssel-Signaltransduktionskaskaden während der Embryogenese und spielt ebenfalls eine essentielle Rolle in der Homöostase hämatopoetischer Stammzellen.

Lef-1 ist der zentrale Transkriptionsmediator innerhalb des Wnt-Signalweges und wurde bisher vor allem in der lymphatischen Differenzierung untersucht. Ein existierendes Lef-1 'Knock-out' Mausmodell konnte aufgrund sehr früher Letalität bisher nur sehr geringe Aussagen bezüglich einer potentiellen Rolle von Lef-1 in der Hämatopoese beantworten.

Um die Funktionen dieses Transkriptionsfaktors in der normalen Hämatopoese detailliert zu beleuchten, muss daher eine andere Strategie angewandt werden. Das in dieser Arbeitsgruppe bereits etablierte murine Knochenmarktransplantationsmodell ist ein sehr gutes experimentelles System zur Analyse der hämatopoetischen Entwicklung und erschien aufgrund dessen sehr gut für die Beantwortung dieser Frage geeignet.

Aufgabe dieser Dissertation war daher die Untersuchung der Rolle des Transkriptionsfaktors Lef-1 in der murinen Hämatopoese durch die Generation eines Lef-1 spezifischen murinen Knochenmarktransplantationsmodells. Dabei sollte neben Fragen zur Differenzierung einzelner hämatopoetischer Subpopulationen zudem geklärt werden, ob eine Dysregulation dieses Transkriptionsfaktors möglicherweise hämatologische Erkrankungen begünstigt oder induziert. Weitere darauf aufbauende Fragestellungen waren im Falle von auftretenden Erkrankungen ihre exakte Charakterisierung bis hin zur Identifizierung der Tumorstammzelle dieser Erkrankungen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Laborausstattung

| | |
|---|---|
| Bakterien-Brutschrank | (Heraeus, Osterode) |
| Bestrahlungsanlage Gammacell 40 | (Atomic Energy of Canada Ltd, Mississauga, Kanada) |
| Blotting Kammer | (BioRad, München) |
| CO ₂ -Inkubator für Zellkultur | (Binder, Tuttlingen) |
| DNA-ThermoCycler | (Peqlab, Erlangen) |
| Entwicklermaschine M35X-OMAT Processor | (Kodak, Stuttgart) |
| Eppendorf Ultrazentrifuge 2K15 | (Sigma, Taufkirchen) |
| Expositionskassetten | (Amersham, Pharmacia, Freiburg) |
| FACS Calibur | (Beckton Dickinson, Heidelberg) |
| FACS Sorter | (Beckton Dickinson, Heidelberg) |
| Laminar-Flow-Sterilbank | (BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl-Genkingen) |
| Flüssigstickstofftank Chronos [®] | (Messer Griesheim GmbH, Krefeld) |
| Gefrierschrank (-80°C) | (New Brunswick Scientific, Nürtingen) |
| Gelelektrophoresekammer | (Peqlab, Erlangen) |
| Heizblock BT 130-2 | (Haep Labor Consult, Bovenenden) |
| Kühl- und Gefrierschränke (4°C, -20°C) | (Siemens, Erlangen & Bosch, Stuttgart) |
| Kühlzentrifuge | (Eppendorf, Hamburg) |
| Mikroskope | (Carl Zeiss, Jena & Leitz, Wetzlar) |
| pH-Meter 766 | (VWR International, Ismaning) |
| Pipetus Accu | (Hirschmann, Eberstadt) |
| Proteingelelektrophoresekammer | (BioRad, München) |
| Rotor Ti 75 | (Beckman, Palo Alto, USA) |
| Schüttler | (Edmund Bühler, Tübingen) |
| Sequenzierer (ABI Prism 310 Genetic Analyzer) | (Applied Biosystems, Foster City, USA) |
| Spektrofotometer Smartspec TM 3000 | (BioRad, München) |
| Vortexer | (Cenco, Breda, Niederlande) |
| Wasserbad | (HASKE, Karlsruhe) |
| Zentrifugen | (Hettich, Tuttlingen) |
| Zytospin | (Thermo Electron Corp., Waltham, USA) |

2.1.2 Verwendete Verbrauchsmaterialien

| | |
|--|---------------------------------------|
| FACS Tubes | (BD Falcon, Heidelberg) |
| Filter (0.22 & 0.45 µm) | (Millipore, Schwalbach) |
| Heparinmicrovette® (CB300) | (Sarstedt, Nümbrecht) |
| Kanülen 0.5 x 25 mm | (BD, Heidelberg) |
| Kanülen 0.55 x 25 mm | (BD, Heidelberg) |
| Kanülen 1.1 x 40 mm | (BD, Heidelberg) |
| Kanülen 16 x 1.5 inch | (Stem Cell Technologies, USA) |
| Objektträger | (Marienfeld, Lauda-Königshofen) |
| Pipetten mit Spitzen | (Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich) |
| Pipetten | (Corning, Wiesbaden) |
| Reagiergefäße | (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) |
| Spritzen 3ml, Kendall Monoject | (Tyco Healthcare, GB) |
| Spritzen 1ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml | (BD Bioscience, Heidelberg) |
| Zellkulturschalen 10, 15 cm für adherente Zellen | (Corning, Schubert & Weiss, München) |
| Zellkulturschalen (96-, 24-, 6-well) | (Sarstedt, Nümbrecht) |
| Zellkulturschalen, 10 cm für Suspensionszellen | (BD Falcon, Heidelberg) |
| Zellsiebe, 40µm | (BD Bioscience, Heidelberg) |
| Zellschaber, 25 cm | (Sarstedt, Nümbrecht) |
| Zytospin Filterkarten | (Histocom AG, Zug, Schweiz) |

2.1.3 Zelllinien

GP+E86: murine embryonale Fibroblastenzelllinie, adhären; wurde retroviral transduziert, um als stabile Verpackungszelllinie zur Transduktion von Knochenmark zu dienen.

293T: humane embryonale Nierenzelllinie, adhären; wurde zur Produktion von VCM transient transfiziert.

NIH-3T3: murine embryonale Fibroblastenzelllinie, adherent; wurde zur Titration sowohl des erhaltenen VCMs aus transienten Transfektionen als auch der Transduktionseffizienz der Verpackungszelllinien verwendet.

Ba/F3: murine, IL-3 abhängige Pro-B Zelllinie, nicht adhären; wurde für Proliferationsassays verwendet

32Dcl3: murine, IL-3 abhängige Zelllinie, ursprünglich erhalten aus Knochenmarks-

Langzeitkulturen aus C3H / HeJ Mäusen, nicht adhärent; wurde für Proliferationsassays verwendet

WEHI-3B: murine monomyelozytische Leukämiezelllinie, teilweise adhärent; makrophagenähnliche Zellen, einer Balb / C Maus entstammend, wurde zur Produktion von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren, z.B. IL-3, verwendet

2.1.4 DNA-Konstrukte

MSCV-IRES-GFP: modifizierte Form des MSCV Vektors, beinhaltet eine bicistronische GFP-Expressionskassette mit einer internen Ribosomen-Bindungsstelle, zur Verfügung gestellt von R.K. Humphries (The Terry Fox Laboratory, Vancouver, Kanada).

Ecopac: Verpackungsvektor, kodiert für die viralen Proteine gag, pol und env (Clontech, Palo Alto, USA).

MIG Lef-1 WT: enthält Wildtyp Lef-1, in dieser Arbeit hergestellt, ursprüngliches Konstrukt zur Verfügung gestellt von R. Grosschedl (MPI für Immunbiologie, Freiburg)

MIG Lef-1 CA: enthält Wildtyp Lef-1, an das mittels eines Polylinkers zur konstitutiven Aktivierung die Lef-1 Bindungsdomäne von β -catenin fusioniert ist, in dieser Arbeit hergestellt, ursprüngliches Konstrukt zur Verfügung gestellt von R. Grosschedl (MPI für Immunbiologie, Freiburg)

MIG Lef-1 DN: enthält im C-Terminus trunkiertes Lef-1 (AA 339-397), so dass keine Bindung an die DNA mehr möglich ist, in dieser Arbeit hergestellt, ursprüngliches Konstrukt zur Verfügung gestellt von R. Grosschedl (MPI für Immunbiologie, Freiburg)

2.1.5 Oligonukleotide

Sämtliche Primer wurden von Metabion AG (Martinsried) synthetisiert und erworben.

Primer für die transkriptionelle Analyse

Bmi-1 fw 5'-AGCCTAAGGAAGAGGTGAATGA-3'

Bmi-1 rev 5'-GGCAATGTCCATTAGCGTGT-3'

Gata2 fw 5'-GACTATGGCAGCAGTCTCTTCC-3'

| | |
|---|---|
| Gata2 rev | 5'-GGTGGTTGTCGTCTGACAATT-3' |
| Hprt fw | 5'-GGGGGCTATAAGTTCTTTGC-3' |
| Hprt rev | 5'-TCCAACACTTCGAGAGGTCC-3' |
| Ebf-1 fw | 5'-GCCTTCTAACCTGCGGAAATC-3' |
| Ebf-1 rev | 5'-GGCGCACATAGAAATCCTGTT-3' |
| C/ebpa fw | 5'-TCGGTGGACAAGAACAGC-3' |
| C/ebpa rev | 5'-CGCAGGCGGTCATTGTC-3' |
| PU1 fw | 5'-CGGATGACTTGGTTACTTACG-3' |
| PU1 rev | 5'-GTAGGAAACCTGGTGACTGAG-3' |
| Lef-1 fw | 5'-AGATGTCAACTCCAAGCAAGG-3' |
| Lef-1 rev | 5'-GTTGAGGCTTCACGTGCATTAG-3' |
| Pax5 fw | 5'-AGGATAGTGGAACCTTGCCCA-3' |
| Pax5 rev | 5'-TGATGGAGTATGAGGAGCCC-3' |
| Primer für Klonierungen | |
| D29 (Lef-1) | 5'-CACCCGTCACACATCCC-3' |
| D30 (Lef-1) | 5'-CAGCCTGGATAAAGCTGC-3' |
| Lef-1 delta56 | 5'-CGCGAATTCATGAACGAGTCCGAAATCATCCC-3' |
| Lef-1 DN1 fw | 5'-CGCGAATTCATGCCCAACTTTCCGGAG-3' |
| Lef-1 DN2 rev | 5'-CCGCTCGAGTCAGATGTAGGCAGCTG-3' |
| Lef-1 DN3 rev | 5'-GCGCTCGAGTTACCGGGAGAGGGCGTGCC-3' |
| Lef-1 CA1 fw | 5'-CCGGAATTCCTTGGACTGGACATTGGTG-3' |
| Lef-1 CA1a fw | 5'-CGCGAATTCATGCTTGGACTTGATATTGGTGCC-3' |
| Primer für DJ _H Rekombinationsanalysen | |
| B rec chk fw1 | 5'-ACGTCGACTTTTGTSAAGGGATCTACTACTGT-3' |
| B rec chk fw2 | 5'-ACGTCGACGCGGASSACCACAGTGCAACTG-3' |
| B rec chk rev | 5'-GGGTCTAGACTCTCAGCCGGCTCCCTCAGGG-3' |

2.1.6 Antikörper

| Name | Firma | Markierung | Verdünnung |
|---------------|---------------------------|------------|------------|
| Sca-1 | BD Pharmingen, Heidelberg | PE | 1:150 |
| CD117 (c-Kit) | BD Pharmingen, Heidelberg | PE / APC | 1:500 |
| CD11b (Mac-1) | BD Pharmingen, Heidelberg | PE / APC | 1:800 |

| | | | |
|-----------------------------|--|-----------|---------|
| Gr-1 | BD Pharmingen, Heidelberg | PE / APC | 1:500 |
| Ter 119 | BD Pharmingen, Heidelberg | PE | 1:150 |
| B220 | BD Pharmingen, Heidelberg | PE / APC | 1:200 |
| CD4 | BD Pharmingen, Heidelberg | PE | 1:150 |
| CD8 | BD Pharmingen, Heidelberg | APC | 1:150 |
| CD19 | BD Pharmingen, Heidelberg | PE | 1:200 |
| CD23 | BD Pharmingen, Heidelberg | PE | 1:200 |
| CD24 | BD Pharmingen, Heidelberg | PE | 1:200 |
| CD41 | BD Pharmingen, Heidelberg | PE | 1:200 |
| CD43 | BD Pharmingen, Heidelberg | PE | 1:200 |
| FcYR II/III | BD Pharmingen, Heidelberg | PE | 1:200 |
| CD 45.1 | BD Pharmingen, Heidelberg | PE | 1:200 |
| F4/80 | Caltag Laboratories, CA, USA | PE | 1:200 |
| AA 4.1 | eBiosciences, San Diego, CA, USA | PE | 1:200 |
| IL-7R α | eBiosciences, San Diego, CA, USA | PE | 1:200 |
| α -Lef-1, polyklonal | Santa Cruz, CA, USA | Ziege | 1:1000 |
| α -Lef-1, polyklonal | Gift from R. Großschedl, MPI Immunbiologie, Freiburg | Kaninchen | 1:1000 |
| α -Ziege IgG-HRP | Santa Cruz, CA, USA | Rind | 1:10000 |
| α -Kaninchen IgG-HRP | Sigma, Taufkirchen | Ziege | 1:10000 |

2.1.7 Chemikalien, Enzyme, Zytokine, Lösungen

2.1.7.1 Chemikalien

| | |
|--|--------------------------------|
| Acrylamid/Bisacrylamid 40 % | (Roth, Karlsruhe) |
| Agarose | (Sigma, Taufkirchen) |
| Ammoniumchlorid (ACI) | (Cell Systems, St. Katharinen) |
| Ammoniumpersulfat (APS) | (Bio-Rad, München) |
| Aprotinin | (Sigma, Taufkirchen) |
| Avertin | (Sigma, Taufkirchen) |
| Bio-Rad Protein Assay Dye Reagenz | (Bio-Rad, München) |
| Bovines Serumalbumin (BSA) | (Fluka, Buch, Schweiz) |
| Bromphenolblau | (Sigma, Taufkirchen) |
| Ciprofloxacin (Ciprobay) | (Bayer, Leverkusen) |
| Dextransulfat | (Sigma, Taufkirchen) |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | (Sigma, Taufkirchen) |
| Dinatriumhydrogenphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) | (Sigma, Taufkirchen) |

| | |
|---|----------------------------------|
| 1,4-Dithioerythritol | (Merck, Darmstadt) |
| DNA Leiter | (NEB, Mannheim) |
| DNase I | (Invitrogen, Karlsruhe) |
| DNAzol | (Invitrogen, Karlsruhe) |
| dNTPs | (Invitrogen, Karlsruhe) |
| Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) | (Pan Biotech, Aidenbach) |
| ECL Detection Reagents | (Amersham Pharmacia, Freiburg) |
| Ecopac | (Cell Gesesys, Foster City, USA) |
| Ethylendiamintetraacetat (EDTA) | (ICN Biomedicals, Aurora, USA) |
| Ethylen Glycol-bis(2-aminoethylether)- N,N,N,N-Tetra-Essigsäure (EGTA) | (Sigma, Taufkirchen) |
| Eisessig | (Sigma, Taufkirchen) |
| Ethanol (EtOH) | (Sigma, Taufkirchen) |
| Ethidiumbromid (EtBr) | (Sigma, Taufkirchen) |
| Ficoll Typ 400 | (Pan Biotech, Aidenbach) |
| Fluorouracil-GRY [®] 5000 (5-FU) | (GRY-Pharma, Kirchzarten) |
| Formaldehyd | (Sigma, Taufkirchen) |
| Formamid | (Merck, Darmstadt) |
| Fötales Kälberserum (FBS) | (Pan Biotech, Aidenbach) |
| Giemsas Azur-Eosin-Methylenblaulösung | (Merck, Darmstadt) |
| Gelatine | (Merck, Darmstadt) |
| Glycin | (Sigma, Taufkirchen) |
| Glyzerin | (Sigma, Taufkirchen) |
| N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N- (2-ethanesulfonic acid) (HEPES) | (Sigma, Taufkirchen) |
| High Performance Chemiluminescence Film | (Amersham Pharmacia, Freiburg) |
| Kaliumchlorid (KCl) | (Merck, Darmstadt) |
| Kalziumchlorid (CaCl ₂) | (Sigma, Taufkirchen) |
| LB Agar | (Gibco BRL, Karlsruhe) |
| May-Grünwalds Eosin-Methylenblaulösung | (Merck, Darmstadt) |
| 2-Mercaptoethanol | (Sigma, Taufkirchen) |
| Methanol (MeOH) | (Merck, Darmstadt) |
| Methocult GF 3434 | (Cell Systems, St. Katharinen) |
| Methocult 3630 | (Cell Systems, St. Katharinen) |
| Milchpulver | (Merck, Darmstadt) |
| Natriumacetat (NaAc) | (Sigma, Taufkirchen) |

| | |
|---|-----------------------------|
| Natriumchlorid (NaCl) | (Sigma, Taufkirchen) |
| Natriumcitrat | (Sigma, Taufkirchen) |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | (Bio-Rad, München) |
| Natriumhydroxid (NaOH) | (Sigma, Taufkirchen) |
| Natriumfluorid (NaF) | (Sigma, Taufkirchen) |
| tert-Amylalkohol | (Sigma, Taufkirchen) |
| tetra-Natriumdiphosphatdekahydrat ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$) | (Sigma, Taufkirchen) |
| Nitrocellulose Membran | (Schleicher&Schüll, Dassel) |
| Orthovanadat | (Sigma, Taufkirchen) |
| Penicillin/Streptomycin (P/S) | (Gibco BRL, Karlsruhe) |
| Phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) | (Sigma, Taufkirchen) |
| Phosphate Buffered Saline (PBS) | (Pan Biotech, Aidenbach) |
| Phosphatase Inhibitor Cocktail 2 | (Sigma, Taufkirchen) |
| Ponceau-S | (Sigma, Taufkirchen) |
| Polyvinylpyrrolidin | (Sigma, Taufkirchen) |
| 2-Propanol | (Sigma, Taufkirchen) |
| Protaminsulfat | (Sigma, Taufkirchen) |
| Proteinase Inhibitor Cocktail (P8340) | (Sigma, Taufkirchen) |
| Propidiumiodid (PI) | (Sigma, Taufkirchen) |
| Rainbow Marker | (Amersham, Freiburg) |
| Saccharose | (Sigma, Taufkirchen) |
| N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin (TEMED) | (Serva, Heidelberg) |
| Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) | (Merck, Darmstadt) |
| Triton-X-100 | (Sigma, Taufkirchen) |
| Trizol | (Gibco BRL, Karlsruhe) |
| Trypan Blau | (Sigma, Taufkirchen) |
| Trypsin-EDTA | (Invitrogen, Karlsruhe) |
| Tween 20 | (Merck, Darmstadt) |
| Ultrapure H_2O | (Gibco BRL, Karlsruhe) |

2.1.7.2 Enzyme

| | |
|-----------------------------|-------------------------|
| Platinum Taq DNA Polymerase | (Invitrogen, Karlsruhe) |
| Platinum Pfx DNA Polymerase | (Invitrogen, Karlsruhe) |
| T4-DNA-Ligase | (Roche, Mannheim) |

| | |
|--------------------|--------------------------|
| T4-DNA-Ligase | (NEB, Frankfurt am Main) |
| Restriktionsenzyme | (NEB, Frankfurt am Main) |

2.1.7.3 Zytokine

| | |
|--|---------------------------|
| Granulocyte Colony Stimulating Factor (G-CSF), rekombinant human | (ImmunoTools, Friesoythe) |
| Interleukin-3 (IL-3), rekombinant murin | (ImmunoTools, Friesoythe) |
| Interleukin-6 (IL-6), rekombinant murin | (ImmunoTools, Friesoythe) |
| Interleukin-7 (IL-7), rekombinant murin | (ImmunoTools, Friesoythe) |
| Stem-Cell Faktor (SCF), rekombinant murin | (ImmunoTools, Friesoythe) |

Zytokine wurden in lyophilisiertem Zustand geliefert und in 0,1 % BSA (Bovine Serum Albumin)-Lösung rekonstituiert, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Nach dem Auftauen wurden sie bei 4°C inkubiert und innerhalb einer Woche verbraucht.

2.1.7.4 Lösungen

Bakterienkultur:

| | |
|---------------------|--|
| LB-Medium: | 25 g LB Agar, ad 1000 ml H ₂ O dest. |
| LB-Amp-Agarplatten: | 15 g LB Agar, Ampicillin 100 µg/ml, ad 1000 ml LB-Medium |
| 5xKCM: | 5.0 ml 3 M KCl, 4.5 ml 1 M CaCl ₂ , 7.5 ml 1 M MgCl ₂ , 13 ml H ₂ O dest. |

Zellkultur:

| | |
|--------------|--|
| FACS-Puffer: | 2.0 % FBS, 0.1 % PI (5 ng/ml Endkonzentration) |
| HBS: | 5.96 g HEPES, 8.18 g NaCl, 133 mg Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O, ad 50 ml H ₂ O dest., pH 7.2 |

Molekularbiologie:

| | |
|-------------------|--|
| TAE-Puffer (50x): | 242 g Tris, 57.1 ml Eisessig, 100 ml 0.5 M EDTA, pH 8.0, ad 1000 ml H ₂ O dest. |
|-------------------|--|

Southern Blot:

| | |
|-----------------------|--|
| Denaturierungslösung: | 45 ml 5 M NaCl, 7.5 ml 10 M NaOH, ad 150 ml H ₂ O dest. |
| 20x Transferpuffer: | 400 ml 50x Denhard's-Lösung, 400 g 10 % Dextran-sulfat-Lösung, 20 g SDS, ad 1000 ml H ₂ O dest. |

| | |
|------------------------|---|
| Denhard's-Lösung: | 5 g Ficoll Typ 400, 5 g Polyvinylpyrrolidin, 5 g BSA, ad 500 ml H ₂ O dest. |
| Hybridisierungspuffer: | 0.2 g Milchpulver, 2 g Dextransulfat, 6 ml 20x Transferpuffer, 2 ml Formamid, 1 ml 20 % SDS, 80 µl 500 mM EDTA, ad 25 ml H ₂ O |
| Waschlösung 1: | 50 ml 20x Transferpuffer, 20 ml 5% SDS, ad 500ml H ₂ O dest. |
| Waschlösung 2: | 5 ml 20x Transferpuffer, 20 ml 5 % SDS, ad 500 ml H ₂ O dest. |

Western Blot:

| | |
|--------------------------|---|
| Lysispuffer: | 50 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 10 % Glyzerin, 1 % Triton X-100, 100 mM NaF, 10 mM Na ₄ P ₂ O ₇ , frisch zugesetzt pro ml: 5 µl Aprotinin (200x), 10 µl 0.1 M PMSF, 10 µl 0.1 M Orthovanadat |
| Laemmli-Puffer: | 187.5 mM Tris, 6 % SDS, 30 % Glyzerin, Spatelspitze Bromphenolblau |
| 7,5 % Gellösung: | 5.65 ml 1.5 M Tris-Puffer (pH 8.8), 3.75 ml 30 % Polyacrylamid-Lösung, 150 µl 10 % SDS, 50µl 10 % APS, 2.9 ml H ₂ O, 1.5 µl TEMED |
| 12,5 % Gellösung: | 5.65 ml 1.5 M Tris-Puffer (pH 8.8), 6.25 ml 30 % Polyacrylamid-Lösung, 2 g Saccharose, 150 µl 10 % SDS, 50 µl 10 % APS, 5.4 ml H ₂ O, 1.5 µl TEMED |
| 4 % Sammelgel: | 2.5 ml 1.5 M Tris-Puffer (pH 6.8), 1.3 ml 30 % Polyacrylamid-Lösung, 100 µl 10 % SDS, 50 µl 10 % APS, 6.1 ml H ₂ O, 10 µl TEMED |
| 10xElektrophoresepuffer: | 151.4 g Tris, 720.65 g Glycin, 50g SDS, ad 5000 ml, pH 8.3 |
| 10xTransblot ohne MeOH: | 72.75 g Tris, 36.63 g Glycin, 0.475 g SDS, ad 5000 ml |
| Transblot-Puffer: | 80 ml Transblot ohne MeOH, 200 ml MeOH, ad 1000 ml |
| Ponceau-Lösung: | 0.5 g Ponceau-S, 1 ml Eisessig, ad 100 ml |
| 10x Net: | 438.3 g NaCl, 93.6 g EDTA, 302.9 g Tris, 25 g Triton-X 100, ad 5000 ml, pH 7.7 |
| G-Net: | 2.5 g Gelatine, 100 ml 10x Net, 10 s aufkochen, 20 min rühren, ad 1000 ml |
| 10xTBS | 12.11 g Tris, 87.66 g NaCl, ad 1000 ml (pH 8.8) |
| TBST: | 100 ml 10xTBS, 1ml Tween 20, ad 1000 ml |
| Stripping-Puffer: | 62.5 mM Tris pH 6.8, 0.1 M 2-Mercaptoethanol, 2 % SDS |

Maus:

- Avertin: Basislösung: 5 g Avertin in 15.5 ml tert-Amylalkohol gelöst
Arbeitslösung: 0.5 ml der Basislösung in 39.5 ml PBS (Endkonzentration 4 mg/ml)
- 5-Fluorouracil: Basislösung: 50 mg/ml (GRY-Pharma, Kirchzarten)
Arbeitslösung: 3 ml der Basislösung zu 2 ml PBS zugegeben
(Endkonzentration 30 mg/ml)
- Formalin: 10 % Formaldehydlösung
- Telleyesnickzky's: 450 ml EtOH, 25 ml Eisessig, 25 ml Formaldehyd

2.1.8 Kits

- Annexin V-PE Apoptosis Detection Kit I (Beckton Dickinson, Heidelberg)
- BigDye Terminator Cycle sequencing Kit (Appl. Biosystems, Foster City, USA)
- Endofree Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden)
- DNeasy® Mini Kit (Qiagen, Hilden)
- GFX™ PCR DNA & Gel Band PCR Purification Kit (Amersham Biosciences, Freiburg)
- GFX™ Micro Plasmid Prep Kit (Amersham Biosciences, Freiburg)
- Microspin S-300 HR & Megaprime DNA Labeling (Amersham Biosciences, Freiburg)
- RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Hilden)
- Thermoscript™ RT-PCR System (Invitrogen, Karlsruhe)

2.1.9 Software

- ABI Prism 310 (Applied Biosystems, Foster City, USA)
- CellQuest 3.1(f) (BD Biosciences, Palo Alto, USA)
- EndNote 6.0.2 (Thompson ISI, Carlsbad, USA)
- L-Calc™ (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada)
- MS Office XP (Microsoft, Redmond, USA)
- OpenLab Software 3.0.8 (Improvision Deutschland, Tübingen)
- Primer3 Program (Whitehead Institute, MIT, USA)
- SigmaPlot 2001 (SSPS Inc., Chicago, USA)
- TINA 2.0 (Raytest, Straubenhardt)
- WinMDI 2.8 (Joseph Trotter)

2.2 Methoden

2.2.1 Klonieren der Konstrukte

Sämtliche Lef-1 Konstrukte wurden für den retroviralen Gentransfer in Zelllinien sowie in primäre Knochenmarkzellen in die 'multiple cloning site' des modifizierten murinen Stammzellvirusvektors 2.1 (MSCV) stromaufwärts des grünen fluoreszierenden Proteins ('green fluorescent protein', GFP) und der 'internal ribosomal entry site' (IRES) einkloniert.

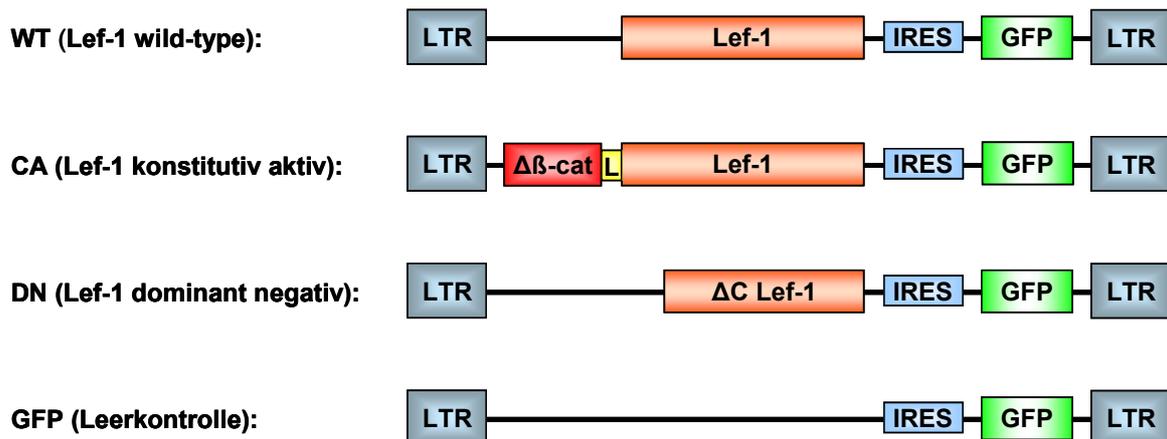


Abb. 2.1: Übersicht über die in dieser Arbeit hergestellten Konstrukte: GFP: green fluorescent protein; IRES: internal ribosome entry site; L: linker; LTR: Long terminal repeat; Δβ-cat: Lef-1 Bindungsdomäne von β-catenin

Lef-1 WT wurde aus dem von R. Grosschedl erhaltenen Plasmid (pBluescript Lef-1) mittels enzymatischem Verdau durch Afe I und Msc I ausgeschnitten, aufgereinigt und durch eine 'Blunt-End' Ligation in die Hpa I Stelle des MIG Vektors subkloniert. Erhaltene Klone wurden auf Insertion in der korrekten Orientierung überprüft.

Die cDNA für die Lef-1 Mutanten CA und DN wurden aus den jeweiligen Plasmiden (CA: pCG Lef-1 CA, DN: pCG Lef-1 DN) durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Dabei wurden spezielle Primer entwickelt, die zusätzlich zu der cDNA am 5' Ende eine EcoR I- und am 3' Ende eine Xho I-Bindungstelle amplifizieren. Die so erhaltenen PCR Produkte wurden ausgeschnitten, aufgereinigt, verdaut und in den mit EcoR I / Xho I verdaute leeren MIG-Vektoren kloniert. Sämtliche Konstrukte wurden vollständig durchsequenziert, um eventuelle Mutationen auszuschließen.

2.2.2 Bakterienkultur

2.2.2.1 Transformation der kompetenten *E.coli* Bakterien

Zur Transformation der Bakterien wurde ein Aliquot von kompetenten Zellen ('E.coli XL-1 blue' oder 'E.coli XL-10 Gold', Stratagene, Heidelberg) auf Eis aufgetaut. Je Ansatz wurden 10 µl 5x KCM, 1 µg Plasmid-DNA (oder 10 µl Ligationsansatz, siehe unter 2.2.7.2) und 25 µl kompetenter Bakterien mit H₂O dest. auf ein Volumen von 50 µl gebracht und erst für 20 min auf Eis, anschließend für 10 min bei RT inkubiert. In einem nächsten Schritt wurden 200 µl steriles S.O.C. Medium (Invitrogen, Karlsruhe) zugegeben und die Bakterien-Suspension zur Expression des Resistenzgens (β -Lactamase) für 60 min bei 37°C und 225 UPM im Bakterienschüttler kultiviert. Im Anschluss daran wurden 150 µl des Transformationsansatzes auf einer vorgewärmten LB-Ampicillin-Agarplatte ausplattiert. Die Platte wurde über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert und am folgenden Morgen auf gewachsene Kolonien überprüft. Einzelkolonien konnten daraufhin isoliert und zur Gewinnung von Plasmid-DNA expandiert werden.

2.2.2.2 Präparation von Plasmid-DNA

Das Prinzip der Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien beruht auf der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979).

2.2.2.2.a Mini-Präparation

Um sicherzustellen, dass mittels Ligation (siehe 2.2.7.2) und Transformation (siehe 2.2.7.1) die gewünschte Integration der Plasmid-DNA in kompetente Bakterien stattfand, wurden Einzelkolonien mit sterilen Pipettenspitzen aus den Agarplatten 'gepickt' und in 3-5 ml LB-Medium (Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin) über Nacht bei 37°C und 225 UPM inkubiert. Zur Plasmid-DNA Extraktion wurde ein Kit der Firma Amersham Bioscience nach Herstellerangaben verwendet.

2.2.2.2.b Maxi-Präparation

Zur Gewinnung größerer Mengen an Plasmid-DNA wurden 200 µl der positiv getesteten Minipräparation in 100 ml LB-Medium (Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin) aufgenommen und erneut über Nacht bei 37°C und 225 UPM im Bakterienschüttler kultiviert. Die

Extraktion der Plasmid-DNA erfolgte am darauf folgenden Morgen mit Hilfe des Qiagen Maxiprep Kits (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben. Die Ausbeute lag zwischen 100-500 µg Plasmid-DNA.

2.2.3 Zellkultur

Sämtliche unter 2.1.3 erwähnten Zelllinien wurden in einem Inkubator (Binder, Tuttlingen) bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Den verwendeten Kulturmedien, RPMI-1640 für die Suspensionszelllinien 32D, Ba/F3 sowie die intermediäre WEHI B3 und DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, 4.5 g/l Glukose, L-Glutamin, Natriumpyruvat, 3.7 g/l NaHCO₃) für die adhärenenten Zelllinien GP+E86, 293T und NIH-3T3, wurde 10 % fötales Kälberserum (FBS) sowie 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin (P/S) zugegeben ('Vollmedium'). Für das Kultivieren von Knochenmark wurde dem DMEM 15 % FBS, P/S sowie ein Zytokincocktail (6 ng/ml IL-3, 10 ng/ml IL-6 und 100 ng/ml SCF Endkonzentration) zugesetzt. *Ex vivo* Zellkulturen wurden, abhängig von den durchgeführten Experimenten, wahlweise mit Zytokincocktail, IL-3 alleine (6 ng/ml) oder ohne Zytokine kultiviert.

Die Suspensionszelllinien 32D, Ba/F3 sowie WEHI B3 wurden in Zellkulturflaschen unterschiedlicher Größen (Sarstedt, Nürnberg) in RPMI-1640 Vollmedium gehalten. Die IL-3 abhängigen Suspensionszelllinien 32D und Ba/F3 wurden mit RPMI Vollmedium und einem Zusatz von 10 % WEHI 3B-konstituiertem Medium kultiviert. Proliferationsassays wurden mit RPMI Vollmedium und definierten IL-3 Zusatz (25 ng/ml) durchgeführt.

Die verwendeten Suspensionszelllinien verfügen über eine hohe Verdopplungsrate und wurden daher alle 3 Tage ca. 1:20 gesplittet. Adhärenente Zellen wurden ebenfalls alle 2 bis 3 Tage verdünnt. Um dies zu erreichen, wurde in einem ersten Schritt das Medium abgenommen und die Zellen einmal mit PBS (Pan Biotech, Aidenbach) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA (Invitrogen, Karlsruhe) für etwa 3 min bei 37°C inkubiert, um die Zellen komplett von der Platte zu lösen. Nach einmaligem Waschen und Inaktivieren des Trypsin-EDTAs mit DMEM wurden sie wieder in Medium aufgenommen und in einer ca. 1:10 Verdünnung replatiert.

2.2.3.1 Transiente Transfektion

Ziel der transienten Transfektion ist die Produktion von Virus enthaltendem Medium (*engl. virus containing medium*, VCM). Dieses Medium kann anschließend für die stabile

Transduktion von Verpackungszelllinien (z.B. GP+E86) oder direkt für die Transduktion von murinem Knochenmark eingesetzt werden. Für die transiente Transfektion wurde die Zelllinie 293T benutzt, da sie leicht und mit hoher Effizienz zu transfizieren ist.

Am Vortag der Transfektion (Tag 0) wurden 1.2×10^7 293T Zellen in einer 15 cm Kulturschale (Corning, Acton, USA) für adhärenente Zellen plattiert, so dass am Tag der Transfektion (Tag 1) die Platte zu ca. 70-80 % konfluent ist. Etwa vier Stunden vor der Transfektion wurde das Medium noch einmal vorsichtig gewechselt. Erster Schritt der Transfektion ist das Zugabe von jeweils 30 µg Plasmid-DNA und Etoposin-Vektor zu sterilem H₂O dest. zu einem Volumen von 900 µl. 100 µl einer sterilen 2.5 M CaCl₂-Lösung (Sigma, Taufkirchen) werden anschließend tröpfchenweise beigegeben, vorsichtig gemischt und eine Minute bei RT inkubiert. Diese Lösung wurde in einem nächsten Schritt ebenfalls tröpfchenweise zu 1 ml einer sterilen Hepes-gepufferten Salzlösung (HBS) mit einem definierten pH-Wert von 7.2 beigegeben, ca. 3-4 min bei RT inkubiert und anschließend vorsichtig auf die 293T Zellen getropft, ohne die Zellen zu irritieren oder das Medium zu vermischen. Am folgenden Morgen (Tag 2) wurde das Medium vorsichtig gewechselt, um die entstandenen Kalziumkristalle zu entfernen. Ab Tag 3 wurde in Abständen von jeweils 12 Stunden insgesamt bis zu viermal das Medium abgenommen und frisches Medium beigegeben. Das abgenommene, Virus enthaltende Medium wurde mit einem 0.45 µm Filter (Millipore, Schwalbach) filtriert, um Zellreste zu entfernen, und sofort zur Transduktion von GP+E86 Zellen oder murinem Knochenmark benutzt, wahlweise auch aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

2.2.3.2 Herstellung einer stabilen Verpackungszelllinie

Zur stabilen Transduktion der Verpackungszelllinie wurden einen Tag vor der Transduktion 5×10^4 GP+E86 Fibroblasten pro Vertiefung einer 6-Well Platte für adhärenente Zellen (Corning, Acton, USA) in die Vertiefungen plattiert (Tag 0). Am folgenden Morgen (Tag 1) wurde das Medium entfernt und vorsichtig 1 ml frisches oder aufgetautes VCM auf die Zellen gegeben. Um das Einschleusen des Virus zu erleichtern, wurde Protaminsulfat (Sigma, Taufkirchen) zu einer Endkonzentration von 10 µg/ml zugesetzt. Nach vier Stunden wurde ca. 2 ml frisches Medium beigegeben. Dieser Ablauf der Transduktion wurde alle 12 Stunden für weitere dreimal wiederholt. Die Zellen wurden anschließend für 48 Stunden expandiert, um auch die Expression des grünfluoreszierenden Proteins (GFP) sicherzustellen. Zuletzt wurden die Zellen trypsinisiert, in FACS Puffer aufgenommen und mit Hilfe eines fluoreszenz-aktivierten Zellsortierers (FACS) FACSVantage (BD,

Heidelberg) in GFP positive und nicht transduzierte Zellen aufgetrennt. GFP positive Zellen wurden anschließend expandiert und ein weiteres Mal sortiert, um hochreine (> 99 % GFP positive Zellen) transduzierte Verpackungszelllinien zu erhalten.

In einigen Fällen wurde anschließend ein Einzelzellsortierungsschritt durchgeführt, da der Titer der transduzierten Verpackungszelllinien zu niedrig erschien. Um die Effizienz zu erhöhen, wurden GFP positive Einzelzellen in 96-Well Platten sortiert und expandiert.

2.2.3.3 Test auf Virusproduktion

Um zu überprüfen, in welchem Umfang sowohl die transduzierten Verpackungszelllinien als auch die transient transfizierten 293T Zellen das integrierte Plasmid produzieren, wurde eine Titration mit NIH-3T3 Zellen durchgeführt. Dazu wurden 1×10^5 NIH-3T3 Zellen je Vertiefung in einer 6-Well Platte plattiert und am folgenden Tag 500 μ l des VCM der 293T Zellen oder des Überstandes konfluenter Verpackungszelllinien unter Zugabe von Protaminsulfat einer Endkonzentration von 10 μ g/ml beigefügt. Nach ca. 3-4 Stunden wurde frisches Vollmedium hinzugefügt, um die Transduktion zu beenden. 48 Stunden nach Beendigung der Transduktion wurden die Zellen durchflusszytometrisch auf GFP-Expression an einem FACS Calibur (BD, Heidelberg) überprüft. Stabile Verpackungszelllinien wurden als ausreichend gut angesehen, wenn mehr als 40 % der NIH-3T3 Zellen transduziert wurden. In allen anderen Fällen wurde eine Einzelzellsortierung durchgeführt, um einen möglichst optimalen Klon für das Transduzieren von murinem Knochenmark zu erhalten.

2.2.4 Tiere und Tierhaltung

2.2.4.1 Donormäuse

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

2.2.4.2 Rezeptormäuse

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

2.2.4.3 Haltung der Tiere

Sämtliche Tiere wurden im Tierstall der GSF Großhadern gezüchtet und unter standardisierten Bedingungen gehalten. Dabei betrug die Raumtemperatur $22 \pm 2^\circ\text{C}$, die relative Luftfeuchtigkeit lag bei 50-60 %, und der hell-dunkel-Zyklus lag bei 12 Stunden. Die Rezeptormäuse wurden nach Geschlechtern getrennt und bis vier Wochen nach Versuchsbeginn in einer speziellen IVC (*engl. internal ventriculation cage*, Einzelbelüfterkäfig) Anlage gehalten, um das Infektionsrisiko nach der Bestrahlung so gering wie möglich zu halten. Neben sterilem Futter bekamen die Rezeptormäuse autoklaviertes, mit Ciprofloxacin versetztes Wasser (Ciprobay 400, Bayer, 20 mg/400 ml Trinkwasser).

Nach vier Wochen wurde das Ciprofloxacin im Trinkwasser abgesetzt und alle Tiere in Typ 2 Makrolon Käfigen (Ibeco, Mannheim; 26 cm x 20 cm x 14 cm, L x B x H) umgesetzt. Die Besatzdichte lag bei 1 bis maximal 5 Mäusen pro Käfig.

2.2.5 Knochenmarktransplantationmodell

2.2.5.1 Überblick

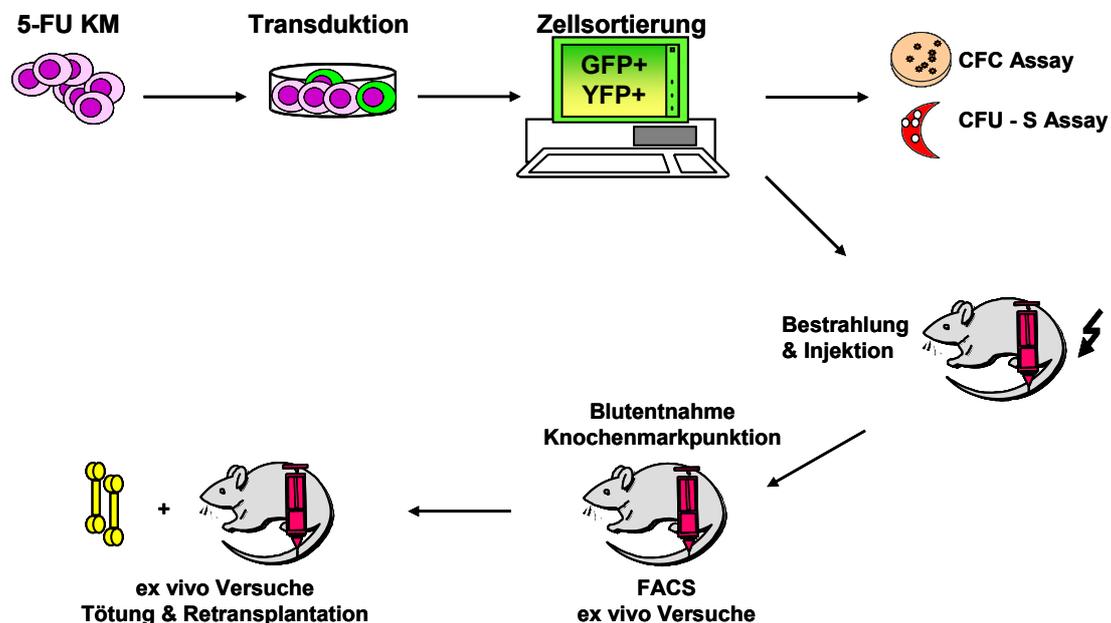


Abb. 2.2: Experimentelles Schema des murinen Knochenmarktransplantationsmodell.

Am Tag 0 wurde den Donormäusen intravenös in die Schwanzvene 5-FU (5-Fluorouracil-GRY® 5000, 150 mg/kg) injiziert. Dieses Medikament tötet schnell teilende Zellen ab. Vorläufer- und Stammzellen sind meist ruhende Zellen, so dass diese Zellen im Knochenmark nach Injektion angereichert werden (Randall und Weissman, 1997). Die Mäuse wurden 4 Tage nach der Injektion getötet, Tibias und Femura herauspräpariert und mit serumangereicherterem Medium gespült, um das Knochenmark zu erhalten. Diese Knochenmarkzellen wurden anschließend für 2 Tage in einem speziellen Knochenmarkmedium (Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) + 15 % FBS, P/S, 6 ng/ml IL3, 10 ng/ml IL6 und 100 ng/ml SCF) kultiviert, was eine Prästimulation und ein Eintreten in den Zellzyklus zum Ziel hat. Das Erreichen der Zellzyklusphase ist essentiell, um das retrovirale Konstrukt stabil in das Genom der Zellen zu integrieren, ferner hilft es bei einer raschen Regeneration der Hämatopoese bei der anschließenden Transplantation in die Empfängertiere.

Am Tag 5 wurden die stabilen Verpackungszelllinien GP+E86 MIG, Lef-1 WT, Lef-1 CA, und Lef-1 DN radioaktiv bestrahlt (4000 cGy mittels einer ¹³⁷CS γ -Strahlen Quelle), um das weitere Wachstum dieser Zellen zu unterbinden. Am Tag 6 wurden das prästimulierte Knochenmark geerntet, in frischem Medium aufgenommen, anschließend zur Verpackungszelllinie zugefügt und gemeinsam für 48 Stunden inkubiert. In einzelnen Fällen würde zur Erhöhung der Effizienz zusätzlich VCM zugegeben. Während der Transduktion wurde zur Verhinderung der Verklumpung der viralen Partikel stets Protaminsulfat mit einer Endkonzentration von 10 μ g/ml zugefügt (Sigma, Taufkirchen), ein essentieller Schritt, um eine adäquate Transduktionseffizienz zu erreichen.

Am Tag 8 wurde das Knochenmark vorsichtig von der Verpackungszelllinie separiert und für weitere 48 in frischem Spezialmedium kultiviert, um die Expression des GFP-Proteins nachweislich sicherzustellen. Anschließend wurde das Knochenmark komplett mit Hilfe eines Zellschabers (Sarstedt, Nümbrecht) geerntet und in einem speziellen FACS-Puffer mittels eines FACSVantage Zellsortierer (BD, San Jose, USA) auf hochreine GFP-positive Knochenmarkzellen sortiert.

GFP positive Zellen wurden wahlweise hochrein oder in einer definierten Mischung mit nicht transduzierten Zellen in zuvor radioaktiv bestrahlte Rezipientenmäuse (800-850 cGy mittels einer ¹³⁷CS γ -Strahlen Quelle) in die Schwanzvene injiziert. Diese Rezipiententiere wurden wie unter 2.2.4.3 beschrieben gehalten. 4 Wochen nach der Transplantation wurde den Tieren peripheres Blut entnommen, um zu kontrollieren, ob die Mäuse die injizierten Zellen zur Rekonstitution des hämatopoetischen Systems angenommen hatten und ein 'engraftment' aufweisen. Auch zu späteren Zeitpunkten wurde peripheres Blut entnommen,

um das 'Engraftment' über die Zeit zu verfolgen und Blutanalysen durchzuführen. Ebenfalls wurden – frühestens 8 Wochen post-transplant – Knochenmarkspunktionen der Femura von Empfängertieren durchgeführt. Diese Proben wurden anschließend immunphänotypisch untersucht und für *ex vivo* Experimente benutzt. Die Tiere wurden neben der Entnahme von peripherem Blut zudem regelmäßig auf optisch sichtbare Zeichen einer (leukämischen) Erkrankung untersucht, wie etwa Blässe in den Füßen, Schweratmigkeit, gekrümmter Körper, abstehendes Fell oder ein gestörter Bewegungsapparat. Die Tiere wurden als moribund erachtet, wenn eines dieser Symptome deutlich zu sehen war.

Im Falle von erkrankten Mäusen wurden die Tiere wie unter 2.2.5.4 getötet, sowie Blut, Knochenmark und andere Organe wie unter 2.2.5.5 beschrieben entnommen. Das erhaltene Material wurde immunphänotypisch charakterisiert, fand Verwendung in *ex vivo* Experimenten, oder wurde zur späteren Untersuchung eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.5.2 Blutentnahme

In regelmäßigem Abstand wurde allen Mäusen im Versuch Blut entnommen, um das 'Engraftment' dieser Tiere zu überprüfen und immunphänotypische Analysen durchzuführen. Zudem wurde der Gehalt an Leukozyten und Erythrozyten bestimmt, um eventuelle Anomalien frühzeitig zu erkennen. Blutausstriche wurden angefertigt, um eine morphologische Charakterisierung und Differenzierung der Leukozyten sicherzustellen.

Zur Blutentnahme wurden die Mäuse in einer speziellen Vorrichtung fixiert und über einer der beiden Lateralvenen am Schwanz mit einer Skalpellklinge (Feather) geritzt. Mittels einer Heparinmikrovette® (Sarstedt, Nümbrecht) wurde das Blut aufgefangen.

2.2.5.3 Knochenmarkpunktion

Frühestens 8 Wochen nach Versuchsbeginn und teilweise zu späteren Zeitpunkten wurde bei den Versuchsmäusen eine Knochenmarkpunktion durchgeführt. Dabei wurde stets auf einen Mindestabstand von 4 Wochen zwischen zwei Entnahmen beim selben Tier geachtet.

Für die Punktion wurden die Tiere in einem ersten Schritt anästhesiert. Dies wurde durch eine intraperitoneale Injektion (BD Microlance, 27 G) mit Avertin (2-2-2 Tribromoethanol, Aldrich, 0,4-0,75 mg/g, zubereitet nach Anleitung des Herstellers) erreicht. Nach dem

Eintreten der Toleranzphase wurde aus dem Femur Knochenmark durch Unterdruck mittels einer 3 ml Spritze (Tyco Healthcare, Mühlhausen) und einer Kanüle (BD Microlance, 24G) entnommen, anschließend sofort in 3 ml DMEM mit 15% FBS aufgenommen und bis zur Verarbeitung auf Eis gelagert.

2.2.5.4 Tötung

Kranke Mäuse wurden mittels CO₂ (Linde, Wiesbaden) getötet. Aufgrund des höheren spezifischen Gewichts ist CO₂ schwerer als Luft und bildet so eine Gasschicht am Boden des Gefäßes.

Um die Erstickungsphase so kurz wie möglich zu gestalten, wurde in das dafür vorgesehene Gefäß zuerst das Gas eingeleitet, anschließend die Tiere hineingesetzt und der Tod abgewartet.

2.2.5.5 Sektion

In einem ersten Schritt wurde bei der soeben getöteten Maus die Brusthöhle mit einem sterilen Sezierbesteck geöffnet und Blut mit einer heparinisierten Spritze direkt aus dem Herzen entnommen. Anschließend fand eine genaue Inspektion der Organe statt, im Falle von Auffälligkeiten wurden diese festgehalten. Das Knochenmark wurde wie unter 2.2.5.1 beschrieben entnommen. Die Milz wurde komplett herauspräpariert, von umgebendem Fettgewebe befreit, sowie gewogen und vermessen. Ein Teil der Milz wurde zerkleinert, mazeriert und filtriert, um eine Einzelzellsuspension zu erhalten. Blutausstriche wurden angefertigt und die Erythrozyten- und Leukozytenzahl im Blut bestimmt. Erythrozyten aus Blut, Milz und Knochenmark wurden anschließend mittels eines Ammoniumchloridpuffers für 10 min bei RT lysiert. Anschließend wurden die Zellproben gewaschen und gezählt, sowie für *ex vivo* Experimente benutzt. Nicht sofort verwendetes Material wurde eingefroren und in Flüssigstickstoff gelagert. Für die pathologisch-histologische Untersuchung der erkrankten Tiere wurden Organe wie Herz, Lunge, Niere, Lymphknoten, Gehirn sowie Anteile von Lunge, Leber, Darm und Milz in Formalin fixiert und für die Analyse in das Pathologische Institut der GSF nach Neuherberg gesandt.

2.2.5.6 Durchflusszytometrische Immunphänotypisierung

Die erythrozytenfreien Einzelzellsuspensionen aus Blut, Knochenmark und Milz wurden immunphänotypisch unter Verwendung der Durchflusszytometrie analysiert. Bei dieser Nachweismethode nutzt man die hochspezifische Antigen-Antikörper Bindung. In einem ersten Schritt färbt man die Einzelzellen mit fluorochrommarkierten, monoklonalen Antikörpern. Je nach Zelltyp werden spezifische Oberflächenmoleküle exprimiert, die diese gefärbten Antikörper binden, so dass eine Identifizierung und Charakterisierung dieser Zellen stattfinden kann. Neben der Analyse der Zellen aufgrund spezifischer Expressionsprofile dieser Oberflächenmoleküle lassen sich zudem Aussagen über Größe und Granularität der Einzelzellsuspensionen anstellen.

Ca. 1×10^5 Zellen wurden mit PBS in einem speziellen FACS Röhrchen (BD Falcon, Heidelberg) gewaschen und anschließend mit fluoreszenz-konjugierten Antikörpern (Verdünnung nach Herstellerangaben, siehe 2.1.6) versetzt. Die Proben wurden anschließend 20 Minuten auf Eis und in Dunkelheit inkubiert, um die Fluoreszenzsignale nicht abzuschwächen. Im Anschluß an die Färbung wurden die Zellen mit PBS gewaschen, um überschüssige nicht gebundene Antikörper zu entfernen, und in FACS Puffer (PBS + 2 % FBS + 0.1 % Propidiumiodid, PI) aufgenommen. Diesem Puffer ist Propidiumiodid zugesetzt, welches tote Zellen anfärbt und somit deren Ausgrenzung bei der Messung ermöglicht. Für die Analyse wurden mit Phycoerythrin versehene Antikörper Sca-1, CD117 (cKit), CD11b (Mac-1), Gr-1, Ter119, CD4, CD19, CD23, CD24, CD41, CD 43, Fcγ RII/III, CD45.1, F4/80, AA 4.1, IL7Rα, sowie mit Allophycocyanin versehene Antikörper CD117 (cKit), CD11b (Mac-1), Gr-1, B220, CD8 verwendet. Die Fluoreszenz wurde mit Hilfe eines FACSCalibur Zytometer (BD, San Jose, USA) detektiert und mittels der CellQuest Software analysiert.

2.2.6 Zellbasierte Assays

2.2.6.1 Ex vivo Proliferation

Die *ex vivo* Zellproliferation wurde in DMEM unter Zugabe von 15 % FBS, P/S sowie den Zytokinen IL3 (6 ng/ml), IL6 (10 ng/ml) und SCF (100 ng/ml) durchgeführt. Daneben wurden IL3-abhängige Zellpopulationen, die Lef-1 WT oder Lef-1 CA exprimieren, *ex vivo* durch Kultivierung in einem Medium (DMEM, 15 % FBS, P/S) generiert, dem als Zytokin lediglich IL3 (6 ng/ml) zugesetzt wurde. Zelllinien konnten durch das Sortieren einzelner Zellen dieser Populationen in 96-Well Platten (Sarstedt, Nümbrecht), in welchen 200 µl

DMEM mit FBS (25 %) und IL3 (6 ng/ml) vorgegeben wurden, unter Verwendung des BD FACSVantage Zellsortierers hergestellt werden. Nach einer Inkubationszeit von 2 Wochen wurden einzelne 'Wells' auf das Entstehen von Zellpopulationen untersucht und im Falle von Wachstum expandiert. Diese Zelllinien konnten anschließend für weitere Untersuchungen verwendet werden.

2.2.6.2 'Colony Forming Unit Spleen' Assay (CFU-S)

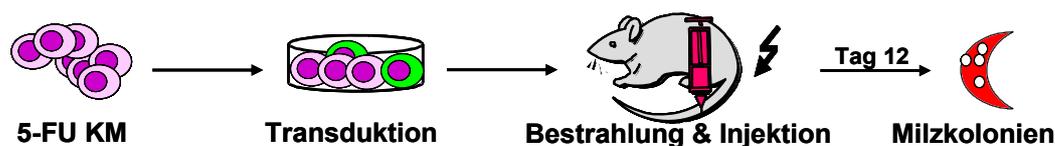


Abb. 2.3: Experimenteller Ablauf des CFU-S Assay.

Der CFU-S Assay untersucht die Frequenz der Stammzellen, die im Gegensatz zu den frühesten repopulierenden Stammzellen ihr Potential zur Langzeitrekonstitution bestrahlter Mäuse verloren haben, jedoch zur Kurzzeitrekonstitution und zur Bildung von Milzkolonien fähig sind (so genannte 'short term repopulating stem cells', ST-HSC).

Primäres murines Knochenmark wurde nach Vorbehandlung mit 5-FU (siehe auch 2.2.5.1) retroviral mit den verschiedenen Konstrukten transduziert und basierend auf der Expression von GFP hochrein an einem Zellsortierer FACSVantage sortiert. Transduzierte, GFP positive Zellen wurden in definierten Mengen in letal bestrahlte Rezipientenmäuse injiziert. Nach 12 Tagen wurden diese Tiere getötet und die Ausbeute an kurzzeit-repopulierenden Stammzellen (ST-HSC) durch die Anzahl an makroskopisch sichtbaren Milzkolonien bestimmt (CFU-S), die nach Inkubation der Milzen in Telleyesnickzky's Lösung gut sichtbar waren.

2.2.7 Molekularbiologischen Methoden

2.2.7.1 DNA-Verdau mittels Restriktionsenzymen

Die unter 2.2.2.2 erhaltene Plasmid-DNA wurde mittels enzymatischer Restriktionsanalyse auf Identität und Orientierung überprüft. Sämtliche Restriktionsenzyme wurden von der Firma New England Biolabs (NEB, Frankfurt am Main) nach Angaben des Herstellers verwendet. Der Restriktionsansatz wurde anschließend auf einem 0.8-1.2 %igem Ethidiumbromid enthaltenden Agarosegel aufgetrennt und unter UV-Licht detektiert.

Verdaute Plasmidelemente, welche für eine Klonierung nötig waren, wurden im Anschluss an den Verdau auf einem 0.8-1.2 %igem Agarosegel aufgetrennt, unter UV-Licht ausgeschnitten und mittels des 'GFX™ PCR DNA & Gel Band PCR Purification Kit' (Amersham Biosciences, Freiburg) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

2.2.7.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation von DNA-Fragmenten ('Insert') und Vektor-DNA wurden meist drei Reaktionen mit unterschiedlichen Verhältnissen von Insert und Vektor-DNA angesetzt. Als Ideal wurde ein Verhältnis von 1:3 angesehen, jedoch wurden meist die Kombinationen von 1:2, 1:3 und 1:5 durchgeführt. Zusätzlich wurde eine Religationskontrolle ohne 'Insert' mitgemacht. Beide DNA-Fragmente wurden mit H₂O, 10 x T4 Ligasepuffer und T4-Ligase (beide NEB, Frankfurt am Main) auf ein Reaktionsvolumen von 20 µl eingestellt und über Nacht bei 16°C ligiert. Vor der Transformation (2.2.2.1) wurden die Ligationsansätze für 10 min bei 65°C inkubiert, um das Ligaseenzym zu inaktivieren.

2.2.7.3 Isolierung von mRNA aus Zellen

Die Isolierung von mRNA aus Zellen wurde mit Hilfe des Trizol-Reagenz (Gibco BRL, Karlsruhe) nach Herstellerangaben durchgeführt. Murine hämatopetische Subpopulationen wurden teilweise aufgrund sehr geringer Zellzahlen mit dem RNeasy® Mini-Kit (Qiagen, Hilden) durchgeführt, um eine messbare Ausbeute zu erreichen.

2.2.7.4 Reverse Transkription: Synthese von cDNA

Die Eigenschaft des Enzyms 'Reverse Transkriptase', mRNA als Matrize für die Synthese eines kompletären cDNA-Strangs zu benutzen, wird bei der Umschreibung der mRNA in cDNA, der sog. reversen Transkription, genutzt. Hierfür wurde mit Hilfe des Thermoscript™ RT-PCR System (Invitrogen, Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers gearbeitet. Um die Kontamination der cDNA-Proben mit genomischer DNA auszuschließen, wurde der reversen Transkription eine DNase I Behandlung (Invitrogen, Karlsruhe) vorgeschaltet, ebenfalls nach Herstellerangaben.

Jeweils gleiche Mengen an fotospektrometrisch gemessener mRNA wurden für die cDNA-Synthese verwendet, um in einer anschließenden PCR-Reaktion auf semiquantitativem Niveau arbeiten zu können. Zusätzlich dazu wurde vor der gewünschten Analyse-PCR

noch die Expression eines Kontrollgens der einzelnen cDNAs mittels PCR überprüft, um eben diese Semiquantität zu bestätigen.

2.2.7.5 Isolierung von genomischer DNA aus Zellen

Genomische DNA wurde sowohl für die Verwendung im Southern Blot (2.2.7.8) als auch für den Nachweis der Rekombination (2.2.7.6) isoliert. Genomisches Material für den Southern Blot wurde aus erkrankten Mäusen und Zelllinien aus mindestens 5×10^6 Zellen mit Hilfe des DNAzol-Reagenz generiert (Invitrogen, Karlsruhe). Für die Extraktion genomischer DNA zur Rekombinations-PCR wurde das DNeasy[®] Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben verwendet.

2.2.7.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eignet sich aufgrund ihrer Fähigkeit, spezifische DNA-Fragmente zu amplifizieren, für eine Vielzahl an Nachweisreaktionen. In dieser Arbeit wurde unter anderem die Expression von Lef-1 in verschiedenen murinen hämatopoetischen Subpopulationen, in den Verpackungszelllinien sowie in verschiedenen Organen erkrankter Tiere mittels der PCR nachgewiesen. Ferner wurden mit Hilfe dieser Technik Fragmente einzelner Mutanten für die anschließende Klonierung amplifiziert. Weitere Anwendungen waren die Erstellung eines Expressionsprofils in aufgereinigten, sortierten Knochenmarkssubpopulationen erkrankter Tiere sowie der daraus generierten Zelllinien. Dabei wurde stets darauf geachtet, die Menge an Input-cDNA und die Anzahl der Zyklen so zu wählen, dass das Erreichen der Sättigungsphase nie erreicht wird. Für den Nachweis einer möglichen DJ_H Rekombination wurde eine so genannte Multiplex-PCR Strategie angewandt. Zwei Vorwärts-Primer und ein Rückwärts-Primer wurden so gewählt, dass sowohl die Keimbahn-Konfiguration (mit einer amplifizierten Größe von 2.15 kb) als auch die Rekombinationen DJ_H1-DJ_H4 (mit den Größen ~1.46, ~1.15, ~0.73 und ~0.20 kb) amplifiziert werden können. Die Menge an hier eingesetzter genomischer DNA lag zwischen 50-200 ng/μl, als Positivkontrolle (Rekombination) diente genomische DNA aus murinem Milzgewebe, als Negativkontrolle diente die murine myeloische Zelllinie 32D (Keimbahn). Das PCR Protokoll hierfür zeigt Tabelle 2.1.

| | Temperatur | Zeit | Zyklen |
|------------------------|------------|--------------|--------|
| Initiale Denaturierung | 94°C | 5 min | |
| Denaturierung | 94°C | 1 min | 35x |
| Annealing | 60°C | 1 min | |
| Elongation | 72°C | 1 min 45 sec | |
| Termination | 72°C | 10 min | |

Tabelle 2.1: Übersicht der DJ_H Rekombinations-PCR.

2.2.7.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese diente zum Nachweis von exprimierten Genen, zur Bestimmung der Größe und Menge von DNA-Fragmenten sowie zur Auftrennung und anschließender Isolierung von DNA. Durch das Anlegen einer Spannung zeigen DNA-Fragmente aufgrund ihrer Größe unterschiedliche Laufgeschwindigkeiten und können so separiert werden. Agarose (Sigma, Taufkirchen) wurde mit einem Anteil von 0.8-1.2 % in einer entsprechenden Menge 1 x TAE Puffer durch kurzes Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Anschließend wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0.33 µg/ml zugegeben und die Lösung in einer Gelkammer (Peqlab, Erlangen) polymerisiert. Nachdem das Gel ausgehärtet war, wurde das Gel mit Laufpuffer (1 x TAE) überschichtet, die Proben mit 10x Ladepuffer verdünnt und in die Kammern aufgetragen. Auftrennung erfolgte durch das Anlegen einer Spannung zwischen 80 und 120 V für etwa 30-60 min, je nach Größe des Gels. Zur Bestimmung der jeweiligen Größe wurden entsprechende DNA-Marker mit definierten Fragmentgrößen (NEB, Frankfurt am Main) verwendet.

2.2.7.8 Southern-Blot

Der Southern-Blot wurde zur Analyse der viralen Integration sowie zur Bestimmung der Klonalität der nachgewiesenen Leukämien durchgeführt. Genomische DNA aus peripherem Blut, Knochenmark und Milz wurde mit Hilfe des DNAzol-Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe) nach Herstellerangaben isoliert (siehe 2.2.7.5). Der Southern Blot wurde anlehnend an Standardprotokolle durchgeführt (Sauvageau, 1997). Erster Schritt ist eine Verdauung mit EcoR I, das die provirale DNA einmal schneidet und ein spezifisches Produkt für die Integration bildet. Um die vollständige Integration des Plasmids zu

überprüfen, wurde die DNA mit NheI verdaut, ein Enzym, das spezifisch in der LTR Region schneidet und somit das komplette Insert ausschneidet. Die verdaute DNA wurde anschließend auf einem 0.8 %igem Agarosegel mit 0.33 µg/ml Ethidiumbromid aufgetrennt. Im Anschluss daran wurde die DNA in einer 0.2 N HCl-Lösung partiell depuriniert und darauf folgend in einem Denaturierungspuffer gewaschen. Mittels Kapillarkraft wurde die DNA im nächsten Schritt mit Hilfe eines 10x Transferpuffers über Nacht auf eine zeta-Probe GT Membran (Amersham Biosciences, Freiburg) übertragen. Am folgenden Morgen fand das 'Cross-Linking' der DNA mit der Membran mit einem UV-Linker bei 150 mJ statt. Als Probe diente ein GFP-Fragment mit einer Länge von 700 bp, welches aus dem pEGFP-C1 Vektor geschnitten wurde und mit [α - 32 P]-dCTP mittels des Megaprime-DNA-Labeling Kits (Amersham Biosciences, Freiburg) nach Herstellerangaben markiert worden war. Anschließend wurde die Probe mit einer Microspin S-300 HR Säule gereinigt. Die Hybridisierung mit dem [α - 32 P]-GFP wurde bei 62°C über Nacht vollzogen. Nach zwei Waschschrritten wurde die Membran getrocknet, mit einer Plastikfolie blasenfrei bedeckt und mit einem Film (Kodak, München) in einer entsprechenden Filmcassette bei -80°C inkubiert. Die Expositionszeiten variierten je nach Intensität des Signals zwischen 24 Stunden und 14 Tagen.

2.2.8 Proteinbiochemische Methoden

2.2.8.1 Präparation von Proteinlysaten

Die Expression des Lef-1 Proteins und der verwendeten Mutanten wurde mittels Western Blot nachgewiesen. Für die Proteinextraktion wurden ca. 5×10^6 transduzierte NIH-3T3 Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen und nach Zentrifugation in einem entsprechenden Lysepuffer aufgenommen (RIPA), dem jedes Mal frisch die Proteaseinhibitoren 1x Aprotinin, 1 mM PMSF und 1 mM Orthovanadat zugesetzt wurden. Nach 30 minütiger Inkubation bei 4°C und stetiger Rotation (10 UPM) wurde das Zelllysat 30 min bei 14.000 UPM und 4°C in einer Tischzentrifuge von Zelldebrisresten getrennt und als Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bei -80°C aufbewahrt.

2.2.8.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels des Bradford-Assays

Die Konzentrationsbestimmung der extrahierten Proteine wurde mit der Methode nach Bradford durchgeführt (Bradford, 1976). Grundprinzip dieser Nachweismethode ist eine Verschiebung des Absorptionsmaximums der sauren Lösung des Farbstoffs Coomassie-

Blau von 470 nm auf 595 nm bei der Bindung dieser Lösung an saure oder basische Gruppen eines Proteins. Eine direkte Korrelation zwischen der Intensität des Farbstoffs und der Konzentration des Proteins ermöglicht die genaue Bestimmung der Konzentration der Proteine im Spektralfotometer.

Die Zellysate wurden 1:10 und die entsprechende Farbstofflösung (Bradford-Reagenz, BioRad, München) 1:5 verdünnt. 20 µl der Proteinverdünnung wurden mit 980 µl mit der verdünnten Farbstofflösung vermischt und für 10 min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde der Ansatz in Polystyrolküvetten transferiert und die Absorption bei 595 nm im Spektralfotometer gegen eine Leerkontrolle der verdünnten Farbstofflösung gemessen. Um die absolute Konzentration der Proteine zu bestimmen, wurde eine Verdünnungsreihe mit dem Protein 'bovines Serumalbumin' (BSA) der Konzentrationen 100, 200, 400, 600, 800 µg/ml vorgeschaltet. In der Regel lagen die gemessenen Konzentrationen zwischen 1-5 µg/µl.

2.2.8.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für das Auftrennen der Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts wurde die denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Lämmli durchgeführt (Laemmli, 1970). Hierfür wurde ein 7.5-12.5 %iges Gradiententrenngel mit Hilfe eines Gradientenmischers gegossen, bei RT auspolymerisiert und mit einem 4 %igem Sammelgel und entsprechendem Kamm überschichtet. Hierbei ist darauf zu achten, dass die Konzentration des Trenngels in der Laufrichtung zunimmt. Vor dem Auftragen der Zellysate (ca. 60-100 µg) in die Taschen wurden diese 1:1 mit 2x Lämmli-Puffer vermischt und bei 95°C für 5 min denaturiert. Die Elektrophorese wurde über Nacht bei konstanten 30 mA in einer mit Elektrophorese-Puffer befüllten Gelkammer (BioRad, München) durchgeführt. Zur Molekulargewichtsbestimmung wurde ein entsprechender Marker mit aufgetragen (Rainbowmarker, Amersham Pharmacia, Freiburg). Die Elektrophorese wurde gestoppt, sobald die so genannte 'Lauffront' (entspricht dem Farbstoff Bromphenolblau, welcher im Lämmli-Puffer enthalten ist) das Ende des Gels erreicht hatte.

2.2.8.4 Western Blot

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden diese mit dem so genannten 'Semidry-Blot-Verfahren' auf eine Nitrocellulose-Membran (Protran, Porengröße 0.45 µm, Schleicher & Schüll, Dassel) übertragen (Kyhse-Andersen, 1984,

Towbin, 1979). Hierfür wurde die Membran gemeinsam mit Filterpapier in Transferpuffer äquilibriert und in einer Semi-Dry Transferkammer (BioRad, München) bei 250 mA für 3 Stunden transferiert. Anschließend erfolgte eine Färbung der Membran mit einer Ponceau-S Lösung, um eine äquivalente Beladung aller Banden zu verifizieren. Die Membran wurde dann zur Entfärbung sowie zur Blockierung unspezifischer Proteine 3 x 20 min in G-Net geschwenkt. Über Nacht erfolgte im nächsten Schritt die Inkubation in G-Net mit dem Primärantikörper in einer entsprechenden Verdünnung (in der Regel 1:1000). Am folgenden Morgen wurde der Primärantikörper 3 x 15 min mit TBST ausgewaschen und die Membran 60 min mit einem entsprechenden Sekundärantikörper (1:20000 in G-Net, HRP (*horse radish peroxidase*)-gekoppeltes anti-Ziege oder anti-Kaninchen-Immunglobulin) bei RT inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Membran erneut 3 x 15 min mit TBST geschwenkt. Die Detektion erfolgte mit dem Chemolumineszenz-Reagenz ECL (Amersham, Freiburg) auf einem Hyperfilm (Amersham, Freiburg) mit einer Expositionszeit bis zu einer Stunde.

2.2.8.5 Strippen der Nitrocellulose-Membran

Nitrocellulose-Membranen können zur Detektion unterschiedlicher Proteine benutzt werden, jedoch sollte der zuvor verwendete Antikörper durch das 'Strippen' der Membran entfernt werden, um das alte Signal zu entfernen. Dabei wurde die Membran nach dem Entwickeln kurz mit TBST geschwenkt, und anschließend in einem erwärmten 'Stripping'-Puffer für ca. 30 min bei 56°C unter leichtem Schwenken inkubiert. Der β -Mercaptoethanol enthaltende Puffer wurde dann mindestens 3 x 20 min oder bis zum vollständigen Verschwinden des β -Mercaptoethanol-Geruchs in TBST gewaschen. Für die erneute Inkubation mit einem Primärantikörper wurde ein Blocken von 3 x 20 min in G-Net vorgeschaltet.

3 Ergebnisse

3.1 Lef-1 wird in der Hämatopoese sowohl in myeloischen und lymphatischen als auch in frühen hämatopoetischen Stammzellen exprimiert

In einem ersten Schritt sollte untersucht werden, inwieweit neben den bisher veröffentlichten Daten eine endogene Expression von Lef-1 in verschiedenen Subpopulationen der hämatopoetischen Zellen vorhanden ist. Hierfür wurden verschiedene Subpopulationen aus murinem Knochenmark mittels immunphänotypischer Marker aufgereinigt und hochrein sortiert. Anschließend wurde aus diesen Zellen mRNA extrahiert und die cDNA revers transkribiert. Mit Hilfe der semiquantitativen PCR konnte dabei gezeigt werden, dass Lef-1 endogen sowohl in myeloischen als auch lymphatischen Zellpopulationen exprimiert wird (Abb. 3.1 A). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Lef-1 ebenfalls in hoch aufgereinigten murinen frühen hämatopoetischen Progenitorzellen exprimiert wird (KSL) und die Expression mit zunehmender Ausdifferenzierung abgeschwächt ist (Abb. 3.1 B).

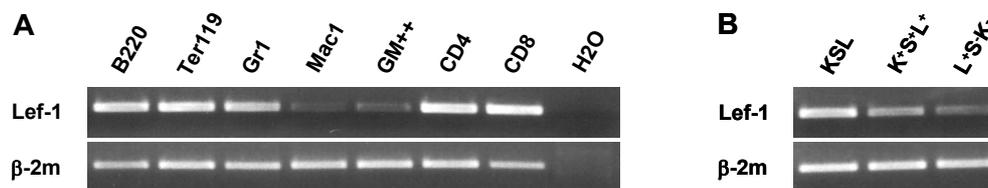


Abb.3.1: Endogene mRNA Expression von Lef-1 in verschiedenen Subpopulation des murinen Knochenmarks: A) PCR mit murinen hämatopoetischen Subpopulationen, als Kontrolle dient β -2 microglobulin (β -2m); GM⁺: Gr1⁺ & Mac1⁺ (repräsentatives Beispiel aus jeweils 5 unabhängigen Analysen der einzelnen Subpopulationen, das mittels der Lef-1 Primer erhaltene PCR-Produkt wurde sequenziert und bestätigte murines Lef-1) B) PCR mit murinen hämatopoetischen Progenitorzellen und weiter ausdifferenzierten Populationen: KSL: Sca1⁺cKit⁺Lin⁻; K⁺S⁺L⁺: Sca1⁺cKit⁺Lin⁺; L⁺S⁺K⁻: Lin⁺Sca1⁻cKit⁻ (repräsentative PCR aus 3 unabhängigen Analysen).

3.2 Nachweis der Proteinexpression der Konstrukte Lef-1 WT und Lef-1 CA

In dieser Arbeit sollte der Effekt der konstitutiven Expression von Lef-1 in der Hämatopoese untersucht werden. Als Modell diente ein etabliertes Knochenmarktransplantationsmodell, das unter 2.2.5 genauer beschrieben ist. Das Lef-1 Wildtyp-Gen sowie die unter 2.2.1 beschriebenen Mutanten wurden stabil in die

Verpackungszelllinie GP+E86 transduziert. Zellen, in denen die Konstrukte erfolgreich ins Genom integriert wurden, wurden anhand der Koexpression des GFP Proteins im FACS bis zu einer Reinheit von über 99 % sortiert (Abb. 3.2 A). Um sicherzugehen, dass die transduzierten Konstrukte exprimiert wurden, wurden als Kontrolle NIH-3T3 Zellen infiziert (Abb. 3.2 B), Proteine extrahiert und im Western Blot analysiert (Abb. 3.2 C).

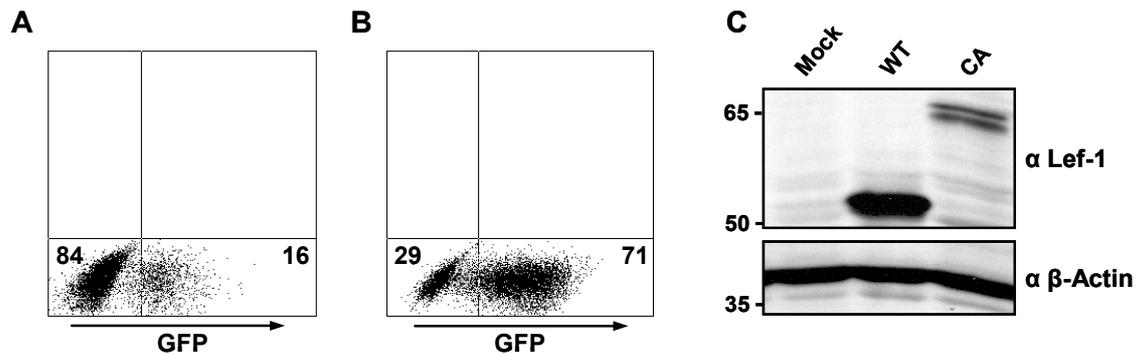


Abb. 3.2: Nachweis der Lef-1 Proteine in den transduzierten Zelllinien: A) FACS-Aufreinigung der stabilen Verpackungszelllinien: Abgebildet ist beispielhaft die Aufreinigung von GP+E86, transduziert mit Lef-1 CA; GFP positive Zellen wurden sortiert und erneut in Kultur gezüchtet, um bei einem sekundären Sortierschritt Reinheiten von über 99 % zu erreichen; B) Kontrolltransduktion von NIH-3T3 Zellen mit den Konstrukten, hier beispielhaft mit Lef WT; C) Western Blot von Extrakten aus NIH-3T3 mit den Konstrukten Lef-1 WT (54 kDa) und CA (65 kDa).

3.3 Transduktion von 5-FU behandeltem murinem Knochenmark

Um einen Einblick in die Funktion von Lef-1 in der normalen Hämatopoese zu bekommen, bedienen wir uns des murinen Knochenmarkstransplantationsmodells. In diesem Modell wurden Knochenmarkszellen durch die Behandlung mit 5-FU mit hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen angereichert aus Donormäusen entnommen und mittels der stabilen Verpackungszelllinie GP+E86 mit den Konstrukten transduziert. GFP positive Zellen wurden hochrein sortiert und konnten für *in vitro* Experimente verwendet werden oder wurden direkt in letal bestrahlte Rezipiententiere intravenös injiziert. Diese bestrahlten Tiere sterben an einem durch die Bestrahlung hervorgerufenem Versagen des hämatopoetischen Systems, wenn die injizierten Zellen nicht im Knochenmark der Rezipienten repopulieren. Für dieses 'Engraftment' und somit für das Überleben dieser Tiere ist eine Mindestmenge an 5-FU behandelten Knochenmarkszellen notwendig, die in etwa bei 4×10^5 Zellen liegt. Die Transduktionseffizienz von Knochenmarkszellen variierte

zwischen den Experimenten und ist in Abbildung 3.3 dargestellt.

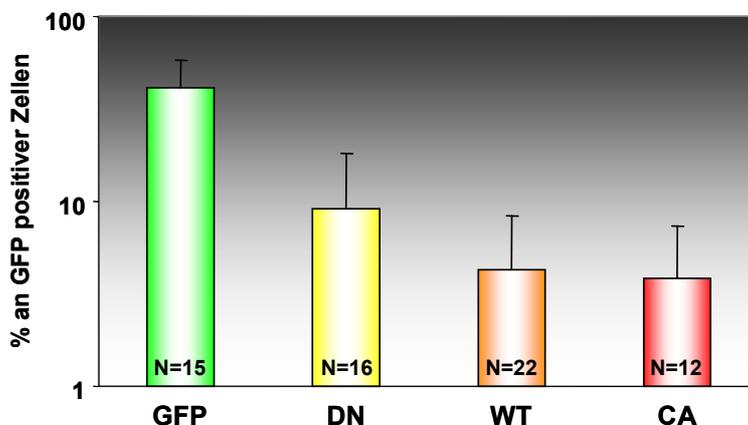


Abb. 3.3: Transduktionseffizienz der Knochenmarkzellen: Effizienz der Transduktion von Knochenmark mit den jeweiligen Konstrukten, die Standardabweichung ist angezeigt.

Für *in vitro* Experimente konnten so stets ausreichend positive Zellen sortiert werden. In mehreren Experimenten konnten jedoch nicht ausreichend viele positive Zellen sortiert werden (4×10^5), um einer Maus ausschließlich GFP-positive Zellen zu injizieren. In diesen Fällen wurden die transduzierten Zellen zusammen mit nicht transduzierten Trägerzellen in die Rezipiententiere injiziert. Abb. 3.4 zeigt einen Überblick über die in dieser Arbeit injizierten Zellzahlen:

| Konstrukt | GFP / YFP positiv | Trägerzellen |
|-----------|-------------------------------------|-------------------------|
| MIG | $3.85-5.00 \times 10^5$ | - |
| DN | $1.75-6.00 \times 10^5$ | $2.00-5.50 \times 10^5$ |
| WT | $4.00 \times 10^4-6.00 \times 10^5$ | $2.50-6.00 \times 10^5$ |
| CA | $2.20-4.00 \times 10^5$ | $3.00-4.00 \times 10^5$ |

Abb. 3.4: Mausexperimente: Injizierte Zellen in letal bestrahlte Rezipiententiere.

Den Tieren wurde bereits 4 Wochen nach Transplantation der Zellen und anschließend in regelmäßigen Abständen peripheres Blut entnommen und mittels Durchflusszytometrie auf GFP-positive Zellen untersucht. Nach acht Wochen wurde in der Regel erstmals eine Knochenmarkpunktion durchgeführt, um auch das Engraftment im Knochenmark nachzuweisen. Tiere, welche mehr als 10 % transduzierte Zellen im peripheren Blut oder Knochenmark aufwiesen, wurden als 'engrafted' angesehen und in die Versuche übernommen.

3.4 Die Überexpression von Lef-1 in hämatopoetischen Vorläuferzellen erhöht die Frequenz an kurzzeitrepopulierenden Stammzellen *in vitro*

Die Frequenz an Stammzellen, die zur Kurzzeitrekstitution fähig sind, kann mittels des CFU-S Assay ('Colony Forming Units in Spleen') untersucht werden. Dieser Test quantifiziert die ST-HSCs ('short-term-hematopoietic stem cells') anhand ihrer Fähigkeit, 12 Tage nach intravenöser Injektion in letal bestrahlte Rezipientenmäuse Kolonien auf der Milz zu bilden. Die Überexpression von Lef-1 WT und Lef-1 CA führte zu einer signifikant gesteigerten Anzahl an Milzkolonien im Vergleich zur GFP-Kontrolle (Lef-1 WT 4x (80 ± 38 , N=7) & Lef-1 CA 6.75x (135 ± 50 , N=6) vs. GFP 20 (± 33 , N=21) und damit zu einer erhöhten Frequenz an ST-HSCs. Die C-terminale Mutante Lef-1 DN zeigte nur eine geringe, nicht signifikante Steigerung gegenüber der Vektorkontrolle (30 ± 21 , N=13, Abb. 3.5).

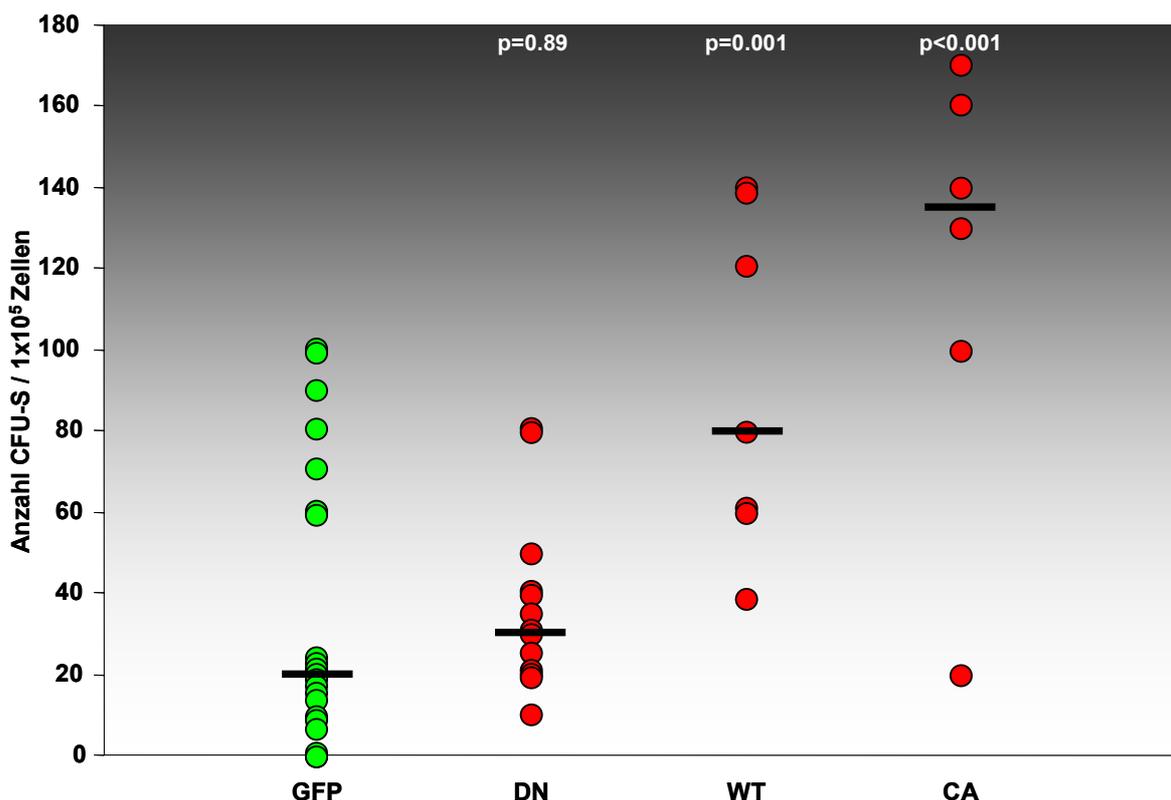


Abb. 3.5: Auswirkung von Lef-1 Überexpression auf kurzzeitrepopulierende Stammzellen: Anzahl an CFU-S am Tag 12 nach Injektion pro 1×10^5 transduzierten Knochenmarkzellen; der Median ist als Linie dargestellt, p zeigt den Status der Signifikanz (T-Test).

3.5 Konstitutiv aktives Lef-1 zeigt ein verstärktes Potential hämatopoetischer Vorläuferzellen zur Rekonstitution des Knochenmarks *in vivo*

Intravenös injizierte Stamm- und Progenitorzellen ermöglichen die Rekonstitution des Knochenmarks in letal bestrahlten Mäusen. Dabei kann zwischen Kurz- und Langzeitrekonstitution unterschieden werden. Kurzzeitrekonstitution wird nach 4 Wochen durch die Analyse peripherer Blutproben gemessen, während eine Langzeitrekonstitution erst ab 8 Wochen angenommen wird. Progenitor- und Stammzellen, die mit konstitutiv aktivem Lef-1 transduziert wurden, hatten in der Langzeitrekonstitution einen Proliferationsvorteil gegenüber nichttransduzierten Trägerzellen und zeigten mit zunehmendem Alter der Rezipiententiere ein sukzessiv gesteigertes Engraftment.

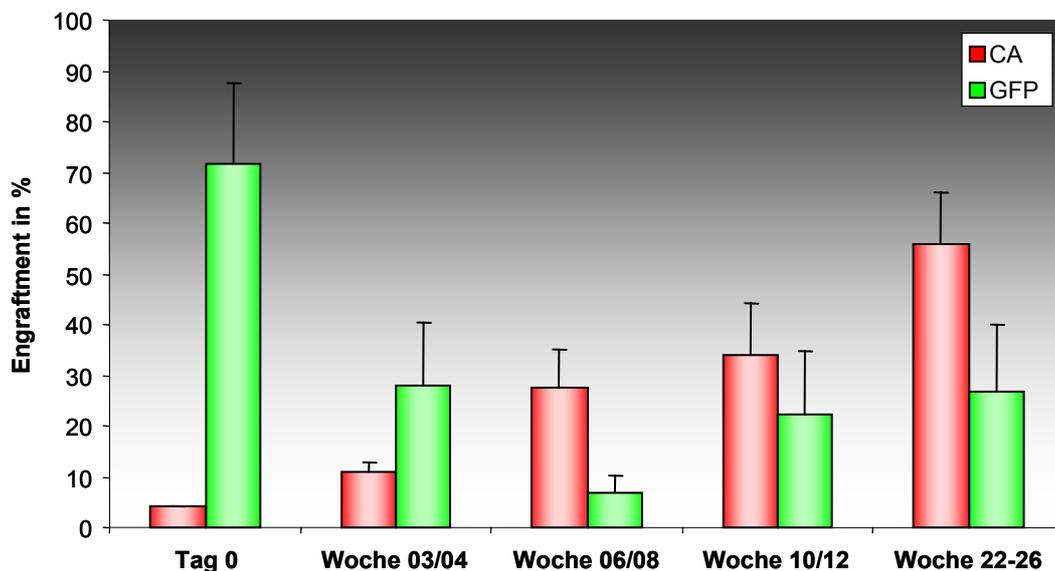


Abb. 3.6: Zeitverlauf des Engraftments der Lef-1 CA bzw. GFP-transduzierten Mäuse: Der Prozentsatz an transduzierten Zellen in peripheren Blutproben wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Lef-1 CA transduzierte Mäuse (N=6) zeigen nach 4 Wochen 11.0 ± 4.4 % und nach 8 Wochen 27.5 ± 18.8 % Engraftment im Median, was einer 2.5 fachen (4 Wochen) und 6.8 fachen (8 Wochen) Zunahme des Engraftments entspricht. Nach 6 Monaten wiesen die Tiere ein medianes Engraftment von 55.7 ± 25.0 auf. Im Vergleich dazu reduzierte sich das mediane Engraftment der Kontrollmäuse (N=5) um den Faktor 2.6 auf 27.9 ± 28.2 % nach 4 Wochen, sowie um den Faktor 3.2 nach 12 Wochen (12.5 ± 27.6 %). Auch das Langzeitengraftment nach 6 Monaten war um den Faktor 2.7 reduziert (26.9 ± 29.4 %).

Während zum Zeitpunkt der Injektion im Durchschnitt 4.0 % transduzierte Zellen

vorhanden waren, zeigten die Mäuse nach 4 Wochen bereits ein Engraftment von Median 11.0 % (± 4.4 %), nach 8 Wochen ein medianes Engraftment von 27.5 % (± 18.8 %) im peripheren Blut mit einer weiterhin folgenden sukzessiven Steigerung. Kontrollmäuse, welche ausschließlich mit GFP-Zellen injiziert wurden, zeigten dagegen ein verringertes Engraftment über einen Zeitraum von 6 Monaten. Einen schematischen Überblick über die Entwicklung der Knochenmarkrekonstitution gibt Abbildung 3.6.

3.6 Überexpression von Lef-1 WT und Lef-1 CA führt zu einer schwerwiegenden Störung der normalen Hämatopoese *in vivo*

3.6.1 Überexpression von Lef-1 WT und Lef-1 CA erhöht den Anteil myeloischer Vorläuferzellen in peripherem Blut

Rezipientenmäuse, die nach mehr als 8 Wochen einen Anteil von 10 % oder mehr an transduzierten Zellen im peripheren Blut oder Knochenmark aufwiesen, wurden für die Studie als 'engrafted' angesehen und im weiteren Verlauf der Arbeit beobachtet. Regelmäßige Blutaussstriche sowie immunphänotypische Untersuchungen von peripheren Blutproben im Zeitraum von 12-70 Wochen post - transplantationem zeigten dabei einen erhöhten Anteil an myeloischen Zellen in mit Lef-1 WT und Lef-1 CA transduzierten Tieren (Abb. 3.7 A), die charakteristisch für die myeloischen Oberflächenmarker Mac1 und Gr1 färben. Wildtyp-transduzierte Mäuse wiesen im Median eine 2.1 fache erhöhte Rate an Gr1 / Mac1⁺⁺ doppelt positiv gefärbter Zellen im Vergleich zu Kontrolltieren auf (61 ± 17 %, N=20 vs. GFP 29 ± 19 %, N=8, $p < 0.001$). Der Anteil dieser Gr1 / Mac1⁺⁺ Zellen war in Lef-1 CA transduzierten Mäusen mit einer 2.9 fachen Steigerung und 84 ± 11 % im Median sogar noch höher (N=12, $p < 0.001$, Abb. 3.7 B).

Dagegen war der Anteil an Granulozyten des Subtyps Gr1⁺ / Mac1⁻ bei Lef-1 WT und Lef-1 CA erheblich reduziert (WT 1.0 ± 1.5 %, CA 1.0 ± 1.0 % vs. 3.0 ± 7.8 % in der Kontrolle, $p < 0.01$, Abb. 3.7 C).

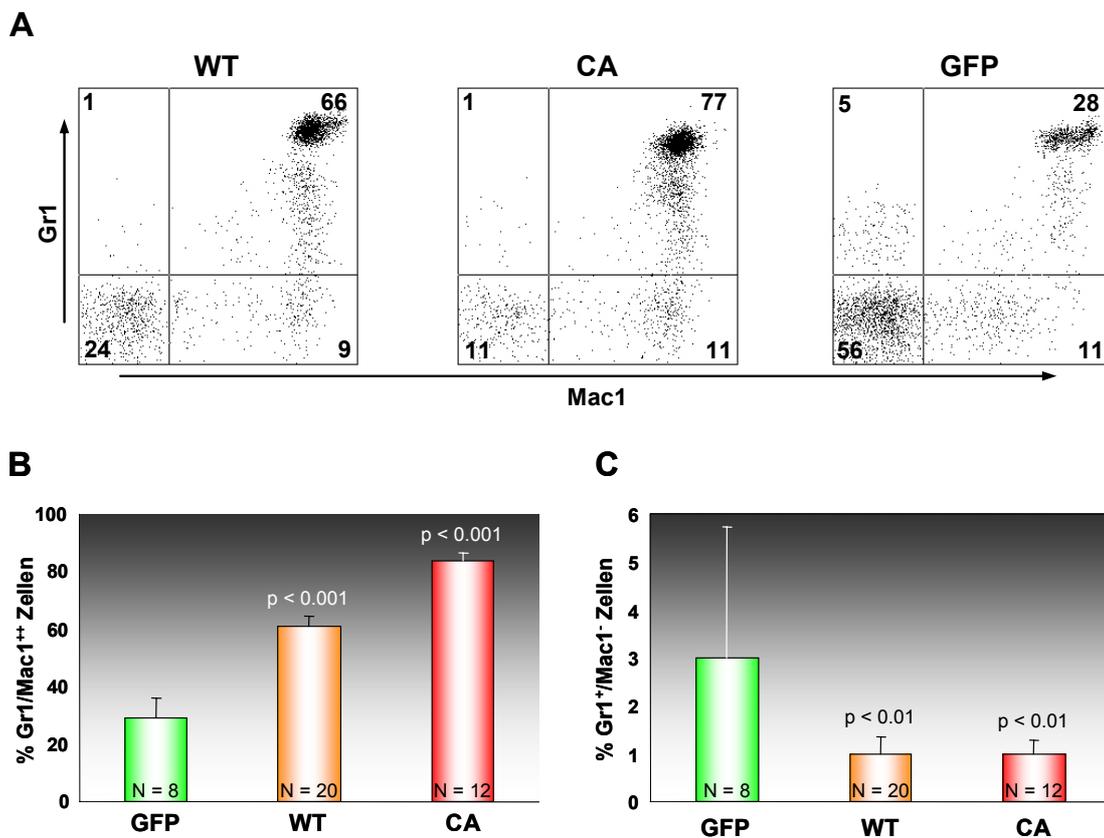


Abb. 3.7: Nachweis myeloischer Zellen im Blut transduzierter Mäuse: A) Beispiele von FACS-Analysen peripheren Blutes einer Lef-1 WT, Lef-1 CA und Kontrollmaus, gefärbt für die myeloischen Marker Gr1 und Mac1 mit jeweiliger Prozentangabe; B) Anteil an Gr1/Mac1⁺⁺ Zellen in Blutproben transduzierter Mäuse im Zeitraum von 12-70 Wochen post-transplantationem; Median, Fehler der Standardabweichung und Signifikanz sind angezeigt; C) Anteil an Granulozyten des Subtyps Gr1⁺/Mac1⁻ in peripherem Blut, Median, Fehler der Standardabweichung sowie Signifikanz sind angezeigt.

3.6.2 Überexpression von Lef-1 WT und Lef-1 CA reduziert den Anteil an Sca1⁺-Zellen in peripherem Blut

Obwohl ein höherer Anteil an myeloischen Zellen in transduzierten Mäusen nachgewiesen werden konnte (Gr1/Mac1⁺⁺), war die Expression von Sca1, ein Marker unter anderem für unreife Progenitorzellen, im transduzierten Blutzellen erheblich reduziert.

Mit Lef-1 WT und Lef-1 CA transduzierte Tiere hatten einen 2.6 fach (WT) und 17 fach (CA) verringerten prozentualen Anteil an Sca1-positiven Zellen im Vergleich zu Kontrolltieren (WT 19 ± 6 %, CA 3 ± 2 % vs. 50 ± 23 %, p<0.001, Abb. 3.8).

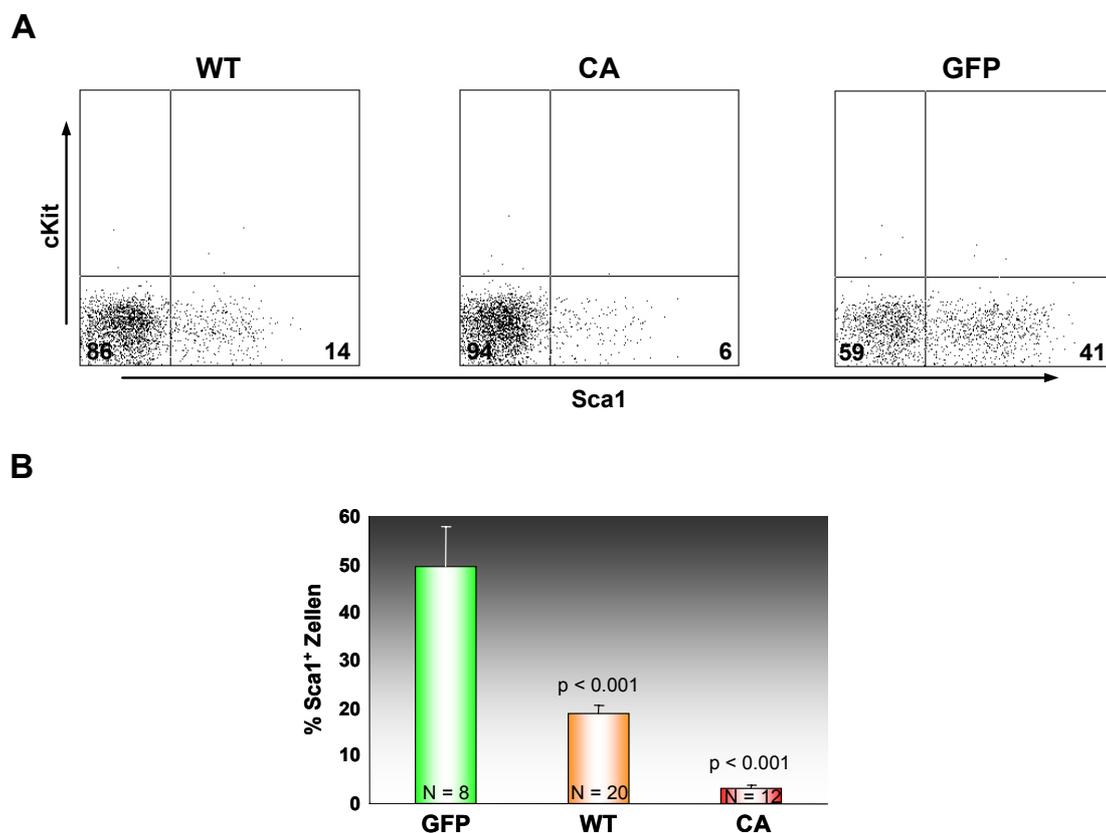


Abb. 3.8: Sca1 positive Zellen in peripherem Blut transduzierter Mäuse: A) Beispiele von FACS-Analysen peripheren Blutes einer Lef-1 WT, Lef-1 CA und Kontrollmaus, gefärbt für den Marker Sca1; B) Anteil an Sca1 positiven Zellen in Blutproben transduzierter Mäuse im Zeitraum von 12-70 Wochen post-transplantationem; Median, Fehler der Standardabweichung und Signifikanz sind angezeigt.

3.6.3 Überexpression von Lef-1 WT und Lef-1 CA reduziert den Anteil an lymphatischen Zellen in peripherem Blut

Während die Überexpression von Lef-1 WT sowie Lef-1 CA die Rate an myeloischen Vorläuferzellen deutlich erhöht, ist zeitgleich ein drastischer Rückgang an lymphatischen Zellen im peripheren Blut dieser Mäuse festzustellen. So zeigen transduzierte Tiere Störungen sowohl in der B-Zell als auch in der T-Zell-Entwicklung.

3.6.3.1 Der Anteil an B-Zellen ist in Lef-1 WT und Lef-1 CA transduzierten Tieren erheblich verringert

Peripheres Blut von Lef-1 WT und Lef-1 CA transduzierten Mäusen zeigte neben der

prozentualen Zunahme an myeloischen Zellen ebenfalls eine Reduktion des Anteils an B- und T-Zellen. Die Rate an B220⁺ Zellen ist in WT- und CA-transduzierten Mäusen 2.0 bzw. 3.3 fach reduziert (WT 13 ± 9 %, CA 8 ± 10 % vs. 27 ± 16 %, p<0.02, Abb. 3.9).

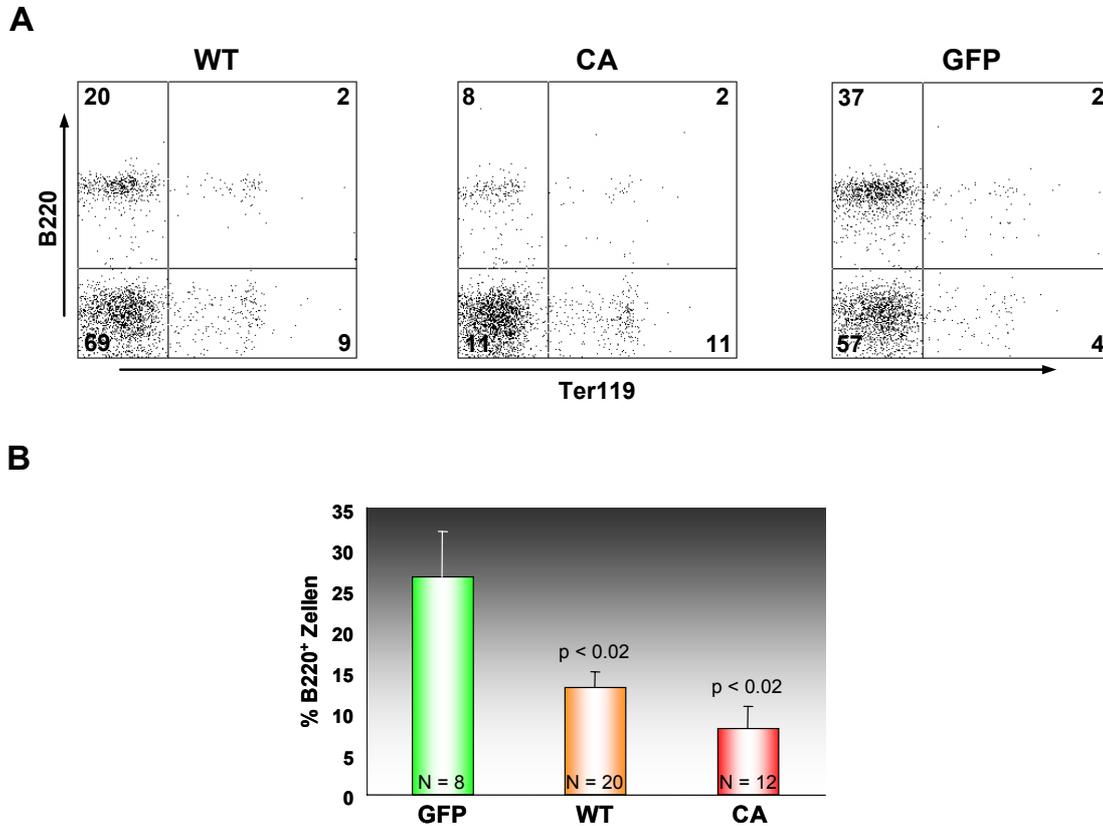


Abb. 3.9: B220⁺ Zellen in transduzierten Mäusen: A) FACS einer Kontroll-, WT und CA transduzierten Maus, gefärbt für B220 und Ter119; B) Anteil an B220⁺ Zellen in Blutproben transduzierter Mäuse, Fehler der Standardabweichung und die Signifikanz sind angezeigt.

3.6.3.2 Die Bildung der T-Zellen ist in Lef-1 WT transduzierten Mäusen gestört und in Lef-1 CA transduzierten Tieren nahezu eliminiert

Neben der Reduktion des Anteils von B-Zellen konnte ebenfalls eine prozentuale Abnahme der T-Zellpopulation in Mäusen mit einer Überexpression von Lef-1 WT und Lef-1 CA beobachtet werden. Lef-1 WT transduzierte Tiere wiesen im Vergleich zu Kontrollmäusen ca. 50 % an zytotoxischen (CD4⁺) und Helfer T-Zellen (CD8⁺) auf, in Mäusen mit konstitutiv aktiviertem Lef-1 waren sowohl CD4- als auch CD8-positive Zellen nahezu vollständig dezimiert (WT: CD4: 5 ± 3 %, CD8: 4 ± 3 %; CA: CD4 & 8: 1 ± 1 % vs. GFP: CD4: 8 ± 22 %, CD8: 8 ± 11; p<0.02 & p<0.002, Abb. 3.10).

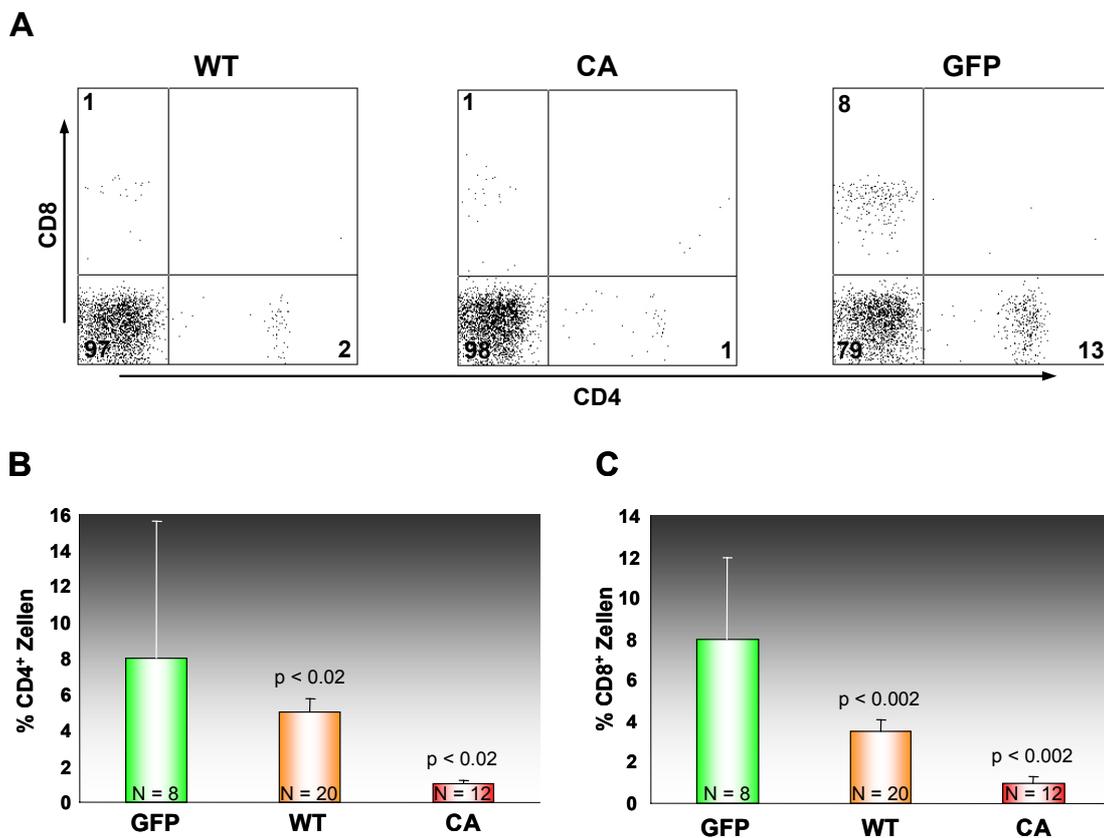


Abb. 3.10: Nachweis von T-Zellen in transduzierten Mäusen: A) FACS einer Kontroll-, WT und CA transduzierten Maus, gefärbt für CD4 und CD8; B) Anteil an CD4 & CD8 positiver Zellen in Blutproben transduzierter Mäuse. Median, Fehler der Standardabweichung und die Signifikanz sind angezeigt.

3.7 Überexpression von Lef-1 WT und Lef-1 CA führt zu einer Inversion des Verhältnisses von lymphatischen und myeloischen Zellen in peripherem Blut

Durch die Störung der Zusammensetzung des peripheren Blutes veränderte sich das lympho-myeloische Verhältnis in transduzierten Mäusen stark in Richtung Myelopoese. Dabei verschob sich das Verhältnis bei WT transduzierten Mäusen fast 4-fach in Richtung myeloischer Zellen gegenüber der Kontrollgruppe, bei Mäusen mit konstitutiv aktiviertem Lef-1 sogar über das 10-fache (WT: 0.28 (N=20) & CA 0.10 (N=11) vs. 1.07 (N=8) in der Kontrollgruppe, $p < 0.01$, Abb. 3.11).

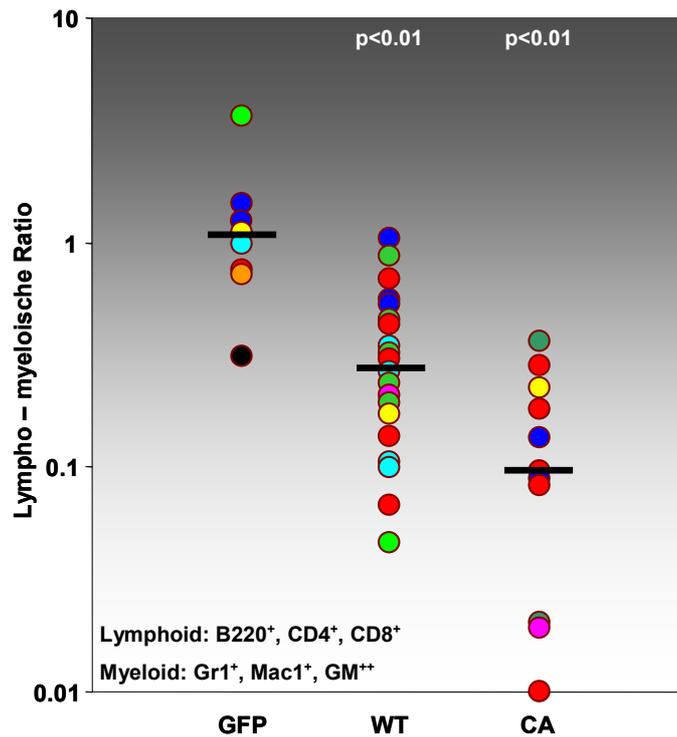


Abb. 3.11: Inversion des lympho-myeloischen Verhältnisses: Peripheres Blut wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten (12-70 Wochen post-transplantationem) entnommen und mittels Antikörperfärbung im FACS auf verschiedene Zelltypen charakterisiert. Unterschiedliche Farben in jeder Reihe entsprechen verschiedenen Tieren. Die gleiche Farbe zeigt die Analyse eines Tieres zu unterschiedlichen Zeitpunkten an.

3.8 Die Expression von Lef-1 WT und Lef-1 CA verursacht hämatologische Erkrankungen in einem Großteil der transduzierten Mäuse

Neben regelmäßigen Untersuchungen des peripheren Blutes wurden mit Lef-1 WT und Lef-1 CA transduzierte Tiere stets auch auf allgemein erkennbare klinische Symptome einer leukämischen Erkrankung wie struppiges Fell, bleiche oder blutarme Füße, geschwollene Lymphknoten oder allgemeine Lethargie untersucht. Die meisten der transduzierten Tiere erkrankten nach einer medianen Latenzzeit von 11 Monaten an einem myeloproliferativen Syndrom oder an akuten Leukämien und wurden bei deutlichen Anzeichen der Krankheit für eine genaue Untersuchung geopfert. Wie in der Kaplan-Meier-Kurve (Abb. 3.12) zu sehen ist, erkrankten 3 der 5 Lef-1 WT transduzierten Tiere und alle der 7 Lef-1 CA transduzierten Tiere im beobachteten Zeitraum von 24 Monaten, während bei den Kontrollmäusen kein Fall einer hämatopoetischen Erkrankung auftrat. Ein wesentliches Erkennungsmerkmal akuter Leukämien im murinen Transplantationsmodell

ist die Fähigkeit der leukämischen Blasten einer erkrankten Maus in sekundär transplantierten Rezipientenmäusen erneut eine Leukämie hervorzurufen. Während von den Lef-1 WT transduzierten erkrankten Mäusen lediglich bei zwei Tieren eine Retransplantiierbarkeit der Krankheit beobachtet werden konnte, zeigten bei den CA transduzierten Tieren 4 von 7 der retransplantierten Tiere akute Leukämien desselben Typs der jeweiligen Spendertiere. Das mediane Überleben Lef-1 WT transduzierter Tiere lag bei 10 Monaten, Lef-1 CA transduzierte Tiere erkrankten nach einem Median von 12 Monaten.

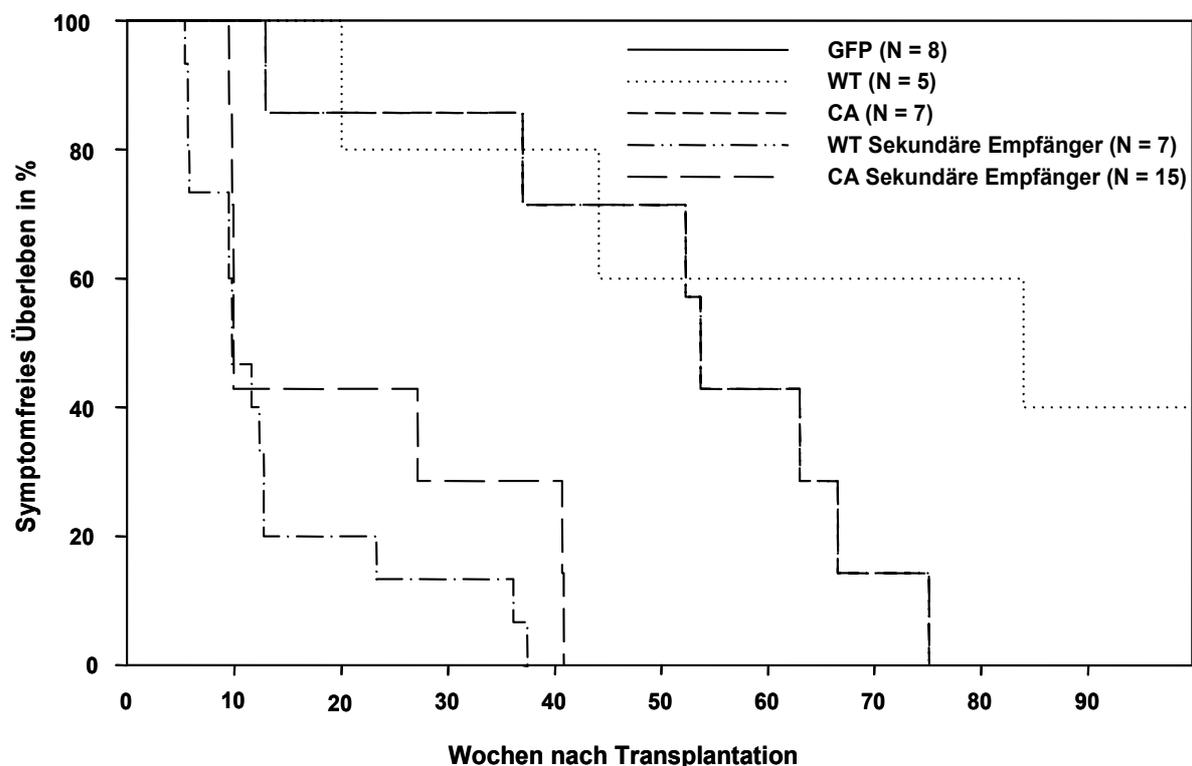


Abb. 3.12: Überlebenskurve der letal bestrahlten und mit Lef-1 WT und Lef-1 CA transduzierten Versuchsmäuse: Erkrankte WT Mäuse zeigten ein medianes Überleben von 310 Tagen (141-589 Tage, N=5), CA transduzierte Mäuse überlebten im Median 377 Tage (91-527 Tage, N=7). Sekundär transplantierte Tiere erkrankten im Median nach jeweils 70 (Lef-1 WT, 67-287 Tage, N=7) und 69 Tagen (Lef-1 CA, 38-254 Tage, N=15) an akuten Leukämien.

Diese Daten zeigen, dass eine Überexpression von Lef-1 im murinen Knochenmarkstransplantationsmodell hämatopoetische Erkrankungen auslösen kann.

3.8.1 Erkrankte Tiere weisen Leukozytose und Anämie auf

Eines der Kennzeichen einer akuten Leukämie ist häufig eine starke Expansion des Pools an weißen Blutkörperchen (Leukozytose) bei gleichzeitiger Abnahme der Anzahl an roten Blutkörperchen (Anämie). Daher gehörte zu den ersten Auswertungen leukämie-spezifischer Symptome die Bestimmung der Leukozyten- und Erythrozytenzahl im peripheren Blut der geopferten Mäuse. Hier zeigte sich bei 5 der erkrankten Mäuse eine ausgeprägte Leukozytose im Vergleich zu den Kontrolltieren mit bis zu 9.3×10^7 weißen Blutzellen (WBC) je Milliliter ($2.7-9.3 \times 10^7$, Median 4.3×10^7 , N=5 vs. GFP: $3.5-9.8 \times 10^6$, Median 5.3×10^6 , N=8, $p < 0.001$). Im Gegensatz dazu zeigten 7 der transduzierten Tiere zum Zeitpunkt des Todes eine ausgeprägte Anämie mit einer 5.1 fachen Reduktion an roten Blutkörperchen (RBCs, $0.4-2.1 \times 10^9$, Median 1.3×10^9 , N=7 vs. GFP: $4.8-10.0 \times 10^9$, Median 6.5×10^9 , N=8, $p < 0.001$).

| Maus | RBC / ml X 10^9 | WBC per ml X 10^6 |
|-------|-------------------|---------------------|
| GFP#1 | 6.0 | 9.3 |
| GFP#2 | 6.7 | 4.25 |
| GFP#3 | 6.6 | 6.3 |
| GFP#4 | 4.8 | 7.6 |
| WT#1 | 1.1 | 43 |
| WT#2 | 1.6 | 8.3 |
| WT#3 | 4.0 | 3.4 |
| WT#4 | 0.6 | 4.1 |
| WT#5 | 6.4 | 35 |
| CA#1 | na | na |
| CA#2 | 1.3 | 93 |
| CA#3 | 6.5 | 7.6 |
| CA#4 | 0.4 | 2.9 |
| CA#5 | 2.0 | 45 |
| CA#6 | 2.1 | 27 |
| CA#7 | na | na |

Tabelle 3.1: Anzahl der RBCs (Rote Blutkörperchen) und WBCs (weiße Blutkörperchen) der erkrankten Mäuse sowie der GFP-Kontrolltiere; na: nicht analysiert.

3.8.2 Ein Teil der erkrankten Tiere zeigt eine Splenomegalie

Ein weiteres Kennzeichen hämatologischer Erkrankungen im murinen System ist häufig der Phänotyp einer vergrößerten Milz ('Splenomegalie', Abb. 3.13). In 8 der mit Lef-1 WT und Lef-1 CA transduzierten Mäusen (N=11) wurde eine teilweise erheblich vergrößerte Milz nachgewiesen, z.T mit sichtbaren weißen Flecken, ein Indiz für eine Infiltration der Milz mit kolonie-bildenden Blastenzellen.

| Maus | Größe / mm | Gewicht / mg |
|-------|------------|--------------|
| GFP#1 | 14 x 5 | 53 |
| GFP#2 | 14 x 4 | 64 |
| GFP#3 | 16 x 4 | 62 |
| GFP#4 | 14 x 4 | 51 |
| WT#1 | 21 x 7 | 305 |
| WT#2 | 18 x 5 | 140 |
| WT#3 | 14 x 4 | 58 |
| WT#4 | 17 x 6 | 136 |
| WT#5 | na | 234 |
| CA#1 | 20 x 5 | 232 |
| CA#2 | 29 x 8 | 715 |
| CA#3 | na | 62 |
| CA#4 | 14 x 4 | 72 |
| CA#5 | 23 x 7 | 401 |
| CA#6 | 23 x 6 | 403 |
| CA#7 | na | na |

Tabelle 3.2: Milzgröße und Milzgewicht mit Lef-1 WT und Lef-1 CA transduzierten Mäuse, na: nicht analysiert.



Abb. 3.13: Splenomegalie: Vergleich der Milz einer GFP-Kontrollmaus und einer Lef-1 WT - transduzierten erkrankten Maus 44 Wochen nach Transplantation.

3.8.3 Leukämische Blasten von erkrankten Lef-1 WT- und Lef-1 CA-Mäusen infiltrieren in verschiedene Organe

Kranke Tiere wurden geopfert und einer Reihe von Untersuchungen unterzogen. Neben der Bestimmung der Zellzahlen aus Blut, Knochenmark und Milz (siehe 3.10 & 3.11) wurden FACS- und histopathologische Tests durchgeführt. Für die Histopathologie wurden verschiedene Organe einer Maus in Formalin fixiert, daraus histologische Gewebsschnitte angefertigt, die anschließend immunphänotypisch gefärbt und unter dem Mikroskop ausgewertet wurden (Abb. 3.14).

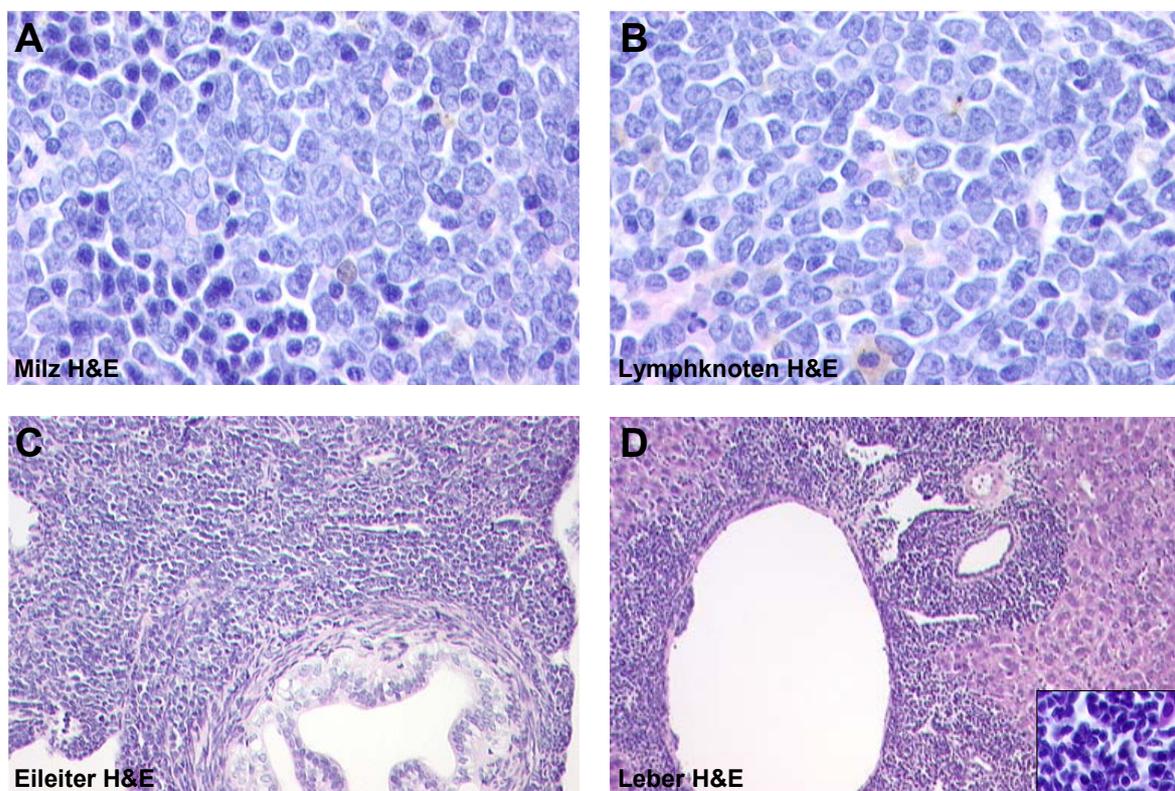


Abb. 3.14: Die Histopathologie erkrankter Lef-1 WT- & Lef-1 CA-Mäuse zeigt die Infiltration verschiedener Organe mit großen chromatinreichen Blastenzellen: Die Blasten weisen nur eine moderate Menge an Zytoplasma auf, auffällig dagegen ist der markante Nucleolus. Neben Milz (A, original 600x vergrößert) sind die Lymphknoten (B, 600x) sowie die Eileiter (C, 100x) dieser Lef-1 WT-Maus infiltriert. Andere häufig betroffene Organe, wie hier zu sehen in einer erkrankten Lef-1 CA-Maus, waren neben dem Darm stets auch die Leber (D, 100x und 400x (Ausschnitt)); H&E: Hämatoxylin-Eosin - Färbung.

3.9 Detaillierte Untersuchungen identifizieren sowohl akute lymphatische als auch myeloische Leukämien

Sowohl morphologische als auch immunphänotypische und histopathologische Untersuchungen ergaben, dass eine Überexpression von Lef-1 sowohl lymphatische als auch myeloische Leukämien hervorrufen konnte.

3.9.1 Morphologische Analyse

Bei der morphologischen Analyse konnten mehrere Charakteristika akuter Leukämien identifiziert werden. Ein Großteil der erkrankten Mäuse wiesen zirkulierende Blasten in Blutaussstrichen auf. 3 der 10 erkrankten Mäuse zeigten eine lymphatische Morphologie der Blasten, während bei Blutaussstrichen der anderen Tiere vor allem myeloische Blasten charakteristisch waren (Abb. 3.15 A, B). Tiere, die noch nicht das Stadium einer akuten Leukämie erreicht hatten, aber trotzdem aufgrund von Anzeichen einer Erkrankung geopfert wurden, zeigten ebenfalls eine auffällige Morphologie. Eine Lef-1 CA transduzierte Maus hatte eine Lähmungserscheinung am hinteren Bein und wurde daher zur Analyse getötet. Diese Maus zeigte keine typischen Zeichen einer Leukämie bezüglich der Anzahl der RBCs, WBCs oder der Milzgröße. Allerdings wies diese Maus eine auffallende Morphologie durch einen deutlich erhöhten Anteil an myeloischen Zellen in Blut, Knochenmark und Milz auf, der auch durchflusszytometrisch bestätigt werden konnte (Abb. 3.15 C). Ein ähnliches Bild zeigten auch Ausstriche aus dem Knochenmark und der Milz dieser Maus. Obwohl diese Maus zum Zeitpunkt des Todes nicht an einer akuten Leukämie erkrankt war und das Knochenmark lediglich ein 'Engraftment' von 68 % aufwies, entwickelten letal bestrahlte sekundäre Rezipiententiere nach einer medianen Latenzzeit von 8 Monaten akute Leukämien (Abb. 3.15 D).

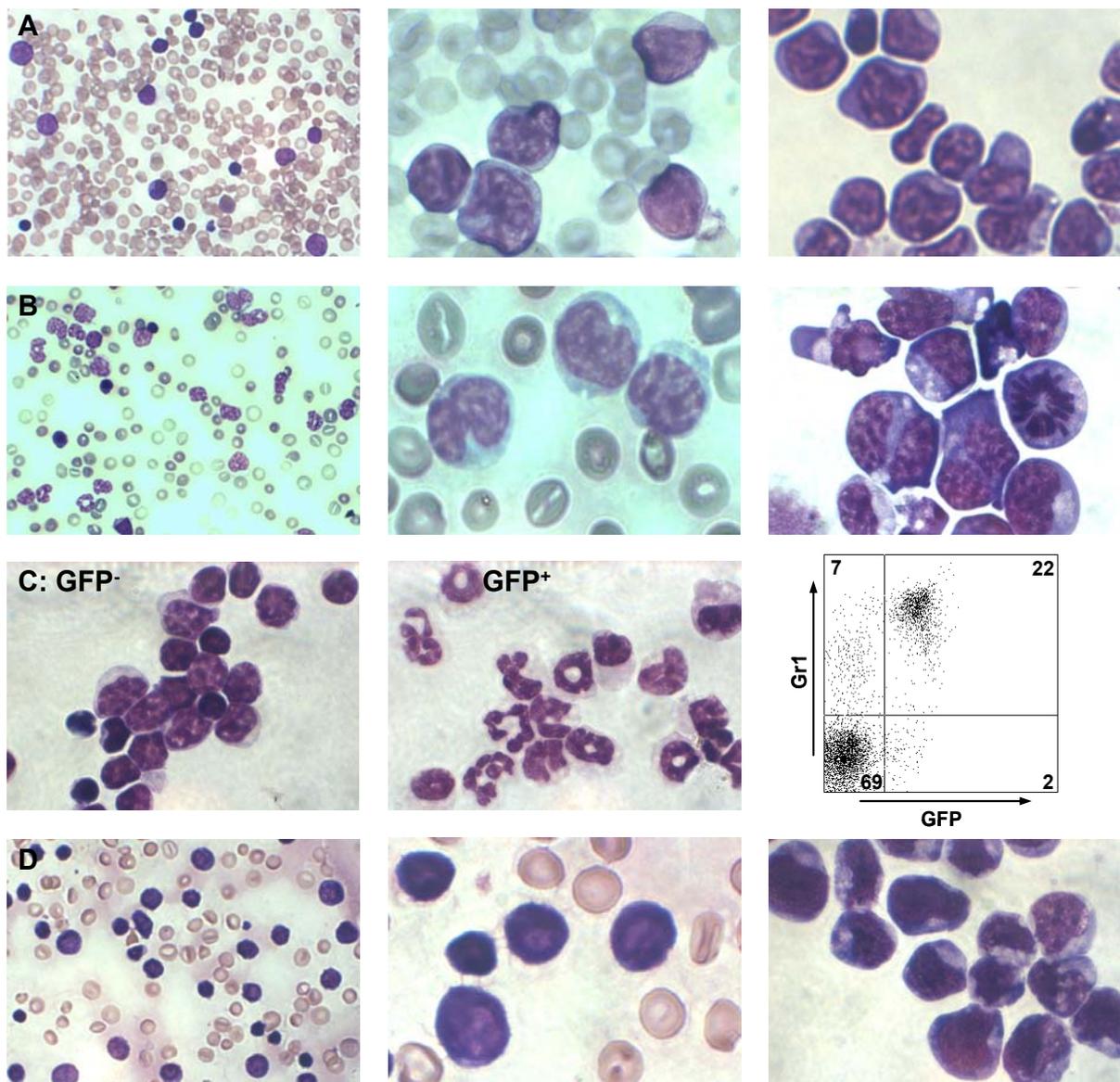


Abb. 3.15: Die morphologische Analyse der erkrankten Mäuse zeigt eine schwerwiegende Störung der normalen Hämatopoese: A) Blutausstrich (400x & 1000x) und Zytospin des Knochenmarks (1000x) einer an ALL erkrankten Maus; B) Blutausstrich (400x & 1000x) und Zytospin des Knochenmarks (1000x) einer an AML erkrankten Maus; C) Zytospin von GFP-negativen und GFP-positiven Zellen aus der Milz (630x) und FACS-Analyse der Zellen einer an Myeloproliferation erkrankten Lef-1 CA transduzierten Maus, die geopfert wurde: gefärbt wurde mit Gr-1; D) Blutausstrich (400x & 1000x) und Zytospin Knochenmark (1000x) einer CA-Sekundärmaus der unter C) abgebildeten Maus mit einer hohen Anzahl an Blasten im Blutausstrich.

3.9.2 Durchflusszytometrische Charakterisierung

Die durchflusszytometrische Charakterisierung wurde dazu verwendet, den Immunphänotyp der auftretenden hämatologischen Erkrankungen zu identifizieren. Von 12 transduzierten Tieren erkrankten 10 an hämatologischen Erkrankungen. Davon litten 4 Tiere an einer Myeloproliferation, welche sich durch eine enorme Anreicherung des Anteils myeloischer Zellen nachweisen ließ. So war der Großteil der GFP-positiven Zellen aus den Kompartimenten Blut, Knochenmark und Milz positiv für die myeloischen Marker Gr1 und Mac1, während die lymphatischen Marker wie etwa B220 oder CD8 kaum oder gar nicht nachgewiesen werden konnten (Median im Knochenmark: Mac1 93 ± 3 %, Gr1 90 ± 6 %). Übereinstimmend damit war das Engraftment dieser Mäuse in der Milz-einem hauptsächlich lymphatischen Organ-meist deutlich geringer als in peripherem Blut oder Knochenmark (Milz: 38 ± 23 % GFP⁺ vs. 74 ± 26 % in PB, 90 ± 8 in KM, N=4, p=0.01 (KM), Abb. 3.16 A).

Drei Tiere erkrankten an einer akuten lymphatischen Leukämie des B-Zelltyps, die durch einen hohen Anteil an B220⁺-Zellen charakterisiert waren (Median 95 ± 5 %)-ein Antigen, das von B-Zellen exprimiert wird. Zusätzlich dazu waren teilweise stammzellspezifische Marker wie Sca1⁺ oder cKit⁺ exprimiert. In allen drei Fällen zeigte eine genauere Untersuchung eine Koexpression der Marker CD43 und AA4.1 zusätzlich zu B220, so dass eine akute B-Zell-Leukämie des Pro-B-Zelltyps postuliert werden kann (Abb. 3.16 B). Interessanterweise zeigten alle Fälle zudem eine teilweise positive Reaktion auf die Marker Gr1 und Mac1 der myeloischen Reihe, was eine Gruppe biphänotypischer Zellen identifizierte, die sowohl positiv für B220 als auch für Mac1 oder Gr1 waren.

Zwei Mäuse starben an einer histopathologisch diagnostizierten akuten myeloischen Leukämie, die auch durchflusszytometrisch durch einen sehr hohen Anteil an myeloischen Zellen gekennzeichnet waren. Auffallend war jedoch auch hier die Existenz einer Gruppe von Zellen, die sowohl für die myeloischen Marker Mac1 und Gr1 als auch für den lymphatischen Marker B220 positiv waren (Abb. 3.16 C).

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass die Überexpression von Lef-1 zu einer Reihe hämatologischer Erkrankungen führt, die sowohl myeloischen als auch lymphatischen Ursprungs sein können.

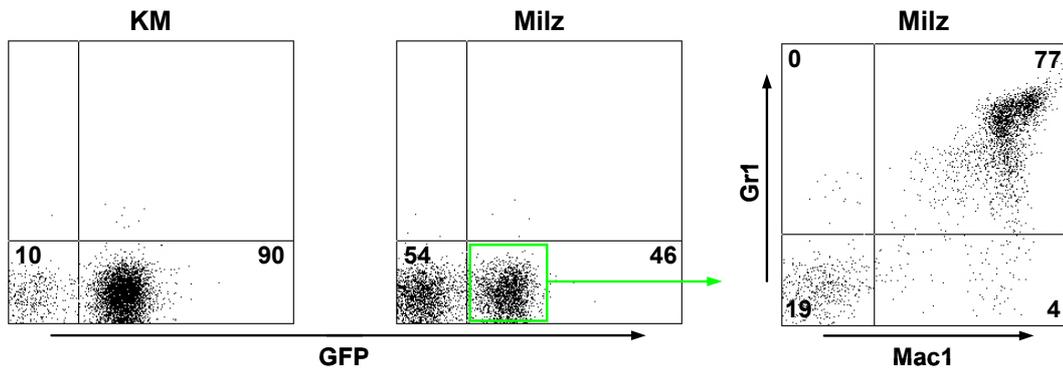
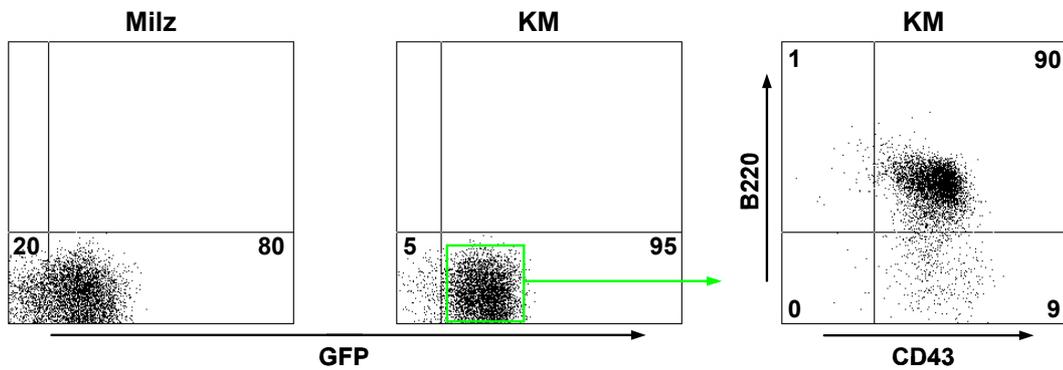
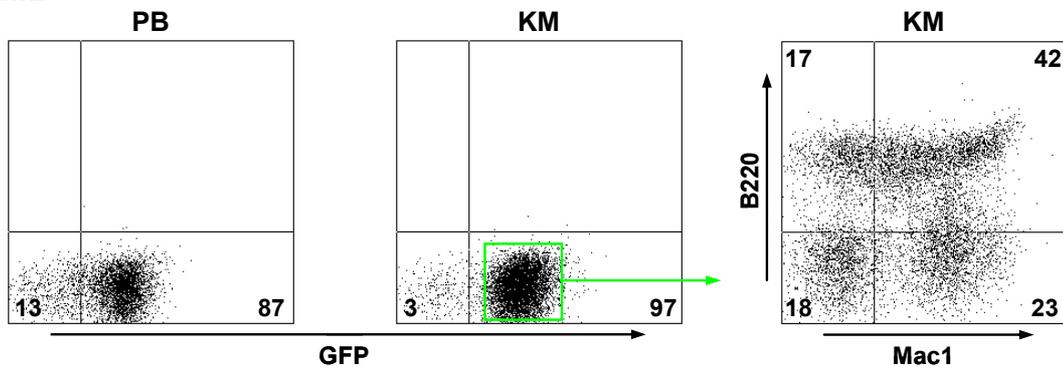
A: MPD**B: ALL****C: AML**

Abb. 3.16: FACS Analyse erkrankter Mäuse: A) Durchflusszytometrische Charakterisierung einer Maus mit Myeloproliferation: abgebildet ist das Engraftment der Maus im Knochenmark & Milz sowie Färbung mit den myeloisch-spezifischen Antikörpern Mac1 und Gr1, die Prozente sind angegeben; B) FACS-Analyse einer an akuter lymphatischer Leukämie erkrankter, CA-transduzierter Maus: abgebildet sind das Engraftment im Knochenmark und der Milz sowie Färbung des Knochenmarks mit den B-Zell spezifischen Antikörpern B220 und CD43. Auffällig ist ein hoher Anteil nicht differenzierter B220⁺CD43⁺ Blasten; C) FACS Analyse einer an AML erkrankter, CA-transduzierter Maus: abgebildet sind Engraftment in peripherem Blut und Knochenmark sowie Färbung mit den Antikörpern Mac1 und B220. Deutlich zu erkennen ist ein hoher Anteil von biphenotypischen Mac1 / B220⁺⁺ Zellen.

3.9.3 Histopathologische Auswertung

Wie unter 3.8.3 erwähnt, wurden histologische Gewebeschnitte von infiltrierten Organen erkrankter Tiere angefertigt und immunhistochemisch mit verschiedenen Antikörpern analysiert. Abbildung 3.17 zeigt beispielhaft eine an akuter lymphatischer Leukämie erkrankte Maus. Verschiedene Organe weisen eine diffuse neoplastische Infiltration auf.

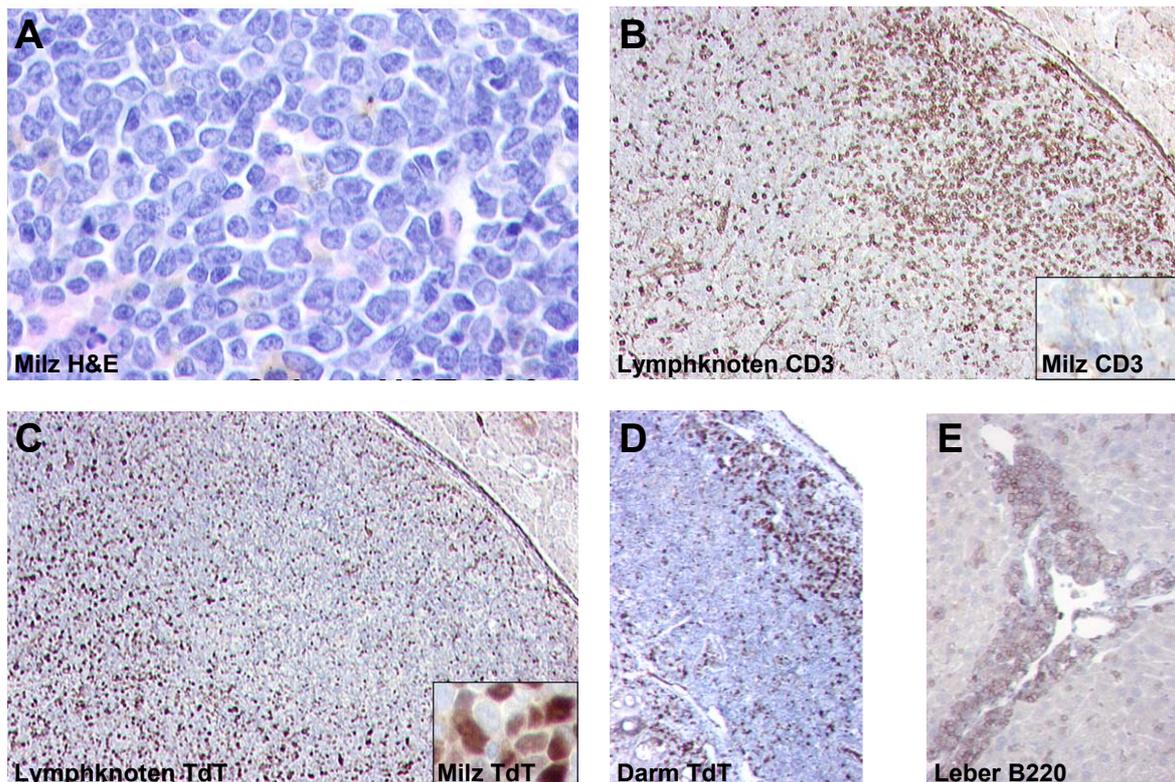


Abb. 3.17: Histopathologie einer an akuter lymphatischer Leukämie erkrankter WT-Maus: A) Blastenzellen infiltrieren die Milz, H&E Färbung, 600x; Lymphknoten gefärbt mit CD3 (B) und TdT (C), beide 100x (mit Fenster von Milz für CD3 & TdT, 600x); D) Infiltrierte Peyer Plaques, TdT-Färbung, normale B-Zellen färben nicht positiv für TdT und dienen als interne Kontrolle, 100x; E) B220 Färbung der Leber, 200x.

Die Färbung der Milz mit Hämatoxylin-Eosin (H&E) zeigt große, unreife Zellen, die durch blastäres Chromatin, einem markanten Nucleolus sowie einer geringen Menge an Zytoplasma charakterisiert sind (A). Die Tumorzellen infiltrieren auch die Lymphknoten. Färbungen mit den Antikörpern TdT ('Terminal Deoxynucleotidyl Transferase', einer DNA-Polymerase, welche in frühen Stadien von T und B-Zellen exprimiert wird, aber nicht in differenzierten Zellen) und CD3 (einem T-Zell Marker) zeigen eine spiegelbildliche

Expression der beiden Antikörper (B, C): die verbliebenen normalen T-Zellen im Lymphknoten zeigen eine positive Reaktion mit CD3 und keine Reaktion mit TdT (B, rechts), maligne Zellen hingegen färben positiv mit TdT, nicht jedoch für CD3 (C, links). Zusätzlich dazu sind auch die Peyer Plaques im Darm (D) sowie die Leber infiltriert (E). Diese Untersuchungen unterstreichen die Diagnose einer lymphoblastischen Leukämie. Die Expression von TdT in einem Teil der Tumorzellen zusammen mit einer eher schwach ausgeprägten Färbung für B220 weisen zudem darauf hin, dass es sich hier um eine B-Zell Neoplasie in einer frühen Phase der B-Zell Differenzierung handelt.

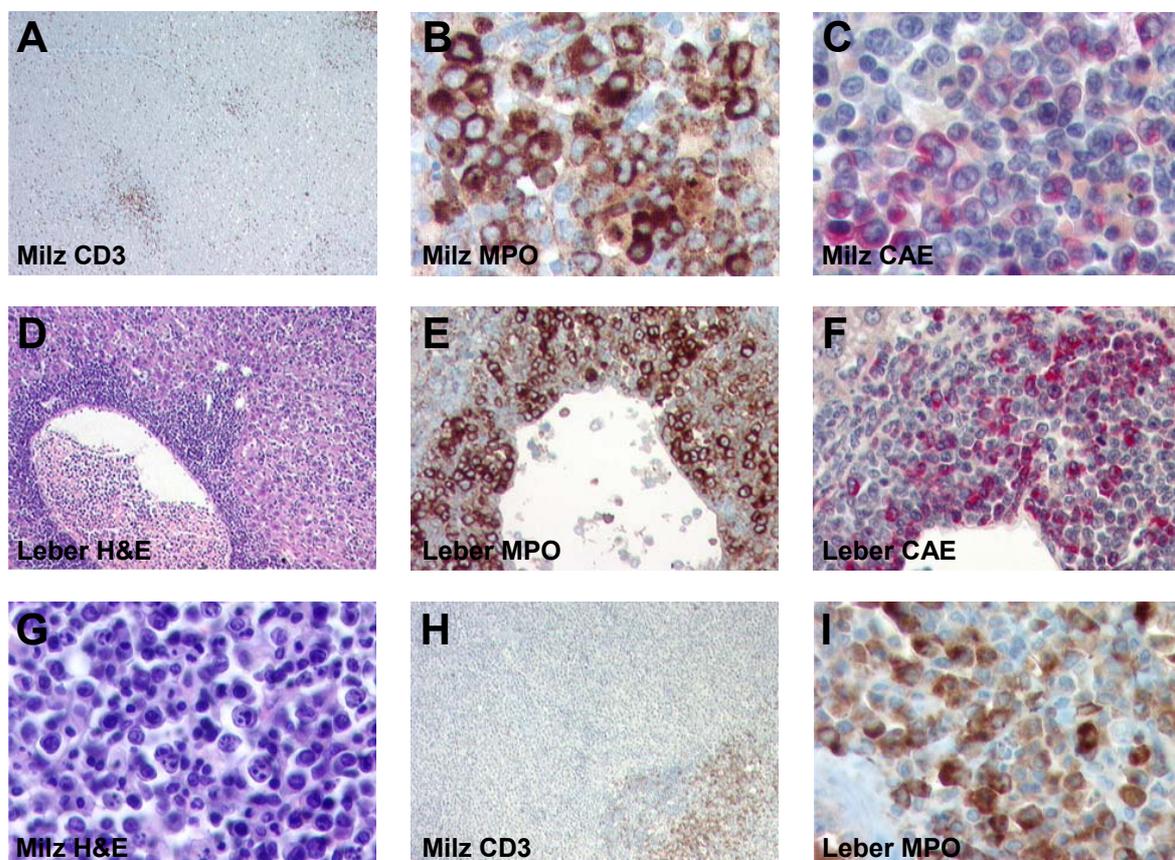


Abb. 3.18: Histopathologie an AML erkrankten CA-Mäusen: Blastenzellen infiltrieren die Milz unter zeitgleicher Verdrängung der T-Zellen (A: Färbung mit CD3, 30x) mit Myeloblasten unterschiedlicher Ausreifung (B: Färbung mit MPO; C: CAE Färbung, beide 600x). Ebenfalls ist die Leber betroffen und zum großen Teil neoplastisch infiltriert (D: H&E Färbung, 100x, E: MPO Färbung, 400x, F: CAE Färbung, 400x). Bilder einer sekundär retransplantierten Maus zeigen dieselben Charakteristika mit einer Infiltration der Milz (H: H&E, 600x) und zeitgleicher Depletion der T-Zellen in der Milz (H: Färbung mit CD3, 100x) sowie einer positiven Reaktion auf myeloische Marker (I: MPO Färbung der infiltrierten Leber, 600x).

In Abbildung 3.18 sind Leber und Milz von CA - transduzierten Mäusen zu sehen, die an akuter myeloischer Leukämie erkrankt sind. Die neoplastische Infiltration der Milz stört die normale Architektur derart, dass dort die normalerweise vorkommenden T-Zellen fast vollständig abwesend sind (A). Immunhistochemisch zeigen die malignen Zellen sowohl in der Milz als auch in der Leber eine positive Reaktion auf die myeloischen Marker Myeloperoxidase ('MPO') und Naphthol-AS-D-Chlorazetatesterase ('CAE') und unterstützen somit die Diagnose einer AML. Die CAE-Färbung weist zudem darauf hin, dass es sich bei den unreifen Zellen um eine Mischung aus Myeloblasten unterschiedlicher Reifegrade mit partieller Ausreifung handelt (B-F). Eine sekundär mit Zellen dieser erkrankten Primärmaus retransplantierten Maus weist nach einer medianen Überlebenszeit von 10 Wochen einen praktisch identischen Phänotyp auf (G-I).

3.10 Durch Lef-1 hervorgerufene Leukämien sind monoklonalen Ursprungs

Um die Frage nach der Klonalität der hervorgerufenen Leukämien zu beantworten, wurde genomische DNA aus Blut, Milz und Knochenmark erkrankter Tiere extrahiert und mittels Southern-Blot untersucht.

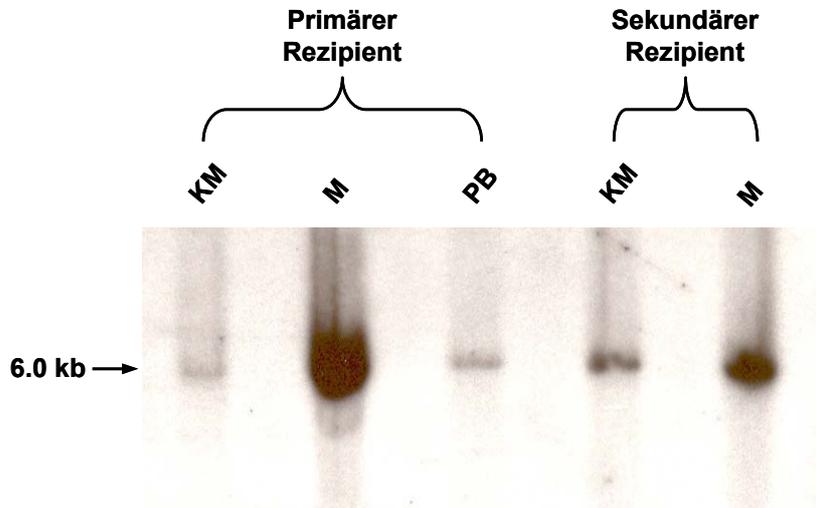


Abb. 3.19: Southern Blot Analyse mit Darstellung der Monoklonalität der durch Lef-1 ausgelösten Leukämien: Reihe 1-3 zeigt jeweils eine Bande gleicher Höhe aus Knochenmark (KM), Milz (M) und peripherem Blut (PB) einer an AML erkrankten Maus. Reihe 4 und 5 entstammen aus einer sekundär retransplantierten Maus mit Zellen der primären Maus, die in Reihe 1-3 untersucht wurde: Es ist derselbe Klon, nachgewiesen durch eine übereinstimmende Größe der Bande in Knochenmark und Milz.

Der erste Schritt ist, wie unter 2.2.7.8 erwähnt, eine Verdauung mit Eco RI, das die

provirale DNA einmal schneidet. Die andere Schnittstelle ist jedoch in einer willkürlichen Entfernung im Genom, allerdings spezifisch für jeden Klon, in den das retrovirale Konstrukt integriert ist. Dementsprechend ist jeder Klon durch eine bestimmte Fragmentgröße charakterisiert, welche sich im Southern-Blot nachweisen lässt. Im Fall von Lef-1 waren die untersuchten Leukämien sämtlich monoklonal (Abb. 3.19). Somit wurde in diesen Fällen die Krankheit stets durch einen einzigen Klon hervorgerufen, was auch die lange Latenz bis zum Ausbruch der Leukämien erklärt.

3.11 Die Analyse der leukämischen Blasten weist auf eine Hierarchie innerhalb der malignen Zellpopulation hin

3.11.1 Leukämische Blasten der Lef-1 transduzierten Mäuse zeigen teilweise die Koexpression von lymphatischen und myeloischen Markern

Die durchflusszytometrische Analyse der erkrankten Mäuse lieferte Hinweise auf das Vorhandensein einer Population von 'biphänotypischen' Zellen, die sowohl myeloische als auch lymphatischen Marker exprimieren. Nachdem in den akuten lymphatischen Leukämien sehr hohe Raten der Zellen positiv für B220 färbten (> 90 % im Knochenmark), zudem aber auch die myeloischen Marker Mac1 und Gr1 zu einem Teil exprimiert wurden, konnte daraus gefolgert werden, dass einige dieser Zellen Marker beider Zellreihen koexprimieren. Ebenso war in den Fällen der Myeloproliferation sowie der akuten myeloischen Leukämien stets ein Anteil an B220 positiven Zellen nachweisbar, der auch immunhistochemisch auffällig war. Mittels einer Doppelfärbung der leukämischen Zellen konnte diese Zellpopulation nachgewiesen werden (Abb. 3.20).

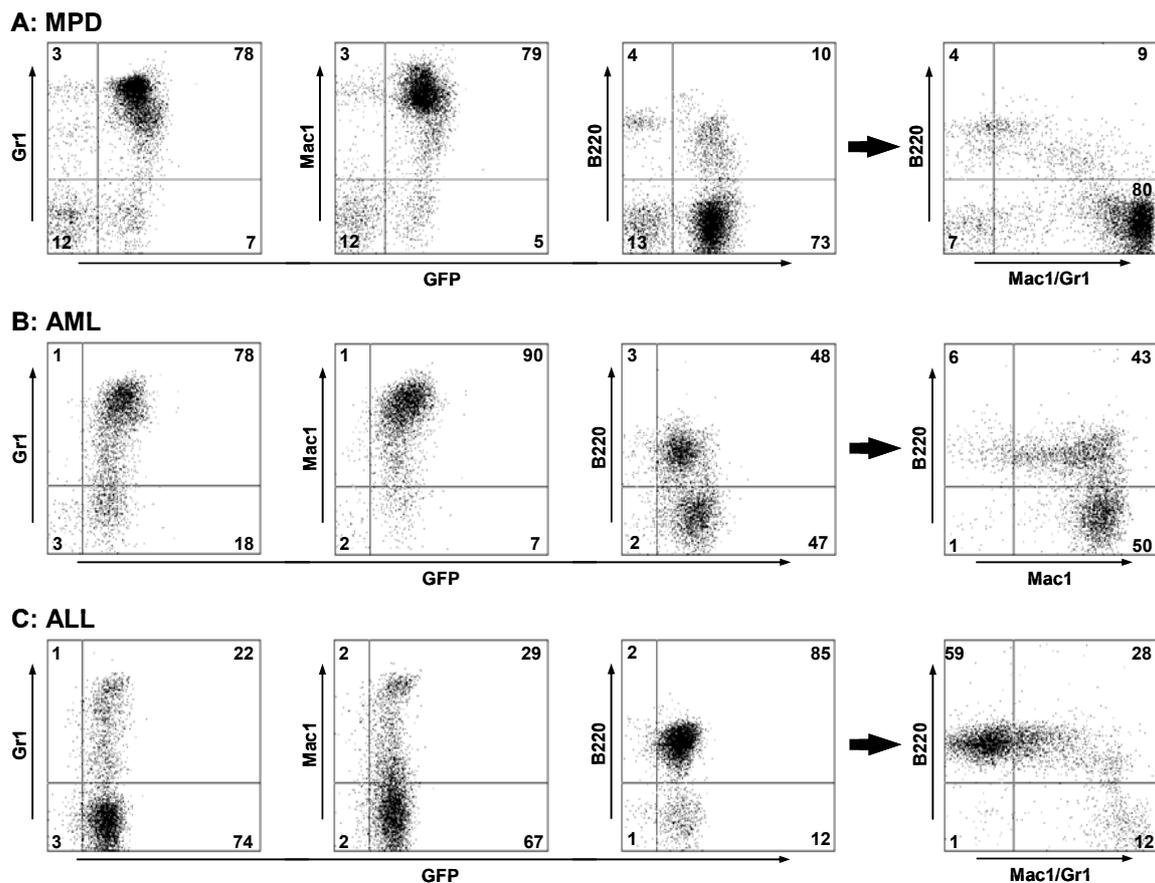


Abb. 3.20: Immunzytometrischer Nachweis einer 'biphänotypischen' Zellpopulation in Knochenmark erkrankter Mäuse: FACS Analysen einer an Myeloproliferation (MPD, A), AML (B) und ALL (C) erkrankter Maus zeigt eine positive Reaktion auf die Marker Mac1, Gr1 und B220. Doppelfärbung mit Mac1 (oder Mac1 / Gr1) und B220 zeigt neben Mac1⁺B220⁻ Zellen zudem auch Mac1⁺B220⁺ und Mac1⁻B220⁺ Zellpopulationen.

Trotz unterschiedlicher histopathologischer Diagnosen von sowohl myeloischen als auch lymphatischen Erkrankungen hatten die Mäuse im Median 23.0 ± 12.4 % Zellen, welche beide Marker gemeinsam exprimierten, während GFP-Kontrollmäuse lediglich 1.8 ± 0.9 % an doppelt positiven Zellen aufwiesen. Das Vorkommen dieser Zellpopulation in sämtlichen Tieren war ein Hinweis auf eine potentielle Gemeinsamkeit in der Entstehung dieser Erkrankungen. Tabelle 3.3 zeigt zusammenfassend den Anteil an Mac1⁺B220⁺ (MB⁺⁺) Zellen der erkrankten Mäusen:

| Maus | MB ⁺⁺ in PB | MB ⁺⁺ in KM | MB ⁺⁺ in M | Diagnose Histopathologie |
|--------|------------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------------|
| GFP | 0.5 | 0.1 | na | na |
| WT#1* | 1.7 | 3.8 | 4.2 | B-ALL |
| WT#2 | 1.7 | 13.8 | 15.6 | MPD |
| WT#3 | 7.4 | 15.5 | 18.8 | na |
| CA#1 | na | 41.2 | na | AML |
| CA#2** | 24.2 | 30.7 | 37.5 | AML |
| CA#3** | 2.1 | 9.0 | 9.6 | MPD |
| CA#4 | na | na | na | MPD |
| CA#5** | 30.0 | 30.5 | 35.7 | B-ALL |
| CA#6* | 41.2 | 32.0 | 32.8 | B-ALL |
| CA#7 | na | na | na | na |

Tabelle 3.3: Biphänotypische Zellen in den Kompartimenten Blut (PB), Knochenmark (KM) und Milz (M) in %; B-ALL: akute lymphatische Leukämie des B-Zelltyps, MPD: Myeloproliferation, AML: akute myeloische Leukämie, na: nicht analysiert, *: statt dem Marker Mac1 wurde Gr1 in Kombination mit B220 verwendet, **: B220 wurde mit einer Kombination aus Mac1 und Gr1 analysiert.

3.11.2 Zellen erkrankter Mäuse proliferieren *ex vivo* unter Zugabe von IL3

In Fall von erkrankten Mäusen wurden Zellen jener Tiere nach dem Opfern für verschiedene *ex vivo* Assays verwendet. Einer dieser Ansätze ist ein Proliferationsassay, der das Wachstum von Zellen unter Einschränkung oder Ausschluss von Wachstumsfaktoren untersucht. So differenzieren Knochenmarkszellen aus gesunden Mäusen unter Zugabe eines Zytokincocktails aus SCF, IL3 und IL6 in der Regel innerhalb von 14 Tagen vollständig aus und sterben. Alternativ ist im murinen System das Phänomen existent, dass diese Zellen nach ca. 7-14 Tagen in Mastzellen ausdifferenzieren und als solche etwa 30-40 Tage ohne immunphänotypische Veränderung proliferieren. Diese Mastzellen sind jedoch eindeutig mittels FACS Analyse zu identifizieren, da sie nahezu 100 % positiv für Sca1 und cKit färben und nicht für ein leukämogenes Potential stehen. Bei einer Zugabe von ausschließlich IL3 sind gesunde Knochenmarkszellen jedoch nicht wachstumsfähig und sterben rasch ab. Bei 5 von 10

erkrankten Mäusen konnten Zellen im Gegensatz zu normalen Knochenmarkszellen unter eingeschränkter Zytokinzufuhr (Flüssigkultur unter Zugabe von IL3) über einen Zeitraum länger als 14 Tage ohne Mastzellbildung proliferieren. Dabei entwickelten alle Zellkulturen einen ähnlichen Immunphänotyp, der durch eine biphänotypische Zellpopulation von Mac1 und B220 positiven Zellen charakterisiert war (Abb. 3.21). Ebenso wuchsen diese Zellen auch unter Zugabe des Zytokincocktails, ohne dabei dem normalen Differenzierungsablauf zu folgen, sondern ebenfalls unter Herausbildung einer biphänotypischen Mac1⁺B220⁺ Population. Diese Beobachtung war ein weiterer Hinweis auf Ähnlichkeiten in den hervorgerufenen Erkrankungen.

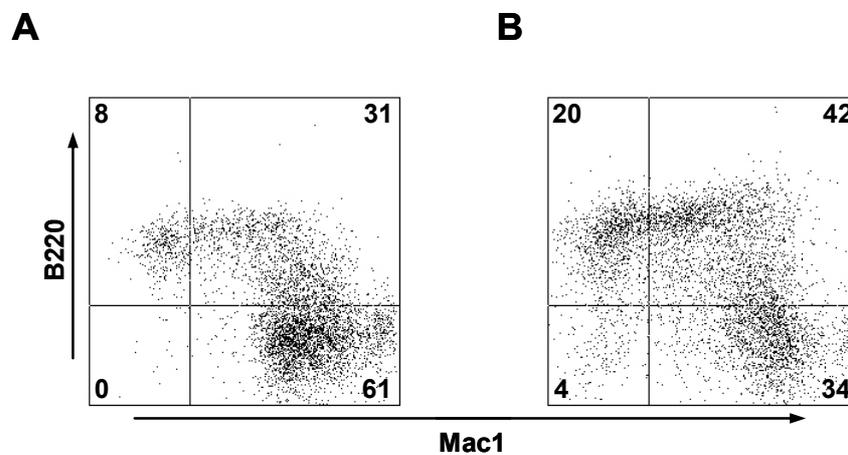


Abb. 3.21: Langzeit-Flüssigkultur zeigt einen charakteristischen Immunphänotyp von Mac1 / B220 positiven Zellen: A) Flüssigkultur von GFP-positiven Knochenmarkszellen nach 14 Tagen unter IL3 Zugabe einer an ALL erkrankten Maus; B) Flüssigkultur nach 14 Tagen unter IL3 Zugabe einer Maus mit myeloproliferativem Syndrom.

3.11.3 Das proliferative Potential ist in der B220⁺Mac1⁻Gr1⁻ Population erhöht

Um zu untersuchen, ob ein Zusammenhang zwischen den einzelnen beobachteten Erkrankungen und der in allen erkrankten Tieren festgestellten biphänotypischen Zellpopulation besteht, wurde in einem nächsten Schritt überprüft, welche Zellen innerhalb der Flüssigkulturen das größte proliferative Potential besitzen. Hierzu wurden Zellkulturen von Mäusen mit unterschiedlicher hämatologischer Erkrankungen (Zellkulturen aus je einer am AML, ALL und an Myeloproliferation erkrankter Maus) mittels des lymphatischen Oberflächenmarkers B220 sowie der myeloischen Marker Mac1 und Gr1 am FACS

charakterisiert und sortiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die $B220^+ / Mac1^-Gr1^-$ Population (B^+MG^-) ein signifikant gesteigertes Proliferationspotential im Vergleich sowohl zu doppelt positiv gefärbten $B220^+ / Mac1^+Gr1^+$ (BMG^{+++}) als auch den $B220^- / Mac1^+Gr1^+$ (B^-MG^+) Zellen aufweist (Abb. 3.22).

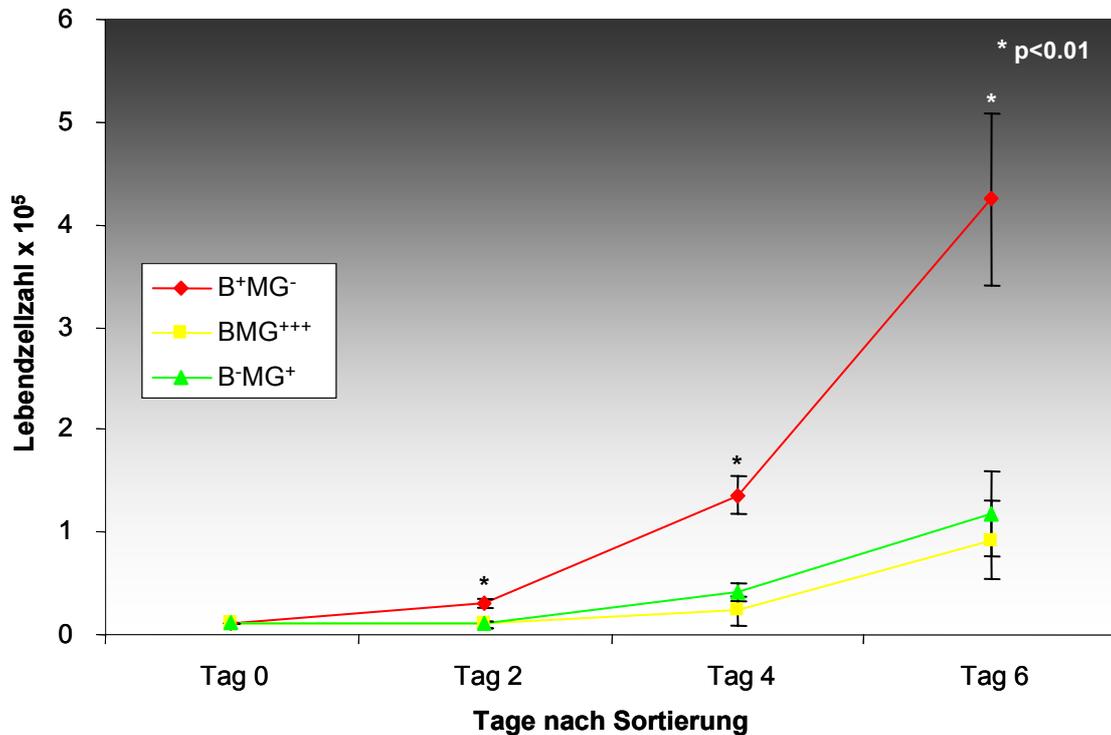


Abb. 3.22: $B220^+ / Mac1^-Gr1^-$ Zellen weisen eine gesteigerte Proliferationsrate im Vergleich sowohl zu $B220^+ / Mac1^+Gr1^+$ als auch zu $B220^- / Mac1^+Gr1^+$ Zellen auf: 10.000 Zellen aus hochrein sortierten Zellpopulationen B^+MG^- , BMG^{+++} und B^-MG^+ wurden in Flüssigkultur unter Zusatz von IL3 plattiert und nach 2, 4 und 6 Tagen gezählt (N=3, pro Ansatz wurden je eine aus Myeloproliferation, AML sowie ALL generierte Zellpopulation verwendet). Angegeben ist die durchschnittliche Zellzahl, der Fehler der Standardabweichung und Signifikanz sind angezeigt.

3.11.4 Das Vermögen für die dauerhafte Proliferation auf der Einzelzellebene ist bei der $B220^+Mac1^-Gr1^-$ Population deutlich gesteigert

In der Abbildung 3.21 kann man eine charakteristische Verteilung der verschiedenen Populationen $Mac1^+B220^-$, $Mac1^+B220^+$ und $Mac1^-B220^+$ erkennen. Mittels des unter 3.11.3 beschriebenen Proliferationsassays konnte ein erhöhtes Wachstum in der B^+MG^- Subpopulation festgestellt werden. Um zu bestimmen, ob diese Fähigkeit der Proliferation

ebenfalls auf der Ebene der Einzelzelle erhöht ist, wurde in einem nächsten Schritt das Wachstumsverhalten auf der Einzelzellebene untersucht. Dabei wurden Einzelzellen der verschiedenen Populationen aus Flüssigkulturen von Mäusen mit unterschiedlicher Diagnose mittels Durchflusszytometrie in 96-Well Platten sortiert, um das Proliferationspotential sowie die klonale Fähigkeit zur Differenzierung auf der Ebene von einzelnen Zellen zu beleuchten (Abb. 3.23 A). Diese Untersuchung zeigte deutlich, dass unabhängig der Erkrankung vor allem die Population der B^+MG^- Zellen eine klonale Expansionsfähigkeit besitzen. Im Gegensatz dazu wiesen B^-MG^+ und BMG^{+++} Zellen nur eine äußerst geringe Proliferations- / Expansionskapazität auf (B^-MG^+ : 3.6 ± 4.0 % Expansionseffizienz, BMG^{+++} : 3.6 ± 4.7 % vs. B^+MG^- : 14.2 ± 8.8 %, $N=6$, $p<0.005$, Abb. 3.23 B).

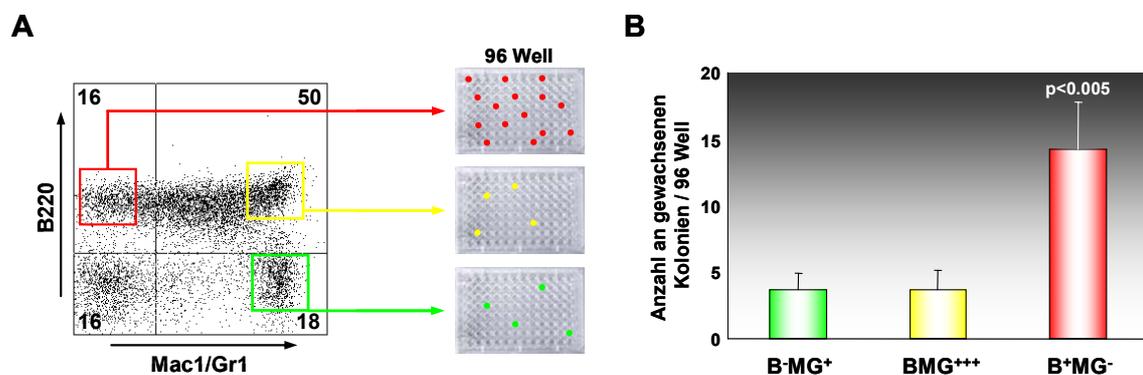


Abb. 3.23: B^+MG^- Zellen expandieren mit hoher Effizienz: A) Versuchsschema der Einzelzellexpansion; aus Flüssigkulturen von je einer an Meloproliferation, AML und ALL erkrankten Maus wurden die verschiedenen Populationen sortiert und jeweils eine Zelle in Vollmedium enthaltende 96-Well Platten sortiert (in Duplikaten). Nach 3-6 Wochen werden die Platten auf das Entstehen von reinen, aus einer Zelle entstammenden Zelllinien untersucht. B) Wachstumseffizienz der einzelnen Subpopulationen B^-MG^+ , BMG^{+++} und B^+MG^- , angegeben in aus Einzelzellen entstandene Zelllinien, der Fehler der Standardabweichung sowie die Signifikanz ist angezeigt.

3.11.5 $B220^+Mac1^-$ Zellen regenerieren alle drei Subpopulationen (B^+M^- , BM^{++} , B^-M^+) *ex vivo*

Die unter 3.11.4 erhaltenen Zelllinien aus der ursprünglich sortierten B^+MG^- Population konnten unbefristet in IL3 enthaltendem Medium vermehrt werden. Dabei zeigten diese Zelllinien nach geraumer Zeit wieder die schon zuvor beobachtete charakteristische

Verteilung der drei B220 / Mac1 Populationen. Um diese Differenzierung noch einmal genauer zu beleuchten, wurden aus einer Zelllinie die verschiedenen Populationen hochrein sortiert und anschließend in regelmäßigen Abständen auf verschiedene Immunmarker untersucht (Abb. 3.24).

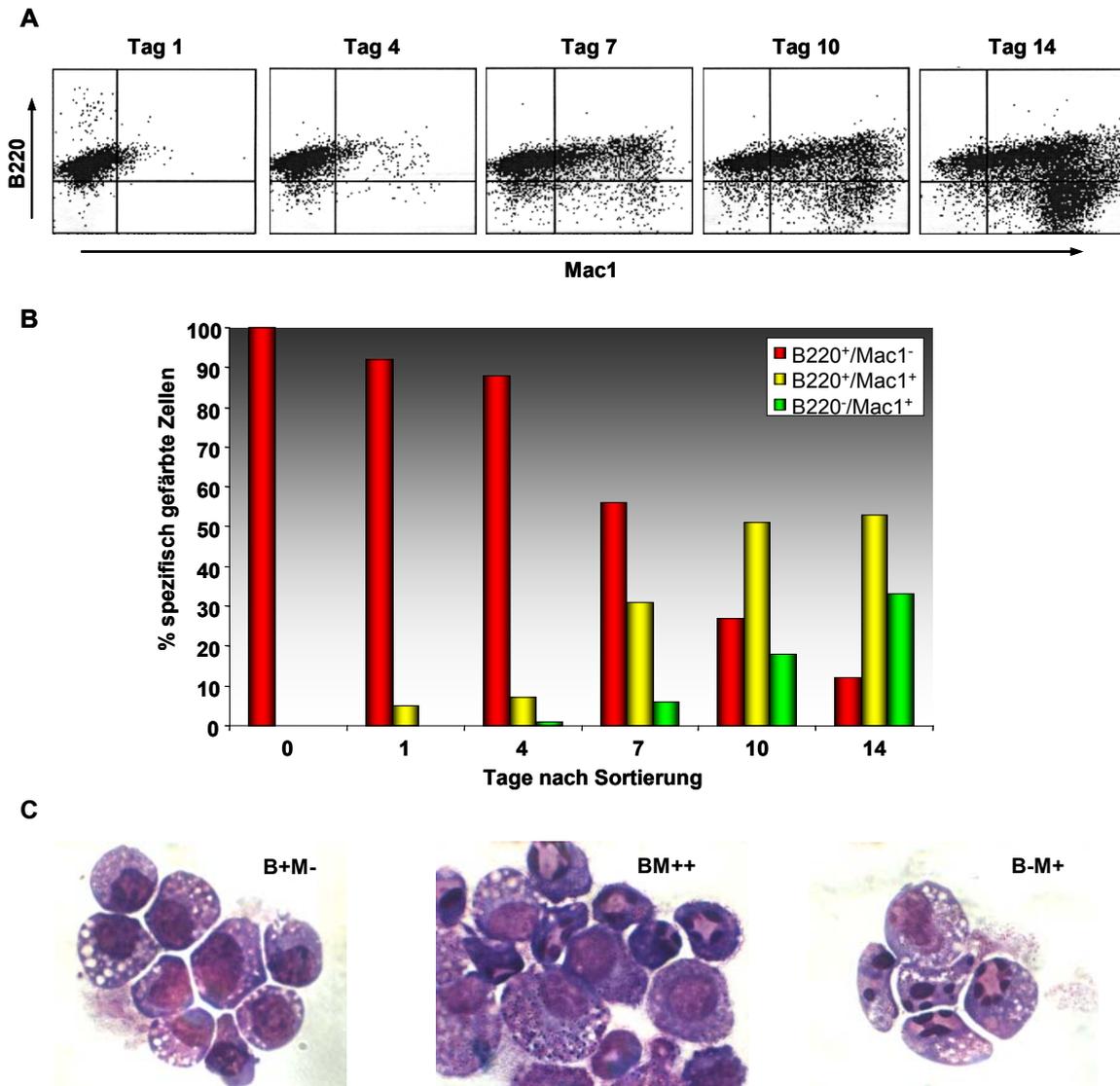


Abb. 3.24: B220⁺Mac1⁻ regeneriert alle drei Subpopulationen: der zeitliche Verlauf der Differenzierung der leukämischen Zelllinien zeigt eine Differenzierung von B220⁺Mac1⁻ (B⁺M⁻) über das Stadium der doppelt positiven B220⁺Mac1⁺ (BM⁺⁺) Zellen bis hin zu den B220⁻Mac1⁺ (B⁻M⁺) Zellen; A) Entstehung von B220⁺Mac1⁺ Zellen aus B220⁺Mac1⁻ Zellen, Analyse der Immunmarker Mac1 und B220 über einen Zeitraum von 14 Tagen; B) Prozentuale Verteilung von B220 und Mac1 positiver Zellen am Tag 1, 4, 7, 10 und 14 nach der Sortierung; C) Giemsa-Wright Färbung der verschiedenen Subpopulationen nach der durchflusszytometrischen Sortierung.

Während B^+M^- und BM^{++} Zellen nicht oder nur äußerst langsam wuchsen, konnte auch hier deutlich gezeigt werden, dass das größte Proliferations- und Differenzierungspotential bei der Population der B^+M^- Zellen lag. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass B^+M^- Zellen sich in B^+M^+ Zellen über die doppelt positive Zwischenstufe differenzieren konnte.

Die Analyse der Morphologie dieser Zellen weist jedoch darauf hin, dass auch diese B^+M^- Zellen nicht einen vollständig ausdifferenzierten Phänotyp typischer myeloischer Zellen aufweisen, sondern noch immer einem unreifen Stadium entsprechen (Abb. 3.24 C).

3.11.6 Diese Subpopulationen weisen klonale DJ_H Rearrangements auf

B220 ist ein allgemeiner Marker für lymphatische Zellen, der in sämtlichen Stufen der B-Zellentwicklung von der Pro-B Zelle bis zur aktivierten B-Zelle exprimiert wird, lediglich Plasmazellen und ein Teil der so genannten B-Gedächtniszellen weisen reduzierte Raten von B220 auf.

Um genauer zu charakterisieren, wie weit diese Zellpopulationen in der lymphatischen Differenzierung fortgeschritten sind, wurden diese auf ein zusätzliches Merkmal lymphatischer Zellen untersucht, dem Rearrangement der D und J Loci auf der Ebene der genomischen DNA der Immunglobulingene. Dieses Rearrangement der D ('diversity') und J ('junction') Regionen findet in der Entwicklung von B-Zellen auf der Ebene der Pro-B Zelle statt und benötigt dazu spezifische Faktoren wie etwa die terminale Transferase TdT. Dieses DJ-Rearrangement kann man mittels einer Multiplex-PCR Strategie untersuchen. Dabei wurde ein Primertrimer spezifisch für die Rearrangements in der schweren Kette der Immunglobuline eingesetzt, um die häufigsten DJ_H Rearrangements nachweisen zu können.

Hierfür wies die B^+M^- Zellpopulation, aus einer einzelnen B^+M^- Zelle generiert, eine rearrangierte DJ_H Bande auf. Ebenso konnte gezeigt werden, dass auch die beiden anderen Populationen B^+M^+ und BM^{++} dieselbe Bande aufwiesen (Abb. 3.25). Dies unterstreicht die Herkunft dieser Zellen aus einer einzelnen $B220^+Mac1^-$ Zelle und schließt eine Kontamination durch ungenaue Sortierungsschritte größtmöglich aus.

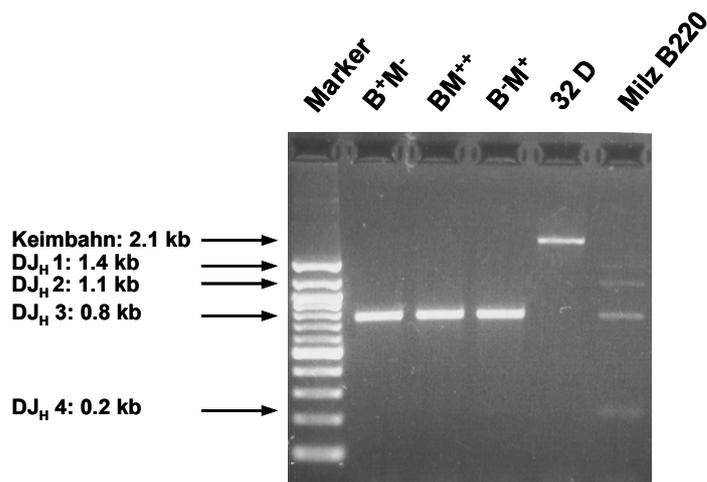


Abb. 3.25: Sowohl $B220^{+}Mac1^{+}$ als auch $B220^{+}Mac1^{-}$ Zellpopulationen weisen dieselbe Bande des Rearrangements der $B220^{+}Mac1^{-}$ Zellpopulation auf: $B^{+}M^{-}$, BM^{++} und $B^{-}M^{+}$ Zellen, aus einer einzelnen $B^{+}M^{-}$ Zelle gewachsen, wurden hochrein sortiert, die genomische DNA extrahiert und mittels PCR auf die Anwesenheit von DJ Rearrangements untersucht. Bande 2-4 weisen jeweils dieselbe rearrangierte Bande auf, die sich deutlich von der Keimbahnbande (Bande 5; Negativkontrolle 32D, eine myeloische, nicht rearrangierte Zelllinie) unterscheidet. Bande 6 zeigt als Positivkontrolle murine Milzzellen mit einer Mehrzahl an rearrangierten Banden.

3.11.7 DJ_H Rearrangements können auch in myeloischen Zellen leukämischer Mäuse nachgewiesen werden

Die Tatsache, dass Zellen erkrankter Mäuse, welche spezifische myeloische Marker exprimieren, *in vitro* aus Zellen mit lymphatischen Eigenschaften entstehen können, deutete an, das auch *in vivo* Zellen mit myeloischen Charakteristika ihren Ursprung in Zellen aus dem lymphatischen Kompartiment haben könnten. Um zu überprüfen, ob auch der Großteil myeloischer Zellen in den erkrankten Mäusen aus transformierten lymphatischen Vorläuferzellen stammt, welche ein DJ_H Rearrangement ausweisen, wurden aus peripherem Blut, Knochenmark und Milzen erkrankter Tiere mit unterschiedlicher Diagnose verschiedene Subpopulationen sortiert und auf ein Rearrangement untersucht (Abb. 3.26).

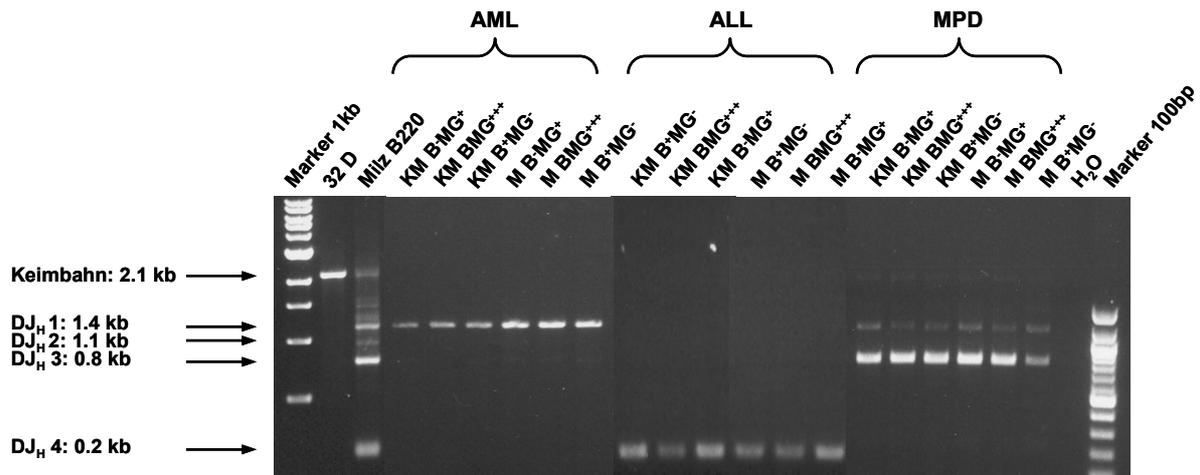


Abb. 3.26: DJ_H Rearrangement in myeloischen Zellpopulationen leukämischer Tiere: Verschiedene Subpopulationen erkrankter Mäuse wurden hochrein sortiert und deren genomische DNA mittels Multiplex-PCR auf rearrangierte D und J Loki untersucht. Banden 4-9 zeigen Subpopulationen (4-6: KM, 7-9: M) einer an AML erkrankten Maus. Deutlich zu sehen ist eine prominente rearrangierte DJ_H2 Bande. In den folgenden Banden sind sortierte Populationen aus KM (Banden 10-12) und M (Banden 13-15) einer an ALL erkrankter Maus zu sehen, welche sämtlich die rearrangierte Bande DJ_H4 aufweisen. Banden 16-21 zeigen rekombinierte Banden DJ_H2 und DJ_H3 einer Maus, welche an einer Myeloproliferation erkrankt war. Als Keimbahnkontrolle dient die myeloische monozytäre Zelllinie 32D (Bande 2), als Kontrolle der rearrangierten Banden dient genomische DNA aus der Milz einer gesunden Maus (Bande 3). KM: Knochenmark; M: Milz; B: B220; MG: doppelt positiv für Mac1 & Gr1.

Die Anwesenheit von rearrangierten Banden in den verschiedenen Subpopulationen der erkrankten Tiere weist deutlich darauf hin, dass der Großteil der leukämischen Zellen aus transformierten rearrangierten Vorläuferzellen entstanden sein muss.

Interessant ist hierbei, dass trotz leukämogenen Potentials dieser Zellen scheinbar ausreichend Differenzierungsmöglichkeit in Richtung beider hämatologischer Kompartimente besteht, da die histopathologische Untersuchung sowohl myeloische als auch lymphatische Leukämien diagnostiziert. In gesunden Tieren besitzen Zellen, die eine positive Reaktion auf B220 zeigen und zudem ein DJ_H Rearrangement aufzeigen, keinerlei Fähigkeit, sich in myeloische Zellen zu differenzieren. Eine Störung des hämatopoetischen Gleichgewichts, etwa durch eine Expressionsänderung wichtiger Transkriptionsfaktoren in solchen Zellen, kann jedoch das Differenzierungspotential entscheidend beeinflussen.

So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass B220⁺, DJ_H rearrangierte B-Vorläuferzellen aus Pax5-defizienten Mäusen die Fähigkeit wiedererlangen können, in Zellen des

myeloischen Kompartiments zu differenzieren, wenn bestimmte, für die myeloische Entwicklung essentielle Transkriptionsfaktoren exprimiert werden (Heavey, 2003, Rolink, 2000). Auch die Überexpression myelo-spezifischer Transkriptionsfaktoren in lymphatischen Vorläuferzellen kann zu einer Transdifferenzierung dieser Zellen in myeloische Zellen führen, wie die Gruppe um Thomas Graf am Beispiel von C/ebp α kürzlich zeigen konnte (Xie, 2004). Dies unterstreicht die Theorie, dass für die Entscheidung einer Zelle, in welche Richtung die Differenzierung gesteuert werden soll, ein feines, aber hochreguliertes Zusammenspiel mehrerer Transkriptionsfaktoren vorausgesetzt ist.

3.11.8 Leukämische Zellen exprimieren weitere Marker charakteristisch für frühe B-Zell-Vorläuferzellen

Da sowohl leukämische Zellen als auch generierte Zelllinien eine positive Reaktion auf den Pan B-Zell Marker B220 aufweisen, testeten wir weitere immunphänotypische Marker, die für die B-Zell-Entwicklung von Bedeutung sind. Dabei zeigte sich, dass B220⁺ Blastenzellen zeitgleich positiv für die Marker CD43 und CD24 sowie teilweise positiv für AA4.1 färben, jedoch negativ für die Oberflächenmarker CD19, CD3 sowie NK1.1 sind (Abb. 3.27). Während CD43 und CD24 neben lymphatischen Geweben auch in myeloischen Zellen wie Granulozyten oder Makrophagen exprimiert werden, ist AA 4.1 dagegen ein Marker, der lediglich in Knochenmarkszellen früher Stadien der B-Zell-Entwicklung sowie in adulten Milzgewebe und fötalem Lebergewebe exprimiert wird. Die Kombination der Färbung von B220, CD43, CD24 sowie AA4.1 wird in der Lymphopoese zur Definition von B-Zell-Vorläuferzellen verwendet. Dagegen zeigten die Blasten keine Expression der Marker CD3, ein speziell für T-Zellen aller Art verwendeter Nachweismarker, oder NK 1.1, ein Marker, der für den Nachweis natürlicher Killerzellen verwendet wird. Der Oberflächenmarker CD19 wird in der B-Zellentwicklung ab der Stufe der Pro-B-Zelle bis hin zu reifen B-Zellen exprimiert. Aus der Abwesenheit des CD19 Markers kann daher geschlossen werden, dass die transformierten Blastenzellen noch vor der Stufe der Pro-B-Zelle in der Differenzierung gestört sind. Diese Daten unterstreichen die Wahrscheinlichkeit der Herkunft der Blastenzellen aus einer lymphatischen Vorläuferzelle.

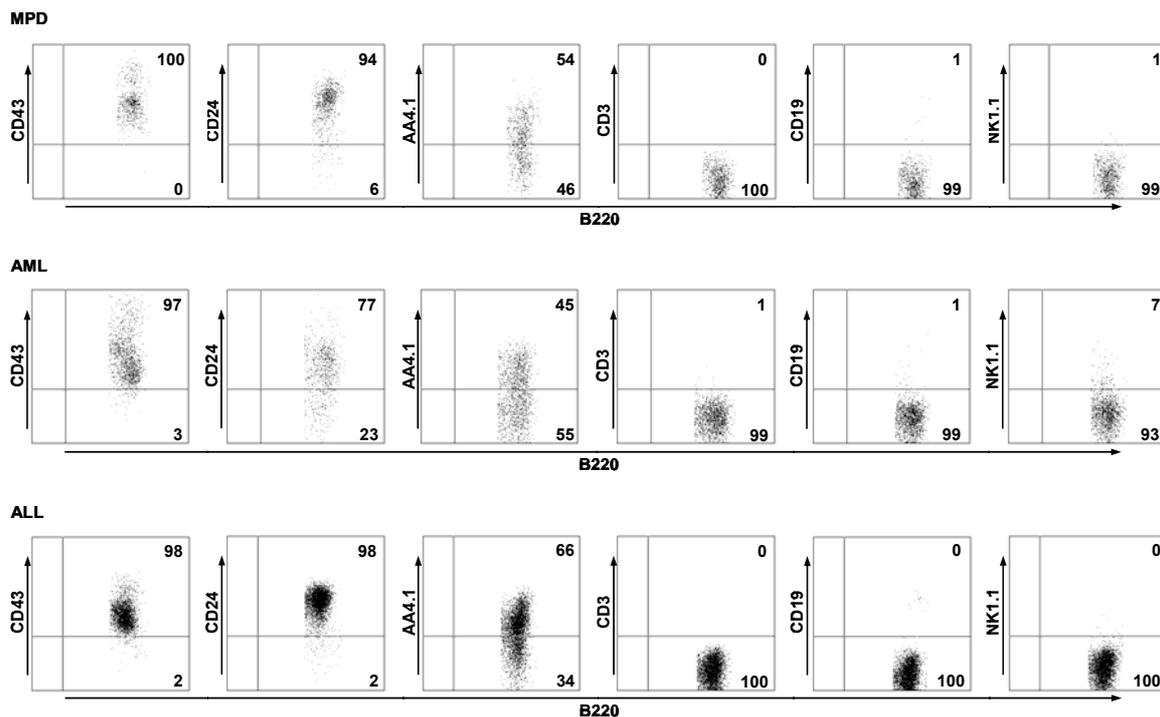


Abb. 3.27: Charakterisierung von erkrankten Mäusen auf weitere lymphospezifische Marker: Immunzytometrische Färbung des Knochenmarks von an MPD, AML und ALL erkrankten Tieren: es wurden B220 und GFP positive Zellen 'vorgegated' und auf weitere lymphatische Marker getestet. Angegeben sind die jeweiligen Antikörper sowie die Prozente an positiven Zellpopulationen.

3.11.9 Der Transkriptionsfaktor *C/ebpa* ist in den Subpopulationen B^+MG^- , BMG^{+++} und B^+MG^+ erkrankter Tiere exprimiert

Trotz der Hinweise, dass die Zellen verschiedene Marker exprimieren, die für das lymphatische Kompartiment charakteristisch sind, entwickelten einige der Tiere hämatopoetische Erkrankungen mit myeloischen Eigenschaften bei gleichzeitiger Eradikation eines Großteils der lymphatischen Zellen, abgesehen von den unter 3.11.1 beschriebenen biphenotypischen, $Mac1^+B220^+$ Zellen. Sowohl in den Fällen der an AML erkrankten Mäuse als auch der Tiere mit Myeloproliferation war ein äußerst hoher Anteil an malignen Zellen im Knochenmark, welche eine positive Reaktion mit myeloespezifischen Markern wie *Mac1*, *Gr1* oder Myeloperoxidase aufwiesen. Ebenso waren auch unter den Blastenzellen der an ALL erkrankter Mäuse ein Teil der Zellen positiv für die myeloischen Marker *Mac1* und *Gr1*. Um zu überprüfen, ob diese myeloischen Signale auch intrazellulär auf der Ebene der Transkription vorhanden sind, wurden verschiedene

Subpopulationen aus dem Knochenmark einer an ALL erkrankten Maus mittels FACS hochrein sortiert und auf die Expression des Transkriptionsfaktors *C/ebpa* überprüft. *C/ebpa* spielt eine bedeutende Rolle in der Myelopoese und die Dysregulation dieses Faktors trägt entscheidend zur Entstehung einer Reihe von myeloischen Erkrankungen bei, deren Phänotyp stets durch eine Blockierung der Bildung reifer Granulozyten charakterisiert ist. Dabei konnte gezeigt werden, dass alle drei Subpopulationen leukämischer Blasten einer an ALL erkrankten Maus den Transkriptionsfaktor *C/ebpa* exprimieren (Abb. 3.28).

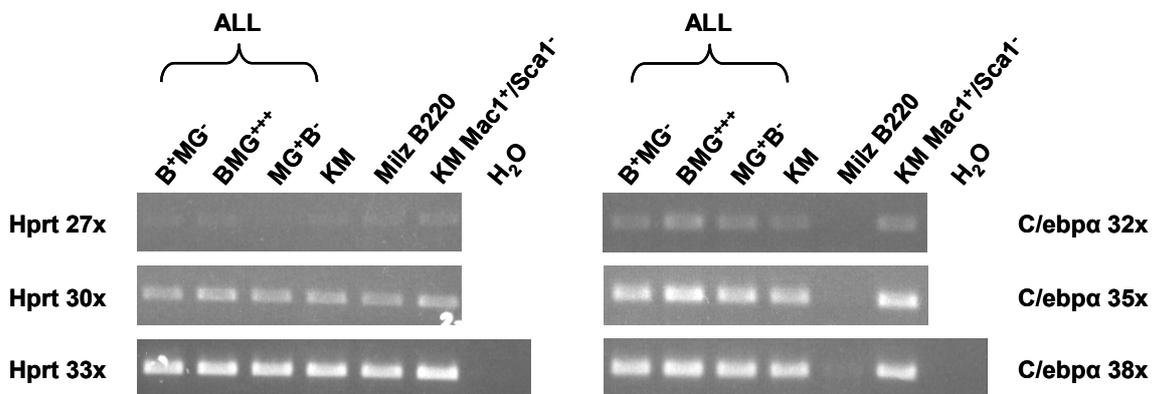


Abb. 3.28: Subpopulationen der leukämischen Blasten exprimieren *C/ebpa*: die Subpopulationen B^+MG^- , BMG^{+++} und B^-MG^+ wurden mittels Durchflusszytometrie hochrein aus einer Knochenmarkprobe einer an ALL erkrankten Maus sortiert. Anschließend wurde RNA extrahiert und die cDNA revers transkribiert. Semiquantitative PCR wurde durch zeitgleiche Durchführung verschiedener Zyklenzahlen erreicht. Als Kontrollen dienten Knochenmark aus einer gesunden, nicht-transduzierten Maus (KM) sowie die daraus sortierten Populationen B220 (lymphatische Zellen aus der Milz als Negativkontrolle für *C/ebpa*, Milz B220) und $Mac1^+ / Sca1^-$ (myeloische Zellen als Positivkontrolle für *C/ebpa*, $KM\ Mac1^+ / Sca1^-$).

3.11.10 Das Transkriptionsprofil von Blastenzellen erkrankter Mäuse mit unterschiedlicher Diagnose zeigt Charakteristika sowohl lymphatischer als auch myeloischer Ausrichtung auf

Die bisher erhaltenen Daten erschweren eine exakte Einordnung der malignen Blasten in eine bestimmte, genau definierte hämatopoetische Population. Die Expression von sowohl myeloischen als auch lymphatischen Markern weist jedoch darauf hin, dass die Transformation der malignen Zellen in einer frühen Phase der hämatopoetischen

Differenzierung stattfindet, in der noch genügend Plastizität der Zellen vorhanden ist, sich sowohl in die Richtung der lymphatischen als auch der myeloischen Richtung zu differenzieren. Andererseits spricht der Nachweis der rearrangierten DJ_H Banden in den Zellen wiederum für ein Stadium, das bereits für eine lymphatische Differenzierung determiniert ist und keine myeloische Differenzierungskapazität mehr ausweisen sollte.

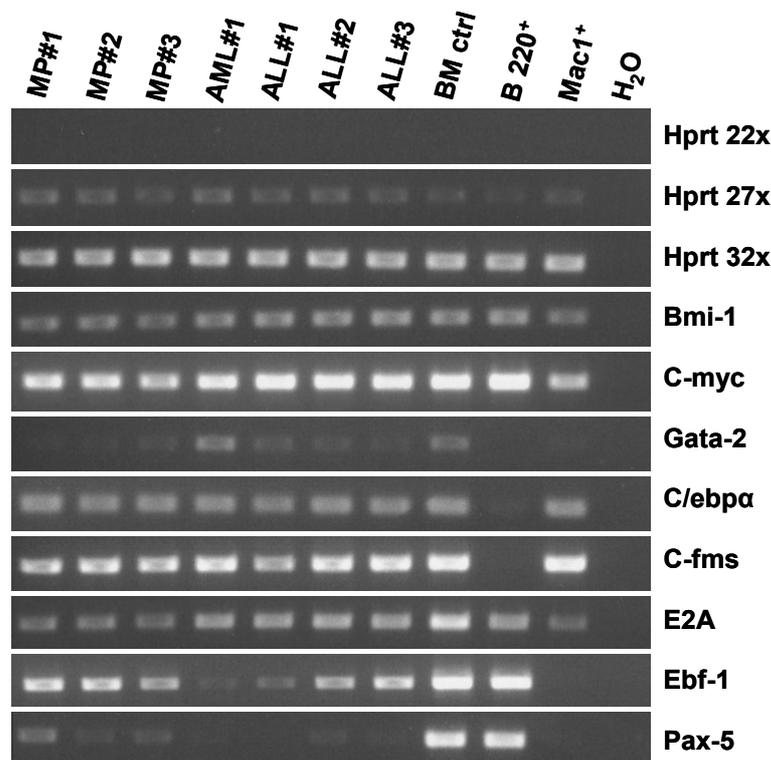


Abb. 3.29: Analyse von in der Hämatopoese wichtiger Transkriptionsfaktoren:

Aus Knochenmarkproben erkrankter Tiere sowie aus hochrein sortierten Proben myelo- bzw. lymphospezifischer Zellpopulationen wurde RNA extrahiert und die cDNA revers transkribiert. Leukämische Blasten aus Mäusen mit unterschiedlichen hämatologischen Erkrankungen weisen ein ähnliches Expressionsprofil in Bezug auf myelo- und lymphospezifische Transkriptionsfaktoren auf. So ist neben C/ebpα auch der Makrophagenspezifische Faktor c-fms exprimiert, während auch in den myeloischen Erkrankungen die lymphatischen Transkriptionsfaktoren E2A und Ebf-1 exprimiert werden. Pax-5, ein spezifischer Transkriptionsfaktor für die fortgeschrittene lymphatische Differenzierung zeigt dagegen nur eine geringe Expression in den hervorgerufenen Erkrankungen oder ist vollkommen abwesend. Als Kontrollen dienten Knochenmark (BM ctrl) aus einer gesunden, nicht-transduzierten Maus sowie die daraus sortierten Populationen B220⁺ (lymphatische Zellen aus der Milz: Milz B220) und Mac1⁺ (differenzierte Mac1⁺ / Sca⁻ myeloische Zellen aus dem Knochenmark) sowie Wasser als Leerkontrolle (H₂O).

Wie unter 3.11.7 beschrieben, kann die Dysregulation wichtiger Transkriptionsfaktoren vereinzelt jedoch das Schicksal einer Zelle zugunsten des anderen Kompartiments beeinflussen. Um einen genaueren Einblick in das Expressionsprofil einiger bekannter, für die Differenzierung von Vorläuferzellen in reife myeloische oder lymphatische Zellen wichtige Transkriptionsfaktoren zu gewinnen, wurde die Expression einer Reihe dieser Transkriptionsfaktoren in Knochenmarkproben erkrankter Tiere mittels semiquantitativer PCR analysiert (Abb. 3.29). Dabei konnte gezeigt werden, dass neben *C/ebpa* auch der myelospezifische Faktor *c-fms* in allen erkrankten Tieren hoch exprimiert wird. Zudem sind die lymphatischen Faktoren *E2A* und *Ebf-1* exprimiert, während *Pax-5* nur gering exprimiert wird oder vollständig abwesend ist.

Diese Daten zeigen, dass die malignen Blastenzellen bei den durch die Überexpression von *Lef-1* hervorgerufenen hämatopetischen Erkrankungen sowohl von myeloischer als auch lymphatischer Erscheinung sein können und spezifische Charakteristika beider Kompartimente aufweisen.

3.11.11 B220⁺Mac1⁻Gr1⁻ Zellen weisen morphologisch einen unreifen Phänotyp auf und zeigen die höchste Frequenz an leukämischen Stammzellen *in vivo*

Mit dem Hintergrund des Vorkommens der B⁺MG⁻, BMG⁺⁺⁺ und B⁻MG⁺ Subpopulationen in allen erkrankten Mäusen sowie den funktionellen und morphologischen Unterschieden der B⁺MG⁻ Zellen gegenüber der BMG⁺⁺⁺ und B⁻MG⁺ Subpopulationen *ex vivo*, war es daher von großem Interesse, diese Populationen morphologisch zu charakterisieren und weiterhin auf die Frequenz der leukämischen Stammzelle *in vivo* zu untersuchen, um zu bestimmen, in welcher dieser Populationen die Frequenz an Leukämie-induzierenden Zellen am höchsten ist.

In einem ersten Schritt wurden Zellen der B⁺M⁻, BM⁺⁺ und B⁻M⁺ Subpopulationen aus Knochenmarkproben aus an AML und ALL erkrankten Tieren hochrein sortiert und auf Objektträgern fixiert. Nach einer Wright-Giemsa Färbung wurde die Morphologie unter dem Mikroskop bestimmt. Dabei zeigte sich deutlich, dass-unabhängig des Subtyps der Leukämie-die Population der B⁺M⁻ Zellen morphologisch unreife Blasten darstellen, während die doppelt positiven BM⁺⁺ bereits teilweise ausdifferenziert sind. Die B⁻M⁺ Subpopulation hingegen ist fast vollständig in myeloische Zellen ausdifferenziert und erscheint somit als Kandidat für leukämische Stammzellen unwahrscheinlich (Abb. 3.30).

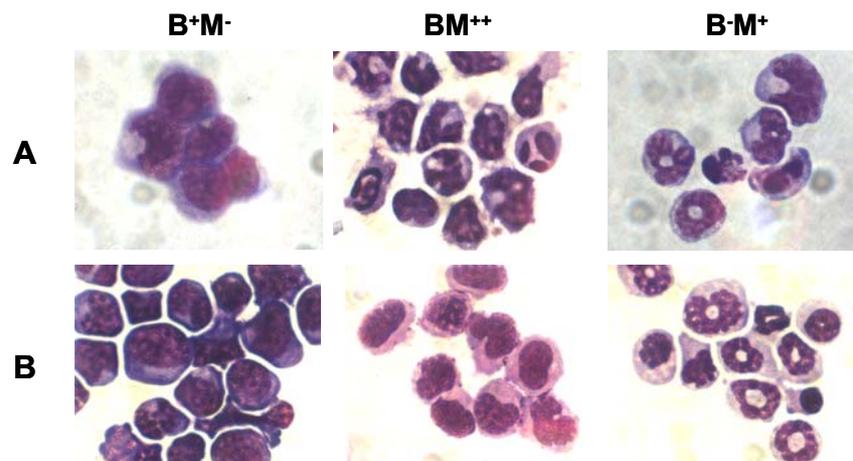


Abb. 3.30: Morphologische Phänotypisierung der leukämischen Subpopulationen: Wright-Giemsa Färbungen der hochrein sortierten Subpopulationen B^+M^- , BM^{++} und B^-M^+ aus einer an AML (A) und ALL (B) erkrankten Maus.

Für die Bestimmung der Frequenz Leukämie-induzierender Zellen wurden verschiedene Verdünnungen der Subpopulationen aus primären leukämischen AML-Blasten zusammen mit nicht transduzierten Carrierzellen in Rezipiententiere injiziert und diese Tiere anschließend auf Engraftment und Zeichen leukämischer Erkrankungen beobachtet ('complete repopulating unit'-Assay, CRU, Abb. 3.31 A). Um sicherzugehen, dass der Marker B220 bedeutend für die leukämische Stammzelle ist, wurde zusätzlich die doppelt negative Zellpopulation $B220^- / Mac1^-Gr1^-$ (B^+MG^-) sortiert und ebenfalls in Verdünnungen in Rezipiententiere injiziert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass auch *in vivo* die Zellpopulation B^+MG^- die höchste Frequenz an Zellen mit der Fähigkeit enthält, Leukämie in transplantierten Tieren zu induzieren. Dabei zeigte die B^+MG^- Population ein um das 10-fache erhöhtes Potential gegenüber der BMG^{+++} Population, ein fast 20-faches erhöhtes Potential gegenüber der B^-MG^+ Populationen und ein mehr als 60-fach gesteigertes Potential gegenüber doppelt negativer Zellen (B^+MG^- : 1 in 433 Zellen, BMG^{+++} : 1 in 4341 Zellen, B^-MG^+ : 1 in 8491 Zellen, B^-MG^- : 1 in 28033 Zellen, $p < 0.001$, Abb. 3.31 B).

Dies unterstreicht die Hypothese, dass diese B^+MG^- Zellen die leukämischen Stammzellkandidaten in diesem Modell der Lef-1 induzierten Leukämien darstellen.

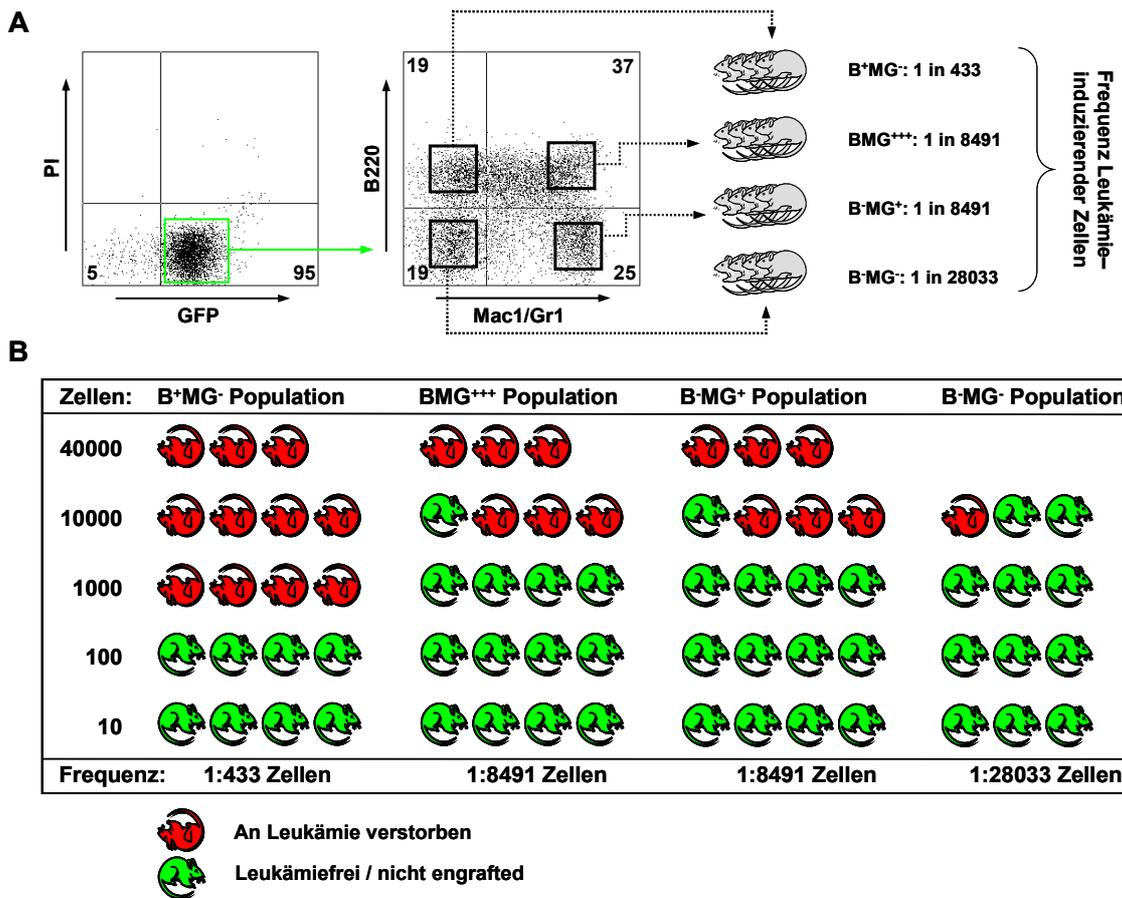


Abb. 3.31: *In vivo* Analyse der Subpopulationen zur Bestimmung der Frequenz der Leukämie - induzierenden Zellen (CRU-Assay): A) Schematischer Überblick über den Versuchsaufbau: Aus einer Knochenmarkprobe einer an AML erkrankten Maus wurden die Subpopulationen B⁺MG⁻, BMG^{+/-}, B-MG⁺ sowie B-MG⁻ hochrein sortiert und in verschiedenen Verdünnungen in Rezipiententiere injiziert. B) Engraftment-Analyse sowie auftretende Leukämien in den unterschiedlichen Populationen.

4 Diskussion

4.1 Lef-1 wird in der frühen Hämatopoese exprimiert und beeinflusst die Frequenz kurzzeitrepulierender Stammzellen

Der Transkriptionsfaktor Lef-1 spielt eine wichtige Rolle in der normalen lymphatischen Hämatopoese und ist in verschiedenen hämatopoetischen Erkrankungen aberrant exprimiert (Dorfman, 2003, Jamieson, 2004, Li, 2004, Lu, 2004, Reya, 2000, Simon, 2005). Als zentraler Transkriptionsmediator des Wnt-Signaling und damit als Zielgen von β -catenin ist er ebenso in der Regulation des 'self-renewal' hämatopoetischer Stammzellen beteiligt (Reya, 2003). Um die Rolle von Lef-1 in der Hämatopoese zu untersuchen und zu überprüfen, ob Lef-1 direkt an der Entstehung maligner hämatopoetischer Erkrankungen beteiligt ist, wurde in dieser Arbeit ein murines Knochenmarktransplantationsmodell verwendet, welches direkte Hinweise auf Funktionen von Lef-1 in der Entwicklung des Blutsystems aufzeigen sollte. Dieses Transplantationsmodell bietet hierbei Vorteile gegenüber *in vitro* Versuchen oder anderen Tiermodellen und ist in der Arbeitsgruppe, in dessen Rahmen diese Arbeit durchgeführt wurde, bereits etabliert (Rawat, 2004, Schessl, 2005, Deshpande 2006).

Wir konnten zeigen, dass Lef-1 in der murinen Hämatopoese sowohl in lymphatischem und myeloischem Gewebe als auch in frühen hämatopoetischen Progenitorzellen exprimiert wird. Durch die retroviral induzierte Expression von Lef-1 erhöhte sich die Frequenz der kurzzeitrepulierenden Stammzellen *in vitro*. Tiere, welche mit konstitutiv aktivem Lef-1 transduziert wurden, wiesen eine gesteigerte Rekonstitution *in vivo* auf. Ebenfalls führte die Überexpression sowohl von Wildtyp-Lef-1 als auch von konstitutiv aktivem Lef-1 *in vivo* zu einer Störung der normalen Hämatopoese mit einer Inversion der lympho-myeloischen Ratio. Ein Großteil der Tiere entwickelte hämatopoetische Erkrankungen wie eine letale Myeloproliferation sowie akute lymphatische und myeloische Leukämien. Eine Analyse der hervorgerufenen Erkrankungen zeigte molekulare und morphologische Gemeinsamkeiten trotz verschiedener histopathologisch diagnostizierter Subtypen mit sowohl myeloischen als auch lymphatischen Leukämien. Untersuchungen der leukämischen Blasten wiesen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* auf einen gemeinsamen malignen Klon der Erkrankungen mit lymphatischer Prägung hin.

In ersten Untersuchungen konnten wir zeigen, dass der Transkriptionsfaktor Lef-1 neben der Expression in lymphatischen Zellen (Jin, 2002, Reya, 2000, Staal und Clevers, 2000, Travis, 1991) ebenso in myeloischen Populationen als auch in frühen hämatopoetischen Vorläuferzellen, die durch die Oberflächenmarker $Sca^+cKit^+Lin^-$ (KSL) definiert werden,

exprimiert wird. Die Expression in myeloischem Gewebe wurde in einer kürzlich erschienenen Publikation bestätigt. Dabei konnte unter anderem gezeigt werden, dass eine variierende Expression von Lef-1 in sämtlichen Stadien der monomyelozytischen Differenzierung vorhanden ist, mit der höchsten Rate an Lef-1 mRNA in der Subpopulation der Promyelozyten (Skokowa, 2006).

In unseren Untersuchungen bewirkte die konstitutive Expression von Lef-1 eine signifikante Steigerung der Frequenz von kurzzeitrepopulierenden Stammzellen, dargestellt durch den sog. 'Colony Forming Assay Spleen' (CFU-S). Daten anderer Gruppen zur Bedeutung von Lef-1 für das Verhalten der kurzzeitrepopulierenden Stammzellen existieren nicht. Diese Steigerung könnte auf eine erhöhte Proliferationsrate hämatologischer Stammzellen zurückzuführen sein. Für das β -catenin wurde gezeigt, dass hämatopoetische Stammzellen, mit einer aktiven Form von β -catenin transduziert, *in vitro* eine gesteigerte Rate an Zellteilungen aufweisen (Reya, 2003). Weiterhin wurde in einer anderen Studie beschrieben, dass die Überexpression von stabilem β -catenin in hämatopoetischen Stammzellen mit einer erhöhten Proliferationsrate dieser Stammzellen mit daraus resultierendem Anstieg an CFU-S Kolonien einhergeht (Scheller, 2006).

Im Gegensatz dazu wurde in dieser Studie jedoch auch gezeigt, dass die Expression von stabilem β -catenin zu einer Verringerung von Kolonien im 'colony-forming cell' (CFC)-Assay führte. Dieser Assay wird zur Untersuchung der Frequenz klonogener Progenitorzellen angewandt. In Rahmen dieser Arbeit wurden ebenfalls CFC-Analysen durchgeführt, lieferten jedoch keine signifikanten Hinweise auf Unterschiede in der Frequenz klonogener Progenitorzellen *in vitro*, sondern zeigten lediglich eine geringe, nicht signifikante Steigerung der Kolonien. Die unterschiedlichen Ergebnisse sind unter anderem auch darauf zurückzuführen, dass die plattierten Zellpopulationen der beiden verglichenen Arbeiten verschiedener Herkunft waren: Während die Gruppe um Scheller hochreine HSCs ausplattierte, wurde in unserer Arbeit eine Mischpopulation aus Vorläufer- und Stammzellen, durch die Injektion von 5-FU angereichert, verwendet. Zudem verhindert die Expression von aktivem β -catenin in HSCs jeglichen korrekten Differenzierungsvorgang und führt zu einer letalen Störung der normalen Hämatopoese (Kirstetter, 2006, Scheller, 2006). Ferner wird in der Arbeit gezeigt, dass die verwendeten HSCs in ihrer Fähigkeit, sich in myeloische Progenitorzellen zu differenzieren, bereits eingeschränkt ist, womit eine Reduzierung der erhaltenen Kolonien, die in diesem Assay eben aus klonogenen Progenitorzellen gebildet werden, zu erklären ist. In unserem Modell wurde jedoch ein Pool an Vorläuferzellen eingesetzt, daher ist es durchaus möglich, dass die Expression von Lef-1 in bestimmten Stufen der Vorläuferzellen eine gesteigerte Proliferation verursacht und daher eine leicht erhöhte Kolonienzahl ausbildet. Dass gerade

Transkriptionsfaktoren in der Hämatopoese unterschiedliche spezifische Funktionen-abhängig von dem Differenzierungsstatus aufweisen-ist vielfach beschrieben (DeKoter und Singh, 2000, Kitajima, 2006, Koschmieder, 2005, Rosenbauer und Tenen, 2007).

Davon abgesehen wurden weitere Funktionen von Lef-1 unabhängig von dem Wnt-Signaling beschrieben (Nawshad und Hay, 2003, Ross und Kadesch, 2001, Skokowa, 2006), so dass neben der Kooperation von Lef-1 mit β -catenin auch weitere Rollen dieses Transkriptionsfaktors in der Hämatopoese-unabhängig des Wnt-Signaling-denkbar sind. So beschrieben etwa Ross und Kollegen eine Aktivierung von Lef-1 durch das Notch-Signaling, ebenfalls eine Signaltransduktionskaskade mit essentieller Bedeutung zur Steuerung der Homöostase (Duncan, 2005). Dafür spricht auch die Beobachtung, dass in den durchgeführten *in vitro* Experimenten nur ein sehr geringer oder kein Unterschied zwischen den beiden verwendeten Konstrukten beobachtet werden konnte, so dass die Möglichkeit besteht, dass die beschriebenen Effekte teilweise unabhängig von einer Aktivierung durch β -catenin auftreten.

4.2 Überexpression von Lef-1 führt zu einer erheblichen Störung der normalen Hämatopoese und induziert verschiedene Arten hämatologischer Erkrankungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Wildtyp-Form (WT) sowie eine konstitutiv aktive Form von Lef-1 (CA) in mit 5-FU behandeltem Knochenmark retroviral exprimiert und in letal bestrahlte Rezipiententiere injiziert, um die Regeneration der Hämatopoese von dem Stadium der Stammzelle über die verschiedenen Differenzierungsstufen zu beobachten und eventuelle maligne Erkrankungen zu untersuchen. Dabei konnten wir zunächst nachweisen, dass die Expression von konstitutiv aktivem Lef-1 in hämatopoetischen Vorläuferzellen zu einem verstärktem Potential der *in vivo* Rekonstitution führt. Dies könnte auf ein gesteigertes 'self-renewal' der transduzierten Stammzellen hinweisen. Bisher gibt es hierzu noch keine Untersuchungen, die spezifisch die Funktion von Lef-1 untersucht haben. Es konnte jedoch zuvor gezeigt werden, dass der Wnt-Signalweg im Allgemeinen und β -catenin im speziellen eine bedeutende Rolle beim 'self-renewal' hämatopoetischer Stammzellen spielen. Hierbei scheint es jedoch wieder auf das zuvor erwähnte Zusammenspiel einzelner Komponenten anzukommen. Während 2003 erstmals gezeigt werden konnte, dass aktiviertes β -catenin den Pool an hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) *in vitro* sowohl morphologisch als auch funktionell anreichert und eine Inaktivierung der Wnt-Kaskade durch retrovirale Überexpression bekannter Wnt-

Inhibitoren eine verringerte Rekonstitution transduzierter Mäuse *in vivo* nach sich zieht (Reya, 2003), zeigen neueste Untersuchungen, dass aktiviertes β -catenin *in vivo* ebenfalls zu einer verringerten Repopulationsfähigkeit führt, wahrscheinlich aufgrund erhöhter Zellzyklusaktivität der HSCs (Scheller, 2006, Kirstetter, 2006). Diese Daten erscheinen auf den ersten Blick widersprüchlich, weisen aber zugleich darauf hin, dass hämatopoetische Stammzellen offensichtlich eine fein gesteuerte Expression von β -catenin benötigen, um die normale Homöostase aufrecht zu erhalten, wie zuvor etwa schon für ein anderes Schlüsselprotein der Hämatopoese, PU.1, beschrieben (rezensiert in Stirewalt 2004).

In dieser Arbeit konnten wir ferner nachweisen, dass die Überexpression beider Konstrukte sowohl die myeloische als auch die lymphatische Differenzierung wesentlich beeinflusst. Es kam in sämtlichen Versuchstieren zu einer prozentualen Verringerung der lymphatischen Zellen innerhalb des transduzierten Kompartimentes, wobei die Populationen der T-Helferzellen und cytotoxischen T-Zellen prozentual äußerst stark reduziert waren. Ebenfalls kam es zu einer verhältnismäßigen Reduktion an B-Zellen. Diese Effekte waren in Tieren mit konstitutiv aktivem Lef-1 verstärkt. Im Gegensatz dazu wiesen sämtliche experimentellen Mäuse eine prozentuale Anreicherung an myeloischen Zellen innerhalb des transduzierten Kompartimentes auf, die vor allem durch eine positive Reaktion auf die myeloischen Marker Mac1 und Gr1 charakterisiert waren, während der Anteil an Zellen, die allein für Gr1 färben, reduziert war. Diese Veränderungen waren ebenfalls verstärkt in Tieren zu beobachten, die die aktive Form von Lef-1 exprimierten. Das Verhältnis von myeloischen zu lymphatischen Zellen war daher innerhalb des transduzierten Kompartimentes invertiert.

Die Funktionen von Lef-1 in der lymphatischen Hämatopoese sind bisher vor allem durch 'Knock-out' Studien untersucht worden. Dabei konnte gezeigt werden, dass Lef-1 gemeinsam mit einem weiteren Transkriptionsfaktor der HMG-Box Proteine, Tcf-1, eine redundante Rolle bei der Differenzierung von T-Zellen einnimmt, und deren gemeinsames Ausschalten in einer Blockierung der T-Zell Differenzierung resultiert (Okamura, 1998). Bei der B-Zell Entwicklung konnte in einem Lef-1 'Knock-out' Mausmodell eine Reduktion der Pro-B Zellfraktion nach der Hardy-Klassifikation (Hardy, 1991) beobachtet werden (Reya, 2000). Über die Rolle von Lef-1 in der myeloischen Hämatopoese gibt es bisher keine umfassende Studie. Im Oktober 2006 konnte die Gruppe um Karl Welte jedoch bestätigen, dass Lef-1 auch in der myeloischen Hämatopoese exprimiert wird, mit einer erhöhten Rate an Lef-1 mRNA vor allem in Promyelozyten (Skokowa, 2006). In dieser Arbeit konnten wir nun zeigen, dass eine verstärkte Expression das hämatopoetische Gleichgewicht empfindlich stört und zu einer Akkumulation an myeloischen Zellen bei zeitgleicher Reduktion von lymphatischen Zellen führt. Diese Ergebnisse werden durch die Studie von

Skokowa et al. unterstrichen, in der gezeigt werden konnte, dass Lef-1 sowohl das Überleben als auch Proliferation und Differenzierung granulözytärer Progenitorzellen entscheidend beeinflusst. Patientenproben mit erblich bedingter Neutropenie, deren Charakteristikum eine Anhäufung funktionell unreifer Promyelozyten bei zeitgleich reduzierter Anzahl funktioneller Granulozyten ist, weisen eine stark verringerte oder fehlende Expression von Lef-1 auf. Eine Rekonstitution der Lef-1 Expression führte hier zu einer Korrektur der fehlerhaften Myelopoese und ermöglichte eine Differenzierung in reife Granulozyten *in vitro*, ein Hinweis auf eine bedeutende regulatorische Funktion von Lef-1 in der Granulopoese. Die in unserer Arbeit beobachtete Zunahme der Mac1⁺/Gr1⁺ Population bei einer zeitgleichen Reduktion der Mac1⁻/Gr1⁺ Zellpopulation weist darauf hin, dass Lef-1 hier äußerst spezifische Funktionen in einzelnen myeloischen Subpopulationen ausüben könnte. Da beide Populationen zu einem Großteil Granulozyten beinhalten (mündliche Mitteilung E. Passegue), erscheint hier wie im Falle anderer bekannter Transkriptionsfaktoren (z.B. PU.1, Rosenbauer, 2004) ein 'Feintuning' dieses Transkriptionsfaktors für das Schicksal der Differenzierung der myeloischen Progenitorzellen entscheidend.

Zeitgleich mit einem gesteigerten Anteil an myeloischen Zellen zeigten die transduzierten Tiere einen prozentual verringerten Anteil an lymphatischen Zellen. Dabei kam es zu einer nahezu vollständigen Eradikation von T-Zellen und einer signifikanten Reduktion an B-Zellen. Bisherige Publikationen verwiesen meist auf eine verringerte Anzahl an B- und T-Zellen im Zusammenhang mit einer Deletion von Lef-1. Neben der bisher meist angenommenen Koppelung einer Funktion von Lef-1 an aktives Wnt-Signaling in der B-Zell Entwicklung und einer Aktivierung des T-Zell Rezeptors alpha (TCR α) in der T-Zell Differenzierung beschrieb eine Studie der Gruppe um Dan Tenen kürzlich eine neue mögliche Rolle der Regulation von Lef-1 in der Hämatopoese. So konnte gezeigt werden, dass Lef-1 den Promoter des in der Hämatopoese fast allgegenwärtigen und bedeutsamen Transkriptionsfaktors PU.1 bindet und so eine Steuerung eben jener lymphatischen Entwicklung mit beeinflussen kann (Rosenbauer, 2006). Es kann somit davon ausgegangen werden, dass Lef-1 auf vielfältige Weise die Entscheidungen einer Zelle bezüglich ihrer hämatopoetischen Differenzierung beeinflusst und dessen geordnete Expression eine Schlüsselfunktion in der geregelten Homöostase ist.

Die beobachtete Zunahme myeloischer Zellen führte nach einer Latenzzeit von etwa 10-12 Monaten zu der Entstehung einer Reihe von hämatologischen Erkrankungen unterschiedlicher Prägung. Der Großteil der transduzierten Tiere erkrankte dabei an einem myeloproliferativen Syndrom mit einer teilweise erhöhten Erythropoese sowie an akuter Leukämie. Diese akuten Leukämien zeigten immunhistochemisch sowohl Charakteristika

einer akuten lymphoblastischen Leukämie als auch einer akuten myeloischen Leukämie. Das Auftreten der Krankheiten nach einer relativ langen Latenzzeit ist mit hoher Wahrscheinlichkeit darauf zurückzuführen, dass die Überexpression von Lef-1 allein nicht ausreicht, um zum endgültigen Ausbruch der Krankheit zu führen, sondern dass es weiterer genetischer Mutationen-so genannter 'second hits'-bedarf. Dies ist in den meisten Transformationen von gesunden zu malignen Zellen ein Prozess, der über mehrere Stufen abläuft (Dash und Gilliland, 2001, Hanahan und Weinberg, 2000).

Die Ursache des Auftretens verschiedener in dieser Arbeit beobachteten Leukämien könnte dabei auf unterschiedliche Zielzellen der 'second hit'-Mutation zurückzuführen sein. Die Überexpression von Lef-1 würde so als 'first hit' dazu dienen, den Differenzierungsprozess zu stören, während ein weiterer 'hit' letztendlich zu der Proliferation onkogener Klone führt (siehe unter 4.4). Diese Hypothese einer primären Störung der normalen Differenzierung und Transformation zu einem späteren Zeitpunkt ist bereits für andere Transkriptionsfaktoren wie c-Myc oder PU.1 beschrieben (Boxer, 2004, Rosenbauer, 2006).

4.3 Die von Lef-1 induzierten Krankheiten sind monoklonalen Ursprungs

Die durch die Überexpression von Lef-1 hervorgerufenen Leukämien wurden auf ihre Klonalität untersucht und waren monoklonalen Ursprungs. Die Herkunft aus einem transformierten Zellklon ist typischerweise mit einer relativ langen Latenzzeit bis zum Ausbruch der Krankheit-wie in dem Modell beobachtet-assoziiert. Eine wichtige Fragestellung ist allerdings, ob die erhaltenen Ergebnisse eventuell durch retroviral induzierte Insertionsmutationen beeinflusst wurden. Eine geringe Transduktionseffizienz der beiden Konstrukte und die Injektion einer niedrigen Anzahl an transduzierten Zellen sprechen eher gegen eine bedeutende Rolle einer Insertionsmutagenese. Bei drei Tieren wurden die retroviralen Integrationsstellen analysiert. Diese ergaben keinerlei Hinweise auf einen möglichen Beitrag zur Leukämogenese und waren in nicht-kodierenden Intronsequenzen lokalisiert. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Insertionsmutagenese in dem vorgestellten Lef-1 Modell eine Bedeutung bei der Entstehung der akuten Leukämien hat.

4.4 Maligne Zellen der durch Lef-1 hervorgerufenen Erkrankungen weisen biphänotypische Charakteristika auf und könnten durch eine Transdifferenzierung lymphatischer Zellen in myeloische Zellen entstanden sein

Durch die Überexpression von Lef-1 entstanden sowohl akute myeloische als auch lymphatische Leukämien auf der Basis histopathologischer Untersuchungen. Allerdings wiesen sämtliche erkrankte Mäuse eine biphänotypische Population auf, die positiv auf die Marker Mac1 und B220 reagierte. Auch im humanen System werden bei einer Vielzahl von Leukämien Blastenpopulationen mit Expression von myeloischen und leukämischen Markern detektiert. So weisen beispielsweise etwa 30 % aller akuten myeloischen Leukämien, die das Fusionsgen AML1/ETO exprimieren, zeitgleich eine Expression des B-Zell spezifischen Transkriptionsfaktors PAX5 auf (Tiacci, 2004). Zudem konnten im murinen Modell bei der Kombination von AML1-ETO und einer FLT3-Mutante akute myeloische Leukämien mit zeitgleicher Expression lymphatischer Marker nachgewiesen werden (Schessl, 2005). Dass auch nicht transformierte Vorläuferzellen durch gezieltes Aktivieren bestimmter Zytokine oder Transkriptionsfaktoren eine Transdifferenzierung ohne maligne Erscheinung durchlaufen können, wurde ebenfalls bereits mehrmals nachgewiesen (Hsu, 2006, Iwasaki-Arai, 2003, King, 2002, Kondo, 2000).

Leukämien mit Blasten, die Charakteristika sowohl myeloischer als auch lymphatischer Herkunft aufweisen, werden als biphänotypische Leukämien bezeichnet. Diese Leukämien sind mit einer schlechten Prognose korreliert und gehen mit großer Wahrscheinlichkeit aus frühen Vorläuferzellen hervor, die sowohl myeloisches als auch lymphatisches Differenzierungspotential besitzen (Matutes, 1997, So, 2003, Sulak, 1990). Neben diesem Modell der 'Zellpromiskuität' (aus dem engl.: 'lineage promiscuity') kann das Vorkommen biphänotypischer Blastenzellen jedoch auch durch die Transformation von Zellen erklärt werden, welche in der Differenzierung bereits weiter in eine bestimmte Richtung fortgeschritten sind, jedoch durch ein transformierendes Ereignis zusätzliche Charakteristika des anderen Kompartiments erhalten (aus dem engl.: 'lineage infidelity', McCulloch, 1987, Smith, 1983). Die ektopische Expression von Lef-1 in frühen hämatopoetischen Vorläuferzellen stellt eine mögliche Erklärung für das Auftreten der biphänotypischen Zellen in den Lef-1 positiven Leukämien dar. Dabei könnte Lef-1 in Vorläuferzellen ohne Prädisposition für ein bestimmtes Kompartiment eine Störung der Differenzierung auslösen, eine maligne Transformation jedoch erst zu einem späteren Zeitpunkt durch weitere Veränderungen (wie etwa Mutationen) induziert werden.

Während einige der Tiere zu einem späteren Zeitpunkt eine akute myeloische Leukämie

entwickelten, erkrankten andere Tiere an einer akuten lymphoblastischen B-Zell Leukämie. Auch im Fall dieser Tiere wurde jedoch bis wenige Wochen vor Ausbruch der Krankheit ein verringerter Anteil an lymphatischen Zellen bei zeitgleich erhöhtem Anteil myeloischer Zellen in peripherem Blut beobachtet. Diese Beobachtung spricht daher in dieser Arbeit gegen das Modell der 'Zellpromiskuität', d.h. einem früh auf den myeloischen oder lymphatischen Bereich festgelegten leukämischen Klon, da in diesem Fall zu einem früheren Zeitpunkt die Entwicklung der unterschiedlichen Leukämien vorhersehbar und eine graduelle Zunahme der Zellen des jeweiligen Kompartiments nachzuweisen sein sollte.

In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass in erkrankten Tieren stets sowohl eine biphänotypische Subpopulation BMG^{+++} als auch die Populationen B^+MG^- und B^-MG^+ nachgewiesen wurden. Zellen aus geopferten Mäusen beider Leukämien proliferierten zum Teil in Langzeitkulturen *ex vivo* unter Zugabe von IL-3 und entwickelten einen ähnlichen Immunphänotyp mit der zeitgleichen Expression der myeloischen Marker Mac1 und Gr1 sowie des lymphatischen Markers B220. Analysen des Proliferations- und Differenzierungsvermögens der drei verschiedenen Subpopulationen *ex vivo* und *in vivo* zeigten, dass die Zellpopulation $B220^+Mac1^-Gr1^-$ das größte Wachstumspotential *ex vivo* sowohl auf der Ebene der 'Bulk'-Masse als auch die höchste Wachstumseffizienz auf der Einzelzellebene besitzt. Zudem konnten genomische DJ-Rearrangements des IgH Lokus in allen drei Subpopulationen (B^+MG^- , BMG^{+++} , B^-MG^+) nachgewiesen werden. Aus einer DJ_H - rearrangierten B^+MG^- -Einzelzelle konnten Zelllinien generiert werden, welche die beiden anderen Subpopulationen BMG^{+++} und B^-MG^+ bilden konnten, die erwartungsgemäß ein identisches DJ_H -Rearrangement aufwiesen. Der CRU-Assay zeigte weiterhin, dass die Frequenz an Leukämie-induzierenden Zellen *in vivo* ebenfalls in der B^+MG^- Population im Vergleich zu den anderen beiden Subpopulationen BMG^{+++} und B^-MG^+ signifikant erhöht ist und damit eine Hierarchie innerhalb der leukämischen Blasten aufzeigt.

Dies belegt eindeutig, dass das transformierende Potential und somit die Frequenz der leukämischen Stammzellen in dieser B^+MG^- Population am höchsten ist. Die für das myeloische Kompartiment spezifischen Marker Mac1 und Gr1 werden erst mit zunehmender Differenzierung verstärkt exprimiert und scheinen somit nicht maßgeblich an der leukämogenen Wirkung beteiligt zu sein. Ein weiterer Aspekt, der dafür spricht, dass die Ursprungszelle, aus der die malignen Zellen-auch die der akuten myeloischen Leukämien-hervorgegangen sind, eine Vorläuferzelle des lymphatischen Kompartiments ist, zeigt das Vorkommen von DJ_H Rearrangements sowohl in myeloischen als auch lymphatischen Blasten der erkrankten Tiere. In normalem hämatopoetischen Gewebe sind

solche B220⁺ / DJ_H rearrangierten Zellen in der Regel nicht in der Lage, eine Differenzierung in myeloische Zellen zu vollbringen. Bei einer von außen induzierten Expression bestimmter Transkriptionsfaktoren konnte jedoch bereits *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden, dass diese Induktion lymphatische Zellen in myeloische Zellen umwandelt, wenn zeitgleich bestimmte für das lymphatische Kompartiment bedeutende Transkriptionsfaktoren ausgeschaltet werden (Heavey, 2003, Hsu, 2006).

Die immunhistochemische Analyse zeigte weiterhin eine Ko-Färbung der B220⁺-positiven Blasten mit den Oberflächenmarkern CD43 sowie dem Heat Shock Antigen CD24 (HSA), bei zeitgleicher Abwesenheit des B-Zell spezifischen Differenzierungsmarkers CD19 sowie des Pan-T-Zell Markers CD3. Dieses Expressionsmuster sowie die Expression der Transkriptionsfaktoren E2A und Ebf-1 entsprechen damit einem frühen Stadium innerhalb der B-Zell Entwicklung (Li, 1996). Wir konnten allerdings auch zeigen, dass auf der Ebene der Transkriptionsfaktoren B-zellspezifische Gene wie Pax-5 nicht exprimiert werden, wohingegen myelospezifische Faktoren wie C/ebpa und c-fms deutlich exprimiert werden. Es muss zudem erwähnt werden, dass es sich in dieser Arbeit um den Versuch der Charakterisierung leukämischer Blastenzellen handelt, und daher eine Zuteilung in klassische B-Zell-Differenzierungsschemata die Zellen nur in Maßen beschreibt und nicht den Phänotyp normaler B-Zellen widerspiegeln kann.

Es ist bekannt, dass Lef-1 in der B-Zell Entwicklung in frühen Pro-B Zellen der Stufen B und C der Hardy Klassifikation exprimiert wird, anschließend jedoch keine signifikante Expression mehr aufweist (Reya, 2000). Diese Zellen sind mittels durchflusszytometrischer Oberflächenmarker als B220⁺CD43⁺HSA⁺BP.1⁻ (B) und B220⁺CD43⁺HSA⁺BP.1⁺ (C) charakterisiert (Hardy, 1991). Während des B Stadiums der Pro-B Zelle findet das Rearrangement der DJ_H Kette unter Mitwirkung der beiden Gene RAG-1 und RAG-2 statt (McBlane, 1995, Oettinger, 1990), welche ihrerseits die Hilfe der HMG-Box Proteine in Anspruch nehmen (van Gent, 1997). Die Differenzierung von frühen lymphatischen Progenitorzellen (CLP) in B-Zellen wird über verschiedene Transkriptionsfaktoren und Zytokine gesteuert, deren strikte Regulation für die weitergehende Reifung lymphatischer Zellen von entscheidender Bedeutung ist. Zwei hierfür benötigte Transkriptionsfaktoren sind PAX-5 und EBF-1. Während von EBF-1 angenommen wird, dass es zu Beginn der frühesten B-Zell Stadien eine Schlüsselrolle spielt, ist PAX-5 in den ersten Schritten der B-Zell Differenzierung weitgehend nicht notwendig, sondern ist hauptsächlich für die B-lymphatische Determinierung und den Erhalt des B-Zell Kompartiments verantwortlich, indem es wichtige Transkriptionsfaktoren wie Notch oder c-fms (M-CSF) reprimiert, die ihrerseits eine Differenzierung in T-Zellen und Makrophagen induzieren können (Roessler und Grosschedl, 2006).

In dieser Arbeit zeichnen sich die leukämischen Blasten durch einen Immunphänotyp aus, der in einer Zwischenstufe der allgemeinen lymphatischen Vorläuferzelle (CLP) und der Pro-B Zelle eingeordnet werden könnte. Diese Blasten weisen jedoch ebenfalls eine Expression der Transkriptionsfaktoren *c-fms* und *C/ebpa* auf und zeigen in den Fällen einer akuten myeloischen Leukämie eine immunhistochemische Reaktion mit Myeloperoxidase und Chlorazetatesterase auf, in beiden Fällen spezifische Marker für das myeloische Kompartiment. Unlängst konnte gezeigt werden, dass die ektopische Expression von *C/ebpa* in CLPs ausreicht, eine Transdifferenzierung in myeloische Zellen zu erreichen. Zugleich konnte eine Repression von *Pax-5* in diesen Zellen nachgewiesen werden (Fukuchi, 2006, Hsu, 2006). Diese und weitere Arbeiten dokumentieren somit einerseits die Fähigkeit von Zellen zur Transdifferenzierung von lymphatischen Zellen in das myeloische Kompartiment und zeigen weiterhin, dass *Pax-5* dabei eine Schlüsselrolle zur Aufrechterhaltung von B-Zellen spielt (Mikkola, 2002, Nutt, 1999, Tagoh, 2004, Tagoh 2006).

In einer weiteren kürzlich erschienenen Publikation konnte zudem nachgewiesen werden, dass *Lef-1* in hämatopoetischen Zellen *C/ebpa* hochregulieren und eine Reifung blockierter Promyelozyten induzieren kann (Skokowa, 2006). Somit könnte die Überexpression von *Lef-1* in einer frühen Stufe der lymphatischen B-Zell Differenzierung zu einer aberranten Expression von *C/ebpa* führen. Diese in unserer Arbeit in Zellen erkrankter Mäuse gefundene Expression von *C/ebpa* könnte demnach zu einer induzierten Differenzierung eben dieser Vorläuferzellen aus dem lymphatischen in das myeloische Kompartiment führen, was den erhöhten Anteil an myeloischen Zellen bei zeitgleicher Reduktion an Lymphozyten im Mausmodell erklären würde. Dabei reprimiert *C/ebpa* den Transkriptionsfaktor *Pax-5* und induziert so eine Störung des B-Zell Kompartiments. Hier könnte auch eine mögliche Erklärung für das Fehlen an Monozyten der Subgruppe *Mac1⁻Gr1⁺* in an MPD oder AML erkrankten Tieren liegen: In der normalen B-Zell Differenzierung reprimiert *Pax-5* den Makrophagen-induzierenden Transkriptionsfaktors *c-fms* (M-CSF), indem es direkt an der *c-fms* Transkriptionsinitiationstelle bindet (Tagoh, 2006). Dagegen ist die normale Granulopoese durch eine Inaktivierung von *c-fms* gekennzeichnet ist (Follows, 2005). Durch die verringerte Expression von *Pax-5* und einer gesteigerten Expression von *c-fms* könnte es so zu einer Störung sowohl der lymphatischen als auch granulozytären Differenzierung kommen. Zudem ist hinlänglich bekannt, dass für die Differenzierung einer hämatopoetischen Vorläuferzelle in funktionelle, reife Zellen ein 'Feintuning' der dafür verantwortlichen Transkriptionsfaktoren notwendig ist. Skokowa et al. beobachteten in der normalen Granulopoese eine nach dem Stadium der Promyelozyten abnehmende Expression an *Lef-1*. Dies könnte darauf hinweisen, dass die

Reifung von Granulozyten des Mac1⁻Gr1⁺-Subtyps eine verringerte Expression von Lef-1 voraussetzt. In unserem Modell hingegen wird durch die retrovirale Insertion eine stetige Expression induziert und könnte so dazu führen, dass Promyelozyten nicht weiter in Granulozyten des Subtyps Mac1⁻Gr1⁺ differenzieren können, sondern blockiert werden. Ebenfalls könnte die Aufrechterhaltung der Expression dieses Transkriptionsfaktors in Pro-B-Zellen der Hardy Klassifikation B und C die weitere Differenzierung von B-Zellen empfindlich stören, da in der normalen Hämatopoese eine Reduzierung des Lef-1 Levels für weitere Reifungsschritte notwendig sein könnte.

Die vorliegenden Ergebnisse schließen jedoch nicht aus, dass sich die so genannte Ursprungszelle (engl. 'cell of origin'), in der durch die induzierte Expression von Lef-1 eine Prädisposition für eine hämatologische Erkrankung erfolgt, von den in dieser Arbeit charakterisierten leukämischen Stammzellen der B⁺MG⁻ Populationen unterscheidet. Diese Ursprungszelle wird als 'präcancerogene Zelle' definiert, welche zur Bildung von Krebs-Stammzellen fähig ist, jedoch selbst nicht transformierend ist (Smith, 2006). So zeigt eine Studie um das Fusionsgen AML1/ETO, dass AML1/ETO positive HSCs selbst über kein leukämogenes Potential verfügen, aber weiter differenzierte Progenitoren mittels zusätzlich erhaltener Mutationen transformierendes Potential erreichen könnten. In diesem Fall spiegeln die AML1/ETO positiven HSCs die Ursprungszellen wieder, die leukämischen Stammzellen hingegen wären in der malignen Progenitorpopulation zu finden (Miyamoto, 2000).

In dem in dieser Arbeit generierten Modell sind daher mehrere Möglichkeiten der Ursprungszelle gegeben: diese können sowohl in den HSC / MPP-Populationen liegen, welche eine gestörte Differenzierung, aber keine maligne Transformation zur Folge haben, als auch in myeloischen Progenitorzellen, welche durch die ektopische Expression von Lef-1 lympho-spezifische Transkriptionsprogramme induzieren. Des Weiteren ist es aber auch möglich, dass diese Ursprungszellen lymphatische, B220⁺ DJ_H rearrangierte Vorläuferzellen sind, welche durch die ektopische Expression von Lef-1 teilweise blockiert werden und in denen eine myeloische Differenzierung eingeleitet wird. Es wurde bereits mehrfach nachgewiesen, dass lymphatischen Vorläuferzellen noch ein ruhendes Vermögen für eine myeloische Differenzierung inherent ist, welches durch veränderte Expression von Transkriptionsfaktoren (Fukuchi, 2006, Nutt, 1999, Xie, 2004) oder Zytokinen (Kondo, 2000) eingeleitet werden kann. Die maligne Transformation dieser Ursprungszellen durch sekundäre Mutationen würde anschließend den Phänotyp der entstandenen Leukämien determinieren.

Zusammenfassend kann davon ausgegangen werden, dass eine Disregulation von Lef-1 eine Reprogrammierung früher Vorläuferzellen-mit hoher Wahrscheinlichkeit lymphatischer

Natur-nach sich zieht, die eine Differenzierung in myeloische Zellen zur Folge hat. Dabei kommt es allem Anschein nach zu einer Störung der Homöostase aufgrund der Induktion einer aberranten Expression weiterer für die Differenzierung wichtiger Transkriptionsfaktoren.

Eine präliminäre Beobachtung, die diese Aussage unterstützt, konnte kürzlich in Rahmen eines Experiments gezeigt werden, welches für ein an diese Arbeit anschließendes Projekt durchgeführt wurde. Dabei wurde einer Lef-1 CA-transduzierten Maus, welche sich noch nicht in einem Stadium einer hämatologischen Erkrankung befand, Knochenmark entnommen. Anschließend wurden die Subpopulationen B^+MG^- , BMG^{+++} , B^-MG^+ sortiert und auf DJ_H-Rearrangement überprüft. Sowohl die B^+MG^- als auch die anderen beiden Populationen wiesen das gleiche Muster an rearrangierten Banden auf. Ferner überlebten die B^+MG^- Zellen *in vitro* bei Kultivierung mit IL-3 über einen Zeitraum von mehr als 14 Tagen, ohne jedoch, wie im Fall der leukämischen Tiere, zu proliferieren, während Zellen der anderen beiden Subpopulationen rasch starben. Diese Zellen könnten daher einen Pool 'präleukämischer' Stammzellen darstellen, deren onkogenes Potential noch nicht aktiviert ist, die jedoch durch die Bildung myeloischer Zellen aus lymphatischen, B220⁺ DJ_H rearrangierten Vorläuferzellen die Inversion der lympho-myeloischen Ratio verursachen.

Es konnte nur ein geringer Unterschied festgestellt werden in Bezug auf die Expression des Wildtypgens oder einer konstitutiv aktiven Mutante von Lef-1. Dies lässt im Zusammenhang mit einer aktuellen Studie darauf schließen, dass die in dieser Arbeit durch Lef-1 hervorgerufene Symptome zumindest teilweise unabhängig der Wnt-Signaltransduktionskaskade stattfinden (Skokowa, 2006). In der Regel wird davon ausgegangen, dass Lef-1 in Verbindung mit aktivem Wnt-Signaling Zielgene aktiviert, hingegen im Fall von inaktivem Wnt-Signaling verstärkt eine Repressorfunktion einnimmt. In der Granulopoese jedoch scheint die Induktion der Differenzierung durch Lef-1 unabhängig von β -catenin abzulaufen (Skokowa, 2006). In dieser Arbeit sind die beobachteten Ergebnisse zwar in Verbindung mit der Expression einer konstitutiv aktiven Mutante gegenüber dem Wildtypgen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* verstärkt, nichtsdestotrotz funktionell äußerst ähnlich. Im Falle einer kompletten Abhängigkeit der Lef-1 Funktionen von Wnt / β -catenin sollten die Effekte dagegen voneinander abweichend sein, da die Expression von Wildtyp-Lef-1 allein keine aktivierenden Funktionen ausüben sollte.

5 Ausblick

Der Wnt-Signalweg wird mehr und mehr als einer der entscheidenden Signaltransduktionskaskaden in der Mitbestimmung des Schicksals hämatopoetischer Stammzellen gesehen. Dabei scheint dieser sowohl in der Rolle des 'self-renewal' als auch in der Differenzierung von Stamm- und frühen Progenitorzellen in reife und funktionsfähige Zellen aller hämatopoetischen Kompartimente an einer Vielzahl von essentiellen Entscheidungen der Zelle beteiligt. Des Weiteren ist dessen aberrante Expression in einer Reihe hämatologischer Erkrankungen ein Hinweis darauf, dass eine strenge und geordnete Regulation Voraussetzung für einen normalen Ablauf der Hämatopoese ist und die unkontrollierte Expression einzelner Wnt-Signaling-beteiligter Proteine die Entstehung von Leukämien unterstützt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein murines Knochenmarktransplantationsmodell für die Expression des Wnt-spezifischen Transkriptionsfaktor Lef-1 generiert. Dabei konnten Einsichten in die Bedeutung von Lef-1 bezüglich der Differenzierung und der Entstehung von malignen Erkrankungen in der Hämatopoese gewonnen werden. Zudem wurden die beobachteten hämatopoetischen Erkrankungen charakterisiert und der Versuch unternommen, leukämische Stammzellen in diesem Modell phänotypisch und funktionell zu identifizieren. Um zu evaluieren, ob Lef-1 auch eine Rolle in der Pathogenese humaner Leukämien verschiedener Klassifikationen spielt, ist geplant, ein großes Patientenkollektiv auf aberrante Expression dieses Transkriptionsfaktors zu 'screenen' und dabei vor allem die Expression von Merkmalen sowohl myeloischer als auch lymphatischer Herkunft genauer zu analysieren. In einem ersten Schritt sollen hier Patientenproben akuter myeloischer Leukämien mit jeweils hoher oder geringer Expression von Lef-1 auf Rearrangements der IgH- und TCR-Bereiche untersucht werden, um auch in humanen myeloischen Leukämien die Möglichkeit einer bedeutenden Funktion dieses Transkriptionsfaktors zu untersuchen. Im Fall von Rearrangements ist es denkbar, dass die Ursache für die entstandenen Erkrankungen myeloischer Ausrichtung möglicherweise auch im humanen System ihren Ursprung in einer Zellpopulation hat, die im lymphatischen Kompartiment zu suchen ist. Daher wäre in diesen Fällen die Behandlung mit herkömmlichen Strategien mit hoher Wahrscheinlichkeit ineffizient, da zwar die Masse an Blastenzellen angegriffen würde, die eigentlich maligne leukämische Stammzellpopulation jedoch von der Therapie ausgeschlossen bliebe. Dabei würden lymphospezifische Marker (wie etwa B220 im murinen System), die in unserem Modell mit hoher Wahrscheinlichkeit von leukämischen Stammzellen exprimiert werden, ein viel versprechendes Ziel für die

Generation spezifischer Antikörpertherapien bieten, da sie nicht auf gesunden hämatopoetischen Stammzellen vorkommen. Gerade das Identifizieren von Markern zur Unterscheidung von normalen hämatopoetischen und leukämischen Stammzellen ist eine der Schlüsselaufgaben in den kommenden Jahren, wird aber bisher vor allem durch eine ausgeprägte Ähnlichkeit im Verhalten der beiden Zellpopulationen erschwert. Diese Unterschiede in der Expression von Oberflächenmolekülen zwischen leukämischen und normalen Stammzellen aufzuzeigen, würde im speziellen die Entwicklung neuer Behandlungsstrategien erleichtern, da diese neu entwickelten Therapien gezielt die leukämische Stammzellpopulation attackieren, gesunde Stammzellen hingegen nicht angreifen würde (Buske, 2006).

Ferner sollen bisher unbekannte Zielgene von Lef-1 in der hämatologischen Differenzierung mittels Array-Technologie entdeckt werden und deren Rolle in der Entstehung maligner hämatologischer Erkrankungen im Kontext des Transkriptionsfaktors Lef-1 beleuchtet werden. Dabei ist gepant, die unter 3.11. beschriebenen Subpopulationen untereinander und im Vergleich zu den jeweiligen Populationen aus gesunden Tieren zu vergleichen. Dies sollte Informationen über Gene liefern, die für das 'self-renewal' bedeutend sind. Diese sollten erwartungsgemäß in der B⁺MG⁻ Population hoch exprimiert sein und eine sukzessive Reduktion in den anderen beiden Populationen aufweisen. Zudem ist eine weitere immunzytometrische Charakterisierung der Zellpopulation mit dem größten leukämogenen Potential geplant, um die leukämischen Stammzellen noch enger eingrenzen zu können. Dabei dienen die gewonnenen Zelllinien dazu, die Population mit dem größten leukämogenen Potential (B⁺MG⁻) mittels weiterer immunzytometrischer Färbung und anschließender Sortierung noch stärker auf das leukämogene Potential einzuschränken.

Ein Schlüsselexperiment zum Nachweis einer potentiellen, durch die ektopische Expression von Lef-1 hervorgerufenen Transdifferenzierung wäre die retrovirale Expression von Lef-1 in frühen lymphatischen Vorläuferzellen (CLPs, siehe 1.1.2) mit einem anschließenden Nachweis der Generierung myeloischer Zellen. Dies ist jedoch experimentell äußerst schwierig, da das Sortieren und Transduzieren der CLPs bisher nur in wenigen Labors erfolgreich durchgeführt wurde. Alternativ wäre die Transduktion verschiedener Vorläuferzellen der B-Lymphopoese denkbar.

In einer letzten Fragestellung soll das in dieser Arbeit generierte Modell auf Wnt-unabhängige Funktionen dieses Transkriptionsfaktors untersucht werden. So wurde vor kurzem berichtet, dass ein hoher Anteil an Patienten mit akuter myeloischer Leukämie eine unterschiedlich starke Expression an Lef-1 und β -catenin aufweisen (Simon, 2005). In dieser Publikation ist jedoch auffällig, dass die Expression dieser beiden Gene nicht

miteinander korreliert und daher eventuell unabhängig voneinander in akuten myeloischen Leukämien auftritt, was allerdings nicht diskutiert wird. Hier ist anvisiert, die in diesem Modell generierten Zelllinien mit verschiedenen Wnt-Inhibitoren zu behandeln und auf potentielle Wnt-unabhängige Funktionen zu überprüfen.

6 Zusammenfassung

Lef-1 ist ein bedeutender Transkriptionsfaktor der Wnt / β -catenin Signaltransduktionskaskade und essentiell für eine geregelte Differenzierung von B- und T-Zellen. In letzter Zeit wurde eine aberrante Expression dieses Transkriptionsfaktors mit einer Vielzahl an hämatopoetischen Erkrankungen in Verbindung gebracht. Es gibt jedoch bisher nur wenige Erkenntnisse über die Rolle dieses Transkriptionsfaktors in der myeloischen und malignen Hämatopoese.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Lef-1 sowohl in lymphatischen als auch in myeloischen Subpopulationen murinen Knochenmarks exprimiert wird, weiterhin ebenso in hochrein sortierten frühen hämatopoetischen Vorläuferzellen. Es wurde nachfolgend in dieser Arbeit ein murines Knochenmarktransplantationsmodell generiert, welches mittels induzierter retroviraler Expression von Lef-1 in murinem Knochenmark und subsequenter Injektion in Rezipiententiere dessen Funktionen in der hämatopoetischen Entwicklung detailliert untersuchen konnte. So zeigte sich, dass sowohl die Expression von Wildtyp-Lef-1 als auch einer konstitutiv aktiven Mutante die Frequenz kurzzeitrepopulierender Stammzellen *in vitro* signifikant steigern konnte. In transplantierten Mäusen beider verwendeter Konstrukte war die normale hämatopoetische Entwicklung schwerwiegend gestört und hatte eine Inversion der lympho-myeloischen Ratio zur Folge. So kam es zu einer Verringerung von B-Zellen und zu einer nahezu vollständigen Eradikation von T-Zellen bei zeitgleicher Akkumulation myeloischer Zellen. Transplantierte Tiere erkrankten nach einer Latenzzeit von 11 Monaten an einem myeloproliferativen Syndrom sowie an akuten myeloischen und lymphatischen Leukämien. Eine genauere Charakterisierung der hervorgerufenen Erkrankungen zeigte eine stets nachweisbare biphänotypische Zellpopulation ($B220^+Mac1^+$) innerhalb der leukämischen Blastenpopulation sowie eine variierende Zahl an $B220^+Mac1^-$ Zellen. Eine tiefere Analyse erbrachte den Beweis, dass *ex vivo* und *in vivo* sowohl diese biphänotypischen als auch $B220^-Mac1^+$ Zellen, aus DJ_H -rearrangierten $B220^+Mac1^-$ Zellen hervorgingen. Die Frequenz der Leukämie-induzierenden Zellen *in vivo* war dabei ebenfalls in der $B220^+Mac1^-$ Subpopulation am höchsten.

Die Expressionsanalyse spezifischer in der Hämatopoese beteiligter Transkriptionsfaktoren bestätigte hingegen ebenfalls eine Expression der myelospezifischen Faktoren *C/ebpa* und *c-fms* und eröffnet so die Möglichkeit einer durch Lef-1 induzierten Verlagerung des hämatopoetischen Gleichgewichts in das myeloische Kompartiment durch eine induzierte Expression myelospezifischer Faktoren in

lymphatischen oder noch undeterminierten hämatopoetischen Vorläuferzellen.

Zusammenfassend belegen diese Ergebnisse, dass eine ausgewogene Expression von Lef-1 essentiell in der hämatologischen Differenzierung ist und dass die Dysregulation dieses Transkriptionsfaktors die Entwicklung hämatologischer Erkrankungen fördert. Ferner liefert dieses Modell Hinweise, dass myeloische Erkrankungen aus malignen Zellen mit lymphatischen Charakteristika hervorgerufen werden könnten, was die Anwendung gängiger therapeutischer Strategien in Subgruppen myeloischen Leukämien hinterfragen und neue Möglichkeiten für eine erfolgreiche Behandlung eröffnen könnte.

7 Abstract

Lef-1 is a key transcription factor of the Wnt / β -catenin signalling pathway and is crucially linked to normal B- and T-cell development. Recently its aberrant expression has been associated with different types of leukemia. However, there are few data about the potential role of this transcription factor in myeloid and malignant hematopoiesis.

Analysis of Lef-1 expression showed expression in both lymphoid and myeloid subpopulations, but also in highly purified early haematopoietic progenitor cells. Consecutively, a murine bone marrow transplantation model was generated to analyse functions of Lef-1 specific to the hematopoietic compartment by retroviral transduced murine bone marrow cells injected into lethally irradiated recipients. It could be shown firstly, that *in vitro* both wild type Lef-1 and a constitutive active mutant of Lef-1 increased the frequency of short term repopulation stem cells. *In vivo*, normal haematopoietic development was severely perturbed in transplanted mice and induced an inversion of the lymphoid-myeloid ratio. Engrafted animals showed a major reduction of B-cells and a virtual depletion of T-cells with a simultaneous increase of myeloid cells. After a median latency of 11 month, transplanted mice developed hematological diseases including myeloproliferation as well as both lymphoid and myeloid leukemias. A more precise characterization of the arisen diseases showed a readily detectable biphenotypic cell population (B220⁺Mac1⁺) in all cases as well as a varying number of B220⁺Mac1⁻ cells. Further analysis proved the ability of this DJ_H-rearranged B220⁺Mac1⁻ population to give rise to both B220⁺Mac1⁺ and B220⁻Mac1⁺ cells *ex vivo* and *in vivo*. Moreover, *in vivo* the frequency of leukemia-initiating cells was highest in the B220⁺Mac1⁻ population.

Expression analysis of transcription factors known to be crucial for hematopoietic development surprisingly showed expression of genes specific for myeloid differentiation like C/ebp α and c-fms suggesting the possibility for a Lef-1 induced shift towards the myeloid lineage through induced expression of myeloid specific genes in lymphoid or non-determined hematopoietic progenitors / stem cells.

Taken together, these findings indicate that balanced expression of Lef-1 plays a key role in haematopoietic differentiation and that deregulation of this transcription factor favours the development of hematological malignancies. In addition this model suggests that myeloid malignancies could be initiated by malignant cells with lymphoid characteristics, possibly challenging the application of standard therapies in subgroups of myeloid leukemias and opening new possibilities for effective treatment.

8 Literaturverzeichnis

- Adams GB, Chabner KT, Alley IR, Olson DP, Szczepiorkowski ZM, Poznansky MC, Kos CH, Pollak MR, Brown EM, Scadden DT, 2006: Stem cell engraftment at the endosteal niche is specified by the calcium-sensing receptor. **Nature** 439: 599-603
- Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF, 2003: Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. **Proc Natl Acad Sci U S A** 100: 3983-8
- Austin TW, Solar GP, Ziegler FC, Liem L, Matthews W, 1997: A role for the Wnt gene family in hematopoiesis: expansion of multilineage progenitor cells. **Blood** 89: 3624-35
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C, 1985: Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. **Ann Intern Med** 103: 620-5
- Bienz M, 1998: TCF: transcriptional activator or repressor? **Curr Opin Cell Biol** 10: 366-72
- Birnboim HC, Doly J, 1979: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Res** 7: 1513-23
- Blair A, Hogge DE, Ailles LE, Lansdorp PM, Sutherland HJ, 1997: Lack of expression of Thy-1 (CD90) on acute myeloid leukemia cells with long-term proliferative ability *in vitro* and *in vivo*. **Blood** 89: 3104-12
- Bonnet D, Dick JE, 1997: Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. **Nat Med** 3: 730-7
- Boxer RB, Jang JW, Sintasath L, Chodosh LA, 2004: Lack of sustained regression of c-MYC-induced mammary adenocarcinomas following brief or prolonged MYC inactivation. **Cancer Cell** 6: 577-86
- Bradford MM, 1976: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem** 72: 248-54
- Brunning RD, 2003: Classification of acute leukemias. **Semin Diagn Pathol** 20: 142-53
- Buske C, Glimm H, Feuring-Buske M, 2006: [Stem cell therapy: biology of hematopoietic stem cells.]. **Internist (Berl)** 47: 459-66
- Cheng T, Rodrigues N, Shen H, Yang Y, Dombkowski D, Sykes M, Scadden DT, 2000: Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21cip1/waf1. **Science** 287: 1804-8
- Chung EJ, Hwang SG, Nguyen P, Lee S, Kim JS, Kim JW, Henkart PA, Bottaro DP, Soon L, Bonvini P, Lee SJ, Karp JE, Oh HJ, Rubin JS, Trepel JB, 2002: Regulation of leukemic cell adhesion, proliferation, and survival by β -catenin. **Blood** 100: 982-90

- Cobas M, Wilson A, Ernst B, Mancini SJ, MacDonald HR, Kemler R, Radtke F, 2004: β -catenin is dispensable for hematopoiesis and lymphopoiesis. **J Exp Med** 199: 221-9
- Cozzio A, Passegue E, Ayton PM, Karsunky H, Cleary ML, Weissman IL, 2003: Similar MLL-associated leukemias arising from self-renewing stem cells and short-lived myeloid progenitors. **Genes Dev** 17: 3029-35
- Dash A, Gilliland DG, 2001: Molecular genetics of acute myeloid leukaemia. **Best Pract Res Clin Haematol** 14: 49-64
- de Guzman CG, Warren AJ, Zhang Z, Gartland L, Erickson P, Drabkin H, Hiebert SW, Klug CA, 2002: Hematopoietic stem cell expansion and distinct myeloid developmental abnormalities in a murine model of the AML1-ETO translocation. **Mol Cell Biol** 22: 5506-17
- DeKoter RP, Singh H, 2000: Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU.1. **Science** 288: 1439-41
- Derksen PW, Tjin E, Meijer HP, Klok MD, MacGillavry HD, van Oers MH, Lokhorst HM, Bloem AC, Clevers H, Nusse R, van der Neut R, Spaargaren M, Pals ST, 2004: Illegitimate WNT signaling promotes proliferation of multiple myeloma cells. **Proc Natl Acad Sci U S A** 101: 6122-7
- Deshpande AJ, Cusan M, Rawat VP, Reuter H, Krause A, Pott C, Quintanilla-Martinez L, Kakadia P, Kuchenbauer F, Ahmed F, Delabesse E, Hahn M, Lichter P, Kneba M, Hiddemann W, Macintyre E, Mecucci C, Ludwig WD, Humphries RK, Bohlander SK, Feuring-Buske M, Buske C, 2006: Acute myeloid leukemia is propagated by a leukemic stem cell with lymphoid characteristics in a mouse model of CALM/AF10-positive leukemia. **Cancer Cell** 10: 363-74
- Dick JE, 2003: Stem cells: Self-renewal writ in blood. **Nature** 423: 231-3
- Dorfman DM, Greisman HA, Shahsafaei A, 2003: Loss of expression of the WNT/ β -catenin-signaling pathway transcription factors lymphoid enhancer factor-1 (LEF-1) and T cell factor-1 (TCF-1) in a subset of peripheral T cell lymphomas. **Am J Pathol** 162: 1539-44
- Duncan AW, Rattis FM, DiMascio LN, Congdon KL, Pazianos G, Zhao C, Yoon K, Cook JM, Willert K, Gaiano N, Reya T, 2005: Integration of Notch and Wnt signaling in hematopoietic stem cell maintenance. **Nat Immunol** 6: 314-22
- Follows GA, Tagoh H, Richards SJ, Melnik S, Dickinson H, de Wynter E, Lefevre P, Morgan GJ, Bonifer C, 2005: c-FMS chromatin structure and expression in normal and leukaemic myelopoiesis. **Oncogene** 24: 3643-51
- Fukuchi Y, Shibata F, Ito M, Goto-Koshino Y, Sotomaru Y, Ito M, Kitamura T, Nakajima H, 2006: Comprehensive analysis of myeloid lineage conversion using mice expression an inducible form of C/EBP α . **Embo J** 25: 3398-410
- Giese K, Amsterdam A, Grosschedl R, 1991: DNA-binding properties of the HMG domain of the lymphoid-specific transcriptional regulator LEF-1. **Genes Dev** 5: 2567-78

- Giese K, Cox J, Grosschedl R, 1992: The HMG domain of lymphoid enhancer factor 1 bends DNA and facilitates assembly of functional nucleoprotein structures. **Cell** 69: 185-95
- Giese K, Grosschedl R, 1993: LEF-1 contains an activation domain that stimulates transcription only in a specific context of factor-binding sites. **Embo J** 12: 4667-76
- Grisolano JL, Wesselschmidt RL, Pelicci PG, Ley TJ, 1997: Altered myeloid development and acute leukemia in transgenic mice expressing PML-RAR alpha under control of cathepsin G regulatory sequences. **Blood** 89: 376-87
- Hanahan D, Weinberg RA, 2000: The hallmarks of cancer. **Cell** 100: 57-70
- Hardy RR, Carmack CE, Shinton SA, Kemp JD, Hayakawa K, 1991: Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow. **J Exp Med** 173: 1213-25
- Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD, 1999: 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. **J Clin Oncol** 17: 3835-49
- He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW, 1998: Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. **Science** 281: 1509-12
- He X, 2003: A Wnt-Wnt situation. **Dev Cell** 4: 791-7
- Heavey B, Charalambous C, Cobaleda C, Busslinger M, 2003: Myeloid lineage switch of Pax5 mutant but not wild-type B cell progenitors by C/EBPalpha and GATA factors. **Embo J** 22: 3887-97
- Held W, Clevers H, Grosschedl R, 2003: Redundant functions of TCF-1 and LEF-1 during T and NK cell development, but unique role of TCF-1 for Ly49 NK cell receptor acquisition. **Eur J Immunol** 33: 1393-8
- Hsu CL, King-Fleischman AG, Lai AY, Matsumoto Y, Weissman IL, Kondo M, 2006: Antagonistic effect of CCAAT enhancer-binding protein-alpha and Pax5 in myeloid or lymphoid lineage choice in common lymphoid progenitors. **Proc Natl Acad Sci U S A** 103: 672-7
- Huntly BJ, Gilliland DG, 2005a: Leukaemia stem cells and the evolution of cancer-stem-cell research. **Nat Rev Cancer** 5: 311-21
- Huntly BJ, Gilliland DG, 2005b: Cancer biology: summing up cancer stem cells. **Nature** 435: 1169-70
- Huntly BJ, Shigematsu H, Deguchi K, Lee BH, Mizuno S, Duclos N, Rowan R, Amaral S, Curley D, Williams IR, Akashi K, Gilliland DG, 2004: MOZ-TIF2, but not BCR-ABL, confers properties of leukemic stem cells to committed murine hematopoietic progenitors. **Cancer Cell** 6: 587-96

- Iwasaki-Arai J, Iwasaki H, Miyamoto T, Watanabe S, Akashi K, 2003: Enforced granulocyte/macrophage colony-stimulating factor signals do not support lymphopoiesis, but instruct lymphoid to myelomonocytic lineage conversion. **J Exp Med** 197: 1311-22
- Jamieson CH, Ailles LE, Dylla SJ, Muijtjens M, Jones C, Zehnder JL, Gotlib J, Li K, Manz MG, Keating A, Sawyers CL, Weissman IL, 2004: Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. **N Engl J Med** 351: 657-67
- Jin ZX, Kishi H, Wei XC, Matsuda T, Saito S, Muraguchi A, 2002: Lymphoid enhancer-binding factor-1 binds and activates the recombination-activating gene-2 promoter together with c-Myb and Pax-5 in immature B cells. **J Immunol** 169: 3783-92
- Kelly LM, Kutok JL, Williams IR, Boulton CL, Amaral SM, Curley DP, Ley TJ, Gilliland DG, 2002a: PML/RARalpha and FLT3-ITD induce an APL-like disease in a mouse model. **Proc Natl Acad Sci U S A** 99: 8283-8
- Kelly LM, Liu Q, Kutok JL, Williams IR, Boulton CL, Gilliland DG, 2002b: FLT3 internal tandem duplication mutations associated with human acute myeloid leukemias induce myeloproliferative disease in a murine bone marrow transplant model. **Blood** 99: 310-8
- King AG, Kondo M, Scherer DC, Weissman IL, 2002: Lineage infidelity in myeloid cells with TCR gene rearrangement: a latent developmental potential of proT cells revealed by ectopic cytokine receptor signaling. **Proc Natl Acad Sci U S A** 99: 4508-13
- Kirstetter P, Anderson K, Porse BT, Jacobsen SE, Nerlov C, 2006: Activation of the canonical Wnt pathway leads to loss of hematopoietic stem cell repopulation and multilineage differentiation block. **Nat Immunol** 7: 1048-56
- Kitajima K, Tanaka M, Zheng J, Yen H, Sato A, Sugiyama D, Umehara H, Sakai E, Nakano T, 2006: Redirecting differentiation of hematopoietic progenitors by a transcription factor, GATA-2. **Blood** 107: 1857-63
- Kondo M, Scherer DC, Miyamoto T, King AG, Akashi K, Sugamura K, Weissman IL, 2000: Cell-fate conversion of lymphoid-committed progenitors by instructive actions of cytokines. **Nature** 407: 383-6
- Koschmieder S, Rosenbauer F, Steidl U, Owens BM, Tenen DG, 2005: Role of transcription factors C/EBPalpha and PU.1 in normal hematopoiesis and leukemia. **Int J Hematol** 81: 368-77
- Krivtsov AV, Twomey D, Feng Z, Stubbs MC, Wang Y, Faber J, Levine JE, Wang J, Hahn WC, Gilliland DG, Golub TR, Armstrong SA, 2006: Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. **Nature** 442: 818-22
- Kuehl M, Sheldahl LC, Park M, Miller JR, Moon RT. 2000: The Wnt/Ca²⁺ pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends Genet* 7: 279-83
- Kyhse-Andersen J, 1984: Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. **J Biochem Biophys Methods** 10: 203-9

- Laemmli UK, 1970: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 227: 680-5
- Li FQ, Person RE, Takemaru K, Williams K, Meade-White K, Ozsahin AH, Gungor T, Moon RT, Horwitz M, 2004: Lymphoid enhancer factor-1 links two hereditary leukemia syndromes through core-binding factor alpha regulation of ELA2. **J Biol Chem** 279: 2873-84
- Li YS, Wasserman R, Hayakawa K, Hardy RR, 1996: Identification of the earliest B lineage stage in mouse bone marrow. **Immunity** 5: 527-35
- Liang H, Chen Q, Coles AH, Anderson SJ, Pihan G, Bradley A, Gerstein R, Jurecic R, Jones SN, 2003: Wnt5a inhibits B cell proliferation and functions as a tumor suppressor in hematopoietic tissue. **Cancer Cell** 4: 349-60
- Lu D, Zhao Y, Tawatao R, Cottam HB, Sen M, Leoni LM, Kipps TJ, Corr M, Carson DA, 2004: Activation of the Wnt signaling pathway in chronic lymphocytic leukemia. **Proc Natl Acad Sci U S A** 101: 3118-23
- Matutes E, Morilla R, Farahat N, Carbonell F, Swansbury J, Dyer M, Catovsky D, 1997: Definition of acute biphenotypic leukemia. **Haematologica** 82: 64-66
- Mazieres J, You L, He B, Xu Z, Lee AY, Mikami I, McCormick F, Jablons DM, 2005: Inhibition of Wnt16 in human acute lymphoblastoid leukemia cells containing the t(1;19) translocation induces apoptosis. **Oncogene** 24: 5396-400
- McBlane JF, van Gent DC, Ramsden DA, Romeo C, Cuomo CA, Gellert M, Oettinger MA, 1995: Cleavage at a V(D)J recombination signal requires only RAG1 and RAG2 proteins and occurs in two steps. **Cell** 83: 387-95
- McCulloch EA, 1987: Lineage infidelity or lineage promiscuity? **Leukemia** 1: 235
- McCulloch EA, Howatson AF, Buick RN, Minden MD, Izaguirre CA, 1979: Acute myeloblastic leukemia considered as a clonal hemopathy. **Blood Cells** 5: 261-82
- McWhirter JR, Neuteboom ST, Wancewicz EV, Monia BP, Downing JR, Murre C, 1999: Oncogenic homeodomain transcription factor E2A-Pbx1 activates a novel WNT gene in pre-B acute lymphoblastoid leukemia. **Proc Natl Acad Sci U S A** 96: 11464-9
- Mikkola I, Heavey B, Horcher M, Busslinger M, 2002: Reversion of B cell commitment upon loss of Pax5 expression. **Science** 297: 110-3
- Miyamoto T, Iwasaki H, Reizis B, Ye M, Graf T, Weissman IL, Akashi K, 2002: Myeloid or lymphoid promiscuity as a critical step in hematopoietic lineage commitment. **Dev Cell** 3: 137-47
- Miyamoto T, Weissman IL, 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: 7521-6

- Muller-Tidow C, Steffen B, Cauvet T, Tickenbrock L, Ji P, Diederichs S, Sargin B, Kohler G, Stelljes M, Puccetti E, Ruthardt M, deVos S, Hiebert SW, Koeffler HP, Berdel WE, Serve H, 2004: Translocation products in acute myeloid leukemia activate the Wnt signaling pathway in hematopoietic cells. **Mol Cell Biol** 24: 2890-904
- Murdoch B, Chadwick K, Martin M, Shojaei F, Shah KV, Gallacher L, Moon RT, Bhatia M, 2003: Wnt-5A augments repopulating capacity and primitive hematopoietic development of human blood stem cells *in vivo*. **Proc Natl Acad Sci U S A** 100: 3422-7
- Nawshad A, Hay ED, 2003: TGF β 3 signaling activates transcription of the LEF1 gene to induce epithelial mesenchymal transformation during mouse palate development. **J Cell Biol** 163: 1291-301
- Nilsson SK, Johnston HM, Coverdale JA, 2001: Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cell niches. **Blood** 97: 2293-9
- Nusse R, 2005: Cell biology: relays at the membrane. **Nature** 438: 747-9
- Nutt SL, Heavey B, Rolink AG, Busslinger M, 1999: Commitment to the B - lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. **Nature** 401: 556-62
- O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE, 2007: A human colon cancer cell capable of initiating growth in immunodeficient mice. **Nature** 445: 106-10
- Oettinger MA, Schatz DG, Gorka C, Baltimore D, 1990: RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. **Science** 248: 1517-23
- Okamura RM, Sigvardsson M, Galceran J, Verbeek S, Clevers H, Grosschedl R, 1998: Redundant regulation of T cell differentiation and TCR α gene expression by the transcription factors LEF-1 and TCF-1. **Immunity** 8: 11-20
- Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H, 1996: Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. **Science** 273: 242-5
- Passegue E, 2006: Cancer biology: A game of subversion. **Nature**: 1-2
- Passegue E, Jamieson CH, Ailles LE, Weissman IL, 2003: Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? **Proc Natl Acad Sci U S A** 100 Suppl 1: 11842-9
- Pongracz J, Hare K, Harman B, Anderson G, Jenkinson EJ, 2003: Thymic epithelial cells provide WNT signals to developing thymocytes. **Eur J Immunol** 33: 1949-56
- Porfiri E, Rubinfeld B, Albert I, Hovanes K, Waterman M, Polakis P, 1997: Induction of a β -catenin-LEF-1 complex by wnt-1 and transforming mutants of β -catenin. **Oncogene** 15: 2833-9
- Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P, Weissman IL, Clarke MF, Ailles LE, 2007: Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. **Proc Natl Acad Sci U S A** 104: 973-8

- Randall TD, Weissman IL, 1997: Phenotypic and functional changes induced at the clonal level in hematopoietic stem cells after 5-fluorouracil treatment. **Blood** 89: 3596-606
- Ranheim EA, Kwan HC, Reya T, Wang YK, Weissman IL, Francke U, 2005: Frizzled 9 knock-out mice have abnormal B-cell development. **Blood** 105: 2487-94
- Rattis FM, Voermans C, Reya T, 2004: Wnt signaling in the stem cell niche. **Curr Opin Hematol** 11: 88-94
- Rawat VP, Cusan M, Deshpande A, Hiddemann W, Quintanilla-Martinez L, Humphries RK, Bohlander SK, Feuring-Buske M, 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: 817-22
- Reya T, Clevers H, 2005: Wnt signalling in stem cells and cancer. **Nature** 434: 843-50
- Reya T, Duncan AW, Ailles L, Domen J, Scherer DC, Willert K, Hintz L, Nusse R, Weissman IL, 2003: A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. **Nature** 423: 409-14
- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL, 2001: Stem cells, cancer, and cancer stem cells. **Nature** 414: 105-11
- Reya T, O'Riordan M, Okamura R, Devaney E, Willert K, Nusse R, Grosschedl R, 2000: Wnt signaling regulates B lymphocyte proliferation through a LEF-1 dependent mechanism. **Immunity** 13: 15-24
- Roessler S, Grosschedl R, 2006: Role of transcription factors in commitment and differentiation of early B lymphoid cells. **Semin Immunol** 18: 12-9
- Rolink AG, Schaniel C, Busslinger M, Nutt SL, Melchers F, 2000: Fidelity and infidelity in commitment to B-lymphocyte lineage development. **Immunol Rev** 175: 104-11
- Rosenbauer F, Tenen DG, 2007: Transcription factors in myeloid development: balancing differentiation with transformation. **Nat Rev Immunol** 7: 105-17
- Rosenbauer F, Owens BM, Yu L, Tumang JR, Steidl U, Kutok JL, Clayton LK, Wagner K, Scheller M, Iwasaki H, Liu C, Hackanson B, Akashi K, Leutz A, Rothstein TL, Plass C, Tenen DG, 2006: Lymphoid cell growth and transformation are suppressed by a key regulatory element of the gene encoding PU.1. **Nat Genet** 38: 27-37
- Rosenbauer F, Wagner K, Kutok JL, Iwasaki H, Le Beau MM, Okuno Y, Akashi K, Fiering S, Tenen DG, 2004: Acute myeloid leukemia induced by graded reduction of a lineage-specific transcription factor, PU.1. **Nat Genet** 36: 624-30
- Ross DA, Kadesch T, 2001: The notch intracellular domain can function as a coactivator for LEF-1. **Mol Cell Biol** 21: 7537-44
- Sauvageau G, Thorsteinsdottir U, Hough MR, Hugo P, Lawrence HJ, Largman C, Humphries RK, 1997: Overexpression of HOXB3 in hematopoietic cells causes defective lymphoid development and progressive myeloproliferation. **Immunity** 6: 13-22
- Scadden DT, 2006: The stem-cell niche as an entity of action. **Nature** 441: 1075-9

- Scheller M, Huelsken J, Rosenbauer F, Taketo MM, Birchmeier W, Tenen DG, Leutz A, 2006: Hematopoietic stem cell and multilineage defects generated by constitutive β -catenin activation. **Nat Immunol** 7: 1037-47
- Schessl C, Rawat VP, Cusan M, Deshpande A, Kohl TM, Rosten PM, Spiekermann K, Humphries RK, Schnittger S, Kern W, Hiddemann W, Quintanilla-Martinez L, Bohlander SK, Feuring-Buske M, Buske C, 2005: The AML1-ETO fusion gene and the FLT3 length mutation collaborate in inducing acute leukemia in mice. **J Clin Invest** 115: 2159-68
- Schilham MW, Wilson A, Moerer P, Benaissa-Trouw BJ, Cumano A, Clevers HC, 1998: Critical involvement of Tcf-1 in expansion of thymocytes. **J Immunol** 161: 3984-91
- Simon M, Grandage VL, Linch DC, Khwaja A, 2005: Constitutive activation of the Wnt/ β -catenin signalling pathway in acute myeloid leukaemia. **Oncogene** 24: 2410-20
- Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB, 2003: Identification of a cancer stem cell in human brain tumours. **Cancer Res** 63: 5821-8
- Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB, 2004: Identification of human brain tumour initiating cells. **Nature** 432: 396-401
- Skokowa J, Cario G, Uenalan M, Schambach A, Germeshausen M, Battmer K, Zeidler C, Lehmann U, Eder M, Baum C, Grosschedl R, Stanulla M, Scherr M, Welte K, 2006: LEF-1 is crucial for neutrophil granulocytopenia and its expression is severely reduced in congenital neutropenia. **Nat Med** 12: 1191-7
- Smith A, 2006: A glossary for stem-cell biology. **Nature** 441: 1060
- Smith LJ, Curtis JE, Messner HA, Senn JS, Furthmayr H, McCulloch EA, 1983: Lineage infidelity in acute leukemia. **Blood** 61: 1138-45
- Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL, 1988: Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. **Science** 241: 58-62
- Staal FJ, Clevers HC, 2005: WNT signalling and haematopoiesis: a WNT-WNT situation. **Nat Rev Immunol** 5: 21-30
- Staal FJ, Meeldijk J, Moerer P, Jay P, van de Weerd BC, Vainio S, Nolan GP, Clevers H, 2001: Wnt signaling is required for thymocyte development and activates Tcf-1 mediated transcription. **Eur J Immunol** 31: 285-93
- Staal FJ, Clevers H, 2000: Tcf/Lef transcription factors during T-cell development: unique and overlapping functions. **Hematol J** 1: 3-6
- Stirewalt DL, 2004: Fine-tuning PU.1. **Nat Genet** 36: 550-1
- Sulak LE, Clare CN, Morale BA, Hansen KL, Montiel MM, 1990: Biphenotypic acute leukemia in adults. **Am J Clin Pathol** 94: 54-8

- Tagoh H, Schebesta A, Lefevre P, Wilson N, Hume D, Busslinger M, Bonifer C, 2004: Epigenetic silencing of the c-fms locus during B-lymphopoiesis occurs in discrete steps and is reversible. **Embo J** 23: 4275-85
- Tagoh H, Ingram R, Wilson N, Salvagiotto G, Warren AJ, Clarke D, Busslinger M, Bonifer C, 2006: The mechanism of repression of the myeloid-specific c-fms gene by Pax5 during B lineage restriction. **Embo J** 25: 1070-80
- Tiacci E, Pileri S, Orleth A, Pacini R, Tabarrini A, Frenguelli F, Liso A, Diverio D, Lo-Coco F, 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: 7399-404
- Tian E, Zhan F, Walker R, Rasmussen E, Ma Y, Barlogie B, Shaughnessy JD, Jr., 2003: The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. **N Engl J Med** 349: 2483-94
- Tickenbrock L, Schwable J, Wiedehage M, Steffen B, Sargin B, Choudhary C, Brandts C, Berdel WE, Muller-Tidow C, Serve H, 2005: Flt3 tandem duplication mutations cooperate with Wnt signaling in leukemic signal transduction. **Blood** 105: 3699-706
- Till JE, Mc CE, 1961: A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. **Radiat Res** 14: 213-22
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J, 1979: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc Natl Acad Sci U S A** 76: 4350-4
- Travis A, Amsterdam A, Belanger C, Grosschedl R, 1991: LEF-1, a gene encoding a lymphoid-specific protein with an HMG domain, regulates T-cell receptor alpha enhancer function [corrected]. **Genes Dev** 5: 880-94
- Van Den Berg DJ, Sharma AK, Bruno E, Hoffman R, 1998: Role of members of the Wnt gene family in human hematopoiesis. **Blood** 92: 3189-202
- van Genderen C, Okamura RM, Farinas I, Quo RG, Parslow TG, Bruhn L, Grosschedl R, 1994: Development of several organs that require inductive epithelial-mesenchymal interactions is impaired in LEF-1-deficient mice. **Genes Dev** 8: 2691-703
- van Gent DC, Hiom K, Paull TT, Gellert M, 1997: Stimulation of V(D)J cleavage by high mobility group proteins. **Embo J** 16: 2665-70
- Verbeek S, Izon D, Hofhuis F, Robanus-Maandag E, te Riele H, van de Wetering M, Oosterwegel M, Wilson A, MacDonald HR, Clevers H, 1995: An HMG-box-containing T-cell factor required for thymocyte differentiation. **Nature** 374: 70-4
- Warner JK, Wang JC, Hope KJ, Jin L, Dick JE, 2004: Concepts of human leukemic development. **Oncogene** 23: 7164-77
- Waterman ML, 2004: Lymphoid enhancer factor/T cell factor expression in colorectal cancer. **Cancer Metastasis Rev** 23: 41-52

- Waterman ML, Fischer WH, Jones KA, 1991: A thymus-specific member of the HMG protein family regulates the human T cell receptor C alpha enhancer. **Genes Dev** 5: 656-69
- Weissman IL, 2000: Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. **Cell** 100: 157-68
- Xie H, Ye M, Feng R, Graf T, 2004: Stepwise reprogramming of B cells into macrophages. **Cell** 117: 663-76
- Xu Y, Banerjee D, Huelsken J, Birchmeier W, Sen JM, 2003: Deletion of β -catenin impairs T cell development. **Nat Immunol** 4: 1177-82
- Zheng X, Beissert T, Kukoc-Zivojnov N, Puccetti E, Altschmied J, Stolz C, Boehrer S, Gul H, Schneider O, Ottmann OG, Hoelzer D, Henschler R, Ruthardt M, 2004: Gamma-catenin contributes to leukemogenesis induced by AML-associated translocation products by increasing the self-renewal of very primitive progenitor cells. **Blood** 103: 3535-43
- Zhou P, Byrne C, Jacobs J, Fuchs E, 1995: Lymphoid enhancer factor 1 directs hair follicle patterning and epithelial cell fate. **Genes Dev** 9: 700-13

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Dr. Habil. Christian Buske möchte ich herzlich für die Möglichkeit danken, in die spannende Welt der Hämatopoese einzutauchen. Mein Dank gilt vor allem für seine aktive Betreuung dieser Arbeit, insbesondere für die stete Diskussionsbereitschaft, seinen wissenschaftlichen Rat und die Vorkorrektur dieser Arbeit. Ebenfalls danken möchte ich Frau Dr. Habil. Michaela Feuring-Buske für die Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dirk Eick für die trotz spontaner Notwendigkeit äußerst unkomplizierte und bereitwillige Übernahme der offiziellen Betreuung sowie für eine äußerst rasche Korrektur.

Ich möchte mich auch bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Hiddemann für seine Unterstützung sowie für anregende Gespräche über Forschung, Medizin, Karriere und die diffizile Frage der Verknüpfung dieser Komponenten herzlich bedanken.

Für die histopathologischen Untersuchungen bedanke ich mich bei Frau Dr. Habil. Letitia Quintanilla-Martinez und bei Herrn Prof. Dr. Rudolf Großschedl für die Konstrukte sowie der Möglichkeit, diese Dissertation an der Fakultät der Biologie zu beginnen.

Den Mitarbeitern des Tierstalls danke ich für eine herausragende Betreuung der Mäuse und eine höchst sympathische Art der Zusammenarbeit in jeglicher Situation.

Der Mensch ist ein Herdentier und trotz des hartnäckigen Gerüchts, der Forscher an sich sei ein zurückgezogener Eremit, wäre diese Arbeit unter keinen Umständen so durchzuführen gewesen, wenn nicht eine Gruppe gewesen wäre, in die sich einzuleben kaum einfacher sein hätte können. Aniruddha Deshpande möchte ich als Mensch danken (stay gold!), und für sein häufig nahes Kratzen an der 4. Dimension des wissenschaftlichen Denkens. Natalia Arseni ist der helle Stern im Labor und trotz der Weltmeisterschaft und sonstigen emotionalen Streitgesprächen immer ein Sympathieträger (non è vero?). Farid Ahmed ist der Ruhepol der Gruppe und daher war das Sortieren von ruhenden HSCs stets ein Highlight. Vijay Pal Singh Rawat danke ich dafür, dass er Forschung lebt und stets in der Lage ist, die neuesten Veröffentlichungen zu rezensieren. Seiner Frau Reetu für Einblicke in die göttlichen Gerichte der indischen Küche. Tina Schessl danke ich für Clooney und allen namhaften Mäusen im Tierstall, sie zeigt, dass Wissenschaft und Sozialleben möglich ist und verkörpert die Losung 'Grün ist die Hoffnung'. Hier wäre auch

Monica Cusan zu erwähnen, ohne Sie hätten Energy-Drinks einen Umsatzeinbruch, die Forschung aber auch. Bianka Ksienzyk möchte ich vor allem für eine Eselsgeduld bei der Zellsortierung danken, Vegi Mahalakshmi Naidu und Pawandeep Kaur für Ihre Bereicherung zur Grundlagenforschung indischer Heterogenität, Silvia Thöne für essentielle Duplos, Hendrik Reuter für aufbauende Gespräche unter ins Alter gekommene Doktoranden, sowie Christiane Stadler und Nicole Behm dafür, dass mein Musikgeschmack nicht stets im Abseits stand. Nicht vergessen werden sollen hier die 'Spiekermänner', Carola Reindl, Tobias Kohl und Shridar Vempati, sie sind immer für amüsante (Gespräche über) Sozialstudien zu haben gewesen.

Des Weiteren möchte ich meinen Freunden außerhalb der Laborwelt dafür danken, dass Sie in den vergangenen Jahren immer da waren, wenn es notwendig schien und sich so gut wie nie über doch häufig fehlende Präsenz beschwerten.

Man sieht nur mit dem Herzen gut, daher möchte ich Steffi für wunderschöne Aussichten danken, die mir so manchen Tag im Labor erträglich gemacht haben, viele Tage außerhalb des Labors mit Sonnenschein bescherte, sowie für eine viel zu oft notwendige Geduld mit einem verwirrten Wissenschaftler.

Ein ganz besonderes Dankeswort gilt meiner Familie. Meinen Geschwistern, Fania und Andreas für..., Ihr wisst es! Und meinen Eltern, Brigitte und Ilias, für all das, was Ihr seid. Diese Arbeit wäre nicht ohne Eure stete Unterstützung in den vergangenen Jahren möglich gewesen, danke!

10 Curriculum Vitae

| | |
|----------------------------|------------------------|
| Name | Konstantin Petropoulos |
| Geburtsdatum | 14. Juli 1974 |
| Geburtsort | München |
| Staatsangehörigkeit | deutsch |
| Familienstand | ledig |

Promotion

seit 12/02 Promotion zum Dr. rer. nat. in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Christian Buske, Klinische Kooperationsgruppe 'Leukämie', GSF (Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit)-Hämatologikum und Medizinische Klinik III, Klinikum Großhadern, München, AG PD Dr. Christian Buske (Leitung: Prof. Dr. Wolfgang Hiddemann)
Titel: Die Rolle des Transkriptionsfaktors 'Lymphoid Enhancer Factor 1' (Lef-1) in der normalen und malignen Hämatopoese

Studium

03/95-09/95 Studium der Philosophie an der Ludwig-Maximilians-Universität München
10/95-06/02 Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München
10/95-12/01 Studium der Biologie & Chemie für das vertiefte Lehramt an der Ludwig-Maximilians-Universität München
08/01-12/01 Erste Staatsprüfung für das Lehramt an Gymnasien
04/02-06/02 Diplomprüfung in Biologie

Schulbildung

01/94-03/95 Zivildienst am Flughafen München II
07/ 1993 Allgemeine Hochschulreife, Gymnasium München-Moosach, München

Berufliche Weiterbildung

04/02-11/02 MedVenture Partners GmbH, Projektbezogene Mitarbeit mit Schwerpunkten in der Erstellung von Markt- und Unternehmensanalysen in den Bereichen Pharma/Biotech/CROs (Projektmitarbeit)
12/01-02/02 KPMG Deutsche Treuhand-Gesellschaft AG, BU Financial Advisory Services/Corporate Finance (Praktikum)
04/01-11/01 Münchener Rückversicherungsgesellschaft AG, BU Casualty Risk Consulting (Werkstudent)

Publikationen

Petropoulos K, Rawat V.P.S., Schessl C, Arseni N, Hiddemann W, Grosschedl R, Quintanilla-Fend L, Feuring-Buske M, Buske C.

'Constitutive expression of Lef-1 in murine hematopoietic progenitors causes myeloid and lymphoid leukemias propagated by a leukemic stem cell with lymphoid characteristics' (manuscript in preparation).

Rawat V.P.S., Thoene S, Naidu V.M., Heilmeier B, Arseni N, Metzeler K, **Petropoulos K**, Hiddemann W, Quintanilla-Martinez L, Spiekermann K, Feuring-Buske M, Buske C.

'CDX2 induces acute myeloid leukemia with aberrant HOX gene expression in mice depending on its N-terminal transactivation domain and is highly expressed in human AML with deregulated HOX gene expression' (manuscript submitted).

Vempati S, Kern R, Wolf U, **Petropoulos K**, Naidu VM, Buske C, Hiddemann W, Kohl TM, Spiekermann K.

'Tyrosine residues 589 and 591 are critical for the transforming potential and function of FLT3-ITD, FLT3-TKD, and ligand dependent induction of FLT3-WT (manuscript submitted).

Vorträge

- 05/07 MDC/DKFZ Cancer Summer School, Berlin
- 06/06 Annual Congress of the European Hematology Association (EHA), 15.6.-18.06.06, Amsterdam, Niederlande (Abstract published in Haematologica-Volume 91, supplement no.1, June 2006)
- 12/05 Annual Meeting of the American Society of Hematology (ASH), 10.12.-13.12.05, Atlanta, USA (Abstract published in Blood, Vol 106, (11), Nov 15, 2005)

Posterpräsentationen

- 04/07 Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Innerer Medizin (DGIM), 2007, Wiesbaden
- 03/07 Keystone Symposium 'stem cells and cancer', 2007, Keystone, USA
- 04/06 Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Innerer Medizin (DGIM), 2007, Wiesbaden
- 10/05 Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen & Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie (DGHO) 2005, Hannover

Auszeichnung

Pfizer Global Research and Development scholarship, Keystone Symposium 'Stem cells and cancer', 2007, Keystone, USA

Travel Award 11th Annual Congress of the European Hematology Association (EHA), 15.06.-18.06.06, Amsterdam, Niederlande