

Die Regulierung von extrazellulären Vesikeln durch hypomethylierende Substanzen in der akuten myeloischen Leukämie

Antonia Elisa Wagner

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Medizin (Dr.med.) genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Marcus Makowski

Prüfer*innen der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Katharina S. Götze
2. Prof. Dr. Maximilian Reichert

Die Dissertation wurde am 04.11.2022 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 13.06.2023 angenommen.

Tabelle 1: Abkürzungsverzeichnis

α	Alpha
ABL	Engl. ABL proto-oncogene
ad	auffüllen auf
Alix	Engl. apoptosis-linked gene-2 (ALG-2) interacting protein X
ALR	Engl. aldehyde reductase
AML	akute myeloische Leukämie
ANGPT1	Angiopoietin 1
APL	akute Promyelozytenleukämie
ASAT	Aspartat-Aminotransferase
ASXL1	Engl. additional sex combs like 1
ATP	Adenosintriphosphat
AZA	5-Azacytidin
BCR	Engl. BCR activator of RhoGEF and GTPase
BIT	BSA, Insulin und Transferrin
CAR	Engl. CXCL12-abundant reticular
CBFB	Engl. core-binding factor beta subunit
CBL	Engl. CBL proto-oncogene
CD	Engl. cluster of differentiation
CEBPA	Engl. CCAAT enhancer binding protein alpha
CFU	Engl. colony forming unit
CXCL12	Engl. CXC chemokine ligand 12 (=SDF-1)
CXCR	Engl. CXC chemokine receptor
DEK	Engl. DEK proto-oncogene
DMSO	Dimethylsulfoxid

DMSZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkultur GmbH
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	Engl. DNA methyltransferase
ELISA	Engl. enzyme linked immunoassay
ERK	Engl. extracellular signal-regulated kinase
ESCRT	Engl. endosomal sorting complex required for transport
EV	extrazelluläre Vesikel
EZH2	Engl. enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit
FACS	Engl. fluorescence-activated cell sorting
FAS	Fettsäure-Synthase
FasL	Engl. Fas Cell Surface Death Receptor-Ligand
FKS	Fetales Kälberserum
FL	FLT3 Ligand
FLT3	Engl. FMS-like tyrosine kinase 3
GAB2	Engl. GRB2 associated binding Protein 2
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GATA2	Engl. GATA binding protein 2
GDI	Engl. gdp dissociation inhibitor
Gly A	Glykophorin A
GRB2	Engl. growth factor receptor bound protein 2

GTP	Guanosintriphosphat
GPI	Glucose-6-phosphat- Isomerase
gy	Gray
HBSS	Hank`s Balanced Salt Solution
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl) - 1piperazinyl) - ethansulfonsäure
HLA	Engl. human leukocyte antigen
HSP	Hitzeschockprotein
HSZ	hämatopoetische Stammzelle
HUVEC	Engl. human umbilical vein endothelial cells
ICAM	Engl. intercellular adhesion molecule
IDH1/2	Engl. isocitrate dehydrogenase 1/2
IMDM	Iscove`s Modified Dulbecco`s Medium
IL	Interleukin
ITD	Engl. internal tandem duplication
KBE	Koloniebildende Einheit
KBE-E	Koloniebildende Einheit- erythroid
KBE-GEMM	Koloniebildende Einheit- granulozytär, erythroid, makrophagozytär und megakaryozytär
KBE-GM	Koloniebildende Einheit- granulozytär und makrophagozytär
KIT	Engl. KIT proto-oncogene
KM	Knochenmark

KRAS	Engl. KRAS proto-oncogene
LAMP	Lysosomal-associated membrane protein
LB	Engl. lysogeny broth
LTC	Engl. long-term culture
m	männlich
MACS	Engl. magnetic assisted cell sorting (=magnetische Zellseparation)
MAP	Engl. mitogen-activated protein
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MECOM	Engl. MDS1 and EVI1 complex locus
MEM	Minimum Essential Medium Eagle
MHC	Engl. major histocompatibility complex
miRNS	Mikro-RNS
MKL1	Engl. MRTFA, myocardin related transcription factor A
ml	Milliliter
MLL	Engl. lysine methyltransferase 2A
MLLT3	Engl. MLLT3 super elongation complex subunit
MLLT10	Engl. MLLT10 histone lysine methyltransferase DOT1L cofactor
µl	Mikroliter
mRNA/RNS	Engl. messenger-RNA
MSZ	Mesenchymale Stammzelle
mut	mutiert
MVP	Engl. major vault protein

MYH11	Engl. myosin heavy chain 11
NKG2D	=KLRK1 (Engl. Killer Cell Lectin Like Receptor K1)
nm	Nanometer
NPM1	Engl. Nucleophosmin 1
NRAS	Engl. NRAS proto-oncogene
NUP214	Engl. nucleoporin 214
PBS	Engl. phosphate buffer saline
PCR	Engl. polymerase chain reaction
PD1	Engl. programmed cell death protein 1
PDL1	Engl. programmed cell death protein 1 ligand
PGAM	Phosphoglyceratmutase
PGK1	Phosphoglyceratkinase 1
PGRL	Engl. PG regulatory-like protein
PHF6	Engl. PHD finger protein 6
PI3	Phosphoinositid-3
PKM1/M2	Engl. pyruvate kinase isozymes M1/M2
PML	Promyelozytenleukämie
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PICALM	Engl. phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein
PRDX1	Engl. Peroxiredoxin-1
PTD	Engl. Partial tandem duplication
RAB	Engl. Ras-related in brain
RAD21	Engl. RAD21 cohesin complex component

RARA	Engl. retinoic acid receptor alpha
Ras	Engl. Rat sarcoma
RBM15	Engl. RNA binding motif protein 15
RhoA	Engl. Ras homolog gene family, member A
rpm	Engl. rounds per minute
rRNS	Ribosomale RNS
RT	Raumtemperatur
RUNX1	Engl. RUNX family transcription factor 1
RUNX1T1	Engl. RUNX1 partner transcriptional co-repressor 1
SAM	S-Adenosyl-Methionin
SCF	Engl. stem cell factor
scRNA/RNS	Engl. small cytoplasmic RNA
SDF-1	Engl. stromal cell-derived factor 1 (=CXCL12)
SF3B1	Engl. Splicing Factor 3b Subunit 1
SHC	Engl. Src homology 2 domain Containing Transforming Protein
SHIP	Engl. Src homology 2 domain containing inositol polyphosphate 5-phosphatase
SHP2	Engl. Src homology 2 domain-containing phosphatase-2
SH2	Engl. Src-homology 2
SMC1/2	Engl. structural maintenance of chromosomes 1/2

Abkürzungsverzeichnis

SNAP	Synaptosomal-associated protein
SNARE	Engl. soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor
snRNA/RNS	Engl. small nuclear RNA
snoRNA/RNS	Engl. small nucleolar RNA
SRSF2	Engl. serine and arginine rich splicing factor 2
STAG2	Engl. stromal antigen 2
TEP	Totalendoprothese
TET1/2	Engl. tet methylcytosine dioxygenase 1/2
TGF	Engl. transforming growth factor
TKD	Tyrosinkinasedomäne
TNF	Tumornekrosefaktor
TPO	Thrombopoetin

TP53	Engl. Tumor protein p53
TRAIL	Engl. TNF-related apoptosis-inducing ligand
t-RNA/RNS	Engl. transfer RNA
TSG101	Engl. Tumor susceptibility gene 101
U2AF1	Engl. U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1
VPS	Engl. Vacuolar protein sorting-associated protein
w	weiblich
WHO	World Health Organization
WT	Wildtyp
WT1	Engl. WT1 transcription factor
ZRSR2	Engl. zinc finger CCCH-type, RNA binding motif and serine/arginine rich 2
°C	Grad Celsius

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	VII
ABSTRACT	X
1 EINLEITUNG	1
1.1 DIE AKUTE MYELOISCHE LEUKÄMIE (AML)	1
1.2 DIE HYPOMETHYLIERENDEN SUBSTANZEN.....	5
1.3 DIE REZEPTOR-TYROSINKINASE FLT3	6
1.4 DIE HÄMATOPOETISCHE STAMMZELLE (HSZ) UND IHRE NICHE	9
1.5 DIE EXTRAZELLULÄREN VESIKEL (EV) UND DAS ENDOSOMALE SYSTEM	11
1.5.1 EINLEITUNG	11
1.5.2 DIE VERSCHIEDENEN TYPEN VON EV	11
1.5.3 ZUSAMMENSETZUNG VON EV	12
1.5.4 DIE BIOGENESE VON EV.....	15
1.5.5 DIE FREISETZUNG VON EV	16
1.5.6 DIE INTERAKTION VON EV MIT DEN EMPFÄNGERZELLEN	16
1.5.7 DIE FUNKTIONEN VON EV	18
1.5.8 DIE WIRKUNGSWEISE VON EV BEI DER AML UND ANDEREN HÄMATOLOGISCHEN ERKRANKUNGEN.....	18
1.6 DIE ZIELSETZUNG DER VORLIEGENDEN ARBEIT	20
2 MATERIAL	22
2.1 CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN	22
2.2 ZYTOKINE	23
2.3 MEDIKAMENTE.....	23
2.4 VERBRAUCHSMATERIALIEN	23
2.5 GERÄTE UND TECHNISCHES ZUBEHÖR	24
2.6 SOFTWAREPROGRAMME.....	24
2.7 OLIGONUKLEOTIDE	25
2.8 PLASMIDE	25
2.9 MOLEKULARGEWICHTSMARKER FÜR DNS UND PROTEINE	25
2.10 ANTIKÖRPER FÜR DIE DURCHFLUSSZYTOMETRIE	25
2.11 KITS	26
2.12 BAKTERIEN	26
2.13 ZELLINIEN.....	27
2.14 KNOCHENMARKPROBEN.....	27
2.15 ZUSAMMENSETZUNG DER ZELLKULTURMEDIEN UND PUFFER	27
3 METHODEN	30
3.1 ALLGEMEINE ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	30
3.1.1 ZELLINIEN.....	30
3.1.2 KNOCHENMARKPROBEN.....	30
3.1.3 EINFRIEREN VON PROBEN.....	31
3.1.4 AUFTAUEN VON PROBEN.....	31
3.1.5 ZELLZÄHLUNG.....	31
3.1.6 KULTIVIERUNG VON MONONUKLEÄREN ZELLEN	31
3.1.7 ZELLVIABILITÄTSMESSUNG MIT ANNEXIN-V/PROPIDIUMIODID-FÄRBUNG	31
3.1.8 ISOLIERUNG VON CD34 ⁺ -ZELLEN MIT MAGNETISCHER ZELLSEPARATION.....	32
3.1.9 KLONOGENER TEST	32

3.2	SPEZIELLE ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	33
3.2.1	GEWINNUNG VON EV	33
3.2.1.1	Herstellung von EV-freiem fetalem Kälberserum (FKS)	33
3.2.1.2	Kultivierung von mononukleären Zellen in EV-freiem Medium	33
3.2.1.3	EV-Isolation aus mononukleären Zellen	34
3.2.2	HERSTELLUNG VON MOLM-13 MIT INTERNALISIERTEM CD63 ⁺ -GFP-KONSTRUKT	34
3.2.2.1	Drei-Plasmid-System	34
3.2.2.2	Transformation kompetenter E. coli Bakterien	34
3.2.2.3	Plasmid-DNS-Präparation	35
3.2.2.4	Herstellung von Lentiviren und lentiviraler Infektion	36
3.3	MOLEKULARBIOLOGISCHE ARBEITSTECHNIKEN	36
3.3.1	DNS-ISOLIERUNG	36
3.3.2	POLYMERASE-KETTENREAKTION EINER ITD VON FLT3	37
3.3.3	AGAROSE-GELELEKTROPHORESE	38
3.4	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODE	38
3.4.1	PELLETIERUNG VON EV	38
3.4.2	HERSTELLUNG VON EV-LYSATEN	38
3.4.3	PROTEINKONZENTRATIONSBESTIMMUNG	38
3.5	IMMUNPHÄNOTYPISCHE ANALYSE	38
3.5.1	EXPRESSIONSANALYSE VON OBERFLÄCHENANTIGENEN AUF ZELLEN	39
3.5.2	EXPRESSIONSANALYSE VON OBERFLÄCHENANTIGENEN AUF EV	39
3.6	FUNKTIONELLE ANALYSEN	40
3.6.1	AZA-TITRATION VON CD34 ⁺ - UND CD34 ⁻ -ZELLEN AUS AML-PATIENTENPROBEN UND GESUNDEN KONTROLLEN	40
3.6.2	UNTERSUCHUNG DES EINFLUSSES LÖSLICHER FAKTOREN AUF CD34 ⁺ -ZELLEN IM TRANSWELL-SYSTEM	40
3.6.3	MIGRATIONSUNTERSUCHUNG MIT KONDITIONIERTEN MEDIEN	42
3.6.3.1	Konditionierung von EL08-1D2 Zellen mit EV	42
3.6.3.2	Migrationsuntersuchung	42
3.7	STATISTISCHE ANALYSEN	44
4	ERGEBNISSE	45
4.1	AML-PATIENTENPROBEN UND GESUNDE KONTROLLEN	45
4.2	AZA-TITRATION VON CD34⁺- UND CD34⁻-ZELLEN AUS AML-PATIENTEN UND GESUNDEN PROBEN	46
4.3	BESTIMMUNG DER VIABILITÄT VON MONONUKLEÄREN ZELLEN NACH VIERTÄGIGER KULTIVIERUNG IN EV-FREIEM MEDIUM	48
4.4	BESTIMMUNG DER TRANSFEKTIONSRATE VON HEK293T-ZELLEN UND DER TRANSDUKTIONSRATE VON MOLM13-ZELLEN	49
4.5	GFP-VERGLEICHSMESSUNG VON KONZENTRIERTEN UND UNKONZENTRIERTEN EV AUS MOLM13 MIT CD63-GFP⁺-KONSTRUKT	50
4.6	BESTIMMUNG DER PROTEINMENGE PRO EV-ISOLATION AUS 4 x 10⁷ ZELLEN	50
4.7	IMMUNPHÄNOTYPISIERUNG VON EV	51
4.8	TRANSWELLVERSUCH MIT CD34⁻-ZELLEN IM OBEREN KOMPARTIMENT	56
4.8.1	FLT3-PCR DER GESUNDEN CD34 ⁺ -ZELLEN	56
4.8.2	VIABILITÄT DER CD34 ⁻ -ZELLEN IM OBEREN KOMPARTIMENT UND DER CD34 ⁺ -ZELLEN IM UNTEREN KOMPARTIMENT	57
4.8.3	KOLONIEBILDUNGSPOTENTIAL	57
4.9	TRANSWELLVERSUCH MIT CD34⁺-ZELLEN IM OBEREN KOMPARTIMENT	58
4.9.1	FLT3-PCR DER GESUNDEN CD34 ⁺ -ZELLEN	58
4.9.2	VIABILITÄT DER CD34 ⁺ -ZELLEN IM OBEREN KOMPARTIMENT UND UNTEREN KOMPARTIMENT	59
4.9.3	KOLONIEBILDUNGSPOTENTIAL	59
4.10	MIGRATIONSUNTERSUCHUNG MIT KONDITIONIERTEN MEDIEN	60

5	<u>DISKUSSION.....</u>	<u>61</u>
6	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>66</u>
7	<u>LITERATURVERZEICHNIS.....</u>	<u>68</u>
8	<u>DANKSAGUNG</u>	<u>78</u>
9	<u>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</u>	<u>79</u>
10	<u>TABELLENVERZEICHNIS</u>	<u>80</u>

Abstract

Acute myeloid leukemia (AML) induces bone marrow insufficiency with consecutive pancytopenia leading to infection and major bleeding events. On the one hand, this is caused by displacement of the healthy hematopoiesis due to massive expansion of the blast population, on the other hand by remodeling of the bone marrow niche caused by the malignant cells. The communication of AML cells with their niche is based on cell-cell contacts as well as soluble factors. It is also assumed that extracellular vesicles (EVs) carrying small RNAs, lipids and proteins, and which can be taken up by cells, play a role in this context. It is therefore of interest to investigate the cargo of EVs secreted by AML cells and determine whether it is modulated by anti-leukemia therapy, e.g. with hypomethylating agents such as azacitidine, which are known to influence RNA synthesis. To this end, EVs of different subtypes of AML and healthy donors were investigated. The FLT3-ITD mutation is the most frequently described genetic aberration in AML and is associated with a poor prognosis, high blast counts, increased risk of relapse and shorter overall survival. FLT3-ITD AML cells are protected from chemotherapy by the bone marrow niche, which is why it was chosen as an AML entity to compare to FLT-WT AML EVs. Immunophenotyping of EVs isolated from bone marrow of AML patients compared to EVs of healthy donors showed significant differences in surface marker expression: Whereas healthy EVs expressed CD41 (* $p < 0,05$, healthy with AZA vs. AML-FLT3-ITD with AZA), CD44 (* $p < 0,05$, healthy without AZA vs. AML-FLT3-WT without AZA), CD64 (* $p < 0,05$, healthy with AZA vs. AML-FLT3-WT with AZA) and CD81 (* $p < 0,05$, healthy with AZA vs. AML-FLT3-ITD with AZA), malignant EVs had a significantly different surface marker expression pattern with expression of CD34 (** $p < 0,01$, healthy without AZA vs. AML-FLT3-ITD without AZA) and CXCR4 (* $p < 0,05$, healthy without AZA vs. AML-FLT3-ITD without AZA). Protein measurement of malignant vs. healthy EVs revealed a trend towards higher protein levels in EVs derived from AML cells (n.s., $p > 0,05$). In addition, this study did not show any influence of soluble factors from malignant cells on the colony forming ability of healthy CD34⁺ cells. However, healthy CD34⁺ cells are less likely to be attracted by stromal cells if they have had previous contact with AML EVs. A modulation of the cargo of EVs by AZA could not be clearly demonstrated, whereby the investigation of RNA of EVs was not part of this thesis. Only slightly increased EV protein levels and a slightly altered expression of the EV surface markers CXCR4, CD34, PD-1 and PDL-1 by AZA treatment was detected. In summary, these

results suggest that AML EVs influence healthy hematopoiesis and the bone marrow microenvironment.

1 Einleitung

1.1 Die akute myeloische Leukämie (AML)

Die AML ist eine maligne Erkrankung des Knochenmarks, welche durch eine klonale Vermehrung und einen Apoptose- und Differenzierungsblock myeloischer Vorläuferzellen (sogenannter Blasten) charakterisiert ist. Die massive Proliferation der Blasten bedingt ein Knochenmarkversagen mit Panzytopenie und konsekutiver Neigung zu opportunistischen Infektionen sowie Anämie und Blutungsneigung, was unbehandelt innerhalb weniger Wochen zum Tod des Patienten führt (Deschler and Lübbert, 2006). Es wird zwischen primärer und sekundärer AML unterschieden. Die primäre oder de novo AML entwickelt sich unabhängig von einer vorhergehenden Knochenmark- oder Krebserkrankung. Eine sekundäre AML kann nach einer anderen hämatologischen Erkrankung wie einem myelodysplastischem Syndrom oder einer myeloproliferativen Erkrankung entstehen. Die AML kann auch durch Chemo- oder Strahlentherapie induziert werden (t-AML). Die Inzidenz liegt bei circa 3,2 Fällen pro 100 000 Einwohner und steigt mit dem Alter an (Howlader *et al.*, 2020). Bei der AML handelt es sich um eine heterogene Gruppe von Erkrankungen. Die Diagnose der AML basiert auf zytomorphologischen sowie immunphänotypischen, als auch molekular- und zytogenetischen Analysen (Döhner *et al.*, 2017). Ab einem Infiltrationsgrad des Knochenmarks von mehr als 20 % myeloischer Blasten oder Nachweis übergleich 20 % im peripheren Blut sind laut World-Health-Organization (WHO) Klassifikation die Kriterien für die Erstdiagnose AML erfüllt. Eine genauere Subtypen-Unterteilung erfolgt im Rahmen der WHO Klassifikation von 2016 (siehe Tabelle 2) (Arber *et al.*, 2016).

Tabelle 2: WHO Klassifikation 2016 von myeloischen Neoplasien und akuter Leukämie (Arber *et al.*, 2016)

Akute myeloische Leukämien und verwandte Neoplasien	
AML mit rekurrenten genetischen Anomalien	
	AML mit t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1
	AML mit inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11
	APL mit t(15;17)(q22;q12); PML-RARA
	AML mit t(9;11)(p22;q23); MLLT3-KMT2A
	AML mit t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214
	AML mit inv(3)(q21q26.2) oder t(3;3)(q21;q26.2); GATA2, MECOM
	AML (megakaryoblastisch) mit t(1;22)(p13;q13); RBM15-MKL1

	Provisorische Entität: AML mit BCR-ABL1
	AML mit mutiertem NPM1
	AML mit biallelischen Mutationen von CEBPA
	Provisorische Entität: AML mit mutiertem RUNX1
AML mit Myelodysplasie-assoziierten Veränderungen	
Therapie-assoziierte myeloische Neoplasie	
AML, nicht anderweitig klassifiziert	
	AML mit minimaler Differenzierung
	AML ohne Ausreifung
	AML mit Ausreifung
	Akute myelomonzytäre Leukämie
	Akute monoblastische/monozytäre Leukämie
	Reine Erythroleukämie
	Akute Megakaryoblastenleukämie
	Akute Basophilenleukämie
	Akute Panmyelose mit Myelofibrose
Myeloisches Sarkom	
Myeloische Down-Syndrom-assoziierte Proliferation	
	Transiente abnormale Myelopoese
	Myeloische Leukämie beim Down-Syndrom

Zyto- und Molekulargenetik sind für die Prognoseeinschätzung und Wahl der Therapie von großer Bedeutung (Grimwade and Hills, 2009). Neben dem Alter haben sie den größten Einfluss auf die Prognose. Mit zunehmendem Alter wird aufgrund von eingeschränkteren Therapiemöglichkeiten seltener eine komplette Remission erreicht und die Wahrscheinlichkeit für ein Rezidiv nimmt zu (Juliusson *et al.*, 2012). Die zyto- und molekulargenetischen Veränderungen bei Erstdiagnose einer AML wurden nach der Klassifikation des european leukemia network (ELN) in prognostische Gruppen unterteilt (siehe Tabelle 3) (Döhner *et al.*, 2017). Es wird zwischen den Risikogruppen günstig, intermediär und ungünstig unterschieden. Die ELN Klassifikation definiert vier verschiedene FLT3-ITD-Genotypen basierend auf der FLT3-ITD-Mutationslast und dem NPM1-Mutationsstatus: (I) NPM1 Mutation ohne FLT3-ITD oder mit niedriger FLT3-ITD Mutationslast (<0,5) mit günstigem Risiko. (II) NPM1 Mutation mit FLT3-ITD und hoher Mutationslast (≥0,5)

mit intermediärem Risiko. (III) Keine NPM1 Mutation und keine FLT3-ITD bzw. FLT3-ITD <0,5 (ohne ungünstige zytogenetische Aberrationen) mit intermediärem Risiko. (IV) Keine NPM1 Mutation aber FLT3-ITD ≥0,5 mit ungünstigem Risiko (Döhner *et al.*, 2017).

Tabelle 3: Zyto- und molekulargenetische Risikogruppen gemäß der ELN Klassifikation (Döhner *et al.*, 2017)

Risikogruppen	Zyto- und molekulargenetische Veränderungen
Günstig	t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1 inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11 NPM1 Mutation ohne FLT3-ITD oder mit niedriger FLT3-ITD Mutationslast (<0,5) Biallelische CEBPA Mutationen
Intermediär	NPM1 Mutation mit FLT3-ITD und hoher Mutationslast (≥0,5) Keine NPM1 Mutation und keine FLT3-ITD bzw. FLT3-ITD <0,5 (ohne ungünstige zytogenetische Aberrationen) t(9;11)(p21.3;q23.3); MLLT3-KMT2A zytogenetische Aberrationen, welche nicht als günstig oder ungünstig eingestuft werden
Ungünstig	t(6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214 t(v;11q23.3); KMT2A rearrangiert t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1 inv(3)(q21.3q26.2) oder t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2-MECOM (EVI1) -5 oder del(5q); -7; -17/abnl(17p) Komplexer Karyotyp (≥ 3 unabhängige Aberrationen) Monosomaler Karyotyp (eine Monosomie außer Verlust des X- oder Y-Chromosoms zusammen mit mindestens einer zusätzlichen Monosomie oder strukturellen Abnormität) Keine NPM1 Mutation aber FLT3-ITD ≥0,5 RUNX1-Mutation ASXL1-Mutation TP53-Mutation

Genetische Veränderungen, die zur Entstehung einer akuten myeloischen Leukämie führen, sind sehr komplex. Nur wenige Treibermutationen genügen zur vollen Ausbildung einer Leukämie. Die Mutationen treten häufig in einem mehrstufigen Prozess auf. Zunächst findet eine initiiierende Mutation statt (beispielsweise NPM1 oder DNMT3A), anschließend kommen weitere kooperierende Mutationen hinzu (Welch *et al.*, 2012). Dies sind häufig Mutationen in

Genen, welche Proteine kodieren, die in Signaltransduktion und Proliferation involviert sind (Kelly and Gilliland, 2002; Swerdlow *et al.*, 2017). Durch moderne Hochdurchsatz-Sequenzierung werden immer mehr genetische Aberrationen entdeckt. Diese können gemäß ihrer biologischen Funktion klassifiziert werden. Die FLT3-ITD-Mutation gehört zur Gruppe der aktivierenden Mutationen der Signaltransduktion (Ley *et al.*, 2013).

Tabelle 4: „The Cancer Genome Atlas“ (Ley *et al.*, 2013)

Kategorie	Genmutationen
Fusionen von Transkriptionsfaktor-Genen	PML-PARA, MYH11-CBFB, RUNX1-RUNX1T1, PICALM-MLLT10
Nukleophosmin 1-Mutationen	NPM1
Mutationen in Tumorsuppressorgenen	TP53, PHF6, WT1
Mutationen in Genen der DNS-Methylierung	DNMT3A, DNMT3B, DNMT1, TET1, TET2, IDH1, IDH2
Aktivierende Mutationen der Signaltransduktion	FLT3, KIT, KRAS, NRAS
Mutationen von Chromatin-Modifikatoren	MLL-PTD, ASXL1, EZH2
Mutationen von myeloischen Transkriptionsfaktoren	RUNX1, CEBPA
Mutationen im Kohesin-Komplex	STAG2, RAD21, SMC1, SMC2
Spleißosomen-Mutationen	SRSF2, U2AF1, ZRSR2

Die Therapie der AML ist heute mehr und mehr individualisiert. Die Therapie-Intention ist bei jüngeren und älteren fitten Patienten kurativ. Bei biologisch vorgealterten Patienten oder Patienten mit erheblichen Komorbiditäten sollte aufgrund der hohen Toxizität und Frühsterblichkeit bei einer nur geringen Chance einer Langzeitremission eine intensive kurative Therapie genauestens evaluiert werden (Kantarjian *et al.*, 2006). Neben supportiver Therapie sollten das Behandlungsregime individuell gewählt werden. So können beispielsweise hypomethylierende Substanzen wie Azacitidine und Decitabine oder aber auch niedrig dosiertes Cytarabin sowie Best Supportive Care (BSC) in palliativer Intention empfohlen werden (Döhner *et al.*, 2010; Fenaux *et al.*, 2010). Bei einem kurativen Therapieansatz erfolgt eine Induktionstherapie mit dem Ziel einer kompletten Remission gefolgt von einer Konsolidierungstherapie. Diese dient dem Erhalt der anhaltenden Remission

(Döhner *et al.*, 2010). Aktuell rücken immer mehr zielgerichtete Therapien in den Fokus. Daneben spielt aber auch epigenetische Regulation eine Rolle.

1.2 Die hypomethylierenden Substanzen

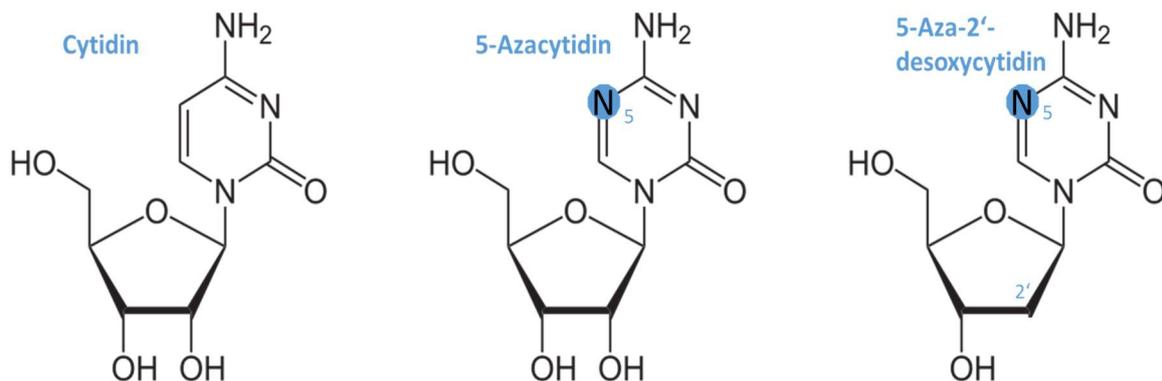


Abbildung 1: Chemische Struktur von Cytidin, Azacytidin und Decitabin. Strukturelle Unterschiede sind in Blau dargestellt. Abbildung nach (Diesch *et al.*, 2016).

Aktuell sind die Azanukleotide Azacytidin (AZA) und Decitabin für die Behandlung einer AML zugelassen. AZA wird in Europa bei Patienten mit AML, die mindestens 65 Jahre alt sind und/oder für eine intensive Therapie mit allogener Stammzelltransplantation nicht in Frage kommen, eingesetzt (Diesch *et al.*, 2016). Azanukleotide sind chemische Analoga des Nucleosids Cytidin. AZA (=5-Azacytidin) besitzt im Vergleich zu Cytidin an der fünften Position ein Stickstoffatom. Decitabin (=5-Aza-2-desoxycytidin) ist ein Analogon mit Desoxyribose. AZA wird größtenteils in RNS, ein kleiner Teil aber auch in DNS eingebaut, wohingegen Decitabin

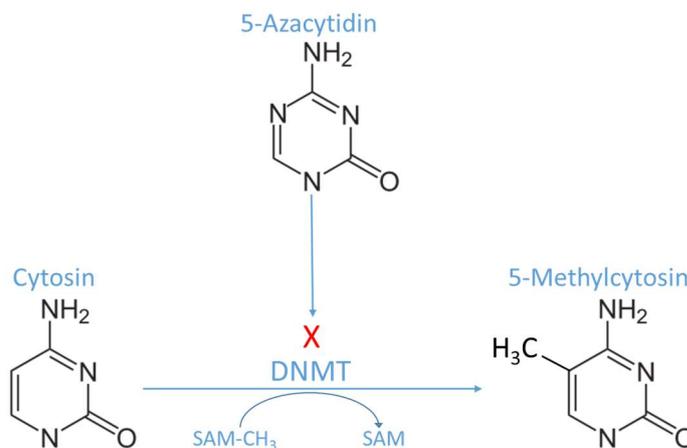


Abbildung 2: Methylierung von Cytosin und dessen Hemmung durch 5-Azacytidin. Der Einbau von 5-Azacytidin behindert die DNS-Methylierung durch irreversible Hemmung der DNMT. Abbildung nach (Wagener and Müller, 2010).

nur mit DNS interagiert. Beide hemmen die DNS-Methyltransferasen (DNMT) irreversibel, insbesondere DNMT1, und verursachen eine Demethylierung (Diesch *et al.*, 2016; Leonhardt *et al.*, 1992). In Krebsepigenomen sind lokale CpG-Inseln von Tumorsuppressorgenen hyper- und Cytosine in CpG-Dinukleotiden allgemein hypomethyliert (Sproul and Meehan, 2013). Beim Gesunden sind CpG-Inseln überwiegend unmethyliert (Deaton and Bird, 2011). Durch eine Methylierung von CpG-Inseln wird das entsprechende Gen nicht abgelesen, was zum Abschalten von Tumorsuppressorgenen (Sproul and Meehan, 2013) und damit unkontrolliertem Wachstum von Tumorzellen führen kann (Esteller, 2007). Durch den Einsatz hypomethylierender Substanzen kann die Stilllegung von Tumorsuppressorgenen aufgehoben werden. Neben der Hypomethylierung bewirken Azanukleotide eine direkte Zytotoxizität durch den Einbau in die DNS beziehungsweise RNS (Diesch *et al.*, 2016).

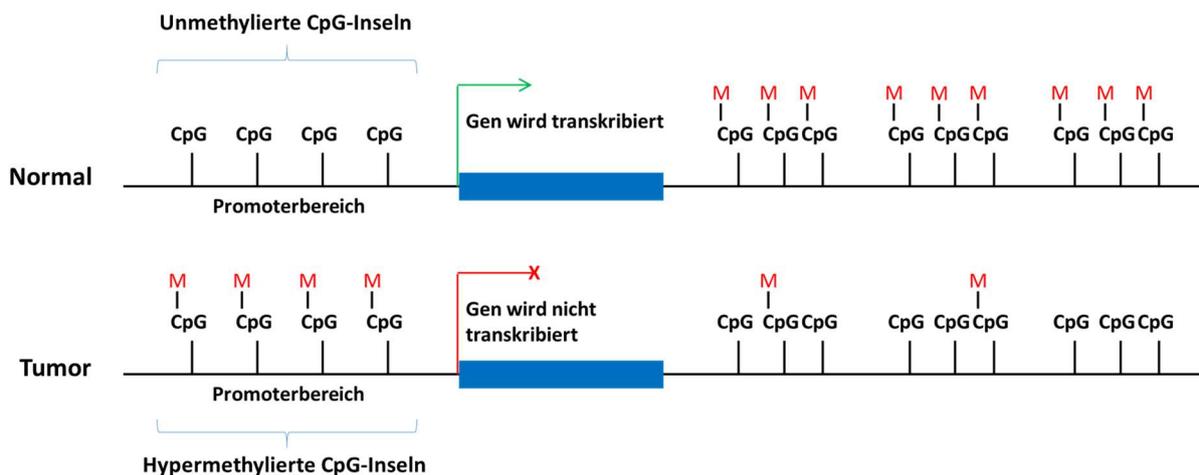


Abbildung 3: Verteilung von CpG-Dinukleotiden im menschlichen Genom und Unterschiede im Methylierungsmuster zwischen normalen und Tumorzellen. In normalen Zellen sind CpG-Inseln, die Promoteren enthalten, unmethyliert und werden transkribiert, während andere CpG-Dinukleotide im Allgemeinen methyliert sind. Bei Krebsepigenomen sind lokale CpG-Inseln von Tumorsuppressorgenen hypermethyliert und Cytosine in CpG-Dinukleotiden hypomethyliert (Sproul and Meehan, 2013; Moison *et al.*, 2014).

1.3 Die Rezeptor-Tyrosinkinase FLT3

FLT3 (FMS-like tyrosine kinase 3) ist eine membrangebundene Rezeptortyrosinkinase (Rosnet *et al.*, 1991). Zusammen mit seinem Ligand FL spielt sie eine Schlüsselrolle bei der Proliferation, Differenzierung und Apoptose von hämatopoetischen Zellen (Grafone *et al.*, 2012). Der FLT3-Rezeptor besteht aus vier Regionen. I) Eine N-terminale extrazelluläre Region, die sich aus fünf Immunglobulin-ähnlichen Domänen zusammensetzt. Die drei distalen Domänen sind an der Ligandenbindung beteiligt, die zwei proximalen an der Dimerisierung

des Rezeptors. II) Eine transmembranöse Domäne. III) Eine juxtamembranöse Domäne. IV) Eine C-terminale intrazelluläre Region. Die letztgenannte Region besteht aus zwei Tyrosinkinasedomänen, welche durch eine Interkinasedomäne miteinander verbunden sind (Agnès *et al.*, 1994).

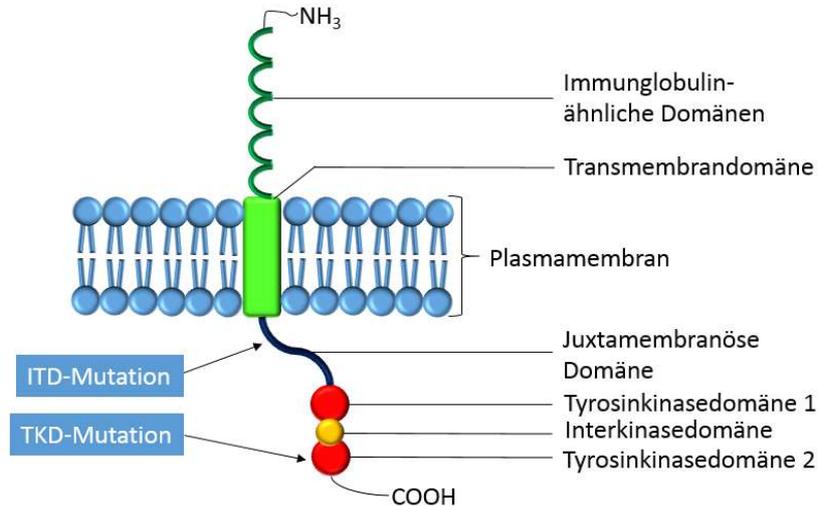


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Aufbaus des FLT3-Rezeptors. Die extrazelluläre N-terminale Immunglobulin-ähnliche Domänen, die transmembranöse Domäne, die juxtamembranöse Domäne, die Interkinasedomäne und die C-terminalen Tyrosinkinasedomänen werden gezeigt. Abbildung nach (Grafone *et al.*, 2012).

Die Funktion des FLT3-Rezeptors ist von der Aktivität seines Liganden FL abhängig. Fast jedes Gewebe exprimiert FL (Levis and Small, 2003). Die Ligandenbindung an den monomeren, unphosphorylierten FLT3 Rezeptor führt zu einer Dimerisierung. Dadurch liegen die Tyrosinkinasedomänen nebeneinander und können sich gegenseitig phosphorylieren. Dadurch wird die Kinaseaktivität gesteigert. Sie kann andere Substrate in der Zelle und Tyrosinreste der zytosolischen Domäne des Rezeptors phosphorylieren. Die neu geschaffenen Phosphotyrosinreste fungieren als Kopplungspunkte für weitere Signaltransduktionswege (Griffith *et al.*, 2004; Rasso, 2012). Das Binden der Signaltransduktionsmoleküle an Phosphotyrosinreste erfolgt mithilfe sogenannter SH2-Domänen. Über die SH2-Domänen können Signalmoleküle aktiviert werden (Rasso, 2012). Zu diesen Proteinen gehören beispielsweise SHC, SHP2, SHIP, CBL, CBL-b, GAB2 oder GRB2 (Schnittger, 2011; Grafone *et al.*, 2012). Dadurch werden Signalkaskaden wie der MAP-Kinase- und PI3-Kinase-Weg in Gang gebracht. Sie regulieren im Zellkern die Transkription von Genen, die für Wachstum und Differenzierung verantwortlich sind (Rasso, 2012).

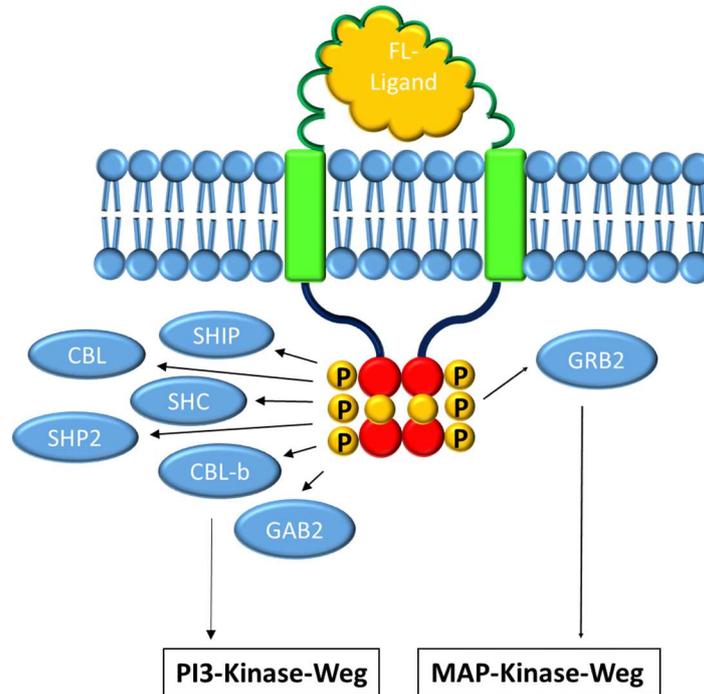


Abbildung 5: Darstellung der Signalkaskaden, die durch den FLT3-Rezeptor aktiviert werden können. Die Bindung des FL-Liganden führt zu einer Dimerisierung des FLT3-Rezeptors und Phosphorylierung der TKD. Anschließend können Signalkaskaden aktiviert werden. Abbildung nach (Grafone *et al.*, 2012).

Mutationen im FLT3-Gen sind die bei der AML am häufigsten beschriebenen genetischen Aberrationen (Kottaridis *et al.*, 2003). Eine Längenmutation in der juxtamembranösen Domäne (FLT3-ITD) ist bei 24 % der Patienten nachweisbar. Punktmutationen oder kleine Deletionen in der zweiten Tyrosinkinasedomäne (TKD) treten bei bis zu 7 % der AML-Fälle auf. Die FLT3-ITD-Mutation führt durch Autophosphorylierung zu einer konstitutiven, Liganden-unabhängigen Aktivierung der vom Gen kodierten Kinase (Gilliland and Griffin, 2002). Eine FLT3-ITD-Mutation wird mit einer deutlich schlechteren Prognose, Leukozytose, hohen Blastenzahl, erhöhtem Risiko für einen Rezidiv und einem kürzerem Gesamtüberleben assoziiert (Kottaridis *et al.*, 2003). Gemäß ELN Klassifikation liegt bei einer hohen Mutationslast von FLT3 und simultaner Mutation von NPM1 ein intermediäres Risiko, bei fehlender Mutation von NPM1 ein hohes Risiko vor (Döhner *et al.*, 2017).

1.4 Die hämatopoetische Stammzelle (HSZ) und ihre Nische

Die HSZ ist der Ausgangspunkt der Hämatopoese. Sie sorgt für die Blutzellproduktion während des gesamten Lebens. Die HSZ ist definiert durch ihre Selbsterneuerung und ihre Pluripotenz, das heißt eine einzelne Stammzelle kann jede der verschiedenen reifen funktionellen hämatopoetischen Zellen generieren: I) Erythrozyten, die den Sauerstofftransport bewerkstelligen. II) Thrombozyten, die mit Blutgefäßen und löslichen Gerinnungsfaktoren interagieren und so die Blutgerinnung regulieren. III) Leukozyten, die das angeborene und erworbene Immunsystem bilden (Ng and Alexander, 2017). Daneben besitzt die HSZ die Fähigkeit des Homings. Bei diesem Prozess gelangen im peripheren Blut zirkulierende HSZ, nachdem sie an Endothelzellen gebunden haben und durch sie hindurch gewandert sind, zurück in die Stammzellnische im Knochenmark. Dieser Vorgang erfolgt u. a. über Attraktion durch CXCL12, welches auch SDF1 genannt wird. Dieses wird von Stromazellen im Knochenmark produziert und bindet an CXCR4 auf der HSZ (Ara *et al.*, 2003). Für den Erhalt der HSZ und der normalen Hämatopoese spielt die hämatopoetische Stammzellnische eine wichtige Rolle. Die Stammzellnische ist ein spezialisiertes Mikromilieu, in welchem die HSZ residieren und interagieren. Dieses Knochenmarkmikromilieu setzt sich aus nicht-zellulären und zellulären Komponenten zusammen. Die nicht-zellulären Bestandteile bilden extrazelluläre Matrixproteine wie Kollagen, Fibronectin, Laminin oder Hyaluronsäure (Schroeder *et al.*, 2016). Die Knochenmarkszellen bestehen aus endothelialen Zellen und mesenchymalen Stromazellen. Die endothelialen Zellen bilden Sinusoide und Arteriolen. Mesenchymale Stromazellen können in die adipogene, chondrogene oder osteogene Richtung differenzieren. (Beerman *et al.*, 2017). Auch andere hämatopoetische Zellen wie Megakaryozyten (Bruns *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2014), Makrophagen (Winkler *et al.*, 2010) und auch das sympathische Nervensystem (Katayama *et al.*, 2006) werden zur Stammzellnische gerechnet. Die Innervation durch das sympathische Nervensystem reguliert die Mobilisation der HSZ durch eine circadiane Freisetzung von Noradrenalin, welche die CXCL12-Expression moduliert (Katayama *et al.*, 2006; Méndez-Ferrer *et al.*, 2008). Hämatopoetische Zellen, wie Makrophagen oder Megakaryozyten können ein Feedback an die Nische geben um die Migration und Proliferation von HSZ zu beeinflussen (Boulais and Frenette, 2015). Viele HSZ sind in Kontakt mit „CXCL12 abundant reticular“ Zellen (CAR-Zellen). Diese exprimieren große Mengen von CXCL12. CXCL12 ist von großer Bedeutung für den Erhalt

des ruhenden Stammzellpools (Sugiyama *et al.*, 2006). Daneben spielen verschiedene perivaskuläre stromale Zellen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Funktion der HSZ. Die Kommunikation innerhalb der Nische erfolgt über zellgebundene Moleküle wie Adhäsine oder Notch-Liganden und Bindung sekretierter Zytokine wie SCF, TGF- β 1, CXCR4, ANGPT1 oder TPO an ihren entsprechenden Oberflächenrezeptor auf der HSZ (Schroeder *et al.*, 2016). Die Nische ist wichtig für die Regulierung der Stammzellen, indem sie ein Gleichgewicht zwischen Differenzierung und Selbsterneuerung aufrechterhält (Beerman *et al.*, 2017). Beim Erwachsenen befinden sich die meisten HSZ in einem ruhenden Stadium, welches sie vor einem DNS-Schaden schützt und die Fähigkeit zur Langzeitrepopularisierung sicherstellt (Cheshier *et al.*, 1999; Arai *et al.*, 2004).

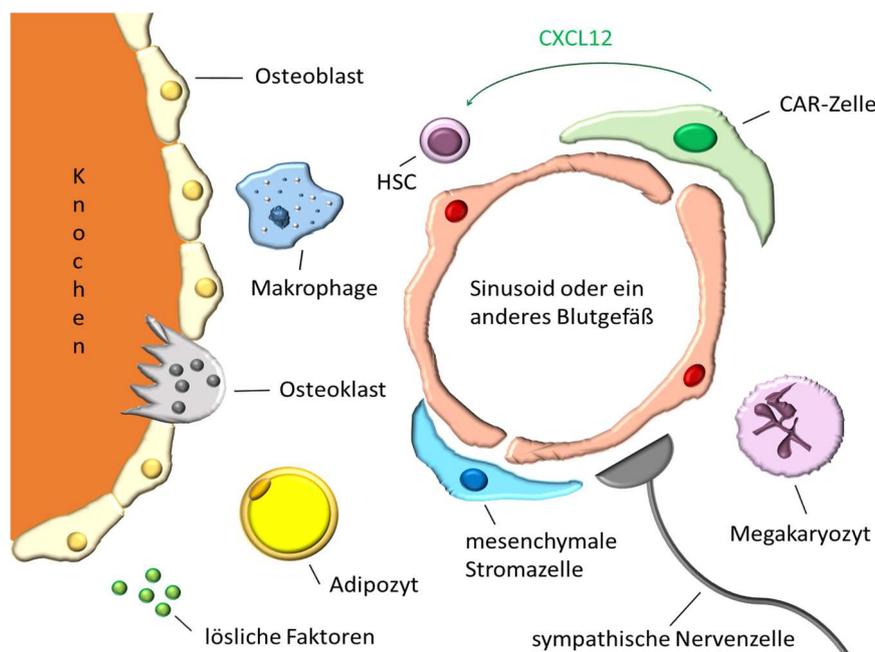


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Stammzellnische. Sie besteht aus einem komplexen Netzwerk von zellulären und azellulären Komponenten. Endotheliale und mesenchymale Zellen unterstützen den Erhalt der hämatopoetischen Stammzelle. Wahrscheinlich tragen auch andere Zellen wie sympathische Nervenzellen, CAR-Zellen, Megakaryozyten und Makrophagen zur Nische bei. Abbildung nach (Beerman *et al.*, 2017).

Änderungen in dieser hämatopoetischen Stammzellnische können zur Entwicklung von Leukämien beitragen. Leukämiezellen ordnen die Nische oft neu, um ihr eigenes Überleben und Wachsen zu unterstützen (Kumar *et al.*, 2016). Chromosomale Veränderungen oder Genmutationen führen zu einer Transformation der HSZ in eine leukämische Stammzelle, die sich selbst erneuern kann und leukämische Blasten hervorbringt. Aktuelle Chemotherapeutika können diese leukämischen Blasten erfolgreich angreifen. Häufig kommt es dennoch zum

Rezidiv, weil sich nicht jede leukämische Zelle in Zellteilung befindet oder durch die Knochenmarksnische geschützt wird (Kumar *et al.*, 2016). In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnten wir zeigen, dass FLT3-ITD leukämische Stammzellen durch die Nische vor Chemotherapie geschützt sind, was durch AZA durchbrochen werden kann (Garz *et al.*, 2017). AZA wiederum beeinflusst auch direkt die Fähigkeit von mesenchymalen Stromazellen maligne Stammzellen zu unterstützen (Wenk *et al.*, 2018).

1.5 Die extrazellulären Vesikel (EV) und das endosomale System

1.5.1 Einleitung

Interzelluläre Kommunikation kann bei benachbarten Zellen durch direkte Zellkontakte betrieben werden, bei entfernten Zellen durch Sekretion von Hormonen und Zytokinen (Camussi *et al.*, 2010). Eine weitere Möglichkeit der Verständigung zwischen den Zellen ist der Transfer von EV. Sie dienen als Transportmittel für Proteine, Lipide und RNS und können selektiv von benachbarten oder entfernten Zellen aufgenommen werden und Empfängerzellen umprogrammieren (Raposo and Stoorvogel, 2013).

1.5.2 Die verschiedenen Typen von EV

Zellen setzen in ihre Umgebung verschiedene Typen von EV frei. Die bekanntesten sind die Exosomen, Mikrovesikel und apoptotischen Körperchen. Als Exosomen werden Abkömmlinge von multivesikulären Endosomen bezeichnet. Sie entsprechen den intraluminalen Vesikeln, die während der Endosomenreifung durch Einwärtsstülpfen der äußeren endosomalen Membran gebildet werden. Die multivesikulären Endosomen können mit der Plasmamembran fusionieren und ihre intrazellulären Vesikel in den Extrazellularraum abgeben. Sie können aber auch mit Lysosomen verschmelzen und abgebaut werden. Exosomen sind ca. zwischen 40 und 100 nm groß. Wohingegen sich Mikrovesikel direkt von der Plasmamembran durch Auswärtsstülpfen abschnüren und zwischen 100 nm und 1 µm groß sind. Apoptotische Körperchen entstehen durch die Fragmentation von apoptotischen Zellen. Sie haben eine Größe von 500 nm bis 5 µm (Giebel, 2017; Raposo and Stoorvogel, 2013) und enthalten intrazelluläre Fragmente, Zellorganelle, Membranen und zytosolische Inhalte (Théry *et al.*,

2001). Bis jetzt gibt es weder Marker für eine genaue Differenzierung zwischen Exosomen, Mikrovesikeln oder apoptotischen Körperchen, noch sind gut entwickelte Techniken zur Aufreinigung bestimmter EV-Subtypen verfügbar (Raposo and Stoorvogel, 2013). Die Komplexität wird verstärkt durch die Tatsache, dass sich EV auch abhängig vom Ursprungszelltyp und Zustand der Zelle (zum Beispiel transformiert, differenziert, stimuliert oder gereizt) unterscheiden (Zhang *et al.*, 2019).

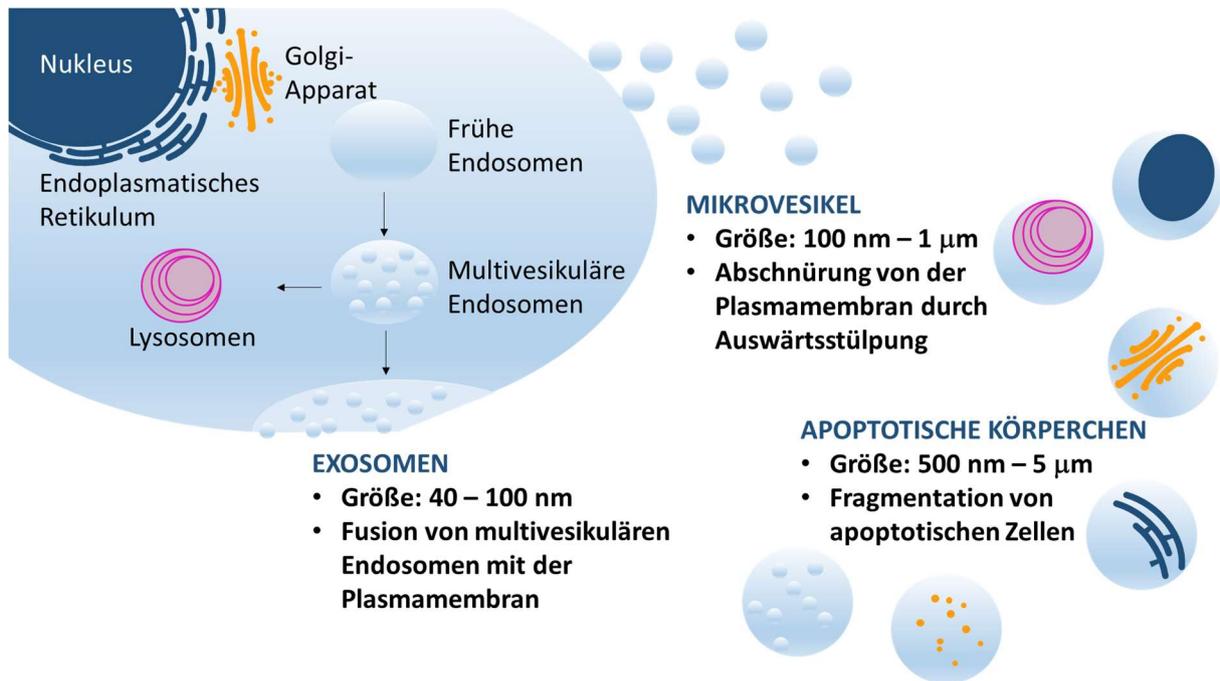


Abbildung 7: Schematische Darstellung der bekanntesten Typen von extrazellulären Vesikeln: Exosomen, Mikrovesikel und apoptotische Körperchen. Exosomen werden intrazellulär generiert aus multivesikulären Endosomen. Mikrovesikel werden durch Abknospen von der Plasmamembran gebildet. Apoptotische Körperchen entstehen bei der Fragmentation von Zellen, die in Apoptose gehen. Abbildung nach (Rufino-Ramos *et al.*, 2017; Jaiswal and Sedger, 2019).

1.5.3 Zusammensetzung von EV

Der Inhalt von EV setzt sich aus Lipiden, Proteinen, RNS und DNS zusammen. EV enthalten keine Zellorganelle (Raposo and Stoorvogel, 2013). Es wurde bisher eine Vielfalt verschiedener Elemente von unterschiedlichen Zelltypen gefunden, etwa 4400 Proteine, 194 Lipide, 1639 mRNA und 764 miRNA (Zhang *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2013; Mathivanan *et al.*, 2012). Die ersten Proteine, die entdeckt wurden, waren MHC-Klasse II-Moleküle und Tetraspanine (Raposo *et al.*, 1996; Escola *et al.*, 1998). Tetraspanine, wie CD63, CD81, CD37 und CD82, gehören zu einer Proteinfamilie, die sich aus vier Transmembrandomänen zusammensetzt und auf späten endozytischen Kompartimenten angereichert wird (Escola *et al.*, 1998; Hemler,

2003). Nach der ersten Proteomuntersuchung von Théry et al kamen weitere Proteine hinzu (Théry *et al.*, 2001). Die meisten Proteine in Exosomen sind als Folge ihres Ursprungs verwandt mit endozytischen Kompartimenten. Exosomen beinhalten zytosolische Proteine, wie Proteine, die für die Bildung von multivesikulären Endosomen mit verantwortlich sind (Alix, TSG 101), oder Hitzeschockproteine (HSP70, HSP90), die bei Stressreaktionen eine große Rolle spielen (Vlassov *et al.*, 2012).

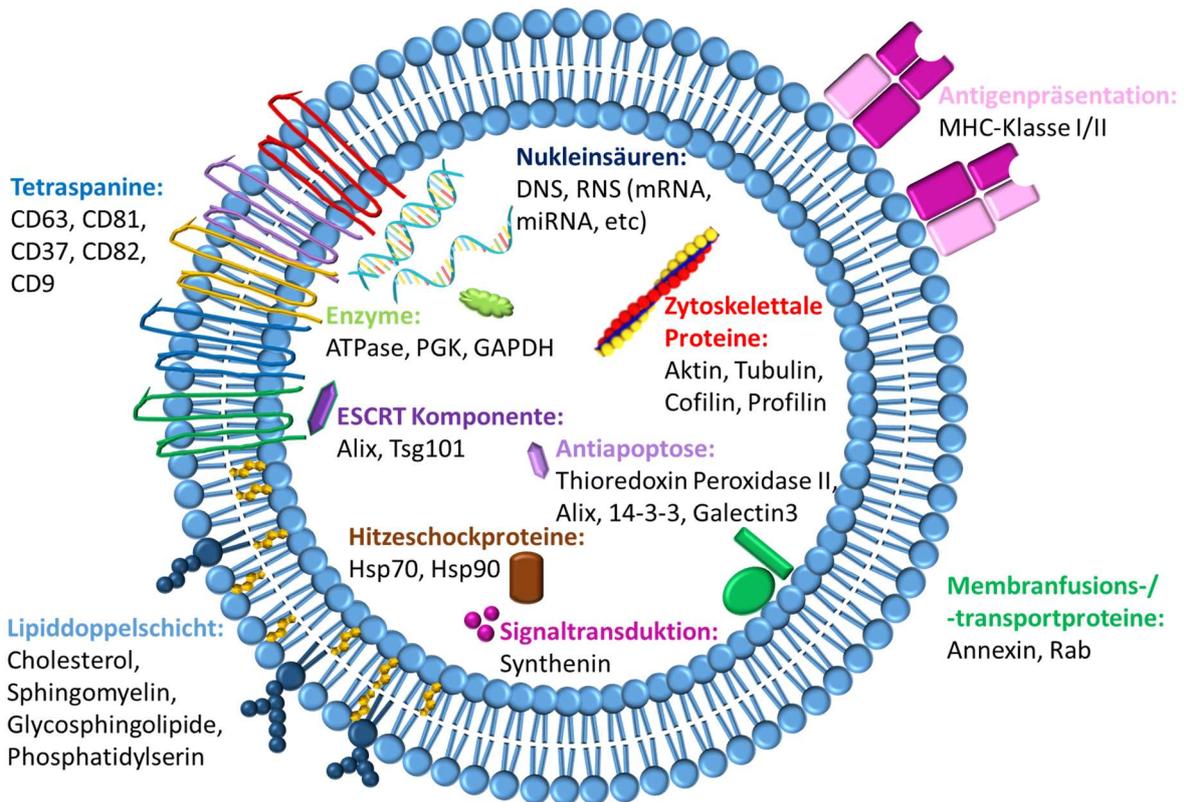


Abbildung 8: Struktur und Zusammensetzung von Exosomen. Exosomen bestehen aus einer Phospholipiddoppelschichtmembran. Die Zusammensetzung ist abhängig vom Ursprung des Zelltyps und dessen Zustand. Exosomen beinhalten Nucleinsäuren und Proteine wie Tetraspanine, ESCRT-Komponenten, Enzyme, zytoskelettale, Hitzeschock-, Antiapoptose-, Signaltransduktions-, Antigenpräsentations- und Membranfusions-/transportproteine. Abbildung nach (Colombo *et al.*, 2014).

Daneben gibt es mit dem Zytoskelett verwandte Proteine (Cofilin und Profilin), Membranfusions-/transportproteine (Annexine und Rab) und Signalfaktoren (Syntenin). Des Weiteren wurden auch Proteine gefunden, die mit der Apoptose in Zusammenhang stehen, wie Thioredoxin Peroxidase II, Alix, 14-3-3 und Galectin-3 (Théry *et al.*, 2001). Eine detaillierte Zusammenfassung der Proteine, die bisher gefunden wurden, findet sich in Tabelle 5.

Tabelle 5: Proteinkomponenten von Exosomen (Choi *et al.*, 2015; Simpson *et al.*, 2008; Natasha *et al.*, 2014; Yellon and Davidson, 2014; Zhang *et al.*, 2019)

Protein Kategorie und Beschreibung	Beispiele
Tetraspanine	CD9, CD63, CD81, CD82, CD37, CD53
Hitzeschockproteine (HSP)	HSP90, HSP70, HSP27, HSP60
Zelladhäsion	Integrine, Lactadherin, ICAM 1
Antigenpräsentation	MHC I/II
Biogenese von multivesikulären Endosomen	Tsg101, Alix, Vps, Rab
Membrantransport	LAMP 1/2, CD13, PGRL
Signalproteine	Ras, ERK, Shp2, GDI, Syntenin-1, 14-3-3, RhoA
Zytoskelettkomponenten	Aktin, Cofilin-1, Moesin, Myosin, Tubulin, Erzin, Radixin, Vimentin
Transkription und Proteinsynthese	Histone 1, 2, 3, Ribosomale Proteine, Ubiquitin, MVP, Komplementfaktor 3
Metabolische Enzyme	FAS, GAPDH, PGK1, PGAM, PKM1/M2, ATP Citrat-Lyase, ATPase, GPI, PRDX1, ASAT, ALR
Membranfusion	Ras, Annexine, SNAP, Dynamin, Syntaxin-3
Antiapoptose	Alix, Thioredoxine, Peroxidase
Wachstumsfaktoren und Zytokine	TNF- α , TNF Rezeptor, TGF- β
Todesrezeptoren	FasL, TRAIL
Eisentransport	Transferrinrezeptor

Neben den Proteinen sind Lipide ein Bestandteil von Exosomen. Im Vergleich zur Plasmamembran enthalten Exosomen von verschiedenen Zellen mehr Cholesterol, Sphingomyelin, Glycosphingolipide und Phosphatidylserin und weniger Phosphatidylcholin (Skotland *et al.*, 2017). Auch RNS konnte in extrazellulären Vesikeln gefunden werden. mRNA und miRNA können zwischen Zellen hin und her transportiert werden (Ratajczak *et al.*, 2006a; Valadi *et al.*, 2007). Mit EV assoziierte mRNA kann in den Zielzellen in Proteine translatiert werden (Valadi *et al.*, 2007; Ratajczak *et al.*, 2006b). miRNA kann die Genexpression in Empfängerzellen regulieren, indem sie die Translation von mRNA in Proteine unterdrückt (Pegtel *et al.*, 2010). Durch Sequenzierung konnten weitere RNS-Spezies in EV nachgewiesen werden, wie t-RNS, r-RNS, nicht-kodierende RNS, snRNA, snoRNA und scRNA (Bellingham *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2013). Daneben wurde einzel- und doppelsträngige DNA in EV gefunden (Balaj *et al.*, 2011; Guescini *et al.*, 2010; Thakur *et al.*, 2014). Da alle Studien zur Isolation der Exosomen die Ultrazentrifugation verwenden, bleibt unklar, ob es sich nicht um eine Ko-Isolation von DNA aus apoptotischen Körperchen, Mikrovesikel oder Proteinkomplexen

handelt (Bebelman *et al.*, 2018). Zusammenfassend sollte man EV als extrazelluläre Organelle ansehen, welche sich aus verschiedenen spezifischen Lipiden, Proteinen und RNS zusammensetzen und Signale von der Signal sendenden Zelle zur Signal empfangenden Zelle übertragen (Ludwig and Giebel, 2012).

1.5.4 Die Biogenese von EV

Da Exosomen in multivesikulären Endosomen gebildet werden und Mikrovesikel durch direkte Abknospung von der Plasmamembran entstehen, unterscheiden sich die Mechanismen, die an ihrer Bildung beteiligt sind. Die intraluminalen Vesikel der multivesikulären Endosomen entstehen durch laterale Abtrennung der Membran von Endosomen, Einwärtsknospung und Abschnürung von Vesikeln (Raposo and Stoorvogel, 2013). Intraluminale Vesikel können auf verschiedenen Wegen gebildet werden. Dies kann endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) abhängig oder unabhängig geschehen. Die ESCRT unabhängige Bildung von intraluminalen Vesikeln erfordert die Sphingomyelinase. Diese produziert das Sphingolipid Ceramid, welches in Exosomen angereichert gefunden wird (Trajkovic *et al.*, 2008). Die kegelförmige Struktur des Ceramids verursacht möglicherweise spontane negative Wölbungen der endosomalen Membran, wodurch das Einwärtsknospen gefördert wird (Castro *et al.*, 2014). Bei der ESCRT abhängigen Vesikelbildung wird der ESCRT-Komplex benötigt. Dieser setzt sich aus vier weiteren Proteinkomplexen zusammen: ESCRT-0 erkennt markierte Proteine und hält diese zurück. ESCRT-I und II triggern die initiale Einwärtsstülpung der äußeren Membran in das Lumen der multivesikulären Endosomen. ESCRT-III bildet eine spiralförmige Struktur, die den abknospenden Hals einengt und mithilfe der ATPase VPS4 wird die Membranabspaltung durchgeführt (Hurley, 2010; Christ *et al.*, 2017). Bei der ESCRT abhängigen Bildung kann zwischen zwei weiteren Wegen unterschieden werden. Es gibt den Ubiquitin- und den Sumo-Protein abhängigen Weg. Durch Ubiquitinierung oder Sumoylierung können die Proteine spezifisch ausgewählt und markiert werden, die durch den ESCRT-Komplex in Endosomen invaginiert werden sollen (Raiborg and Stenmark, 2009; Kunadt *et al.*, 2015). Trotz der zunehmenden Klärung der Bildung von Exosomen bleibt der genaue Mechanismus unklar. Ungeklärt bleibt auch der Mechanismus für die Entstehung von Mikrovesikeln aus der Plasmamembran. Hierbei gibt es Überschneidungen mit der Exosomenbiogenese. So kann die ESCRT-Maschinerie (Nabhan *et al.*, 2012; Wang and Lu,

2017) oder die saure Sphingomyelinase (Bianco *et al.*, 2009) an der Bildung von Mikrovesikel beteiligt sein. Nach Shen *et al.* genügen Plasmamembrananker um oligomerisierte zytoplasmatische Proteine in Mikrovesikel zu bringen (Shen *et al.*, 2011).

1.5.5 Die Freisetzung von EV

Es ist weiterhin unklar, was zur Freisetzung von Mikrovesikeln an der Plasmamembran führt und was die Mobilisation von sekretorischen multivesikulären Endosomen in die Zellperipherie, deren Kopplung und Fusion mit der Zelloberfläche vorantreibt. Für diese Vorgänge wird das Zytoskelett mit Aktin und Mikrotubuli benötigt. Ebenso sind assoziierte molekulare Motoren wie Kinesin und Myosin erforderlich. Die multivesikulären Endosomen, die für die Exozytose bestimmt sind, werden entlang der Mikrotubuli durch den molekularen Motor Kinesin zur Plasmamembran transportiert. Auch braucht man die molekularen Schalter GTPasen und die Fusionsmaschinerie SNARE und zugehörige Faktoren (Cai *et al.*, 2007). Der Mechanismus für den sekretorischen multivesikulären Endosomentransport ist möglicherweise zell-spezifisch. Es konnten verschiedene RABs, die für das Andocken an der Plasmamembran verantwortlich sind, identifiziert werden. RAB35 vermittelt das Andocken bei oligodendroglialen Zellen (Hsu *et al.*, 2010), RAB27 hingegen bei mehreren Krebszelllinien (Ostrowski *et al.*, 2010; Hoshino *et al.*, 2013). Die Stimulierung zur Vesikelabgabe kann abhängig von der Zellart auf unterschiedlichen Wegen erfolgen. Beispielsweise geben Thrombozyten vermehrt extrazelluläre Vesikel ab, nachdem sie durch Thrombin aktiviert wurden (Heijnen *et al.*, 1998) und dendritische Zellen, nachdem eine Aktivierung durch Lipopolysaccharide stattfand (Nolte-'t Hoen *et al.*, 2013). Ein zentraler Stimulus für die Freisetzung von extrazellulären Vesikeln scheint die ansteigenden Ca^{2+} -Konzentration zu sein. Sie wurde sowohl bei einer humanen Erythroleukämiezelllinie (Savina *et al.*, 2005) als auch bei Mastzellen (Raposo *et al.*, 1997) gezeigt.

1.5.6 Die Interaktion von EV mit den Empfängerzellen

EV können mit ihren Zielzellen interagieren und ihnen ihre Inhalte wie Proteine, Lipide und RNS übertragen. Die Bindung von EV an ihre Empfängerzelle ist spezifisch. Erste Hinweise hierfür erhielt man durch die Entdeckung, dass isolierte B-Zell-Exosomen selektiv an folliculäre

dendritische Zellen in lymphatischen Follikeln binden (Denzer *et al.*, 2000). Die molekularen Mechanismen für die Zielzellauswahl der EV bleiben unklar. Wahrscheinlich ist die Zielzellspezifität bestimmt durch Tetraspanine, Integrine, extrazelluläre Matrixproteine, Immunglobulinsuperfamilien, Proteoglykane und Lektine (French *et al.*, 2017; Mulcahy *et al.*, 2014).

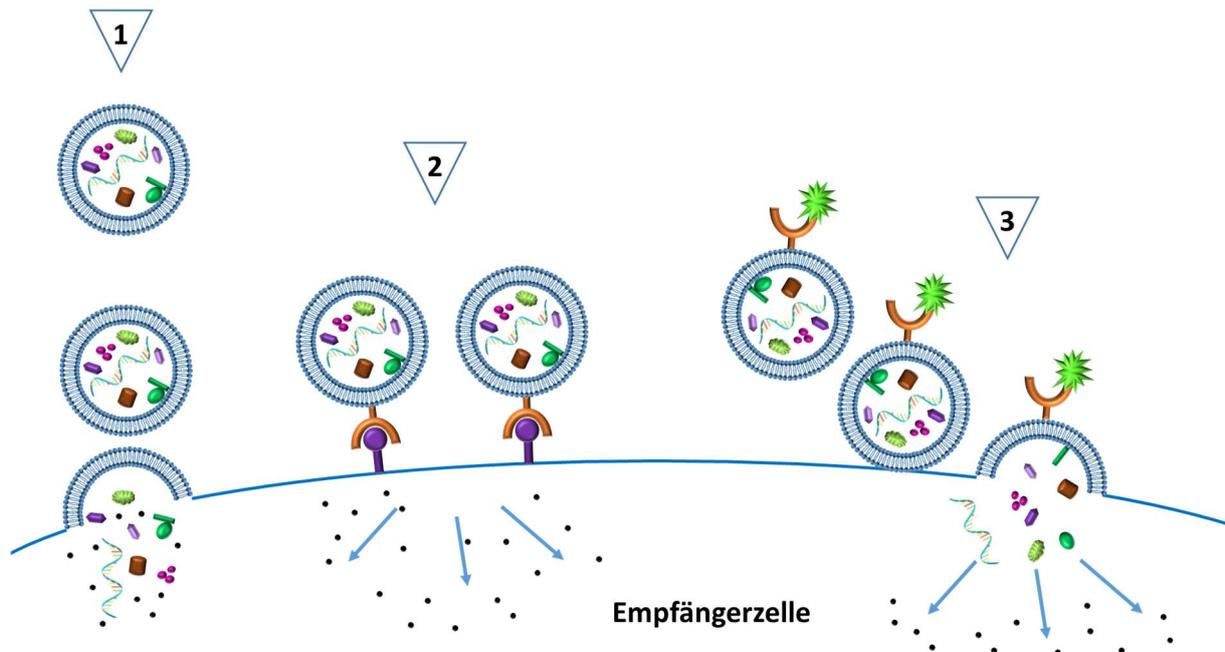


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Beeinflussung von Zielzellen durch EV. Es gibt drei mögliche Wege: (1) Epigenetische Umprogrammierung der Empfängerzelle durch die Belieferung von funktionellen Proteinen, Lipiden und RNS. (2) Direkte Stimulation der Zielzelle via an der Oberfläche gebundene Liganden. (3) Transfer von aktivierten Rezeptoren zur Empfängerzelle. Abbildung nach (Zhang *et al.*, 2019).

Nachdem die EV an der Zielzelle gebunden haben, können sie entweder mit der Plasmamembran verbunden bleiben (Edgar *et al.*, 2016), sich von ihr trennen, direkt mit der Plasmamembran fusionieren (Montecalvo *et al.*, 2012) oder endozytiert werden (Tian *et al.*, 2010). Die Moleküle, die in Exosomen enthalten sind, können durch folgende Mechanismen die Zielzellen beeinflussen. (I) Epigenetische Umprogrammierung der Empfängerzelle durch die Belieferung von funktionellen Proteinen, Lipiden und RNS (II) Direkte Stimulation der Zielzelle via an der Oberfläche gebundene Liganden. (III) Transfer von aktivierten Rezeptoren zur Empfängerzelle (Khalyfa and Gozal, 2014).

1.5.7 Die Funktionen von EV

EV spielen eine große Rolle in physiologischen und pathologischen Prozessen. In den letzten Jahren wurden Exosomen in nahezu allen Körperflüssigkeiten entdeckt und können von verschiedensten Zellen sekretiert werden. Dementsprechend vielfältig sind ihre Funktionen. Allgemein akzeptiert ist, dass sie wichtige Transportmechanismen der interzellulären Kommunikation zwischen Zellen sowohl in der Nähe als auch auf Distanz sind (Raposo and Stoorvogel, 2013). Die Funktionen von EV sind breit gefächert und beinhalten unter anderem Folgendes. (I) Exosomen von mesenchymalen Stromazellen sind Hauptverantwortliche für die Wundheilung. So konnte die myokardiale Infarktgröße reduziert werden (Liu *et al.*, 2017; Lai *et al.*, 2010) und große Effekte bei der Hautwundheilung erreicht werden (Zhang *et al.*, 2015). (II) Durch Exosomen von mesenchymalen Stromazellen konnten Symptome einer Patientin, die an einer ansonsten behandlungsrefraktären „graft-versus-host disease“ litt, unterdrückt werden (Kordelas *et al.*, 2014). (III) Innerhalb des zentralen Nervensystems werden zahlreiche pathogene Proteine, die an Erkrankungen des ZNS beteiligt sind, wie Prionen (Fevrier *et al.*, 2004), β -Amyloid Peptid (Rajendran *et al.*, 2006), Superoxiddismutase (Gomes *et al.*, 2007) und α -Synuclein (Emmanouilidou *et al.*, 2010) in Assoziation mit EV freigesetzt. Diese sekretierten EV nehmen wahrscheinlich an der Verbreitung durch Interaktion mit der Empfängerzelle teil. (IV) EV, die durch intestinale Epithelzellen freigesetzt werden, sind durch Antigenpräsentation an inflammatorischen Prozessen beteiligt. Durch diese EV erlangen die statischen Epithelzellen die Fähigkeit auf Distanz zu agieren (van Niel *et al.*, 2001). Eine bedeutende Funktion haben EV auch bei der Entstehung und Progression der AML (Kumar *et al.*, 2016).

1.5.8 Die Wirkungsweise von EV bei der AML und anderen hämatologischen Erkrankungen

Die Wichtigkeit der Mikroumgebung bei der Krankheitsentstehung und beim Krankheitsprogress der AML wird zunehmend als bedeutungsvoll angesehen. Eine mögliche Rolle von Exosomen hat an Bedeutung gewonnen. In AML-Plasmaproben ist die Anzahl von Exosomen im Vergleich zu Kontrollplasma signifikant erhöht (Hong *et al.*, 2014). Exosomen von Leukämiezellen können die Mikroumgebung verändern, indem sie ihre Fracht wie mRNS, miRNS und Proteine auf stromale Zellen, endotheliale Zellen und Immunzellen übertragen.

Dies förderte die Angiogenese, die Immunsuppression und die transformierten Stromazellen (Kumar *et al.*, 2016).

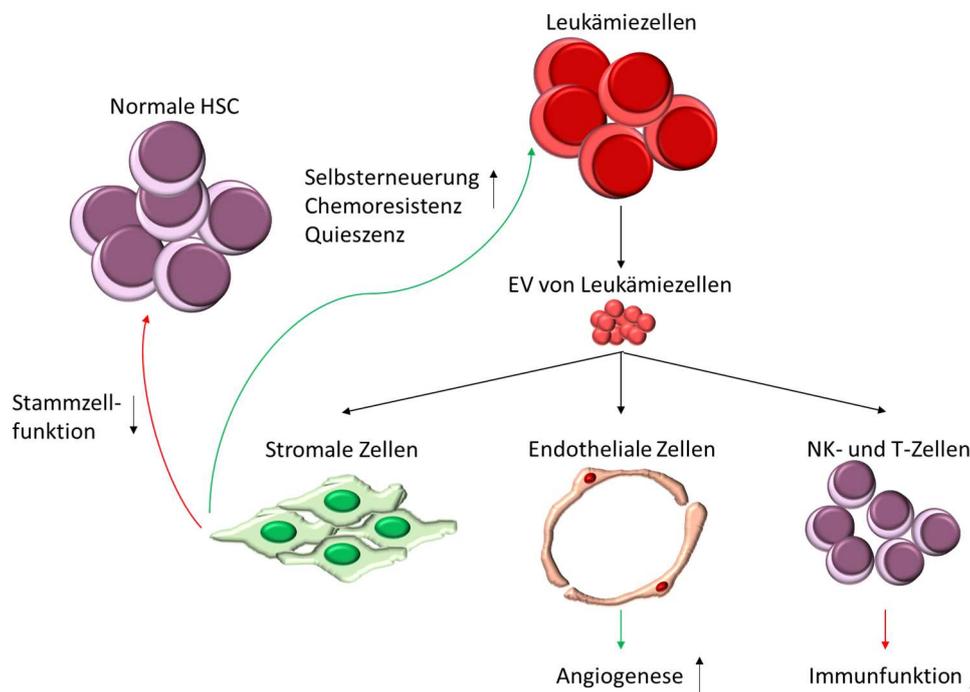


Abbildung 10: Wirkung von AML-EV auf ihre Mikroumgebung. Der Inhalt von EV wird auf stromale Zellen, endotheliale Zellen und Immunzellen übertragen. Dies führt zu einer gesteigerten Angiogenese und einer Immunsuppression. Das transformierte Stroma unterstützt die hämatopoetische Stammzelle weniger und fördert stattdessen die Selbsterneuerung, Chemoresistenz und Quieszenz der leukämischen Zellen. Abbildung nach (Kumar *et al.*, 2016).

Das durch die Leukämie veränderte Stroma hat eine verminderte Unterstützungsfunktion für die normale hämatopoetische Stammzelle. Durch die CXCR4-CXCL12-Achse werden hämatopoetische Stammzellen lokalisiert in ihrer Nische zurückgehalten. Diese Achse wird durch das Leukämiewachstum zerstört (Schroeder and DiPersio, 2012). Bei diesem Prozess spielen Exosomen eine Rolle. Durch eine Übertragung von miRNA-150 mit Hilfe von Molm14-Exosomen (Molm14: humane AML-Zelllinie) wurde in Ba/F3-Zellen (murine B-Vorläufer-Zelllinie) die CXCR4-Expression herunterreguliert. Dies resultierte in einer geringeren Chemotaxis auf CXCL12 von Ba/F3-Zellen (Huan *et al.*, 2013). Exosomen von Leukämiezellen können also möglicherweise das Leukämiewachstum fördern, indem sie in die CXCR4-CXCL12-Achse interferieren. Sie können auch die Angiogeneseigenschaften von Endothelzellen beeinflussen. Umezumi *et al.* zeigten, dass Exosomen eine wichtige Rolle bei der Neoplasie-Endothelzell-Kommunikation spielen. Sie transfizierten die humane Leukämiezelllinie K562 mit CY3 markierter pre-miR-92a. miR-92a reguliert die endotheliale Genexpression.

Anschließend kultivierten sie die transfizierten Leukämiezellen zusammen mit den endothelialen Zellen HUVEC. Es wurde Cy3-miR-92a im Zytoplasma von den Endothelzellen gefunden. Dieses war zusammen mit CD63, einem Exosomenmarker, lokalisiert. In den Endothelzellen war das Zielgen von miR-92a Integrin $\alpha 5$ reduziert. Diese Studie zeigt, dass Exosomen von Leukämiezellen die Endothelzellen beeinflussen können und zu einer gesteigerten Angiogenese führen können (Umezu *et al.*, 2013). Leukämieexosomen sind auch bei der Immundysfunktion von wichtiger Bedeutung. Das Immunsystem von Leukämiepatienten interagiert mit den leukämischen Zellen. Die T-Zellfunktion ist bei der AML beeinträchtigt. T-Zellen sind nicht fähig eine effektive Immunsynapse mit den Blasten und den normalen antigen-präsentierenden Zellen zu bilden (Le Dieu *et al.*, 2009). Auch kann die Immunreaktion von NK-Zellen durch Leukämieexosomen dysreguliert werden. AML-Exosomen aus Serum können das zytotoxische Potential von NK-Zellen unterdrücken, indem sie NKG2D herunterregulieren (Szczepanski *et al.*, 2011). Dies führt zu einem Versagen der Immunantwort auf leukämische Blasten.

1.6 Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Innerhalb der letzten Jahre konnten viele neue Erkenntnisse über die AML und ihre Nische gewonnen werden. Veränderungen innerhalb der hämatopoetischen Nische können zur Leukämieentwicklung beitragen. Die leukämische Zelle ordnet die hämatopoetische Nische neu, um ihr eigenes Überleben und Wachstum zu unterstützen. Dennoch bleibt unklar, wie die Interaktionen zwischen AML-Zellen und ihrer Nische vermittelt werden. Es wird vermutet, dass die AML die Stromazellen und die gesunden hämatopoetischen Stammzellen über EV verändern kann. Ziel dieser Dissertation war, die Rolle von AML-EV auf die gesunde Hämatopoese sowie die Knochenmark-Nische genauer zu untersuchen. Die AML-Patienten wurden basierend auf ihrem FLT3-ITD-Mutationsstatus in zwei Patientengruppen unterteilt. Die FLT3-ITD-Mutation hat eine zentrale Bedeutung bei der Leukämieentstehung und ist mit einer schlechten Prognose und einer erhöhten Rezidivwahrscheinlichkeit assoziiert. Daneben können bei der AML auch epigenetische Veränderungen durch Methylierung von Promotorgenen auftreten. Diesen können hypomethylierende Substanzen wie AZA

entgegenwirken. Eine Intention dieser Arbeit war es, zudem auch die Wirkung von AZA auf EV zu erforschen. Die spezifischen Forschungsfragen meiner Arbeit waren:

- Unterscheiden sich die EV aus AML-KM von EV aus gesundem KM im Hinblick auf ihre Proteinmengen und Oberflächenmarker?
- Können lösliche Faktoren von malignen/AML-Zellen gesunde hämatopoetische Stammzellen in ihrem Koloniebildungspotential modulieren?
- Können EV hämatopoetische Stammzellen indirekt über Stromazellen in ihrer Migrationsfähigkeit manipulieren?
- Kann eine Behandlung mit AZA EV verändern?

2 Material

2.1 Chemikalien und Reagenzien

Aldehyde/Sulfate Latex Beads 4 % w/v 4 µm	molecular probes
α-MEM	Thermo Fisher
Ampicillin	Sigma-Aldrich
Agarose NEEO ultra Qualität Roti® Garose	Carl Roth
Bacto™ Agar	Omin Life Science
Bacto™ Hefeextrakt	Carl Roth
Bacto™ Trypton	Carl Roth
Benzamidin	Sigma-Aldrich
Biocoll Separating Solution	Biochrom
BIT 9500 Serum Substitute	Stemcell technologies
Bovines Serum Albumin (BSA)	Carl Roth
CaCl ₂	Merck
Ciprofloxacin	Fresenius Kabi
Count Bright™ Absolute Counting Beads	Thermo Fisher
Deionisiertes Wasser	Braun
Deoxyribonuklease (DNase) I	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva
Dulbecco`s Modified Eagle Medium, 1x (DMEM)	Thermo Fisher
Ethidiumbromid	Carl Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich
Exosome depleted FCS	Thermo Scientific
Fetales Kälber Serum (FKS)	Biochrom
Gelatine	Sigma-Aldrich
Glutamin	Sigma-Aldrich
Glycin	Carl Roth
HBSS	Thermo Fisher
HEPES	Thermo Fisher
Horse Serum (HS)	Biochrom
Hydrocortison	Sigma-Aldrich
IMDM + Glutamax I	Thermo Fisher
Na ₂ VO ₄	Sigma-Aldrich
Na ₄ P ₂ O ₇	Sigma-Aldrich
NaCl	Sigma-Aldrich
NaF	Sigma-Aldrich
2-Mercaptoethanol	Thermo Fisher
MyeloCult H5100	StemCell technologies
Orange G	Thermo Fisher
PBS	Thermo Fisher
PCR Master Mix Y	peqlab
Penicillin/Streptomycin	Thermo Fisher
PMSF	Sigma-Aldrich
Propidiumiodid (PI)	Thermo Fisher

Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich
Retronectin	Takara clonotech
RPMI 1640	Thermo Fisher
Salzsäure (HCl)	Milipore
StemMACS™ HSC-CFU complete with EPO	Miltenyi Biotec
TE-Puffer	Qiagen
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Sigma-Aldrich
Triton X 100	Carl Roth
Trypanblau	Thermo Fisher
0,5 % Trypsin-EDTA-Lösung, 10 x	Thermo Fisher

2.2 Zytokine

FLT3-Ligand, SCF, IL-3, IL-6, TPO, CXCL12 und LDL wurden von R&D Systems verwendet.

2.3 Medikamente

AZA (Celgene Corp) wurde vor Gebrauch aus einer Stocklösung frisch angesetzt. Die Konzentration und Stoffmenge der Stocklösung betragen 25 mg/ml bzw. 0,1 M. Aus der Stocklösung wurde eine 10 mM Arbeitslösung durch Verdünnung mit deionisiertem Wasser hergestellt. In den Versuchen wurde eine Stoffmenge von 0,5 µM verwendet. Die Verdünnung aus der Arbeitslösung erfolgte durch das eingesetzte Zellkulturmedium.

2.4 Verbrauchsmaterialien

Stumpfe Kanülen	Covidien
Cryo Tubes	Greiner Bio-One GmbH
FACS-Filter	Biogenetics Steriline
FACS-Röhrchen, 5 ml	Falcon
Mikrozentrifugengefäße mit Deckelverriegelung	Eppendorf
MS/LS-Säulen	miltenyi-biotec
PCR-Strips	Biozym Scientific GmbH
Petrischalen	Greiner Bio-One GmbH
50 ml Röhrchen	Greiner Bio-One GmbH
Spritze (3 ml und 10 ml)	Braun
Transwell mit 0,4 µm Membran	Costar
Transwell mit 5 µm Membran	Costar
Tube, Thickwall, Polycarbonate, 1 ml, 11 x 34 mm	Beckmann Coulter
6-well-Platten	Greiner Bio-One GmbH

12-well-Platten	Greiner Bio-One GmbH
24-well-Platten	Greiner Bio-One GmbH
96-well-Platten	Greiner Bio-One GmbH
Whatman Filter	GE Healthcare
Whatman Papier	GE Healthcare
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One GmbH
Zellkulturschalen	TPP
Zellsieb	Greiner Bio-One GmbH

2.5 Geräte und technisches Zubehör

Brutschrank (Hera cell 150i)	Thermo Scientific
Drehrad	Brand
Durchflusszytometer (Cyan ADP 9c)	Beckmann Coulter
Durchflusszytometer (MoFlow)	Beckman Coulter
Elektrophoresekammer	BioRad
ELx800 Universal Microplate Reader	BIO-TEK
Glaswaren	Labware SCHOTT AG
Lichtmikroskop	Carl Zeiss
MACS-Ständer	Miltenyi Biotec
MACS Mini/Midi Separator	Miltenyi Biotec
Microfuge (Centrifuge 5415 D)	Eppendorf AG
Microfuge (Megafuge 1.0R)	Thermo Fisher Scientific
Microfuge (Megafuge 16R)	Thermo Scientific
Mikrozentrifuge (MIKRO 22R)	Hettich Zentrifugen
NanoDrop 2000c	Thermo Fisher Scientific
OPTIMAX X-Ray Film Processor	Protec GmbH
SONOPLUS Homogenisator (Sonoplus HD 2070)	Bandelin electronic
Sterilbank (HeraSafe HSP 18)	Heraeus
Stickstofftank (BioSafe MD)	Cryotherm
Thermocycler Gene Touch	Biozym Scientific GmbH
Thermomixer comfort	Eppendorf AG
Ultrazentrifuge (Optima TL100)	Beckman Coulter
Universal Hood II	BioRad
Vortexer	Werke & Co
Wasserbad	GFL
Zählkammer (Neubauer)	Marienfeld Superior

2.6 Softwareprogramme

Flow Jo
Graph Pad Prism
Microplate Manager 5.2.

2.7 Oligonukleotide

Alle Primer wurden von Eurofins verwendet.

FLT3-ITD RV 5' CTTTCAGCATTTTGACGGCAACC 3'

FLT3-ITD FW 5' GCAATTTAGGTATGAAAGCCAGC 3'

CD63-RV 5' AGTATCAGAAGTGGCTACGAGGTGAGAATTCATCGGT 3'

CD63-FW 5' ACCGATCTCAGCAATGGCGGTGGAAGGAGGAATG 3'

2.8 Plasmide

Die Plasmide pCD/NL-BH, pcoPE01 und pCL6-CD63-eGFP wurden netterweise von Helmut Hanenberg, Universitätsklinikum Essen zur Verfügung gestellt.

2.9 Molekulargewichtsmarker für DNS und Proteine

100 bp DNA ladder

Thermo Fisher

Protein-Standard II

Bio Rad

2.10 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Tabelle 6: Antikörper für die Durchflusszytometrie

Antikörper	Klon	Fluorochrom	Hersteller
Anti-IgG	MOPC-21	FITC	BD Pharmingen
Anti-CD15	80H5	FITC	BD Pharmingen
Anti-CD34	581	FITC	BD Pharmingen
Anti-CD38	T16	FITC	BD Pharmingen
Anti-CD44	G44-26	FITC	BD Pharmingen
Anti-CD45	HI30	FITC	eBioscience
Anti-CD64	22	FITC	BD Pharmingen
Anti-CD71	YDJ1.2.2	FITC	BD Pharmingen
Anti-CD81	M38	FITC	molecular probes
Annexin-V		FITC	BD Pharmingen
Anti-IgG1	11711	PE	R&D
Anti-IgG	MOPC-21	PE	BD Pharmingen
Anti-CD7	8H8.1	PE	BD Pharmingen
Anti-CD13	SJ1D1	PE	BD Pharmingen
Anti-CD14	RM052	PE	BD Pharmingen
Anti-CD33	D3HL60.251	PE	BD Pharmingen
Anti-CD117	104D2D1	PE	BD Pharmingen

Anti-CD123	7G3	PE	BD Pharmingen
Anti-GlyA	11E4B-7-6	PE	BD Pharmingen
Anti-CXCR4	2B11	PE	BD Pharmingen
Anti-IgG	679.1Mc7	ECD	Beckmann Coulter
Anti-CD45	J33	ECD	BD Pharmingen
Anti-CD90	5E10	ECD	BD Pharmingen
Anti-IgG	679.1Mc7	PC5	BD Pharmingen
Anti-CD3	UCHT1	PC5	BD Pharmingen
Anti-CD4	13B8.2	PC5	BD Pharmingen
Anti-CD10	ALB1	PC5	BD Pharmingen
Anti-HLA-DR	Immu357	PC5	BD Pharmingen
Anti-IgG	679.1Mc7	PC5.5	Beckmann Coulter
Anti-CD33	D3HL60.251	PC5.5	Beckmann Coulter
Anti-IgG	679.1Mc7	PC7	BD Pharmingen
Anti-CD19	J4.119	PC7	BD Pharmingen
Anti-CD41	P2	PC7	BD Pharmingen
Anti-CD56	N901	PC7	BD Pharmingen
Anti-PD1	eBio J105	PC7	Thermo Fisher
Anti-IgG	eB149/10H5	APC	eBioscience
Anti-IgG2a	MOPC-173	APC	BioLegend
Anti-CD135	BV10A4H2	APC	eBioscience
Anti-CXCR4	2B11	APC	eBioscience
Annexin-V		APC	BD Pharmingen
Anti-PDL1	MIH1	PB	Thermo Fisher

2.11 Kits

CD34 MicroBead KIT
 DC-Proteinassay-KIT II
 exoEasy Maxi Kit
 peqGOLD XChange Plasmid Maxi Kit
 qiaprep spin miniprep kit
 ZR-Viral Kit™

Miltenyi Biotec
 BioRad
 Qiagen
 PeqLabBiotechnologie GmbH
 Qiagen
 Zymo Research

2.12 Bakterien

One Shot TOP10 Chemically Competent *E. coli* Invitrogen

2.13 Zelllinien

- EL08-1D2 Murine Stromazelllinie aus der Aorta-Gonaden-Mesonephros Subregion (Oostendorp *et al.*, 2002).
- Molm-13 Humane AML-Zelllinie aus peripherem Blut eines 20-jährigen Mannes mit AML FAB M5a. Sie trägt eine interne Tandem Duplikation von FLT3 (Matsuo *et al.*, 1997).
- HEK293T Humane embryonale Nierenzelllinie, die gut transfizierbar ist und das SV-40 large T-Antigen exprimiert (Graham *et al.*, 1977; Pear *et al.*, 1993; DuBridg e *et al.*, 1987).

Molm-13 und HEK293T Zelllinien sind von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DMSZ).

2.14 Knochenmarkproben

Die Knochenmarkproben stammen von Patienten mit neu diagnostizierter AML. Sie wurden für eine Registerstudie im Rahmen der AML-Studiengruppe (AMLSG) rekrutiert. Die gesunden Kontrollen wurden altersentsprechend ausgewählt. Diese wurden zum einen aus Leukapheresaten der Bayerischen Stammzellbank gGmbH gewonnen, zum anderen aus „gesunden“ Hüftköpfen, die bei einer Hüft-TEP in der Praxis Orthopraxx von Dr. M. Nolde entnommen wurden. Eine hämatologische Erkrankung der gesunden Kontrollen wurde ausgeschlossen. Eine schriftliche Einverständniserklärung, die mit der Deklaration von Helsinki übereinstimmt, liegt von allen Patienten und Spendern vor. Die Protokolle wurden vom Ethikausschuss der TUM geprüft.

2.15 Zusammensetzung der Zellkulturmedien und Puffer

Annexin-V/Propidiumiodid-Puffer	deionisiertes Wasser 140 mM NaCl 10 mM Hepes 2,5 mM CaCl ₂
DNase-Arbeitslösung	1 ml 0,15 M NaCl 5 mg DNase

Material

Einfrüermedium	90 % FKS (hitzeinaktiviert) 10 % DMSO
FACS-Puffer	PBS 0,5 % BSA
Gelatine 1 %	deionisiertes Wasser 1 % Gelatinepulver autoklavieren
HF ₂ -Puffer	deionisiertes Wasser 10 % HBSS, 10 x 2 % FKS (hitzeinaktiviert) 1 % Penicillin/Streptomycin Hepes 10 mM steril filtrieren
Langzeitkulturmedium (LTC-Medium)	Myelokult H5100 8 µg/ml Ciprofloxacin 20 ng/ml TPO 10 ng/ml FLT3-Ligand 2 mM Glutamin 1 µM Hydrocortison steril filtrieren
LB-Ampicillin-Platten	LB Medium 1,5 % Agar 100 µg Ampicillin/ml
LB-Medium	deionisiertes Wasser 1 % Trypton 0,5 % Hefeextrakt 0,5 % NaCl
Medium für EL08-1D2-Stromazellen	α-MEM 15 % FKS (hitzeinaktiviert) 5 % HS (hitzeinaktiviert) 1 % Penicillin/Streptomycin 10 µM β-Mercaptoethanol steril filtrieren
Medium für HEK293T-Zellen	DMEM 10 % FKS (hitzeinaktiviert) 1 % Penicillin/Streptomycin steril filtrieren
Medium für MOLM-13-Zellen	RPMI 1640 10 % FKS (hitzeinaktiviert) 1 % Penicillin/Streptomycin steril filtrieren

Material

Medium für mononukleäre Zellen (MZ-Medium)	90 % RPMI 10 % FKS (hitzeinaktiviert) 1 % Penicillin/Streptomycin 20 ng/ml TPO 10 ng/ml FLT3-Ligand steril filtrieren
Medium zur EV-Isolation	90 % RPMI 10 % EV-freies FKS 1 % Penicillin/Streptomycin 20 ng/ml TPO 10 ng/ml FLT3-Ligand steril filtrieren
Propidiumiodid-Stocklösung	5 mg/ml DMSO
Propidiumiodid-Arbeitslösung	Stocklösung 1:100 in PBS verdünnen
Protein Lyse Puffer	Phosphatpuffer (pH=7,0) 1 % Triton X 100 130 mM NaCl 10 mM TRIS HCl (pH7,4) 10 mM Na ₄ P ₂ O ₇ (ph=7-7,5) 5 mM EDTA 5 mM NaF 1 mM PMSF 1 mM Na ₃ VO ₄ 50 nM Benzamidin Protease Inhibitor Cocktail
Serumfreies Medium mit 5 Wachstumsfaktoren (SFM+5WF-Medium)	80 % IMDM + Glutamax I 20 % BIT9500 8 µg/ml Ciprofloxacin 4 µg/ml LDL 100 ng/ml SCF 100 ng/ml FLT3-Ligand 25 ng/ml TPO 10 ng/ml IL3 10 ng/ml IL6 10 µM 2-Mercaptoethanol steril filtrieren

3 Methoden

3.1 Allgemeine zellbiologische Methoden

Alle Zellen wurden bei 90 % relativer Luftfeuchtigkeit, 5 % CO₂ und 37 °C im Brutschrank kultiviert.

3.1.1 Zelllinien

- Molm-13 Ca. 1×10^7 Molm-13 Zellen wurden pro 10 ml Medium ausgesät und alle 3 Tage 1:2 gesplittet.
- HEK293T Ca. 2×10^6 Zellen wurden pro 25 cm² ausgesät und alle 3 Tage 1:5 gesplittet. Das Loslösen vom Boden erfolgte durch Beklopfen der Flasche.
- EL08-1D2 Ca. $0,5 \times 10^6$ Zellen wurde auf zuvor mit 0,1%iger Gelatine behafteten, 60 cm² großen Zellkulturschalen in Stromamedium ausgesät und alle 4 Tage 1:2 gesplittet. Das Loslösen vom Boden erfolgte mittels Trypsins. Diese Zelllinie besitzt die Fähigkeit hämatopoetische Stammzellen zu unterstützen. Für Langzeit-Co-Kulturen wurden 2×10^6 Zellen pro 6-well-Platte ausgesät und nach 2 Tagen bei 80 % Konfluenz mit 30 Gy zehn Minuten bestrahlt. Nach 7-tägiger Regeneration und einem Waschschrift mit PBS konnten die Langzeit-Co-Kulturen im entsprechenden Medium angesetzt werden. Die Hälfte des Mediums wurde ein Mal pro Woche durch neues ersetzt.

Die Medien sind unter 2.15 aufgelistet.

3.1.2 Knochenmarkproben

Die Isolierung von mononukleären Zellen aus Knochenmarkspiraten und Hüftköpfen erfolgte mit Dichtegradientenzentrifugation. Die Hüftköpfe zerkleinerte man mit einer Zange, wusch die Bröckel mit PBS aus und filterte das ausgespülte Material. Anschließend wurde das aus den Hüftköpfen ausgewaschene Material bzw. das heparinisierte Knochenmarkblut mit IMDM 1 + 1 verdünnt, über 12,5 ml Ficoll-Trennlösung geschichtet und 15 min bei 2100 rpm ohne Bremse zentrifugiert. Während der Zentrifugation reicherten sich die mononukleären Zellen im Interphasenring an. Dieser wurde abgenommen und zwei Mal mit IMDM gewaschen.

3.1.3 Einfrieren von Proben

Für eine langfristige Aufbewahrung der Proben wurden $0.5-1 \times 10^8$ Zellen in 1 ml FKS mit 10 % DMSO resuspendiert, in ein Einfriergefäß überführt und in einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierhilfe bei -80 °C weggefroren. Diese ermöglicht ein langsames und gleichmäßiges Einfrieren mit einer Rate von -1 °C/min . Die Proben wurden dauerhaft bei -196 °C in einem Stickstofftank gelagert.

3.1.4 Auftauen von Proben

Die eingefrorenen Proben wurden bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und schnellstmöglich in 20 ml vorgelegten HF_2 -Puffer gegeben. Die Zellen wurden bei 1500 rpm 5 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet 5 min mit $200\text{ }\mu\text{g/ml}$ DNase verdaut. Danach wurde die Probe mit HF_2 -Puffer aufgefüllt und durch ein $100\text{ }\mu\text{m}$ Zellsieb gefiltert, zentrifugiert und 2-mal mit HF_2 -Puffer gewaschen.

3.1.5 Zellzählung

Nach Färbung mit Trypanblau zählte man die Zellen in der Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop. Eine Einschätzung der Viabilität ist über die Farbstärke möglich, da der Farbstoff Trypanblau durch die perforierte Zellmembran in tote Zellen eindringen kann.

3.1.6 Kultivierung von mononukleären Zellen

Die mononukleären Zellen wurden in RPMI mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert. Daneben enthielt das Medium noch den Wachstumsfaktor FLT3-Ligand (10 ng/ml) und das Zytokin Thrombopoetin (20 ng/ml).

3.1.7 Zellviabilitätsmessung mit Annexin-V/Propidiumiodid-Färbung

Zur prozentualen Bestimmung der lebenden Zellen wurde ein Zellpellet mit Annexin-V/Propidiumiodid-Puffer gewaschen, mit $2\text{ }\mu\text{l}$ Annexin-V und $1\text{ }\mu\text{l}$ Propidiumiodid gefärbt und via Durchflusszytometrie analysiert.

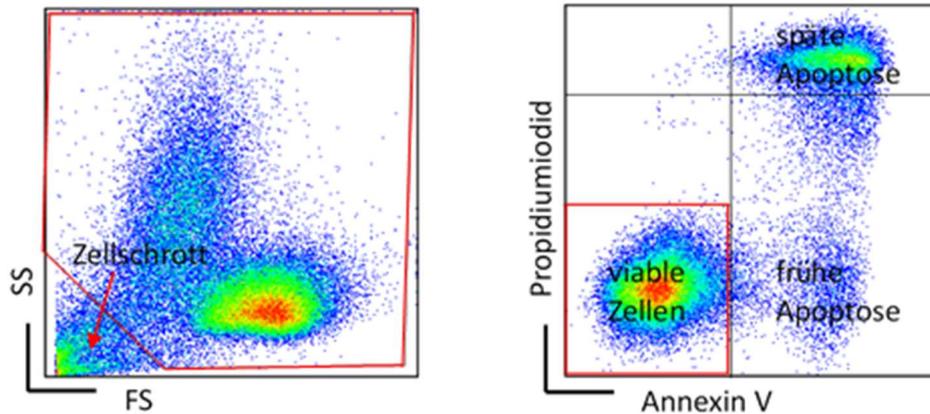


Abbildung 11: Schleusstrategie zur Detektion von viablen Zellen nach Annexin-V/Propidiumiodid-Färbung. Links: Durch die Schleuse wird der Zellschrott nicht mit analysiert. Rechts: Es wird eine Schleuse auf die Annexin-V und Propidiumiodid negativen Zellen gesetzt. Diese entsprechen den viablen Zellen.

Phosphatidylserin befindet sich normalerweise auf der Innenseite der Zellmembran einer lebenden Zelle, bei beginnender Apoptose wandert Phosphatidylserin an die Außenseite der Membran (Verhoven *et al.*, 1995) und markiert somit spät-apoptotische Zellen. Annexin V hat in Anwesenheit von Calcium eine hohe Affinität zu Phosphatidylserin (Tait *et al.*, 1989; Andree *et al.*, 1990). Annexin V kann nicht an viablen Zellen binden, da es die Phospholipiddoppelschicht nicht durchdringen kann. Wohingegen dies bei früh-apoptotischen Zellen möglich ist, da die Membranintegrität gestört ist. Zur Unterscheidung zwischen früh- und spät-apoptotischen Zellen wurde die Färbung mit dem Vitalfarbstoff Propidiumiodid kombiniert. Dieser färbt DNS und kann Membranen nicht durchdringen. Dementsprechend detektiert Annexin-V Zellen im früh- und spätapoptotische Stadium, Propidiumiodid im spätapoptotischen Stadium. Viable Zellen binden weder Annexin-V noch Propidiumiodid (Koopman *et al.*, 1994; van Engeland *et al.*, 1998).

3.1.8 Isolierung von CD34⁺-Zellen mit magnetischer Zellseparation

Zur Anreicherung von CD34⁺-Zellen mit der magnetischen Zellseparation („Magnetic assisted cell sorting“ MACS) wurde das Kit von Miltenyi Biotec nach Herstellerangaben verwendet.

3.1.9 Klonogener Test

Der klonogene Test ermöglicht die Quantifizierung des Koloniebildungspotentials von CD34⁺-Zellen. Entsprechend dem Differenzierungspotential der Ausgangszellen entstehen

unterschiedliche Kolonietypen. Bei der Zählung wurde zwischen KBE-GEMM (Koloniebildende Einheit- granulozytär, erythroid, makrophagozytär und megakaryozytär), KBE-GM (Koloniebildende Einheit- granulozytär und makrophagozytär) und KBE-E (Koloniebildende Einheit-erythroid) unterschieden. Für die statistische Analyse wurde die Gesamtanzahl aller gezählten Kolonietypen verwendet. Zur Analyse wurde eine standardisierte Zellzahl nach genauestmöglicher Zählung in 300 µl HF₂-Puffer aufgenommen und in 3 ml Methylzellulose gegeben. Bei kurzfristigen KBEs wurden 1500 und bei langfristigen KBEs 3000 Zellen eingesetzt. Kurzfristige KBEs entsprechen den Progenitorzellen. Langfristige KBEs stellen die frühen Progenitorzellen und Stammzellen dar. Die Methylzellulose mit den enthaltenen Zellen ruhte nach gründlichem Mischen 10 min, bis alle Luftblasen aufgestiegen waren. Daraufhin wurde mit einer stumpfen Aluminiumnadel die Methylzellulose in eine Spritze aufgenommen und jeweils die Hälfte auf zwei 35 mm große Petrischalen verteilt. Sie wurden mit einer weiteren, offenen, mit Wasser befüllte Schale in eine 10 cm große Schale gestellt und für 14 Tage im Brutschrank inkubiert. Das Ablesen der gewachsenen Kolonien erfolgte mäanderförmig.

3.2 Spezielle zellbiologische Methoden

3.2.1 Gewinnung von EV

3.2.1.1 Herstellung von EV-freiem fetalem Kälberserum (FKS)

Hitzeinaktiviertes FKS wurde bei 120 000 g und 4 °C für 18 Stunden ultrazentrifugiert. Der Überstand wurde 0,22 µm steril filtriert und zur Herstellung des EV-Isolationsmediums weiterverwendet.

3.2.1.2 Kultivierung von mononukleären Zellen in EV-freiem Medium

Es wurden 4×10^7 Zellen in einer 75 cm² großen Zellkulturflasche in 10 ml EV-Isolationsmedium ausgesät und vier Tage kultiviert. Bei einem Teil der Proben wurde 0,5 µl der AZA Arbeitslösung hinzugefügt, sodass das Medium eine Stoffmenge von 0,5 µM AZA hatte.

3.2.1.3 EV-Isolation aus mononukleären Zellen

Sie fand vier Tage nach der Aussaat der Zellen statt. Zunächst wurde zwei Mal zentrifugiert. Dabei wird der Überstand weiterverwendet. Das erste Mal bei 300 g 10 min zur Entfernung der Zellen, das zweite Mal bei 12 000 g 30 min zur Beseitigung des Zelldetritus. Anschließend wurde der Überstand durch einen 0,45 µm Filter steril filtriert. Nun folgte die EV-Isolation mit Hilfe des ExoEasy Maxi Kits nach Angaben des Herstellers. Am Ende erhielt man die EV im XE-Puffer gelöst.

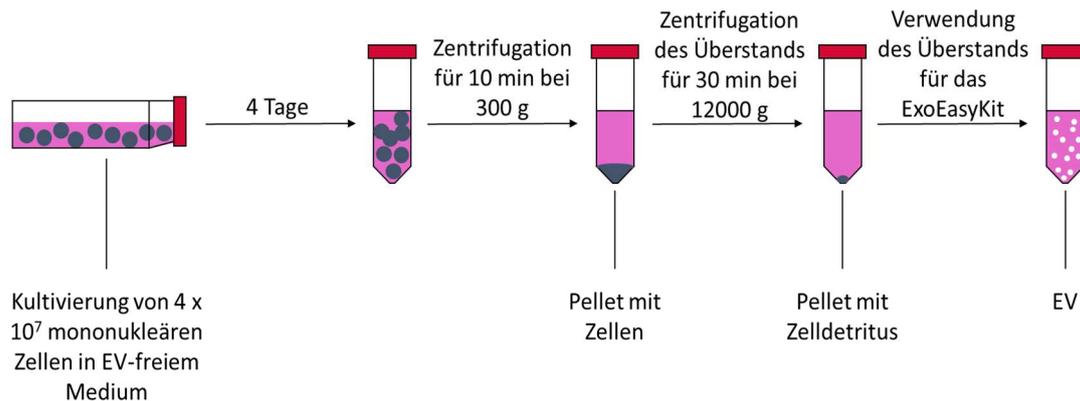


Abbildung 12: Gewinnung von EV. Nach Kultivierung der mononukleären Zellen in EV-freiem Medium und aufeinanderfolgenden Zentrifugationsschritten des Überstands werden die EV mit Hilfe des ExoEasy Kits isoliert.

3.2.2 Herstellung von MOLM-13 mit internalisiertem CD63⁺-GFP-Konstrukt

Durch lentiviralen Gentransfer besteht die Möglichkeit CD63⁺-GFP in Molm-13 zu exprimieren.

3.2.2.1 Drei-Plasmid-System

Für die Produktion der Lentiviren wurde ein Drei-Plasmid-System benützt. Folgende Plasmide wurden verwendet: Das Transfervektor-Plasmid mit Indikatorgen pCL6-CD63-eGFP (Ludwig *et al.*, 2018), das Helfer-Plasmid pCD/NL-BH (Mochizuki *et al.*, 1998) und das Hüll-Plasmid pcoPE01 (Müllers *et al.*, 2011).

3.2.2.2 Transformation kompetenter E. coli Bakterien

Alle Plasmide wurden auf einem Whatman-Papier erhalten. Die ausgeschnittenen Plasmide wurden in ein Mikrozentrifugengefäß mit 100 µl TE-Puffer transferiert und gemischt. Nach 5 Minuten und erneutem Mischen entfernte man das Whatman-Papier. 10 µl der in TE-Puffer gelösten Plasmide wurden nun auf auf Eis aufgetaute kompetente E-coli-Bakterien gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Dann wurde ein Hitzeschock 50 Sekunden bei 42 °C durchgeführt.

Dies erhöht die Transformation, da die DNS dadurch verstärkt von den Zellen aufgenommen wird. Danach ruhte der Ansatz 3 Minuten auf Eis. Nach Zugabe von 250 µl LB-Medium und dreimaligem Invertieren wurden die Zellen 1 Stunde bei 37 °C und 125 rpm geschüttelt. Anschließend wurden jeweils 200 µl auf eine Ampicillin-Platte ausgestrichen und über Nacht im Bakterienschrank kultiviert. Nur transformierte Bakterien sind resistent gegenüber Ampicillin, untransformierte hingegen nicht. Das Wachstum auf der Ampicillin-Platte weist auf eine gelungene Transformation hin.

3.2.2.3 Plasmid-DNS-Präparation

3.2.2.3.1 Minipräparation

Für die Vervielfältigung der Plasmid-DNS wurde 1 Kolonie pro Platte in 5 ml LB-Medium mit 5 µl Ampicillin gegeben und über Nacht auf einen 37 °C warmen Schüttler gestellt. Zunächst wurde eine Isolation der Plasmid-DNS in kleinen Mengen (Mini-Präp) durchgeführt. Es wurde das qiaprep spin miniprep kit nach Herstellerangaben verwendet. Die DNS-Konzentration wurde mit dem NanoDrop gemessen.

3.2.2.3.2 Sequenzierung

Die Sequenzanalysen wurden von Eurofins durchgeführt. Die verwendeten Primer sind in der Tabelle 7 aufgelistet.

Tabelle 7: CD63-Primer

Bezeichnung	Sequenz
CD63-RV	5' AGTATCAGAAGTGGCTACGAGGTGAGAATTCATCGGT 3'
CD63-FW	5' ACCGATCTCAGCAATGGCGGTGGAAGGAGGAATG 3'

3.2.2.3.3 Maxi-Präparation

Nach durch Sequenzierung bestätigter erfolgreicher Transformation wurde die Plasmid-DNS aus den transformierten Bakterien durch das peqGold XChange Plasmid Maxi Kit nach Herstellerangaben isoliert. Anschließend wurde die DNS-Konzentration mit dem NanoDrop bestimmt.

3.2.2.4 Herstellung von Lentiviren und lentiviraler Infektion

3.2.2.4.1 Calcium Phosphat Transfektion von HEK293T-Zellen

Für die Transfektion der HEK293T-Zellen wurden am Vorabend jeweils 10^6 Zellen in 2 Kulturschalen ausgesät. Es wurde ein Transfektions-Mix erstellt. Dieser setzt sich aus jeweils 5 µg DNS der drei Plasmide, ad 175 µl H₂O, 25 µl 2M CaCl₂ und 200 µl Hepes 2 x zusammen. Letzteres wurde während des Vortexens tropfenweise hinzugegeben. Außerdem wurde ein Kontroll-Mix ohne Plasmid-DNS produziert. Nach 5 Minuten Inkubationszeit wurden beide Mixe auf jeweils eine der beiden vorbereiteten HEK293T-Platten gegeben und bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium abgenommen und durch frisches Medium ersetzt.

3.2.2.4.2 Primäre und sekundäre Virustransduktion von MOLM-13-Zellen

Nach einem und zwei weiteren Tagen fanden die primäre und sekundäre Virustransduktion statt. Es wurden Retronectin-Platten, die am Vortag in 12-well 40 µg/ml hergestellt wurden und bei 4 °C über Nacht gelagert wurden, mit 2 % BSA 30 min bei Raumtemperatur geblockt und mit 1 x HBSS gewaschen. Ferner wurde der virale Überstand geerntet und 0,45 µm steril gefiltert. Von diesem wurde 1 ml auf die Retronectin-Platten gegeben und 2 Stunden in der auf 32 °C vorgewärmten Zentrifuge bei 2000 g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand entfernt und pro Vertiefung 5×10^6 Molm13-Zellen hinzugefügt. Dem folgten eine 5-minütige Zentrifugation und eine Inkubation bei 37 °C über Nacht. Bei der sekundären Virustransduktion wurden als Zielzellen die bereits bei der primären Virustransduktion transduzierten Molm13 verwendet. Die Transfektions- und Transduktionsrate wurde 3 Tage nach jeweiliger Durchführung mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Die GFP positiven Zellen wurden 96 Stunden nach der letzten Infektion durchflusszytometrisch sortiert.

3.3 Molekularbiologische Arbeitstechniken

3.3.1 DNS-Isolierung

Alle DNS-Isolierungen wurden mit dem ZR Viral DNA Kit™ durchgeführt. Als Ausgangsmaterial dienten CD34⁺-Zellen. Anschließend wurde die DNA-Konzentration der Proben mit dem NanoDrop gemessen.

3.3.2 Polymerase-Kettenreaktion einer ITD von FLT3

Die PCR wurde an genomischer DNS durchgeführt. Die ITD von FLT3 beschränkt sich auf die Exone 11 und 12. Es wurden diese veröffentlichten Primer verwendet 11F, 5' GCAATTTAGGTATGAAAGCCAGC 3' und 12R, 5' CTTTCAGCATTTTGACGGCAACC 3' (Kiyoi *et al.*, 1997). Der PCR-Ansatz und das PCR-Programm sind in Tabelle 9 und Tabelle 10 dargestellt. Es wurde eine Touchdown-PCR angewandt. Bei dieser variieren die Anlagerungstemperaturen des Primers. Die Anlagerungstemperatur ist im 1. Zyklus um 10°C höher als die Schmelztemperatur des Primers. Dadurch wird eine sehr hohe Spezifität der Primer-Bindung an das Template erzwungen. In jedem weiteren Zyklusschritt wird die Temperatur um 1°C gesenkt, bis die errechnete optimale Anlagerungstemperatur erreicht ist. Diesem folgen 30 weitere Zyklen bei idealer Temperatur von 60°C.

Tabelle 8: FLT3-ITD-Primer

Name	Sequenz
FLT3-ITD 12R	5' CTTTCAGCATTTTGACGGCAACC 3'
FLT3-ITD 11F	5' GCAATTTAGGTATGAAAGCCAGC 3'

Tabelle 9: PCR-Ansatz

Reagenz	Menge
Mastermix	12 µl
Primer 11F	1 µl
Primer 12R	1 µl
H ₂ O	ad 25 µl
DNS	50-100 ng

Tabelle 10: PCR-Programm

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [min:sek]
1. Initiale Denaturierung	94	3:0
2. Denaturierung	94	0:30
3. Anlagerung	70 (-1°C pro weiteren Zyklus)	0:30
4. Elongation	72	0:15
9 x wiederholen ab Schritt 2 mit Anlagerungstemperatursenkung		
5. Denaturierung	94	0:30
6. Anlagerung	60	0:30
7. Elongation	72	0:15
29 x wiederholen ab Schritt 5		
8. Finale Elongation	72	10:00
9. Pause	4	∞

3.3.3 Agarose-Gelelektrophorese

Das PCR-Produkt wurde mit 5 µl Orange G versetzt. Dies dient der Stabilisierung, dem Einsinken der Probe in die Tasche beim Probenauftrag und der visuellen Verfolgung der DNS-Migration. Anschließend wurden die Proben auf ein ethidiumbromidhaltiges 2%iges Agarosegel aufgetragen und eine Spannung von 120 Volt angelegt. Die Größenauftrennung der DNS-Fragmente wurde mit UV-Licht sichtbar gemacht und mit einer Geldokumentationseinheit fotografiert.

3.4 Proteinbiochemische Methode

3.4.1 Pelletierung von EV

Die EV wurden nach der Isolierung mit dem Exolso-Kit durch Ultrazentrifugation bei 120 000 g; 1,5 Stunden und 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde komplett abgenommen und das EV Pellet mit dem entsprechendem Medium resuspendiert.

3.4.2 Herstellung von EV-Lysaten

Nach Konzentrierung der EV wurde der Überstand verworfen und das EV-Pellet in Lysepuffer resuspendiert. Nach 15 min folgte die Sonifizierung der EV-Lysate.

3.4.3 Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Abschätzung der Proteinkonzentration wurde das DC Protein Assay Kit II nach Herstellerangaben verwendet. Dieses basiert auf dem Lowry-Assay (LOWRY *et al.*, 1951). Die Proteinabsorption wurde bei 750 nm mit dem ELx800 Universal Microplate reader und der Microplate Manager 5.2. Software gemessen.

3.5 Immunphänotypische Analyse

Alle durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden am Cyan ADP 9c durchgeführt und mit der FlowJo Software ausgewertet.

3.5.1 Expressionsanalyse von Oberflächenantigenen auf Zellen

Zur Darstellung von Oberflächenantigenen inkubierte man die Zellen 20 min bei 4 °C unter Lichtausschluss mit einem fluorochromen Antikörper im FACS-Puffer. Sollten tote Zellen abgegrenzt werden, wurde Propidiumiodid während der Antikörperinkubation hinzugegeben. Dieses interkaliert in die DNS nekrotischer Zellen und ermöglicht somit den Ausschluss dieser Zellen. Durch einen Waschschrift mit 2 ml FACS-Puffer konnten überschüssige Antikörper entfernt werden.

3.5.2 Expressionsanalyse von Oberflächenantigenen auf EV

Für die FACS-Analyse von EV wurde die Methode von Théry angewandt (Théry *et al.*, 2006). Um EV durchflusszytometrisch messen zu können, müssen sie aufgrund ihrer geringen Größe von 100-200 nm an Latexkugeln angeheftet werden.

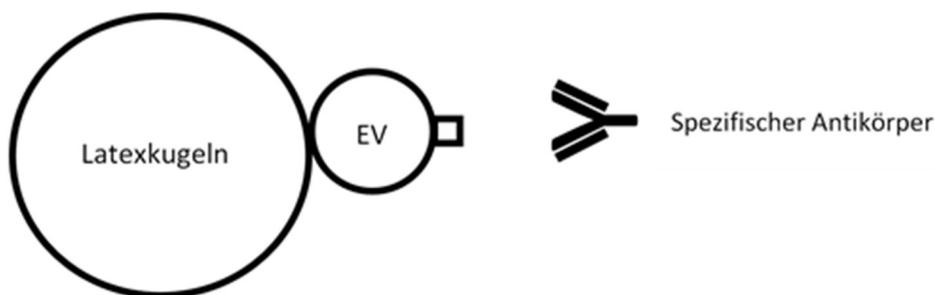


Abbildung 13: Anheften der EV an Latexkugeln und Bindung spezifischer Antikörper. Für die durchflusszytometrische Messung von EV ist aufgrund der geringen Größe ein Kopplungsvorgang an Latexkugeln notwendig. Anschließend können die Antigene der EV mit spezifischen fluorochrom-markierten Antikörpern gefärbt werden.

Man inkubierte 5 µg aufgetauter EV mit 10 µl Latexkugeln 15 min bei RT. Diese 5 µg EV entsprechen einer EV-Isolation mit dem ExoEasy Maxi Kit nach viertägiger Kultur von 1×10^7 Zellen. Danach füllte man es mit PBS auf 1 ml auf und ließ es 2 Stunden auf einem Drehrad inkubieren. Anschließend wurde 110 µl von 1M Glycin dazugegeben und 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Proben wurden 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert und der Überstand entfernt. Es schlossen sich zwei Waschschriffe mit 1 ml PBS/0,5 % BSA an. Das Zellpellet, welches die an Latexpartikel gebundene EV enthielt, wurde nun in 0,5 ml PBS/0,5 % BSA resuspendiert. Für die Färbung wurden 10 µl der gekoppelten EV eingesetzt und mit fluorochromen Antikörpern ad 50 µl PBS/0,5 % BSA 30 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend

wurde zwei Mal mit PBS/0,5 % BSA gewaschen und das Zellpellet in 500 μ l PBS/0,5 % BSA aufgenommen. Es wurde zu jedem Fluorochrom eine geeignete Isotypkontrolle mitgeführt.

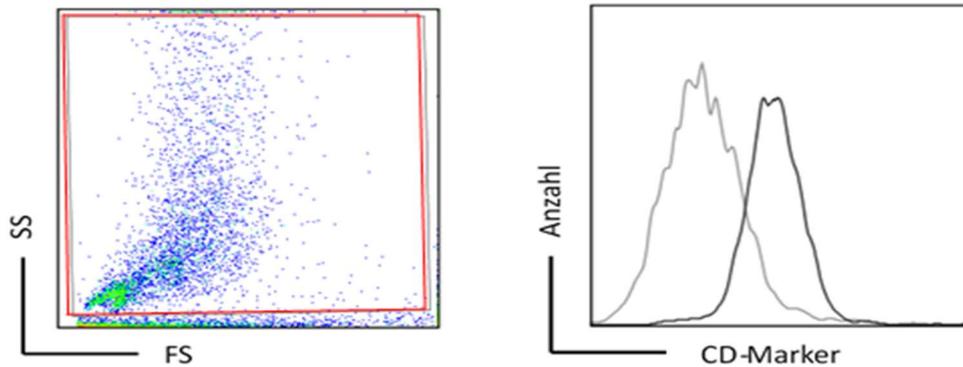


Abbildung 14: Schleusstrategie zur Bestimmung von CD-Markern auf an Latexkugeln gebundenen EV. Links: Es wird eine Schleuse auf die Latexkugeln gesetzt. Rechts: Dargestellt ist ein CD-Marker mit passender Isotypkontrolle.

3.6 Funktionelle Analysen

3.6.1 AZA-Titration von CD34⁺- und CD34⁻-Zellen aus AML-Patientenproben und gesunden Kontrollen

Mit Hilfe einer MACS-Sortierung wurden CD34⁺- von CD34⁻-Zellen aus ficollisierten Knochenmarksproben von AML-Patienten und gesunden Kontrollen getrennt. Die CD34⁺-Zellen wurden in SFM+5WF-Medium gegeben, die CD34⁻ in MZ-Medium. Die Zellen der Proben wurden jeweils auf acht Vertiefungen in einer 24-well Platte in 990 μ l Medium verteilt. Daneben wurde aus einer 1 M AZA-Lösung eine geometrische Verdünnungsreihe mit dem Verdünnungsfaktor 1:2 hergestellt. In die acht Vertiefungen, die dieselbe Probe enthielten, wurden jeweils 10 μ l einer Verdünnungsstufe hinzu pipettiert. Dieser Schritt entspricht einer weiteren Verdünnung von 1:100. Die finale AZA-Verdünnungsreihe bestand aus den Konzentrationen 10; 5; 2,5; 1,25; 0,63; 0,31; 0,16 und 0 μ M. Nach vier Tagen wurde die Zellviabilität durchflusszytometrisch mit Annexin-V und Propidiumiodid bestimmt.

3.6.2 Untersuchung des Einflusses löslicher Faktoren auf CD34⁺-Zellen im Transwell-System

Aus mononukleären Zellen von gesunden Knochenmarkproben wurden mittels MACS CD34⁺-Zellen isoliert. Davon wurden pro Vertiefung 30 000 Zellen in eine 12-well-Platte in 750 μ l SFM+5WF-Medium gegeben. Man setzte darauf ein Transwell. Dieses enthielt eine Membran

mit einer Porengröße von $0,4\ \mu\text{m}$. Durch diese Membran gelangen nur lösliche Faktoren wie Zytokine oder EV. Das Durchtreten von Zellen ist nicht möglich. In das Transwell wurden 30 000 CD34⁻-Zellen bzw. CD34⁺-Zellen in 750 μl SFM+5WF-Medium gegeben. Die Zellen im Transwell stammen entweder von gesunden Kontrollen, FLT3-WT- oder FLT3-ITD-Patienten.

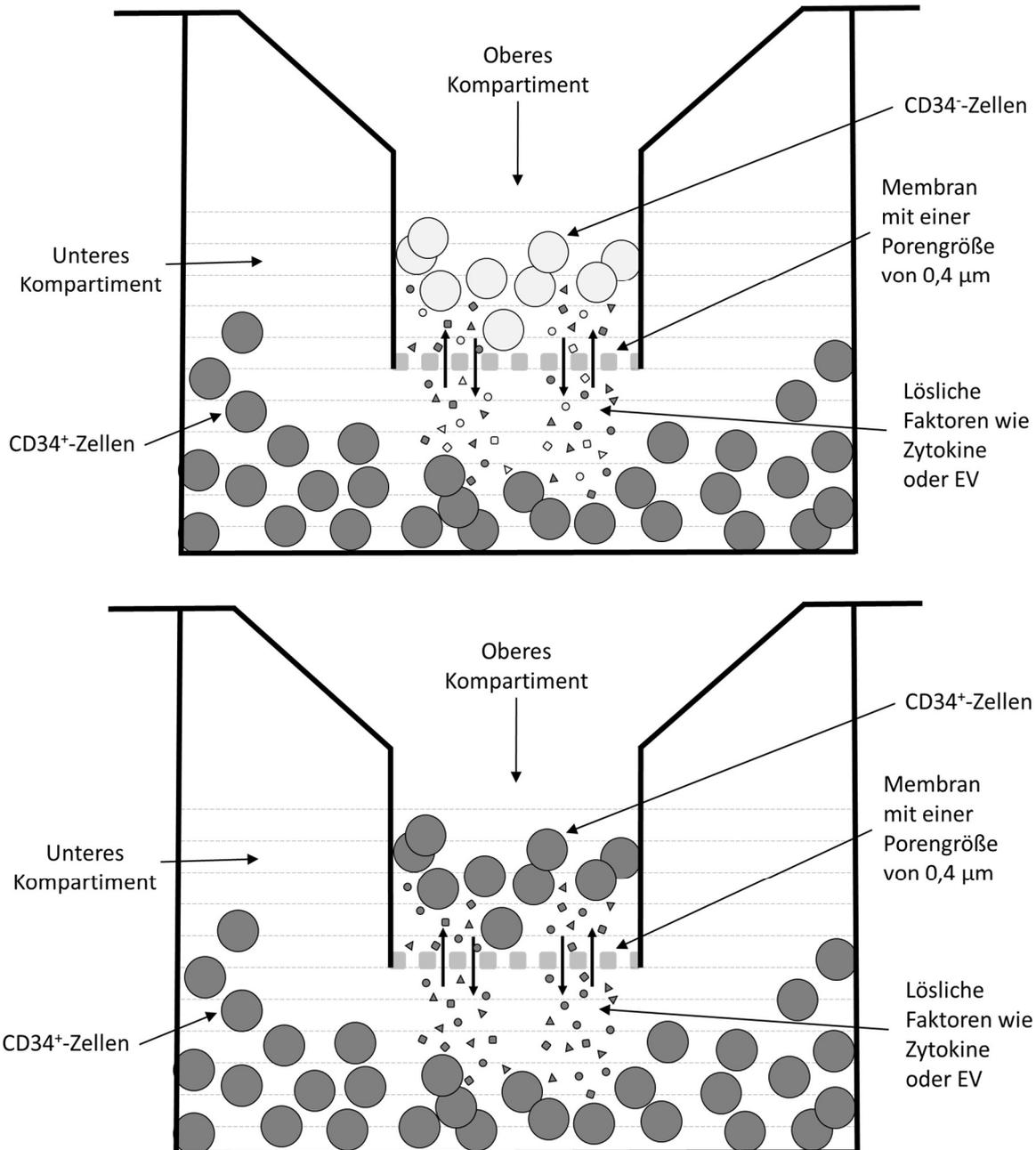


Abbildung 15: Darstellung des Transwell-Systems zur Untersuchung des Einflusses löslicher Faktoren auf CD34⁺-Zellen. Im oberen Kompartiment befinden sich CD34⁻- (obere Abbildung) oder CD34⁺- Zellen (untere Abbildung), die durch Negativ- beziehungsweise Positiv-Selektion mittels magnetischer Zellseparation gewonnen wurden. Im unteren Kompartiment sind CD34⁺-Zellen aus gesundem Knochenmark. Getrennt werden beide Kompartimente durch eine Membran mit einer Porengröße von $0,4\ \mu\text{m}$. Diese Membran ist für Zellen nicht passierbar. Eine Kommunikation zwischen den Zellen im oberen und unteren Kompartiment kann nicht über direkten Zellkontakt erfolgen, sondern nur über lösliche Faktoren wie EV oder Zytokine.

Alle Ansätze wurden mit und ohne AZA durchgeführt. Es wurde eine AZA-Konzentration von 0,5 μM verwendet. Es wurden kurz- und langfristige KBEs aus der unteren Vertiefung angesetzt und nach vier Tagen die Viabilität gemessen. Ebenso wurde aus der unteren Vertiefung nach vier Tagen von den gesunden CD34⁺-Zellen eine FLT3-ITD-PCR durchgeführt.

3.6.3 Migrationsuntersuchung mit konditionierten Medien

3.6.3.1 Konditionierung von EL08-1D2 Zellen mit EV

Zunächst wurden 2×10^6 EL08-1D2 pro 6-well-Platte in 2 ml EL08-ID2-Medium/Vertiefung ausgesät. Bei Konfluenz wurden jeweils 66 μl EV beziehungsweise Puffer hinzugegeben. Die EV stammten von mononukleären Zellen von gesunden, FLT3-WT oder FLT3-ITD Patienten und wurden mit und ohne AZA isoliert. Am nächsten Tag tauschte man das Medium gegen MZ-Medium aus. Nach einem weiteren Tag wurde das konditionierte Medium gesammelt. Aus diesem wurde die Migrationsuntersuchung angesetzt.

3.6.3.2 Migrationsuntersuchung

Am Vortag wurden CD34⁺-Zellen von mononukleären Zellen aus Knochenmarkproben mittels MACS angereichert und zur Regeneration über Nacht in SFM+5WF-Medium gegeben. Diese Zellen wurden in Medium für mononukleäre Zellen gewaschen und anschließend das Zellpellet in 400 μl pro 1×10^5 CD34⁺-Zellen resuspendiert. In eine 12-well Platte werden 600 μl der vorbereiteten konditionierten Medien gegeben bzw. eine positive Kontrolle, die 100 ng/ml CXCL12 enthält. Nun setzte man das Transwell darauf. Es besteht aus einer Membran mit einer Porengröße von 5 μm , durch die die Zellen wandern können. Das Transwell wurde mit 50 μl Medium äquilibriert. Nun gab man 400 μl der CD34⁺-Zellen auf das Transwell. Der Ansatz inkubierte für 24 Stunden. Für die absolute Messung der migrierten Zellen nahm man 500 μl vom Medium aus der unteren Vertiefung und fügte 600 μl PBS und 50 μl Counting beads (=Zählkügelchen) hinzu.

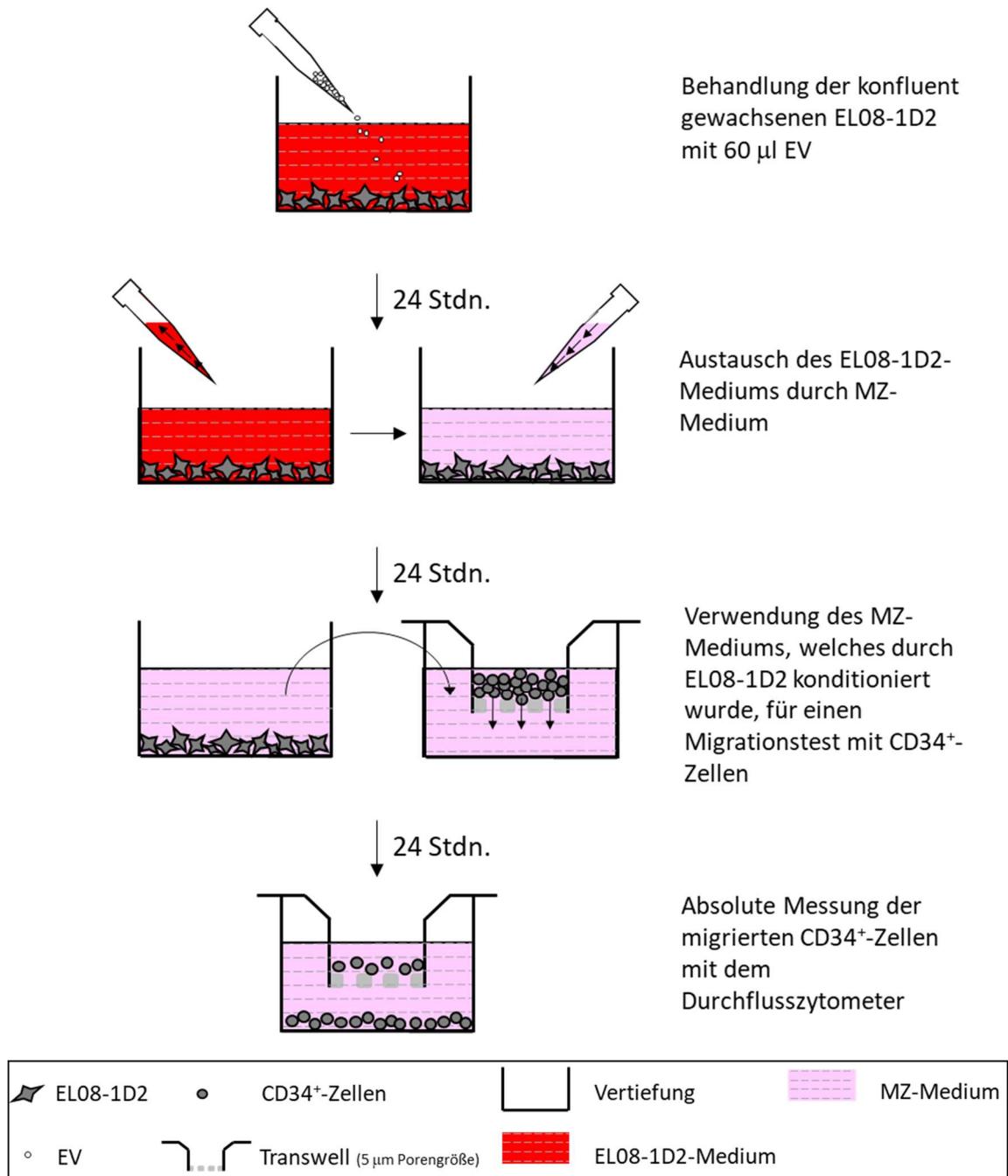


Abbildung 16: Darstellung zum Versuchsaufbau der Migrationsuntersuchung. Nach einer Behandlung von EL08-1D2 mit EV wurde das dadurch konditionierte Medium für einen Migrationstest verwendet. Gemessen wurde die absolute Anzahl der durch die Membran gewanderten CD34⁺-Zellen.

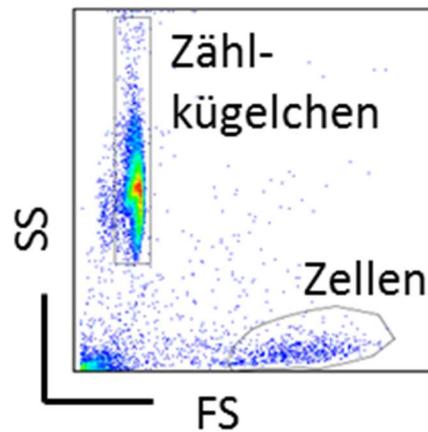


Abbildung 17: Absolute durchflusszytometrische Messung der migrierten CD34⁺-Zellen. Zur Quantifizierung wurde die Analyse nach Messung von 50 000 Zählkügelchen gestoppt.

3.7 Statistische Analysen

Statistische Analysen wurden mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang- oder dem Kruskal-Wallis-Test mit Dunns Mehrfachvergleich durchgeführt und mit der Graph Pad Prism Software erstellt. Unterschiede zwischen den Gruppen werden als signifikant bezeichnet, wenn p unter 5 % liegt. p -Werte werden in den Abbildungen nur dort gezeigt, wo eine statistische Signifikanz gefunden wurde: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4 Ergebnisse

4.1 AML-Patientenproben und gesunde Kontrollen

Für diese Arbeit wurden 26 verschiedene Knochenmarkproben und eine periphere Blutprobe analysiert (siehe Tabelle 11). Diese wurden im Rahmen des Standard-Panels der AMLSG Studie auf folgende Mutationen untersucht: FLT3-ITD und -TKD, NPM1, CEBF/MYH11, RUNX1/RUNX1T1, PML/RARA, IDH1/2, CEBPA, MLL-AF9 und BCR-ABL1. Von Nummer 2 wurde sowohl Knochenmark als auch peripheres Blut verwendet. Die Probennummern 1, 9 und 26 stammen von Patienten mit einer sekundären AML nach MPN beziehungsweise MDS; die Nummern 4, 10 und 17 von Patienten mit refraktärer AML und die Nummer 11 von einem AML Rezidiv. In Tabelle 12 sind die gesunden Proben dargestellt. Ein Teil der gesunden Proben wurde von Knochenmarkspendern gewonnen, der andere aus Hüftköpfen.

Tabelle 11: Charakterisierung der AML-Patientenproben

NR	Alter	Geschlecht	Karyotyp	FLT3	NPM1	sonstige Mutationen
1	60	w	46, XX	WT	WT	NRAS, RUNX1
2	81	w	46, XX	ITD	mut	Keine weiteren bekannt
3	58	w	46, XX	ITD	mut	Keine weiteren bekannt
4	69	m	46, XY	ITD	mut	Keine weiteren bekannt
5	39	w	46, XX	WT	mut	Keine weiteren bekannt
6	69	m	46, XY	WT	WT	Keine weiteren bekannt
7	82	w	51, XX, +X, +4, del(7)(q22q34), +8, +8, +10	WT	WT	Keine weiteren bekannt
8	49	w	46, XX	WT	WT	CEBPA
9	69	m	46, X,-Y, +13 46, XY	WT	WT	RUNX1, ASXL1, EZH2, ZRSR2
10	49	w	46, XX	ITD	mut	DNMT3A
11	20	m	46, XY, t(8;21)(q22;q22), 46, XY	WT	WT	RUNX1/RUNX1T1
12	75	m	Nicht bekannt	TKD	mut	Keine weiteren bekannt
13	73	m	46, XY	ITD, TKD	mut	Keine weiteren bekannt
14	53	w	46, XX	WT	mut	Keine weiteren bekannt
15	51	w	46, XX	ITD	mut	Keine weiteren bekannt
16	69	m	46, XY	WT	WT	IDH2, RUNX1
17	51	m	46, XY	WT	mut	Keine weiteren bekannt
18	59	w	45, XX, t(3;3)(q21;q26.2), del(5)(q13), -7,	WT	WT	Keine weiteren bekannt

			der(7;8)(q10;q10), t(7;7)(q36;p11), +8, del(18)(q21)			
19	60	m	46, XY	WT	WT	Keine weiteren bekannt
20	52	w	46, XX	WT	WT	RUNX1, SF3B1
21	37	w	46, XX	WT	WT	Keine weiteren bekannt
22	77	w	46, XX	ITD	mut	Keine weiteren bekannt
23	52	m	47, XYY	WT	WT	IDH1
24	76	m	46, XY	ITD	mut	Keine weiteren bekannt
25	58	w	46, XX	WT	mut	Keine weiteren bekannt
26	75	w	46, XX	ITD	WT	Keine weiteren bekannt

Tabelle 12: Charakterisierung der gesunden Proben

NR	Material	Alter	Geschlecht
1	KM	19	m
2	KM	40	m
3	KM	4	m
4	KM	60	m
5	KM	39	m
6	KM	45	m
7	KM	53	m
8	KM	40	w
9	KM	45	w
10	KM	67	w

11	Hüftkopf	64	m
12	Hüftkopf	70	m
13	Hüftkopf	56	m
14	Hüftkopf	60	m
15	Hüftkopf	45	m
16	Hüftkopf	52	w
17	Hüftkopf	50	w
18	Hüftkopf	48	w
19	Hüftkopf	57	w

4.2 AZA-Titration von CD34⁺- und CD34⁻-Zellen aus AML-Patienten und gesunden Proben

Zur Maximierung epigenetischer Effekte sollte eine möglichst hohe und gleichzeitig nicht zytotoxische AZA-Konzentration in den Versuchen verwendet werden. Diese wurde mithilfe einer AZA-Titration ermittelt. Es wurde die Viabilität von CD34⁺- und CD34⁻-Zellen unter viertägiger Behandlung mit AZA in verschiedenen Konzentrationen untersucht. Dabei wurde zwischen gesundem, AML-FLT3-WT- und AML-FLT3-ITD-Primärmaterial unterschieden. Wie in der Abbildungen 18 und 19 zu sehen ist, zeigt sich sowohl bei den CD34⁺- als auch bei den CD34⁻-Zellen eine verminderte Lebensfähigkeit mit zunehmender AZA-Konzentration. Die Viabilitätsabnahme nimmt ab einer Konzentration von 0,63 μ M verstärkt zu. Um annähernd eine Viabilität von mindestens 50 % zu erreichen, wurde in Übereinstimmung mit anderen Arbeiten für die weiteren Experimente die Konzentration 0,5 μ M gewählt (Stresemann *et al.*, 2006; Hollenbach *et al.*, 2010). Zudem erweist sich das AML-Kollektiv, vor allem das mit Nachweis einer FLT3-ITD, im Vergleich zu gesunden Proben als signifikant weniger viabel. Dies

beruht nicht unbedingt auf einer erhöhten Empfindlichkeit der AML-Zellen gegenüber AZA. Primäre AML-Zellen gehen ohne unterstützende Funktion von Stromazellen schnell in Apoptose. Dies bedingt eine Abnahme der Gesamtzellzahl und einen geringeren Prozentsatz viabler Zellen (Azadniv *et al.*, 2020; Garrido *et al.*, 2001).

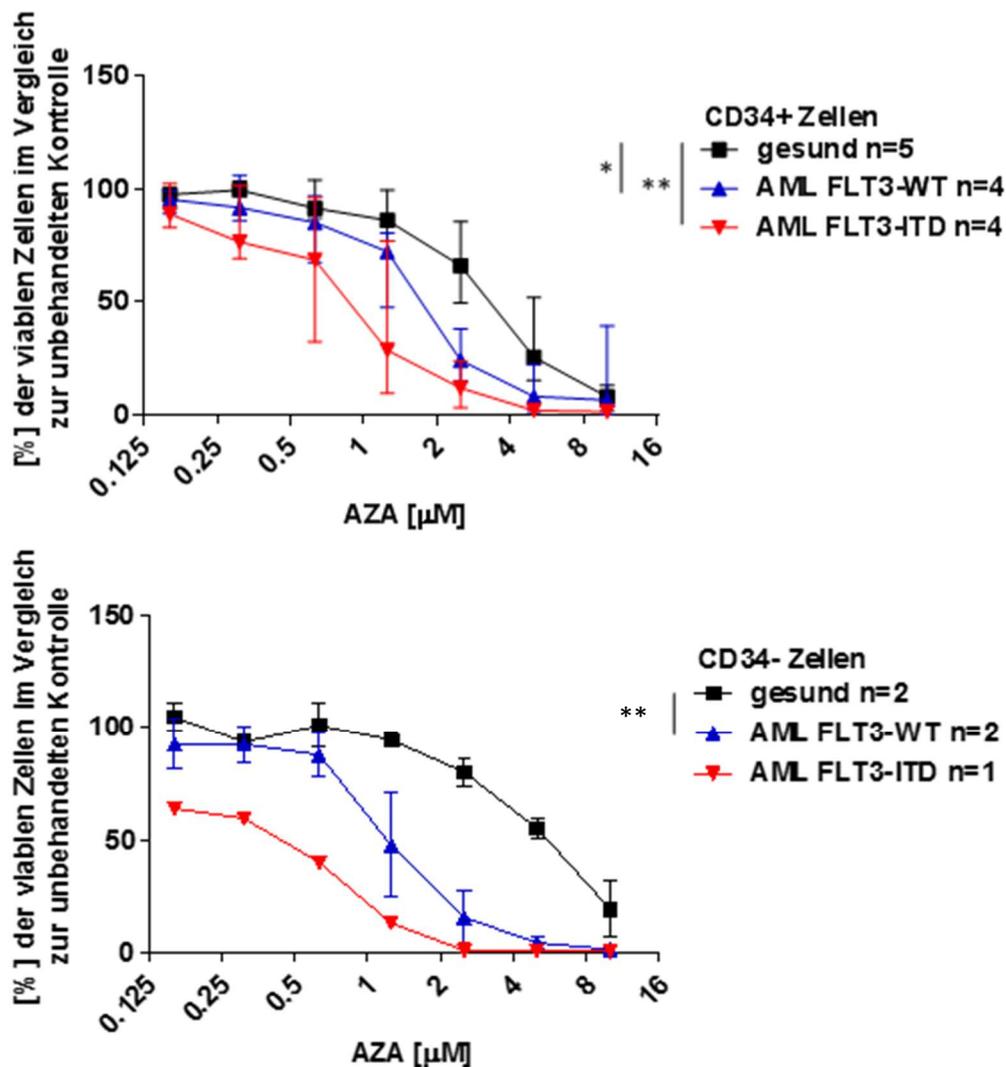


Abbildung 18: AZA-Titration der CD34⁺ (A) und CD34⁻ Zellen (B) aus AML-Patienten- und gesunden Proben. Die Zellen wurden 96 Stunden mit AZA inkubiert. AZA wurde in Konzentrationen einer geometrischen Verdünnungsreihe eingesetzt. X-Achse: 2er-logarithmische Darstellung der absoluten AZA-Konzentration in μM . Y-Achse: [%] der viablen Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Das heißt der Anteil der viablen Zellen der unbehandelten Kontrolle entspricht 100 %. Die Werte der behandelten Proben wurden in Relation zur unbehandelten Kontrolle rechnerisch ermittelt. Die Ergebnisse zeigen die Medianwerte \pm Spannweite. $*p < 0,01$, bezogen auf gesund vs. AML-FLT3-ITD, $*p < 0,05$, bezogen auf gesund vs. AML-FLT3-WT (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test) (obere Abbildung). $**p < 0,01$, bezogen auf gesund vs. AML-FLT3-WT (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test) (untere Abbildung).

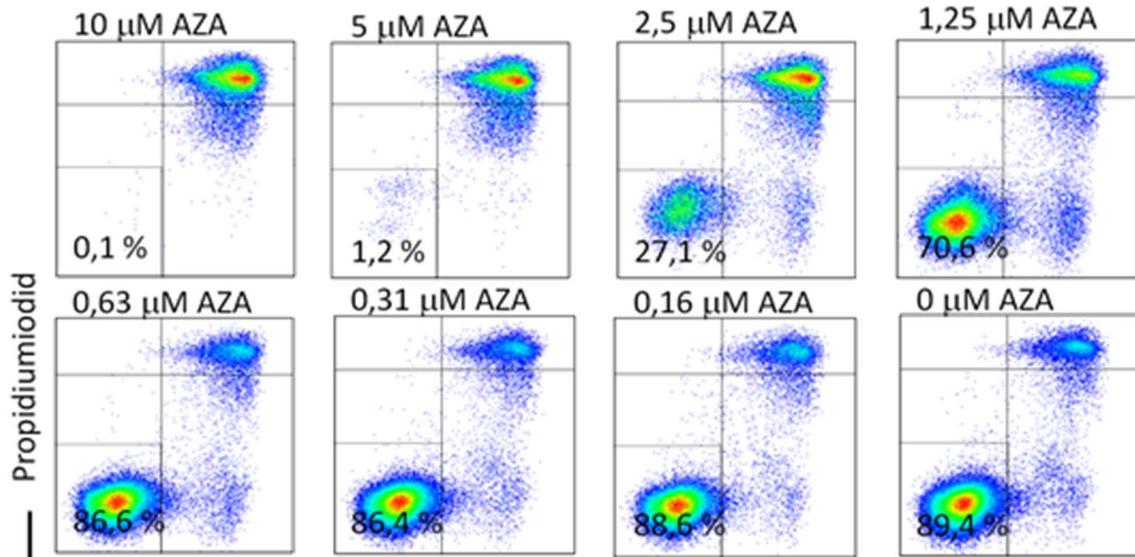


Abbildung 19: Exemplarische Durchflusszytometrische Darstellung der AZA-Titration. Es wird die Viabilität in Abhängigkeit von der AZA-Konzentration am Beispiel von Patientenummer 10 dargestellt.

4.3 Bestimmung der Viabilität von mononukleären Zellen nach viertägiger Kultivierung in EV-freiem Medium

Die Kultivierung von mononukleären Zellen erfolgt üblicherweise in einem Medium mit fetalem Kälberserum, welches EV enthält. Zur Vermeidung einer kontaminierenden EV-Quelle wird bei der Isolierung von EV aus mononukleären Zellen EV freies fetales Kälberserum verwendet. Dies führt jedoch zu einer verminderten Proliferation der Zellen (Eitan *et al.*, 2015; Angelini *et al.*, 2016). Eine ausreichende Viabilität ist allerdings für eine effektive EV-Bildung erforderlich. Nach viertägiger Kultivierung in EV-freiem Medium zeigte das gesunde Kollektiv im Vergleich zu den beiden AML-Kollektiven eine nicht signifikante höhere Lebensfähigkeit. Die geringere Viabilität von AML-Proben ist nicht zwangsläufig auf das EV-freie fetale Kälberserum zurückzuführen. Die bereits in 4.2 erwähnte Kultur induzierte Apoptose ist auch hier von Bedeutung. Ein direkter Vergleich mit Medium, welches normales fetales Kälberserum enthält, wurde jedoch nicht durchgeführt. Darüber hinaus bestehen keine Unterschiede zwischen den mit 0,5 µM AZA behandelten Zellen und den unbehandelten Zellen. Dies bestätigt die gewählte AZA-Konzentration, da fehlenden Unterschiede zwischen den Behandlungen auf keine vermehrte Zytotoxizität durch AZA hinweisen.

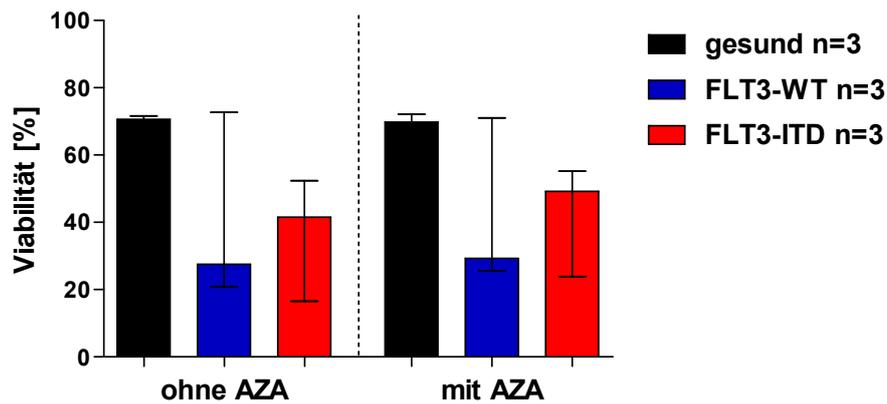


Abbildung 20: Viabilitätsbestimmung von mononukleären Zellen nach viertägiger Kultivierung in EV-freiem Medium. X-Achse: Dieselben Zellen wurden jeweils mit und ohne 0,5 μM AZA inkubiert. Y-Achse: [%] der viablen Zellen. Die Ergebnisse zeigen die Medianwerte \pm Spannweite. $p > 0,05$ (Kruskal-Wallis-Test mit Dunns Mehrfachvergleich).

4.4 Bestimmung der Transfektionsrate von HEK293T-Zellen und der Transduktionsrate von MOLM13-Zellen

Um eine einfache qualitative Darstellung von isolierten EV zu ermöglichen, wurden MOLM13-Zellen mit CD63-GFP⁺-Konstrukt nach Transfektion von HEK293T-Zellen transduziert. CD63 ist ein Tetraspanin, welches sich in der Zelle in der Zellmembran und in Endosomenmembranen befindet (Pols and Klumperman, 2009). Außerhalb der Zelle kommt es in EV vor (Mathivanan and Simpson, 2009). Durch die Internalisierung des Fusionsprotein CD63-GFP⁺ dienen diese MOLM-13- Zellen als permanente Zellquelle für GFP⁺-markierte EV. Die Transfektions- und Transduktionsrate wurden mittels Durchflusszytometrie ermittelt und die entsprechenden Zellen durch fluoreszierende Zellsortierung isoliert. Die Bestimmung erfolgte durch die direkte Messung von GFP. 74,1 % der HEK293T-Zellen und 8 % der Molm13-Zellen exprimierten GFP.

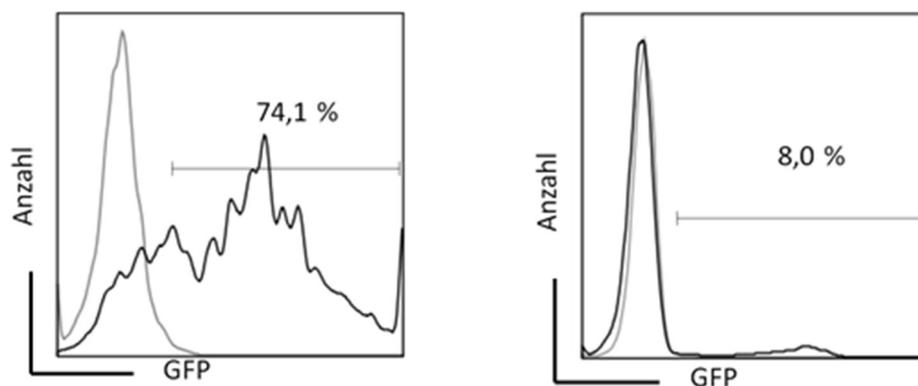


Abbildung 21: Durchflusszytometrische Bestimmung der CD63-GFP⁺-Expression. Links: HEK293T-Zellen nach Transfektion. Rechts: Molm13-Zellen nach Transduktion.

4.5 GFP-Vergleichsmessung von konzentrierten und unkonzentrierten EV aus Molm13 mit CD63-GFP⁺-Konstrukt

Aus Molm13-Zellen mit CD63-GFP⁺-Konstrukt wurden anschließend die konsekutiv fluoreszierenden EV mittels Exolso-Kit isoliert. Es wurde deren GFP-Signal nach Bindung an Latexkugeln durchflusszytometrisch bestimmt. Dies wurde mit EV, die zusätzlich zur Konzentrierung ultrazentrifugiert wurden, verglichen. GFP wird auf 76 % der unkonzentrierten und auf 4 % der konzentrierten EV exprimiert. Durch Ultrazentrifugation kommt es demnach zum Verlust des GFP-Signals von EV. Nach einer Arbeit von Nordin *et al.* führt Ultrazentrifugation zur Fragmentierung von EV und Freisetzung von CD63-GFP⁺ in den Überstand (Nordin *et al.*, 2015). Folglich wurden für die weiteren Experimente nur unkonzentrierte EV verwendet.

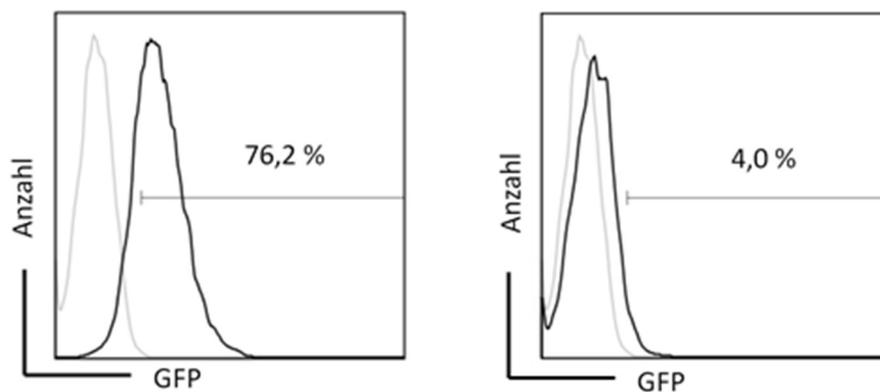


Abbildung 22: GFP-Vergleichsmessung von konzentrierten und unkonzentrierten EV, die von Molm13 mit CD63-GFP⁺-Konstrukt isoliert wurden. Links: Unkonzentrierte EV. Rechts: Konzentrierte EV

4.6 Bestimmung der Proteinmenge pro EV-Isolation aus 4×10^7 Zellen

Es ist bekannt, dass AZA durch Hypomethylierung die Expression von Genen ungerichtet wiederherstellen kann. Zudem führt AZA zu einer veränderten RNS- und daraus resultierenden Proteinsynthese (Diesch *et al.*, 2016). Da EV sowohl RNS als auch Proteine beinhalten, ist es von Interesse die Proteinkonzentrationen in EV nach Behandlung mit AZA zu untersuchen. Die absolut gemessene Proteinmenge pro EV-Isolation betrug bei den Zellen, die ohne AZA kultiviert wurden, zwischen 17-32 μg , bei den Zellen mit 0,5 μM AZA 20-44 μg . Zwischen den einzelnen Kollektiven zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die Behandlung mit AZA die Proteinmenge tendenziell steigt. Es bleibt jedoch unklar, ob ursächlich mehr EV sekretiert werden, vermehrt Gene durch Hypomethylierung exprimiert werden oder durch Modifikation von RNS vermehrt Proteine gebildet werden.

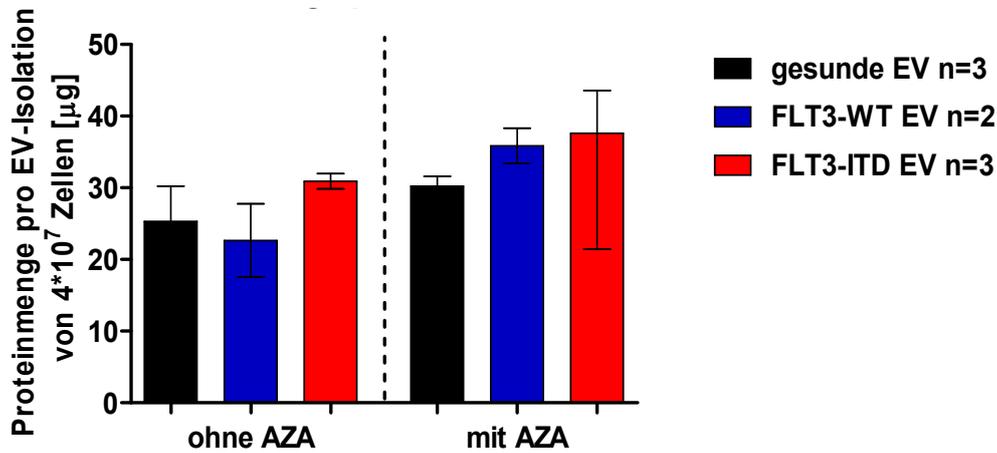


Abbildung 23: Proteinmenge pro EV-Isolation. Es wurden 4×10^7 Zellen in einer 75 cm^2 großen Zellkulturflasche in EV-Isolationsmedium ausgesät und kultiviert. Jede Probe wurde jeweils mit und ohne $0,5 \mu\text{M}$ AZA verwendet (X-Achse). Nach vier Tagen erfolgte die EV-Isolation mit dem Exolso Kit. Die Proteinmenge wurde nach Ultrazentrifugation, Lyse und Sonifizierung mit dem Protein Assay Kit II bestimmt. Die Ergebnisse zeigen die Medianwerte \pm Spannweite. $p > 0,05$ (Kruskal-Wallis-Test mit Dunns Mehrfachvergleich).

4.7 Immunphänotypisierung von EV

Die Durchflusszytometrie wurde verwendet, um EV zu charakterisieren, die aus KM von AML-Patienten und gesunden Kontrollen isoliert wurden. Es zeigten sich Differenzen zwischen dem gesunden Kollektiv und den AML-FLT3-WT- beziehungsweise AML-FLT3-ITD-Kollektiven. Während gesunde EV eine hohe Expression von CD41, CD44, CD64 und CD81 aufweisen, zeigen AML-EV eine verstärkte Expression von CD34 und CXCR4. Die Expression des myeloischen Blastenmarkers CD34 bestätigt, dass die EV von leukämischen Zellen stammen. Es konnte allerdings kein Zusammenhang zwischen der CD34 Expression auf EV und der Expression auf den Blasten hergestellt werden (Daten werden nicht gezeigt). So wird beispielsweise bei Patientenprobe NR 3 (in Abbildung 24 2. Probe von links bei den AML FLT3-ITD EV) auf den Blasten kein CD34 exprimiert, die EV weisen jedoch zu 79 % CD34 auf. Darüber hinaus fällt bei den ersten beiden AML FLT3-ITD-EV (Patienten NR 4 und 3) eine verstärkte Expression von CD64 und CD41 auf. Dies ist weder durch eine geringe Knochenmarkinfiltration (96 bzw. 85 % Blasten) noch durch eine monozytäre Differenzierung erklärbar. Zwischen den Behandlungen ohne und mit $0,5 \mu\text{M}$ AZA ergeben sich keine eindeutigen Unterschiede. Es

konnte nur eine geringfügige, nicht signifikante abnehmende Expression von CXCR4 und CD34 und zunehmende Expression von PD-1 und PDL-1 festgestellt werden. Diese können durch eine veränderte Knochenmarkszusammensetzung bei direkter Zytotoxizität oder veränderte Methylierungsstatus der Promotoren von Genen bedingt sein. Näheres ist den Abbildungen 24-26 zu entnehmen.

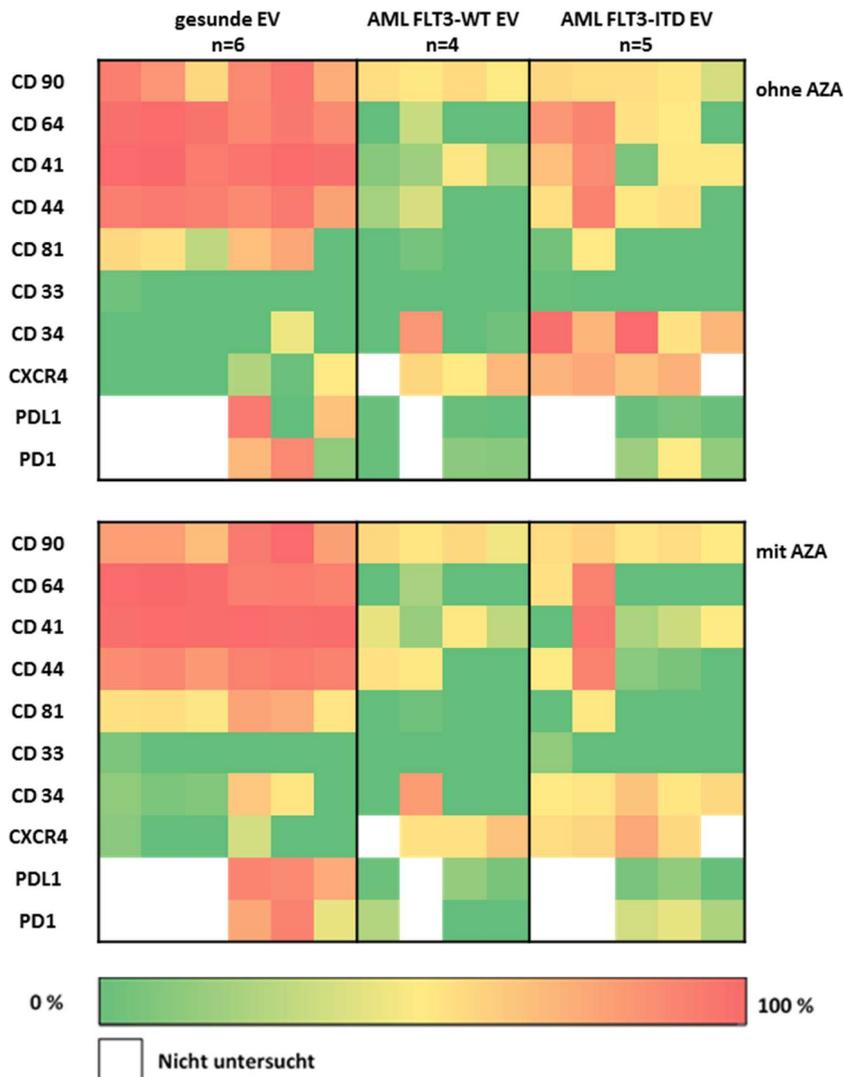


Abbildung 24: Durchflusszytometrische Bestimmung der Positivität von CD-Markern auf EV ohne (oben) und mit 0,5 μ M AZA (unten). Die Darstellung ohne AZA enthält an dergleichen Position dieselbe Proben wie die Abbildung mit AZA. Abgebildet sind Marker mit Unterschieden zwischen den Kollektiven, ein typischer EV-Marker und myeloischer Marker.

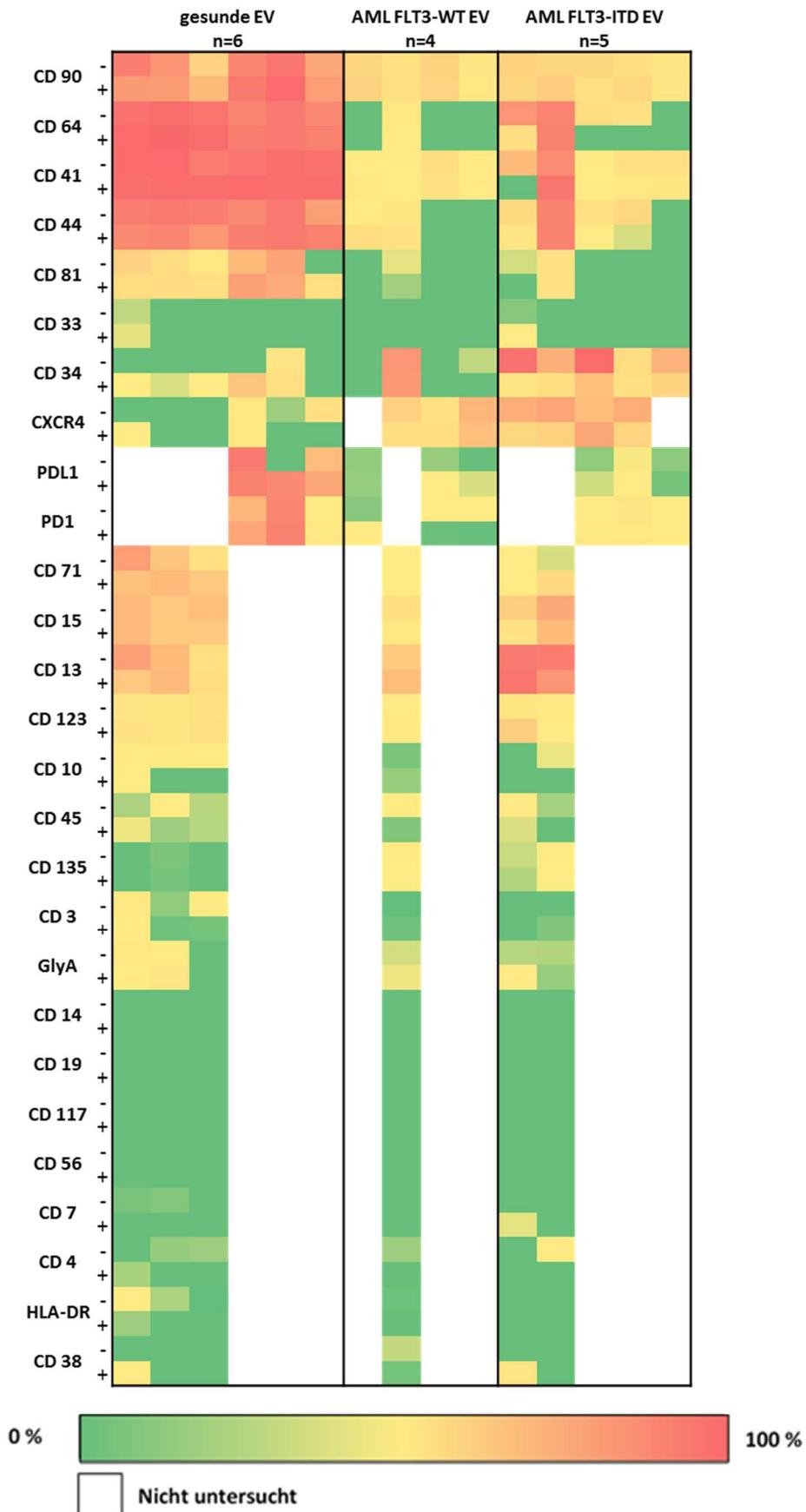
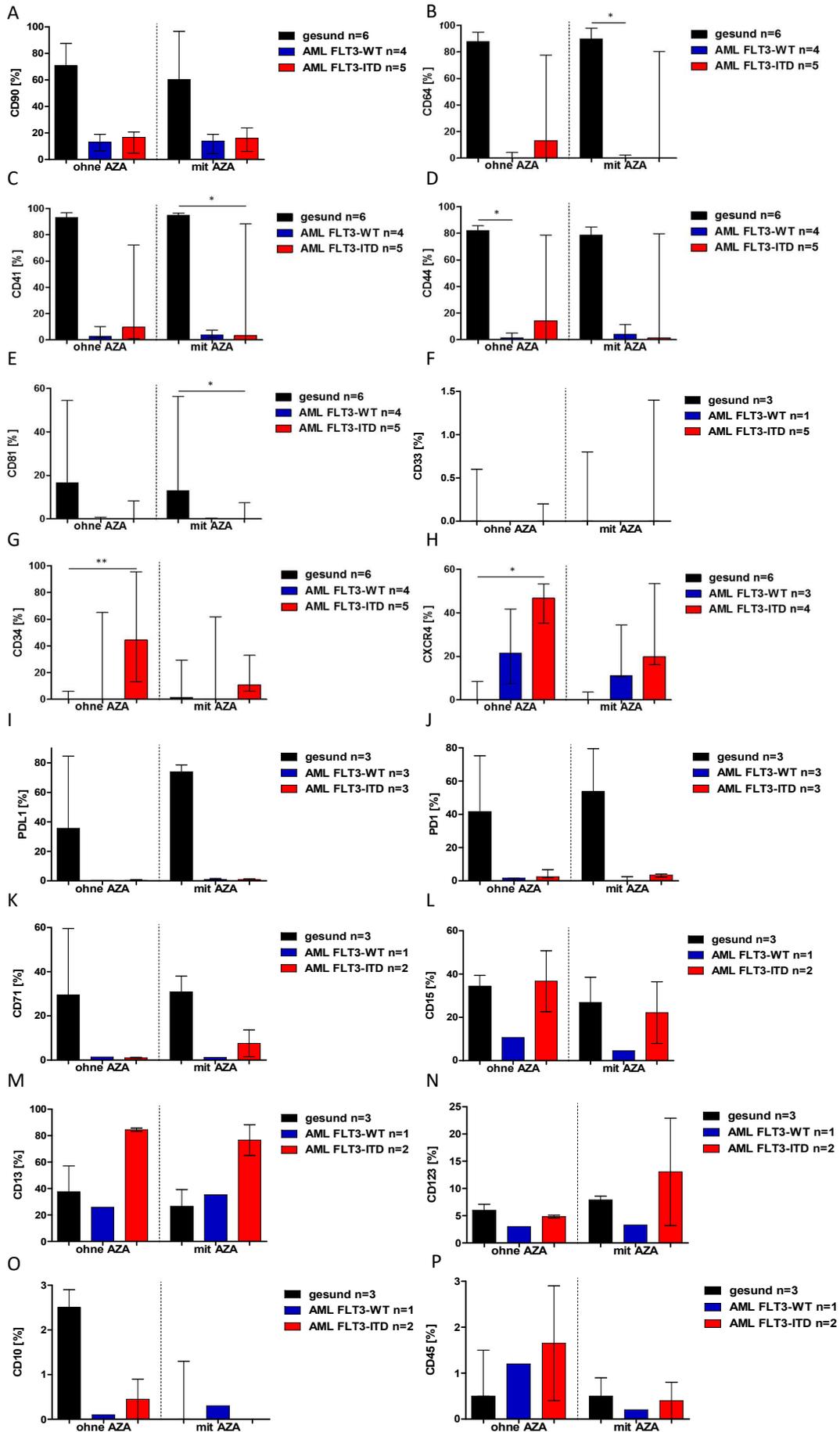


Abbildung 25: Durchflusszytometrische Bestimmung der Positivität von CD-Markern auf EV. Die Darstellung enthält alle untersuchten Marker. Dieselbe Probe mit und ohne AZA-Behandlung findet sich nach CD-Markern geordnet untereinander in derselben Spalte.



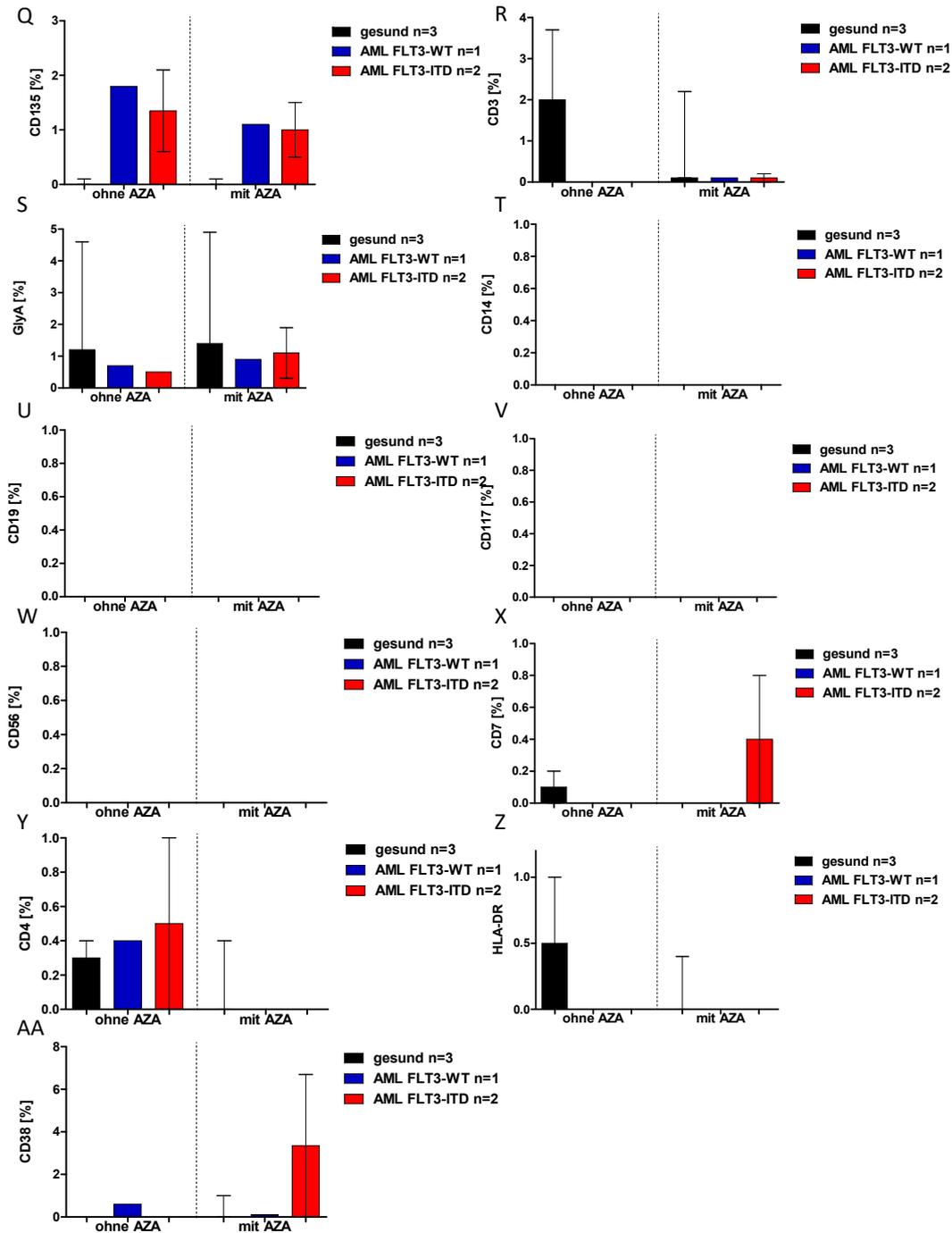


Abbildung 26: Durchflusszytometrische Bestimmung der Positivität von CD-Markern auf EV nach Bindung an Latexkugeln. Jede Abbildung stellt einen CD-Marker dar (Y-Achse). Alle Proben wurden mit und ohne 0,5 μM AZA behandelt (X-Achse). Die Ergebnisse zeigen die Medianwerte ± Spannweite (Kruskal-Wallis-Test mit Dunns Mehrfachvergleich). Expression von CD64: * $p < 0,05$, bezogen auf gesund mit AZA vs. AML-FLT3-WT mit AZA (B). Expression von CD41: * $p < 0,05$, bezogen auf gesund mit AZA vs. AML-FLT3-ITD mit AZA (C). Expression von CD44: * $p < 0,05$, bezogen auf gesund ohne AZA vs. AML-FLT3-WT ohne AZA (D). Expression von CD81: * $p < 0,05$, bezogen auf gesund mit AZA vs. AML-FLT3-ITD mit AZA (E). Expression von CD34: ** $p < 0,01$, bezogen auf gesund ohne AZA vs. AML-FLT3-ITD ohne AZA (G). Expression von CXCR4: * $p < 0,05$, bezogen auf gesund ohne AZA vs. AML-FLT3-ITD ohne AZA (H). Expression von CD90, CD33, PDL1, PD1, CD71, CD15, CD13, CD123, CD10, CD45, CD135, CD3, GlyA, CD14, CD19, CD117, CD56, CD7, CD4, HLA-DR und CD38: $p > 0,05$ (A, F, I-AA).

4.8 Transwellversuch mit CD34⁻-Zellen im oberen Kompartiment

Bei der AML wird die gesunde Hämatopoese unterdrückt. Wie es zur Suppression kommt, ist nicht vollständig geklärt. In diesem Versuch wurde die hemmende Wirkung von löslichen Faktoren, zu denen auch die EV gehören, geprüft. Es wird in diesem Abschnitt mit der Untersuchung der Wirkung löslicher Faktoren von CD34⁻-Zellen begonnen. In 4.9 ist der Effekt solubler Faktoren, die von CD34⁺- Zellen abgegeben werden, dargestellt.

4.8.1 FLT3-PCR der gesunden CD34⁺-Zellen

Als Möglichkeit der Suppression wird die Übertragung genetischer Information in Betracht gezogen. Ridder et al zeigten, dass Vesikel umschlossene mRNS übertragen werden kann (Ridder *et al.*, 2014). Der Einbau von DNS in EV ist jedoch grundsätzlich fraglich (Bebelman *et al.*, 2018). In diesem Versuch wurde speziell der Transfer von DNS mit FLT3-ITD-Mutation auf gesunde CD34⁺-Zellen untersucht. Dabei wurde die genomische DNS von den gesunden CD34⁺-Zellen aus dem unteren Kompartiment analysiert. In keiner Probe konnte eine FLT3-ITD-Mutation nachgewiesen werden. Es kam also nicht zum DNS-Transfer auf die gesunden CD34⁺-Zellen. Eine Suppression der Hämatopoese via DNS-Übertragung einer FLT3-ITD Mutation konnte somit ausgeschlossen werden.

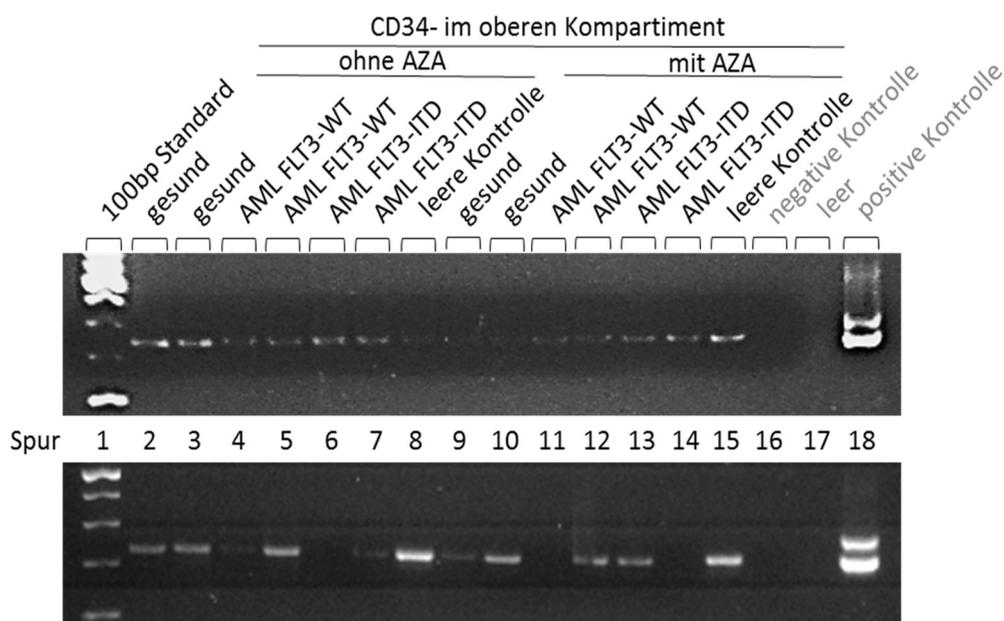


Abbildung 27: FLT3-PCR aus genomischer DNS von gesunden CD34⁺-Zellen aus dem unteren Kompartiment des Transwellversuchs mit CD34⁻-Zellen. Im oberen Kompartiment befanden sich CD34⁻-Zellen. Diese stammten entweder von gesunden, AML-FLT3-WT- oder AML-FLT3-ITD-Spendern. Dieselben Proben wurden mit und ohne 0,5 μ M AZA behandelt. Die obere Darstellung zeigt die FLT3-PCR der gesunden CD34⁺-Zellen des Spenders NR 4, die untere des Spenders NR 5.

4.8.2 Viabilität der CD34⁻-Zellen im oberen Kompartiment und der CD34⁺-Zellen im unteren Kompartiment

Nach vier Tagen im Transwell-System ist die Viabilität der CD34⁻-Zellen im oberen Kompartiment geringer als die der CD34⁺-Zellen im unteren Kompartiment. Die AZA-Behandlung führt in beiden Kompartimenten zu einer minimalen, jedoch nicht signifikanten Abnahme der Viabilität. Die geringen Viabilitäten sind nicht Ausdruck einer direkten Unterdrückung, sondern können auf die unterschiedlichen, zellspezifischen Medien im unteren und oberen Kompartiment, zurückgeführt werden. Die Medien konnten in das jeweilige andere Kompartiment diffundieren, sodass die Zusammensetzung des Mediums nicht mehr ideal für die Zellen war. Insgesamt erwiesen sich die gesunden CD34⁺-Zellen unabhängig von der Co-Kultivierung als gleich viabel.

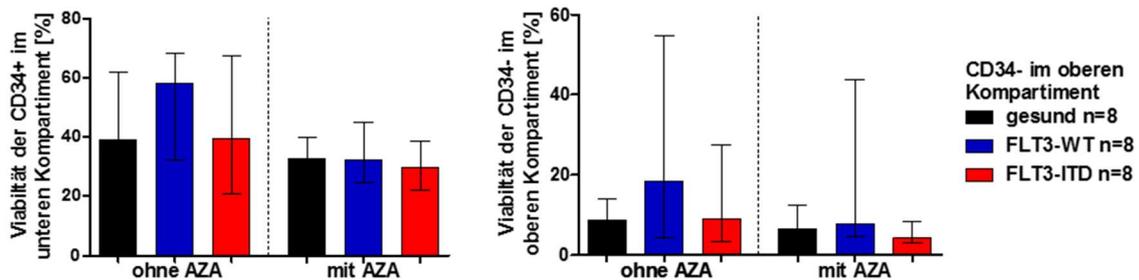


Abbildung 28: Bestimmung der Viabilität der gesunden CD34⁺-Zellen im unteren Kompartiment (links) und der variablen CD34⁻-Zellen im oberen Kompartiment (rechts). Alle Proben wurden mit und ohne 0,5 μ M AZA behandelt (X-Achse). Y-Achse: Viabilität in Prozent. Die Ergebnisse zeigen die Medianwerte \pm Spannweite. $p > 0,05$ (Kruskal-Wallis-Test mit Dunns Mehrfachvergleich).

4.8.3 Koloniebildungspotential

Das Koloniebildungspotential von gesunden CD34⁺-Zellen nach Co-Kultivierung im Transwell-System mit CD34⁻-Zellen von gesunden und AML-Spendern unterscheidet sich nicht, weder nach Kurzzeit- noch nach Langzeitkultivierung. Auch sind keine Differenzen zwischen den mit

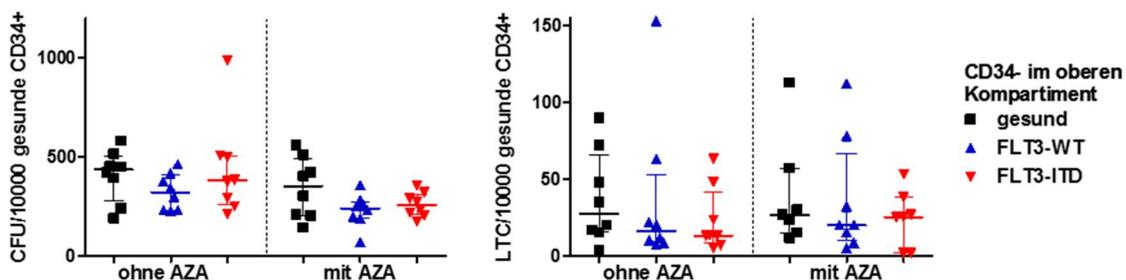


Abbildung 29: Anzahl der in Methylzellulose gebildeten Kolonien pro 10000 gesunde CD34⁺-Zellen. Die Koloniebildungsrate wurde nach vier Tagen (links) und nach sechs Wochen (rechts) bestimmt. Die Ergebnisse zeigen die Medianwerte \pm Spannweite. $p > 0,05$ (Kruskal-Wallis-Test mit Dunns Mehrfachvergleich).

AZA und den unbehandelten Zellen erkennbar. Eine Beeinträchtigung der Klonogenität von gesunden CD34⁺-Zellen durch lösliche Faktoren von CD34⁻-Zellen konnte nicht gezeigt werden.

4.9 Transwellversuch mit CD34⁺-Zellen im oberen Kompartiment

In diesem Versuch erfolgten die gleichen Untersuchungen wie in 4.8. Der einzige Unterschied besteht darin, dass die löslichen Faktoren von CD34⁺-Zellen und nicht CD34⁻-Zellen abgegeben wurden.

4.9.1 FLT3-PCR der gesunden CD34⁺-Zellen

Analog zu 4.8.1 wurde die genomische DNS von den gesunden CD34⁺-Zellen aus dem unteren Kompartiment bezüglich einer FLT3-ITD-Mutation untersucht. Diese konnte in keiner Probe nachgewiesen werden und somit auch keine DNS-Transfer.

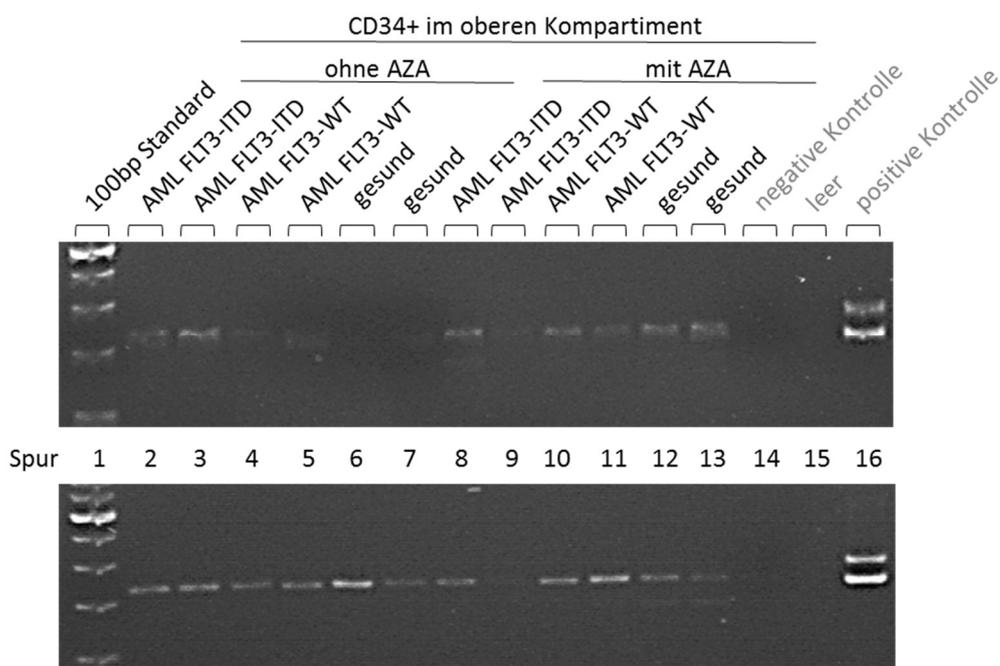


Abbildung 30: FLT3-PCR aus genomischer DNS von gesunden CD34⁺- Zellen aus dem unteren Kompartiment des Transwellversuchs mit CD34⁺-Zellen. Im oberen Kompartiment befanden sich CD34⁺-Zellen, diese stammten entweder von gesunden, AML-FLT3-WT oder AML-FLT3-ITD Spendern. Dieselben Proben wurden mit und ohne 0,5 μ M AZA behandelt. Die obere Darstellung zeigt die FLT3-PCR der gesunden CD34⁺-Zellen des Spenders NR 2, die untere des Spenders NR 3.

4.9.2 Viabilität der CD34⁺-Zellen im oberen Kompartiment und unteren Kompartiment

Im oberen Kompartiment zeigt sich eine Tendenz zur geringeren Viabilität der CD34⁺- Zellen von AML-Spendern im Vergleich zu gesunden. Dies betrifft vor allem die AML-FLT3-ITD-Proben. Dies ist mutmaßlich, wie bereits in 4.2 und 4.3 erwähnt, auf die Kultur bedingte Apoptose von AML-Zellen zurückzuführen und nicht auf eine Beeinflussung durch lösliche Faktoren aus dem anderen Kompartiment. Die Viabilität nimmt unter AZA-Behandlung in allen drei Kollektiven ab, jedoch nicht signifikant. Ursächlich hierfür könnte die direkte Zytotoxizität von AZA sein. Eine minimale, einheitliche Abnahme der Viabilität bei AZA-Behandlung zeigt sich auch im unteren Kompartiment. Ansonsten sind keine Unterschiede der gesunden CD34⁺-Zellen abhängig von der Co-Kultivierung feststellbar. Die Abgabe löslicher Faktoren von CD34⁺-Zellen unterschiedlicher Entitäten beeinflusst die Viabilität nicht.

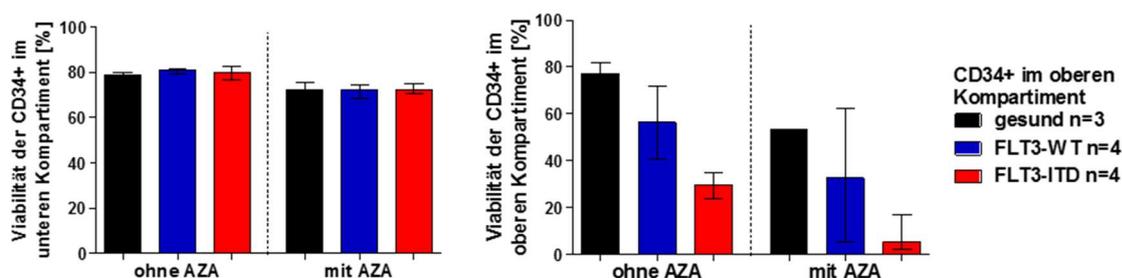


Abbildung 31: Bestimmung der Viabilität der gesunden CD34⁺-Zellen im unteren Kompartiment (links) und der variablen CD34⁺-Zellen im oberen Kompartiment (rechts). Alle Proben wurden mit und ohne 0,5 μ M AZA behandelt (X-Achse). Y-Achse: Viabilität in Prozent. Die Ergebnisse zeigen die Medianwerte \pm Spannweite. $p > 0,05$ (Kruskal-Wallis-Test mit Dunns Mehrfachvergleich).

4.9.3 Koloniebildungspotential

Weder nach Kurzzeit- noch nach Langzeitkultivierung sind Unterschiede im Hinblick auf die Koloniebildung von gesunden CD34⁺-Zellen nach Co-Kultivierung im Transwell-System mit

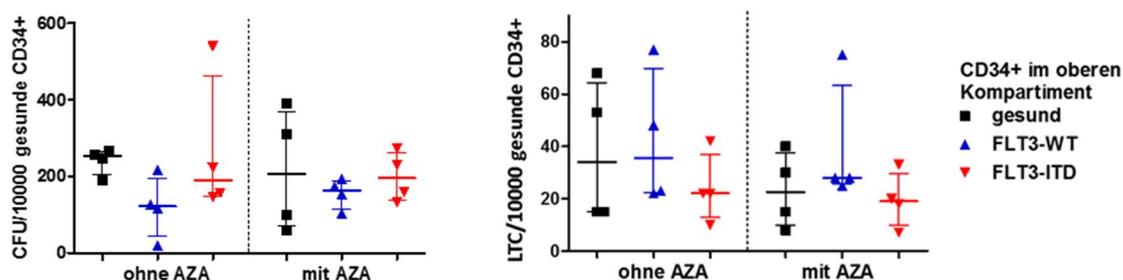


Abbildung 32: Anzahl der in Methylzellulose gebildeten Kolonien pro 10 000 gesunde CD34⁺-Zellen. Die Koloniebildungsrate wurde nach vier Tagen (links) und nach sechs Wochen (rechts) bestimmt. Die Ergebnisse zeigen die Medianwerte \pm Spannweite. $p > 0,05$ (Kruskal-Wallis-Test mit Dunns Mehrfachvergleich).

CD34⁺-Zellen von gesunden und AML-Spendern erkennbar. Auch gibt es keine Unterschiede durch eine AZA Behandlung. Eine Hemmung des Koloniebildungspotentials von gesunden CD34⁺-Zellen durch soluble Faktoren von CD34⁺-Zellen konnte nicht gezeigt werden.

4.10 Migrationsuntersuchung mit konditionierten Medien

Bei der Unterdrückung der gesunden Hämatopoese ist der Verlust von Stamm- und Vorläuferzellen im KM von Bedeutung. In diesem Test wurde untersucht, ob AML-EV zu einer verstärkten Mobilisation von CD34⁺-Zellen vom KM weg beitragen, indem sie Stromafaktoren dysregulieren, die für die Erhaltung von Vorläufer- und Stammzellen sorgen. EL08-1D2 wurden mit EV von AML oder gesunden Spendern beziehungsweise nur mit Puffer inkubiert. Nach einem Tag wurde das Medium gewechselt. Nach einem weiteren Tag wurde der Überstand für eine Migrationsuntersuchung mit gesunden CD34⁺-Zellen verwendet. Die Zellmigration wurde in Transwellplatten mit einer Porengröße von 5 µm durchgeführt und mit Count Bright Beads quantifiziert. Dieser Versuch zeigt eine Tendenz zu einem indirekt negativen Effekt auf die Wanderung von gesunden CD34⁺-Zellen gegenüber Medium, welches von EL08-1D2 stammt, die mit AML-EV behandelt wurden im Vergleich zu gesunden EV. Diese Wirkung besteht tendenziell auch bei AZA-Behandlung. Gegenüber der Positivkontrolle migrierten durchschnittlich 13 % der Ausgang-CD34⁺-Zellen. Zusammenfassend zeigte sich eine mäßige Beeinträchtigung der Fähigkeit zur Migration von CD34⁺-Zellen, indem AML-EV auf EL08-1D2 wirken und CD34⁺-Zellen von diesen weg mobilisiert werden.

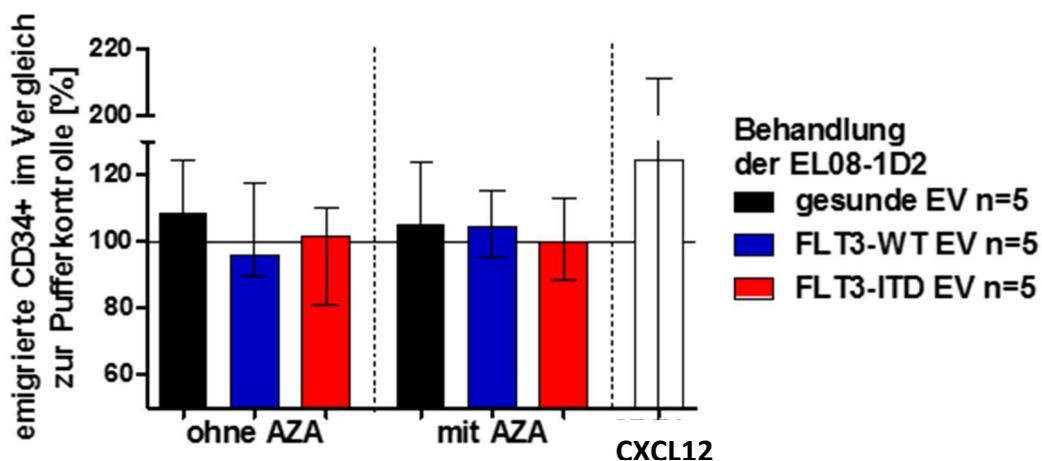


Abbildung 33: Migrationsuntersuchung mit durch EV konditioniertes Medium. Diese wurde mit und ohne AZA durchgeführt. Es wurde eine CXCL12-Kontrolle mitgeführt, um die Migrationsfähigkeit zu überprüfen (X-Achse). Auf der Y-Achse sind die emigrierten CD34⁺-Zellen im Vergleich zur Pufferkontrolle in Prozent dargestellt. Die Ergebnisse zeigen die Medianwerte ± Spannweite. $p > 0,05$ (Kruskal-Wallis-Test mit Dunns Mehrfachvergleich).

5 Diskussion

Die Knochenmarksnische spielt bei der AML-Entstehung und Aufrechterhaltung der Erkrankung eine große Rolle. Die Nische wird durch die leukämischen Zellen moduliert. Viele Einflussfaktoren werden im Rahmen dessen diskutiert, darunter auch die Kommunikation zwischen den Zellen über einen Transfer von spezifischen EV. Diese können möglicherweise zu funktionellen Veränderungen in den Zielzellen führen und somit zur Leukämieentstehung und –aufrechterhaltung beitragen. In der vorliegenden Doktorarbeit unterscheiden sich die EV aus KM von AML-Patienten immunphänotypisch deutlich von EV von gesunden Spendern. Das Knochenmark von AML-Patienten ist durch eine signifikant erhöhte Expression von CXCR4 und CD34 auf EV charakterisiert. Der Nachweis einer verstärkten Expression von CXCR4 auf EV von AML-Patienten wurde bereits in anderen, im folgenden aufgeführten Publikationen beschrieben. Grundsätzlich können bei leukämische Blasten von Patienten mit AML unterschiedliche Mengen von CXCR4 exprimiert werden (Möhle *et al.*, 1998). Kalinkovich *et al* zeigte, dass AML-Patientenmaterial erhöhte Plasma- und Knochenmarkspiegel von CXCR4⁺-Mikropartikel aufweist. Durchflusszytometrisch wurde CXCR4 sowohl bei gesunden Spendern als auch bei AML-Patienten nachgewiesen. Im ELISA waren die Spiegel von CXCR4 bei AML-Patienten gegenüber gesunden Patienten signifikant erhöht. Huan *et al* untersuchten RNS-Transkripte aus Exosomen von AML-Patienten auf das Vorhandensein von CXCR4. In allen AML-Primärproben und –Zelllinien konnte ein RNS-Transkript von CXCR4 nachgewiesen werden (Huan *et al.*, 2013). Auch zur Expression von CD34 auf EV von AML-Patienten gibt es konforme Studien. CD34 kann sich auf der Oberfläche von AML-Zellen befinden (Oyan *et al.*, 2005). Szczepanski *et al* isolierten Mikrovesikel aus Plasma von AML-Patienten und gesunden Spendern. Bei 16 von 19 AML-Patienten zeigte sich durchflusszytometrisch eine Expression von CD34, welche bei den gesunden Spendern nur kaum nachweisbar war (Szczepanski *et al.*, 2011). Die im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführten Messungen der Oberflächenexpressionsmarker ergaben auch, dass auf EV von gesunden Knochenmarkern im Vergleich zu AML-EV mehr CD41, CD44, CD64 und CD81 exprimiert wird. Es handelt sich dabei um Marker der physiologischen Populationen des Knochenmarks. CD41 ist ein Adhäsionsrezeptor, ein Thrombozyten- und Megakaryozytenmarker. Dieser kommt auch in einem geringen Level auf primitiven hämatopoetischen Zellen vor (Debili *et al.*, 2001). Ebenso ein Adhäsionsrezeptor und Stammzellmarker ist CD44. Dieses wird aber auch auf vielen

Krebsarten inklusive AML exprimiert. (Senbanjo and Chellaiah, 2017). CD64 ist ein integrales Membranglykoprotein, Makrophagen- und Monozytenmarker (Olweus *et al.*, 1995). CD81 gehört zur Gruppe der Tetraspanine und ist wichtig für den Erhalt der funktionalen Integrität von hämatopoetischen Stammzellen während der Regeneration (Lin *et al.*, 2011). Zusammenfassend können die Expressionsunterschiede auf eine unterschiedliche Beladung bzw. Oberflächenexpression maligner im Vergleich zu gesunden EV hindeuten. Hinweise hierfür gibt es auch bei der Proteinbestimmung mit einer Tendenz zu höheren Proteinmengen in AML-EV. Hong *et al.* wiesen in Exosomen, die aus dem Plasma von neu diagnostizierten und unbehandelten AML-Patienten isoliert wurden, ebenso erhöhte Proteinspiegel im Vergleich zu Kontrollexosomen nach. Die Exosomen wurden allerdings aus Plasma und nicht wie bei meinen Experimenten aus Knochenmark gewonnen. Bei ihren Untersuchungen bestand keine Korrelation vom Proteinlevel zur Prozentzahl der Blasten oder zum zytogenetischen Profil der Patienten. Auch konnte der Proteinspiegel keine Voraussagen zum Ansprechen auf die Induktionstherapie machen, jedoch konnten signifikante Veränderungen im exosomalen Proteinlevel, die nach einer Induktion oder einer Konsolidierung auftraten, nützlich sein für die Evaluierung des Ansprechens auf die Chemotherapie. Die Abnahme des Proteinlevels der Exosomen im peripheren Blut stimmte mit der Abnahme von Blasten im Knochenmark überein (Hong *et al.*, 2014). Bereits Studien aus den 1970-er vermuten, dass AML-Blasten die normale Hämatopoese hemmen. Chiyoda *et al.* zeigten, dass leukämische Knochenmarkszellen die Koloniebildungsfähigkeit von normalen Knochenmarkszellen unterdrücken können, wohingegen normale Knochenmarkszellen kaum suppressive Eigenschaften haben (Chiyoda *et al.*, 1976). Zu einer vergleichbaren Schlussfolgerung kamen auch Broxmeyer *et al.* Sie untersuchten Zellextrakte und konditioniertes Medium von KM und PB von Patienten mit akuter Leukämie auf die Aktivität gegenüber KBE. Beide Versuchsansätze hatten einen hemmenden Einfluss auf die Koloniebildung von normalen KBE (Broxmeyer *et al.*, 1978). Dass sich die Unterdrückung der normalen Hämatopoese auch bei Versuchen mit konditionierten Medien zeigt, weist darauf hin, dass die Beeinflussung möglicherweise über lösliche Faktoren wie EV und nicht nur über direkte Zellkontakte beeinflusst werden könnte. Die Studienergebnisse zu den Effekten der AML auf KBE sind teilweise sehr unterschiedlich bis widersprüchlich. Neben den bereits genannten Studien, bei denen eine Hemmung der normalen KBE gesehen wurde, wiesen andere Studien eine Unterdrückung nicht nach. Goldman *et al.* berichtete sogar davon, dass monozytäre Leukämien zu einem Anstieg von KBE

führen können (Goldman *et al.*, 1976). Resümierend konnte in dieser Doktorarbeit keine signifikante Modulation der Koloniebildung von CD34⁺-Zellen durch soluble Faktoren aus Knochenmark von AML-Patienten festgestellt werden. Eine mögliche Ursache hierfür ist die Inhomogenität der AML-Patienten. Auch von Bedeutung ist, dass sämtliche soluble Faktoren wie Zytokine mitwirkten und in den bisher genannten Studien keine reine EV-Fraktion getestet wurde. Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit auch die Manipulation der Migrationsfähigkeit von CD34⁺-Zellen indirekt über die Behandlung von Stromazellen mit EV analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass gesunde CD34⁺-Zellen tendenziell weniger von stromalen EL08-1D2-Zellen angelockt werden, wenn die Stromazellen vorher mit EV von AML-Patienten in Kontakt kamen. Dies stimmt mit den Aussagen der *in vitro* und murinen Xenograftstudien von Huan *et al* überein. Sie wiesen nach intrafemoraler Injektion von AML-Exosomen eine erhöhte Anzahl an Progenitorzellen im peripheren Blut nach. Sie demonstrierten auch, dass AML-Exosomen wesentliche Retentionsfaktoren wie SCF oder CXCL12 in stromalen Zellen herunterregulieren können, was zu einer hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellmobilisierung vom Knochenmark weg führt (Huan *et al.*, 2015). Die in der Migrationsuntersuchung gezeigten tendenziellen Unterschiede könnten eventuell durch die Verwendung einer anderen stromalen Zelllinie vergrößert werden. Aiuti *al* untersuchten die chemotaktische Wirkung auf CD34⁺-Zellen durch konditionierte Medien, die von verschiedenen stromalen Knochenmarkzelllinien stammten. Besonders MS5-Zellen fielen durch eine gute Chemotaxis auf CD34⁺-Zellen. Daneben könnte eine höhere Migrationsbereitschaft der CD34⁺-Zellen zu deutlicheren Unterschieden führen. Beispielsweise reagiert die murine myeloische Progenitorzelllinie M1 chemotaktisch nicht gut auf CXCL12 (Aiuti *et al.*, 1997). Zur Überprüfung der Migrationsfähigkeit wurde in meinen Versuchen als Positivkontrolle 100 ng/ml CXCL12 mitgeführt. Es migrierten durchschnittlich 13 % der Ausgang-CD34⁺-Zellen gegenüber der Positivkontrolle. Bei Aiuti *et al* migrierten in einem transendothelialen Ansatz von CD34⁺-Knochenmarkszellen ca. 25 % der Ausgangszellen. Die eingesetzten CD34⁺-Zellen wiesen also eine eingeschränkte Migrationsbereitschaft auf. Es ist bekannt, dass AZA, ein Methyltransferaseinhibitor und ein Demethylierer von Promotoren in CpG-Regionen von vielen Genen, die Expression von Genen wiederherstellen oder steigern kann (Fenaux *et al.*, 2010). Es gibt allerdings nur wenige Studien über die Effekte von AZA auf EV. In den hier aufgeführten Untersuchungen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen EV mit und ohne AZA-Behandlung festgestellt werden. Damit ließ sich unsere Ausgangshypothese, dass

AZA den Inhalt und die Wirkung von AML-EV modulieren könnte, nicht bestätigen. Es ergaben sich lediglich tendenzielle Unterschiede bei der Immunphänotypisierung bei den Markern CXCR4, CD34, PD-1 und PDL-1 und der Proteinmengenbestimmung. Bei der Proteinbestimmung nimmt die Menge des Proteins nach Behandlung mit AZA zu. Eine höhere Proteinkonzentration in EV nach Behandlung mit hypomethylierende Substanzen stellten auch Xiao et al fest. Sie verwendeten allerdings Decitabin bei der Isolierung von Exosomen, die von HepG₂ und Hep3B (HCC-Zelllinien) stammten. Die Konzentration von Gesamtprotein in Exosomen war nach einer Behandlung mit Decitabin signifikant höher als ohne Behandlung. Decitabin kann folglich durch Demethylierung die Proteinmenge in Exosomen erhöhen (Xiao *et al.*, 2010). Anhaltspunkte für Unterschiede nach Behandlung mit AZA ergaben sich auch bei der Immunphänotypisierung der EV. Die Expression von PDL-1 und PD-1 nahm nach AZA-Behandlung zu, während die Expression von CXCR4 und CD34 abnahm. Ørskov et al legten dar, dass PD-1 über DNS-Methylierung reguliert wird. Sie untersuchten die PD-1-Promotor-Demethylierung von T-Zellen aus peripherem Blut von Patienten, die mit AZA behandelt wurden. Bei 41 % der Patienten zeigte sich eine signifikante Abnahme in der Promotorenmethylierung. Die PD-1-Promotoren-Demethylierung korrelierte mit einer Zunahme der PD-1-Expression. Darüber hinaus korrelierte die PD-1-Promotoren-Demethylierung mit einem schlechten Therapieansprechen und einem kürzerem Gesamtüberleben (Ørskov *et al.*, 2015). Diese Ergebnisse ähneln denen von Yang et al. Sie untersuchten unter anderem die PDL-1- und PD-1-Expression in peripherem Blut nach Behandlung mit hypomethylierenden Substanzen. Beide Marker wurden hochreguliert. Patienten, die resistent gegen die Therapie waren, zeigten eine relativ starke Zunahme bei den Genexpressionen verglichen mit den Patienten, die auf die Therapie ansprachen. Auch eine Exposition von Leukämiezelllinien und humanen Proben gegenüber Decitabin führte zu einer partiellen Demethylierung von PD-1 (Yang *et al.*, 2014). Hypomethylierende Substanzen induzieren also die PD-1- und PDL-1-Expression, was konform mit den gezeigten Ergebnissen ist. Im Gegensatz dazu zeigte sich in den hier aufgeführten Ergebnissen eine Expressionshemmung von CXCR4 und CD34 auf EV durch AZA. Lee et al behandelten humane MSZ mit AZA. Die Promotoren von CXCR4 wurden durch die AZA-Behandlung hypomethyliert und es wurde eine erhöhte Expression von CXCR4 nachgewiesen (Lee *et al.*, 2015). Zu einem vergleichbaren Resümee kamen auch Li et al. Sie injizierten LS174T-Kolonkrebzellen in die vordere Augenkammer, subkutan oder in die Milz. Es wurde die CXCR4-Expression bestimmt.

Die Tumorzellen, die von der vorderen Augenkammer stammten, zeigten geringere CXCR4-Expressionen verglichen zu den subkutanen oder denen aus der Milz. Die Tumorzellen aus der vorderen Augenkammer wiesen eine erhöhte Methyltransferaseaktivität auf. Es erfolgte eine Behandlung mit 5-AZA-2-deoxycytidin, um eine Demethylierung zu erzeugen. Dies führte bei den Tumorzellen aus der vorderen Augenkammer zu einer Hochregulierung von CXCR4 (Li *et al.*, 2013). Auch die Expression von CD34 wird epigenetisch reguliert, wie Walczak-Drzewiecka *et al.* darlegten. Sie untersuchten die Differenzierung von Mastzellen aus zirkulierenden, pluripotenten hämatopoetischen Progenitoren. Die *in vitro* Mastzelldifferenzierung ist assoziiert mit einer abnehmenden CD34-Expression und einer zunehmenden HIF1A-Expression. Parallel zu diesen Veränderungen änderte sich auch der Methylierungsstatus der jeweiligen Promotoren (Walczak-Drzewiecka *et al.*, 2008). Diese Studien deuten an, dass die von der epigenetischen Regulation abhängige DNS-Methylierung die Genexpressionsveränderungen vermittelt. Eine Induktion der Expression von CXCR4 und CD34 erfolgte bei Hypomethylierung. Es wurden jedoch nur die Zellen untersucht und keine EV. Eine reduzierte Expression von CXCR4 und CD34 auf EV nach AZA-Behandlung ist durch ein vermindertes Abtransportieren auf EV erklärbar.

Die erwähnten Studien zeigen, dass leukämische EV an der Umgestaltung der Mikroumgebung und der Unterdrückung der gesunden Hämatopoese bei der AML beteiligt sind. Auch wenn in dieser Arbeit keine direkten zielspezifischen Effekte gezeigt werden konnten, deuten die Unterschiede zwischen gesunden Spendern und AML Patientenproben bei der Charakterisierung der EV auf eine mögliche Beteiligung an der Dysregulation von Faktoren, die für den Erhalt der Hämatopoese wichtig sind, hin. Tendenzielle Unterschiede in den Eigenschaften der AML-EV nach Behandlung mit AZA, sowie in der Literatur beschriebene Genexpressionsveränderungen durch hypomethylierende Substanzen implizieren, dass AML-EV therapeutische Ziele des Stammzellnische zerstörenden Effekts der Leukämiegenese darstellen könnten.

6 Zusammenfassung

Die akute myeloische Leukämie (AML) führt zu Knochenmarksinsuffizienz mit konsekutiver Panzytopenie, was wiederum Infektions- und Blutungskomplikationen hervorruft. Dies erfolgt einerseits durch Verdrängung der gesunden Hämatopoese aufgrund von massiver Expansion der Blastenpopulation mit starker Proliferation und Ausbreitung der Zellen, andererseits durch Umgestaltung der gesamten Nische durch die malignen Zellen. Die Kommunikation der AML-Zellen mit ihrer Nische basiert zum einen auf Zell-Zell-Kontakten, zum anderen auf solublen Faktoren. Es wird vermutet, dass extrazelluläre Vesikel (EV), die kleine RNS, Lipide und Proteine beinhalten, und von Zellen aufgenommen werden können, in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen. Es ist deshalb von Interesse die Beladung von EV, die von AML-Zellen sekretiert werden, zu untersuchen und herauszufinden, ob sie durch eine anti-leukämische Therapie, z. B. hypomethylierende Substanzen wie Azacitidin, von denen bekannt ist, dass sie die RNS-Synthese beeinflussen, moduliert wird. Zu diesem Zweck wurden EV verschiedener Subtypen der AML und gesunder Spender untersucht. Die FLT3-ITD-Mutation ist die bei der AML am häufigsten beschriebene genetische Aberration und ist mit einer schlechten Prognose, hohen Blastenzahl, erhöhtem Rezidivrisiko und kürzerem Gesamtüberleben assoziiert. FLT3-ITD AML-Zellen werden vor Chemotherapie von ihrer Knochenmarksnische geschützt. Aus diesem Grund wurde sie als eine AML-Entität gewählt, um sie mit FLT-WT AML-EV zu vergleichen. Die Immunphänotypisierung von EV, die aus KM von AML-Patienten isoliert wurden, zeigt im Vergleich zu EV von gesunden Spendern signifikante Unterschiede in der Expression von Oberflächenmarkern: Während gesunde EV eine Expression von CD41 (* $p < 0,05$, gesund mit AZA vs. AML-FLT3-ITD mit AZA), CD44 (* $p < 0,05$, gesund ohne AZA vs. AML-FLT3-WT ohne AZA), CD64 (* $p < 0,05$, gesund mit AZA vs. AML-FLT3-WT mit AZA) und CD81 (* $p < 0,05$, gesund mit vs. AML-FLT3-ITD mit AZA) aufweisen, haben maligne EV ein deutlich anderes Oberflächenmarker-Expressionsmuster mit Expression von CD34 (** $p < 0,01$, gesund ohne AZA vs. AML-FLT3-ITD ohne AZA) und CXCR4 (* $p < 0,05$, gesund ohne AZA vs. AML-FLT3-ITD ohne AZA). Die Proteinmessung von malignen vs. gesunden EV ergibt einen Trend zu höheren Proteinspiegeln in EV, die von AML-Zellen stammen (n.s., $p > 0,05$). Darüber hinaus zeigt diese Arbeit keinen Einfluss von löslichen Faktoren von malignen Zellen auf die Koloniebildungsbereitschaft gesunder CD34⁺-Zellen. Gesunde CD34⁺-Zellen werden jedoch seltener von Stromazellen angezogen, wenn sie zuvor

mit AML-EV in Kontakt gekommen sind. Eine Modulation der Beladung von EV durch AZA lässt sich experimentell nicht sicher nachweisen, wobei die Untersuchung von RNS aus EV nicht Bestandteil dieser Arbeit war. Nur leicht erhöhte AML-EV Proteinspiegel und leicht veränderte Expressionen der EV Oberflächenmarker CXCR4, CD34, PD-1 und PDL-1 durch AZA-Behandlung werden gezeigt. Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass AML-EV die gesunde Hämatopoese und die Mikroumgebung des Knochenmarks beeinflussen.

7 Literaturverzeichnis

- Agnès, F., Shamoon, B., Dina, C., Rosnet, O., Birnbaum, D. and Galibert, F. (1994), "Genomic structure of the downstream part of the human FLT3 gene. Exon/intron structure conservation among genes encoding receptor tyrosine kinases (RTK) of subclass III", *Gene*, Vol. 145 No. 2, pp. 283–288.
- Aiuti, A., Webb, I.J., Bleul, C., Springer, T. and Gutierrez-Ramos, J.C. (1997), "The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood", *The Journal of experimental medicine*, Vol. 185 No. 1, pp. 111–120.
- Andree, H.A., Reutelingsperger, C.P., Hauptmann, R., Hemker, H.C., Hermens, W.T. and Willems, G.M. (1990), "Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers", *The Journal of biological chemistry*, Vol. 265 No. 9, pp. 4923–4928.
- Angelini, F., Ionta, V., Rossi, F., Miraldi, F., Messina, E. and Giacomello, A. (2016), "Foetal bovine serum-derived exosomes affect yield and phenotype of human cardiac progenitor cell culture", *BiolImpacts BI*, Vol. 6 No. 1, pp. 15–24.
- Ara, T., Tokoyoda, K., Sugiyama, T., Egawa, T., Kawabata, K. and Nagasawa, T. (2003), "Long-term hematopoietic stem cells require stromal cell-derived factor-1 for colonizing bone marrow during ontogeny", *Immunity*, Vol. 19 No. 2, pp. 257–267.
- Arai, F., Hirao, A., Ohmura, M., Sato, H., Matsuoka, S., Takubo, K., Ito, K., Koh, G.Y. and Suda, T. (2004), "Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche", *Cell*, Vol. 118 No. 2, pp. 149–161.
- Arber, D.A., Orazi, A., Hasserjian, R., Thiele, J., Borowitz, M.J., Le Beau, M.M., Bloomfield, C.D., Cazzola, M. and Vardiman, J.W. (2016), "The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia", *Blood*, Vol. 127 No. 20, pp. 2391–2405.
- Azadniv, M., Myers, J.R., McMurray, H.R., Guo, N., Rock, P., Coppage, M.L., Ashton, J., Becker, M.W., Calvi, L.M. and Liesveld, J.L. (2020), "Bone marrow mesenchymal stromal cells from acute myelogenous leukemia patients demonstrate adipogenic differentiation propensity with implications for leukemia cell support", *Leukemia*, Vol. 34 No. 2, pp. 391–403.
- Balaj, L., Lessard, R., Dai, L., Cho, Y.-J., Pomeroy, S.L., Breakefield, X.O. and Skog, J. (2011), "Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences", *Nature communications*, Vol. 2, p. 180.
- Bebelman, M.P., Smit, M.J., Pegtel, D.M. and Baglio, S.R. (2018), "Biogenesis and function of extracellular vesicles in cancer", *Pharmacology & therapeutics*, Vol. 188, pp. 1–11.
- Beerman, I., Luis, T.C., Singbrant, S., Lo Celso, C. and Méndez-Ferrer, S. (2017), "The evolving view of the hematopoietic stem cell niche", *Experimental hematology*, Vol. 50, pp. 22–26.
- Bellingham, S.A., Coleman, B.M. and Hill, A.F. (2012), "Small RNA deep sequencing reveals a distinct miRNA signature released in exosomes from prion-infected neuronal cells", *Nucleic acids research*, Vol. 40 No. 21, pp. 10937–10949.
- Bianco, F., Perrotta, C., Novellino, L., Francolini, M., Riganti, L., Menna, E., Saglietti, L., Schuchman, E.H., Furlan, R., Clementi, E., Matteoli, M. and Verderio, C. (2009), "Acid sphingomyelinase activity triggers microparticle release from glial cells", *The EMBO journal*, Vol. 28 No. 8, pp. 1043–1054.
- Boulais, P.E. and Frenette, P.S. (2015), "Making sense of hematopoietic stem cell niches", *Blood*, Vol. 125 No. 17, pp. 2621–2629.
- Broxmeyer, H.E., Jacobsen, N., Kurland, J., Mendelsohn, N. and Moore, A.S. (1978), "In vitro suppression of normal granulocytic stem cells by inhibitory activity derived from human leukemia cells", *Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 60 No. 3, pp. 497–511.
- Bruns, I., Lucas, D., Pinho, S., Ahmed, J., Lambert, M.P., Kunisaki, Y., Scheiermann, C., Schiff, L., Poncz, M., Bergman, A. and Frenette, P.S. (2014), "Megakaryocytes regulate hematopoietic stem cell quiescence through CXCL4 secretion", *Nature medicine*, Vol. 20 No. 11, pp. 1315–1320.

- Cai, H., Reinisch, K. and Ferro-Novick, S. (2007), "Coats, tethers, Rabs, and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle", *Developmental cell*, Vol. 12 No. 5, pp. 671–682.
- Camussi, G., Deregibus, M.C., Bruno, S., Cantaluppi, V. and Biancone, L. (2010), "Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication", *Kidney international*, Vol. 78 No. 9, pp. 838–848.
- Castro, B.M., Prieto, M. and Silva, L.C. (2014), "Ceramide. A simple sphingolipid with unique biophysical properties", *Progress in lipid research*, Vol. 54, pp. 53–67.
- Cheshier, S.H., Morrison, S.J., Liao, X. and Weissman, I.L. (1999), "In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 96 No. 6, pp. 3120–3125.
- Chiyoda, S., Mizoguchi, H., Asano, S., Takaku, F. and Miura, Y. (1976), "Influence of leukaemic cells on the colony formation of human bone marrow cells in vitro II. Suppressive effects of leukaemic cell extracts", *British journal of cancer*, Vol. 33 No. 4, pp. 379–384.
- Choi, D.-S., Kim, D.-K., Kim, Y.-K. and Ghoo, Y.S. (2015), "Proteomics of extracellular vesicles. Exosomes and ectosomes", *Mass spectrometry reviews*, Vol. 34 No. 4, pp. 474–490.
- Christ, L., Raiborg, C., Wenzel, E.M., Campsteijn, C. and Stenmark, H. (2017), "Cellular Functions and Molecular Mechanisms of the ESCRT Membrane-Scission Machinery", *Trends in biochemical sciences*, Vol. 42 No. 1, pp. 42–56.
- Deaton, A.M. and Bird, A. (2011), "CpG islands and the regulation of transcription", *Genes & development*, Vol. 25 No. 10, pp. 1010–1022.
- Debili, N., Robin, C., Schiavon, V., Letestu, R., Pflumio, F., Mitjavila-Garcia, M.T., Coulombel, L. and Vainchenker, W. (2001), "Different expression of CD41 on human lymphoid and myeloid progenitors from adults and neonates", *Blood*, Vol. 97 No. 7, pp. 2023–2030.
- Denzer, K., van Eijk, M., Kleijmeer, M.J., Jakobson, E., Groot, C. de and Geuze, H.J. (2000), "Follicular dendritic cells carry MHC class II-expressing microvesicles at their surface", *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)*, Vol. 165 No. 3, pp. 1259–1265.
- Deschler, B. and Lübbert, M. (2006), "Acute myeloid leukemia. Epidemiology and etiology", *Cancer*, Vol. 107 No. 9, pp. 2099–2107.
- Diesch, J., Zwick, A., Garz, A.-K., Palau, A., Buschbeck, M. and Götze, K.S. (2016), "A clinical-molecular update on azanucleoside-based therapy for the treatment of hematologic cancers", *Clinical epigenetics*, Vol. 8, p. 71.
- Döhner, H., Estey, E., Grimwade, D., Amadori, S., Appelbaum, F.R., Büchner, T., Dombret, H., Ebert, B.L., Fenaux, P., Larson, R.A., Levine, R.L., Lo-Coco, F., Naoe, T., Niederwieser, D., Ossenkoppele, G.J., Sanz, M., Sierra, J., Tallman, M.S., Tien, H.-F., Wei, A.H., Löwenberg, B. and Bloomfield, C.D. (2017), "Diagnosis and management of AML in adults. 2017 ELN recommendations from an international expert panel", *Blood*, Vol. 129 No. 4, pp. 424–447.
- Döhner, H., Estey, E.H., Amadori, S., Appelbaum, F.R., Büchner, T., Burnett, A.K., Dombret, H., Fenaux, P., Grimwade, D., Larson, R.A., Lo-Coco, F., Naoe, T., Niederwieser, D., Ossenkoppele, G.J., Sanz, M.A., Sierra, J., Tallman, M.S., Löwenberg, B. and Bloomfield, C.D. (2010), "Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults. Recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet", *Blood*, Vol. 115 No. 3, pp. 453–474.
- DuBridge, R.B., Tang, P., Hsia, H.C., Leong, P.M., Miller, J.H. and Calos, M.P. (1987), "Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system", *Molecular and cellular biology*, Vol. 7 No. 1, pp. 379–387.
- Edgar, J.R., Manna, P.T., Nishimura, S., Banting, G. and Robinson, M.S. (2016), "Tetherin is an exosomal tether", *eLife*, Vol. 5.
- Eitan, E., Zhang, S., Witwer, K.W. and Mattson, M.P. (2015), "Extracellular vesicle-depleted fetal bovine and human sera have reduced capacity to support cell growth", *Journal of extracellular vesicles*, Vol. 4, p. 26373.
- Emmanouilidou, E., Melachroinou, K., Roumeliotis, T., Garbis, S.D., Ntzouni, M., Margaritis, L.H., Stefanis, L. and Vekrellis, K. (2010), "Cell-produced alpha-synuclein is secreted in a calcium-

- dependent manner by exosomes and impacts neuronal survival”, *The Journal of neuroscience the official journal of the Society for Neuroscience*, Vol. 30 No. 20, pp. 6838–6851.
- Escola, J.M., Kleijmeer, M.J., Stoorvogel, W., Griffith, J.M., Yoshie, O. and Geuze, H.J. (1998), “Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes”, *The Journal of biological chemistry*, Vol. 273 No. 32, pp. 20121–20127.
- Esteller, M. (2007), “Cancer epigenomics. DNA methylomes and histone-modification maps”, *Nature reviews. Genetics*, Vol. 8 No. 4, pp. 286–298.
- Fenaux, P., Mufti, G.J., Hellström-Lindberg, E., Santini, V., Gattermann, N., Germing, U., Sanz, G., List, A.F., Gore, S., Seymour, J.F., Dombret, H., Backstrom, J., Zimmerman, L., McKenzie, D., Beach, C.L. and Silverman, L.R. (2010), “Azacitidine prolongs overall survival compared with conventional care regimens in elderly patients with low bone marrow blast count acute myeloid leukemia”, *Journal of clinical oncology official journal of the American Society of Clinical Oncology*, Vol. 28 No. 4, pp. 562–569.
- Fevrier, B., Vilette, D., Archer, F., Loew, D., Faigle, W., Vidal, M., Laude, H. and Raposo, G. (2004), “Cells release prions in association with exosomes”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 101 No. 26, pp. 9683–9688.
- French, K.C., Antonyak, M.A. and Cerione, R.A. (2017), “Extracellular vesicle docking at the cellular port. Extracellular vesicle binding and uptake”, *Seminars in cell & developmental biology*, Vol. 67, pp. 48–55.
- Garrido, S.M., Appelbaum, F.R., Willman, C.L. and Banker, D.E. (2001), “Acute myeloid leukemia cells are protected from spontaneous and drug-induced apoptosis by direct contact with a human bone marrow stromal cell line (HS-5)”, *Experimental hematology*, Vol. 29 No. 4, pp. 448–457.
- Garz, A.-K., Wolf, S., Grath, S., Gaidzik, V., Habringer, S., Vick, B., Rudelius, M., Ziegenhain, C., Herold, S., Weickert, M.-T., Smets, M., Peschel, C., Oostendorp, R.A.J., Bultmann, S., Jeremias, I., Thiede, C., Döhner, K., Keller, U. and Götze, K.S. (2017), “Azacitidine combined with the selective FLT3 kinase inhibitor crenolanib disrupts stromal protection and inhibits expansion of residual leukemia-initiating cells in FLT3-ITD AML with concurrent epigenetic mutations”, *Oncotarget*, Vol. 8 No. 65, pp. 108738–108759.
- Giebel, B. (2017), “On the function and heterogeneity of extracellular vesicles”, *Annals of translational medicine*, Vol. 5 No. 6, p. 150.
- Gilliland, D.G. and Griffin, J.D. (2002), “The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia”, *Blood*, Vol. 100 No. 5, pp. 1532–1542.
- Goldman, J.M., Th'ng, K.H., Catovsky, D. and Galton, D.A. (1976), “Production of colony-stimulating factor by leukemic leukocytes”, *Blood*, Vol. 47 No. 3, pp. 381–388.
- Gomes, C., Keller, S., Altevogt, P. and Costa, J. (2007), “Evidence for secretion of Cu,Zn superoxide dismutase via exosomes from a cell model of amyotrophic lateral sclerosis”, *Neuroscience letters*, Vol. 428 No. 1, pp. 43–46.
- Grafone, T., Palmisano, M., Nicci, C. and Storti, S. (2012), “An overview on the role of FLT3-tyrosine kinase receptor in acute myeloid leukemia. Biology and treatment”, *Oncology reviews*, Vol. 6 No. 1, e8.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C. and Nairn, R. (1977), “Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5”, *The Journal of general virology*, Vol. 36 No. 1, pp. 59–74.
- Griffith, J., Black, J., Faerman, C., Swenson, L., Wynn, M., Lu, F., Lippke, J. and Saxena, K. (2004), “The structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain”, *Molecular cell*, Vol. 13 No. 2, pp. 169–178.
- Grimwade, D. and Hills, R.K. (2009), “Independent prognostic factors for AML outcome”, *Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, pp. 385–395.
- Guescini, M., Genedani, S., Stocchi, V. and Agnati, L.F. (2010), “Astrocytes and Glioblastoma cells release exosomes carrying mtDNA”, *Journal of neural transmission (Vienna, Austria 1996)*, Vol. 117 No. 1, pp. 1–4.

- Heijnen, H.F., Debili, N., Vainchencker, W., Breton-Gorius, J., Geuze, H.J. and Sixma, J.J. (1998), "Multivesicular bodies are an intermediate stage in the formation of platelet alpha-granules", *Blood*, Vol. 91 No. 7, pp. 2313–2325.
- Hemler, M.E. (2003), "Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain", *Annual review of cell and developmental biology*, Vol. 19, pp. 397–422.
- Hollenbach, P.W., Nguyen, A.N., Brady, H., Williams, M., Ning, Y., Richard, N., Krushel, L., Aukerman, S.L., Heise, C. and MacBeth, K.J. (2010), "A comparison of azacitidine and decitabine activities in acute myeloid leukemia cell lines", *PloS one*, Vol. 5 No. 2, e9001.
- Hong, C.-S., Muller, L., Whiteside, T.L. and Boyiadzis, M. (2014), "Plasma exosomes as markers of therapeutic response in patients with acute myeloid leukemia", *Frontiers in immunology*, Vol. 5, p. 160.
- Hoshino, D., Kirkbride, K.C., Costello, K., Clark, E.S., Sinha, S., Grega-Larson, N., Tyska, M.J. and Weaver, A.M. (2013), "Exosome secretion is enhanced by invadopodia and drives invasive behavior", *Cell reports*, Vol. 5 No. 5, pp. 1159–1168.
- Howlander, N., Noone, A.M., Krapcho, M., Miller, D., Brest, A., Yu, M., Ruhl, J., Tatalovich, Z., Mariotto, A., Lewis, D.R., Chen, H.S., Feuer, E.J. and Cronin, K.A. (2020), "SEER Cancer Statistics Review, 1975-2017. Basierend auf den im November 2019 eingereichten SEER-Daten, veröffentlicht auf der SEER-Website, April 2020", available at: https://seer.cancer.gov/csr/1975_2017/.
- Hsu, C., Morohashi, Y., Yoshimura, S.-I., Manrique-Hoyos, N., Jung, S., Lauterbach, M.A., Bakhti, M., Grønborg, M., Möbius, W., Rhee, J., Barr, F.A. and Simons, M. (2010), "Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C", *The Journal of cell biology*, Vol. 189 No. 2, pp. 223–232.
- Huan, J., Hornick, N.I., Goloviznina, N.A., Kamimae-Lanning, A.N., David, L.L., Wilmarth, P.A., Mori, T., Chevillet, J.R., Narla, A., Roberts, C.T., Loriaux, M.M., Chang, B.H. and Kurre, P. (2015), "Coordinate regulation of residual bone marrow function by paracrine trafficking of AML exosomes", *Leukemia*, Vol. 29 No. 12, pp. 2285–2295.
- Huan, J., Hornick, N.I., Shurtleff, M.J., Skinner, A.M., Goloviznina, N.A., Roberts, C.T. and Kurre, P. (2013), "RNA trafficking by acute myelogenous leukemia exosomes", *Cancer research*, Vol. 73 No. 2, pp. 918–929.
- Huang, X., Yuan, T., Tschannen, M., Sun, Z., Jacob, H., Du, M., Liang, M., Dittmar, R.L., Liu, Y., Liang, M., Kohli, M., Thibodeau, S.N., Boardman, L. and Wang, L. (2013), "Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing", *BMC genomics*, Vol. 14, p. 319.
- Hurley, J.H. (2010), "The ESCRT complexes", *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, Vol. 45 No. 6, pp. 463–487.
- Juliusson, G., Lazarevic, V., Hörstedt, A.-S., Hagberg, O. and Höglund, M. (2012), "Acute myeloid leukemia in the real world. Why population-based registries are needed", *Blood*, Vol. 119 No. 17, pp. 3890–3899.
- Kantarjian, H., O'Brien, S., Cortes, J., Giles, F., Faderl, S., Jabbour, E., Garcia-Manero, G., Wierda, W., Pierce, S., Shan, J. and Estey, E. (2006), "Results of intensive chemotherapy in 998 patients age 65 years or older with acute myeloid leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome. Predictive prognostic models for outcome", *Cancer*, Vol. 106 No. 5, pp. 1090–1098.
- Katayama, Y., Battista, M., Kao, W.-M., Hidalgo, A., Peired, A.J., Thomas, S.A. and Frenette, P.S. (2006), "Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow", *Cell*, Vol. 124 No. 2, pp. 407–421.
- Kelly, L.M. and Gilliland, D.G. (2002), "Genetics of myeloid leukemias", *Annual review of genomics and human genetics*, Vol. 3, pp. 179–198.
- Khalyfa, A. and Gozal, D. (2014), "Exosomal miRNAs as potential biomarkers of cardiovascular risk in children", *Journal of translational medicine*, Vol. 12, p. 162.
- Kim, D.-K., Kang, B., Kim, O.Y., Choi, D.-S., Lee, J., Kim, S.R., Go, G., Yoon, Y.J., Kim, J.H., Jang, S.C., Park, K.-S., Choi, E.-J., Kim, K.P., Desiderio, D.M., Kim, Y.-K., Lötvall, J., Hwang, D. and Gho, Y.S.

- (2013), "EVpedia. An integrated database of high-throughput data for systemic analyses of extracellular vesicles", *Journal of extracellular vesicles*, Vol. 2.
- Kiyoi, H., Naoe, T., Yokota, S., Nakao, M., Minami, S., Kuriyama, K., Takeshita, A., Saito, K., Hasegawa, S., Shimodaira, S., Tamura, J., Shimazaki, C., Matsue, K., Kobayashi, H., Arima, N., Suzuki, R., Morishita, H., Saito, H., Ueda, R. and Ohno, R. (1997), "Internal tandem duplication of FLT3 associated with leukocytosis in acute promyelocytic leukemia. Leukemia Study Group of the Ministry of Health and Welfare (Kohseisho)", *Leukemia*, Vol. 11 No. 9, pp. 1447–1452.
- Koopman, G., Reutelingsperger, C.P., Kuijten, G.A., Keehnen, R.M., Pals, S.T. and van Oers, M.H. (1994), "Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis", *Blood*, Vol. 84 No. 5, pp. 1415–1420.
- Kordelas, L., Rebmann, V., Ludwig, A.-K., Radtke, S., Ruesing, J., Doeppner, T.R., Epple, M., Horn, P.A., Beelen, D.W. and Giebel, B. (2014), "MSC-derived exosomes: a novel tool to treat therapy-refractory graft-versus-host disease", *Leukemia*, Vol. 28 No. 4, pp. 970–973.
- Kottaridis, P.D., Gale, R.E. and Linch, D.C. (2003), "FIt3 mutations and leukaemia", *British journal of haematology*, Vol. 122 No. 4, pp. 523–538.
- Kumar, B., Garcia, M., Murakami, J.L. and Chen, C.-C. (2016), "Exosome-mediated microenvironment dysregulation in leukemia", *Biochimica et biophysica acta*, Vol. 1863 No. 3, pp. 464–470.
- Kunadt, M., Eckermann, K., Stuendl, A., Gong, J., Russo, B., Strauss, K., Rai, S., Kügler, S., Falomir Lockhart, L., Schwalbe, M., Krumova, P., Oliveira, L.M.A., Bähr, M., Möbius, W., Levin, J., Giese, A., Kruse, N., Mollenhauer, B., Geiss-Friedlander, R., Ludolph, A.C., Freischmidt, A., Feiler, M.S., Danzer, K.M., Zweckstetter, M., Jovin, T.M., Simons, M., Weishaupt, J.H. and Schneider, A. (2015), "Extracellular vesicle sorting of α -Synuclein is regulated by sumoylation", *Acta neuropathologica*, Vol. 129 No. 5, pp. 695–713.
- Lai, R.C., Arslan, F., Lee, M.M., Sze, N.S.K., Choo, A., Chen, T.S., Salto-Tellez, M., Timmers, L., Lee, C.N., El Oakley, R.M., Pasterkamp, G., Kleijn, D.P.V. de and Lim, S.K. (2010), "Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury", *Stem cell research*, Vol. 4 No. 3, pp. 214–222.
- Le Dieu, R., Taussig, D.C., Ramsay, A.G., Mitter, R., Miraki-Moud, F., Fatah, R., Lee, A.M., Lister, T.A. and Gribben, J.G. (2009), "Peripheral blood T cells in acute myeloid leukemia (AML) patients at diagnosis have abnormal phenotype and genotype and form defective immune synapses with AML blasts", *Blood*, Vol. 114 No. 18, pp. 3909–3916.
- Lee, S., Kim, H.-S., Roh, K.-H., Lee, B.-C., Shin, T.-H., Yoo, J.-M., Kim, Y.-L., Yu, K.-R., Kang, K.-S. and Seo, K.-W. (2015), "DNA methyltransferase inhibition accelerates the immunomodulation and migration of human mesenchymal stem cells", *Scientific reports*, Vol. 5, p. 8020.
- Leonhardt, H., Page, A.W., Weier, H.U. and Bestor, T.H. (1992), "A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei", *Cell*, Vol. 71 No. 5, pp. 865–873.
- Levis, M. and Small, D. (2003), "FLT3. ITDoes matter in leukemia", *Leukemia*, Vol. 17 No. 9, pp. 1738–1752.
- Ley, T.J., Miller, C., Ding, L., Raphael, B.J., Mungall, A.J., Robertson, A.G., Hoadley, K., Triche, T.J., Laird, P.W., Baty, J.D., Fulton, L.L., Fulton, R., Heath, S.E., Kalicki-Veizer, J., Kandoth, C., Klco, J.M., Koboldt, D.C., Kanchi, K.-L., Kulkarni, S., Lamprecht, T.L., Larson, D.E., Lin, L., Lu, C., McLellan, M.D., McMichael, J.F., Payton, J., Schmidt, H., Spencer, D.H., Tomasson, M.H., Wallis, J.W., Wartman, L.D., Watson, M.A., Welch, J., Wendl, M.C., Ally, A., Balasundaram, M., Birol, I., Butterfield, Y., Chiu, R., Chu, A., Chuah, E., Chun, H.-J., Corbett, R., Dhalla, N., Guin, R., He, A., Hirst, C., Hirst, M., Holt, R.A., Jones, S., Karsan, A., Lee, D., Li, H.I., Marra, M.A., Mayo, M., Moore, R.A., Mungall, K., Parker, J., Pleasance, E., Plettner, P., Schein, J., Stoll, D., Swanson, L., Tam, A., Thiessen, N., Varhol, R., Wye, N., Zhao, Y., Gabriel, S., Getz, G., Sougnez, C., Zou, L., Leiserson, M.D.M., Vandin, F., Wu, H.-T., Applebaum, F., Baylin, S.B., Akbani, R., Broom, B.M., Chen, K., Motter, T.C., Nguyen, K., Weinstein, J.N., Zhang, N., Ferguson, M.L., Adams, C., Black, A., Bowen, J., Gastier-Foster, J., Grossman, T., Lichtenberg, T., Wise, L., Davidsen, T., Demchok, J.A., Shaw, K.R.M., Sheth, M., Sofia, H.J., Yang, L., Downing, J.R. and Eley, G. (2013), "Genomic and

- epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia”, *The New England journal of medicine*, Vol. 368 No. 22, pp. 2059–2074.
- Li, H., Niederkorn, J.Y., Sadegh, L., Mellon, J. and Chen, P.W. (2013), “Epigenetic regulation of CXCR4 expression by the ocular microenvironment”, *Investigative ophthalmology & visual science*, Vol. 54 No. 1, pp. 234–243.
- Lin, K.K., Rossi, L., Boles, N.C., Hall, B.E., George, T.C. and Goodell, M.A. (2011), “CD81 is essential for the re-entry of hematopoietic stem cells to quiescence following stress-induced proliferation via deactivation of the Akt pathway”, *PLoS biology*, Vol. 9 No. 9, e1001148.
- Liu, L., Jin, X., Hu, C.-F., Li, R., Zhou, Z. and Shen, C.-X. (2017), “Exosomes Derived from Mesenchymal Stem Cells Rescue Myocardial Ischaemia/Reperfusion Injury by Inducing Cardiomyocyte Autophagy Via AMPK and Akt Pathways”, *Cellular physiology and biochemistry international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, Vol. 43 No. 1, pp. 52–68.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. and RANDALL, R.J. (1951), “Protein measurement with the Folin phenol reagent”, *The Journal of biological chemistry*, Vol. 193 No. 1, pp. 265–275.
- Ludwig, A.-K. and Giebel, B. (2012), “Exosomes. Small vesicles participating in intercellular communication”, *The international journal of biochemistry & cell biology*, Vol. 44 No. 1, pp. 11–15.
- Ludwig, A.-K., Miroschedji, K. de, Doepfner, T.R., Börger, V., Ruesing, J., Rebmann, V., Durst, S., Jansen, S., Bremer, M., Behrmann, E., Singer, B.B., Jastrow, H., Kuhlmann, J.D., El Magraoui, F., Meyer, H.E., Hermann, D.M., Opalka, B., Raunser, S., Epple, M., Horn, P.A. and Giebel, B. (2018), “Precipitation with polyethylene glycol followed by washing and pelleting by ultracentrifugation enriches extracellular vesicles from tissue culture supernatants in small and large scales”, *Journal of extracellular vesicles*, Vol. 7 No. 1, p. 1528109.
- Mathivanan, S., Fahner, C.J., Reid, G.E. and Simpson, R.J. (2012), “ExoCarta 2012. Database of exosomal proteins, RNA and lipids”, *Nucleic acids research*, Vol. 40 No. Database issue, D1241-4.
- Mathivanan, S. and Simpson, R.J. (2009), “ExoCarta: A compendium of exosomal proteins and RNA”, *Proteomics*, Vol. 9 No. 21, pp. 4997–5000.
- Matsuo, Y., MacLeod, R.A., Uphoff, C.C., Drexler, H.G., Nishizaki, C., Katayama, Y., Kimura, G., Fujii, N., Omoto, E., Harada, M. and Orita, K. (1997), “Two acute monocytic leukemia (AML-M5a) cell lines (MOLM-13 and MOLM-14) with interclonal phenotypic heterogeneity showing MLL-AF9 fusion resulting from an occult chromosome insertion, ins(11;9)(q23;p22p23)”, *Leukemia*, Vol. 11 No. 9, pp. 1469–1477.
- Méndez-Ferrer, S., Lucas, D., Battista, M. and Frenette, P.S. (2008), “Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations”, *Nature*, Vol. 452 No. 7186, pp. 442–447.
- Mochizuki, H., Schwartz, J.P., Tanaka, K., Brady, R.O. and Reiser, J. (1998), “High-titer human immunodeficiency virus type 1-based vector systems for gene delivery into nondividing cells”, *Journal of virology*, Vol. 72 No. 11, pp. 8873–8883.
- Möhle, R., Bautz, F., Rafii, S., Moore, M.A., Brugger, W. and Kanz, L. (1998), “The chemokine receptor CXCR-4 is expressed on CD34+ hematopoietic progenitors and leukemic cells and mediates transendothelial migration induced by stromal cell-derived factor-1”, *Blood*, Vol. 91 No. 12, pp. 4523–4530.
- Moison, C., Guieysse-Peugeot, A.L. and Arimondo, P.B. (2014), “DNA methylation in cancer”, *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*, No. 4.
- Montecalvo, A., Larregina, A.T., Shufesky, W.J., Stolz, D.B., Sullivan, M.L.G., Karlsson, J.M., Baty, C.J., Gibson, G.A., Erdos, G., Wang, Z., Milosevic, J., Tkacheva, O.A., Divito, S.J., Jordan, R., Lyons-Weiler, J., Watkins, S.C. and Morelli, A.E. (2012), “Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes”, *Blood*, Vol. 119 No. 3, pp. 756–766.
- Mulcahy, L.A., Pink, R.C. and Carter, D.R.F. (2014), “Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake”, *Journal of extracellular vesicles*, Vol. 3.

- Müllers, E., Uhlig, T., Stirnagel, K., Fiebig, U., Zentgraf, H. and Lindemann, D. (2011), "Novel functions of prototype foamy virus Gag glycine- arginine-rich boxes in reverse transcription and particle morphogenesis", *Journal of virology*, Vol. 85 No. 4, pp. 1452–1463.
- Nabhan, J.F., Hu, R., Oh, R.S., Cohen, S.N. and Lu, Q. (2012), "Formation and release of arrestin domain-containing protein 1-mediated microvesicles (ARMs) at plasma membrane by recruitment of TSG101 protein", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 109 No. 11, pp. 4146–4151.
- Natasha, G., Gundogan, B., Tan, A., Farhatnia, Y., Wu, W., Rajadas, J. and Seifalian, A.M. (2014), "Exosomes as immunotherapeutic nanoparticles", *Clinical therapeutics*, Vol. 36 No. 6, pp. 820–829.
- Ng, A.P. and Alexander, W.S. (2017), "Haematopoietic stem cells. Past, present and future", *Cell death discovery*, Vol. 3, p. 17002.
- Nolte-'t Hoen, E.N.M., van der Vlist, E.J., Boer-Brouwer, M. de, Arkesteijn, G.J.A., Stoorvogel, W. and Wauben, M.H.M. (2013), "Dynamics of dendritic cell-derived vesicles. High-resolution flow cytometric analysis of extracellular vesicle quantity and quality", *Journal of leukocyte biology*, Vol. 93 No. 3, pp. 395–402.
- Nordin, J.Z., Lee, Y., Vader, P., Mäger, I., Johansson, H.J., Heusermann, W., Wiklander, O.P.B., Hällbrink, M., Seow, Y., Bultema, J.J., Gilthorpe, J., Davies, T., Fairchild, P.J., Gabrielsson, S., Meisner-Kober, N.C., Lehtiö, J., Smith, C.I.E., Wood, M.J.A. and El Andaloussi, S. (2015), "Ultrafiltration with size-exclusion liquid chromatography for high yield isolation of extracellular vesicles preserving intact biophysical and functional properties", *Nanomedicine nanotechnology, biology, and medicine*, Vol. 11 No. 4, pp. 879–883.
- Olweus, J., Lund-Johansen, F. and Terstappen, L.W. (1995), "CD64/Fc gamma RI is a granulomonocytic lineage marker on CD34+ hematopoietic progenitor cells", *Blood*, Vol. 85 No. 9, pp. 2402–2413.
- Oostendorp, R.A.J., Harvey, K.N., Kusadasi, N., Bruijn, M.F.T.R. de, Saris, C., Ploemacher, R.E., Medvinsky, A.L. and Dzierzak, E.A. (2002), "Stromal cell lines from mouse aorta-gonad-mesonephros subregions are potent supporters of hematopoietic stem cell activity", *Blood*, Vol. 99 No. 4, pp. 1183–1189.
- Ørskov, A.D., Treppendahl, M.B., Skovbo, A., Holm, M.S., Friis, L.S., Hokland, M. and Grønbaek, K. (2015), "Hypomethylation and up-regulation of PD-1 in T cells by azacytidine in MDS/AML patients. A rationale for combined targeting of PD-1 and DNA methylation", *Oncotarget*, Vol. 6 No. 11, pp. 9612–9626.
- Ostrowski, M., Carmo, N.B., Krumeich, S., Fanget, I., Raposo, G., Savina, A., Moita, C.F., Schauer, K., Hume, A.N., Freitas, R.P., Goud, B., Benaroch, P., Hacohen, N., Fukuda, M., Desnos, C., Seabra, M.C., Darchen, F., Amigorena, S., Moita, L.F. and Thery, C. (2010), "Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway", *Nature cell biology*, Vol. 12 No. 1, 19-30; sup pp 1-13.
- Oyan, A.M., Bø, T.H., Jonassen, I., Ulvestad, E., Gjertsen, B.T., Kalland, K.-H. and Bruserud, O. (2005), "CD34 expression in native human acute myelogenous leukemia blasts. Differences in CD34 membrane molecule expression are associated with different gene expression profiles", *Cytometry. Part B, Clinical cytometry*, Vol. 64 No. 1, pp. 18–27.
- Pear, W.S., Nolan, G.P., Scott, M.L. and Baltimore, D. (1993), "Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 90 No. 18, pp. 8392–8396.
- Pegtel, D.M., Cosmopoulos, K., Thorley-Lawson, D.A., van Eijndhoven, M.A.J., Hopmans, E.S., Lindenberg, J.L., Gruijl, T.D. de, Würdinger, T. and Middeldorp, J.M. (2010), "Functional delivery of viral miRNAs via exosomes", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 107 No. 14, pp. 6328–6333.
- Pols, M.S. and Klumperman, J. (2009), "Trafficking and function of the tetraspanin CD63", *Experimental cell research*, Vol. 315 No. 9, pp. 1584–1592.

- Raiborg, C. and Stenmark, H. (2009), "The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins", *Nature*, Vol. 458 No. 7237, pp. 445–452.
- Rajendran, L., Honsho, M., Zahn, T.R., Keller, P., Geiger, K.D., Verkade, P. and Simons, K. (2006), "Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 103 No. 30, pp. 11172–11177.
- Raposo, G., Nijman, H.W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C.V., Melief, C.J. and Geuze, H.J. (1996), "B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles", *The Journal of experimental medicine*, Vol. 183 No. 3, pp. 1161–1172.
- Raposo, G. and Stoorvogel, W. (2013), "Extracellular vesicles. Exosomes, microvesicles, and friends", *The Journal of cell biology*, Vol. 200 No. 4, pp. 373–383.
- Raposo, G., Tenza, D., Mecheri, S., Peronet, R., Bonnerot, C. and Desaymard, C. (1997), "Accumulation of major histocompatibility complex class II molecules in mast cell secretory granules and their release upon degranulation", *Molecular biology of the cell*, Vol. 8 No. 12, pp. 2631–2645.
- Rassow, J. (2012), *Biochemie: Mit 67 Tabellen ; [mit Stoffwechselweg-Animationen], Duale Reihe, 3., vollst. überarb. u. erw. Aufl.*, Thieme, Stuttgart.
- Ratajczak, J., Miekus, K., Kucia, M., Zhang, J., Reca, R., Dvorak, P. and Ratajczak, M.Z. (2006a), "Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors. Evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery", *Leukemia*, Vol. 20 No. 5, pp. 847–856.
- Ratajczak, J., Wysoczynski, M., Hayek, F., Janowska-Wieczorek, A. and Ratajczak, M.Z. (2006b), "Membrane-derived microvesicles. Important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication", *Leukemia*, Vol. 20 No. 9, pp. 1487–1495.
- Ridder, K., Keller, S., Dams, M., Rupp, A.-K., Schlaudraff, J., Del Turco, D., Starmann, J., Macas, J., Karpova, D., Devraj, K., Depboylu, C., Landfried, B., Arnold, B., Plate, K.H., Höglinger, G., Sültmann, H., Altevogt, P. and Momma, S. (2014), "Extracellular vesicle-mediated transfer of genetic information between the hematopoietic system and the brain in response to inflammation", *PLoS biology*, Vol. 12 No. 6, e1001874.
- Rosnet, O., Marchetto, S., deLapeyriere, O. and Birnbaum, D. (1991), "Murine Flt3, a gene encoding a novel tyrosine kinase receptor of the PDGFR/CSF1R family", *Oncogene*, Vol. 6 No. 9, pp. 1641–1650.
- Savina, A., Fader, C.M., Damiani, M.T. and Colombo, M.I. (2005), "Rab11 promotes docking and fusion of multivesicular bodies in a calcium-dependent manner", *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, Vol. 6 No. 2, pp. 131–143.
- Schnittger, S. (2011), "FLT3 (FMS-like tyrosine kinase 3)", *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*, No. 4.
- Schroeder, M.A. and DiPersio, J.F. (2012), "Mobilization of hematopoietic stem and leukemia cells", *Journal of leukocyte biology*, Vol. 91 No. 1, pp. 47–57.
- Schroeder, T., Geyh, S., Germing, U. and Haas, R. (2016), "Mesenchymal stromal cells in myeloid malignancies", *Blood research*, Vol. 51 No. 4, pp. 225–232.
- Senbanjo, L.T. and Chellaiah, M.A. (2017), "CD44. A Multifunctional Cell Surface Adhesion Receptor Is a Regulator of Progression and Metastasis of Cancer Cells", *Frontiers in cell and developmental biology*, Vol. 5, p. 18.
- Shen, B., Wu, N., Yang, J.-M. and Gould, S.J. (2011), "Protein targeting to exosomes/microvesicles by plasma membrane anchors", *The Journal of biological chemistry*, Vol. 286 No. 16, pp. 14383–14395.
- Simpson, R.J., Jensen, S.S. and Lim, J.W.E. (2008), "Proteomic profiling of exosomes. Current perspectives", *Proteomics*, Vol. 8 No. 19, pp. 4083–4099.
- Skotland, T., Sandvig, K. and Llorente, A. (2017), "Lipids in exosomes. Current knowledge and the way forward", *Progress in lipid research*, Vol. 66, pp. 30–41.
- Sproul, D. and Meehan, R.R. (2013), "Genomic insights into cancer-associated aberrant CpG island hypermethylation", *Briefings in functional genomics*, Vol. 12 No. 3, pp. 174–190.

- Stresemann, C., Brueckner, B., Musch, T., Stopper, H. and Lyko, F. (2006), "Functional diversity of DNA methyltransferase inhibitors in human cancer cell lines", *Cancer research*, Vol. 66 No. 5, pp. 2794–2800.
- Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M. and Nagasawa, T. (2006), "Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches", *Immunity*, Vol. 25 No. 6, pp. 977–988.
- Swerdlow, S.H., Campo, E., Harris, N.L., Jaffe, E.S., Pileri, S.A., Stein, H. and Thiele, J. (Eds.) (2017), *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues, World Health Organization classification of tumours*, Revised 4th edition, International Agency for Research on Cancer, Lyon.
- Szczepanski, M.J., Szajnik, M., Welsh, A., Whiteside, T.L. and Boyiadzis, M. (2011), "Blast-derived microvesicles in sera from patients with acute myeloid leukemia suppress natural killer cell function via membrane-associated transforming growth factor-beta1", *Haematologica*, Vol. 96 No. 9, pp. 1302–1309.
- Tait, J.F., Gibson, D. and Fujikawa, K. (1989), "Phospholipid binding properties of human placental anticoagulant protein-I, a member of the lipocortin family", *The Journal of biological chemistry*, Vol. 264 No. 14, pp. 7944–7949.
- Thakur, B.K., Zhang, H., Becker, A., Matei, I., Huang, Y., Costa-Silva, B., Zheng, Y., Hoshino, A., Brazier, H., Xiang, J., Williams, C., Rodriguez-Barrueco, R., Silva, J.M., Zhang, W., Hearn, S., Elemento, O., Paknejad, N., Manova-Todorova, K., Welte, K., Bromberg, J., Peinado, H. and Lyden, D. (2014), "Double-stranded DNA in exosomes. A novel biomarker in cancer detection", *Cell research*, Vol. 24 No. 6, pp. 766–769.
- Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G. and Clayton, A. (2006), "Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids", *Current protocols in cell biology*, Chapter 3, Unit 3.22.
- Théry, C., Boussac, M., Véron, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., Garin, J. and Amigorena, S. (2001), "Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes. A secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles", *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)*, Vol. 166 No. 12, pp. 7309–7318.
- Tian, T., Wang, Y., Wang, H., Zhu, Z. and Xiao, Z. (2010), "Visualizing of the cellular uptake and intracellular trafficking of exosomes by live-cell microscopy", *Journal of cellular biochemistry*, Vol. 111 No. 2, pp. 488–496.
- Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., Schwille, P., Brügger, B. and Simons, M. (2008), "Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes", *Science (New York, N.Y.)*, Vol. 319 No. 5867, pp. 1244–1247.
- Umezumi, T., Ohyashiki, K., Kuroda, M. and Ohyashiki, J.H. (2013), "Leukemia cell to endothelial cell communication via exosomal miRNAs", *Oncogene*, Vol. 32 No. 22, pp. 2747–2755.
- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J.J. and Lötvall, J.O. (2007), "Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells", *Nature cell biology*, Vol. 9 No. 6, pp. 654–659.
- van Engeland, M., Nieland, L.J., Ramaekers, F.C., Schutte, B. and Reutelingsperger, C.P. (1998), "Annexin V-Affinity assay. A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure", *Cytometry*, Vol. 31 No. 1, pp. 1–9.
- van Niel, G., Raposo, G., Candalh, C., Boussac, M., Hershberg, R., Cerf-Bensussan, N. and Heyman, M. (2001), "Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles", *Gastroenterology*, Vol. 121 No. 2, pp. 337–349.
- Verhoven, B., Schlegel, R.A. and Williamson, P. (1995), "Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes", *The Journal of experimental medicine*, Vol. 182 No. 5, pp. 1597–1601.
- Vlassov, A.V., Magdaleno, S., Setterquist, R. and Conrad, R. (2012), "Exosomes. Current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials", *Biochimica et biophysica acta*, Vol. 1820 No. 7, pp. 940–948.

- Walczak-Drzewiecka, A., Ratajewski, M., Wagner, W. and Dastyh, J. (2008), "HIF-1 α is up-regulated in activated mast cells by a process that involves calcineurin and NFAT", *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)*, Vol. 181 No. 3, pp. 1665–1672.
- Wang, Q. and Lu, Q. (2017), "Plasma membrane-derived extracellular microvesicles mediate non-canonical intercellular NOTCH signaling", *Nature communications*, Vol. 8 No. 1, p. 709.
- Welch, J.S., Ley, T.J., Link, D.C., Miller, C.A., Larson, D.E., Koboldt, D.C., Wartman, L.D., Lamprecht, T.L., Liu, F., Xia, J., Kandoth, C., Fulton, R.S., McLellan, M.D., Dooling, D.J., Wallis, J.W., Chen, K., Harris, C.C., Schmidt, H.K., Kalicki-Veizer, J.M., Lu, C., Zhang, Q., Lin, L., O'Laughlin, M.D., McMichael, J.F., Delehaunty, K.D., Fulton, L.A., Magrini, V.J., McGrath, S.D., Demeter, R.T., Vickery, T.L., Hundal, J., Cook, L.L., Swift, G.W., Reed, J.P., Alldredge, P.A., Wylie, T.N., Walker, J.R., Watson, M.A., Heath, S.E., Shannon, W.D., Varghese, N., Nagarajan, R., Payton, J.E., Baty, J.D., Kulkarni, S., Klco, J.M., Tomasson, M.H., Westervelt, P., Walter, M.J., Graubert, T.A., DiPersio, J.F., Ding, L., Mardis, E.R. and Wilson, R.K. (2012), "The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia", *Cell*, Vol. 150 No. 2, pp. 264–278.
- Wenk, C., Garz, A.-K., Grath, S., Huberle, C., Witham, D., Weickert, M., Malinverni, R., Niggemeyer, J., Kyncl, M., Hecker, J., Pagel, C., Mulholland, C.B., Müller-Thomas, C., Leonhardt, H., Bassermann, F., Oostendorp, R.A.J., Metzeler, K.H., Buschbeck, M. and Götze, K.S. (2018), "Direct modulation of the bone marrow mesenchymal stromal cell compartment by azacitidine enhances healthy hematopoiesis", *Blood advances*, Vol. 2 No. 23, pp. 3447–3461.
- Winkler, I.G., Sims, N.A., Pettit, A.R., Barbier, V., Nowlan, B., Helwani, F., Poulton, I.J., van Rooijen, N., Alexander, K.A., Raggatt, L.J. and Lévesque, J.-P. (2010), "Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs", *Blood*, Vol. 116 No. 23, pp. 4815–4828.
- Xiao, W.-H., Sanren, G.-W., Zhu, J.-H., Li, Q.-W., Kang, H.-R., Wang, R.-L., Song, L.-P. and Ye, M. (2010), "Effect of 5-aza-2'-deoxycytidine on immune-associated proteins in exosomes from hepatoma", *World journal of gastroenterology*, Vol. 16 No. 19, pp. 2371–2377.
- Yang, H., Bueso-Ramos, C., DiNardo, C., Estecio, M.R., Davanlou, M., Geng, Q.-R., Fang, Z., Nguyen, M., Pierce, S., Wei, Y., Parmar, S., Cortes, J., Kantarjian, H. and Garcia-Manero, G. (2014), "Expression of PD-L1, PD-L2, PD-1 and CTLA4 in myelodysplastic syndromes is enhanced by treatment with hypomethylating agents", *Leukemia*, Vol. 28 No. 6, pp. 1280–1288.
- Yellon, D.M. and Davidson, S.M. (2014), "Exosomes. Nanoparticles involved in cardioprotection?", *Circulation research*, Vol. 114 No. 2, pp. 325–332.
- Zhang, B., Wang, M., Gong, A., Zhang, X., Wu, X., Zhu, Y., Shi, H., Wu, L., Zhu, W., Qian, H. and Xu, W. (2015), "HucMSC-Exosome Mediated-Wnt4 Signaling Is Required for Cutaneous Wound Healing", *Stem cells (Dayton, Ohio)*, Vol. 33 No. 7, pp. 2158–2168.
- Zhang, Y., Liu, Y., Liu, H. and Tang, W.H. (2019), "Exosomes. Biogenesis, biologic function and clinical potential", *Cell & bioscience*, Vol. 9, p. 19.
- Zhao, M., Perry, J.M., Marshall, H., Venkatraman, A., Qian, P., He, X.C., Ahamed, J. and Li, L. (2014), "Megakaryocytes maintain homeostatic quiescence and promote post-injury regeneration of hematopoietic stem cells", *Nature medicine*, Vol. 20 No. 11, pp. 1321–1326.

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich bei der Durchführung und Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

- Mein Dank gilt Prof. Dr. med. Florian Bassermann, der mir die Möglichkeit gab diese Promotionsarbeit an der III. Medizinischen Klinik und Poliklinik am Klinikum rechts der Isar zu bearbeiten.
- Herzlichen Dank auch an Prof. Dr. med. Katharina Götze für die Vergabe des interessanten Themas, die großartige Betreuung und die stetige Unterstützung im Rahmen der Doktorarbeit.
- Vielen Dank an Prof. Dr. med. Maximilian Reichert für seine Zeit als mein offizieller Mentor.
- Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. med. Judith Hecker und Dr. rer. nat. Anne-Kathrin Garz. Durch die intensive Betreuung von Dr. rer. nat. Anne-Kathrin Garz habe ich viele neue Arbeitstechniken gelernt. Bei der Durchführung der Experimente stand sie mir mit Rat und Tat unermüdlich zur Seite. Dr. med. Judith Hecker hatte immer ein offenes Ohr für sämtliche Fragen und war für mich dank ihrer mehrfachen Durchsicht dieser Abhandlung, ihrer kritischen Betrachtungen und ihrer differenzierten Anmerkungen eine fantastische Unterstützung.
- Ebenso möchte ich mich bei allen Laborkollegen für die tolle Zeit, die freundliche Arbeitsatmosphäre und die Hilfsbereitschaft bedanken.

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Chemische Struktur von Cytidin, Azacitidin und Decitabin.	5
Abbildung 2: Methylierung von Cytosin und dessen Hemmung durch 5-Azacytidin.....	5
Abbildung 3: Verteilung von CpG-Dinukleotiden im menschlichen Genom und Unterschiede im Methylierungsmuster zwischen normalen und Tumorzellen.	6
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Aufbaus des FLT3-Rezeptors.....	7
Abbildung 5: Darstellung der Signalkaskaden, die durch den FLT3-Rezeptor aktiviert werden können.	8
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Stammzellnische.	10
Abbildung 7: Schematische Darstellung der bekanntesten Typen von extrazellulären Vesikeln: Exosomen, Mikrovesikel und apoptotische Körperchen.....	12
Abbildung 8: Struktur und Zusammensetzung von Exosomen.	13
Abbildung 9: Schematische Darstellung der Beeinflussung von Zielzellen durch EV.....	17
Abbildung 10: Wirkung von AML-EV auf ihre Mikroumgebung.	19
Abbildung 11: Schleusstrategie zur Detektion von viablen Zellen nach Annexin-V/Propidiumiodid-Färbung.....	32
Abbildung 12: Gewinnung von EV.	34
Abbildung 13: Anheften der EV an Latexkugeln und Bindung spezifischer Antikörper.	39
Abbildung 14: Schleusstrategie zur Bestimmung von CD-Markern auf an Latexkugeln gebundenen EV.	40
Abbildung 15: Darstellung des Transwell-Systems zur Untersuchung des Einflusses löslicher Faktoren auf CD34 ⁺ -Zellen.	41
Abbildung 16: Darstellung zum Versuchsaufbau der Migrationsuntersuchung.	43
Abbildung 17: Absolute durchflusszytometrische Messung der migrierten CD34 ⁺ -Zellen.	44
Abbildung 18: AZA-Titration der CD34 ⁺ - (A) und CD34 ⁻ -Zellen (B) aus AML-Patienten- und gesunden Proben.	47
Abbildung 19: Exemplarische Durchflusszytometrische Darstellung der AZA-Titration.	48
Abbildung 20: Viabilitätsbestimmung von mononukleären Zellen nach viertägiger Kultivierung in EV-freiem Medium.....	49
Abbildung 21: Durchflusszytometrische Bestimmung der CD63-GFP ⁺ -Expression.....	49
Abbildung 22: GFP-Vergleichsmessung von konzentrierten und unkonzentrierten EV, die von Molm13 mit CD63-GFP ⁺ -Konstrukt isoliert wurden.....	50
Abbildung 23: Proteinmenge pro EV-Isolation.....	51
Abbildung 24: Durchflusszytometrische Bestimmung der Positivität von CD-Markern auf EV ohne (oben) und mit 0,5 µM AZA (unten).....	52
Abbildung 25: Durchflusszytometrische Bestimmung der Positivität von CD-Markern auf EV.....	53
Abbildung 26: Durchflusszytometrische Bestimmung der Positivität von CD-Markern auf EV nach Bindung an Latexkugeln.	55
Abbildung 27: FLT3-PCR aus genomischer DNS von gesunden CD34 ⁺ -Zellen aus dem unteren Kompartiment des Transwellversuchs mit CD34 ⁻ -Zellen.....	56
Abbildung 28: Bestimmung der Viabilität der gesunden CD34 ⁺ -Zellen im unteren Kompartiment (links) und der variablen CD34 ⁻ -Zellen im oberen Kompartiment (rechts).....	57
Abbildung 29: Anzahl der in Methylzellulose gebildeten Kolonien pro 10 000 gesunde CD34 ⁺ -Zellen.	57
Abbildung 30: FLT3-PCR aus genomischer DNS von gesunden CD34 ⁺ - Zellen aus dem unteren Kompartiment des Transwellversuchs mit CD34 ⁺ -Zellen.	58
Abbildung 31: Bestimmung der Viabilität der gesunden CD34 ⁺ -Zellen im unteren Kompartiment (links) und der variablen CD34 ⁺ -Zellen im oberen Kompartiment (rechts).	59
Abbildung 32: Anzahl der in Methylzellulose gebildeten Kolonien pro 10 000 gesunde CD34 ⁺ -Zellen.	59
Abbildung 33: Migrationsuntersuchung mit durch EV konditioniertes Medium.....	60

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Abkürzungsverzeichnis	III
Tabelle 2: WHO Klassifikation 2016 von myeloischen Neoplasien und akuter Leukämie (Arber <i>et al.</i> , 2016).....	1
Tabelle 3: Zyto- und molekulargenetische Risikogruppen gemäß der ELN Klassifikation (Döhner <i>et al.</i> , 2017).....	3
Tabelle 4: „The Cancer Genome Atlas“ (Ley <i>et al.</i> , 2013)	4
Tabelle 5: Proteinkomponenten von Exosomen (Choi <i>et al.</i> , 2015; Simpson <i>et al.</i> , 2008; Natasha <i>et al.</i> , 2014; Yellon and Davidson, 2014; Zhang <i>et al.</i> , 2019)	14
Tabelle 6: Antikörper für die Durchflusszytometrie.....	25
Tabelle 7: CD63-Primer	35
Tabelle 8: FLT3-ITD-Primer	37
Tabelle 9: PCR-Ansatz	37
Tabelle 10: PCR-Programm.....	37
Tabelle 11: Charakterisierung der AML-Patientenproben	45
Tabelle 12: Charakterisierung der gesunden Proben.....	46