

Aus dem Institut für Transfusionsmedizin  
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Generierung TEL-AML1-exprimierender dendritischer Zellen  
aus leukämischen Blasten zur Induktion einer  
antileukämischen Immunreaktion

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Roderich Bender  
aus Hamburg

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. A. Salama  
2. Prof. Dr. med. T. Tonn  
3. Prof. Dr. med. C. A. Schmitt

Datum der Promotion: 03.06.2012

# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich zunächst bei Herrn Professor Dr. med. Salama, Leiter des Instituts für Transfusionsmedizin der Charité - Universitätsmedizin Berlin, für die Überlassung des Themas meiner Dissertation bedanken.

Für die umfassende wissenschaftliche Betreuung und ihre fortwährende Unterstützung bei meinem Promotionsvorhaben bedanke ich mich bei meiner Betreuerin, Frau Privatdozentin Dr. med. habil. Moldenhauer.

Bei Herrn Professor Dr. med. Dr. rer. nat. Seeger aus der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Onkologie und Hämatologie und seiner Arbeitsgruppe, insbesondere Frau Kerstin Hasse, möchte ich mich für die sehr gute Einarbeitung in das Thema und die Bereitstellung der Patientenproben sehr herzlich bedanken.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Moldenhauer. Hervorheben möchte ich insbesondere Frau Kerstin Schmidt, die mich sehr gut im Labor eingearbeitet hat.

Für die Hilfestellung bei der Zellsortierung möchte ich mich bei den Mitarbeitern der Flow Cytometrie Core Facility des Max-Planck-Instituts für Infektionsbiologie bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir stets helfend zur Seite standen und ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>6</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>7</b>
1.1 Hämatopoese	7
1.2 Lymphozytopoese	8
1.3 Leukämie	10
1.3.1 Akute lymphoblastische Leukämien	11
1.4 Das Fusionsgen <i>TEL-AML1</i>	15
1.4.1 TEL	16
1.4.2 AML1	19
1.4.3 TEL-AML1	20
1.5 Aufgabenstellung der Arbeit	27
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>29</b>
2.1 Material	29
2.1.1 Zellen	29
2.1.2 Reagenzien	30
2.1.3 Geräte	34
2.1.4 Plastikwaren	34
2.1.5 Software	35
2.2 Zellkultur Methoden	35
2.2.1 Kulturbedingungen	36
2.2.2 Zellzahlbestimmung und Viabilität	37
2.2.3 Behandlung mit Zytokinen und Histondeacetylase-Inhibitoren	37
2.3 Durchflusszytometrische Analyse von Zelloberflächenantigenen	38
2.4 Zellsortierung	40
2.4.1 Durchflusszytometrische Zellsortierung	40
2.5 Molekularbiologische Methoden	40
2.5.1 RNA Isolation	41
2.5.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung und Qualitätskontrolle der RNA	42
2.5.3 Agarose-Gelelektrophorese	43
2.5.4 Reverse Transkription	44
2.5.5 Real-Time quantitative PCR und cDNA Quantifizierung	45
2.6 Protein-biochemische Methoden	51
2.6.1 Zellyse und Proteinaufreinigung	51
2.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration	52

2.6.3	SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese . . . . .	53
2.6.4	Western blot Analyse . . . . .	53
2.7	Statistik . . . . .	55
2.7.1	Deskriptive Statistik . . . . .	55
2.7.2	Mathematische Statistik . . . . .	56
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>57</b>
3.1	Differenzierung von <i>TEL-AML1</i> -positiven leukämischen Blasten zu dendritischen Zellen . . . . .	57
3.1.1	Durchflusszytometrische Immunphänotypisierung . . . . .	58
3.2	Einfluss von Histondeacetylase-Inhibitoren auf die Histon-Acetylierung . . . . .	70
3.3	<i>TEL-AML1</i> -Expression . . . . .	71
3.3.1	<i>TEL-AML1</i> -Expression auf mRNA-Ebene . . . . .	72
3.3.2	<i>TEL-AML1</i> -Expression auf Proteinebene . . . . .	81
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>84</b>
4.1	Generierung von dendritischen Zellen . . . . .	85
4.2	Einfluss von Histondeacetylase-Inhibitoren auf die Histon-Acetylierung . . . . .	87
4.3	<i>TEL-AML1</i> -Expression leukämischer Blasten nach Differenzierung zu dendritischen Zellen . . . . .	89
4.3.1	<i>TEL-AML1</i> -Expression leukämischer REH-Zellen nach Differenzierung zu dendritischen Zellen . . . . .	89
4.3.2	<i>TEL-AML1</i> -Expression leukämischer Patientenblasten nach Differenzierung zu dendritischen Zellen . . . . .	90
4.3.3	<i>TEL-AML1</i> -Expression auf Proteinebene . . . . .	92
4.4	Kritische Einordnung der Ergebnisse und Ausblick . . . . .	92
	<b>Zusammenfassung</b>	<b>98</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>99</b>
	<b>Publikationsliste</b>	<b>114</b>

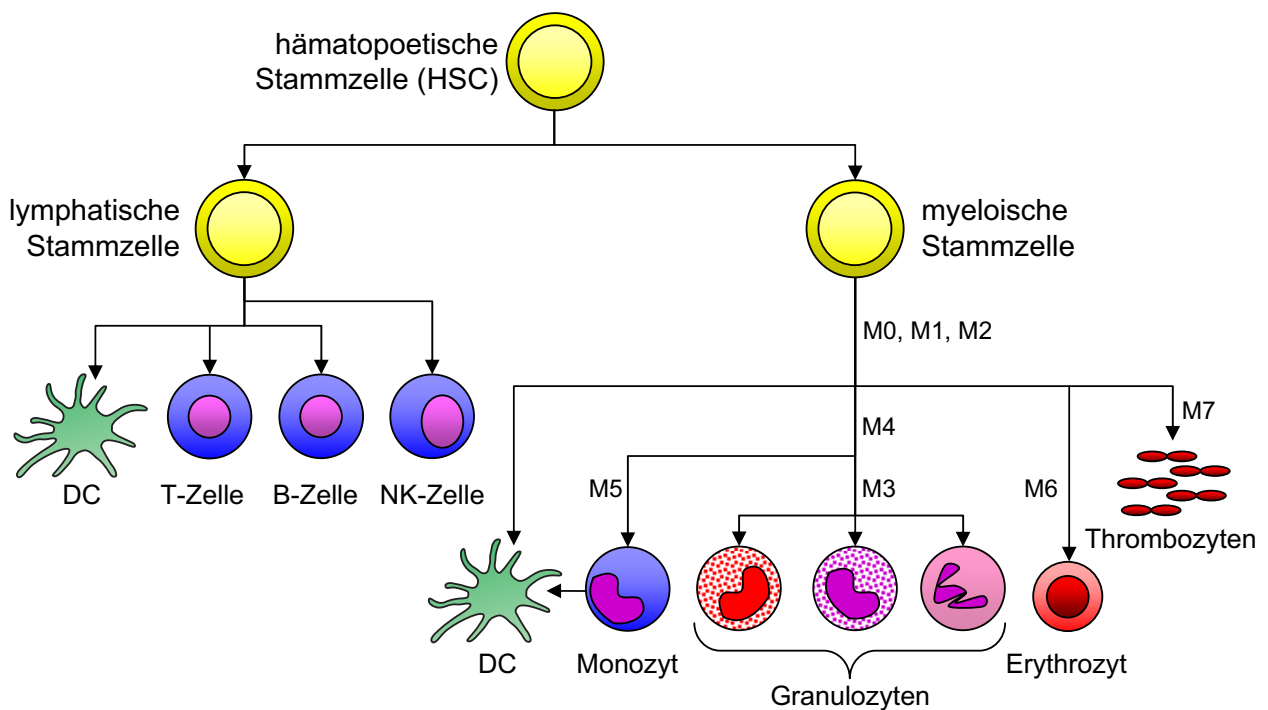
# Abkürzungsverzeichnis

ALL	.....	Akute lymphoblastische Leukämie
AML	.....	Akute myeloische Leukämie
AML1	.....	Akute-myeloische-Leukämie-1-Gen
BCR	.....	B-Zell-Rezeptor (B cell receptor)
BVZ-ALL	.....	B-Vorläuferzell-ALL
CBF	.....	core binding factor
DC	.....	dendritische Zelle (dendritic cell)
ETS	.....	E-26 transforming specific Domäne
FITC	.....	Fluoresceinisothiocyanat
FRET	.....	Förster-Resonanzenergietransfer
GM-CSF	.....	granulocyte/macrophage colony-stimulating factor
HAT	.....	Histon-Acetyl-Transferase
HDAC	.....	Histondeacetylase
HdI	.....	Histondeacetylase-Inhibitor
HRP	.....	Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase)
IL	.....	Interleukin
Iso	.....	Isobutyrat
MHC	.....	Haupt-Histokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
NK	.....	Natürliche Killerzelle
PBS	.....	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PD	.....	Pointed Domäne
PE	.....	Phycoerythrin
RHD	.....	RUNT-homologe Domäne
Saha	.....	Suberoylanilid-Hydroxamsäure
SD	.....	Standardabweichung (standard deviation)
TAE	.....	Tris-Acetat-EDTA
TCR	.....	T-Zell-Rezeptor (T cell receptor)
TEL	.....	Translocation-ETS-Leukemia-Gen
TGK	.....	Zytokinkombination TNF- $\alpha$ , GM-CSF, Kit-Ligand (SCF)
TNF- $\alpha$	.....	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
Val	.....	Valproat

# 1 Einleitung

## 1.1 Hämatopoese

Die Hämatopoese umfasst den Prozess der Bildung und Reifung von Blutzellen. Aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen entstehen durch differentielle Zellteilungen Progenitorzellen der myeloischen und lymphatischen Zellreihe (Abbildung 1.1). In weiteren Reifungsschritten entstehen die terminal differenzierten lymphozytären und myelomonozytären Zellen, die Erythrozyten und die Thrombozyten (Orkin, 1996).



**Abbildung 1.1** – Schematische Darstellung der Hämatopoese. DC: dendritische Zelle; NK-Zelle: natürliche Killerzelle; M0-M7: Bezeichnung des AML-Subtyps, der dem Differenzierungs- und Reifestadium in der Abbildung entspricht (FAB-Klassifikation, Kapitel 1.3.1.1). (Eigene Abbildung)

## 1.2 Lymphozytopoese

Die Lymphozytopoese ist ein Teil der Hämatopoese und umfasst die Bildung und Reifung der Lymphozyten. Mit einem Durchmesser von 7 bis 12  $\mu\text{m}$  sind sie die kleinsten Leukozyten. Sie sind rund, gering beweglich und haben einen großen, runden Zellkern. Sie leiten sich von lymphatischen Progenitorzellen ab. Man unterteilt die Lymphozyten in T-Lymphozyten und B-Lymphozyten, die große funktionelle Unterschiede aufweisen, aber lichtmikroskopisch nicht immer unterschieden werden können. Durch die Rasterelektronenmikroskopie oder Immunphänotypisierung lässt sich ihre Zugehörigkeit jedoch in der Regel feststellen.

Lymphozyten sind ein wichtiger Bestandteil des adaptiven Immunsystems. Sie versetzen den Organismus in die Lage, spezifisch auf bekannte und unbekannte Pathogene reagieren zu können. Zusätzlich wird über Gedächtnis-Lymphozyten ein immunologisches Gedächtnis unterhalten, damit rekurrierende Pathogene schneller und zielgerichteter abgewehrt werden können.

Eine zelluläre adaptive Immunität wird vor allem durch *T-Lymphozyten* vermittelt. Zu den T-Lymphozyten gehören die naiven T-Zellen, die CD8<sup>+</sup> T-Killerzellen, die CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen, die T-Suppressorzellen und die Gedächtnis-T-Zellen.

*B-Lymphozyten* sind Teil der humoralen adaptiven Immunität und damit in der Lage, spezifische Antikörper zu bilden. Zu den B-Lymphozyten gehören die naiven B-Zellen, die aktivierten B-Zellen, die Plasmazellen und die Gedächtnis-B-Zellen. Als gemeinsames Merkmal tragen die B-Lymphozyten das Oberflächen-Antigen CD19.

Neben den B- und T-Lymphozyten gehen noch weitere Zelltypen aus den lymphatischen Progenitorzellen hervor. Zu diesen gehören die natürlichen Killerzellen, die weder einen T-Zell- noch einen B-Zell-Rezeptor tragen. Ein weiterer Zelltyp sind die lymphatischen dendritischen Zellen (Banchereau et al., 2000).

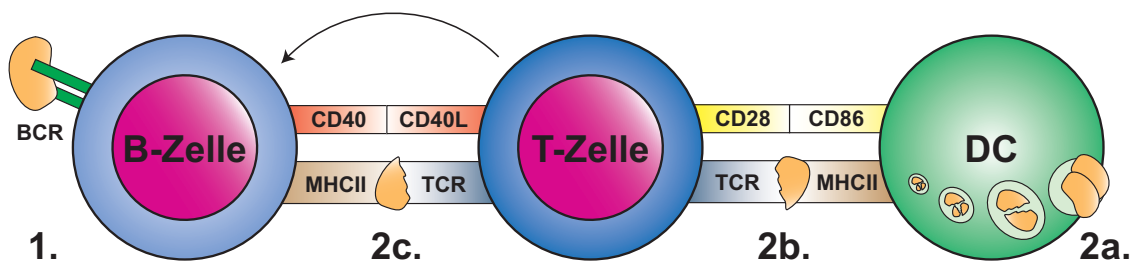
**Dendritische Zellen** Dendritische Zellen (DC) sind die potentesten Antigen-präsentierenden Zellen. Sie vermitteln die adaptive Immunität, indem sie Antigene phagozytieren, prozessieren und den Zellen des adaptiven Immunsystems präsentieren. Dendritische Zellen können sich von verschiedenen hämatopoetischen Stammzellen ableiten (Abbildung 1.1). *Lymphatische* dendritische Zellen leiten sich von pluripotenten lymphatischen Stammzellen ab. Sie sind überwiegend in den Lymphknoten lokalisiert (Merad und Manz, 2009). *Myeloische* dendritische Zellen hingegen leiten



sich von pluripotenten myeloischen Stammzellen oder Monozyten ab (Palucka et al., 2007; Banchereau et al., 2003). Sie sind in verschiedenen Körpergeweben lokalisiert, welche sie jedoch nach Antigenkontakt verlassen können, um in das Lymphsystem zu migrieren.

Dendritische Zellen präsentieren intrazelluläre Antigene zytotoxischen T-Zellen über MHC-I-Moleküle<sup>1</sup>. Endozytotisch aufgenommene Antigene werden hingegen über MHC-II-Moleküle T-Helferzellen präsentiert (Banchereau und Steinman, 1998).

B-Lymphozyten können nach B-Zell-Rezeptor-vermittelten Antigenkontakt auch ohne die Stimulation von DC Antikörper bilden (Abbildung 1.2, Nr. 1). In der Regel benötigt der B-Lymphozyt aber einen zweiten verstärkenden Stimulus, um ausreichend aktiviert zu werden. Dieser zweite Stimulus kann durch T-Helferzellen vermittelt werden, die ihrerseits von dendritischen Zellen aktiviert werden (Abbildung 1.2, Nr. 2a-2c). Daneben können B-Lymphozyten auch direkt durch DC stimuliert werden (Zhou et al., 2010). Die B-Zell-vermittelte humorale Immunität steht somit wesentlich unter der Kontrolle von dendritischen Zellen.



**Abbildung 1.2** – B-Zell-Aktivierung. 1: Unprozessiertes Antigen wird über den B-Zell-Rezeptor gebunden, die B-Zelle wird nicht ausreichend aktiviert. 2a: Antigen wird von der dendritischen Zellen endozytotisch aufgenommen und prozessiert. 2b: Prozessiertes Antigen wird über MHC-II-Moleküle der T-Helferzelle präsentiert (die im Gegensatz zur B-Zelle in der Regel nicht durch unprozessiertes Antigen aktiviert werden kann). 2c: Die T-Zelle aktiviert die Antigen-präsentierende B-Zelle (Pfeil), die ebenfalls prozessiertes Antigen über MHC-II-Moleküle präsentiert. BCR: B-Zell-Rezeptor; TCR: T-Zell-Rezeptor; CD40L: CD40-Ligand. (Eigene Abbildung)

**CD83** Das Glykoprotein CD83 ist einer der wichtigsten Marker für reife dendritische Zellen (Banchereau und Steinman, 1998; Lechmann et al., 2002). Es handelt sich um ein Adhäsionsmolekül, das an ruhende Monozyten und an eine Untergruppe von aktivierten CD8<sup>+</sup>-T-Zellen bindet. Während der DC-Reifung wird CD83 zusammen mit kostimulatorischen Molekülen hochreguliert (Lechmann et al., 2002; Scholler et al., 2002). Es konnte gezeigt werden, dass CD83 transfizierte B-Lymphoblasten T-Zellen effizienter stimulieren als untransfizierte B-Lymphoblasten, und auch zytotoxische T-Zellen

<sup>1</sup>MHC: Haupt-Histokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex). MHC werden von Zellen exprimiert, um Zellen des spezifischen Immunsystems Antigene zu präsentieren. Siehe auch Kapitel 4.1

aktiviert werden konnten (Scholler et al., 2002). CD83 ist ein wichtiger funktioneller Marker für das allostimulatorische Potential von leukämischen Zellen (Harrison et al., 2001; Moldenhauer et al., 2004).

**HLA-DR** Das humane Leukozytenantigen DR (HLA-DR) ist ein Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex, MHC) der Klasse II. Haupthistokompatibilitätskomplexe wurden erstmals im Rahmen von Transplantationsinkompatibilitäten („Histo-Inkompabilitäten“) identifiziert und sind daher für diese Gruppe namensgebend. HLA-DR und weitere HL-Antigene der Klasse II (DP und DQ) werden von Antigen-präsentierenden Zellen exprimiert, um den Zellen des spezifischen Immunsystems Epitope phagozytierter Antigene zu präsentieren. Das HL-Antigen bildet zusammen mit einer kurzen Peptidsequenz einen Liganden für den T-Zell-Rezeptor. Die HL-Antigene der Klasse I (A, B und C) finden sich auf nahezu allen Körperzellen. Sie unterscheiden sich in ihrer Struktur und auch funktionell von den HL-Antigenen der Klasse II und dienen der Präsentation von Selbst-Antigenen.

**CD86** Das Glykoprotein CD86 gehört neben CD80 und CD40 zur Gruppe der kostimulatorischen Moleküle. Es wird bei leukämischen dendritischen Zellen hochreguliert und charakterisiert in Form eines CD86+/CD80– Immunphänotyps leukämische dendritischen Zellen (Maeda et al., 2000). CD86 wird auf der Zelloberfläche primärer dendritischer Zellen exprimiert und vermittelt über die Bindung an CD28 die Aktivierung von T-Zellen. Wird eine T-Zelle ohne begleitende kostimulatorische Signale stimuliert, so führt dies in der Regel zu einer T-Zell-Anergie bzw. Immuntoleranz (Maeda et al., 2000). T-Zellen benötigen folglich akzessorische kostimulatorische Signale, um ausreichend aktiviert zu werden. Über die Kostimulation erhalten T-Zellen wichtige Zusatzinformationen über die Herkunft und Qualität des präsentierten Antigens. Bei der B-Zell-vermittelten Antigenpräsentation erfolgt die Kostimulation über CD40, bei der DC-vermittelten Antigenpräsentation hingegen vor allem über CD80 und CD86. Durch die gemeinsame Stimulation durch B-Zelle und dendritischer Zelle wird die T-Zelle ausreichend aktiviert und immunreaktiv.

## 1.3 Leukämie

Die Leukämie (griechisch von *λευκός* „weiß“ und *αίμα* „das Blut“) ist ein Sammelbegriff für verschiedene Neoplasien des hämatopoetischen Systems, die durch die klonale Expansion pathologisch transformierter Zellen gekennzeichnet sind. Die normale Zellregulation, und Zellfunktionen im

Bereich Zellwachstum, Differenzierung, Apoptose und Selbsterneuerung können gestört sein. Es gibt Hinweise dafür, dass Leukämien ihren Ursprung in genetischen Mutationen haben, die bereits in unreifen hämatopoetischen Stammzellen auftreten (Greaves, 2003).

Zunächst als singuläre Krankheitsentität geprägt wurde der Begriff *Leukämie* im 19. Jahrhundert von Rudolf Virchow; dieser konnte bei mehreren Patienten eine krankhafte Vermehrung der weißen Blutbestandteile beobachten. Anfang des 20. Jahrhunderts wurde durch verbesserte Färbeverfahren und Blutbilduntersuchungen die Abgrenzung der akuten lymphoblastischen Leukämie von der akuten myeloischen Leukämie möglich. Seit 1976 werden nach den Vorschlägen der French-American-British (FAB) Co-operative Group die akute myeloische Leukämie (AML) und die akute lymphoblastische Leukämie (ALL) durch morphologische und zytochemische Methoden in weitere Subtypen unterteilt. In den folgenden Jahrzehnten konnte die zunächst morphologisch geprägte Subtypisierung durch immunzytometrische und molekularbiologische Verfahren präzisiert und erweitert werden. Bei ein Drittel aller malignen pädiatrischen Neoplasien in Europa handelt es sich um Leukämien (Robert Koch-Institut, 2008).

### 1.3.1 Akute lymphoblastische Leukämien

Die ALL ist eine klonale Erkrankung lymphozytärer Zellen, bei der sich pathologisch transformierte Lymphozyten oder unreife Progenitorzellen stark vermehren. Die Expansion von leukämischen Zellen im Knochenmark verdrängt die gesunde Hämatopoese, so dass als Folge Anämien, Thrombozytopenien und Granulozytopenien auftreten können. Charakteristische klinische Symptome sind eine Anämie-bedingte Blässe und Leistungsabfall, eine Thrombozytopenie-bedingte spontane Hämatombildung und petechiale Blutungen, und Granulozytopenie-bedingte Infektionen und Fieberschübe. Daneben können durch die Zellexpansion in verschiedenen Körperregionen und Organen Leber-, Milz- und Lymphknotenvergrößerungen auftreten. Ohne spezifische Therapie führt die ALL innerhalb weniger Wochen bis Monate zum Tod.

Die ALL ist eine Erkrankung aller Altersgruppen, zeigt aber einen Häufigkeitsgipfel im frühen Kindesalter. Die Inzidenzrate im Kindesalter<sup>2</sup> liegt bei 4,1 (Robert Koch-Institut, 2008), womit ungefähr jeder zweitausendste Mensch im Laufe seiner Kindheit an einer ALL erkrankt. Mit einem Anteil von 80% ist sie die dominierende Leukämieform in der Pädiatrie.

---

<sup>2</sup>bezogen auf 100.000 Kinder im Alter unter 15 Jahren, altersstandardisiert auf die westdeutsche Bevölkerung (Stand 1987)

### 1.3.1.1 Diagnostik und Klassifikation

Die Unterscheidung verschiedener Leukämieformen ist von prognostischer und therapeutischer Relevanz. Wegweisend ist die Knochenmarkuntersuchung, insbesondere, da bei etwa 20% der Patienten bei Diagnose keine zirkulierenden leukämischen Blasten nachgewiesen werden können (Pui, 2006). Definitionsgemäß muss der Blastenanteil der kernhaltigen Zellen bei akuten lymphoblastischen Leukämien mindestens 20% betragen und die Blasten der lymphatischen Reihe zugeordnet werden können.

Die Diagnostik der akuten Leukämien basiert auf folgenden drei Säulen: 1. Die zytomorphologische und zytochemische Beurteilung. 2. Immunphänotypisierung. 3. Zytogenetik und Molekularbiologie.

**Zytomorphologie und Zytochemie** Die FAB-Klassifikation (French-American-British) für akute Leukämien wurde im Jahr 1976 von Bennett et al. vorgeschlagen (Bennett et al., 1976). Sie basiert auf konventionellen zytomorphologischen und zytochemischen Methoden. Dabei werden zunächst akute lymphoblastische und akute myeloische Leukämien voneinander abgegrenzt. Die Leukämieformen werden anschließend weiter untergliedert, wobei die drei Subtypen der akuten lymphoblastischen Leukämie (L1, L2 und L3) durch das Auftreten bestimmter zytologischer Eigenschaften und durch die Heterogenität in der Verteilung dieser Muster definiert sind (Tabelle 1.1). Die FAB-Klassifikation hat aufgrund neuerer diagnostischer Verfahren an Bedeutung verloren.

FAB-Klassifikation der ALL	
FAB-Typ	zytologische Eigenschaften
L1	Kleine Zellen mit homogenem Chromatin. Meist reguläre Zellkerne mit unauffälligen Nucleoli. Spärliches Zytoplasma.
L2	Große, heterogene Zellen mit variablem, heterogenem Chromatin. Die irregulären Zellkerne weisen gelegentlich größere Nucleoli auf. Gelegentlich deutliche Basophilie.
L3	Große, homogene Zellen mit homogenem, fein getüpfeltem Chromatin. Der Zellkern ist regulär konfiguriert und kann prominente Nucleoli aufweisen. Charakteristisch ist eine ausgeprägte Basophilie und multiple zytoplasmatische Vesikel.

**Tabelle 1.1** – Die FAB-Klassifikation unterteilt die lymphoblastische Leukämie nach den Vorschlägen von Bennett et al. (1976) in drei Subtypen (L1, L2, L3). Die Einteilung erfolgt anhand zytomorphologischer und zytochemischer Kriterien. Typisch für die ALL ist eine negative Peroxidase-Reaktion und eine positive PAS(Periodsäure-Schiff)-Reaktion (Munker et al., 2006). (Nach Bennett et al. (1976))

**Immunphänotypisierung** Bei der Immunphänotypisierung wird mit Hilfe von markierten Antikörpern die Expression membranständiger und intrazellulärer Antigene auf Leukämiezellen durchflusszytometrisch untersucht (Erklärung des Verfahrens in Kapitel 2.3). Das Antigen-Expressionsmuster ergänzt die morphologisch gestützte Liniendeterminierung und ermöglicht auch in unklaren Fällen eine Zuordnung zu einer der Zellreihen (Béné et al., 1995). Darüber hinaus ermöglicht die Immunphänotypisierung auch die Zuordnung zu einem Differenzierungsstadium innerhalb der T-Zell-, B-Zell- und myeloischen Reihe.

Für die Subtypisierung der ALL existieren mehrere Klassifikationen, wobei die EGIL<sup>3</sup> und SJCRH<sup>4</sup> Klassifikationen am weitesten verbreitet sind (Tabelle 1.2).

	<b>B-ALL*</b>				<b>T-ALL†</b>			
	pro-B	common	prä-B	reife	pro-T	prä-T	kortikale	reife
<i>Vorläufer-Antigene</i>								
TdT	+	+	+	-	+	+	+	+/-
HLA-DR	+	+	+	+	+/-	-	-	-
CD10	-	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-
<i>B-Antigene</i>								
CD19	+	+	+	+	-	-	-	-
CD79a	+	+	+	+	-	-	-	-
cyCD22	+	+	+	+	-	-	-	-
cyIgM	-	-	+	-	-	-	-	-
mIg	-	-	-	+‡	-	-	-	-
<i>T-Antigene</i>								
cyCD3	-	-	-	-	+	+	+	-
mCD3	-	-	-	-	-	+	+	+
CD7	-	-	-	-	+	+	+	+
CD2	-	-	-	-	-	+	+	+
CD1a	-	-	-	-	-	-	+	-

\*Mindestens zwei der drei B-Zell-Marker CD19, CD79a und CD22 müssen positiv sein.

†Der T-Zell-Marker CD3 muss zytoplasmatisch oder membranständig nachweisbar sein.

‡Selten mIg-, dann ist aber der Nachweis von intrazellulären Leichtketten (Typ  $\kappa$  oder  $\lambda$ ) erforderlich.

**Tabelle 1.2** – Einteilung der akuten lymphoblastischen Leukämien nach der EGIL-Klassifikation. Der Nachweis eines Oberflächen-Antigens gilt als positiv, wenn die Expression des Antigens auf  $\geq 20\%$  der Blasten nachweisbar ist. Aufgrund ihrer hohen Spezifität bilden CD3, CD79a und TdT eine Ausnahme, sie werden bereits ab 10% als positiv gewertet. TdT: terminale Desoxyribonukleotidyltransferase; cy: zytoplasmatisch; m: membranständig; Ig: Immunglobulin. (Nach Pui (2006) und Béné et al. (1995))

Entsprechend der EGIL-Klassifikation erfolgt die Unterteilung der B-Zell-ALL anhand ihres Reifesta-

<sup>3</sup>European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (Béné et al., 1995)

<sup>4</sup>St. Jude Children's Research Hospital (Memphis, Tennessee, USA)

diums in eine pro-B-ALL (B-I), common-B-ALL (B-II), prä-B-ALL (B-III) und reife B-ALL (B-IV). Grundsätzliche Voraussetzung für die Zuordnung zur B-Vorläuferzell-ALL (BVZ-ALL) ist, dass mindestens zwei der drei B-Zell-Rezeptor-assoziierten Antigene CD19, CD22 und CD79a positiv sind. Die Unterscheidung der verschiedenen BVZ-ALL Subgruppen erfolgt anschließend durch CD10 und Immunglobuline.

Die frühe pro-B-ALL (B-I) ist CD10 und IgM negativ. Die common-B-ALL (B-II) als nächste Reifungsstufe ist dagegen CD10 positiv. CD10 wird aufgrund seiner Spezifität auch als common-ALL-Antigen (CALLA) bezeichnet und ist bei pädiatrischen B-ALL mit einer relativ guten Prognose assoziiert (Pezzutto et al., 2006).

Die reiferen B-ALL (B-III und B-IV) exprimieren bereits die für B-Zellen charakteristischen Immunglobuline, wobei dies mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist (Pezzutto et al., 2006). Bei der prä-B-ALL (B-III) ist das Immunglobulin vom Typ M zunächst im Zytoplasma lokalisiert. Erst die reife-B-ALL (B-IV) ist als Zeichen der fast abgeschlossenen Ausreifung auch für membranständig gelegene Immunglobuline positiv (mit begleitender  $\kappa$ - oder  $\lambda$ - Leichtkettenrestriktion<sup>5</sup>).

Weitere typische B-Zell-assoziierte Oberflächenmarker können auf einem Großteil der B-ALL nachgewiesen werden. Dazu gehören zum Beispiel HLA-DR (humanes Leukozytenantigen DR) und das Enzym TdT (terminale Desoxyribonukleotidyltransferase). T-Zell-Marker sind nur ausnahmsweise positiv.

Analog zur B-ALL wird auch die T-ALL anhand ihres Expressionsmusters einem Reifungsgrad zugeordnet (Tabelle 1.2). Charakteristisch für die T-Zellreihe ist das Vorhandensein des T-Zell-Rezeptor-assoziierten Antigens CD3 (Pezzutto et al., 2006). Selten können ALL auch ein B-/T-Zell-biphenotypisches Expressionsmuster aufweisen. Sie werden im Rahmen der EGIL-Klassifikation als eigenständige ALL-Entität berücksichtigt. Ebenso sind undifferenzierte lymphoblastische Leukämien selten. Sie weisen keine B- und T-Zell-spezifischen Antigene auf, sind aber für den unspezifischen lymphozytischen Marker TdT positiv (Pezzutto et al., 2006).

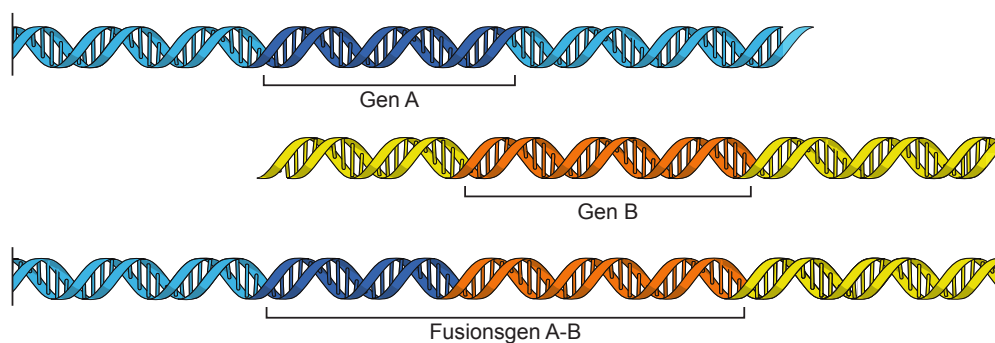
Die immunphänotypische Subtypisierung ist zwar von therapeutischer und prognostischer Relevanz, Sie wird jedoch zunehmend durch Genotypisierungen ersetzt (Pui, 2006).

**Molekulargenetik** Im Gegensatz zu soliden Tumoren weisen Leukämien häufig balancierte oder reziproke Translokationen auf (Rowley, 1998; Pezzutto et al., 2006; Pui, 2006). Durch chromosomale Translokationen können Gene verschiedener Chromosomen fusionieren. Die hierbei

---

<sup>5</sup>Bei der Leichtkettenrestriktion sind die leichten Ketten der Immunglobuline nicht variabel, sondern durch die Monoklonalität der Ig-bildenden Zelle auf einen Leichtkettentyp festgelegt.

entstehenden Fusionsgene kodieren Fusionsproteine, die sich von ihren Wildtyp-Proteinen durch eine veränderte Proteinstruktur oder ein verändertes Expressionsmuster unterscheiden (Rabbitts, 1994; Look, 1997; Zelent et al., 2004). Häufig sind Genabschnitte betroffen, die wichtig für die Stammzell-Differenzierung und die Zelllinien-spezifische Ausreifung sind. Durch die Beeinflussung regulatorischer Zellprozesse kann die Zelle ihre physiologischen Eigenschaften verlieren, Apoptose-resistent werden, die Fähigkeit zur Differenzierung verlieren oder sich unkontrolliert vermehren (Pui et al., 2004). Die häufigsten ALL-Fusionsgene und die korrespondierenden Translokationen sind in Tabelle 1.3 aufgelistet. Neben diesen Translokationen weisen B-ALL meistens weitere komplexe numerische und strukturelle chromosomale Veränderungen auf.



**Abbildung 1.3** – Mechanismus der Fusionsgenbildung. Die Gene A und B befinden sich auf unterschiedlichen Chromosomen. Kommt es zu einer Translokation, deren Bruchpunkte im Bereich der beiden Gene liegen, fusionieren diese zu einem Fusionsgen A-B und einem reziproken Fusionsgen B-A (nicht dargestellt). Das Fusionsgen wird durch die Promotorsequenz des 5'-nahen Gens reguliert. (Eigene Abbildung)

Die Klassifikation molekulargenetischer Mutationen ist von großer therapeutischer und prognostischer Bedeutung, insbesondere durch die Fortschritte im Bereich des *rational drug designs*. So konnte durch die Entwicklung des Tyrosinkinase-Inhibitors Imatinib erstmals eine leukämische Mutation (BCR-ABL, Tabelle 1.3) zielgerichtet und spezifisch durch eine spezifische Pharmakotherapie antagonisiert werden. Weil molekulargenetische Veränderungen nur ausnahmsweise ein morphologisches Korrelat haben, ist die molekulargenetische Analyse zu einem unverzichtbaren Werkzeug in der Klassifizierung der Leukämien geworden.

## 1.4 Das Fusionsgen *TEL-AML1*

Die Translokation  $t(12;21)(p13;q22)$  ist die häufigste Translokation bei pädiatrischen Leukämien (Tabelle 1.3). Durch die Translokation fusionieren die Gene *TEL* und *AML1* zu einem gemeinsamen

Fusionsgene bei ALL				
Fusionsgen	Translokation	Häufigkeit (%)		Typ
		Kinder	Erwachsene	
<i>TEL-AML1</i>	t(12;21)(p13;q22)	20-25	< 1	B-ALL
<i>BCR-ABL</i>	t(9;22)(q34;q11)	3-5	20-30	Ph+ B-ALL
<i>E2A-PBX1</i>	t(1;19)(q23;p13)	5-6	3	prä-B-ALL
<i>MLL-AF4</i>	t(4;11)(q21;q23)	2	3-5	pro-B-ALL
<i>E2A-HLF</i>	t(17;19)(q22;p13)	< 1	< 1	prä-B-ALL

**Tabelle 1.3** – Rekurrende Genfusionen bei pädiatrischen und adulten ALL. BCR: breakpoint cluster region; ABL: Abelson; PBX1: pre-B-Zell Leukämie Homeobox 1; MLL: myeloid/lymphoid or mixed lineage leukemia; AF4: ALL Fusionsgen von Chromosom 4; HLF: hepatischer Leukämiefaktor; Ph: Philadelphia-Chromosom (bezeichnet das verkürzte Chromosom 22 nach der Translokation mit Chromosom 9). (Nach Pui (2006))

*TEL-AML1*-Fusionsgen. Es kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der onkogene Eigenschaften besitzt und B-Vorläuferzellen präleukämisch transformiert.

### 1.4.1 TEL

TEL (Translocation–ETS–Leukemia), auch ETV6 genannt, ist ein nukleärer Transkriptionsfaktor, dessen Gen sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 12 befindet (12p13). Er gehört zur Gruppe der ETS-Transkriptionsfaktoren (E-26 transforming specific), die als gemeinsames Merkmal eine ETS-Domäne besitzen, durch die eine sequenzspezifische DNA-Bindung vermittelt wird (Leprince et al., 1983; Nunn et al., 1983; Poirel et al., 1997). Das *TEL*-Gen umfasst 240 Kilo-Basenpaare DNA und setzt sich aus 8 Exons und 7 Introns zusammen.



**Abbildung 1.4** – Schematische Darstellung des TEL-Proteins. Es besteht aus 452 Aminosäuren und umfasst drei funktionelle Domänen. Proteininteraktionen mit mSin3A, UBC9 und N-CoR sind eingezeichnet. Auf sie wird im Text näher eingegangen. PD: Pointed Domäne; UBC9: ubiquitin-conjugating enzyme 9; N-CoR: nuclear corepressor. (Nach Loh und Rubnitz (2002); Zelent et al. (2004))

*TEL* wurde erstmals aus Zellen eines Patienten mit chronisch myelomonozytärer Leukämie (CMML) kloniert (Golub et al., 1994). Bei dem Patienten lag die Translokation t(5;12)(q33;p13) vor, bei der *TEL* mit der Tyrosin-Kinase Domäne des PDGF-Rezeptors (platelet-derived growth factor) zu



einem dominanten Onkogen fusioniert ist (Carroll et al., 1996; Jousset et al., 1997). Weitere *TEL*-Rearrangements ließen sich in verschiedenen hämatologischen Neoplasien nachweisen (Tabelle 1.4), wobei es sich bei den Fusionspartnern sowohl um Transkriptionsfaktoren, als auch um Proteinkinasen handelt. Zusätzlich konnte häufig eine weitere *TEL*-Deletion beobachtet werden. Man nimmt daher an, dass ein Loss-of-function<sup>6</sup> von *TEL* zur Genese oder Progression der *TEL-AML1*-positiven Leukämie beiträgt (Agape et al., 1997).

TEL-Fusionsgene		
Fusionsgen	Translokation	Literaturverweis
<i>TEL-AML1</i>	t(12;21)(p13;q22)	Romana et al. (1995a); Shurtleff et al. (1995)
<i>TEL-PDGF-R</i>	t(5;12)(q33;p13)	Golub et al. (1994)
<i>TEL-JAK2</i>	t(9;12)(p24;p13)	Lacronique et al. (1997); Peeters et al. (1997)
<i>TEL-EV11</i>	t(3;12)(q26;p13)	Raynaud et al. (1996b)
<i>TEL-ABL</i>	t(9;12)(q34;p13)	Papadopoulos et al. (1995)

**Tabelle 1.4** – Fusionspartner von *TEL* bei chromosomalen Translokationen. PDGF-R: platelet-derived growth factor receptor; ABL: Abelson; JAK2: Janus Kinase 2; AML1: Akute myeloische Leukämie 1; EVI1: Ecotropic viral integration site 1. (Nach Golub et al. (1997))

Der Transkriptionsfaktor *TEL* besteht aus drei funktionellen Domänen: 1. die Pointed Domäne (PD), 2. die Repressionsdomäne und 3. die ETS-Domäne. In Abbildung 1.4 ist die Proteinstruktur von *TEL* schematisch dargestellt.

**ETS-Domäne** Die ETS-Domäne ist eine DNA-Bindungsdomäne. Sie besteht aus einer hoch konservierten Aminosäuresequenz, die die DNA-Sequenz GGAA/T binden kann (Nye et al., 1992; Wasylyk et al., 1992; Thompson et al., 1991; Watson et al., 1988; Boyle et al., 1986). Die Sekundärstruktur der ETS-Domäne bildet ein Helix-Turn-Helix (HTH)-Motiv.

Zunächst wurde *in vitro* demonstriert, dass *TEL* an ETS-spezifische Bindungsstellen der DNA binden kann (Poirel et al., 1997). Jousset et al. (1997) konnten jedoch zeigen, dass *TEL* *in vivo* als Homodimer oder Oligomer vorliegt und in diesem Zustand nicht mit den regulären ETS-Bindungsstellen assoziieren kann.

**Pointed Domäne** Die Pointed Domäne, auch als B-Domäne bezeichnet (Boulukos et al., 1989), übernimmt bei *TEL* die Funktion einer Oligomerisierungsdomäne (Jousset et al., 1997). Damit

<sup>6</sup>Bei einer Loss-of-function Mutation wird ein Gen funktionslos, weil beide Allele eines Gens in eine funktionslose Form mutiert sind.

unterscheidet sich TEL von anderen ETS-Proteinen, die in der Regel als Monomere vorliegen, da sie keine Oligomerisierungseigenschaften aufweisen (Jousset et al., 1997; Wasylyk et al., 1993). Bemerkenswert ist, dass die Oligomerisierungseigenschaft vom übrigen Proteinkontext unabhängig zu sein scheint (Jousset et al., 1997).

Ausgehend von Gensequenz-Analysen wurde für die Pointed Domäne zunächst ein Helix-Loop-Helix(HLH)- oder Helix-Turn-Helix(HTH)-Motiv als Sekundärstruktur vermutet (Seth und Papas, 1990; Reddy und Rao, 1991; Wang et al., 1992). Dies stellte sich aber nach einer multiplen-Alignment Analyse von Jousset et al. (1997) als unwahrscheinlich heraus.

Die Pointed Domäne kann mit mehreren Proteinen interagieren. So konnten Chakrabarti et al. eine Interaktion mit dem Enzym UBC9 (Ubiquitin-conjugating enzyme) nachweisen (Chakrabarti et al., 1999). UBC9 gehört zu den Ubiquitin-konjugierenden Enzymen. Bei der Ubiquitinierung von Zielproteinen handelt es sich um reversible posttranslationale Modifikationen, die die Halbwertszeit, Eigenschaften und Verteilung von Proteinen beeinflussen können, wobei besonders der proteosomalen Degradation eine wichtige Rolle zukommt. Die UBC9-Bindung mit TEL führt jedoch nicht zu einer TEL-Degradation, sondern zu einer Modulation der transkriptionalen Aktivität von TEL.

Eine weitere Proteininteraktion findet mit dem Corepressor mSin3A statt (Fenrick et al., 1999). Über mSin3A wird die Ausbildung eines Repressionskomplexes, bestehend aus dem Transkriptionsfaktor TEL, den Corepressoren mSin3A und SMRT und den Histondeacetylasen 1 bis 3, vermittelt. In Verbindung mit der Repressionsdomäne von TEL wird dadurch die Transkription von bestimmten Genabschnitten reprimiert.

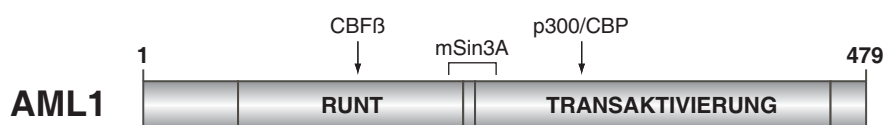
**Repressions-Domäne** Die zentral gelegene Repressionsdomäne bindet den Corepressor N-CoR (Wang und Hiebert, 2001). Über N-CoR werden Histondeacetylasen rekrutiert, die zusammen mit dem über die Pointed Domäne rekrutierten Repressionskomplex die transkriptionale Repression von TEL vermitteln (Loh und Rubnitz, 2002; Wasylyk et al., 1992). Ohne die Rekrutierung von N-CoR verliert TEL einen Großteil seiner repressiven Eigenschaften (Chakrabarti und Nucifora, 1999; Loh und Rubnitz, 2002).

**Funktionen von TEL** TEL ist ein vorwiegend repressiver Transkriptionsfaktor. Durch TEL werden Histondeacetylasen rekrutiert, die durch Histon-Deacetylierungen die Chromatinstruktur verdichten und dadurch die Transkription benachbarter Genabschnitte erschweren. Im menschlichen Organismus wird TEL ubiquitär exprimiert (Golub et al., 1994), wobei er in verschiedenen Geweben als anti-apoptotischer Faktor wirken kann (Wang et al., 1997). In der adulten Hämatopoese wird

durch TEL ein normaler Pool an lymphatischen Progenitorzellen aufrechterhalten (Wang et al., 1998).

## 1.4.2 AML1

AML1 (akute myeloische Leukämie 1), auch CBF $\alpha$ 2 (core binding factor) genannt, ist ein Transkriptionsfaktor, dessen Gen sich auf dem langen Arm von Chromosom 21 (21q22) befindet (Levanon et al., 1994). Er gehört zur Gruppe der RUNX-Proteine (runx-related genes), die als gemeinsames Merkmal eine DNA-bindende RUNX-homologe Domäne (RHD) tragen (Abbildung 1.5). Erstmals identifiziert wurde das *AML1*-Gen bei einer AML vom Typ FAB M2 mit der Translokation t(8;21)(q22;q22), bei der *AML1* mit dem *ETO*-Gen fusioniert ist (Miyoshi et al., 1991; Erickson et al., 1992; Nisson et al., 1992; Miyoshi et al., 1993). In den folgenden Jahren wurde die Beteiligung von *AML1* auch bei anderen leukämischen Translokationen nachgewiesen (Tabelle 1.5).



**Abbildung 1.5** – Schematische Darstellung des AML1-Proteins. Es besteht aus 479 Aminosäuren. Die RUNT-homologe Domäne (RUNT) besitzt DNA bindende Eigenschaften, die durch CBF $\beta$  verstärkt werden. Über die Transaktivierungsdomäne wird die Aktivität des Transkriptionsfaktors über Cofaktoren (p300/CBP) reguliert. CBF: core binding factor; CBP: CREB-bindendes Protein. (Nach Zelent et al. (2004))

Als  $\alpha$ -Untereinheit bildet AML1 über die RH-Domäne zusammen mit dem Protein CBF $\beta$  als  $\beta$ -Untereinheit einen als CBF (core binding factor) bezeichneten heterodimeren Transkriptionsfaktorenkomplex (Tenen et al., 1997). CBF $\beta$  bindet jedoch nicht direkt die DNA, sondern verstärkt lediglich die Affinität der  $\alpha$ -Untereinheit zu der DNA (Lopez et al., 1999; Jousset et al., 1997). Neben AML1 kann die  $\alpha$ -Untereinheit auch durch die Transkriptionsfaktoren AML2 (CBF $\alpha$ 3) und AML3 (CBF $\alpha$ 1) gebildet werden.

AML1 besitzt eine C-terminal gelegene Transaktivierungsdomäne (Abbildung 1.5), über die verschiedene Coaktivatoren die transkriptionelle Aktivität von AML1 regulieren. Wesentliche Aktivatoren der Transkription sind die Cofaktoren p300 und CBP (CREB-bindendes Protein) (Kitabayashi et al., 1998). Diese bilden einen Histon-Acetyl-Transferase (HAT) Komplex mit PCAF<sup>7</sup>, der im Bindungsbereich von AML1 die Chromatinstruktur durch Histon-Acetylierungen auflockert und damit eine

<sup>7</sup>PCAF: P300/CBP-assoziiierter Faktor

AML1-Fusionsgene		
Fusionsgen	Translokation	Literaturverweis
<i>TEL-AML1</i>	t(12;21)(p13;q22)	Golub et al. (1995); Romana et al. (1994, 1995a)
<i>AML1-ETO</i>	t(8;21)(q22;q22)	Miyoshi et al. (1991)
<i>AML1-EV11</i>	t(3;21)(q26;q22)	Mitani et al. (1994)
<i>AML1-MTG16</i>	t(16;21)(q24;q22)	Gamou et al. (1998)

**Tabelle 1.5** – Fusionspartner von *AML1* bei chromosomalen Translokationen. ETO: eight twenty-one; EV11: Ecotropic viral integration site 1; MTG16: myeloid transforming gene.

Transkription der DNA ermöglicht (Kitabayashi et al., 1998; Yang et al., 1996). Transkriptionell aktiviert werden unter anderem Gene, die für IL-3 (Taylor et al., 1996), GM-CSF (Cockerill et al., 1996) und den T-Zell-Rezeptor (Erman et al., 1998) kodieren. Über die Regulation von Homeobox(HOX)-Genen<sup>8</sup> werden viele weitere regulatorische Gene der Hämatopoese beeinflusst (Ichikawa et al., 2004; Look, 1997).

Auf der anderen Seite kann AML1 auch als transkriptionaler Repressor wirken (Imai et al., 1998). Dazu kann AML1 über ein C-terminales VWRPY Motiv mit dem Corepressor TLE1 (transducin-like enhancer of split) interagieren und als transkriptionaler Repressor wirken (Imai et al., 1998; Aronson et al., 1997). Außerdem konnte demonstriert werden, dass AML1 mit dem Corepressor mSin3A assoziieren kann (Fenrick et al., 1999), wobei die Assoziation über Phosphorylierungen reguliert wird (Imai et al., 2004). In der Regel wirkt AML1 jedoch als transkriptionaler Aktivator.

Von AML1 existieren drei Spleißvarianten (AML1a, AML1b, AML1c), wobei AML1b und AML1c alle funktionellen Domänen besitzen (Miyoshi et al., 1995). Bei der Spleißvariante AML1a fehlt die Transaktivierungsdomäne. AML1a scheint vor allem regulatorische Effekte auf AML1b auszuüben (Zhang et al., 2005; Tanaka et al., 1997).

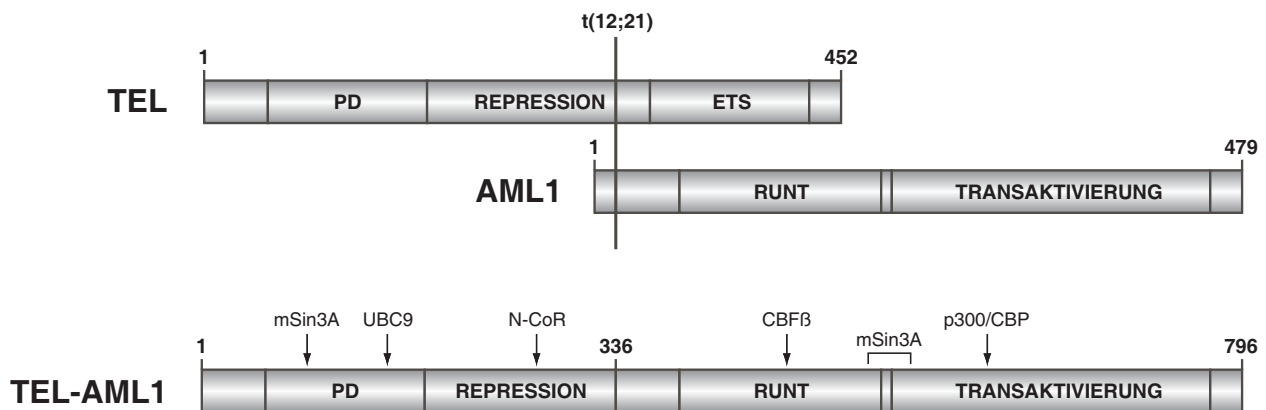
### 1.4.3 TEL-AML1

Bei der Translokation t(12;21)(p13;q22) fusioniert das *TEL*-Gen von Chromosom 12 mit dem *AML1*-Gen auf Chromosom 21. Die Bruchstellen liegen meist im Intron 5 von *TEL* und breit verteilt im großen Intron 1 von *AML1* (Wiemels und Greaves, 1999; Romana et al., 1995b).

Das Fusionsprotein TEL-AML1 wird über den *TEL*-Promotor exprimiert (Romana et al., 1995a). Es beinhaltet die 336 N-terminalen Aminosäuren von TEL und beinahe die gesamte Proteinstruktur und

<sup>8</sup>HOX-Gene tragen eine phylogenetisch hoch konservierte Homeobox-Sequenz. Sie kodieren für Transkriptionsfaktoren, die die Zelldiversifikation und Musterbildung in der Embryonalentwicklung steuern.

alle funktionellen Domänen von AML1 (Golub et al., 1995; Romana et al., 1995b; Shurtleff et al., 1995; McLean et al., 1996; Raynaud et al., 1996a). Von TEL sind die Pointed Domäne und ein großer Teil der Repressionsdomäne erhalten, die DNA-bindende ETS-Domäne hingegen fehlt (Golub et al., 1996). Das reziproke AML1-TEL-Fusionsprotein wird nur inkonstant exprimiert und scheint von geringer biologischer Bedeutung zu sein (McLean et al., 1996). Eine Übersicht der TEL-AML1 Proteinstruktur gibt Abbildung 1.6.



**Abbildung 1.6** – Schematische Darstellung der Proteine TEL, AML1 und TEL-AML1. Bei TEL und AML1 ist der Bruchstellenbereich der Translokation t(12;21) eingezeichnet. Für TEL-AML1 sind zusätzlich die Proteininteraktionen eingezeichnet. (Nach Loh und Rubnitz (2002); Zelent et al. (2004))

**Entstehung** Chromosomale Translokationen entstehen durch die fehlerhafte Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (Wiemels und Greaves, 1999; Zucman-Rossi et al., 1998; Gillert et al., 1999). Ursache ist eine nicht-homologe Rekombination zweier Chromosomenarme. Befinden sich in beiden Bruchstellenbereichen Gene, so fusionieren diese infolge der Translokation. Es entstehen Fusionsgene mit veränderten Eigenschaften oder veränderten Expressionsmustern.

Für B-Vorläuferzellen konnte gezeigt werden, dass durch die Anwendung von subletalen apoptotischen Stimuli, Etoposid, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder Salicylsäure Doppelstrangbrüche im Intron 5 von *TEL* und im Intron 1 von *AML1* gehäuft beobachtet werden konnten. Nach Serum-Entzug und Aminophyllin-Behandlung konnten auch *TEL-AML1*-Fusionstranskripte nachgewiesen werden (Eguchi-Ishimae et al., 2001). Bei *TEL* waren die Bruchstellen häufig in der Nähe einer für DNA-Schäden anfälligen hoch polymorphen Repeat-Region mit paranemischer<sup>9</sup> DNA-Struktur lokalisiert (Wiemels und Greaves, 1999). Unabhängig davon sind beide Gene in B-Vorläuferzellen stark aktiviert und aufgrund der damit verbundenen relativ lockeren Chromatinstruktur anfälliger für DNA-Schäden.

<sup>9</sup>Bei einer paranemischen DNA-Struktur können die Einzelstränge ohne gegenseitige Auseinanderrotation voneinander getrennt werden (Yagil, 1991).

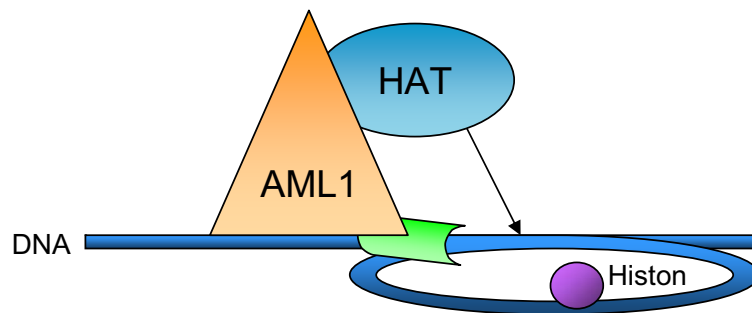
Neben spezifischen prädisponierenden Faktoren für Entstehung einer *TEL-AML1* Genfusion gibt es noch allgemeine Risikofaktoren, die generell die Entstehung einer Leukämie begünstigen. Dazu zählen ionisierende Strahlen, Alkylantien, Topoisomerase II-bindende Substanzen, Virusinfektionen, prädisponierende Genotypen und nutritive Faktoren, wie etwa Folsäuremangel (Pui, 2006).

**Pathophysiologie** Der Transkriptionsfaktor AML1 bindet über die RH-Domäne sequenzspezifisch DNA-Abschnitte. Über die Transaktivierungsdomäne wird dabei die transkriptionale Aktivität von AML1 reguliert. Er kann kontextabhängig als transkriptionaler Aktivator oder Repressor wirken, wobei er jedoch meist als transkriptionaler Aktivator fungiert. Die transkriptionale Aktivierung basiert auf einer Histon-Acetyl-Transferasen (HAT) vermittelten Histon-Acetylierung, durch die die Bindung der DNA an die Histone abgeschwächt wird. Die Folge ist eine Auflockerung der Chromatinstruktur im Bindungsbereich von AML1, wodurch die Transkription der AML1-Zielgene ermöglicht wird (Abbildung 1.7a).

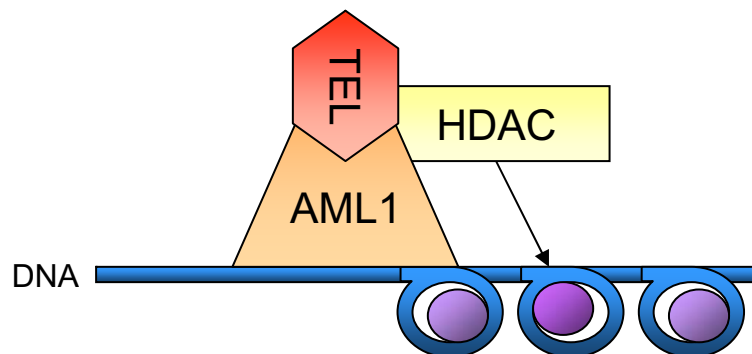
Das Fusionsprotein *TEL-AML1* ist ebenfalls ein Transkriptionsfaktor. Über die RH-Domäne reguliert er die gleichen Zielgene wie AML1. Im Gegensatz zu AML1 wirkt *TEL-AML1* aber aufgrund seiner veränderten Eigenschaften als dysregulierter, konstitutiver Repressor (Hiebert et al., 1996; Fears et al., 1997). Die Zielgene von AML1 werden durch *TEL-AML1* kontextunabhängig reprimiert (Abbildung 1.7b). Dies führt dazu, dass *TEL-AML1*-positive B-Vorläuferzellen präleukämisch transformieren und die Anzahl pluripotenter hämatopoetischer Vorläuferzellen zunimmt.

Es konnte gezeigt werden, dass die Genrepression von *TEL-AML1* vor allem durch das *TEL*-Fragment vermittelt wird. Ohne die Pointed Domäne von *TEL* verliert *TEL-AML1* seine konstitutiv reprimierenden Eigenschaften (Fischer et al., 2005). Durch die Assoziation mit den Corepressoren mSin3A, N-CoR und SMRT werden Histondeacetylasen rekrutiert, die eine konstitutive Transkriptionsrepression bewirken (Nagy et al., 1997; Chakrabarti und Nucifora, 1999; Fenrick et al., 1999; Guidez et al., 2000). Histondeacetylasen reprimieren die Transkription, indem sie die DNA-Bindung an Histone durch Histon-Deacetylierungen verstärken. Infolgedessen wird die Chromatinstruktur verdichtet und die Initiation der Transkription benachbarter Genabschnitte verhindert. Aufgrund dieses Pathomechanismus kann die *TEL-AML1*-abhängige Genrepression maßgeblich durch Histondeacetylase-Inhibitoren (HdI), wie zum Beispiel Trichostatin A, antagonisiert werden (Chakrabarti und Nucifora, 1999).

Über die Pointed Domäne bildet *TEL-AML1* Dimere mit *TEL* oder *TEL-AML1*, wodurch die Interaktion mit Corepressoren möglicherweise verstärkt wird (Fischer et al., 2005). Über die Pointed Domäne findet zudem eine Interaktion mit dem Enzym UBC9 (Ubiquitin-conjugating enzyme) statt. Normalerweise steuert UBC9 durch SUMO-1 Konjugationen das nukleoläre Verteilungsmuster



(a) AML1 bindet sequenzspezifisch DNA-Abschnitte und wirkt als transkriptionaler Aktivator, indem durch HAT die Chromatinstruktur aufgelockert wird. Der DNA-Abschnitt kann durch Polymerasen (grün dargestellt) transkribiert werden.



(b) TEL-AML1 bindet die gleichen DNA-Abschnitte wie AML1, wirkt aber als transkriptionaler Repressor. Durch Histondeacetylasen (HDAC) wird die Chromatinstruktur verdichtet und die Transkription der Genabschnitte blockiert.

**Abbildung 1.7** – Schematische Darstellung der AML1- (a) und TEL-AML1-Funktion (b). HAT: Histoneacetyl-Transferasen; HDAC: Histondeacetylasen. (Eigene Abbildung)

des Wildtyp-TEL. Durch die UBC9-Interaktion mit der Pointed Domäne wird aber auch TEL-AML1 SUMO-1 konjugiert. Als Folge weist TEL-AML1 das gleiche nukleoläre Verteilungsmuster wie Wildtyp-TEL auf, wohingegen die sequenzspezifische DNA-Bindung weiterhin über das AML1-Fragment vermittelt wird.

**TEL-Deletion** Nach derzeitigem Kenntnisstand reicht die Expression des TEL-AML1-Fusionsproteins alleine nicht aus, um eine Leukämie zu induzieren. Fischer et al. (2005) konnten im Mausmodell zeigen, dass durch die Expression von *TEL-AML1* die Ausdifferenzierung des pro-B-Zell-Kompartiments behindert wird, und im Knochenmark multipotente hämatopoetische Vorläuferzellen akkumulieren. Über den Beobachtungszeitraum von einem Jahr kam es jedoch nicht zur Ausbildung einer Leukämie. Diese Studie deckt sich mit den Ergebnissen von Mori et al. (2002), die das TEL-AML1-Fusionsprotein bei ungefähr 1% aller Neugeborenen im Nabelschnurblut nachweisen konnten. Damit war es über 100-mal häufiger, als es die Rate *TEL-AML1*-positiver Leukämien vermuten lässt. Deswegen wird angenommen, dass die *TEL-AML1* Genfusion eine prädisponierende präleukämische Initialmutation ist und bereits pränatal entsteht (Maia et al., 2001). Entsprechend einer two- oder multi-hit Hypothese (Knudsonhypothese) wären weitere Mutationen nötig, um eine Leukämie zu induzieren (Greaves, 2003; Knudson, 1992). Diese Annahme wird durch die Beobachtung gestützt, dass nach dem Nachweis von *TEL-AML1* in hämatopoetischen Zellen über zehn Jahre vergehen können, bis eine Leukämie auftritt (Wiemels et al., 1999).

Als zweites Mutationsereignis kommt vor allem eine *TEL*-Deletion infrage. Bei den meisten *TEL-AML1*-positiven Leukämien lässt sich eine *TEL*-Deletion auf dem zytogenetisch intakten Chromosom 12 nachweisen. Die *TEL*-Deletion betrifft hierbei nur eine Subpopulation der *TEL-AML1*-positiven Zellklone (Romana et al., 1996). Weiterhin berichteten Ford et al. (2001), dass bei zwei untersuchten Leukämiepatienten die *TEL*-Mutation zum Zeitpunkt des ersten Rezidivs von der ursprünglich dokumentierten *TEL*-Mutation abwich. Es wird diskutiert, ob in diesen beiden Fällen das Rezidiv durch eine erneute Mutation im *TEL*-Gen in übriggebliebenen *TEL-AML1*-positiven präleukämischen Zellklonen entstanden ist (Kim et al., 1996). Die Bedeutung der *TEL*-Deletion ist jedoch nicht abschließend geklärt. McLean et al. (1996) konnten zeigen, dass TEL-AML1 sowohl mit sich selbst als auch mit dem Wildtyp-TEL dimerisieren kann. Durch eine *TEL*-Deletion würde TEL als Dimerisierungspartner wegfallen und dadurch eine Homodimerisierung von TEL-AML1 begünstigen. Möglicherweise wird so die onkogene Aktivität von TEL-AML1 verstärkt (Golub et al., 1995). Zusätzlich könnte der Funktionsverlust von TEL die leukämische Transformation zusätzlich begünstigen.



**Klinische Aspekte der *TEL-AML1*-positiven Leukämie** Die kurative Therapie der ALL beginnt in der Regel mit einer intensiven Polychemotherapie als sogenannte Induktionsphase, während der eine vollständige Rückbildung (Remission) der Erkrankung angestrebt wird. Es folgen Konsolidierungs- und Erhaltungsphase mit dem Ziel einer anhaltenden Remission. Bei gesichertem ZNS-Befall kann zusätzlich eine ZNS-Bestrahlung erforderlich sein. Bei Patienten mit einer hohen Rezidivwahrscheinlichkeit oder einem schlechten Ansprechen der Therapie kann, wenn ein immungenetisch passender Spender zur Verfügung steht, zusätzlich eine allogene Stammzell- bzw. Knochenmarktransplantation durchgeführt werden, der eine Hochdosis-Chemotherapie vorangeht (Gadner et al., 2005).

Erste Therapiebeobachtungsstudien haben ergeben, dass *TEL-AML1*-positive Leukämien ein besonders gutes Therapieergebnis zeigen (Loh und Rubnitz, 2002). Über 92% der *TEL-AML1*-positiven Patienten überlebten nach Therapie eine mittlere Beobachtungszeit von 5 bzw. 8 Jahren (Shurtleff et al., 1995; McLean et al., 1996). Auch wurde eine gegenüber *TEL-AML1*-negativen Leukämien signifikant niedrigere Rezidivrate beschrieben (McLean et al., 1996). Vor diesem Hintergrund wurde der *TEL-AML1*-Status als möglicher positiv-prädiktiver Marker für die Risikostratifizierung und den Therapieerfolg diskutiert.

Die in den darauffolgenden Jahren publizierten Studien zeigten zum Teil deutlich abweichende Ergebnisse (Nakao et al., 1996; Harbott et al., 1997; Seeger et al., 1998; Pui, 2000). Seeger et al. (1998) konnten zeigen, dass von 146 B-Vorläufer-ALL-Patienten, die alle nach dem gleichen Studienprotokoll behandelt wurden (BFM-Protokoll), 24% im Stadium des 1. Rezidivs *TEL-AML1* positiv waren. Dieser Prozentsatz entspricht dem Anteil *TEL-AML1*-positiver Leukämien bei Diagnosestellung, was gegen eine seltenere Rezidivrate spricht. Allerdings konnte bestätigt werden, dass die rezidivfreie Zeit signifikant verlängert war (Seeger et al., 1999). Vor diesem Hintergrund reevaluierten Loh et al. ihre vormals publizierten Studienergebnisse. Dabei zeigte sich, dass das ereignisfreie 5-Jahres-Überleben und das Gesamtüberleben im *TEL-AML1*-positiven Patientenkollektiv etwa 8-9% höher als in der Kontrollgruppe war ( $p = 0,03$  und  $0,05$ ). In einer multivariaten Regressionsanalyse war der *TEL-AML1*-Status jedoch kein unabhängiger prädiktiver Faktor. Als unabhängige Faktoren wurden hingegen die Variablen *Risikogruppenzuordnung*<sup>10</sup> ( $p = 0,009$ ) und *Asparaginasebehandlung* ( $p = 0,04$ ) identifiziert (Loh et al., 2006).

Trotz der verbesserten Therapie ist die Leukämie eine ernsthafte Erkrankung mit potenziell tödlichem Ausgang. Auch unter optimalen Therapiebedingungen sterben über 10% der Patienten. Auf der anderen Seite wird durch die medikamentöse Behandlung und durch die Strahlentherapie das Auftreten von Zweittumoren signifikant begünstigt. Bei der ALL wird ein 14-facher Anstieg von

<sup>10</sup>Die Risikogruppenzuordnung erfolgte über die Variablen *Alter* und *Leukozytenzahl bei Diagnosestellung*.

malignen Tumorerkrankungen beobachtet. Das kumulative Risiko beträgt nach 15 Jahren bereits 3,3% (Borgmann et al., 2008; Löning et al., 2000). Vor allem hohe Dosen von Etoposid und Cyclophosphamid im Rahmen der Konditionierung vor Knochenmarktransplantation werden für das Auftreten sekundärer Neoplasien verantwortlich gemacht (Borgmann et al., 2008). Insbesondere für junge Patienten ist der Anstieg sekundärer Neoplasien ein Problem, da ihr kumulatives Risiko aufgrund der ferneren Lebenserwartung verhältnismäßig hoch ist. Es werden daher weiterhin große Anstrengungen unternommen, die vorhandenen Therapieregime zu optimieren und neue Therapiemöglichkeiten zu entwickeln. Die zellulären Immuntherapien zählen zu diesen neuartigen Therapieformen.

## 1.5 Aufgabenstellung der Arbeit

Die therapeutischen Optionen zur Behandlung der Rezidiv-ALL sind eingeschränkt. Daher könnten immuntherapeutische Ansätze interessante Alternativen bieten. Die Entwicklung einer dendritischen Zellvakzine ist hierbei eine vielversprechende Möglichkeit, wobei eine Strategie die Induktion einer spezifischen Immunantwort gegen leukämiespezifische Fusionsproteine ist. So könnten zum Beispiel leukämische dendritische Zellen im Rahmen neuer Therapiestrategien genutzt werden, um eine antileukämische Immunreaktion zu induzieren, indem leukämieassoziierte Selbst-Antigene oder Fusionsproteine präsentiert werden (Yun et al., 1999). Voraussetzung ist jedoch, dass die leukämischen Selbst-Antigene weiterhin exprimiert werden.

Die chromosomale Translokation t(12;21)(p13;q22) ist die häufigste Translokation bei pädiatrischen Leukämien. Die Gene *TEL* und *AML1* fusionieren zu einem *TEL-AML1*-Fusionsgen, das für einen onkogenen Transkriptionsfaktor kodiert. Dieser fehlreguliert die Zielgene von *AML1*, indem er als konstitutiver Repressor wirkt und B-Vorläuferzellen präleukämisch transformiert. Vermittelt wird die *TEL-AML1*-abhängige Repression durch mehrere Corepressoren, die Histondeacetylasen rekrutieren. Histondeacetylase-Inhibitoren (HdI) können die repressive Wirkung von *TEL-AML1* antagonisieren, indem sie Histondeacetylasen hemmen.

In Vorarbeiten wurde bereits der positive Einfluss des HdI Trichostatin A auf die *ex vivo* Produktion leukämischer DC nachgewiesen (Moldenhauer et al., 2004; Insinga et al., 2005). In dieser Arbeit sollen Kulturbedingungen erarbeitet werden, um aus *TEL-AML1*-positiven leukämischen Blasten dendritische Zellen als mögliche Zellvakzine zu generieren. Insbesondere soll untersucht werden, ob analog zu Trichostatin A auch die HdI Valproat, Isobutyrat und Suberoylanilid-Hydroxamsäure (Saha) die Differenzierung zu dendritischen Zellen signifikant beeinflussen können.

Weiterhin soll untersucht werden, ob leukämische dendritische Zellen weiterhin das Fusionsonkoprotein *TEL-AML1* exprimieren. Erst durch die fortgesetzte Expression von *TEL-AML1* wären leukämische dendritische Zellen in der Lage, *TEL-AML1* zu präsentieren um damit eine *TEL-AML1* spezifische Immunreaktion auszulösen.

Folgende konkrete Fragestellungen sollen im Rahmen dieser Arbeit behandelt werden:

1. Welchen Einfluss haben die HdI Valproat, Isobutyrat und Saha auf die Differenzierung zu leukämischen dendritischen Zellen?
2. Führen HdI in den eingesetzten Konzentrationen zu einer gesteigerten Histon-Acetylierung?

3. Verändert sich durch die Behandlung mit HdI die Expression von *TEL-AML1*? Ist die *TEL-AML1*-Expression in leukämischen dendritischen Zellen verändert?
4. Lassen sich die Ergebnisse des Zelllinien-Modells auf ALL-Zellen von Patienten übertragen? Führt die Behandlung mit HdI bei *TEL-AML1*-positiven Patientenzellen zu einer veränderten Expression von *TEL-AML1*?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Zellen

**Patientenzellen** Die Knochenmarkbiopsien von 136 Kindern mit diagnostizierter ALL wurden aufbereitet und der *TEL-AML1*-Status bestimmt (Schmidt et al., 2009). Insgesamt standen 25 *TEL-AML1*-positive Patientenproben zur weiteren experimentellen Analyse zur Verfügung, von denen sechs im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden. Für die Studie an Patientenzellen lag ein positives Ethikvotum der Ethikkommission der Charité vor. Für jeden Patienten lag eine schriftliche Einwilligungserklärung der Erziehungsberechtigten vor.

**Zelllinien** Die Zelllinie *REH* wurde 1973 aus dem peripheren Blut eines 15-jährigen nordafrikanischen Mädchens mit akuter lymphoblastischer Leukämie im Stadium des ersten Rezidivs gewonnen. Die Zelllinie trägt die Translokation  $t(12;21)(p13;q22)$  und exprimiert das Fusionsgen *TEL-AML1* (Poirel et al., 1997). Das zweite *TEL* Allel ist deletiert. Der immunologische Phänotyp entspricht einer common B-ALL (B-II) und ist negativ für CD80, CD86 und positiv für HLA-DR (Matsuo und Drexler, 1998). Die Zelllinie *HL-60* wurde 1976 aus dem peripheren Blut einer 35-jährigen Frau mit akuter myeloischer Leukämie (FAB Typ AML-M2) gewonnen (Gallagher et al., 1979). Die Zelllinie *NALM-6* wurde 1976 aus dem peripheren Blut eines 19-jährigen Mannes mit prä-B-ALL (B-III) im Stadium des ersten Rezidivs gewonnen. Sie trägt die Translokation  $t(5;12)(q31;p12)$  ohne Beteiligung des *TEL*-Gens (Wlodarska et al., 1997). Die Zelllinie *MOLT-16* wurde 1984 aus dem peripheren Blut eines 5-jährigen Mädchens mit T-ALL im Stadium des ersten Rezidivs gewonnen.

Die Zelllinie *REH* wurde von der ATCC<sup>1</sup> bezogen. Alle anderen Zelllinien wurden von der DSMZ<sup>2</sup> bezogen.

---

<sup>1</sup>American Type Culture Collection, USA

<sup>2</sup>Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

## 2.1.2 Reagenzien

### 2.1.2.1 Chemikalien und Reagenzien

Agarose	Promega, USA
Biocoll	Biochrom, Berlin
Bovines Serum-Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, USA
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, USA
Chloroform	Mallinckrodt Baker, Niederlande
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, USA
Dinatrium-EDTA <sup>3</sup>	Carl Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe
Elektrochemilumineszenz (ECL) Reagenz	Amersham, USA
Elektrochemilumineszenz (ECL) Reagenz	Invitrogen, USA
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Promega, USA
Glycerin	Carl Roth, Karlsruhe
HEPES	Sigma-Aldrich, USA
Isobutyrat	Sigma-Aldrich, USA
Isopropanol	Mallinckrodt Baker, Niederlande
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Bioline, Großbritannien
Methanol	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
MOPS <sup>4</sup> SDS <sup>5</sup> Laufpuffer	Invitrogen, USA
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Carl Roth, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin	PAA Laboratories, Österreich
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, USA
Reduzierendes Agens (NuPAGE)	Invitrogen, USA

<sup>3</sup>EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure

<sup>4</sup>MOPS: 3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure

<sup>5</sup>SDS: Natriumlaurylsulfat

RLT (RNAlater) Puffer	Qiagen, Niederlande
RNase AWAY	VWR International, Darmstadt
RPE Puffer	Qiagen, Niederlande
RW1 Puffer	Qiagen, Niederlande
Suberoylanilid-Hydroxamsäure (Saha)	Sigma-Aldrich, USA
Salzsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Transferpuffer (NuPAGE)	Invitrogen, USA
Tris <sup>6</sup>	Carl Roth, Karlsruhe
Tris-Acetat SDS Laufpuffer	Invitrogen, USA
TRItidy G	AppliChem, Gatersleben
Trypanblau	Biochrom, Berlin
Tween 20	Sigma-Aldrich, USA
Valproat	Sigma-Aldrich, USA
Wasser für die Molekularbiologie	Carl Roth, Karlsruhe

### 2.1.2.2 Zellkulturmedien und Zytokine

c-KIT-Ligand (SCF) (spezifische Aktivität $5 \times 10^5$ U/mg)	PeprTech, Hamburg
Fetales Kälberserum (FBS)	Biochrom, Berlin
Flt3-Ligand (spezifische Aktivität $1 \times 10^6$ U/mg)	PeprTech, Hamburg
GM-CSF (spezifische Aktivität $2,5 \times 10^7$ U/mg)	PeprTech, Hamburg
Interleukin-3 (spezifische Aktivität $1 \times 10^7$ U/mg)	PeprTech, Hamburg
Interleukin-4 (spezifische Aktivität $1 \times 10^7$ U/mg)	PeprTech, Hamburg
L-Glutamin	Invitrogen, USA
RPMI-1640 <sup>7</sup>	Biochrom, Berlin
StemSpan H3000	StemCell Technologies, Kanada
TNF- $\alpha$ (spezifische Aktivität $1 \times 10^8$ U/mg)	PeprTech, Hamburg

<sup>6</sup>Tris: Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

<sup>7</sup>RPMI: benannt nach dem *Roswell Park Memorial Institute, USA*

## 2.1.2.3 Puffer und Lösungen

PBS-Puffer (1×)*	
Verbindung	Konz. (g/l)
NaCl	8
KCl	0,2
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,44
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,24

\*pH 7,4 (add. HCl)

**Tabelle 2.1** – NaCl: Natriumchlorid, KCl: Kaliumchlorid, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: Natriumhydrogenphosphat, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: Kaliumdihydrogenphosphat

PBST-Puffer (1×)*	
Verbindung	Konz.
NaCl	8 g/l
KCl	0,2 g/l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,44 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,24 g/l
Tween-20	0,1%

\*pH 7,4 (add. HCl)

**Tabelle 2.2** – NaCl: Natriumchlorid, KCl: Kaliumchlorid, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: Natriumhydrogenphosphat, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: Kaliumdihydrogenphosphat

TAE-Puffer (50×)	
Verbindung	Konz.
Tris	242 g/l
Essigsäure	57,1 ml/l
Na <sub>2</sub> EDTA (0,5 M, pH 8)	100 ml/l

**Tabelle 2.3**

Agarose-Gel (1%)	
Verbindung	Konz. (g/l)
Agarose Pulver	0,3 g
Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE)	30 mL
Ethidiumbromid	3 µl

**Tabelle 2.4**

Lysepuffer (Säureextraktion)	
Reagenz	Konz. (mM)
HEPES*	10
MgCl <sub>2</sub>	1,5
KCl	10
DTT	0,5
PMSF	1,5

\*pH 7,9 (add. NaOH)

**Tabelle 2.5** – HEPES: 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, MgCl<sub>2</sub>: Magnesiumchlorid, KCl: Kaliumchlorid, DTT: Dithiothreitol, PMSF: Phenylmethylsulfonylfluorid

Lysepuffer (Ultraschall)		
Reagenz	Konz.	Substanzgruppe
NaCl	150 mM/l	
Tris HCl	100 mM/l	Puffersystem
Na-Deoxycholat	0,50 %	Detergens
SDS	0,50 %	Detergens
NP-40	0,50 %	Detergens
EDTA	5 mM/l	Protease-Inhibitor
Pefabloc SC	1 mM/l	Protease-Inhibitor
Natriumfluorid	10 mM/l	Phosphatase-Inhibitor

**Tabelle 2.6** – NaCl: Natriumchlorid, HCl: Salzsäure, EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure, Tris: Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, SDS: Natriumdodecylsulfat, NP-40: Nonoxynol-40, Pefabloc: 4-(2-Aminoethyl)-benzonsulfonylfluorid



#### 2.1.2.4 Nukleinsäuren, Primer und Enzyme

Beta-Aktin Primer (TaqMan)	Applied Biosystems, USA
DNA Leiter (100 bp)	Promega, USA
dNTP (Desoxyribonukleosidtriphosphate)	Promega, USA
Hexanukleotide	Roche Diagnostics, Schweiz
MagicMark XP	Invitrogen, USA
PCR Mastermix (TaqMan)	Applied Biosystems, USA
Rainbow Marker	GE Healthcare, Großbritannien
Reverse Transkriptase (SuperScript II)	Invitrogen, USA
Rückwärts-Primer (Aex3)	TIB Molbiol, Berlin
Sonde (TEL)	TIB Molbiol, Berlin
Vorwärts-Primer (TEL S)	TIB Molbiol, Berlin

#### 2.1.2.5 Antikörper

Anti-Acetyl-Histon-H4 (Rabbit)	Upstate, USA
Anti-AML1/RHD (Rabbit, IgG)	Calbiochem, USA
Anti-CD14 (FITC)	Becton Dickinson, USA
Anti-CD1a (PE)	Becton Dickinson, USA
Anti-CD80 (FITC)	Becton Dickinson, USA
Anti-CD83 (PE)	Beckman Coulter, Krefeld
Anti-CD86 (PE)	Becton Dickinson, USA
Anti-IgG1 (FITC)	ImmunoTools, Friesoythe
Anti-IgG1 (PE)	ImmunoTools, Friesoythe
Anti-Mouse-IgG (HRP konjugiert)	Promega, USA
Anti-NTEL (Mouse, IgG)	AG Seeger
Anti-Rabbit-IgG (HRP konjugiert)	Promega, USA

#### 2.1.2.6 Kits

BCA Protein Assay	Thermo Scientific, USA
DiffQuick	Siemens Health Care, Berlin
RNeasy Mini	Qiagen, Niederlande
QIAshredder	Qiagen, Niederlande

### 2.1.3 Geräte

BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Brutschrank	Thermo Scientific, USA
Durchflusszytometer (FACScan)	Becton Dickinson, USA
Elektrophorese-Gerät	Bio-Rad, USA
Gel-Kamm groß	Bio-Rad, USA
Gel-Kamm klein	Bio-Rad, USA
Gel-Schiene groß	Bio-Rad, USA
Gel-Schiene klein	Bio-Rad, USA
Gelkammer (Sub-Cell 96)	Bio-Rad, USA
GeneAmp PCR 9700 Thermocycler	Applied Biosystems
Haemocytometer Neubauer-improved	Optik Labor, Friedrichshofen
Mikroskop (M20)	Wild Heerbrugg, Schweiz
Pipette Easypet	Eppendorf, Hamburg
Pipette Research 10	Eppendorf, Hamburg
Pipette Research 200	Eppendorf, Hamburg
Pipette Research 20	Eppendorf, Hamburg
Pipette Research 1000	Eppendorf, Hamburg
RTq-PCR-Gerät (iCycler MyiQ)	Bio-Rad, USA
Sonopuls Ultraschallgerät	Bandelin, Berlin
Stromquelle für Gel-Elektrophorese (PowerPac HC)	Bio-Rad, USA
Tischzentrifuge (Biofuge 13)	Thermo Electron, USA
Vortex (Genie 2)	Scientific Industries, USA
Versadoc MP 4000	Bio-Rad, USA
Werkbank (LaminAir HB 2472)	Thermo Scientific, USA
Western Blot Kammer (XCell SureLock)	Invitrogen, USA
Zentrifuge (Megafuge 1.0)	Thermo Electron, USA

### 2.1.4 Plastikwaren

Deckgläser (22 x 22 mm)	G. Menzel Glasbearbeitungswerk, Braunschweig
Eppendorf-Gefäße	Eppendorf, Hamburg
FACS Tubes	Becton Dickinson, USA
Kanüle (Microlance 3, 20G)	Becton Dickinson, USA

Microplatte 96 well	Greiner Bio-One, Austria
Multiwell Platte (Falcon, 24-well)	Becton Dickinson, USA
Multiwell Platte (Falcon, 6-well)	Becton Dickinson, USA
Pipettenspitzen 10	Greiner Bio-One, Austria
Pipettenspitzen 1000	Greiner Bio-One, Austria
Pipettenspitzen 200	Greiner Bio-One, Austria
Reagenzgefäß (FALCON, 15 ml)	Becton Dickinson, USA
Reagenzgefäß (FALCON, 50 ml)	Becton Dickinson, USA
Spritze (Discardit II, 20ml)	Becton Dickinson, USA
Sterilfilter	Becton Dickinson, USA
Zellkulturflasche (Falcon 25 cm, belüftet)	Becton Dickinson, USA
Zellkulturflasche (Falcon 75 cm, belüftet)	Becton Dickinson, USA

### 2.1.5 Software

BD CellQuest	Becton Dickinson, USA
Excel 2003	Microsoft, USA
Gene Expression Analysis Software 1.1	Bio-Rad, USA
Quantity One	Bio-Rad, USA
REST-MCS 2.0	Pfaffl et al., 2002
SPOT advanced 3.5.5	Diagnostic instruments, USA
SPSS 12	SPSS, USA

## 2.2 Zellkultur Methoden

Alle Zellkulturarbeiten wurden an einer Reinraum-Werkbank mit Laminar-Airflow-Verfahren durchgeführt. Für die Herstellung von Zellkultur-Vollmedium wurde das Grundmedium RPMI-1640 mit fetalem Kälberserum (FBS) oder Humanserum und 10 µg/ml L-Glutamin versetzt. Das Vollmedium wurde mit 10 I.E./ml Penicillin und 10 µg/ml Streptomycin gemischt und über einen Filter mit einem Porendurchmesser von 0,2 µm sterilfiltriert. Vollmedium wurde für maximal 2 Wochen bei 4 °C gelagert und vor Gebrauch im Wasserbad bei 37 °C erwärmt. Alle Zentrifugationsschritte wurden, soweit nicht explizit anders angegeben, bei 1600 rpm für 7 Minuten in einer Heraeus Megafuge 1.0 (Thermo Scientific) durchgeführt. Für die Herstellung von Lösungen und Puffergemischen wurde Reinstwasser vom Typ I, 18,2 MΩ-cm (Millipore) verwendet, PBS-Puffer wurde zusätzlich vor

Gebrauch autoklaviert.

## **2.2.1 Kulturbedingungen**

### **2.2.1.1 Kultivierung**

Die kryokonservierten Zellsuspensionen wurden zum Auftauen zunächst im Wasserbad bei 37 °C erwärmt, bis im Kryoröhrchen Flüssigkeit sichtbar wurde. Der Inhalt des Kryoröhrchens wurde anschließend mit 15 ml frischem Medium versetzt, um das DMSO auszuwaschen. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert, in frischem Medium resuspendiert und gezählt. Die Kultivierung der Zelllinien REH, NALM-6 und MOLT-16 erfolgte im Grundmedium RPMI-1640 mit 10% FBS. Die Zellkultur wurde mit einer Zellzahl von  $10^6/\mu\text{l}$  gestartet und in 25 cm<sup>2</sup> großen Zellkulturflaschen bei 37 °C unter Frischluftzufuhr und einem konstant gehaltenen CO<sub>2</sub>-Anteil von 5% im Inkubator kultiviert. Die Zellzahl wurde im Verlauf bei etwa  $0,5-1 \times 10^6/\mu\text{l}$  gehalten. Bedarfsgerecht wurde in zwei- bis dreitägigem Abstand die Hälfte der Zellsuspension verworfen oder in eine neue Zellkulturflasche überführt und durch frisches Vollmedium ersetzt. In regelmäßigen Abständen wurde ein kompletter Mediumwechsel durchgeführt. Dazu wurde die Zellsuspension in 50 ml Schraubdeckelröhrchen überführt und zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden anschließend resuspendiert und in neue Zellkulturflaschen überführt.

Die Kultivierung leukämischer Patientenzellen erfolgte im Grundmedium StemSpan H3000 mit 10% gepooltem Humanserum. Im Gegensatz zu herkömmlichen Kulturmedien enthält StemSpan keine tierischen Proteine, sondern setzt sich aus humanen oder humanen rekombinanten Proteinen zusammen. Dieses Medium hat sich für die Kultivierung und Differenzierung leukämischer Patientenzellen bewährt (Schmidt et al., 2009). Das Knochenmarkmaterial wurde zunächst im Verhältnis 1:2 in RPMI-1640 mit 5% Humanserum verdünnt. Zwei 15 ml Schraubdeckelröhrchen wurden mit jeweils 5 ml Ficoll befüllt und die Knochenmarksuspension in gleichen Teilen vorsichtig auf das Ficoll geschichtet. Nach Dichtegradientenzentrifugation der Röhrchen (1800 rpm, 35 min, ohne Bremse) wurden die Interphasen in ein frisches Schraubdeckelröhrchen überführt und mit PBS-Puffer aufgefüllt und zweimal zentrifugiert ( $1 \times 2000$  rpm,  $1 \times 1000$  rpm, 10 min) und das Pellet in 1 ml Medium resuspendiert. Anschließend wurde die Zellzahl und Viabilität bestimmt. Die Zellkultur wurde mit  $1-3 \times 10^5$  Zellen gestartet und für sieben Tage in einer 6-Well-Zellkulturplatte kultiviert. Bedarfsgerecht wurde in zwei- bis dreitägigem Abstand 200  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension verworfen und durch frisches Medium ersetzt.

### 2.2.2 Zellzahlbestimmung und Viabilität

Die Anzahl und Viabilität der Zellen wurde im Hämocytometer (Typ Neubauer improved) bestimmt. Jeweils 10 µl der Zellsuspension wurden im Verhältnis 1:2 mit Trypanblau verdünnt und in das Hämocytometer überführt. Unter dem Mikroskop wurden 4 Großquadrate mit einem Volumen von je 6,25 nl ausgezählt und die Zellzahl anhand der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl (/ml)} = \frac{\text{Gezählte Zellen}}{4} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

Zur Bestimmung der Viabilität wurden die Zellen mit dem Diazofarbstoff Trypanblau gefärbt. Der Farbstoff dringt in die geschädigte Zelle ein und färbt diese blau, vitale Zellen bleiben hingegen ungefärbt und erscheinen lichtmikroskopisch hell-leuchtend. Die Viabilität wurde aus dem Verhältnis der intakten, ungefärbten Zellen gegenüber der Gesamtzellzahl berechnet.

### 2.2.3 Behandlung mit Zytokinen und Histondeacetylase-Inhibitoren

Die Zellen wurden mit den Histondeacetylase-Inhibitoren (HdI) Valproat, Isobutytrat und Suberoylanilid-Hydroxamsäure (Saha) in den Konzentrationsstufen 128 nM, 256 nM, 512 nM und 1024 nM behandelt. Daneben wurden entsprechend Tabelle 2.7 unterschiedliche Zytokinkombinationen eingesetzt.

Für Versuche mit der Zelllinie REH wurde die unbehandelte Zellkultur zentrifugiert, in frischem Medium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Anschließend wurden auf einer 24-Well-Zellkulturplatte jeweils  $3 \times 10^5$  Zellen in 2 ml RPMI-1640 Medium mit 10% FBS eingesetzt und mit der Zytokinkombination TGK (Tabelle 2.7a) und unterschiedlichen Hdi in unterschiedlichen Konzentrationen kultiviert. Alle 48 Stunden wurden 300 µl der Zellsuspension vorsichtig abpipettiert und durch 1 ml frisches Medium ersetzt.

Für Versuche mit Patientenblasten wurden die Proben zentrifugiert (1200 rpm, 7 min, mit Bremse), in frischem Medium resuspendiert und anschließend die Zellzahl bestimmt. Jeweils  $1-3 \times 10^5$  Zellen wurden auf einer 24-Well-Platte in StemSpan-Medium mit 10% Humanserum kultiviert.

Für Generierung leukämischer dendritischer Zellen aus Patientenblasten wurde der Zytokincocktail TGKFI3I4 (Tabelle 2.7b) eingesetzt, die sich in unserer Arbeitsgruppe für die Kultivierung von ALL-Patientenblasten bewährt hat. Nach jeweils zwei bis drei Tagen wurden 200 µl der Zellsuspension vorsichtig von der Oberfläche abpipettiert und durch frisches Medium ersetzt.

TGK		TGKFI3I4	
Reagenz	Konz. (ng/ml)	Reagenz	Konz. (ng/ml)
TNF- $\alpha$	100	TNF- $\alpha$	50
GM-CSF	100	GM-CSF	25
SCF	20	SCF	50
		Flt3-Ligand	50
		Interleukin-3	20
		Interleukin-4	50

(a) (b)

**Tabelle 2.7** – Zytokinkombinationen. TNF- $\alpha$ : Tumornekrosefaktor- $\alpha$ , GM-CSF: Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor, SCF: stem cell factor (KIT-Ligand). Flt3-Ligand: FMS-like tyrosine kinase 3 ligand

## 2.3 Durchflusszytometrische Analyse von Zelloberflächenantigenen

**Theoretischer Hintergrund** Das Durchflusszytometer ist ein optisches Messsystem, um Streulicht und Fluoreszenzsignale von Zellen innerhalb einer Suspension zu analysieren. Die Zellsuspension wird über eine Kapillare angesaugt und innerhalb einer Messküvette an einem fokussierten Lichtstrahl und an einem Laser vorbeigeleitet. Für jede Zelle werden Streulicht und Fluoreszenzsignale über Photodetektoren registriert. Durch die erfassten Daten können die analysierten Zellen physikalisch und biochemisch charakterisiert werden.

Das Durchflusszytometer arbeitet nach dem Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung. Die langsam einfließende Zellsuspension wird innerhalb der Messküvette von einem schneller fließenden laminaren Hüllstrom umspült. Aufgrund der höheren und laminaren Strömung bleiben Hüllstroms und Zellsuspension voneinander getrennt, sodass die Zellen nur einzeln aneinandergereiht und in der Mitte zentriert die Messküvette passieren können (hydrodynamisch fokussiert). Die Messküvette kann so größer als der normale Zelldurchmesser sein. Das macht sie stabiler und weniger anfällig für Verstopfungen.

Die Streuung des Lichtstrahls wird für jede Zelle als Einzelereignis von Photodetektoren registriert. Das im Strahlengang gestreute Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter, FSC) ist ein Maß für die Zellgröße; das in einem Winkel von 90° gestreute Seitwärtsstreulicht (Sideward Scatter, SSC) korreliert mit der Zellgranularität.

Neben dem Streulichtverhalten können auch Zelloberflächen-Antigene detektiert und quantifiziert

werden. Die Zellen werden zunächst mit Antigen-spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörpern inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Durch einen Laserstrahl werden die Fluoreszenzfarbstoffe angeregt und das emittierte Licht spezifischer Wellenlänge durch Photodetektoren registriert.

Das genutzte Durchflusszytometer FACScan (Becton Dickinson) ermöglicht neben einer 2-Winkel-Streulichtmessung die gleichzeitige Analyse von drei verschiedenen Fluoreszenz-Wellenlängen ( $\lambda_{FL-1} = 537 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{FL-2} = 597 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{FL-3} = 650 \text{ nm}$ ).

**Praktisches Vorgehen** Die frisch kultivierten Zellsuspensionen wurden nach Bestimmung der Zellzahl und Vitalität in 5 ml FACS-Röhrchen überführt und zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml PBS-Puffer resuspendiert und das vorhandene Restmedium entfernt. Die Zellen wurden anschließend in 100  $\mu\text{l}$  PBS resuspendiert und mit 1,4  $\mu\text{l}$  eines Fluoresceinisothiocyanat (FITC)- und eines Phycoerythrin (PE)-markierten monoklonalen Antikörpers versetzt und für 30 Minuten bei 4 °C bei Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurden die doppelgefärbten Proben mit 1 ml PBS-Puffer versetzt, zentrifugiert und das Pellet in 200  $\mu\text{l}$  PBS-Puffer resuspendiert. Die immunfluoreszenzmarkierten Zellsuspensionen wurden am FACScan (Becton Dickinson) gemessen und mit der Software BD Cellquest ausgewertet.

Das FSC/SSC-Streubild wurde am Computer auf die charakteristische Zellpopulation eingegrenzt, um Artefakte und Zelldetritus aus der Messung auszuschließen. Eine Differenzierung dendritischer Zellen von leukämischen Blasten war im FSC/SSC-Streubild nicht möglich. Für die eingegrenzte Zellpopulation wurden die PE- und die FITC-Fluoreszenzintensitäten im Dotplot gegeneinander aufgetragen. Die Festlegung des fluoreszenznegativen Bereichs erfolgte durch vorherige Messung der unspezifischen Antikörperbindung durch Isotypen-Antikörper (IgG1-FITC und IgG1-PE). Der fluoreszenznegative Bereich wurde so gewählt, dass in der Kontrolle mehr als 99% aller Zellen fluoreszenznegativ waren. Die Einstellungen wurden für die Probenmessung nicht verändert. Pro Messvorgang wurden insgesamt 10.000 Einzelereignisse erfasst und der Anteil fluoreszenzpositiver Zellen in Prozent dokumentiert.

## 2.4 Zellsortierung

### 2.4.1 Durchflusszytometrische Zellsortierung

**Theoretischer Hintergrund** Bei der durchflusszytometrischen Zellsortierung werden die Zellen in gewohnter Weise mit Fluorchromen markiert und anschließend in einem speziellen Durchflusszytometer analysiert. Anders als bei der konventionellen Durchflusszytometrie wird der Zellstrom anschließend aufgetrennt. Entspricht die Analyse der Einzelzelle zuvor definierten Sortiervorgaben, wird der Flüssigkeitsstrom elektrisch geladen, bis sich die mit Flüssigkeit umhüllte Einzelzelle vom restlichen Strom abscheidet. Der nur noch von Luft umgebene Tropfen bleibt elektrisch geladen und kann durch elektrostatische Ablenkung vom restlichen Strom getrennt gesammelt werden.

**Praktisches Vorgehen** Die kultivierten Zellsuspensionen wurden in 5 ml FACS-Röhrchen überführt und für jede Probe die Zellzahl und Vitalität bestimmt. Die Probenaufbereitung entspricht dem Vorgehen bei konventioneller Durchflusszytometrie (Kapitel 2.3). Die Antikörpermarkierung erfolgte mit je 2,5 µl Anti-HLA-DR (FITC) und Anti-CD83 (PE). Die Zellsortierung wurde am FACSAria Durchflusszytometer der Flow Cytometry Core Facility (FCCF) des Deutschen Rheuma-Forschungszentrums Berlin durchgeführt. Konfiguration und Auswertung erfolgten mit der FACS-DiVa Software. Die Reinheit der Proben wurde anschließend durchflusszytometrisch am FACScan bestimmt.

## 2.5 Molekularbiologische Methoden

Für molekularbiologische Arbeiten wurde grundsätzlich Nuklease- und Protease-freies Reinstwasser verwendet. Für die Arbeit mit RNA wurden zusätzliche Maßnahmen getroffen, um Kontaminationen durch RNasen (Ribonukleasen) zu vermeiden. RNasen sind im Gegensatz zu DNasen äußerst stabil und benötigen keine divalenten Kationen als Kofaktoren. Außerdem ist RNA durch die 2'-Hydroxylgruppe der Ribose unter alkalischen Bedingungen relativ instabil (alkalische Spaltung). Deswegen ist RNA besonders anfällig für Kontaminationen durch Nukleasen und vorzeitige Degradation. Zur Inaktivierung von RNasen wurde stets Diethyldicarbonat(DEPC)-behandeltes Reinstwasser verwendet. DEPC bindet kovalent an primäre und sekundäre Amine wie zum Beispiel der Histidin-Seitenkette und inaktiviert dadurch RNasen. Alle Versuchsschritte, die die Arbeit mit RNA betrafen, wurden außerdem unter streng RNase-freien Laborbedingungen und mit RNase-freien Verbrauchsmaterialien durchgeführt.



Die Methodik der Genexpressions-Analyse auf RNA-Ebene erfolgte in mehreren Schritten, da eine direkte RNA-Amplifikation derzeit nicht praktikabel ist. Zunächst wurde die Gesamt-RNA aus den Zellproben extrahiert und quantifiziert. Anschließend wurde die RNA in komplementäre DNA umgeschrieben. Als letzter Schritt wird das Zielgen-Transkript selektiv durch die Real-Time quantitative PCR (RTq-PCR) amplifiziert und quantifiziert.

## 2.5.1 RNA Isolation

Die Isolation von Zelllinien-RNA erfolgte mit dem Säulenzentrifugationssystem RNeasy Mini der Firma Qiagen. Für Patientenproben wurde auf die saure Guanidinthiocyanat-Phenol-Chloroform Extraktion zurückgegriffen, die sich in Etablierungsversuchen durch höhere RNA-Ausbeuten auszeichnete. Zusätzlich kann diese Methode wiederholt werden, um die RNA-Ausbeute nochmals zu steigern.

### 2.5.1.1 Saure Guanidinthiocyanat-Phenol-Chloroform Extraktion

**Theoretischer Hintergrund** Dieses Verfahren basiert auf der Einzelschritt-RNA-Isolierungsmethode von Chomczynski und Sacchi (1987) und wird in Anlehnung an die Reagenz TRIzol (Invitrogen) auch als Trizol-Extraktion bezeichnet. Durch Guanidinthiocyanat werden selektiv Proteine und RNasen denaturiert, während die Integrität der RNA erhalten bleibt. Durch die Addition von Phenol entsteht ein zweiphasiges Gemisch, in dem sich die polare RNA nach vorübergehender Emulsion in der wässrigen Phase löst. Proteine und Lipide hingegen werden in der Phenol-Phase gelöst und damit räumlich von der RNA getrennt. Auch DNA ist vollständig in der Phenol-Phase gelöst, da DNA im Gegensatz zu RNA eine pH-abhängige Löslichkeitsverteilung aufweist und bei pH 4,0 vollständig in der Phenol-Phase gelöst ist. Die Zugabe von Chloroform erhöht zusätzlich die Phasendichte von Phenol und stabilisiert dadurch die Phasengrenzschicht.

**Praktisches Vorgehen** Die Zellproben wurden zunächst pelletiert und in 1 ml TRIzol-Reagenz resuspendiert. Anschließend wurden die Proben für 5 Minuten inkubiert, um eine komplette Dissoziation der Nukleoproteine zu gewährleisten. Nach Addition von 200 µl Chloroform wurden die Proben für 15 Sekunden kräftig geschüttelt und für weitere 2 Minuten inkubiert. Die Phasenauftrennung erfolgte anschließend durch Zentrifugation (12.000 rpm, 15 min). Die wässrige obere Phase wurde vorsichtig abpipettiert und mit 500 µl 2-Propanol gemischt, wodurch RNA präzipitiert. Nach 10-minütiger Inkubation wurde das RNA-Präzipitat pelletiert (12.000 rpm, 10 min) und der

Überstand vorsichtig abpipettiert. Das kaum sichtbare RNA-Pellet wurde mit 1 ml 75%igem Ethanol gemischt und erneut zentrifugiert (7.500 rpm, 5 min). Der Ethanol-Überstand wurde mit großer Sorgfalt abpipettiert und das verbliebene RNA-Pellet für etwa 15-30 Minuten luftgetrocknet. Die RNA wurde anschließend in 20 µl RNase-freiem Wasser gelöst. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten in einer vorgekühlten Tischzentrifuge bei 4 °C.

### 2.5.1.2 Säulenzentrifugations-Extraktion

Das Säulensystem RNeasy der Firma Qiagen kombiniert die Einzelschritt RNA-Isolierungsmethode (Chomczynski und Sacchi, 1987) mit der Nutzung von Siliziummembranen mit selektiven Bindungseigenschaften.

Die Zellen wurden zunächst in PBS-Puffer gewaschen und anschließend in 600 µl denaturierendem Guanidinthiocyanat/ $\beta$ -Mercaptoethanol Puffer (RLT-Puffer) lysiert. Hierdurch wurden RNasen inaktiviert, ohne die Integrität der RNA zu zerstören. Nach kurzer Inkubation wurde das Zelllysate auf eine QIAshredder-Säule überführt und für zwei Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die QIAshredder-Säule homogenisiert das Lysat und trennt unerwünschte Zellbestandteile von der RNA. Anschließend wurde dem Lysat ein Volumen 70%igen Ethanols hinzugegeben und 600 µl auf eine siliziumtragende Zentrifugationssäule (RNeasy Mini) aufgetragen und für 30 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert. Dieser Schritt wurde für das übriggebliebene Lysat mit der gleichen Säule wiederholt. In diesem Schritt wurde die RNA an die Siliziummembran der Säule gebunden, so dass diesmal das Durchflussvolumen verworfen werden konnte. Die Säule wurde nun viermal mit 500 µl RW1-Puffer bei 10.000 rpm gewaschen um Kontaminationen von der Siliziummembran zu entfernen. Zwischen den ersten beiden Waschsritten wurde die Säule für 15 Minuten mit 25 Kunitz<sup>8</sup> Einheiten DNase I inkubiert. Um die Membran zu trocknen, wurde die Säule anschließend bei 10.000 rpm für eine Minute ohne Medium zentrifugiert und anschließend die RNA mit 20 µl RNase-freiem Wasser eluiert und bei 10.000 rpm für eine Minute abzentrifugiert.

## 2.5.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung und Qualitätskontrolle der RNA

**Theoretischer Hintergrund** Die photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA-Proben erfolgte durch Messung der Extinktion bei der Wellenlänge  $\lambda = 260\text{nm}$ . Die Extinktion  $E_{260} = 1$

---

<sup>8</sup>Eine Kunitz Einheit ist definiert als die Menge DNase I, die benötigt wird, um in hochpolymerisierter DNA bei 25 °C und pH 5,0 einen Anstieg der A<sub>260</sub> von 0,001/ml/min zu bewirken (Kunitz, 1950a,b).

entspricht 40 ng/μl einzelsträngiger RNA, sodass sich die Konzentration der RNA nach folgender Formel berechnen lässt:

$$\text{Konzentration [ng/}\mu\text{l]} = E_{260} \times \text{Verdünnung} \times 40$$

Für RNA liegt das Absorptionsmaximum bei 260 nm, für Proteine und aromatische Verbindungen hingegen bei 280 nm. Die Bildung des Extinktions-Quotienten  $E_{260}/E_{280}$  lässt daher Rückschlüsse über die Reinheit der RNA zu. Liegt der Quotient zwischen 1,8 und 2,1, gilt die RNA als rein. Niedrigere Werte weisen auf Proteinkontamination hin.

**Praktisches Vorgehen** Nach Bestimmung des Glasküvetten-Leerwerts mit RNase-freiem Wasser wurde 1 μl des RNA-Eluats mit 75 μl RNase-freiem Wasser verdünnt und die Extinktion bei 260 nm und bei 280 nm bestimmt. Die Konzentration und Reinheit der RNA wurde errechnet und dokumentiert.

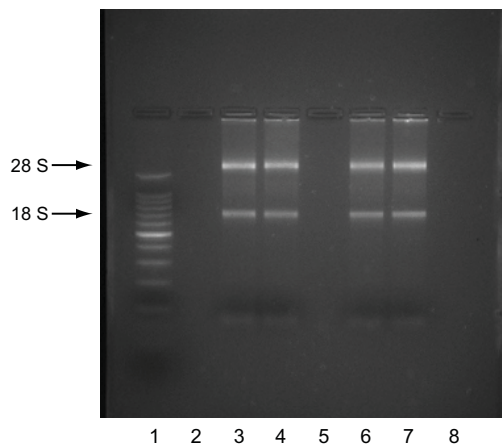
### 2.5.3 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Kontrolle der Integrität der isolierten RNA wurde eine horizontale Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt.

**Theoretischer Hintergrund** Elektrophorese bezeichnet das Auftrennen elektrisch geladener Teilchen in einem durch Gleichspannung erzeugten elektrischen Feld. Bei der Gelelektrophorese wird die Wanderungsgeschwindigkeit nicht nur durch die Ladung der einzelnen Teilchen, sondern zusätzlich durch das Gel als Trägermaterial beeinflusst. Das Gel wirkt dabei als Molekularsieb, weshalb kleine Moleküle schneller durch das Gel wandern können als große Moleküle.

Die Auftrennung von Nukleinsäuren erfolgt typischerweise in Agarose-Gelen. Bei angelegter Spannung wandern die Nukleinsäuren in Richtung Anode, wobei sie ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Anschließend werden durch den interkalierenden Fluoreszenz-Farbstoff Ethidiumbromid die Nukleinsäure-Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht. Durch standardisierte Marker (DNA-Leitern) können die Fragmentgrößen bestimmt werden.

**Praktisches Vorgehen** Zur Herstellung des Gels wurden 30 ml einer 1%igen Agaroselösung (gelöst in Tris-Acetat-EDTA) in der Mikrowelle aufgeköcht, bis keine Schlieren mehr sichtbar waren. Nach dem Abkühlen (handwarm) wurden 3 μl Ethidiumbromid addiert, die Agaroselösung in einen



**Abbildung 2.1** – Visualisierung eines Agarosegels nach Elektrophorese. Die Spuren 3, 4, 6 und 7 sind mit Proben-RNA beladen. Spur 1 ist mit einer DNA-Leiter beladen. Die Spuren 2, 5 und 8 wurden nicht beladen. In allen Probenspuren kommen die zwei typischen ribosomalen RNA Banden zur Darstellung. Die Proben sind nicht „verschmiert“. Es handelt sich um nicht degradierte, hochwertige RNA. S: Svedberg. (Eigene Abbildung)

Gelschlitten gegossen und ein Taschenkamm eingesetzt. Nach etwa einer halben Stunde wurde das Gel in die Elektrophoresekammer gelegt, der Taschenkamm entfernt und mit TAE-Puffer bedeckt. 2 µl der RNA-Proben wurden mit 8 µl RNase-freiem Wasser und 5 µl 3× Probenpuffer versetzt und zusammen in die Geltaschen pipettiert. Die RNA-Leiter wurde in eine separate Tasche pipettiert. Nach der Elektrophorese (85 V, 45 min) wurde das Gel zur Dokumentation der RNA-Banden auf einem UV-Transilluminator bei einer Anregungs-Wellenlänge von  $\lambda = 290\text{-}365\text{ nm}$  visualisiert.

Typische 18 S<sup>9</sup> und 28 S rRNA-Banden deuten auf eine nicht degradierte, qualitativ hochwertige RNA hin.

## 2.5.4 Reverse Transkription

**Theoretischer Hintergrund** Bei der reversen Transkription (RT) wird RNA zu komplementärer DNA (cDNA) umgeschrieben. Katalysiert wird dieser Prozess durch das Enzym Reverse Transkriptase. Es handelt sich um eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die in der Lage ist, kurze an RNA gebundene Oligonukleotide (Primer) an ihrem 3'-Ende mit Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTP) zu verlängern, bis ein komplementärer mRNA-cDNA-Doppelstrang entsteht.

**Praktisches Vorgehen** Zur Umschreibung von RNA in cDNA wurde die gentechnisch modifizierte Variante der Reversen Transkriptase des Moloney Murinen Leukämievirus (M-MLV RT) mit reduzierter intrinsischer RNase H-Aktivität und verbesserter Thermostabilität eingesetzt (SuperScript II, Invitrogen). Als Primer dienten randomisierte Nukleotid-Hexamere. Zunächst wurde 1 µg der RNA in 10 µl RNase-freiem Wasser gelöst und für 10 Minuten bei 70 °C inkubiert, um die

<sup>9</sup>S: Svedberg (Einheit des Sedimentationskoeffizienten)

Entfaltung von Sekundärstrukturen zu gewährleisten. Anschließend wurden 4 µl RT-Puffer (5×), 1 µl dNTP (20 nM), 2 µl Hexamere (1×), 2 µl Dithiothreitol (0,1 M) und 1 µl SuperScript II (200 U/µl) addiert.

Der Reaktionsansatz wurde zunächst für 10 Minuten bei 25 °C inkubiert, um ein Priming der Hexamere zu ermöglichen. Für die reverse Transkription wurden die Proben anschließend für 45 Minuten bei 42 °C inkubiert. Abschließend wurde für 3 Minuten die Reverse Transkriptase bei 99 °C inaktiviert. Die synthetisierte cDNA wurde bis zur Weiterverwendung bei -20 °C zwischengelagert.

### 2.5.5 Real-Time quantitative PCR und cDNA Quantifizierung

Die Real-Time quantitative PCR (RTq-PCR) ist eine Methode zur Vervielfältigung und Quantifizierung von DNA. Im Gegensatz zur klassischen PCR findet bei der RTq-PCR bereits während der Amplifikation eine Messung des PCR-Produkts statt (Real-Time), wodurch eine genauere Quantifizierung der DNA möglich wird.

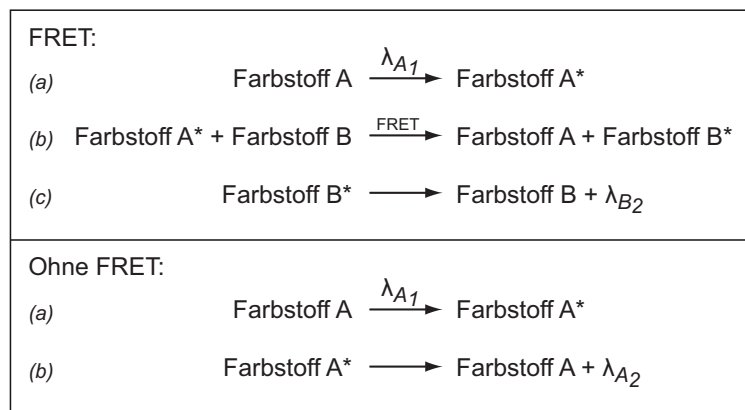
**Konventionelle PCR** Bei der konventionellen PCR wird durch eine wärmostabile DNA-Polymerase und spezifische Primer ein definierter Abschnitt der DNA amplifiziert. Die neu synthetisierte Doppelstrang-DNA dient in nachfolgenden Amplifikationszyklen neben der Ausgangs-DNA ebenfalls als PCR-Matrize. Theoretisch steigt daher in jedem Amplifikationszyklus die Menge der Ziel-DNA exponentiell zur Anzahl  $n$  der durchlaufenen Zyklen ( $2^n$ ). Die PCR durchläuft üblicherweise 20-40 Zyklen, wobei jeder Zyklus aus drei Einzelschritten besteht: 1. Denaturierung: Das Reaktionsvolumen wird auf 95 °C erhitzt, wodurch Wasserstoffbrückenbindungen gelöst werden und die dsDNA in ihre Einzelstränge aufgetrennt wird. 2. Primerhybridisierung: Die Temperatur wird primerspezifisch auf 50-65 °C abgekühlt, damit die Primer an die Einzelstrang-DNA binden können. 3. Amplifikation: Die spezifische Ziel-DNA amplifiziert, indem DNA-Polymerasen an DNA-gebundenen Primer binden und die Ziel-DNA vom 5'- in Richtung 3'-Ende synthetisieren. Die notwendige Temperatur ist von der eingesetzten Polymerase abhängig und beträgt bei der Taq-Polymerase 72 °C.

Am Ende der PCR wird die gewonnene DNA durch eine Agarose-Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt und die Ziel-DNA-Bande anhand ihrer Größe identifiziert. Die Konzentration der Ziel-DNA ( $c_e$ ) wird mithilfe eines DNA-bindenden Farbstoffs bestimmt. Unter der Annahme einer ideal exponentiellen PCR-Kinetik ( $2^n$ ) lässt sich daraus die Ausgangskonzentration ( $c_0$ ) berechnen:  $c_0 = c_e/2^n$ . Weil aber die Reaktionskinetik nur in der ersten Phase der PCR exponentiell verläuft, ist diese Berechnung ungenau. Tatsächlich verlangsamt sich in späteren Phasen die Reaktionskinetik

durch veränderte Reaktionsbedingungen. Eine streng exponentielle Amplifikation findet nicht mehr statt.

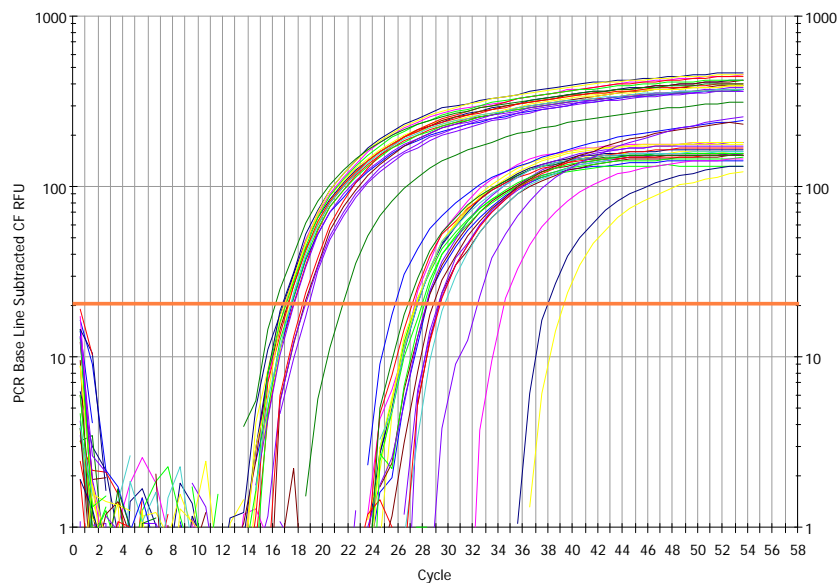
**Real-Time quantitative PCR** Im Gegensatz zur klassischen PCR wird bei der Real-Time quantitativen PCR (RTq-PCR) das PCR-Produkt bereits während der DNA-Amplifikation gemessen. Dies erlaubt eine sehr viel präzisere Quantifizierung der Ausgangskonzentration. Für dieses Verfahren werden Geräte eingesetzt, die neben einer Thermocycler-Funktionalität über ein optisches Anregungs- und Detektionssystem verfügen.

Da verfahrensbedingt eine räumliche Auftrennung des PCR-Produkts nicht möglich ist, wird eine Ziel-DNA-spezifische Farbstoffsonde benötigt. Sie verhindert, dass unspezifisch gebildete PCR-Produkte das Messergebnis verfälschen. Bei der DNA-Sonde handelt es sich um ein kurzes Stück DNA, das komplementär zur Ziel-DNA ist und an ihren Enden kovalent mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert ist. Durch die räumliche Nähe der beiden Farbstoffe ( $< 10 \text{ nm}$ ) kommt es zum Phänomen der Fluoreszenzlöschung (Quenching) (Abbildung 2.2, *FRET*). Wird die DNA-Sonde durch die 5'-Exonuklease-Funktion der Taq-Polymerase gespalten, trennen sich die Farbstoffe räumlich voneinander und es kann kein Energietransfer mehr stattfinden. Der initial angeregte Farbstoff emittiert in seiner spezifischen Wellenlänge (Abbildung 2.2, *ohne FRET*). Der Anstieg der Fluoreszenzintensität dieser Wellenlänge ist proportional zur spezifisch synthetisierten DNA und wird über ein Detektionssystem gemessen.



**Abbildung 2.2** – Farbstoff A wird durch ein Photon mit der spezifischer Wellenlänge  $\lambda_{A1}$  angeregt und überträgt anschließend seine Anregungsenergie durch Resonanzeffekte auf einen räumlich naheliegenden Farbstoff B. Dieser Farbstoff fluoresziert nun mit der spezifischen Wellenlänge  $\lambda_{B2}$ . Farbstoff A hingegen zeigt keine Fluoreszenz mit der Wellenlänge  $\lambda_{A2}$  (Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer, FRET). Wird die DNA-Sonde durch die 5'-Exonuklease-Funktion der Taq-Polymerase gespalten, trennen sich die Farbstoffe räumlich voneinander und es kann kein Energietransfer mehr stattfinden. Der angeregte Farbstoff A emittiert in seiner spezifischen Wellenlänge  $\lambda_{A2}$ .

**Quantifizierung** Nach Abschluss der RTq-PCR wird für jede Probe die gemessene Fluoreszenzintensität gegen die Zeit aufgetragen. Man erhält Sigmoidfunktionen, die deskriptiv in eine Anlaufphase, lineare Phase und Plateauphase unterteilt werden können. Eine exponentielle Amplifikation findet nur in der Anlaufphase statt. Anschließend wird ein Fluoreszenzschwellenwert festgelegt, bei dem sich alle Probenfunktionen in einer exponentiellen Phase befinden. In halblogarithmischer Auftragung entspricht dieser Bereich einer Geraden (Abbildung 2.3). Für jede Probe wird der Zyklus bestimmt, in dem der Fluoreszenzschwellenwert überschritten wurde. Dieser Zyklus wird als Schwellenwert-Zyklus (threshold cycle,  $C_t$ ) dokumentiert.



**Abbildung 2.3** – RTq-PCR. Für jede Probe wurde die gemessene Fluoreszenzintensität (CF RFU) gegen die Zeit (cycle) aufgetragen. In halblogarithmischer Darstellung zeigen die Proben für die exponentielle Phase einen annähernd geradlinigen Verlauf. In diesen Bereich wird der Fluoreszenzschwellenwert gelegt (rote horizontale Linie). Für jede Probe lässt sich nun der Schwellenwert-Zyklus ablesen, bei dem der Fluoreszenzschwellenwert überschritten wurde. CF RFU: curve fit relative fluorescence units. (Eigene Abbildung)

Neben der Zielgen-PCR wird für alle Proben parallel eine RTq-PCR für ein konstitutiv exprimiertes Referenzgen (Housekeeping-Gen) durchgeführt. So kann anschließend die Ziel-DNA-Quantität bzgl. des Referenz-Gens normalisiert werden:

$$\text{Zielgen-Expression} = \frac{2^{C_t(\text{Ziel-Gen})}}{2^{C_t(\text{Kontroll-Gen})}}$$

Durch Umformung des Terms kann die Zielgen-Expression vereinfacht als  $\Delta C_t$  angegeben werden:

$$\frac{2^{C_t(\text{Ziel-Gen})}}{2^{C_t(\text{Kontroll-Gen})}} = 2^{C_t(\text{Ziel-Gen}) - C_t(\text{Kontroll-Gen})} = 2^{\Delta C_t}$$

Zwischen zwei Proben kann nun die relative Zielgen-Expression wie folgt berechnet werden:

$$n\text{-fache Expression} = \frac{2^{\Delta C_{t\text{Probe A}}}}{2^{\Delta C_{t\text{Probe B}}}} = 2^{\Delta C_{t\text{Probe A}} - \Delta C_{t\text{Probe B}}} = 2^{-\Delta \Delta C_t(\text{Probe A} - \text{Probe B})}$$

Diese Methode wird als  $-\Delta \Delta C_t$ -Methode bezeichnet. Sie ist die einfachste Methode zur relativen Gen-Quantifizierung, erweist sich aber oft als ungenau, da für die exponentielle Phase der PCR eine exakte Verdoppelung der DNA angenommen wird ( $2^n$ ).

Diese Methode wurde unter Berücksichtigung der tatsächlichen Exponentialfunktion erweitert (Pfaffl, 2001).

$$n\text{-fache Expression} = \frac{(E_{\text{Zielgen}})^{\Delta C_t(\text{Zielgen})(\text{Probe A} - \text{Probe B})}}{(E_{\text{Kontrollgen}})^{\Delta C_t(\text{Kontrollgen})(\text{Probe A} - \text{Probe B})}}$$

Die Basis der Exponentialfunktion wird als Effizienz ( $E$ ) bezeichnet. Sie wird durch die RTq-PCR einer cDNA-Verdünnungsreihe bestimmt.  $C_t$ -Werte und Verdünnungsstufen werden gegeneinander aufgetragen und durch die Koordinaten wird eine Gerade gelegt. Die Effizienz ( $E$ ) berechnet sich dann nach der Formel  $E = 10^{(-1/\text{Steigung})}$ .

**Praktisches Vorgehen** Auf einer 6-Well-Zellkulturplatte wurden jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen in 2 ml RPMI-Vollmedium eingesetzt. Eine Zellkultur wurde mit dem Zytokincocktail TGK versetzt, weitere Zellkulturen wurden mit Valproat, Isobutytrat oder Saha in Kombination mit TGK angesetzt. Als Negativkontrolle diente eine in Vollmedium angesetzte Zellkultur ohne HdI und Zytokinzusätze. Nach jeweils 48 Stunden wurden 300  $\mu\text{l}$  der Zellkultursuspensionen vorsichtig abpipettiert und durch Vollmedium und gegebenenfalls TGK ersetzt.

Nach einer Woche wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert, und die relative Expression von *TEL-AML1* durch eine RTq-PCR quantifiziert. Die Normalisierung von *TEL-AML1* erfolgte durch das konsekutiv exprimierte Referenzgen *Beta-Aktin*. Die Amplifikation von *TEL-AML1* und *Beta-Aktin* erfolgte für jede Probe getrennt in Triplikaten auf einer 96-Well-PCR-Platte. Die *TEL-AML1*-Sonde wurde am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff FAM (6-Carboxy-fluorescein-Phosphoramidit, Reporter) und am 3'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff TAMRA (6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin, Quencher) markiert (TIB Molbiol, Berlin). Die *Beta-Aktin*-PCR erfolgte mit dem TaqMan-Kit (Applied Biosystems). Zur Berechnung der Effizienz diente eine Verdünnungsreihe



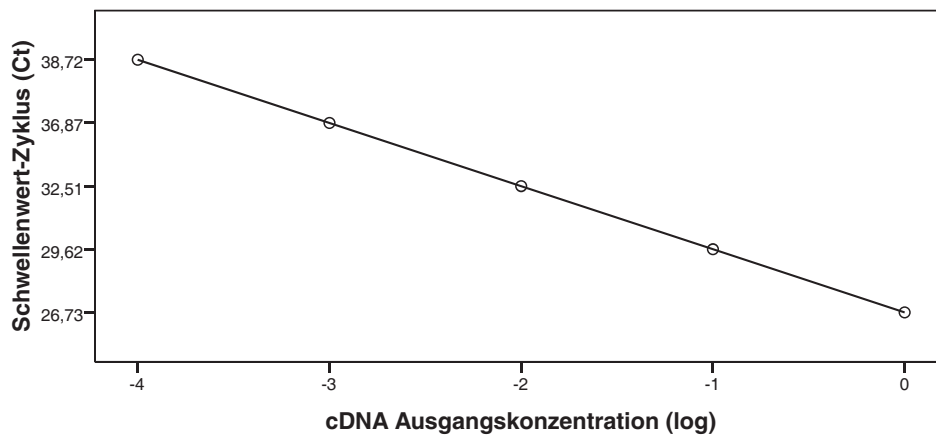
der Zelllinie Reh ( $10^0 - 10^{-4}$   $\mu\text{l}$  cDNA).

for-Primer: 5'-gAAgggAAgCCCATCAACCTC-3' (TEL S, 21 mer)

rev-Primer: 5'-TgAAgCggCggCTCgT-3' (Aex3, 16 mer)

DNA-Sonde: 5'-TCTCCCCgCCTgAAgAgCACgCCA-3' (TEL)

Um die TEL-AML1-RTq-PCR gegenüber einem Referenzgen zu normalisieren, wurde für alle Proben parallel eine RTq-PCR für das konstitutiv exprimierte Referenzgen *Beta-Aktin* durchgeführt. Die Beta-Aktin-RTq-PCR wurde etwa ab dem 16. Zyklus positiv und war bis mindestens  $10^{-4}$   $\mu\text{g}$  eingesetzter cDNA sensitiv. Die Effizienzen und die Korrelationskoeffizienten wurden für die RTq-PCR durch Verdünnungsreihen der Zelllinie Reh ( $10^0 - 10^{-4}$   $\mu\text{g}$  cDNA) bestimmt (Abbildung 2.4). Die Effizienz  $E$  lag für beide RTq-PCR im Bereich von 2,00 ( $\pm 5\%$ ), wobei die Effizienzen in der Regel um weniger als 0,1 Punkte voneinander abwichen.



**Abbildung 2.4** – Standardkurve einer TEL-AML1-PCR: Der Korrelationskoeffizient der Einzelwerte liegt bei 0,995. Die Steigung von -3,124 entspricht einer PCR-Effizienz von 2,09. (Eigene Abbildung)

Das PCR-Gerät iCycler MyiQ (Bio-Rad) wurde zum Vorheizen des Anregungssystems eingeschaltet und die PCR-Plattenbelegung definiert. Anschließend wurde entsprechend der Anzahl der Proben der TEL-AML1-Mastermix zusammengestellt (Tabelle 2.8). Der Beta-Aktin-Mastermix wurde nach Herstellerangaben angesetzt (TaqMan PCR Mastermix (2 $\times$ ) und Beta-Aktin-TaqMan-Mix im Verdünnungsverhältnis 10:1).

Entsprechend der vordefinierten Plattenbelegung wurde in jedes verwendete Reaktions-Well der 96-Well-Platte 10  $\mu\text{l}$  des jeweiligen Mastermix vorgelegt.

Jeweils 1  $\mu\text{l}$  der Proben-cDNA wurde mit 9  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  verdünnt (1:10) und zu den einzelnen Reaktionsgefäßen hinzupipettiert. Anschließend wurde die Probenverdünnungsreihe hinzupipettiert.

TEL-AML1-Mastermix	
Reagenz	Konz. ( $\mu\text{l}$ )
Taq-Platinum (5 U/ $\mu\text{l}$ )	0,2
dNTP (2 mM)	2
TEL S (10 $\mu\text{M}$ )	0,5
Aex3 (10 $\mu\text{M}$ )	0,5
TEL-AML1-Sonde (10 $\mu\text{M}$ )	0,2
Platinum PCR Puffer (10 $\times$ )	2
MgCl <sub>2</sub>	3
H <sub>2</sub> O	1,6

**Tabelle 2.8** – Für jedes Reaktions-Well werden 10  $\mu\text{l}$  des TEL-AML1-Mastermix mit 10  $\mu\text{l}$  einer 1:10 verdünnten Proben-cDNA versetzt. Taq-Platinum: DNA-Polymerase, dNTP: Desoxyribonukleosid-triphosphate, MgCl<sub>2</sub>: Magnesiumchlorid, H<sub>2</sub>O: Reinstwasser

iCycler PCR Protokoll					
Zyklus	1	2			3
Wiederholung	1 $\times$	45 $\times$			1 $\times$
Einzelschritt	1.	1.	2.	3.	1.
Dauer (min)	8:00	0:15	0:15	0:10	5:00
Temperatur	95 °C	60 °C	72 °C	95 °C	14 °C

**Tabelle 2.9** – Jeder PCR-Zyklus besteht aus einem oder mehreren Einzelschritten, die durch die Proben temperatur und die Dauer definiert sind.

Die PCR-Platte wurde mit Deckelstreifen verschlossen und bei 3000  $\text{min}^{-1}$  impulszentrifugiert. Die Proben wurden in das PCR-Gerät gesetzt und der PCR-Lauf entsprechend dem Protokoll aus Tabelle 2.9 gestartet.

Die Spezifität der TEL-AML1-PCR wurde durch die Austestung verschiedener Zellproben bestätigt. Die TEL-AML1-positive Zelllinie REH zeigte bei 1  $\mu\text{g}$  eingesetzter cDNA ab Zyklus 26 eine exponentielle Amplifikation. Bis zu einer cDNA Menge von  $10^{-4}$   $\mu\text{g}$  war die RTq-PCR sensitiv (Abbildung 2.4). Zelllinien ohne die Translokation t(12;21) wie K562 blieben über alle PCR-Zyklen hinweg negativ.

Die Versuchsaufbereitung und Auswertung erfolgte mit der iCycler iQ Optical System Software (Version 3.1, Bio-Rad). Die weitere statistische Auswertung erfolgte mit der Gene Expression Analysis Software 1.1 (Bio-Rad) und der REST-MCS Software 2.0 (Pfaffl et al., 2002).

## 2.6 Protein-biochemische Methoden

### 2.6.1 Zellyse und Proteinaufreinigung

Die Analyse von intrazellulären und membrangebundenen Proteinen erfordert die Zerstörung von Biomembranen durch chemische oder physikalische Methoden. Durch diesen als Zellyse bezeichneten Vorgang werden Proteine freigelegt, die anschließend aufgereinigt und analysiert werden können.

Für den Nachweis von TEL-AML1 im Western Blot wurden Gesamtproteinlysate von REH-Zellen hergestellt. Dazu wurden die Zellen mit einem auf Detergenzien basierenden Lysepuffer und anschließender Ultraschallbehandlung aufgeschlossen (Kapitel 2.6.1.1).

Für den Nachweis von Histonproteinen im Western Blot wurden die basischen Histonproteine durch Säurepräzipitation von den nicht-basischen Proteinen getrennt und durch Dialyse aufkonzentriert (Kapitel 2.6.1.2).

#### 2.6.1.1 Ultraschallgestützte Proteinextraktion

**Praktisches Vorgehen** Der Lysepuffer wurde entsprechend Tabelle 2.6 hergestellt. Anschließend wurde der Lysepuffer in Eppendorfröhrchen aliquotiert und bis zum weiteren Gebrauch bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Für die Proteinextraktion wurde der Lysepuffer aufgetaut und mit PIC (peptidase and phosphatase inhibitor cocktail) und Natriumvanadat ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) versetzt. Die Zellsuspension wurde zweimal in einem 15 ml Schraubdeckelröhrchen mit kaltem PBS-Puffer gewaschen, gezählt und in 100  $\mu\text{l}$  Lysepuffer (je  $1 \times 10^7$  Zellen) gründlich resuspendiert. Das Zellgemisch wurde mit Ultraschall behandelt (Intensität 50%, 12 Pulse) und anschließend zentrifugiert (1800 rpm, 10 min,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Der Überstand wurde vorsichtig abgetragen und zur Weiterverwendung in ein neues Röhrchen überführt.

#### 2.6.1.2 Saure Proteinextraktion und Dialyse

**Theoretischer Hintergrund** Bei der sauren Proteinextraktion präzipitieren Proteine durch die Addition einer starken Säure. Sehr basische Proteine, wie etwa Histone, bleiben jedoch in Lösung und können nach Zentrifugation als Überstand in ein neues Reagenzgefäß überführt werden. Das Proteinlysate kann anschließend in mehreren Dialyseschritten aufkonzentriert und von der Säure

befreit werden. Dieses Verfahren findet insbesondere Anwendung bei der Histonprotein-Extraktion, um das sonst übliche unsaubere Bandenprofil mit hoher Hintergrundfluoreszenz im Western Blot zu vermeiden (Shechter et al., 2007).

**Praktisches Vorgehen** Der Lysepuffer wurde entsprechend der Tabelle 2.5 zusammengestellt, wobei DTT und PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) erst direkt vor der Anwendung hinzugefügt wurden. Für die Dialyse wurden präparierte Eppendorf-Reaktionsgefäße (1,5 ml) genutzt: In die Deckel wurden mit einem erhitzten Skalpell runde, glatt berandete Öffnungen geschnitten. Die Reaktionsgefäße wurden von Plastikresten befreit und autoklaviert.

Insgesamt  $5 \times 10^6$  Zellen wurden in 200  $\mu$ l Lysepuffer resuspendiert und mit 40  $\mu$ l einer 1 molaren Salzsäure versetzt. Die Proben wurden für 30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend in einer Tischzentrifuge zentrifugiert (11.000 rpm, 10 Min, 4 °C). Der Überstand wurde in die Dialyse-Gefäße transferiert, die Deckelöffnung von innen mit einem Stück feuchter Dialysemembran verdeckt und verschlossen.

Die Dialyse erfolgte zunächst zweimal gegen Essigsäure (200 mM/l) für je 2 Stunden und anschließend dreimal gegen Reinstwasser für 1, 8 und 16 Stunden. Das Zellysate wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bis zur Weiterverwendung bei -20 °C gelagert.

## 2.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

**Theoretischer Hintergrund** Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte quantitativ photometrisch nach der BCA-(Bicinchoninsäure)-Reaktion. Grundlage der BCA-Reaktion ist die Fähigkeit von Proteinen im alkalischen Milieu zweiwertige Kupferionen zu reduzieren (Biuret-Reaktion). Einwertige Kupferionen werden anschließend durch BCA komplexiert, wodurch ein violetter Farbstoff entsteht. Die photometrisch gemessene Absorption korreliert mit der Konzentration der Kupfer-reduzierenden Gruppen und entspricht in Näherung der Gesamtproteinkonzentration.

**Praktisches Vorgehen** Von den Proteinlysate wurden 25  $\mu$ l in Duplikaten auf eine 96-Well-Flachbodenplatte ausplattiert. Als Standard diente eine ebenfalls in Duplikaten angelegte Verdünnungsreihe mit bovinen Serumalbumin (BSA). Die BCA Reagenzien A und B (BCA Protein Assays, Pierce) wurden im Verhältnis 50 + 1 gemischt und 200  $\mu$ l dieser Arbeitsreagenz jeder Proteinprobe

hinzupipettiert. Anschließend wurden die Proben für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Quantifizierung der Farbstoffabsorption erfolgte am Mikroplatten-Absorptionslesegerät bei der Wellenlänge von 590 nm.

### 2.6.3 SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese

Die Funktionsweise der Gelelektrophorese wurde in Kapitel 2.5.3 dargestellt.

Die Auftrennung von denaturierten Proteinen anhand ihres Molekulargewichtes erfolgte durch eine vertikale SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (XCell SureLock, Invitrogen). Hierzu wurden jeweils 13 µl des Proteinlysats in 5 µl LDS Puffer (4×) und 2 µl reduzierendem Agens (10×) aufgenommen und anschließend für 10 Minuten bei 70 °C inkubiert. Jeweils 20 µl der Proben wurden nun versuchsabhängig entweder auf 10% Bis-Tris-Gele oder auf 3-8% Tris-Acetat-Gradientengele aufgetragen. Neben den Proteinproben wurde auch ein Marker (Protein-Leiter) aufgetragen, um eine Größenbestimmung der Proteinbanden zu ermöglichen. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte entweder in Tris-Acetat SDS Laufpuffer oder MOPS SDS Laufpuffer mit 0,25% Antioxidans für 75 Minuten bei 150 V bzw. 30 Minuten bei 200 V für die Histonproteine.

### 2.6.4 Western blot Analyse

Der Immunoblot erfolgte mit dem nassen tank-blot System XCell SureLock (Invitrogen). Die aufgetrennten Proteine wurden für 1 Stunde bei 35 V in Transferpuffer, 10% Methanol und 1% Antioxidans vom SDS Polyacrylamid Gel auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Anschließend wurde die Nitrocellulosemembran für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit 5% Milchpulver in PBST-Puffer inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungen zu reduzieren. Der Primärantikörper wurde verdünnt (Anti-N-Tel 1:1000, Anti-AML1-RHD 1:40, Anti-Histon-H4 1:40) und über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler mit der Membran inkubiert.

Am nächsten Morgen wurde die Membran für 3 × 5 Minuten mit 5% Milchpulverlösung in PBST-Puffer gewaschen und anschließend mit einem Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper für 35 Minuten inkubiert. Es folgten drei Waschschrte mit PBST-Puffer mit 5% Milchpulver, PBST-Puffer und PBS-Puffer.

Anschließend wurde durch das Auftragen des Meerrettich-Peroxidase-Substrats (ECL Substrat) der membranständige Sekundärantikörper sichtbar gemacht (Luminol-Reaktion). Danach wurde

lichtempfindlicher Film in der Dunkelkammer durch die Chemolumineszenz der Membran belichtet und entwickelt.

Der Nachweis des TEL-AML1-Fusionsproteins erfolgte im Western Blot durch Antisera gegen die RH-Domäne von AML1 (AML1-RHD) und die N-terminale Region von TEL (N-TEL). Sowohl der N-terminale Teil von TEL als auch die RH-Domäne von AML1 bleiben im TEL-AML1-Fusionsprotein erhalten womit sie in Kombination geeignet sind, um TEL-AML1 nachzuweisen. Ein fusionsstellen-spezifisches Antiserum ist nicht verfügbar. Die Zellysate wurden elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und das Anti-AML1-RHD Bandenprofil durch Antikörperinkubation sichtbar gemacht.

## 2.7 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software SPSS Version 14, Microsoft Excel Version 2003, der Gene Expression Analysis Software Version 1.1 (Bio-Rad) und der REST-MCS Software Version 2.0 (Pfaffl et al., 2002).

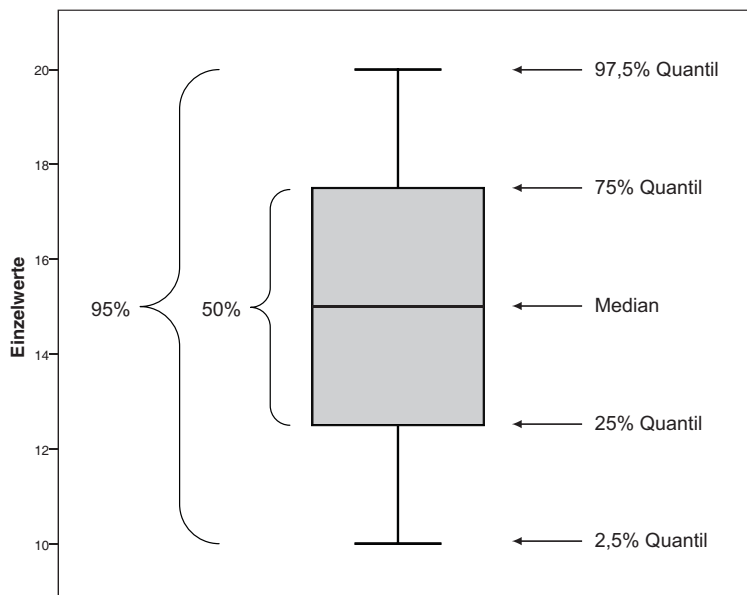
### 2.7.1 Deskriptive Statistik

Aus den einzelnen Proben der verschiedenen Konditionen wurden Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) der untersuchten Parameter bestimmt. Die Berechnung erfolgte softwaregestützt nach folgenden Formeln:

$$\text{arithmetischer Mittelwert: } \bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

$$\text{Standardabweichung: } s = \sqrt{s^2} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

Die grafische Darstellung der Messergebnisse erfolgte im Boxplot-Diagramm (Abbildung 2.5). In einem Boxplot werden fünf statistische Variablen zusammengefasst, anhand derer sich die Streuung der Einzelwerte und die Schiefe der Verteilung besonders gut ablesen lässt.



**Abbildung 2.5** – Boxplot. Durch ein Rechteck (Box) werden die 25% und 75% Quantile begrenzt. Es enthält 50% der Einzelwerte. Durch zwei weitere vertikal verbundene horizontale Linien (Whisker) werden die 2,5% und 97,5% Quantile begrenzt. Zwischen ihnen liegen 95% der Einzelwerte. Werte außerhalb dieses Bereichs werden als Kreise dargestellt. Innerhalb der Box ist der Median als waagerechte Linie eingezeichnet. Durch den Boxplot werden damit fünf statistische Werte in einer Grafik zusammenfassend dargestellt. (Eigene Abbildung)

## 2.7.2 Mathematische Statistik

**Statistische Signifikanz** Die maximale Irrtumswahrscheinlichkeit (Signifikanzniveau  $\alpha$ ) wurde für alle statistischen Tests a priori auf 0,05 (5%) festgelegt. Ein Unterschied zwischen zwei Konditionen wurde als signifikant bezeichnet und die Nullhypothese verworfen, wenn der  $p$ -Wert eines statistischen Tests kleiner als das festgelegte Signifikanzniveau  $\alpha$  war.

**Statistische Tests** Für die statistische Testung der immunphänotypischen Messergebnisse wurde ein zweiseitiger t-Test durchgeführt. Für die statistische Testung der RTq-PCR Messergebnisse wurde der *Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation* Algorithmus von Pfaffl et al. angewandt, wobei für die Schätzung des  $p$ -Werts 2000 Randomisierungen durchgeführt wurden. Der Algorithmus basiert auf einem von der Normalverteilung unabhängigen Randomisierungstest und nutzt dabei die Paarbildungsmethode (Pfaffl, 2001; Pfaffl et al., 2002).



## 3 Ergebnisse

### 3.1 Differenzierung von *TEL-AML1*-positiven leukämischen Blasten zu dendritischen Zellen

Für verschiedene Leukämieformen konnte gezeigt werden, dass aus leukämischen Blasten *in vitro* leukämische dendritische Zellen generiert werden können (Choudhury et al., 1998). In der Literatur sind hierfür verschiedene Protokolle beschrieben (Woiciechowsky et al., 2001; Joshi et al., 2002; Pospíšilová et al., 2002), wobei insbesondere Zytokinkombinationen aus GM-CSF, TNF- $\alpha$ , c-KIT-Ligand, IL-3 und IL-4 eingesetzt werden (Oehler et al., 2000; Hagihara et al., 2001; Tsuchiya et al., 2002; Panoskaltsis et al., 2002).

Für die *TEL-AML1*-positive BVZ-ALL-Zelllinie REH konnte gezeigt werden, dass durch die Addition des Histondeacetylase-Inhibitors (HdI) Trichostatin A deutlich mehr dendritische Zellen generiert werden können, als durch alleinige Zytokinstimulation (Moldenhauer et al., 2004). Zudem waren nur die mit Trichostatin A vorbehandelten REH-DC in der Lage, eine Blasten-spezifische zytotoxische Immunreaktion zu induzieren. Dieser positiv-proliferative Effekt begründet sich wahrscheinlich darin, dass ein Teil der leukämischen Wirkung von *TEL-AML1* durch HdI antagonisiert werden kann.

Um den Effekt verschiedener HdI auf die Generierung leukämischer dendritischer Zellen zu untersuchen, wurden t(12;21)-positive REH-Zellen mit den HdI Valproat, Isobutyrat oder Suberoylanilid-Hydroxamsäure (Saha) und dem DC-induzierenden Zytokincocktail TGK (Tabelle 2.7a, Seite 38) behandelt. Trichostatin A wurde aufgrund der hohen Zytotoxizität in dieser Arbeit nicht eingesetzt. Untersucht wurde die Wirkung auf die Expression DC-typischer Oberflächenmarker, die Zellzahl, die Viabilität und die Zytomorphologie. Darüber hinaus wurde die Persistenz des Fusionsproteins *TEL-AML1* in den differenzierten Zellen nachgewiesen.

### 3.1.1 Durchflusszytometrische Immunphänotypisierung

Die Zelllinie REH wurde mit Valproat, Isobutyrat oder Saha in den Konzentrationen 128 nM, 256 nM, 512 nM und 1024 nM versetzt und anschließend für drei bis neun Tage mit dem DC-induzierenden Zytokincocktail TGK behandelt (Moldenhauer et al., 2003, 2004). Als Negativkontrolle diente eine in Vollmedium kultivierte REH-Kultur ohne HdI- und Zytokinzusätze.

An den Tagen drei, fünf, sieben und neun wurde die Expression der Oberflächenantigene CD83, HLA-DR und CD86 auf behandelten REH-Zellen durchflusszytometrisch untersucht und die Zellzahl und Viabilität bestimmt. Zur Ergänzung des immunphänotypischen Profils wurden ebenfalls die Oberflächenantigene CD80, CD1a und CD14 untersucht. Die Ergebnisse der Immunphänotypisierung sind in den Abbildungen 3.1 bis 3.6 und in den Tabellen 3.1 und 3.2 zusammengefasst. Mithilfe des t-Tests wurde geprüft, ob sich die Mittelwerte der HdI-Konditionen signifikant von der Zytokinkondition (TGK) unterscheiden. Nur die Zytokinkondition TGK wurde gegen die Negativkontrolle getestet.

Am *dritten Tag* war der Mittelwert der prozentualen CD83+/HLA-DR+ Expression in der TGK-Kondition mit 5,77% ( $\pm 3,03$ ) im Vergleich zur Negativkontrolle (1,54%  $\pm 1,55$ ) signifikant erhöht ( $p = 0,003$ ). Auch die CD86+/CD80- Expression war mit 10,03% ( $\pm 4,45$ ) gegenüber der Negativkontrolle (4,59%  $\pm 3,58$ ) erhöht ( $p = 0,01$ ). In den HdI Konditionen zeigte sich bis auf eine Ausnahme keine Steigerung der CD83+/HLA-DR+ und CD86+/CD80- Expression. Nur Isobutyrat 512 nM zeigte mit 11,47 % ( $\pm 8,29$ ) eine gegenüber der Zytokinkondition gesteigerte CD83+/HLA-DR+ Expression ( $p = 0,04$ ).

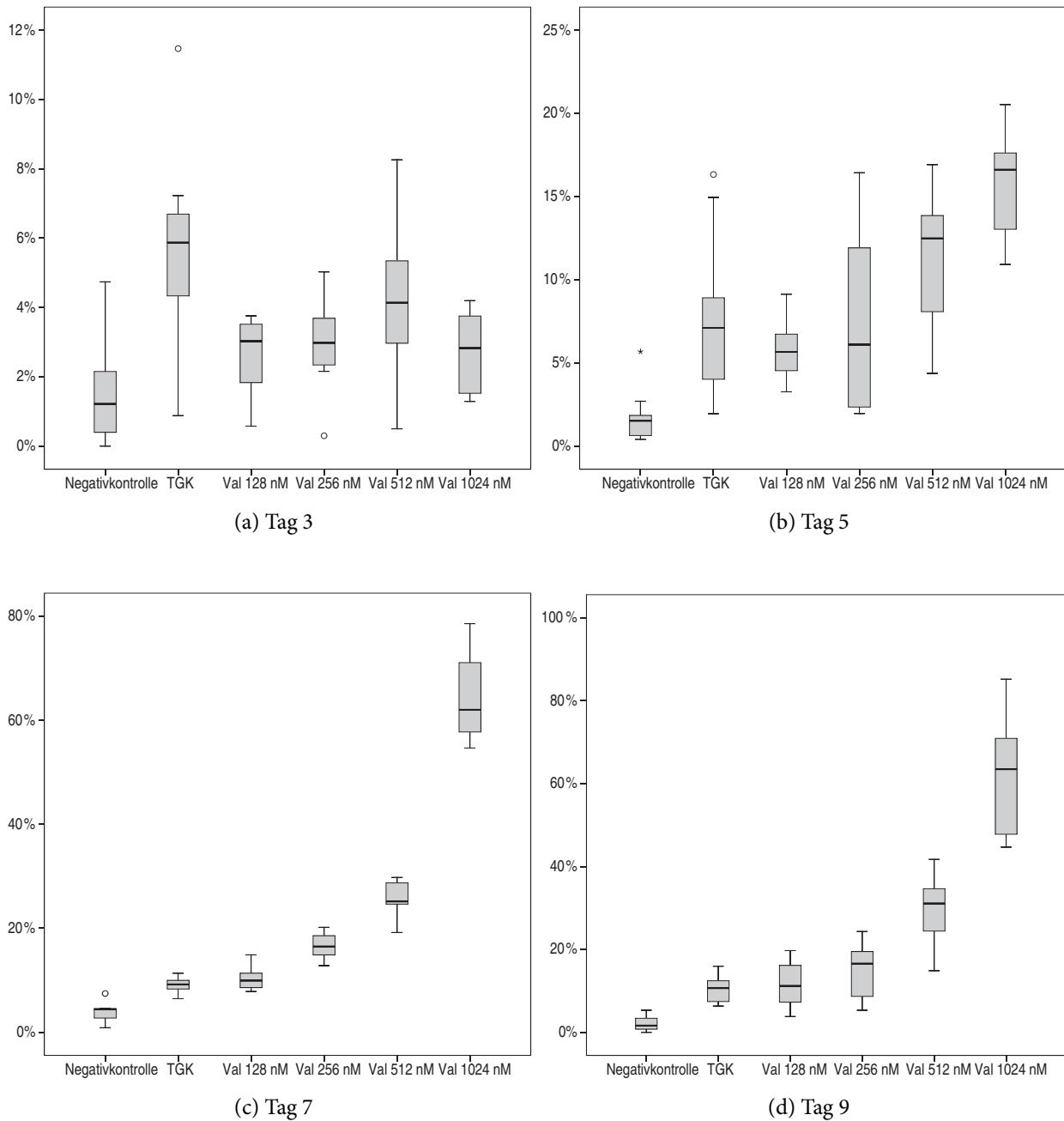
Am *fünften Tag* war die Expression von CD83+ und HLA-DR+ in der Zytokinkondition TGK mit 7,79% ( $\pm 4,92$ ) weiterhin gesteigert ( $p = 0,003$ ). Von den HdI zeigte nur Valproat 1024 nM eine gegenüber der Zytokinkondition erhöhte CD83+/HLA-DR+ Expression, alle anderen HdI unterschieden sich von der Zytokinkondition nicht signifikant. Die CD86+/CD80- Expression war in der Zytokinkondition mit 10,09% ( $\pm 2,70$ ) gegenüber der Negativkontrolle (2,85%  $\pm 10,09$ ) hochsignifikant gesteigert. In den HdI Konditionen ließ sich die CD86+/CD80- Expression weiter steigern, wobei Valproat 512 nM mit 16,29% ( $\pm 4,65$ ) und Saha 1024 nM mit 20,97% ( $\pm 6,77$ ) die höchste Frequenz CD86+/CD80- Zellen aufwiesen.

Am *siebten Tag* war die CD83+/HLA-DR+ Expression in der Zytokinkondition mit 9,09% ( $\pm 1,63$ ) gegenüber der Kontrolle (3,90%  $\pm 2,11$ ) hochsignifikant erhöht. Valproat führte darüber hinaus ab einer Konzentration von 256 nM zu einer nochmals gesteigerten Frequenz der CD83 und HLA-DR positiven Zellen. So zeigte Valproat 512 nM eine CD83+/HLA-DR+ Expression von 25,83% ( $\pm 3,64$ ), und in der Konzentration 1024 nM 64,71% ( $\pm 9,66$ ). In den Saha Konditionen 256 nM und 512 nM war die Frequenz CD83/HLA-DR positiver Zellen mit 19,15% ( $\pm 8,33$ ) und 20,17% ( $\pm 8,17$ ) ebenfalls

erhöht, Isobutyrat hingegen war nur in der Kondition 512 nM besser als die Zytokinkondition, bei jedoch großer Standardabweichung ( $18,31\% \pm 9,39$ ,  $p = 0,04$ ). Bezüglich der CD86+/CD80-Expression waren alle Valproat Konditionen ab 256 nM gegenüber der Zytokinkondition erhöht, wobei die Valproat 256 nM und 512 nM mit  $18,60\% (\pm 1,81)$  und  $26,22\% (\pm 7,53)$  hochsignifikante Werte aufwiesen. Saha war in allen Konditionen besser als die Zytokinkondition, erreichte jedoch mit  $9,18-17,04\% (\pm 1,43-8,39)$  nicht die hohen Werte von Valproat. Isobutyrat war nur in der Konzentration 512 nM mit  $8,10\% \pm 2,88$  erhöht.

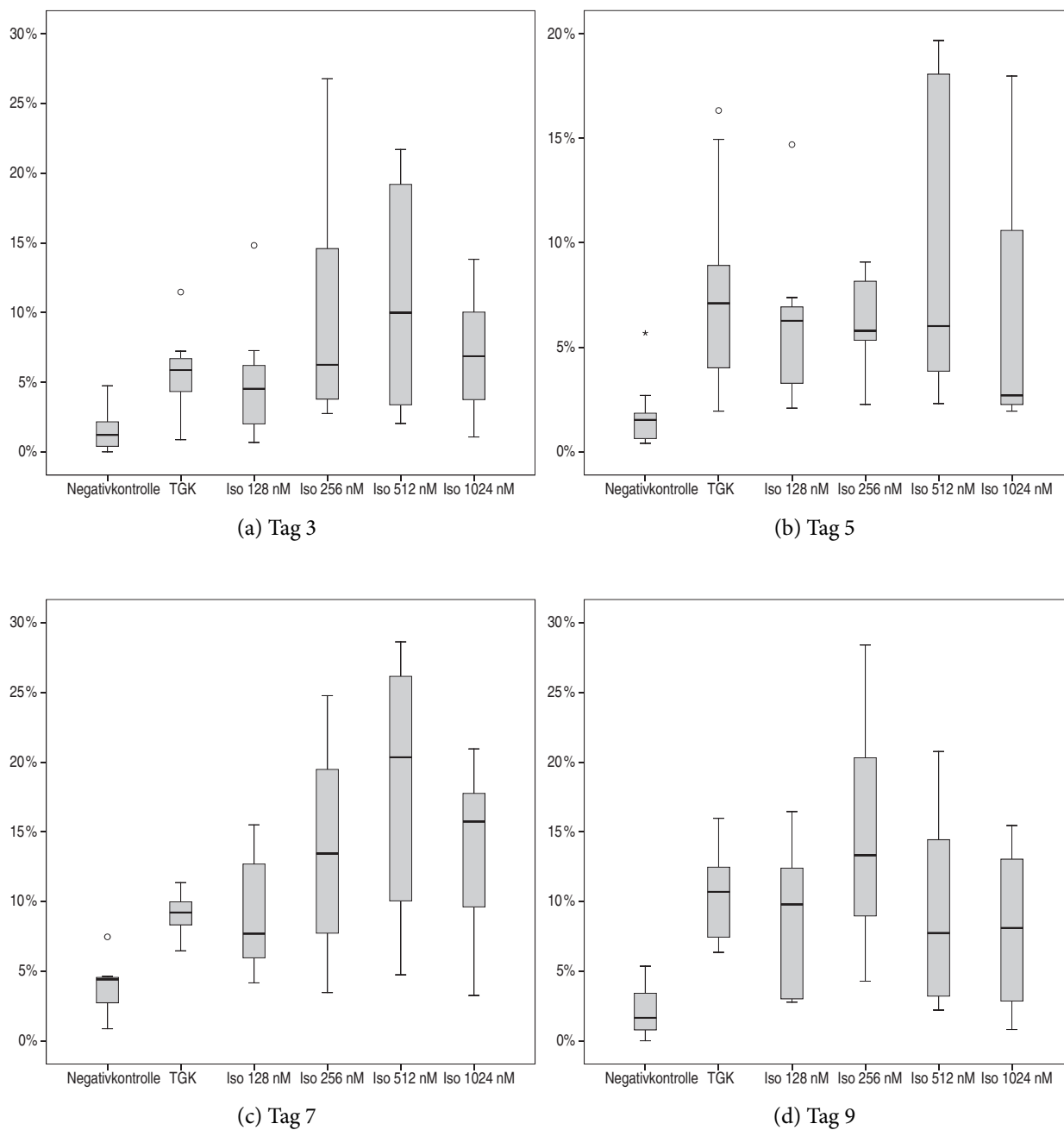
Am *neunten Tag* war die Zytokinkondition TGK mit  $10,40\% (\pm 3,59)$  HLA-DR/CD83 positiven Zellen hochsignifikant gegenüber der Negativkontrolle erhöht. Nur mit Valproat 512 nM und 1024 nm konnte eine noch darüber hinausgehende signifikante Steigerung erzielt werden. In den übrigen Konditionen war die HLA-DR/CD83 Expression eher rückläufig. Ähnlich verhielt es sich mit der CD86+/CD80-Expression. Die Zytokinkondition war mit  $9,01\% (\pm 4,89)$  gegenüber der Negativkontrolle ( $2,77\% \pm 1,19$ ) signifikant erhöht. Nur die Valproat-Konditionen führten noch zu einer weiteren Steigerung der CD86+/CD80-Expression ( $14,34-25,40\% \pm 3,99-8,9$ ). Die anderen HdI waren gegenüber der Zytokinkondition nicht signifikant erhöht.

## Valproat (CD83+/HLA-DR+)



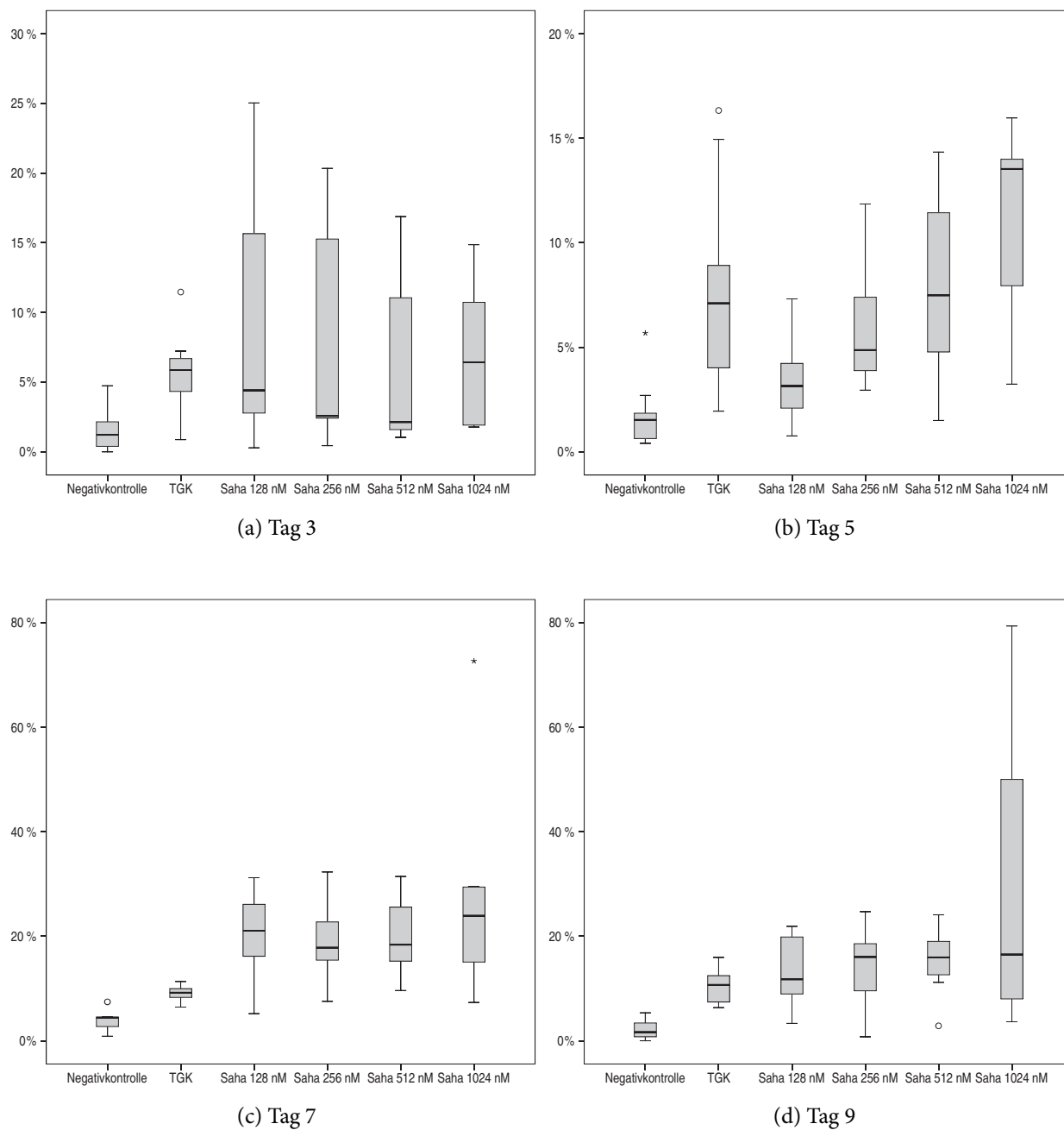
**Abbildung 3.1** – Frequenz CD83/HLA-DR positiver REH-Zellen nach Behandlung mit dem Zytokincocktail TGK und Valproat in verschiedenen Konzentrationen (Val). Dargestellt sind die Ergebnisse nach drei, fünf, sieben und neun Kultivierungstagen. Durch Kreise und Sternchen werden Ausreißer einzeln dargestellt, wobei die Werte über dem 1,5-fachen (o) bzw. 3-fachen (\*) Interquartilabstand des jeweiligen Boxplots liegen. Die mathematische Statistik ist in Tabelle 3.1 zusammengefasst. TGK: Zytokincondition (TNF- $\alpha$ , GM-CSF und c-KIT-Ligand).

## Isobutyrat (CD83+/HLA-DR+)



**Abbildung 3.2** – Frequenz CD83/HLA-DR positiver REH-Zellen nach Behandlung mit dem Zytokincocktail TGK und Isobutyrat in verschiedenen Konzentrationen (Iso). Dargestellt sind die Ergebnisse nach drei, fünf, sieben und neun Kultivierungstagen. Durch Kreise und Sternchen werden Ausreißer einzeln dargestellt, wobei die Werte über dem 1,5-fachen (o) bzw. 3-fachen (\*) Interquartilabstand des jeweiligen Boxplots liegen. Die mathematische Statistik ist in Tabelle 3.1 zusammengefasst. TGK: Zytokincondition (TNF- $\alpha$ , GM-CSF und c-KIT-Ligand).

## Saha (CD83+/HLA-DR+)



**Abbildung 3.3** – Frequenz CD83/HLA-DR positiver REH-Zellen nach Behandlung mit dem Zytokincocktail TGK und Saha in verschiedenen Konzentrationen (Saha). Dargestellt sind die Ergebnisse nach drei, fünf, sieben und neun Kultivierungstagen. Durch Kreise und Sternchen werden Ausreißer einzeln dargestellt, wobei die Werte über dem 1,5-fachen (o) bzw. 3-fachen (\*) Interquartilabstand des jeweiligen Boxplots liegen. Die mathematische Statistik ist in Tabelle 3.1 zusammengefasst. TGK: Zytokincondition (TNF- $\alpha$ , GM-CSF und c-KIT-Ligand).

## CD83+/HLA-DR+ (%)

Tag 3					Tag 5				
Kondition	MW	SA	<i>p</i> -Wert	N	Kondition	MW	SA	<i>p</i> -Wert	N
Kontrolle	1,54	1,55	0,003	8	Kontrolle	1,75	1,65	0,003	9
TGK	5,77	3,03		8	TGK	7,79	4,92		9
Val 128 nM	2,58	1,19	0,01	7	Val 128 nM	5,80	1,97	0,15	7
Val 256 nM	2,91	1,51	0,02	7	Val 256 nM	7,48	6,05	0,46	6
Val 512 nM	4,22	2,49	0,15	7	Val 512 nM	11,10	4,51	0,09	7
Val 1024 nM	2,70	1,24	0,01	7	Val 1024 nM	15,63	3,40	0,001	7
Iso 128 nM	5,20	4,85	0,40	7	Iso 128 nM	6,21	4,25	0,25	7
Iso 256 nM	10,00	8,22	0,09	9	Iso 256 nM	6,23	2,24	0,20	9
Iso 512 nM	11,47	8,29	0,04	9	Iso 512 nM	9,60	7,41	0,28	9
Iso 1024 nM	7,05	4,51	0,27	7	Iso 1024 nM	6,90	7,14	0,39	7
Saha 128 nM	9,52	9,37	0,17	7	Saha 128 nM	3,41	2,17	0,02	7
Saha 256 nM	8,39	8,23	0,22	7	Saha 256 nM	6,03	3,34	0,21	7
Saha 512 nM	6,48	6,58	0,40	7	Saha 512 nM	7,97	4,82	0,47	7
Saha 1024 nM	6,91	5,32	0,31	7	Saha 1024 nM	10,95	4,62	0,11	7

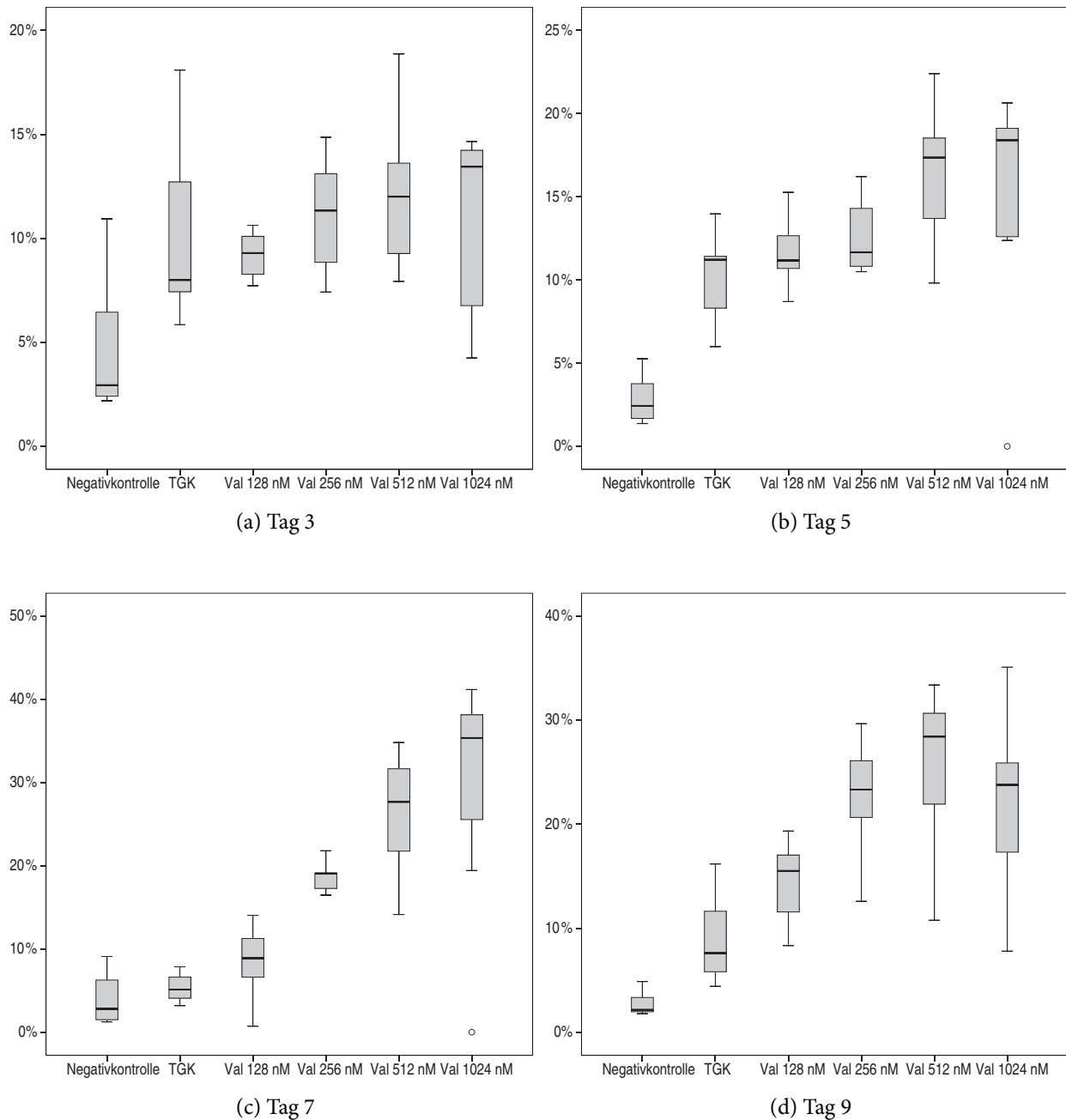
(a) (b)

Tag 7					Tag 9				
Kondition	MW	SA	<i>p</i> -Wert	N	Kondition	MW	SA	<i>p</i> -Wert	N
Kontrolle	3,90	2,11	< 0,001	7	Kontrolle	2,20	1,92	< 0,001	7
TGK	9,09	1,63		7	TGK	10,40	3,59		7
Val 128 nM	10,37	2,55	0,5	7	Val 128 nM	11,68	6,19	0,32	7
Val 256 nM	16,63	2,69	0,02	7	Val 256 nM	14,66	7,25	0,10	7
Val 512 nM	25,83	3,64	0,003	7	Val 512 nM	29,42	9,42	0,001	7
Val 1024 nM	64,71	9,66	< 0,001	7	Val 1024 nM	61,54	15,35	< 0,001	7
Iso 128 nM	9,24	4,34	0,31	7	Iso 128 nM	8,55	5,74	0,24	7
Iso 256 nM	13,69	7,80	0,16	8	Iso 256 nM	14,94	9,07	0,13	7
Iso 512 nM	18,31	9,39	0,04	8	Iso 512 nM	9,42	7,58	0,38	7
Iso 1024 nM	13,53	7,19	0,19	7	Iso 1024 nM	8,03	5,54	0,17	8
Saha 128 nM	20,30	8,87	0,30	7	Saha 128 nM	13,53	7,13	0,16	7
Saha 256 nM	19,15	8,33	0,04	7	Saha 256 nM	13,98	8,04	0,16	7
Saha 512 nM	20,17	8,17	0,03	7	Saha 512 nM	15,18	6,87	0,07	7
Saha 1024 nM	27,56	21,70	0,05	7	Saha 1024 nM	29,02	34,29	0,18	4

(c) (d)

**Tabelle 3.1** – Frequenz CD83/HLA-DR positiver REH-Zellen nach Behandlung mit dem Zytokincocktail TGK und Valproat, Isobutytrat oder Saha in verschiedenen Konzentrationen. Für jede Kondition sind Mittelwert (MW), Standardabweichung (SA) und die Anzahl der Einzelerperimente (N) tabellarisch aufgelistet. Dargestellt sind die Werte für den dritten, fünften, siebten und neunten Zellkulturtag. Val: Valproat; Iso: Isobutytrat; Saha: Suberoylanilid-Hydroxamsäure; TGK: Zytokincocktail (TNF- $\alpha$ , GM-CSF und KIT-Ligand).

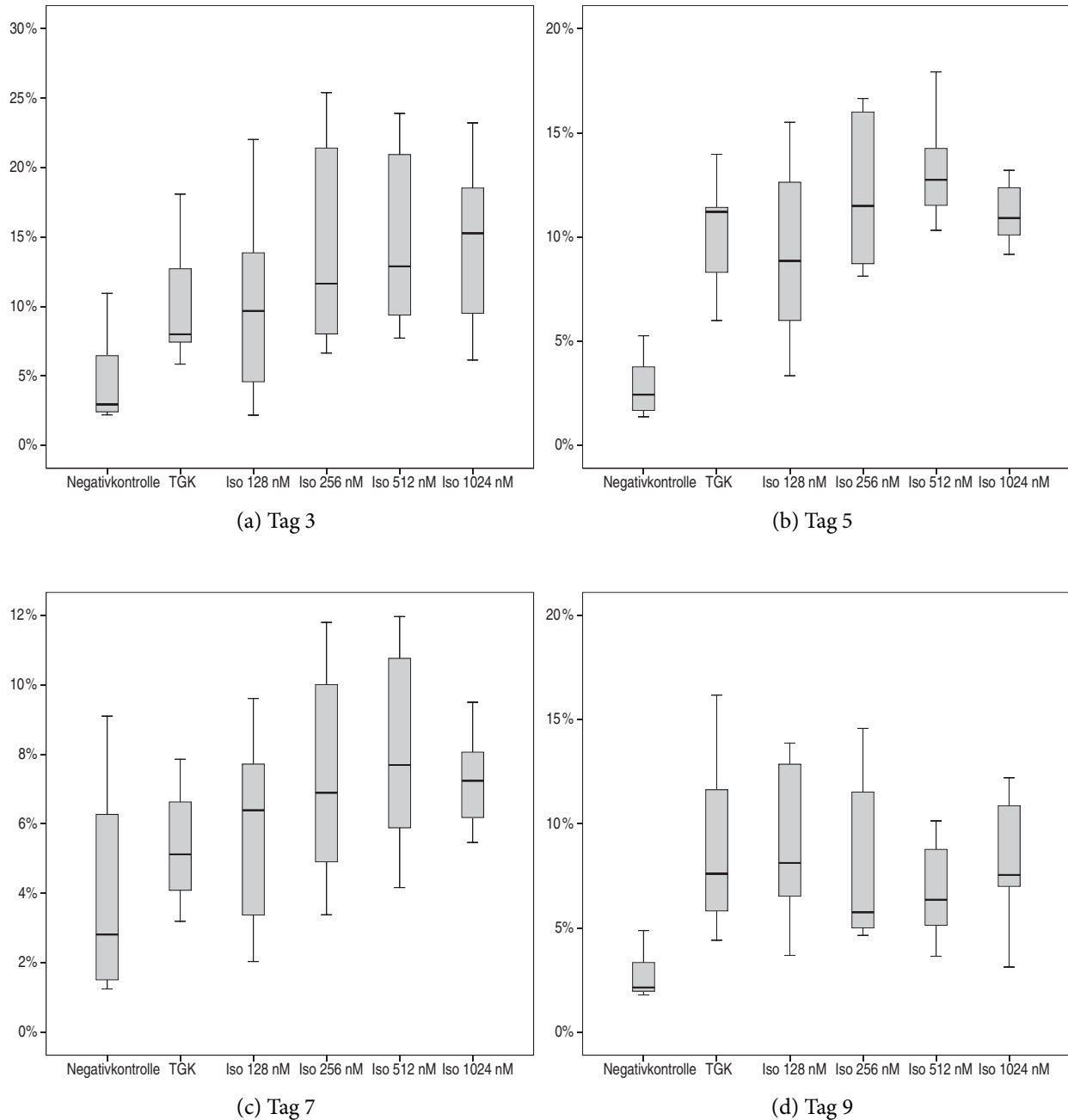
## Valproat (CD86+/CD80-)



**Abbildung 3.4** – Frequenz der CD86+/CD80- Expression von REH-Zellen nach Behandlung mit dem Zytokincocktail TGK und Valproat in verschiedenen Konzentrationen (Val). Dargestellt sind die Ergebnisse nach drei, fünf, sieben und neun Kultivierungstagen. Die mathematische Statistik ist in Tabelle 3.2 zusammengefasst. TGK: Zytokincondition (TNF- $\alpha$ , GM-CSF und c-KIT-Ligand).

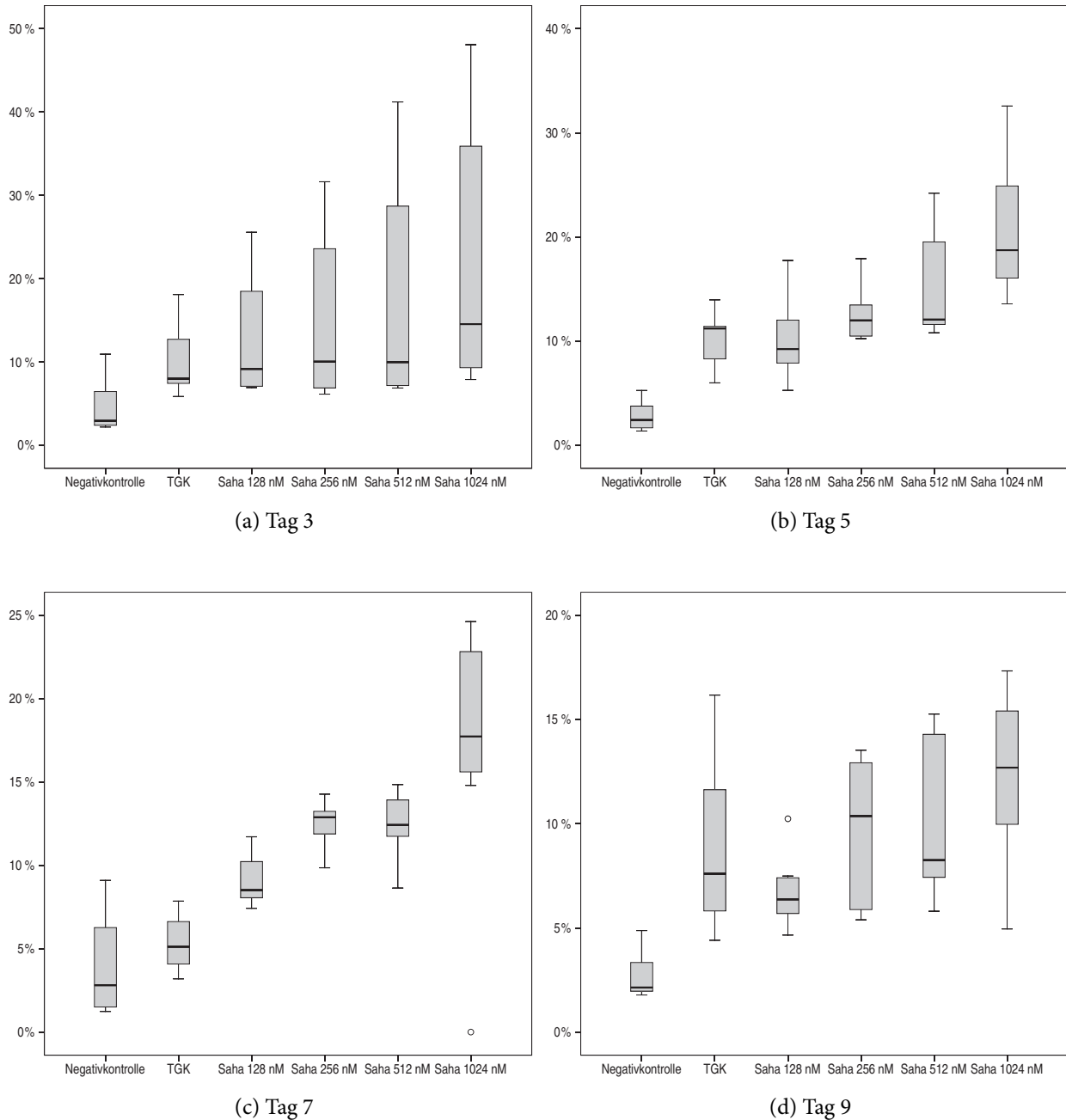


## Isobutyrat (CD86+/CD80-)



**Abbildung 3.5** – Frequenz der CD86+/CD80- Expression von REH-Zellen nach Behandlung mit dem Zytokincocktail TGK und Isobutyrat in verschiedenen Konzentrationen (Iso). Dargestellt sind die Ergebnisse nach drei, fünf, sieben und neun Kultivierungstagen. Die mathematische Statistik ist in Tabelle 3.2 zusammengefasst. TGK: Zytokincondition (TNF- $\alpha$ , GM-CSF und c-KIT-Ligand).

## Saha (CD86+/CD80-)



**Abbildung 3.6** – Frequenz der CD86+/CD80- Expression von REH-Zellen nach Behandlung mit dem Zytokincocktail TGK und Saha in verschiedenen Konzentrationen (Saha). Dargestellt sind die Ergebnisse nach drei, fünf, sieben und neun Kultivierungstagen. Die mathematische Statistik ist in Tabelle 3.2 zusammengefasst. TGK: Zytokincondition (TNF- $\alpha$ , GM-CSF und c-KIT-Ligand).

## CD86+/CD80- (%)

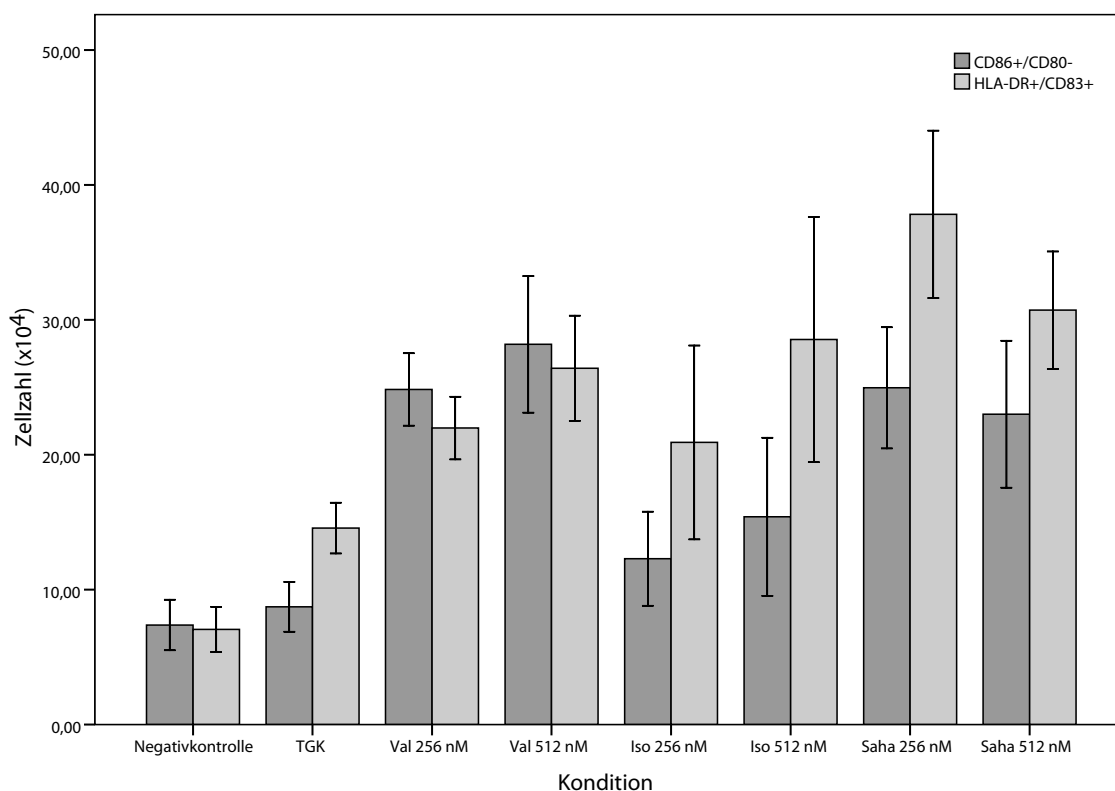
Tag 3					Tag 5				
Kondition	MW	SA	p-Wert	N	Kondition	MW	SA	p-Wert	N
Kontrolle	4,59	3,58	0,01	8	Kontrolle	2,85	1,47	< 0,001	7
TGK	10,03	4,45		8	TGK	10,09	2,70		7
Val 128 nM	9,20	1,13	0,31	7	Val 128 nM	11,69	2,21	0,12	7
Val 256 nM	11,08	2,90	0,30	7	Val 256 nM	12,66	2,41	0,04	7
Val 512 nM	12,08	3,88	0,18	7	Val 512 nM	16,29	4,65	0,01	7
Val 1024 nM	10,62	4,49	0,40	7	Val 1024 nM	14,64	7,23	0,08	7
Iso 128 nM	10,11	7,43	0,49	7	Iso 128 nM	9,28	4,78	0,35	7
Iso 256 nM	14,50	7,29	0,07	9	Iso 256 nM	12,12	3,65	0,11	9
Iso 512 nM	14,78	6,41	0,05	9	Iso 512 nM	13,29	2,53	0,02	9
Iso 1024 nM	14,39	6,37	0,08	7	Iso 1024 nM	11,17	1,50	0,19	7
Saha 128 nM	13,26	7,68	0,18	7	Saha 128 nM	10,30	4,11	0,46	7
Saha 256 nM	15,54	10,87	0,12	7	Saha 256 nM	12,58	2,79	0,06	7
Saha 512 nM	18,55	14,41	0,09	7	Saha 512 nM	15,62	5,37	0,02	7
Saha 1024 nM	22,99	17,58	0,05	7	Saha 1024 nM	20,97	6,77	0,002	7

(a) (b)

Tag 7					Tag 9				
Kondition	MW	SA	p-Wert	N	Kondition	MW	SA	p-Wert	N
Kontrolle	4,10	3,20	0,19	7	Kontrolle	2,77	1,19	0,01	7
TGK	5,37	1,77		7	TGK	9,01	4,89		7
Val 128 nM	8,31	5,06	0,14	5	Val 128 nM	14,34	3,99	0,02	7
Val 256 nM	18,60	1,81	< 0,001	7	Val 256 nM	22,73	5,71	< 0,001	7
Val 512 nM	26,22	7,53	< 0,001	7	Val 512 nM	25,40	7,92	< 0,001	7
Val 1024 nM	29,14	14,73	0,003	7	Val 1024 nM	21,87	8,90	0,004	7
Iso 128 nM	5,74	2,85	0,39	7	Iso 128 nM	9,21	4,07	0,47	7
Iso 256 nM	7,35	3,11	0,08	8	Iso 256 nM	8,29	4,48	0,39	7
Iso 512 nM	8,10	2,88	0,02	8	Iso 512 nM	6,85	2,49	0,16	7
Iso 1024 nM	7,24	1,46	0,03	7	Iso 1024 nM	8,37	3,20	0,39	7
Saha 128 nM	9,18	1,70	0,001	7	Saha 128 nM	6,73	1,70	0,14	8
Saha 256 nM	12,47	1,43	< 0,001	7	Saha 256 nM	9,66	3,65	0,39	8
Saha 512 nM	12,47	2,08	< 0,001	7	Saha 512 nM	10,13	3,83	0,32	8
Saha 1024 nM	17,04	8,39	0,01	7	Saha 1024 nM	12,31	4,00	0,09	8

(c) (d)

**Tabelle 3.2** – Frequenz der CD86+/CD80- Expression von REH-Zellen nach Behandlung mit dem Zytokincocktail TGK und Valproat, Isobutytrat oder Saha in verschiedenen Konzentrationen. Für jede Kondition sind Mittelwert (MW), Standardabweichung (SA) und die Anzahl der Einzelerperimente (N) tabellarisch aufgelistet. Dargestellt sind die Werte für den dritten, fünften, siebten und neunten Zellkulturtag. Val: Valproat; Iso: Isobutytrat; Saha: Suberoylanilid-Hydroxamsäure; TGK: Zytokincocktail (TNF- $\alpha$ , GM-CSF und KIT-Ligand).



**Abbildung 3.7** – HLA-DR+/CD83+ und CD86+/CD80– Expression bezogen auf die absolute Zellzahl. Für ausgewählte Probenkonditionen ist die Zahl der HLA-DR+/CD83+ und CD86+/CD80– Zellen für den siebten Zellkulturtag dargestellt. Die Fehlerbalken repräsentieren  $\pm 1$  Standardabweichung. Val: Valproat; Iso: Isobutytrat; Saha: Suberoylanilid-Hydroxamsäure; TGK: Zytokinkondition.

	CD83+/HLA-DR+			CD86+/CD80–		
	MW %	MW $\times 10^4$	<i>p</i> -Wert	MW %	MW $\times 10^4$	<i>p</i> -Wert
Kontrolle	3,90 (2,11)	7,05 (4,43)	0,006	4,10 (3,20)	7,38 (4,96)	0,31
TGK	9,09 (1,63)	14,56 (4,98)		5,37 (1,77)	8,73 (4,88)	
Val 256 nM	16,63 (2,69)	21,98 (6,15)	0,02	18,60 (1,81)	24,84 (7,11)	< 0,001
Val 512 nM	25,83 (3,64)	26,41 (10,31)	0,01	26,22 (7,53)	28,18 (13,40)	0,004
Iso 256 nM	13,69 (7,80)	20,92 (16,06)	0,22	7,35 (3,11)	12,30 (7,79)	0,20
Iso 512 nM	18,31 (9,39)	28,54 (20,32)	0,10	8,10 (2,88)	15,40 (13,09)	0,16
Saha 256 nM	19,15 (8,33)	37,82 (16,41)	0,01	12,47 (1,43)	24,96 (11,87)	0,01
Saha 512 nM	20,17 (8,17)	30,72 (11,50)	0,004	12,47 (2,08)	23,00 (14,42)	0,02

**Tabelle 3.3** – HLA-DR+/CD83+ und CD86+/CD80– Expression bezogen auf die absolute Zellzahl. Die *p*-Werte beziehen sich auf die absolute Zellzahl. Angegeben ist jeweils der Mittelwert (MW) und in Klammern die Standardabweichung. Val: Valproat; Iso: Isobutytrat; Saha: Suberoylanilid-Hydroxamsäure; TGK: Zytokinkondition (TNF- $\alpha$ , GM-CSF und KIT-Ligand).

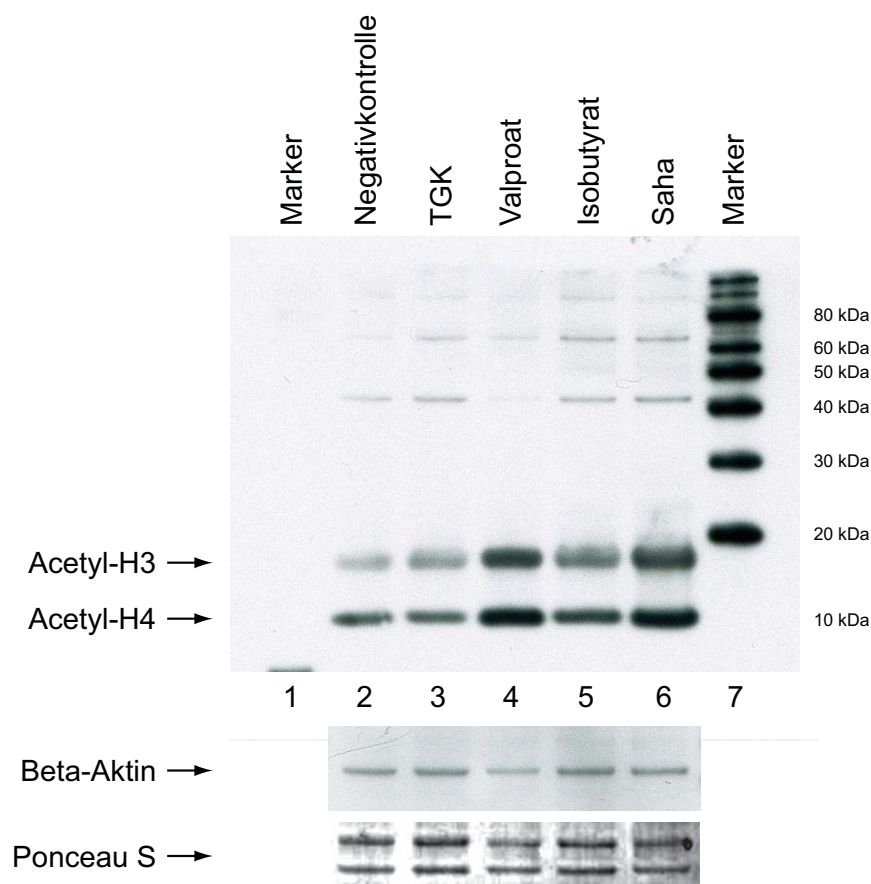
*Zusammenfassend* lässt sich festhalten, dass am siebten und neunten Tag die höchste Expression CD83+/HLA-DR+ und CD86+/CD80– positiver Zellen beobachtet werden konnten. Die höchsten Werte wurden dabei durch den Einsatz von Valproat und Saha erreicht. Durch Isobutytrat konnten nur vereinzelt signifikante Expressionssteigerungen erreicht werden, wobei die Einzelwerte über den Beobachtungszeitraum deutlich inkonsistenter waren. Die reine Zytokinkondition TGK zeigte an allen untersuchten Tagen eine gegenüber der Negativkontrolle signifikante Expressionssteigerung von CD83+ und HLA-DR+. An den Tagen 3, 5 und 9 war zudem die Expression von CD86+/CD80– ebenfalls signifikant erhöht.

Die höchsten *absoluten Zellzahlen* immunphänotypischer dendritischer Zellen konnten am siebten Tag durch die HdI-Konditionen Valproat 512 nM und Saha 256 nM erreicht werden. Nach Addition von Valproat 512 nM waren am siebten Tag  $26,4 \times 10^4$  der Zellen HLA-DR/CD83 positiv und  $28,2 \times 10^4$  der Zellen wiesen ein CD86+/CD80– Expressionsmuster auf. Für die Kondition Saha 256 nM waren  $37,8 \times 10^4$  der Zellen HLA-DR/CD83 positiv,  $25 \times 10^4$  der Zellen zeigten ein CD86+/CD80– Expressionsmuster. Isobutytrat führte zu keiner gegenüber der Zytokinkondition erhöhten absoluten Zellzahl. In der reinen Zytokinkondition TGK waren am siebten Tag  $14,6 \times 10^4$  der Zellen CD83+/HLA-DR+ positiv und damit gegenüber der Negativkontrolle signifikant erhöht, bezogen auf die Zahl CD86+/CD80– positiver Zellen war am siebten Kultivierungstag jedoch gegenüber der Negativkontrolle kein signifikanter Unterschied festzustellen. In Tabelle 3.3 sind die absoluten Zellzahlen für ausgewählte Konditionen dargestellt und der prozentualen Expression gegenübergestellt.

Insbesondere durch die HdI Valproat und Saha konnte die Frequenz und die absolute Zellzahl immunphänotypischer dendritischer Zellen gegenüber der Zytokinkondition TGK signifikant gesteigert werden. Nach sieben Kultivierungstagen waren in der Kondition Valproat 512 nM die Zahl CD83+/HLA-DR+ und CD86+/CD80– positiver Zellen um das 1,8- bzw. 3,2-fache gesteigert. In der Kondition Saha 256 nM war die Zahl CD83+/HLA-DR+ und CD86+/CD80– positiver Zellen um das 2,6- bzw. 2,8-fache gesteigert.

## 3.2 Einfluss von Histondeacetylase-Inhibitoren auf die Histon-Acetylierung

Histonproteine können posttranslational durch Methylierungen und Acetylierungen modifiziert werden. Der onkogene Transkriptionsfaktor TEL-AML1 führt durch die übermäßige Rekrutierung von Histondeacetylase zu einer verstärkten Deacetylierung der Histone. Dieser Pathomechanismus kann durch Histondeacetylase-Inhibitoren (HdI) teilweise antagonisiert werden.



**Abbildung 3.8** – Western Blot von acetylierten Histonen des Typs H3 und H4. Auf den Spuren zwei bis sechs sind die Bandenprofile verschiedener Probenkonditionen zu sehen. Spur eins ist mit einem in Chemilumineszenz nicht sichtbaren Größenmarker beladen (Rainbow Mark). Spur sieben zeigt den Größenmarker Magic Mark XP. Die gleiche Proteinbeladung der Spuren wurde durch Beta-Aktin- und Ponceau-S-Färbungen dokumentiert. TGK: Zytokinkondition (TNF- $\alpha$ , GM-CSF und c-KIT-Ligand).

Um zu zeigen, dass die in dieser Arbeit eingesetzten HdI die Histon-Acetylierung beeinflussen, wurden für verschiedene Probenkonditionen acetylierte Histone im Western Blot dargestellt. REH-Zellen wurden für 24 Stunden mit Zytokinen (TGK), Valproat 512 nM, Isobutytrat 512 nM oder Saha 512 nM

inkubiert. Die Konzentrationsstufe von 512 nM wurde gewählt, da alle untersuchten HdI in dieser Konzentration bereits am dritten Kultivierungstag zu einer signifikanten Expressionssteigerung der CD83+/HLA-DR+ und CD86+/CD80– positiven Zellen führten und damit ein deutlicher Effekt auf die Histonacetylierung zu erwarten war. Anschließend wurden die Histonproteine durch eine saure Proteinextraktion und Dialyse isoliert und aufkonzentriert (Shechter et al., 2007). Die Histonproteine wurden elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und das Anti-Acetyl-Histon-H4 Bandenprofil durch Antikörperinkubation sichtbar gemacht (Abbildung 3.8). Der polyklonale Antikörper reagiert dabei nicht nur mit Acetyl-Histonen vom Typ H4 bei 10 kDa, sondern weist eine zusätzliche Kreuzreaktivität mit dem Acetyl-Histon des Typs H3 bei 14 kDa auf.

Die Spuren vier, fünf und sechs der Abbildung 3.8 zeigen die HdI behandelten Zellproben. Gegenüber der unbehandelten Negativkontrolle und der Zytokinkondition TKG auf den Spuren zwei und drei zeigen die HdI-behandelten Proben eine gesteigerte Intensität der Acetyl-Histon-Banden. Die höchsten Intensitätssteigerungen wurden bei Valproat und Saha beobachtet, bei Isobutytrat fiel diese etwas geringer aus. Damit konnte gezeigt werden, dass die HdI Valproat, Isobutytrat und Saha nach 24 Stunden zu einer gesteigerten Histonacetylierung in *TEL-AML1*-positiven REH-Zellen führen.

### 3.3 *TEL-AML1*-Expression

Die Translokation t(12;21)(p13;q22) führt zu einer Fusion der Gene *TEL* und *AML1* auf dem Chromosom 21 (Romana et al., 1995a; Golub et al., 1995). Die Genexpression des Fusionsproteins *TEL-AML1* verläuft in mehreren Schritten. Zunächst wird am codogenen Strang der DNA ausgehend vom 3'-Ende in Richtung 5'-Ende ein zum Gen komplementärer mRNA-Strang synthetisiert. Dieser Vorgang wird als *Transkription* bezeichnet. Anschließend wird die mRNA im Rahmen der *Translation* in eine Proteinstruktur umgeschrieben. Experimentell kann die Genexpression deshalb sowohl auf Transkriptionsebene (mRNA-Ebene) als auch auf Translationsebene (Proteinebene) nachgewiesen werden, wobei der mRNA-Nachweis besonders sensitiv ist und eine sehr präzise Quantifizierung der Genexpression erlaubt.

Um die Expression des Fusionsgens *TEL-AML1* auf mRNA-Ebene nachzuweisen und zu quantifizieren, wurde eine Real-Time quantitative PCR (RTq-PCR) durchgeführt. Auf Proteinebene wurde *TEL-AML1* durch Western Blots nachgewiesen.

### 3.3.1 *TEL-AML1*-Expression auf mRNA-Ebene

Es wurde untersucht, ob dendritische Zellen, die aus *TEL-AML1*-positiven leukämischen Blasten hervorgegangen sind, Veränderungen in der *TEL-AML1*-Expression aufweisen. Insbesondere die Frage, ob HdI einen Einfluss auf die *TEL-AML1*-Expression haben, wurde untersucht.

Mithilfe einer RTq-PCR wurde die Transkription von *TEL-AML1* nachgewiesen. Etabliert wurde die RTq-PCR im Rahmen der Berlin-Frankfurt-Münster(BFM)-Studiengruppe zur routinemäßigen ALL-Diagnostik (Seeger et al., 2001). Grundlage ist eine fluoreszenzmarkierte DNA-Sonde, die spezifisch mit dem Exon 5 von *TEL* hybridisiert. Da die Bindungsstelle der Sonde außerhalb des Fusionsbereichs von *TEL-AML1* liegt, wird gewährleistet, dass auch Fusionsvarianten von *TEL-AML1* sicher diagnostiziert werden (Romana et al., 1995a). Der Vorwärts-Primer bindet an das Exon 5 von *TEL*, der Rückwärts-Primer an das Exon 4 von *AML1*. Die Primersequenzen sind in Kapitel 2.5.5 aufgeführt.

Im Nachfolgenden werden die Ergebnisse von Genexpressionsanalysen dargestellt, in denen Veränderungen der *TEL-AML1*-Expression nach DC-induzierter Reifung quantifiziert wurden. Untersucht wurden die leukämischen Blasten der *TEL-AML1*-positiven Zelllinie REH und die leukämischen Blasten von *TEL-AML1*-positiven Patienten der Berlin-Frankfurt-Münster(BFM)-Studiengruppe. Die Expressionsanalyse auf mRNA-Ebene erfolgte durch eine *TEL-AML1*-RTq-PCR.

Patientenproben aus der Kinderklinik wurden mithilfe der RTq-PCR auf *TEL-AML1* hin untersucht oder waren bereits im Rahmen der BFM-Studiengruppe vortypisiert. Alle Proben wurden in Triplikaten oder Quadruplikaten gemessen und die Versuche mehrfach wiederholt.

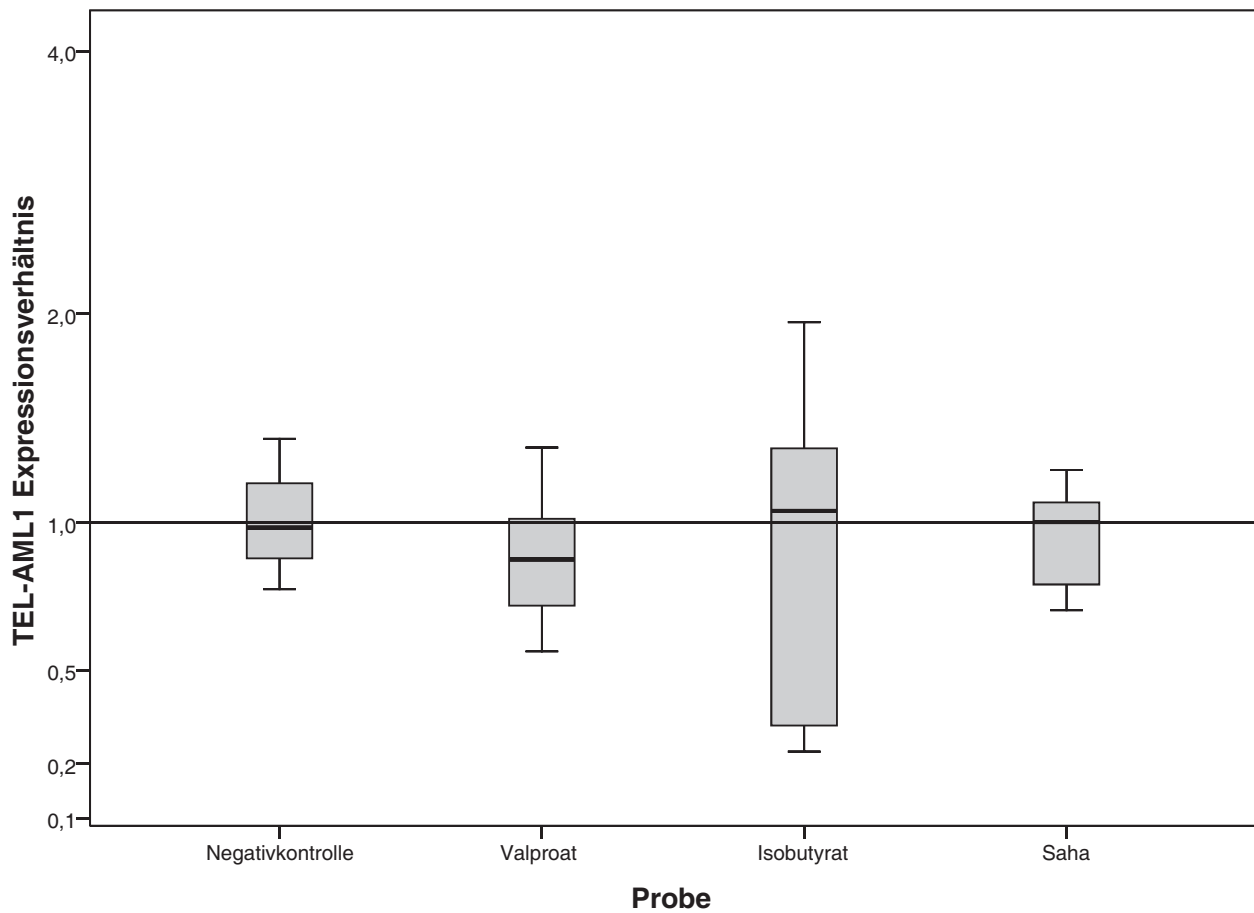
#### 3.3.1.1 PCR-Analyse von behandelten REH

Die *TEL-AML1*-Expression HdI-behandelter und unbehandelter Zellen der Zelllinie REH wurde durch RTq-PCR verglichen und relativ zueinander quantifiziert.

Die relativen Expressionsverhältnisse der Proben sind in Form von Boxplots und einer Tabelle in Abbildung 3.9 zusammengefasst. Für die Valproat-Kondition liegt das arithmetische Mittel der Einzelwerte bei 0,89 ( $\pm 0,23$ ). Durch den *Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation* Algorithmus berechnet sich eine relative Expression von 0,85 mit einem  $p$ -Wert von 0,66. Für die Isobutyrat-Kondition liegt das arithmetische Mittel der Einzelwerte bei 0,92 ( $\pm 0,53$ ). Die berechnete relative *TEL-AML1*-Expression beträgt 0,83 mit einem  $p$ -Wert von 0,36. Der Mittelwert der Saha Kondition liegt bei 9,96 ( $\pm 0,18$ ). Die relative Genexpression berechnet sich auf 0,97 mit einem  $p$ -Wert von 0,90.



Damit sind die Irrtumswahrscheinlichkeiten der Probenkonditionen ( $p = 0,99-0,66$ ) höher als das Signifikanzniveau ( $\alpha = 0,05$ ). Ein Unterschied in der *TEL-AML1* Genexpression in REH-Zellen nach der Behandlung mit den HDI Valproat, Isobutyrat oder Saha konnte somit statistisch nicht nachgewiesen werden. Die HDI Valproat, Isobutyrat und Saha hatten keinen signifikanten Einfluss auf die *TEL-AML1*-Expression.



<i>TEL-AML1</i> -Expression leukämischer dendritischer Zellen					
Probe	Expressions- verhältnis	<i>p</i> -Wert	Mittelwert	Standard- abweichung	N
Negativkontrolle			1,03	0,30	12-15
Valproat	0,85	0,66	0,89	0,23	18
Isobutytrat	0,83	0,36	0,92	0,53	20
Saha	0,97	0,90	0,96	0,18	18

**Abbildung 3.9** – Relative *TEL-AML1*-Expression nach DC-induzierender Behandlung mit HdI. Die Einzeldaten der Probenbedingungen sind in Boxplots zusammengefasst, die mathematische Statistik ist in Form einer Tabelle dargestellt. Unterschiede in der Genexpression nach HdI-Behandlung konnten nicht nachgewiesen werden. N: Anzahl der Einzelmessungen.

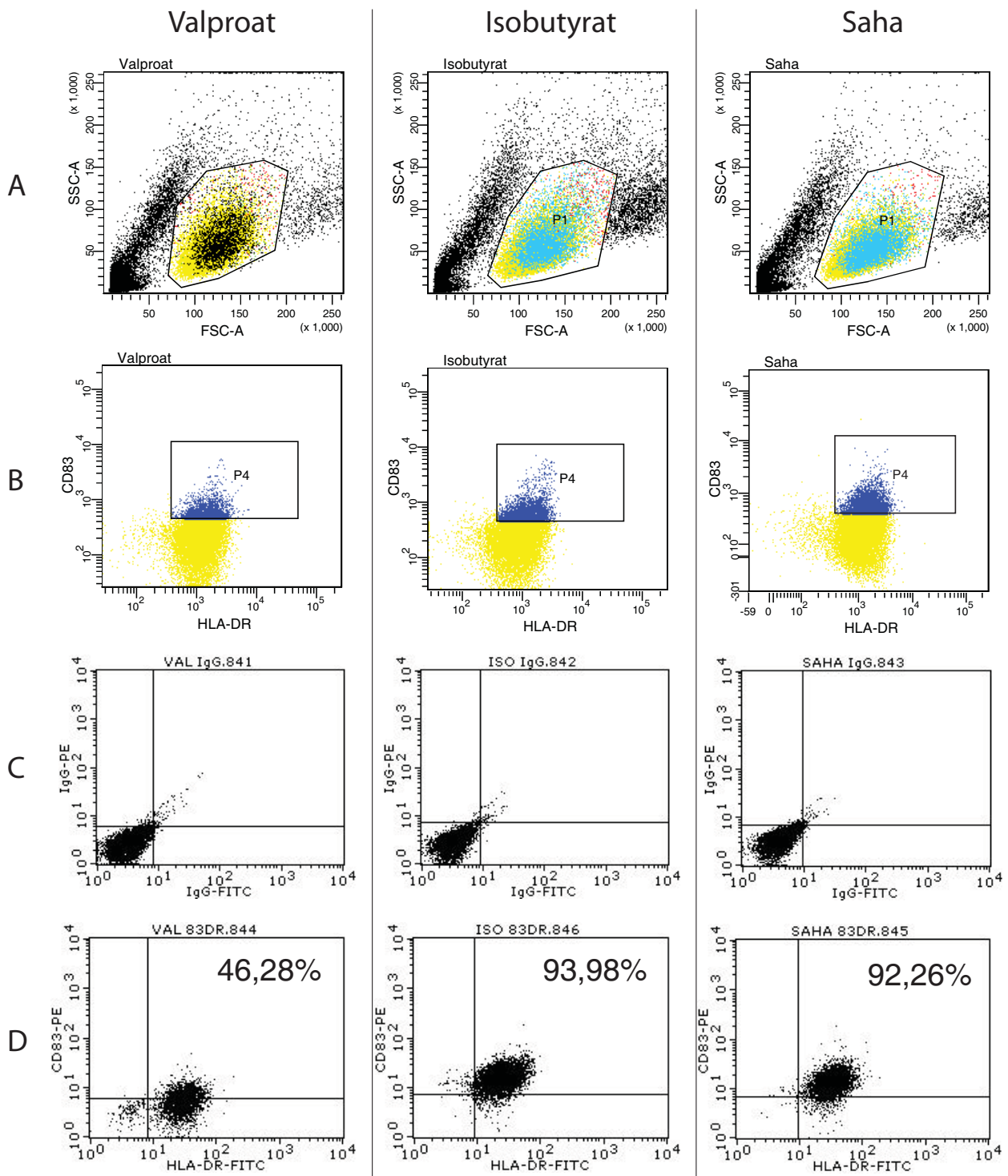
### 3.3.1.2 PCR-Analyse von sortierten leukämischen dendritischen Zellen

Im vorangegangenen Abschnitt wurden *TEL-AML1*-Expressionsanalysen zwischen HdI-behandelten und unbehandelten Zellen der Zelllinie REH vorgestellt. In den Experimenten blieb jedoch unberücksichtigt, dass nur ein Teil der leukämischen Zellen durch die Behandlung in dendritische Zellen differenziert (Kapitel 3.1.1). Die Zellpopulation der dendritischen Zellen wurde daher in weiteren Experimenten selektiv untersucht, da sie bei der Induktion einer spezifischen Immunreaktion von besonderer Relevanz ist.

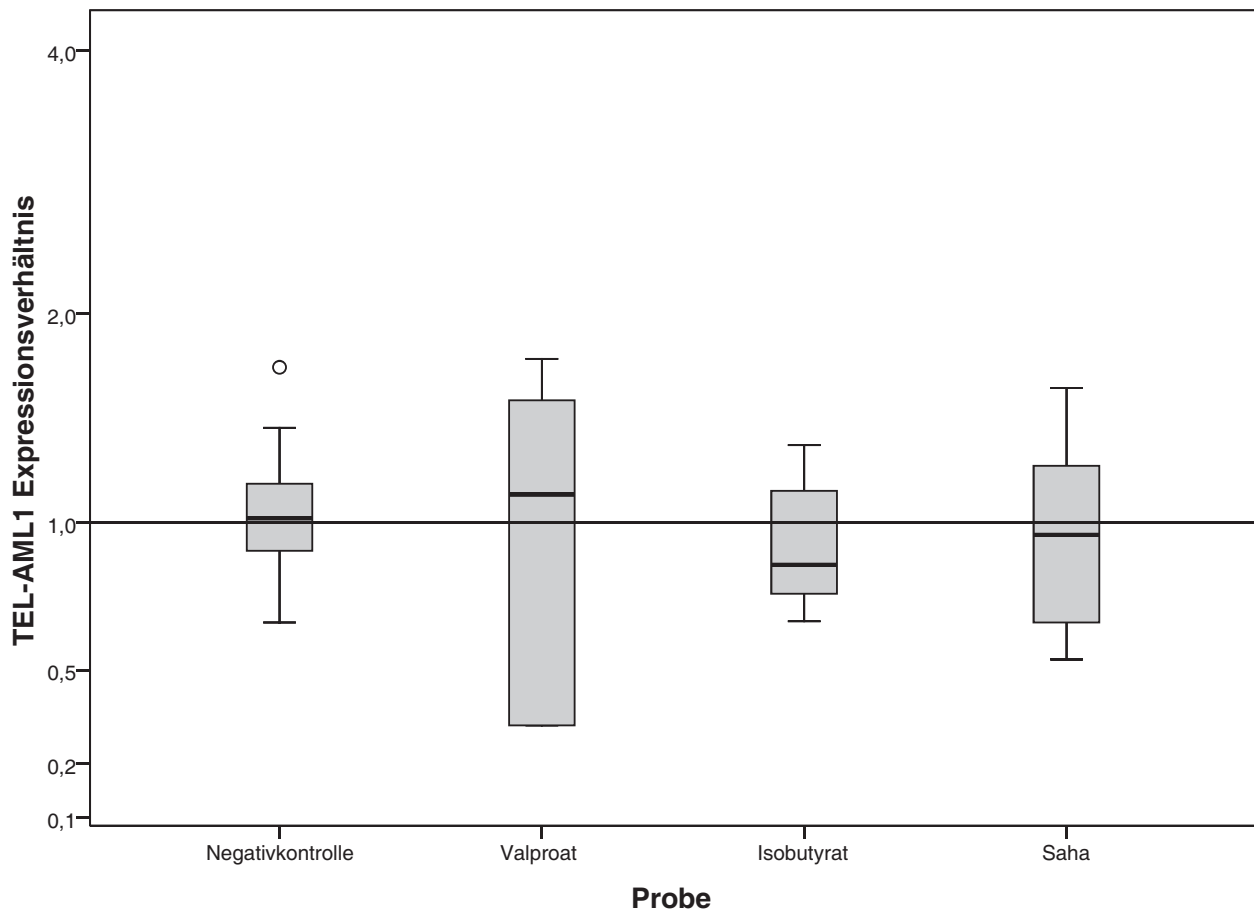
Um die Subpopulation der leukämischen dendritischen Zellen selektiv zu analysieren, wurden die Zellen nach der Behandlung (siehe Kapitel 3.3.1.1) durchflusszytometrisch sortiert. Dazu wurden die Zellen mit den farbstoffmarkierten Antikörpern Anti-HLA-DR (FITC) und Anti-CD83 (PE) markiert, und anschließend am fünften Tag am Durchflusszytometer FACSAria sortiert. Die Sortiervorgaben der Proben sind in Abbildung 3.10 dargestellt (Zeile A und B). Die immunphänotypische Reinheit der Proben wurde durchflusszytometrisch am FACScan reevaluiert, wobei Reinheiten von über 90% dokumentiert werden konnten. Die durch Valproat vorbehandelten Zellen waren nach dem Rücktransport der Proben und der erneuten Probenaufarbeitung (u.a. Zentrifugation, Resuspension und Inkubation) mehrheitlich avital, weswegen eine präzise FACS-Messung wiederholt misslang. Im Anschluss an die Zellsortierung wurden Veränderungen der relativen *TEL-AML1*-Expression in gesorteten, leukämischen dendritischen Zellen durch die RTq-PCR analysiert. Der Versuch wurde zweimal durchgeführt, die Probenmessung erfolgte in Triplikaten oder Quadruplikaten.

Die relativen Einzelexpressionen der sortierten Proben sind in Abbildung 3.11 dargestellt. Das arithmetische Mittel der sortierten Valproat-Proben liegt bei 0,99 ( $\pm 0,64$ ). Die Expressionsverhältnisse wurden nach dem *Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation* Algorithmus berechnet, und beträgt für die Valproat-Proben 1,00 ( $p = 0,99$ ). Der Mittelwert der sortierten Isobutytrat-Proben liegt bei 0,92 ( $\pm 0,24$ ), wobei das relative Expressionsverhältnis 0,90 beträgt ( $p = 0,49$ ). Für die sortierten Saha Proben liegt der Mittelwert bei 1,00 ( $\pm 0,39$ ). Das relative Expressionsverhältnis beläuft sich auf 0,93, mit einem  $p$ -Wert von 0,71.

Die relative *TEL-AML1*-Expression der sortierten Proben erreicht mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $p = 0,49-0,99$  nicht das Signifikanzniveau  $\alpha$ . Eine Veränderung der relativen *TEL-AML1*-Genexpression in gesorteten, leukämischen dendritischen Zellen der Zelllinie REH konnte nicht festgestellt werden.



**Abbildung 3.10** – Zellsortierung, 1. Versuchsdurchgang (Tag 5). Zeile A: Die Vorwärts- und Seitwärts-Streuung der Probenkonditionen ist in Form von Dotplots (Punktauftragungen) dargestellt. Durch ein polygonales Feld wird jeweils der Bereiche eingegrenzt, der im Rahmen der Sortierung positiv selektiert wird. Zeile B: Die Fluoreszenzintensitäten von Anti-HLA-DR (FITC) und Anti-CD83 (PE) sind gegeneinander aufgetragen. Ein Rechteck begrenzt die Zellfraktion, die durch die Sortierung isoliert werden soll. Zeile C und D: Reevaluierung der sortierten Proben. In Zeile C ist die Isotypenkontrolle dargestellt, in Zeile D die Frequenz HLA-DR/CD83 positiver Zellen nach Sortierung. FSC: Vorwärts-Streuung (forward scatter); SSC: Seitwärts-Streuung (side scatter).



<i>TEL-AML1</i> -Expression sortierter DC					
Probe	Expressions- verhältnis	<i>p</i> -Wert	Mittelwert	Standard- abweichung	N
Negativkontrolle			1,05	0,34	9
Valproat	1,00	0,99	0,99	0,64	7
Isobutytrat	0,90	0,49	0,92	0,24	8
Saha	0,93	0,71	1,00	0,39	8

**Abbildung 3.11** – Relative *TEL-AML1*-Expression immunphänotypischer dendritischer Zellen, die durch HdI generiert wurden. Die Einzeldaten der Probenbedingungen sind in Boxplots zusammengefasst, die mathematische Statistik ist in Form einer Tabelle dargestellt. Unterschiede in der Genexpression nach HdI-Behandlung konnten nicht nachgewiesen werden. Der Kreis (o) symbolisiert einen Ausreißer mit einem Werte über dem 1,5-fachen Interquartilabstand des dazugehörigen Boxplots. N: Anzahl der Einzelmessungen.

### 3.3.1.3 PCR-Analyse von Patientenzellen

Im Rahmen der Berlin-Frankfurt-Münster(BFM)-Studiengruppe wurden die Knochenmarkbiopsien von 136 Kindern mit diagnostizierter ALL aufbereitet (Schmidt et al., 2009). Für jeden Patienten lag eine schriftliche Einwilligungserklärung der Erziehungsberechtigten vor. In 26 der 136 Zellproben (19,12%) konnte die Translokation t(12;21) und die Expression des Fusionsgens *TEL-AML1* durch eine Real-Time quantitative PCR (RTq-PCR) nachgewiesen werden. Da eine Probe aufgrund bakterieller Verunreinigung ausgeschlossen werden musste, standen insgesamt 25 *TEL-AML1*-positive Patientenproben zur experimentellen Analyse zur Verfügung.

Sechs der 25 Patientenproben wiesen eine ausreichende Zellzahl auf, um zu untersuchen, ob durch die Behandlung mit dem Histondeacetylase-Inhibitor (HdI) Valproat die *TEL-AML1*-Expression in leukämischen Patientenzellen verändert wird. Wir wählten Valproat als HdI, da in den vorherigen FACS-Experimenten gezeigt werden konnte, dass Valproat die Generierung von dendritische Zelle signifikant begünstigt. Daneben ist Valproat bereits als Arzneistoff für die Behandlung von Epilepsien am Menschen zugelassen, weswegen für Valproat das Nebenwirkungsprofil gut charakterisiert ist.

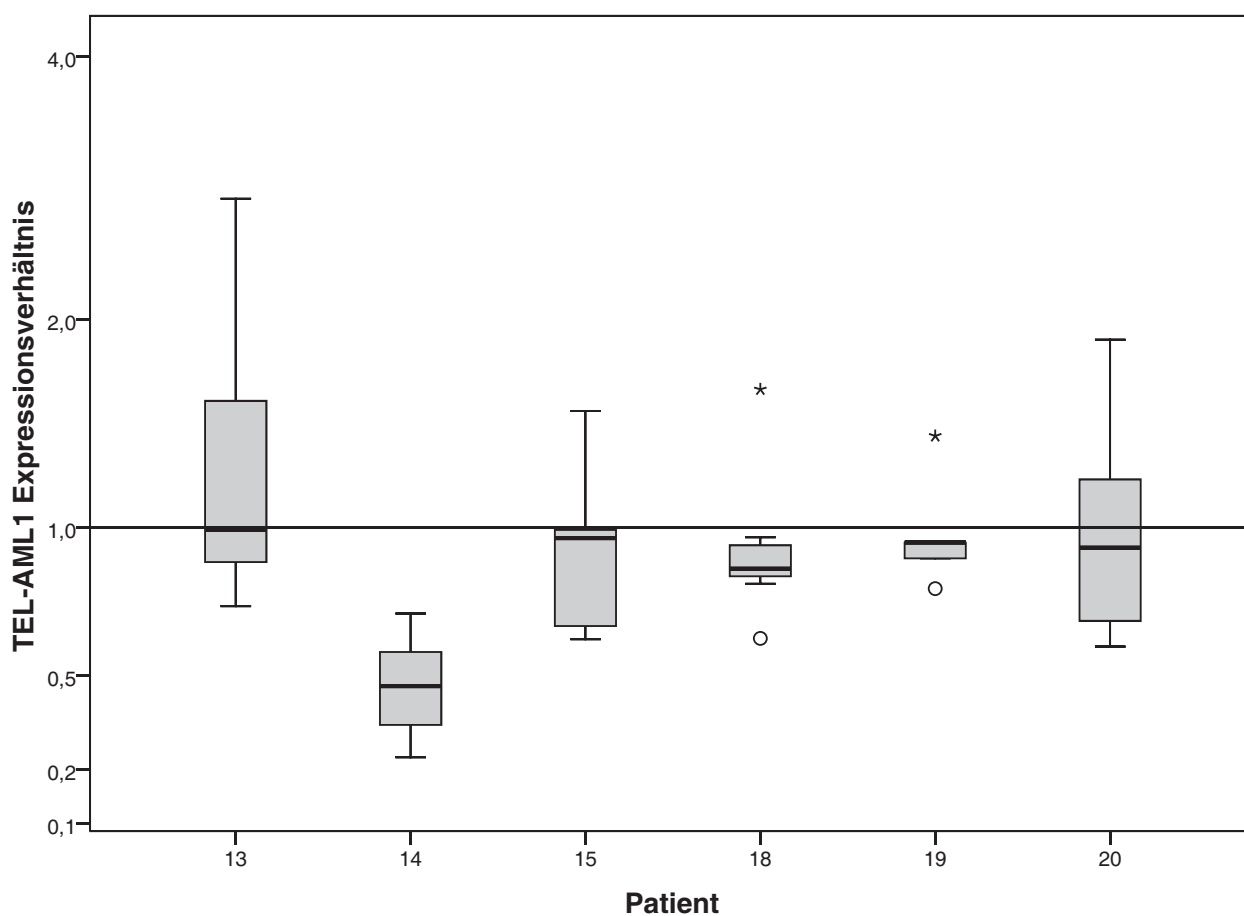
Die sechs untersuchten Patienten waren Kinder im Alter zwischen einem und acht Jahren, die sich zum Zeitpunkt der Probengewinnung im Stadium der Erstdiagnose oder im Stadium des ersten Rezidivs befanden. Die von diesen Kindern kultivierten leukämischen Zellen zeigten nach der DC-induzierenden Behandlung eine gute oder sehr gute DC-typische Morphologie mit erhöhtem Zytoplasmagehalt und dendritischen Fortsätzen. Bei vier der sechs Proben wurde ein ausgeprägtes immunphänotypisches DC-Profil nachgewiesen. Die Charakterisierung der einzelnen Proben ist in Tabelle 3.4 zusammengefasst.

Charakterisierung der <i>TEL-AML1</i> -positiven Patientenproben								
Nr.	Initialen	Alter	Geschlecht	Stadium	Blasten- anteil (%)	Vorregime	DC- Morpho.	DC- Phäno.
13	GB	3	M	Erstdiagnose	86	n.v.	(+)	+
14	KK	8	M	Erstdiagnose	82	n.v.	+	+
15	BL	6	W	Erstdiagnose	99	n.v.	+	+
18	KT	1	M	Erstdiagnose	95	n.v.	+	n.t.
19	HM	7	M	1. Rezidiv	97	COALL	+	+
20	KL	8	W	1. Rezidiv	75	COALL	+	n.t.

**Tabelle 3.4** – Charakterisierung der Patientenproben. Bei allen Patienten wurde eine common-B-ALL diagnostiziert. Morpho.: Morphologie, Phäno: Phänotyp, n.v.: nicht vorhanden, n.t.: nicht typisiert, COALL: multizentrische pädiatrische ALL-Therapiestudie, Nr: interne Probennummer.

Die *TEL-AML1*-Expression von behandelten und unbehandelten leukämischen Patientenproben wurden durch RTq-PCR verglichen. Auf einer 6-Well-Zellkulturplatte wurden  $0,5-1 \times 10^6$  Zellen in 2 ml StemSpan-Medium mit 5% Humanserum und dem Zytokincocktail TGKFI3I4 (Tabelle 2.7b) eingesetzt. Für jeden Patienten wurde eine Zellprobe mit 256 nM Valproat versetzt und parallel eine Negativkontrolle ohne HdI kultiviert. Nach 5 Tagen wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert und die relative *TEL-AML1*-Expression quantifiziert. Für jede Probe wurde der Versuch zwei- oder dreimal durchgeführt. Die Messung erfolgte in Triplikaten oder Quadruplikaten.

Bei fünf der sechs Patientenproben wurde die *TEL-AML1*-Expression durch Valproat nicht signifikant verändert ( $p > 0,7 < 0,99$ ) und entsprach somit der Expression in undifferenzierten Zellproben. Bei einer Probe (Nr. 14) führte die Kultivierung mit Valproat zu einer Herunterregulation von *TEL-AML1* um den Faktor -2,128 auf  $0,47 \pm 0,21$  ( $p = 0,01$ ).



TEL-AML1-Expression Patienten					
Patient Nr.	Expressionsverhältnis	p-Wert	Mittelwert	Standardabweichung	N
13	1,19	0,73	1,30	0,68	9
14	0,47	0,01	0,49	0,14	9
15	0,87	0,89	0,91	0,32	7
18	0,90	0,70	0,94	0,32	7
19	0,97	0,76	0,99	0,24	5
20	0,95	0,99	1,03	0,47	9

**Abbildung 3.12** – Relative *TEL-AML1*-Expression von Valproat behandelten leukämischen Patientenzellen. Die Einzeldaten sind in Boxplots zusammengefasst, die mathematische Statistik ist in Form einer Tabelle dargestellt. In Probe Nr. 14 ist *TEL-AML1* um den Faktor -2,128 auf 0,47 herunterreguliert. Die anderen Proben zeigen keine signifikanten Veränderungen der *TEL-AML1*-Expression. Durch Kreise und Sternchen werden Ausreißer dargestellt, wobei die Werte über dem 1,5-fachen (o) bzw. 3-fachen (\*) Interquartilabstand des jeweiligen Boxplots liegen. N: Anzahl der Einzelmessungen.



### 3.3.2 *TEL-AML1*-Expression auf Proteinebene

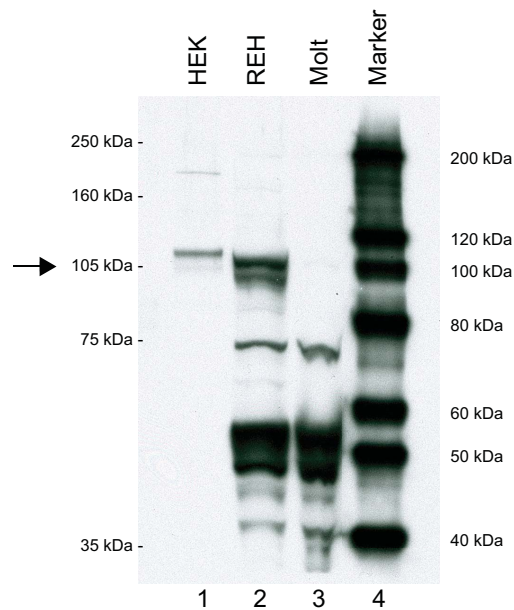
Um die *TEL-AML1*-Expression behandelter und unbehandelter Zellen der Zelllinie REH auf Proteinebene zu analysieren, wurde das *TEL-AML1*-Fusionsprotein für verschiedene Probenkonditionen im Western Blot analysiert. Die Darstellung des *TEL-AML1*-Fusionsproteins erfolgte durch Antisera gegen *AML1*-RHD und gegen N-*TEL*. Die Prinzipien des *TEL-AML1*-Nachweises auf Proteinebene wurden bereits in Kapitel 2.6.4 dargelegt.

Wie aus Abbildung 3.13a zu entnehmen ist, reagiert Anti-*AML1*-RHD in der REH-Probe deutlich mit zwei bis drei Proteinbanden im Bereich von 95-105 kDa (zweite Spur, Pfeil). Bei der *TEL-AML1*-negativen Zelllinie Molt kommt dieses Bandenmuster nicht zur Darstellung (dritte Spur). Dies legt nahe, dass es sich bei den Banden im Bereich von 100 kDa um die *TEL-AML1*-Fusionsproteine handelt.

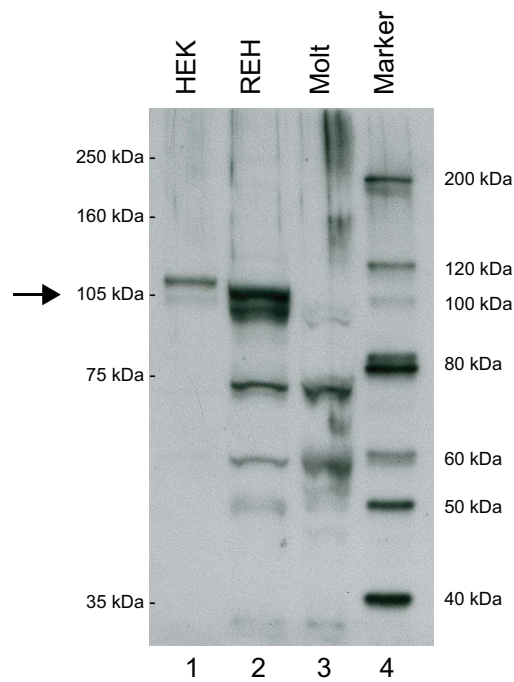
Da jedoch aberrante *AML1*-Varianten und unspezifische Bindungen nicht gänzlich ausgeschlossen werden konnten, wurden die Proben zusätzlich mit N-*TEL* Antiserum behandelt. Wie Abbildung 3.13b zu entnehmen ist, bindet Anti-N-*TEL* in der REH-Probe analog zu Anti-*AML1*-RHD Proteine im Bereich zwischen 95 und 105 kDa (Pfeil). Diese Banden konnten wiederum nicht in t(12;21)-negativen Zellen nachgewiesen werden (dritte Spur).

Das Bandenmuster beider Antikörper entspricht darüber hinaus im Bereich von 100 kDa dem Bandenmuster *TEL-AML1* transfizierter HEK-Zellen (Abbildung 3.13, erste Spur), sodass es sich in Zusammenschau mit sehr großer Wahrscheinlichkeit um das *TEL-AML1*-Fusionsprotein handelt. Die Daten entsprechen den Ergebnissen von Agape et al. (1997) und Poirel et al. (1998), die REH-Zellen spezifisch zwei Banden bei 95 und 105 kDa bzw. drei Banden bei 90, 96 und 106 kDa nachweisen konnten. Das mehrere Banden im Bereich von 100 kDa zur Darstellung kommen ist dem Umstand zuzuschreiben, dass mindestens zwei Splicevarianten für *TEL-AML1* existieren (Romana et al., 1995a).

Für die ultraschallgestützte Proteinextraktion waren verfahrensbedingt Zellsuspensionsvolumina von mindestens 500 µl von Vorteil. Um eine für den Western Blot ausreichende Konzentration des Gesamtproteinlysats zu erhalten, wurde daher für jede Probenkondition eine Ausgangszellzahl von circa  $5 \times 10^7$  Zellen gewählt. Eine Zellkultur wurde mit dem Zytokincocktail TGK kultiviert, weitere Zellkulturen wurden zusätzlich mit den Hdi Valproat, Isobutytrat oder Saha behandelt. Die REH-Kontrolle wurde weder mit Zytokinen, noch mit Hdi behandelt. Nach einer Woche wurde für jede Probenkondition das *TEL-AML1*-Fusionsprotein im Western Blot dargestellt (Abbildung 3.14).

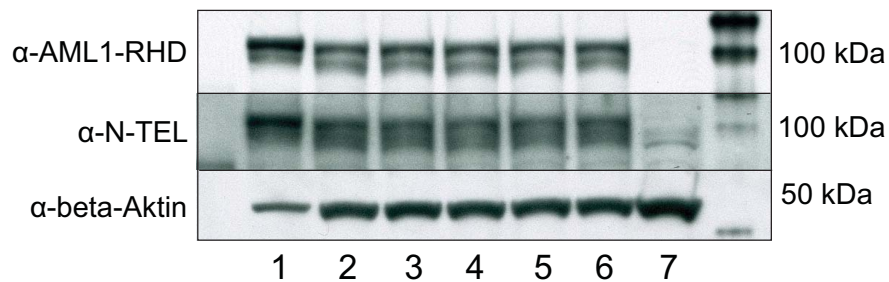


(a) Anti AML1-RHD



(b) Anti N-TEL

**Abbildung 3.13** – Nachweis des TEL-AML1-Fusionsproteins im Western Blot. Abgebildet sind die Bandenprofile nach Anti-AML1-RHD- (a) und Anti-N-TEL-Inkubation (b). Reh-Zellen (Spur 2) und *TEL-AML1*-transfizierte HEK-Zellen (Spur 1) zeigen im Bereich von 100 kDa das TEL-AML1-typische Bandenprofil, das in der *TEL-AML1*-negativen Zelllinie Molt (Spur 3) nicht zur Darstellung kommt. HEK: human embryonic kidney. RHD: RUNT-homologe Domäne.



**Abbildung 3.14** – TEL-AML1-Western Blot. Dargestellt ist der TEL-AML1 relevante Bereich um 100 kDa. 1: *TEL-AML1*-transfizierte HEK-Zellen. 2: REH-Kontrolle. 3: Zytokinkondition TGK (Reh). 4: Valproat 256 nM (Reh). 5: Isobutyrat 256 nM (Reh). 6: Saha 256 nM (Reh). 7: Zelllinie Molt (Negativkontrolle). Die Proteinbeladung wurde durch Beta-Aktin dokumentiert.  $\alpha$ : Antikörper.

Das Anti-TEL-AML1 Bandenprofil ist in allen Probenkonditionen nachweisbar (Abbildung 3.14, Spuren 1-6). Die Proben reagieren deutlich mit zwei Proteinbanden im Bereich von 100 kDa, die sowohl durch den Anti-N-TEL-, als auch durch Anti-AML1-RHD-Antikörper zur Darstellung kommen. Die t(12;21)-negative Kontrolle bleibt in diesem Bereich nahezu signalfrei (Spur 7). Das Bandenmuster ist ebenfalls in *TEL-AML1*-transfizierten HEK-Zellen nachweisbar (Spur 1). Somit konnte das TEL-AML1-Fusionsprotein auch nach der Behandlung mit HdI auf Proteinebene nachgewiesen werden.

## 4 Diskussion

Die chromosomale Translokation t(12;21)(p13;q22) ist die häufigste Translokation bei pädiatrischen Leukämien. Die Gene *TEL* und *AML1* fusionieren zu einem gemeinsamen Fusionsgen, das für den onkogenen Transkriptionsfaktor TEL-AML1 kodiert. Dieser fehlreguliert die Zielgene von AML1, indem er als konstitutiver Repressor wirkt und dadurch in B-Vorläuferzellen zu einer prä-leukämischen Transformation führt (Fischer et al., 2005; Maia et al., 2001). Vermittelt wird die TEL-AML1-abhängige Repression durch die Corepressoren mSin3A, N-CoR und SMRT, die ihrerseits Histondeacetylasen rekrutieren. Histondeacetylasen reprimieren die Transkription, indem Sie durch Histon-Deacetylierungen die Chromatinstruktur verdichten und die Initiation der Transkription verhindern.

Das Fusionsprotein TEL-AML1 ist ein Leukämie-spezifisches Antigen. Zum einen kann der Fusionsbereich über MHC-Moleküle präsentiert werden (Yun et al., 1999), zum anderen besteht aufgrund der veränderten räumlichen Proteinstruktur die Möglichkeit des Vorhandenseins weiterer leukämie-spezifischer Epitope. TEL-AML1 ist somit ein vielversprechendes leukämisches Immunogen, das im Rahmen von Immuntherapien genutzt werden könnte, um eine spezifische, antileukämische Immunreaktion zu induzieren. Eine spezifische zytotoxische T-Zell-Reaktion *in vitro* konnte bereits demonstriert werden (Moldenhauer et al., 2004; Yotnda et al., 1998).

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob dendritische Zellen, die sich von *TEL-AML1*-positiven leukämischen Zellen ableiten, weiterhin das Fusionsprotein TEL-AML1 exprimieren. Erst dann kann TEL-AML1 als Antigen präsentiert werden.

**Histonmodifikationen** Die Genexpression in der Zelle wird durch verschiedene Mechanismen reguliert. Zu diesen Mechanismen gehören die Expression von Transkriptionsfaktoren, Interferenz-RNA (RNAi), DNA-Methylierungen und posttranslationale Histon-Modifikationen. Dabei lässt sich der aktuelle Zustand der Genregulation (*epigenetischer Zustand*) nicht alleine aus dem Genom ableiten. Die Gesamtheit der Histonmodifikationen wird aufgrund der hohen epigenetischen Relevanz auch als *Histon-Code* bezeichnet (Jenuwein und Allis, 2001). Wesentliche Mechanismen der Histonmodifikationen sind Acetylierungen und Deacetylierungen, die durch zwei Enzymgruppen

reguliert werden (Marks et al., 2001). Histon-Acetyl-Transferasen (HAT) auf der einen Seite katalysieren Histon-Acetylierungen, wodurch die Polarität der Histone abnimmt und die Bindung an die DNA abgeschwächt wird. In Folge wird die Chromatinstruktur aufgelockert und die Transkription benachbarter Gensequenzen erleichtert. Histondeacetylasen auf der anderen Seite reprimieren die Transkription, indem sie durch Histon-Deacetylierungen die DNA-Histon-Bindung verstärken. Es kommt zu einer Verdichtung der Chromatinstruktur, so dass die Transkription benachbarter Genabschnitte erschwert wird. Beide Enzymgruppen werden durch verschiedene Kofaktoren in komplexer Weise reguliert.

**Histondeacetylase-Inhibitoren** Histondeacetylase-Inhibitoren (HdI) sind eine Gruppe von Substanzen, die mit Histondeacetylasen interferieren und sie in ihrer Funktion behindern (Minucci und Pelicci, 2006; Marks et al., 2001). Durch die Inhibition der natürlichen Gegenspieler der HAT kommt es zu einer Hyperacetylierung der Histone. Dadurch wird die Chromatinstruktur aufgelockert und die Genexpression begünstigt. Dies kann sowohl eine Zelldifferenzierung als auch eine Apoptose zur Folge haben.

Trichostatin A ist ein Fungizid und HdI (Tsuji et al., 1976; Yoshida et al., 1990). Aufgrund seiner hohen Zyto- und Genotoxizität wird Trichostatin A jedoch nicht klinisch eingesetzt (Olaharski et al., 2006). Für die Generierung *TEL-AML1*-positiver leukämischer DC wurden in dieser Arbeit daher die weniger toxischen HdI Valproat, Isobutyrat und Suberoylanilid-Hydroxamsäure (Saha) verwendet. Sie werden in der Regel gut toleriert und werden auch im Rahmen klinischer Studien eingesetzt (Minucci und Pelicci, 2006).

Valproat ist ein Antikonvulsivum mit gut charakterisiertem Nebenwirkungsprofil. Es ist ein Inhibitor von spannungsabhängigen Natrium- und Kalziumkanälen und darüber hinaus ein HdI (Göttlicher et al., 2001). Isobutyrat wird in mehreren klinischen Studien eingesetzt, besitzt aber zurzeit keine allgemeingültige Arzneimittelzulassung. Saha (Internationaler Freiname: *Vorinostat*) wurde im Jahre 2006 unter dem Markennamen Zolinza für die Behandlung des kutanen T-Zell-Lymphoms zugelassen.

## 4.1 Generierung von dendritischen Zellen

Dendritische Zellen sind die potentesten Antigen-präsentierenden Zellen. Sie vermitteln die adaptive Immunität, indem sie Antigene phagozytieren, prozessieren und den Zellen des adaptiven

Immunsystems in geeigneter Weise präsentieren. Bemerkenswert ist ihre Fähigkeit, zytotoxische T-Zellen direkt aktivieren zu können.

Ein neuartiger Ansatz der Immuntherapie sieht vor, dendritische Zellen direkt aus leukämischen Blasten zu generieren (Choudhury et al., 1998; Smit et al., 1997). Dieser Ansatz erscheint sinnvoll, da leukämische dendritische Zellen die Leukämie-induzierenden genetischen Alterationen bereits in sich tragen (Choudhury et al., 1999; Cignetti et al., 1999). Eine zusätzliche Antigen-Beladung *in vitro* würde dadurch entfallen.

Leukämische Zellen können durch geeignete Stimulation in dendritische Zellen differenziert werden (Choudhury et al., 1998; Smit et al., 1997). Leukämische dendritische Zellen unterscheiden sich gegenüber nativen dendritischen Zellen dahingehend, dass sie Träger der leukämieassoziierten Genmutationen sind (Blair et al., 2001; Choudhury et al., 1999; Cignetti et al., 1999). Leukämische dendritische Zellen könnten daher im Rahmen neuer Therapiestrategien genutzt werden, um leukämieassoziierte Selbst-Antigene zu präsentieren, und um eine antileukämische Immunreaktion zu induzieren. Eine Voraussetzung hierfür ist, dass die leukämischen Antigene immunogen sind. Für verschiedene leukämiespezifische Antigene konnte dies demonstriert werden (Ossenkoppele et al., 2003; Claxton et al., 2001). Auch für die Fusionsregion von TEL-AML1 konnte gezeigt werden, dass durch sie die Proliferation spezifischer TEL-AML1 reaktiver T-Zellen stimuliert wird (Yotnda et al., 1998; Yun et al., 1999). Auch eine TEL-AML1-abhängige zytotoxische Immunreaktion konnte beobachtet werden (Schmidt et al., 2009).

Für die Generierung von leukämischen dendritischen Zellen existieren verschiedene Protokolle (Woiciechowsky et al., 2001; Joshi et al., 2002; Pospíšilová et al., 2002). Die dabei gebräuchlichsten Zytokine sind GM-CSF, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ), Interleukin-4 und CD40-Ligand. In unserer Arbeitsgruppe hat sich für die DC-Generierung aus Zelllinien ein Zytokincocktail aus TNF- $\alpha$ , GM-CSF und KIT-Ligand bewährt (Tabelle 2.7a, Seite 38).

Nach der DC-induzierenden Behandlung haben wir verschiedene Oberflächenmarker durchflusszytometrisch analysiert, um reife dendritischen Zellen anhand ihres immunphänotypischen Profils zu identifizieren und charakterisieren. Die Oberflächenantigene CD83, HLA-DR und CD86 wurden als Marker für reife dendritische Zellen gewertet (Maeda et al., 2000; Banchereau und Steinman, 1998).

Durch die Kultivierung der *TEL-AML1*-positiven Zelllinie REH mit der Zytokinkondition TGK ließen sich dendritische Zellen generieren. Der Anteil CD83/HLA-DR positiver Zellen lag in der Regel zwischen 7-10%. Etwa der gleiche Anteil war auch positiv für den kostimulatorischen Marker CD86. Durch die Addition von Histondeacetylase-Inhibitoren (HDI) konnten der Anteil und die

absolute Zellzahl CD83/HLA-DR positiver Zellen deutlich, nämlich um das Zwei- bis Dreifache, gesteigert werden. Die höchste Zellzahl CD83/HLA-DR und CD86 positiver Zellen wurde in der Regel am siebten Tag erreicht. So konnte bei Valproat (512 nM) eine mittlere CD83+/HLA-DR+ und CD86+/CD80- Expression von ~26 % beobachtet werden. Saha (256 nM) erreichte eine mittlere CD83/HLA-DR Expression von ~19 % und eine CD86 Expression von ~25 %. Dadurch konnten, ausgehend von einer Ausgangszellzahl von  $3 \times 10^5$  Zellen zwischen  $2,5-3 \times 10^5$  leukämische dendritische Zellen generiert werden. Auch waren die leukämischen dendritischen Zellen erst nach der HdI Behandlung in der Lage, TEL-AML1-spezifische zytotoxische T-Zellreaktion zu induzieren (Schmidt et al., 2009).

Die Ursache für den positiven Effekt von HdI auf die Differenzierung zu dendritische Zellen ist nicht abschließend geklärt, es liegt jedoch nahe, dass auch in leukämischen Zellen der Histondeacetylasen-Inhibition eine entscheidende Rolle zukommt. Bekannt ist, dass die TEL-AML1-abhängige Genrepression durch HdI antagonisiert werden kann (Sasaki et al., 2008; Wang und Hiebert, 2001; Chakrabarti und Nucifora, 1999). Die Aufhebung der TEL-AML1-abhängigen Genrepression kann neben der Induktion von Apoptosen auch zu Zelldifferenzierungen führen (Sasaki et al., 2008; Starkova et al., 2007). Interessant ist, dass für einige HdI auch in *TEL-AML1*-negativen Leukämiezellen ein positiver Effekt auf die DC-Generierung nachgewiesen wurde. So konnte für verschiedene *TEL-AML1*-negative AML-Zelllinien gezeigt werden, dass durch die Anwendung von HdI die Bildung von immunphänotypischen dendritischen Zellen verbessert werden konnte (Klisovic et al., 2003). Die Fähigkeit zur Allostimulation scheint jedoch nach HdI Behandlung im Vergleich zu *TEL-AML1*-positiven dendritischen Zellen herabgesetzt zu sein (Schmidt et al., 2009). Eine Erklärung hierfür könnte die Interaktion von HdI mit regulatorischen T-Zellen sein, die ihrerseits die Stimulation zytotoxischer T-Zellen unterdrücken könnten (Reddy und Zou, 2007; Tao et al., 2007). Daneben gibt es Hinweise darauf, dass HdI zu einer antigen-spezifischen Anergie von T-Helferzellen führen könnten (Edens et al., 2006). *TEL-AML1*-positive DC zeigten hingegen nach der Behandlung mit den HdI Valproat, Isobutytrat oder Saha ein gesteigertes allostimulatorisches Potential, mit der eine zytotoxische Zelllyse induziert werden konnte (Schmidt et al., 2009).

## 4.2 Einfluss von Histondeacetylase-Inhibitoren auf die Histon-Acetylierung

Um den Wirkmechanismus der in dieser Arbeit eingesetzten HdI zu untersuchen, wurde die *TEL-AML1*-positive Zelllinie REH mit den HdI Valproat, Isobutytrat oder Saha behandelt und anschließend

die Histon-Acetylierung auf Proteinebene im Western Blot untersucht.

Für verschiedene Histondeacetylase-Inhibitoren (HdI), wie Valproat (Insinga et al., 2005; Göttlicher et al., 2001), Saha (Nimmanapalli et al., 2003), Trichostatin A (Insinga et al., 2005; Moldenhauer et al., 2004), Natriumbutyrat (Maeda et al., 2000) und andere HdI (Klisovic et al., 2003; Fiskus et al., 2008) konnte auf Proteinebene ein Effekt auf die Histon-Acetylierung dargestellt werden. Auch *in vivo* konnte eine HdI induzierte Hyperacetylierung von Histonen demonstriert werden (Insinga et al., 2005; Göttlicher et al., 2001).

Die in dieser Arbeit untersuchten HdI Valproat, Isobutyrat und Saha haben einen Effekt auf die Histon-Acetylierung. Die mit HdI behandelten Zellproben zeigten gegenüber der Negativkontrolle eine Steigerung des Acetylierungsgrads der Histone H3 und H4. Eine HdI-bedingte Hyperacetylierung der Histone scheint damit wahrscheinlich. Erschwert wird die Interpretation der Histon-Acetylierung allerdings durch die relativ ausgeprägte *a priori* Acetylierung der nativen REH-Zellen. Ähnlich hohe basale Acetylierungsgrade konnten auch in Histon-Experimenten mit der Zelllinie K562 demonstriert werden (Nimmanapalli et al., 2003). Einige Arbeitsgruppen nutzen daher die Zelllinien HeLa oder HL-60 als Probenmaterial, die sich offenbar aufgrund der geringeren Histon-Acetylierung besser für den Nachweis von Hyperacetylierungen eignen. Auf diese Zelllinien wurde jedoch bewusst nicht zurückgegriffen, da sie *TEL-AML1* negativ sind und damit bezogen auf die Fragestellungen dieser Arbeit nur von geringer Relevanz sind.

Die Quantifizierung der Histon-Acetylierung für einzelne Proben war nur eingeschränkt möglich, da für die Aufreinigung der Histonproteine ein spezielles Dialyseverfahren angewendet werden musste. Hierbei handelt es sich um eine Säure-Dialyse, bei welcher die basischen Histonproteine aufgereinigt und aufkonzentriert wurden. Dieses Verfahren ist nötig, da die Acetyl-Histon-Antikörper relativ unspezifische Bindungseigenschaften besitzen.

Da bei der Säure-Dialyse die typischen Ladekontroll-Proteine ( $\beta$ -Aktin, GAPDH<sup>1</sup>) mit ausgewaschen werden, hängt ihre Konzentration nicht mehr nur von der Gesamtproteinkonzentration ab, sondern auch von der Qualität der Dialyse (Fiskus et al., 2008). Als Ladekontrolle wurde deshalb neben Beta-Aktin zusätzlich eine unspezifische Protein-Färbung mit Ponceau-S durchgeführt, wodurch eine annähernd gleiche Proteinbeladung dokumentiert werden konnte.

---

<sup>1</sup>Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, ein Enzym der Glykolyse



### 4.3 **TEL-AML1-Expression leukämischer Blasten nach Differenzierung zu dendritischen Zellen**

Untersucht wurde der Einfluss von Histondeacetylase-Inhibitoren (HdI) auf die *TEL-AML1*-Expression. Aufgrund ihres Wirkmechanismus antagonisieren sie die Wirkung von TEL-AML1, wodurch Zellen differenzieren oder apoptotisch werden können. Ob es hierbei auch zu einer Veränderung der *TEL-AML1*-Expression kommt, wurde bisher noch nicht untersucht. Eine direkte Beeinflussung der Promotorregion von *TEL-AML1* durch HdI konnte nicht ausgeschlossen werden.

Um diesen Sachverhalt zu untersuchen, wurden Genexpressionsanalysen mit RTq-PCR und Western-Blot-Experimenten durchgeführt.

#### 4.3.1 **TEL-AML1-Expression leukämischer REH-Zellen nach Differenzierung zu dendritischen Zellen**

Zellen der Zelllinie REH wurden über sieben Tage mit dem Zytokincocktail TGK und jeweils einem HdI behandelt. Anschließend wurden die Proben aufgearbeitet und die Expression von *TEL-AML1* im Rahmen einer RTq-PCR untersucht. Für jedes HdI wurden mindestens sechs Proben in Triplikaten analysiert.

Es konnte im Ergebnis kein Unterschied in der *TEL-AML1*-Genexpression nach der Behandlung mit den HdI Valproat, Isobutyrat oder Saha nachgewiesen werden.

In diesem Experiment wurde jedoch nicht berücksichtigt, dass nur ein Teil der REH-Zellen, nämlich etwa 18-26%, in dendritische Zellen differenziert. Etwa drei Viertel der Zellen weisen nach DC-induzierender Behandlung kein immunphänotypisches DC-Profil auf. Für eine Immuntherapie sind vorrangig leukämische dendritische Zellen von Relevanz, diese sind aber in der Gesamtheit der untersuchten Zellen unterrepräsentiert.

Aus diesem Grund wurde die *TEL-AML1*-Expression in weiteren Experimenten selektiv für die Subpopulation der leukämischen dendritischen Zellen untersucht. Analog zu den vorbeschriebenen Experimenten wurden REH-Zellen mit dem Zytokincocktail TGK und verschiedenen HdI kultiviert. Im Unterschied zu den Vorexperimenten wurden die leukämischen dendritische Zellen jedoch anschließend durchflusszytometrisch sortiert. Die immunphänotypischen dendritischen Zellen wurden selektiert und aufgereinigt, und anschließend im Rahmen einer RTq-PCR untersucht.

Die Ergebnisse dieser Experimente zeigen, dass leukämische dendritische Zellen, die mit der Hilfe von HdI generiert wurden, keine signifikante Veränderung der *TEL-AML1*-Expression aufweisen. Die Unterschiede der relativen *TEL-AML1*-Expression erreichten nicht das Signifikanzniveau. Damit konnte gezeigt werden, dass dendritische Zellen, die sich von *TEL-AML1*-positiven leukämischen Zellen ableiten, weiterhin das Fusionsprotein TEL-AML1 exprimieren. Somit erfüllen die leukämischen dendritischen Zellen eine wesentliche Voraussetzung, um das leukämieassoziierte Antigen TEL-AML1 präsentieren zu können.

### 4.3.2 *TEL-AML1*-Expression leukämischer Patientenblasten nach Differenzierung zu dendritischen Zellen

Für die vorangegangenen Genexpressionsanalysen wurde als Versuchsobjekt die *TEL-AML1*-positive Zelllinie REH genutzt. Zelllinien haben den Vorteil, dass sie *in vitro* leicht zu kultivieren sind und in nahezu unbegrenzter Menge zur Verfügung stehen. Sie sind streng monoklonal und in der Regel zytogenetisch gut charakterisiert. Zelllinien können unter *in vitro* Bedingungen für längere Zeit überleben, leukämische Patientenblasten hingegen überleben die *in vitro* Kulturbedingungen in der Regel nur für kurze Zeit. Hämatopoetische Zelllinien sind daher ein wichtiges Modell, um verschiedene Aspekte der hämatopoetischen Differenzierung und Tumorgenese zu studieren.

Zelllinien sind in der Regel durch unphysiologische Zelleigenschaften an die Zellkulturbedingungen angepasst. Diese einerseits gewünschte Anpassung an *in vitro* Bedingungen führt jedoch dazu, dass Zelllinien nicht mehr alle nativen Zelleigenschaften abbilden. Außerdem fehlt die natürliche Interaktion mit dem übrigen Zellverband. Aus diesen Gründen können die Ergebnisse aus Zelllinien-Experimenten nicht unkritisch auf den Menschen übertragen werden.

Um die externe Validität des Zelllinienmodells zu erhöhen und auf leukämische Patientenzellen auszuweiten, wurden in dieser Arbeit die leukämischen Zellen von Patienten untersucht. Es wurden Knochenmarkbiopsien von insgesamt 136 Kindern mit diagnostizierter ALL aufbereitet, wovon 25 Proben *TEL-AML1* positiv waren und zur experimentellen Analyse zur Verfügung standen. Sechs der 25 Patientenproben hatten eine ausreichende Zellzahl um zu untersuchen, ob die Histondeacetylasen-Inhibition zu einer Veränderung der relativen *TEL-AML1*-Expression führt (Schmidt et al., 2009).

Bei fünf der sechs untersuchten Patientenproben wurde die *TEL-AML1*-Expression durch Histondeacetylasen-Inhibition nicht verändert ( $p > 0,7 < 0,99$ ). Bei einer Patientenprobe führte die Addition des HdI Valproat jedoch zu einer signifikanten Herunterregulation der *TEL-AML1*-Expression,

verglichen mit der alleinigen Zytokinkontrolle. Die *TEL-AML1*-Expression war um den Faktor  $-2,128$  herunterreguliert, die relative Expression von *TEL-AML1* betrug  $0,47$  ( $p = 0,01$ ) gegenüber der Negativkontrolle. Der Grund für die Herunterregulation der *TEL-AML1*-Expression in einer Patientenprobe konnte nicht abschließend geklärt werden. Eine mögliche Erklärung ist, dass es in besagter Patientenprobe durch die Valproat-abhängige Inhibition von Histondeacetylasen und der konsekutiven Histonhyperacetylierung zu einem funktionellen Verlust der *TEL*-Promotoraktivität kam. Über diesen Mechanismus ließe sich die verringerte *TEL-AML1*-Expression gut erklären. Eine direkte Beeinflussung der Promotorregion von *TEL-AML1* durch Valproat kann somit nicht sicher ausgeschlossen werden. Durch strukturelle Unterschiede auf molekularbiologischer Ebene zwischen den einzelnen Patientenproben könnte die abweichende Wirkung von Valproat in lediglich einer Patientenprobe erklärt werden. Die erniedrigte *TEL-AML1*-Expression könnte darüber hinaus auf einen direkten tumortherapeutischen Effekt von Valproat hinweisen. Anhand von Tiermodellen konnte bereits demonstriert werden, dass HdI über die Aktivierung von intrinsischen Apoptose-signalwegen zu einer Tumorregression führen können (Insinga et al., 2005). Möglicherweise kann dieser antitumoröse Effekt durch die Inhibition des *TEL*-Promotors in *TEL-AML1*-positiven Zellen weiter verstärkt werden.

Als Ursache für die erniedrigt gemessene *TEL-AML1*-Expression in Probe Nr. 14 müssen auch experimentelle Fehler diskutiert werden, allerdings ist ein methodisch bedingter Fehler eher unwahrscheinlich, da die Messergebnisse aus insgesamt drei Einzelversuchen gewonnen wurden. Ein systematischer Fehler erscheint aufgrund der Kongruenz der übrigen Messergebnisse ebenfalls unwahrscheinlich.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle sechs untersuchten Patientenproben *TEL-AML1* auch nach der Kultivierung *in vitro* und Histondeacetylasen-Inhibition exprimieren. In fünf der sechs Patientenproben konnte anschließend keine Veränderung der *TEL-AML1*-Expression nachgewiesen werden. Bei einer Patientenprobe führte die Histondeacetylasen-Inhibition jedoch zu einer signifikanten Herunterregulation der *TEL-AML1*-Expression, weswegen eine direkte Beeinflussung des *TEL*-Promotors nicht sicher ausgeschlossen werden kann. In FISH<sup>2</sup>-Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte ebenfalls demonstriert werden, dass die Translokation t(12;21) auch nach der HdI-Behandlung in leukämischen Patientenzellen nachweisbar bleibt.

---

<sup>2</sup>FISH: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

### 4.3.3 *TEL-AML1*-Expression auf Proteinebene

Um die Expression von *TEL-AML1* auch auf Proteinebene darzustellen, wurden Western-Blot-Experimente durchgeführt. Dabei ließ sich das *TEL-AML1* Bandenprofil in allen t(12;21)-positiven Probenkonditionen nachweisen, wobei zwei bis drei *TEL-AML1*-Proteinbanden im Bereich von 95-105 kDa zur Darstellung kamen. Ein identisches Bandenprofil zeigten auch *TEL-AML1*-transfizierte HEK-Zellen. Die t(12;21)-negativen Kontrollen blieben im Bereich um 100 kDa signalfrei. Zwischen behandelten und unbehandelten Probenkonditionen konnten keine relevanten Unterschiede in der *TEL-AML1*-Expression festgestellt werden. Auch nach Histondeacetylasen-Inhibition ließen sich die regulären *TEL-AML1*-Fusionsproteine nachweisen.

Das Auftreten mehrerer *TEL-AML1* Banden deckt sich mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen. So beschreiben Poirel et al. (1998) ebenfalls drei bis fünf *TEL-AML1* Banden im Bereich von 100 kDa. Die wahrscheinliche Ursache für das Auftreten mehrerer Banden ist ein alternatives Spleißen des *TEL-AML1*-Gens. Bei der Translokation t(12;21)(p13;q22) fusioniert das *TEL*-Gen von Chromosom 12 mit dem *AML1*-Gen auf Chromosom 21. Die Bruchstellen liegen im Intron 5 von *TEL* und breit verteilt im Intron 1, selten im Intron 2 von *AML1* (Wiemels und Greaves, 1999; Romana et al., 1995b). Durch Expression des *TEL-AML1*-Fusionsgens entsteht ein Fusionstranskript, bei dem das Exon 5 von *TEL* mit dem Exon 1 oder 2 von *AML1* fusioniert ist (Agape et al., 1997; Romana et al., 1995b). Zusätzlich zu diesem konstitutiven Fusionstranskript sind weitere Spleißvarianten beschrieben, die durch Überspringen (exon-skipping) des Exons 2, oder durch Fusion des Exon 2 von *TEL* mit dem Exon 5 von *AML1* entstehen (Elbers, 2007; Bernard et al., 1996; Romana et al., 1995a).

## 4.4 Kritische Einordnung der Ergebnisse und Ausblick

Leukämien machen in Europa etwa ein Drittel aller malignen pädiatrischen Neoplasien aus. Damit sind sie die häufigsten malignen Erkrankungen im Kindesalter. Etwa 80% der Leukämien sind ALL. Im Zeitraum von 1988 bis 1997 betrug das mittlere 5-Jahres-Überleben von Kindern mit ALL 79%. Für Säuglinge und Jugendliche (15-18 Jahre) war das 5-Jahres-Überleben mit 44% bzw. 49% deutlich schlechter (Coerbergh et al., 2006). In den darauffolgenden Jahren konnte durch Risikostratifizierung und Therapieoptimierungen die Heilungsrate deutlich gesteigert werden. Mit aktuellen Therapieregimen kann bei Kindern und Jugendlichen ein ereignisfreies 5-Jahres-Überleben von etwa 70-80% erreicht werden (Barry et al., 2007; Rubnitz et al., 2008). Das Gesamtüberleben nach 5-Jahren liegt bei etwa 90% und nach 10-Jahren bei knapp unter 90%, wobei der *TEL-AML1*

Status keinen signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben hat (Forestier et al., 2008; Robert Koch-Institut, 2008).

Trotz der stetig verbesserten Therapie versterben über 10% der erkrankten Patienten an den Folgen einer Leukämie. Es werden daher weiterhin große Anstrengungen unternommen, um die vorhandenen Therapieregime zu optimieren und neue Therapiemöglichkeiten zu entwickeln. Zu diesen neuartigen Therapieformen zählen auch die zellulären Immuntherapien und Zellvakzine.

Ein möglicher Ansatz in der Immuntherapie sieht vor, dendritische Zellen direkt aus leukämischen Blasten zu generieren (Choudhury et al., 1998; Smit et al., 1997). Für verschiedene Leukämieformen konnte gezeigt werden, dass leukämische Blasten durch eine gezielte induktive Behandlung *in vitro* in dendritische Zellen differenziert werden können. Leukämische Zellen entsprechen oft frühen Reifungsstufen hämatopoetischer Zellen und können aufgrund ihrer Zelllinienzugehörigkeit und erhaltener Pluripotenz prinzipiell in spätere Reifungsstufen differenzieren. Ein wesentlicher Unterschied zu den körpereigenen nativen dendritischen Zellen besteht darin, dass leukämische dendritische Zellen leukämieassoziierte Genmutationen bereits in sich tragen. Es besteht daher Grund zur Annahme, dass leukämische dendritische Zellen leukämieassoziierte Antigene präsentieren können, ohne dass eine gesonderte Tumorantigen-Beladung *in vitro* vorgenommen werden muss.

Etwa 20% der pädiatrischen ALL tragen die Translokation t(12;21) und das Fusionsgen *TEL-AML1*. Das resultierende Fusionsprotein ist ein leukämiespezifisches Antigen, das über MHC-Moleküle präsentiert werden kann und eine zytotoxische T-Zell-Reaktion induziert (Yun et al., 1999; Yotnda et al., 1998). *TEL-AML1* könnte daher im Rahmen neuartiger Therapien genutzt werden, um eine antileukämische Immunreaktion in *TEL-AML1*-positiven Leukämien zu induzieren (Schmidt et al., 2009).

Mehrere Arbeitsgruppen konnten demonstrieren, dass die *TEL-AML1*-bedingte präleukämische Transformation durch Histondeacetylase-Inhibitoren antagonisierbar ist (Wang und Hiebert, 2001; Chakrabarti und Nucifora, 1999). Dies führt zu einer zunehmenden Zelldifferenzierung und begünstigt die Generierung dendritischer Zellen (Sasaki et al., 2008; Starkova et al., 2007; Schmidt et al., 2009; Moldenhauer et al., 2004).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass dendritische Zellen, die mithilfe von HdI aus *TEL-AML1*-positiven leukämischen Blasten generiert wurden, weiterhin *TEL-AML1* exprimieren. Mit einer Ausnahme zeigten alle untersuchten Proben keine signifikante Veränderung in der Expression von *TEL-AML1*. Unter Berücksichtigung des immunphänotypischen Antigenprofils erfüllen die generierten dendritischen Zellen damit wesentliche Voraussetzungen, um Epitope von *TEL-AML1* zu präsentieren und so eine tumorspezifische Immunreaktion zu induzieren. In Experimenten

unserer Arbeitsgruppe konnte nachgewiesen werden, dass durch *TEL-AML1*-positive leukämische dendritische Zellen eine *TEL-AML1*-spezifische Immunreaktionen ausgelöst werden kann (Schmidt et al., 2009).

Die *TEL-AML1*-Mutation eignet sich insbesondere aufgrund ihrer Häufigkeit als Ziel für Immuntherapien. Als mögliche klinische Anwendung könnten *TEL-AML1*-positiven Leukämiepatienten leukämische Blasten entnommen werden, um aus ihnen *ex vivo* dendritische Zellen zu generieren. Diese Zellen könnten dem Patienten anschließend als dendritische Zellvakzine reinfundiert werden, um *in vivo* eine antileukämische Immunreaktion zu induzieren (Maggio et al., 2007; Steinman und Banchereau, 2007). Immungestützte antileukämische Effekte sind im Rahmen von allogenen Stammzelltransplantationen klinisch etabliert und ihr Nutzen gut dokumentiert.

In den letzten Jahren wurden eine Vielzahl verschiedener Immunvakzinierungsstudien durchgeführt, bei denen Patienten *ex vivo* manipulierte dendritische Zellvakzine zur Tumorthherapie erhalten haben. In einer multizentrischen, doppelverblindeten Phase-III-Studie zur Behandlung des metastasierten Prostatakarzinoms (IMPACT-Studie<sup>3</sup>) konnte gezeigt werden, dass durch die Therapie mit einer spezifischen dendritischen Zellvakzine der primäre Endpunkt Gesamtüberleben signifikant verbessert werden konnte. In der Studie wurden autologe dendritische Zellen mit einem Konjugat aus Prostata-spezifischer alkalischer Phosphatase (PAP) und GM-CSF beladen und den Patienten im Abstand von 2 Wochen in insgesamt 3 Zyklen infundiert. Im Vergleich mit dem Placebo-Arm kam es zu einer Verbesserung des Gesamtüberlebens um 4,1 Monate. Die 3-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit betrug nach der Zellvakzine-Behandlung 31,7% im Vergleich zu 23% für den Placebo-Arm. Die dendritische Zellvakzine wurde von der amerikanischen Arzneimittelzulassungsbehörde FDA<sup>4</sup> als Arzneimittel zur Behandlung des metastasierten Prostatakarzinoms unter dem internationalen Freinamen Sipuleucel-T zugelassen (Higano et al., 2009; Kantoff et al., 2010).

In einer Phase-III-Studie zur Behandlung des malignen Melanoms (AJCC<sup>5</sup> Stadium IV) konnte hingegen keine Überlegenheit einer dendritischen Zellvakzine gegenüber einer Standardchemotherapie festgestellt werden. In der Studie wurden den Patienten Peptid-gepulste dendritische Zelle subkutan injiziert und mit dem etablierten Therapiestandard Dacarbazin verglichen. Primärer Endpunkt der Studie war die objektive Ansprechrates. Nach 98 eingeschlossenen Patienten zeigte der primäre Endpunkt keinen signifikanten Unterschied, woraufhin die Studie vorzeitig abgebrochen wurde. Die studienbegleitende Arbeitsgruppe publizierte abschließend, dass die vom Studiendesign geforderte Vakzinqualität und Zellzahl nicht durchgehend erreicht werden konnte (Schadendorf et al., 2006).

<sup>3</sup>IMPACT: Immunotherapy for Prostate Adeno Carcinoma Treatment

<sup>4</sup>FDA: Food and Drug Administration

<sup>5</sup>AJCC: American Joint Committee on Cancer

In den letzten Jahren wurden auch mehrere klinische Studien zur Anwendung von HdI in der Tumortherapie durchgeführt, nachdem im Tiermodell demonstriert werden konnte, dass HdI eine Tumorregression induzieren können (Marks et al., 2001; Insinga et al., 2005). Bei der Mehrzahl der Studien handelt es sich um klinische Phase-I- oder Phase-II-Studien.

Für das HdI Valproat wurden Ergebnisse mehrerer Phase-I- und Phase-II-Studien im Bereich der Hämatoblastosen, aber auch für solide Tumoren wie beispielsweise das Cervix-Karzinom publiziert (Raffoux et al., 2010; Pilatrino et al., 2005). Valproat ist in der Behandlung von Epilepsieerkrankungen etabliert und weist dort eine gute Verträglichkeit auf. Für einen messbaren Effekt auf die Histon-Deacetylierung sind jedoch deutlich höhere Valproat-Spiegel erforderlich, wodurch die Zahl unerwünschter Nebenwirkungen zunimmt. Es konnte gezeigt werden, dass vor allem die neurologische Toxizität dosislimitierend ist (Minucci und Pelicci, 2006).

In einer Phase-I/II-Studie von Munster et al. wurde der Effekt von Valproat in Kombination mit Epirubicin, 5-Fluoruracil und Cyclophosphamid bei Patienten mit soliden Tumoren untersucht. Eingeschlossen wurden unter anderem Patienten, die an einem malignen Melanom, Mammakarzinom, gastrointestinalen Tumor oder einem kleinzelligen Bronchialkarzinom erkrankt waren. Eine partielle Remission konnte bei 9 von 41 Patienten beobachtet werden (22%). Nebenwirkungen betrafen vor allem eine Valproat-assoziierte Abgeschlagenheit und die Epirubicin-induzierte Myelosuppression. Eine Valproat-induzierte Histonhyperacetylierung konnte durchgehend beobachtet werden (Munster et al., 2009).

Rocca et al. publizierten die Ergebnisse einer Phase-I/II-Studie zur Behandlung des metastasierten malignen Melanoms (AJCC Stadium IV). In der Studie wurde Valproat in Kombination mit der etablierten Chemoimmunotherapie bestehend aus Dacarbazin und Interferon- $\alpha$  verabreicht, wobei die Kombination mit Valproat gegenüber der alleinigen Immunochemotherapie keine Überlegenheit zeigte (Rocca et al., 2009).

In zwei Phase-II-Studien wurde der Effekt von Saha bei Patienten mit vorthera-piertem cutanen T-Zell-Lymphom untersucht. Bei 30% der insgesamt 107 eingeschlossenen Patienten konnten rückläufige Hautläsionen im Sinne einer partiellen Remission beobachtet werden. Häufige Nebenwirkungen der Therapie waren Abgeschlagenheit, Thrombozytopenie, Durchfall und Übelkeit, zu den schwerwiegenden Nebenwirkungen zählten Dehydratation, Thrombozytopenie und thrombembolische Ereignisse (Duvic et al., 2007; Olsen et al., 2007). Aufgrund der positiven Studienergebnisse wurde Saha unter dem internationalen Freinamen Vorinostat im Jahr 2006 für die Behandlung des kutanen T-Zell-Lymphoms zugelassen (Mann et al., 2007).

Schaefer et al. veröffentlichten die Ergebnisse einer Phase-II-Studie zur Behandlung der akuten

myeloischen Leukämie. Insgesamt wurden 37 Patienten, die nicht für eine Standardchemotherapie infrage kamen in die Studie eingeschlossen und mit Saha behandelt. Insgesamt wurde nur ein geringes Therapieansprechen beobachtet und die Therapie wurde häufig vor Erreichen der geplanten 4 Zyklen vorzeitig abgebrochen (Schaefer et al., 2009).

In einer Phase-I-Studie wurden 41 Patienten, die an einer Leukämie oder an einem Myelodysplastischen Syndrom erkrankt waren, eingeschlossen und mit Saha behandelt. Bei 17% der Patienten konnte eine hämatologische Verbesserung dokumentiert werden, bei 4 Patienten kam es zu einer Komplettremission. Eine Hyperacetylierung von Histon-H3-Protein konnte bei allen untersuchten Patienten beobachtet werden. Dosislimitierend waren Übelkeit, Erbrechen, Abgeschlagenheit und Diarrhoe (Garcia-Manero et al., 2008).

Von Kelly et al. wurden die Ergebnisse zu einer Phase-I-Studie zu Saha veröffentlicht. Insgesamt wurden 73 Patienten mit fortgeschrittenen Tumorerkrankungen mit Saha behandelt. Wichtige dosislimitierende Nebenwirkungen in der Behandlung waren Anorexie, Exsikkose, Diarrhoen und Abgeschlagenheit. Im Patientenkollektiv konnten eine Komplettremission und 3 partielle Remission beobachtet werden (Kelly et al., 2005).

Für das HdI Isobutytrat gibt es bisher keine größeren klinischen Anwendungsstudien, jedoch finden sich Phase-I und Phase-II-Studien zu anderen strukturverwandten Butyraten. In einer Phase-II-Studie wurden Patienten, die an einem nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinomen erkrankt waren, mit einem Prodrug der Buttersäure (AN-9<sup>6</sup>) behandelt. Die Therapie zeigte wenig Nebenwirkungen, eine partielle Remission wurde bei 6,4% der Patienten beobachtet (Reid et al., 2004). In einer Phase-I-Studie wurde Natriumphenylbutytrat bei Patienten mit Leukämien und Myelodysplastischem Syndrom erprobt, auch hier wurde die Therapie im Allgemeinen gut vertragen bei insgesamt geringem Therapieansprechen (Minucci und Pelicci, 2006).

Die bisher durchgeführten Studien zeigen, dass sowohl die HdI Valproat, Isobutytrat und Saha, als auch dendritische Zellvakzine insgesamt eine gute klinische Verträglichkeit aufweisen. Aufgrund des oft mangelnden Therapieansprechens und fehlender Überlegenheit gegenüber etablierter Chemotherapien gehören sie jedoch bis auf wenige Ausnahmen bislang noch nicht zum Standardrepertoire der Tumortherapie. Die Gründe für das oft mangelnde Therapieansprechen auf dendritische Zellvakzine sind noch nicht vollständig geklärt und Gegenstand der aktuellen Forschung. Eine wichtige Erklärung für das geringe Therapieansprechen könnte die Interaktion der dendritischen Zellvakzine mit regulatorischen T-Zellen (Tregs) und Typ2-T-Helferzellen *in vivo* sein, die in Folge die erhoffte Stimulation zytotoxischer T-Zellen unterdrücken (Palucka et al., 2011). Experimente deuten darauf

---

<sup>6</sup>AN-9: Pivaloyloxymethylbutytrat



hin, dass in der direkten Tumorumgebung wichtige Interaktionen mit dendritischen Zellen stattfinden, die entscheidend für die Aktivierung eines antitumorösen Effektes sind. Wahrscheinlich spielen hierbei auch direkte immunsuppressive Eigenschaften von Tumoren eine Rolle. Tumorzellen können veränderte Oberflächeneigenschaften aufweisen und immunsuppressive Moleküle exprimieren oder immunsuppressive Faktoren sezernieren. Durch spezifische Tumoreigenschaften könnte somit der tumorsuppressive Effekt von dendritischen Zellen inhibiert werden. Darüber hinaus konnte speziell für HdI demonstriert werden, dass sie *in vivo* die Bildung und Stimulation regulatorischer T-Zellen (Tregs) anregen, die damit einen antitumorösen Effekt inhibieren könnten (Tao et al., 2007; Reddy und Zou, 2007).

Ein weiterer Grund für das geringe Therapieansprechen könnte darin begründet sein, dass durch die Behandlung dendritischer Zellvakzine *ex vivo* das immunstimulatorische Potential gegenüber nativen dendritischer Zellen herabgesetzt wird (Palucka et al., 2007). Dendritische Zellvakzine lassen sich bekanntermaßen auf unterschiedliche Weise herstellen, wobei bislang keine einheitlichen Standards bezüglich der Präparation *ex vivo* existieren. Hierin begründen sich große Unterschiede in der Qualität der dendritischen Zellvakzine in verschiedenen Studien.

Ein Problem in der Anwendung dendritischer Zellvakzine besteht darin, dass die Immunogenität einzelner zur Immunstimulation genutzten Tumorantigene nicht ausreichend belegt ist (Mohty et al., 2001). Tumorantigene unterscheiden sich in ihrem immunogenen Potential, und es scheint, als wären nur einige Tumorantigene geeignet, eine relevante Immunogenität zu vermitteln und eine klinisch relevante Immunreaktion zu induzieren.

Ein mangelndes Therapieansprechen könnte auch in der zytostatischen Vorbehandlung der Studienpatienten begründet sein. Durch die zytostatische Vorbehandlung wird in der Regel auch das körpereigene Immunsystem beeinträchtigt; bis zur vollständigen Rekonstitution des Immunsystems nach Chemotherapie können mehrere Jahre vergehen, weswegen aktive Immunisierungen in ihrer Wirkung abgeschwächt werden könnten.

Trotz aller Probleme und Hindernisse nimmt der klinische Stellenwert dendritischer Zellvakzine stetig zu. Eine erste dendritische Zellvakzine wurde von der amerikanischen Arzneimittelzulassungsbehörde FDA zugelassen und ist seither für die Behandlung des metastasierten Prostatakarzinoms kommerziell verfügbar. Der langfristige Stellenwert dendritischer Zellvakzinen bleibt abzuwarten, insbesondere da sie sich auch gegen andere, teils neuartigen Tumorthérapien beweisen müssen. Es besteht jedoch begründete Hoffnung, dass weitere dendritische Zellvakzine den Weg in Tumorthérapie finden. Die aktuellen Studien stimmen zuversichtlich, dass Sie für Patienten von Nutzen sein können und ihren festen Platz in der Tumorthérapie finden werden.

# Zusammenfassung

Das Fusiononkoprotein TEL-AML1 entsteht durch die chromosomale Translokation t(12;21)(p13;q22) und ist bei etwa 20% der akuten lymphoblastischen Leukämien (ALL) im Kindesalter nachweisbar. Eine vielversprechende Therapieoption in der Behandlung der *TEL-AML1*-positiven Leukämie ist die Induktion einer gegen TEL-AML1 gerichteten Immunreaktion mithilfe dendritischer Zellen. Ein neuartiger Ansatz in der Immuntherapie sieht vor, dendritische Zellen direkt aus leukämischen Blasten zu generieren.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, aus *TEL-AML1*-positiven Leukämiezellen dendritische Zellen zu generieren. Dies gelang durch die Verwendung von Histondeacetylase-Inhibitoren (HdI). Die dendritischen Zellen könnten im Rahmen von aktiven Immunvaksinierungen eingesetzt werden, um eine spezifische, antileukämische Immunreaktion zu induzieren.

Um den Effekt verschiedener HdI auf die Generierung leukämischer dendritischer Zellen zu untersuchen, wurden *TEL-AML1*-positive Leukämiezellen mit Zytokinen und den HdI Valproat, Isobutytrat oder Saha behandelt und anschließend durchflusszytometrisch immunphänotypisiert. Es konnte gezeigt werden, dass durch Addition von Histondeacetylase-Inhibitoren dendritische Zellen generiert werden können. Gegenüber der reinen Zytokinbehandlung konnte durch die Addition von HdI eine bis zu 2,6-fache Zahl dendritischer Zellen generiert werden.

Um den Einfluss der HdI-Behandlung auf die *TEL-AML1*-Expression zu analysieren, wurden mithilfe Real-Time quantitativer PCR (RTq-PCR) und Western Blot *TEL-AML1*-Genexpressionsanalysen durchgeführt. In den generierten dendritischen Zellen konnte die Persistenz des *TEL-AML1*-Fusionsproteins nachgewiesen werden. Im Zelllinienmodell und in fünf von sechs untersuchten Patientenproben kam es nach der Behandlung mit HdI *in vitro* zu keiner signifikanten Veränderung der *TEL-AML1*-Expression. Bei einer Patientenprobe war nach der Behandlung mit Valproat die *TEL-AML1*-Expression auf  $0,47 \pm 0,21$  herunterreguliert ( $p = 0,01$ ), möglicherweise infolge eines funktionellen Verlusts der *TEL*-Promotoraktivität durch Histonhyperacetylierung.

Die *ex vivo* generierten dendritischen Zellen erfüllen damit wesentliche Voraussetzungen, um eine *TEL-AML1*-spezifische antileukämische Immunreaktion *in vivo* zu induzieren. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um ihren klinischen Nutzen in der Behandlung der *TEL-AML1*-positiven Leukämie unter Beweis zu stellen.

# Literaturverzeichnis

- Agape P, Gerard B, Cave H, et al. Analysis of ETV6 and ETV6-AML1 proteins in acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*, 98(1):234–239, 1997.
- Aronson BD, Fisher AL, Blechman K, Caudy M, Gergen JP. Groucho-dependent and -independent repression activities of Runt domain proteins. *Mol Cell Biol*, 17(9):5581–5587, 1997.
- Banchereau J, Paczesny S, Blanco P, et al. Dendritic cells: controllers of the immune system and a new promise for immunotherapy. *Ann N Y Acad Sci*, 987:180–187, 2003.
- Banchereau J, Pulendran B, Steinman R, Palucka K. Will the making of plasmacytoid dendritic cells in vitro help unravel their mysteries? *J Exp Med*, 192(12):F39–F44, 2000.
- Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392(6673):245–252, 1998.
- Barry E, DeAngelo DJ, Neuberg D, et al. Favorable outcome for adolescents with acute lymphoblastic leukemia treated on Dana-Farber Cancer Institute Acute Lymphoblastic Leukemia Consortium Protocols. *J Clin Oncol*, 25(7):813–819, 2007.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol*, 33(4):451–458, 1976.
- Bernard OA, Romana SP, Poirel H, Berger R. Molecular cytogenetics of t(12;21) (p13;q22). *Leuk Lymphoma*, 23(5-6):459–465, 1996.
- Blair A, Rowbottom AW, Browne SJ, et al. An optimised biphasic culture system for the generation of functional dendritic cells from patients with acute lymphoblastic leukaemia at presentation and in clinical remission. *Leukemia*, 15(10):1596–1603, 2001.
- Béné MC, Castoldi G, Knapp W, et al. Proposals for the immunological classification of acute leukaemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia*, 9(10):1783–1786, 1995.

- Borgmann A, Zinn C, Hartmann R, et al. Secondary malignant neoplasms after intensive treatment of relapsed acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Eur J Cancer*, 44(2):257–268, 2008.
- Boulukos KE, Pognonec P, Rabault B, Begue A, Ghysdael J. Definition of an Ets1 protein domain required for nuclear localization in cells and DNA-binding activity in vitro. *Mol Cell Biol*, 9(12):5718–5721, 1989.
- Boyle WJ, Lipsick JS, Baluda MA. Antibodies to the evolutionarily conserved amino-terminal region of the v-myb-encoded protein detect the c-myb protein in widely divergent metazoan species. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(13):4685–4689, 1986.
- Carroll M, Tomasson MH, Barker GF, Golub TR, Gilliland DG. The TEL/platelet-derived growth factor beta receptor (PDGF beta R) fusion in chronic myelomonocytic leukemia is a transforming protein that self-associates and activates PDGF beta R kinase-dependent signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(25):14845–14850, 1996.
- Chakrabarti SR, Nucifora G. The leukemia-associated gene TEL encodes a transcription repressor which associates with SMRT and mSin3A. *Biochem Biophys Res Commun*, 264(3):871–877, 1999.
- Chakrabarti SR, Sood R, Ganguly S, Bohlander S, Shen Z, Nucifora G. Modulation of TEL transcription activity by interaction with the ubiquitin-conjugating enzyme UBC9. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(13):7467–7472, 1999.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162(1):156–159, 1987.
- Choudhury A, Toubert A, Sutaria S, Charron D, Champlin RE, Claxton DF. Human leukemia-derived dendritic cells: ex-vivo development of specific antileukemic cytotoxicity. *Crit Rev Immunol*, 18(1-2):121–131, 1998.
- Choudhury BA, Liang JC, Thomas EK, et al. Dendritic cells derived in vitro from acute myelogenous leukemia cells stimulate autologous, antileukemic T-cell responses. *Blood*, 93(3):780–786, 1999.
- Cignetti A, Bryant E, Allione B, Vitale A, Foa R, Cheever MA. CD34(+) acute myeloid and lymphoid leukemic blasts can be induced to differentiate into dendritic cells. *Blood*, 94(6):2048–2055, 1999.
- Claxton DF, McMannis J, Champlin R, Choudhury A. Therapeutic potential of leukemia-derived dendritic cells: preclinical and clinical progress. *Crit Rev Immunol*, 21(1-3):147–155, 2001.
- Cockerill PN, Osborne CS, Bert AG, Grotto RJ. Regulation of GM-CSF gene transcription by core-binding factor. *Cell Growth Differ*, 7(7):917–922, 1996.

- Coebergh JWW, Reedijk AMJ, de Vries E, et al. Leukaemia incidence and survival in children and adolescents in Europe during 1978-1997. Report from the Automated Childhood Cancer Information System project. *Eur J Cancer*, 42(13):2019–2036, 2006.
- Duvic M, Talpur R, Ni X, et al. Phase 2 trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) for refractory cutaneous T-cell lymphoma (CTCL). *Blood*, 109(1):31–39, 2007.
- Edens RE, Dagtas S, Gilbert KM. Histone deacetylase inhibitors induce antigen specific anergy in lymphocytes: a comparative study. *Int Immunopharmacol*, 6(11):1673–1681, 2006.
- Eguchi-Ishimae M, Eguchi M, Ishii E, et al. Breakage and fusion of the TEL (ETV6) gene in immature B lymphocytes induced by apoptogenic signals. *Blood*, 97(3):737–743, 2001.
- Elbers S. *TEL-AML1 - Spleißvarianten und sequentielle Untersuchung zum Therapieansprechen von TEL-AML1 positiven ALL-Rezidiven im Kindesalter*. Dissertation, Medizinische Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin, 2007.
- Erickson P, Gao J, Chang KS, et al. Identification of breakpoints in t(8;21) acute myelogenous leukemia and isolation of a fusion transcript, AML1/ETO, with similarity to Drosophila segmentation gene, runt. *Blood*, 80(7):1825–1831, 1992.
- Erman B, Cortes M, Nikolajczyk BS, Speck NA, Sen R. ETS-core binding factor: a common composite motif in antigen receptor gene enhancers. *Mol Cell Biol*, 18(3):1322–1330, 1998.
- Fenrick R, Amann JM, Lutterbach B, et al. Both TEL and AML-1 contribute repression domains to the t(12;21) fusion protein. *Mol Cell Biol*, 19(10):6566–6574, 1999.
- Fischer M, Schwieger M, Horn S, et al. Defining the oncogenic function of the TEL/AML1 (ETV6/RUNX1) fusion protein in a mouse model. *Oncogene*, 24(51):7579–7591, 2005.
- Fiskus W, Rao R, Fernandez P, et al. Molecular and biologic characterization and drug sensitivity of pan-histone deacetylase inhibitor-resistant acute myeloid leukemia cells. *Blood*, 112(7):2896–2905, 2008.
- Ford AM, Fasching K, Panzer-Grümayer ER, Koenig M, Haas OA, Greaves MF. Origins of late relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia with TEL-AML1 fusion genes. *Blood*, 98(3):558–564, 2001.
- Forestier E, Heyman M, Andersen MK, et al. Outcome of ETV6/RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukaemia in the NOPHO-ALL-1992 protocol: frequent late relapses but good overall survival. *Br J Haematol*, 140(6):665–672, 2008.

- Gadner H, Gaedicke G, Niemeyer C, Ritter J. *Pädiatrische Hämatologie und Onkologie (German Edition)*. Springer, 1 Auflage, 2005. ISBN 9783540037026.
- Gallagher R, Collins S, Trujillo J, et al. Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 54(3):713–733, 1979.
- Gamou T, Kitamura E, Hosoda F, et al. The partner gene of AML1 in t(16;21) myeloid malignancies is a novel member of the MTG8(ETO) family. *Blood*, 91(11):4028–4037, 1998.
- Garcia-Manero G, Assouline S, Cortes J, et al. Phase 1 study of the oral isotype specific histone deacetylase inhibitor MGCD0103 in leukemia. *Blood*, 112(4):981–989, 2008.
- Gillert E, Leis T, Repp R, et al. A DNA damage repair mechanism is involved in the origin of chromosomal translocations t(4;11) in primary leukemic cells. *Oncogene*, 18(33):4663–4671, 1999.
- Golub TR, Barker GF, Bohlander SK, et al. Fusion of the TEL gene on 12p13 to the AML1 gene on 21q22 in acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(11):4917–4921, 1995.
- Golub TR, Barker GF, Lovett M, Gilliland DG. Fusion of PDGF receptor beta to a novel ets-like gene, tel, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12) chromosomal translocation. *Cell*, 77(2):307–316, 1994.
- Golub TR, Barker GF, Stegmaier K, Gilliland DG. Involvement of the TEL gene in hematologic malignancy by diverse molecular genetic mechanisms. *Curr Top Microbiol Immunol*, 211:279–288, 1996.
- Golub TR, Barker GF, Stegmaier K, Gilliland DG. The TEL gene contributes to the pathogenesis of myeloid and lymphoid leukemias by diverse molecular genetic mechanisms. *Curr Top Microbiol Immunol*, 220:67–79, 1997.
- Greaves M. Pre-natal origins of childhood leukemia. *Rev Clin Exp Hematol*, 7(3):233–245, 2003.
- Göttlicher M, Minucci S, Zhu P, et al. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J*, 20(24):6969–6978, 2001.
- Guidez F, Petrie K, Ford AM, et al. Recruitment of the nuclear receptor corepressor N-CoR by the TEL moiety of the childhood leukemia-associated TEL-AML1 oncoprotein. *Blood*, 96(7):2557–2561, 2000.
- Hagihara M, Shimakura Y, Tsuchiya T, et al. The efficient generation of CD83 positive immunocompetent dendritic cells from CD14 positive acute myelomonocytic or monocytic leukemia cells in vitro. *Leuk Res*, 25(3):249–258, 2001.

- Harbott J, Viehmann S, Borkhardt A, Henze G, Lampert F. Incidence of TEL/AML1 fusion gene analyzed consecutively in children with ALL in relapse. *Blood*, 90(12):4933–4937, 1997.
- Harrison BD, Adams JA, Briggs M, Brereton ML, Yin JA. Stimulation of autologous proliferative and cytotoxic T-cell responses by "leukemic dendritic cells" derived from blast cells in acute myeloid leukemia. *Blood*, 97(9):2764–2771, 2001.
- Higano CS, Schellhammer PF, Small EJ, et al. Integrated data from 2 randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trials of active cellular immunotherapy with sipuleucel-T in advanced prostate cancer. *Cancer*, 115(16):3670–3679, 2009.
- Ichikawa M, Asai T, Chiba S, Kurokawa M, Ogawa S. Runx1/AML-1 ranks as a master regulator of adult hematopoiesis. *Cell Cycle*, 3(6):722–724, 2004.
- Imai Y, Kurokawa M, Tanaka K, et al. TLE, the human homolog of groucho, interacts with AML1 and acts as a repressor of AML1-induced transactivation. *Biochem Biophys Res Commun*, 252(3):582–589, 1998.
- Imai Y, Kurokawa M, Yamaguchi Y, et al. The corepressor mSin3A regulates phosphorylation-induced activation, intranuclear location, and stability of AML1. *Mol Cell Biol*, 24(3):1033–1043, 2004.
- Insinga A, Monestiroli S, Ronzoni S, et al. Inhibitors of histone deacetylases induce tumor-selective apoptosis through activation of the death receptor pathway. *Nat Med*, 11(1):71–76, 2005.
- Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science*, 293(5532):1074–1080, 2001.
- Joshi SS, Vu UE, Lovgren TR, et al. Comparison of phenotypic and functional dendritic cells derived from human umbilical cord blood and peripheral blood mononuclear cells. *J Hematother Stem Cell Res*, 11(2):337–347, 2002.
- Jousset C, Carron C, Boureux A, et al. A domain of TEL conserved in a subset of ETS proteins defines a specific oligomerization interface essential to the mitogenic properties of the TEL-PDGFR beta oncoprotein. *EMBO J*, 16(1):69–82, 1997.
- Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, et al. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med*, 363(5):411–422, 2010.
- Kelly WK, O'Connor OA, Krug LM, et al. Phase I study of an oral histone deacetylase inhibitor, suberoylanilide hydroxamic acid, in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol*, 23(17):3923–3931, 2005.

- Kim DH, Moldwin RL, Vignon C, et al. TEL-AML1 translocations with TEL and CDKN2 inactivation in acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Blood*, 88(3):785–794, 1996.
- Kitabayashi I, Yokoyama A, Shimizu K, Ohki M. Interaction and functional cooperation of the leukemia-associated factors AML1 and p300 in myeloid cell differentiation. *EMBO J*, 17(11):2994–3004, 1998.
- Klisovic MI, Maghraby EA, Parthun MR, et al. Depsipeptide (FR 901228) promotes histone acetylation, gene transcription, apoptosis and its activity is enhanced by DNA methyltransferase inhibitors in AML1/ETO-positive leukemic cells. *Leukemia*, 17(2):350–358, 2003.
- Knudson AG. Heredity and environment in the origin of cancer. *Prog Clin Biol Res*, 376:31–40, 1992.
- Kunitz M. Crystalline desoxyribonuclease; digestion of thymus nucleic acid; the kinetics of the reaction. *J Gen Physiol*, 33(4):363–377, 1950a.
- Kunitz M. Crystalline desoxyribonuclease; isolation and general properties; spectrophotometric method for the measurement of desoxyribonuclease activity. *J Gen Physiol*, 33(4):349–362, 1950b.
- Lacronique V, Boureux A, Valle VD, et al. A TEL-JAK2 fusion protein with constitutive kinase activity in human leukemia. *Science*, 278(5341):1309–1312, 1997.
- Lechmann M, Zinser E, Golka A, Steinkasserer A. Role of CD83 in the immunomodulation of dendritic cells. *Int Arch Allergy Immunol*, 129(2):113–118, 2002.
- Leprince D, Gegonne A, Coll J, et al. A putative second cell-derived oncogene of the avian leukaemia retrovirus E26. *Nature*, 306(5941):395–397, 1983.
- Levanon D, Negreanu V, Bernstein Y, Bar-Am I, Avivi L, Groner Y. AML1, AML2, and AML3, the human members of the runt domain gene-family: cDNA structure, expression, and chromosomal localization. *Genomics*, 23(2):425–432, 1994.
- Löning L, Zimmermann M, Reiter A, et al. Secondary neoplasms subsequent to Berlin-Frankfurt-Münster therapy of acute lymphoblastic leukemia in childhood: significantly lower risk without cranial radiotherapy. *Blood*, 95(9):2770–2775, 2000.
- Loh ML, Goldwasser MA, Silverman LB, et al. Prospective analysis of TEL/AML1-positive patients treated on Dana-Farber Cancer Institute Consortium Protocol 95-01. *Blood*, 107(11):4508–4513, 2006.
- Loh ML, Rubnitz JE. TEL/AML1-positive pediatric leukemia: prognostic significance and therapeutic approaches. *Curr Opin Hematol*, 9(4):345–352, 2002.



- Look AT. Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science*, 278(5340):1059–1064, 1997.
- Lopez RG, Carron C, Oury C, Gardellin P, Bernard O, Ghysdael J. TEL is a sequence-specific transcriptional repressor. *J Biol Chem*, 274(42):30132–30138, 1999.
- Maeda T, Towatari M, Kosugi H, Saito H. Up-regulation of costimulatory/adhesion molecules by histone deacetylase inhibitors in acute myeloid leukemia cells. *Blood*, 96(12):3847–3856, 2000.
- Maggio R, Peragine N, Calabrese E, et al. Generation of functional dendritic cells (DC) in adult acute lymphoblastic leukemia: rationale for a DC-based vaccination program for patients in complete hematological remission. *Leuk Lymphoma*, 48(2):302–310, 2007.
- Maia AT, Ford AM, Jalali GR, et al. Molecular tracking of leukemogenesis in a triplet pregnancy. *Blood*, 98(2):478–482, 2001.
- Mann BS, Johnson JR, Cohen MH, Justice R, Pazdur R. FDA approval summary: vorinostat for treatment of advanced primary cutaneous T-cell lymphoma. *Oncologist*, 12(10):1247–1252, 2007.
- Marks P, Rifkind RA, Richon VM, Breslow R, Miller T, Kelly WK. Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat Rev Cancer*, 1(3):194–202, 2001.
- Matsuo Y, Drexler HG. Establishment and characterization of human B cell precursor-leukemia cell lines. *Leuk Res*, 22(7):567–579, 1998.
- McLean TW, Ringold S, Neuberg D, et al. TEL/AML-1 dimerizes and is associated with a favorable outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 88(11):4252–4258, 1996.
- Merad M, Manz MG. Dendritic cell homeostasis. *Blood*, 113(15):3418–3427, 2009.
- Minucci S, Pelicci PG. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer*, 6(1):38–51, 2006.
- Mitani K, Ogawa S, Tanaka T, et al. Generation of the AML1-EVI-1 fusion gene in the t(3;21)(q26;q22) causes blastic crisis in chronic myelocytic leukemia. *EMBO J*, 13(3):504–510, 1994.
- Miyoshi H, Kozu T, Shimizu K, et al. The t(8;21) translocation in acute myeloid leukemia results in production of an AML1-MTG8 fusion transcript. *EMBO J*, 12(7):2715–2721, 1993.
- Miyoshi H, Ohira M, Shimizu K, et al. Alternative splicing and genomic structure of the AML1 gene involved in acute myeloid leukemia. *Nucleic Acids Res*, 23(14):2762–2769, 1995.

- Miyoshi H, Shimizu K, Kozu T, Maseki N, Kaneko Y, Ohki M. t(8;21) breakpoints on chromosome 21 in acute myeloid leukemia are clustered within a limited region of a single gene, AML1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(23):10431–10434, 1991.
- Mohty M, Jarrossay D, Lafage-Pochitaloff M, et al. Circulating blood dendritic cells from myeloid leukemia patients display quantitative and cytogenetic abnormalities as well as functional impairment. *Blood*, 98(13):3750–3756, 2001.
- Moldenhauer A, Frank RC, Pinilla-Ibarz J, et al. Histone deacetylase inhibition improves dendritic cell differentiation of leukemic blasts with AML1-containing fusion proteins. *J Leukoc Biol*, 76(3):623–633, 2004.
- Moldenhauer A, Nociari MM, Dias S, Lalezari P, Moore MAS. Optimized culture conditions for the generation of dendritic cells from peripheral blood monocytes. *Vox Sang*, 84(3):228–236, 2003.
- Mori H, Colman SM, Xiao Z, et al. Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(12):8242–8247, 2002.
- Munker R, Hiller E, Glass J, Paquette R. *Modern Hematology: Biology and Clinical Management (Contemporary Hematology)*. Humana Press, 2006. ISBN 1597451495.
- Munster P, Marchion D, Bicaku E, et al. Clinical and biological effects of valproic acid as a histone deacetylase inhibitor on tumor and surrogate tissues: phase I/II trial of valproic acid and epirubicin/FEC. *Clin Cancer Res*, 15(7):2488–2496, 2009.
- Nagy L, Kao HY, Chakravarti D, et al. Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. *Cell*, 89(3):373–380, 1997.
- Nakao M, Yokota S, Horiike S, et al. Detection and quantification of TEL/AML1 fusion transcripts by polymerase chain reaction in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 10(9):1463–1470, 1996.
- Nimmanapalli R, Fuino L, Stobaugh C, Richon V, Bhalla K. Cotreatment with the histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) enhances imatinib-induced apoptosis of Bcr-Abl-positive human acute leukemia cells. *Blood*, 101(8):3236–3239, 2003.
- Nisson PE, Watkins PC, Sacchi N. Transcriptionally active chimeric gene derived from the fusion of the AML1 gene and a novel gene on chromosome 8 in t(8;21) leukemic cells. *Cancer Genet Cytogenet*, 63(2):81–88, 1992.
- Nunn MF, Seeburg PH, Moscovici C, Duesberg PH. Tripartite structure of the avian erythroblastosis virus E26 transforming gene. *Nature*, 306(5941):391–395, 1983.

- Nye JA, Petersen JM, Gunther CV, Jonsen MD, Graves BJ. Interaction of murine ets-1 with GGA-binding sites establishes the ETS domain as a new DNA-binding motif. *Genes Dev*, 6(6):975–990, 1992.
- Oehler L, Berer A, Kollars M, et al. Culture requirements for induction of dendritic cell differentiation in acute myeloid leukemia. *Ann Hematol*, 79(7):355–362, 2000.
- Olaharski AJ, Ji Z, Woo JY, et al. The histone deacetylase inhibitor trichostatin a has genotoxic effects in human lymphoblasts in vitro. *Toxicol Sci*, 93(2):341–347, 2006.
- Olsen EA, Kim YH, Kuzel TM, et al. Phase IIb multicenter trial of vorinostat in patients with persistent, progressive, or treatment refractory cutaneous T-cell lymphoma. *J Clin Oncol*, 25(21):3109–3115, 2007.
- Orkin SH. Development of the hematopoietic system. *Curr Opin Genet Dev*, 6(5):597–602, 1996.
- Ossenkoppele GJ, Stam AGM, Westers TM, et al. Vaccination of chronic myeloid leukemia patients with autologous in vitro cultured leukemic dendritic cells. *Leukemia*, 17(7):1424–1426, 2003.
- Palucka AK, Ueno H, Fay JW, Banchereau J. Taming cancer by inducing immunity via dendritic cells. *Immunol Rev*, 220:129–150, 2007.
- Palucka K, Ueno H, Fay J, Banchereau J. Dendritic cells and immunity against cancer. *J Intern Med*, 269(1):64–73, 2011.
- Panoskaltis N, Belanger TJ, Liesveld JL, Abboud CN. Optimal cytokine stimulation for the enhanced generation of leukemic dendritic cells in short-term culture. *Leuk Res*, 26(2):191–201, 2002.
- Papadopoulos P, Ridge SA, Boucher CA, Stocking C, Wiedemann LM. The novel activation of ABL by fusion to an ets-related gene, TEL. *Cancer Res*, 55(1):34–38, 1995.
- Peeters P, Raynaud SD, Cools J, et al. Fusion of TEL, the ETS-variant gene 6 (ETV6), to the receptor-associated kinase JAK2 as a result of t(9;12) in a lymphoid and t(9;15;12) in a myeloid leukemia. *Blood*, 90(7):2535–2540, 1997.
- Pezzutto A, Ulrichs T, Burmester GR. *Taschenatlas der Immunologie*. Thieme Georg Verlag, 2006. ISBN 3131153822.
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29(9):e45, 2001.

- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res*, 30(9):e36, 2002.
- Pilatrino C, Cilloni D, Messa E, et al. Increase in platelet count in older, poor-risk patients with acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome treated with valproic acid and all-trans retinoic acid. *Cancer*, 104(1):101–109, 2005.
- Poirel H, Lacronique V, Mauchauffé M, et al. Analysis of TEL proteins in human leukemias. *Oncogene*, 16(22):2895–2903, 1998.
- Poirel H, Oury C, Carron C, et al. The TEL gene products: nuclear phosphoproteins with DNA binding properties. *Oncogene*, 14(3):349–357, 1997.
- Pospíšilová D, Borovičková J, Poloučková A, et al. Generation of functional dendritic cells for potential use in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Immunol Immunother*, 51(2):72–78, 2002.
- Pui CH. Acute lymphoblastic leukemia in children. *Curr Opin Oncol*, 12(1):3–12, 2000.
- Pui CH. *Childhood Leukemias*. Cambridge University Press, 2006. ISBN 0521825199.
- Pui CH, Relling MV, Downing JR. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*, 350(15):1535–1548, 2004.
- Rabbitts TH. Chromosomal translocations in human cancer. *Nature*, 372(6502):143–149, 1994.
- Raffoux E, Cras A, Recher C, et al. Phase 2 clinical trial of 5-azacitidine, valproic acid, and all-trans retinoic acid in patients with high-risk acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome. *Oncotarget*, 1(1):34–42, 2010.
- Raynaud S, Cave H, Baens M, et al. The 12;21 translocation involving TEL and deletion of the other TEL allele: two frequently associated alterations found in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 87(7):2891–2899, 1996a.
- Raynaud SD, Baens M, Grosgeorge J, et al. Fluorescence in situ hybridization analysis of t(3; 12)(q26; p13): a recurring chromosomal abnormality involving the TEL gene (ETV6) in myelodysplastic syndromes. *Blood*, 88(2):682–689, 1996b.
- Reddy ES, Rao VN. *erg*, an ets-related gene, codes for sequence-specific transcriptional activators. *Oncogene*, 6(12):2285–2289, 1991.
- Reddy P, Zou W. Blocking HDACs boosts regulatory T cells. *Nat Med*, 13(11):1282–1284, 2007.

- Reid T, Valone F, Lipera W, et al. Phase II trial of the histone deacetylase inhibitor pivaloyloxymethyl butyrate (Pivanex, AN-9) in advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 45(3):381–386, 2004.
- Robert Koch-Institut. *Krebs in Deutschland 2003 – 2004. Häufigkeiten und Trends*. Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V., Berlin, 6. Auflage, 2008. ISBN 978-3-89606-182-9.
- Rocca A, Minucci S, Tosti G, et al. A phase I-II study of the histone deacetylase inhibitor valproic acid plus chemoimmunotherapy in patients with advanced melanoma. *Br J Cancer*, 100(1):28–36, 2009.
- Romana SP, Coniat ML, Berger R. t(12;21): a new recurrent translocation in acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*, 9(3):186–191, 1994.
- Romana SP, Coniat ML, Poirel H, Marynen P, Bernard O, Berger R. Deletion of the short arm of chromosome 12 is a secondary event in acute lymphoblastic leukemia with t(12;21). *Leukemia*, 10(1):167–170, 1996.
- Romana SP, Mauchauffé M, Coniat ML, et al. The t(12;21) of acute lymphoblastic leukemia results in a tel-AML1 gene fusion. *Blood*, 85(12):3662–3670, 1995a.
- Romana SP, Poirel H, Leconiat M, et al. High frequency of t(12;21) in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 86(11):4263–4269, 1995b.
- Rowley JD. The critical role of chromosome translocations in human leukemias. *Annu Rev Genet*, 32:495–519, 1998.
- Rubnitz JE, Wichlan D, Devidas M, et al. Prospective analysis of TEL gene rearrangements in childhood acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. *J Clin Oncol*, 26(13):2186–2191, 2008.
- Sasaki K, Yamagata T, Mitani K. Histone deacetylase inhibitors trichostatin A and valproic acid circumvent apoptosis in human leukemic cells expressing the RUNX1 chimera. *Cancer Sci*, 99(2):414–422, 2008.
- Schadendorf D, Ugurel S, Schuler-Thurner B, et al. Dacarbazine (DTIC) versus vaccination with autologous peptide-pulsed dendritic cells (DC) in first-line treatment of patients with metastatic melanoma: a randomized phase III trial of the DC study group of the DeCOG. *Ann Oncol*, 17(4):563–570, 2006.

- Schaefer EW, Loaiza-Bonilla A, Juckett M, et al. A phase 2 study of vorinostat in acute myeloid leukemia. *Haematologica*, 94(10):1375–1382, 2009.
- Schmidt K, Seeger K, Scheibenbogen C, et al. Histone deacetylase inhibition improves differentiation of dendritic cells from leukemic blasts of patients with TEL/AML1-positive acute lymphoblastic leukemia. *J Leukoc Biol*, 85(3):563–573, 2009.
- Scholler N, Hayden-Ledbetter M, Dahlin A, Hellström I, Hellström KE, Ledbetter JA. Cutting edge: CD83 regulates the development of cellular immunity. *J Immunol*, 168(6):2599–2602, 2002.
- Seeger K, Adams HP, Buchwald D, et al. TEL-AML1 fusion transcript in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. The Berlin-Frankfurt-Münster Study Group. *Blood*, 91(5):1716–1722, 1998.
- Seeger K, Buchwald D, Peter A, et al. TEL-AML1 fusion in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 94(1):374–376, 1999.
- Seeger K, Kreuzer KA, Lass U, et al. Molecular quantification of response to therapy and remission status in TEL-AML1-positive childhood ALL by real-time reverse transcription polymerase chain reaction. *Cancer Res*, 61(6):2517–2522, 2001.
- Seth A, Papas TS. The c-ets-1 proto-oncogene has oncogenic activity and is positively autoregulated. *Oncogene*, 5(12):1761–1767, 1990.
- Shechter D, Dormann HL, Allis CD, Hake SB. Extraction, purification and analysis of histones. *Nat Protoc*, 2(6):1445–1457, 2007.
- Shurtleff SA, Buijs A, Behm FG, et al. TEL/AML1 fusion resulting from a cryptic t(12;21) is the most common genetic lesion in pediatric ALL and defines a subgroup of patients with an excellent prognosis. *Leukemia*, 9(12):1985–1989, 1995.
- Smit WM, Rijnbeek M, van Bergen CA, et al. Generation of dendritic cells expressing bcr-abl from CD34-positive chronic myeloid leukemia precursor cells. *Hum Immunol*, 53(2):216–223, 1997.
- Starkova J, Madzo J, Cario G, et al. The identification of (ETV6)/RUNX1-regulated genes in lymphopoiesis using histone deacetylase inhibitors in ETV6/RUNX1-positive lymphoid leukemic cells. *Clin Cancer Res*, 13(6):1726–1735, 2007.
- Steinman RM, Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature*, 449(7161):419–426, 2007.
- Tanaka T, Tanaka K, Ogawa S, et al. An acute myeloid leukemia gene, AML1, regulates transcriptional activation and hemopoietic myeloid cell differentiation antagonistically by two alternative spliced forms. *Leukemia*, 11 Suppl 3:299–302, 1997.

- Tao R, de Zoeten EF, Ozkaynak E, et al. Deacetylase inhibition promotes the generation and function of regulatory T cells. *Nat Med*, 13(11):1299–1307, 2007.
- Taylor DS, Laubach JP, Nathan DG, Mathey-Prevot B. Cooperation between core binding factor and adjacent promoter elements contributes to the tissue-specific expression of interleukin-3. *J Biol Chem*, 271(24):14020–14027, 1996.
- Tenen DG, Hromas R, Licht JD, Zhang DE. Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia. *Blood*, 90(2):489–519, 1997.
- Thompson CC, Brown TA, McKnight SL. Convergence of Ets- and notch-related structural motifs in a heteromeric DNA binding complex. *Science*, 253(5021):762–768, 1991.
- Tsuchiya T, Hagihara M, Shimakura Y, et al. The generation of immunocompetent dendritic cells from CD34+ acute myeloid or lymphoid leukemia cells. *Int J Hematol*, 75(1):55–62, 2002.
- Tsuji N, Kobayashi M, Nagashima K, Wakisaka Y, Koizumi K. A new antifungal antibiotic, trichostatin. *J Antibiot (Tokyo)*, 29(1):1–6, 1976.
- Wang CY, Petryniak B, Ho IC, Thompson CB, Leiden JM. Evolutionarily conserved Ets family members display distinct DNA binding specificities. *J Exp Med*, 175(5):1391–1399, 1992.
- Wang L, Hiebert SW. TEL contacts multiple co-repressors and specifically associates with histone deacetylase-3. *Oncogene*, 20(28):3716–3725, 2001.
- Wang LC, Kuo F, Fujiwara Y, Gilliland DG, Golub TR, Orkin SH. Yolk sac angiogenic defect and intra-embryonic apoptosis in mice lacking the Ets-related factor TEL. *EMBO J*, 16(14):4374–4383, 1997.
- Wang LC, Swat W, Fujiwara Y, et al. The TEL/ETV6 gene is required specifically for hematopoiesis in the bone marrow. *Genes Dev*, 12(15):2392–2402, 1998.
- Wasylyk B, Hahn SL, Giovane A. The Ets family of transcription factors. *Eur J Biochem*, 211(1-2):7–18, 1993.
- Wasylyk C, Kerckaert JP, Wasylyk B. A novel modulator domain of Ets transcription factors. *Genes Dev*, 6(6):965–974, 1992.
- Watson DK, McWilliams MJ, Lapis P, Lautenberger JA, Schweinfest CW, Papas TS. Mammalian ets-1 and ets-2 genes encode highly conserved proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(21):7862–7866, 1988.

- Wiemels JL, Cazzaniga G, Daniotti M, et al. Prenatal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children. *Lancet*, 354(9189):1499–1503, 1999.
- Wiemels JL, Greaves M. Structure and possible mechanisms of TEL-AML1 gene fusions in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res*, 59(16):4075–4082, 1999.
- Wlodarska I, Aventín A, Inglés-Esteve J, et al. A new subtype of pre-B acute lymphoblastic leukemia with t(5;12)(q31q33;p12), molecularly and cytogenetically distinct from t(5;12) in chronic myelomonocytic leukemia. *Blood*, 89(5):1716–1722, 1997.
- Woiciechowsky A, Regn S, Kolb HJ, Roskrow M. Leukemic dendritic cells generated in the presence of FLT3 ligand have the capacity to stimulate an autologous leukemia-specific cytotoxic T cell response from patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 15(2):246–255, 2001.
- Yagil G. Paranemic structures of DNA and their role in DNA unwinding. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 26(5-6):475–559, 1991.
- Yang XJ, Ogryzko VV, Nishikawa J, Howard BH, Nakatani Y. A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature*, 382(6589):319–324, 1996.
- Yoshida M, Kijima M, Akita M, Beppu T. Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J Biol Chem*, 265(28):17174–17179, 1990.
- Yotnda P, Garcia F, Peuchmaur M, et al. Cytotoxic T cell response against the chimeric ETV6-AML1 protein in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest*, 102(2):455–462, 1998.
- Yun C, Senju S, Fujita H, et al. Augmentation of immune response by altered peptide ligands of the antigenic peptide in a human CD4+ T-cell clone reacting to TEL/AML1 fusion protein. *Tissue Antigens*, 54(2):153–161, 1999.
- Zelent A, Greaves M, Enver T. Role of the TEL-AML1 fusion gene in the molecular pathogenesis of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Oncogene*, 23(24):4275–4283, 2004.
- Zhang Q, Wang M, Xing H, Rao Q, Wang J. The effects of different transcripts of AML1 on the transactivation of M-CSF-R gene. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*, 26(11):641–644, 2005.
- Zhou Z, Li X, Li J, et al. Direct B-cell stimulation by peripheral blood monocyte-derived dendritic cells in idiopathic thrombocytopenic purpura patients. *J Clin Immunol*, 30(6):814–822, 2010.
- Zucman-Rossi J, Legoix P, Victor JM, Lopez B, Thomas G. Chromosome translocation based on illegitimate recombination in human tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(20):11786–11791, 1998.



# Lebenslauf

Der Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version dieser Arbeit nicht veröffentlicht.

# Publikationsliste

Teile dieser Dissertation wurden in folgender Publikation veröffentlicht:

SCHMIDT K, SEEGER K, SCHEIBENBOGEN C, **BENDER R**, ABDULLA M, SÜSSMILCH S, SALAMA A, MOLDENHAUER A. Histone deacetylase inhibition improves differentiation of dendritic cells from leukemic blasts of patients with TEL/AML1-positive acute lymphoblastic leukemia. *J Leukoc Biol*, 85(3):563–573, 2009

# Erklärung

„Ich, Roderich Bender, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *Generierung TEL-AML1-exprimierender dendritischer Zellen aus leukämischen Blasten zur Induktion einer anti-leukämischen Immunreaktion* selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift