



Technische Universität München  
TUM School of Medicine and Health

**Bedeutung der regulierten Nekrose in der  
Knochenmarksnische für die Pathogenese der  
akuten myeloischen Leukämie**

**Marta Dechant**

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Medicine and Health der Technischen Universität München zur Erlangung einer Doktorin der Medizin genehmigten Dissertation.

**Vorsitz:**

apl. Prof. Dr. Bernhard Haslinger

**Prüfer der Dissertation:**

1. apl. Prof. Dr. Philipp J. Jost

2. apl. Prof. Dr. Robert Oostendorp

Die Dissertation wurde am 10.02.2023 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 30.09.2023 angenommen.



Diese Dissertation wurde durch das Mildred-Scheel-Doktorandenprogramm der Deutschen Krebshilfe gefördert.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Problemstellung</b> .....	<b>3</b>
<b>3. Material und Methodik</b> .....	<b>12</b>
3.1. Material .....	12
3.1.1. Eukaryotische Zellen.....	12
3.1.2. Bakterien, Plasmide und Primer.....	12
3.1.2.1. Bakterienstämme.....	12
3.1.2.2. Plasmide.....	12
3.1.3. Antikörper .....	13
3.1.3.1. Primäre Antikörper.....	13
3.1.3.2. Sekundäre Antikörper.....	13
3.1.4. Reagenzien.....	13
3.1.4.1. Chemikalien.....	13
3.1.4.2. Zellkulturmedien .....	15
3.1.4.3. Antibiotika .....	15
3.1.4.4. Allgemeine Enzyme und Restriktionsenzyme.....	15
3.1.4.5. Reagenzienansätze (Kits) .....	16
3.1.5. Geräte und Laborhilfsmittel.....	16
3.1.6. Verbrauchsmaterialien .....	17
3.1.7. Puffer und Lösungen.....	18
3.1.7.1. Lösungen und Medien für die Zellkultur.....	18
3.1.7.2. Puffer und Lösungen für die Bakterienkultur .....	19
3.1.7.3. Puffer und Lösungen für die DNA-Gelelektrophorese .....	19
3.1.7.4. Puffer und Lösungen für den Western Blot.....	20
3.1.8. Software.....	22
3.2. Methodik .....	22
3.2.1. Generierung Nekroptose-defizienter Stromazelllinien mithilfe des CRISPR/ Cas9 Systems .....	22
3.2.2. Agarose-Gelelektrophorese und Sanger Sequenzierung als Kontrolle der erfolgreichen Insertion der Polynukleotide in den Vektor.....	24
3.2.3. Calcium-Phosphat Transfektion zur Einbringung der DNA in EL08-1D2 Stromazellen....	25
3.2.4. Generierung klonaler Zelllinien mit spezifischen Deletionen durch Single Cell Sort und anschließender Expansionsperiode .....	26
3.2.5. Sicherung der Deletionen von klonalen Stromazelllinien durch Western und Konfokal-Mikroskopie.....	27
3.2.6. Synthese von hämatopoetischen Stammzellen mit AML typischen genetischen Aberrationen mittels retroviraler Infektion .....	30
3.2.7. Ko-Kulturen zur Detektion des Einflusses von Nekroptose in der Tumormikroumgebung auf die gesunde und leukämische Hämatopoese .....	31

3.2.7.1. FACS Analyse der gesunden und leukämischen hämatopoetischen Zellen nach Ko-Kultivierung mit Stromazellen.....	33
3.2.7.2. Ko-Kulturen mit direktem und fehlendem Zell-Zell-Kontakt .....	35
3.2.7.3. Auswertung der HSC Koloniebildungsfähigkeit durch CFC-Assays .....	36
3.2.7.4. Ko-Kulturen mit diversen Zelltodinhhibitoren .....	37
<b>4. Ergebnisse.....</b>	<b>39</b>
4.1. Transfektion des Vektors px458 in EL08-1D2 Zellen.....	39
4.2. Nachweis der Nekroptose defizienten EL08-1D2 Zellklone .....	39
4.3. <i>Mlkl</i> <sup>-/-</sup> Stromazellen unterstützen AML-ETO transduziertes Knochenmark nicht .....	42
4.4. Hämatopoetische Stammzellen werden vor allem durch direkten Zellkontakt zu EL08-1D2 Stromazellen erhalten.....	43
4.5. MLKL in Stromazellen führt durch direkten Kontakt zu hämatopoetischen Stammzellen zu deren Differenzierung - Ein Zelltodunabhängiger Mechanismus von MLKL.....	47
4.6. Differenzierung hämatopoetischer Zellen in Abhängigkeit von Apoptose und Nekroptose in Stromazellen .....	50
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>60</b>
5.1. Vielseitige Funktionen von MLKL und ihr Einfluss auf die Plasmamembran	60
5.2. Zellkontakt-abhängige Unterstützung hämatopoetischer Zellen als scheinbarer Widerspruch zur bisherigen Literatur.....	63
5.3. Wechselwirkung zwischen Stroma und LSCs in der Nische .....	63
5.4. Klinische Bedeutung von MLKL und Ausblick.....	65
<b>6. Zusammenfassung und Ausblick.....</b>	<b>66</b>
<b>7. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>68</b>
<b>8. Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>84</b>
<b>9. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>85</b>
<b>10. Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>88</b>
<b>11. Danksagung.....</b>	<b>90</b>

# 1. Einleitung

Im März 1845 wurde eine 50-jährige Patientin namens Marie Straide in die Berliner Charité aufgenommen. Sie präsentierte sich mit Diarrhoe, Epistaxis, Beinödemen und einer Splenomegalie. Ihr Zustand verschlechterte sich rapide und sie verstarb innerhalb von drei Monaten. Als Rudolf Virchow eine Obduktion durchführte, fand er eine gelb-grüne Substanz im Herzen, der Aorta und den unteren Extremitäten. Diese Substanz ähnelte Pus. Bei der mikroskopischen Untersuchung stellte Virchow ein umgekehrtes Verhältnis der roten und weißen Blutkörperchen fest (Kampen, 2012). Fast zeitgleich beschrieb John Bennett seine Entdeckung der „Leukozythämie“ (Bennett, 1845). 1847 postulierte Virchow die Erkrankung „Leukämie“, welche sich als Begriff durchsetzte (Seufert, 1982). Bis heute besteht kein Konsens über den „wahren“ Entdecker der Leukämie (Beutler, 2001; Kampen, 2012). In der Literatur sind Alfred Vulpéau, Alfred Donné, John Bennett und Rudolf Virchow häufig genannte Akteure (Kampen, 2012).

Aktuell gewinnt das Krankheitsbild der Leukämien stetig an Bedeutung. Die Relevanz und das wissenschaftliche Interesse sind an der steigenden Anzahl der Publikationen sichtbar. Bis 1950 erschienen 955 Artikel über Leukämien, von 1950 bis 2000 bereits 157.204 und in den vergangenen zehn Jahren nochmal über 69.063 Artikel (Kampen, 2012). Leukämien lassen sich im Allgemeinen in wie folgt unterteilen: in je zwei chronische (chronische myeloische und chronische lymphatische Leukämie) und je zwei akute Formen (akute myeloische und akute lymphatische Leukämie). Die Arbeit fokussiert sich insbesondere auf die AML.

Beobachtungen zeigen einen Anstieg der AML Inzidenz weltweit im Zeitraum von 1990 bis 2017 (Yi et al., 2020). 2016 betrug die altersstandardisierte Inzidenz 4,3 pro 100.000 Personenjahre in den USA (Shallis et al., 2019). 62% aller Leukämie assoziierten Todesfälle in den USA sind auf die AML zurückzuführen, was in absoluten Zahlen über 10.000 Menschenleben bedeutet (Shallis et al., 2019).

Die mediane Überlebenszeit der betroffenen Patienten beträgt in etwa 8,5 Monate (Shallis et al., 2019). Das Langzeitüberleben ist stark abhängig vom Alter der Diagnosestellung. Patienten, die vor ihrem 40. Lebensjahr diagnostiziert

wurden, zeigen ein fünffach höheres 2- und 5-Jahres-Überleben im Vergleich zu Diagnosestellungen nach dem 65. Lebensjahr (Song et al., 2018). Das Outcome der Erkrankten konnte in den letzten Jahren durch präzisere Therapien wie gezielte Angriffspunkte (De Kouchkovsky & Abdul-Hay, 2016; Stone et al., 2017) und den Fortschritt der Begleitmedikation wie Antibiotika verbessert werden (Kadia et al., 2016).

Die einzige kurative Therapie der AML bleibt jedoch die allogene Stammzelltransplantation. Derzeitiger Forschungsgegenstand ist die Optimierung der Transplantationsbedingungen (Boyd et al., 2014). Insgesamt konnte die Mortalität dieser riskanten Therapie über die Jahre reduziert werden, wenn die Ergebnisse der Transplantationen von 1993 bis 1997 und von 2003 bis 2007 miteinander verglichen werden (Gooley et al., 2010).

Im Zusammenhang mit Knochenmarkstransplantationen wurde deutlich, dass die Knochenmarksnische als Ort der Blutbildung und gleichzeitig Umgebung der leukämischen Zellen (leukemia initiating cells, LICs) die Tumorgenese beeinflusst (Boyd et al., 2014; Kovtonyuk et al., 2016; Mirantes et al., 2014).

Während die Regulierung in der gesunden Nische weitgehend verstanden ist (Mendelson & Frenette, 2014; Wei & Frenette, 2018), bleiben die Mechanismen der leukämischen Nische unklar (Mirantes et al., 2014).

Eine besondere Zellgruppe der Nische bilden mesenchymale Stammzellen (MSCs). Durch komplexe Regulationsmechanismen können sie mithilfe von Zytokinen und Wachstumsfaktoren die gesunde Hämatopoese sowie die Tumorentwicklung steuern (Bergfeld & DeClerck, 2010; Hanahan & Weinberg, 2011). Ob MSCs tumorfördernd oder antitumoral wirken wird kontrovers diskutiert (Bergfeld & DeClerck, 2010; Fang & Salven, 2011). Um den Sachverhalt fokussiert zu durchleuchten, habe ich ein typisches Kennzeichen von Krebszellen, die Resistenz gegen den Zelltod, näher untersucht (Hanahan & Weinberg, 2011). Im Detail handelt es sich um eine bestimmte Art von Zelltod, der sogenannten regulierten Nekrose bzw. Nekroptose.

In dieser Dissertation stelle ich die Relevanz der regulierten Nekrose in der Knochenmarksnische für die Pathogenese der akuten myeloischen Leukämie dar.

## 2. Problemstellung

Um diesen Themenkomplex besser zu verstehen, ist es sinnvoll sich zunächst die drei Teilaspekte Hämatologie und die Pathogenese der AML, die Knochenmarksnische und deren Zusammensetzung und die regulierte Nekrose als Signalweg gesondert zu betrachten. Anschließend können diese Themen zusammengeführt und die sich daraus ergebende Fragestellung diskutiert werden.

Eingangs soll die Pathogenese der AML knapp umrissen werden. Akute Leukämien im Allgemeinen sind definiert als maligne klonale Neoplasien der hämatopoetischen Vorläuferzellen mit  $\geq 20\%$  unreifzelliger Blasten im peripheren Blut oder im Knochenmark. Bei der AML sind myeloische Vorläuferzellen betroffen. Folge ist häufig eine Panzytopenie im peripheren Blut mit entsprechenden Symptomen wie Abgeschlagenheit und Infektanfälligkeit und Blutungsneigung (Herold, 2019). Ätiologisch spielen Faktoren wie genetische Veränderungen der Stammzellen (Levine, 2013; Thomas & Majeti, 2017), Knochenmarksschädigung durch Noxen wie Benzol und Chemotherapeutika wie Alkylanzien (Leone et al., 1999), Entwicklungen aus anderen hämatologischen Erkrankungen wie dem myelodysplastischen Syndrom und das Zigarettenrauchen eine Rolle (Shallis et al., 2019). Daraus ergeben sich myeloische Vorläuferzellen mit einem Differenzierungsblock, die die Produktion von reiferen hämatopoetischen Progenitorzellen und schließlich die physiologische Blutbildung verhindern (Miraki-Moud et al., 2013). Gegenstand aktueller Forschung ist die medikamentöse Aufhebung des Differenzierungsblockes der leukämischen Zellen beispielsweise durch epigenetische Modifizierung durch IDH-Inhibitoren (Bose & Konopleva, 2018) und KDM1A-Inhibitoren wie ORY-1001 (Maes et al., 2018). Denn bisher wird das Krankheitsbild mittels konventioneller Chemotherapeutika wie Cytarabin und Daunorubicin, Idarubicin oder Mitoxantron oder der allogenen Stammzelltransplantation therapiert (Herold, 2019). Bei AMLs mit bestimmten genetischen Anomalien wie der FLT3-ITD Mutation, kann die Therapie zusätzlich zum Chemotherapie-Schema mit Tyrosinkinase-Inhibitoren wie Midostaurin oder Sorafenib ergänzt werden (De Kouchkovsky & Abdul-Hay, 2016). Ansätze die AML gezielter mittels Tyrosinkinase-Inhibitoren, STAT-

## | Problemstellung

Inhibitoren, monoklonaler Antikörper sowie CART Therapie zu behandeln, führt aufgrund der molekularen Diversität der malignen Zellen nur bedingt zum Erfolg (De Kouchkovsky & Abdul-Hay, 2016). Neben den bereits genannten Ansätzen, die direkt auf die leukämischen Zellen wirken, gibt es Hypothesen, die das Mikromilieu der Tumorzellen und somit die Knochenmarksnische betreffen. Die Tumorumgebung fördert die Proliferation, das Überleben und die Migration vom Tumor selbst (Coussens, 2002) und unterdrückt die physiologische Hämatopoese (Boyd et al., 2014). Ein pro-inflammatorisches Zytokin, das in der Tumorumgebung zur Expansion von LICs und zeitgleichen Unterdrückung normaler HSPCs führt, ist beispielsweise Interleukin-1 (Carey et al., 2017). Insgesamt ist die Knochenmarksnische maßgeblich für die Regulation der Hämatopoese. Mesenchymale Stammzellen, Osteoblasten und Endothelzellen unterstützen durch Chemokine die physiologische Blutbildung (Morrison & Scadden, 2014), indem sie die Aktivität der HSCs steuern (Mendelson & Frenette, 2014; Wei & Frenette, 2018). Leukämien verändern dieses Mikromilieu zu ihren Gunsten (Raaijmakers et al., 2010; Reynaud et al., 2011; Schepers et al., 2013).

Generell sind Nischen durch ihre Anatomie und ihre Funktion definiert (Scadden, 2006). Stammzellpopulationen sind in Nischen organisiert. Das heißt HSCs befinden sich in spezifischen anatomischen Bereichen und werden dort durch Zellen der Nische geschützt sowie in ihrer Proliferation, dem Erhalt, der Reparatur unterstützt. Gleichzeitig wird überschwänglicher Zellteilung vorgebeugt (Morrison & Spradling, 2008; Scadden, 2006). Um die Knochenmarksnische zu verstehen, müssen ihre Bestandteile gesondert betrachtet werden. Dazu gehören mesenchymale Stammzellen, die in Adipozyten, Chondroblasten und Osteoblasten differenzieren können (Mendes et al., 2005). Weiterhin zählen Osteozyten, Endothelzellen, adrenerge Nervenzellen, HSC Nachkommen wie Makrophagen, Megakaryozyten, T-Zellen sowie neutrophile Granulozyten dazu (Wei & Frenette, 2018).

Adipozyten scheinen HSCs negativ zu regulieren, sodass fettreiches Knochenmark weniger HSPCs und weniger hämatopoetische Aktivität zeigt im Vergleich zu fettarmen Mark (Naveiras et al., 2009). Allerdings bleibt unklar, ob dieser Mechanismus direkt oder indirekt von Adipozyten gelenkt wird. Der Einfluss von Osteoblasten und -zyten kann nicht präzise von dem der MSCs getrennt wer-

## Problemstellung

den. Trotzdem ist anzunehmen, dass sie auf HSCs regulatorisch wirken, da sie zum einen Nachfolger von MSCs sind und zum anderen ohne Osteozyten die G-CSF Mobilisierung von HSCs reduziert ist (Asada et al., 2013). Außerdem führt die Abwesenheit von Osteozyten zu schweren Lymphopenien (Sato et al., 2013). Endothelzellen tragen zur Sekretion von CXCL12 (Ding & Morrison, 2013; Greenbaum et al., 2013), Stem Cell Factor (Ding et al., 2012) sowie JAGGED-1 (Poulos et al., 2013) bei. Diese Zytokine regulieren die Proliferation, Aktivität und den Erhalt der HSCs (Omatsu et al., 2010; Sugiyama et al., 2006). Außerdem wirken Endothelzellen über Notch Liganden und E-Selectin auf die HSC Expansion und die Hämatopoese nach myelosuppressivem Stress (Hooper et al., 2009; Kobayashi et al., 2010; Winkler et al., 2012).

Das Knochenmark wird durch das autonome Nervensystem innerviert. Adrenerge Nervenzellen des Sympathikus tragen durch Sekretion von Noradrenalin zur HSC Mobilisierung und hämatopoetischen Erholung bei (Wei & Frenette, 2018). Darüber hinaus wird über  $\beta$ 3-Adrenorezeptoren die zirkadiane CXCL12 Freisetzung durch Stromazellen und HSC Freisetzung aus dem Knochenmark beeinflusst (Lucas et al., 2008; Mendez-Ferrer et al., 2008). Sowohl die direkte Mobilisierung von HSPCs als auch die Zusammensetzung der Nische aus Osteoblasten wird vom sympathischen Nervensystem gesteuert (Katayama et al., 2006). Ferner kommt es in der Knochenmarksnische zur Autoregulation von HSCs durch ihre Nachfolger wie den Makrophagen, Megakaryozyten, T-Zellen und neutrophilen Granulozyten. Makrophagen tragen direkt zur HSC Erhaltung und indirekt über andere Nischenzellen vor allem über Osteoblasten und -zyten zur HSC Retention bei (Chow et al., 2011; Christopher et al., 2011). Bei einer Reduktion von Makrophagen konnte eine erhöhte Freisetzung von HSCs ins periphere Blut beobachtet werden (Winkler et al., 2010).

Megakaryozyten gelten als direkte Regulatoren des steady-state HSC Ruhezustands (Bruns et al., 2014; Zhao et al., 2014). Durch die Signalmoleküle CXCL4 und TGF- $\beta$ 1 kann dieser Ruhezustand erhalten werden. Bei in vitro Ko-Kulturen mit HSCs und Megakaryozyten beobachtete man hingegen eine verstärkte HSC Proliferation (Heazlewood et al., 2013; Nakamura-Ishizu et al., 2015). Diese gegensätzlichen Mechanismen lassen auf eine kontextabhängige Regulation der Megakaryozyten schließen und erfordern weitere Forschung.

## | Problemstellung

T-Lymphozyten der Nische unterscheiden sich von peripheren T-Zellen (Di Rosa & Santoni, 2002; Price & Cerny, 1999; Zeng et al., 2002). Das Verhältnis von CD4/CD8 positiven T-Zellen ist in der Peripherie nicht so ausgeglichen im Vergleich zur Ratio der in der Nische. CD4<sup>+</sup>-T-Zellen scheinen die Hämatopoese positiv zu beeinflussen (Monteiro et al., 2005; Sharara et al., 1997). CD8<sup>+</sup>-zytotoxische-T-Zellen sind in der Lage eine Emergency-Hämatopoese auszulösen, indem sie die Proliferation von Progenitorzellen hochregulieren (Schürch et al., 2014). CD150<sup>+</sup>-Treg-Zellen dagegen erhalten HSCs durch Adenosin Produktion im Ruhezustand (Hirata et al., 2018). Neutrophile Granulozyten agieren als Bindeglied zwischen autonomem Nervensystem und der Nische in einem zirkadianen Rhythmus (Zhang et al., 2015). Dadurch kommt es zur Modulation von CXCL12 produzierenden Nischenzellen und HSPC Retention im Knochenmark (Casanova-Acebes et al., 2013). Andererseits setzen Neutrophile PGE2 frei, das wiederum über Osteoblasten und -zyten zur G-CSF-induzierten HSC Mobilisierung führt (Kawano et al., 2017).

Mesenchymale Stammzellen sind wohl eines der wichtigsten Bestandteile der Nische, da sie in Osteoblasten, Chondroblasten, Fibroblasten und Adipozyten differenzieren können und somit komplexen Einfluss auf die hämatopoetische Unterstützung ausüben, auch wenn undifferenzierte mesenchymale Stammzellen nur 0,01% bis 0,001% der mononukleären Zellen der Nischenpopulation ausmachen. Zum Vergleich: HSCs repräsentieren 1% der genannten Population (Civin et al., 1996; Pittenger et al., 1999). Zellzyklusregulation, Migration sowie Freisetzung oder Verbleib der HSCs in der Nische werden streng von MSCs kontrolliert (Mendez-Ferrer et al., 2010; Omatsu et al., 2010; Schepers et al., 2015). Dies geschieht vor allem durch die Sekretion von SCF, CXCL12 und spezieller von Adiponectin aus Adipozyten sowie G-CSF aus Osteoblasten (Sugiyama et al., 2006; Taichman RS, 1994; Yokota et al., 2000).

Neben diesen direkten Mechanismen sind MSCs in der Lage die Hämatopoese indirekt, durch Einfluss auf andere Zellen, zu prägen. Hiervon ist das Immunsystem besonders betroffen. Die Inhibition der T-Zellproliferation mittels Indolamin-2,3-Dioxygenase und Kynurenin lässt auf eine anti-inflammatorische Wirkung der Stromazellen schließen (Bartholomew A, 2002; Di Nicola M, 2002; Frenette et al., 2013). Dies könnte auch den antiproliferativen Effekt auf B-

## | Problemstellung

Zellen erklären (Asari et al., 2009; Corcione et al., 2006). Die immunologische Antwort wird überdies von mesenchymalen Stamm- und Vorläuferzellen, durch Wirkung auf Makrophagen, dendritische Zellen und natürliche Killerzellen über Cyclooxygenase 2 und Prostaglandin E2, moduliert (Frenette et al., 2013; Nemeth et al., 2009).

Im Hinblick auf die duale Funktion der MSCs, die einerseits die Knochenmarksnische verwalten und andererseits das Immunsystem mitregulieren, bilden MSCs ein Bindeglied zwischen Stammzellbiologie und Immunologie in der Onkogenese.

Im Rahmen von malignen Tumorerkrankungen und Entzündungen werden MSCs über Chemokinfreisetzung rekrutiert, um angiogenetisch, immunmodulatorisch und osteolytisch zu wirken (Dwyer et al., 2007; Lin et al., 2008). Die entarteten Zellen werden dadurch in ihrem Wachstum, im Überleben und ihrer Therapieresistenz bestärkt (Bergfeld & DeClerck, 2010; Prockop, 2009). Eine Studie stellt den Zusammenhang zwischen MSC Sekretion und erleichterter Metastasierung von Brustkrebs her. Hierbei beobachtete man, dass die Freisetzung einer Disintegrin und Metalloproteinase ADAM10 seitens der Stromazellen, zu einer verstärkten Krebszellmigration bei Brustkrebs führt, indem das für die Zelladhäsion wichtige Protein E-Cadherin der entarteten Zellen gespalten wird (Dittmer et al., 2009). Diese Beobachtungen passen zu allgemeineren molekularbiologischen Studien. In der Studie wurde für Zellen allgemein gezeigt, dass ein Protein eines Zelltodsignalwegs, der Nekroptose, Komplexe mit ADAMs bildet und es dadurch zu Zelltod, Entzündung, Zellmigration und -invasion kommt (Gong, Guy, Crawford, et al., 2017). Das besagte Protein ist bekannt als Mixed lineage kinase domain like pseudokinase, kurz MLKL, und steht am Ende des Nekroptosesignalwegs. Die Komplexbildung zwischen MLKL und ADAMs führt zur Spaltung einiger Proteine der Zelloberfläche wie E-Cadherin. Experimente zeigten, dass vor allem ADAM9 und ADAM10 relevant sind (Cai et al., 2016). Dieser molekularbiologische Sachverhalt weist darauf hin, dass der Vorgang auch in der Nische zwischen MSCs und malignen Zellen stattfindet. Dies stellt eine mögliche Erklärung für die Beobachtungen der Brustkrebsstudie dar.

## Problemstellung

In anderen Arbeiten zum Kolonkarzinom und Kaposi-Sarkom war allerdings eine Inhibition des Tumorwachstums durch Stromazellen zu sehen (Khakoo et al., 2006; Ohlsson LB, 2009).

Insgesamt beeinflussen MSCs die Onkogenese sowohl positiv als auch negativ. In welchen Zusammenhängen MSCs exzitatorisch oder inhibitorisch agieren, muss noch herausgefunden werden.

Wie oben bereits erwähnt, wird angenommen, dass Nekroptose sowohl in hämatopoetischen Zellen als auch in Nischenzellen das Tumorwachstum durch Zelltod und Inflammation maßgeblich lenkt. Allgemeiner spielt die regulierte Nekrose bei der Abwehr von Virusinfektionen sowie bei der Pathogenese mehrerer Erkrankungen wie der Sepsis eine Rolle (Duprez et al., 2011; Mocarski et al., 2011). Nekroptose resultiert in einer Zellschwellung, anschließender Membranruptur und Ausschüttung von DAMPs (Damage Associated Molecular Pattern) und Zytokinen (Pasparakis & Vandenabeele, 2015). Diese Signalauslösung löst eine Inflammation, Gewebeschädigung und Immunantwort aus (Höckendorf et al., 2017; Lamkanfi & Dixit, 2012) und kann dadurch zu schwerwiegenden hämatologischen Pathologien führen (Yabal et al., 2014). Nekroptose in MSCs beeinflusst folglich die blutbildenden Zellen in ihrem Differenzierungsverhalten, durch Ausschüttung von DAMPs und Interleukin-1 $\beta$  (Günther et al., 2011; Kang et al., 2013).

Die regulierte Nekrose wird durch die Freisetzung von TNF ausgelöst. TNF kann durch Rezeptorbindung an Zellen entweder zum Überleben oder zum Zelltod, der Apoptose oder Nekroptose, führen. Das Überleben der Zelle wird durch den NF- $\kappa$ B Signalweg unterstützt, der die Expression charakteristischer Proteine hochreguliert. Durch Inhibition des NF- $\kappa$ B Signalwegs führt TNF zum Zelltod (Vanden Berghe et al., 2010). Es bindet an seinen Rezeptor TNFR1 (TNF-Rezeptor 1) und bildet zunächst einen „Complex I“ bestehend aus TNFR1, TNFR1-associated death domain (TRADD), RIPK1, TNFR-associated factor 2 (TRAF2), cellular inhibitor of apoptosis protein 1 (cIAP1), cIAP2 und dem linear ubiquitin chain assembly complex (LUBAC). Bei Anwesenheit von Caspase 8 formen sich Complex IIa oder IIb, die weitere Proteine beinhalten, und führen zur Apoptose (Jost et al., 2009). Complex IIc, auch bekannt als Nekrosom, ent-

## Problemstellung

steht in Abwesenheit von Caspase 8 und in Anwesenheit von RIPK3 und MLKL oder Hemmung von FLICE-like inhibitory protein long isoform (FLIP<sub>1</sub>). Er besteht aus RIPK1 und RIPK3 und bildet sich durch Autophosphorylierungen. Aktiviertes RIPK3 phosphoryliert und rekrutiert MLKL, welches sich selbst ebenfalls zum Komplex formt und an der Plasmamembran lokalisiert ist (Cai et al., 2014; Conrad et al., 2016; Dondelinger et al., 2014; Wang et al., 2014). Hier interagiert MLKL mit Phosphatidylinositol-Phosphaten (PIPs) und permeabilisiert PIP-haltige Plasmamembranen durch positiv geladene Aminosäuren in der 4-Helix-Bündel-Domäne (4HBD) von MLKL (Dondelinger et al., 2014). Auch wenn der Signalweg der Nekroptose bis hierher mittlerweile gut erforscht ist, bleibt unklar welche Vorgänge downstream von MLKL ablaufen (Conrad et al., 2016). Mehrere Mechanismen werden mit der Aktivierung von MLKL und der regulierten Nekrose assoziiert wie beispielsweise Veränderungen der Mitochondrien- und Lysosomenintegrität (Vanden Berghe et al., 2014). Außerdem wird vermutet, dass MLKL Poren an der Plasmamembran ausbildet, die die osmotisch vermittelte Membranruptur der Zelle begünstigen.

Dieser Vorgang wird durch Endosomal Sorting Complexes Required for Transport (ESCRT), genauer ESCRT-III, verlangsamt oder verhindert. Der ESCRT-III Komplex besteht aus CHMP2aY, CHMP4B, VPS4, IST1 oder TSG101 (Gong, Guy, Crawford, et al., 2017). Das bedeutet einerseits, dass Zellen Zeit gewinnen um die Transkription bestimmter Zytokine und Chemokine wie CXCL1 und CXCL10 hochzufahren, sodass die Signale an benachbarten Zellen ankommen, und andererseits, dass eine MLKL Aktivierung nicht als „point of no return“ gilt (Gong, Guy, Olason, et al., 2017). Die veränderte Transkription der Zellen wird darauf zurückgeführt, dass eine geringe Menge an MLKL in den Nukleus gelangt, um die Transkription inflammatorischer Signale hoch zu regulieren (Yoon et al., 2016). Ein weiterer Mechanismus downstream von MLKL ist die Phosphatidylserin Externalisierung. Phosphatidylserine (PS) sind Phospholipide, die sich regulär auf der Plasmamembraninnenseite befinden. Bekannt ist, dass bei der Apoptose Scramblase aktiviert wird und Flippase gleichzeitig inhibiert wird, sodass PS an die Zelloberfläche gelangt (Martin et al., 1995; Segawa et al., 2014; Suzuki et al., 2013). Lange galt dies als typisches Kennzeichen von apoptotischen Zellen. Nun wurde die PS Externalisierung auch als Folge von

## | Problemstellung

MLKL Aktivierung erkannt (Gong, Guy, Crawford, et al., 2017; Zargarian et al., 2017).

Andere Arbeiten zeigen, dass MLKL bei der Regulation des Calciuminfluxes und Natriuminfluxes mitwirkt, (Cai et al., 2014; Chen et al., 2014). Ferner reguliert MLKL Nekroptose-unabhängig die Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen während vaskulärer Entzündungen (Dai et al., 2020).

Dass MLKL einen Komplex mit der Disintegrin und Metalloprotease ADAM10 eingeht, wurde im Kapitel 2 bereits angedeutet. Dieser Komplex führt zum Ectodomain-Shedding (Edwards et al., 2008). Darunter versteht man die proteolytische Abtrennung von extrazellulären Domänen, den sogenannten Ektodomänen, von der Zellmembran. Betroffen sind Proteine der Zelloberfläche, Rezeptoren, Wachstumsfaktoren und Zytokine. Beispiele dafür sind Cadherine, Fas-Liganden, TNF- $\alpha$ , ErbB2, EpCAM und andere Proteine (Reiss K & P., 2009). Infolgedessen lösen sich Zelladhäsionen auf und beschleunigen Nekroptose. Frühere Studien zeigen eine erleichterte Zellmobilität und somit eine höhere Wahrscheinlichkeit der Tumormetastasierung (Dittmer et al., 2009). Es konnte eine erhöhte Proteinkonzentration im Medium nekroptotischer Zellen in vitro nachgewiesen werden im Vergleich zu Zellen, bei denen die Nekroptose inhibiert wurde. Einige dieser Proteine sind EpCAM (epithelial cell adhesion molecule), BCAM (basal cell adhesion molecule) und TfR (Transferrin-Rezeptor), die im Medium von HT29 Zellen mittels Massenspektrometrie nachgewiesen wurden. Die freigesetzten Proteinfragmente tragen zur Inflammation bei. Insgesamt führt der Prozess des Ectodomain-Sheddings durch MLKL und ADAMS zur Lockerung von Zell-Zell-Kontakten sowie Zell-Matrix-Kontakten, Erleichterung der Zellmigration und Inflammation (Cai et al., 2016). Demnach sind Dysregulationen von ADAMs mit Autoimmunerkrankungen, Neurodegeneration, Infektionen, Entzündung und Malignomen assoziiert (Seals & Courtneidge, 2003). Die Komplexbildung zwischen ADAMs und MLKL lässt schließen, dass Nekroptose nicht nur über DAMPs und Zytokin-Freisetzung Inflammation fördert, sondern auch durch die Freisetzung von Proteinfragmenten des Ectodomain-Sheddings. Diese Erkenntnisse über die regulierte Nekrose konkretisieren unser aktuelles Verständnis von Inflammation und Zellmigration allgemein und im Rahmen von Pathologien wie Krebserkrankungen (Edwards

## | Problemstellung

et al., 2008). Trotzdem bleiben zahlreiche Fragen offen. Wie beeinflussen die freigesetzten Proteinfragmente die Transkription benachbarter Zellen? Welche Rolle spielt Nekroptose bei der Tumormetastasierung? Dieses Verständnis könnte die zukünftige Tumorthherapie maßgebend prägend.

Nach dieser Einführung in die Hämatologie und Pathogenese der AML, in die Thematik der Knochenmarksnische und den Signalweg der Nekroptose, werden die Schnittpunkte deutlich. Neben der Bedeutung der Leukämiezellen auf die gesunde und maligne Hämatopoese (Carey et al., 2017; Höckendorf et al., 2016), existiert ein wesentlicher Einfluss der Knochenmarksnische auf entsprechende Zellen und vice versa. Eine gesunde Nische fördert demnach die physiologische Blutbildung. Gesunde HSCs und LICs sind kompetitiv und konkurrieren um den Platz in der Nische. Ziel ist es demnach, eine Dysregulation des Knochenmarks möglichst zu vermeiden, sodass die gesunde Hämatopoese überwiegt und LICs verdrängt werden. Therapeutisch bedeutet dies, dass ein Homing von gesunden HSCs nach allogener Knochenmarkstransplantation in einer regelrechten Nische residuelle LICs endgültig verdrängen kann und es somit seltener zu Rezidiven kommt (Boyd et al., 2014). Multiple Möglichkeiten ergeben sich, beim Versuch die genannte Dysregulation im Knochenmark zu erklären. In dieser Arbeit wird vor allem auf die Nekroptose als Ursache für Inflammation und Milieuveränderung in der Nische eingegangen. Hier werfen sich zahlreiche Fragen auf. Tragen DAMPs und freigesetzte Proteine der Nekroptose zur erhöhten Entzündungsaktivität in der Knochenmarksnische bei und begünstigen dadurch die Proliferation von LICs (Carey et al., 2017)? Oder führt Nekroptose nicht nur in LICs selbst sondern auch in der Nische zur Aufhebung ihres Differenzierungsblocks (Höckendorf et al., 2016)?

Daher wird im Rahmen dieser Arbeit die Relevanz der regulierten Nekrose in der Knochenmarksnische für die Pathogenese der akuten myeloischen Leukämie untersucht.

## 3. Material und Methodik

### 3.1. Material

#### 3.1.1. Eukaryotische Zellen

##### EL08-1D2 Zellen

Die murine Zelllinie EL08-1D2 (embryonic liver-derived) wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Robert Oostendorp der III. Medizinischen Klinik für Hämatologie und internistische Onkologie, Klinikum rechts der Isar, zur Verfügung gestellt (Oostendorp et al., 2005; Oostendorp et al., 2002).

##### Primäre murine Knochenmark- und mesenchymale Stammzellen

Knochenmarkzellen und mesenchymale Stammzellen wurden aus weiblichen und männlichen C57BL/6 Wildtyp oder *Mkl1*<sup>-/-</sup> Mäusen entnommen. Das Durchschnittsalter der Tiere lag bei etwa vier Monaten.

Die Mäuse wurden unter pathogenfreien Bedingungen gehalten. Sie wurden nach der Geburt auf der Grundlage ihres Genotyps den Versuchsgruppen zugewiesen. Es gab keine anderen Faktoren, die die Gruppenauswahl beeinflussten. Alle Versuche wurden gemäß den Richtlinien der Tierethikkommission durchgeführt, in Übereinstimmung mit Richtlinien der Bezirksregierung von Oberbayern (AZ. 55.2-1-54-2532-224-15).

#### 3.1.2. Bakterien, Plasmide und Primer

##### 3.1.2.1. Bakterienstämme

Für die molekularbiologischen Klonierungsarbeiten und Transformationen wurden sowohl der kompetente *Escherichia coli* (*E. coli*)-Stamm DH5 $\alpha$  als auch der Stbl3-Stamm verwendet .

##### 3.1.2.2. Plasmide

Für alle Klonierungsarbeiten wurde ein PX458-Plasmid verwendet (Ran et al., 2013).

### 3.1.3. Antikörper

#### 3.1.3.1. Primäre Antikörper

**Tabelle 1: Antikörper zur Differenzierung von murinen hämatopoetischen Subpopulationen**

Antikörper	Farbe	Klon
Sca-1, Ly-6A/E	PE-Cy7	D7
CD48	APC	HM48-1
ckit, CD117	PE	2B8
TER-119	Pacific Blue / eFluor 450	TER-119
CD11b	Pacific Blue	M1/70
CD11c	Pacific Blue	N418
Gr-1	Pacific Blue	RB6-8C5
Ly6c	Pacific Blue	HK1.4
TCR $\beta$	Pacific Blue	H57-597
CD3	Pacific Blue	17A2
B220	Pacific Blue	RA3_6B2
CD19	Pacific Blue	eBio1D3

Oben aufgeführte Antikörper wurden von eBioscience erworben.

**Tabelle 2: Liste verwendeter Antikörper im Western Blot**

Antikörper	Spezies	Konzentration	Hersteller
$\alpha$ -Tubulin	Kaninchen	1/1000	Cell Signaling Technology
Lymphotoxin- $\alpha$	Ratte	1/500	R&D MAB749
MLKL	Ratte	1/1000	3H1 Millipore
RIPK3	Kaninchen	1/1000	ProSci 2283, ENZO
TNF - $\alpha$	Kaninchen	1/750	ab6671

#### 3.1.3.2. Sekundäre Antikörper

Als sekundäre Antikörper wurden Ziege-anti-Ratte sowie Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper in einer Verdünnung von 1:3000 und 1:5000 in Magermilch von Jackson ImmunoResearch verwendet.

### 3.1.4. Reagenzien

#### 3.1.4.1. Chemikalien

Acrylamid 40% /Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Agar-Agar, Kobe I	Roth, Karlsruhe
Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf

## Material und Methodik

Albumin Fraktion V	Roth, Karlsruhe
Ammoniumchlorid	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Aqua	B. Braun, Melsungen
Aqua ad iniectabilia	Berlin-Chemie, Berlin
$\beta$ -Mercaptoethanol 50mM	Gibco, Eggenstein
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Chloroquin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Chlorwasserstoff (HCl)	Roth, Karlsruhe
DNA-Marker Low density DNA (100 B)	NEB, Bad Schwalbach
DMSO	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Fötales Kälberserum	PAN Biotech, Aidenbach
Gelatine Lösung 2%, Type B, G1393	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Magermilchpulver	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
PBS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Pferdeserum	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Polybrene	Merck Millipore,

Ponceau S	Burlington, Massachusetts, USA Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Propidium Iodid Lösung	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Rinderalbumin (BSA)	Pierce, Bonn
Rotiphorese Gel	Roth, Karlsruhe
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin/EDTA 0,5%, 10x	Gibco, Eggenstein
Tween 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Wasserbadschutz	Akadia-Chemie, Plankstadt
<b>3.1.4.2. Zellkulturmedien</b>	
$\alpha$ -MEM + GlutaMAX Medium	Gibco, Eggenstein
RPMI Medium	Gibco, Eggenstein
<b>3.1.4.3. Antibiotika</b>	
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Eggenstein
<b>3.1.4.4. Allgemeine Enzyme und Restriktionsenzyme</b>	
BbsI	ThermoScientific, Schwerte
Buffer G, 10x	ThermoScientific, Schwerte
Buffer 0, 10x	ThermoScientific, Schwerte
EcoRI	New England Biolabs, Bad Schwalbach
T4 Ligation Buffer	ThermoScientific,

T4 PNK

Schwerte

New England Biolabs,  
Bad Schwalbach

T4 Ligase

New England Biolabs,  
Bad Schwalbach

### 3.1.4.5. Reagenzienansätze (Kits)

Maxi und Miniprep

Macherey-Nagel

ECL

Pierce

### 3.1.5. Geräte und Laborhilfsmittel

Agarose Gelelektrophorese System

Biorad, München

Agarose Geldokumentation

Analytic Jena AG, Jena

Aspirator

Starlab, Hamburg

Autoklav

Systec, Linden

Durchflusszytometer Aria III

BD, Franklin Lakes,  
New Jersey, USA

Durchflusszytometer Canto II

BD, Franklin Lakes,  
New Jersey, USA

Durchflusszytometer Fusion

BD, Franklin Lakes,  
New Jersey, USA

Elektrophoresekammer PowerPac HC

Biorad, München

Feinwaage VWR, Darmstadt

Gefrierbehälter Nalgene

Thermo Scientific,  
Waltham, Massachusetts,  
USA

Gefrierschrank -20°C

Liebherr, Kirchdorf

Heizblock Eppendorf

Hamburg

Inkubator

Binder, Tuttlingen

Kühlschrank +4°C

Liebherr, Kirchdorf

Lichtmikroskop DMI1

Leica, Wetzlar

Microplate Reader GloMax

Promega, Fitchburg,  
Wisconsin, USA

Mikrowelle

A. Hartenstein, Würzburg

## Material und Methodik

Mikrozentrifuge	Starlab, Hamburg
pH-Meter Mettler Toledo	Gießen
Plattformschüttler	Heidolph, Schwabach
Pipetten 1 µl-1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhelfer ErgoOne Fast	Starlab, Hamburg
Schüttel-Inkubator 3033	GFL, Burgwedel
Sterilbank ENVAIReco safe Comfort Plus gen	ENVAIReco, Emmendingen
Thermocycler MyCycler	Biorad, München
Thermoblock Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Tube Roller	Starlab, Hamburg
Ultratiefkühlschrank -80°C	Binder, Tuttlingen
Vortexer Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Waage	Kern, Balingen
Wasserbad GFL 1056	GFL, Burgwedel
Western Blot & Chemi Imaging Chemidoc	Biorad, München
Western Blot & Chemi Imaging Fusion FX	Vilber, Eberhardzell
Zentrifuge Rotina 420R	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg

### 3.1.6. Verbrauchsmaterialien

Einweghandschuhe Latex	Roth, Karlsruhe
Einweghandschuhe Nitril	Abena, Zörrig
Falcons	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Kanülen Sterican®	B. Braun, Melsungen
Kryoröhrchen	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Membranen, für 6- und 24-Well-Platten, 0,4 µm Porengröße,	Sigma Merck, Darmstadt

## Material und Methodik

kollagenbeschichtetes PTFE

Nitrocellulose-Membran

Protran Schleicher &  
Schuell, Dassel

Parafilm M®

Bemis, Burnley, UK

Pipettenspitzen 0,1 µl-1000 µl

Labsolute, Renningen

Pipettenspitzen 0,1 µl-1000 µl, steril

Greiner Bio-One,  
Kremsmünster, Österreich

Plastikpipetten 5ml, 10 ml, 20ml, 50ml, steril

Greiner Bio-One,  
Kremsmünster, Österreich

Präzisionstücher

Kimberly-Clark, Irving  
Texas, USA

Probenröhrchen mit Kappe, Simport

Fisher Scientific, Schwerte

Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml

Eppendorf, Hamburg

Spritzen

B. Braun, Melsungen

Spritzenfilter

Sartorius, Göttingen

Zellkulturplatten, 6-Well

Sarstedt, Nümbrecht

### 3.1.7. Puffer und Lösungen

Alle Bestandteile von Zellkultur- und Bakterien-Medien wurden, sofern nicht verwendungsfertig erworben, vor der Verwendung durch Filtration oder Autoklavieren sterilisiert.

#### 3.1.7.1. Lösungen und Medien für die Zellkultur

α-MEM Komplettmedium (für EL08-1D2)

500 ml α-MEM + GlutaMAX Medium

15% fötales Kälberserum

5% Pferdeserum

0,01% β-Mercaptoethanol

1% Penicillin/Streptomycin

FACS Puffer

49 ml PBS

## Material und Methodik

1-2 ml FBS

Sterile Filtration mit 0,22µm Filtern

### 0,1% Gelatine Lösung

2,5 ml 2% Gelatine Lösung

Mit sterilem H<sub>2</sub>O auf 50 ml auffüllen

### RPMI Komplettmedium (für primäre Knochenmarkszellen)

500 ml RPMI Medium

20% fötales Kälberserum

0,05% β-Mercaptoethanol

1% Glutamat

1% Penicillin/ Streptomycin

### **3.1.7.2. Puffer und Lösungen für die Bakterienkultur**

#### Luria-Bertani Broth (LB-Medium; pH 7,5)

1,0% (w/v) Trypton

0,5% (w/v) Hefeextrakt

1,0% (w/v) NaCl

H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>

#### LB-Agar<sup>Amp</sup>

LB-Medium pH 7,5

1,5% Agar

50 µg/ml Ampicillin (Endkonzentration)

H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>

#### LB-Medium<sup>Amp</sup>

LB-Medium pH 7,5

50 µg/ml Ampicillin (Endkonzentration)

### **3.1.7.3. Puffer und Lösungen für die DNA-Gelelektrophorese**

#### TrisAcetat-EDTA (TAE) Puffer 50x

2M TrisAcetat:

## Material und Methodik

242g Tris HCl  
57,2 ml CH<sub>3</sub>COOH  
50 mM EDTA:  
100ml 0,5M EDTA  
pH 8 einstellen und auf 1000ml auffüllen

### 3.1.7.4. Puffer und Lösungen für den Western Blot

#### Lysepuffer

1:10 RIPA  
20x Roche Proteaseinhibitor  
100x Natriumfluorid NaF (Phosphataseinhibitor)  
100x Natriumorthovanadat Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (Phosphataseinhibitor)  
Mit H<sub>2</sub>O auffüllen  
Es werden 30µl Lysepuffer pro Probe benötigt

#### Trenngelpuffer

1,5 M Tris/HCl pH 8,8  
0,6% (w/v) SDS

#### Sammelgelpuffer (4x)

0,5 M Tris/HCl pH 6,8  
0,6% (w/v) SDS

#### TBS 10x

24g Tris pure  
80g NaCl  
800ml H<sub>2</sub>O  
pH 7,4 einstellen mit 37% HCL auf 1L

#### TBST 10x

24g Tris pure  
80g NaCl  
2,5ml Tween

## Material und Methodik

800ml H<sub>2</sub>O

pH 7,4 einstellen mit 37% HCL auf 1L

### Transfer Buffer 10x

58,2g Tris

29,4g Glycine

20ml 0,4% SDS-Lösung

Auf 1L mit H<sub>2</sub>O auffüllen

### Transfer Buffer 1x

100ml 10x Transfer Buffer

200ml Methanol

Auf 1L mit H<sub>2</sub>O auffüllen

### Running Buffer 10x

30,2g Tris pure

144,0g Glycine

50 ml (oder 10g) 20% SDS

Auf 1L mit H<sub>2</sub>O auffüllen

### Stripping Buffer

3,8g 62,5mM Tris/HCl

50ml (oder 10g) 20% SDS

3,5ml β-Mercaptoethanol

pH=6,8 einstellen

Auf 500ml mit H<sub>2</sub>O auffüllen

### TAE 50x

242g Tris

37,2g EDTA

800ml H<sub>2</sub>O

57,1ml Eisessig

pH=8 einstellen

## Material und Methodik

Auf 1L mit H<sub>2</sub>O auffüllen

### Sammelgel 4%

1,3ml Acrylamid 30%

2,3ml Sammelgelpuffer

6,2ml Wasser

110µl APS 10%

53µl Temed

### Trenngel 15%

12,3ml Acrylamid 30%

6,2ml Trenngelpuffer

6,2ml Wasser

220µl APS 10%

110µl Temed

### **3.1.8. Software**

Ape – A Plasmid Editor v2.0.46

EndNote X9.3.3

FlowJo 10.6.2

GraphPad Prism 8

Intas Gel Imager

Microsoft Office Paket

## 3.2. Methodik

### **3.2.1. Generierung Nekroptose-defizienter Stromazelllinien mithilfe des CRISPR/ Cas9 Systems**

Für die Generierung Nekroptose-defizienter Zellen wurden vier Proteine der Nekroptose Signalkaskade ausgewählt. *Tnf*, *Lymphotoxin-α*, *Ripk3* und *Mkl1* wurden in der Stromazelllinie EL08-1D2 mittels CRISPR/Cas9 System deletiert. Zusätzlich wurden zwei Leervektor Kontrollen und je zwei sgRNAs als non-targeting Kontrollen (Negativkontrollen) verwendet. Als non-targeting Kontrollen wurden die Gene *Rfp* und *LacZ* ausgewählt, die in der EL08-1D2 Zelllinie natür-

licherweise nicht vorkommen. Die verwendeten Sequenzen sind in Tabelle 1 dargestellt.

Für die Klonierung der guideRNA in den Vector px458 wurde der Vektor zunächst verdaut (Ran et al., 2013). Dafür wurden 1 µg px458 mit 1 µl BbsI und 2 µl 10x Buffer G vermischt und auf 20 µl mit Nuklease-freiem Wasser aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte bei 65°C für 20 Minuten. Es folgte die Phosphorylierung und das Annealing der einzelnen RNA Oligos. 1 µl Oligosequenz\_vorwärts, 1 µl Oligosequenz\_umgekehrt, 1 µl 10x T4 Ligation Buffer, 6,5 µl Nuklease-freies Wasser und 0,5 µl T4 PNK (T4 Polynucleotide Kinase) wurden im Cyclor für 30 Minuten bei 37°C, anschließend für 5 Minuten bei 95°C inkubiert und letztlich mit 0,1°C pro Sekunde auf 25°C heruntergekühlt. Die so entstandenen doppelsträngigen Polynukleotide wurden in Nuklease-freiem Wasser auf 1:200 in 2 ml Eppendorf Mikroreaktionsgefäßen verdünnt.

Für die Ligation wurden 1 µl des aus Schritt 1 verdauten Plasmids (50ng), 1 µl der doppelsträngigen, 1 µl der verdünnten Polynukleotide, 1 µl 10x Buffer T4, 7 µl Wasser und 1 µl Quick Ligase/T4 Ligase vermischt, gevortext, abzentrifugiert und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Transformation wurde durchgeführt, indem 3 µl des Ligationsgemisches mit 20 µl Eis gekühlten Stbl3 Bakterien für 10 Minuten auf Eis, 30 Sekunden bei 42°C und wieder für 2 Minuten auf Eis inkubiert. 100 µl des SOC Mediums wurden hinzu pipettiert und für 45 Minuten bei 37°C auf dem Thermomix geschüttelt (~500). Das Gemisch wurde auf Platten mit Nährmedium ausgesät und über Nacht im Bakterieninkubator bei 37°C inkubiert.

Nachdem Wachstum einiger Bakterienkolonien wurden vier bis acht einzelne Bakterienkolonien pro guideRNA gepickt. Bei vier Zielgenen mit je vier guideRNAs, also 16 guideRNAs, und vier Kontrollen ergeben sich insgesamt 80 bis 160 gepflückte Kolonien. Deren Plasmid-DNA wurde mithilfe des Mini Preparations Kits von Macherey-Nagel separat aufgereinigt.

Abschließend wurde für das Screening 1 µl Plasmid DNA, 1 µl FD BbsI, 0,5 µl EcoRV/EcoRI, 2 µl Buffer 10x (Buffer 0, Tango oder R) vermischt, mit Wasser auf 20 µl aufgefüllt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Mithilfe von Agarose-Gelelektrophorese konnte überprüft werden, ob die guideRNA in den Vektor internalisiert wurde. Die Integration der RNA in das Plasmid px458 zerstört die

Bindungsstelle des Restriktionsenzym BbsI bei circa 267bp. Die beiden Bindungsstellen des Restriktionsenzym EcoRI bei 6302bp und 5519bp bleiben auch nach Insertion erhalten. Folglich werden Plasmide mit integrierter guideRNA nur zwei Banden bei 783bp und 8,5kb zeigen. Bei erfolgloser Klonierung zeigen sich demnach drei Banden bei 783bp, 6035bp, 2470bp.

**Tabelle 3: Zusammensetzung der guideRNA**

Gen	Zielsequenz	Oligosequenz vorwärts	Oligosequenz umgekehrt
<i>LacZ</i>	TCGTAGTTATCTACACGACG	caccgTCGTAGTTATCTACACGACG	aaacCGTCGTGTAGATAAAGTACGAc
<i>rfp</i>	GGCTCGTTAGTTCAAGTCGG	caccgGGCTCGTTAGTTCAAGTCGG	aaacCCGACTTGAAGTAAACGAGCCc
<i>Tnf_1</i>	AAGAAATCTTACCTACGACG	caccgAAGAAATCTTACCTACGACG	aaacCGTCGTAGGTAAGATTCTTc
<i>Tnf_2</i>	GTAGACAAGGTACAACCCAT	caccgGTAGACAAGGTACAACCCAT	aaacATGGGTTGTACCTTGCTACc
<i>Tnf_3</i>	TGGGCCATAGAACTGATGAG	caccgTGGGCCATAGAACTGATGAG	aaacCTCATCAGTTCTATGGCCAc
<i>Tnf_4</i>	CAGTAGACAGAAGAGCGTGG	caccgCAGTAGACAGAAGAGCGTGG	aaacCCACGCTCTTCTGTCTACTGc
<i>Lta_1</i>	GAGGCAGAAGTTTACCAACA	caccgGAGGCAGAAGTTTACCAACA	aaacTGTTGGTAAACTTCTGCCTCc
<i>Lta_2</i>	TGTGCCAGGTAGATGGGAGT	caccgTGTGCCAGGTAGATGGGAGT	aaacACTCCCATCTACCTGGCACAc
<i>Lta_3</i>	GTGCTTCTGAGGGAGTGGAT	caccgGTGCTTCTGAGGGAGTGGAT	aaacATCCACTCCCTCAGAAAGCACc
<i>Lta_4</i>	GATCGTGCCTTCTCCGACA	caccgGATCGTGCCTTCTCCGACA	aaacTGTCGGAGAAAGGCACGATCc
<i>Ripk3_1</i>	GAGTTAATGATTCATTGCTG	caccgGAGTTAATGATTCATTGCTG	aaacCAGCAATGAATCATTAACTCc
<i>Ripk3_2</i>	GGCCTGTCCACGTTTCAGGG	caccgGGCCTGTCCACGTTTCAGGG	aaacCCCTGAAACGTGGACAGGCCc
<i>Ripk3_3</i>	GTGTAGGAAGAAGATATCCT	caccgGTGTAGGAAGAAGATATCCT	aaacAGGATATCTTCTTCTACACc
<i>Ripk3_4</i>	CGGACACGAAGTCCCACTGG	caccgCGGACACGAAGTCCCACTGG	aaacCCAGTGGGACTTCGTGTCCGc
<i>Mkl_1</i>	GCACACGGTTTCCTAGACGC	caccgGCACACGGTTTCCTAGACGC	aaacGCGTCTAGGAAACCGTGTGCc
<i>Mkl_2</i>	GATGCAGTTGCAAATTAGCG	caccgGATGCAGTTGCAAATTAGCG	aaacCGTAATTTGCAACTGCATCc
<i>Mkl_3</i>	AGGAACATCTTGGACCTCCG	caccgAGGAACATCTTGGACCTCCG	aaacCGGAGGTCCAAGATGTTCTc
<i>Mkl_4</i>	GGCTGCGCACACTCATTGTG	caccgGGCTGCGCACACTCATTGTG	aaacCACAAATGAGTGTGCGCAGCCc

### 3.2.2. Agarose-Gelelektrophorese und Sanger Sequenzierung als Kontrolle der erfolgreichen Insertion der Polynukleotide in den Vektor

Für die Agarose-Gelelektrophorese wurde 1 %iges Gel angefertigt. Dazu vermenge man 1g Agarose mit 100ml TAE Puffer. Das Gemisch wurde drei Minuten in der Mikrowelle erwärmt bis die Agarose vollständig im Puffer gelöst war. 2,5 µl SYBR Safe wurde hinzu pipettiert und in die Form gegossen. Zu der aufgereinigten Plasmid DNA wurden je 5 µl Nachfüllpuffer pipettiert. Sobald das Gel ausgehärtet war, wurde es in einer Gelelektrophorese Box mit TAE Puffer vollständig bedeckt und die Taschen wurden mit dem Plasmid DNA-

Nachfüllpuffer Gemisch aufgeladen. Die erste Tasche wurde mit 8µl log2 ladder beladen. Das Gerät lief auf 80 Volt eingestellt, bis die Proben durchgelaufen waren.

Bei den Ansätzen der aufgereinigten DNA, die nach der Agarose-Gelelektrophorese, wahrscheinlich die eingesetzten guideRNAs enthielten, wurde zur weiteren Kontrolle eine DNA-Sequenzierung nach Sanger vorgenommen. Es wurde der GATC Service der Firma eurofins genutzt. Dazu wurden LIGHTrun tubes verwendet. Von jeder guideRNA wurde jeweils die vielversprechendste Plasmid-DNA einer Bakterienkolonie gewählt. Insgesamt wurden 16 Plasmide mit guideRNAs für Tnf, Lymphotoxin- $\alpha$ , Ripk3 und Mkl und vier weitere für die Kontrollen sequenziert. Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden mit ApE analysiert. Von je einem Ansatz pro guideRNA, das heißt von insgesamt 20, wurde die DNA durch Bakterienproliferation über Nacht im Bakterienschüttler bei 37°C vervielfältigt und aufgereinigt mittels Maxi Kit von Macherey-Nagel.

### **3.2.3. Calcium-Phosphat Transfektion zur Einbringung der DNA in EL08-1D2 Stromazellen**

Zur Einbringung der modifizierten DNA in die Zielzellen EL08-1D2 mussten diese zunächst in Kultur genommen werden. Dazu wurden 10cm Platten mit 0,1% Gelatinelösung benetzt. Die 2%ige Gelatine wurde in einer 1:20 Verdünnung mit sterilem Wasser verwendet. Es wurden 5ml der Lösung pro Platte verwendet und vor der Kultivierung der Zellen mindestens drei Stunden im Zellkultur-Inkubator inkubiert.

Generell gibt es unterschiedliche Arten von Transfektionen. Testungen ergaben, dass die Calcium-Phosphat-Transfektion für EL08 Zellen die effizientere Lösung im Vergleich zur Lipofectamin-Transfektion ist. Dafür wurden Zellen in Probeläufen nach beiden Arten transfeziert und unter einem GFP-fähigen Mikroskop betrachtet. Eine GFP-Positivität zeigt die erfolgreiche Einbringung der DNA in die Zellen an. Im Vergleich konnten wesentlich mehr GFP-positive Zellen nach der Calcium-Phosphat-Transfektion detektiert werden.

Am Tag vor der Transfektion wurden die EL08-1D2 Zellen mit einer Dichte von  $1 \times 10^5$  pro ml auf 10cm Platten ausgesät.

Am Tag der Transfektion wurde das Medium der Zellen vorsichtig verworfen. Der Zellrasen sollte möglichst erhalten bleiben. Um das zu gewährleisten wurden 10 ml frisches Medium langsam und am Plattenrand hinzugefügt. An diesem Tag sollte die Konfluenz der Zellen bei 70% bis 80% liegen.

20  $\mu$ l Chloroquin vermischt mit 480 $\mu$ l Medium wurden tropfenweise auf die Zellen gegeben und vorsichtig geschwenkt. Dieser Ansatz wurde 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

Für die Kristallisation und Transfektion wurden 500 $\mu$ l Wasser und 10 $\mu$ g DNA vermischt und 50 $\mu$ l Calciumchlorid hinzugefügt. Zur besseren Kristallisation wurde mithilfe einer elektronischen Pipettierhilfe Luft in den Ansatz geblasen. Dieses Gemisch wurde tropfenweise in 500 $\mu$ l 2xHBS Puffer (pH=7) pipettiert und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Die DNA-haltige Lösung wurde unter Schwenken tropfenweise auf die Zellen gegeben. Der erste Medium Wechsel musste nach vier bis sechs Stunden erfolgen. Nach 24 Stunden konnten die ersten GFP-positiven Zellen beobachtet werden und nach circa 48 Stunden war ein Maximum erreicht, sodass die Zellen dann sortiert werden konnten.

### **3.2.4. Generierung klonaler Zelllinien mit spezifischen Deletionen durch Single Cell Sort und anschließender Expansionsperiode**

Nach der Calcium-Phosphat Transfektion wurden EL08-1D2 durch fluoreszenz-aktivierte Durchflusszytometrie einzeln sortiert (Single Cell Sort) und expandiert. Somit entstanden Nekroptose defiziente klonale Zelllinien.

48h nach der Calcium-Phosphat Transfektion wurden die Zellen für die Durchflusszytometrie vorbereitet, sofern eine GFP Positivität mikroskopisch ersichtlich war.

Dafür wurden die adhärennten Zellen mit Trypsin und Kulturmedium geerntet und zwei Mal in je 10 ml FACS Puffer gewaschen. Nach dem Abzentrifugieren wurden die Zellen in 1 ml FACS Puffer gelöst und in ein 15 ml Falcon filtriert, um Zellklumpen zu vermeiden.

Am Vortag wurden 96-Well Platten mit 0,1% Gelatine inkubiert. Am Versuchstag wurden je 100 $\mu$ l Zellmedium mit 2% Penicillin-Streptomycin je Well vorge-

legt. Der hohe Antibiotikagehalt sollte Kontaminationen während der Durchflusszytometrie vermeiden. Nach dem Sort wurden 50 µl Medium je Well nachgelegt.

Die Einstellungen des BD FACSAria III waren:

- Nozzlegröße: 100 µm
- Precision: Single Cell
- Fluorochrome: FITC (GFP)

Nach dem Sort wurden die Zellen alle zwei bis drei Tage, insgesamt 14 Tage lang, lichtmikroskopisch auf ihr Wachstum kontrolliert. Sobald einzelne Kolonien einen konfluierenden Zellrasen bildeten, wurden sie in 48-Well, 6-Well und schließlich in 10 cm Platten expandiert. Die Expansionsperiode der Klone dauerte etwa 30 bis 60 Tage. Das Material wurde bei – 80°C oder in Flüssigstickstoff kryokonserviert.

Insgesamt wurden zwei Leervektorkontrollen, je eine guideRNA für die Non-Targeting Kontrollen *Rfp* und *LacZ* und je vier guideRNAs für *Tnf*, *Lt-α*, *Ripk3* und *Mikl* in EL08-1D2 Zellen transfiziert und die GFP positiven Zellen einzeln in 96-Well Platten sortiert. Aus diesen 20 96-Well Platten unterschiedlicher guide RNAs expandierten etwa je fünf bis zehn Kolonien, d.h. etwa 100 bis 200 Klone. Die Expansionsperiode der Zellen wurde beendet, sobald mindestens fünf Klone vorhanden waren und genügend Material für vier bis fünf Kryovials, die je 1,25 bis 2,5 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml enthielten. Für mindestens fünf Klone der unterschiedlichen guideRNA enthaltenden Stromazellen wurde Material für die folgenden Western Blots gesichert. Gen Ende der Expansion wurden demnach etwa 100 Pellets asserviert. Zur Detektion der Genknock-outs von *Tnf*, *Lt-α*, *Ripk3* und *Mikl* auf Proteinebene dienten Western Blots und Konfokal-Mikroskopie.

### **3.2.5. Sicherung der Deletionen von klonalen Stromazelllinien durch Western und Konfokal-Mikroskopie**

Abschließend sicherte eine Western Blot Analyse die Deletion in der Zelllinie auf Proteinebene. Die Western Blots für die Proteine TNF und Lymphotoxin-α

ergaben eine sehr niedrige Expression in der EL08-1D2 Zelllinie. Diese Klone wurden daher für weitere Experimente ausgeschlossen.

Für den Western Blot wurden die Zellen eingangs lysiert. Pro Probe wurden abhängig von der Zellmenge und Pelletgröße 30µl bis 50 µl verwendet. Diese wurden gevortext, für 30 Minuten auf Eis inkubiert und zehn Minuten auf höchster Geschwindigkeit abzentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Eppendorf Cups abgenommen und das Pellet verworfen.

Ein BCA Protein Assay wurde zur Quantifizierung der Proteinmenge in den Proben verwendet. Pro Probe wurden 200µl Reagenzien benötigt. Jede Probe wird doppelt vermessen, um Messungenauigkeiten zu minimieren. Insgesamt wurden meist also zwei Nullwerte, 24 Standardverdünnungen und die doppelte Probenanzahl gemessen. Für den Standard wurde BSA 1mg/ml in den gewünschten Verdünnungen benutzt. Meist reichte die Skala der Standardverdünnungen von 0,2 mg/ml in Schritten von 0,2 mg/ml bis 1 mg/ml und dann in Schritten von 1mg/ml Schritten bis 14 mg/ml, abhängig von der zu erwartenden Proteinkonzentration der Proben. Als Nullwert wurde der reine Lysepuffer verwendet. Es wurde 1µl Probe pro Well in Doppelbestimmung verwendet und mit 200µl des BCA Reagenzes vermengt. Das BCA Reagenz setzte sich zusammen aus Reagenz A und Reagenz B, wobei B in einer 1:50 Verdünnung in A aufgelöst wurde. Dazu wurde eine 96-Well-Platte mit flachem Boden verwendet. Diese wurde nach Vermengung der Reagenzien mit den Proben für genau 30 Minuten bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Die Messung der Extinktion wurde bei 570nm vorgenommen.

Die Proteinkonzentration der Proben wurde auf 20µg/µl festgelegt. Um die gewünschte Konzentration zu erreichen, wurden die Proben mit einfach und vierfach Lämmli verdünnt. Das Material wurde 5 Minuten bei 95°C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt. Nun wurde entweder unmittelbar danach der Western Blot gestartet oder die Proben wurden bei -80°C gelagert.

Für die SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) zur Auftrennung der Proteine wurden Gele in Gelkammern befestigt und mit 1x SDS-Running Puffer aufgefüllt. Für die erste Geltasche war der pre-stained

Marker vorgesehen. Die restlichen Geltaschen wurden mit den Proben aufgeladen. Geltaschen ohne Probe mussten mit 1xLämmli befüllt werden.

Bei konstanter Spannung lief das Gel die ersten 30 bis 40 Minuten mit 70 Volt bis die Proteine das Sammelgel vollständig durchquert haben. Dann wurde die Spannung bis maximal 130 Volt erhöht. Bis die Proben das Gel ausreichend durchquert haben, dauerte es circa 60 Minuten.

Für den Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran wurde eine Blotting Kammer mit 1x Transfer Puffer befüllt und in einer Styroporbox mit Eis ummantelt. Für den erfolgreichen Transfer ist die richtige Reihenfolge von Materialien entscheidend. Es wurde sich an folgendes Schema gehalten:

- Klemmkammer (rot oder weiß)
- Schwamm
- Whatman-Paper
- Membran
- Gel
- Whatman-Paper
- Schwamm
- Klemmkammer (schwarz)

Der Transfer erfolgte bei konstanter Stromstärke. Pro Gel wurden 0,2 Ampere für 1,5h eingestellt. Zur Erfolgskontrolle wurde die Membran 5 Minuten in 1x TBST gewaschen und mit Ponceau angefärbt. Bei korrekter Ausführung wurden hierbei Proteinbanden auf der Membran sichtbar. Die Membranen wurden abermals in 1x TBST gewaschen.

Sie wurden, abhängig von der Lösung in der der Primärantikörper gelöst ist, in 5% Magermilch bzw. 5% BSA in 1xTBST auf einem Schwenker blockiert.

Der Primärantikörper mussten nach Anleitung in Magermilch bzw. BSA in TBST verdünnt werden (z.B. 1:1000). Für eine längere Haltbarkeit der gelösten Primärantikörper wurden 10µl Natriumazid verwendet. Die Inkubation erfolgte in einem 50ml Falcon auf einem Tuberoller über Nacht im Kühlraum bei etwa 8°C. Am darauffolgenden Tag war mehrmaliges Waschen in 1xTBST notwendig, das etwa 60 Minuten in Anspruch nahm.

Der Sekundärantikörper wurde nach Anleitung in Magermilch bzw. BSA verdünnt. Die Membranen wurden darin auf einem Tuberoller für etwa 1,5h bei Raumtemperatur inkubiert und nachfolgend für mindestens 30 Minuten in 1xTBST unter mehrmaligem Wechsel bei Raumtemperatur gewaschen.

Zum Entwickeln der Western-Blot Membran Aufnahmen wurden ECL, ECL PLUS bzw. ECL FEMPTO, abhängig von der Proteinexpression, verwendet. Für die Bildgebung wurde ein Fusion FX Gerät der Firma Vilber nach Anleitung benutzt.

Um die Detektion der Ladekontrolle durchzuführen wurde die ausgewertete Membran gestrippt. Hierfür wurden 150µl Natriumazid in 15ml 1xTBST vermengt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Die Membranen mussten nachfolgend mehrmals mit Wasser gewaschen werden, um sie anschließend für 20 Minuten in 1xTBST unter häufigem Wechsel zu säubern. Als Ladekontrolle wurde  $\alpha$ -Tubulin verwendet und nach Anleitung des Sekundärantikörpers angewendet. Alle Membranen wurden trocken auf Whatman-Paper gelagert.

### **3.2.6. Synthese von hämatopoetischen Stammzellen mit AML typischen genetischen Aberrationen mittels retroviraler Infektion**

(Glaser et al., 2012; Grundler et al., 2005) beschreiben die verwendeten retroviralen Konstrukte für AML-ETO, FLT3-ITD und MLL-ENL (Addgene plasmid 12433). Der Überstand des Retrovirus wurde in der ecotropen Phoenix-E (G. Nolan, Stanford, CA) Zelllinie durch Calcium-Phosphat-Transfektion hergestellt, wobei pMIG als Kontrolle diente.

Vier Tage vor Isolierung der hämatopoetischen Stammzellen wurde den Mäusen 5-Fluoruracil in einer Dosis von 150 mg/kg intraperitoneal injiziert. Für die retrovirale Infektion der Zellen wurde das Knochenmark von C57BL/6 Mäusen isoliert und über Nacht in RPMI/20% FCS und den Wachstumsfaktoren IL-3 (10 ng/ml), IL-6 (10 ng/ml), SCF (100 ng/ml) stimuliert. Durch zweimalige Spin-Infektion in 1200g, bei 32°C für 90 Minuten alle 24 Stunden in retroviralem Überstand, versetzt mit den oben genannten Wachstumsfaktoren und 4 µg/ml Polybrene, wurden die Zellen mit den genetischen Aberrationen transduziert.

Die infizierten Zellen präsentieren sich als GFP positiv. Zur Erfolgskontrolle und Aufreinigung der infizierten von den noch gesunden Stammzellen wurden sie durchflusszytometrisch auf GFP-Positivität und Viabilität sortiert. Schließlich wurden die hämatopoetischen Zellen mit der Stromazelllinie EL08-1D2 oder primären murinen mesenchymalen Stammzellen für 7 Tage ko-kultiviert.

### **3.2.7. Ko-Kulturen zur Detektion des Einflusses von Nekroptose in der Tumormikroumgebung auf die gesunde und leukämische Hämatopoese**

Es wurden Zellen der Stromazelllinie EL08-1D2 oder primäre mesenchymale Stammzellen mit hämatopoetischen Knochenmarkszellen für sieben Tage ko-kultiviert. Die Experimente bestanden aus murinem Material. Bei Verwendung von humanem Material wird dies explizit erwähnt. Um eine Nekroptosedefizienz sicher zu stellen, wurden für einige Ansätze Zelltodinhibitoren verwendet. Für die Einschätzung der Zellkontaktabhängigkeit zwischen Stroma und hämatopoetischen Zellen dienten Membranen zur räumlichen Trennung der beiden Zelltypen. Anschließend wurden Zelltod und –differenzierung der KM-Zellen mittels FACS ausgewertet. Außerdem wurde ein CFC-Assay der Ko-Kultur Nummer 10 angefertigt.

Die EL08-1D2 Zellen wurden am Vortag in 6-Well-, 24-Well- oder 96-Well-Platten ausgelegt. Die primären MSCs wurden im Rahmen der Kollaboration mit AG Oostendorp 14 Tage vorher ausgelegt, sodass ein konfluierender Zellrasen entstand.

Die KM-Zellen stammen aus Wildtyp-Mäusen (C57/BL6), denen vier Tage vor Zellisolierung 150 mg/kg 5-Fluoruracil intraperitoneal verabreicht wurde. Außerdem wurden die Zellen über Nacht in RPMI/20% mit Wachstumsfaktoren stimuliert (10 ng/ml IL-3, 10 ng/ml IL-6 und 100 ng/ml SCF). Die FLT3-ITD infizierten Zellen benötigten dabei keine Stimulation.

Am Tag der Ko-Kultivierung wurden gesunde oder leukämische KM-Zellen auf mit Stromazellen ausgelegte Platten pipettiert. Für alle Ansätze bis auf Ko-Kulturen acht und neun wurde ausschließlich die Zellzahl der KM-Masse berücksichtigt. Für die Ko-Kulturen acht und neun wurden vor Beginn am Tag 0

## Material und Methodik

der HSC-Anteil, d.h. Lineage negative, Sca-1 positive, c-Kit positive, CD48 negative und positive Zellen der KM-Masse durchflusszytometrisch bestimmt. Für genaue Informationen zu Versuchskonstellationen, Zellzahl und Dauer siehe Tabelle 4.

**Tabelle 4: Zusammensetzung der Ko-Kulturen**

Ko-Kultur Nummer	1	2	3	4	5
Stromazelltyp	EL08-1D2				
Genotyp	-		2x NT		
	2x EV				
	4x <i>Ripk3</i> <sup>-/-</sup>				
	4x <i>Mik1</i> <sup>-/-</sup>				
Zellmenge/cm <sup>2</sup>	5200		31250*	5200	
KM-Zelltyp	KM-Masse				
Genotyp	Gesund		Gesund (pMIG)		
	AML-ETO				
	FLT3-ITD MLL-ENL		-		
KM-Zellmenge/cm <sup>2</sup>	3125	2000	3125		
KM Vorbehandlung	Retrovirale KM-Infektion				
Dauer	7 Tage	7 und 14 Tage	7 Tage	7 Tage	7 Tage
Kommentar			* UV-bestrahlte Zellen	Mischung gesundes und infiziertes KM im 1:1 Verhältnis	Mischung gesundes und infiziertes KM im 3:1 Verhältnis

Ko-Kultur Nummer	6	7	8	9	10
Stromazelltyp	EL08-1D2				primäre MSCs
Genotyp	2x NT				WT <i>Mik1</i> <sup>-/-</sup>
	2x EV				
	4x <i>Mik1</i> <sup>-/-</sup>				
	4x <i>Ripk3</i> <sup>-/-</sup>				-
Zellmenge/cm <sup>2</sup>	5200	50000	5200	8200	konfluent
KM-Zelltyp	KM-Masse		HSCs		KM-Masse
Genotyp	Gesund (pMIG)	Gesund (human)	Gesund		Gesund
	AML-ETO				
KM-Zellmenge/cm <sup>2</sup>	3125	87000	90	50	3420
KM Vorbehandlung	Retrovirale KM-Infektion	-	-	-	-
Dauer	7 Tage				

Kommentar	Mischung gesundes und infiziertes KM im 1:3 Verhältnis		HSC Gehalt Detektion mittels FACS, Zelltodinhhibition in Stromazellen	HSC Gehalt Detektion mittels FACS, Membranen zur Trennung der Zelltypen	Membranen zur Trennung der Zelltypen
-----------	--	--	---	---	--------------------------------------

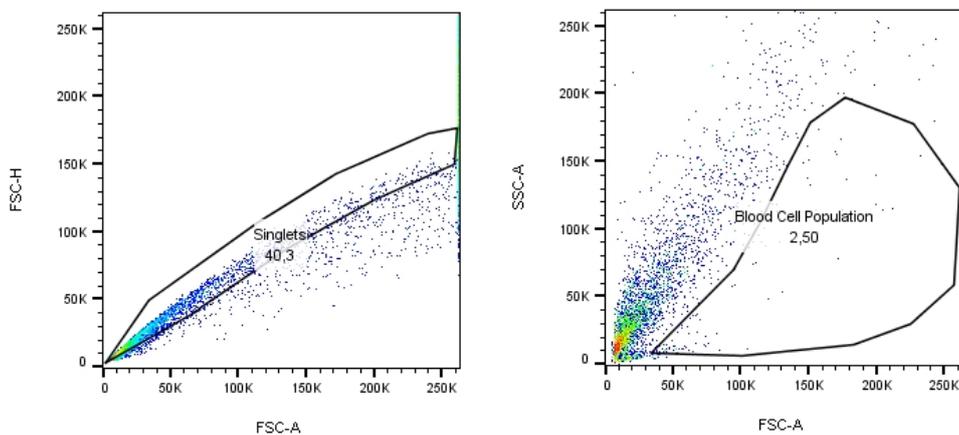
EV=Empty Vector Kontrolle

NT=Non-targeting Kontrolle

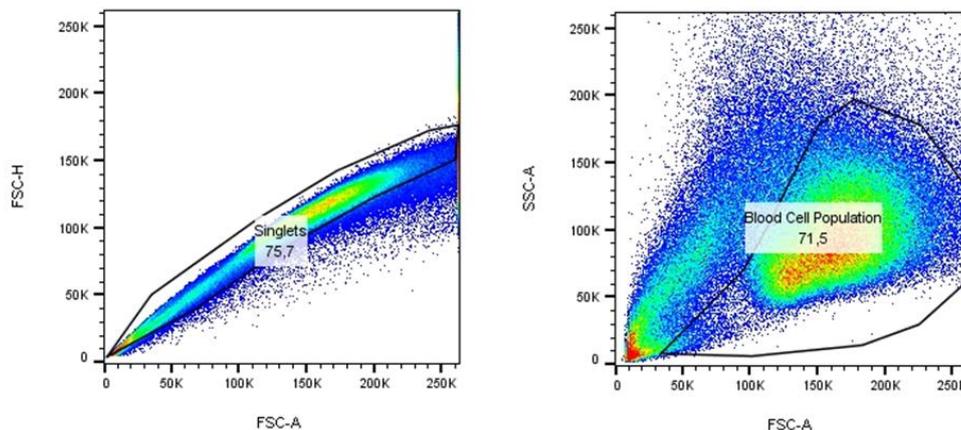
### 3.2.7.1. FACS Analyse der gesunden und leukämischen hämatopoetischen Zellen nach Ko-Kultivierung mit Stromazellen

Am Tag der Auswertung wurden die Zellen geerntet und in FACS Puffer gewaschen. Das Vorwärtsstreulicht (FSC = Forward Scatter) und das Seitwärtsstreulicht (SSC = Side Scatter) ermöglichten die Differenzierung zwischen HSCs und Stromazellen. Stromazellen präsentieren sich größer und weisen eine höhere Granularität als HSCs auf (Abb. 1).

A



B



**Abbildung 1: Unterscheidung zwischen hämatopoetischen Zellen und Stromazellen in der FACS Analyse.**

FACS Analyse von murinen mesenchymalen Stammzellen (A) und hämatopoetischen Zellen nach 7 Tagen Ko-Kultur (B). Repräsentative FACS Blots. Durch unterschiedliche Eigenschaften der beiden Zellpopulationen im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht können sie differenziert werden.

Für die Analyse der hämatopoetischen Zellen wurden die Lineage-Marker (Lin) Terr119, CD11b, CD11c, Gr-1, Ly6C, TCR- $\beta$ , CD3, B220, CD19 in APC-7 verwendet. Sobald einer dieser neun Marker positiv wurde, zählten die Zellen zur Lineage positiven und damit ausgereiften Population. Weitere Oberflächenmarker wie c-kit in PE, Sca-1 in PE-7 und CD48 in APC wurden detektiert (Abb. 2). Als Progenitorzellen zählen Lin negative, c-Kit positive und Sca-1 negative Zellen. Zu den sogenannten Short-Term HSCs (ST-HSC) und multipotenten Vorläuferzellen (MPPs) zählten Lin negative, c-Kit positive, Sca-1 positive und CD48 positive Zellen. Long-Term HSCs (LT-HSCs) waren Lin negativ, c-Kit positiv, Sca-1 positiv und CD48 negativ (Höckendorf et al., 2016; Jost & Höckendorf, 2019). Als Viabilitätsnachweis diente Propidium-Iodid-Lösung. Quantitativ wurden sowohl die relativen als auch die absoluten Zellzahlen erfasst.

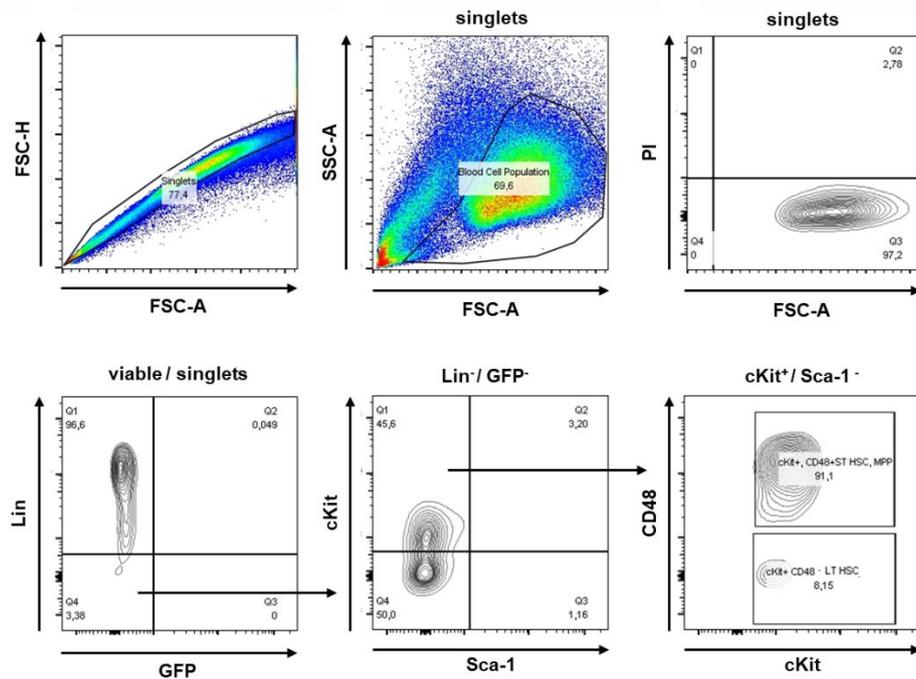


Abbildung 2: Gating Strategie für HSCs und myeloide Progenitorzellen.

### 3.2.7.2. Ko-Kulturen mit direktem und fehlendem Zell-Zell-Kontakt

Um herauszufinden ob der Einfluss der Stromazellen auf KM-Zellen Zellkontakt abhängig ist, wurden die beiden Zellarten in der Hälfte der Ansätze von Ko-Kultur 10 (siehe Kapitel 3.2.7.) räumlich voneinander getrennt. Hierfür wurden Membranen mit einer Porengröße von 0,4  $\mu\text{m}$  Durchmesser verwendet. Dadurch bleibt die Interaktion zwischen KM- und Stromazellen über sezernierte Substanzen gewährleistet. Für die andere Hälfte der Ansätze in Ko-Kultur 10 wurden keine Membranen verwendet. Der Versuchsaufbau ist in Abb. 3 dargestellt.

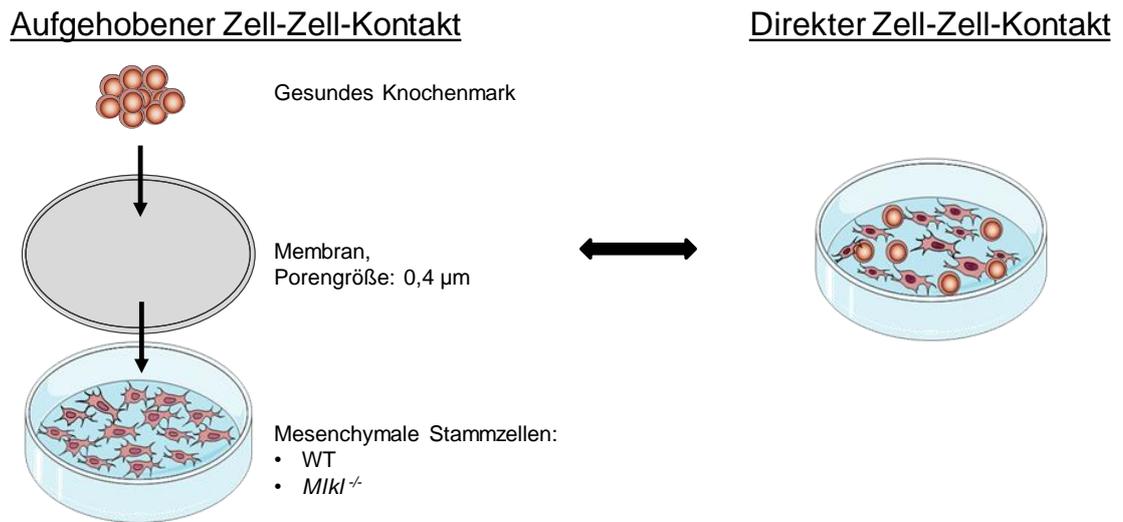


Abbildung 3: Versuchsaufbau Ko-Kultur 10.

Die Auswertung erfolgte nach sieben Tagen wie in Kapitel 3.2.7.1. beschrieben mittels FACS und wie in Kapitel 3.2.7.4. beschrieben mittels CFC-Assay.

### 3.2.7.3. Auswertung der HSC Koloniebildungsfähigkeit durch CFC-Assays

Zur Vorbereitung der CFC-Assays wurden drei 3 cm Platten, davon eine deckellos und mit Wasser befüllt, in eine 10 cm Platte gestellt. Das Wasser schützt die Versuchsansätze vor Austrocknung. Die Zellen mussten vor Beginn des Assays mindestens dreimal mit PBS gewaschen werden. Zellen für zwei Ansätze wurden dann in ein Falcon, das 2 ml Methylcellulose enthielt, pipettiert. Die Zellzahl ist abhängig davon, ob Wachstumsfaktoren in den Kulturen enthalten sind. Für Versuche ohne Wachstumsfaktoren wurden 16.000 bis 20.000 Zellen pro ml verwendet. Für zytokinhaltige Ansätze waren maximal 10.000 Zellen nötig. 250µl Medium (Stromamedium oder  $\alpha$ -MEM) wurden neben 25 µl Penicillin-Streptomycin (1%) zugesetzt und gevortext. Nun mussten die Ansätze solange in Ruhe stehen bis alle Blasen verschwanden. Sie wurden gleichmäßig (etwa 1,1ml) auf zwei 3 cm Platten unter Vermeidung von Blasen, verteilt. Die Methylcellulose sollte homogen in den Platten verteilt sein. Nach zehn bis 14 Tagen im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurden Anzahl und Kolonieart unter dem Mikroskop bestimmt.

### 3.2.7.4. Ko-Kulturen mit diversen Zelltodinhhibitoren

HSCs wurden mit EL08-1D2 Zellen, wie in Kapitel 3.2.7. beschrieben, ko-kultiviert und, wie in Kapitel 3.2.7.1. beschrieben, ausgewertet. Für Ko-Kultur Nummer 8 wurden verschiedene Zelltodinhhibitoren verwendet, um den Einfluss von Apoptose- und/oder Nekroptose-defizienter Stromazellen auf die gesunde Hämatopoese zu eruieren. Eine Übersicht über die Inhibitoren ist in Tabelle 5 dargestellt. Als Kontrolle diente DMSO.

**Tabelle 5: Übersicht über Zelltodinhhibitoren**

Bezeichnung	Zielstruktur	Konzentration
Necrostatin-1s (Nec1s)	RIPK1	1:1000
GSK		1:10.000
Emricasan	Caspasen	1:2000

Außerdem wurde Ko-Kultur 8 in folgende drei Gruppen unterteilt:

1. „+ Waschen“: In diesen Ansätzen, wurden EL08-1D2 Zellen 48h mit den genannten Inhibitoren vorbehandelt. Am Tag 0 wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit HSCs ko-kultiviert und nach sieben Tagen ausgewertet.
2. „- Waschen“: In diesen Ansätzen, wurden EL08-1D2 Zellen 24h mit den genannten Inhibitoren vorbehandelt. Am Tag 0 wurden die Zellen nicht gewaschen, d.h. die Inhibitoren verblieben im Medium. Sie wurden mit HSCs ko-kultiviert und nach sieben Tagen ausgewertet.
3. „KM-Zellen“: In diesen Ansätzen, wurden keine EL08-1D2 Zellen verwendet (siehe Tabelle 3). Am Tag 0 wurden KM-Zellen mit genannten Inhibitoren versetzt und nach sieben Tagen ausgewertet.

Als Stromazellen dienten *Rfp* und *LacZ* Non-Targeting Kontrollen, sowie je zwei Zellklone für *Ripk3* und *Mkl*, die das jeweilige Zielgen ausschalten. Um statistisch relevante Aussagen treffen zu können, wurden alle Ansätze als technische Triplikate angefertigt. Das Pipettierschema der beiden 96-Well Platten ist in Tabelle 6 dargestellt.



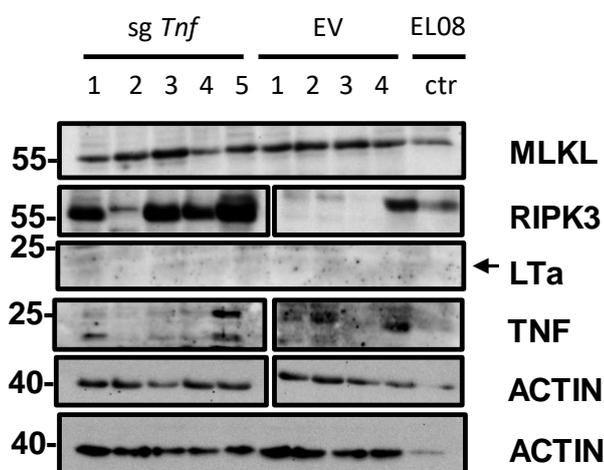
## 4. Ergebnisse

### 4.1. Transfektion des Vektors px458 in EL08-1D2 Zellen

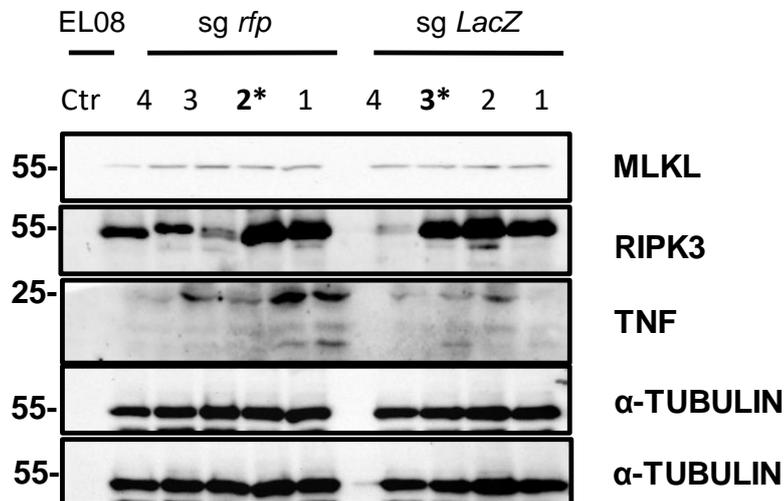
### 4.2. Nachweis der Nekroptose defizienten EL08-1D2 Zellklone

Eine Western Blot Analyse sicherte die Deletion in der Zelllinie EL08-1D2 auf Proteinebene. Die Western Blots für die Proteine TNF und Lymphotoxin- $\alpha$  ergaben eine sehr niedrige Expression (Abb. 4 A). Diese Klone wurden für weitere Experimente ausgeschlossen. Der Nachweis der Deletion von RIPK3 und MLKL auf Proteinebene ist in Abb. 4 A-C dargestellt. Zellen, die nachweisbar entweder kein RIPK3 oder kein MLKL mehr synthetisierten, dienten als Stromazellen der Ko-Kulturen. Sobald mehr als ein Protein, z.B. durch Off-Target-Effekte der CRISPR/Cas9-Guides, nicht mehr nachweisbar war, wurde der Klon für weiterführende Versuche ausgeschlossen (Abb. 4 C, Pfeil). In den Non-Targeting Kontrollen sg *Rfp* und sg *LacZ* konnten noch alle relevanten Proteine nachgewiesen werden. Als Kontrolle dienten unbehandelte EL08-1D2 Zellen. Um ein anderes Imaging Verfahren anzuwenden, wurde MLKL in verschiedenen Zellklonen mittels Konfokal-Mikroskopie dargestellt (Abb. 6).

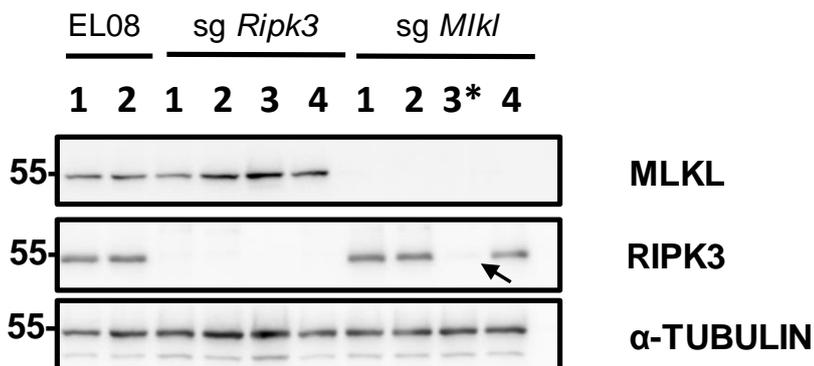
A



B



C



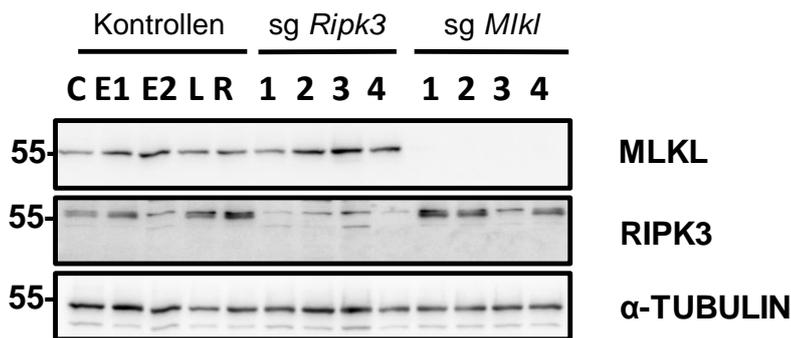
**Abbildung 4: Synthese der Nekroptose-defizienten EL08-1D2 Zellklone (A-C).**

Western Blot Analyse der EL08-1D2 abgeleiteten Zelllinien, die mit CRISPR/Cas9 Expressionsvektoren gegen (A) sg *Tnf* (5 unabhängige Klone) und Empty Vector Kontrollen (4 unabhängige Klone) sowie (B) den Non-Targeting Kontrollen sg *rfp* (4 unabhängige Klone) oder sg *LacZ* (4 unabhängige Klone) und (C) sg *Ripk3* (4 unabhängige Klone) oder sg *Mkl* (4 unabhängige Klone) transduziert worden waren.

Wegen der niedrigen bzw. nicht nachweisbaren Expression von TNF und LTa wurden sg *Tnf*-Klone für weitere Experimente ausgeschlossen. 2 und 4 der Empty Vector Kontrolle wurden zur Ko-Kultivierung verwendet (A). Die mit \* markierten Klone der Non-Targeting Kontrollen wurden für weitere Co-Kultur Experimente verwendet, da sie die relevanten Proteine MLKL und RIPK3 exprimieren (B). Die Zellklone mit einer Deletion von RIPK3 oder MLKL wurden für weitere Versuche verwendet. Der mit Pfeil markierte Klon wurde verworfen, da er eine Co-Deletion von RIPK3 aufweist (C).

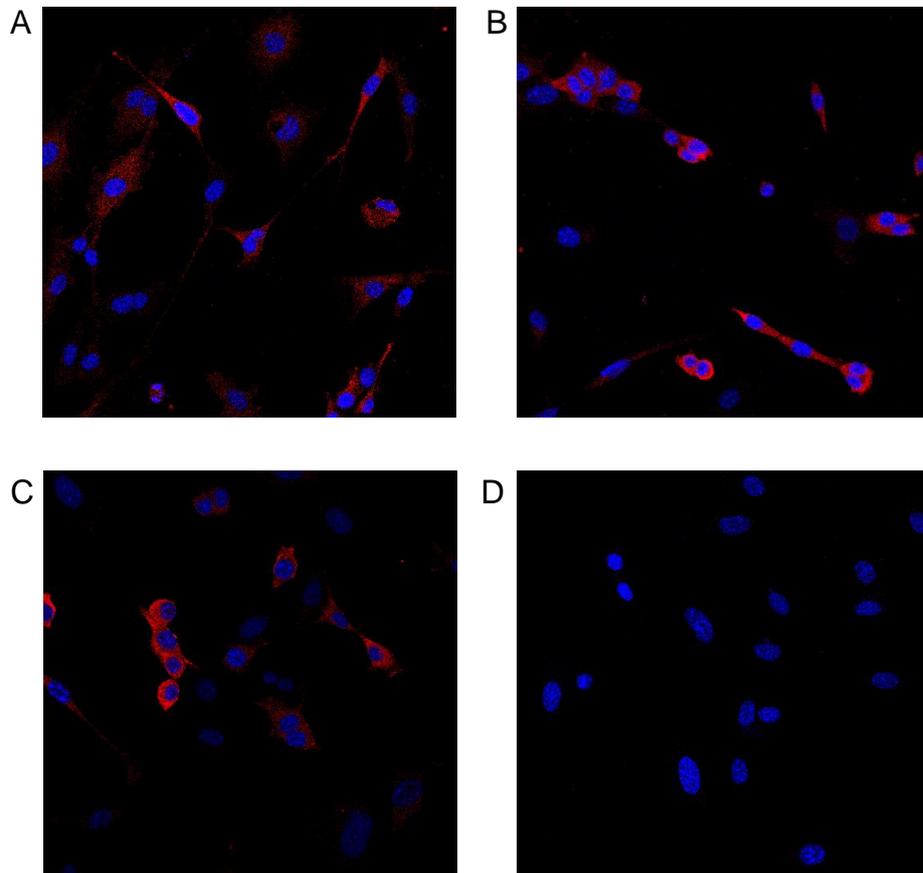
EV: Empty Vector Kontrolle, Ctr: Kontrolle, Sg: single guide

## Ergebnisse



**Abbildung 5: Übersicht der Proteinsynthese von in Ko-Kulturen verwendeten EL08-1D2 Zellklonen.**

Western Blot Analyse der EL08-1D2 abgeleiteten Zelllinien, die mit CRISPR/Cas9 Expressionsvektoren gegen *LacZ* (L), *rfp* (R) sowie *Ripk3* (4 unabhängige Klone) oder *Mkl1* (4 unabhängige Klone) transduziert worden waren. E1 und E2 stellen zwei unabhängige Klone der Leervektor-kontrollen dar. Als zusätzliche Kontrolle C dienen unbehandelte EL08-1D2 Zellen. Die hier aufgeführten Zellklone wurden für Ko-Kulturen verwendet.

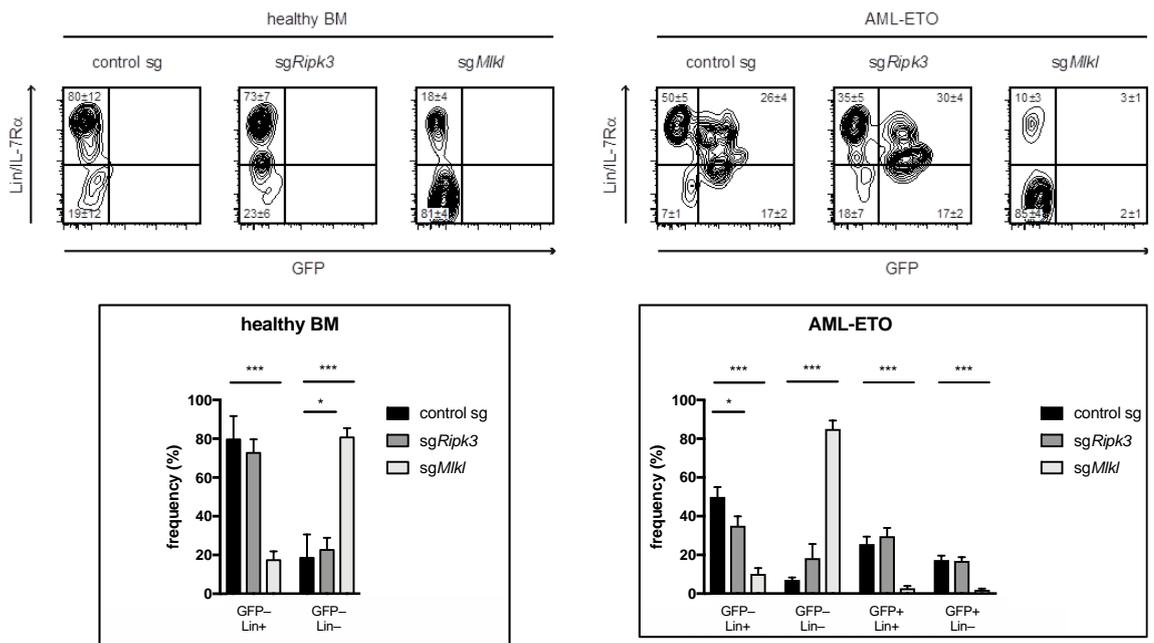


**Abbildung 6: MLKL Proteinsynthese in EL08-1D2 Zellklonen (A-D).**

Konfokal-Mikroskopie der EL08-1D2 abgeleiteten Zelllinien, die mit CRISPR/Cas9 Expressionsvektoren gegen *LacZ* (A), *rfp* (B), *Ripk3* (C) sowie *Mkl1* (D) transduziert worden waren. Es wurde je ein repräsentativer Zellklon pro Gen ausgewählt. Blau dargestellt sind die Zellkerne. Rot markiert MLKL.

### 4.3. *Mkl1*<sup>-/-</sup> Stromazellen unterstützen AML-ETO transduziertes Knochenmark nicht

Mittels FACS-Analyse wurde das Differenzierungsverhalten von gesunden und mit AML-ETO infizierten KM-Zellen nach siebentägiger Ko-Kultur mit Nekroptose-defizienten EL08-1D2 Zellen ausgewertet (Abb. 7).

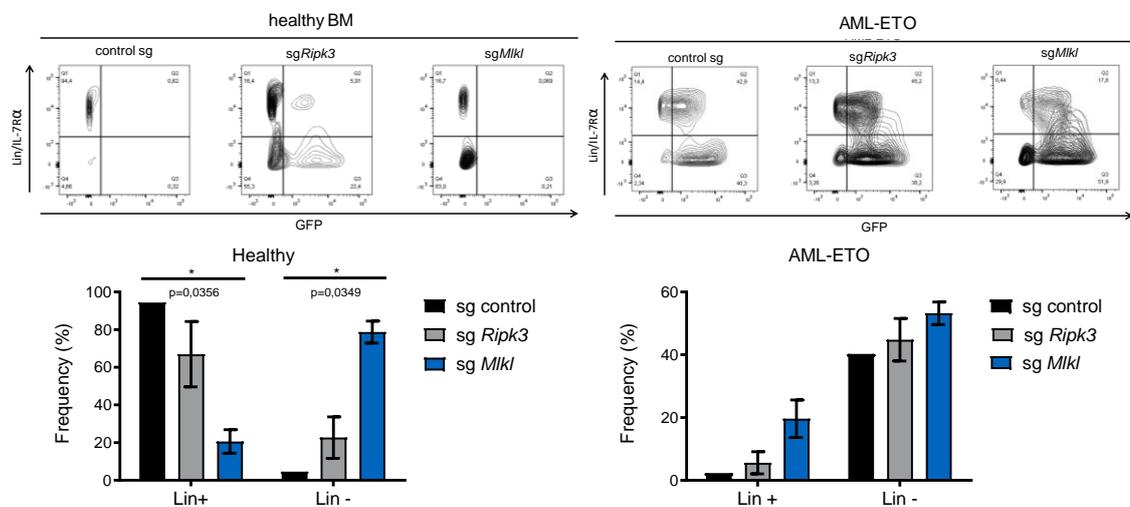


**Abbildung 7: Differenzierung hämatopoetischer Zellen in Abhängigkeit von RIPK3 bzw. MLKL in EL08-1D2 Stromazellen in Ko-Kultur 1.**

Repräsentative FACS Blots (oben) und Quantifizierung (unten) der Differenzierung gesunder und leukämischer (GFP+) hämatopoetischen Zellen nach 7-tägiger Ko-Kultur mit Leervektor-kontrollen (2 unabhängige Klone) oder RIPK3- bzw. MLKL-defizienten EL08-1D2 Zellen (je 4 unabhängige Klone). Alle Werte zeigen den Mittelwert +/- Standardabweichung des Mittelwerts (SEM).

Es kam zu einer starken Reduktion der Zelldifferenzierung unter Ko-Kultivierung mit *Mkl1*-defizientem Stroma. Dieser Effekt war unabhängig von gesunder oder leukämischer Hämatopoese. Er konnte in beiden Ansätzen beobachtet werden und war reproduzierbar (Abb. 7 und 8).

Bei der Betrachtung der mit AML-ETO infizierten KM-Zellen fiel auf, dass sie von MLKL-defizienten Stromazellen nicht unterstützt wurden. In diesem Ansatz wurden leukämische Zellen mithilfe von GFP markiert. Dieser Effekt war in weiteren Versuchsansätzen (Abb. 8) nicht reproduzierbar.



**Abbildung 8: Differenzierung hämatopoetischer Zellen in Abhängigkeit von RIPK3 bzw. MLKL in EL08-1D2 Stromazellen in Ko-Kultur 2.**

Repräsentative FACS Blots (oben) und Quantifizierung (unten) der Differenzierung gesunder und leukämischer (GFP+) hämatopoetischen Zellen nach 7-tägiger Ko-Kultur mit Leervektor-kontrollen (2 unabhängige Klone) oder RIPK3- bzw. MLKL-defizienten EL08-1D2 Zellen (je 4 unabhängige Klone). Alle Werte zeigen den Mittelwert +/- Standardabweichung des Mittelwerts (SEM).

#### 4.4. Hämatopoetische Stammzellen werden vor allem durch direkten Zellkontakt zu EL08-1D2 Stromazellen erhalten

Für Ko-Kultur 9 wurden vier verschiedene *Mkl*-defiziente EL08-1D2 Zellklone mit gesunden hämatopoetischen Knochenmarkszellen aus WT Mäusen 7 Tage, sowohl mit als auch ohne Membran zwischen den Zellarten, kultiviert (Tabelle 4). Als Kontrolle dienten je zwei Leervektor und Non-Targeting (sg *rfp*, sg *LacZ*) EL08-1D2 Zellklone. Für die Auswertung der KM-Zellen durch FACS wurde zunächst die Population der hämatopoetischen Zellen durch den Forward und Side Scatter von anderen Zellen separiert (Abb.1). Anschließend wurden die Zellen auf ihren Grad der Differenzierung wie in Kapitel 3.2.7.1. untersucht (Abb. 2).

Hämatopoetische KM-Zellen wurden durch direkten Zell-Zell-Kontakt zu den EL08-1D2 Zellklonen besser erhalten als ohne Kontakt (Abb. 9 G-L).

## Ergebnisse

Die Betrachtung der relativen Anteile der Zellpopulationen zeigte vergleichsweise ähnliche Zahlen zwischen Zellen nach Ko-Kultur mit *Mkl*-defizienten EL08-1D2 Zellklonen und ihren Kontrollen. Auch im Vergleich zwischen Ko-Kulturen mit und ohne Membran divergieren die Werte nicht (Abb. 9 A-F).

Die absolute Zellzahl der reiferen Lineage positiven KM-Zellen mit direktem Kontakt zu *Mkl*-defizienten sowie zu den Kontroll-Klonen liegt bei durchschnittlich etwa 41.300 und 54.900 Zellen (Abb. 9 G). Wohingegen die absolute Zellzahl der gleichen Population bei den Ansätzen mit Membran bei etwa 17.000 Zellen lag (Abb. 9 G). Diese Beobachtung zieht sich durch alle Zellpopulationen unter Berücksichtigung der absoluten Zellzahlen:

Die absolute Zellzahl der unreifen Lineage negativen KM-Zellen mit direktem Kontakt zu *Mkl*-defizienten sowie zu den Kontroll-Klonen liegt durchschnittlich zwischen 20.000 und 30.000 Zellen (Abb. 9 H). Wohingegen die absolute Zellzahl bei Ansätzen mit Membran bei etwa 10.000 Zellen lag (Abb. 9 H).

Die Anzahl der Progenitorzellen nach direktem Stroma-Zell-Kontakt lag bei 1100, verglichen mit der gleichen Population ohne Kontakt zu Stromazellen, bei der die Zellzahl etwa 250 betrug (Abb. 9 I).

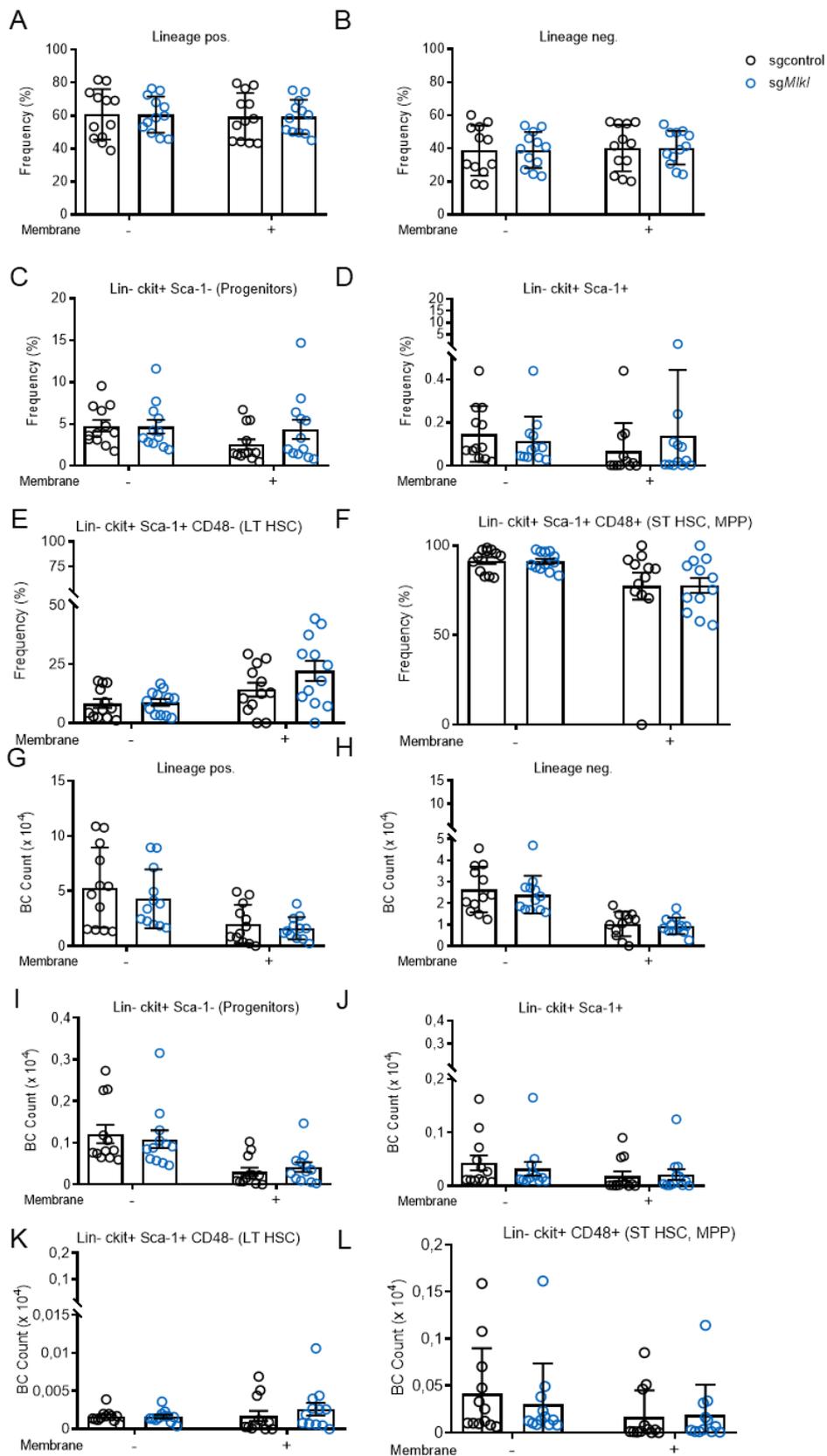
Die absoluten und relativen Zellzahlen der Short-Term HSCs, multipotenten Vorläuferzellen (MPPs) und Long-Term-HSCs waren in der Gesamtpopulation zu niedrig, um aussagekräftige Deutungen formulieren zu können (Abb. 9 E-F, K-L).

In Ko-Kultur 9 konnte kein verändertes Differenzierungsverhalten zwischen KM-Zellen kultiviert mit *Mkl*-defizientem Stroma im Vergleich zur Kultivierung mit Kontroll-Stroma-Zellen festgestellt werden (Abb. 9). Der Effekt der Erhaltung unreifer Lineage negativer Zellen bei Abwesenheit von MLKL in EL08-1D2 Zellen und MSCs konnte in drei Ansätzen reproduziert werden (Abb. 7, 8, 10). Der genaue Grund für die abweichenden Beobachtungen in Ko-Kultur 9 konnten nicht eruiert werden. Womöglich lag es an der abweichenden Zellzahl zu Beginn von Ko-Kultur 9. Vor Kultivierung der KM-Zellen, wurde der Anteil der HSCs mittels FACS ermittelt, um einen Ausgangswert festhalten zu können.

## | Ergebnisse

Dabei wurden ca. 50 HSCs/cm<sup>2</sup> ausgelegt (Tabelle 4). Für Ko-Kulturen 1, 2 und 10 wurde die Zahl der KM-Zellen beachtet und es wurden ca. 3000/cm<sup>2</sup> Zellen gesät. Es besteht die Möglichkeit, dass die Zelldichte der hämatopoetischen Zellen eine ausschlaggebende Rolle spielt. Durch regulative Mechanismen können sich KM-Zellen autoregulieren (Mendelson & Frenette, 2014). Somit würde diese Art der Regulation mit der Interaktion zwischen KM-Zellen und Stroma interferieren und vorherige Beobachtungen überschatten.

## Ergebnisse



**Abbildung 9** Differenzierung hämatopoetischer Zellen in Abhängigkeit von MLKL sowie von Zellkontakt zu EL08-1D2 Stromazellen in Ko-Kultur (A-L).

FACS Analyse von hämatopoetischen Zellen nach 7-tägiger Ko-Kultur mit MLKL-defizienten EL08-1D2 Zellen (4 unabhängige Klone), Leervektorkontrollen (2 unabhängige Klone) oder Non-Targeting Kontrollen (*rfp* und *LacZ*, 2 unabhängige Klone). Die Ko-Kulturen wurden mit und ohne Membran (0,4 µm Porengröße) zwischen KM- und Stromazellen durchgeführt. Es werden relative (A-F) und absolute Häufigkeiten (G-L) gezeigt. Es wurden 3 technische Replikate pro Klon vorgenommen. Alle Werte zeigen den Mittelwert +/- Standardabweichung des Mittelwerts (SEM).

### 4.5. MLKL in Stromazellen führt durch direkten Kontakt zu hämatopoetischen Stammzellen zu deren Differenzierung - Ein Zell-todunabhängiger Mechanismus von MLKL

Für Ko-Kultur Nummer 10 wurden MSCs aus WT oder *Mkl1*<sup>-/-</sup> Mäusen mit gesunden hämatopoetischen Knochenmarkszellen aus WT Mäusen 7 Tage in Kultur genommen. Bei diesem Experiment kam ausschließlich primäres Material zum Einsatz. Die Mäuse für diesen Versuchsansatz waren im Geschlecht und im Alter angepasst. Freundlicherweise wurde die Isolation und Kultivierung der MSCs durch Dr. Rouzanna Istvanffy und Franziska Hettler übernommen. Außerdem wurden für die Hälfte der Versuchsansätze Membranen zur räumlichen Trennung von KM- und mesenchymalen Stammzellen verwendet (siehe auch Tabelle 4).

Für die Auswertung der KM-Zellen durch FACS wurde zunächst die Population der hämatopoetischen Zellen durch den Forward und Side Scatter von anderen Zellen separiert (Abb. 1). Anschließend wurden die Zellen auf ihren Grad der Differenzierung wie in Kapitel 3.2.7.1. untersucht (Abb. 2).

Eine reduzierte KM-Zelldifferenzierung unter Ko-Kultivierung mit *Mkl1*<sup>-/-</sup> MSCs konnte, wie schon in vorherigen Versuchen (Abb. 7 und 8) gesehen, auch in diesem Ansatz beobachtet werden. Alle im Folgenden genannten Zahlenwerte beziehen sich auf Durchschnittswerte. Der Anteil an Lineage positiven Zellen in der Kontrollkultur war signifikant höher als in der Ko-Kultur mit *Mkl1*<sup>-/-</sup> MSCs (Abbildung 10 A). Damit war der Anteil an unreifen Lin negativen Zellen in den

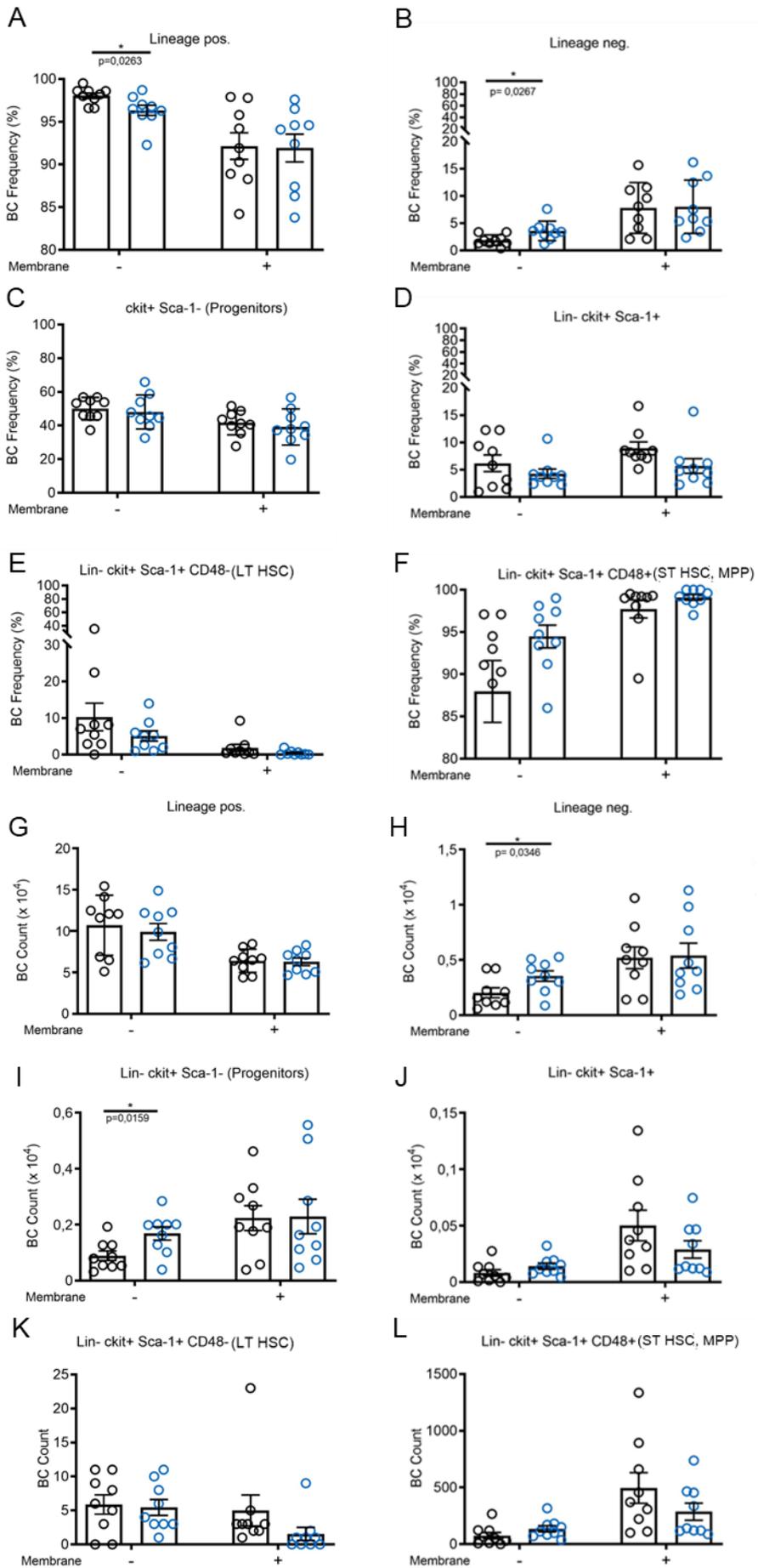
## Ergebnisse

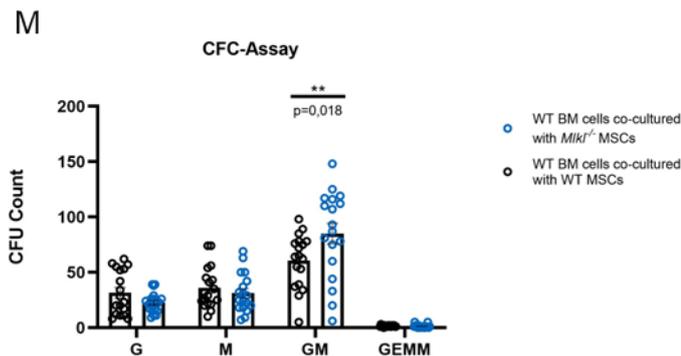
Ko-Kulturen mit *Mikl*<sup>-/-</sup>MSCs mit etwa 3,6% signifikant höher als in der Kontrolle mit 1,9% (Abb.10 B). In absoluten Zahlen waren es 3544 Lin negative Zellen nach Ko-Kultivierung mit *Mikl*<sup>-/-</sup>MSCs. Signifikant niedriger mit 2033 Zellen präsentierte sich die Kontrolle (Abb. 10 H). Dieser Effekt verschwand, sobald KM- und Stromazellen ihren direkten Zell-Zell-Kontakt verloren, indem sie durch eine Membran getrennt worden sind (Abb.10 A-B, G-H). Hier lag der Anteil an Lin positiven Zellen in beiden Ko-Kulturen bei etwa 92% und der Anteil Lin negativer Zellen bei etwa 8%.

Der relative Anteil der Progenitorzellen unterschied sich zwischen den Ko-Kulturen nicht wesentlich mit etwa 48% nach Kultivierung mit *Mikl*<sup>-/-</sup>MSCs und mit 50% in der Vergleichskultur (Abb. 10 C). Die absolute Anzahl an Progenitorzellen mit durchschnittlich 1686 Zellen im *Mikl*<sup>-/-</sup>MSCs Ansatz war allerdings signifikant höher im Vergleich zur Kultur mit WT MSCs mit 892 Zellen (Abb. 10 I). Die Signifikanz verschwand bei Auflösung des Zellkontaktes der beiden Zellarten. Die Anzahl an Progenitorzellen näherten sich in *Mikl*<sup>-/-</sup>MSCs mit 2292 Zellen an die Kontrollgruppe mit 2236 an, sobald der Zellkontakt durch eine Membran getrennt wurde (Abb. 10 I). Durch den niedrigen Anteil an Short Term-HSCs, multipotenten Vorläuferzellen und Long Term HSCs (Abb. 10 K-L), lassen sich keine richtungsweisenden Aussagen treffen.

Das zweite Read-out Verfahren von Ko-Kultur 10, ein CFC-Assay, bestätigte die Beobachtungen der FACS Analysen. Die Zahl der Colony-Forming-Units der Granulozyten und Monozyten (CFU-GMs), die der zweit unreifsten Gruppe entspricht, war nach Ko-Kultivierung mit *Mikl*<sup>-/-</sup>MSCs mit einer Anzahl von durchschnittlich 85 signifikant höher als ihrer Kontrolle mit 61 (Abb. 10 M). Die Anzahl der CFU-GEMMs war klassischerweise niedrig. Diese Auszählung wurde ausschließlich für die Ansätze ohne Membran vorgenommen.

# Ergebnisse





**Abbildung 10: Differenzierung hämatopoetischer Zellen in Abhängigkeit von MLKL sowie von Zellkontakt zu murinen mesenchymalen Stammzellen (A-M).**

FACS Analyse (A-L) und CFC-Assay (M) von hämatopoetischen Zellen nach 7-tägiger Ko-Kultur mit WT und *Mik1*<sup>-/-</sup> MSCs. Die Ko-Kulturen wurden mit und ohne Membran (0,4 µm Porengröße) zwischen KM- und mesenchymalen Stammzellen durchgeführt. Es werden relative (A-F) und absolute Häufigkeiten (G-L) gezeigt. Es wurden 3 biologische und technische Replikate vorgenommen. Alle Werte zeigen den Mittelwert +/- Standardabweichung des Mittelwerts (SEM).

#### 4.6. Differenzierung hämatopoetischer Zellen in Abhängigkeit von Apoptose und Nekroptose in Stromazellen

Um den Effekt von Apoptose- und Nekroptose-Defizienz in Stromazellen auf die gesunde Hämatopoese zu bewerten, wurden Stromazellen, wie in 3.2.7.4 beschrieben, zusätzlich mit verschiedenen Zelltodinhhibitoren vorbehandelt. Der Einfluss der verwendeten Zelltodinhhibitoren auf hämatopoetische KM-Zellen, die sich nicht in Ko-Kulturen befanden, ist in Abbildung 11 A-B dargestellt.

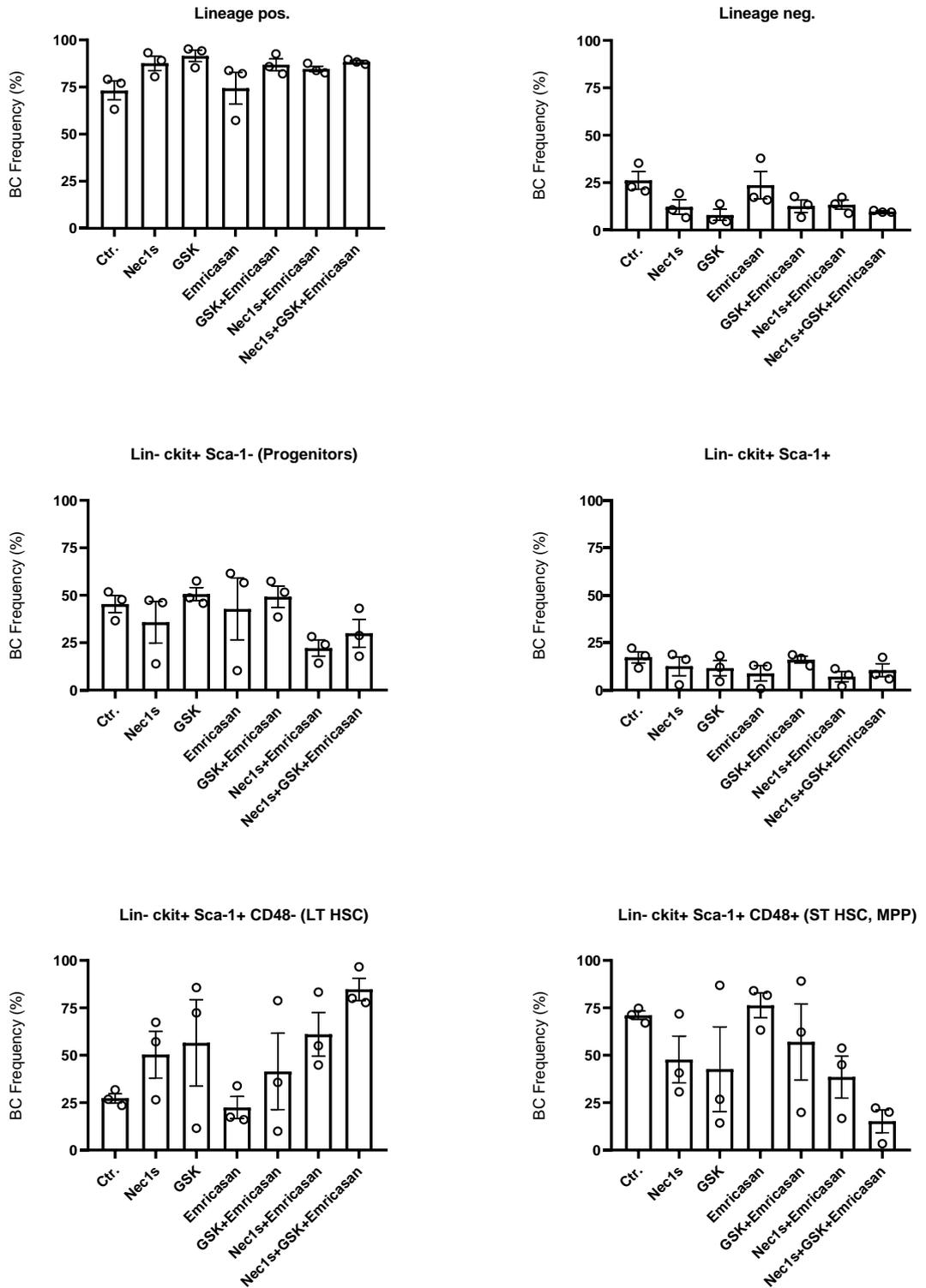
Der Anteil Lineage negativer Zellen ist tendenziell höher in Abwesenheit von MLKL in Stromazellen, unabhängig von der Blockade des Apoptose- oder Nekroptose-Signalwegs (Abb. 11 C-D). Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese einer Nekroptose und RIPK3- unabhängigen Aktivierung und Funktion von MLKL, die sich auch in den vorherigen Experimenten abgezeichnet hat.

Weder Necrostatin-1s, noch GSK oder Emricasan beeinflussen das Überleben oder die Differenzierung von hämatopoetischen Zellen in vitro signifikant (Abb. 11 A-B). Die Anwesenheit von Stromazellen unterstützt den Verbleib in unreiferen Stadien. Der Anteil Lineage-negativer KM-Zellen, die ohne Stroma kultiviert

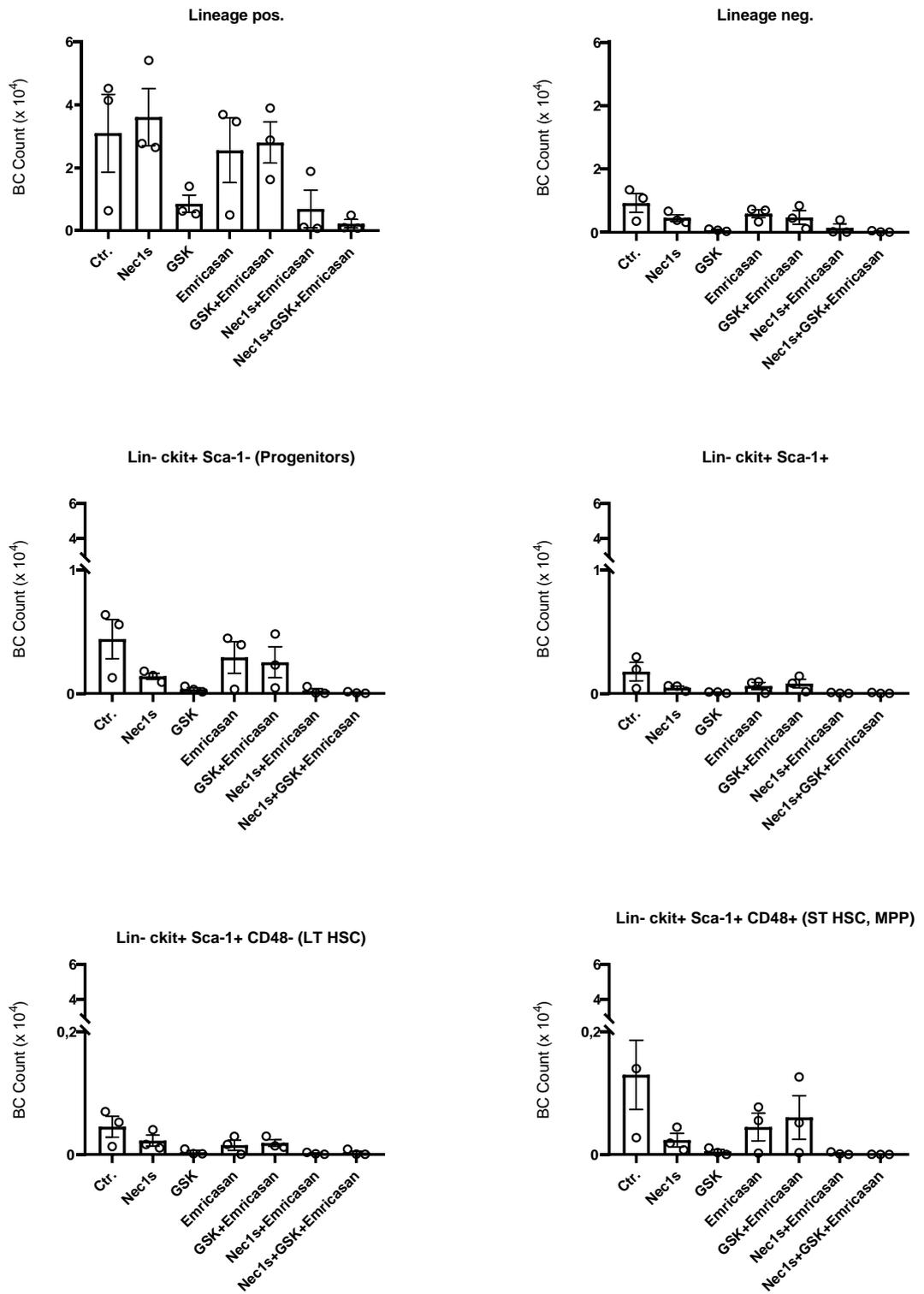
## | Ergebnisse

wurden, ist deutlich geringer im Vergleich zu den anderen beiden Ansätzen mit KM- und Stromazellen zusammen (Abb. 11 A-B).

A



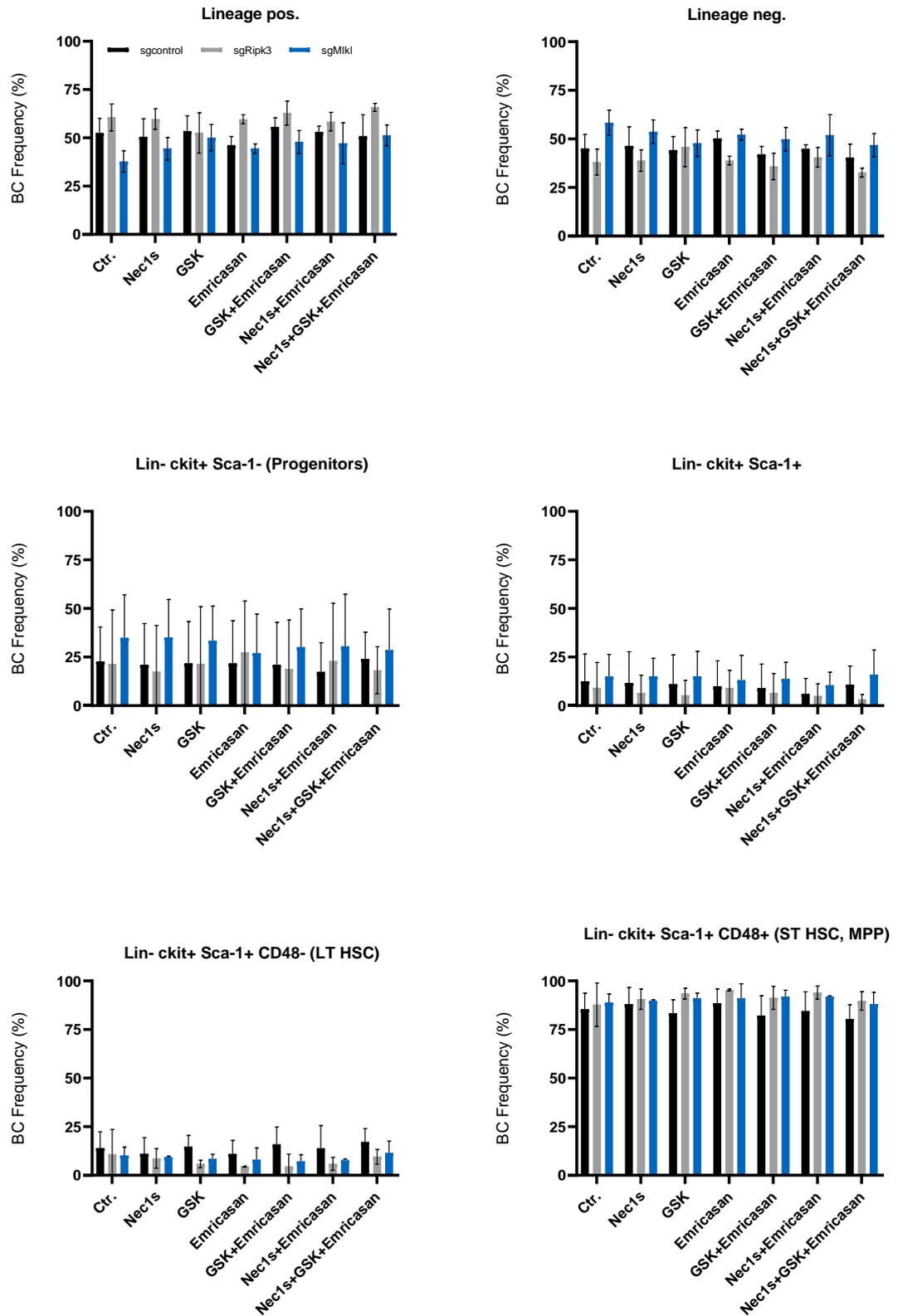
B



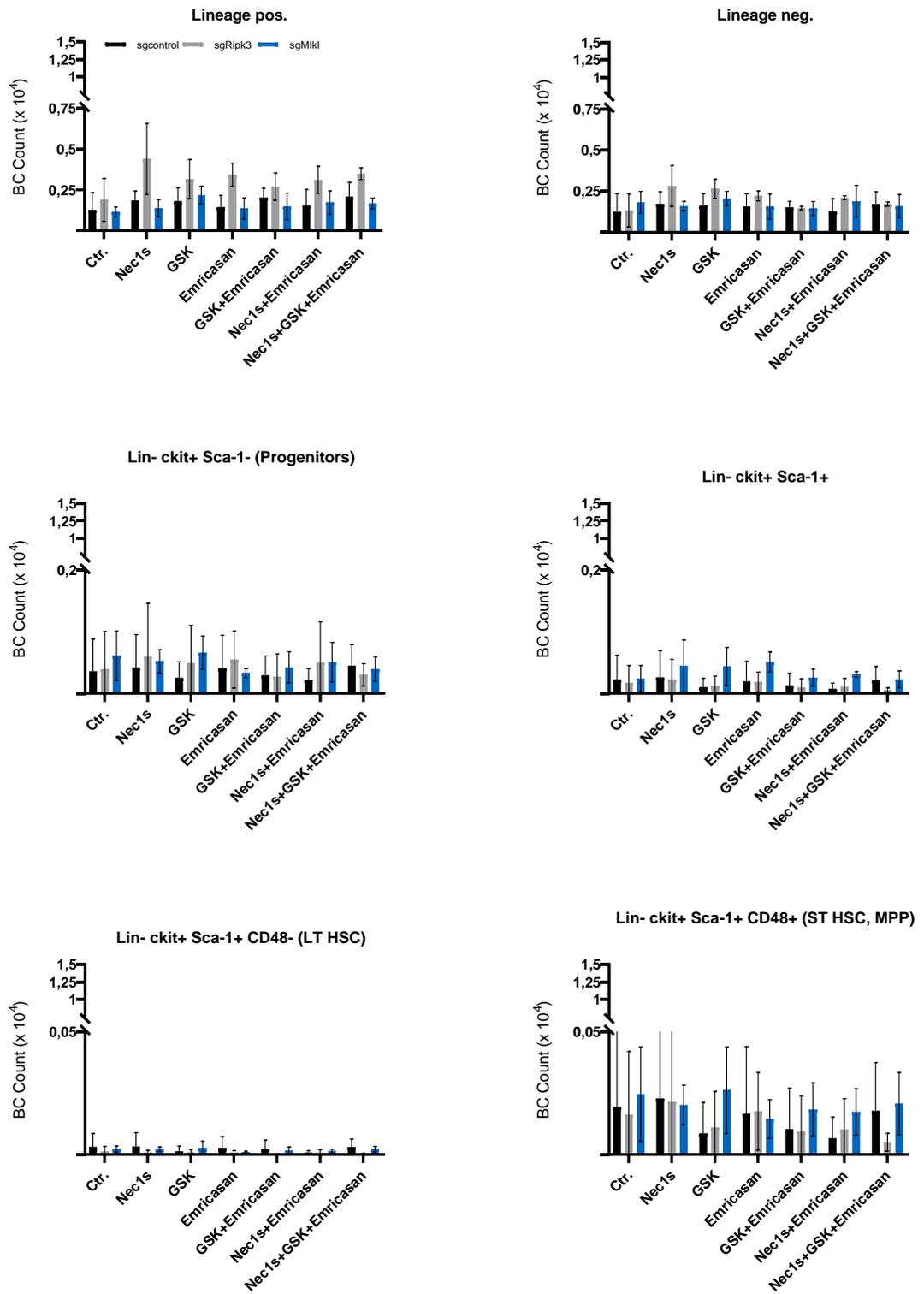
## | Ergebnisse

C

## Ergebnisse

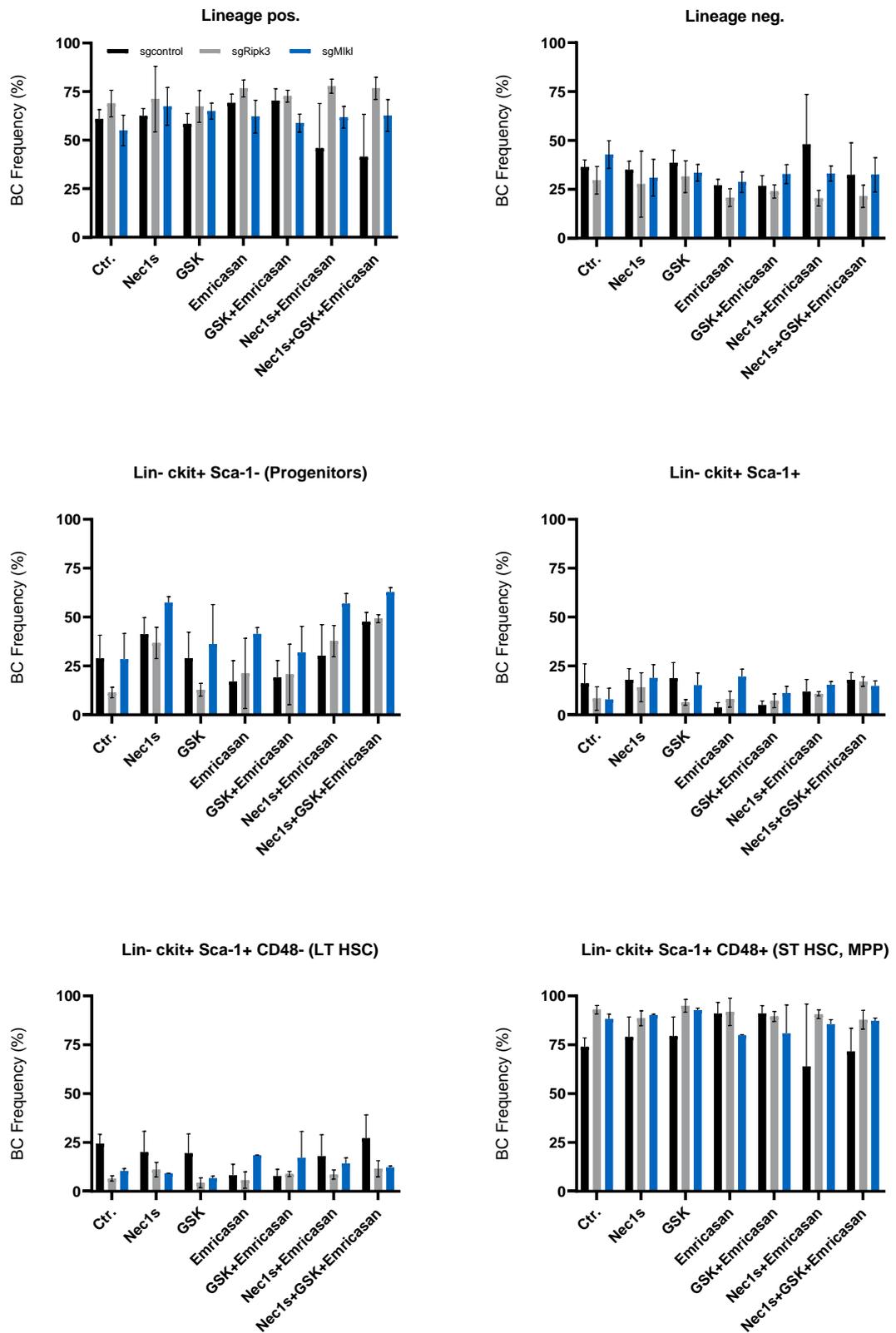


D



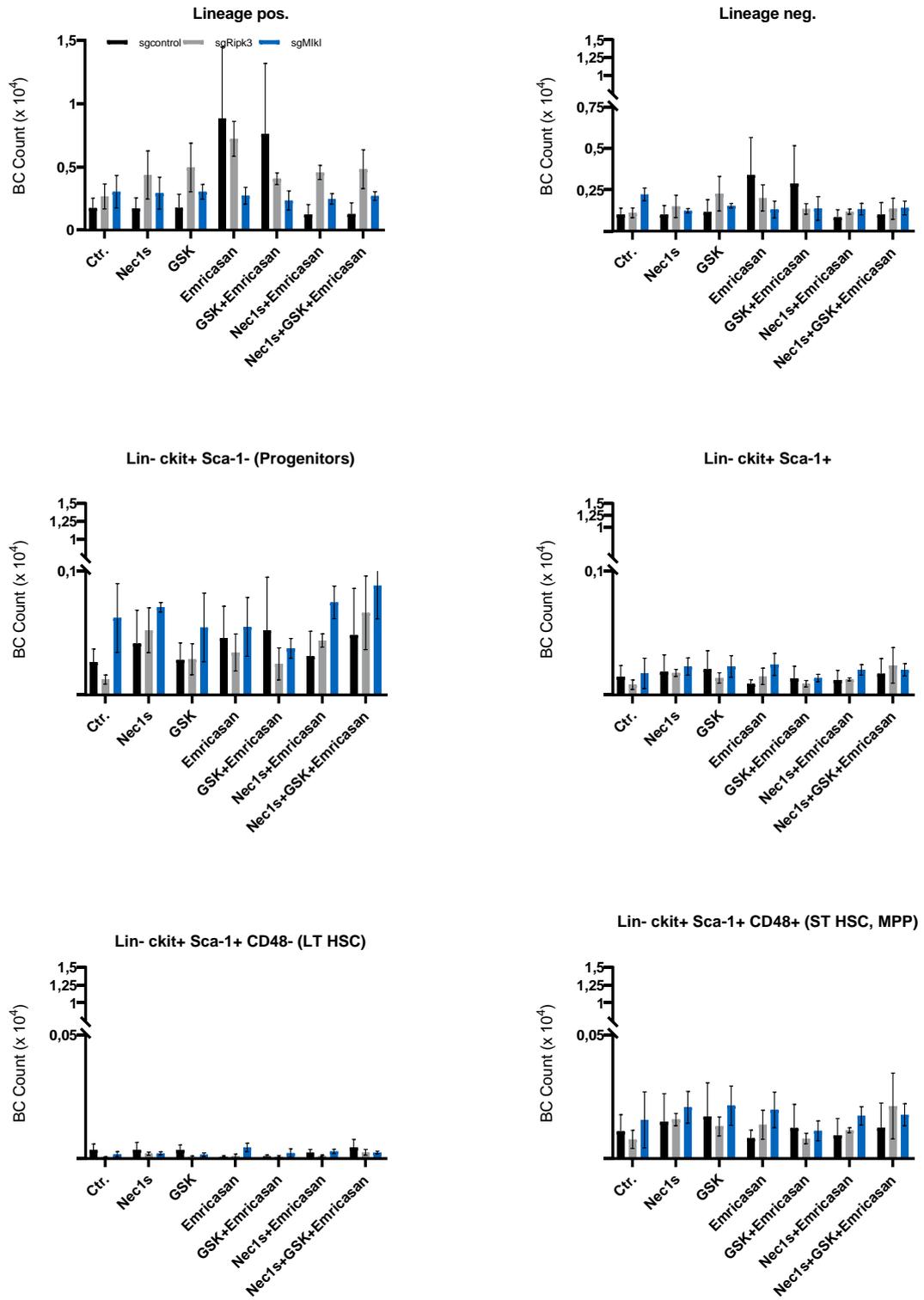
# Ergebnisse

E



# Ergebnisse

F



### **Abbildung 11: Differenzierung hämatopoetischer Zellen in Abhängigkeit von RIPK3 und MLKL in Stromazellen sowie in Anwesenheit verschiedener Zelltodinhhibitoren (A-F).**

FACS Analyse von HSCs, die separat und in Ko-Kulturen mit der Stromazelllinie EL08-1D2 und Zelltodinhhibitoren für 7 Tage ko-kultiviert wurden. Als Zelltodinhhibitoren dienten die RIPK1-Inhibitoren Necrostatin-1 (Nec1s) und GSK, sowie der Caspase-Inhibitor Emricasan. Als Kontrolle diente DMSO. Differenzierung primärer hämatopoetischer Zellen nach 7-tägiger Kultur ohne Stromazellen mit den genannten Inhibitoren. Relative (A) und absolute Häufigkeiten (B). Differenzierung primärer hämatopoetischer Zellen nach 7-tägiger Ko-Kultur mit EL08-1D2 Stromazellen. Die Stromazellen wurden 48 Stunden vor der Ko-Kultur mit den jeweiligen Inhibitoren vorbehandelt. An Tag 0 wurden die Stromazellen mit PBS gewaschen und mit HSCs ko-kultiviert. Es werden relative (C) und absolute (D) Häufigkeiten angegeben. In weiteren Ko-Kulturen wurden die Inhibitoren 24 Stunden vor Ko-Kultivierung mit den Stromazellen versetzt. Die HSCs wurden an Tag 0 hinzugefügt. Die Inhibitoren verblieben 7 Tage im Medium. Es werden relative (E) und absolute Häufigkeiten (F) dargestellt.

## 5. Diskussion

Zunächst soll die Diskussion verschiedene Funktionen von MLKL aufzeigen und eine Einordnung in die aktuelle Literatur ermöglichen. Hierbei wird auf das Ectodomain Shedding, Phosphatidylserin Externalisierung und Komplexbildung mit Disintegrin und Metalloproteasen sowie weitere Nekroptose-unabhängige Funktionen von MLKL eingegangen (Edwards et al., 2008; Gong, Guy, Crawford, et al., 2017; Maretzky T. , 2005; Martens et al., 2021). Darüber hinaus werden Schwachpunkte und scheinbare Widersprüche der Arbeit aufgeführt und diskutiert. (Oostendorp et al., 2005) beschrieb eine Zellkontakt-unabhängige Unterstützung von hämatopoetischen Zellen durch die Stromazelllinie. Im Gegensatz dazu zeigt vorliegende Arbeit einen Vorteil bei direktem Kontakt beider Zellarten. Des Weiteren wird auf die uneindeutigen Ergebnisse bei der Wechselwirkung zwischen Stroma und LSCs eingegangen. Abschließend wird die Bedeutung von MLKL im klinischen Zusammenhang und ein Ausblick dargelegt.

### 5.1. Vielseitige Funktionen von MLKL und ihr Einfluss auf die Plasmamembran

Die vorliegende Dissertation lässt eine bisher unbekannte und Nekroptose-unabhängige Funktion der Pseudokinase MLKL vermuten (Abb. 7, 8, 10). Auch wenn MLKL für seine ausführende Rolle als „Executor Protein“ der Nekroptose“ bekannt ist (Lalaoui & Brumatti, 2017), bleiben Mechanismen downstream des Proteins weitgehend unerforscht (Conrad et al). In der Fachliteratur werden immer mehr neue Nekroptose-unabhängige Funktionen von MLKL beschrieben, wie Rezeptor-Internalisierung, Ligand-Rezeptor Degradation, Endosomal Trafficking, die Bildung extrazellulärer Vesikel, Autophagy, Axonreparaturmechanismen und die Regulation des Inflammasoms (Martens et al., 2021).

Ein wesentlicher Effekt von MLKL auf die Differenzierung hämatopoetischer Zellen wurde durch (Wang et al., 2021) im Rahmen der AML beschrieben. Hier

konnte eine Verstärkte Differenzierung der hämatopoetischen Progenitorzellen in Anwesenheit von MLKL gezeigt werden.

Die verstärkte Differenzierung der hämatopoetischen Zellen bei Anwesenheit von MLKL in Stromazellen (Abb. 7, 8, 10) und der Verlust dieses Effektes bei Trennung des direkten Zellkontaktes zwischen HSCs und Stroma durch eine kollagenbeschichtete Membran (0,4 µm Porengröße) deuten auf eine MLKL-abhängige Zell-Zell-Interaktion hin. Frühere Erkenntnisse beschreiben die Komplexbildung von MLKL mit der Disintegrin und Metalloprotease ADAM10, die zu Ectodomain-Shedding führt und somit extrazelluläre Domänen proteolytisch von der Zelloberfläche abtrennt (Edwards et al., 2008; Maretzky T. , 2005). Anoctamin-6, ein Phospholipid mit Scramblasefunktion, reguliert ADAM abhängiges Ectodomain-Shedding (Nagata et al., 2016; Veit et al., 2018). Dies lässt ein Membranprotein in Stromazellen vermuten, das durch MLKL Aktivierung von der Plasmamembran abgespalten wird. Unsere Daten weisen darauf hin, dass MLKL u.a. ein bisher unbekanntes Membranprotein der Stromazellen spalten könnte. Dieses Protein führt zu einer verstärkten Differenzierung von HSPCs (Abb. 7, 8, 10). Unsere Ergebnisse lassen sich gut mit den Erkenntnissen von (Cai et al., 2016) vereinbaren. Vom Ectodomain-Shedding sind u.a. Proteine der Zelloberfläche wie Cadherine, Rezeptoren, Wachstumsfaktoren und Zytokine (Reiss K & P., 2009) betroffen. Allerdings setzen Cai et al. diese MLKL Funktion in Zusammenhang mit Nekroptose, indem sie den gesamten Signalweg mittels TNF, SMAC-Mimetika und dem Apoptose-Inhibitor z-VAD-fmk induzieren. Die Ergebnisse vorliegender Arbeit zeigen hingegen, dass bei Nekroptose-defizienz durch *Ripk3*<sup>-/-</sup> das Differenzierungsverhalten der HSPCs unverändert bleibt (Abb. 7, 8).

In einer Zusammenschau der aktuellen Publikationen können zwei Möglichkeiten diskutiert werden. Zum einen kann MLKL im Rahmen der Nekroptose, aber unabhängig von RIPK3, von einer bisher unbekanntem Protein-Kinase aktiviert werden. (Petrie et al., 2017) und (Tanzer et al., 2015) berichten über eine MLKL-Phosphorylierungsstelle S158 zusätzlich zur bekannten durch RIPK3 induzierbaren Phosphorylierungsstelle. Zum anderen kann es sich um eine von RIPK3 und der Nekroptose völlig unabhängigen Funktion von MLKL handeln.

## Diskussion

Beide der aufgeführten Optionen führen zur Modifikation der Plasmamembran betroffener Zellen. Sei es die Phosphatidylserin Externalisierung (Gong, Guy, Crawford, et al., 2017; Martin et al., 1995; Segawa et al., 2014; Suzuki et al., 2013; Zargarian et al., 2017), die in Kapitel 2 diskutiert wurde, oder die Komplexbildung von MLKL mit Disintegrin und Metalloprotease ADAM10 (Edwards et al., 2008).

Die RIPK3-unabhängige Aktivierung von MLKL wird in verschiedenen Arbeiten präsentiert. Eine RIPK3-unabhängige Initiierung von Nekroptose in Hepatozyten mit aktivem RIPK1 und MLKL wird in einer Arbeit zu Hepatitis beschrieben (Günther et al., 2016). Die Transkription und Freisetzung von Chemokinen wie CXCL1 und 10 erfolgt durch MLKL Aktivierung, indem N-Termini RIPK3-unabhängig dimerisieren (Gong, Guy, Crawford, et al., 2017). Hierfür wurde hMLKL<sup>1-181</sup>-2Fv in NIH 3T3 Zellen aktiviert. Da die Zellen kein RIPK3 exprimieren, wurde auf die Unabhängigkeit von RIPK3 geschlossen. In RIPK3-defizienten HeLa und HepG2 Zellen wurde gezeigt, dass MLKL zu einer leichten Reduktion von TNF-Rezeptor 1 Präsentation nach TNF Bindung führte (Yoon et al., 2017). Diese Ergebnisse passen zur Hypothese des Ectodomain-Sheddings durch MLKL (Cai et al., 2016; Edwards et al., 2008).

MLKL-Depletion vermindert die Freisetzung von Entzündungsmediatoren in der Nische. Das fördert die gesunde Hämatopoese stärker als die leukämische. Sicherlich ist dies nur einer von zahlreichen Mechanismen innerhalb der Knochenmarksnische. Sobald sich Parameter wie der Anteil der leukämischen Zellen in der KM-Nische ändert, können weitere Regulationsmechanismen aktiviert werden. Durch einen höheren Anteil an LICs konnte sich die leukämische Hämatopoese trotz MLKL-Depletion durchsetzen (Abb.7).

Unabhängig von MLKL und seiner Funktion in der Nische, ergaben sich zahlreiche Hinweise auf andere Funktionen des Proteins. Ergebnisse von (Yoon et al., 2017) zeigten, dass MLKL zur zellulären Kommunikation beiträgt. Es fördert Endosomal-Trafficking in Zellen und die Synthese von Intraluminal-Vesicles (ILV). ILVs akkumulieren innerhalb der Zelle zu Multi-Vesicular-Bodies (MVBs) (Katzmann et al., 2002; Peng, 2021). MLKL Depletion führte in HepG2 Zellen zu

einer Reduktion von MVBs. Durch Behandlung der Zellen mit Ionomycin, das die Exosomfreisetzung fördert, konnte gezeigt werden, dass es sich um die defiziente ILV Synthese handelte (Colombo et al., 2014). Die Abwesenheit von RIPK1 und RIPK3 beeinflusste die Zahl der MVBs nicht. Das weist darauf hin, dass diese MLKL Funktion unabhängig von der Phosphorylierung durch RIPK3 ist (Yoon et al., 2017). Weitere Hinweise, dass MLKL essenziell für die Zell-Zell-Kommunikation ist, liefert (Gong, Guy, Olauson, et al., 2017). Durch Verzögerung des Zelltods, werden Signale und Entzündungsmediatoren für umgebende Zellen synthetisiert. Verantwortlich dafür ist ESCRT-III, das downstream von MLKL agiert und Nekroptose sowie die Zerstörung der Plasmamembran verzögert (Gong, Guy, Olauson, et al., 2017).

### 5.2. Zellkontakt-abhängige Unterstützung hämatopoetischer Zellen als scheinbarer Widerspruch zur bisherigen Literatur

Weitere Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass EL08-1D2 Zellen murine hämatopoetische Zellen durch direkten Zellkontakt erhalten. Vor allem die höhere Zellzahl in Ko-Kulturen mit direktem Zellkontakt (Abb. 9, 10) sprach dafür. Oostendorp et al. publizierte, dass HSCs auch ohne direkten Zellkontakt zu EL08-1D2 Zellen in Langzeitkulturen unterstützt wurden. Die Arbeitsgruppe untersuchte vor allem die Unterstützung von humanen HSCs. Die Ko-Kulturen stellten Langzeitkulturen über mindestens 4 Wochen dar. Durch die verschiedenen Fragestellungen beider Arbeiten und den genannten Unterschieden im Versuchsaufbau (humane und murine HSCs, Kurzeit- gegen Langzeitkultur) schließen sich beide Erkenntnisse nicht aus.

### 5.3. Wechselwirkung zwischen Stroma und LSCs in der Nische

Die Betrachtung der leukämischen Hämatopoese und deren Wechselwirkung mit Stromazellen zeigte die Unterstützung von AML-ETO transduzierten Knochenmarkszellen (Abb. 7). In Ko-Kultur 1 wurden leukämische HSCs durch

MLKL im Stroma unterstützt (Abb. 7). Dieser Effekt war in weiteren Versuchsansätzen (Abb. 8) nicht reproduzierbar. Die unterschiedlichen Ergebnisse können auf die Versuchsdurchführung und die Geräteeinstellungen zurückgeführt werden. Vor Beginn der ersten Ko-Kultur wurde das retroviral infizierte KM-Zellgemisch auf GFP-Positivität sortiert. Dabei dienten die GFP-negativen Zellen, also die nicht mit AML-ETO infizierten Zellen, als gesunde Kontrolle. Die Einstellung des Fluss-Sortierers war aufgrund der niedrigen Zellzahl „Yield“. Für spätere Experimente wurde für eine höhere Präzision die Einstellung „Purity“ verwendet (Abb. 7). Es kann demnach davon ausgegangen werden, dass in Ko-Kultur 1 fälschlicherweise einige gesunde GFP-negative Zellen in den AML-ETO Ansatz sortiert wurden (Abb. 7). Ist der Anteil der gesunden KM-Zellen zu hoch, kann es zur Konkurrenz zwischen leukämischer und gesunder Hämatopoese und anschließender Verdrängung einer Population kommen. Die gesunden KM-Zellen können sich durchsetzen und leukämische Zellen verdrängen (Boyd et al., 2014). Um das Phänomen der Verdrängung der leukämischen Hämatopoese verifizieren, sollten in Ko-Kulturen 4 bis 6 gesunde und leukämische KM-Zellen zu unterschiedlichen Anteilen gemischt und ausgewertet werden. Da für die Versuche der ebenfalls GFP markierte Vektor pMIG als Kontrolle verwendet wurde, konnten gesunde und leukämische Populationen im FACS nicht mehr eindeutig unterschieden werden. Um eine Verifizierung zu ermöglichen, sollten in weiteren Ansätzen Marker wie mCherry anstelle von GFP für den Vektor verwendet werden.

Dieses Phänomen würde die Abwesenheit leukämischer Zellen im AML-ETO Ansatz erklären, lässt aber offen warum es lediglich bei MLKL-defizientem Stroma zu sehen war (Abb. 7). Es bekräftigt die Hypothese, dass MLKL Nekroptose bzw. RIPK3-unabhängig zu einem pro-inflammatorischen Mikromilieu im Knochenmark beiträgt. Dysregulationen in der Knochenmarksnische durch veränderte Signale von Nischenzellen wie MSCs und Osteoblasten (Schepers et al., 2015) können zur Inflammation und zur Förderung leukämischer Hämatopoese führen (Lane et al., 2009; Schepers et al., 2013).

#### 5.4. Klinische Bedeutung von MLKL und Ausblick

Die vorliegende Arbeit gibt Hinweise auf eine pro-inflammatorische und RIPK3-unabhängige Wirkung von MLKL in der KM-Nische. Einerseits trägt MLKL somit zur verstärkten Differenzierung hämatopoetischer Zellen bei. Andererseits schafft MLKL ein inflammatorisches Mikromilieu, das die leukämische Hämatopoese unterstützt. Außerdem reagieren Tumorzellen mit hoher MLKL Expression sensibler auf Chemotherapeutika (Ratovitski, 2015).

Den unmittelbar an MLKL anschließenden Mechanismus und die hierbei aktivierten Komponenten gilt es herauszufinden. RNA-Sequenzierung der Versuchsansätze nach Ko-Kulturen, Western Blots zur Sicherung auf Proteinebene oder eine massenspektrometrische Analyse wären denkbare Ansätze. Für weitere Nachforschungen dient der MLKL Inhibitor Necrosulfonamid (NSA) als nützliches Werkzeug verschiedene Signalwege voneinander zu trennen (Sun et al., 2012). Der Einsatz von NSA zeigte in Ko-Kulturen eine reduzierte Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen (Zhu et al., 2018).

Mit der bisherigen Erkenntnis und weiteren Versuchen kann es ermöglicht werden die gezielte Modulation von MLKL im LSC-Mikromilieu therapeutisch zu nutzen.

## 6. Zusammenfassung und Ausblick

Diese Dissertation beleuchtet die Bedeutung der regulierten Nekrose in der Knochenmark-Nische für die Pathogenese der akuten myeloischen Leukämie. Hierbei stellte sich die herausragende Rolle von MLKL, einem Protein, das an der Nekroptose beteiligt ist, dar. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass MLKL in der Knochenmark-Nische zum einen die Differenzierung der hämatopoetischen Knochenmarkzellen fördert. Zum anderen kann MLKL die leukämische Hämatopoese durch Erzeugung eines pro-inflammatorischen Milieus unterstützen.

Akute myeloische Leukämie entsteht durch unkontrollierte Proliferation früher hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen (Boyd et al., 2014), den sogenannten leukämischen Stammzellen. Die Funktion gesunder HSZs wird durch komplexe Wechselwirkungen mit KM-Nische sowohl aufrechterhalten als auch reguliert (Wei & Frenette, 2018). Während die steuernden Faktoren zwischen hämatopoetischen Zellen und ihrer gesunden KM-Nische weitgehend verstanden sind, bleiben die Wechselwirkungen von leukämischen Stammzellen mit ihrer Nische weitgehend unerforscht.

Es zeigte sich, dass die Deregulation der Nische ein wichtiger Faktor bei der Entwicklung myeloischer Malignitäten ist (Raaijmakers et al., 2010). Zudem hat unser Labor die zentrale Rolle der Nekroptose für die Differenzierung und das Überleben von LSCs in der AML dargestellt (Höckendorf et al., 2016).

Zielsetzung war herauszufinden wie einzelne Proteine, die bei der Nekroptose beteiligt sind, wie TNF Lymphotoxin- $\alpha$ , RIPK3 und MLKL (Conrad et al., 2016), die Differenzierung und das Überleben von hämatopoetischen Zellen über das Knochenmarkmikromilieu beeinflussen.

Zunächst wurden Nekroptose-defiziente Stromazelllinien EL08-1D2 (Oostendorp et al., 2002) mittels CRISPR/Cas9 System, durch Deletion von Tnf, Lymphotoxin- $\alpha$ , Ripk3 und Mlkl, generiert. Dafür wurden Vektoren mit der Zielsequenz hergestellt. Mittels Calcium-Phosphat Transfektion wurden die GFP-markierten Vektoren in die EL08-1D2 Stromazellen eingebracht. Durch Single Cell Sorting wurden GFP-positive Zellen separiert und zu klonalen Zelllinien expandiert. Western Blots sicherten die Abwesenheit auf Proteinebene.

## Zusammenfassung und Ausblick

Die monoklonalen Stromazelllinien wurden mit gesundem und AML-Knochenmark ko-kultiviert, um den Effekt der Nekroptose im Stroma auf die Hämatopoese zu beleuchten. Zelltod und Differenzierung der KM-Zellen wurden durchflusszytometrisch analysiert. Einen zusätzlichen deskriptiven Faktor stellte die Koloniebildungsfähigkeit der hämatopoetischen Zellen des KMs dar. Die Zellen wurden nach der Ko-Kultur in CFC-Assays überführt.

Wenn KM-Zellen mit *Mkl*-defizientem Stroma ko-kultiviert werden, zeigen Daten dieser Arbeit, dass es zu einer verringerten Differenzierung von KM-Zellen kommt. Diese Beobachtung ist unabhängig davon, ob das KM gesund oder leukämisch ist. Außerdem scheint MLKL in Stromazellen AML-ETO transduzierte KM-Zellen zu unterstützen.

Um herauszufinden, ob der beobachtete Effekt zellkontakt-abhängig ist, wurden Ko-Kulturen mit Membranen durchgeführt, die KM und Stroma voneinander trennen. Die Differenzierung der HSZs ist MLKL abhängig und wird durch den direkten Zellkontakt mit den Stromazellen gefördert.

Die vorliegende Dissertation gibt Hinweise auf eine pro-inflammatorische und RIPK3-unabhängige Wirkung von MLKL in der KM-Nische. Diesen bisher unbekanntem Mechanismus downstream von MLKL gilt es noch herauszufinden. Eine RNA-Sequenzierung der Zellen nach Ko-Kulturen könnte die nötigen Hinweise erbringen. Western Blots sichern die Ergebnisse auf Proteinebene. Die Isolierung von Membranproteinen und deren massenspektrometrische Analyse wäre ebenfalls ein denkbarer Ansatz. Um die Hypothese abschließend zu sichern, können erneut Stromazellklone mittels CRISPR/Cas9 mit dem entsprechenden Zielgen generiert und ko-kultiviert werden. Mit den Erkenntnissen dieser Arbeit und weiteren Nachforschungen könnte es in Zukunft gelingen, durch gezielte Modulation von MLKL in der KM-Nische den Verlauf der AML positiv zu beeinflussen. Erste in-vitro Ansätze, die MLKL-exprimierende Vektoren verwenden, um Nekroptose in Tumorzellen zu initiieren, sind bekannt (Van Hoecke et al., 2020).

## 7. Literaturverzeichnis

Asada, N., Katayama, Y., Sato, M., Minagawa, K., Wakahashi, K., Kawano, H., Kawano, Y., Sada, A., Ikeda, K., Matsui, T., & Tanimoto, M. (2013, Jun 6). Matrix-embedded osteocytes regulate mobilization of hematopoietic stem/progenitor cells. *Cell Stem Cell*, 12(6), 737-747. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.05.001>

Asari, S., Itakura, S., Ferreri, K., Liu, C. P., Kuroda, Y., Kandeel, F., & Mullen, Y. (2009, May). Mesenchymal stem cells suppress B-cell terminal differentiation. *Exp Hematol*, 37(5), 604-615. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2009.01.005>

Bartholomew A, S. C., Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, Hardy W., Devine S, Ucker D, Deans R, Moseley A, Hoffman R. (2002). Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Experimental Hematology*, 30, 42-48.

Bennett, J. H. (1845). Leucocythemia. clinical lectures on the principles and practice of medicine. *last Edinburgh edition New York : Samuel S. & Wood W.; 1860*, p. 814–844.

Bergfeld, S. A., & DeClerck, Y. A. (2010, Jun). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells and the tumor microenvironment. *Cancer Metastasis Rev*, 29(2), 249-261. <https://doi.org/10.1007/s10555-010-9222-7>

Beutler, E. (2001). The treatment of acute leukemia past, present, and future. *Leukemia*, 15, 658–661.

Bose, P., & Konopleva, M. Y. (2018, Mar 12). ORY-1001: Overcoming the Differentiation Block in AML. *Cancer Cell*, 33(3), 342-343. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.02.014>

Boyd, A. L., Campbell, C. J., Hopkins, C. I., Fiebig-Comyn, A., Russell, J., Ulemek, J., Foley, R., Leber, B., Xenocostas, A., Collins, T. J., & Bhatia, M. (2014, Sep 22). Niche displacement of human leukemic stem cells uniquely allows their competitive replacement with healthy HSPCs. *J Exp Med*, 211(10), 1925-1935. <https://doi.org/10.1084/jem.20140131>

Bruns, I., Lucas, D., Pinho, S., Ahmed, J., Lambert, M. P., Kunisaki, Y., Scheiermann, C., Schiff, L., Poncz, M., Bergman, A., & Frenette, P. S. (2014, Nov). Megakaryocytes regulate hematopoietic stem cell

quiescence through CXCL4 secretion. *Nat Med*, 20(11), 1315-1320. <https://doi.org/10.1038/nm.3707>

Cai, Z., Jitkaew, S., Zhao, J., Chiang, H. C., Choksi, S., Liu, J., Ward, Y., Wu, L. G., & Liu, Z. G. (2014, Jan). Plasma membrane translocation of trimerized MLKL protein is required for TNF-induced necroptosis. *Nat Cell Biol*, 16(1), 55-65. <https://doi.org/10.1038/ncb2883>

Cai, Z., Zhang, A., Choksi, S., Li, W., Li, T., Zhang, X. M., & Liu, Z. G. (2016, Aug). Activation of cell-surface proteases promotes necroptosis, inflammation and cell migration. *Cell Res*, 26(8), 886-900. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.87>

Carey, A., Edwards, D. K. t., Eide, C. A., Newell, L., Traer, E., Medeiros, B. C., Pollyea, D. A., Deininger, M. W., Collins, R. H., Tyner, J. W., Druker, B. J., Bagby, G. C., McWeeney, S. K., & Agarwal, A. (2017, Mar 28). Identification of Interleukin-1 by Functional Screening as a Key Mediator of Cellular Expansion and Disease Progression in Acute Myeloid Leukemia. *Cell Rep*, 18(13), 3204-3218. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.03.018>

Casanova-Acebes, M., Pitaval, C., Weiss, L. A., Nombela-Arrieta, C., Chevre, R., N, A. G., Kunisaki, Y., Zhang, D., van Rooijen, N., Silberstein, L. E., Weber, C., Nagasawa, T., Frenette, P. S., Castrillo, A., & Hidalgo, A. (2013, May 23). Rhythmic modulation of the hematopoietic niche through neutrophil clearance. *Cell*, 153(5), 1025-1035. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.040>

Chen, X., Li, W., Ren, J., Huang, D., He, W. T., Song, Y., Yang, C., Li, W., Zheng, X., Chen, P., & Han, J. (2014, Jan). Translocation of mixed lineage kinase domain-like protein to plasma membrane leads to necrotic cell death. *Cell Res*, 24(1), 105-121. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.171>

Chow, A., Lucas, D., Hidalgo, A., Mendez-Ferrer, S., Hashimoto, D., Scheiermann, C., Battista, M., Leboeuf, M., Prophete, C., van Rooijen, N., Tanaka, M., Merad, M., & Frenette, P. S. (2011, Feb 14). Bone marrow CD169+ macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche. *J Exp Med*, 208(2), 261-271. <https://doi.org/10.1084/jem.20101688>

Christopher, M. J., Rao, M., Liu, F., Woloszynek, J. R., & Link, D. C. (2011, Feb 14). Expression of the G-CSF receptor in monocytic cells is sufficient to mediate hematopoietic progenitor mobilization by G-CSF in mice. *J Exp Med*, 208(2), 251-260. <https://doi.org/10.1084/jem.20101700>

Civin, C. I., Trischmann, T., Kadan, N. S., Davis, J., Noga, S., Cohen, K., Duffy, B., Groenewegen, I., Wiley, J., Law, P., Hardwick, A., Oldham, F., &

- Gee, A. (1996). Highly purified CD34-positive cells reconstitute hematopoiesis. *Journal of Clinical Oncology*, 14, 2224-2233.
- Colombo, M., Raposo, G., & Thery, C. (2014). Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 30, 255-289. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122326>
- Conrad, M., Angeli, J. P., Vandenabeele, P., & Stockwell, B. R. (2016, May). Regulated necrosis: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov*, 15(5), 348-366. <https://doi.org/10.1038/nrd.2015.6>
- Corcione, A., Benvenuto, F., Ferretti, E., Giunti, D., Cappiello, V., Cazzanti, F., Risso, M., Gualandi, F., Mancardi, G. L., Pistoia, V., & Uccelli, A. (2006, Jan 1). Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *BLOOD*, 107(1), 367-372. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-07-2657>
- Coussens, L. M., and Werb, Z. . (2002). Inflammation and cancer. *Nature*, 420, 860-867.
- Dai, J., Zhang, C., Guo, L., He, H., Jiang, K., Huang, Y., Zhang, X., Zhang, H., Wei, W., Zhang, Y., Lu, L., & Hu, J. (2020, Apr 24). A necroptotic-independent function of MLKL in regulating endothelial cell adhesion molecule expression. *Cell Death Dis*, 11(4), 282. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2483-3>
- De Kouchkovsky, I., & Abdul-Hay, M. (2016, Jul 1). 'Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update'. *Blood Cancer J*, 6(7), e441. <https://doi.org/10.1038/bcj.2016.50>
- Di Nicola M, C.-S. C., Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S and Gianni AM. (2002). Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *BLOOD*, 99, 3838–3843.
- Di Rosa, F., & Santoni, A. (2002). Bone marrow CD8 T cells are in a different activation state than those in lymphoid periphery. *Eur. J. Immunol.* , 32, 1873-1880.
- Ding, L., & Morrison, S. J. (2013, Mar 14). Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. *Nature*, 495(7440), 231-235. <https://doi.org/10.1038/nature11885>
- Ding, L., Saunders, T. L., Enikolopov, G., & Morrison, S. J. (2012, Jan 25). Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature*, 481(7382), 457-462. <https://doi.org/10.1038/nature10783>

- Dittmer, A., Hohlfeld, K., Lutzkendorf, J., Muller, L. P., & Dittmer, J. (2009, Sep). Human mesenchymal stem cells induce E-cadherin degradation in breast carcinoma spheroids by activating ADAM10. *Cell Mol Life Sci*, 66(18), 3053-3065. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0089-0>
- Dondelinger, Y., Declercq, W., Montessuit, S., Roelandt, R., Goncalves, A., Bruggeman, I., Hulpiau, P., Weber, K., Schon, C. A., Marquis, R. W., Bertin, J., Gough, P. J., Savvides, S., Martinou, J. C., Bertrand, M. J., & Vandenameele, P. (2014, May 22). MLKL compromises plasma membrane integrity by binding to phosphatidylinositol phosphates. *Cell Rep*, 7(4), 971-981. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.04.026>
- Duprez, L., Takahashi, N., Van Hauwermeiren, F., Vandendriessche, B., Goossens, V., Vanden Berghe, T., Declercq, W., Libert, C., Cauwels, A., & Vandenameele, P. (2011, Dec 23). RIP kinase-dependent necrosis drives lethal systemic inflammatory response syndrome. *Immunity*, 35(6), 908-918. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.09.020>
- Dwyer, R. M., Potter-Beirne, S. M., Harrington, K. A., Lowery, A. J., Hennessy, E., Murphy, J. M., Barry, F. P., O'Brien, T., & Kerin, M. J. (2007, Sep 1). Monocyte chemotactic protein-1 secreted by primary breast tumors stimulates migration of mesenchymal stem cells. *Clin Cancer Res*, 13(17), 5020-5027. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0731>
- Edwards, D. R., Handsley, M. M., & Pennington, C. J. (2008, Oct). The ADAM metalloproteinases. *Mol Aspects Med*, 29(5), 258-289. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.001>
- Fang, S., & Salven, P. (2011, Feb). Stem cells in tumor angiogenesis. *J Mol Cell Cardiol*, 50(2), 290-295. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2010.10.024>
- Frenette, P. S., Pinho, S., Lucas, D., & Scheiermann, C. (2013). Mesenchymal stem cell: keystone of the hematopoietic stem cell niche and a stepping-stone for regenerative medicine. *Annu Rev Immunol*, 31, 285-316. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095919>
- Glaser, S. P., Lee, E. F., Trounson, E., Bouillet, P., Wei, A., Fairlie, W. D., Izon, D. J., Zuber, J., Rappaport, A. R., Herold, M. J., Alexander, W. S., Lowe, S. W., Robb, L., & Strasser, A. (2012, Jan 15). Anti-apoptotic Mcl-1 is essential for the development and sustained growth of acute myeloid leukemia. *Genes Dev*, 26(2), 120-125. <https://doi.org/10.1101/gad.182980.111>
- Gong, Y. N., Guy, C., Crawford, J. C., & Green, D. R. (2017, Oct 2). Biological events and molecular signaling following MLKL activation during

- necroptosis. *Cell Cycle*, 16(19), 1748-1760.  
<https://doi.org/10.1080/15384101.2017.1371889>
- Gong, Y. N., Guy, C., Olauson, H., Becker, J. U., Yang, M., Fitzgerald, P., Linkermann, A., & Green, D. R. (2017, Apr 6). ESCRT-III Acts Downstream of MLKL to Regulate Necroptotic Cell Death and Its Consequences. *Cell*, 169(2), 286-300 e216.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.03.020>
- Gooley, T. A., Chien, J. W., Pergam, S. A., Hingorani, S., Sorror, M. L., Boeckh, M., Martin, P. J., Sandmaier, B. M., Marr, K. A., Appelbaum, F. R., Storb, R., & McDonald, G. B. (2010, November 25, 2010). Reduced Mortality after Allogeneic Hematopoietic-Cell Transplantation. *N Engl J Med* 363, 2091-2101.
- Greenbaum, A., Hsu, Y. M., Day, R. B., Schuettpelz, L. G., Christopher, M. J., Borgerding, J. N., Nagasawa, T., & Link, D. C. (2013, Mar 14). CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. *Nature*, 495(7440), 227-230.  
<https://doi.org/10.1038/nature11926>
- Grundler, R., Miething, C., Thiede, C., Peschel, C., & Duyster, J. (2005, Jun 15). FLT3-ITD and tyrosine kinase domain mutants induce 2 distinct phenotypes in a murine bone marrow transplantation model. *BLOOD*, 105(12), 4792-4799. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-11-4430>
- Günther, C., He, G. W., Kremer, A. E., Murphy, J. M., Petrie, E. J., Amann, K., Vandenabeele, P., Linkermann, A., Poremba, C., Schleicher, U., Dewitz, C., Krautwald, S., Neurath, M. F., Becker, C., & Wirtz, S. (2016, Nov 1). The pseudokinase MLKL mediates programmed hepatocellular necrosis independently of RIPK3 during hepatitis. *J Clin Invest*, 126(11), 4346-4360. <https://doi.org/10.1172/JCI87545>
- Günther, C., Martini, E., Wittkopf, N., Amann, K., Weigmann, B., Neumann, H., Waldner, M. J., Hedrick, S. M., Tenzer, S., Neurath, M. F., & Becker, C. (2011, Sep 14). Caspase-8 regulates TNF-alpha-induced epithelial necroptosis and terminal ileitis. *Nature*, 477(7364), 335-339.  
<https://doi.org/10.1038/nature10400>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011, Mar 4). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Heazlewood, S. Y., Neaves, R. J., Williams, B., Haylock, D. N., Adams, T. E., & Nilsson, S. K. (2013, Sep). Megakaryocytes co-localise with hemopoietic stem cells and release cytokines that up-regulate stem cell proliferation. *Stem Cell Res*, 11(2), 782-792. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2013.05.007>

Herold, G. u. M. (2019). *Innere Medizin*.

Hirata, Y., Furuhashi, K., Ishii, H., Li, H. W., Pinho, S., Ding, L., Robson, S. C., Frenette, P. S., & Fujisaki, J. (2018, Mar 1). CD150(high) Bone Marrow Tregs Maintain Hematopoietic Stem Cell Quiescence and Immune Privilege via Adenosine. *Cell Stem Cell*, 22(3), 445-453 e445. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.01.017>

Höckendorf, U., Yabal, M., Herold, T., Munkhbaatar, E., Rott, S., Jilg, S., Kauschinger, J., Magnani, G., Reisinger, F., Heuser, M., Kreipe, H., Sotlar, K., Engleitner, T., Rad, R., Weichert, W., Peschel, C., Ruland, J., Heikenwalder, M., Spiekermann, K., Slotta-Huspenina, J., Gross, O., & Jost, P. J. (2016, Jul 11). RIPK3 Restricts Myeloid Leukemogenesis by Promoting Cell Death and Differentiation of Leukemia Initiating Cells. *Cancer Cell*, 30(1), 75-91. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.06.002>

Höckendorf, U., Yabal, M., & Jost, P. J. (2017, Jan 2). Killing AML: RIPK3 leads the way. *Cell Cycle*, 16(1), 3-4. <https://doi.org/10.1080/15384101.2016.1232069>

Hooper, A. T., Butler, J. M., Nolan, D. J., Kranz, A., Iida, K., Kobayashi, M., Kopp, H. G., Shido, K., Petit, I., Yanger, K., James, D., Witte, L., Zhu, Z., Wu, Y., Pytowski, B., Rosenwaks, Z., Mittal, V., Sato, T. N., & Rafii, S. (2009, Mar 6). Engraftment and reconstitution of hematopoiesis is dependent on VEGFR2-mediated regeneration of sinusoidal endothelial cells. *Cell Stem Cell*, 4(3), 263-274. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.01.006>

Jost, P. J., Grabow, S., Gray, D., McKenzie, M. D., Nachbur, U., Huang, D. C., Bouillet, P., Thomas, H. E., Borner, C., Silke, J., Strasser, A., & Kaufmann, T. (2009, Aug 20). XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis. *Nature*, 460(7258), 1035-1039. <https://doi.org/10.1038/nature08229>

Jost, P. J., & Höckendorf, U. (2019, Jan). Necroinflammation emerges as a key regulator of hematopoiesis in health and disease. *Cell Death Differ*, 26(1), 53-67. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0194-4>

Kadia, T. M., Ravandi, F., Cortes, J., & Kantarjian, H. (2016, May). New drugs in acute myeloid leukemia. *Ann Oncol*, 27(5), 770-778. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw015>

Kampen, K. R. (2012). The discovery and early understanding of leukemia. *Leukemia Research*, 36(1), 6-13. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2011.09.028>

- Kang, T. B., Yang, S. H., Toth, B., Kovalenko, A., & Wallach, D. (2013, Jan 24). Caspase-8 blocks kinase RIPK3-mediated activation of the NLRP3 inflammasome. *Immunity*, 38(1), 27-40. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.09.015>
- Katayama, Y., Battista, M., Kao, W. M., Hidalgo, A., Peired, A. J., Thomas, S. A., & Frenette, P. S. (2006, Jan 27). Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. *Cell*, 124(2), 407-421. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.10.041>
- Katzmann, D. J., Odorizzi, G., & Emr, S. D. (2002, Dec). Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3(12), 893-905. <https://doi.org/10.1038/nrm973>
- Kawano, Y., Fukui, C., Shinohara, M., Wakahashi, K., Ishii, S., Suzuki, T., Sato, M., Asada, N., Kawano, H., Minagawa, K., Sada, A., Furuyashiki, T., Uematsu, S., Akira, S., Uede, T., Narumiya, S., Matsui, T., & Katayama, Y. (2017, Feb 2). G-CSF-induced sympathetic tone provokes fever and primes antimobilizing functions of neutrophils via PGE2. *BLOOD*, 129(5), 587-597. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-07-725754>
- Khakoo, A. Y., Pati, S., Anderson, S. A., Reid, W., Elshal, M. F., Rovira, II, Nguyen, A. T., Malide, D., Combs, C. A., Hall, G., Zhang, J., Raffeld, M., Rogers, T. B., Stetler-Stevenson, W., Frank, J. A., Reitz, M., & Finkel, T. (2006, May 15). Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma. *J Exp Med*, 203(5), 1235-1247. <https://doi.org/10.1084/jem.20051921>
- Kobayashi, H., Butler, J. M., O'Donnell, R., Kobayashi, M., Ding, B. S., Bonner, B., Chiu, V. K., Nolan, D. J., Shido, K., Benjamin, L., & Rafii, S. (2010, Nov). Angiocrine factors from Akt-activated endothelial cells balance self-renewal and differentiation of haematopoietic stem cells. *Nat Cell Biol*, 12(11), 1046-1056. <https://doi.org/10.1038/ncb2108>
- Kovtonyuk, L. V., Fritsch, K., Feng, X., Manz, M. G., & Takizawa, H. (2016). Inflamm-Aging of Hematopoiesis, Hematopoietic Stem Cells, and the Bone Marrow Microenvironment. *Frontiers in Immunology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00502>
- Lalaoui, N., & Brumatti, G. (2017, Feb). Relevance of necroptosis in cancer. *Immunol Cell Biol*, 95(2), 137-145. <https://doi.org/10.1038/icb.2016.120>
- Lamkanfi, M., & Dixit, V. M. (2012). Inflammasomes and their roles in health and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 28, 137-161. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101011-155745>

- Lane, S. W., Scadden, D. T., & Gilliland, D. G. (2009, Aug 6). The leukemic stem cell niche: current concepts and therapeutic opportunities. *BLOOD*, 114(6), 1150-1157. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-01-202606>
- Leone, G., Mele, L., Pulsoni, A., Equitani, F., & Pagano, L. (1999). The Incidence of Secondary Leukemias. *Haematologica*, 84, 937-945.
- Levine, R. L. (2013, Sep). Molecular pathogenesis of AML: translating insights to the clinic. *Best Pract Res Clin Haematol*, 26(3), 245-248. <https://doi.org/10.1016/j.beha.2013.10.003>
- Lin, S. Y., Yang, J., Everett, A. D., Clevenger, C. V., Koneru, M., Mishra, P. J., Kamen, B., Banerjee, D., & Glod, J. (2008, Oct 15). The isolation of novel mesenchymal stromal cell chemotactic factors from the conditioned medium of tumor cells. *Exp Cell Res*, 314(17), 3107-3117. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.07.028>
- Lucas, D., Battista, M., Shi, P. A., Isola, L., & Frenette, P. S. (2008, Oct 9). Mobilized hematopoietic stem cell yield depends on species-specific circadian timing. *Cell Stem Cell*, 3(4), 364-366. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.09.004>
- Maes, T., Mascaro, C., Tirapu, I., Estiarte, A., Ciceri, F., Lunardi, S., Guibourt, N., Perdones, A., Lufino, M. M. P., Somervaille, T. C. P., Wiseman, D. H., Duy, C., Melnick, A., Willekens, C., Ortega, A., Martinell, M., Valls, N., Kurz, G., Fyfe, M., Castro-Palomino, J. C., & Buesa, C. (2018, Mar 12). ORY-1001, a Potent and Selective Covalent KDM1A Inhibitor, for the Treatment of Acute Leukemia. *Cancer Cell*, 33(3), 495-511 e412. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.02.002>
- Maretzky T. , R. K., Ludwig A., Buchholz J., Scholz F. Proksch E., de Strooper B., Hartmann D., and Saftig P. (2005). ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and  $\beta$ -catenin translocation. *PNAS*.
- Martens, S., Bridelance, J., Roelandt, R., Vandenabeele, P., & Takahashi, N. (2021, Jun). MLKL in cancer: more than a necroptosis regulator. *Cell Death Differ*, 28(6), 1757-1772. <https://doi.org/10.1038/s41418-021-00785-0>
- Martin, S. J., Reutelingsperger, C. E. M., McGahon, A. J., Rader, J. A., van Schie, R. C. A. A., LaFace, D. M., & Green, D. R. (1995). Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med*, 182, 1545-1556.

- Mendelson, A., & Frenette, P. S. (2014, Aug). Hematopoietic stem cell niche maintenance during homeostasis and regeneration. *Nat Med*, *20*(8), 833-846. <https://doi.org/10.1038/nm.3647>
- Mendes, S. C., Robin, C., & Dzierzak, E. (2005, Mar). Mesenchymal progenitor cells localize within hematopoietic sites throughout ontogeny. *Development*, *132*(5), 1127-1136. <https://doi.org/10.1242/dev.01615>
- Mendez-Ferrer, S., Lucas, D., Battista, M., & Frenette, P. S. (2008, Mar 27). Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. *Nature*, *452*(7186), 442-447. <https://doi.org/10.1038/nature06685>
- Mendez-Ferrer, S., Michurina, T. V., Ferraro, F., Mazloom, A. R., Macarthur, B. D., Lira, S. A., Scadden, D. T., Ma'ayan, A., Enikolopov, G. N., & Frenette, P. S. (2010, Aug 12). Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*, *466*(7308), 829-834. <https://doi.org/10.1038/nature09262>
- Miraki-Moud, F., Anjos-Afonso, F., Hodby, K. A., Griessinger, E., Rosignoli, G., Lillington, D., Jia, L., Davies, J. K., Cavenagh, J., Smith, M., Oakervee, H., Agrawal, S., Gribben, J. G., Bonnet, D., & Taussig, D. C. (2013, Aug 13). Acute myeloid leukemia does not deplete normal hematopoietic stem cells but induces cytopenias by impeding their differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *110*(33), 13576-13581. <https://doi.org/10.1073/pnas.1301891110>
- Mirantes, C., Passegue, E., & Pietras, E. M. (2014, Dec 10). Pro-inflammatory cytokines: emerging players regulating HSC function in normal and diseased hematopoiesis. *Exp Cell Res*, *329*(2), 248-254. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.08.017>
- Mocarski, E. S., Upton, J. W., & Kaiser, W. J. (2011, Dec 23). Viral infection and the evolution of caspase 8-regulated apoptotic and necrotic death pathways. *Nat Rev Immunol*, *12*(2), 79-88. <https://doi.org/10.1038/nri3131>
- Monteiro, J. P., Benjamin, A., Costa, E. S., Barcinski, M. A., & Bonomo, A. (2005, Feb 15). Normal hematopoiesis is maintained by activated bone marrow CD4+ T cells. *BLOOD*, *105*(4), 1484-1491. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-07-2856>
- Morrison, S. J., & Scadden, D. T. (2014, Jan 16). The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature*, *505*(7483), 327-334. <https://doi.org/10.1038/nature12984>

- Morrison, S. J., & Spradling, A. C. (2008, Feb 22). Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell*, 132(4), 598-611. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.038>
- Nagata, S., Suzuki, J., Segawa, K., & Fujii, T. (2016, Jun). Exposure of phosphatidylserine on the cell surface. *Cell Death Differ*, 23(6), 952-961. <https://doi.org/10.1038/cdd.2016.7>
- Nakamura-Ishizu, A., Takubo, K., Kobayashi, H., Suzuki-Inoue, K., & Suda, T. (2015, Nov 16). CLEC-2 in megakaryocytes is critical for maintenance of hematopoietic stem cells in the bone marrow. *J Exp Med*, 212(12), 2133-2146. <https://doi.org/10.1084/jem.20150057>
- Naveiras, O., Nardi, V., Wenzel, P. L., Hauschka, P. V., Fahey, F., & Daley, G. Q. (2009, Jul 9). Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. *Nature*, 460(7252), 259-263. <https://doi.org/10.1038/nature08099>
- Nemeth, K., Leelahavanichkul, A., Yuen, P. S., Mayer, B., Parmelee, A., Doi, K., Robey, P. G., Leelahavanichkul, K., Koller, B. H., Brown, J. M., Hu, X., Jelinek, I., Star, R. A., & Mezey, E. (2009, Jan). Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med*, 15(1), 42-49. <https://doi.org/10.1038/nm.1905>
- Ohlsson LB, V. L., Kjellman C, Edvardsen K, Lindvall M. (2009). Mesenchymal progenitor cell-mediated inhibition of tumor growth in vivo and in vitro in gelatin matrix. *Experimental and Molecular Pathology*, 75, 248–255. [https://doi.org/10.1016/S0014-4800\(03\)00090-X](https://doi.org/10.1016/S0014-4800(03)00090-X)
- Omatsu, Y., Sugiyama, T., Kohara, H., Kondoh, G., Fujii, N., Kohno, K., & Nagasawa, T. (2010, Sep 24). The essential functions of adipogenic progenitors as the hematopoietic stem and progenitor cell niche. *Immunity*, 33(3), 387-399. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.08.017>
- Oostendorp, R. A., Robin, C., Steinhoff, C., Marz, S., Brauer, R., Nuber, U. A., Dzierzak, E. A., & Peschel, C. (2005, Jun-Jul). Long-term maintenance of hematopoietic stem cells does not require contact with embryo-derived stromal cells in cocultures. *Stem Cells*, 23(6), 842-851. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0120>
- Oostendorp, R. A. J., Harvey, K. N., Kusadasi, N., de Bruijn, M. F. T. R., Saris, C., Ploemacher, R. E., & Medvinsky, A. L. a. D., Elaine A. . (2002). Stromal cell lines from mouse aorta-gonads-mesonephros subregions are potent supporters of hematopoietic stem cell activity. *BLOOD*, 99(4).

- Pasparakis, M., & Vandenabeele, P. (2015, Jan 15). Necroptosis and its role in inflammation. *Nature*, *517*(7534), 311-320. <https://doi.org/10.1038/nature14191>
- Peng, L., Wang Y., Yang B., Qin Q., Song E., Song Y. (2021, 1 April 2021). Polychlorinated biphenyl quinone regulates MLKL phosphorylation that stimulates exosome biogenesis and secretion via a short negative feedback loop. *Environmental Pollution*, *274*.
- Petrie, E. J., Hildebrand, J. M., & Murphy, J. M. (2017, Feb). Insane in the membrane: a structural perspective of MLKL function in necroptosis. *Immunol Cell Biol*, *95*(2), 152-159. <https://doi.org/10.1038/icb.2016.125>
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., & Marshak, D. R. (1999). Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science*, *284*, 143-147.
- Poulos, M. G., Guo, P., Kofler, N. M., Pinho, S., Gutkin, M. C., Tikhonova, A., Aifantis, I., Frenette, P. S., Kitajewski, J., Rafii, S., & Butler, J. M. (2013, Sep 12). Endothelial Jagged-1 is necessary for homeostatic and regenerative hematopoiesis. *Cell Rep*, *4*(5), 1022-1034. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.07.048>
- Price, P. E., & Cerny, J. (1999). Characterization of CD4+ T cells in mouse bone marrow. I. Increased activated memory phenotype and altered TCR V $\beta$  repertoire. *Eur. J. Immunol.*, *29*, 1051-1056.
- Prockop, D. J. (2009, Jun). Repair of tissues by adult stem/progenitor cells (MSCs): controversies, myths, and changing paradigms. *Mol Ther*, *17*(6), 939-946. <https://doi.org/10.1038/mt.2009.62>
- Raaijmakers, M. H., Mukherjee, S., Guo, S., Zhang, S., Kobayashi, T., Schoonmaker, J. A., Ebert, B. L., Al-Shahrour, F., Hasserjian, R. P., Scadden, E. O., Aung, Z., Matza, M., Merckenschlager, M., Lin, C., Rommens, J. M., & Scadden, D. T. (2010, Apr 8). Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia. *Nature*, *464*(7290), 852-857. <https://doi.org/10.1038/nature08851>
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013, Nov). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc*, *8*(11), 2281-2308. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143>
- Ratovitski, E. A. (2015, May 22). Phospho-DeltaNp63alpha-responsive microRNAs contribute to the regulation of necroptosis in squamous cell

carcinoma upon cisplatin exposure. *FEBS Lett*, 589(12), 1352-1358. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.04.020>

Reiss K, & P., S. (2009). The “a disintegrin and metalloprotease” (ADAM) family of sheddases: physiological and cellular functions. *Semin Cell Dev Biol*, 20, 126-137.

Reynaud, D., Pietras, E., Barry-Holson, K., Mir, A., Binnewies, M., Jeanne, M., Sala-Torra, O., Radich, J. P., & Passegue, E. (2011, Nov 15). IL-6 controls leukemic multipotent progenitor cell fate and contributes to chronic myelogenous leukemia development. *Cancer Cell*, 20(5), 661-673. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.10.012>

Sato, M., Asada, N., Kawano, Y., Wakahashi, K., Minagawa, K., Kawano, H., Sada, A., Ikeda, K., Matsui, T., & Katayama, Y. (2013, Nov 5). Osteocytes regulate primary lymphoid organs and fat metabolism. *Cell Metab*, 18(5), 749-758. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.09.014>

Scadden, D. T. (2006, Jun 29). The stem-cell niche as an entity of action. *Nature*, 441(7097), 1075-1079. <https://doi.org/10.1038/nature04957>

Schepers, K., Campbell, T. B., & Passegue, E. (2015, Mar 5). Normal and leukemic stem cell niches: insights and therapeutic opportunities. *Cell Stem Cell*, 16(3), 254-267. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.02.014>

Schepers, K., Pietras, E. M., Reynaud, D., Flach, J., Binnewies, M., Garg, T., Wagers, A. J., Hsiao, E. C., & Passegue, E. (2013, Sep 5). Myeloproliferative neoplasia remodels the endosteal bone marrow niche into a self-reinforcing leukemic niche. *Cell Stem Cell*, 13(3), 285-299. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.06.009>

Schürch, C. M., Riether, C., & Ochsenbein, A. F. (2014, Apr 3). Cytotoxic CD8+ T cells stimulate hematopoietic progenitors by promoting cytokine release from bone marrow mesenchymal stromal cells. *Cell Stem Cell*, 14(4), 460-472. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.01.002>

Seals, D. F., & Courtneidge, S. A. (2003, Jan 1). The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev*, 17(1), 7-30. <https://doi.org/10.1101/gad.1039703>

Segawa, K., Kurata, S., Yanagihashi, Y., Brummelkamp, T. R., Matsuda, F., & Nagata, S. (2014). Caspase-mediated cleavage of phospholipid flippase for apoptotic phosphatidylserine exposure. *Science*, 344(6188), 1164-1168.

- Seufert, W. S., Wolf D. (1982). The Recognition of Leukemia as a Systemic Disease. *Journal of the History of Medicine and Allied Sciences*, XXXVII(1), Pages 34–50.
- Shallis, R. M., Wang, R., Davidoff, A., Ma, X., & Zeidan, A. M. (2019, Jul). Epidemiology of acute myeloid leukemia: Recent progress and enduring challenges. *Blood Rev*, 36, 70-87. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2019.04.005>
- Sharara, L. I., Andersson, A., Guy-Grand, D., Fischer, A., & DiSanto, J. (1997). Deregulated TCR Alpha Beta T Cell Population Provokes Extramedullary Hematopoiesis in Mice Deficient in the Common Gamma Chain. *Eur. J. Immunol.*, 27, 990-998.
- Song, X., Peng, Y., Wang, X., Chen, Y., Jin, L., Yang, T., Qian, M., Ni, W., Tong, X., & Lan, J. (2018). Incidence, Survival, and Risk Factors for Adults with Acute Myeloid Leukemia Not Otherwise Specified and Acute Myeloid Leukemia with Recurrent Genetic Abnormalities: Analysis of the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Database, 2001-2013. *Acta Haematol*, 139(2), 115-127. <https://doi.org/10.1159/000486228>
- Stone, R. M., Mandrekar, S. J., Sanford, B. L., Laumann, K., Geyer, S., Bloomfield, C. D., Thiede, C., Prior, T. W., Dohner, K., Marcucci, G., Lo-Coco, F., Klisovic, R. B., Wei, A., Sierra, J., Sanz, M. A., Brandwein, J. M., de Witte, T., Niederwieser, D., Appelbaum, F. R., Medeiros, B. C., Tallman, M. S., Krauter, J., Schlenk, R. F., Ganser, A., Serve, H., Ehninger, G., Amadori, S., Larson, R. A., & Dohner, H. (2017, Aug 3). Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation. *N Engl J Med*, 377(5), 454-464. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1614359>
- Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M., & Nagasawa, T. (2006, Dec). Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity*, 25(6), 977-988. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.10.016>
- Sun, L., Wang, H., Wang, Z., He, S., Chen, S., Liao, D., Wang, L., Yan, J., Liu, W., Lei, X., & Wang, X. (2012, Jan 20). Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase. *Cell*, 148(1-2), 213-227. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.031>
- Suzuki, J., Denning, D. P., Imanishi, E., Horvitz, H. R., & Nagata, S. (2013). Xk-Related Protein 8 and CED-8 Promote Phosphatidylserine Exposure in Apoptotic Cells. *Science*, 341(6144), 403-406.

- Taichman RS, E. S. (1994). Human osteoblasts support hematopoiesis through the production of granulocyte colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.*, *179*, 1677-1682.
- Tanzer, M. C., Tripaydonis, A., Webb, A. I., Young, S. N., Varghese, L. N., Hall, C., Alexander, W. S., Hildebrand, J. M., Silke, J., & Murphy, J. M. (2015, Oct 15). Necroptosis signalling is tuned by phosphorylation of MLKL residues outside the pseudokinase domain activation loop. *Biochem J*, *471*(2), 255-265. <https://doi.org/10.1042/BJ20150678>
- Thomas, D., & Majeti, R. (2017, Mar 23). Biology and relevance of human acute myeloid leukemia stem cells. *BLOOD*, *129*(12), 1577-1585. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-10-696054>
- Van Hoecke, L., Riederer, S., Saelens, X., Sutter, G., & Rojas, J. J. (2020, Aug 20). Recombinant viruses delivering the necroptosis mediator MLKL induce a potent antitumor immunity in mice. *Oncoimmunology*, *9*(1), 1802968. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2020.1802968>
- Vanden Berghe, T., Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S., Walczak, H., & Vandenabeele, P. (2014, Feb). Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *15*(2), 135-147. <https://doi.org/10.1038/nrm3737>
- Vanden Berghe, T., Vanlangenakker, N., Parthoens, E., Deckers, W., Devos, M., Festjens, N., Guerin, C. J., Brunk, U. T., Declercq, W., & Vandenabeele, P. (2010, Jun). Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features. *Cell Death Differ*, *17*(6), 922-930. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.184>
- Veit, M., Koyro, K. I., Ahrens, B., Bleibaum, F., Munz, M., Rovekamp, H., Andra, J., Schreiber, R., Kunzelmann, K., Sommer, A., Bhakdi, S., & Reiss, K. (2018, Nov). Anoctamin-6 regulates ADAM sheddase function. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, *1865*(11 Pt A), 1598-1610. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.08.011>
- Wang, H., Sun, L., Su, L., Rizo, J., Liu, L., Wang, L. F., Wang, F. S., & Wang, X. (2014, Apr 10). Mixed lineage kinase domain-like protein MLKL causes necrotic membrane disruption upon phosphorylation by RIP3. *Mol Cell*, *54*(1), 133-146. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.003>
- Wang, X., Ros, U., Agrawal, D., Keller, E. C., Slotta-Huspenina, J., Dill, V., Shen, B., Shi, R., Herold, T., Belka, C., Mishra, R., Bassermann, F., Garcia-Saez, A. J., & Jost, P. J. (2021, Dec). MLKL promotes cellular differentiation in myeloid leukemia by facilitating the release of G-CSF. *Cell Death Differ*, *28*(12), 3235-3250. <https://doi.org/10.1038/s41418-021-00811-1>

- Wei, Q., & Frenette, P. S. (2018, Apr 17). Niches for Hematopoietic Stem Cells and Their Progeny. *Immunity*, 48(4), 632-648. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.03.024>
- Winkler, I. G., Barbier, V., Nowlan, B., Jacobsen, R. N., Forristal, C. E., Patton, J. T., Magnani, J. L., & Levesque, J. P. (2012, Nov). Vascular niche E-selectin regulates hematopoietic stem cell dormancy, self renewal and chemoresistance. *Nat Med*, 18(11), 1651-1657. <https://doi.org/10.1038/nm.2969>
- 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., & Levesque, J. P. (2010, Dec 2). Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs. *BLOOD*, 116(23), 4815-4828. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-11-253534>
- Yabal, M., Muller, N., Adler, H., Knies, N., Gross, C. J., Damgaard, R. B., Kanegane, H., Ringelhan, M., Kaufmann, T., Heikenwalder, M., Strasser, A., Gross, O., Ruland, J., Peschel, C., Gyrd-Hansen, M., & Jost, P. J. (2014, Jun 26). XIAP restricts TNF- and RIP3-dependent cell death and inflammasome activation. *Cell Rep*, 7(6), 1796-1808. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.05.008>
- Yi, M., Li, A., Zhou, L., Chu, Q., Song, Y., & Wu, K. (2020). The global burden and attributable risk factor analysis of acute myeloid leukemia in 195 countries and territories from 1990 to 2017: estimates based on the global burden of disease study 2017. *Journal of Hematology & Oncology*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00908-z>
- Yokota, T., Oritani, K., Takahashi, I., Ishikawa, J., Matsuyama, A., Ouchi, N., Kihara, S., Funahashi, T., Tenner, A. J., Tomiyama, Y., & Matsuzawa, Y. (2000). Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. *BLOOD*, 96, 1723-1732.
- Yoon, S., Bogdanov, K., Kovalenko, A., & Wallach, D. (2016, Feb). Necroptosis is preceded by nuclear translocation of the signaling proteins that induce it. *Cell Death Differ*, 23(2), 253-260. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.92>
- Yoon, S., Kovalenko, A., Bogdanov, K., & Wallach, D. (2017, Jul 18). MLKL, the Protein that Mediates Necroptosis, Also Regulates Endosomal Trafficking and Extracellular Vesicle Generation. *Immunity*, 47(1), 51-65 e57. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.001>

- Zargarian, S., Shlomovitz, I., Erlich, Z., Hourizadeh, A., Ofir-Birin, Y., Croker, B. A., Regev-Rudzki, N., Edry-Botzer, L., & Gerlic, M. (2017, Jun). Phosphatidylserine externalization, "necroptotic bodies" release, and phagocytosis during necroptosis. *PLoS Biol*, 15(6), e2002711. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2002711>
- Zeng, D., Hoffmann, P., Lan, F., Huie, P., Higgins, J., & Strober, S. (2002). Unique patterns of surface receptors, cytokine secretion, and immune functions distinguish T cells in the bone marrow from those in the periphery impact on allogeneic bone marrow transplantation. *BLOOD*, 99, 1449-1457.
- Zhang, D., Chen, G., Manwani, D., Mortha, A., Xu, C., Faith, J. J., Burk, R. D., Kunisaki, Y., Jang, J. E., Scheiermann, C., Merad, M., & Frenette, P. S. (2015, Sep 24). Neutrophil ageing is regulated by the microbiome. *Nature*, 525(7570), 528-532. <https://doi.org/10.1038/nature15367>
- Zhao, M., Perry, J. M., Marshall, H., Venkatraman, A., Qian, P., He, X. C., Ahamed, J., & Li, L. (2014, Nov). Megakaryocytes maintain homeostatic quiescence and promote post-injury regeneration of hematopoietic stem cells. *Nat Med*, 20(11), 1321-1326. <https://doi.org/10.1038/nm.3706>
- Zhu, K., Liang, W., Ma, Z., Xu, D., Cao, S., Lu, X., Liu, N., Shan, B., Qian, L., & Yuan, J. (2018, May 1). Necroptosis promotes cell-autonomous activation of proinflammatory cytokine gene expression. *Cell Death Dis*, 9(5), 500. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0524-y>

## 8. Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1: Unterscheidung zwischen hämatopoetischen Zellen und Stromazellen in der FACS Analyse.....</b>	<b>34</b>
<b>Abbildung 2: Gating Strategie für HSCs und myeloide Progenitorzellen. ....</b>	<b>35</b>
<b>Abbildung 3: Versuchsaufbau Ko-Kultur 10. ....</b>	<b>36</b>
<b>Abbildung 4: Synthese der Nekroptose-defizienten EL08-1D2 Zellklone (A-C)....</b>	<b>40</b>
<b>Abbildung 5: Übersicht der Proteinsynthese von in Ko-Kulturen verwendeten EL08-1D2 Zellkonen.....</b>	<b>41</b>
<b>Abbildung 6: MLKL Proteinsynthese in EL08-1D2 Zellkonen (A-D). ....</b>	<b>41</b>
<b>Abbildung 7: Differenzierung hämatopoetischer Zellen in Abhängigkeit von RIPK3 bzw. MLKL in EL08-1D2 Stromazellen in Ko-Kultur 1. ....</b>	<b>42</b>
<b>Abbildung 8: Differenzierung hämatopoetischer Zellen in Abhängigkeit von RIPK3 bzw. MLKL in EL08-1D2 Stromazellen in Ko-Kultur 2. ....</b>	<b>43</b>
<b>Abbildung 9 Differenzierung hämatopoetischer Zellen in Abhängigkeit von MLKL sowie von Zellkontakt zu EL08-1D2 Stromazellen in Ko-Kultur (A-L). ....</b>	<b>46</b>

## 9. Abkürzungsverzeichnis

Ak	Antikörper
AML	akute myeloische Leukämie
AML-ETO	häufiges Fusionsprotein bei AML aus AML1 (bekannt als RUNX1) und ETO (Eight-Twenty One oncoprotein), klinische Bezeichnung für AML mit t(8;21) (q21;q22)
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumin)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Ca <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Calciumphosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's Minimal Essential Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleotid-Triphosphat
E. coli	Escherichia Coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EL08-1D2	embryonic-liver-derived cell clones
EV	Leervektor, empty vector
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FBS	Fetal Bovine Serum
FLT3-ITD	FMS-related tyrosine kinase 3 - interne Tandem-Duplikation
FLT3-TKD	FMS-related tyrosine kinase 3 - Tyrosinkinasedomäne
fwd	forward
g	Gramm
h	Stunde

## Abkürzungsverzeichnis

HCl	Chlorwasserstoff
HSZ	hämatopoetische Stammzelle
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	steriles bidestilliertes Wasser
KM	Knochenmark
kb	Kilobase
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumhydrogenphosphat
LB	Luria-Bertani Broth
LDL	low density lipoprotein
LSC	leukämische Stammzelle
LT- $\alpha$	Lymphotoxin- $\alpha$
M	molar
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
MLKL	mixed lineage kinase domain like protein
MLL-ENL	Fusionsprotein, Mixed-lineage leukemia – eleven nineteen leukemia
MSC	Mesenchymale Stammzelle
NaCl	Natriumchlorid
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
nt	Non-targeting
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
mM	millimolar
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
rev	reverse

## | Abkürzungsverzeichnis

RIPK3	receptor interacting serine/threonine kinase 3
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris-Essigsäure-EDTA-Puffer
TBS	tris buffered saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
u.a.	unter anderem
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ M	mikromolar
V	Volt
z.B.	zum Beispiel

## 10. Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1: Antikörper zur Differenzierung von murinen hämatopoetischen Subpopulationen .....</b>	<b>13</b>
<b>Tabelle 2: Liste verwendeter Antikörper im Western Blot .....</b>	<b>13</b>
<b>Tabelle 3: Zusammensetzung der guideRNA.....</b>	<b>24</b>
<b>Tabelle 4: Zusammensetzung der Ko-Kulturen .....</b>	<b>32</b>
<b>Tabelle 5: Übersicht über Zelltodinhhibitoren .....</b>	<b>37</b>
<b>Tabelle 6: Pipettierschema Ko-Kultur 8.....</b>	<b>38</b>

|

## 11. Danksagung

Ich danke Prof. em. Dr. Christian Peschel und Univ.-Prof. Dr. Florian Bassermann, die es mir ermöglichten, die vorliegende Dissertation an ihrer Klinik durchzuführen. Mein herzlichster Dank geht an Prof. Dr. Philipp Jost. Ich bedanke mich für die kontinuierlich exzellente Betreuung und lehrreiche Zeit während dieser Arbeit. Im Besonderen gilt mein Dank meiner Mentorin und Betreuerin Dipl. hum. biol. Ulrike Höckendorf, die mich stets durch ihre weit überdurchschnittliche Expertise und ihre hervorragenden Fachkenntnisse sowohl in Konzeption als auch in Fragen der Durchführung unterstützte. Ich danke dir unter anderem für die herausragende Lehre in der Durchflusszytometrie und für die Einführung in sämtliche Softwares. Außerdem möchte ich mich bei PD Dr. med. Stefanie Jilg und Caterina Branca für ihre fachkundige Expertise bedanken. Ein großer Dank geht auch an die gesamte Arbeitsgruppe um Prof. Jost. Vor allem möchte ich mich bei den Kollegen Timo Odinius und Lars Buschhorn für die moralische und fachliche Unterstützung am FACS Gerät bedanken. Ich danke Deepti Agrawal sehr herzlich für die Einführung zum Western Blot.

Celina Wagner, Richard Hauch, Dr. Veronika Dill, Adam Wahida, MD Enkhtsetseg Munkhbaatar, Xin Wang, Monica Yabal, Anne Jacob und Stephanie Ziehe, ich danke euch für die gute Atmosphäre im Labor. Ich habe mich zu jeder Zeit wohl und willkommen bei euch gefühlt.

Bei den Mitgliedern der AG Knolle und AG Ruland möchte mich recht herzlich für ihre Mithilfe vor allem in technischen und organisatorischen Aspekten bedanken. Danke Abdallah, Abdul, Jan, Konstanze, Sava, Silke, Tobias und Miriam, dass ihr mich nie habt hängen lassen.

Großer Dank gilt Prof. Dr. Robert Oostendorp und Dr. Rouzanna Istvanffy für die Bereitstellung der Stromazelllinie EL08-1D2 und primärer muriner mesenchymaler Stammzellen und für die fachliche Unterstützung des Projekts. Außerdem möchte ich mich bei PD Dr. med Christian Posch und den Teilnehmern des EWCD 2019, insbesondere bei Dr. Gabriela Brumatti und PD Dr. rer. nat. Beat Bornhauser, für ihre Denkanstöße bedanken. Weiterhin bedanke ich mich bei der Deutschen Krebshilfe für die großzügige Unterstützung durch das Mildred-Scheel-Doktorandenprogramm.

## | Danksagung

Zuletzt bedanke ich mich bei meiner Familie, insbesondere meinen Großeltern Olga und Johann Dechant, meiner Mutter Elena Dechant und meinem Bruder Johann Dechant, für ihren bedingungslosen und liebevollen Beistand.