

Fakultät für Medizin  
Hämatologische Forschung

Die extrinsische Rolle von Secreted frizzled-related protein 1  
(*Sfrp1*) in kindlicher Leukämie

Christian Kehr

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzende(r): Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. dr R. A. J. Oostendorp
2. Prof. Dr. A. Krackhardt

Die Dissertation wurde am 25.05.2016 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin der Technischen Universität München am 12.04.2017 angenommen.



Meiner Familie



# Inhaltsverzeichnis

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. Einleitung .....</b>                                    | <b>1</b>  |
| <b>2. Literaturübersicht.....</b>                             | <b>3</b>  |
| 2.1 Hämatopoese .....   | 3         |
| 2.1.1 Die hämatopoetische Stammzelle .....                    | 4         |
| 2.1.2 Die hämatopoetische Stammzellnische .....               | 6         |
| 2.2 WNT-Signale .....   | 7         |
| 2.2.1 WNT-Signalwege .....                                    | 8         |
| 2.2.2 WNT-Signale in benigner und maligner Hämatopoese .....  | 10        |
| 2.3 Secreted frizzled-related protein 1 ( <i>Sfrp1</i> )..... | 11        |
| 2.3.1 SFRP1 in benigner Hämatopoese.....                      | 12        |
| 2.3.2 SFRP1 in maligner Hämatopoese.....                      | 14        |
| 2.4 Kindliche Leukämien .....                                 | 15        |
| 2.4.1 Kindliche ALL im Speziellen .....                       | 17        |
| 2.5 Das Philadelphia-Chromosom.....                           | 18        |
| 2.5.1 <i>BCR-ABL</i> in kindlicher ALL .....                  | 19        |
| 2.6 Die Doktorarbeit .....                                    | 20        |
| 2.6.1 Aufbau der Doktorarbeit .....                           | 21        |
| 2.6.2 Ziele und Fragestellungen der Doktorarbeit .....        | 23        |
| <b>3. Material.....</b>                                       | <b>26</b> |
| 3.1 Allgemeine Materialien .....                              | 26        |
| 3.2 Technische Instrumente .....                              | 27        |
| 3.3 Biologische und chemische Reagenzien.....                 | 28        |
| 3.4 Medien und Puffer .....                                   | 29        |
| 3.5 Antikörper.....   | 30        |
| 3.6 Vektoren .....  | 32        |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.7 Zelllinien .....   | 33        |
| 3.8 Mausstämme .....   | 33        |
| 3.9 Software .....   | 33        |
| <b>4. Methoden .....</b>   | <b>34</b> |
| 4.1 Phoenix-Zellen .....   | 34        |
| 4.1.1 Phoenix-Selektion .....  | 34        |
| 4.1.2 Phoenix-Passagierung .....                                     | 35        |
| 4.1.3 Phoenix-Transfektion .....                                     | 35        |
| 4.1.4 Infektion fetaler Leberzellen via Phoenix-Retroviren .....     | 36        |
| 4.2 Mäuse .....  | 37        |
| 4.3 Vorversuch .....   | 38        |
| 4.4 Primäre Transplantation .....                                    | 39        |
| 4.5 Sekundäre Transplantation .....                                  | 40        |
| 4.6 Zellgewinnung aus Mausgeweben .....                              | 41        |
| 4.7 Zellanalyse .....  | 42        |
| 4.7.1 Durchflusszytometrie .....                                     | 43        |
| 4.8 Statistik .....  | 46        |
| <b>5. Ergebnisse .....</b>   | <b>47</b> |
| 5.1 Vorversuch .....   | 48        |
| 5.1.1 Gesamtzellzahlen .....   | 51        |
| 5.1.2 Knochenmark .....  | 51        |
| 5.1.3 Milz .....   | 52        |
| 5.1.4 Peripheres Blut .....  | 52        |
| 5.2 Hauptversuch, primäre Transplantation .....                      | 53        |
| 5.2.1 <i>MIG-Sfrp1<sup>-/-</sup></i> gegen <i>MIG</i> -Wildtyp ..... | 54        |
| 5.2.1.1 Gesamtzellzahlen .....                                       | 56        |
| 5.2.1.2 Knochenmark .....  | 56        |

|  |           |
|--|-----------|
| 5.2.1.3 Milz .....   | 57        |
| 5.2.1.4 Peripheres Blut .....  | 58        |
| 5.2.2 <i>MIG</i> -Wildtyp gegen <i>BA</i> -Wildtyp.....                                    | 59        |
| 5.2.2.1 Gesamtzellzahlen .....   | 61        |
| 5.2.2.2 Knochenmark.....   | 61        |
| 5.2.2.3 Milz .....   | 62        |
| 5.2.2.4 Peripheres Blut .....  | 63        |
| 5.2.3 <i>BA-Sfrp1<sup>-/-</sup></i> gegen <i>BA</i> -Wildtyp.....                          | 64        |
| 5.2.3.1 Gesamtzellzahlen .....   | 66        |
| 5.2.3.2 Knochenmark.....   | 67        |
| 5.2.3.3 Milz .....   | 68        |
| 5.2.3.4 Peripheres Blut .....  | 69        |
| 5.2.3.5 Tumoren .....  | 69        |
| 5.3 Hauptversuch, sekundäre Transplantation .....  | 71        |
| 5.3.1 Transplantation mit Spenderzellen einer primären <i>BA</i> -WT-Maus .....            | 72        |
| 5.3.1.1 Gesamtzellzahlen .....   | 73        |
| 5.3.1.2 Knochenmark.....   | 73        |
| 5.3.1.3 Peripheres Blut .....  | 73        |
| 5.3.2 Transplantation mit Spenderzellen primärer <i>BA-Sfrp1<sup>-/-</sup></i> -Mäuse..... | 74        |
| 5.3.2.1 Gesamtzellzahlen .....   | 77        |
| 5.3.2.2 Knochenmark.....   | 77        |
| 5.3.2.3 Milz .....   | 78        |
| 5.3.2.4 Peripheres Blut .....  | 78        |
| 5.3.2.5 Tumoren .....  | 79        |
| <b>6. Diskussion .....</b>   | <b>80</b> |
| 6.1 Vorversuch .....   | 80        |
| 6.2 Hauptversuch, primäre Transplantation .....  | 82        |

|  |            |
|--|------------|
| 6.2.1 <i>MIG</i> -Wildtyp gegen <i>MIG-Sfrp1<sup>-/-</sup></i> .....                       | 82         |
| 6.2.2 <i>MIG</i> -Wildtyp gegen <i>BA</i> -Wildtyp.....                                    | 83         |
| 6.2.3 <i>BA</i> -Wildtyp gegen <i>BA-Sfrp1<sup>-/-</sup></i> .....                         | 85         |
| 6.3 Hauptversuch, sekundäre Transplantation .....  | 87         |
| 6.3.1 Transplantation mit Spenderzellen einer primären <i>BA</i> -WT-Maus .....            | 87         |
| 6.3.2 Transplantation mit Spenderzellen primärer <i>BA-Sfrp1<sup>-/-</sup></i> -Mäuse..... | 88         |
| 6.4 Schlussfolgerungen und Ausblick.....   | 90         |
| <b>7. Zusammenfassung .....</b>  | <b>92</b>  |
| <b>8. Summary .....</b>  | <b>94</b>  |
| <b>9. Quellen .....</b>  | <b>96</b>  |
| <b>10. Anhang .....</b>  | <b>107</b> |
| 10.1 Abbildungsverzeichnis.....  | 107        |
| 10.2 Tabellenverzeichnis.....  | 108        |
| 10.3 Abkürzungsverzeichnis.....  | 109        |
| <b>11. Danksagung .....</b>  | <b>112</b> |

## 1. Einleitung

Kindliche Leukämien weisen in Deutschland etwa 5 Neuerkrankungen pro 100.000 Kindern unter 15 Jahren auf. Sie stellen knapp ein Drittel aller bösartigen Erkrankungen im Kindesalter dar. Abhängig von der entarteten Zelle unterscheidet man zwischen lymphatischen und myeloischen Leukämien. Entsprechend ihrem Verlauf werden chronische von akuten Verlaufsformen unterschieden. Im Kindesalter machen die akuten Formen fast die Gesamtheit aller Leukämiefälle aus (Kaatsch P und Spix C. 2015). Es ist bereits bekannt, dass die ersten Weichen zur Entstehung von kindlichen Leukämien bereits während der Embryogenese stattfinden. So spielen beispielsweise Chromosomentranslokationen oft eine frühe, oder sogar initiierende Rolle und finden in kindlichen Leukämien meist pränatal und in frühen Vorläuferzellen statt (Greaves MF und Wiemels J. 2003; Wiemels J. 2008).

In Wissenschaftskreisen fand in den letzten Jahrzehnten ein neues Konzept zum Verständnis von Krebs immer mehr Anklang; das Konzept, Krebs als eine Stammzellerkrankung anzusehen. Es besagt, dass die morphologische und auch funktionelle Zellheterogenität von Leukämien und auch von soliden Tumoren auf einer hierarchischen Zellorganisation basiert, an deren Spitze eine so genannte „Krebsstammzelle“ steht. Schon in den 1970ern wurde von namhaften Hämatologen in Studien zu akuten Leukämien wohl zum ersten Mal die Existenz einer „leukämischen Stammzelle“ (LSC) nahegelegt; eine Zelle mit ähnlichen zytokinetischen Eigenschaften wie eine normale, hämatopoetische Stammzelle (HSC), die in der Lage zur Selbsterneuerung und Differenzierung sei (Clarkson B und Baserga R. 1974). Schließlich gelang der direkte Beweis der LSC in den 1990ern, sodass der Begriff „leukämische Stammzelle“ heute fester Bestandteil der aktuellen Krebsforschung ist (Dick JE. 2008; Klauke K et al. 2015).

Immer größere Bedeutung wird der Beziehung von gesunden und auch leukämischen Stammzellen zu ihrer Mikroumgebung, der so genannten hämatopoetischen Stammzellnische, zugesprochen. Forscher bemühen sich um ein tieferes Verständnis der molekularen Mitspieler in dieser Beziehung, um zu klären, welche extrinsische Rolle die Mikroumgebung auf Leukämogenese hat (Dick JE und

Lapidot T. 2005; Agarwal P und Bhatia R. 2015). Einer von diesen molekularen Mitspielern ist die Familie der WNT-Proteine. Welche Rolle Aktivatoren und Inhibitoren von WNT-Proteinen in benigner und auch in maligner Hämatopoese einnehmen, ist Gegenstand aktuellster Forschung und wird von der Oostendorp Arbeitsgruppe intensiv untersucht (Schreck C et al. 2014).

Die vorliegende Doktorarbeit befasst sich mit einem WNT-Inhibitor im Speziellen, mit dem Protein SFRP1. Um dessen Rolle in kindlicher Leukämie besser zu verstehen, wurden neugeborene Knockoutmäuse, denen das gleichnamige Gen *Sfrp1* ausgeschaltet wurde, in einem auf Serientransplantationen basierenden, juvenilen Leukämiemodell untersucht.

## 2. Literaturübersicht

### 2.1 Hämatopoese

Unter Hämatopoese versteht man die Bildung der zellulären Bestandteile des Blutes. Der Ursprung aller Blutzellen liegt in einer gemeinsamen, multipotenten, hämatopoetischen Stammzelle (HSC). Unter Multipotenz wird hier die Fähigkeit einer HSC verstanden, sich selbst zu erneuern und das gesamte Blutzellsystem regenerieren zu können (Becker AJ. 1963). Im klassischen Betrachtungsansatz bringt diese multipotente HSC oligopotente HSCs hervor; also bereits differenzierte Zellen, die in ihren Entwicklungsmöglichkeiten schon eingeschränkter sind. Aus letzteren wiederum gehen myeloische (MPs) und lymphatische Vorläuferzellen (CLPs) hervor (s. S. 5, Abb. 1). MPs sind schließlich für die Bildung unipotenter, also ausdifferenzierter, Erythro-, Thrombo-, Mono- und Granulozyten verantwortlich und CLPs für die Bildung unipotenter Lymphozyten. Die neueste Forschung zeigt jedoch, dass unipotente Zellen auch direkt aus multipotenten Zellen entspringen können, ohne dabei über die oligopotente Differenzierungszwischenstufe zu gehen. Bei Thrombozytenvorläufern, den Megakaryozyten, trifft dies sogar auf die Mehrheit der Zellen zu. Weiterhin bestehen Unterschiede zwischen fetalen und adulten Differenzierungswegen (Notta F et al. 2016). Diese Erkenntnisse stellen den klassischen, strikt hierarchischen Betrachtungsansatz grundlegend in Frage und bedürfen weiterer Forschung auf diesem Gebiet.

Erythrozyten sind die roten Blutkörperchen und ihre Hauptaufgabe ist der Transport von Sauerstoff zum Körper und der Abtransport von Kohlenstoffdioxid zur Lunge. Wird ein Gefäß verletzt, sind es Thrombozyten (Blutplättchen), welche hauptverantwortlich für die Blutstillung sind. Sie verschließen das betroffene Gefäß und setzen die Blutgerinnung in Gang. Monozyten und Granulozyten gehören zum angeborenen, oder auch unspezifischen, Immunsystem und schützen den Körper über verschiedenste, nicht spezifische Abwehrmechanismen. Lymphozyten hingegen sind Zellen des erworbenen, oder auch spezifischen, Immunsystems und für erregerspezifische Abwehrreaktionen zuständig. B-Lymphozyten garantieren

hierbei für die so genannte humorale Immunität, den Immunschutz durch Antikörperproduktion, und T-Lymphozyten für den Schutz auf Zellebene, der zellulären Immunität.

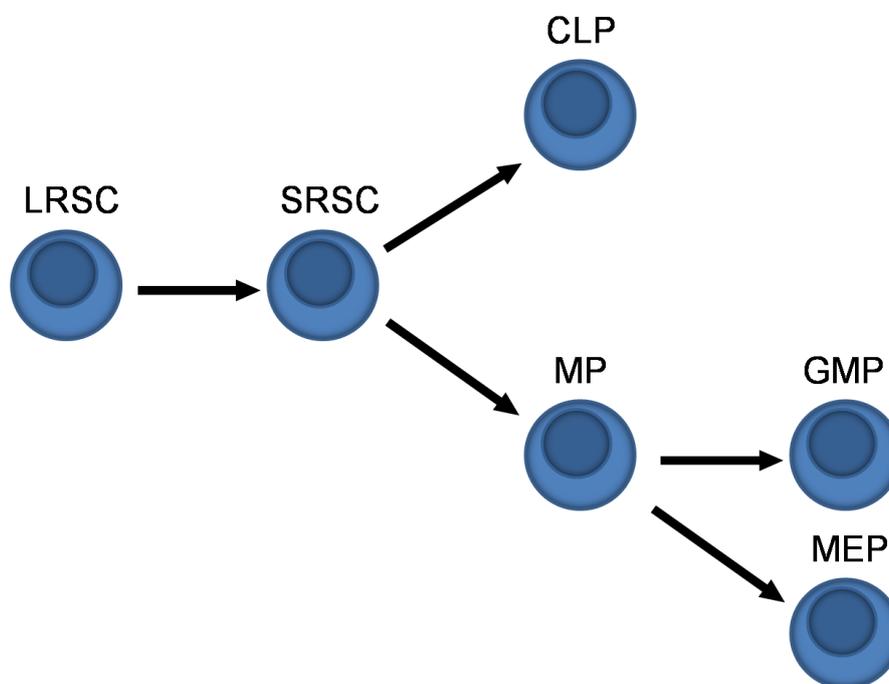
In der Ontogenese von Wirbeltieren wird der Ort der Hämatopoese mehrmals gewechselt. Noch 1970 gingen Moore und Metcalf davon aus, dass Hämatopoese in Vertebraten ausschließlich aus dem Dottersack entspringt, von wo aus HSCs zuerst die Leber, später den Thymus und die Milz und letztendlich das Knochenmark populieren (Moore MA und Metcalf D. 1970). Wenige Jahre später konnte jedoch für Vögel gezeigt werden, dass Hämatopoese auch intraembryonal entspringt (Dieterlen-Lièvre F. 1975). In den 1990ern gelang dies schließlich auch für Mäuse, bei denen hämatopoetische Aktivität in der so genannten Aortogonadomesonephron-Region (AGM-Region) festgestellt wurde (Medvinsky AL et al. 1993). Von der humanen Hämatopoese weiß man heute, dass sie auch vom Dottersack sowie von hämatopoetisch aktiven, sich redifferenzierenden Gefäßzellen der Aorta und Dotterhautarterie ausgeht (Tavian M et al. 2005) und dass multipotente HSCs ausschließlich von dort stammen (Tavian M et al. 2001). Nachdem die Hämatopoese schließlich vom Dottersack und der AGM-Region über die Plazenta und die fetale Leber gewandert ist, durchlaufen HSCs einen letzten Ortswechsel, den Wanderungsprozess ins Knochenmark (Mikkola HK und Orkin SH. 2006). Dort wird sich zeitlebens die Hämatopoese abspielen, in der hämatopoetischen Stammzellnische (Wilson A und Trumpp A. 2006). Auf HSCs und ihre Nische wird in den beiden nächsten Textabschnitten näher eingegangen.

### **2.1.1 Die hämatopoetische Stammzelle**

Die Differenzierung und Reife einer Zelle kann durch die An- oder Abwesenheit von Oberflächenantigenen bestimmt werden, welche in ihrer Kombination spezifisch für die Zelle sind. Das Anfärben der Antigene macht Zellen voneinander unterscheidbar, so auch die hämatopoetische Stammzelle. In Anlehnung an die Arbeit von Spangrude und seinen Kollegen im Jahr 1988 wurden HSCs in dieser Arbeit durch die Abwesenheit der für reife Blutzellen typischen Oberflächenantigene CD3, B220,

TER-119, GR-1 und CD11b (Lin<sup>-</sup>) und die Anwesenheit der Leukozytenantigene 6A-2/6E-1 (Ly-6A/E, SCA1<sup>+</sup>) und CD117 (KIT<sup>+</sup>) gekennzeichnet und LSKs benannt (Spangrude GJ et al. 1988).

Um der beträchtlichen Heterogenität von HSCs in Bezug auf ihr Selbsterneuerungspotenzial sowie ihr in vitro und in vivo Verhalten Rechnung zu tragen, werden in der hämatologischen Forschung außerdem die Antigene CD34 und CD150 gefärbt (Morita Y et al. 2010). Auf diese Weise können LSKs mit fast unlimitiertem Selbsterneuerungspotenzial, so genannte Langzeit repopulierende Stammzellen (LRSCs) (CD34<sup>-</sup>, CD150<sup>+</sup>), von LSKs ohne Selbsterneuerungspotenzial, den Kurzzeit repopulierenden Stammzellen (SRSCs) (CD34<sup>+</sup>, FLK-2/FLT-3<sup>+</sup>), unterschieden werden. Aus den meist ruhenden, sich selten teilenden LRSCs gehen die sich häufiger teilenden SRSCs hervor (s. u. Abb. 1). So kommt es, dass die LRSCs diejenigen Zellen sind, die zeitlebens die Hämatopoese aufrechterhalten und SRSCs die Zellen, die sich in CLPs und MPs weiterdifferenzieren (Weissmann IL et al. 2001).



**Abbildung 1: Schemadarstellung des klassischen Betrachtungsansatzes zur hämatopoetischen Stammzellhierarchie in Anlehnung an Renström J et al. 2010.** LRSC=Langzeit repopulierende Stammzelle, SRSC=Kurzzeit repopulierende Stammzelle, CLP=lymphatische Vorläuferzelle, MP=myeloische Vorläuferzelle, GMP=Granulozyten-Monozytenvorläuferzelle, MEP=Megakryozyten-Erythrozytenvorläuferzelle.

Einer speziellen Subpopulation von LRSCs wird die Eigenschaft zugesprochen, die potentesten HSCs für die langfristige Selbsterneuerung aller Blutzellreihen zu sein. In Homöostase ruhen sie in der G0-Phase des Zellzyklus, aber unter Stress aktivieren sie höchst effektiv ihre Selbsterneuerung und verlassen die G0-Phase, um die Hämatopoese anzutreiben. Bei Wiedereintritt der Homöostase kehren sie wieder in den Ruhezustand zurück. Diese Beobachtung ist bemerkenswert, weil sie vermuten lässt, dass die Zellen unter hämatopoetischem Stress je nach Bedarf zwischen Ruhezustand und Selbsterneuerung wechseln können; und zwar auf Abruf (Wilson A et al. 2008).

### 2.1.2 Die hämatopoetische Stammzellnische

In der Forschung fiel der Begriff "Stammzell-Nische" das erste Mal in einer Hypothese von Schofield im Jahr 1978. Hierin beschrieb er einen Ort, an dem Stammzellen durch den sie umgebenden Zellverband beeinflusst und erhalten werden (Schofield R. 1978). Heute wird unter der hämatopoetischen Stammzellnische die Umgebung von HSCs im Knochenmark verstanden; der Ort also, wo die Blutbildung stattfindet. Diese, auch als Mikroumgebung bezeichnete, Nische reguliert HSCs, indem sie deren Selbsterneuerung, Überleben, Differenzierung und Proliferation kontrolliert. Sie wird als Schlüsselfaktor für die Homöostase von HSCs angesehen (Morrison SJ und Spradling AC. 2008). Weiterhin werden zwei Typen der HSC-Nische beschrieben; zum einen die endostale Nische, in der HSCs in Nachbarschaft von Osteoblasten im trabekulären Knochen angesiedelt sind und zum anderen die vaskuläre Nische, welche HSCs nahe sinusoidalen Endothelien beherbergt (Zhang J et al. 2003).

Neben intrinsischen, zelleigenen Signalwegen zur Regulation von Hämatopoese werden in der Forschung zunehmend extrinsische Signalwege geschätzt; also nicht wie HSCs selber Einfluss auf die Hämatopoese nehmen, sondern die Art und Weise, wie genau die Nische von außen auf ihre HSCs wirkt und diese beeinflusst. Dies ist nicht zuletzt so, weil man sich durch tiefere Kenntnisse der zu Grunde liegenden, molekularen Mechanismen ein besseres Verständnis von physiologischen

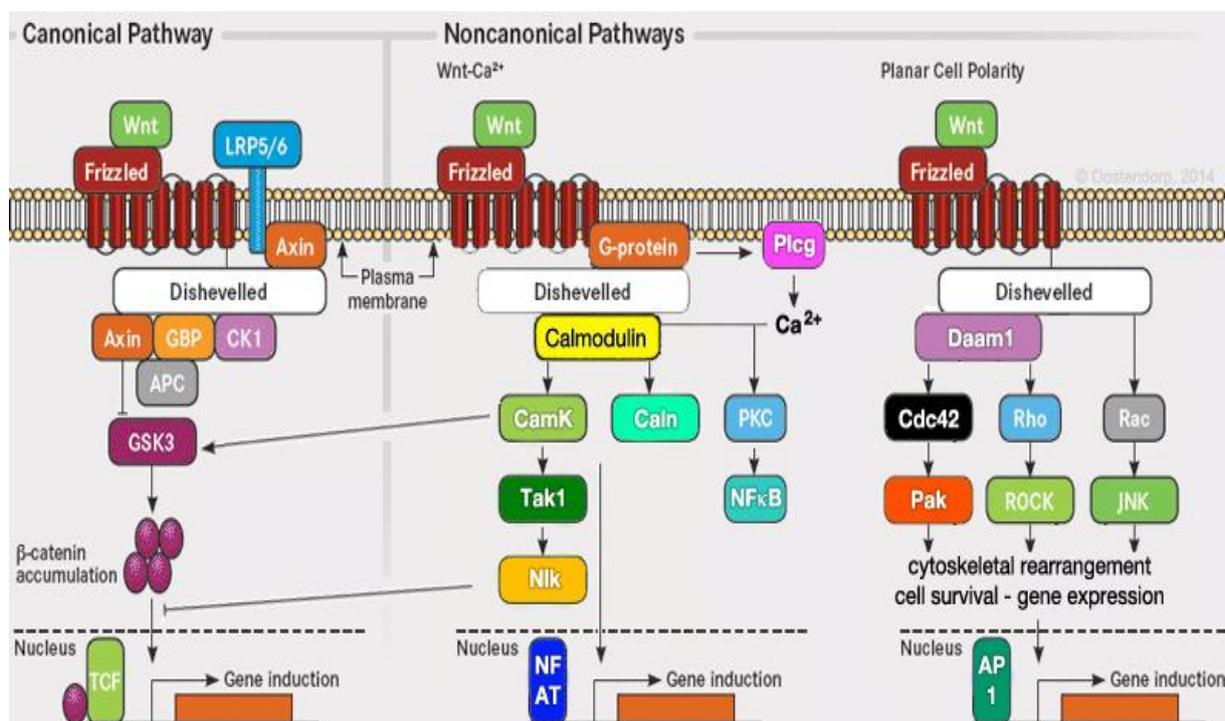
Prozessen, besonders aber auch von pathologischen Prozessen, wie zum Beispiel Krebs, erhofft (Singh SR. 2012). Eben das ist der Grund, weshalb die hämatopoetische Stammzellnische auch für die vorliegende Arbeit von großer Relevanz ist und warum das Oostendorp Labor so intensiv die Verbindung der Nische zu gutartiger (benigner) und bösartiger (maligner) Hämatopoese erforscht. In diesem Zusammenhang erläuterte die Oostendorp Arbeitsgruppe bereits eine plausible Kausalkette für die Entstehung von Leukämien auf Grund einer gestörten HSC-Nische. Die Balance zwischen Ruhestadium und Aktivierung von HSCs sei eine Hauptfunktion der Nische, die, wenn gestört, zu einer Daueraktivierung von HSCs führen könne. Dies wiederum führe zu der möglichen Anreicherung von Mutationen, welche in letzter Konsequenz das Auftreten verschiedener Leukämien begünstigen (Schreck C et al. 2014).

## 2.2 WNT-Signale

WNT-Moleküle, auch WNTs genannt, sind eine Proteinfamilie von Zell-Zell-Mediatoren. Bereits während der Embryogenese nehmen sie eine Schlüsselfunktion in der interzellulären Signalvermittlung ein. Im erwachsenen Organismus erhalten sie die Gewebshomöostase, wobei sie in unterschiedlichsten Zelltypen zu finden sind. Über Signalkaskaden wirken sie auf eine Bandbreite von Zielgenen, deren Wirkspektrum von Proliferation, über Differenzierung bis hin zur Bestimmung des Zellschicksals reicht. Um genaueste Kontrolle zu gewährleisten, sind WNT-Signalwege äußerst präzise reguliert, höchstgradig konserviert und mit multiplen Rückkopplungsmechanismen ausgestattet (Logan CY und Nusse R. 2004). Dabei ist für eine ordentliche Zell-Zell-Kommunikation neben der direkten Signalaktivierung durch Ligand-Rezeptor-Kontakt auch die Regulation durch sezernierte Antagonisten unverzichtbar (Nierhs C. 1999). So werden WNT-Signale beispielsweise von DKK (Dickkopf), WISE (WNT modulator in surface ectoderm), WIF (WNT inhibiting factor) und SFRP (Secreted Frizzled-related protein) gehemmt (Kawano Y und Kypta R. 2003).

## 2.2.1 WNT-Signalwege

WNT-Signale werden von extrazellulär mittels Signaltransduktion über verschiedene Signalkaskaden bis in den Zellkern geleitet, um hier die Transkription von WNT-Zielgenen zu beeinflussen. Es werden der kanonische WNT-Signalweg und die zwei nicht-kanonischen WNT-Signalwege unterschieden. Funktionell sind sie jedoch nicht strikt voneinander getrennt, denn sie interagieren auch miteinander (Ishitani T et al. 1999; Flentke GR et al. 2014). Abbildung 2 (s. u.) stellt die verschiedenen WNT-Signalwege dar. Eine Übersicht zu den wichtigsten molekularen Mitspielern der unterschiedlichen Signalkaskaden geben die beiden darauffolgenden Textabschnitte.



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der WNT-Signalwege mit den bisher bekannten Interaktionspartnern.**

Der kanonische WNT-Signalweg besitzt ein zentrales Molekül, den Transkriptionsregulator  $\beta$ -Catenin. In Abwesenheit von WNTs herrschen im Zytoplasma von WNT-Zielzellen niedrige Level von  $\beta$ -Catenin. Dieses wird von

einem trimeren Komplex aus Axin, APC und der Kinase GSK-3 $\beta$  gebunden und von letzterer phosphoryliert. Phosphoryliertes  $\beta$ -Catenin wird anschließend ubiquitinyliert, um dann von Proteasomen erkannt und abgebaut zu werden. Ohne WNT-Signal bleiben die  $\beta$ -Catenin Level also niedrig. In Anwesenheit von WNTs binden diese an der Zelloberfläche an einen Rezeptorkomplex, der aus einem Frizzled-Rezeptor (FZD) und einem LRP-Korezeptor besteht. Hierdurch wird auf zytoplasmatischer Seite eine noch nicht bis ins Detail erklärte Interaktion zwischen Axin und Dishevelled (DSH) in Gang gesetzt, die die Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin unterbindet und somit dessen proteasomalen Abbau verhindert. Als Folge steigt das  $\beta$ -Catenin-Level sowohl intrazellulär als auch nukleär. Im Zellkern wirkt es dann fördernd auf verschiedenste Transkriptionsfaktoren, unter anderem auf den TCF/LEF-Transkriptionskomplex (Logan CY und Nusse R. 2004). Bekannte Zielgene von WNTs sind Zyklin D1 und MYC; es gehören aber noch viele weitere Gene dazu, die in Zellzyklusregulation und Proliferation eingebunden sind (Nygren MK et al. 2007).

Die zwei nicht-kanonischen WNT-Signalwege laufen  $\beta$ -Catenin unabhängig ab. Es handelt sich um den Kalzium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) abhängigen und den so genannten PCP-Signalweg. Sie sind hochkomplex und verzweigt, weswegen hier nur kurz auf Schlüsselpunkte der Signaltransduktion eingegangen wird. Wie auch im kanonischen Signalweg binden WNT-Liganden bei den beiden nicht-kanonischen Signalwegen an FZD-Rezeptoren; allerdings hier mit anderen Korezeptoren. Der WNT/ $\text{Ca}^{2+}$ -Signalweg läuft über eine von  $\text{G}\alpha$ -Proteinen ausgelösten, intrazellulären Freisetzung von Kalziumionen und anschließender Aktivierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -regulierten Effektorproteine Calcineurin, PKC $\alpha$  und CaMKII. Darauf folgt die Transkriptionsaktivierung, unter anderem vom Transkriptionsfaktor NFAT (Rao TP und Kühl M. 2010). Im PCP-Weg führen WNT-Signale zu einer DSH-vermittelten Aktivierung von GTPasen der so genannten RHO-Familie, worauf eine Aktivierung und Phosphorylierung der JNK folgt (Klein TJ und Mlodzik M. 2005). Es konnte gezeigt werden, dass nicht-kanonische WNT-Signale auch in der Hämatopoese von Bedeutung sind. So deuten Forschungsergebnisse darauf hin, dass sie bei der Nischenetablierung von Bedeutung sind, indem sie die trabekuläre Knochenformation fördern und endostale Oberflächen vergrößern (Yin T und Li L. 2006).

## 2.2.2 WNT-Signale in benigner und maligner Hämatopoese

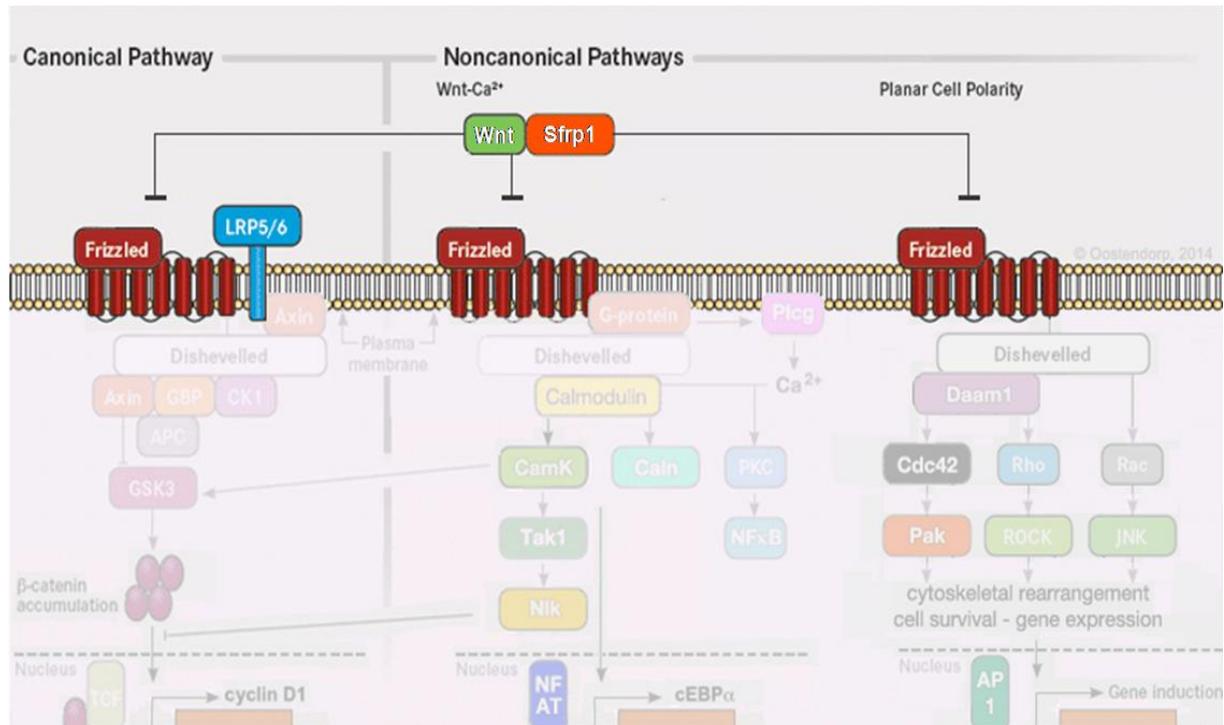
Auch in der Hämatopoese spiegelt sich das breitgefächerte Wirkspektrum von WNTs wider. So ist es nicht erstaunlich, dass WNT-Signalen eine essenzielle Rolle in der Produktion von Blutzellen zugeschrieben wird (Austin TW et al. 1997; Van Den Berg DJ. 1998). Man weiß bereits, dass besonders die nicht-kanonischen Signalwege durch ihr Wirken in Skeletogenese und mesenchymaler Differenzierung in der Ausgestaltung lokaler Nischenarchitektur beteiligt sind. Besonders das Protein WNT5A sticht hier hervor. Es wird hauptsächlich von Stromazellen und Osteoblasten exprimiert; es vermittelt also extrinsisch zwischen HSCs und ihrer Nische und verbessert dadurch HSC-Erhalt und -Proliferation. An intrinsischen WNT-Signalen ist WNT3A zu nennen, das von HSCs stark exprimiert wird und ebenfalls entscheidend für die Hämatopoese ist (Schreck C et al. 2014).

Welche Rolle WNT-Signale in maligner Hämatopoese, beziehungsweise in Leukämogenese, spielen, ist für die Forschung und auch für die vorliegende Arbeit von großem Interesse. Dieses Interesse ist verständlich, da die Rolle von gestörten WNT-Signalen in verschiedensten Neoplasien bereits etabliert und bekannt ist (Duchartre Y et al. 2016). Die folgerichtige Vermutung, dass fehlgesteuerte WNT-Signale eine entscheidende Schnittstelle zwischen benigner und maligner Hämatopoese einnehmen, ist also gut begründet. So konnten zum Beispiel bereits erhöhte Aktivitäten von WNT-Signalen in AML-Patienten festgestellt werden (Simon M et al. 2005). Weiterhin war es möglich zu zeigen, dass  $\beta$ -Catenin für die Progression einer chronisch myeloischen Leukämie in eine Blastenkrise notwendig ist (Zhao C et al. 2007). In akuten lymphatischen Leukämien konnte die Aktivierung des kanonischen WNT-Signalwegs durch WNT3A gezeigt werden (Nygren MK et al. 2007). Neben diesen exemplarisch dargestellten Erkenntnissen gibt es noch weitere Mechanismen, wie WNT-Signale an Leukämien beteiligt sind. Einer dieser Mechanismen ist zum Beispiel die Herabregulierung von WNT-Inhibitoren, wie im Folgenden beschrieben wird.

## 2.3 Secreted frizzled-related protein 1 (*Sfrp1*)

Die *Sfrp*-Genfamilie besteht sowohl im menschlichen als auch im murinen Genom aus fünf Mitgliedern (Kawano Y und Kypta R. 2003) und kodiert für gleichnamige Proteine. In dieser Arbeit werden Gene im Kursivdruck geschrieben und Proteine im Normal- und Großdruck. Auf das Gen „Secreted frizzled-related protein 1“ wird sich also als *Sfrp1* bezogen und auf das entsprechende Protein als SFRP1. Die *Sfrp*-Genfamilie wird in die *FrzB*- und die *Sfrp1*-Unterfamilien eingeteilt, wobei letztere für die Proteine SFRP1, SFRP2 und SFRP5 kodieren (Jones SE und Jomary C. 2002). SFRP-Proteine verdanken ihren Namen den Frizzled-Rezeptoren. Die Familie der Frizzled-Rezeptoren stellen die primären Rezeptoren für WNT-Liganden dar. Sie bestehen aus einer heptahelikalen Transmembrandomäne und einer extrazellulären, N-terminalen Peptidverlängerung, der so genannten cysteinreichen Domäne (CRD). WNTs binden direkt an diese CRD von FZDs (Bhanot P et al. 1996). Da SFRPs ebenfalls solch eine CRD mit ähnlicher Sequenz wie in FZDs besitzen, binden WNT-Moleküle auch hieran (Rattner A et al. 1997).

SFRP1 gehört zu einer Reihe unterschiedlicher WNT-Signalinhibitoren. Neben der SFRP-Familie gehören die schon oben genannten Inhibitoren DKK, WISE und WIF, aber auch noch andere, wie Kremen, CTGF, SOST und mehr, dazu (Cruciat CM und Niehrs C. 2013). Es ist bekannt, dass SFRP1 in der Lage ist sowohl den kanonischen als auch die nicht-kanonischen WNT-Signalwege zu regulieren (Suzuki H et al. 2004). Die nachstehende Abbildung 3 (s. S. 12) veranschaulicht, wie SFRP1 mit WNT interagiert und so die Signalwege inhibiert. Des Weiteren weiß man um die elementare Funktion von SFRP1 und seinem Zusammenspiel mit SFRP2 in der Morphogenese während der Embryonalentwicklung (Sato W et al. 2006). Paradox erscheint jedoch, dass für den sezernierten WNT-Inhibitor SFRP1 auch eine agonistische Wirkung auf FZD2 (Rodriguez J et al. 2005) sowie auf FZD4 und FZD7 festgestellt werden konnte (Dufourcq P et al. 2008). Hinzu kommt, dass nur wenige WNT-Inhibitoren, SFRP1 eingeschlossen, reine WNT-Modulatoren sind, sondern dass die Mehrzahl unter ihnen ebenfalls Signalwege wie den TGF- $\beta$ - und den FGF-Signalweg beeinflusst (Cruciat CM et al. 2013).



**Abbildung 3: Schemadarstellung der Interaktion zwischen SFRP1 und WNT in Anlehnung an Abbildung 2 (s. S. 8).** SFRP1 bindet WNT, sodass dieses nicht mehr an den Frizzled-Rezeptor binden kann. Die gehemmten WNT-Signalwege sind grau schattiert dargestellt.

Es bleiben also Unklarheiten über die Funktion und Aufgabenbereiche von SFRP1 und es scheint wahrscheinlich, dass die zukünftige Forschung auch weitere neue Erkenntnisse zu SFRP1 liefern wird. Ein Aufgabenbereich von SFRP1, der heute schon besser beleuchtet und für diese Arbeit von großer Relevanz ist, ist dessen regulierende Funktion in der Hämatopoese. Welche Rolle genau SFRP1 in benigner und auch in maligner Hämatopoese spielt, wird in den nächsten Textabschnitten erläutert.

### 2.3.1 SFRP1 in benigner Hämatopoese

In den murinen Stromazelllinien EL08-1D2 und UG26-1B6, welche beide den Erhalt fetaler und adulter HSCs unterstützen, konnte die Oostendorp Arbeitsgruppe bereits mehrere überexprimierte Moleküle identifizieren, darunter SFRP2 (Oostendorp RA et al. 2005). Dies gelang nun auch für SFRP1, das in beiden Zelllinien mit WNT1, -2,

-3A und -7B agiert. Um in einem nächsten Schritt die Rolle von SFRP1 für den HSC-Erhalt genauer zu untersuchen, wurde zunächst *in vitro* ein stabiles Knockdown von *Sfrp1* in der UG26-1B6 Stromazelllinie etabliert. Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass der Verlust von SFRP1 in der Mikroumgebung die Aktivität von Blutvorläuferzellen erhöht (Renström J et al. 2009).

Studienergebnisse, die zeigten, dass endostale Oberflächen trabekulärer Knochen für die hämatopoetische Nische wichtig sind (Yin T und Li L. 2006), wurden anschließend mit der Erkenntnis verknüpft, dass SFRP1 in knochenaukleidenden, osteoblastähnlichen Zellen exprimiert wird (Yokota T et al. 2008). Deswegen stellte die Oostendorp Arbeitsgruppe die Hypothese auf, dass SFRP1 ein wichtiger Faktor in der extrinsischen Regulation der Hämatopoese sein könnte. Folglich, um SFRP1-bedingte, intrinsische von extrinsischen Effekten zu unterscheiden, wurden in einem weiteren Schritt *Sfrp1*-Knockoutmäuse (*Sfrp1*<sup>-/-</sup>-Mäuse) untersucht. Hierbei wurden die Mausgewebe Knochenmark, Milz, Thymus und peripheres Blut analysiert, woran sich auch die vorliegende Arbeit orientiert hat. Die *in vivo* Ergebnisse ließen auf eine veränderte Homöostase von Leukozyten, besonders von Lymphozyten, schließen. Zellzyklusanalysen zeigten zum einen, dass LSKs und multipotente Vorläuferzellen (MPPs) von *Sfrp1*<sup>-/-</sup>-Mäusen vermehrt ruhen und sich in der G0/G1-Phase des Zellzyklus befinden. Reife Zellen hingegen zeigten vermehrte Teilungsaktivität, wiesen also eine größere Population in der S-Phase des Zellzyklus auf. Dies zeigte also, dass SFRP1 Einfluss auf die Produktion hämatopoetischer Vorläuferzellen und reifer Zellen nimmt. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Abwesenheit von SFRP1 die Expression von WNT-Mediatoren und WNT-Zielgenen in HSCs und frühen Vorläuferzellen verändert (Renström J et al. 2009).

Transplantationsexperimente an genetisch unveränderten Wildtypmäusen (WT-Mäuse) erbrachten, dass SFRP1-Abwesenheit in Spender-HSCs keine intrinsisch verursachten Defekte verursachte. Jedoch wurde in *Sfrp1*-Knockoutmäusen ein schwerer Verlust des Langzeiterhalts von WT-HSCs deutlich, was auf eine relevante extrinsische Bedeutung von SFRP1 im „Engraftment“ hindeutete; dem „Anwachsen“ von HSCs in ihrer Nische. Hier ergab die Serientransplantation nämlich erst ein erhöhtes WT-HSC-Engraftment in primären *Sfrp1*<sup>-/-</sup>-Empfängermäusen, um dann in sekundären WT-Empfängern signifikant abzufallen. Daraus wurde geschlossen, dass in primären *Sfrp1*<sup>-/-</sup>-Mäusen die

Fähigkeit der Mikroumgebung LRSCs zu erhalten wohl so stark eingeschränkt wurde, dass die adäquate Regeneration der Hämatopoese in sekundären Empfängern nicht mehr möglich war (Renström J et al. 2009).

Mit dieser Reihe von Experimenten konnte also bereits die wichtige extrinsische Regulation von SFRP1 auf HSC-Selbsterneuerung und HSC-Erhalt in benigner Hämatopoese belegt werden. Welche Rolle SFRP1 nun aber in maligner Hämatopoese einnimmt, ist die wesentliche Fragestellung dieser Doktorarbeit. Der folgende Textabschnitt gibt einen Überblick des aktuellen Forschungsstandes auf diesem Gebiet und zeigt, welche Erkenntnisse zu SFRP1 in maligner Hämatopoese bereits herausgefunden wurden.

### 2.3.2 SFRP1 in maligner Hämatopoese

Es ist bereits für verschiedenste Moleküle bekannt, dass deren Störung in nicht hämatopoetischen Nischenzellen ein erhöhtes Risiko für eine maligne Transformation in hämatopoetischen Zellen nach sich zieht. So zeigte beispielsweise die Stilllegung von Genen in Osteoblastenvorläufern im Lebendversuch, dass sich als Folge sekundär Myelodysplasien und Leukämien entwickelten (Raaijmakers MH et al. 2010). Mit dem Wissen über die extrinsisch regulierende Funktion von SFRP1 auf HSC-Erhalt und -Selbsterneuerung ist es daher nicht abwegig anzunehmen, dass auch SFRP1 zu den Molekülen gehören könnte, deren Störungen sekundär zu Leukämien führen können.

Des Weiteren wird für Leukämien das Phänomen des „Hijacking“ beschrieben, was so viel heißt wie „Überfallen“ oder „Entführen“. Damit beschreibt man die Fähigkeit leukämischer Zellen, die Knochenmarknische so zur ihrem Nutzen gefügig zu machen, dass ihr eigenes Überleben gefördert wird (Schepers K et al. 2013). In diesem Sinne ist auch eine Herabregulierung von WNT-Inhibitoren in Nischenzellen oder HSCs vorstellbar, sodass deren Proliferation uneingeschränkt stattfinden kann. So ist bereits bekannt, dass in Krebszellen oft die Promotorregionen von WNT-Antagonisten methyliert und damit inaktiv sind. Tatsächlich sind in der CLL die *Sfrp1*- und auch die *Dkk1*-Gene die meist methylierten Gene und damit stillgelegt

(Moskalev EA et al. 2012). Die Promotormethylierung von *Sfrp*- und *Dkk*-Genen wurde sogar als so wichtig eingestuft, dass sie in Myelodysplasien schon als prognostischer Marker für die Progression in AML vorgeschlagen wurde (Wang Y et al. 2013). In AML-Patienten konnte weiterhin eine Assoziation zwischen Hypermethylierung von WNT-Inhibitoren und onkogenen Fusionsproteinen beobachtet werden. Eine *Sfrp1*-Hypermethylierung wurde hierbei mit dem Fusionsprotein AML1-ETO, t(8:21), assoziiert (Hou HA et al. 2011).

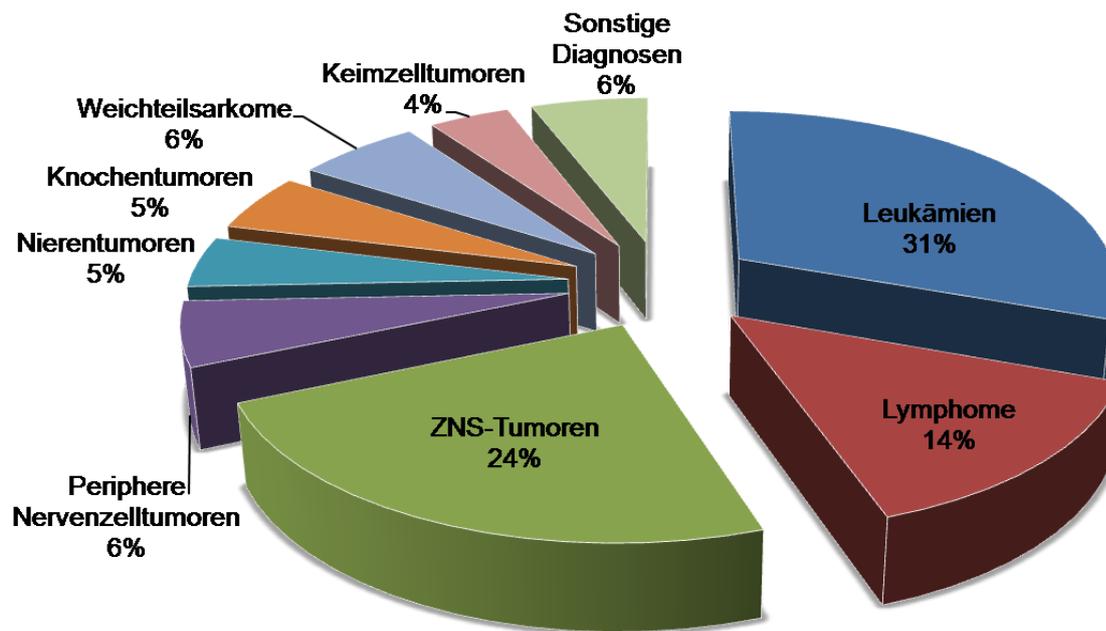
Die bisherigen Forschungserkenntnisse zusammengenommen, geben Anlass, *Sfrp1* als ein mögliches Tumorsuppressorgen in leukämischen Zellen zu verstehen. Dies ist nicht abwegig, denn für solide Tumoren wird SFRP1 bereits seit Längerem als ein potenzieller Kandidat für Tumorsuppression gehandelt (Huang J et al. 2007). Neben der intrinsischen Funktion von SFRP1 in maligner Hämatopoese gilt es jedoch noch zu klären, wie ein verändertes extrinsisches SFRP1-Nischensignal auf leukämische Zellen und die Entwicklung von Leukämien allgemein wirkt. Genau mit diesem extrinsischen Nischeneinfluss auf maligne, hämatopoetische Zellen beschäftigt sich diese Doktorarbeit.

## 2.4 Kindliche Leukämien

Leukämien sind umgangssprachlich als Blutkrebs bekannt und gehören den bösartigen Erkrankungen des blutbildenden Systems an. Sie entstehen aus der Entartung reifer Leukozyten oder unreifer hämatopoetischer Vorläuferzellen, so genannte Blasten. Durch die ungehemmte Proliferation der entarteten Zellen wird das periphere Blut mit ihnen überschwemmt, die Leukozytenwerte steigen. Der Überschwemmungszustand des Blutes mit weißen Blutzellen ist namensgebend für die Leukämien, „weißes Blut“. Sie werden auf Grund morphologischer, immunologischer, zyto- und molekulargenetischer Unterschiede in myeloische und lymphatische Formen eingeteilt. Abhängig von ihrem klinischen Auftreten können sie akut oder chronisch verlaufen. Nach diesen Kriterien lassen sich folgende vier Leukämiehauptformen voneinander abgrenzen: die Akute myeloische Leukämie

(AML), die Akute lymphatische Leukämie (ALL), die Chronische myeloische Leukämie (CML) und die Chronische lymphatische Leukämie (CLL).

Im Kindesalter ist die Leukämie mit knapp einem Drittel aller Krebserkrankungen die häufigste bösartige Erkrankung von Kindern (s. S. 17, Abb. 4). Bei ihnen dominieren die akuten Verlaufsformen, welche von allen Fällen mit fast 80% ALL und rund 15% AML beziffert werden (Kaatsch P und Spix C. 2015). Deswegen wird im Folgenden lediglich auf die akuten Verlaufsformen eingegangen. Die Ursachen für kindliche, akute Leukämien sind multifaktoriell. Sie reichen von Erbkrankheiten über ionisierende Strahlung bis hin zu mutagenen Medikamenten (Buffler PA et al. 2005). Sowohl die ALL als auch die AML entstehen im Knochenmark, verdrängen dort allmählich die normale Blutbildung und führen damit zu einer progressiven Knochenmarkinsuffizienz. Neben unspezifischen Symptomen, wie Fieber, Abgeschlagenheit, Appetitlosigkeit und schmerzenden Knochen, leiden die Kinder auch an der fortschreitenden Knochenmarkinsuffizienz, die verantwortlich ist für Symptome wie Blässe (Anämie), Hautblutungen (Thrombozytopenie) und schwere Infektionen (Neutrozytopenie) (Yiallourous M. 2012). Heute werden nach ausführlichster Diagnostik und Risikostratifizierung multimodale Therapien eingeleitet, die immer bessere Prognosen erlauben. So lag in den 1980ern die 5-Jahresüberlebensrate bei Kindern für die ALL noch bei unter 80% und die der AML bei knapp über 40%. Bereits seit 2007 lag die 5-Jahresüberlebensrate für die ALL bei über 90% und die der AML bei über 70%, sogar mit steigender Tendenz (Kaatsch P und Spix C. 2015). Dass Kinder, die an Leukämie leiden, heute immer bessere Chancen auf ein krankheitsfreies Überleben haben, liegt maßgeblich an der Forschung in diesem Bereich.



**Abbildung 4: Bösartige Erkrankungen im Kindesalter in Deutschland (Kaatsch P und Spix C. 2015).**

### 2.4.1 Kindliche ALL im Speziellen

Die kindliche Akute lymphatische Leukämie, auch Akute lymphoblastische Leukämie genannt, macht 26% aller malignen Erkrankungen im Kindesalter aus. Am häufigsten betrifft sie Kinder im Alter von 1 bis 5 Jahren, wobei Jungen etwas öfter betroffen sind als Mädchen (1,2:1) (Kaatsch P und Spix C. 2015). Die ALL geht meist aus unreifen, lymphatischen Blasten des Knochenmarks, seltener auch aus reifen Lymphozyten, hervor und kann potenziell in alle Gewebe des Körpers infiltrieren. Häufig weisen Lymphknoten, Leber und Milz eine Infiltration auf, seltener aber auch Hirnhäute oder Hoden. Entsprechend wird bei ALL-Patienten neben umfassenden Untersuchungen prätherapeutisch eine Erhebung des Organbefalls durchgeführt. Vor Therapiebeginn wird außerdem eine immunologische Analyse des leukämischen Zellklons anberaumt, um dessen Reifegrad und B- oder T-Zelldifferenzierung zu bestimmen. In der großen Mehrheit der Fälle wird hierbei

eine monoklonale Expansion von Vorläuferzellen der B-Zelllinie festgestellt (Yiallourous M. 2012).

Die Inzidenz von ALL im Kindesalter steigt in Deutschland und Europa zwar jährlich um circa 0,7%, aber auch die Patientenzahlen mit einem Langzeitüberleben von mindestens 15 Jahren liegen mittlerweile bei 89% und steigen weiter (Kaatsch P und Spix C. 2015). Neben diesen sehr guten Prognosen konnte die Etablierung so genannter Prognosefaktoren außerdem die Rezidivraten und Nebenwirkungen maßgeblich reduzieren. So konnten klinische Studien von Kindern und Jugendlichen mit ALL prognostische Parameter ermitteln, um individuelle Therapien zu ermöglichen. Demnach hängen Krankheitsverlauf und Heilungsaussicht von positiven und negativen Prognosefaktoren und der daraus resultierenden Risikogruppe ab. Ein negativer Prognosefaktor ist das Philadelphia-Chromosom (Schrappe M. 2008), auf welches im nächsten Abschnitt im Detail eingegangen wird.

## 2.5 Das Philadelphia-Chromosom

Bei dem Philadelphia-Chromosom handelt es sich um eine balancierte Translokation zwischen den langen Armen der Chromosomen 9 und 22,  $t(9;22)(q34;q11)$ . Eine inkomplette Sequenz des *c-ABL*-Gens von Chromosom 9 wird auf das *BCR*-Gen von Chromosom 22 transloziert (Groffen J et al. 1983). 1985 konnte schließlich gezeigt werden, dass auf diese Weise auf Chromosom 22 ein neues Fusionsgen namens *BCR-ABL* entsteht (Shtivelman E et al. 1985).

BCR steht im Englischen für „breakpoint cluster region“. Obwohl das Fusionsprotein BCR-ABL ausführlich in Studien untersucht wurde, ist die Funktion des normalen BCR-Genprodukts noch nicht geklärt. Klar ist bisher nur, dass es eine Serin/Threoninkinaseaktivität (Maru Y und Witte ON. 1991) und eine GTPase-aktivierende Komponente aufweist (Kweon SM et al. 2008).

Der Proteinname *c-ABL* leitet sich von dem englischen Akronym „Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog 1“ ab. Das *c-ABL*-Gen an sich kodiert für eine gleichnamige Tyrosinkinase, die auch bekannt ist als ABL1. Es zählt zu den

Protoonkogenen, den Genen also, die, wenn mutiert, zu konstitutiv aktiven Onkogenen werden und somit krebsauslösend sind. Das „c“ in *c-ABL* steht für „zellulär“, um es von viralen Protoonkogenen, die mit einem „v“ gekennzeichnet sind, abzugrenzen. Im gesunden Zustand unterliegt das Genprodukt von *c-ABL* auf Grund seiner molekularen Beschaffenheit einem autoinhibitorischen Kontrollmechanismus, der *c-ABL* in seiner inaktiven Form hält. Durch die Fusion der Gene *BCR* und *c-ABL* verliert letzteres jedoch eine kleine N-terminale Region, die für eben diesen Kontrollmechanismus zuständig ist. Diese Störung der internen Kontrolle von *c-ABL* führt zu einer erhöhten Tyrosinkinaseaktivität im Fusionsprotein *BCR-ABL* (Nagar B et al. 2003).

Mit dem Wissen, dass das *c-ABL*-Protoonkogen eine Schlüsselfunktion in wichtigen Zellprozessen wie Wachstum, Überleben und Apoptose spielt (Sirvent A et al. 2008), ist es auch nicht erstaunlich, dass das *BCR-ABL*-Onkogen und dessen ungehemmte Tyrosinkinase regelmäßig in verschiedensten Leukämien gefunden werden. So kommt es, dass das Philadelphia-Chromosom in menschlichen Leukämien die am häufigsten vorkommende genetische Aberration ist und in 95% von CML-Patienten, in 20 bis 40% von erwachsenen ALL-Patienten, in 2 bis 5% von kindlichen ALL-Patienten und sehr selten auch in AML-Patienten nachgewiesen werden kann (Gleißner B et al. 2002). Leukämien, die das Philadelphia-Chromosom aufweisen, werden auch als Philadelphia-Chromosom positive Leukämien, Ph<sup>+</sup>-Leukämien, bezeichnet. Interessanterweise sind unterschiedliche Ph<sup>+</sup>-Leukämien mit unterschiedlichen *BCR-ABL*-Fusionsproteinen assoziiert (Radich JP et al. 1994). Mit welchem *BCR-ABL*-Protein die ALL im Kindesalter vergesellschaftet ist, wird im nachstehenden Textabschnitt erläutert.

### 2.5.1 *BCR-ABL* in kindlicher ALL

Obwohl nur 2 bis 5% der Kinder, die an ALL leiden, das Philadelphia-Chromosom aufweisen (Gleißner B et al. 2002), ist die kindliche Ph<sup>+</sup>-ALL zwar selten, wegen der relativen Häufigkeit von ALL im Kindesalter insgesamt jedoch keinesfalls eine Rarität (Kaatsch P und Spix C. 2015). In kindlicher ALL hat die Anwesenheit der

Philadelphia-Translokation eine stark negative prognostische Bedeutung. Betroffene Kinder haben trotz anderer positiver Prognosefaktoren, wie beispielsweise ein niedriger Leukozytenwert, ein kürzeres Überleben und werden daher bei der Risikostratifizierung in die Hoch-Risiko Gruppe eingeteilt (Bloomfield CD et al. 1986).

Die Transkription des Hybridgens *BCR-ABL* resultiert meistens in den Proteinen p190<sup>BCR-ABL</sup> und p210<sup>BCR-ABL</sup>, in selteneren Fällen auch in anderen *BCR-ABL*-Fusionsprodukten. Grund hierfür ist ein unterschiedlicher Bruchpunkt im *BCR*-Gen, der entweder zum Einbau der M-*BCR*-Region, „major *BCR* region“, führt und in dem Fusionsprotein p210<sup>BCR-ABL</sup> resultiert, oder der m-*BCR*-Region, „minor *BCR* region“, die im Fusionsprotein p190<sup>BCR-ABL</sup> zu finden ist. Namensgebend für beide Proteine ist ihre Masse in Kilodalton, einer in der Biochemie gebräuchlichen Masseneinheit. Im Kindesalter ist die Ph<sup>+</sup>-ALL meistens mit dem leichteren Protein p190<sup>BCR-ABL</sup> assoziiert, wohingegen p210<sup>BCR-ABL</sup> vielmehr das Kennzeichen der adulten CML ist. Unterschiedliche Fusionsprodukte weisen außerdem ein unterschiedlich malignes Transformationspotenzial auf. So konnte in Transfektionsversuchen und in transgenen Mausmodellen bereits für p190<sup>BCR-ABL</sup> ein höheres Transformationspotenzial als für p210<sup>BCR-ABL</sup> gezeigt werden (Gleißner B et al. 2002).

Interessanterweise werden für p190<sup>BCR-ABL</sup> in der Literatur auch Synonyme verwendet. So wurde sich auf p190<sup>BCR-ABL</sup> selten auch als p185/p190<sup>BCR-ABL</sup> bezogen (Rudolph C et al. 2005) und in aktuellerer Literatur deutlich häufiger als p185<sup>BCR-ABL</sup> (Mian AA et al. 2012; Rafiei A et al. 2015). Das Fusionsgen *BCR-ABL* wird in dieser Doktorarbeit im Kursivdruck mit *BA* abgekürzt und das entsprechende Fusionsprotein *BCR-ABL* im Normaldruck mit *BA* (s. a. Schepers K et al. 2013).

## 2.6 Die Doktorarbeit

Die Oostendorp Arbeitsgruppe hat bereits intensiv die Rolle von WNT-Signalen in normaler und maligner Hämatopoese erforscht (Schreck C et al. 2014) und konnte außerdem für SFRP1 dessen extrinsische Regulationsfunktion auf gesunde HSCs nachweisen (Renström J et al. 2009). Welchen extrinsischen Einfluss SFRP1 jedoch

auf maligne HSCs hat, bleibt noch zu klären und ist daher Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Hierfür boten sich Transplantationsversuche an, da diese optimale in vivo Bedingungen für die Untersuchung von hämatopoetischen Stammzellen darstellen. Um außerdem die Funktion eines Gens genauer zu verstehen, wird selbiges in der Forschung gerne ausgeschaltet, sodass durch die entstehenden Veränderungen Rückschlüsse auf die Genfunktion getroffen werden können. Deshalb setzt sich diese Doktorarbeit an Hand von Transplantationsversuchen mit der Untersuchung von *Sfrp1*-Knockoutmäusen (*Sfrp*<sup>-/-</sup>-Mäusen) auseinander.

Heute sind in der Fachliteratur bereits verschiedenste Leukämiemodelle mit adulten Mäusen zu finden. Jedoch blieb die Suche nach Leukämiemodellen mit juvenilen Mäusen, um kindliche Leukämien besser zu verstehen, bis vor ein paar Jahren erfolglos. Mit dem Ziel, den unterschiedlichen Bedingungen einer adulten und einer juvenilen Umgebung gerecht zu werden, etablierte die Oostendorp Arbeitsgruppe in Folge dessen erstmals Transplantationsversuche in einem juvenilen Leukämiemodell. Besonders hierbei war auch die Einführung der intrahepatischen Transplantationsmethode (Gitzelmann S. 2011). Mit der Hoffnung, Leukämien im kindlichen Organismus noch besser zu verstehen, wurde das juvenile Leukämiemodell auch in dieser Arbeit als Untersuchungsgrundlage herangezogen.

### 2.6.1 Aufbau der Doktorarbeit

Die Arbeit zu Händen setzte sich aus einem Vorversuch und einem Hauptversuch zusammen. Der Vorversuch bestand aus einer Transplantation, der Hauptversuch aus einer primären und einer sekundären Transplantation. Der Vorversuch diente hierbei lediglich zur Kalibrierung der Verfahrenstechniken für die primäre Transplantation des Hauptversuchs. Mit Ausnahme des Vorversuchs wurden sämtliche Daten zu Wildtypmäusen in Kooperation mit Dr. vet. Grziwok aus dem Oostendorp Labor erarbeitet. Da die primäre Transplantation den Großteil des Hauptversuchs ausmachte und bis auf wenige Änderungen vom Vorversuch abgeleitet war, wird im Folgenden exemplarisch der Aufbau des Vorversuchs

erläutert und anschließend noch kurz die sekundäre Transplantation. Die am Ende dieses Kapitels gezeigte Abbildung gibt eine Übersicht zu allen Versuchsteilen (s. S. 25, Abb. 5).

Für die Transplantation im Vorversuch wurden neugeborene Wildtypmäuse beider Geschlechter zunächst subletal bestrahlt, um deren körpereigene Hämatopoese mehrheitlich zu zerstören. Anschließend wurde ihnen ein HSC-reiches Zellgemisch fetaler Leber (FL) transplantiert. Da die fetale Mäuseleber ab dem embryonalen Entwicklungstag 12.5 (E12.5) der Hauptort hämatopoetischer Stammzellvermehrung und –differenzierung ist und zwischen Entwicklungstag E15.5 und E16.5 ein Maximum an HSCs beherbergt, wurde sie im Zeitraum E15.5-16.5 gewonnen (Ema H und Nakauchi H. 2000). Diese transplantierten HSCs sollten das bestrahlte Knochenmark repopulieren. Das HSC-reiche FL-Gemisch wurde vor der Transplantation mittels retroviralem Gentransfer entweder mit einem als Kontrolle dienenden *MIG*-Leervektor oder einem *BA*-Vektor infiziert. Letzterer war mit einem für das Protein p190<sup>BCR-ABL</sup> kodierenden Transgen bestückt. Ziel dieses Arbeitsschrittes war die Schaffung infizierter HSCs, mit dem Potenzial sich zu einer leukämischen Stammzelle, LSC, zu entwickeln. Außerdem waren beide Vektoren zur Kenntlichmachung mit dem Grünen Fluoreszenzprotein (GFP) bestückt. Wie effizient eine Transplantation abgelaufen ist, wurde am Grad des Engraftments bemessen, also wie gut die HSCs in ihrer Nische anwuchsen. Ein erfolgreiches Engraftment lag vor, wenn GFP<sup>+</sup>-Zellen >1% der Gesamtzellzahl im peripheren Blut ausmachten.

Da genetische Mutationen, die zur Entstehung kindlicher Leukämien führen können, bereits pränatal zu beobachten sind (Wiemels J. 2008), wurden bewusst fetale Leberzellen für die Transplantation verwendet, um so die intrauterine, onkogene Aktivierung bestmöglich zu simulieren. Es ist heutzutage außerdem bekannt, dass Leukämien, wie auch andere Krebsarten, nicht durch eine einzige Mutation ausgelöst werden, sondern vielmehr das Produkt mehrerer genetischer und/oder epigenetischer Veränderungen sind. Es wird daher ein Minimum von zwei Veränderungen angenommen, bei der die eine zu gesteigerter, durch Apoptose unbeeinflussbarer, Zellproliferation führt und die andere zu einem Differenzierungsblock (Lin YW und Aplan PD. 2004). Bezüglich dessen lässt sich zu Leukämien sagen, dass sie genetisch betrachtet recht „simpler gestrickt“ sind, da bei

ihnen oft nur drei oder sogar weniger Veränderungen beobachtet werden (Wiemels J. 2008). Von dem *BCR-ABL*-Gendefekt weiß man, dass er maßgeblich für die Transformation einer gesunden Zelle in eine leukämische Zelle verantwortlich ist (Pane F et al. 2002). Die Einbringung des onkogenen *BA*-Vektors in die neugeborenen Mäuse machte es daher sehr wahrscheinlich, dass sie eventuell Leukämien entwickelten und die Krankheit studiert werden konnte.

Bei der sekundären Transplantation, dem zweiten Teil des Hauptversuchs, wurden *BA*-WT-Zellen von primär transplantierten WT- oder *Sfrp1*<sup>-/-</sup>-Mäusen in sekundäre WT-Empfängermäuse weitertransplantiert.

## 2.6.2 Ziele und Fragestellungen der Doktorarbeit

Das übergeordnete Ziel dieser Doktorarbeit war die Klärung folgender Kernfrage: „Welche Rolle spielt das extrinsische SFRP1-Nischensignal auf leukämische Zellen und Leukämogenese?“ Zur Beantwortung dieser Frage waren drei komplexe Versuche notwendig. Abbildung 5 zeigt die Reihenfolge und den Aufbau aller Versuche in einer Übersichtsgrafik (s. S. 25, Abb. 5).

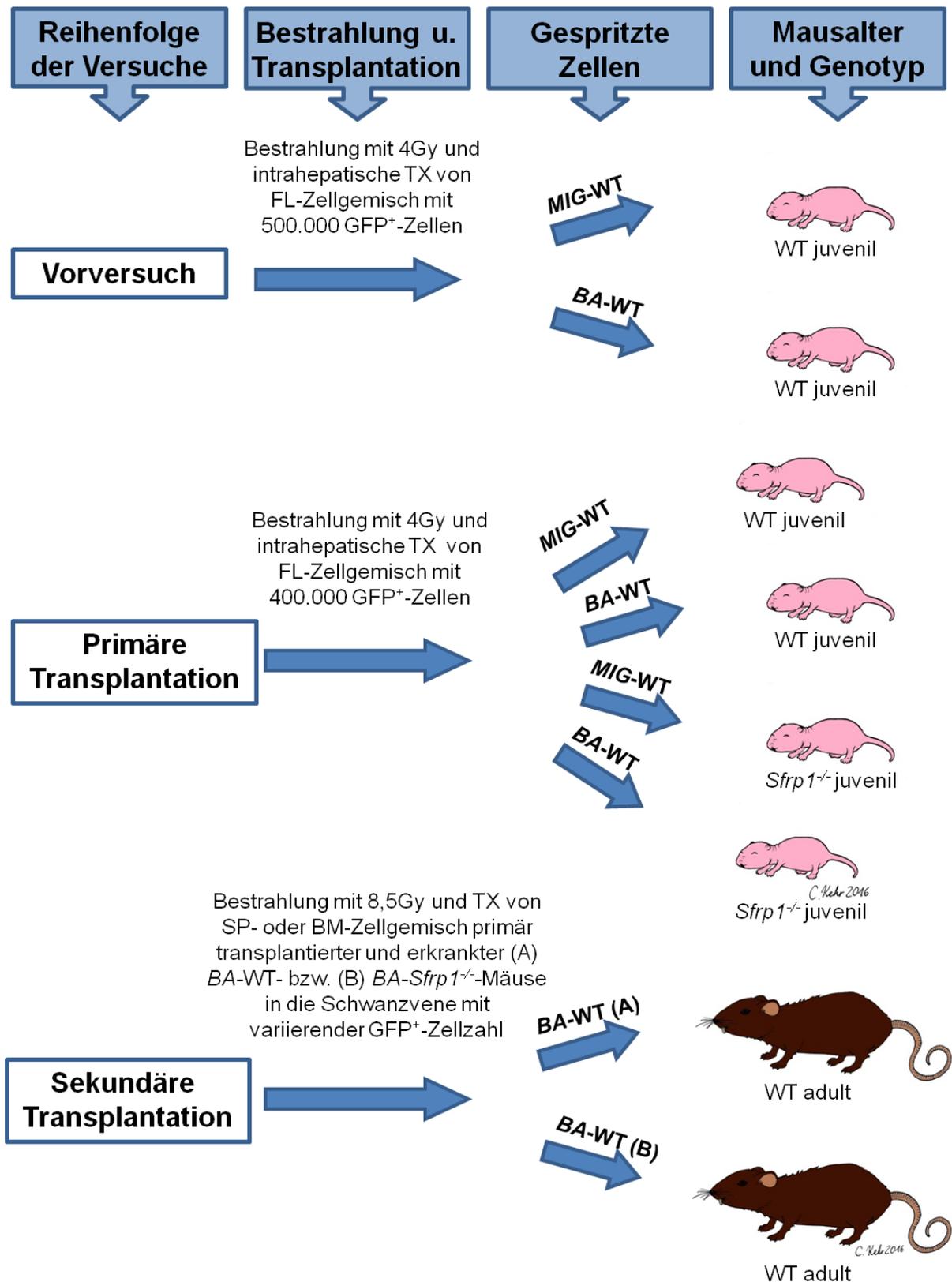
Der zu Beginn durchgeführte Vorversuch war lediglich von vorbereitender Natur und verfolgte das Ziel, eine geeignete GFP<sup>+</sup>-Spenderzellzahl für die primäre Transplantation des Hauptversuchs zu ermitteln. Die Spenderzahl sollte idealerweise so ausfallen, dass die Mehrheit der *BA*-Mäuse eine Leukämie entwickelte, dabei aber gleichzeitig nicht zu jung erkrankte. Zu jung erkrankte Tiere hätten wegen ihrer kleinen Anatomie eine erschwerte Gewebegewinnung bedeutet und ihre niedrigen Totalzellzahlen wären nachteilig für die Analyse gewesen.

Im Mittelpunkt der primären Transplantation des Hauptversuchs stand die oben formulierte Kernfrage. Hierfür galt es die folgenden drei Leitfragen zu beantworten.

- Erstens: „Welche phänotypischen Unterschiede bestehen bereits bei gesunden Mäusen zwischen den beiden Mausgenotypen?“ Um dieser Frage auf den Grund zu gehen, wurden die *MIG*-Populationen beider Genotypen verglichen.

- Zweitens: „Wie unterscheiden sich an Leukämie erkrankte und gesunde Mäuse im genetisch unveränderten Kontrollstamm?“ Hierfür wurden *MIG*- und *BA*-Mäuse des Wildtypstammes miteinander verglichen.
- Drittens: „Wie unterscheiden sich Leukämien zwischen dem *Sfrp1*-Knockoutstamm und dem als Kontrolle dienenden Wildtypstamm?“ Zur Beantwortung der letzten Leitfrage wurden die *BA*-Populationen der beiden Genotypen zum Vergleich gegenübergestellt.

Das Ziel der sekundären Transplantation des Hauptversuchs war es, die Reproduzierbarkeit der Leukämien zu beweisen und so durch Neumutationen spontan entstandene, bösartige Krankheiten auszuschließen. So sollte der Beweis geliefert werden, dass der Krankheitsursprung tatsächlich in den transplantierten, mit *BA*-Vektor infizierten GFP<sup>+</sup>-Zellen lag. Um dabei zusätzliche Erkenntnisse bezüglich geeigneter Spenderzellen für die sekundäre Transplantation zu erhalten, wurden die folgenden drei Parameter von Spenderzellen herangezogen: die Zellzahl, der Organursprung und ob Zellen im frischen Zustand oder nach Kältekonservierung weitertransplantiert wurden.



**Abbildung 5: Übersichtsgrafik des Vorversuchs und der primären und sekundären Transplantation (TX) des Hauptversuchs. FL=fetale Leber, SP=Milz, BM=Knochenmark.**

## 3. Material

### 3.1 Allgemeine Materialien

**Tabelle 1: Allgemeine Materialien.**

| Produkt   | Hersteller                         |
|---|------------------------------------|
| Blutlanzetten, Typ Supra                                | Megro, Wesel, DE                   |
| Einfrierflakon 2ml                                      | Corning , Corning, USA             |
| Filter 0,45/30/70/100µm                                 | BD Biosciences, Heidelberg, DE     |
| Filterspitzen TipOne™<br>10/100/200/1000µl              | Starlab, Hamburg, DE               |
| Glasaufsatzfilter, mit Vakuum<br>betrieben, Steritop®   | Millipore, Billerica, USA          |
| Nadeln, 100 Sterican®, 27 Gauge                         | B. Braun Melsungen, Melsungen, DE  |
| Nadeln, extra fein, 6/Stk.                              | Hamilton, Bonaduz, CH              |
| Petrischalen 10cm, mit<br>Wachstumsverstärker behandelt | Corning, Corning, USA              |
| Pipettierhilfe (Pipetboy)                               | Integra Biosciences, Fernwald, DE  |
| Polypropylen Zentrifugenröhrchen<br>15/50ml             | Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE |
| Serologiepipetten 1,5/5/10/25/50ml                      | BD Biosciences, Heidelberg, DE     |
| Sicherheitsverschlussröhrchen für<br>Mikrozentrifuge    | Eppendorf, Hamburg, DE             |
| S-Monovette®  | Sarstedt, Nümbrecht, DE            |
| U-40 Insulinspritzen Omnifix®, 1ml                      | B. Braun Melsungen, Melsungen, DE  |
| Spritzen mit Nadel, Sub-Q, 1ml                          | BD, Franklin Lakes, USA            |
| Spritzen Omnifix® zum<br>Einmalgebrauch 3/5/10/20/30ml  | B. Braun Melsungen, Melsungen, DE  |
| Spritzen, gasdicht, Typ 1710                            | Hamilton, Bonaduz, CH              |
| Zellkulturflaschen Cellstar®<br>125/250/550ml           | Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE |
| Zellkulturplatten mit 12 Einlässen                      | Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE |

## 3.2 Technische Instrumente

**Tabelle 2: Technische Instrumente.**

| Instrument          | Name  | Hersteller                                |
|---------------------|---|---|
| Bestrahlungseinheit | Gulmay  | Gulmay, Suwanee, USA                      |
| Blutmessgerät       | Counter Scil Vet Abc™<br>(Animal Blood Counter) | Scil vet academy,<br>Viernheim, DE        |
| Durchflusszytometer | CyAn™ ADP LxP8<br>CyAn™ ADP P9C                 | Beckman Coulter, Krefeld,<br>DE           |
| Eismaschine         | Seriennummer: 061244                            | Ziegra Eismaschinen,<br>Isernhagen, DE    |
| Linearbeschleuniger | Mevatron KD2                                    | Siemens, Erlangen, DE                     |
| Mikroskop           | Axiovert 25                                     | Carl Zeiss, Jena, DE                      |
| Präzisionswaage     | PLJ 2100-2M                                     | Kern & Sohn, Balingen,<br>DE              |
| Thermomixer         | Comfort   | Eppendorf, Hamburg, DE                    |
| Vortex              | IKA® MS1 minishaker                             | IKA Werke, Staufen im<br>Breisgau, DE     |
| Wasserbad           | SUB   | Grant Instruments,<br>Cambridgeshire, UK  |
| Werkbank, steril    | ANTARES 48/72                                   | Heraeus™ Instruments,<br>Hanau, DE        |
| Zählkammer          | Neubauer-improved                               | Paul Marienfeld, Lauda<br>Königshofen, DE |
| Zellinkubator       | Heracell 240®                                   | Heraeus™ Instruments,<br>Hanau, DE        |
| Zentrifuge          | Megafuge™ 3.0 RS,<br>Multifuge™ 3S              | Heraeus™ Instruments,<br>Hanau, DE        |

### 3.3 Biologische und chemische Reagenzien

**Tabelle 3: Biologische und chemische Reagenzien.**

| Reagenzien                                   | Hersteller                                |
|--|---|
| Albumin Fraktion V $\geq 98\%$ , bovin (BSA) | Carl Roth, Karlsruhe, DE                  |
| Beta-Mercaptoethanol                         | Life Technologies™, Darmstadt, DE         |
| Borgal®-Lösung 24%                           | Virbac, Bad Oldesloe, DE                  |
| Ciprofloxacin                                | Fresenius Kabi, Bad Homburg, DE           |
| Dimethylsulfoxid (DMSO)                      | SERVA Electrophoresis, Heidelberg, DE     |
| Diphtherietoxin                              | Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE            |
| Ethanol 99,8%                                | AppliChem, Darmstadt, DE                  |
| Ethidiumbromid-Lösung 1%                     | Carl Roth, Karlsruhe, DE                  |
| Fantasia Tattoofarben, hot pink              | Magic Moon Tattooing, Erkelenz, DE        |
| Fetales Kalbsserum (FCS)                     | PAA, Cölbe, DE                            |
| Formalin-Lösung 10%                          | Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE            |
| HBSS   | Life Technologies™, Darmstadt, DE         |
| HEPES  | Life Technologies™, Darmstadt, DE         |
| Hygromycin B                                 | Life Technologies™, Darmstadt, DE         |
| Isofluran 100%                               | Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA |
| Isopropanol                                  | Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE            |
| Lipofectamin 2000®                           | Life Technologies™, Darmstadt, DE         |
| mIL-3 (Maus-Interleukin-3)                   | R&D Systems, Wiesbaden, DE                |
| mIL-6 (Maus-Interleukin-6)                   | R&D Systems, Wiesbaden, DE                |
| m-SCF (Maus-Stammzellfaktor)                 | R&D Systems, Wiesbaden, DE                |
| Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)          | Life Technologies™, Darmstadt, DE         |
| Polybren                                     | Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE            |
| Propidium-Iodid (PI)                         | Life Technologies™, Darmstadt, DE         |
| Trypanblau                                   | Life Technologies™, Darmstadt, DE         |
| Trypsin 10x                                  | Life Technologies™, Darmstadt, DE         |
| DNAse (DNAse I, DN25)                        | Sigma-Aldrich Chemie, München, DE         |

### 3.4 Medien und Puffer

**Table 4: Handelsübliche Medien und Puffer.**

| Handelsübliche Medien und Puffer | Hersteller                        |
|----------------------------------|-----------------------------------|
| ACK Lysepuffer                   | Life Technologies™, Darmstadt, DE |
| DMEM                             | Life Technologies™, Darmstadt, DE |
| Dulbeccos PBS (DPBS)             | PAA, Cölbe, Deutschland           |
| IMDM                             | Life Technologies™, Darmstadt, DE |
| Opti-MEM®                        | Life Technologies™, Darmstadt, DE |
| Trypsin-EDTA 0,5% (10x)          | Life Technologies™, Darmstadt, DE |

**Table 5: Selbst erstellte Medien und Puffer.**

| Selbst erstellte Medien und Puffer      | Inhaltsstoffe   |
|---|---|
| Basales Knochenmarkmedium (BBMM), 500ml | 325ml IMDM mit L-Glutamin<br>150ml FCS<br>25ml BSA<br>2,5ml Pen/Strep (100x)<br>1ml Beta-Mercaptoethanol (50mM) |
| Einfriermedium (DMSO 11%), 50ml         | 44,5ml FCS<br>5,5ml DMSO  |
| FACS-Puffer, 500ml                      | 500ml DPBS<br>2,5g BSA  |
| HF2-Puffer, 1000ml                      | 860ml deionisiertes Wasser<br>100ml HBSS (10x)<br>20ml FCS<br>10ml HEPES<br>10ml Pen/Strep                      |
| Phoenix-Kulturmedium, 550ml             | 500ml DMEM<br>50ml FCS  |
| Selektionsmedium für Phoenix-Zellen     | 10ml DMEM<br>1ml FCS<br>60µl Hygromycin<br>10µl Diphtherietoxin   |

### 3.5 Antikörper

**Tabelle 6: Primäre Antikörper.**

| Primäre Antikörper                       | Klon     | Fluoreszenzstoff                              | Volumen pro 1x10 <sup>6</sup> Zellen | Hersteller                      |
|--|----------|---|--------------------------------------|---------------------------------|
| Biotin gebundenes Anti-Maus B220         | RA3-6B2  |   | 0,2µl                                | ebioscience, San Diego, CA, USA |
| Biotin gebundenes Anti-Maus CD3e         | 145-2C11 |   | 0,2µl                                | ebioscience, San Diego, CA, USA |
| Biotin gebundenes Anti-Maus CD11b        | M1/70    |   | 0,2µl                                | ebioscience, San Diego, CA, USA |
| Biotin gebundenes Anti-Maus GR-1 (Ly-6G) | RB6-8C5  |   | 0,2µl                                | ebioscience, San Diego, CA, USA |
| Biotin gebundenes Anti-Maus TER-119      | TER-119  |   | 0,2µl                                | ebioscience, San Diego, CA, USA |
| CD4                                      | GK1.5    | PE-Cy5  | 1µl                                  | ebioscience, San Diego, CA, USA |
| CD8a                                     | 53-6.7   | PE-Cy5  | 1µl                                  | ebioscience, San Diego, CA, USA |
| CD11b                                    | M1/70    | APC-eFluor®780                                | 1µl                                  | ebioscience, San Diego, CA, USA |
| CD34                                     | RAM34    | eFluor®647                                    | 2µl                                  | ebioscience, San Diego, CA, USA |
| CD45                                     | 30-F11   | APC-eFluor®780, eFluor®450, FITC, PE, PE-Cy5, | 1µl                                  | ebioscience, San Diego, CA, USA |

|               |         | PE-Cy5.5,<br>PE-Cy7   |     |                                       |
|---------------|---------|-----------------------|-----|---------------------------------------|
| CD45r (B220)  | RA3-6B2 | PE-Cy7                | 1µl | ebioscience,<br>San Diego,<br>CA, USA |
| CD117 (KIT)   | 2B8     | APC-eFluor®780,<br>PE | 3µl | ebioscience,<br>San Diego,<br>CA, USA |
| CD127 (IL7-R) | A7R34   | PE                    | 1µl | ebioscience,<br>San Diego,<br>CA, USA |
| GR-1 (Ly-6G)  | RB6-8C5 | eFluor®450            | 1µl | ebioscience,<br>San Diego,<br>CA, USA |
| SCA1          | D7      | PE-Cy7                | 3µl | ebioscience,<br>San Diego,<br>CA, USA |

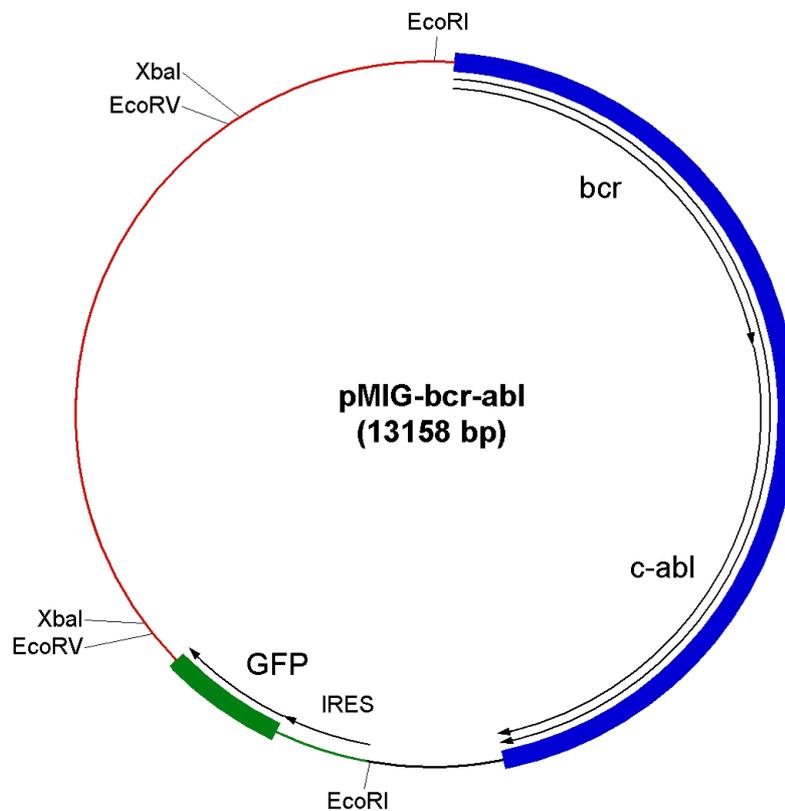
***Tabelle 7: Sekundäre Antikörper.***

| Sekundäre Antikörper | Fluoreszenzstoff | Volumen pro 1x10 <sup>6</sup> Zellen | Hersteller                           |
|----------------------|------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Streptavidin         | eFluor®450       | 0,5µl                                | Life Technologies™,<br>Darmstadt, DE |

### 3.6 Vektoren

**Tabelle 8: Vektoren.**

| Name                         | Labor  |
|------------------------------|--|
| MIG                          | Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der Bubnoff Gruppe (Miething C et al. 2003) |
| pMIG-p185 <sup>Bcr-Abl</sup> | Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der Bubnoff Gruppe (Miething C et al. 2003) |



**Abbildung 6: Vektorkarte vom pMIG<sup>BCR-ABL</sup>-Plasmid.** Der MIG-Vektor ist vom Murinen Stammzellvirus (MSZV) abgeleitet und beinhaltet die Gene für das Grüne Fluoreszenzprotein (GFP), eine Resistenz gegen Ampicillin (AMP), eine so genannte interne ribosomale Eintrittspforte (IRES) und das Fusionsonkogen p185<sup>BCR-ABL</sup> (Miething C et al. 2003). Der MIG-Kontrollvektor (hier nicht dargestellt) enthält nur GFP, AMP und IRES.

### 3.7 Zelllinien

**Tabelle 9: Zelllinien.**

| Name                     | Hersteller                                   |
|--------------------------|--|
| Phoenix-Zellen, ekotroph | G. Nolan, Stanford University, Stanford, USA |

### 3.8 Mausstämme

**Tabelle 10: Mausstämme.**

| Name  | Hersteller   |
|---|--|
| 129S2xB16J (Wildtyp)                            | Harlan Laboratories, Rossdorf, DE  |
| 129xB1/6 <i>Sfrp1</i> <sup>-/-</sup> (Knockout) | Vom Labor von Akihiko Shomono ursprünglich als <i>Sfrp1</i> <sup>-/-</sup> - <i>Sfrp2</i> <sup>+/-</sup> -Mäuse bekommen (Sato et al. 2006). Die <i>Sfrp1</i> <sup>-/-</sup> -Mäuse wurden aus Kreuzungen mit 129xB1/6 im ZPF gezüchtet. |

### 3.9 Software

**Tabelle 11: Software.**

| Name                         | Hersteller                           |
|------------------------------|--------------------------------------|
| Adobe Acrobat Reader DC      | Adobe Systems, Lehi, UT, USA         |
| FlowJo, Version 8.8.3        | FlowJo, Ashland, OR, USA             |
| Graphpad Prism, Version 5.01 | GraphPad Software, La Jollo, CA, USA |
| Microsoft Office 2007        | Microsoft, Redmond, WA, USA          |
| Microsoft Paint              | Microsoft, Redmond, WA, USA          |

## 4. Methoden

### 4.1 Phoenix-Zellen

Phoenix, oder  $\Phi$ NX, ist eine Verpackungszelllinie, die international zur Retrovirusproduktion für viralen Gentransfer Anwendung findet. Ursprünglich stammt Phoenix von der humanen, embryonalen Nierenzelllinie 293T ab, die das große SV40 T-Antigen trägt. Die Zelllinie 293T wurde genetisch so verändert, dass sie leere Viruspartikel produziert, die anschließend mit beliebigen Transgenen beladen werden können (Swift S et al. 2001). Beladene Viruspartikel sind infektiös, aber nicht replikationsfähig, sodass infizierte Wirtszellen nicht selber zu neuen Virusproduzenten werden. Auf diese Weise ist ein gezielter und kontrollierter Gentransfer gewährleistet. Hier verwendete Phoenix-Zellen produzierten ekotrophe Viren, das heißt Viren, die ausschließlich Ratten- und Mauszellen infizieren konnten (s. S. 36, Abb. 7).

#### 4.1.1 Phoenix-Selektion

Phoenix-Zellen wurden regelmäßig selektioniert, um sicherzustellen, dass sich keine funktionseinschränkende Mutationen einschlichen. Zur Selektion wurden Diphtherietoxin und Hygromycin B verwendet, gegen welche die Phoenix-Zellen Resistenzgene besaßen.

Zunächst wurden  $5 \times 10^6$  Phoenix-Zellen in 10ml Selektionsmedium suspendiert und anschließend in Cellstar Zellkulturflaschen 250ml bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> über Nacht inkubiert. Die Zellen wurden täglich gesplittet bis am Tag 2 bis 3 die Selektion einsetzte. Da Phoenix-Zellen adhärenz Zellen sind, schwammen tote Zellen im Medium und konnten durch Wechsel des Mediums aussortiert werden. Dieser Prozess wurde so lange fortgesetzt bis keine Zellen mehr starben. An diesem Zeitpunkt wurden die Zellen als Passage „null“ definiert. Im Anschluss wurden die

Zellen entweder bis Passage fünf (P5) gezogen, um in Versuchen verwendet zu werden, oder sie wurden nur bis P3 gezogen und für spätere Benutzung eingefroren.

#### 4.1.2 Phoenix-Passagierung

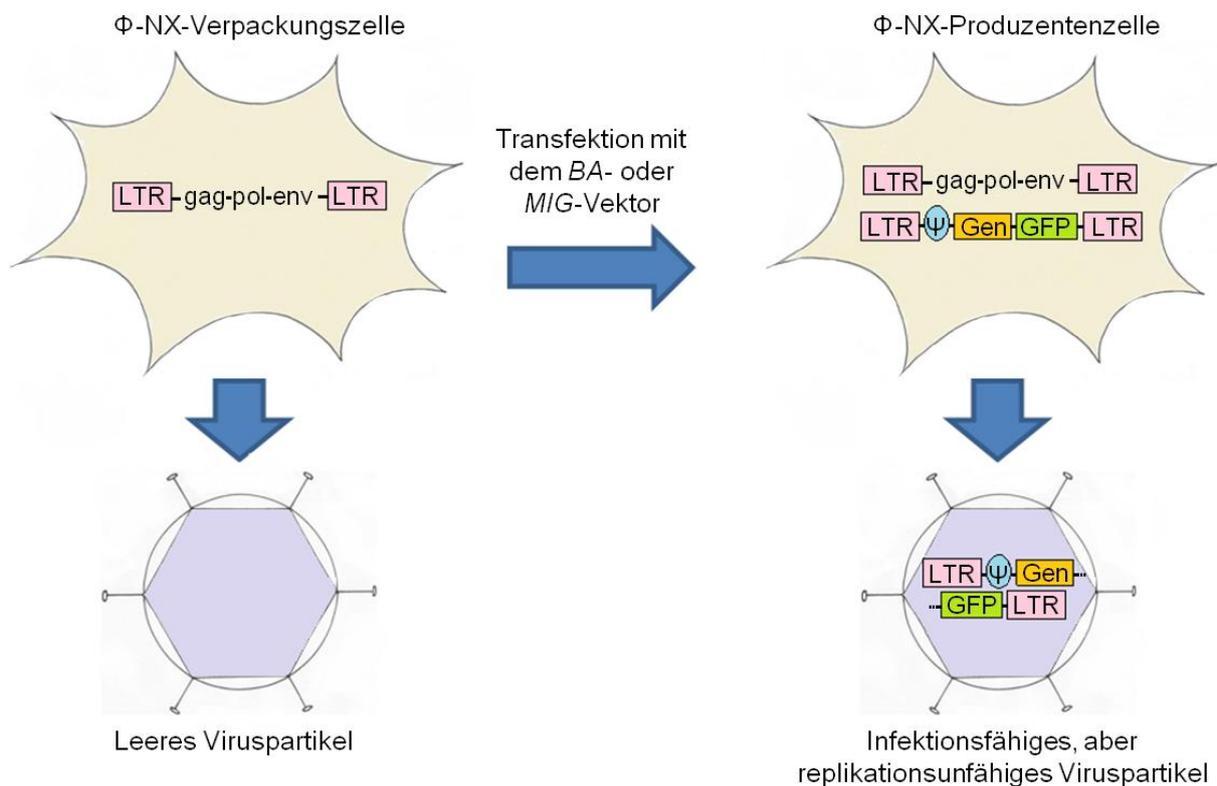
Der Generationszyklus von Phoenix-Zellen betrug etwa 24 Stunden, weshalb eine tägliche Splittung der Zellen nötig war. Die Zellen wurden in frisch gefiltertem Phoenix-Medium in Cellstar Zellkulturflaschen der Größen 125/250/550ml gezogen. Wegen der Adhärenz von Phoenix-Zellen wurde teilweise mit DPBS verdünnte Trypsinlösung (Verhältnis 10:1) verwendet, die das Ablösen der Zellen von den Zellkulturflaschen erleichterte.

#### 4.1.3 Phoenix-Transfektion

Bei der Transfektion wurden die Phoenix-Zellen mit Plasmiden transfiziert, die entweder das Transgen *MIG* oder *MIG-p185<sup>Bcr-Abl</sup>* trugen. Nur die Phoenix-Zellpassagen P5 bis P10 wurden für diesen Arbeitsschritt verwendet, da vor P5 keine gute Virusproduktion zu erwarten und nach P10 eine erneute Selektion der Zellen vonnöten war. Aufgetaute Phoenix-Zellen mussten drei Passagen gezogen werden, bevor sie zu einer guten Virusproduktion im Stande waren. Abbildung 7 zeigt eine schematische Darstellung der Transfektion (s. S. 36, Abb. 7).

Bei der Transfektion wurden zwei Ansätze hergestellt. Im ersten Ansatz wurden jeweils 200µg Vektor-DNA, einmal *MIG*- und einmal *BA*-DNA, in 5ml Opti-MEM aufgenommen und für 5 - 10min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Im zweiten Ansatz wurden 20ml Opti-MEM mit 800µl Lipofectamin 2000 gemischt und ebenfalls 5 - 10min bei RT inkubiert. Der zweite Ansatz wurde nun zur Hälfte auf die beiden Vektorengemische verteilt und anschließend weitere 40min bei RT inkubiert. Auf diese Weise erhielt man je Vektor ein Gemisch von rund 15ml. Pro Vektor wurden nun 10 Petrischalen mit je  $4 \times 10^6$  Phoenix-Zellen transfiziert. Dafür erhielt jede

Schale 1,5ml von dem Vektorgemisch und wurde anschließend mit 3,5ml Phoenix-Medium aufgefüllt. Nun erfolgte die Transfektion für 4h im Inkubator bei 37°C unter 5% CO<sub>2</sub>. Danach wurde das Medium durch basales Knochenmarkmedium (BBMM) ersetzt und über Nacht bis zur ersten Infektion wieder im Inkubator bebrütet.



**Abbildung 7: Schematische Darstellung der Transfektion von Phoenix-Zellen.** Die LTR-Sequenzen (long terminal repeats) regulieren die Genexpression. Gag, env und pol sind Strukturgene, die für die Bildung des leeren Viruspartikels verantwortlich sind.  $\psi$  (Psi) ist eine Verpackungssequenz, sodass das Viruspartikel mit dem Transgen beladen werden kann. GFP (Grünes Fluoreszenzprotein) dient zur Kenntlichmachung infizierter Zellen.

#### 4.1.4 Infektion fetaler Leberzellen via Phoenix-Retroviren

Zum Gentransfer wurden fetale Mausleberzellen durch die von Phoenix produzierten Retroviren infiziert. Dazu wurden die fetalen Leberzellen auf Zellkulturplatten mit je zwölf Einlässen gegeben, wobei ein Einlass  $6 \times 10^6$  bis  $7 \times 10^6$  Zellen enthielt. Die

Zellen wurden in mit Wachstumsfaktoren angereichertem BBMM bei 37°C unter 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Insgesamt wurden die fetalen Leberzellen viermal im Abstand von 12h infiziert. Zu Beginn einer Infektion wurde der Virusüberstand von den Phoenix-Zellen abgenommen und gesammelt. Die Phoenix-Zellen erhielten erneut BBMM und wurden wieder inkubiert. Das Medium der fetalen Leberzellen wurde gesammelt und zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in BBMM resuspendiert und wieder auf die Zellkulturplatten verteilt. Das BBMM war pro Milliliter Endvolumen mit je 1µl wachstumsfördernden mL-3, mL-6, m-SCF und mit 0,5µl infektionseffizienzsteigerndem Polybren angereichert. Der gesammelte Virusüberstand wurde ebenfalls wieder auf die Einlässe der Zellkulturplatten verteilt. Anschließend wurden die Zellkulturplatten für 90min mit 2400U/min bei 32°C zentrifugiert.

Nach dem vierten Durchgang wurden die infizierten, nun transgenen, Leberzellen gesammelt, abzentrifugiert und in HF2-Puffer aufgenommen. Bevor die FL-Zellen für Versuche verwendet werden konnten, wurde der Erfolg der Infektion mittels GFP-Positivität im Durchflusszytometer ermittelt.

## 4.2 Mäuse

Alle in den Versuchen verwendeten Mäuse wurden im Zentrum für Präklinische Forschung (ZPF) gemäß den FELASA Empfehlungen unter spezifisch Pathogen freien (SPF) Bedingungen gehalten. Zur Unterscheidung adulter Tiere wurde ein Nummernkode in ihre Ohren gestanzt. Um neugeborene Mäuse unterscheiden zu können, wurde bei einem Teil der Mäuse mit einer Blutlanzette eine Vorderpfote mit Tattoofarbe rot tätowiert.

Im Erkrankungsfall wurden Mäuse entsprechend den Auflagen des Tierschutzgesetzes (Abschnitt 3, §4, Absatz 3) euthanasiert. Um hierbei das Leiden von Mäusen so minimal wie möglich zu halten, zogen die Tierpfleger folgende Parameter heran, um den Krankheitsstatus der Mäuse zu beurteilen: Rückzugsverhalten und Isolation von der Gruppe, ein gekrümmter Rücken, starke

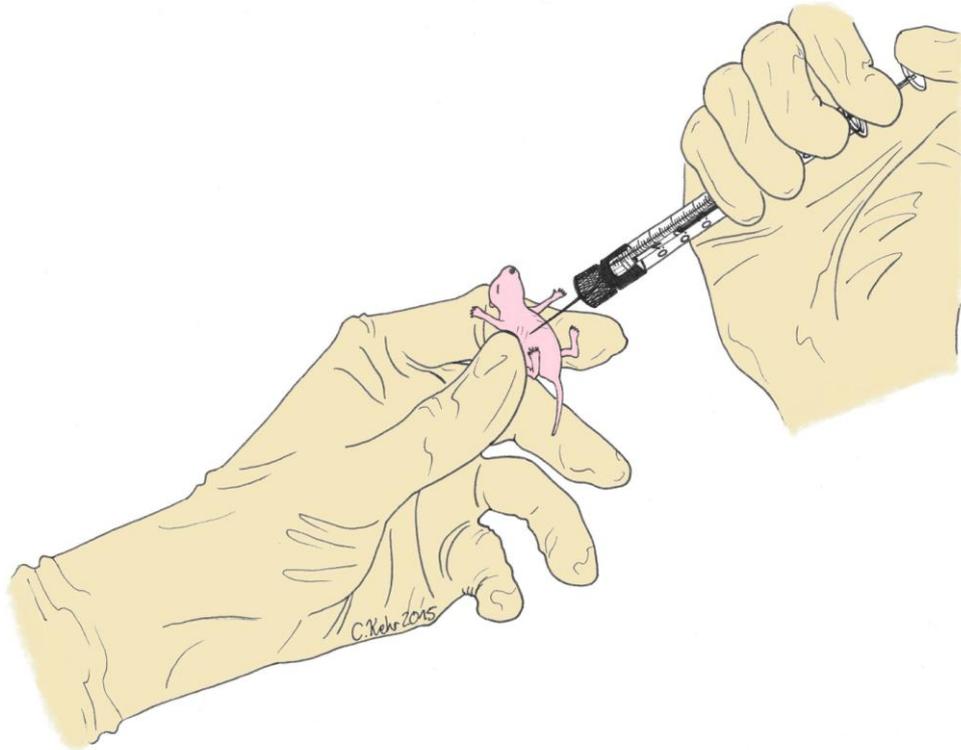
Bewegungsunlust und ein ausfallendes, struppiges Fell. Waren eins oder mehrere dieser Parameter positiv, wurde der Forscher umgehend verständigt. Dieser musste schnellstmöglich, persönlich den Zustand der Maus evaluieren und bei Bestätigung des Krankheitsstatus die Maus euthanasieren.

### 4.3 Vorversuch

Für den Vorversuch wurde eine Spenderzellzahl von  $500 \times 10^3$  GFP-positiven, fetalen Leberzellen von Wildtypmäusen gewählt. Da die FL-Infektionsrate variierte und lediglich GFP<sup>+</sup>-Zellen für die Spenderzellzahl ausschlaggebend war, hing die transplantierte Gesamtzellzahl von deren prozentualem Anteil erfolgreich infizierter GFP<sup>+</sup>-Zellen ab. Im Vorversuch ging es nicht um die Untersuchung von SFRP1, daher wurde dieser nur an Wildtypmäusen durchgeführt. *MIG*-WT-Mäuse dienten als Kontrollpopulation für *BA*-WT-Mäuse, da bei ihnen auf Grund des *MIG*-Leervektors keine Erkrankung zu erwarten war.

Um eine juvenile Leukämie möglichst genau zu simulieren, wurden im Vorversuch neugeborene Mäuse beider Geschlechter zwischen erstem bis einschließlich fünftem Lebensstag verwendet. Vor der Transplantation wurden die Tiere mit 4Gy subletal bestrahlt. Je nach Verfügbarkeit dienten hierzu die Bestahlungseinheiten Gulmay oder Mevatron KD2. Anschließend wurde den Mäusen ein FL-Zellgemisch mit  $500 \times 10^3$  GFP<sup>+</sup>-Zellen intrahepatisch gespritzt (s. S. 39, Abb. 8). Das Zellgemisch pro Maus war in 20µl HF2-Puffer suspendiert. Durch die hohe Hauttransparenz neugeborener Mäuse ließ sich deren Leber leicht lokalisieren. Auf Grund der kleinen anatomischen Beschaffenheit der jungen Mäuse wurden besonders feine Nadeln und gasdichte Spritzen der Firma Hamilton für die Punktion benutzt (s. S. 39, Abb. 8). Nach erfolgter Transplantation wurde den Mäusen als Prophylaxe gegen Infektionen für sechs Wochen das Chemotherapeutikum Borgal 2mg/ml (Sulfadoxin 200mg/ml mit Trimethoprim 40mg/ml) ins Trinkwasser gegeben. Als Versuchsende galt entweder die Erkrankung und somit Euthanasierung der letzten *BA*-WT-Maus oder im Falle ihres Nichterkrankens der Versuchsabbruch bei frühestens Tag 100 nach Transplantation. Die nicht erkrankten *MIG*-WT-Mäuse wurden mit der letzten

*BA*-WT-Maus euthanasiert. Das Überleben von Mäusen wurde in Tagen ab Transplantationstermin, einschließlich des selbigen, bemessen.



**Abbildung 8:** Schematische Darstellung der intrahepatischen Transplantation einer neugeborenen Maus.

#### 4.4 Primäre Transplantation

Die primäre Transplantation war der erste und gleichzeitig größere Teil des Hauptversuchs. Bis auf wenige Änderungen glich der Aufbau der primären Transplantation dem im Vorversuch. Zur Untersuchung von SFRP1 wurden hier *Sfrp1*-Knockoutmäuse verwendet und Wildtypmäuse dienten als Kontrollpopulation. Wie schon im Vorversuch wurden auch im Hauptversuch *MIG*-WT-Mäuse als Kontrollgruppe für *BA*-WT-Mäuse verwendet und zusätzlich *MIG-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Mäuse für *BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Mäuse. Es wurden wieder Mäuse beider Geschlechter zwischen erstem bis einschließlich fünftem Lebenstag für die Transplantation verwendet. Auch hier wurde davor mit 4Gy subletal bestrahlt. Auf Grund neu gewonnener Erkenntnisse im Vorversuch, welche später in der Diskussion thematisiert werden, wurde jedoch die

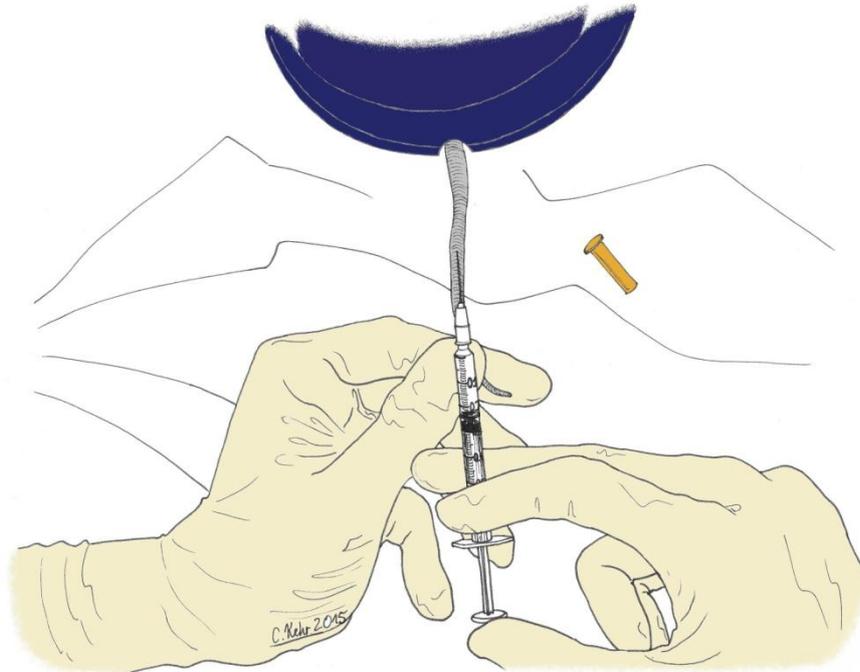
GFP<sup>+</sup>-Spenderzellzahl für die primäre Transplantation auf  $400 \times 10^3$  GFP<sup>+</sup>-WT-Zellen reduziert. Wie schon im Vorversuch war die gespritzte Gesamtzellzahl variabel. Die Spenderzellen pro Maus waren in 20  $\mu$ l HF2-Puffer suspendiert und wurden wieder intrahepatisch mit Nadeln und Spritzen von Hamilton appliziert (s. S. 39, Abb. 8). Anschließend wurde dem Trinkwasser der Versuchstiere wieder für sechs Wochen Borgal 2mg/ml zugesetzt. Als Versuchsende galt abermals die Euthanasierung der zuletzt erkrankten BA-WT-Maus oder bei deren Nichterkranken der Versuchsabbruch bei frühestens Tag 100 nach Transplantation. Zu diesem Zeitpunkt wurden auch wieder die nicht erkrankten MIG-WT-Mäuse euthanasiert. Auch hier wurde das Überleben von Mäusen in Tagen ab Transplantationstermin, einschließlich des selbigen, bemessen.

## 4.5 Sekundäre Transplantation

Die sekundäre Transplantation machte den zweiten Teil des Hauptversuchs aus. Hierbei wurden GFP<sup>+</sup>-WT-Zellen von primär transplantierten, erkrankten *Sfrp1*<sup>-/-</sup>-Mäusen oder WT-Mäusen in sekundäre WT-Empfängermäuse weitertransplantiert. Weil dabei weder die Untersuchung von SFRP1 noch die Simulation eines juvenilen Leukämie Modells von Bedeutung waren, wurden weder Knockoutmäuse noch neugeborene Mäuse als Empfänger verwendet, sondern acht Wochen alte, männliche Wildtypmäuse. Des Weiteren waren hierfür auch keine MIG-WT-Kontrollmäuse erforderlich.

Die Mäuse wurden vor der Transplantation mit 8,5Gy letal bestrahlt, um sämtliche körpereigenen HSCs zu zerstören. Transplantierte GFP<sup>+</sup>-Zellen wurden frisch oder nach Kältekonservierung weitertransplantiert und stammten entweder vom Knochenmark oder der Milz. Je nachdem, wie viele Zellen aus den Organen gewonnen werden konnten, wurden zwischen  $600 \times 10^3$  und  $2,2 \times 10^6$  GFP<sup>+</sup>-Zellen pro Maus gespritzt. Da der prozentuale GFP<sup>+</sup>-Anteil auch in Knochenmark und Milz variabel war, variierte somit auch die gespritzte Gesamtzellzahl. Die Transplantation erfolgte mit 1ml-Spritzen vom Typ Sub-Q in die Schwanzvene, Vena caudalis mediana (s. S. 41, Abb. 9). Nach der Transplantation wurde den Mäusen

Borgal 2mg/ml als Infektionsprophylaxe ins Trinkwasser gegeben. Das Überleben der Mäuse wurde wie schon in den vorigen Versuchen in Tagen ab Transplantationstermin, einschließlich des selbigen, bemessen.



**Abbildung 9: Schemadarstellung der Transplantation in die Schwanzvene einer adulten Maus.** Mausekörper unter abgedunkeltem Gefäß.

## 4.6 Zellgewinnung aus Mausgeweben

Bei allen Versuchen wurden folgende Gewebe analysiert: peripheres Blut (PB), Knochenmark (BM) und Milz (SP). Die verwendeten Abkürzungen ergeben sich aus dem Englischen. Falls eine erkrankte Maus eine optische Vergrößerung von Leber oder Thymus zeigte, oder einen Tumor aufwies, wurde dieses Gewebe ebenfalls analysiert. Im Folgenden wird auch die Gewinnung von fetaler Leber (FL) für die Infektion erläutert. Zwischen Gewinnung und weiterer Nutzung oder Analyse von Zellen wurden diese stets auf Eis gekühlt.

Das periphere Blut (PB) einer Maus wurde umgehend nach deren Euthanasierung aus den Herzhöhlen gewonnen. Hierzu wurden S-Monovetten verwendet.

Das Knochenmark (BM) pro Maus wurde aus den zwei Oberschenkelknochen (Femores) und den zwei Schienbeinknochen (Tibiae) einer Maus gewonnen. Im Folgenden wird hierfür die Abkürzung F+T verwendet. Für die Gewinnung wurden die Knochen freipräpariert, entnommen und an den Epiphysen abgeschnitten. Auf diese Weise waren die Röhrenknochen mit einer Sterican Nadel passierbar und das Mark konnte mit HF2-Puffer ausgespült werden. Nach Filtern (30µm Filter) und Zentrifugieren wurde das Zellpellet wieder in HF2-Puffer resuspendiert und konnte weiterverwendet werden.

Die Zellaufbereitung von Leber-, Milz (SP)-, Thymus- und Tumorzellen glich sich in allen Verfahrensschritten und wird deshalb gesammelt beschrieben. Jedes dieser Mausegewebe wurde separat freipräpariert, entnommen, zerquetscht und mit HF2-Puffer durch einen 70µm Filter gespült. Danach wurde die Zellsuspension durch einen feineren 30µm Filter gespült, zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet mit HF2-Puffer resuspendiert.

Für die Gewinnung fetaler Leber (FL) wurden zunächst adulte Wildtypmäuse verpaart. Um Trächtigkeit bei den Weibchen festzustellen, wurden diese morgens und abends auf einen vaginalen Pfropf untersucht. Letzterer ist ein Zeichen für kürzlich stattgefundene Begattung und wurde somit als Tag 0.5 nach Begattung definiert. Die Muttertiere wurden zwischen Tag 15.5 und 16.5, teilweise schon am Tag 14.5, nach Begattung euthanasiert und die noch nicht lebensfähigen Jungtiere freipräpariert. Die fetalen Lebern wurden entnommen, gesammelt, zerdrückt und mit HF2-Puffer erst durch einen gröberen 70µm Filter, dann durch einen 30µm Filter gespült und zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in HF2-Puffer resuspendiert, die Zellen gezählt und bis zur Infektion eingefroren.

## 4.7 Zellanalyse

Die Analyse solider Gewebe sowie von Blut wurde fast gänzlich mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Lediglich von Blut wurde zur Bestimmung der totalen Blutzellzahlen zusätzlich ein Blutbild mit dem Blutmessgerät Counter Scil Vet

Abc angefertigt. Für die durchflusszytometrische Untersuchung mussten die Zellen jedoch zuerst gezählt werden.

Die Arbeitsschritte für das Zählen von frischen und aufgetauten Zellen unterschieden sich nicht. Lediglich die für die Transplantation aufgetauten FL-Zellen stellten eine Besonderheit dar, weil sie vor dem Zählen zunächst einem DNase-Verdau unterzogen werden mussten. Dabei handelt es sich um eine Prozedur, die freie DNA toter Zellen zersetzt, sodass lebende Zellen beim Zählen nicht verklumpen. Hierfür wurden die aufgetauten FL-Zellen in HF2-Puffer aufgenommen, zentrifugiert und in 1ml HF2-Puffer und 20µl DNase für 15min bei RT inkubiert. Anschließend glichen sich die Prozeduren von aufgetauten FL-Zellen und von den übrigen Zellen. Für das Zählen wurden alle Zellen zunächst durch Filtrieren und Zentrifugieren aufbereitet und anschließend in 1ml HF2-Puffer aufgenommen. Danach wurde 1µl der Zellsuspension entnommen, dieser mit HF2-Puffer auf 1:10 oder 1:100 verdünnt und mit Trypanblau im Verhältnis 1:1 gemischt. Trypanblau färbte tote Zellen, sodass in der Neubauer Zählkammer nur lebende Zellen weiß imponierten und gezählt werden konnten. Dann konnte die Zellanalyse je nach Verfügbarkeit mit dem CyAn ADP LxP8 oder dem CyAn ADP P9C Durchflusszytometer (FACS) durchgeführt werden. Die gewonnenen Daten wurden mit der Software FlowJo 8.8.3 analysiert und in Microsoft Office Excel 2007 und Graphpad Prism 5.01 ausgewertet.

#### 4.7.1 Durchflusszytometrie

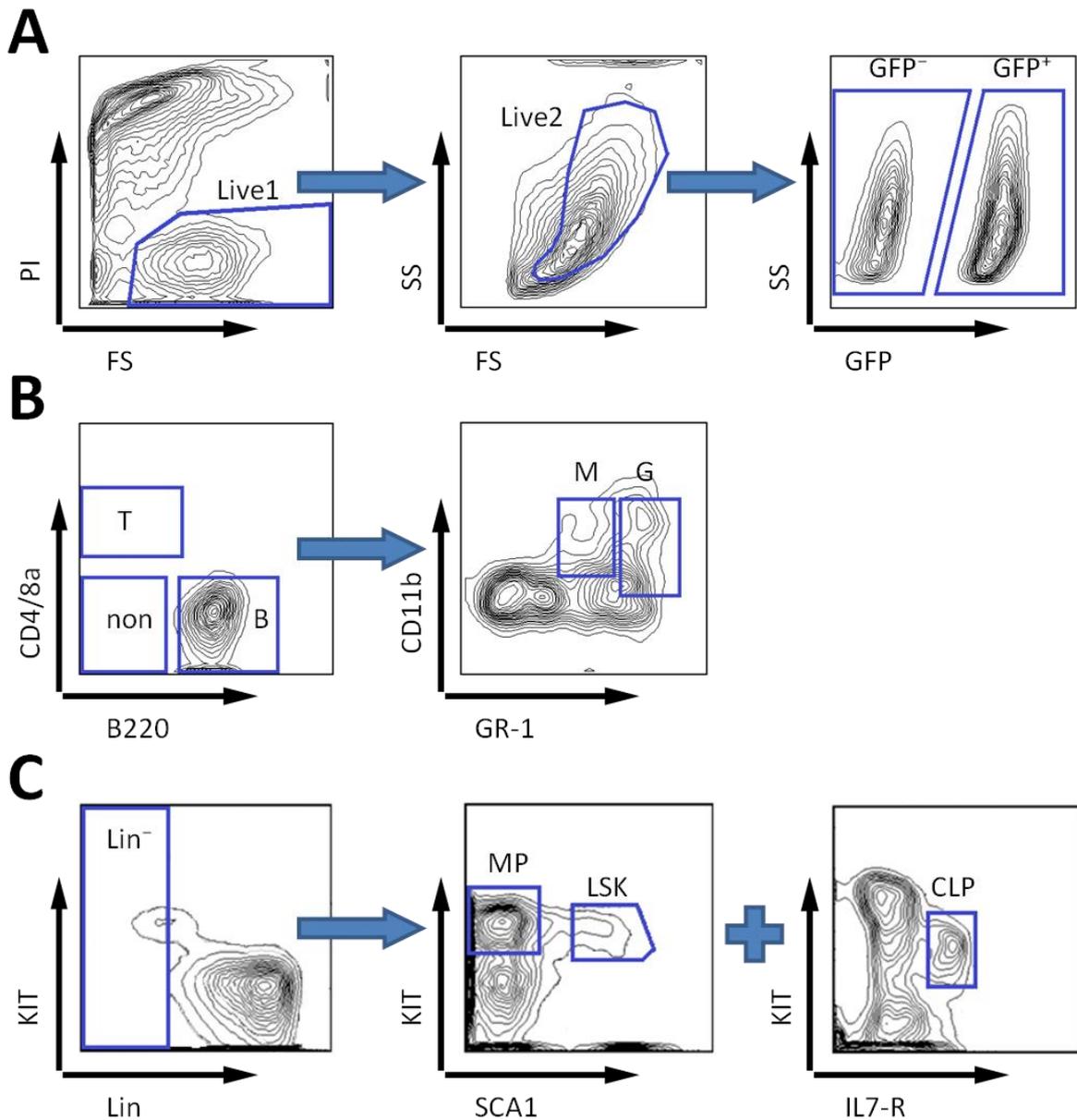
Die Durchflusszytometrie ist ein wissenschaftliches Verfahren, das in kürzester Zeit große Zellzahlen analysieren kann und sich daher gut eignet, um Aussagen zu ganzen Zellpopulationen zu treffen. Bei ihr fließen Zellen mit hoher Geschwindigkeit durch einen Kanal und werden so zu einem Strahl gebündelt, dass die Zellen nacheinander, einzeln einen Flusskanal passieren. Laserstrahlen detektieren die vorbeifließenden Zellen und abhängig von der entstehenden Lichtstreuung und -brechung können Aussagen zur Zellmorphologie getroffen werden. Durch das zusätzliche Anfärben von Oberflächenantigenen mit Fluoreszenzfarbstoff markierten

Antikörpern lassen sich die Zellen noch weiter analysieren und in Populationen einordnen.

In dieser Arbeit wurden die Populationen von Leukozyten, deren Vorläufern und von hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) angefärbt. Dabei wurde das Augenmerk ausschließlich auf die transplantierten GFP<sup>+</sup>-Wildtypzellen und ihre Subpopulationen gelegt; die Ergebnisse also, welche die malignen Zellen einer Leukämie darstellten. Reife Leukozyten wurden mit einer „Reifezellfärbung“ und unreife Vorläufer und HSCs mit einer „Stammzellfärbung“ gefärbt. Erstere wurde für peripheres Blut, Knochenmark-, Milz-, Leber- und Tumorgewebe gebraucht und letztere für Knochenmark- und Milzgewebe. Je Mausgewebe wurden pro Maus  $3 \times 10^6$  Zellen für die Reifezellfärbung und  $6 \times 10^6$  Zellen für die Stammzellfärbung verwendet. Teilweise wurden die Zellen jedoch wegen Zellknappheit im Verhältnis 1/3 zu 2/3 auf die Reifezell- und die Stammzellfärbung aufgeteilt. Erythrozytenreiches Gewebe wurde vor der durchflusszytometrischen Untersuchung zur Erythrozytenlyse für 15min in ACK-Lysepuffer auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen in 100µl FACS-Puffer mit einem primären Antikörper für 15min bei 4°C im abgedunkelten Kühltank gefärbt. Dabei wurde die Antikörpermenge stets so gewählt, dass das gefärbte Oberflächenantigen der Zellen vollständig gesättigt war. Danach wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen. Diese Schritte wurden für die Stammzellfärbung ein zweites Mal wiederholt, um mit einem sekundären Antikörper zu färben. Um bei der Analyse tote von lebenden Zellen unterscheiden zu können, wurde Propidium-Iodid (PI) in der Konzentration 1µg/ml zur Hilfe genommen, welches die toten Zellen rot färbte.

Die ersten drei Schritte beider Färbungen waren identisch und werden in der untenstehenden Abbildung 10 A (s. S. 45) dargestellt. In diesen ersten Schritten ging es darum, lebende und tote Zellen aufzutrennen und die Zellen in GFP-negative und GFP-positive Zellen zu teilen. Anschließend wurden in den weiteren Schritten der Reifezellfärbung B- und T-Lymphozyten sowie die nicht-lymphoiden „non-B, non-T“-Zellen aus der GFP<sup>+</sup>-Population geschleust; Granulozyten und Monozyten wurden wiederum aus der „non-B, non-T“-Population geschleust (s. S. 45, Abb. 10 B). In der Stammzellfärbung wurden Lin<sup>-</sup>-Zellen nach den gemeinsamen Arbeitsschritten stets aus der GFP<sup>+</sup>-Population und LSKs, MPs und

CLPs aus der Lin<sup>-</sup>-Population geschleust (s. u. Abb. 10 C). Zum Teil wurden CLPs auch direkt aus der GFP<sup>+</sup>-Population geschleust.



**Abbildung 10: Schemadarstellung der Zellfärbungen für die Durchflusszytometrie.** (A) Die ersten Schritte beider Zellfärbungen an Hand vom Knochenmark einer BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>-Maus. (B) Die darauffolgenden Schritte der Reifezellfärbung mit Bildern der obigen Maus. (C) Die darauffolgenden Schritte der Stammzellfärbung mit Bildern, die freundlicherweise von Dr. Schreck aus dem Oostendorp Labor zur Verfügung gestellt wurden und in abgewandelter Form dargestellt sind (Schreck C. 2015).

## 4.8 Statistik

Bei der Datenanalyse wurden Mittelwerte, Standardfehler und Signifikanzen erhoben. Für die Signifikanzmessung wurde der ungepaarte T-Test und auch der Mann-Whitney-U-Test (U-Test) durchgeführt, um so bei der Analyse sowohl den normalverteilten Daten (T-Test) als auch den nicht normalverteilten Daten (U-Test) gerecht zu werden. Das Überleben wurde mittels der Kaplan-Meier-Methode dargestellt und mit dem Logrank-Test (Mantel-Cox-Test) auf Signifikanz überprüft. In allen drei Tests wurde mit einem Signifikanzniveau von  $\alpha=0,05$  gearbeitet. Ein P-Wert kleiner 0,05 ( $p<0,05$ ) galt also als signifikant. Die P-Werte und die Abbildungen von signifikanten Ergebnissen wurden stets im T-Test mit einem Sternchen (\*), im U-Test mit einem Gradzeichen (°) und im Logrank-Test mit einem Nummernzeichen (#) versehen. Ob Daten, die stark vom Mittelwert abwichen, als Ausreißer gewertet werden durften, wurde mit dem Dean-Dixon-Ausreißertest überprüft.

## 5. Ergebnisse

Das übergeordnete Ziel dieser Doktorarbeit war, die extrinsische Rolle von SFRP1 auf leukämische Zellen und Leukämogenese zu klären. Deshalb wurden für Mäuse an Hand klinischer Erkrankungszeichen (Rückzugsverhalten und Isolation von der Gruppe, ein gekrümmter Rücken, starke Bewegungsunlust und ein ausfallendes, struppiges Fell) und gemäß ihrer Zelldifferenzierung in der Reifezellfärbung des Knochenmarks drei Leukämietypen definiert:

- Lymphatischer Typ: GFP-positive B- und T-Zellen (lymphatische Zellen) machen  $\geq 50\%$  aller GFP<sup>+</sup>-Zellen aus.
- Myeloischer Typ: GFP-positive Granulozyten und Monozyten (myeloische Zellen) machen  $\geq 50\%$  aller GFP<sup>+</sup>-Zellen aus.
- Gemischter Typ: Sowohl lymphatische als auch myeloische Zellen machen jeweils  $\geq 25\%$  aller GFP<sup>+</sup>-Zellen aus.

Die Definitionsgrenze von 50% mag niedrig erscheinen, ist aber in Anbetracht der Tatsache, dass das Leiden von Mäusen sehr früh beendet wurde und sich damit auch die Leukämien in einem frühen, oder sogar initialem Stadium befanden, gerechtfertigt.

In dieser Arbeit wurden Wildtypmäuse (WT-Mäuse) nach Transplantation mit *MIG*- oder *BA*-Vektor bestückten Wildtypzellen (*MIG*-WT- bzw. *BA*-WT-Zellen) als *MIG*-WT-Mäuse oder als *BA*-WT-Mäuse bezeichnet. *Sfrp1*<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden entsprechend als *MIG-Sfrp1*<sup>-/-</sup>-Mäuse oder als *BA-Sfrp1*<sup>-/-</sup>-Mäuse bezeichnet (s. S. 48, Tab. 12). Zur Revision der Normblutwerte im Ergebnisteil gibt die nachfolgende Tabelle 13 eine Übersicht.

**Tabelle 12: Bezeichnung von Mäusen vor und nach Transplantation (TX).**

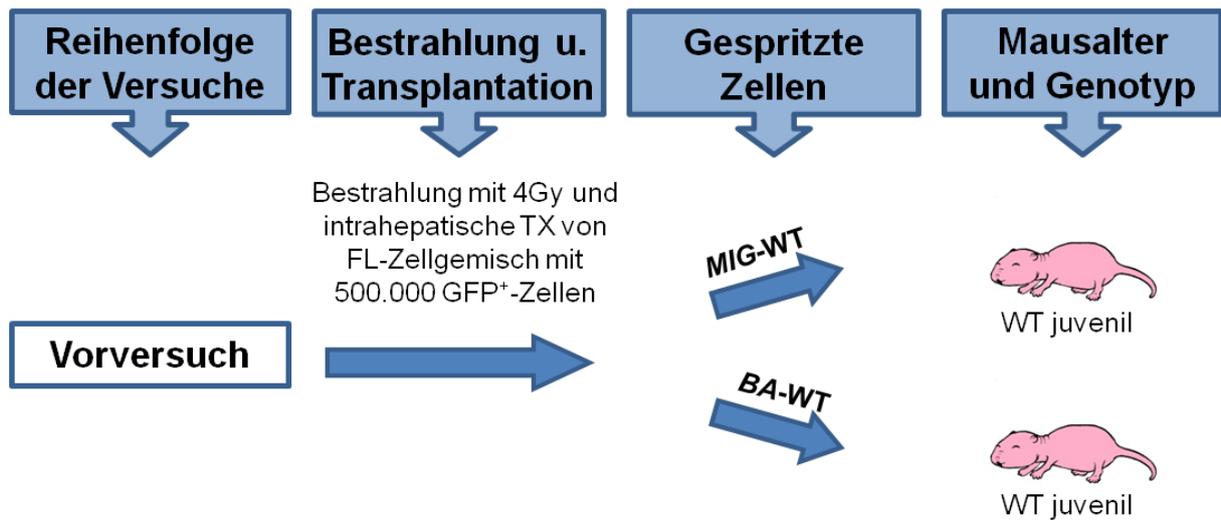
| Mausbezeichnung vor TX            | Spenderzellen | Mausbezeichnung nach TX                |
|-----------------------------------|---------------|--|
| WT-Maus                           | MIG-WT        | MIG-WT-Maus                            |
| WT-Maus                           | BA-WT         | BA-WT-Maus                             |
| <i>Sfrp1</i> <sup>-/-</sup> -Maus | MIG-WT        | MIG- <i>Sfrp1</i> <sup>-/-</sup> -Maus |
| <i>Sfrp1</i> <sup>-/-</sup> -Maus | BA-WT         | BA- <i>Sfrp1</i> <sup>-/-</sup> -Maus  |

**Tabelle 13: Normwerte der Maus im peripheren Blut (PB), gemessen am Blutmessgerät Counter Scil Vet Abc.**

| Zelltyp                             | Normwert     |
|-------------------------------------|--------------|
| Leukozyten in 10 <sup>3</sup> /μl   | 3,00 - 15,00 |
| Lymphozyten in 10 <sup>3</sup> /μl  | 1,20 - 3,20  |
| Erythrozyten in 10 <sup>6</sup> /μl | 5,00 - 12,0  |
| Thrombozyten in 10 <sup>3</sup> /μl | 140 - 600    |

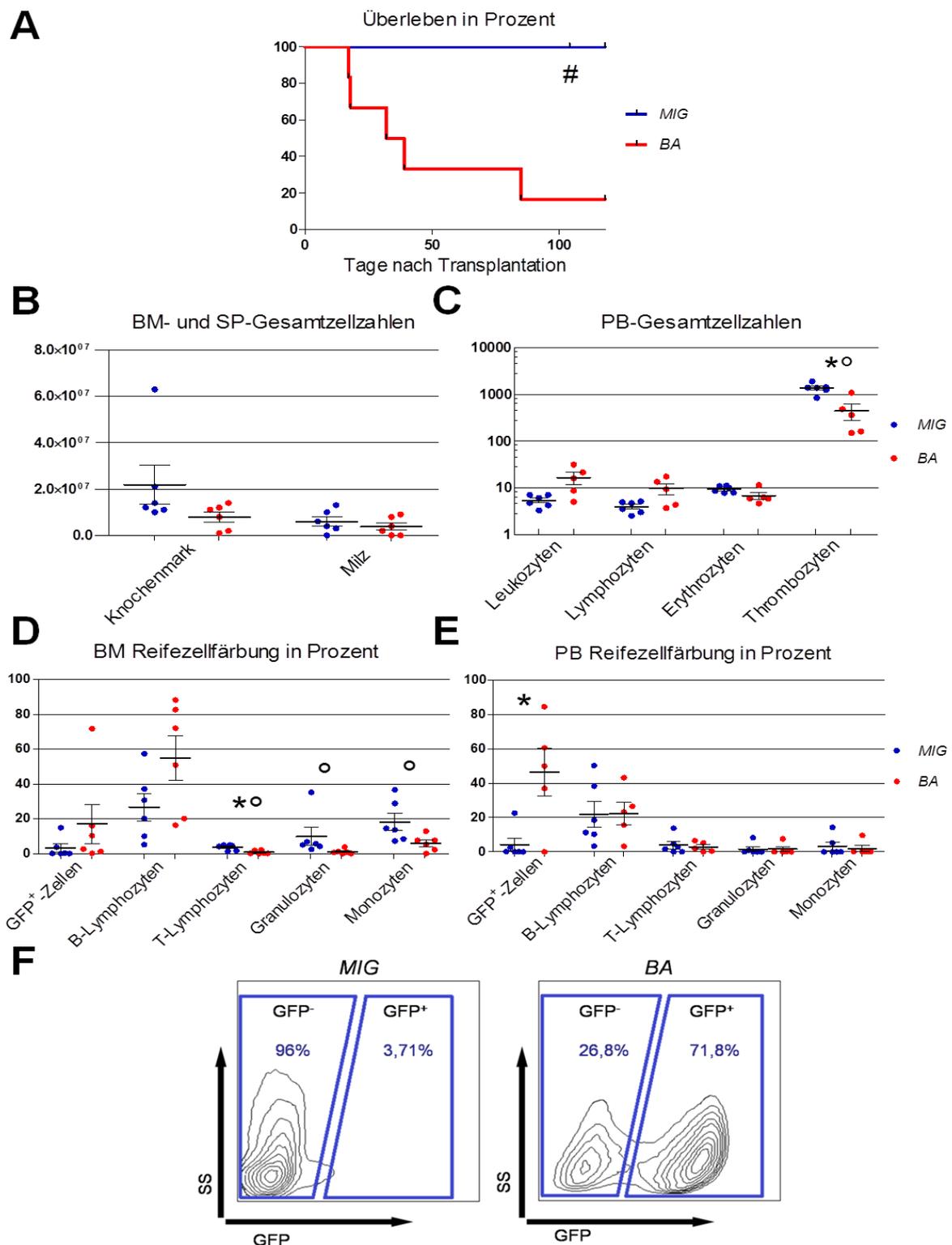
## 5.1 Vorversuch

Der Vorversuch diente als Vorbereitung für die primäre Transplantation des Hauptversuchs, indem er für diese eine geeignete GFP<sup>+</sup>-Spenderzellzahl ermitteln sollte. Dabei sollte die Spenderzellzahl zwei Kriterien erfüllen: sie sollte zum einen so hoch wie nötig gewählt werden, sodass die Mehrheit der BA-WT-Mäuse eine Leukämie entwickelte und zum anderen so niedrig wie möglich, sodass die Empfänger nicht zu früh erkrankten.



**Abbildung 11: Übersichtsgrafik zum Versuchsaufbau des Vorversuchs.** TX=Transplantation, FL=fetale Leber.

Der Vorversuch wurde in zwei separaten Versuchsansätzen durchgeführt, um die Auswirkungen möglicher Fehlerquellen zu minimieren. Insgesamt wurden sechs *MIG*- und sechs *BA*-Wildtypmäuse untersucht. Fünf der sechs *BA*-WT-Mäuse erkrankten zwischen Tag 17 und Tag 39. Eine *BA*-WT-Maus erkrankte nicht und somit wurde mit ihr der Versuch nach 118 Tagen beendet. Das mittlere Überleben von *BA*-WT-Mäusen lag bei Tag 32 nach Transplantation; der Tag also, an dem 50% der *BA*-WT-Mäuse erkrankt sind. Die *MIG*-WT-Mäuse blieben ohne Erkrankung und wurden regelgerecht mit der letzten *BA*-WT-Maus euthanasiert. Das Überleben der Populationen unterschied sich signifikant mit einer mittleren Lebenszeit der *BA*-WT-Mäuse von 35,5 Tagen ( $p^{\#}=0,004$ ) (s. S. 50, Abb. 12 A). Das Blut einer *BA*-WT-Maus wurde nicht analysiert, die Zellzahlwerte der Milz zweier *BA*-WT-Mäuse und von einer *MIG*-WT-Maus ergaben null und das Milzgewicht einer weiteren *BA*-WT-Maus wurde nicht erhoben. Da es im Vorversuch vorerst darum ging, eine geeignete Spenderzellzahl für die primäre Transplantation zu finden, reichte die Reifezellfärbung aus.



**Abbildung 12: Ergebnisüberblick des Populationsvergleichs von MIG-WT-Mäusen und BA-WT-Mäusen des Vorversuchs.** (A) Kaplan-Meier-Überlebenskurve mit 6 MIG-WT- und 6 BA-WT-Mäusen. (B) Gesamtzellzahlen von Knochenmark (BM) und Milz (SP). (C) Gesamtzellzahlen vom peripheren Blut (PB). Leukozyten, Lymphozyten und Thrombozyten in  $10^3/\mu\text{l}$  und Erythrozyten in  $10^6/\mu\text{l}$ . (D) Reifzellfärbung vom Knochenmark (BM) in Prozent. (E) Reifzellfärbung vom peripheren Blut (PB) in Prozent. (F) FACS-Bilder der Reifzellfärbung vom Knochenmark (BM) in Prozent am Beispiel einer gesunden MIG-WT-Maus und einer erkrankten BA-WT-Maus.

### 5.1.1 Gesamtzellzahlen

Die Knochenmarkmittelwerte der *MIG*-WT-Mäuse lagen pro zwei Oberschenkelknochen (Femores) und zwei Schienbeinknochen (Tibiae) (F+T) bei  $21,8 \times 10^6$  gegenüber  $8 \times 10^6$  bei *BA*-WT-Mäusen und die Milzmittelwerte lagen in *MIG*-WT-Mäusen pro Milz bei  $6 \times 10^6$  versus  $3,8 \times 10^6$  in *BA*-WT-Mäusen (s. S. 50, Abb. 12 B).

In der Blutmessung mittels Bloodcounter zeigten die Leukozyten im Mittel in *MIG*-WT-Mäusen  $5,4 \times 10^3/\mu\text{l}$  und in *BA*-WT-Mäusen  $16,5 \times 10^3/\mu\text{l}$  ( $p^\circ=0,04$ ). Lymphozyten lagen in *MIG*-WT-Mäusen durchschnittlich bei  $4,0 \times 10^3/\mu\text{l}$  und in *BA*-WT-Mäusen bei  $9,7 \times 10^3/\mu\text{l}$ . Die Erythrozytenwerte lagen im Normbereich und unterschieden sich nicht (s. S. 48, Tab. 13). Die Thrombozyten unterschieden sich signifikant ( $p^*=0,003$  und  $p^\circ=0,009$ ) mit durchschnittlich  $1377 \times 10^3/\mu\text{l}$  in *MIG*-WT- und  $450 \times 10^3/\mu\text{l}$  in *BA*-WT-Mäusen (s. S. 50, Abb. 12 C).

### 5.1.2 Knochenmark

Die Reifezellfärbung des Knochenmarks zeigte bei *MIG*-WT-Mäusen 3,2%, bei *BA*-WT-Mäusen 17,0%  $\text{GFP}^+$ -Zellen. Ausreißer waren eine *MIG*-WT-Maus mit fast 15% und eine *BA*-WT-Maus mit knapp 72%  $\text{GFP}^+$ -Zellen (Dean-Dixon-Ausreißertest). Die  $\text{GFP}^+$ -B-Zellpopulation lag in der *BA*-WT-Gruppe bei 55,1% und in der Kontrollgruppe bei 26,8%. Die  $\text{GFP}^+$ -T-Lymphozyten unterschieden sich signifikant ( $p^*=0,008$  und  $p^\circ=0,03$ ) mit im Schnitt 3,6% in *MIG*-WT- und 0,8% in *BA*-WT-Mäusen. Im U-Test unterschieden sich außerdem die Granulozyten ( $p^\circ=0,004$ ) und die Monozyten ( $p^\circ=0,03$ ) signifikant (s. S. 50, Abb. 12 D. F).

In absoluten Zahlen brachte die Reifezellfärbung des Knochenmarks in der *MIG*-WT-Population im Schnitt  $82,3 \times 10^3$   $\text{GFP}^+$ -Zellen hervor, in der *BA*-WT-Population  $411,2 \times 10^3$ . Davon waren in *MIG*-WT-Mäusen  $40,3 \times 10^3$  B-Zellen

und  $3,9 \times 10^3$  T-Zellen, in *BA*-WT-Mäusen  $358,4 \times 10^3$  B-Zellen und  $0,2 \times 10^3$  T-Zellen. *MIG*-WT-Mäuse besaßen im Schnitt  $5,2 \times 10^3$  Granulozyten und  $10,2 \times 10^3$  Monozyten, *BA*-WT-Mäuse  $0,2 \times 10^3$  Granulozyten und  $1,7 \times 10^3$  Monozyten.

### 5.1.3 Milz

Die Milzgewichte beider Mauspopulationen unterlagen einer großen Varianz. Der *MIG*-WT-Mittelwert lag bei 91,4mg und der *BA*-WT-Mittelwert bei 120,5mg. Die Reifezellfärbung zeigte, dass Milzen von *BA*-WT-Tieren zu 22,6% und die von *MIG*-WT-Tieren zu 5,1% grün waren. Davon waren auf der *BA*-WT-Seite 24,7% B-Zellen und auf der *MIG*-WT-Seite 15,5%. Grün fluoreszierende T-Zellen machten 5,8% bei *BA*-WT- und 17,9% bei *MIG*-WT-Mäusen aus. Beide Mausstämme wiesen ungefähr 1% Granulozyten und 4% Monozyten auf.

In absoluten Zahlen ausgedrückt, zeigten *MIG*-WT-Tiere im Schnitt  $58,4 \times 10^3$  GFP<sup>+</sup>-Milzzellen und *BA*-WT-Tiere  $334,7 \times 10^3$ . Anteilig davon waren in *MIG*-WT-Tieren  $15,5 \times 10^3$  B-Lymphozyten und  $14,3 \times 10^3$  T-Lymphozyten, in *BA*-WT-Tieren  $219,3 \times 10^3$  B-Lymphozyten und  $6,0 \times 10^3$  T-Lymphozyten. Auch hier unterschieden sich die Granulozyten- und Monozytenmittelwerte kaum.

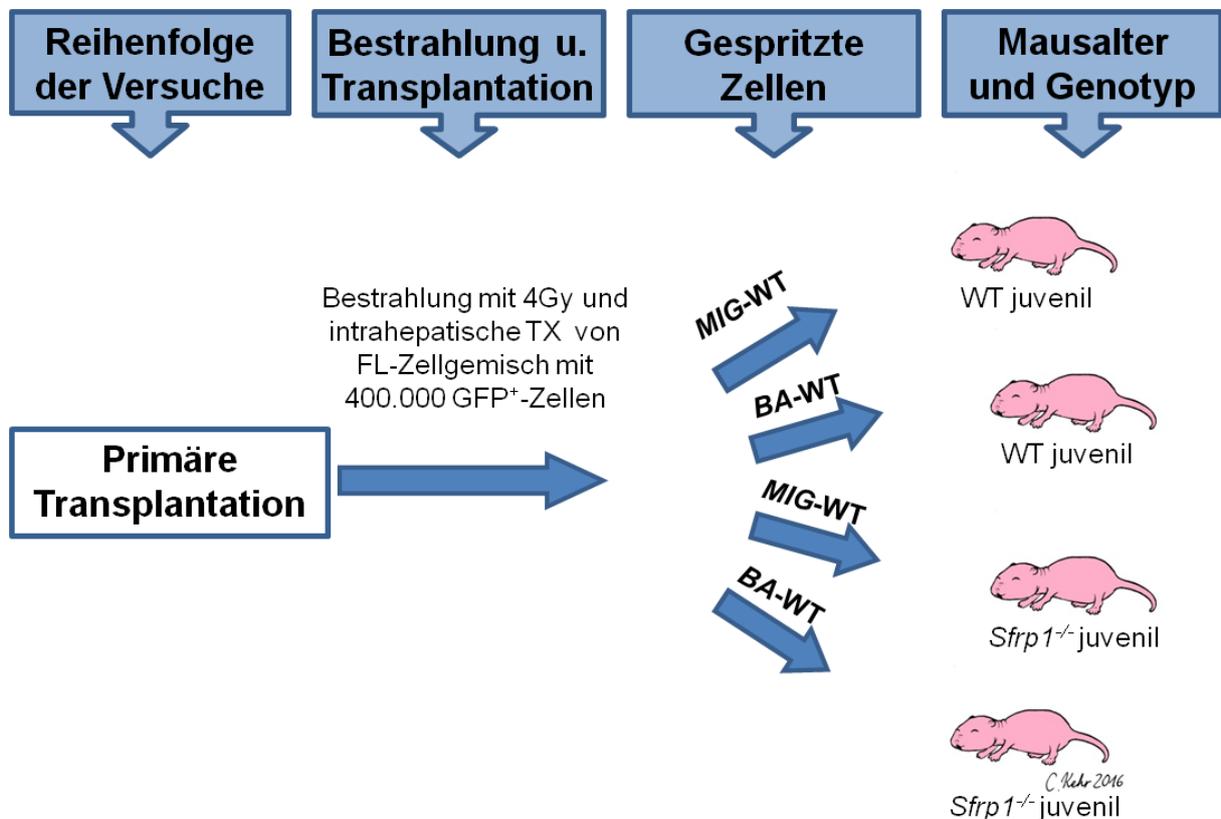
### 5.1.4 Peripheres Blut

Im peripheren Blut unterschieden sich die Leukozyten in ihrer Grünfärbung signifikant ( $p^*=0,04$ ). Der *MIG*-WT-Mittelwert von GFP<sup>+</sup>-Leukozyten lag bei 4,3%, der entsprechende *BA*-WT-Wert bei 46,5%. Ausreißer war die schon bei der Knochenmarkanalyse hervorgestochene *MIG*-WT-Maus mit fast 23% GFP<sup>+</sup>-Zellen (Dean-Dixon-Ausreißertest). Beide Mausgruppen wiesen rund 22% B-Zellen und etwa 3-4% T-Zellen auf. Auch die Granulozyten und Monozyten waren in beiden Gruppen fast identisch und lagen bei 1-4% (s. S. 50, Abb. 12 E).

In absoluten Zahlen unterschieden sich die Populationen wieder signifikant bezüglich GFP-Positivität ( $p^*=0,04$  und  $p^{\circ}=0,02$ ) mit im Schnitt  $0,1 \times 10^3$  Zellen in *MIG-WT*- und  $0,9 \times 10^3$  Zellen in *BA-WT*-Tieren.

## 5.2 Hauptversuch, primäre Transplantation

Die primäre Transplantation sollte die Kernfrage der Doktorarbeit beantworten: „Welche Rolle spielt das extrinsische SFRP1-Nischensignal auf leukämische Zellen und Leukämogenese?“ Die drei hierfür definierten Leitfragen sind den jeweiligen Unterkapiteln vorangestellt. Auf Grund neuer Erkenntnisse aus dem Vorversuch wurde außerdem die GFP<sup>+</sup>-Spenderzellzahl von  $500 \times 10^3$  auf  $400 \times 10^3$  gesenkt. Warum die Spenderzellzahl geändert wurde, wird in der Diskussion erläutert.



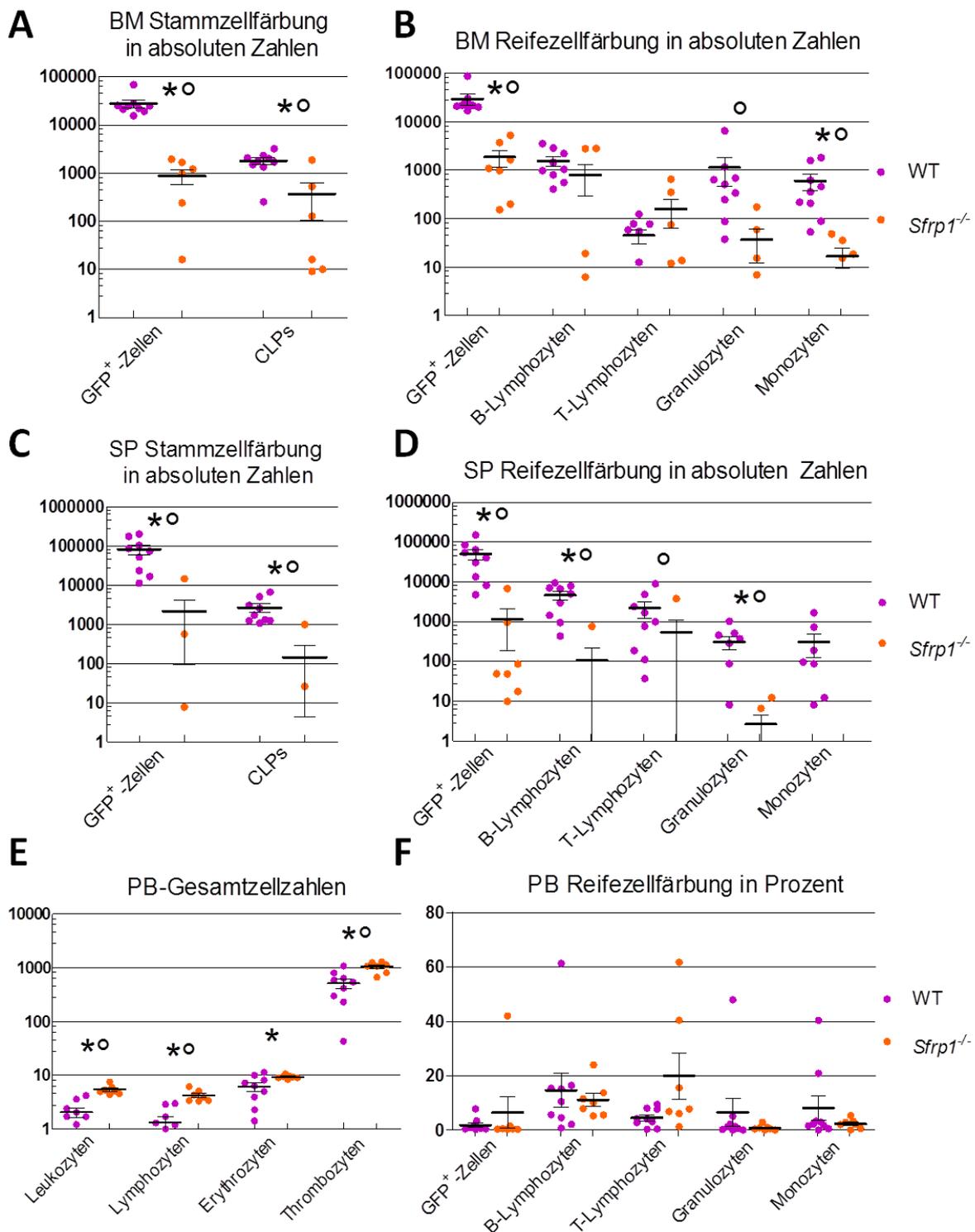
**Abbildung 13: Übersichtsgrafik zum Versuchsaufbau der primären Transplantation des Hauptversuchs.** TX=Transplantation, FL=fetale Leber.

Zur Minimierung von Fehlern wurde die primäre Transplantation im Wildtypstamm in zwei und im *Sfrp1*-Knockoutstamm sogar in drei separaten Versuchsansätzen durchgeführt. Insgesamt wurden dabei für im Kontrollstamm sieben *BA*-WT- und neun *MIG*-WT-Mäuse, im Knockoutstamm acht *BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>*- und sieben *MIG-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Mäuse untersucht. Im *Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Stamm war ein dritter Versuchsansatz erforderlich, da die Mausmutter beim zweiten Versuch fünf ihrer sechs transplantierten Mäusebabys aufgefressen hatte.

### 5.2.1 *MIG-Sfrp1<sup>-/-</sup>* gegen *MIG*-Wildtyp

„Welche phänotypischen Unterschiede bestehen bereits bei gesunden Mäusen zwischen den beiden Mausgenotypen?“ Um diese erste Leitfrage zu klären, wurden die *MIG*-Populationen beider Genotypen verglichen. Diese Fragestellung lehnte sich zwar an die Publikation von Renström an (s. a. Renström J et al. 2009), weshalb auch die Reproduzierung ähnlicher Ergebnisse zu erwarten war, die Versuchswiederholung war hier dennoch notwendig, um eine versuchsinterne Vergleichsgrundlage zu leukämischen Mäusen zu schaffen.

In der primären Transplantation sind alle Mäuse, denen *MIG*-WT-Spenderzellen transplantiert wurden, gesund geblieben. *MIG*-WT-Mäuse wurden mit der zuletzt erkrankten *BA*-WT-Maus und *MIG-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Mäuse mit der zuletzt erkrankten *BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Maus eines jeden Versuchsansatzes euthanasiert und bei Nichterkranken eines *BA*-WT- oder *BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Tieres mit eben diesem am Versuchsende. *MIG*-WT- und *MIG-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Mäuse wurden demnach zwischen Tag 45 und Tag 104 euthanasiert.



**Abbildung 14: Ergebnisüberblick des Populationsvergleichs von MIG-WT- und MIG-Sfrp1<sup>-/-</sup>-Mäusen der primären Transplantation des Hauptversuchs. (A) Absolute Zahlen vom Knochenmark (BM) in der Stammzellfärbung. (B) Absolute Zahlen vom Knochenmark (BM) in der Reifezellfärbung. (C) Absolute Zahlen der Milz (SP) in der Stammzellfärbung. (D) Absolute Zahlen der Milz (SP) in der Reifezellfärbung. (E) Gesamtzellzahlen vom peripheren Blut (PB). Leukozyten, Lymphozyten und Thrombozyten in 10<sup>3</sup>/μl und Erythrozyten in 10<sup>6</sup>/μl. (F) Reifezellfärbung vom peripheren Blut (PB) in Prozent.**

### 5.2.1.1 Gesamtzellzahlen

Bei den Gesamtzellzahlen ähnelten sich die Knochenmarkmittelwerte stark mit  $13,5 \times 10^6$  pro F+T bei *MIG-WT*-Mäusen und  $13,1 \times 10^6$  pro F+T bei *MIG-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Mäusen. Die Milzwerte lagen bei  $27,1 \times 10^6$  pro Milz für den *MIG-WT*- und bei  $13,9 \times 10^6$  pro Milz für den *MIG-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Stamm. Deutlich signifikante Unterschiede ließen sich in allen Zellpopulationen des peripheren Blutes feststellen. Der *MIG-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Mittelwert für Leukozyten war mit  $5,4 \times 10^3/\mu\text{l}$  über doppelt so hoch wie der *MIG-WT*-Mittelwert mit nur  $2,1 \times 10^3/\mu\text{l}$  ( $p^*=0,001$  und  $p^\circ=0,0002$ ). Die Lymphozyten lagen in *MIG-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Mäusen bei  $4,2 \times 10^3/\mu\text{l}$  und in *MIG-WT*-Mäusen bei  $1,3 \times 10^3/\mu\text{l}$  ( $p^*=0,0001$  und  $p^\circ=0,001$ ).

Mit  $9,4 \times 10^6/\mu\text{l}$  Erythrozyten lag der *MIG-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Mittelwert circa drei Millionen pro Mikroliter höher als der *MIG-WT*-Mittelwert mit  $6,2 \times 10^6/\mu\text{l}$  ( $p^*=0,02$ ). Mit Mittelwerten von  $1041/\mu\text{l}$  in *MIG-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Mäusen und  $516/\mu\text{l}$  in *MIG-WT*-Mäusen differierten die Thrombozyten ebenfalls deutlich ( $p^*=0,002$  und  $p^\circ=0,003$ ) (s. S. 55, Abb. 14 E).

### 5.2.1.2 Knochenmark

Die Stammzellfärbung des Knochenmarks war, abgesehen von wenigen Ausnahmen im *MIG-WT*-Stamm, in beiden Genotypen 0 - 2% GFP-positiv, wobei *MIG-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Mäuse fast alle bei 0% lagen ( $p^\circ=0,0003$ ). Entsprechend lagen die *MIG-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Subpopulation ebenfalls oft nahe null. Die GFP<sup>+</sup>-Zellen bestanden in *MIG-WT*-Mäusen im Mittel aus 7,1% CLPs, in *MIG-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Mäusen aus 40,4% CLPs, wobei letztere hauptsächlich extreme Werte nahe 0% oder 100% annahmen. In beiden Genotypen wiesen GFP<sup>+</sup>-Zellen meistens kaum bis gar keine grünen LSKs oder MPs auf.

Die absoluten Zahlen der Stammzellfärbung des Knochenmarks ergaben höchst signifikante Unterschiede bezüglich grüner Fluoreszenz mit durchschnittlich nur  $0,9 \times 10^3$  Zellen für *MIG-Sfrp1<sup>-/-</sup>*- und  $28,1 \times 10^3$  Zellen für *MIG-WT*-Mäuse

( $p^*=0,0009$  und  $p^\circ=0,0002$ ). GFP<sup>+</sup>-CLPs unterschieden sich ebenfalls deutlich signifikant mit Mittelwerten von  $0,4 \times 10^3$  Zellen in *MIG-Sfrp1*<sup>-/-</sup>- und  $2 \times 10^3$  Zellen in *MIG-WT*-Mäusen ( $p^*=0,002$  und  $p^\circ=0,005$ ) (s. S. 55, Abb. 14 A).

Auch in der Reifezellfärbung des Knochenmarks zeigten beide Genotypen kaum grüne Fluoreszenz. Fast alle *MIG-WT*-Mäuse lagen bei 2 - 6% GFP<sup>+</sup>-Zellen und die *MIG-Sfrp1*<sup>-/-</sup>-Mäuse bei 0 - 2% ( $p^\circ=0,001$ ). Durchschnittlich waren GFP<sup>+</sup>-Zellen in *MIG-WT*-Mäusen zu 6,1% zu B-Zellen differenziert und in *MIG-Sfrp1*<sup>-/-</sup>-Mäusen zu 20,3%, wobei letztere fast ausschließlich aus extremen Werten nahe 0% oder 75,5% bestanden. In beiden Genotypen gab es bis auf wenige Ausnahmen im *MIG-Sfrp1*<sup>-/-</sup>-Stamm keine nennenswerte GFP<sup>+</sup>-T-Zelldifferenzierung.

Die Totalzahlen von GFP<sup>+</sup>-Zellen der Reifezellfärbung des Knochenmarks unterschieden sich signifikant mit im Schnitt  $1,9 \times 10^3$  Zellen im *MIG-Sfrp1*<sup>-/-</sup>- und  $29,7 \times 10^3$  Zellen im *MIG-WT*-Stamm ( $p^*=0,005$  und  $p^\circ=0,0002$ ). Granulozyten unterschieden sich signifikant im U-Test ( $p^\circ=0,001$ ), Monozyten sogar im T- und im U-Test mit durchschnittlich 17 Zellen bei *MIG-Sfrp1*<sup>-/-</sup>-Mäusen und 600 Zellen bei *MIG-WT*-Mäusen ( $p^*=0,03$  und  $p^\circ=0,0002$ ) (s. S. 55, Abb. 14 B).

### 5.2.1.3 Milz

Die Analyse der Milzgewichte ergab annähernd identische Mittelwerte mit 82mg bei *MIG-WT*- und 83mg bei *MIG-Sfrp1*<sup>-/-</sup>-Mäusen.

In der Stammzellfärbung der Milz konnten signifikante Unterschiede in der Grünfärbung der Zellen festgestellt werden. *MIG-Sfrp1*<sup>-/-</sup>-Tiere wiesen im Schnitt 0,1% grüne Zellen auf, *MIG-WT*-Tiere 5,6% ( $p^*=0,004$  und  $p^\circ=0,0002$ ). Diese grünen Zellen zeigten eine Differenzierung zu CLPs von 1,6% in der *MIG-Sfrp1*<sup>-/-</sup>-Population und von gut 5,3% in der *MIG-WT*-Population ( $p^\circ=0,03$ ). Bei fast allen Tieren beider Genotypen gab es keine GFP<sup>+</sup>-LSKs oder -MPs.

Die absoluten Zahlen der Stammzellfärbung der Milz stellten höchst signifikante Ergebnisse bezüglich grüner Fluoreszenz dar mit im Mittel lediglich  $2,2 \times 10^3$  Zellen

bei *MIG-Sfrp1<sup>-/-</sup>*- und  $82,6 \times 10^3$  Zellen bei *MIG-WT*-Tieren ( $p^*=0,008$  und  $p^\circ=0,0003$ ). Die Unterschiede in der CLP-Differenzierung waren ebenfalls signifikant, mit nur  $0,1 \times 10^3$  Zellen in der *MIG-Sfrp1<sup>-/-</sup>*- und  $2,7 \times 10^3$  Zellen in der *MIG-WT*-Population ( $p^*=0,005$  und  $p^\circ=0,0002$ ) (s. S. 55, Abb. 14 C).

In der Reifezellfärbung der Milz lagen die Mittelwerte bezüglich GFP-Positivität in *MIG-WT*-Mäusen bei 3,9%, in *MIG-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Mäusen bei fast 0% ( $p^\circ=0,0002$ ). Die B-Zelldifferenzierung unterschied sich signifikant, mit 1,6% im *MIG-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Stamm und mit 11,8% im *MIG-Wildtypstamm* ( $p^*=0,002$  und  $p^\circ=0,005$ ). Die T-Zellen unterschieden sich im U-Test ( $p^\circ=0,01$ ). Bis auf wenige Ausnahmen lagen GFP<sup>+</sup>-LSKs und -MPs bei beiden Genotypen regelmäßig bei null oder fast null Prozent.

Die absoluten Zahlen der Reifezellfärbung der Milz stellten eine klare Signifikanz in der GFP<sup>+</sup>-Population dar, mit Mittelwerten von  $1,1 \times 10^3$  im *MIG-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Stamm und  $50,3 \times 10^3$  im *MIG-WT*-Stamm ( $p^*=0,01$  und  $p^\circ=0,0003$ ). Die GFP<sup>+</sup>-Population wies des Weiteren für B-Zellen mit  $0,1 \times 10^3$  Zellen bei *MIG-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Tieren und  $4,7 \times 10^3$  Zellen bei *MIG-WT*-Tieren eine signifikante Differenz auf ( $p^*=0,003$  und  $p^\circ=0,0003$ ). T-Zellen unterschieden sich nur im U-Test ( $p^\circ=0,01$ ). Ebenfalls unterschieden sich die Granulozyten signifikant, mit durchschnittlich nur 3 Zellen in *MIG-Sfrp1<sup>-/-</sup>*- und 300 Zellen in *MIG-WT*-Tieren ( $p^*=0,03$  und  $p^\circ=0,02$ ) (s. S. 55, Abb. 14 D).

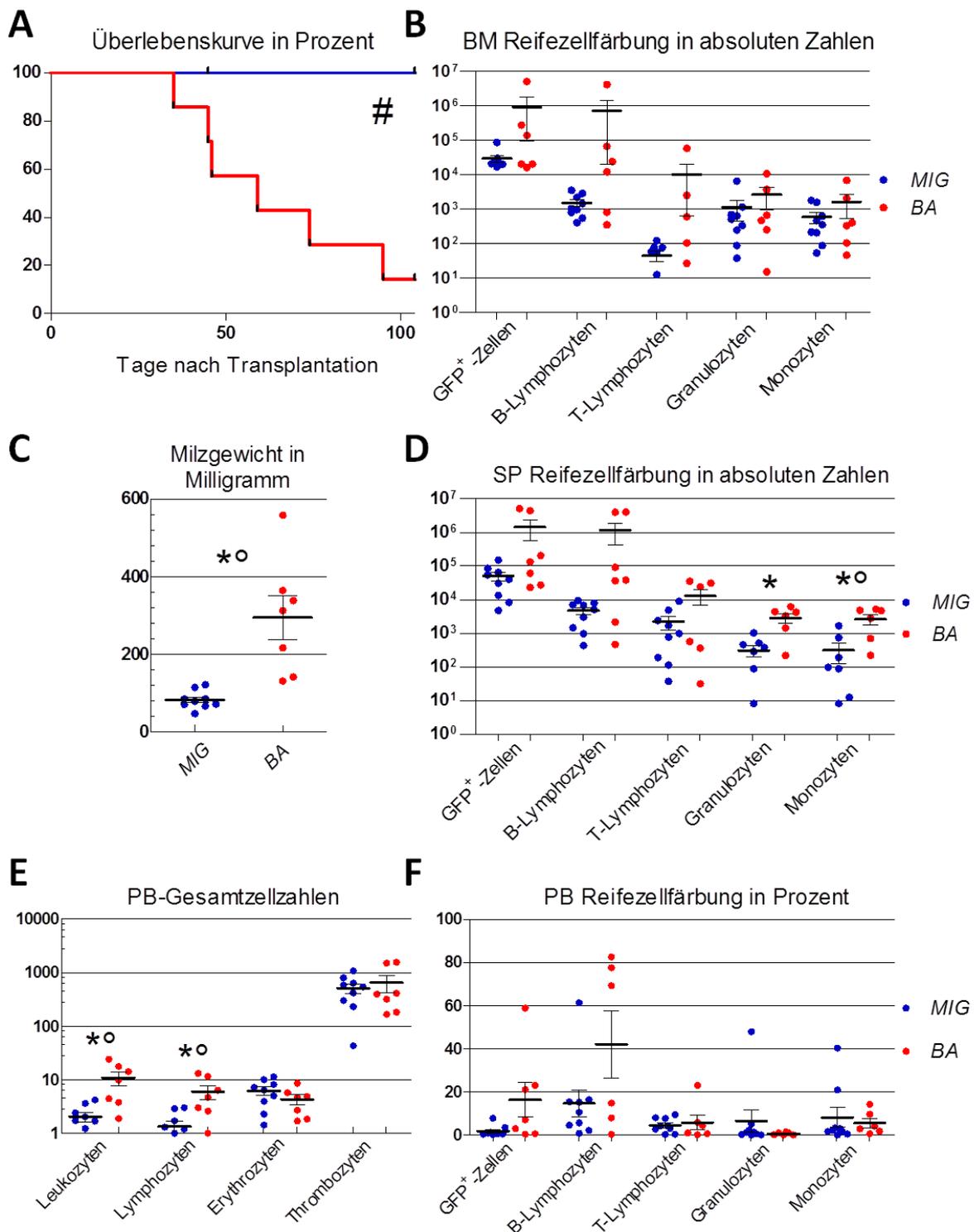
#### 5.2.1.4 Peripheres Blut

Die Leukozyten zeigten im peripheren Blut in beiden Genotypen bis auf wenige Ausnahmen sehr kleine GFP<sup>+</sup>-Populationen von meist weniger als 2%. Keine der GFP<sup>+</sup>-Subpopulationen wies Unterschiede auf (s. S. 55, Abb. 14 F).

### 5.2.2 *MIG*-Wildtyp gegen *BA*-Wildtyp

„Wie unterscheiden sich an Leukämie erkrankte und gesunde Mäuse im genetisch unveränderten Kontrollstamm?“ Zur Beantwortung dieser zweiten Leitfrage wurden *MIG*- und *BA*-Wildtypmäuse miteinander verglichen.

Im Wildtypstamm erkrankten sechs der sieben *BA*-WT-Mäuse zwischen Tag 35 und 95. Eine *BA*-WT-Maus erkrankte nicht und somit wurde der letzte Versuchsansatz am Tag 104 beendet. Am Tag 59 erkrankte die vierte der sieben *BA*-WT-Mäuse, womit das mittlere Überleben von 50% zu diesem Zeitpunkt bereits überschritten war. Bei den neun *MIG*-WT-Mäusen sind keine Erkrankungen aufgetreten. Der Logrank-Test ergab für die beiden Populationen einen signifikanten Überlebensunterschied ( $p^{\#}=0,01$ ) (s. S. 60, Abb. 15 A). Bei einer anderen *BA*-WT-Maus fielen ein leicht hämorrhagischer Peritonealerguss von circa 10ml, ein Ileus und ein Dickdarmtumor auf, wobei letzterer nicht analysiert wurde. Bei einer weiteren *BA*-WT-Maus wurde keine Knochenmarkanalyse durchgeführt.



**Abbildung 15: Ergebnisüberblick des Populationsvergleichs von MIG-WT-Mäusen und BA-WT-Mäusen der primären Transplantation des Hauptversuchs.** (A) Kaplan-Meier-Überlebenskurve mit 9 MIG-WT- und 7 BA-WT-Mäusen. (B) Absolute Zahlen vom Knochenmark (BM) in der Reifezellfärbung. (C) Milzgewichte in Milligramm. (D) Absolute Zahlen der Milz (SP) in der Reifezellfärbung. (E) Gesamtzellzahlen vom peripheren Blut (PB). Leukozyten, Lymphozyten und Thrombozyten in  $10^3/\mu\text{l}$  und Erythrozyten in  $10^6/\mu\text{l}$ . (F) Dotplot der Reifezellfärbung vom peripheren Blut (PB) in Prozent.

### 5.2.2.1 Gesamtzellzahlen

Bei den Gesamtzellzahlen lagen die Mittelwerte in der *MIG*-WT-Population für das Knochenmark bei  $13,5 \times 10^6$  pro F+T und für die Milz bei  $27,1 \times 10^6$  pro Organ. Die *BA*-WT-Population wies  $20,6 \times 10^6$  Knochenmarkszellen pro F+T und  $49,6 \times 10^6$  Milzzellen pro Organ auf. Die Leukozyten im peripheren Blut hatten einen signifikanten Unterschied zu verbuchen mit durchschnittlich  $2,1 \times 10^3/\mu\text{l}$  in der *MIG*-WT-Population und über fünfmal so viel in der *BA*-WT-Population,  $10,9 \times 10^3/\mu\text{l}$  ( $p^*=0,03$  und  $p^\circ=0,003$ ). Die Lymphozyten im peripheren Blut unterschieden sich im Mittel ebenfalls signifikant mit  $1,3 \times 10^3/\mu\text{l}$  in *MIG*-WT- und  $6,1 \times 10^3/\mu\text{l}$  in *BA*-WT-Tieren ( $p^*=0,04$  und  $p^\circ=0,01$ ). Die Thrombozytenmittelwerte lagen bei  $516 \times 10^3/\mu\text{l}$  in *MIG*-WT- und  $651 \times 10^3/\mu\text{l}$  in *BA*-WT-Mäusen. Die Erythrozyten zeigten im Mittel einen *MIG*-WT-Wert von  $6,2 \times 10^6/\mu\text{l}$  versus einen *BA*-WT-Wert von  $4,3 \times 10^6/\mu\text{l}$  (s. S. 60, Abb. 15 E).

### 5.2.2.2 Knochenmark

In der Stammzellfärbung des Knochenmarks lagen die  $\text{GFP}^+$ -Zellen bei 7,1% in der *MIG*-WT-Population und bei 26,4% in der *BA*-WT-Population ( $p^\circ=0,03$ ). Diese  $\text{GFP}^+$ -Zellen erwiesen sich bei *BA*-WT-Mäusen zu 22,3% und bei *MIG*-WT-Mäusen zu lediglich 7,2% als CLPs. Beide Populationen zeigten bis auf wenige Ausnahmen keine Differenzierung zu MPs und LSKs.

In absoluten Zahlen wurden in der Stammzellfärbung des Knochenmarks ein *MIG*-WT-Mittelwert von  $28,1 \times 10^3$   $\text{GFP}^+$ -Zellen beobachtet und ein *BA*-WT-Mittelwert von  $406,8 \times 10^3$   $\text{GFP}^+$ -Zellen ( $p^\circ=0,03$ ). Im U-Test unterschieden sich die  $\text{GFP}^+$ -CLPs mit  $197,8 \times 10^3$  in *BA*-WT- und  $1,8 \times 10^3$  in *MIG*-WT-Mäusen signifikant ( $p^\circ=0,05$ ).

In der Reifezellfärbung des Knochenmarks waren die  $\text{GFP}^+$ -Zellen mit 7,8% für die *MIG*-WT- und 26,4% für die *BA*-WT-Population vertreten. Die Reifezellfärbung konnte weiterhin zeigen, dass bei *BA*-WT-Mäusen die Mehrheit der lymphoiden

GFP<sup>+</sup>-Zellen aus 34% B-Lymphozyten bestand, welche bei *MIG*-WT-Mäusen nur 6,1% ausmachten. Ausgenommen einer *BA*-WT-Maus lagen T-Lymphozyten in den Mäusen beider Populationen stets unter 1%. Die Mittelwerte von Granulozyten und Monozyten lagen in beiden Populationen mit etwa 3 - 6% dicht beieinander.

Ausgedrückt in absoluten Zahlen lagen die GFP<sup>+</sup>-Zellen in der *MIG*-WT-Population mit rund  $29,7 \times 10^3$  Zellen weit unter der *BA*-WT-Population mit  $939,3 \times 10^3$  Zellen, unterschieden sich wegen Ausreißern (Dean-Dixon-Ausreißertest) aber nicht signifikant. Auch in den GFP<sup>+</sup>-Subpopulationen differierten die Mittelwerte deutlich, waren aber wegen einer großen Streuung nicht signifikant (s. S. 60, Abb. 15 B).

### 5.2.2.3 Milz

Das Milzgewicht unterschied sich höchst signifikant mit Mittelwerten von 82mg bei *MIG*-WT- und 294mg bei *BA*-WT-Mäusen ( $p^*=0,009$  und  $p^\circ=0,0002$ ) (s. S. 60, Abb. 15 C).

Die Stammzellfärbung der Milz zeigte weiterhin, dass die Milzen von *BA*-WT-Mäusen im Durchschnitt zu 32% und die von *MIG*-WT-Mäusen zu 5,6% grün fluoreszierten. Die GFP<sup>+</sup>-Zellen waren bei *BA*-WT-Mäusen 19,1% CLPs und bei *MIG*-WT-Mäusen 5,3%. Auch hier wiesen in beiden Mauspopulationen fast alle Mäuse keine GFP<sup>+</sup>-Zellen mit LSK- oder MP-Differenzierung auf.

Absolut lagen *MIG*-WT-Mäuse in der Stammzellfärbung der Milz im Mittel bei  $82,6 \times 10^3$  grünen Zellen, *BA*-WT-Mäuse bei  $1628 \times 10^3$ . Davon waren bei *MIG*-WT-Tieren im Schnitt  $2,7 \times 10^3$  Zellen, bei *BA*-WT-Tieren knapp  $633,7 \times 10^3$  Zellen zu CLPs differenziert.

Die reifen Milzzellen zeigten bezüglich GFP-Positivität ähnliche Werte wie die Stammzellfärbung, mit 3,9% für *MIG*-WT- und 27,1% für *BA*-WT-Mäuse, womit sie im U-Test signifikant waren ( $p^\circ=0,002$ ). Signifikant hoben sich im T-Test die B-Lymphozyten von *BA*-WT-Mäusen von denen der *MIG*-WT-Mäuse ab, mit rund 46,5% zu 11,8% ( $p^*=0,04$ ). Die T-Lymphozyten unterschieden sich mit 2,9% in

*BA*-WT- und 3,6% in *MIG*-WT-Tieren nicht. Mit nur wenigen Ausnahmen lagen die Granulozyten- und Monozytenmittelwerte in beiden Populationen unter 2%.

Die absoluten Zahlen der Reifezellfärbung der Milz für GFP<sup>+</sup>-Zellen ergaben im arithmetischen Mittel  $50,3 \times 10^3$  für *MIG*-WT- und  $1433,1 \times 10^3$  für *BA*-WT-Tiere. Davon stellten bei *MIG*-WT-Tieren  $4,7 \times 10^3$  Zellen B-Lymphozyten dar, bei *BA*-WT-Tieren  $1171,5 \times 10^3$  Zellen. Die Granulozyten und Monozyten zeigten beim Vergleich der absoluten Zahlen signifikante Unterschiede. Granulozyten unterschieden sich mit einem *MIG*-WT-Wert von  $0,3 \times 10^3$  und einem *BA*-WT-Wert von  $2,8 \times 10^3$  ( $p^*=0,03$ ). Die Monozyten unterschieden sich mit Mittelwerten von  $0,3 \times 10^3$  bei *MIG*-WT- und  $2,6 \times 10^3$  bei *BA*-WT-Tieren ( $p^*=0,04$  und  $p^\circ=0,04$ ) (s. S. 60, Abb. 15 D).

#### 5.2.2.4 Peripheres Blut

Die Leukozyten im peripheren Blut wiesen in der *BA*-WT-Population eine Grünfärbung von im Schnitt 16,2% und in der *MIG*-WT-Population eine von 1,8% auf. Von diesen Zellen waren bei *BA*-WT-Mäusen 42% zu B-Lymphozyten ausdifferenziert und bei *MIG*-WT-Mäusen 14,7%. Die anderen Subpopulationen unterschieden sich nicht (s. S. 60, Abb. 15 F).

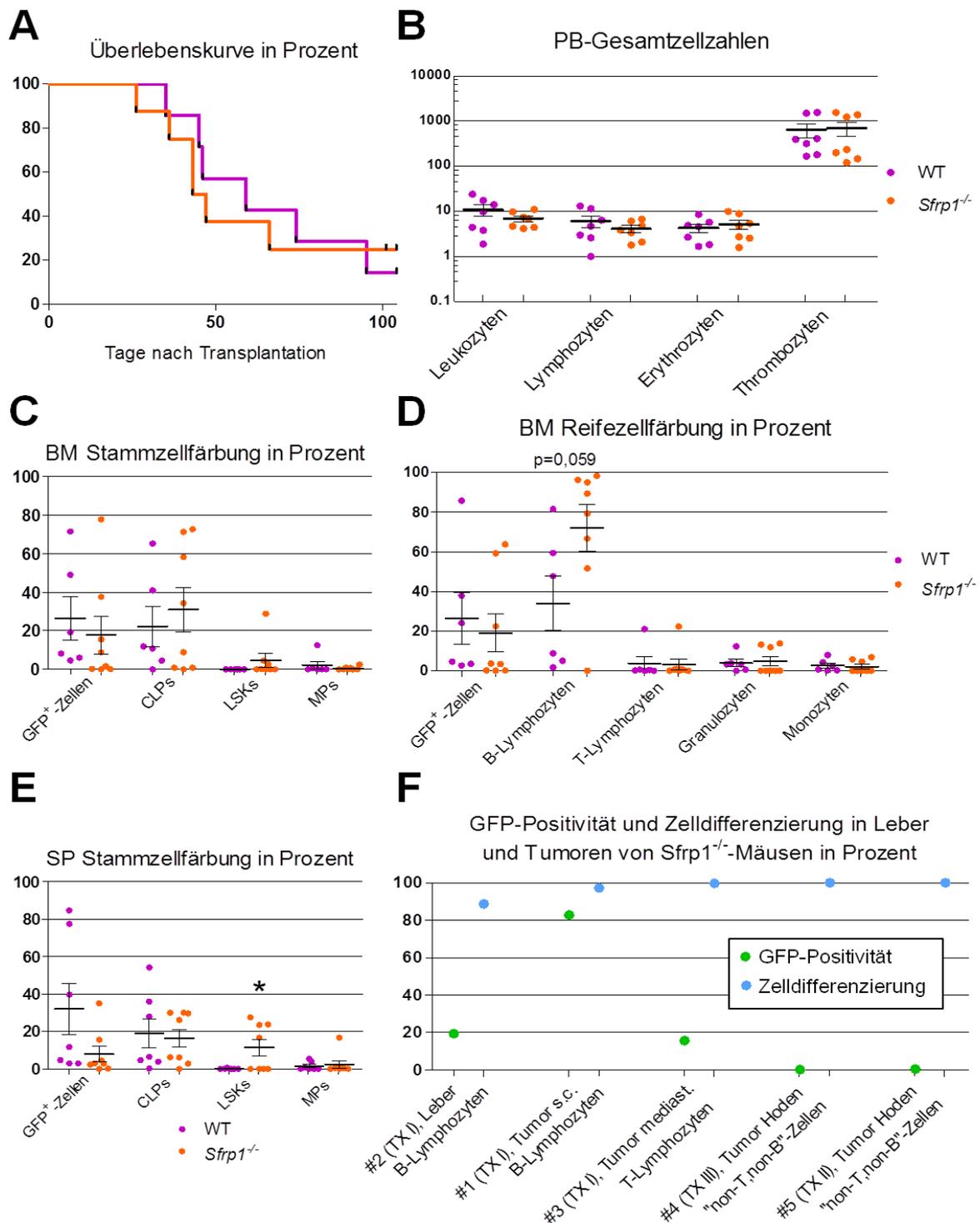
In absoluten Zahlen ausgedrückt, ergaben die GFP<sup>+</sup>-Leukozyten Werte von 6/ $\mu$ l Zellen in *MIG*-WT-Tieren und 143/ $\mu$ l Zellen in *BA*-WT-Tieren. Im U-Test unterschieden sich die B-Lymphozyten ( $p^\circ=0,01$ ) und die Monozyten ( $p^\circ=0,05$ ). Ansonsten zeigten die GFP<sup>+</sup>-Subpopulationen keine Unterschiede.

### 5.2.3 *BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>* gegen *BA-Wildtyp*

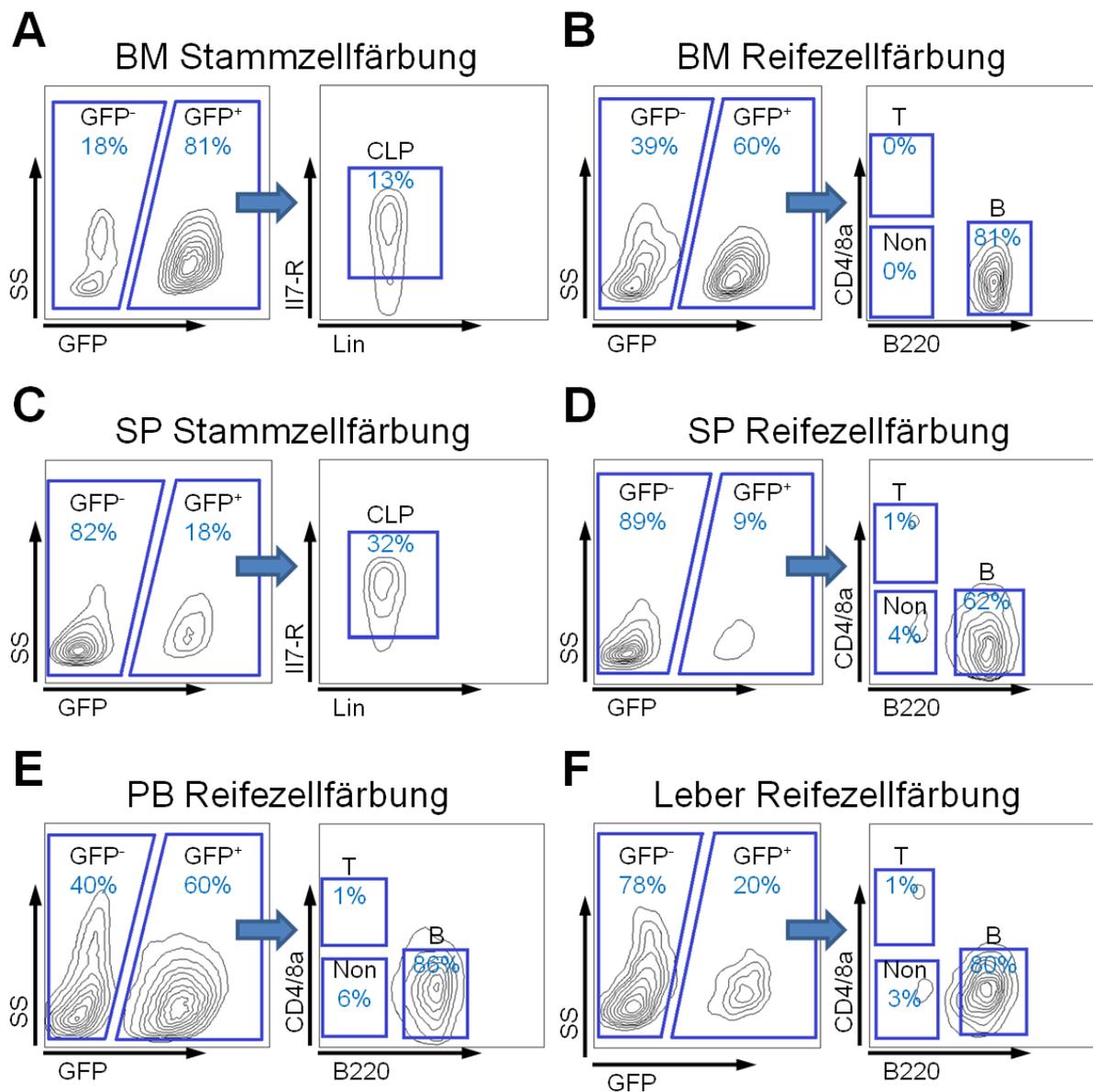
Die wichtigste Leitfrage dieser Doktorarbeit war, ob und wie sich *BA*-induzierte Leukämien zwischen dem *Sfrp1*-Knockoutstamm und dem als Kontrolle dienenden Wildtypstamm unterschieden. Um dieser Fragestellung auf den Grund zu gehen, wurden *BA*-WT-Spenderzellen in neugeborene WT- und *Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Empfänger transplantiert und die Genotypen zum Vergleich gegenübergestellt.

Im Kontrollstamm erkrankten sechs der sieben *BA*-WT-Mäuse zwischen Tag 35 und 95, im Knockoutstamm sechs von acht *BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Mäusen zwischen Tag 26 und 66. Eine *BA*-WT-Maus und zwei *BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Mäuse erkrankten nicht, womit der letzte Versuchsansatz nach 104 Tagen beendet wurde. Das mittlere Überleben der beiden Mauspopulationen lag bei 59 Tagen in *BA*-WT- und 45 Tagen in *BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Mäusen (s. S. 65, Abb. 16 A). Im Wildtypstamm stach die bereits oben erwähnte *BA*-WT-Maus mit Peritonealerguss, Ileus und Dickdarmtumor hervor. In *BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Mäusen zeigten sechs von acht *BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Tieren gewebständige Tumoren, deren Analyse unten in einem separaten Unterkapitel behandelt wird. Eine *BA*-WT-Maus erhielt keine Knochenmarkanalyse. Eine Blutuntersuchung mittels Bloodcounter wurde bei einer *BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Maus nicht durchgeführt.

Zur Verdeutlichung, wie sich eine leukämische Maus in der Analyse darstellte, zeigt die nachfolgende Abbildung 17 ein typisches Bild einer an Leukämie erkrankten Maus (s. S. 66).



**Abbildung 16: Ergebnisüberblick des Populationsvergleichs von BA-WT-Mäusen und BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>-Mäusen der primären Transplantation des Hauptversuchs.** (A) Kaplan-Meier-Überlebenskurve mit 7 BA-WT- und 8 BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>-Mäusen. (B) Gesamtzellzahlen vom peripheren Blut (PB). Leukozyten, Lymphozyten und Thrombozyten in 10<sup>3</sup>/μl und Erythrozyten in 10<sup>6</sup>/μl. (C) Stammzellfärbung und (D) Reifezellfärbung vom Knochenmark (BM) in Prozent. (E) Stammzellfärbung der Milz (SP) in Prozent. (F) GFP-Positivität und Zelldifferenzierung von Leber und Tumoren in Prozent. TXI, TXII und TXIII= erster, zweiter und dritter Transplantationsversuchsansatz.



**Abbildung 17: Repräsentative FACS-Bilder von einer an Leukämie erkrankten BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>-Maus in Prozent.** (A) Stammzellfärbung vom Knochenmark (BM). (B) Reifezellfärbung vom Knochenmark (BM). (C) Stammzellfärbung der Milz (SP). (D) Reifezellfärbung der Milz (SP). (E) Reifezellfärbung des peripheren Blutes (PB). (F) Reifezellfärbung der Leber.

### 5.2.3.1 Gesamtzellzahlen

Die Analyse der Knochenmarksgesamtzellzahlen ergaben  $20,6 \times 10^6$  Zellen pro F+T in BA-WT- und  $10 \times 10^6$  Zellen pro F+T in BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>-Mäusen und waren damit im

U-Test signifikant ( $p=0,02$ ). Die Milzzellen lagen in *BA-WT*-Mäusen im Mittel bei  $49,6 \times 10^6$  pro Milz zu  $26,4 \times 10^6$  Zellen pro Milz in *BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Mäusen. Der Leukozytenmittelwert lag bei  $10,9 \times 10^3/\mu\text{l}$  in *BA-WT*- und  $7,0 \times 10^3/\mu\text{l}$  in *BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Tieren. Die Lymphozyten im peripheren Blut zeigten im Mittel  $6,1 \times 10^3/\mu\text{l}$  in *BA-WT*- und  $4,1 \times 10^3/\mu\text{l}$  in *BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Tieren. Bezüglich Erythrozyten enthielt das Blut von *BA-WT*-Tieren durchschnittlich  $4,3 \times 10^6/\mu\text{l}$  Zellen und das von *BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Tieren  $5,2 \times 10^6/\mu\text{l}$ . Der Thrombozytenmittelwert in der *BA-WT*-Population lag bei  $650,6 \times 10^3/\mu\text{l}$ , in der *BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Population lag er bei  $701,6 \times 10^3/\mu\text{l}$  (s. S. 65, Abb. 16 B).

### 5.2.3.2 Knochenmark

Die Stammzellfärbung des Knochenmarks zeigte eine GFP-Positivität von 26,5% in *BA-WT*- und 17,7% in *BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Mäusen. In *BA-WT*-Mäusen waren 22,3% und in *BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Mäusen 31% CLPs. Neben wenigen Ausnahmen liegen die Werte von LSKs und MPs in beiden Genotypen bei oder nahe null (s. S. 65, Abb. 16 C).

Die absoluten Zahlen der Stammzellfärbung des Knochenmarks ergaben  $406,8 \times 10^3$  GFP<sup>+</sup>-Zellen für *BA-WT*-Tiere, für *BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Tiere  $150,4 \times 10^3$ . Davon waren in *BA-WT*-Tieren  $197,8 \times 10^3$  CLPs, in *BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Tieren  $35,1 \times 10^3$ . *BA-WT*-Mäuse enthielten im Schnitt 4 LSKs und *BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Mäuse 1360.

Prozentual zeigte die Reifezellfärbung des Knochenmarks eine GFP-Positivität von 26,4% in *BA-WT*- und 19,1% in *BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Mäusen. Die nicht erkrankte *BA-WT*-Maus lag bei 2,7% GFP<sup>+</sup>-Zellen. Die zwei nicht erkrankten *BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Mäuse hingegen lagen bei 0,2% und 0% GFP<sup>+</sup>-Knochenmarkzellen. Obwohl die Mittelwerte der B-Zelldifferenzierung mit 34% in *BA-WT*- und 72,1% in *BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Mäusen weit auseinander lagen, war der T-Test nur annähernd signifikant ( $p=0,059$ ).

Die T-Zellen unterschieden sich nicht, ebenso wenig die Granulozyten und Monozyten (s. S. 65, Abb. 16 D).

In absoluten Zahlen waren in *BA-WT*-Tieren in der Reifezellfärbung des Knochenmarks im Mittel  $939,3 \times 10^3$  GFP<sup>+</sup>-Zellen zu beobachten, in *BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Tieren  $226,5 \times 10^3$ . Anteilig davon waren  $719,9 \times 10^3$  B-Zellen im *BA-WT*- und  $214,8 \times 10^3$  B-Zellen im *BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Stamm. *BA-WT*-Mäuse besaßen  $2,6 \times 10^3$  Granulozyten und *BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Mäuse  $0,4 \times 10^3$ . Der Monozytenwert von *BA-WT*-Mäusen lag bei  $1,7 \times 10^3$  und der von *BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Mäusen bei  $0,2 \times 10^3$  Zellen.

### 5.2.3.3 Milz

Die Analyse der Milzgewichte ergab beim Vergleich der Genotypenmittelwerte 294mg für *BA-WT*- und 218mg für *BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Mäuse.

Die Stammzellfärbung zeigte eine Grünfärbung von 32% in *BA-WT*- und 7,9% in *BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Mäusen. CLPs lagen mit Werten von 19,1% für *BA-WT*- und 16,4% für *BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Mäuse dicht beieinander. Signifikante Unterschiede zeigten die hämatopoetischen Stammzellen, die LSKs, mit 11,4% bei *BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Tieren und 0,1% bei *BA-WT*-Tieren ( $p^*=0,04$ ) (s. S. 65, Abb. 16 E).

Die absoluten Zahlen ergaben in der Milzstammzellfärbung im Schnitt für *BA-WT*-Mäuse  $1628 \times 10^3$  GFP<sup>+</sup>-Zellen und für *BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Mäuse  $139 \times 10^3$ . Davon waren in *BA-WT*-Mäusen  $633,7 \times 10^3$  CLPs und in *BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Mäusen  $12,5 \times 10^3$ . Die LSKs lagen im Schnitt bei  $3,1 \times 10^3$  pro *BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Maus und  $0,1 \times 10^3$  pro *BA-WT*-Maus.

Die Reifezellfärbung zeigte für *BA-WT*-Milzen 27,1% GFP<sup>+</sup>-Zellen und für *BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Milzen 9,2%. Davon waren in *BA-WT*-Mäusen 46,5% B-Zellen und 2,9% T-Zellen, in *BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Mäusen 50,3% B-Zellen und 12% T-Zellen. Granulozyten- und Monozytenwerte von *BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Mäusen lagen bei 11,3% und 10,3% und von *BA-WT*-Mäusen bei 4,9% und 4,2%.

Die Reifezellfärbung der Milzen ergab in absoluten Zahlen durchschnittlich  $1433 \times 10^3$  GFP<sup>+</sup>-Zellen für den *BA-WT*- und  $278 \times 10^3$  für den *BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Stamm. Im *BA-WT*-Stamm waren davon  $1172 \times 10^3$  B-Zellen, im *BA-Knockout*stamm hingegen

$204 \times 10^3$ . Die T-Zellzahlen lagen im *BA-WT*-Stamm bei  $13 \times 10^3$  und im *BA-Knockout*-Stamm bei  $7 \times 10^3$ . Die Granulozytenmittelwerte lagen jeweils bei  $2,8 \times 10^3$ . Das Mittel bei den Monozyten lag in der *BA-WT*-Population bei  $2,6 \times 10^3$  und in der *BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Population bei  $1,5 \times 10^3$ .

#### 5.2.3.4 Peripheres Blut

Die Blutanalyse erbrachte für Leukozyten eine Grünfärbung von 16,2% in *BA-WT*- und 21,1% in *BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Mäusen. In der B-Zellpopulation waren sich die Werte mit 42% zu 40% zwischen *BA-WT*- und *BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Stamm recht ähnlich. T-Zellen, Granulozyten und Monozyten zeigten keine Unterschiede.

In absoluten Zahlen ausgedrückt, besaßen *BA-WT*-Tiere im Schnitt 143 grüne Zellen, *BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Tiere 255 grüne Zellen. Die Mittelwerte von Granulozyten und Monozyten lagen in beiden Genotypen bei null. Auch die absoluten Zahlen zeigten in den GFP<sup>+</sup>-Subpopulationen keine Unterschiede.

#### 5.2.3.5 Tumoren

Sechs von acht Mäusen im *BA-Sfrp1*-Knockoutstamm wiesen einen Tumor auf. Bei einer *BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Maus wurde eine besonders große Leber festgestellt, welche eine grüne Fluoreszenz von nahezu 20% zeigte, die wiederum zu knapp 90% aus B-Lymphozyten bestand (s. S. 65, Abb. 16 F und S. 66, Abb. 17 F). Eine weitere *BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Maus zeigte einen subkutanen Tumor auf der Brust. Dieser bestand zu knapp 83% aus GFP<sup>+</sup>-Zellen, welche über 97% zu B-Lymphozyten differenziert waren. Eine andere *BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Maus wies einen vom Thymus ausgehenden, mediastinalen Tumor auf. Dieser Tumor zeigte knapp 16% GFP-Positivität, welche zu fast 100% von T-Lymphozyten stammte. Die beiden nicht erkrankten *BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Mäuse brachten Hodentumore hervor, die jeweils unter 0,5% GFP<sup>+</sup>-Zellen aufwiesen. Diese GFP<sup>+</sup>-Zellen bestanden zu über 99% aus nicht lymphoiden

„non-B, non-T“-Zellen (s. S. 65, Abb. 16 F). Einen weiteren Tumor zeigte eine *BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Maus, welcher aus der Schultermuskulatur hervorzugehen schien. Die dazugehörige Gewebeprobe wurde jedoch nicht analysiert.

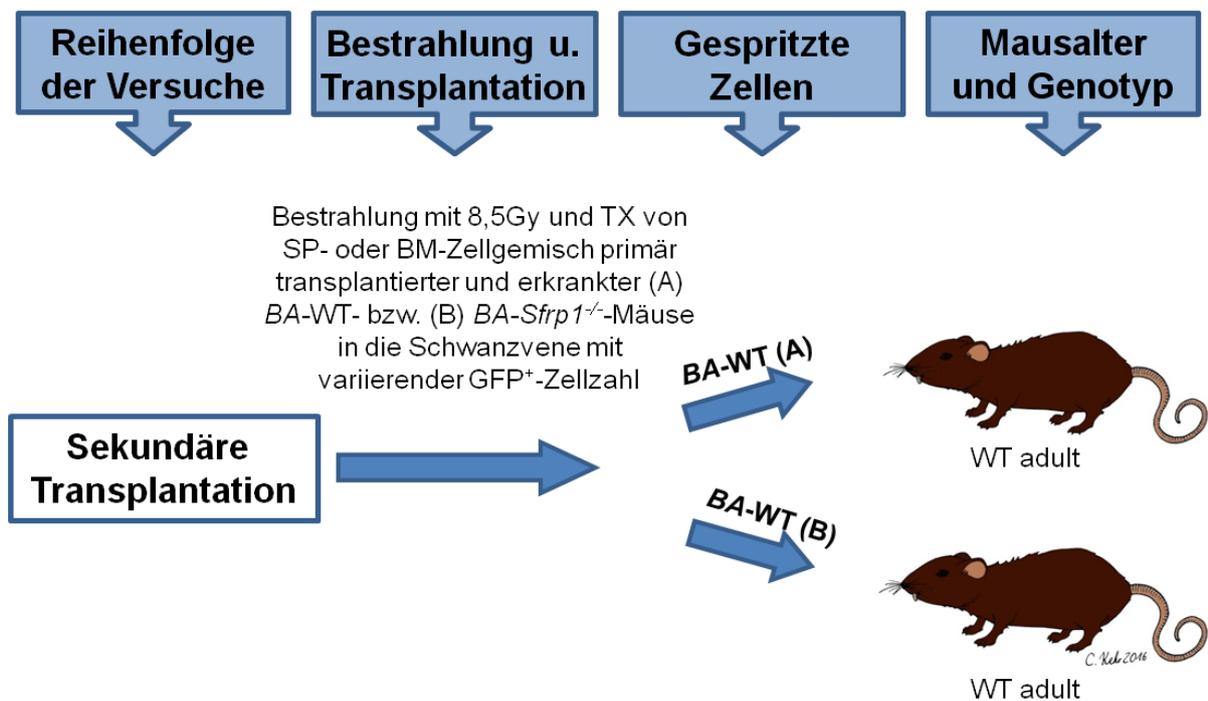
Im WT-Stamm wies nur die bereits erwähnte *BA-WT*-Maus einen Dickdarmtumor auf. Tabelle 14 gibt eine Übersicht zu allen Mäusen, die einen Tumor boten.

**Tabelle 14: Tumorübersicht zu *BA-WT*- und *BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Mäusen der primären Transplantation des Hauptversuchs.** TXI, TXIII=erster und dritter Transplantationsansatz.

| BA-Empfänger                           |         |                                     |                    | Tumor              |                          |                                   |
|--|---------|-------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------------|-----------------------------------|
| Nummer                                 | Zustand | Krankheit                           | Überleben in Tagen | Ort                | GFP <sup>+</sup> -Anteil | GFP <sup>+</sup> -Differenzierung |
| <i>Sfrp1<sup>-/-</sup></i> -#1 (TXI)   | krank   | B-Zell-Leukämie                     | 26                 | s.c. Brust         | 82,8%                    | 97,3% B-Zellen                    |
| <i>Sfrp1<sup>-/-</sup></i> -#2 (TXI)   | krank   | B-Zell-Leukämie                     | 47                 | Leber              | 19,4%                    | 88,7% B-Zellen                    |
| <i>Sfrp1<sup>-/-</sup></i> -#3 (TXI)   | krank   | T-Zell-Leukämie oder T-Zell-Lymphom | 66                 | Thymus             | 15,7%                    | 99,7% T-Zellen                    |
| <i>Sfrp1<sup>-/-</sup></i> -#3 (TXIII) | krank   | B-Zell-Leukämie                     | 43                 | Schultermuskulatur | -----                    | -----                             |
| <i>Sfrp1<sup>-/-</sup></i> -#4 (TXIII) | gesund  | keine                               | 101                | Hoden              | 0,2%                     | 100% „non-B, non-T“-Zellen        |
| <i>Sfrp1<sup>-/-</sup></i> -#5 (TXII)  | gesund  | keine                               | 104                | Hoden              | 0,5%                     | 100% „non-B, non-T“-Zellen        |
| WT-#6 (TXII)                           | krank   | B-Zell-Leukämie                     | 59                 | Dickdarm           | -----                    | -----                             |

### 5.3 Hauptversuch, sekundäre Transplantation

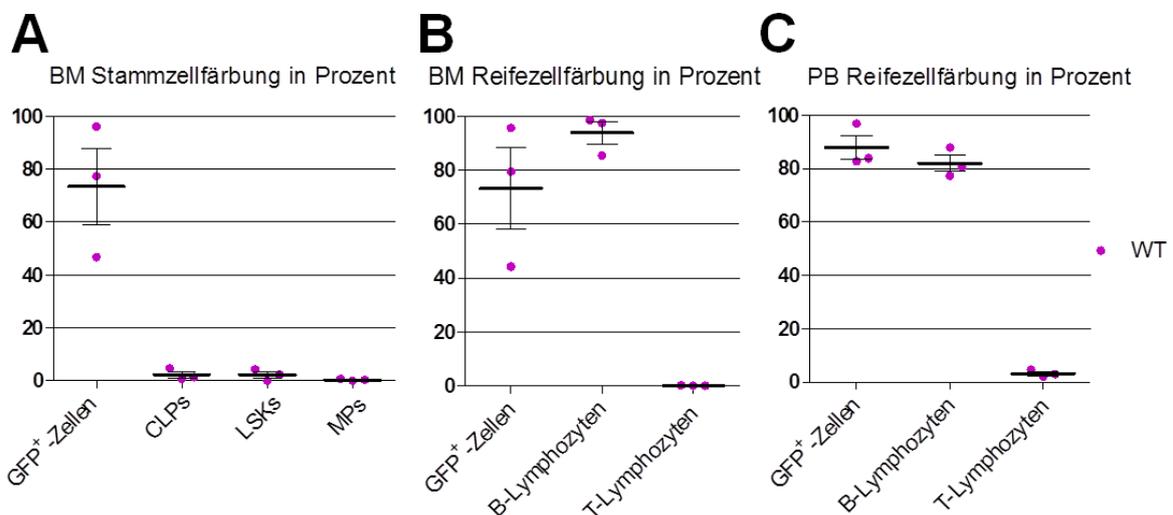
Die sekundäre Transplantation des Hauptversuchs zielte vorrangig auf die Reproduzierbarkeit der Leukämien ab, um zu beweisen, dass der Krankheitsursprung in den transplantierten *BA-GFP<sup>+</sup>*-Zellen lag. Außerdem sollte eruiert werden, welche der folgenden Parameter von Spenderzellen für den Erfolg der sekundären Transplantation erforderlich sind: die Zellzahl, der Organursprung und ob Zellen im frischen Zustand oder nach Kältekonserrierung weitertransplantiert wurden.



**Abbildung 18: Übersichtsgrafik zum Versuchsaufbau der sekundären Transplantation des Hauptversuchs.** TX=Transplantation, SP=Milz, BM=Knochenmark.

### 5.3.1 Transplantation mit Spenderzellen einer primären BA-WT-Maus

Bei dem ersten Teil der sekundären Transplantation wurden GFP<sup>+</sup>-Zellen einer primär transplantierten, vermutlich an B-Zelleukämie erkrankten BA-WT-Maus in drei WT-Mäuse weitertransplantiert. Zu besagter Spendermaus gab es zwar keinen Knochenmarkbefund, aber auf Grund der klinischen Symptomatik in Verbindung mit dem Milzbefund von fast 70% B-Zellanteil von insgesamt 5% GFP<sup>+</sup>-Zellen in der Reifezellfärbung wurde von einer B-Zelleukämie ausgegangen. Die drei Empfängermäuse erhielten  $1 \times 10^6$ ,  $1,5 \times 10^6$  oder  $2 \times 10^6$  frische GFP<sup>+</sup>-Milzzellen. Sie alle zeigten am Tag 20 Krankheitssymptome und wurden somit gemeinsam euthanasiert. Bis auf die Erhebung der Milzgewichte wurde eine weitere Analyse der Milz unterlassen. Das durchschnittliche Milzgewicht lag bei 282mg pro Maus.



**Abbildung 19: Ergebnisüberblick der sekundären Transplantation des Hauptversuchs mit Spenderzellen einer primären BA-WT-Maus.** (A) Stammzellfärbung vom Knochenmark (BM). (B) Reifezellfärbung vom Knochenmark (BM). (C) Reifezellfärbung des peripheren Blutes (PB).

### 5.3.1.1 Gesamtzellzahlen

Die Knochenmarkttotalzahlen ergaben im Durchschnitt  $14 \times 10^6$  pro F+T. Im peripheren Blut lag die durchschnittliche Leukozytenzahl bei  $4,1 \times 10^3/\mu\text{l}$  und die Lymphozytenzahl bei  $2,8 \times 10^3/\mu\text{l}$ . Der Erythrozytenmittelwert lag bei  $5,3 \times 10^6/\mu\text{l}$  und der Mittelwert der Thrombozyten bei  $645 \times 10^3/\mu\text{l}$ .

### 5.3.1.2 Knochenmark

Die Stammzellfärbung des Knochenmarks zeigte zu 73,4% GFP<sup>+</sup>-Zellen. Grüne Vorläuferzellen waren 2,3% CLPs und 0,4% MPs (s. S. 72, Abb. 19 A). LSKs machten 2,3% aus.

Bezifferte man diese Werte in absoluten Zahlen erhielt man  $1862 \times 10^3$  GFP<sup>+</sup>-Zellen, von denen  $59,8 \times 10^3$  CLPs,  $0,4 \times 10^3$  LSKs und  $0,1 \times 10^3$  MPs waren.

In der Reifezellfärbung war das Knochenmark zu 73,3% grün gefärbt. Die reifen, grünen Zellen waren zu 94% zu B-Lymphozyten differenziert und mit 0,1% kaum zu T-Lymphozyten (s. S. 72, Abb. 19 B). Für Granulozyten und Monozyten wurden Werte von jeweils 0% beobachtet.

In absoluten Zahlen zeigte die Reifezellfärbung des Knochenmarks  $1244 \times 10^3$  grüne Zellen, von denen  $1214 \times 10^3$  B-Zellen waren und nur verschwindend wenige  $0,3 \times 10^3$  T-Zellen.

### 5.3.1.3 Peripheres Blut

Von allen untersuchten Geweben zeigten die Leukozyten mit 87,8% den höchsten Anteil an GFP<sup>+</sup>-Zellen. Von diesen GFP<sup>+</sup>-Zellen waren 82% B-Lymphozyten und

3,2% T-Lymphozyten. Granulozyten und Monozyten lagen bei 25,2% und 8,2% (s. S. 72, Abb. 19 C).

Die obigen Zahlen entsprachen in absoluten Zahlen  $187 \times 10^3$  GFP<sup>+</sup>-Zellen, von denen  $156 \times 10^3$  B-Lymphozyten,  $6 \times 10^3$  T-Lymphozyten und nur  $0,2 \times 10^3$  Granulozyten und  $0,1 \times 10^3$  Monozyten waren.

### 5.3.2 Transplantation mit Spenderzellen primärer *BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Mäuse

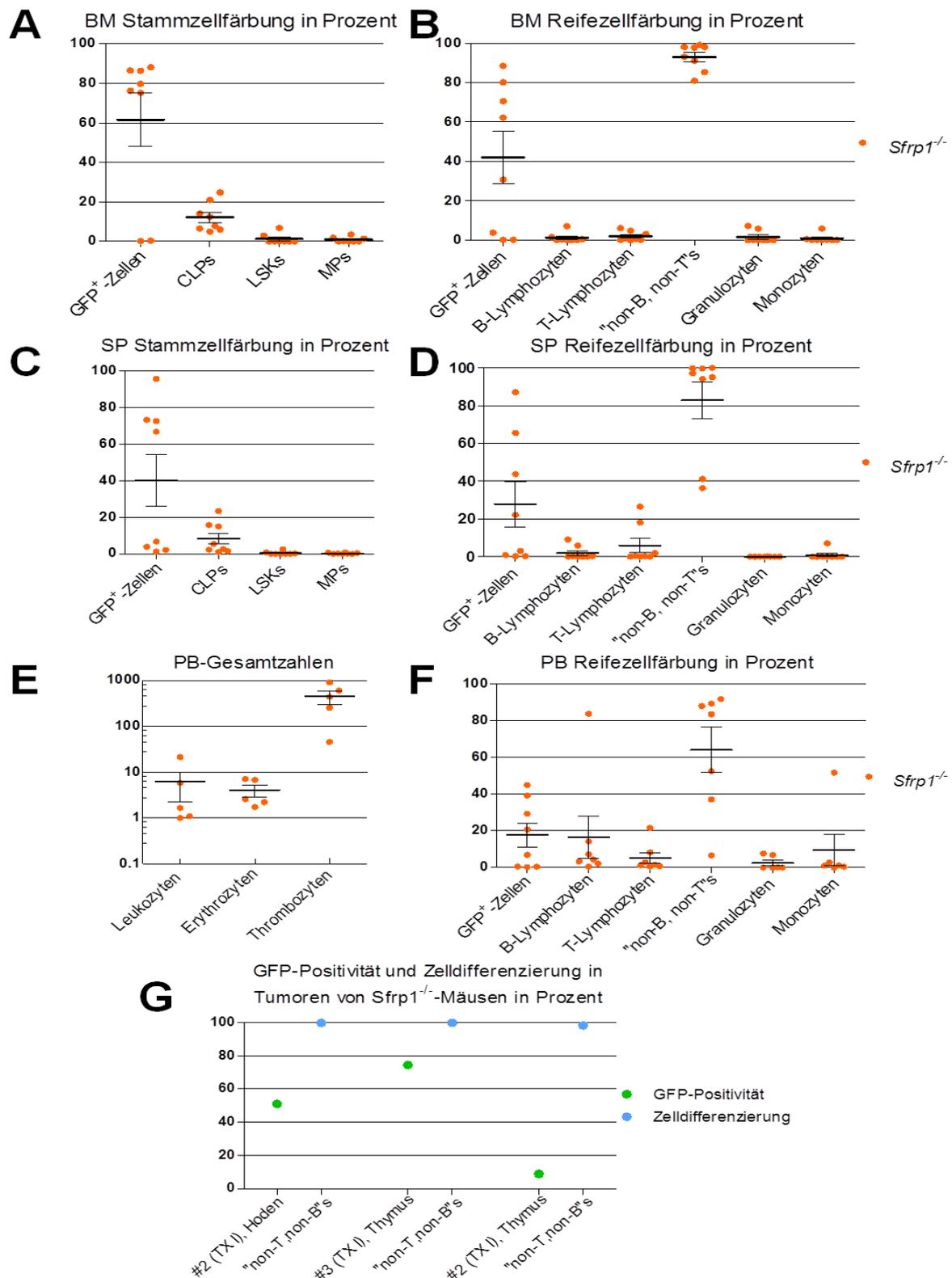
Im zweiten Teil der sekundären Transplantation wurden aus primär transplantierten, erkrankten *BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Tieren GFP-positive Knochenmark- und Milzzellen in zwei Versuchsansätzen in insgesamt acht WT-Mäuse weitertransplantiert. Im ersten Versuchsansatz wurden dabei  $0,6 \times 10^6$ ,  $1,1 \times 10^6$  oder  $1,6 \times 10^6$  frische GFP<sup>+</sup>-Milzzellen einer an B-Zellleukämie erkrankten *BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Maus in drei WT-Empfängermäuse weitertransplantiert. Im zweiten Versuchsansatz wurden aufgetaute GFP<sup>+</sup>-Zellen von zwei primär an B-Zellleukämie erkrankten *BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Tieren gemischt und in fünf WT-Empfängermäuse weitertransplantiert: zweimal  $2,2 \times 10^6$  Milzzellen und dreimal  $1 \times 10^6$  Knochenmarkzellen. Die nachfolgende Tabelle 15 gibt hierzu eine Übersicht.

**Tabelle 15: Übersicht der BA-WT-Spenderzellen primärer BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>-Spendermäuse für sekundäre BA-WT-Empfängermäuse. BM=Knochenmark, SP=Milz, PB=peripheres Blut.**

| Primäre BA-Sfrp1 <sup>-/-</sup> -Spender |                   |               |  |                                    |                      | Sekundäre BA-WT-Empfänger  |  |              |                    |
|--|-------------------|---------------|--|------------------------------------|----------------------|----------------------------|--|--------------|--------------------|
| Primäre Spender-Nummer                   | Spender-Krankheit | Spender-Organ | GFP <sup>+</sup> -Anteil Spender-Organ | GFP <sup>+</sup> -Spender-Zellzahl | Spender-Zell-Zustand | Sekundäre Empfänger Nummer | Empfänger -Krankheit                           | Milz-Gewicht | Überleben in Tagen |
| #1 (TXI)                                 | B-Zell-Leukämie   | SP            | 5,0%                                   | 600.000                            | frisch               | #1.1                       | Vermutlich undiff. „non-B, nonT“-Zell-Leukämie | 265mg        | 39                 |
| "  | "                 | "             | "                                      | 1.100.000                          | "                    | #1.2                       | "  | 326mg        | 94                 |
| "  | "                 | "             | "                                      | 1.600.000                          | "                    | #1.3                       | "  | 158mg        | 94                 |
| #1 und #2 (TXIII)                        | "                 | SP gepoolt    | 26%                                    | 2.200.000                          | aufgetaut            | #1/2.1                     | "  | 68mg         | 13                 |
| "  | "                 | "             | "                                      | "                                  | "                    | #1/2.2                     | "  | 53mg         | 8                  |
| "  | "                 | BM gepoolt    | 38%                                    | 1.000.000                          | aufgetaut            | #1/2.3                     | "  | 37mg         | 9                  |
| "  | "                 | "             | "                                      | "                                  | "                    | #1/2.4                     | "  | 34mg         | 13                 |
| "  | "                 | "             | "                                      | "                                  | "                    | #1/2.5                     | "  | 45mg         | 11                 |

Sechs der acht WT-Mäuse, die Spenderzellen primärer BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>-Mäuse erhalten haben, erkrankten zwischen Tag 8 und Tag 39; fünf davon bereits innerhalb der zweiten Woche. Zwei Mäuse des ersten Versuchsansatzes erkrankten nicht und wurden nach 94 Tagen euthanasiert.

Da die Daten zu Gesamtzellzahlen von soliden Organen lückenhaft waren, werden im Folgenden nur die Gesamtzellzahlen des peripheren Blutes und die Prozentwerte der Organanalysen dargestellt.



**Abbildung 20: Ergebnisüberblick der sekundären Transplantation des Hauptversuchs mit Spenderzellen aus primären BA-*Sfrp1*<sup>-/-</sup>-Mäusen.** (A) Stammzellfärbung und (B) Reifezellfärbung vom Knochenmark (BM) in Prozent. (C) Stammzellfärbung und (D) Reifezellfärbung der Milz (SP) in Prozent. (E) Gesamtzahlen des peripheren Blutes (PB). (F) Reifezellfärbung des peripheren Blutes (PB) in Prozent. (G) GFP-Positivität und Zelldifferenzierung der Tumoren in Prozent. TXI= erster Transplantationsversuchsansatz.

### 5.3.2.1 Gesamtzellzahlen

Im peripheren Blut lag der Leukozytenmittelwert bei  $6,2 \times 10^3/\mu\text{l}$ , wobei dieser irreführend war, da die Mehrheit der Mauswerte Extreme zeigte. So lagen die Leukozyten bei drei der fünf Mäuse unter  $1,7 \times 10^3/\mu\text{l}$  und die nicht erkrankte Maus des ersten Versuchsansatzes mit  $21,4 \times 10^3/\mu\text{l}$  weit über dem Mittelwert. Auffallend ist, dass die zwei nicht erkrankten Mäuse des ersten Ansatzes auch bei Erythrozyten und Thrombozyten die einzigen Mäuse waren, die jeweils deutlich über dem Durchschnitt lagen. Bei der ersten lagen die Erythrozyten- und Thrombozytenwerte bei  $7,1 \times 10^6/\mu\text{l}$  und  $915 \times 10^3/\mu\text{l}$ , bei der zweiten bei  $6,8 \times 10^6/\mu\text{l}$  und  $603 \times 10^3/\mu\text{l}$ . Alle anderen Mäuse hielten sich unter den Mittelwerten von  $4,1 \times 10^6/\mu\text{l}$  für Erythrozyten und  $452 \times 10^3/\mu\text{l}$  für Thrombozyten auf (s. S. 76, Abb. 20 E).

### 5.3.2.2 Knochenmark

Mäuse wiesen in der Stammzellfärbung des Knochenmarks im Schnitt 61,6% GFP<sup>+</sup>-Zellen auf. Erkrankte Tiere zeigten stets über 75% GFP<sup>+</sup>-Zellen, jedoch wurde der Schnitt durch die zwei nicht erkrankten Mäuse gemindert. GFP<sup>+</sup>-Vorläuferzellen waren zu 12,2% CLPs. MPs und LSKs lagen mit wenigen Ausnahmen bei oder nahe 0% (s. S. 76, Abb. 20 A).

Die Reifezellfärbung des Knochenmarks zeigte im Mittel eine GFP-Positivität von 42,1%. Davon machten B-Lymphozyten lediglich 1,2% und T-Lymphozyten 2% aus. Die große Mehrheit der grünen Zellen machte mit durchschnittlich 93% die nicht lymphoide „non-B, non-T“-Population aus, welche 1,7% Granulozyten und 0,9% Monozyten besaß (s. S. 76, Abb. 20 B).

### 5.3.2.3 Milz

Das Milzgewicht von WT-Empfängermäusen, die Spenderzellen aus *Sfrp1*<sup>-/-</sup>-Mikroumgebung erhalten hatten, lag bei der sekundären Transplantation im Schnitt bei 123mg. Erwähnenswert ist, dass die Milzen der früh euthanasierten Mäuse aus dem zweiten Versuchsansatz, die zwischen Tag 8 und Tag 13 erkrankten, alle unter 70mg lagen. Ältere Mäuse zeigten höhere Milzgewichte (s. S. 75, Abb. 15).

Die Milzen der acht Tiere wiesen in der Stammzellfärbung im Durchschnitt eine GFP-Positivität von 40,3% auf, die wiederum zu 8,4% aus CLPs, 0,3% MPs und 0,4% LSKs bestand. Sowohl die GFP-Population als auch deren Subpopulationen zeigten stark schwankende Werte (s. S. 76, Abb. 20 C).

Die Reifezellfärbung der Milz hingegen wies 27,8% GFP<sup>+</sup>-Zellen auf. Diese bestanden im Schnitt aus 2% B-Lymphozyten und 5,9% T-Lymphozyten. Dies lag an den beiden nicht erkrankten Mäusen des ersten Versuchsansatzes, da fast alle anderen Werte 0% waren. Ähnlich wie beim Knochenmark bestand auch bei der Milz die GFP<sup>+</sup>-Zellmehrheit aus 83% „non-B, non-T“-Zellen. In fast keiner Maus waren Granulozyten oder Monozyten zu finden, mit der Ausnahme einer Maus, die 7,1% Monozyten zeigte (s. S. 76, Abb. 20 D).

### 5.3.2.4 Peripheres Blut

Im peripheren Blut zeigten 17,8% der Zellen eine GFP bedingte Grünfärbung. Anteilig davon waren 16,6% B-Lymphozyten und 5,3% T-Lymphozyten. Wie schon in Knochenmark und Milz lag der größte GFP<sup>+</sup>-Anteil mit 64,1% bei den nicht lymphoiden „non-B, non-T“-Zellen. Von den nicht lymphoiden Zellen besaßen Granulozyten einen Anteil von 2,4% und Monozyten einen Anteil von 9,5% (s. S. 76, Abb. 20 F).

### 5.3.2.5 Tumoren

Die beiden nicht erkrankten Mäuse wiesen jeweils einen Thymustumor mit 74% und 9% GFP<sup>+</sup>-Anteil auf und erstere zusätzlich einen Tumor im Genitalbereich mit 51% GFP<sup>+</sup>-Anteil. Die GFP<sup>+</sup>-Zellen aller drei Tumoren bestanden zu fast 100% aus „non-B, non-T“-Zellen (s. S. 76, Abb. 20 G).

## 6. Diskussion

Die Kernfrage, welche die vorliegende Doktorarbeit beantworten sollte, war, welche Rolle das extrinsische SFRP1-Nischensignal auf leukämische Zellen und Leukämogenese spielt. Entsprechend wurde die folgende Nullhypothese aufgestellt:

„Das extrinsische SFRP1-Nischensignal auf leukämische Zellen und Leukämogenese spielt keine Rolle.“

Diese Nullhypothese galt es zu falsifizieren.

### 6.1 Vorversuch

Der Vorversuch diente als Vorbereitung für die primäre Transplantation des Hauptversuchs, für die er eine geeignete GFP<sup>+</sup>-Spenderzellzahl ermitteln sollte. Die zwei Kriterien, die dabei erfüllt werden sollten, waren, dass die Mehrheit der *BA-WT*-Mäuse eine Leukämie entwickelte und dass die Tiere nicht in zu jungem Alter erkrankten, um die anschließende Gewebegewinnung und -analyse nicht zu erschweren. Ob die Spenderzellzahl von  $500 \times 10^3$  GFP<sup>+</sup>-FL-Wildtypzellen eine gute Wahl war, um diese Kriterien zu erfüllen, oder ob die Spenderzellzahl für die primäre Transplantation des Hauptversuchs adaptiert werden sollte, wird nun geklärt.

Zu Beginn ist zu nennen, dass mit fünf von insgesamt sechs *BA-WT*-Mäusen die Mehrheit der Untersuchungsgruppe erkrankte. Ein erfolgloses Engraftment mit nahe 0% GFP<sup>+</sup>-Zellen im peripheren Blut begründet das Nichterkranken der sechsten *BA-WT*-Maus. Da *MIG-WT*-Mäuse wie erwartet gesund blieben, stellten sie eine gute Kontrollpopulation dar.

In Anbetracht der Tatsache, dass *MIG-WT*-Tiere im Schnitt 16 Wochen und *BA-WT*-Tiere nur gut 7 Wochen alt wurden und sich noch in der Wachstumsphase befanden, hätte man bei den Gesamtzellzahlen von Knochenmark und Milz wegen der größeren Körpermaße höhere *MIG-WT*-Werte erwarten können. Es gab jedoch

keine signifikanten Unterschiede. Die plausibelste Erklärung hierfür böten die erwarteten *BCR-ABL* induzierten Leukämien. Diese könnten die hohen *BA-WT*-Gesamtzellzahlen vom Knochenmark gut durch eine diffuse Knochenmarkinfiltration erklären und die Milzzahlen mit Splenomegalien auf Grund ausgelagerter, extramedullärer Hämatopoese. Die deutlich überproportionierten Milzen der *BA-WT*-Tiere passen gut zu dieser Erklärung.

Die Gesamtzellzahlen des peripheren Blutes von *BA-WT*-Tieren deuten ebenfalls auf Leukämien hin. Die Leukozyten von *BA-WT*-Mäuse lagen hier deutlich über der oberen Normgrenze (s. S. 48, Tab. 13). Auch die Lymphozyten im peripheren Blut von *BA-WT*-Mäusen waren etwa dreimal so hoch wie die obere Normgrenze (s. S. 48, Tab. 13), was stark für eine Leukämie mit lymphatischer Differenzierung spricht. Zu einer ungebremsen Proliferation von malignen Leukozyten passte weiterhin, dass die Thrombozyten in der *MIG-WT*-Population etwa dreimal so hoch waren wie die der *BA-WT*-Population, was gut mit einer Verdrängung der Thrombopoese durch maligne Zellen zu vereinbaren ist (s. a. Yiallourous M. 2012). Auch die Erythrozyten von *BA-WT*-Mäusen deuten einen Trend zu einer verdrängten Erythropoese an (s. a. Yiallourous M. 2012). Zwar bezifferte der T-Test hier nur einen  $p^*$ -Wert von 0,097, bezöge dieser aber nicht die gesund gebliebene *BA-WT*-Maus mit ein, ergäbe sich schlagartig ein hoch signifikanter  $p^*$ -Wert von  $p=0,0009$ . Dies zeigt musterbeispielhaft, wie bei kleinen Fallzahlen nur eine Maus den Unterschied zwischen signifikanten und nicht signifikanten Ergebnissen ausmachen kann.

Der starke Verdacht, dass *BA-WT*-Mäuse an Leukämien litten, ließ sich schließlich in der Knochenmarkanalyse bestätigen: vier der fünf erkrankten *BA-WT*-Mäuse erfüllten mit 50 bis 90% B-Zellanteil aller  $GFP^+$ -Zellen die definierten Voraussetzungen für eine lymphatische B-Zelleukämie (s. S. 47). Die fünfte Maus zeigte zwar klinische Symptome, wies im Knochenmark von allen  $GFP^+$ -Zellen aber nur 16% B-Zell-Anteil auf und erfüllte damit nicht alle Leukämiekriterien. Eventuell befand sich hier die Erkrankung noch im Entwicklungsstadium.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Mehrheit der *BA-WT*-Tiere an B-Zelleukämien erkrankte, womit das erste der zwei Zielkriterien des Vorversuchs erfüllt war. Da die ersten *BA-WT*-Mäuse jedoch schon 2,5 Wochen nach Transplantation erkrankten, erfüllten sie nicht das Kriterium ausreichender physischer

Größe, um so die Gewebegewinnung und -analyse zu erleichtern. Deshalb wurde die GFP<sup>+</sup>-Spenderzellzahl für die primäre Transplantation des Hauptversuchs von  $500 \times 10^3$  auf  $400 \times 10^3$  GFP<sup>+</sup>-FL-Zellen gesenkt, in der Hoffnung, die Erkrankungen setzten erst später ein.

## 6.2 Hauptversuch, primäre Transplantation

Das gesetzte Ziel der primären Transplantation des Hauptversuchs war, die Leukämieentwicklung zwischen dem *Sfrp1*-Knockoutstamm und dem als Kontrollgruppe fungierenden Wildtypstamm zu vergleichen.

### 6.2.1 MIG-Wildtyp gegen MIG-*Sfrp1*<sup>-/-</sup>

Zunächst sollte die Gegenüberstellung der MIG-Wildtyp- mit der MIG-*Sfrp1*<sup>-/-</sup>-Populationen die bereits in gesunden Mäusen bestehenden phänotypischen Unterschiede untersuchen, um diese später von Unterschieden einer differierenden Leukämieentwicklung abgrenzen zu können.

In der primären Transplantation blieben erwartungsgemäß alle Empfänger von nicht onkogenen MIG-Zellen ohne Erkrankung. Die Gesamtzellzahlen der Knochenmark- und Milzproben unterschieden sich nicht, was bereits gewonnene Erkenntnisse der Oostendrop Arbeitsgruppe bestätigte (Renström J et al. 2009). 2009 konnte festgestellt werden, dass in *Sfrp1*<sup>-/-</sup>-Tieren die Leukozyten und Lymphozyten im peripheren Blut signifikant höher lagen als in der Kontrollgruppe. Die vorliegende Arbeit bestätigte eine ähnliche Differenz, jedoch bei deutlich niedrigeren Gesamtzellzahlen in beiden Genotypen. Eine plausible Erklärung hierfür bieten die Bestrahlung und die Transplantation kurz nach Geburt, sowie die Transfektion der Spenderzellen, unbestreitbar drei starke Stressoren mit möglicher Langzeitwirkung auf die Hämatopoese. Weiterhin ist interessant, dass auch die

WT-Gesamtzellzahlen von Erythrozyten und Thrombozyten weit niedriger waren als 2009 beobachtet, aber die entsprechenden *Sfrp1*<sup>-/-</sup>-Werte bestätigt werden konnten (s. S. 55, Abb. 14 E). Dies könnte womöglich für eine verbesserte Regenerationsfähigkeit der Erythro- und Thrombopoese von *Sfrp1*<sup>-/-</sup>-Tieren unter Stress sprechen.

Die Knochenmark- und Milzanalyse ergab einige Male Signifikanzen in den GFP<sup>+</sup>-Populationen und -Subpopulationen. Deren Aussagekraft für phänotypische Vergleiche ist jedoch fraglich, denn in beiden Genotypen spiegelten nicht die untersuchten GFP<sup>+</sup>-Zellen die Mehrheit der Zellen wider, sondern die nicht untersuchten GFP<sup>-</sup>-Zellen. Da der *MIG*-Vektor, im Gegensatz zum *BA*-Vektor, für Zellen keinen Überlebensvorteil bot, entwickelten sich *MIG*-Vektor tragende Zellen parallel neben einer großen Mehrheit unveränderter GFP<sup>-</sup>-Zellen. Ein repräsentativerer Vergleich der *MIG*-WT- und der *MIG-Sfrp1*<sup>-/-</sup>-Phänotypen wäre daher gewesen, die GFP<sup>-</sup>-Zellen gegenüberzustellen.

Zusammenfassend konnte also zum einen die in 2009 beschriebene, veränderte Homöostase von Leukozyten und Lymphozyten bestätigt werden, bei jedoch vermutlich stressbedingt geringeren Gesamtzellzahlen. Zum anderen könnten die neu gewonnenen Erkenntnisse zu *Sfrp1*<sup>-/-</sup>-Tieren als eine verbesserte Regenerationsfähigkeit der Erythro- und Thrombopoese unter Stress gedeutet werden.

### 6.2.2 *MIG*-Wildtyp gegen *BA*-Wildtyp

Zur Beantwortung der zweiten Leitfrage, wie sich erkrankte von gesunden Mäusen im genetisch unveränderten Kontrollstamm unterschieden, wurden die *MIG*- und *BA*-Wildtypmäuse miteinander verglichen.

Bei diesem Vergleich stieg das mittlere Überleben von *BA*-WT-Mäusen von 32 Tagen im Vorversuch auf nun 59 Tage, wobei hier schon über 50% der *BA*-WT-Mäuse erkrankt waren. Da der Versuchsaufbau bis auf die Senkung der Spenderzellzahl von  $500 \times 10^3$  auf  $400 \times 10^3$  GFP<sup>+</sup>-Zellen identisch zum Vorversuch war, ist das

verspätete Erkranken von *BA-WT*-Mäusen auf eben diese Veränderung zurückzuführen. Wie beabsichtigt, führte die verlängerte Wachstumsphase zu physisch größeren Mäusen und folglich zu erhöhten Zellzahlen der Organproben, was sich schlussendlich auch in repräsentativeren Analysewerten niederschlug.

Die *BA-WT*-Maus mit dem beschriebenen Dickdarmtumor litt gleichzeitig an einer Leukämie. Separate Tumorentitäten scheinen wahrscheinlich, da sowohl der Ileus als auch der blutige Peritonealguss besser mit einem Darmtumor im fortgeschrittenen Stadium, als mit einer leukämischen Streuung ins lymphatische Darmgewebe zu vereinbaren sind.

In der Analyse des peripheren Blutes ließ sich das Nichterkranken der gesund gebliebenen *BA-WT*-Maus auf ein fehlgeschlagenes Engraftment zurückführen. Jedoch blieb auch eine erkrankte *BA-WT*-Maus unter der 1%-GFP<sup>+</sup>-Zellgrenze für erfolgreiches Engraftment, sodass hier ein Infekt in Erwägung gezogen werden sollte.

Eine *BA-WT*-Maus mit positivem Engraftment zeigte zwar klinische Symptome und eine Splenomegalie, erfüllte mit ihrer GFP<sup>+</sup>-Knochenmarkdifferenzierung aber nicht das letzte fehlende Leukämiekriterium, sodass hier die Krankheitsentwicklung möglicherweise in einem Anfangsstadium festgehalten wurde. Gleichzeitig ist es wichtig, in Erinnerung zu behalten, dass nicht bei jeder *BA-WT*-Maus eine Leukämie zu erwarten war. Denn mit dem Wissen, dass Leukämien auf mehrere genetische und/oder epigenetische Veränderung zurückzuführen sind (Lin YW und Aplan PD. 2004), garantierte auch das Einbringen der onkogenen *BA-WT*-Zellen nicht, dass Mäuse ausnahmslos an Leukämie erkrankten.

Die Knochenmarkanalyse ergab zwei B-Linienleukämien und zeigte eine erkrankte *BA-WT*-Maus, die mit nur 48% GFP<sup>+</sup>-B-Zellen knapp der Diagnosestellung entging. Die beobachteten Leukämien passen zu den Ergebnissen verschiedener Mausmodelle, die bereits 1991 zeigen konnten, dass sich durch das Einbringen *BCR-ABL*-positiver Zellen nicht nur CMLs, sondern auch ALLs hervorrufen ließen (Daley GQ et al. 1991; Kelliher M et al. 1991).

In Anbetracht der Tatsache, dass dieses Teilexperiment leukämische und gesunde *WT*-Mäuse vergleichen sollte, aber insgesamt zu wenige *BA-WT*-Tiere eine klar

diagnostizierbare Leukämie entwickelten, ist für eine Versuchswiederholung eine größere Fallzahl zu empfehlen, um mehr definitive Leukämiediagnosen zu erhalten und somit auch eine größere Aussagekraft.

### 6.2.3 BA-Wildtyp gegen BA-*Sfrp1*<sup>-/-</sup>

Der Vergleich der BA-WT- mit der BA-*Sfrp1*<sup>-/-</sup>-Population sollte die dritte und wichtigste Leitfrage beantworten, wie sich die Leukämien in den Empfängergenotypen unterscheiden.

Mit einem mittleren Überleben von 45 Tagen in *Sfrp1*<sup>-/-</sup>-Tieren und 59 Tagen in WT-Tieren zeichnete sich ein Trend für ein kürzeres *Sfrp1*<sup>-/-</sup>-Überleben ab. Vor dem Hintergrund, dass das *Sfrp1*-Gen in mehreren Leukämiearten hypermethyliert ist (Pehlivan M et al. 2009; Hou HA et al. 2011; Moskalev EA et al. 2012) und damit funktionell inaktiv, ist die Annahme berechtigt, dass Leukämien im *Sfrp1*-Knockoutleukämiemodell womöglich früher zum Tode führten, weil sie sich bereits von Geburt an in einer SFRP1-freien Umgebung entwickeln konnten. Um diesen Trend mit signifikanten Ergebnissen zu bestätigen, könnte eine Versuchswiederholung mit größeren Fallzahlen helfen.

Im Genotypenvergleich fiel auf, dass fünf von sechs erkrankten BA-*Sfrp1*<sup>-/-</sup>-Tieren sehr ausgeprägte B-Zelleukämien zeigten und dabei ihr niedrigster GFP<sup>+</sup>-B-Zellwert fast dem höchsten Wert einer leukämischen BA-WT-Maus entsprach. Dies könnte zu der Hypothese verleiten, Leukämien verliefen in BA-*Sfrp1*<sup>-/-</sup>-Tieren ausgeprägter als in BA-WT-Tieren, weil SFRP1 womöglich ein extrinsischer Tumorsuppressor in der Hämatopoese sei. Da aber Renström und Kollegen 2009 auch in benigner Hämatopoese erhöhte B-Zellwerte in Abwesenheit von SFRP1 beobachten konnten (Renström J et al. 2009), muss die obige Hypothese relativiert werden. Die erhöhten B-Zellwerte sind nicht als rein leukämieassoziiert zu betrachten, sondern auch, zumindest teilweise, auf genotypische Unterschiede zurückzuführen, die sowohl in benigner als auch in maligner Hämatopoese vorkommen. Dies deckt sich auch mit der von Yokota

vorgeschlagenen, inhibitorischen Rolle von SFRP1 auf die B-Lymphopoese (Yokota T et al. 2008). Daher sollte die Hypothese etwas vorsichtiger lauten und von möglicherweise extrinsisch tumorsuppressiven Eigenschaften von SFRP1 auf die Hämatopoese sprechen, welche sich hier womöglich mit genotypischen Unterschieden ergänzen.

Auch die sechste erkrankte *BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Maus erfüllte mit über 70% GFP<sup>+</sup>-T-Zellen im Knochenmark formal die Kriterien einer lymphatischen Leukämie und zeigte außerdem einen ausgeprägten Thymustumor, dessen GFP<sup>+</sup>-Zellen bei fast 100% T-Zelldifferenzierung lagen. Die Leukämiediagnose war jedoch problematisch, da in der einschlägigen Literatur unklar ist, ob es sich bei entsprechenden Befunden um eine T-Zell-ALL oder um ein T-Zell-Lymphoblastisches Non-Hodgkin-Lymphom handelt. Die Knochenmarkinfiltration von unter 1% GFP<sup>+</sup>-Zellen spräche für ein Lymphom und an Hand von Genexpressionsprofilen könnten Unterscheidungen getroffen werden (Hoelzer D und Gökbuget N. 2009). Da in dieser Doktorarbeit jedoch keine Genexpressionsprofile erhoben wurden, kann ohne Spekulation nur gesagt werden, dass es sich um einen Thymustumor mit GFP<sup>+</sup>-T-Zelldifferenzierung handelte.

Doch auch diese Erkenntnis allein ist bemerkenswert, denn von acht *BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Tieren boten noch vier weitere Tumoren, wohingegen im WT-Stamm einzig der bereits oben beschriebene Darmtumor beobachtet wurde. Neben obigem Thymustumor besaß eine *BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Maus mit B-Zelleukämie einen subkutanen Tumor im Brustbereich, der ebenfalls mehrheitlich GFP-positiv war und gut mit einer begleitenden Lymphadenopathie zu vereinbaren ist, wie sie auch im Kindesalter in über 60% aller ALL-Patienten auftritt (Yiallourous M. 2012). In den zwei nicht erkrankten *Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Tieren wurden aber auch GFP-negative Hodentumore gefunden, welche daher also nicht als leukämische Infiltrate, sondern als eigenständige Tumore zu betrachten sind. Unabhängig von der Hämatopoese spricht dies für tumorsuppressive Eigenschaften von SFRP1 und bekräftigt die in der Literatur vertretene Sicht (s. a. Huang J et al. 2007), SFRP1 als Tumorsuppressor anzusehen. Ob der nicht analysierte Tumor, der aus der Schultermuskulatur einer leukämischen *BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Maus hervorzugehen schien, leukämieassoziiert war, ist unwahrscheinlich. Hingegen ist die Lebervergrößerung einer leukämischen *BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Maus zusammen mit einer vergrößerten Milz als leukämieassoziierte

Hepatosplenomegalie anzusehen, wie sie auch regelmäßig in kindlichen ALL-Patienten vorkommt (Yiallourous M. 2012).

Fasst man den obigen Versuchsteil zusammen, stellt sich heraus, dass nicht eine einzige *BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Maus ohne soliden Tumor oder Leukämie geblieben ist. Die Hypothese, SFRP1 verkörpere tatsächlich tumorsuppressive Eigenschaften, und das nicht nur extrinsisch in der Hämatopoese, hätte, falls bestätigt, weitreichende Folgen für die Krebsforschung und auf lange Sicht auch für die Entwicklung neuer Therapieansätze. Daher ist eine Versuchswiederholung mit größeren Fallzahlen unbedingt zu empfehlen. Die Nullhypothese, dass sich Leukämien im *Sfrp1*-Knockoutstamm von Leukämien im Wildtypstamm nicht unterscheiden, kann zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht abgelehnt werden.

## 6.3 Hauptversuch, sekundäre Transplantation

Die sekundäre Transplantation des Hauptversuchs verfolgte das Hauptziel, die Reproduzierbarkeit der Leukämien zu beweisen und so spontan entstandene Malignitäten auszuschließen. Da sowohl die sekundären Empfängermause als auch die weitertransplantierten GFP<sup>+</sup>-Spenderzellen einen Wildtyphintergrund besaßen, gründeten jegliche phänotypischen Veränderungen, die in der sekundären Transplantation zu beobachten waren, ausschließlich auf der Mikroumgebung der primären Empfängermause.

### 6.3.1 Transplantation mit Spenderzellen einer primären BA-WT-Maus

Die Analyse der drei sekundären Empfängermause, die frische GFP<sup>+</sup>-Milzzellen einer primär an B-Zellleukämie erkrankten *BA-WT*-Maus empfangen haben, zeigte, dass alle Empfänger ebenfalls Leukämien vom B-Zellphänotyp entwickelten. Variierende

Spenderzellzahlen schienen keinen Unterschied zu machen, da alle Analysewerte sehr nahe beieinander lagen. Der nicht einmal drei Wochen dauernde, hoch akute Leukämieverlauf, lässt sich damit begründen, dass Leukämien auf multiplen Mutationen basieren (s. a. Lin YW und Aplan PD. 2004). Diese müssen in primären Empfängern zunächst akkumulieren, bevor die Erkrankung ausbricht, sekundären Empfängern werden aber bereits ausselektionierte, leukämische Zellen transplantiert. So lassen sich auch die enorm hohen GFP<sup>+</sup>-Werte und GFP<sup>+</sup>-B-Zellwerte im Knochenmark (s. S. 72, Abb. 19 A, B) und peripheren Blut (s. S. 72, Abb. 19 C) erklären.

Zusammenfassend kann also festgestellt werden, dass sich frische GFP<sup>+</sup>-Milzzellen primär erkrankter Tiere gut zur Weitertransplantation für die Serientransplantation eignen, aber variierende Spenderzellzahlen keinen nennenswerten Unterschied machen. Da weiterhin der Erkrankungsphänotyp der drei sekundären Empfänger so unmissverständlich dem der primär erkrankten Spendermaus glich, kann geschlussfolgert werden, dass es sich um die Reproduktion ein und derselben Krankheit handelte. Damit wurde der Beweis geliefert, dass der Krankheitsursprung in den transplantierten *BA*-Zellen lag.

### 6.3.2 Transplantation mit Spenderzellen primärer *BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Mäuse

Für die Ergebnisse der sekundären Transplantation von weitertransplantierten GFP<sup>+</sup>-Spenderzellen aus primär erkrankten *BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Tieren ist zunächst festzuhalten, dass sowohl frische als auch kältekonservierte Spenderzellen in der Lage waren, Erkrankungen in sekundären Empfängern hervorzurufen. Außerdem lässt sich für höhere Spenderzellzahlen ein schnelleres Erkranken von Empfängern schlussfolgern, was auch bereits in Kapitel 6.2.2 bestätigt wurde.

Bemerkenswert war die Differenzierung der GFP<sup>+</sup>-Zellen, die in allen untersuchten Organen, einschließlich der drei Tumoren, fast ausnahmslos nicht lymphoide „non-B, non-T“-Zellen ohne weitere granulozytäre oder monozytäre Differenzierung waren (s. S. 76, Abb. 20 B, D, F, G). Diese Beobachtung verwunderte, da auch in

der sekundären Transplantation der Erkrankungsphänotyp primär erkrankter *BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Spendermäuse erwartet wurde: B-Zelleukämien. Eine sehr aufwendige Arbeit der Forschergruppe um Klauke bietet und belegt zwei höchst interessante Erklärungsansätze für dieses Phänomen. In einem auf *Cbx7* basierenden Leukämiemausmodell gelang den Forschern mit einer neuen Markierungsmethode, dem „Cellular Barcoding“, das sichere Identifizieren und Verfolgen von leukämischen Zellklonen in Serientransplantationen. Es bot sich eine erstaunliche und ungeahnte Komplexität und Heterogenität von Leukämien, welche bei der Serientransplantation unter anderem eine dynamische Differenzierungskonversion durchliefen, wie sie in der vorliegenden Doktorarbeit beschrieben ist (Klauke K et al. 2015).

Der erste Erklärungsansatz: eine Leukämische Stammzelle (LSC) mit multipotentem Differenzierungspotenzial kann sich, abweichend vom primär manifestierten Erkrankungsphänotyp, sekundär in einen anderen Erkrankungsphänotyp entwickeln (Klauke K et al. 2015).

Der zweite Erklärungsansatz: ein in primären Empfängern noch unbedeutender, ruhender Zellklon mit malignem Potenzial wird durch die Serientransplantation aktiviert, proliferiert und verdrängt im sekundären Empfänger den dominanten Zellklon des primären Empfängers, sodass sich der Erkrankungsphänotyp ändert. Primär koexistieren also mehrere leukämische Zellklone mit unterschiedlichen phänotypischen Eigenschaften, die Forscher sprechen von einer oligoklonalen Leukämie (Klauke K et al. 2015).

Abschließend lässt sich sagen, dass die Reproduzierbarkeit primärer Erkrankungen von *BA-Sfrp1<sup>-/-</sup>*-Tieren wegen der Differenzierungskonversion in der sekundären Transplantation nicht erfolgreich war. In Anbetracht der obigen Erklärungen scheint es jedoch wahrscheinlich, dass der Erkrankungsursprung sekundärer Empfänger in den weitertransplantierten GFP<sup>+</sup>-Zellen lag. Um dies abschließend zu beweisen, hätte die Serientransplantation das „Cellular Barcoding“ auf molekulargenetischer Ebene benötigt (s. a. Klauke K et al. 2015), was jedoch über den Rahmen dieser Doktorarbeit hinausgegangen wäre.

## 6.4 Schlussfolgerungen und Ausblick

Das angestrebte Ziel dieser Arbeit war es, zu klären, welche extrinsische Rolle der WNT-Inhibitor SFRP1 in kindlicher Leukämie spielt. Das hierbei verwendete juvenile Leukämiemodell wurde erfolgreich mit dem Vorversuch vorbereitet und für die Mehrheit der erkrankten *BCR-ABL*-Mäuse ließ sich eine Leukämie diagnostizieren. Daher lässt sich festhalten, dass sich die intrahepatische Transplantation hämatopoetischer *BCR-ABL*-Zellen in neugeborene Mäuse gut für das Leukämiestudium eignete, um Erkenntnisse zur Philadelphia-Chromosom positiven ALL im Kindesalter zu gewinnen, an der 2 bis 5% aller kindlicher ALL-Patienten leiden (Gleißner B et al. 2002).

Die primäre Transplantation des Hauptversuchs legte zunächst die Grundlage für den Leukämievergleich, indem sie die bereits in benigner Hämatopoese bestehenden, genotypischen Unterschiede aufzeigte: *Sfrp1*-Knockoutmäuse wiesen im peripheren Blut höhere Leukozyten- und Lymphozytenwerte als ihre Wildtypkontrollen auf, was auch zu anderen Beobachtungen in der Literatur passt (Yokota T et al. 2008; Renström J et al. 2009). Schließlich ließen sich in maligner Hämatopoese im *Sfrp1*-Knockoutstamm eindeutiger Leukämiediagnosen und mehr Tumoren beobachten als im Wildtypkontrollstamm. Daher lässt sich für SFRP1 schlussfolgern, dass dessen fehlendes extrinsisches Nischensignal in *Sfrp1*-Knockoutmäusen klare Tendenzen zeigte, proliferative Erkrankungen in hämatopoetischen Zellen zu begünstigen (s. a. Raaijmakers MH et al. 2010). Des Weiteren wird die Annahme bestärkt, dass SFRP1 auch in nicht hämatopoetischen Zellen tumorsuppressive Eigenschaften verkörpere (s. a. Huang J et al. 2007). Diese Erkenntnisse stellen nur einen kleinen Forschungsschritt dar, auf den hoffentlich viele weitere Schritte folgen werden.

Zukünftige Projekte sollten besonders die in der sekundären Transplantation beobachteten Differenzierungskonversionen der Erkrankungsphänotypen berücksichtigen und der Frage nachgehen, was dies für neue Therapieansätze in der Humanmedizin bedeutet. Denn Differenzierungskonversionen werden immer wieder in pädiatrischen Patienten mit Leukämierезидивen beobachtet (Rossi JG et al. 2012;

Grammatico S et al. 2013) und könnten der Grund sein, weshalb Behandlungsprotokolle, die bei der Erstmanifestation einer Leukämie anschlagen, bei einem Leukämierезidiv versagen (Leung AY et al. 2013; Patel C et al. 2013). Die Tatsache, dass die primären Erkrankungen von *Sfrp1*-Knockoutmäusen in der Serientransplantation ausnahmslos eben diese Differenzierungskonversionen unterliefen, spricht für das hohe Potenzial, das in der SFRP1-Forschung für die Entwicklung neuartiger Therapieansätze für kindliche Leukämierезidive steckt.

Da Krankheitsreэidive nach wie vor etwa 15% der kindlichen ALL-Patienten betreffen (Yiallourous M. 2012), besteht die Hoffnung, dass die zukünftige Forschung immer neue Therapieansätze für Reэidive entwickelt, um das Langzeitüberleben von betroffenen Kindern noch weiter zu verbessern. Möglicherweise ist SFRP1 ein Kandidat dafür.

## 7. Zusammenfassung

In den letzten Jahrzehnten ordnet die internationale Forschungsgemeinschaft Krebs immer mehr als eine Stammzellerkrankung ein. Der Goldstandard für die Untersuchung von Stammzellen sind *in vivo* Transplantationsversuche. Verschiedene Leukämie Modelle mit adulten Mäusen wurden bereits etabliert, aber Modelle mit juvenilen Mäusen, um kindliche Leukämien zu studieren, wurden bisher nicht beschrieben. Als Konsequenz etablierte die Oostendorp Arbeitsgruppe 2011 erstmalig ein juveniles Leukämietransplantationsmodell, welches sich auch die vorliegende Arbeit zu Nutze machte, um kindliche Leukämien besser zu verstehen.

Diese Doktorarbeit setzte sich mit dem Protein Secreted frizzled-related Protein 1 (SFRP1) auseinander. SFRP1 gilt als ein Inhibitor von WNT-Signalproteinen. WNT-Signale nehmen eine Schlüsselfunktion in der Regulation der Hämatopoese ein, indem sie hämatopoetische Stammzellen (HSCs) und deren Stammzellnische beeinflussen. WNT-Signale wirken auf eine Vielzahl von Genen und regulieren unter anderem die Proliferation und Differenzierung von Zellen. Daher spielen Störungen von WNT-Signalen in vielen Neoplasien eine wichtige Rolle, Leukämien eingeschlossen. Verschiedene Leukämieformen zeigen auch ein gestörtes intrinsisches SFRP1-Signal, auf Grund von Hypermethylierung der *Sfrp1*-Promotorregion; mit intrinsisch ist die Störung eines SFRP1-Signals innerhalb leukämischer Zellen gemeint. Welche Rolle aber das extrinsische SFRP1-Nischensignal auf leukämische Zellen und Leukämogenese spielt, galt es noch zu klären und war daher die Kernfrage dieser Doktorarbeit.

Um zu untersuchen, wie sich das Fehlen vom extrinsischen SFRP1-Nischensignal auf Leukämien auswirkte, wurden HSCs mittels retroviralem Gentransfer mit dem onkogenen p190<sup>BCR-ABL</sup>-Vektor bestückt und in WT-Mäuse und *Sfrp1*-Knockoutmäuse transplantiert. Dabei tendierten *Sfrp1*-Knockoutmäuse dazu, ausgeprägtere Leukämien als ihre WT-Kontrollen zu entwickeln. Des Weiteren zeigten mehr als die Hälfte aller Knockoutmäuse solide Tumoren, was die Hypothese bekräftigte, dass SFRP1 potenziell extrinsisch tumorsuppressive Eigenschaften verkörpere.

Weiterhin zeigten sich in der Serientransplantation von malignen Zellen primärer, leukämischer *Sfrp1*-Knockoutspender in sekundäre Wildtypempfänger Differenzierungskonversionen der Leukämiephänotypen. Diese Beobachtung bietet einen interessanten Erklärungsansatz für folgendes Phänomen in kindlicher Leukämie: eine Therapie schlägt zwar bei der Erstmanifestation einer Leukämie an, versagt aber bei einem Leukämierezidiv.

All diese vielversprechenden Beobachtungen zusammengenommen geben Anlass, das große Potenzial von SFRP1 für die Entwicklung neuartiger Therapieansätze in kindlicher Leukämieforschung nicht zu unterschätzen. Daher soll in dieser Doktorarbeit abschließend gesagt werden, dass weitere Forschungsprojekte zu dem Protein SFRP1 sehr sinnvoll erscheinen und hoffentlich dazu beitragen können, Kindern mit Leukämien zu noch besseren Langzeitüberlebensprognosen zu verhelfen.

## 8. Summary

During the last decades the international research community more and more classifies cancers as stem cell diseases. The gold standard to investigate stem cells are transplantation-based assays *in vivo*. Various leukemia models working with adult mice have been established, but for the study of cancer in children models with juvenile mice have not been described. As a consequence, in 2011 the Oostendorp laboratory was the first to establish a juvenile leukemia transplantation model. The thesis at hand takes advantage of this model to better understand children's leukemias.

This doctoral thesis deals with the protein Secreted frizzled-related Protein 1 (SFRP1). SFRP1 is known to be an inhibitor of WNT signaling proteins. WNT signals constitute a pivotal function in the regulation of hematopoiesis by influencing hematopoietic stem cells (HSCs) and their niche. WNT signaling impacts on a multitude of genes and regulate, amongst others, the proliferation and differentiation of cells. This is why perturbations in WNT signaling play an important role in many neoplasias including leukemias. Various types of leukemia also demonstrate a disturbed intrinsic SFRP1 signal due to hypermethylation of the *Sfrp1* promoter region; intrinsic meaning the perturbation of an SFRP1 signal within a leukemic cell. Though which role the extrinsic SFRP1 niche signal plays on leukemic cells and leukemogenesis is yet to be established and thus was the key question of this doctoral thesis.

To investigate how the absence of the extrinsic SFRP1 niche signal acts on leukemias, HSCs were infected with oncogenic p190<sup>BCR-ABL</sup> via retroviral gene transfer and transplanted into WT and *Sfrp1* knockout mice. *Sfrp1* knockout mice tended to develop more pronounced leukemias as their WT controls. Moreover more than half of all knockout mice exhibited non-circulating tumors, which corroborates the hypothesis that SFRP1 potentially embodies extrinsic tumor suppressive features.

Furthermore, the serial transplantation of malign cells from primary, leukemic *Sfrp1* knockout donors into secondary wild type recipients displayed a transformation

of the leukemic phenotype. This observation offers an interesting explanation approach for the following phenomenon in children's leukemia: a therapeutic strategy may work on the primary manifestation of leukemia, but fails to work on a leukemia relapse.

All these promising observations taken together give reason not to underestimate the great potential of SFRP1 for the development of novel therapeutic approaches in children's leukemia research. Therefore, this doctoral thesis finally concludes that further research projects for the protein SFRP1 are very reasonable and can hopefully contribute to even better long-term survival rates for children with leukemia.

## 9. Quellen

- Agarwal P, Bhatia R. 2015.** Influence of Bone Marrow Microenvironment on Leukemic Stem Cells: Breaking Up an Intimate Relationship. *Adv Cancer Res.* 2015, 127:227-52
- Austin TW, Solar GP, Ziegler FC, Liem L, Matthews W.** A role for the Wnt gene family in hematopoiesis: expansion of multilineage progenitor cells. *Blood.* 1997, 89(10):3624-35
- Becker AJ, McCulloch EA, Till JE. 1963.** Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature.* 1963, 197:452-4
- Bhanot P, Brink M, Samos CH, Hsieh JC, Wang Y, Macke JP, Andrew D, Nathans J, Nusse R. 1996.** A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature.* 1996, 382(6588):225-30
- Bloomfield CD, Goldman AI, Alimena G, Berger R, Borgström GH, Brandt L, Catovsky D, de la Chapelle A, Dewald GW, Garson OM. 1986.** Chromosomal abnormalities identify high-risk and low-risk patients with acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 1986, 67(2):415-20
- Buffler PA, Kwan ML, Reynolds P, Urayama KY. 2005.** Environmental and genetic risk factors for childhood leukemia: appraising the evidence. *Cancer Invest.* 2005, 23(1):60-75.
- Clarkson B, Baserga R. 1974.** The survival value of the dormant state in neoplastic and normal populations. *Control of Proliferation in Animal Cells*, 1974, 945-972
- Cruciat CM, Niehrs C. 2013.** Secreted and transmembrane wnt inhibitors and activators. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013, 5(3):a015081

- Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D. 1991.** Blast crisis in a murine model of chronic myelogenous leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991, 88(24):11335-8
- Dick JE, Lapidot T. 2005.** Biology of normal and acute myeloid leukemia stem cells. *Int J Hematol.* 2005, 82(5):389-96
- Dick JE. 2008.** Stem cell concepts renew cancer research, *Blood.* 2008, 112:4793–807
- Dieterlen-Lievre F. 1975.** On the origin of haemopoietic stem cells in the avian embryo: an experimental approach. *J Embryol Exp Morphol.* 1975, 33(3):607-19
- Duchartre Y, Kim YM, Kahn M. 2016.** The Wnt signaling pathway in cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2016, 99:141-9
- Dufourcq P, Leroux L, Ezan J, Descamps B, Lamazière JM, Costet P, Basoni C, Moreau C, Deutsch U, Couffinhall T, Duplâa C. 2008.** Regulation of endothelial cell cytoskeletal reorganization by a secreted frizzled-related protein-1 and frizzled 4- and frizzled 7-dependent pathway: role in neovessel formation. *Am J Pathol.* 2008, 172(1):37-49
- Ema H, Nakauchi H. 2000.** Expansion of hematopoietic stem cells in the developing liver of a mouse embryo. *Blood.* 2000, 95(7):2284-8
- Flentke GR, Garic A, Hernandez M, Smith SM. 2014.** CaMKII represses transcriptionally active  $\beta$ -catenin to mediate acute ethanol neurodegeneration and can phosphorylate  $\beta$ -catenin. *J Neurochem.* 2014, 128(4):523-35
- Gitzelmann S. 2011.** Etablierung der intrahepatischen Stammzelltransplantation bei neugeborenen Mäusen. *Technische Universität München.* 2011

- Gleißner B, Gökbuget N, Bartram CR, Janssen B, Rieder H, Janssen JW, Fonatsch C, Heyll A, Voliotis D, Beck J, Lipp T, Munzert G, Maurer J, Hoelzer D, Thiel E; German Multicenter Trials of Adult Acute Lymphoblastic Leukemia Study Group. 2002.** Leading prognostic relevance of the BCR-ABL translocation in adult acute B-lineage lymphoblastic leukemia: a prospective study of the German Multicenter Trial Group and confirmed polymerase chain reaction analysis. *Blood*. 2002, 99(5):1536-43
- Grammatico S, Vitale A, La Starza R, Gorello P, Angelosanto N, Negulici AD, De Propriis MS, Nanni M, Meloni G, Mecucci C, Foà R. 2013.** Lineage switch from pro-B acute lymphoid leukemia to acute myeloid leukemia in a case with t(12;17)(p13;q11)/TAF15-ZNF384 rearrangement. *Leuk Lymphoma*. 2013, 54(8):1802-5
- Greaves MF, Wiemels J. 2003.** Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2003, 3(9):639-49
- Groffen J, Heisterkamp N, Stephenson JR, van Kessel AG, de Klein A, Grosveld G, Bootsma D. 1983.** c-sis is translocated from chromosome 22 to chromosome 9 in chronic myelocytic leukemia. *J Exp Med*. 1983, 158(1):9-15
- Hoelzer D, Gökbuget N. 2009.** T-cell lymphoblastic lymphoma and T-cell acute lymphoblastic leukemia: a separate entity? *Clin Lymphoma Myeloma*. 2009, 9 Suppl 3:S214-21
- Hou HA, Kuo YY, Liu CY, Lee MC, Tang JL, Chen CY, Chou WC, Huang CF, Lee FY, Liu MC, Yao M, Tien HF. 2011.** Distinct association between aberrant methylation of Wnt inhibitors and genetic alterations in acute myeloid leukaemia. *Br J Cancer*. 2011, 105(12):1927-33
- Huang J, Zhang YL, Teng XM, Lin Y, Zheng DL, Yang PY, Han ZG. 2007.** Down-regulation of SFRP1 as a putative tumor suppressor gene can contribute to human hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer*. 2007, 7:126

- Ishitani T, Ninomiya-Tsuji J, Nagai S, Nishita M, Meneghini M, Barker N, Waterman M, Bowerman B, Clevers H, Shibuya H, Matsumoto K. 1999.** The TAK1-NLK-MAPK-related pathway antagonizes signalling between beta-catenin and transcription factor TCF. *Nature*. 1999, 399(6738):798-802
- Jones SE, Jomary C. 2002.** Secreted Frizzled-related proteins: searching for relationships and patterns. *Bioessays*. 2002, 24(9):811-20
- Kaatsch P, Spix C. 2015.** German Childhood Cancer Registry – Annual Report 2015 (1980-2014). *Institute of Medical Biostatistics, Epidemiology and Informatics (IMBEI) at the University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz, veröffentlicht auf [www.kinderkrebsregister.de](http://www.kinderkrebsregister.de)*. 2015
- Kawano Y, Kypka R. 2003.** Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci*. 2003, 116(Pt 13):2627-34
- Kelliher M, Knott A, McLaughlin J, Witte ON, Rosenberg N. 1991.** Differences in oncogenic potency but not target cell specificity distinguish the two forms of the BCR/ABL oncogene. *Mol Cell Biol*. 1991, 11(9):4710-6
- Klauke K, Broekhuis MJ, Weersing E, Dethmers-Ausema A, Ritsema M, González MV, Zwart E, Bystrykh LV, de Haan G. 2015.** Tracing dynamics and clonal heterogeneity of Cbx7-induced leukemic stem cells by cellular barcoding. *Stem Cell Reports*. 2015, 4(1):74-89
- Klein TJ, Mlodzik M. 2005.** Planar cell polarization: an emerging model points in the right direction. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2005, 21():155-76
- Kweon SM, Cho YJ, Minoo P, Groffen J, Heisterkamp N. 2008.** Activity of the Bcr GTPase-activating domain is regulated through direct protein/protein interaction with the Rho guanine nucleotide dissociation inhibitor. *J Biol Chem*. 2008, 283(6):3023-30
- Leung AY, Man CH, Kwong YL. 2013.** FLT3 inhibition: a moving and evolving target in acute myeloid leukaemia. *Leukemia*. 2013, 27(2):260-8

- Lin YW, Aplan PD. 2004.** Leukemic transformation. *Cancer Biol Ther.* 2004, 3(1):13-20
- Logan CY, Nusse R. 2004.** The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2004, 20:781-810
- Maru Y, Witte ON. 1991.** The BCR gene encodes a novel serine/threonine kinase activity within a single exon. *Cell.* 1991, 67(3):459-68
- Medvinsky AL, Samoylina NL, Müller AM, Dzierzak EA. 1993.** An early pre-liver intraembryonic source of CFU-S in the developing mouse. *Nature.* 1993, 364(6432):64-7
- Mian AA, Metodieva A, Najajreh Y, Ottmann OG, Mahajna J, Ruthardt M. 2012.** p185(BCR/ABL) has a lower sensitivity than p210(BCR/ABL) to the allosteric inhibitor GNF-2 in Philadelphia chromosome-positive acute lymphatic leukemia. *Haematologica.* 2012, 97(2):251-7
- Miething C, Mugler C, Grundler R, Hoepfl J, Bai RY, Peschel C, Duyster J. 2003.** Phosphorylation of tyrosine 393 in the kinase domain of Bcr-Abl influences the sensitivity towards imatinib in vivo. *Leukemia.* 2003, 17(9):1695-9
- Mikkola HK, Orkin SH. 2006.** The journey of developing hematopoietic stem cells. *Development.* 2006, 133(19):3733-44
- Moore MA, Metcalf D. 1970.** Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo. *Br J Haematol.* 1970,18(3):279-96
- Morita Y, Ema H, Nakauchi H. 2010.** Heterogeneity and hierarchy within the most primitive hematopoietic stem cell compartment, *J Exp Med.* 2010, 207(6):1173-82
- Morrison SJ, Spradling AC. 2008.** Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell.* 2008, 132(4):598-611

- Moskalev EA, Luckert K, Vorobjev IA, Mastitsky SE, Gladkikh AA, Stephan A, Schrenk M, Kaplanov KD, Kalashnikova OB, Pötz O, Joos TO, Hoheisel JD. 2012.** Concurrent epigenetic silencing of wnt/ $\beta$ -catenin pathway inhibitor genes in B cell chronic lymphocytic leukaemia. *BMC Cancer*. 2012, 12:213
- Nagar B, Hantschel O, Young MA, Scheffzek K, Veach D, Bornmann W, Clarkson B, Superti-Furga G, Kuriyan J. 2003.** Structural basis for the autoinhibition of c-Abl tyrosine kinase. *Cell*, 2003, 112(6):859-71
- Niehrs C. 1999.** Head in the WNT: the molecular nature of Spemann's head organizer. *Trends Genet*. 1999,15(8):314-9
- Notta F, Zandi S, Takayama N, Dobson S, Gan OI, Wilson G, Kaufmann KB, McLeod J, Laurenti E, Dunant CF, McPherson JD, Stein LD, Dror Y, Dick JE. 2016.** Distinct routes of lineage development reshape the human blood hierarchy across ontogeny. *Science*. 2016, 351(6269):aab2116
- Nygren MK, Døsen G, Hystad ME, Stubberud H, Funderud S, Rian E.** Wnt3A activates canonical Wnt signalling in acute lymphoblastic leukaemia (ALL) cells and inhibits the proliferation of B-ALL cell lines. *Br J Haematol*. 2007, 136(3):400-13
- Oostendorp RA, Robin C, Steinhoff C, Marz S, Bräuer R, Nuber UA, Dzierzak EA, Peschel C. 2005.** Long-term maintenance of hematopoietic stem cells does not require contact with embryo-derived stromal cells in cocultures. *Stem Cells*. 2005, 23(6):842-51
- Pane F, Intrieri M, Quintarelli C, Izzo B, Muccioli GC, Salvatore F. 2002.** BCR/ABL genes and leukemic phenotype: from molecular mechanisms to clinical correlations. *Oncogene*. 2002, 21(56):8652-67
- Patel C, Stenke L, Varma S, Lindberg ML, Björkholm M, Sjöberg J, Viktorsson K, Lewensohn R, Landgren O, Gottesman MM, Gillet JP. 2013.** Multidrug resistance in relapsed acute myeloid leukemia: evidence of biological heterogeneity. *Cancer*. 2013, 119(16):3076-83

- Pehlivan M, Sercan Z, Sercan HO. 2009.** sFRP1 promoter methylation is associated with persistent Philadelphia chromosome in chronic myeloid leukemia. *Leuk Res.* 2009, 33(8):1062-7
- Raaijmakers MH, Mukherjee S, Guo S, Zhang S, Kobayashi T, Schoonmaker JA, Ebert BL, Al-Shahrour F, Hasserjian RP, Scadden EO, Aung Z, Matza M, Merkenschlager M, Lin C, Rommens JM, Scadden DT. 2010.** Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia. *Nature.* 2010, 464(7290):852-7
- Radich JP, Kopecky KJ, Boldt DH, Head D, Slovak ML, Babu R, Kirk J, Lee A, Kessler P, Appelbaum F, Gehly G. 1994.** Detection of BCR-ABL fusion genes in adult acute lymphoblastic leukemia by the polymerase chain reaction. *Leukemia.* 1994, 8(10):1688-95
- Rafiei A, Mian AA, Döring C, Metodieva A, Oancea C, Thalheimer FB, Hansmann ML, Ottmann OG, Ruthardt M. 2015.** The functional interplay between the t(9;22)-associated fusion proteins BCR/ABL and ABL/BCR in Philadelphia chromosome-positive acute lymphatic leukemia. *PLoS Genet.* 2015, 11(4):e1005144
- Rao TP, Köhl M. 2010.** An updated overview on Wnt signaling pathways: a prelude for more. *Circ Res.* 2010, 106(12):1798-806
- Rattner A, Hsieh JC, Smallwood PM, Gilbert DJ, Copeland NG, Jenkins NA, Nathans J. 1997.** A family of secreted proteins contains homology to the cysteine-rich ligand-binding domain of frizzled receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997, 94(7):2859-63
- Renström J, Istvanffy R, Gauthier K, Shimono A, Mages J, Jardon-Alvarez A, Kröger M, Schiemann M, Busch DH, Esposito I, Lang R, Peschel C, Oostendorp RA. 2009.** Secreted frizzled-related protein 1 extrinsically regulates cycling activity and maintenance of hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell.* 2009, 5(2):157-67
- Renström J, Kröger M, Peschel C, Oostendorp RA. 2010.** How the niche regulates hematopoietic stem cells. *Chem Biol Interact.* 2010, 184(1-2):7-15

- Rodriguez J, Esteve P, Weinl C, Ruiz JM, Fermin Y, Trousse F, Dwivedy A, Holt C, Bovolenta P. 2005.** SFRP1 regulates the growth of retinal ganglion cell axons through the Fz2 receptor. *Nat Neurosci.* 2005, 8(10):1301-9
- Rossi JG, Bernasconi AR, Alonso CN, Rubio PL, Gallego MS, Carrara CA, Gutter MR, Eberle SE, Cocce M, Zubizarreta PA, Felice MS. 2012.** Lineage switch in childhood acute leukemia: an unusual event with poor outcome. *Am J Hematol.* 2012, 87(9):890-7
- Rudolph C, Hegazy AN, von Neuhoff N, Steinemann D, Schröck E, Stripecke R, Klein C, Schlegelberger B. 2005.** Cytogenetic characterization of a BCR-ABL transduced mouse cell line. *Cancer Genet Cytogenet.* 2005, 161(1):51-6
- Satoh W, Gotoh T, Tsunematsu Y, Aizawa S, Shimono A. 2006.** Sfrp1 and Sfrp2 regulate anteroposterior axis elongation and somite segmentation during mouse embryogenesis. *Development.* 2006, 133(6):989-99
- Schepers K, Pietras EM, Reynaud D, Flach J, Binnewies M, Garg T, Wagers AJ, Hsiao EC, Passegué E. 2013.** Myeloproliferative neoplasia remodels the endosteal bone marrow niche into a self-reinforcing leukemic niche. *Cell Stem Cell.* 2013, 13(3):285-99
- Schofield R. 1978.** The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells.* 1978, 4(1-2):7-25
- Schrappé M. 2008.** Risk-adapted stratification and treatment of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Radiat Prot Dosimetry.* 2008, 132(2):130-3
- Schreck C, Bock F, Grziwok S, Oostendorp RA, Istvánffy R. 2014.** Regulation of hematopoiesis by activators and inhibitors of Wnt signaling from the niche. *Ann N Y Acad Sci.* 2014, 1310:32-43
- Schreck C. 2015.** The role of Wnt5a in hematopoiesis and leukemia. *Technische Universität München.* 2015

- Shtivelman E, Lifshitz B, Gale RP, Canaani E. 1985.** Fused transcript of *abl* and *bcr* genes in chronic myelogenous leukaemia. *Nature*. 1985, 315(6020):550-4
- Simon M, Grandage VL, Linch DC, Khwaja A. 2005.** Constitutive activation of the Wnt/beta-catenin signalling pathway in acute myeloid leukaemia. *Oncogene*. 2005, 24(14):2410-20
- Singh SR. 2012.** Stem cell niche in tissue homeostasis, aging and cancer. .2012, 19(35):5965-74
- Sirvent A, Benistant C, Roche S. 2008.** Cytoplasmic signalling by the c-Abl tyrosine kinase in normal and cancer cells. *Biol Cell*. 2008, 100(11):617-31
- Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. 1988.** Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science*. 1988, 241(4861):58-62
- Suzuki H, Watkins DN, Jair KW, Schuebel KE, Markowitz SD, Chen WD, Pretlow TP, Yang B, Akiyama Y, Van Engeland M, Toyota M, Tokino T, Hinoda Y, Imai K, Herman JG, Baylin SB. 2004.** Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. *Nat Genet*. 2004, 36(4):417-22
- Swift S, Lorens J, Achacoso P, Nolan GP. 2001.** Rapid production of retroviruses for efficient gene delivery to mammalian cells using 293T cell-based systems. *Curr Protoc Immunol*. 2001, Chapter 10:Unit 10.17C
- Tavian M, Robin C, Coulombel L, Péault B. 2001.** The human embryo, but not its yolk sac, generates lympho-myeloid stem cells: mapping multipotent hematopoietic cell fate in intraembryonic mesoderm. *Immunity*. 2001, 15(3):487-95
- Tavian M, Péault B. 2005.** Embryonic development of the human hematopoietic system. *Int J Dev Biol*. 2005, 49(2-3):243-50
- Van Den Berg DJ, Sharma AK, Bruno E, Hoffman R.** Role of members of the Wnt gene family in human hematopoiesis. *Blood*. 1998, 92(9):3189-202

- Wang Y, Zhu XX, Zhu CS. 2013.** Abnormal methylation patterns of SFRP1 gene in cells of leukemia and inhibition of arsenic trioxide on the SFRP1 gene. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi.* 2013, 34(2):157-9
- Weissman IL, Anderson DJ, Gage F. 2001.** Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2001, 17:387-403
- Wiemels J. 2008.** Chromosomal translocations in childhood leukemia: natural history, mechanisms, and epidemiology. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2008, (39):87-90
- Wilson A, Trumpp A. 2006.** Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol.* 2006, 6(2):93-106
- Wilson A, Laurenti E, Oser G, van der Wath RC, Blanco-Bose W, Jaworski M, Offner S, Dunant CF, Eshkind L, Bockamp E, Lió P, Macdonald HR, Trumpp A. 2008.** Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell.* 2008, 135(6):1118-29
- Yiallourous M. 2012.** Akute lymphoblastische Leukämie (ALL). *Kompetenznetz Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (KPOH)*, veröffentlicht auf [www.kinderkrebsinfo.de](http://www.kinderkrebsinfo.de). 2012, zuletzt bearbeitet am 09.01.2013
- Yin T, Li L. 2006.** The stem cell niches in bone. *J Clin Invest.* 2006, 116(5):1195-201
- Yokota T, Oritani K, Garrett KP, Kouro T, Nishida M, Takahashi I, Ichii M, Satoh Y, Kincade PW, Kanakura Y. 2008.** Soluble frizzled-related protein 1 is estrogen inducible in bone marrow stromal cells and suppresses the earliest events in lymphopoiesis. *J Immunol.* 2008, 181(9):6061-72
- Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong WG, Ross J, Haug J, Johnson T, Feng JQ, Harris S, Wiedemann LM, Mishina Y, Li L. 2003.** Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature.* 2003, 425(6960):836-41

---

**Zhao C, Blum J, Chen A, Kwon HY, Jung SH, Cook JM, Lagoo A, Reya T.** Loss of beta-catenin impairs the renewal of normal and CML stem cells in vivo. *Cancer Cell.* 2007, 12(6):528-41

## 10. Anhang

### 10.1 Abbildungsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| <b>Abbildung 1:</b> Schemadarstellung des klassischen Betrachtungsansatzes zur hämatopoetischen Stammzellhierarchie .....    | 5  |
| <b>Abbildung 2:</b> Schematische Darstellung der WNT-Signalwege mit den bisher bekannten Interaktionspartnern. ....          | 8  |
| <b>Abbildung 3:</b> Schemadarstellung der Interaktion zwischen SFRP1 und WNT. ....   | 12 |
| <b>Abbildung 4:</b> Bösartige Erkrankungen im Kindesalter in Deutschland .....   | 17 |
| <b>Abbildung 5:</b> Übersichtsgrafik des Vorversuchs und der primären und sekundären Transplantation des Hauptversuchs ..... | 25 |
| <b>Abbildung 6:</b> Vektorkarte vom pMIGp <sup>BCR-ABL</sup> -Plasmid .....  | 32 |
| <b>Abbildung 7:</b> Schematische Darstellung der Transfektion von Phoenix-Zellen. ....                                       | 36 |
| <b>Abbildung 8:</b> Schematische Darstellung der intrahepatischen Transplantation einer neugeborenen Maus .....              | 39 |
| <b>Abbildung 9:</b> Schemadarstellung der Transplantation in die Schwanzvene einer adulten Maus .....                        | 41 |
| <b>Abbildung 10:</b> Schemadarstellung der Zellfärbungen für die Durchflusszytometrie. ....                                  | 45 |
| <b>Abbildung 11:</b> Übersichtsgrafik zum Versuchsaufbau des Vorversuchs. ....   | 49 |
| <b>Abbildung 12:</b> Ergebnisüberblick des Populationsvergleichs von MIG-WT-Mäusen und BA-WT-Mäusen des Vorversuchs .....    | 50 |
| <b>Abbildung 13:</b> Übersichtsgrafik zum Versuchsaufbau der primären Transplantation des Hauptversuchs. ....                | 53 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Abbildung 14:</b> Ergebnisüberblick des Populationsvergleichs von <i>MIG</i> -WT- und <i>MIG-Sfrp1<sup>-/-</sup></i> -Mäusen der primären Transplantation des Hauptversuchs. ....     | 55 |
| <b>Abbildung 15:</b> Ergebnisüberblick des Populationsvergleichs von <i>MIG</i> -WT-Mäusen und <i>BA</i> -WT-Mäusen der primären Transplantation des Hauptversuchs.....                  | 60 |
| <b>Abbildung 16:</b> Ergebnisüberblick des Populationsvergleichs von <i>BA</i> -WT-Mäusen und <i>BA-Sfrp1<sup>-/-</sup></i> -Mäusen der primären Transplantation des Hauptversuchs ..... | 65 |
| <b>Abbildung 17:</b> Repräsentative FACS-Bilder von einer an Leukämie erkrankten <i>BA-Sfrp1<sup>-/-</sup></i> -Maus.....  | 66 |
| <b>Abbildung 18:</b> Übersichtsgrafik zum Versuchsaufbau der sekundären Transplantation des Hauptversuchs. ....  | 71 |
| <b>Abbildung 19:</b> Ergebnisüberblick der sekundären Transplantation des Hauptversuchs mit Spenderzellen einer primären <i>BA</i> -WT-Maus.....   | 72 |
| <b>Abbildung 20:</b> Ergebnisüberblick der sekundären Transplantation des Hauptversuchs mit Spenderzellen aus primären <i>BA-Sfrp1<sup>-/-</sup></i> -Mäusen.....                        | 76 |

## 10.2 Tabellenverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabelle 1:</b> Allgemeine Materialien.....               | 26 |
| <b>Tabelle 2:</b> Technische Instrumente.....               | 27 |
| <b>Tabelle 3:</b> Biologische und chemische Reagenzien..... | 28 |
| <b>Tabelle 4:</b> Handelsübliche Medien und Puffer. ....    | 29 |
| <b>Tabelle 5:</b> Selbst erstellte Medien und Puffer. ....  | 29 |
| <b>Tabelle 6:</b> Primäre Antikörper. ....                  | 30 |
| <b>Tabelle 7:</b> Sekundäre Antikörper. ....                | 31 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabelle 8:</b> Vektoren.....   | 32 |
| <b>Tabelle 9:</b> Zelllinien.....   | 33 |
| <b>Tabelle 10:</b> Mausstämme.....  | 33 |
| <b>Tabelle 11:</b> Software.....  | 33 |
| <b>Tabelle 12:</b> Bezeichnung von Mäusen vor und nach Transplantation.....   | 48 |
| <b>Tabelle 13:</b> Normwerte der Maus im peripheren Blut.....   | 48 |
| <b>Tabelle 14:</b> Tumorübersicht zu <i>BA-WT</i> - und <i>BA-Sfrp1<sup>-/-</sup></i> -Mäusen der primären Transplantation des Hauptversuchs. ....                | 70 |
| <b>Tabelle 15:</b> Übersicht der <i>BA-WT</i> -Spenderzellen primärer <i>BA-Sfrp1<sup>-/-</sup></i> -Spendermäuse für sekundäre <i>BA-WT</i> -Empfängermäuse..... | 75 |

### 10.3 Abkürzungsverzeichnis

|        |   |   |
|--------|---|---|
| ABL    | = | Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog 1        |
| AGM    | = | aortogonadomesonephron                                  |
| ALL    | = | Akute lymphatische Leukämie                             |
| AML    | = | Akute myeloische Leukämie                               |
| APC    | = | Adenomatosis Polyposis Coli-Protein                     |
| BBMM   | = | basal bone marrow media                                 |
| BCR    | = | breakpoint cluster region                               |
| BM     | = | bone marrow   |
| CaMKII | = | Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II |

---

|               |   |  |
|---------------|---|--|
| CLP           | = | common lymphoid precursor                              |
| CML           | = | Chronische myeloische Leukämie                         |
| CRD           | = | Cysteinreiche Domäne                                   |
| CTGF          | = | connective tissue growth factor                        |
| DNA           | = | desoxyribonucleic acid                                 |
| DSH           | = | dishevelled  |
| F+T           | = | zwei Femores und zwei Tibiae                           |
| FACS          | = | fluorescence-activated-cell-sorting                    |
| FGF           | = | fibroblast growth factor                               |
| FL            | = | Fetale Leberzellen                                     |
| FZD           | = | Frizzled-Rezeptor                                      |
| GFP           | = | Grünes Fluoreszenzprotein                              |
| GSK-3 $\beta$ | = | Glykogen-Synthase-Kinase-3 $\beta$                     |
| GTPase        | = | Guanosintriphosphatase                                 |
| HSC           | = | hematopoietic stem cell                                |
| JNK           | = | c-Jun N-terminal Kinase                                |
| LEF           | = | lymphoid enhancer-binding factor                       |
| LRP           | = | low density lipoprotein (LDL) receptor-related protein |
| LRSC          | = | long-term repopulating stem cell                       |
| LSC           | = | leukemic stem cell                                     |
| LTR           | = | long terminal repeat                                   |
| MP            | = | myeloid precursor                                      |

---

|               |   |   |
|---------------|---|---|
| MPP           | = | multipotent progenitor cell                             |
| MSZV          | = | Murines Stammzellvirus                                  |
| NFAT          | = | Nuclear Factor of Activated T-Cells                     |
| PB            | = | peripher blood  |
| PCP           | = | planar cell polarity                                    |
| PI            | = | Propidium-Iodid   |
| PKC $\alpha$  | = | Protein Kinase C $\alpha$                               |
| RNA           | = | ribonucleic acid  |
| mRNA          | = | messenger ribonucleic acid                              |
| RT            | = | Raumtemperatur  |
| SFRP          | = | secreted frizzled-related protein                       |
| SOST          | = | sclerostin  |
| SP            | = | spleen  |
| SPF           | = | specific-pathogen-free                                  |
| SRSC          | = | short-term repopulating stem cell                       |
| TCF           | = | T cell-specific transcription factor                    |
| TGF- $\beta$  | = | Tumor growth factor- $\beta$                            |
| TX            | = | Transplantation   |
| TX I, II, III | = | erster, zweiter, dritter Transplantationsversuchsansatz |
| WBC           | = | white blood cell  |
| WT            | = | Wildtyp   |
| ZPF           | = | Zentrum für Präklinische Forschung                      |

## 11. Danksagung

Ich möchte mich bei dem Direktor der III. Medizinischen Klinik des Klinikums rechts der Isar Herrn Prof. Dr. Christian Peschel bedanken, unter dessen Schirmherrschaft mir die Grundlagenforschung in der Hämatologie und Onkologie ermöglicht wurde.

Weiterhin gilt mein Dank meinem Doktorvater Herrn Prof. dr Robert Oostendorp, in dessen Labor für Stammzellphysiologie ich mehrere Jahre arbeiten durfte und bei dem ich das Privileg hatte, eine so umfangreiche, experimentelle Forschungsarbeit ableisten zu dürfen. Danke für die Betreuung, die Gespräche und die Zeit, die mir gewidmet wurden.

Meiner ganzen Arbeitsgruppe möchte ich für mehrere Dinge danken: für die Anleitung in der mir bis damals noch unbekanntem Laborwelt, für die tatkräftige Unterstützung vor Ort und für die Erreichbarkeit auch zu sehr unkonventionellen Zeiten. Namentlicher Dank gebührt hier Rouzanna Istvánffy, Christina Schreck, Franziska Ruf und Sandra Grziwok.

Zu guter Letzt möchte ich meinen Motivatoren danken: meinen Freunden und meiner Familie. Ohne ihre immerwährende Unterstützung wäre diese Arbeit nicht zu Stande gekommen. Die größte Motivation, nicht zu verzagen und immer weiterzumachen, schenkte mir dabei meine wundervolle Frau Miriam. Vielen, vielen Dank dafür.

*„Diese Doktorarbeit ist kein Sprint. Diese Doktorarbeit ist ein Marathon.“*

*Christian Kehr*