

Aus der Medizinischen Klinik  
mit Schwerpunkt für Hämatologie und Onkologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Identifizierung und Charakterisierung von differentiell exprimierten  
Genen im Knochenmarkstroma bei der akuten myeloischen  
Leukämie**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von  
Marlene Luther  
aus Berlin

Datum der Promotion: 14.09.2018

***Wege entstehen dadurch, dass man sie geht.***

***Franz Kafka***

# Inhaltsverzeichnis

<b>I Abstract</b>	6
<b>Deutscher Abstract</b>	6
<b>Englischer Abstract</b>	7
<b>II Einleitung</b>	8
<b>II.1 Die akute myeloische Leukämie</b>	8
II.1.1 Epidemiologie und Ätiologie	8
II.1.2 Pathophysiologie	8
II.1.3 Klinik	10
II.1.4 Diagnose	10
II.1.5 Therapie, Prognose	11
<b>II.2 Das „Microenvironment“</b>	13
II.2.1 Das „Tumor-Microenvironment“ - Bedeutung für Tumorinitiation, -progression und Chemotherapieresistenz	13
II.2.2 Das Microenvironment im Knochenmark	16
II.2.2.1 Nische der hämatopoetischen Stammzelle	16
II.2.2.2 Nische der leukämischen Stammzelle	18
II.2.3 Stroma-Tumor-Interaktion als therapeutisches Target	19
II.2.4 Der Wachstumsfaktor Insulin-like growth factor 2 als potentielles Therapietarget	21
<b>II.3 Fragestellung</b>	22
<b>III Materialien und Methoden</b>	24
<b>III.1 Materialien</b>	24
III.1.1 Probenmaterial	24
III.1.1.1 Patientenproben	24
III.1.1.1.1 Patientenproben für Microarray-Analysen	24
III.1.1.1.2 Patientenproben für Validierung mittels quantitativer real-time PCR	24
III.1.1.2 Zelllinien	25

III.1.2	Primer	25
III.1.3	Enzyme	27
III.1.4	Kits	28
III.1.5	Medien, Puffer, Lösungen, Chemikalien	28
III.1.6	Geräte	28
III.1.7	Computerprogramme	29
<b>III.2</b>	<b>Methoden</b>	29
III.2.1	Vorarbeiten	29
III.2.2	Datenanalyse	30
III.2.2.1	DAVID bioinformatics resources	30
III.2.2.2	Pubmed	30
III.2.3	Gewinnung von Probenmaterial	30
III.2.3.1	Primäre Zellen	30
III.2.3.2	RNA-Isolation	30
III.2.3.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	31
III.2.3.4	cDNA-Synthese	31
III.2.4	Validierung von Kandidatengenomen mittels quantitativer real-time PCR (qRT-PCR)	32
III.2.4.1	Primerdesign	32
III.2.4.2	Testen der Spezifität der Primer mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	32
III.2.4.3	Agarose-Gelelektrophorese	33
III.2.4.4	Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)	33
III.2.5	Rezeptorexpression bei leukämischen Blasten und Stromazellen	35
III.2.6	Korrelation von Genexpression und Ausprägung klinischer Parameter	35
III.2.7	Methoden in der Zellkultur	35
III.2.7.1	Allgemeine Kulturbedingungen	35
III.2.7.2	Bestimmung der Zellzahl	36
III.2.7.3	Auftauen und Einfrieren von Zellen	36
III.2.7.3.1	Auftauen	36
III.2.7.3.2	Einfrieren	36
III.2.7.4	Proliferations-Assay mittels WST1-Reagenz	36
III.2.7.4.1	Behandlung der Zellen mit rhIGF2	37

III.2.7.4.1.1 Zelllinien	37
III.2.7.4.1.2 Leukämische Blasten	37
III.2.7.4.2 WST-Assay	37
III.2.8 Statistik	37
<b>IV Ergebnisse</b>	<b>39</b>
<b>IV.1 Globale Genexpressionsdaten der mesenchymalen Stromazellen aus dem Knochenmark von AML-Patienten und gesunden Probanden</b>	<b>39</b>
<b>IV.2 Identifizierung von Kandidatengen im AML-Knochenmarkstroma</b>	<b>39</b>
IV.2.1 Ergebnisse der bioinformatischen Analysen mit David bioinformatics resources	39
IV.2.2 Einordnung der identifizierten Kandidatengene in den aktuellen wissenschaftlichen Kontext	43
<b>IV.3 Validierung von Kandidatengen</b>	<b>47</b>
<b>IV.4 Rezeptorexpression der IGF-Familie in leukämischen Blasten und Stromazellen</b>	<b>52</b>
<b>IV.5 Einfluss von IGF2 auf die Proliferation leukämischer Zellen</b>	<b>54</b>
<b>IV.6 Korrelation der IGF2-Expression mit der Ausprägung klinischer Merkmale</b>	<b>57</b>
<b>V Diskussion</b>	<b>59</b>
<b>V.1 Aberrationen in der globalen Genexpression mesenchymaler Stromazellen in der AML</b>	<b>59</b>
<b>V.2 Validierung von Kandidatengen</b>	<b>61</b>
<b>V.3 Bedeutung der IGF2-Überexpression</b>	<b>65</b>
<b>V.4 Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>69</b>
<b>VI Literaturverzeichnis</b>	<b>73</b>
<b>VII Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>84</b>
<b>VIII Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>85</b>
<b>IX Lebenslauf</b>	<b>87</b>
<b>X Danksagung</b>	<b>89</b>

# **I Abstract**

## **Deutscher Abstract**

Die akute myeloische Leukämie (AML) besitzt insbesondere bei älteren Patienten sowie Hochrisikopatienten oft noch eine sehr schlechte Prognose, so dass hier dringend neue Therapieansätze erforderlich sind.

Das Tumor-Stroma („Microenvironment“), welches zu Progression, Therapieresistenz und eventuell auch Initiation der Erkrankung beizutragen scheint, stellt eine vielversprechende Zielstruktur für neue Therapien dar. Allerdings sind die zugrundeliegenden Mechanismen noch unzureichend verstanden.

Daher wurde hier die Genexpression in mesenchymalen Stromazellen des Knochenmarks (BM-MSK) - dem Microenvironment der hämatopoetischen und vermutlich auch leukämischen Stammzelle - von AML-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden untersucht. Es sollten Gene identifiziert werden, deren veränderte Expression zur Leukämie beitragen könnte und die somit potentielle Zielstrukturen für neue Therapien darstellen. Dazu wurden mittels Microarray generierte Genexpressionsdaten der BM-MSK von 19 Patienten mit AML Erstdiagnose (ED) und 4 gesunden Probanden mit Hilfe bioinformatischer Analysen (DAVID Bioinformatics) analysiert und so Kandidatengene identifiziert, deren Expression nachfolgend mittels qRT-PCR an einer unabhängigen Kohorte gesunder Normalpersonen (NP) und AML-Patienten ED bestimmt wurde. Anschließend wurden für einen der Kandidaten, den Wachstumsfaktor Insulin-like growth factor 2 (IGF2), funktionelle Analysen angeschlossen.

Die bioinformatische Analyse der in den AML-BM-MSK differentiell exprimierten Gene aus den Microarray-Analysen zeigte, dass diese Gene in Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Immunantwort involviert sind. Eine Überexpression konnte anschließend für IGF2 mittels qRT-PCR bestätigt (AML ED n = 63, NP n = 9, p = 0,003) und auch in der Remission noch nachgewiesen werden (AML n = 44, NP n = 9, p = 0,028). Bei den nachfolgenden funktionellen Analysen für IGF2 wurde zunächst an einer Kohorte von 130 AML ED gezeigt, dass die Blasten Rezeptoren für IGF2 exprimieren; eine Grundvoraussetzung, damit IGF2 einen direkten Einfluss auf diese ausüben kann. Anschließend wurde mit einem Proliferations-Assay (WST1) der mitogene Einfluss von IGF2 auf Leukämiezelllinien und primäre Blasten untersucht. Hier konnte kein signifikanter Effekt festgestellt werden. Die abschließend durchgeführte Korrelation der IGF2-Expression in den AML-BM-MSK mit der Ausprägung klinischer Merkmale zeigte keine statistisch signifikanten Korrelationen; jedoch konnte bei erhöhter IGF2-Expression eine Tendenz zu einer kürzeren Überlebenszeit beobachtet werden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass in den AML-BM-MSK eine gegenüber Gesunden veränderte Genexpression vorliegt und dass die Überexpression des Wachstumsfaktors IGF2 einen

Mechanismus darstellen könnte, über den das Stroma die Leukämie fördert. Weitere Analysen bezüglich der funktionellen Bedeutung von IGF2 in der AML wären nötig sowie Untersuchungen, ob IGF2 möglicherweise eine Zielstruktur für neue Therapieansätze in der AML darstellen könnte.

### **Englischer Abstract**

The prognosis of acute myeloid leukemia (AML) is still very poor, especially for elderly patients and high risk patients. Hence, new therapies are still required.

The tumor microenvironment is a promising target for new therapies. There is growing evidence that the microenvironment is relevant for cancer progression, therapy resistance and perhaps also cancer initiation. However, the underlying mechanisms are not yet fully understood.

Here the gene expression in mesenchymal stromal cells from the bone marrow (BM-MSK) – the microenvironment of the hematopoietic and probably also the leukemic stem cell – of healthy donors (HD) and patients with AML at first diagnosis (FD) was compared. The aim was to identify genes whose altered expression could contribute to leukemia and could therefore become targets for new therapies.

For this approach, the microarray data of AML-BM-MSK (n = 19) and HD-BM-MSK (n = 4) were analysed using bioinformatic tools (DAVID Bioinformatics) to identify genes of interest. For these candidates the expression was determined with qRT-PCR in an independent cohort of patients (AML FD) and healthy donors. Subsequently functional analyses for one candidate, the Insulin-like growth factor 2 (IGF2), were performed.

The bioinformatic analyses showed that the differently expressed genes in AML-BM-MSK are involved in processes such as proliferation, differentiation and the immune system. Using qRT-PCR, an overexpression of IGF2 could be validated (AML FD n = 63, HD n = 9, p = 0,003). In addition, IGF2 overexpression was also shown for AML-BM-MSK in remission (AML n = 44, HD n = 9, p = 0,028). In the functional analyses for IGF2 first it was demonstrated in a cohort of 130 AML FD that the blasts express receptors for IGF2, a prerequisite for direct IGF2 influence on leukemic blasts. To study the mitogenic effect of IGF2 on leucemic cells, IGF2 was subsequently added to leukemic cell lines and primary AML blasts. However, an impact on proliferation could not be observed. Finally, a correlation between IGF2 expression in AML-BM-MSK and clinical parameters was investigated, but lacked statistical significant results. Though a non-significant trend of elevated IGF2 expression and shortened overall survival was observed.

In summary, AML-BM-MSK exhibit an altered gene expression and IGF2 overexpression might be a mechanism of the stroma to contribute to leukemia. Further analyses are required to explore the role of IGF2 in AML in more detail and to test whether IGF2 could become a new target in AML therapy.

## II Einleitung

### Die akute myeloische Leukämie

#### *Epidemiologie und Ätiologie*

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist im Erwachsenenalter mit einem Anteil von ca. 80% die häufigste akute Leukämie. Die Inzidenz liegt bei erwachsenen Europäern bei 5-8/ 100.000 Einwohner pro Jahr mit einer Mortalität von 4-6/ 100.000 Einwohnern pro Jahr [1, 2].

Die AML kann sich in jedem Alter manifestieren, tritt aber häufiger bei Älteren auf; das mediane Erkrankungsalter liegt bei 65 Jahren. Während die Inzidenz bei Personen bis zu einem Alter von 64 Jahren nur 1,8/ 100.000 Einwohner pro Jahr beträgt, liegt sie bei Personen ab 65 Jahren bei 17/ 100.000 Einwohner pro Jahr (Inzidenz in den USA in den Jahren 2000 – 2003) [3].

Die AML tritt meist ohne erkennbare Ursache auf (de-novo-AML), bei ca. 10% der Patienten lassen sich hingegen bestimmte Vorerkrankungen (z. B. das myelodysplastische Syndrom) oder eine vorherige Exposition gegenüber exogenen Noxen (z. B. Chemotherapeutika oder ionisierende Strahlung) beobachten. Diese Formen werden als sekundäre AML (sAML) bzw. therapieassoziierte AML (tAML) bezeichnet [1, 3].

#### *Pathophysiologie*

Leukämien sind maligne Neoplasien des hämatopoetischen Systems und können je nach Verlauf und betroffener Zellreihe unterteilt werden in akute oder chronische und myeloische oder lymphatische Leukämien.

Bei der AML liegen genetische Alterationen in einer myeloischen Vorläuferzelle vor, die zu einer autonomen klonalen Proliferation mit massiver Expansion und Freisetzung unreifer Zellen (Blasten) in das periphere Blut führen [4].

In einem Modell zur Leukämogenese („2-Hit-Hypothese“) wird angenommen, dass die Leukämogenese ein mehrstufiger Prozess ist und Mutationen in verschiedenen Genen notwendig sind, damit eine Leukämie entsteht: Klasse-1-Mutationen, aktivierende Mutationen in Genen, die die Proliferation fördern (z.B. Mutationen, die zur Aktivierung der Rezeptor-Tyrosinkinasen FLT3 und KIT führen), und Klasse-2-Mutationen, Mutationen in Genen, die die Differenzierung steuern (z.B. Mutationen in den Genen für die Transkriptionsfaktoren RUNX1 und CEBP alpha). Zudem tragen Mutationen in Genen, die für epigenetische Modifizierungen relevant sind (z.B. DNMT3A, EZH2), zur Leukämogenese bei [3-5].

Durch diese Mutationen werden die leukämischen Zellen also dahingehend verändert, dass keine normalen, funktionsfähigen Blutzellen entstehen. Das Differenzierungspotential ist limitiert und die Differenzierung kann nur bis zu den unreifen und damit funktionslosen Blasten erfolgen. Die Proliferationskapazität ist zudem erhöht, während die Apoptoserate vermindert ist. Die Hämatopo-



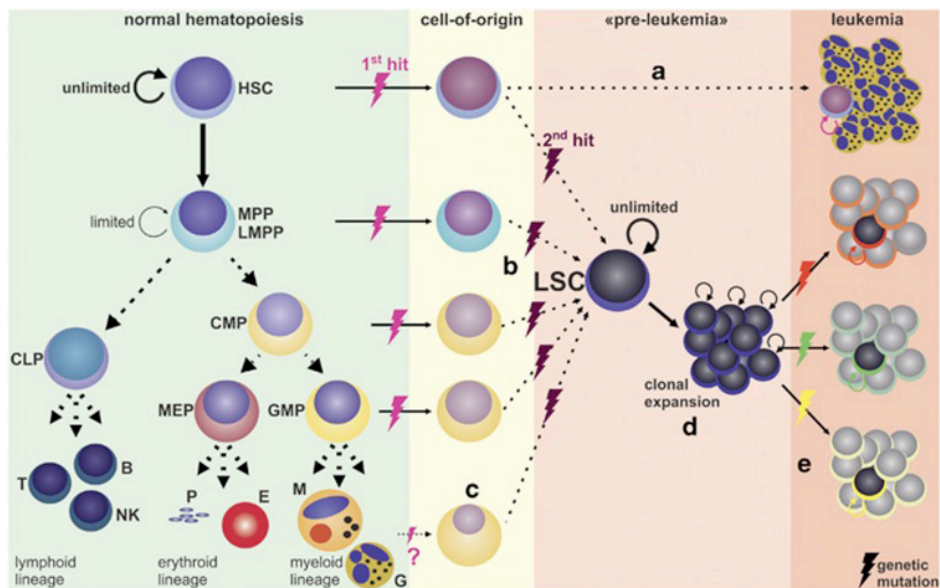
ese verläuft nicht mehr kontrolliert und an die physiologischen Bedürfnisse angepasst, sondern die Blasten expandieren stimulusunabhängig und verdrängen die normale Hämatopoese [4].

Mutationen können die Chromosomenanzahl (Genommutation), die Chromosomenstruktur (Chromosomenmutation) und einzelne Gene (Genmutation) betreffen. Bei ca. 50 - 80% der Patienten liegen chromosomale Aberrationen vor. Hierzu gehören Translokationen und Inversionen, die zu Fusionsproteinen führen können sowie Deletionen. Häufige chromosomale Aberrationen sind beispielsweise  $t(8;21)(q22;q22)$  und  $inv(16)(p13;q22)$ , die beide mit einer guten Prognose assoziiert sind sowie Deletionen der Chromosomen 5 und 7, die hingegen mit einer schlechten Prognose verbunden sind [3].

Genmutationen treten insbesondere bei Patienten mit normalem Karyotyp auf. Auch für diese, insbesondere für NPM1 (Nucleophosmin) [6], FLT3 (Rezeptortyrosinkinase) [7] und CEBP alpha (Transkriptionsfaktor) [8] konnte eine wichtige prognostische Bedeutung gezeigt werden.

Zudem gibt es aber auch zunehmend Arbeiten, die zeigen, dass nicht nur Mutationen in den hämatopoetischen Zellen selbst, sondern auch das Stroma im Knochenmark eine Rolle bei der Progression und möglicherweise auch der Initiation der Leukämie zu spielen scheint. Während es im Gesunden die Nische für hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen bildet und die Hämatopoese reguliert, scheint es in der Leukämie die Existenz leukämischer Stammzellen (LSC) zu fördern [9, 10]. Als LSC werden leukämische Zellen bezeichnet, die stammzelltypische Eigenschaften aufweisen wie Quieszens, self-renewal und Multipotenz. Krebszellen mit stammzelltypischen Eigenschaften konnten inzwischen bei zahlreichen Malignomen identifiziert werden und werden beim „Cancer Stem Cell Model“ als wesentlicher Mechanismus bei der Karzinogenese angesehen [11-13].

So beobachteten Lapidot et al., dass nur ein kleiner Teil der leukämischen Zellen dazu fähig ist, nach Transplantation in eine Maus eine Leukämie auszubilden. Diese Zellen exprimierten charakteristische Oberflächenmarker der hämatopoetischen Stammzellen (CD34+, CD38-). LSC sind, wie zuvor angeführt, u.a. dadurch gekennzeichnet, dass sie wie die hämatopoetischen Stammzellen (HSC) die Fähigkeit zur Selbsterneuerung (self-renewal) besitzen [14]. Während des self-renewal entsteht bei jeder Zellteilung auch wieder eine Stammzelle, so dass der Stammzellpool aufrechterhalten wird, während die Tochterzellen weiter differenzieren können. Bei dem „Cancer Stem Cell Model“ wird davon ausgegangen, dass die Tochterzellen der LSC dann weiter in die leukämischen Blasten differenzieren, die den Hauptteil der Krebszellen bilden [13, 15].



**Abb. 1: Modell der leukämischen Stammzelle.** In der physiologischen Hämatopoese entstehen aus hämatopoetischen Stammzellen (HSC) mit Fähigkeit zum unbegrenzten self-renewal, aber nur geringer proliferativer Aktivität, multipotente Progenitoren (MPP) mit nur begrenzter Fähigkeit zum self-renewal. Aus diesen bilden sich alle weiteren Zellen des Blutsystems, die eine höhere Proliferationskapazität aufweisen, aber die Fähigkeit zum self-renewal verloren haben.

Die leukämische Stammzelle (LSC) kann vermutlich aus HSC oder Progenitoren und eventuell auch weiter differenzierten Zelle, die die Fähigkeit zum self-renewal wiedererlangt haben, entstehen. Aus dieser entwickeln sich dann durch klonale Expansion die leukämischen Blasten.

CLPs: common lymphoid progenitors, CMPs: common myeloid progenitors, GMPs granulocyte-macrophage progenitors, MEP: megakaryocyte-erythrocyte progenitor, B: B-Zelle, T: T-Zelle, NK: NK-Zelle, E: Erythrozyt, P: Platelet (Thrombozyt), M: Monozyt, G: Granulozyt

Riether et al. 2015 [11]

### *Klinik*

Die Symptome bei der AML resultieren maßgeblich aus der Verdrängung der normalen Hämatopoese im Knochenmark. Erythrozyten, Thrombozyten und funktionsfähige Leukozyten können nicht mehr ausreichend gebildet werden. Es kommt zu einer Anämie mit Symptomen wie Blässe und verminderter Leistungsfähigkeit, einer Thrombozytopenie mit vermehrter Blutungsneigung und einem Mangel an funktionsfähigen Leukozyten mit einer erhöhten Infektanfälligkeit.

Hinzukommen können unspezifische Symptome wie Nachtschweiß und Gewichtsverlust oder extramedulläre Leukämieherde, die zu einer Splenomegalie oder Gingivahyperplasie führen können [1, 4].

### *Diagnose*

Im Blutbild fallen i.d.R. zunächst eine Anämie und Thrombozytopenie auf, die Leukozytenzahl kann erhöht, vermindert oder normwertig sein.

Wesentlich für die Diagnosestellung sind im Folgenden ein Blutaussstrich und die Untersuchung des Knochenmarks. Die Diagnose „AML“ kann nach WHO-Kriterien bei myeloischen Neoplasien mit einem Blastenanteil im Blut oder Knochenmark von  $> 20\%$  gestellt werden [2].

Anhand von Morphologie und Zytochemie kann meist schon eine Abgrenzung zur ALL und eine Einordnung in den FAB (French, American and British group of leukemia experts)-Subtyp erfolgen. Histologie (insbesondere bei Punctio sicca), Immunphänotypisierung (sichere Abgrenzung zur ALL, Bestimmung des Differenzierungsgrads), Zytogenetik (Untersuchung auf chromosomale Aberrationen) und Molekularbiologie (Untersuchung auf Genmutationen) ergänzen die Untersuchung [1, 2].

Die Einteilung in Subtypen erfolgt nach FAB- und WHO (World Health Organisation)-Klassifikation. Während die Einteilung nach der FAB-Klassifikation auf Morphologie und Zytochemie beruht, berücksichtigt die neuere WHO-Klassifikation zudem Zyto- und Molekulargenetik sowie Therapieassoziation bzw. Vorerkrankungen wie ein myelodysplastisches Syndrom. Diese Faktoren sind prognostisch relevant und bilden die Grundlage für ein risikostratifiziertes Therapieregime [1, 2, 4].

#### *Therapie, Prognose*

Die Therapie der AML sollte, wenn möglich, im Rahmen von Therapiestudien erfolgen. Die Therapiestrategie richtet sich nach Risiko, Alter und Allgemeinzustand des Patienten. Für die Beurteilung des Risikos werden die Patienten in die 3 Risikogruppen Niedrig-, Intermediär- und Hochrisiko eingeteilt. Die Einordnung in eine der Risikogruppen nach ELN (European LeukemiaNet) Klassifikation 2017 erfolgt anhand von chromosomalen Aberrationen und Genmutationen [1, 4, 16]. Prognostisch ungünstig sind u.a. ein komplex aberranter Karyotyp (3 oder mehr klonale Aberrationen) [1] und eine FLT3-Mutation [7], prognostisch günstig hingegen ist beispielsweise eine Mutation im NPM1-Gen [6].

Risk category*	Genetic abnormality
Favorable	t(8;21)(q22;q22.1); RUNX1-RUNX1T1
	inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11
	Mutated NPM1 without FLT3-ITD or with FLT3-ITD <sup>low†</sup>
	Biallelic mutated CEBPA
Intermediate	Mutated NPM1 and FLT3-ITD <sup>high†</sup>
	Wild-type NPM1 without FLT3-ITD or with FLT3-ITD <sup>low†</sup> (without adverse-risk genetic lesions)
	t(9;11)(p21.3;q23.3); MLLT3-KMT2A <sup>‡</sup>
	Cytogenetic abnormalities not classified as favorable or adverse
Adverse	t(6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214
	t(v;11q23.3); KMT2A rearranged
	t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1
	inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2,MECOM(EV11)
	-5 or del(5q); -7; -17/abn(17p)
	Complex karyotype, <sup>§</sup> monosomal karyotype <sup>‡</sup>
	Wild-type NPM1 and FLT3-ITD <sup>high†</sup>
	Mutated RUNX1 <sup>‡</sup>
	Mutated ASXL1 <sup>‡</sup>
Mutated TP53 <sup>#</sup>	

**Abb. 2:** Risikogruppen gemäß der Klassifikation des European LeukemiaNet ELN 2017 [16]

Sofern der Zustand des Patienten es zulässt, wird eine Induktions-, Konsolidierungs- und ggf. Re-Induktions- und Erhaltungstherapie durchgeführt. Mit der Induktionstherapie soll eine komplette Remission erreicht werden (<5% Blasten und Erholung des Blutbildes), die Standardtherapie ist hier die Gabe von Cytosin-Arabinosid (Cytarabin, AraC) und einem Anthrazyklin. Um das Rezidivrisiko zu senken, wird eine Konsolidierungstherapie angeschlossen. Bei der Hochrisikogruppe erfolgt hier, wenn möglich, eine allogene (selten auch autologe) Stammzelltransplantation. Bei Patienten der Niedrigrisikogruppe kann zur Konsolidierung eine Chemotherapie mit AraC durchgeführt werden. Bei Patienten der Intermediärrisikogruppe stehen im Wesentlichen die Stammzelltransplantation und die Chemotherapie mit AraC als therapeutische Optionen zur Verfügung [1, 2, 4].

Für die akute Promyelozyten-Leukämie (AML M3) gibt es ein hiervon abweichendes Therapieregime, dieses wird hier aber nicht näher erläutert.

Neben diesen konventionellen Therapieregimen werden zunehmend auch neuere Substanzen eingesetzt, die gegen spezielle Strukturen gerichtet sind („targeted therapy“), wie z. B. Tyrosinkinase-Inhibitoren bei FLT3-Mutation [17] und Antikörper gegen Oberflächenstrukturen wie das CD33-Antigen auf leukämischen Blasten [18].

Patienten, die wegen ihres Alters und aufgrund von Komorbiditäten für diese aggressiven Therapieregime nicht infrage kommen, sollten „Best Supportive Care“ erhalten oder eine Palliativtherapie, die low-dose AraC oder ein demethylierendes Pharmakon wie Azacytidine beinhalten kann [2].

Einen hohen Stellenwert hat auch die supportive Therapie mit Maßnahmen wie der Prophylaxe und Therapie von infektiösen Erkrankungen und der Gabe von Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentraten [4].

In den letzten Jahrzehnten hat sich die Prognose für AML-Patienten verbessert, allerdings sind die Ergebnisse, insbesondere für Hochrisikopatienten und ältere Patienten, noch immer unbefriedigend. Während die Remissionsrate bei Patienten bis zu einem Alter von 60 Jahren bei Niedrigrisikopatienten 80-90% beträgt, liegt sie in der Hochrisikogruppe bei nur 40-50% und bei den über 60-Jährigen bei 30–50%.

Die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit bei den Patienten bis 60 Jahre beträgt in der Niedrigrisikogruppe 60-70%, in der Hochrisikogruppe hingegen nur 15-20% und bei den über 60-Jährigen lediglich 10-15% [1, 19].

Gründe für die schlechte Prognose bei Älteren liegen zum einen in der Biologie der AML mit einem häufigeren Auftreten von Aberrationen, die mit einer schlechten Prognose assoziiert sind. Zum anderen liegen bei Älteren aber auch häufiger Komorbiditäten vor, die dazu führen können, dass konventionelle Therapien wie Chemotherapie und Stammzelltransplantation nicht durchführbar sind [20].

Die AML ist also vor allem eine Erkrankung des älteren Menschen, besitzt aber gerade hier noch eine sehr schlechte Prognose. Somit sind insbesondere für Ältere und Hochrisikopatienten dringend neue Therapieansätze erforderlich.

## **Das „Microenvironment“**

### *Das „Tumor-Microenvironment“ - Bedeutung für Tumorentstehung, -progression und Chemotherapieresistenz*

In den letzten Jahrzehnten konnte gezeigt werden, dass Tumore nicht nur aus den Tumorzellen selbst bestehen, sondern dass auch die die Tumorzellen umgebenden Zellen, das Stroma oder „Microenvironment“, eine wichtige Rolle bei der Erkrankung spielt. Über Zell-Zell- und Zell-Extrazellulärmatrix (EZM) - Kontakt sowie über lösliche Faktoren wie Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren kann das Stroma wichtige Vorgänge wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose der Tumorzellen regulieren [21, 22].

Die Stromazellen stammen bei soliden Tumoren direkt aus dem umgebenden Fettgewebe, werden aber auch aus dem Knochenmark rekrutiert [23]. Zudem gibt es auch Hinweise, dass Tumorzellen selbst ihr eigenes Stroma generieren können. So konnte gezeigt werden, dass Brustepithelzellen nach EMT (epithelial-to-mesenchymal transition) mesenchymalen Stromazellen ähnelten und wie diese ein Differenzierungspotential in Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten aufwiesen [24].

Es konnte auch gezeigt werden, dass das Tumorstroma im Vergleich zum Stroma gesunder Personen verändert ist. Diese Veränderungen können zum einen vermutlich durch die Tumorzellen selbst hervorgerufen werden, zum anderen sind aber auch Veränderungen des Stromas durch die Therapie möglich, die dazu führen könnten, dass das Stroma die Tumorzellen besser schützen kann [9, 25-27]. Zudem konnte gezeigt werden, dass eventuell auch primäre Veränderungen im Stroma schon zur Karzinogenese beitragen könnten [28].

Das Tumorstroma besteht aus vielen unterschiedlichen Zellen wie Endothelzellen, mesenchymalen Stromazellen (MSC), Osteoblasten, Osteoklasten, Fibroblasten und Immunzellen [10, 29, 30].

MSC sind mesenchymale Vorläuferzellen und wichtiger Bestandteil des Stromas, da sie in verschiedene Zellen differenzieren können und wichtige Funktionen wie die Hämatopoese regulieren. Auch im Tumorstroma kommt ihnen eine zentrale Bedeutung zu. Sie bilden eine recht heterogene Gruppe und sind durch verschiedene Oberflächenmarker gekennzeichnet sowie durch ihr Differenzierungspotential in Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten [29, 31, 32].

Zusätzlich können sie vermutlich in viele weitere Zellen wie die CAF (carcinoma-associated fibroblasts) differenzieren [33]. Während normale Fibroblasten die Karzinogenese hemmen [34], können CAF diese fördern [35]. So zum Beispiel über die Expression von SDF-1 (stromal cell-derived factor 1 = CXCL12) [36], VEGF (vascular endothelial growth factor) [37] und MMPs (Matrix-Metalloproteinasen) [21, 38].

Aber auch die MSC selbst können die Proliferation der Tumorzelle fördern sowie die Apoptose hemmen und die malignen Zellen zudem vor einer Chemotherapiebehandlung schützen [39, 40], beispielsweise über den NF- $\kappa$ B-Signalweg [41] und die Expression von Fibronectin [42].

Auch über die Modulation anderer Stromakomponenten, wie die Stimulation der Angiogenese und eine Beeinflussung der Immunantwort, können die MSC zur Tumorerkrankung beitragen [29]. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Stromazellen die Aktivität zytotoxischer T- und NK-Zellen hemmen und eine Expansion regulatorischer T-Zellen fördern können und auf diese Weise ein immunsuppressives Tumor-Microenvironment schaffen. Die Modulation der Immunantwort durch die MSC erfolgt dabei direkt durch Zell-Zell-Kontakte sowie auch indirekt durch die Sekretion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ) [21, 31].

Die Zellen des Immunsystems sind wichtig für die Bekämpfung der Tumorzellen. Für verschiedenste Tumorentitäten konnte gezeigt werden, dass das Auftreten von Malignomen häufiger und der Verlauf schwerer unter Immunsuppression ist. Auch konnte eine positive prognostische Bedeutung einer Tumordinfiltration mit Immunzellen beobachtet werden [43, 44].

Allerdings scheint sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem das Tumorstroma nicht nur hemmen, sondern auch fördern zu können [21, 43]. So sollen Immunzellen durch Mechanismen wie eine Stimulation der Angiogenese und Expression von Wachstumsfaktoren im Rahmen einer Inflammation zur Progression sowie auch Initiation einer Krebserkrankung



beitragen und über die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies zusätzlich direkt einen mutagenen Einfluss auf die benachbarten Zellen ausüben können [43, 45].

Beispielsweise konnte beobachtet werden, dass B-Zellen die Karzinogenese über eine chronische Inflammation fördern können [46] und dass auch der Tumor selbst über Tumornekrosen eine Inflammation fördern und somit zur weiteren Progression beitragen kann [43].

Wichtige Signalwege im Rahmen der Immunantwort sind der IL-6/JAK/STAT3- und der NF- $\kappa$ B-Signalweg [41]. Auch der TGF- $\beta$ -Signalweg spielt eine zentrale Bedeutung bei der Regulation des Immunsystems. Er kontrolliert wichtige Funktionen wie Proliferation, Differenzierung und Migration der Zellen, seine Funktion ist jedoch sehr komplex und kontext- und gewebeabhängig. So kann er die Entwicklung von Malignomen sowohl hemmen als auch fördern. Vor allem zu Beginn der Erkrankung wirkt er, beispielsweise durch Hemmung der Proliferation der Tumorzellen, als Tumorsuppressor. Später können Veränderungen in Tumorzellen jedoch zu einem Verlust der wachstumshemmenden Wirkung führen und der TGF- $\beta$ -Signalweg durch die Förderung von Prozessen wie Angiogenese und Hemmung der Immunantwort zur Progression der Erkrankung beitragen [22, 47-52]. Auch das Stroma selbst wird durch TGF- $\beta$  beeinflusst, beispielsweise die Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix (EZM) und auch viele Funktionen in den MSC, wo TGF- $\beta$  vermutlich die Differenzierung in Fibroblasten und CAF fördern, in Adipozyten hingegen hemmen kann. Zudem scheint der TGF- $\beta$ -Signalweg auch beteiligt zu sein an der Vermittlung von Einflüssen der MSC auf die HSC wie die Förderung eines Ruhezustands, der Quieszenz [53-55].

Vielversprechende Ergebnisse konnten für die Inhibition von TGF- $\beta$  bereits in klinischen Studien für verschiedene Tumorentitäten sowie in präklinischen Analysen für die AML gezeigt werden [48, 56].

Neben den Zellen und den Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren sowie der EZM, die von den Stromazellen produziert werden, haben auch die Gefäße eine wichtige Bedeutung im Tumor-Microenvironment.

Sie sind zum einen wichtig für eine ausreichende Versorgung des Tumors mit Sauerstoff und Nährstoffen und somit ein interessantes Therapie-Target. Auf der anderen Seite sind sie aber auch bedeutsam für die Verteilung von Chemotherapeutika innerhalb des Tumors und es konnte gezeigt werden, dass eine Hypoxie über verschiedene Mechanismen zu Progression und Chemotherapieresistenz beitragen kann [21, 37, 57, 58]. Zudem können über die Gefäßverteilung innerhalb eines Tumors vermutlich Nischen mit unterschiedlichen Bedingungen geschaffen werden, was zur Heterogenität zwischen verschiedenen Tumoren und auch innerhalb eines Tumors beitragen könnte [21].

Verschiedene Wachstumsfaktoren können die Angiogenese stimulieren, einer mit zentraler Bedeutung ist VEGF. Eine erhöhte VEGF-Expression konnte bei verschiedenen Tumorentitäten mit einer schlechteren Prognose assoziiert werden [59]. Auch in der AML konnte gezeigt werden, dass

die Gefäßdichte, die MVD (microvessel density), im Knochenmark von AML-Patienten höher ist als bei Gesunden und eine negative prognostische Bedeutung besitzt [60, 61][62].

Während das Augenmerk bei den Mechanismen, die zur Initiation und Progression einer Tumorerkrankung sowie zu einer Therapieresistenz führen, früher nur auf der Tumorzelle selbst lag, konnte in letzter Zeit also gezeigt werden, dass auch das Stroma auf vielfältige Weise hierzu beitragen kann. Wie zuvor erläutert, können direkte Zellkontakte sowie von Stromazellen sezernierte Faktoren zu Progression und Therapieresistenz sowie vermutlich auch Initiation der Erkrankung beitragen. Die der Stroma-Tumorzell-Interaktion zugrundeliegenden Mechanismen sind allerdings noch unzureichend verstanden.

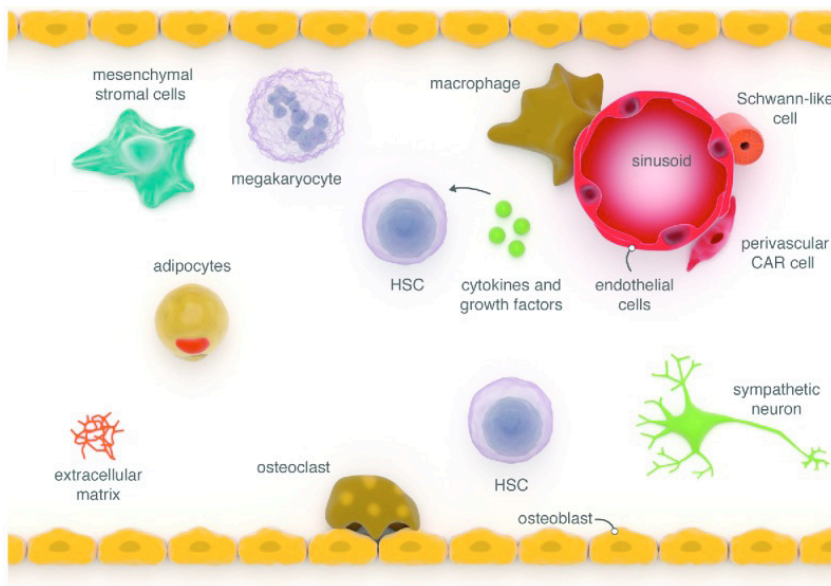
### *Das Microenvironment im Knochenmark*

#### *Nische der hämatopoetischen Stammzelle*

Die Knochenmarknische ist das Microenvironment der hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen und kontrolliert die Hämatopoese. Es besteht wahrscheinlich aus unterschiedlich zusammengesetzten Unternischen, die verschiedene Bedingungen bieten, so beispielsweise mehr die Quieszenz oder die Differenzierung der hämatopoetischen Zellen fördern. Während der Differenzierung scheinen die Vorläuferzellen dann zwischen den verschiedenen Nischen zu wechseln [63-66]. Allerdings ist dies sowie die genaue Zusammensetzung der Nischen noch unzureichend verstanden, bisher überwiegend nur im Mausmodell untersucht worden und wird teilweise noch sehr kontrovers diskutiert [63, 67].

Wichtige Bestandteile der Knochenmarknische sind die extrazelluläre Matrix und spezialisierte Zellen wie MSC, Osteoblasten, -klasten, Endothelzellen und retikuläre Zellen. Diese Zellen produzieren Zytokine, Chemokine und Adhäsionsmoleküle, die die Hämatopoese regulieren und sie an äußere Bedingungen und spezielle Erfordernisse, zum Beispiel einen erhöhten Bedarf an neuen Zellen bei Blutverlust, anpassen können.





**Abb. 3: Modell der hämatopoetischen Nische.** Die Knochenmarknische besteht aus verschiedenen Zellen wie mesenchymalen Stromazellen, Makrophagen, Adipozyten und Osteoblasten, die die hämatopoetischen Stammzellen (HSC) direkt über Zell-Zell-Kontakte sowie indirekt über die Produktion von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Extrazellulärmatrix (EZM) beeinflussen. CAR cell: CXCL12-abundant reticular cell. Krause et al. 2015 [68]

Die MSC besitzen auch im Knochenmark-Microenvironment eine zentrale Bedeutung und haben hier eine wichtige Funktion in der Regulation der Hämatopoese. So konnte beispielsweise im Mausmodell gezeigt werden, dass eine Depletion der Nestin<sup>+</sup> MSC zu einer Reduktion der HSC im Knochenmark führte [67]. Über Zytokine und Wachstumsfaktoren können sie self-renewal und Differenzierung der HSC steuern [31]. Zudem differenzieren MSC wie schon zuvor erläutert unter anderem in Osteoblasten und Adipozyten. Osteoblasten scheinen an der Regulation der Hämatopoese beteiligt zu sein, allerdings wird dies noch kontrovers diskutiert. So konnte gezeigt werden, dass Osteoblasten und Osteoprogenitoren wichtig für die Aufrechterhaltung eines Stammzellpools sind und Veränderungen in Osteoprogenitoren zu hämatopoetischer Insuffizienz, MDS und AML führen könnten [28, 69, 70]. In anderen Studien hingegen konnte kein direkter Einfluss der Osteoblasten auf die HSC beobachtet werden, hier waren allerdings auch nur einzelne Signalwege betrachtet worden [65, 71].

Adipozyten scheinen hingegen einen hemmenden Einfluss auf die Hämatopoese auszuüben. So wurde beobachtet, dass in adipozytenreichen Regionen des Knochenmarks die hämatopoetische Aktivität vermindert ist und dass Mäuse, bei denen die normalerweise durch Bestrahlung induzierte vermehrte Bildung von Adipozyten blockiert war, ein verbessertes Knochenmark-Engraftment zeigten [72].

Die Knochenmarknische ist also essentiell für die Regulation der physiologischen Hämatopoese; sie kontrolliert self-renewal, Quieszenz, Proliferation, Differenzierung und Apoptose der HSC,

um lebenslang einen Stammzellvorrat aufrecht zu erhalten und gleichzeitig eine unkontrollierte Expansion dieser Zellen zu verhindern [63, 73-75].

#### *Nische der leukämischen Stammzelle*

Wie zuvor beschrieben, reguliert die Knochenmarknische in der Hämatopoese wichtige Funktionen wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose der Zellen; Störungen in diesem Gleichgewicht können vermutlich zur Leukämie beitragen [74]. Wie unter 2.2.1 ausgeführt, kann das Stroma über Mechanismen wie direkten Zell-Zell-Kontakt oder sezernierte Faktoren das Wachstum von Krebszellen fördern. Für die Leukämie sind die zugrundeliegenden Mechanismen bisher weniger gut erforscht als für solide Tumore, aber auch für hämatologische maligne Neoplasien konnte gezeigt werden, dass das Stroma eine wichtige Rolle bei Progression, Resistenz und eventuell auch Initiation der Erkrankung zu spielen scheint [28, 41].

So wurde beobachtet, dass sich leukämische Zellen in den Knochenmarknischen ansiedeln und von den Bedingungen dort profitieren können [76, 77]. Im Mausmodell konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die MSC bei leukämischen Zellen Überleben und Chemotherapieresistenz über den NF- $\kappa$ B-Signalweg [41] und die Interaktion von Fibronectin des Stromas und VLA-4 (very late antigen 4) auf den Leukämiezellen [42] fördern konnten. Konopleva et al. beobachteten zudem eine verminderte Apoptose von leukämischen Zellen in Kokultur mit Stroma durch die Hochregulation von Genen der Bcl-2-Familie [39]. Für den TGF $\beta$ -Signalweg wurde in soliden Tumoren, wie zuvor ausgeführt, bereits vielfach gezeigt, dass er eine bedeutende Rolle bei der Tumprogression spielt und auch in der Leukämie scheint er beispielsweise zur Chemotherapieresistenz beitragen zu können [48].

Wie bei den soliden Tumoren liegen auch in der Leukämie Alterationen im Microenvironment vor. So konnte in den MSC in der AML eine veränderte DNA-Methylierung und Genexpression gezeigt werden [9, 30, 64]. Auch in funktionellen Assays wurden Veränderungen des Stromas in der Leukämie wie eine verminderte Differenzierung in Osteoblasten beobachtet [9, 25, 30]. Hier wurde auch gezeigt, dass diese Veränderungen zumindest teilweise durch die leukämischen Zellen selbst hervorgerufen sein könnten. Eine verminderte Differenzierung der MSC in Osteoblasten konnte nicht nur bei AML-MS, sondern auch bei den MSC gesunder Personen beobachtet werden, wenn sie mit dem Medium von AML-Zelllinien kultiviert wurden [9]. Auch im Mausmodell wurde eine verminderte Anzahl und funktionelle Inhibition von Osteoblasten und Osteoprogenitoren in der AML beobachtet, was zumindest teilweise durch das von den leukämischen Zellen sezernierte Chemokin CCL3 erklärt werden könnte [25].

Zudem konnte gezeigt werden, dass die im Stroma induzierten Veränderungen nicht nur zu einer vermehrten Unterstützung leukämischer Zellen, sondern eventuell auch zu einer selektiven Hemmung der physiologischen Hämatopoese beitragen können. Zhang et al. beobachteten im Mausmodell eine vermehrte G-CSF-Produktion der leukämischen Zellen, die zu einer verminderten CXCL12-Expression durch das Stroma führte mit vermindertem Homing und Verbleib der HSC

im Knochenmark, während die LSC hiervon unabhängig zu sein schienen [26]. Und auch bei AML-Patienten konnte eine veränderte Expression von Faktoren wie CXCL12 in den MSC beobachtet werden, die zu einem verminderten Support der HSC führte [27].

Im Stroma der Leukämie liegen also Alterationen vor, die wahrscheinlich zu Progression, Resistenz und eventuell sogar Initiation der Leukämie beitragen können sowie möglicherweise auch zur Insuffizienz der physiologischen Hämatopoese.

### *Stroma-Tumor-Interaktion als therapeutisches Target*

Mit Bevacizumab, einem VEGF-Antikörper, der 2004 von der FDA (Food and Drug Administration) zur Behandlung des metastasierten kolorektalen Karzinoms zugelassen wurde, konnte das erste Mal die Effektivität einer Therapie mit dem Tumor-Microenvironment als Therapietarget gezeigt werden [22]. Seitdem konnte in vielen weiteren Tumorentitäten ein Vorteil durch den Einsatz von VEGF-Antikörpern demonstriert werden [78-80]. Wie zuvor ausgeführt, ist auch im Knochenmark von Patienten mit AML die Gefäßdichte erhöht [60, 61] und in der Maus konnten mit VEGF-Blockade ein Rückgang der Gefäßdichte, eine Reduzierung der Zahl leukämischer Zellen in Blut, Milz, Leber und Knochenmark und ein verbessertes Überleben gezeigt werden [62]. Die Ergebnisse klinischer Studien mit VEGF-Antikörpern bei AML-Patienten sind allerdings recht heterogen [81, 82]. Ursächlich hierfür könnte zum einen die Redundanz proangionetischer Faktoren sein – neben VEGF beispielsweise FGF (fibroblast growth factor), PDGF (platelet-derived growth factor) und EGF (epidermal growth factor), die gerade auch in fortgeschrittenen Tumorstadien vermehrt exprimiert werden – und die heterogene VEGF-Expression unterschiedlicher Patienten [22]. Dies zeigt exemplarisch, wie wichtig es auch bei diesen Therapien ist, genau das Patientenkollektiv zu identifizieren, das von der Therapie profitiert.

Ein weiterer interessanter Ansatz ist die Beeinflussung der Antitumor-Immunantwort. Wie bereits unter 2.2.2.1 ausgeführt, ist das Immunsystem wichtig für die Bekämpfung maligner Zellen [43, 44]. Bei der Leukämie zeigt sich dies insbesondere beim Graft-versus-Leukemia-Effekt (GvL) nach allogener Stammzelltransplantation und Gabe allogener Lymphozyten, bei dem die Spenderlymphozyten gegen verbliebene Leukämiezellen vorgehen [44, 83].

Zurzeit werden verschiedene therapeutische Ansätze erforscht, die die Antitumor-Immunantwort nutzen. Besonders interessant sind hier die Checkpoint-Inhibitoren, die Bispecific T cell Engager (BiTE) und die CAR (chimeric antigen receptor)-T cells.

Checkpoint-Inhibitoren blockieren Signalwege, die das Immunsystem hemmen und können somit zu einer verstärkten Anti-Tumorantwort des Immunsystems beitragen. Angriffspunkte sind insbesondere CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4) und PD-1 (Programmed Cell Death 1 Protein). Diese werden vor allem von T-Zellen exprimiert und führen nach Bindung ihrer Liganden zu einer Hemmung der T-Zell-Funktion. Tumorzellen exprimieren die Liganden häufig vermehrt und können so einer Eradikation durch das Immunsystem entgehen [83, 84]. Die Check-

point-Inhibitoren blockieren die Interaktion von CTLA-4 und seinen Liganden CD80 und CD86 beziehungsweise von PD-1 und PD-L1 und -L2 und haben bei verschiedenen Tumorerkrankungen in klinischen Studien bereits positive Effekte gezeigt, insbesondere beim malignen Melanom und nicht-kleinzelligen Lungen-Karzinom [84, 85].

Die Bedeutung von Checkpoint-Inhibitoren in hämatologischen Neoplasien ist bisher noch deutlich weniger untersucht als in soliden Tumoren. Klinische Studien (bis Phase 2) wurden hier hauptsächlich bei Lymphomen durchgeführt und scheinen recht vielversprechend [86]. Kürzlich zeigte sich beispielsweise bei der PD-1-Blockade mit Nivolumab bei 23 Patienten mit rezidiviertem oder refraktärem Hodgkin-Lymphom ein Ansprechen bei 87% der Patienten mit einer kompletten Remission bei 17% [87].

In der AML gibt es bisher nur sehr wenige Daten zum Einsatz von Checkpoint-Inhibitoren. Sie weisen jedoch darauf hin, dass diese zumindest als Monotherapeutikum nicht so erfolgreich wie bei soliden Tumoren und Lymphomen zu sein scheinen [84, 86]. Interessanter scheint ihr Einsatz hier in Kombination mit Chemotherapie, anderen Immuntherapien und insbesondere auch nach allogener Stammzelltransplantation zu sein [84, 86]. Nach allogener Stammzelltransplantation könnte der GvL-Effekt hierdurch verstärkt werden, zudem wurde kürzlich gezeigt, dass der PD-1-Signalweg zumindest mitverantwortlich sein könnte für ein Rezidiv nach allogener Stammzelltransplantation [83].

Diese Ansätze werden zurzeit in präklinischen und klinischen Studien untersucht. So wird in einer Phase-2-Studie die Vakzinierung mit dendritischen Zellen in Kombination mit einer PD-1-Blockade in der AML getestet (NCT01096602) [88]. In einer weiteren klinischen Studie, einer Phase 1/1b Studie, wird aktuell der Einsatz von CTLA-4- bzw. PD-1-Blockade mit Ipilimumab und Nivolumab nach Rezidiv hämatologischer Neoplasien nach Stammzelltransplantation untersucht (NCT01822509) [89].

Ein anderer Ansatz für die Verbesserung der Antitumor-Immunantwort ist die Verwendung von BiTEs. Diese bispezifischen Antikörper verbessern die Rekrutierung und Aktivierung von T-Zellen, indem sie Tumor- und T-Zelle binden und eine immunologische Synapse herstellen. Ein BiTE, der bei der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) schon sehr erfolgreich ist, ist Blinatumomab. Dieser bindet CD3 auf T-Zellen und CD19 auf B-Zellen und verstärkt so die Antwort zytotoxischer T-Zellen gegenüber malignen B-Zellen [90, 91].

Eine weitere Strategie sind die CAR-T-Zellen, autologe T-Lymphozyten, die ex vivo modifiziert werden, so dass sie einen T-Zell-Rezeptor für Tumorantigene/ tumorassoziierte Antigene exprimieren. Bisher werden vor allem CAR-T-Zellen eingesetzt, die sich gegen CD19 bei B-Zell-Neoplasien richten. Diese haben bei redivierten und refraktären ALL-Patienten recht vielversprechende Ergebnisse gezeigt [91].

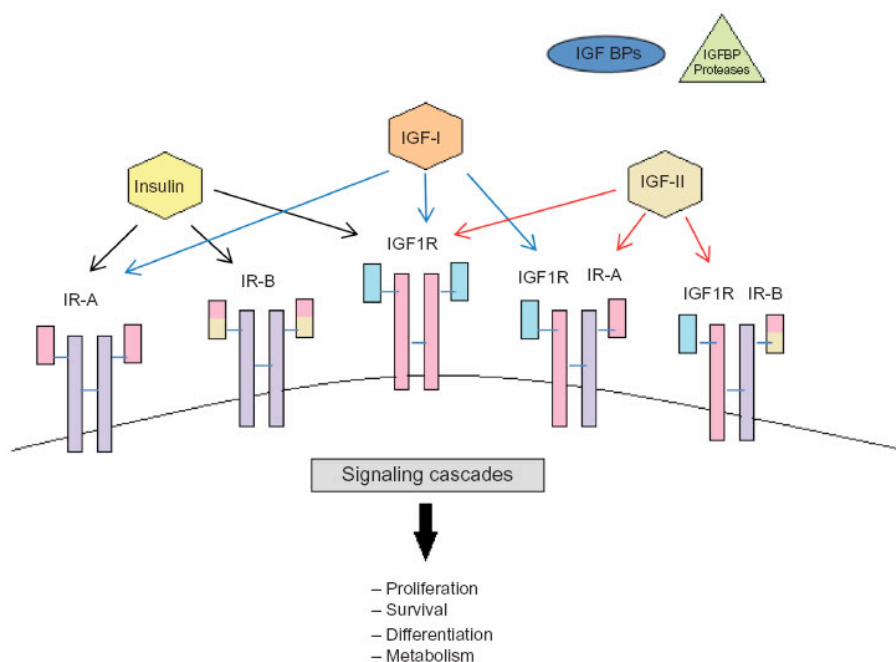
Dies zeigt also, wie vielversprechend das Tumor-Microenvironment als Zielstruktur für neue Therapien ist. Zudem wird aber auch ersichtlich wie wichtig es ist, die der Stroma-Malignom-Interak-

tion zugrundeliegenden Mechanismen weiter zu erforschen, um mit einem besseren Verständnis genauer die Patienten identifizieren zu können, die von den Therapien profitieren und darüber hinaus weitere Mechanismen aufzudecken, die als Therapietarget genutzt werden könnten.

#### *Der Wachstumsfaktor Insulin-like growth factor 2 als potentielles Therapietarget*

Der in dieser Arbeit untersuchte Wachstumsfaktor Insulin-like growth factor 2 (IGF2) wirkt insbesondere mitogen sowie antiapoptotisch und reguliert Differenzierung und Metabolismus. Eine besonders wichtige Rolle spielt er während der Embryonalentwicklung, wird aber auch im adulten Organismus weiterhin besonders von der Leber, aber auch von vielen weiteren Organen exprimiert. Seine Wirkung vermittelt IGF2 auto-, para- sowie endokrin [92-94].

Die IGF-Familie umfasst die Liganden IGF1, IGF2 und Insulin, die Rezeptoren IGF-1-Rezeptor (IGF-1R), Insulin-Rezeptor (IR), den IGF-1R/ IR-Hybridrezeptor und den IGF-2-Rezeptor (IGF-2R) sowie die Insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs), die insbesondere die Verfügbarkeit von IGF1 und IGF2 beeinflussen und darüber hinaus wahrscheinlich auch von IGF1 und 2 unabhängige eigene Effekte ausüben [92-94].



**Abb. 4: Die IGF-Familie.** Die Liganden IGF1, IGF2 und Insulin können über die Insulin-Rezeptoren IR-A und IR-B, den IGF-1-Rezeptor (IGF-1R) sowie die Rezeptor-Heterodimere IGF-1R-IR-A/B eine Signalkaskade induzieren, die Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Überleben und Metabolismus steuern. Zudem können die Liganden durch die Insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) gebunden werden; IGFBP-Proteasen können die IGFBPs spalten. Zielinska et al. 2015 [95]

Die Effekte von IGF2 werden hauptsächlich über den IGF-1R, den IR und den IGF1R/ IR-Hybridrezeptor vermittelt. Die Ligandenbindung führt zur Autophosphorylierung der Rezeptortyrosinkinasen, anschließend erfolgt über die IRS (Insulin-Rezeptor-Substrate) und SHCs (SH containing)



intrazellulär die Kopplung an den PI3K-Akt-mTOR- und den RAS-RAF-MEK-ERK-Signalweg. Zusätzlich bindet IGF2 an den IGF-2-Rezeptor. Der IGF-2R hat eine hemmende Wirkung auf den Signalweg, indem er eine Endozytose und Degradation von IGF2 ohne Signaltransduktion bewirkt und so die extrazelluläre IGF2-Konzentration senkt [96].

Die Regulation der Expression von IGF2 erfolgt insbesondere über Imprinting, bei dem die Genexpression von der Methylierung von DMRs (differentially methylated regions) abhängt: Die Gene für IGF2 und H19, eine non-coding RNA, die Vorläufer für verschiedene micro-RNAs ist, die die Zellproliferation u.a. über die Hemmung der IGF-1R-Expression hemmen, liegen zusammen auf Chromosom 11p15 und teilen sich einen Enhancer. Das maternale Chromosom ist an der DMR unmethyliert. Hier kann das DNA-binding zinc finger insulator protein CTCF binden, das die Expression von IGF2 verhindert, so dass nur H19 exprimiert wird. Auf dem paternalen Chromosom ist die DMR methyliert, was dazu führt, dass CTCF nicht binden kann; hier wird nur IGF2 exprimiert. Dies führt dazu, dass IGF2 nur von dem paternalen und H19 nur von dem maternalen Chromosom exprimiert wird. Eine Hypomethylierung (erasure of imprinting) führt zu einer Überexpression von H19 und einer verminderten IGF2-Expression, während eine Hypermethylierung (loss of imprinting, LOI) in einer IGF2-Überexpression und einer verminderten Expression von H19 resultiert. Ein LOI kann bei vielen Malignomen beobachtet werden wie auch bei der AML, wobei dies nicht immer mit der Genexpression korreliert. Der IGF-Signalweg ist aber bei Malignomen häufig verstärkt aktiv und es konnte eine wichtige Rolle des Signalwegs für Karzinogenese, Krankheitsprogression, Metastasierung und auch die Chemotherapieresistenz gezeigt werden [13, 92-94, 97, 98].

IGF2 ist somit eine interessante Zielstruktur für Therapien. Es stehen auch schon verschiedene Ansätze für die Hemmung des Signalweges zur Verfügung, die aktuell in klinischen Studien, überwiegend bei soliden Tumoren, getestet werden.

### **Fragestellung**

Die AML ist noch immer eine Erkrankung mit einer sehr schlechten Prognose, insbesondere für Ältere und Patienten, die zur Hochrisikogruppe gehören [1, 19]. Daher ist es wichtig, hier neue Therapieansätze zu identifizieren.

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen malignen Zellen und ihrem Stroma eine bedeutende Rolle bei der Progression, eventuell auch Initiation der Erkrankung sowie der Therapieresistenz zu spielen scheint. Das Tumorstroma stellt somit einen interessanten Angriffspunkt für neue Therapien dar [22, 28, 41, 84, 86]. Insbesondere für hämatologische Neoplasien sind die zugrundeliegenden Mechanismen allerdings noch unzureichend verstanden.

Mesenchymale Stromazellen haben eine wichtige Bedeutung in der Hämatopoese [31, 67] sowie im Tumor-Microenvironment [39-42]. Daher soll in dieser Arbeit die Genexpression in mesenchymalen Stromazellen des Knochenmarks (BM-MS) von Patienten mit AML im Vergleich

zu gesunden Probanden untersucht werden. Auf diese Weise sollen Kandidatengene identifiziert werden, deren veränderte Expression die Leukämie beeinflussen könnte und die somit potentielle Zielstrukturen für neue Therapien darstellen.

Hierfür sollen zunächst die mittels Microarray generierten Genexpressionsdaten der BM-MSC von 19 Patienten mit AML und 4 gesunden Probanden mit Hilfe bioinformatischer Analysen und Literaturrecherche analysiert und so Kandidatengene identifiziert werden.

Anschließend soll deren Expression mit quantitativer real-time PCR (qRT-PCR) an einem unabhängigen Patientenkollektiv bestimmt und für einen ausgewählten Kandidaten funktionelle Analysen angeschlossen werden.

### III Materialien und Methoden

#### Materialien

##### *Probenmaterial*

##### *Patientenproben*

Bei den verwendeten Proben handelte es sich um Knochenmarkaspirate von AML-Patienten (eingeschlossen in das SAL-AML-Register, Universität Dresden) und gesunden Normalpersonen, aus denen BM-MSC isoliert wurden. Alle Personen hatten eine Einverständniserklärung nach den Vorgaben der Deklaration von Helsinki zur Probenentnahme und anschließenden wissenschaftlichen Nutzung unterschrieben und es lag ein positives Ethikvotum für die Verwendung der Knochenmarkaspirate vor.

##### *Patientenproben für Microarray-Analysen*

	AML Erstdiagnose	Normalpersonen
Gesamtanzahl	19	4
Alter bei Probenentnahme	Median: 56 Jahre, range 27 – 79 Jahre	Median: 23 Jahre, range 21 – 59 Jahre
Geschlecht	53 % männlich, 47 % weiblich	50 % männlich, 50 % weiblich

**Tab. 1: Proben-Zusammensetzung für Microarray-Analysen.** Gezeigt ist, wie viele Personen jeweils eingeschlossen wurden, in welchem Zeitraum die Proben gewonnen wurden und die Verteilung von Alter und Geschlecht bei den eingeschlossenen Personen.

##### *Patientenproben für Validierung mittels quantitativer real-time PCR*

	AML Erstdiagnose	Normalpersonen	AML Remission
Gesamtanzahl	61	9	44
Alter bei Probenentnahme	Median: 53 Jahre, range: 18-82 Jahre	Median: 25 Jahre range: 21-59 Jahre	Median: 59 Jahre, range: 19-77 Jahre
Geschlecht	67% männlich, 33% weiblich	44% männlich, 46% weiblich	52% männlich, 48% weiblich

**Tab. 2: Proben-Zusammensetzung für Microarray-Analysen.** Gezeigt ist, wie viele Personen jeweils eingeschlossen wurden, in welchem Zeitraum die Proben gewonnen wurden und die Verteilung von Alter und Geschlecht bei den eingeschlossenen Personen.



### Zelllinien

Die Zelllinien KG-1a, K562 und U-937 wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) erworben. Die Zelllinie HS-5 stammt von der American Type Culture Collection (ATCC).

Zelllinie	Zelltyp	Herkunft
KG-1a	AML (Erythroleukämie)	Knochenmark von 59-jährigem Mann
K-562	CML (Blastenkrise), BCR-ABL-positiv	Pleuraerguss von 53-jähriger Frau
U-937	Großzellig anaplastisches Lymphom	Pleuraerguss von 37-jährigem Mann
HS-5	Stromazellen (Morphologie: Fibroblast)	Knochenmark von 30-jährigem, gesundem Mann

**Tab. 3: Zelllinien.** Gezeigt sind Tumorentität und Ursprung der Zellen.

### Primer

Die Primersequenzen entstammen entweder der Primer-Bank (<http://pga.mgh.harvard.edu/primer-bank/>) oder wurden selber designt. Dies geschah mit Hilfe der Software Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>), wobei die Gensequenz der Ensembl Genom-Datenbank (<http://www.ensembl.org/index.html>) entnommen wurde. Anschließend wurden die Primersequenzen noch einmal hinsichtlich ihrer Zielstruktur überprüft (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>).

Alle Primer wurden durch die Firma Metabion synthetisiert.

Gen	Orientierung	Nukleotidsequenz [5'→3']	Amplikongröße [bp]
FN1	FWD	CGGTGGCTGTCAGTCAAAG	130
	REV	AAACCTCGGCTTCCTCCATAA	
COL1A1	FWD	TCACCCACCGACCAAGAAAC	230
	REV	ACGAAATTCTCCGGTTGAT	
TGFB1	FWD	CTAATGGTGGAAACCCACAACG	209
	REV	TATCGCCAGGAATTGTTGCTG	
THBS1	FWD	AGACTCCGCATCGCAAAGG	157
	REV	TCACCACGTTGTTGTCAAGGG	
CTNNB1	FWD	AAAGCGGCTGTTAGTCACTGG	215
	REV	CGAGTCATTGCATACTGTCCAT	
SMAD3	FWD	TCCATCCCGAAAACACTAA	126
	REV	CATGCTGTGGTTCATCTGGT	
IGF2	FWD	GGAGACGTACTGTGCTACCC	124
	REV	CTGCTCCAGGTGTCATATTGG	

IGFBP4	FWD	CCCACGAGGACCTCTACATC	172
	REV	CAGTCCAGCTCCCCCTTT	
IGFBP5	FWD	GGTTTGCCTCAACGAAAAGA	136
	REV	ACTGCTTCAGCCTTCAGCTC	
ENTPD1	FWD	CAGGGTGCCAGGATCATTAC	110
	REV	GGGACTATGCTGAACCACCTT	
KITLG	FWD	AATCCTCTCGTCAAAACTGAAGG	163
	REV	CCATCTCGCTTATCCAACAATGA	
Hspg2	FWD	GTGTGGTGTTCATCAAGGAGC	146
	REV	GGGAGAGGTGACGTAGGAGG	
ILK	FWD	CCTGCACTATGCCTGTTTTTGG	193
	REV	TGTGTCCTTGTATGGAATACGGT	
FYN	FWD	GACCTCCATCCCCAACTACA	167
	REV	CATCTTCTGTCCGTGCTTCA	
VEGFA	FWD	GGAGTGTGTGCCCACTGAG	100
	REV	GTGCTGTAGGAAGCTCATCTCTC	
CTSZ	FWD	GCTCCTGTGAAGGGGGTAAT	155
	REV	GGCGTGGCACTCTTTGAAT	
CALR	FWD	CCCGATCCCAGTATCTATGC	103
	REV	CGTTGGTGATGAGGAAGTTG	
PLAU	FWD	GCTTGTCCAAGAGTGCATGGT	153
	REV	CAGGGCTGGTTCTCGATGG	
CDH11	FWD	GAGGGGCAGGTGCTACAG	159
	REV	TCCTTCCCCTGAGAGAATGT	
ITGA11	FWD	GTCACCCTGTCCAACGTGTC	142
	REV	TCCCTGTGGTGTAGTAGGAGC	
WISP1	FWD	CGGGGCCTCTACTGTGACTA	118
	REV	AGGACTGGCCGTTGTTGTAG	
WNT5a	FWD	CCTAGTGGCTTTGGCCATATT	100
	REV	TTCTGACATCTGAACAGGGTTA	
LRP5	FWD	GGCGTGTGCTGGTCAATG	164
	REV	AATGTGCGGGAGCTTGTC	
PSEN1	FWD	CCTGCACCGTTGTCCTACTT	101
	REV	TGCTCCTGCCGTTCTCTATT	
CCL28	FWD	TGCACGGAGGTTTCACATCAT	182
	REV	TTGGCAGCTTGCACTTTCATC	
TGFB2	FWD	CGCCAAGGAGGTTTACAAAA	153
	REV	CTGAGACGTCAAATCGAACAA	
CXCL12	FWD	TCAGCCTGAGCTACAGATGC	161
	REV	CTTTAGCTTCGGGTCAATGC	
VEGFB	FWD	GAGATGTCCCTGGAAGAACACA	172
	REV	GAGTGGGATGGGTGATGTCAG	
LGALS3	FWD	GCCTTATAACCTGCCTTTGC	142

	REV	GAAGCGTGGGTAAAGTGGA	
SOX9	FWD	AGTACCCGCACTTGCACAAC	153
	REV	GCGGCTGGTACTTGTAAATCC	
CD274	FWD	CACAGATGTGAAATTGCAGGA	152
	REV	CATGTTTCAGAGGTGACTGGA	
CD200	FWD	CAGGATGCCCTTCTCTCATC	101
	REV	TTTCATCCTGGGTCACCACT	
CDCA7	FWD	CAGAAACCAAGGCCAGATGT	176
	REV	ACCCTGAGAGGTCCAGAGTG	
ATTF3	FWD	AGCCCCTGAAGAAGATGAAA	152
	REV	TCTGAGCCTTCAGTTCAGCA	
EGF	FWD	TGGGTGGATTTAGAAAGACAAC	109
	REV	TCCAATTTATTGCCATTCCAG	
DCN	FWD	TCCTGATGACCGCGACTT	116
	REV	GAGTTGTGTCAGGGGGAAGA	
ACAN	FWD	CTGCAGAACAGTGCCATCAT	163
	REV	CACCAGGAAACTCATCCTTG	
CTSD	FWD	ATTCAGGGCGAGTACATGATCC	117
	REV	CGACACCTTGAGCGTGTAG	
FST	FWD	TTCAAGTGGATGATTTTCAACG	109
	REV	TCTTCTTGTTTCATTCGGCATT	
CLU	FWD	AACGAAGAGCGCAAGACACT	113
	REV	ACTCCTGGGAGCTCCTTCAG	
PLAG1	FWD	GCATACAACAAGACTGCACCA	102
	REV	CACAATAATTACTTGTGGGTTTTTC	
LIMS1	FWD	CGCTGAGAAGATCGTGAACA	158
	REV	GACAGCAAGGGGCAAGAG	
NT5E	FWD	ACCAGGGCACTATCTGGTTC	134
	REV	CAGGGTGCCAGGATCATTAC	
Primer für cD-NA-Synthese (Oligo dT 20)		TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	

**Tab. 4: Sequenzen der verwendeten Primer (FWD Primer: Bindung an Antisense-Strang, REV Primer: Bindung an Sense-Strang der DNA) und die Amplikongröße in Basenpaaren (bp).**

*Enzyme*

DNase

Macherey-Nagel

MMLV HP (Reverse Transkriptase)

Epicentre Biotechnologies

RNasin® Plus (RNase-Inhibitor)

Promega



Zentrifuge Centrifuge 5804R

Eppendorf

Thermal Cycler 2720

Applied Biosystem

Mikroskop ID03

Zeiss

### *Computerprogramme*

Pubmed ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/</a> )	Literaturrecherche
DAVID Bioinformatics Resources 6.7 ( <a href="https://david.ncifcrf.gov/">https://david.ncifcrf.gov/</a> )	Bioinformatische Auswertung
GraphPad Prism version 5.0	Statistische Auswertung
Ensembl Genome Browser ( <a href="http://www.ensembl.org/index.html">http://www.ensembl.org/index.html</a> )	Primerdesign
Primer3 ( <a href="http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/">http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/</a> )	Primerdesign
BLAT Search Genome ( <a href="https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat">https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat</a> )	Primerdesign

## **Methoden**

### *Vorarbeiten*

Die für die Analysen dieser Arbeit verwendeten Genexpressionsdaten stammen aus vorangegangenen Versuchen der Arbeitsgruppe. Ziel war der Vergleich der Genexpression in mesenchymalen Stromazellen des Knochenmarks (BM-MSK) von Patienten mit AML und gesunden Probanden (Normalpersonen, NP).

Hierfür wurden Knochenmarkaspirate von 19 Patienten mit neu diagnostizierter AML und 4 Normalpersonen verwendet (s. 3.1.1.1). Mittels Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation wurden die mononukleären Zellen isoliert und anschließend kultiviert. Nach 24 Stunden wurden die nicht adhären Zellen entfernt und die BM-MSK über 4 Passagen expandiert. Die BM-MSK waren durch ihre Plastikadhärenz, ihr Differenzierungspotential in Adipozyten und Osteoblasten und die Oberflächenmarker CD73<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup>/CD271<sup>dim/-</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD33<sup>-</sup> definiert [32]. Die RNA dieser Zellen wurde anschließend isoliert, um die globale Genexpression der Zellen mittels Microarray zu bestimmen (HG-U 133 Plus 2.0-GeneChip (Affymetrix)). Die hiermit gewonnenen Daten wurden anschließend mit der RMA-Methode (Robust Multichip Average) normalisiert und mit dem Programm GeneSpring Software 4.2 (Silicon Genetics, Redwood City, CA) ausgewertet. Um eine Liste mit bei der AML differentiell exprimierten Genen zu erhalten, wurden die Gene eingeschlossen, die bei der AML im Vergleich zu den Normalpersonen mindestens 1,5-fach über- oder unterexprimiert waren, FDR < 0,05. Zudem waren „present calls“ von mindestens 75% gefordert (Expression des Gens in mindestens 75% der Proben).

### *Datenanalyse*

Die mittels Microarray gewonnenen Genexpressionsdaten wurden mit Hilfe der bioinformatischen Software DAVID bioinformatics resources und Literaturrecherche analysiert, um interessante Kandidaten für eine Validierung mittels qRT-PCR zu identifizieren. Der Fokus lag hier insbesondere auf Genen, deren Produkte sezerniert werden oder membranständige Liganden darstellen und somit die Leukämiezellen direkt beeinflussen können.

#### *DAVID bioinformatics resources*

DAVID bioinformatics resources ist eine bioinformatische Software, die frei im Internet verfügbar ist und mit der große Gen- und Proteinlisten hinsichtlich ihrer Funktion analysiert werden können.

Hierfür werden jeweils für einen Signalweg oder eine biologische Funktion der Anteil der in der Liste vorhandenen Gene an der Liste mit dem Anteil, den die in den Signalweg involvierten Gene am Gesamtgenom haben, verglichen. Somit kann mittels DAVID bioinformatics resources ermittelt werden, welche Signalwege und biologischen Funktionen wie stark angereichert bzw. geringer repräsentiert sind und welche Gene jeweils involviert sind.

Die Listen mit bei der AML hoch- bzw. herunterregulierten Genen wurden hierfür bei DAVID bioinformatics resources (<http://david.ncifcrf.gov/>) hochgeladen und insbesondere hinsichtlich der angereicherten Signalwege und der übergeordneten biologischen Funktionen („Gene-Ontology“-Applikation, GOTERM\_bp\_5 und „Functional Annotation Clustering“) untersucht.

#### *Pubmed*

Die Recherche mittels Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) fand in den Jahren 2012 - 2014 statt. Hierbei wurden sowohl Gene aus der Analyse mit DAVID bioinformatics resources weiterverfolgt als auch weitere Gene, die aus pathophysiologischen Gründen relevant erschienen.

### *Gewinnung von Probenmaterial*

#### *Primäre Zellen*

Die Gewinnung von BM-MSC und leukämischen Blasten wurde nicht selbst durchgeführt und erfolgte auf die gleiche Weise wie die der BM-MSC für die Microarrays (s. 3.2.1).

Die RNA der BM-MSC wurde bei -80°C gelagert, die Blasten direkt anschließend für Proliferations-Assays verwendet (s.3.2.8).

#### *RNA-Isolation*

Die Ribonukleinsäure (ribonucleic acid, RNA) der Zellen wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kits von QIAGEN isoliert.

Die Zellen werden hierbei zunächst lysiert, homogenisiert und die Proteine (somit auch die RNasen) denaturiert. Die RNA wird an eine Silicagelmembran gebunden, während die anderen Zellbestandteile in mehreren Waschschriften entfernt werden. Durch Zugabe einer DNase wird die noch enthaltene DNA abgebaut. Abschließend wird die RNA mit 30µl RNase-freiem Wasser von der Silicagelmembran der Säule eluiert.

Die RNA-Isolation erfolgte nach Angaben des Handbuchs des Herstellers.

#### *Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren*

Die Konzentration und Reinheit der RNA und DNA wurden mittels Spektralphotometer (Nano-Drop) bestimmt. Hierfür wird die Lichtabsorption bei 230, 260 und 280 nm gemessen.

Da Nukleinsäuren ihr Absorptionsmaximum bei 260 nm haben, kann aus der Lichtabsorption bei 260 nm deren Konzentration berechnet werden.

Proteine hingegen haben ihr Absorptionsmaximum bei 280 nm. Das Verhältnis der Messwerte bei 260 nm und 280 nm ist somit ein Maß für die Proteinverunreinigung der Probe; das Optimum liegt für reine DNA bei 1,8, für reine RNA bei 2,0.

Ethanol und andere Lösungsmittel haben ihr Absorptionsmaximum bei 230 nm, so dass analog zu der Proteinverunreinigung hiermit die Verunreinigung der Probe mit Lösungsmitteln bestimmt werden kann. Das Verhältnis der Messwerte bei 260 und 230 nm sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

#### *cDNA-Synthese*

Aus der zuvor isolierten RNA wurde mit Hilfe von reverser Transkriptase RNA in cDNA (complementary DNA) umgeschrieben.

RNA, reverse Transkriptase, Oligo dT20 Primer, Nukleotide (dNTPs) und ein RNase-Inhibitor wurden zusammengegeben. Die RNA dient als Vorlage für die durch die reverse Transkriptase zu synthetisierende cDNA. Die Oligo dT20 Primer können an den Poly-A<sup>+</sup>-Schwanz der mRNAs binden, so dass die gesamte mRNA in cDNA umgeschrieben werden kann. Die dNTPs dienen hierbei als Bausteine und ein RNase-Inhibitor verhindert den Abbau der RNA.

	Volumen [µl]
MMLV HP (200 U/µL) (reverse Transkriptase)	0,50
Oligo dT20 Primer	2,00
dNTP (10 mM)	2,00
Puffer (10x)	2,00
RNase Inhibitor (40 U/µL)	0,50
Wasser	2,00
500 ng RNA in einem Volumen von 11 µl	11,00
total	20,00

Die Synthese erfolgte im Thermocycler, wo die Ansätze für eine Stunde bei 50°C inkubiert wurden. Die cDNA wurde anschließend bei -20°C gelagert.

#### *Validierung von Kandidatengenens mittels quantitativer real-time PCR (qRT-PCR)*

Die mittels Literaturrecherche und bioinformatischer Analysen identifizierten Kandidatengene wurden an einem Set von zunächst 4 AML und 4 NP untersucht. Hierbei sollte getestet werden, ob die mittels Microarray beobachteten Expressionsunterschiede an einem unabhängigen Kollektiv mit Hilfe von qRT-PCR reproduziert werden können.

Anschließend wurde die Expression ausgewählter Kandidatengene in einer größeren Kohorte bestimmt.

#### *Primerdesign*

Die Primersequenzen entstammen entweder der Primer-Bank (<http://pga.mgh.harvard.edu/primer-bank/>) oder wurden selber designt. Dies geschah mit Hilfe der Software Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>), wobei die Gensequenz der Ensembl Genom-Datenbank (<http://www.ensembl.org/index.html>) entnommen wurde. Anschließend wurden die Primersequenzen noch einmal hinsichtlich ihrer Zielstruktur überprüft (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>).

#### *Testen der Spezifität der Primer mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)*

Bei der Polymerase-Kettenreaktion wird eine bestimmte, von Primern flankierte DNA-Sequenz durch eine DNA-Polymerase vervielfältigt.

Zur Testung der Spezifität der Primer wurde mit diesen eine PCR mit cDNA der humanen Stromazelllinie HS-5 durchgeführt und nach anschließender Gelelektrophorese das einzelne Produkt beurteilt. Dieses musste die erwartete Größe aufweisen und es durften keine unspezifischen Banden vorhanden sein.

Zusammensetzung jedes PCR-Reaktionsansatzes:

	V o l u m e n [μl]
HOTSTAR Taq Mastermix	12,5
Wasser	7,5
Primer (FWD)	1,5
Primer (REV)	1,5
HS-5 cDNA	2



Anschließend erfolgte die Inkubation im Thermocycler mit folgenden Reaktionsbedingungen:

Aktivierung der DNA-Polymerase (10 Min. 95°C), dann 35 Zyklen folgender Reaktionen:		
Phase	Temperatur [°C]	Dauer [sec]
<b>Denaturierung:</b> Aufspaltung doppelsträngiger DNA in Einzelstränge	95	30
<b>Annealing:</b> Primer-Anlagerung an DNA	60	30
<b>Elongation:</b> Synthese des komplementären DNA-Strangs	72	60
Abschließend fand eine zehnmünütige Elongationsphase statt, um sicherzustellen, dass alle DNA-Moleküle vollständig verlängert wurden. Das PCR-Produkt wurde nach Beendigung des Prozesses bei 4°C gekühlt.		

### *Agarose-Gelelektrophorese*

Nach der PCR wurde mit den PCR-Produkten eine Gelelektrophorese durchgeführt. Mit dieser können DNA-Moleküle hinsichtlich ihrer Größe aufgetrennt werden.

Hierfür werden die PCR-Produkte auf ein Agarose-Gel aufgetragen und eine elektrische Spannung angelegt. Die negativ geladenen DNA-Moleküle wandern daraufhin von der Kathode Richtung Anode. Durch die Siebwirkung des Gels können kleinere Fragmente schneller wandern und somit eine weitere Strecke zurücklegen. Gleichzeitig läuft ein Größenstandard mit, so dass anschließend die Größe der Fragmente abgeschätzt werden kann. Mit UV-Licht können die Banden durch das in die DNA-Doppelstränge eingelagerte Ethidiumbromid sichtbar gemacht werden.

Herstellung des Agarosegels (1,5%-ig):		
Substanz	Konzentration der Stammlösung	Menge
Agarose		1,5 g
Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer	1 x	100 ml
Ethidiumbromid	10 mM	10 µl
Anschließend wurden jeweils 8 µl PCR-Produkt mit 2 µl Ladepuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Bei einer Spannung von 100 V erfolgte die Auftrennung über eine Stunde bzw. bis die Lauffront (Bromphenolblau) ca. 2/3 der Strecke zurückgelegt hatte.		

### *Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)*

Die qRT-PCR beruht auf dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion und ermöglicht eine quantitative Bestimmung von DNA-Molekülen während jedes einzelnen PCR-Zyklus. Das Fluorophor Sybr Green lagert sich dabei in die Doppelstränge der DNA-Moleküle ein, so dass das Fluoreszenzsignal mit zunehmender DNA-Menge ansteigt. Die Intensität des Fluoreszenzsignals korreliert dabei in einem gewissen Bereich linear mit der Menge an doppelsträngiger DNA.

Die relative Expression des Gens kann anschließend mit der CT-Methode berechnet werden:

Der CT-Wert (cycle threshold) gibt die Anzahl von Zyklen an, nach denen die Fluoreszenz einen bestimmten Schwellenwert (Threshold) erreicht hat. Dieser Schwellenwert für die Fluoreszenz wird für jeden Lauf festgelegt und befindet sich über dem Hintergrundsignal und in der exponentiellen Phase der Amplifikation. Je mehr Ausgangs-DNA vorhanden war, desto früher wird dieser Punkt erreicht, desto niedriger ist der CT-Wert. Indem die mRNA des „gene of interest“ (GOI) in cDNA umgeschrieben und mittels qRT-PCR quantifiziert wird, kann also indirekt die Expression des Gens bestimmt werden.

Zudem wird für jede Probe die Expression von einem „housekeeping gene“ mitgemessen, dessen Expression konstant sein sollte und das als Referenzgen dient. Durch die Subtraktion der CT-Werte der beiden Gene ( $dCT = CT_{\text{housekeeping gene}} - CT_{\text{GOI}}$ ) kann die relative Expression des GOI als  $2^{dCT}$  angegeben werden.

Für diese Versuche wurde als „housekeeping gene“ das Gen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) gewählt. Die Bestimmung der Messwerte erfolgte in Duplikaten und mit folgender Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (Menge jeweils pro Ansatz):

	Menge [ $\mu$ l]
SYBR Green/ ROX qPCR Master Mix	12,5
Primermix (FWD, REV)	0,5
Wasser	10
cDNA	2

Die Amplifizierung fand in einem Masterzykler mit folgendem Programm statt:

Temperatur [ $^{\circ}$ C]	Dauer [min]
50	2
95	10

Anschließend 40 Zyklen:

Phase	Temperatur [ $^{\circ}$ C]	Dauer [sec]
Denaturierung	95	15
Annealing	55	15
Elongation	72	30

Anschließend:

Temperatur [ $^{\circ}$ C]	Dauer [sec]
95	15
60	15
60 > 95	20 min
95	15

Bei der abschließenden Schmelzkurvenanalyse wird die Temperatur langsam erhöht und somit die DNA wieder in ihre Einzelstränge aufgespalten. Das Sybr Green wird dadurch freigesetzt,

was zu einem Abfall des Fluoreszenzsignals führt. Je nach Länge des DNA-Segments sind für die Aufspaltung unterschiedliche Temperaturen notwendig. Somit kann das gewünschte PCR-Produkt identifiziert und von unspezifischen unterschieden werden, wie beispielsweise Primer-Primer-Dimeren, die bereits bei einer deutlich geringeren Temperatur in ihre Einzelstränge aufgespalten werden.

#### *Rezeptorexpression bei leukämischen Blasten und Stromazellen*

Die Daten für die Analyse der Rezeptorexpression in den Blasten stammen aus Vorversuchen der Arbeitsgruppe. Hierbei handelt es sich um Microarraydaten von AML-Blasten und CD34+ Zellen gesunder Normalpersonen [99, 100].

Die Daten für die Stromazellen entstammen den unter 3.2.1 beschriebenen Microarray-Versuchen. Die Auswertung erfolgte anschließend mit der Software GraphPad Prism v.5.0 (Graph Pad Software, USA).

#### *Korrelation von Genexpression und Ausprägung klinischer Parameter*

Die Korrelation erfolgte mit Hilfe einer Patientendatenbank, die anhand von Angaben aus Arztbriefen und schriftlichen Untersuchungsbefunden erstellt wurde. Mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS wurde anschließend für jeden Patienten die Expression des Kandidatengens mit der Ausprägung prognostisch relevanter klinischer Merkmale korreliert.

Hierfür wurden die Patienten anhand der Genexpression in 2 Gruppen eingeteilt: Patienten, bei denen die Genexpression über dem Mittelwert + 2 Standardabweichungen der gesunden Normalpersonen lag, wurden der Gruppe „IGF2 high“, die anderen der Gruppe „IGF2 low“ zugeteilt.

Die Korrelation mittels SPSS erfolgte mit der Hilfe von Herrn PD Dr. Martin Neumann (AG Balduş).

#### *Methoden in der Zellkultur*

Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an der Sterilwerkbank durchgeführt.

##### *Allgemeine Kulturbedingungen*

Alle Zellen wurden mit RPMI-Medium 1640 kultiviert. Diesem wurde fötales Kälberserum (fetal calf serum, FCS) in unterschiedlichen Konzentrationen je nach Zelllinie (s. Tab. 5) und 1% Antibiotika-Antimykotika-Lösung ( $\alpha\alpha$ ) zugesetzt. Das Wachstum erfolgte im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

Die Zellen wurden 3x/ Woche passagiert und dabei auf folgende Zellzahlen eingestellt:

Zelllinie	FCS-Konzentration	Zellzahl nach Passagieren
KG-1a	20 %	0,5 x 10 <sup>6</sup> Zellen/ml
K-562	10 %	0,1 x 10 <sup>6</sup> Zellen/ml
U-937	10 %	0,1 x 10 <sup>6</sup> Zellen/ml
HS-5	20 %	Bei 80-90 % Konfluenz: 1/5 der Ausgangszellzahl

**Tab. 5: Kulturbedingungen.** Gezeigt ist für jede Zelllinie die FCS-Konzentration des Mediums und auf welche Zellzahl die Zellen beim Passagieren eingestellt wurden.

### *Bestimmung der Zellzahl*

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen mit Trypanblau versetzt, das vitale Zellen auf Grund einer intakten Zellmembran ungefärbt lässt, die anderen hingegen blau anfärbt. Anschließend wurden die vitalen Zellen unter einem Lichtmikroskop mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels folgender Formel:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{x Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

### *Auftauen und Einfrieren von Zellen*

#### *Auftauen*

Die Zellen aus dem Stickstofftank wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und anschließend sofort in 10 ml Medium aufgenommen. Um die Reste des Einfriermediums zu entfernen, wurden die Zellen nachfolgend zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in frischem Medium aufgenommen.

#### *Einfrieren*

Für das Einfrieren der Zellen wurde das Medium abzentrifugiert und das Zellpellet in Einfriermedium (FCS + 10% DMSO) in einem Kryoröhrchen aufgenommen (max. 1x10<sup>7</sup>/ml).

Anschließend wurden die Zellen für ein langsames Abkühlen in einer Einfrierbox bei -80°C gelagert. Für eine längere Aufbewahrung wurden die Röhrchen abschließend in einen Tank mit flüssigem Stickstoff überführt.

### *Proliferations-Assay mittels WST1-Reagenz*

Die Zelllinien KG-1a, K-562 und U-937 sowie leukämische Blasten wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von rekombinantem Insulin-like growth factor 2 (rhIGF2) für 24 – 96 Stunden inkubiert. Mit Hilfe des WST-Assays wurde anschließend die Auswirkung des IGF2 auf die Proliferation der Zellen untersucht.

### *Behandlung der Zellen mit rhIGF2*

#### *Zelllinien*

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in 96-Well-Mikrotiterplatten mit jeweils 6 Replikaten pro Ansatz. Da FCS verschiedene Wachstumsfaktoren enthält, wurden die Zellen zunächst gewaschen und anschließend in RPMI-Medium ohne FCS-Zusatz mit 1 %  $\alpha\alpha$  aufgenommen.

Die Zellzahl entsprach der Zellzahl nach normalem Passagieren (s. 3.2.8.1). Anschließend wurden verschiedene Konzentrationen rhIGF2 hinzugegeben mit folgenden Ansätzen:

- Medium ohne Zellen (für die Bestimmung des Hintergrundsignals)
- Zellen ohne rhIGF2
- Zellen + 10 ng rhIGF2/ml
- Zellen + 100 ng rhIGF2/ml
- Zellen + 200 ng rhIGF2/ml

Die Zellen wurden in einem Volumen von 100  $\mu$ l/Well ausgesät und die Inkubation erfolgte anschließend bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> für 24, 48, 72 und 96 Stunden.

#### *Leukämische Blasten*

Der Versuchsaufbau für die Blasten entsprach dem für die Zelllinien, jedoch wurden die Blasten in RPMI-Medium mit 10% FCS kultiviert, da sie die Abwesenheit von FCS schlechter tolerierten. Sie wurden in einer Zellzahl von  $5 \times 10^5$  Zellen/ml ausgesät. Zudem erfolgte die Bestimmung auf Grund des begrenzten Materials in Vierfachbestimmung.

#### *WST-Assay*

Bei dem WST-Assay wird das Tetrazoliumsalz WST (water soluble tetrazolium salt) zu den Zellen hinzugegeben und durch deren mitochondriale Dehydrogenasen zu Formazan umgesetzt. Dies bewirkt einen Farbumschlag, der photometrisch gemessen werden kann. Die Signalstärke ist somit abhängig von der Anzahl der Zellen und deren metabolischen Aktivität, so dass die Signalstärke mit der Anzahl vitaler Zellen korreliert.

Die WST-Lösung wurde zunächst mit RPMI-Medium 1:1 verdünnt, anschließend wurden jeweils 20  $\mu$ l/Well zu den Zellen hinzugegeben. Nach einer zweistündigen Inkubation bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde mit dem Spektrophotometer (Elisa-Plattenlesegerät) die Absorption bei 450 nm bei einer Referenzwellenlänge von 620 nm bestimmt.

#### *Statistik*

Die statistischen Analysen und graphischen Darstellungen erfolgten mit der Software GraphPad Prism v.5.0 (Graph Pad Software, USA).

Für die Prüfung auf Signifikanz wurden mit Hilfe des non-parametrischen Mann-Whitney-U-Tests die Mittelwerte zweier Stichproben verglichen,  $p$  (zweiseitig)  $< 0,05$  wurde als ein statistisch signifikanter Unterschied gewertet.

Die Korrektur für multiples Testen wurde mit der Benjamini-Hochberg-Methode durchgeführt, eine FDR  $< 0,1$  wurde als statistisch signifikant angesehen.

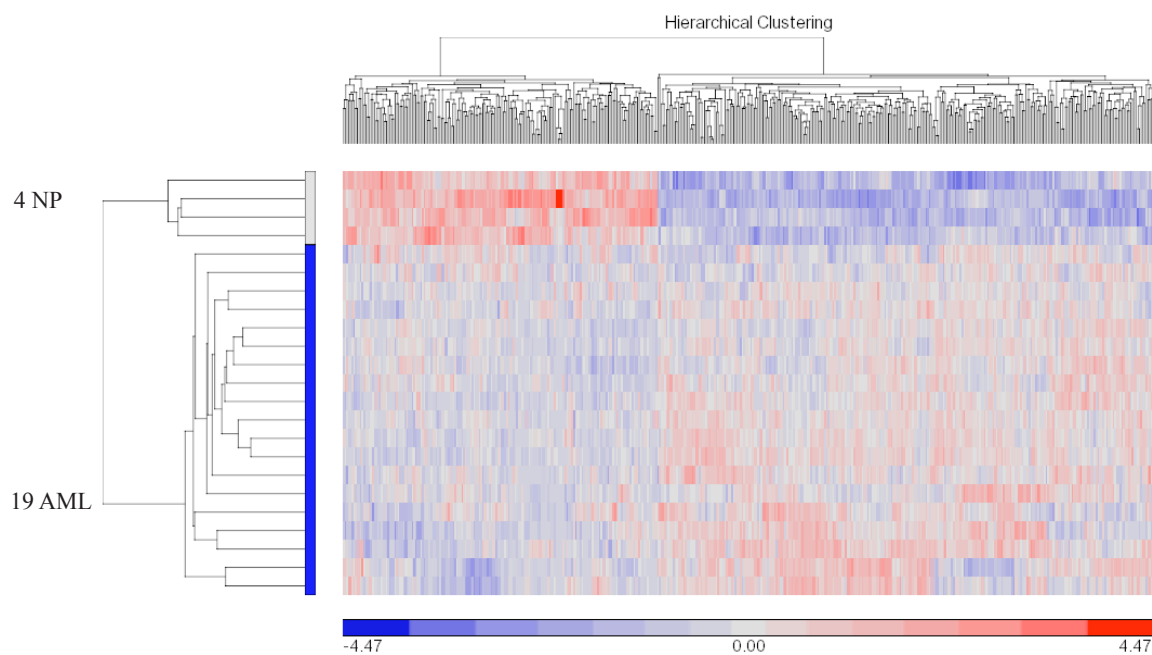
Die Korrelation der IGF2-Expression mit der Ausprägung klinischer Parameter erfolgte mittels Chi-Quadrat-Test, Median-Test und Kaplan-Meier-Analyse mittels SPSS-Software mit der Hilfe von Herrn PD Dr. Martin Neumann (AG Baldus).

## IV Ergebnisse

### Globale Genexpressionsdaten der mesenchymalen Stromazellen aus dem Knochenmark von AML-Patienten und gesunden Probanden

Die Ergebnisse dieser Versuche stammen aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe. Zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene in den BM-MSC von AML-Patienten wurde die BM-MSC-RNA von Knochenmarkaspiraten von 19 AML-Patienten (Erstdiagnose) und 4 gesunden Normalpersonen für Microarray-Analysen verwendet. Die BM-MSC waren zuvor über ihre Plastikadhärenz von den restlichen mononukleären Zellen getrennt und anschließend über 4 Passagen expandiert worden (s. Abschnitt 3.2.1).

Insgesamt konnten hiermit 389 differentiell exprimierte Gene ermittelt werden (fold change > 1,5, FDR < 0,05). Hiervon waren 238 Gene über- und 151 Gene unterexprimiert (s. Abb. 5).



**Abb. 5: Graphische Darstellung der Microarray-Analyse als Heatmap.** Hierarchisches Clustering der in den AML-BM-MSC im Vergleich zu den NP-BM-MSC 238 über- und 151 unterexprimierten Gene. AML ED (n=19), NP (n=4), fold change > 1,5, FDR < 0,05. rot = hohe Expression, blau = niedrige Expression. NP: Normalpersonen.

### Identifizierung von Kandidatengen im AML-Knochenmarkstroma

#### *Ergebnisse der bioinformatischen Analysen mit David bioinformatics resources*

Um Kandidatengene für die anschließende Validierung mittels qRT-PCR zu identifizieren, wurden die aus den Microarray-Analysen gewonnenen Genexpressionsdaten zunächst mit Hilfe der bioin-

formatischen Software DAVID bioinformatics resources hinsichtlich der angereicherten Signalwege und biologischen Funktionen untersucht.

#### Ergebnisse für die in der AML herunterregulierten Gene

Bei einer Analyse der in den BM-MSK der AML-Patienten herunterregulierten Gene bezüglich ihrer **biologischen Funktion** mit Hilfe der „Gene-Ontology“-Applikation (GOTERM\_BP\_5) wurden 83,7% (128 Gene) der Gene aus der Liste eingeschlossen.

Für diese zeigte sich insbesondere eine Beteiligung an Genexpression, Biosynthese und allgemeinen Homöostaseprozessen ( $p < 0,05$ , FDR nach Benjamini-Hochberg  $< 0,1$ , s. Tab. 6).

Term	Gen-Anzahl	Anteil an Listengenen [%]	Fold Enrichment	p-Wert	FDR
GO:0030003~cellular cation homeostasis	10	6.54	3.78	< 0.005	0.07
GO:0055082~cellular chemical homeostasis	13	8.5	3.29	< 0.005	0.07
GO:0045892~negative regulation of transcription, DNA-dependent	12	7.84	3.24	< 0.005	0.07
GO:0051253~negative regulation of RNA metabolic process	12	7.84	3.18	< 0.005	0.07
GO:0051254~positive regulation of RNA metabolic process	15	9.8	2.99	< 0.005	0.08
GO:0045941~positive regulation of transcription	16	10.46	2.72	< 0.005	0.08
GO:0010628~positive regulation of gene expression	16	10.46	2.64	< 0.005	0.08
GO:0051173~positive regulation of nitrogen compound metabolic process	17	11.11	2.53	< 0.005	0.07
GO:0010557~positive regulation of macromolecule biosynthetic process	17	11.11	2.5	< 0.005	0.08
GO:0009891~positive regulation of biosynthetic process	18	11.76	2.49	< 0.005	0.08

**Tab. 6: Signifikant angereicherte biologische Funktionen der herunterregulierten Gene in BM-MSK von AML-Patienten (DAVID bioinformatics, GOTERM\_BP\_5,  $p < 0.05$ , FDR  $< 0,1$ ).**

Gezeigt ist, wie viele Listengene an der jeweiligen biologischen Funktion beteiligt sind, deren Anreicherungsfaktor gegenüber dem gesamten Genom, der p-Wert und die FDR (nach Benjamini-Hochberg).



Bei spezifischeren Kategorien zeigte sich insbesondere eine Beteiligung an metabolischen Prozessen, Apoptoseregulation, Signaltransduktion und Immunantwort. Diese Kategorien beinhalteten allerdings jeweils nur sehr wenige Gene und waren statistisch nicht signifikant.

Die **Signalweganalyse** (KEGG, Biocharta, Panther) wies eine recht geringe Genanzahl pro Signalweg und eine hohe FDR auf. Somit ist die Wahrscheinlichkeit für falsch positiv signifikante Ergebnisse erhöht. Sie bietet dennoch einen Anhalt, welche Signalwege bei der Stroma-Leukämie-Interaktion eine Rolle spielen könnten.

Die KEGG-Signalweganalyse schloss 42,5% der herunterregulierten Gene ein. Hierbei zeigte sich eine Beteiligung an folgenden Signalwegen:

Term	Gen-Anzahl	Gen- Symbol	p-Wert	FDR
Epithelial cell signaling in Helicobacter pylori infection	5	NFKBIA, IL8, MET, JUN, ATP6V0E1	0.01	0.63
NOD-like receptor signaling pathway	4	NFKBIA, IL8, IL1B, CXCL2	0.04	0.88
MAPK signaling pathway	8	DUSP1, HSPA1A/B, DUSP2, IL1B, EGF, DUSP5, PPM1B	0.05	0.80

**Tab. 7: Angereicherte Signalwege der herunterregulierten Gene in BM-MSC von AML-Patienten (DAVID bioinformatics, KEGG-Pathwayanalyse).** Gezeigt ist, welche Listengene an dem jeweiligen Signalweg beteiligt sind, der p-Wert und die FDR (nach Benjamini-Hochberg).

Wie schon bei den biologischen Funktionen sind auch zwei der drei ermittelten Signalwege in die Immunantwort involviert (NOD-like-Pathway, H.pylori-Abwehr).

Der MAPK-Signalweg spielt insbesondere bei der Proliferation und Differenzierung eine wichtige Rolle. Bei den in den BM-MSC der AML-Patienten vermindert exprimierten Genen sind hauptsächlich Gene betroffen, die diesen Signalweg intrazellulär hemmen, was eine vermehrte Aktivität des MAPK-Signalwegs in den BM-MSC bewirken könnte. Zusätzlich sind aber auch Liganden des Signalwegs vermindert exprimiert. Der Einfluss auf die leukämischen Blasten wäre dann eher eine herabgesetzte Aktivität des MAPK-Signalwegs in diesen.

## Ergebnisse für die in der AML hochregulierten Gene

Bei der Analyse der hochregulierten Gene bezüglich ihrer **biologischen Funktion** lieferte die Untersuchung mittels der „Gene-Ontology“-Applikation keine statistisch signifikanten Ergebnisse. Deshalb wurde hier die Funktion „Functional Annotation Clustering“ verwendet, wobei eine Gruppe identifiziert werden konnte, die signifikant angereichert war. Sie beinhaltet Gene, die eine Rolle im Zusammenhang mit Lysosomen spielen (s. Tab. 8).

Term	Gen-Anzahl	Anteil an Listengenen [%]	Fold Enrichment	p-Wert	FDR
GO:0005764~lysosome	16	6.45	7.18	< 0.005	1.19E-06
GO:0000323~lytic vacuole	16	6.45	7.18	< 0.005	1.19E-06
GO:0005773~vacuole	17	6.85	6.39	< 0.005	9.07E-07
lysosome	12	4.84	6.51	< 0.005	7.28E-04

**Tab.8: Angereicherte biologische Funktionen der hochregulierten Gene in BM-MSC von AML-Patienten (DAVID bioinformatics, Functional Annotation Clustering, p-Wert < 0.05, FDR < 0,1).** Gezeigt ist, wie viele Listengene an der jeweiligen biologischen Funktion beteiligt sind, deren Anreicherungsfaktor gegenüber dem gesamten Genom, der p-Wert und die FDR (nach Benjamini-Hochberg).

Auch bei den hochregulierten Genen beinhalteten die einzelnen Pathways bei der **Signalweganalyse** jeweils nur sehr wenige Gene aus der Liste und wiesen eine hohe FDR auf. Die KEGG-Signalweganalyse schloss 25% der Listengene ein und erbrachte folgende angereicherte Signalwege:

Term	Gen-Anzahl	Gen-Symbol	p-Wert	FDR
hsa04142:Lysosome	6	ASAH1, TPP1, HEXB, CTSL, LAMP2, GM2A	0.01	0.66
hsa04610:Complement and coagulation cascades	4	CD55, CD59, F8, PROS1	0.05	0.88

**Tab. 9: Angereicherte Signalwege der hochregulierten Gene in BM-MSC von AML-Patienten (DAVID bioinformatics, KEGG-Pathwayanalyse).** Gezeigt ist, welche Listengene an dem jeweiligen Signalweg beteiligt sind, der p-Wert und die FDR (nach Benjamini-Hochberg).

Wie schon die Analyse der biologischen Funktion zeigt auch die Signalweganalyse eine Anreicherung der hochregulierten Gene im Zusammenhang mit Lysosomen.

Zudem findet sich - wie schon bei den biologischen Funktionen und der Signalweganalyse der herunterregulierten Gene - eine Anreicherung für einen in die Immunantwort involvierten Signalweg.

#### *Einordnung der identifizierten Kandidatengene in den aktuellen wissenschaftlichen Kontext*

Anschließend erfolgte eine Literaturrecherche mit Pubmed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pub-med>). Von besonderem Interesse waren hier Gene, deren Produkte sezerniert werden oder membranständige Liganden darstellen und somit die Blasten direkt beeinflussen können. Die ausgewählten Kandidatengene konnten den 3 Bereichen „TGF- $\beta$ -Signalweg“, „Immunantwort“ sowie „Wachstumsfaktoren und Strukturproteine“ zugeordnet werden. Hier soll eine kurze Vorstellung von jeweils 3 Vertretern einer Kategorie erfolgen, deren Ergebnisse aus der Validierung mittels qRT-PCR nachfolgend unter 4.3 präsentiert werden.

#### Kandidaten aus der TGF- $\beta$ -Familie

Wie unter 2.2.1 ausgeführt, spielt der TGF- $\beta$ -Signalweg eine bedeutende Rolle bei der Regulation wichtiger zellulärer Prozesse wie Proliferation und Differenzierung sowie in der Organisation des Stromas und in malignen Erkrankungen. Die Liganden umfassen TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 sowie TGF- $\beta$ 3, die Signaltransduktion erfolgt über SMAD-Proteine (canonical signalling) oder SMAD-unabhängig (non-canonical signalling) über die Aktivierung von Signalwegen wie den PI3K/AKT- und den MAPK-Signalweg [22, 47-52].

Gen	Funktion
TGFB1	Sowohl Förderung als auch Hemmung des Tumorwachstums [22, 47-52]
	Vielfältige Einflüsse auf das Stroma wie Beeinflussung der EZM-Zusammensetzung und der Differenzierung von MSC [53-55]
	Hemmung der Immunantwort, u. a. über Rekrutierung von regulatorischen T-Zellen [50], MDSC (myeloid-derived suppressor cells) [51] und Hemmung der NK-Zell-Reifung [52]
	Erhöhte Aktivität des TGF- $\beta$ -Signalwegs in Stromazellen beim multiplen Myelom [101] Bei Hinzugabe von TGF- $\beta$ zu Leukämiezelllinien verminderte Apoptose unter AraC-Behandlung; Aufhebung dieses Effekts durch TGF- $\beta$ -Inhibitor [48]
SMAD3	Vermittlung der intrazellulären Signaltransduktion von TGF- $\beta$ [102, 103]
	Förderung der Aktivität von SMAD3 und Assoziation von SMAD3 mit DNA durch Hypoxie [102]
	Hemmung des TGF- $\beta$ -Signalwegs durch IL-1 $\beta$ über Phosphorylierung von SMAD3 [103]
THBS1 (Thrombospondin)	Extrazelluläres Matrix-Glykoprotein mit vielfältigen biologischen Funktionen, Vermittlung seiner Effekte TGF- $\beta$ -abhängig und -unabhängig [102, 104, 105], kann inaktives TGF- $\beta$ aktivieren [102]
	Wichtiger Angiogenese-Inhibitor [105]
	Hemmt Tumorwachstum, bei Tumoren häufig vermindert exprimiert [105]
	Adhäsionsprotein für verschiedene hämatopoetische Progenitorzellen [106], Förderung der Differenzierung hämatopoetischer Zellen; wahrscheinlich wichtige Funktion bei Vermittlung des Effekts von atRA (all-trans retinoic acid) bei AML M3 [104]

**Tab. 10: Kandidatengene aus der Kategorie „TGF- $\beta$ -Signalweg“, dargestellt mit Gensymbol und Funktion.**

### In die Immunantwort involvierte Kandidatengene

Sowohl für solide Tumore als auch hämatologische Neoplasien konnte gezeigt werden, dass das Immunsystem eine zentrale Rolle in der Eradikation der malignen Zellen sowie auch in der Progression der Erkrankung spielt [43, 44, 83].

Die Analysen mit David bioinformatics resources ergaben bei den biologischen Funktionen sowie auch bei der Signalweganalyse eine Anreicherung der in den AML-BM-MSC differentiell exprimierten Gene im Rahmen der Immunantwort. Tab. 11 zeigt exemplarisch 3 Gene aus der Liste differentiell exprimierter Gene, die eine Bedeutung im Rahmen der Immunantwort besitzen.

<b>Expression in AML-BM-MSC (fold change)</b> AML n = 19 vs. NP n = 4	<b>Gen</b>	<b>Funktion</b>
Überexprimiert (1,7)	CCL28 = Mucosae-associated epithelial chemokine (MEC)	Chemokin, kann über die Rezeptoren CCR3 und CCR10 CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten rekrutieren [107] sowie über CCR10 zusätzlich regulatorische T-Zellen [108]
		Wachstumsfaktor für hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen [109]
		Expression kann über IL-1 $\beta$ und TNF-alpha NF-kB-abhängig stimuliert werden [110] sowie über Hif-1 alpha im hypoxischen Tumor-Microenvironment; erhöhte Expression ist mit schlechterer Prognose bei Ovarial-Karzinom assoziiert [108]
Vermindert exprimiert (-1,8)	IL1B	Zytokin, vielfältige biologische Funktionen; bei vielen Tumoren überexprimiert, scheint Progression fördern zu können [111, 112]
		Kann TGF- $\beta$ -Signalweg hemmen und so auch inhibierenden Effekt von TGF- $\beta$ auf Proliferation myeloider Progenitorzellen aufheben [103]
		Hinzugabe von IL-1 $\beta$ führte zu erhöhter Proliferation leukämischer Zellen; Ansprechen auf IL-1 $\beta$ korrelierte mit schlechterer Prognose [113]
		Blockade des IL-1R hemmt Tumorwachstum in Mausmodell [112]

Vermindert exprimiert (-2,2)	CD274 = PD-1L	<p>Ligand für PD-1. PD-1 wird auf verschiedenen Immunzellen exprimiert, Bindung hemmt deren Funktion und bremst so die Immunantwort [83]</p> <p>Physiologische Funktion: Hemmung überschießender Immunreaktion, pathologische Funktion: PD-L1-Überexpression durch Tumorzellen und damit Hemmung der gegen den Tumor gerichteten Immunantwort [84]</p>
		<p>Verstärkte PD-L1- und -L2-Expression bei Inkubation von AML-Zelllinie mit aktivierten T-Zellen [114]. Liganden-Überexpression auch bei leukämischen Progenitorzellen bei Rezidiv nach allogener Stammzelltransplantation beobachtet, könnte gegen minor histocompatibility antigen (MiHA) gerichtete CD8+ T-Zellen hemmen und zu Rezidiv beitragen; Blockade des PD-1-Signalwegs führte zu erhöhter Proliferation MiHA-spezifischer T-Zellen [83]</p>
		<p>PD-1-Signalweghemmung für solide Tumore und hämatologische Neoplasien (insbesondere bei Lymphomen) im Rahmen klinischer Studien in Erprobung [84-86]</p>
		<p>PD-L1-Expression in Tumorstroma bisher weniger gut untersucht, aber in ALL längeres Überleben bei Patienten beobachtet, deren Stromazellen PD-L1 exprimierten [115]</p>

**Tab. 11: Kandidatengene aus der Kategorie „Immunantwort“, dargestellt mit Gensymbol und Funktion sowie dem fold change (AML n = 19 vs. NP n = 4) aus den Microarray-Analysen.**

## Kandidatengene aus der Gruppe der Wachstumsfaktoren und Strukturproteine

In der Analyse der Microarray-Daten zeigte sich in den AML-BM-MSC eine differentielle Expression zahlreicher Wachstumsfaktoren und Strukturproteine, die vielfältige Einflüsse auf das Stroma sowie die malignen Zellen selbst ausüben können.

Expression in AML-BM-MSC (fold change) AML n = 19 vs. NP n = 4	Gen	Funktion
Überexprimiert (5,3)	DCN (Decorin)	Gehört zur Familie der small leucine-rich Proteoglykane, besitzt vielfältige biologische Funktionen wie Organisation der EZM und Regulation von Proliferation, Adhäsion, Migration und Angiogenese [116]
		Tumorsuppressor in den meisten Tumoren, u. a. über Hemmung der Proliferation [116] und Förderung einer Antitumor-Immunantwort [117] Effekte teilweise über Hemmung von Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta$ 1 [117] und Wachstumsfaktorrezeptoren wie EGFR [118] und IGF1R [119] In zahlreichen Tumoren vermindert exprimiert, verminderte Expression mit schlechterer Prognose assoziiert [116]
		Verminderte Decorin-Expression in Stroma beim multiplen Myelom beobachtet; durch Kokultur mit malignen Zellen induzierbar, Effekt durch Proteasominhibitor aufhebbar [120]
Überexprimiert (3,0)	LGALS3 (Galectin-3)	Gehört zur Familie der $\beta$ -galactosid-Bindungsproteine, reguliert u. a. Zellzyklus, Apoptose, Zelladhäsion, mRNA-Prozessierung, Angiogenese und Immunsystem [121-123]
		Überexpression bei verschiedenen soliden Tumoren und hämatologischen Neoplasien, meist mit einer schlechteren Prognose assoziiert [121-123]
		Erhöhte Expression in AML-BM-MSC beobachtet [124] Unabhängiger negativer prognostischer Marker in der AML [121] Galectin-3-Expression in vitro bei Kultivierung von MSC mit leukämischen Zellen erhöht [124]
		Blockade von Galectin 3 in soliden Tumoren und hämatologischen Neoplasien in präklinischen Versuchen vielversprechende Ergebnisse, Testung verschiedener Präparate aktuell in klinischen Studien, hauptsächlich bei Melanom-Patienten [122, 125]
Überexprimiert	VEGF	In Knochenmark von AML-Patienten höhere MVD (microvessel density) als bei Gesunden, Rückgang nach Induktionschemotherapie [60, 61] Durch VEGF-Blockade Verbesserung der Überlebenszeit im Mausmodell [62], Ergebnisse für Ansprechen bei AML-Patienten heterogen [81, 82]
		In Lungen-Karzinom Tumore mit p53-Mutation höhere VEGF-Expression und MVD [126]
		Enge Verbindung zwischen Angiogenese in Tumor-Microenvironment und Immuntoleranz gegenüber Tumoren; gezeigt, dass regulatorische T-Zellen selbst Angiogenese über VEGF-Sekretion stimulieren können [108]

**Tab. 12: Kandidatengene aus der Kategorie „Wachstumsfaktoren und Strukturproteine“, dargestellt mit Gen-symbol und Funktion sowie dem fold change (AML n = 19 vs. NP n = 4) aus den Microarray-Analysen.**

## Validierung von Kandidatengen

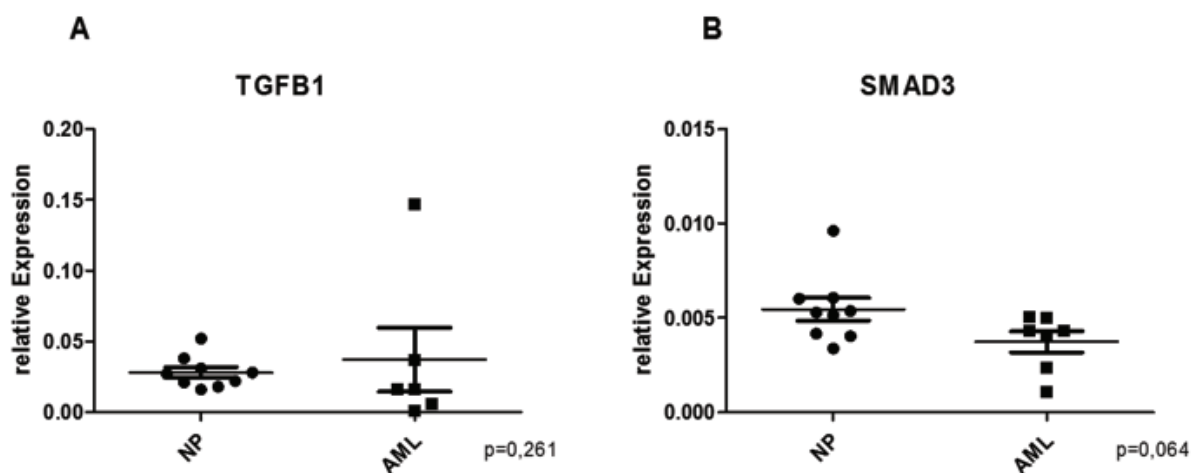
Die Validierung der mittels bioinformatischer Analysen und Literaturrecherche identifizierten Kandidatengene aus den Microarray-Analysen erfolgte durch qRT-PCR an einer unabhängigen Kohorte.

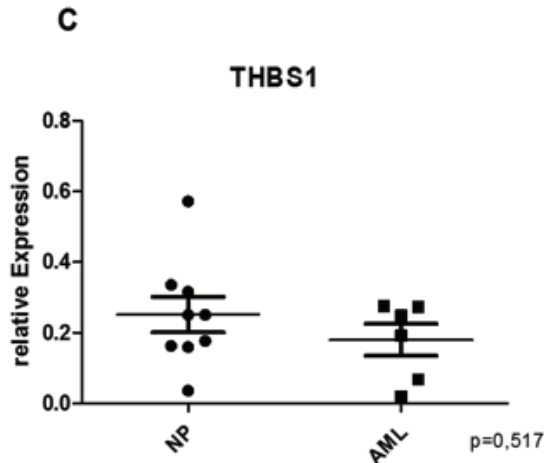
Diese setzte sich aus BM-MSC aus Knochenmarkaspiraten von 4 AML-Patienten (Erst diagnose) und 4 gesunden Normalpersonen zusammen. Ausgewählte Kandidaten wurden anschließend an einer größeren Kohorte getestet.

Hier sollen exemplarisch die Ergebnisse einiger der getesteten Gene dargestellt werden (Abb. 6-9). Unter diesen befinden sich Vertreter des TGF- $\beta$ -Signalwegs wie TGFB1, SMAD3 und THBS1 sowie in immunologische Prozesse involvierte Gene wie CCL28, CD274 und IL1B. Aus der Gruppe der Wachstumsfaktoren und Strukturproteine sind hier die Ergebnisse für IGF2, VEGFB, Galectin-3 und Decorin dargestellt. Teilweise konnte die in den Microarray-Analysen beobachtete Tendenz reproduziert werden, der Unterschied war allerdings häufig statistisch nicht signifikant. Für Decorin hatte auch in weiteren Versuchen der Arbeitsgruppe mittels RNAseq bei 5 AML (ED)- und 6 NP-BM-MSC eine veränderte Expression im Stroma der AML gezeigt werden können [127].

### Kandidaten aus der TGF- $\beta$ -Familie

Die Gene des TGF- $\beta$ -Signalwegs wurden auf Grund der wichtigen Bedeutung des Signalwegs sowohl für die physiologische Hämatopoese als auch für solide Tumoren und maligne hämatologische Neoplasien (s. Tab. 10) und Ergebnissen aus früheren Microarray-Analysen (hier nicht dargestellt) ausgewählt. Der Expressionsunterschied zwischen AML und Normalpersonen ist für keines der Gene statistisch signifikant, tendenziell scheinen die Mitglieder des TGF- $\beta$ -Signalwegs in der AML aber herunterreguliert zu sein (s. Abb. 6).





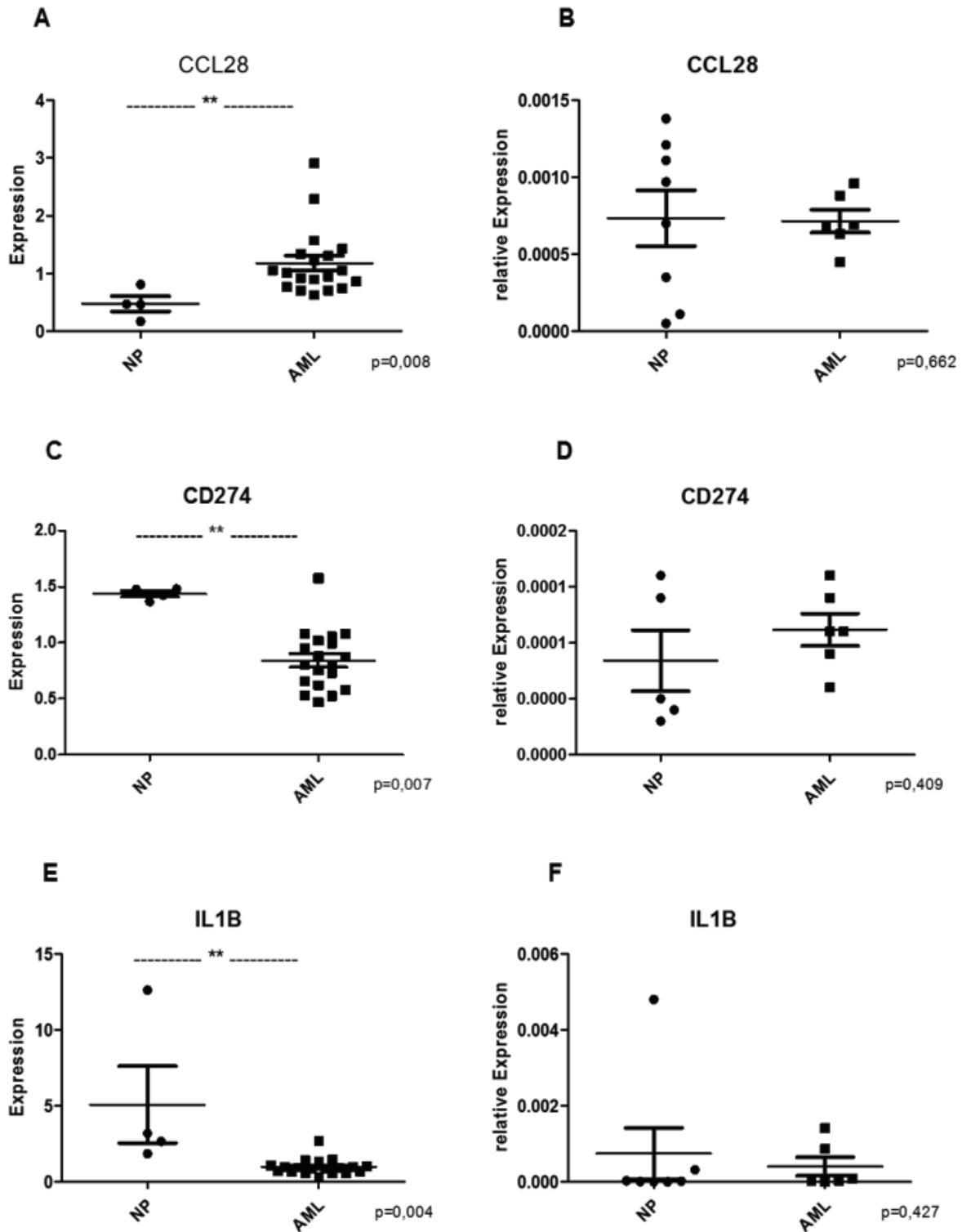
**Abb. 6: mRNA-Expression von Kandidatengenen in BM-MSK von AML ED und NP.** Gezeigt sind jeweils die Einzeldaten für AML ED (n = 6 - 7) und NP (n = 9) bestimmt mittels qRT-PCR in Duplikaten jeweils relativ zur Expression vom housekeeping gene GAPDH (dCT). Angegeben ist der Mean + SEM, das Signifikanzniveau wurde mittels Mann-Whitney-U-Test bestimmt.

TGFB1: Transforming growth factor beta 1, SMAD3: Mothers against decapentaplegic homolog 3, THSB1: Thrombospondin-1 .

#### In die Immunantwort involvierte Kandidatengene:

Dargestellt sind jeweils die Microarray- und die qRT-PCR-Daten für jedes Gen. In den Microarray-Daten, die aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe stammen, zeigt sich eine deutliche Überexpression von CCL28 und eine signifikant verminderte Expression von CD274 und IL1B. Dabei ergibt sich die deutlich höhere IL1B-Expression bei den NP durch einen Ausreißer (wobei dieser Unterschied in beiden probe sets für IL1B vorhanden ist), aber auch ohne diesen ist IL1B bei den NP stärker exprimiert als bei den AML-Patienten. Diese Unterschiede konnten in den qRT-PCR-Versuchen an einer unabhängigen Kohorte für die dargestellten Kandidaten nicht bestätigt werden. Ein häufiges Problem war eine starke Streuung der Expressionsstärke auch bei den Normalpersonen, hier insbesondere bei CCL28 und CD274 (Abb. 7 B, D) zu sehen. Auch bei den für die qRT-PCR-Versuche verwendeten NP gibt es für IL1B wieder einen Ausreißer, der aber nicht identisch mit der für die Microarray-Versuche verwendeten Probe ist.



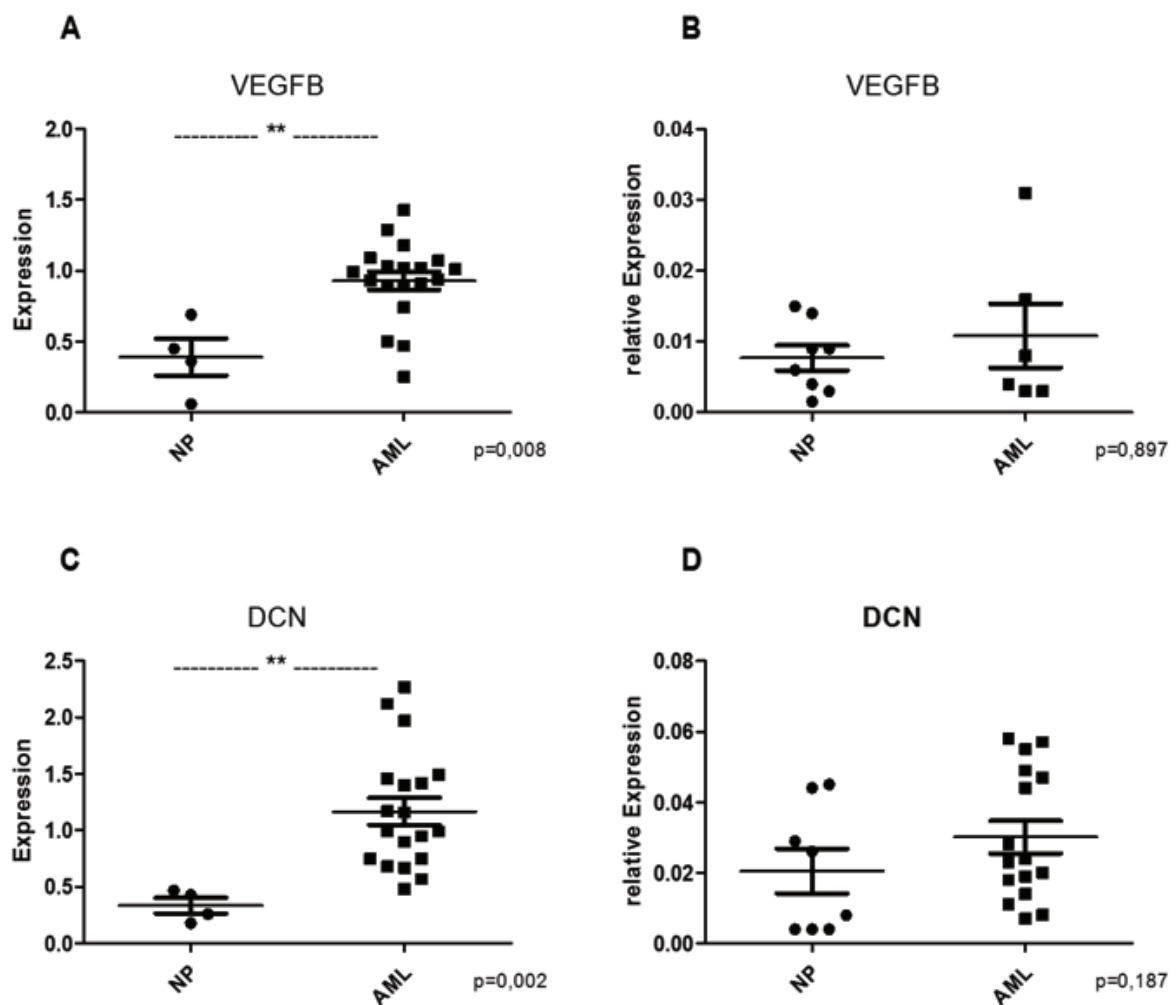


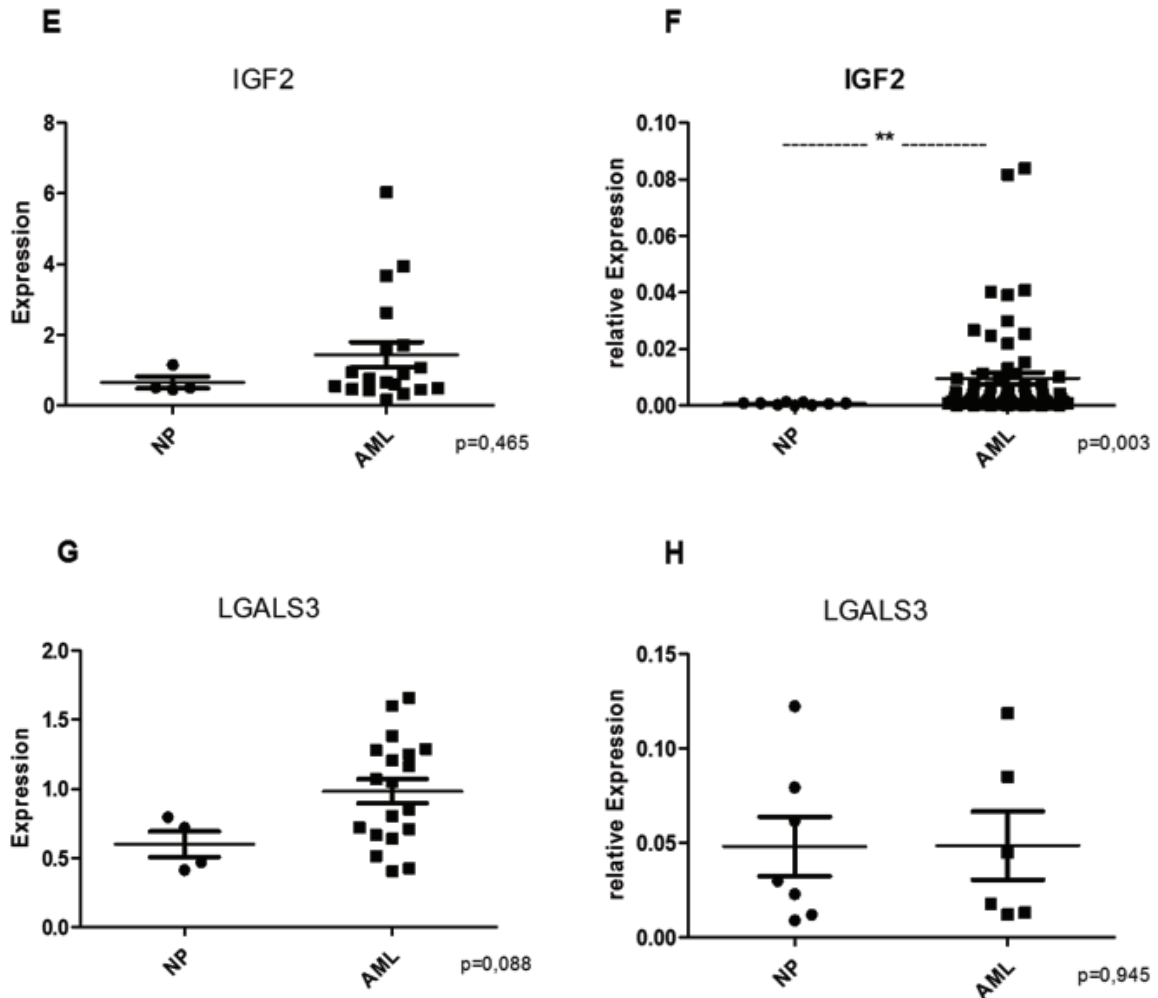
**Abb. 7: mRNA-Expressionsdaten von Kandidatengenen in BM-MSC von AML ED und NP aus Microarray-Analysen (A, C, E) sowie qRT-PCR-Versuchen (B, D, F).** Gezeigt sind jeweils die Einzeldaten aus Microarray-Analysen (dargestellt pro Person jeweils als Median der einzelnen probe sets, AML n = 19, NP n = 4) und qRT-PCR-Versuchen (bestimmt in Duplikaten jeweils relativ zur Expression vom housekeeping gene GAPDH (dCT), AML n = 7, NP n = 8), durchgeführt an unabhängigen Kohorten. Angegeben ist der Mean + SEM, das Signifikanzniveau wurde mittels Mann-Whitney-U-Test bestimmt, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ .

CCL28: C-C motif chemokine ligand 28, CD274: cluster of differentiation 274 = PDL1, IL1B: Interleukin 1 beta.

### Kandidatengene aus der Gruppe der Wachstumsfaktoren und Strukturproteine:

Auch für die Kandidaten aus der Gruppe der Wachstumsfaktoren und Strukturproteine konnten in den Microarray-Analysen beobachtete Unterschiede in den qRT-PCR-Versuchen nicht immer bestätigt werden (s. Abb. 8). Für den Wachstumsfaktor IGF2 hingegen konnte mit qRT-PCR eine deutliche Überexpression in der AML gezeigt werden. IGF2 wurde auf Grund der Ergebnisse der Literaturrecherche und älteren Microarray-Analysen ausgewählt, bei den hier dargestellten Microarraydaten war die Überexpression nicht signifikant. Allerdings zeigt sich die IGF2-Überexpression auch in den qRT-PCR-Versuchen nur bei einem Teil der Patienten, was vermutlich auf die Heterogenität der AML zurückgeführt werden kann. Dies könnte auch die Ursache dafür sein, dass die Überexpression in der relativ kleinen Stichprobe für die hier gezeigten Microarray-Analysen nicht so deutlich zu sehen war.

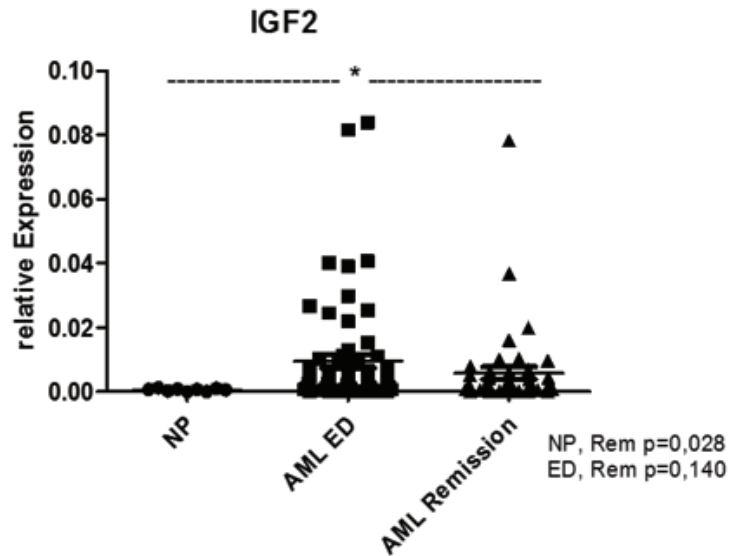




**Abb. 8:** mRNA-Expressionsdaten von Kandidatengen in BM-MSC von AML ED und NP aus Microarray-Analysen (A, C, E, G) und qRT-PCR-Versuchen (B, D, F, H). Gezeigt sind jeweils die Einzeldaten aus Microarray-Analysen (dargestellt pro Person jeweils als Median der einzelnen probe sets, AML n = 19, NP n = 4) und qRT-PCR-Versuchen (bestimmt in Duplikaten jeweils relativ zur Expression vom housekeeping gene GAPDH (dCT), AML n = 6 – 63, NP n = 8 – 9), durchgeführt an unabhängigen Kohorten. Angegeben ist der Mean + SEM, das Signifikanzniveau wurde mittels Mann-Whitney-U-Test bestimmt, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ .

VEGFB: Vascular endothelial growth factor B, DCN: Decorin, IGF2: Insulin-like growth factor 2, LGALS3: Galectin-3.

Anschließend wurde untersucht, ob die IGF2-Überexpression auch bei AML-Patienten in Remission beobachtet werden kann oder ob die Expression in Remission wieder sinkt. Es zeigte sich, dass auch in Remission eine IGF2-Überexpression vorliegt (Abb. 9).

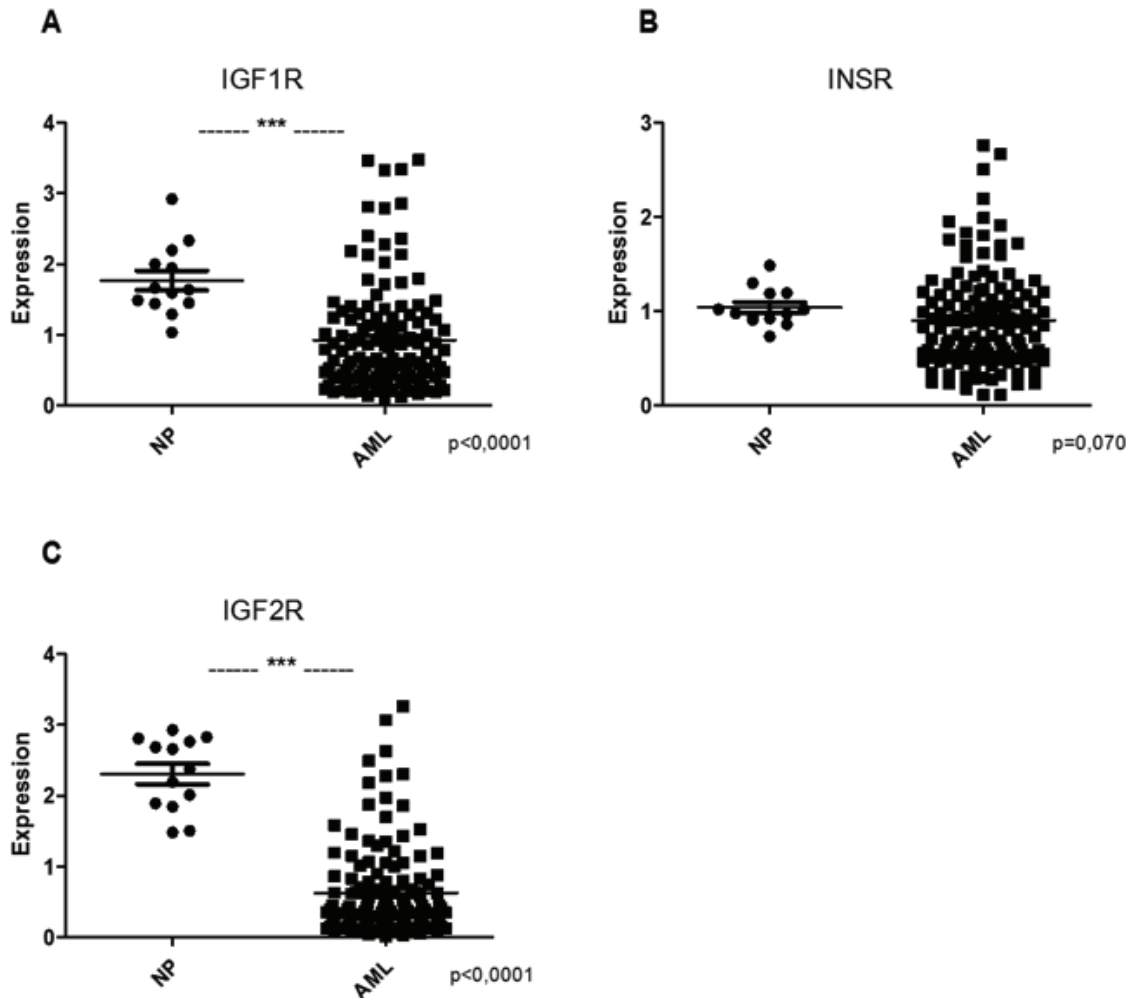


**Abb. 9: IGF2-mRNA-Expression in BM-MSC von AML ED, AML Rem und NP.** Gezeigt sind die Einzeldaten für AML Rem (n = 44) im Vergleich zu AML ED (n = 63) und NP (n = 9) gemessen mittels qRT-PCR in Duplikaten jeweils relativ zur Expression vom housekeeping gene GAPDH (dCT). Angegeben ist der Mean + SEM, das Signifikanzniveau wurde mittels Mann-Whitney-U-Test bestimmt, \* =  $p < 0,05$ .

IGF2: Insulin-like growth factor 2, ED: Erstdiagnose, NP: Normalperson.

### Rezeptorexpression der IGF-Familie in leukämischen Blasten und Stromazellen

Damit die Überexpression des IGF2 durch das Stroma einen direkten Effekt auf die leukämischen Zellen haben kann, müssen diese die entsprechenden Rezeptoren exprimieren. In kleineren Studien konnte bereits eine Expression des Insulin- und IGF1-Rezeptors durch AML-Blasten gezeigt werden, die jedoch recht heterogen war [128]. Hier sollte nun die Rezeptorexpression in einer größeren Kohorte betrachtet und eruiert werden, ob eventuell sogar eine Überexpression der Rezeptoren vorliegt. Hierfür wurden Microarray-Daten von leukämischen Blasten bzw. CD34+ hämatopoetischen Zellen von 130 AML-Patienten und 13 gesunden Normalpersonen aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe verwendet [99, 100].

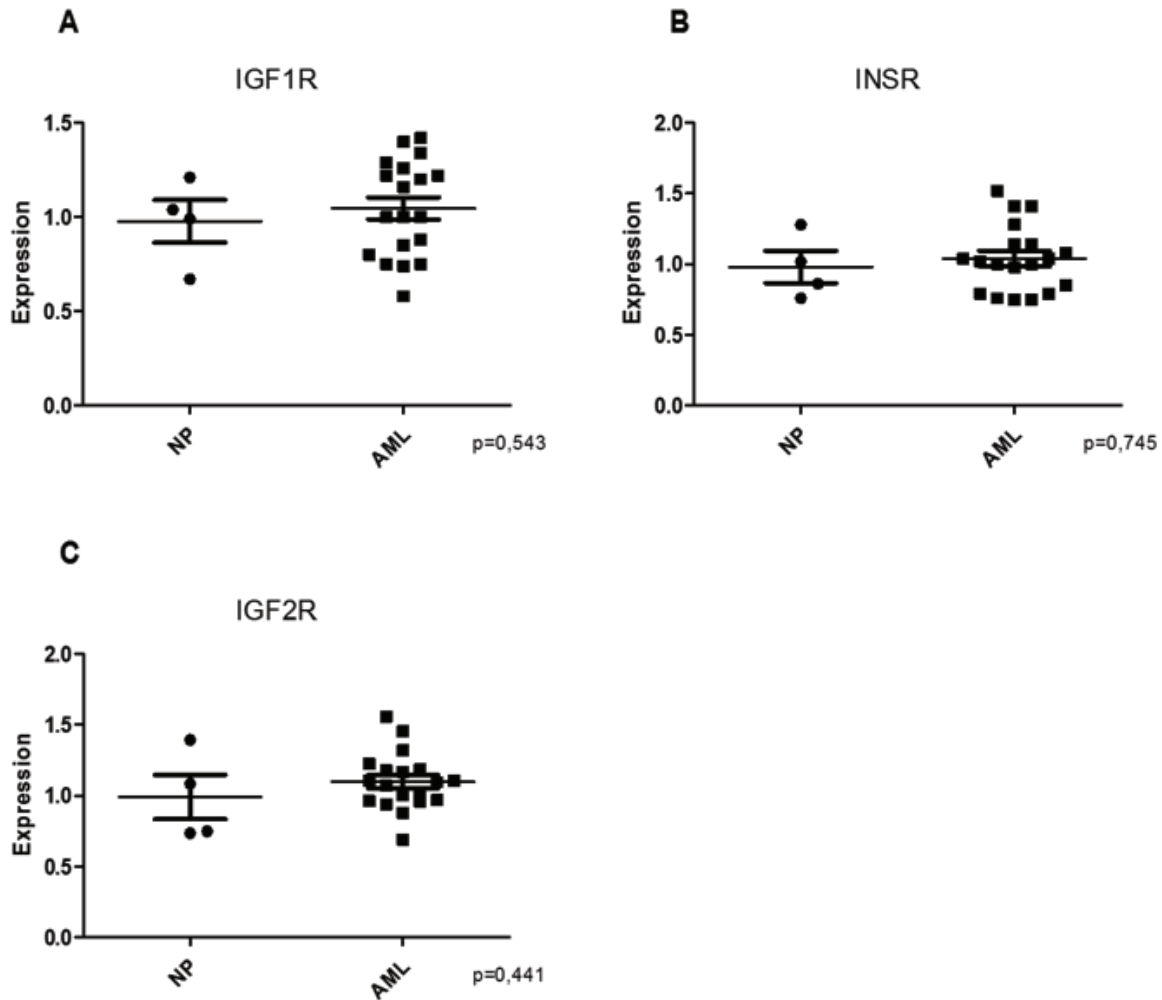


**Abb. 10: mRNA-Expression von Rezeptoren für IGF2 in AML-Blasten und CD34+ Zellen gesunder NP.** Gezeigt sind jeweils die Einzeldaten aus Microarray-Analysen (dargestellt pro Person jeweils als Median der einzelnen probe sets) für NP (n = 13) und AML (n = 130). Angegeben ist der Mean + SEM, das Signifikanzniveau wurde mittels Mann-Whitney-U-Test bestimmt, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ .

IGF1R: Insulin-like growth factor 1 receptor, INSR: Insulin receptor, IGF2R: Insulin-like growth factor 2 receptor, NP: Normalperson.

Abb. 10 zeigt, dass IGF1-Rezeptor und Insulin-Rezeptor, über die IGF2 seine Effekte vermittelt, auch von AML-Blasten exprimiert werden, allerdings ist die IGF1-Rezeptor-Expression in den AML-Blasten signifikant herunterreguliert. Aber auch der IGF2-Rezeptor, der den Signalweg hemmen kann, ist signifikant vermindert exprimiert. Insgesamt zeigt sich aber eine recht große Streuung bei der Stärke der Rezeptorexpression.

Da IGF2 autokrin auch auf die Stromazellen selbst wirken kann, wurde zusätzlich die Expression der Rezeptoren in den BM-MSCs der 19 AML-Patienten und 4 Normalpersonen aus den unter 3.1.1.1.1 beschriebenen Microarray-Analysen analysiert. Hier zeigten sich keine Expressionsunterschiede zwischen AML und NP (Abb. 11).



**Abb. 11: mRNA-Expression von Rezeptoren für IGF2 in BM-MSC von AML ED und NP.** Gezeigt sind jeweils die Einzeldaten aus Microarray-Analysen (dargestellt pro Person jeweils als Median der einzelnen probe sets) für NP (n = 4) und AML (n = 19). Angegeben ist der Mean + SEM, das Signifikanzniveau wurde mittels Mann-Whitney-U-Test bestimmt.

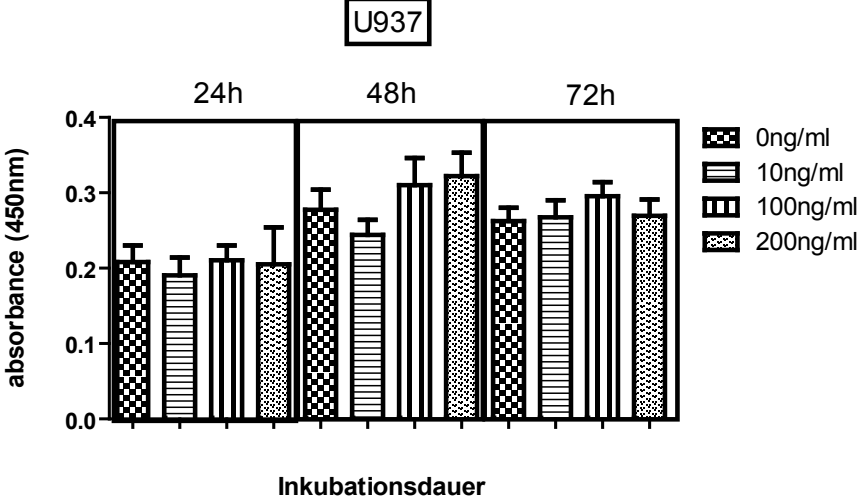
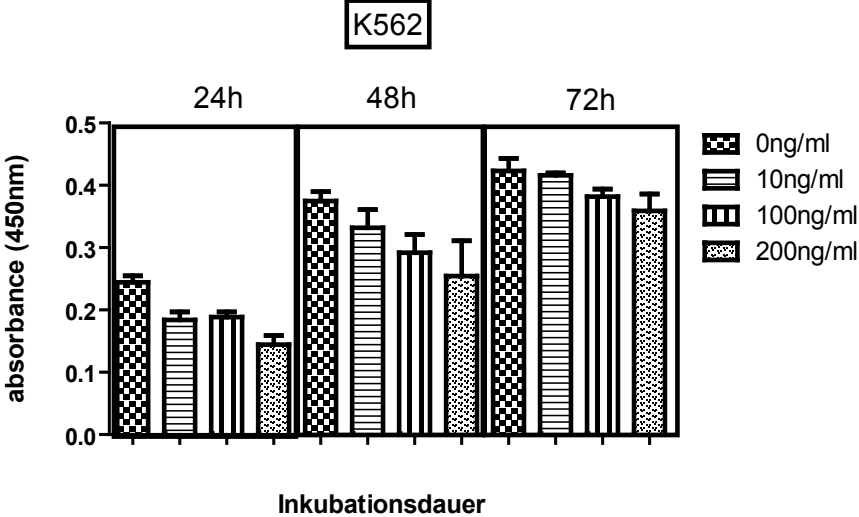
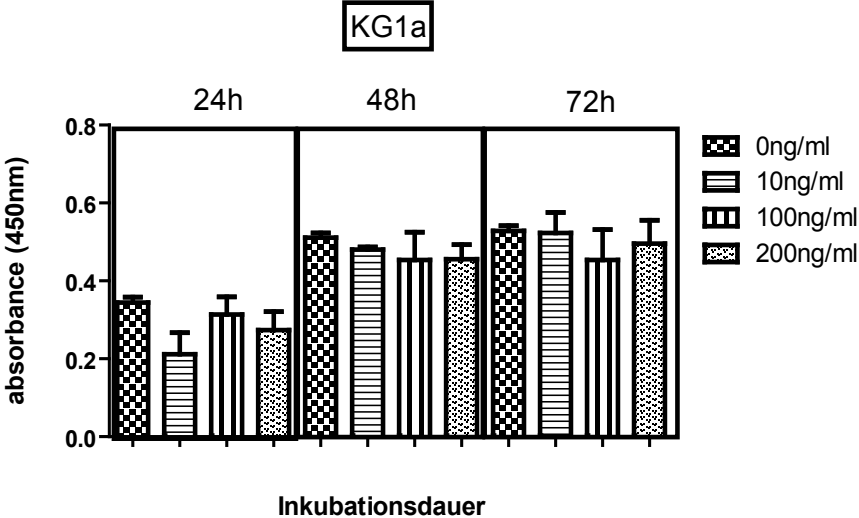
IGF1R: Insulin-like growth factor 1 receptor, INSR: Insulin receptor, IGF2R: Insulin-like growth factor 2 receptor, NP: Normalperson.

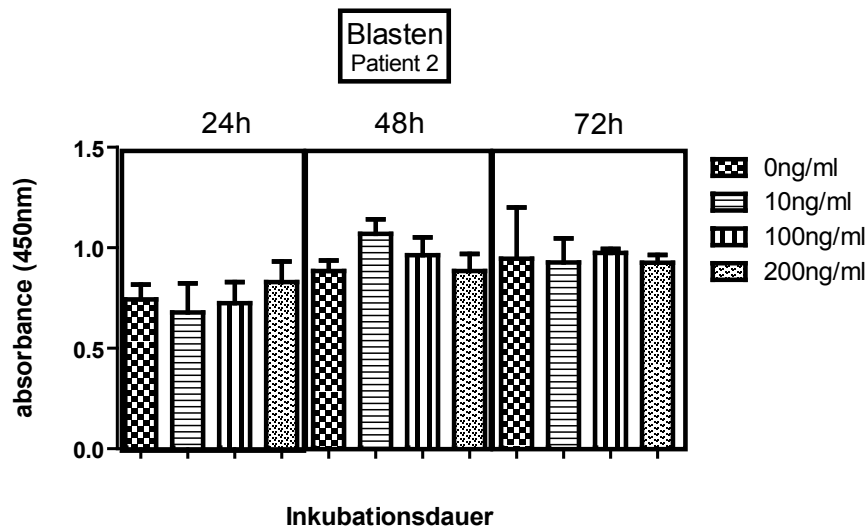
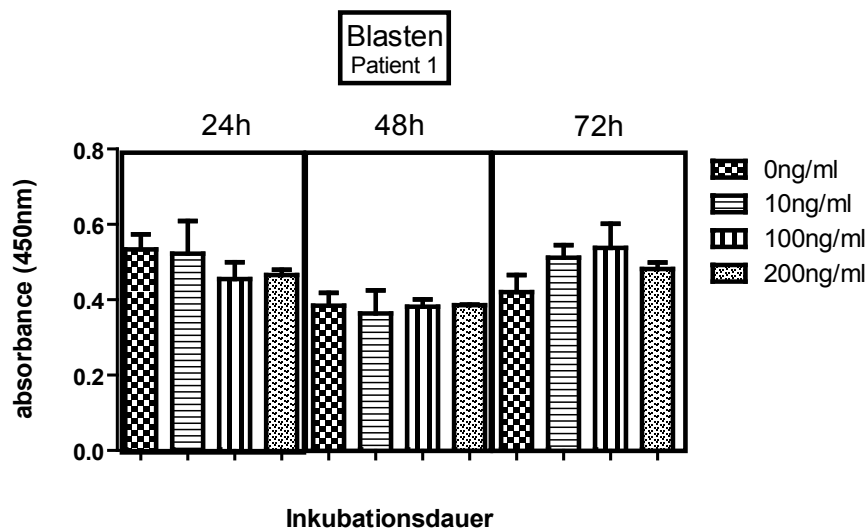
### **Einfluss von IGF2 auf die Proliferation leukämischer Zellen**

Da für den Wachstumsfaktor IGF2 bereits für verschiedene Tumore gezeigt werden konnte, dass IGF2 die Proliferation der malignen Zellen stimulieren kann [93], wurde hier der Effekt verschiedener Konzentrationen IGF2 auf die Proliferation leukämischer Zelllinien und AML-Blasten (ED) untersucht.

Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen IGF2 für 24 – 72 h inkubiert, anschließend wurde die Viabilität mit dem WST-Assay bestimmt. Bei diesem ist die Signalstärke abhängig von der Anzahl der Zellen und ihrer metabolischen Aktivität, so dass die Signalstärke mit der Anzahl vitaler Zellen korreliert.

Hier zeigt sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen unbehandelten Zellen und Zellen mit IGF2-Zusatz (s. Abb. 12).





**Abb. 12: Einfluss von IGF2 auf die Viabilität von Leukämiezellen.** Die Zelllinien KG1a, K562 und U937 sowie primäre Blasten wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen rhIGF2 für 24, 48 und 72h inkubiert; die Viabilität wurde anschließend mit WST1 bestimmt. Die gemessene absorbance korreliert positiv mit der Anzahl und metabolischen Aktivität der Zellen. Dargestellt ist jeweils der Median aus mindestens 4 Replikaten (+ range), für die Zelllinien exemplarische Darstellung aus 3 Versuchen mit identischen Bedingungen, die Versuche für die Blasten erfolgten jeweils ohne Wiederholung.

Die hier dargestellten Versuche erfolgten mit einer FCS-Konzentration des Kulturmediums von 10% bei den Blasten und 0% bei den Zelllinien, jedoch konnte auch mit anderen FCS-Konzentrationen (0-20% bei Blasten und Zelllinien) sowie längerer Inkubationszeit (7 Tage) kein statistisch signifikanter Effekt von IGF2 auf die Proliferation beobachtet werden.



## **Korrelation der IGF2-Expression mit der Ausprägung klinischer Merkmale**

Die IGF2-Expression in den BM-MSK wurde für jeden Patienten mit der Ausprägung verschiedener klinischer Merkmale korreliert.

Hierfür wurden die Patienten anhand ihrer IGF2-Expression in 2 Gruppen eingeteilt: Bei Patienten der Gruppe „IGF2 high“ lag die IGF2-Expression über dem Mittelwert + 2 Standardabweichungen der gesunden Normalpersonen, die anderen Patienten wurden der Gruppe „IGF2 low“ zugerechnet.

Zunächst wurde geprüft, ob Faktoren wie Alter oder Geschlecht die IGF2-Expression beeinflussen. Beim Alter der Patienten konnte kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden (für AML ED „IGF2 high“ waren 44% der Patienten über 60 Jahre alt, bei „IGF2 low“ 41% über 60 Jahre). Auch bei dem Geschlecht zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied (Tab. 13).

Bei dem Vergleich der IGF2-Expression bei Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose und bei Patienten, die sich in Remission befanden, zeigte sich, dass bei den Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose etwas mehr Personen der Gruppe „IGF2 high“ angehörten als bei den Patienten, die sich in Remission befanden (68% der AML ED: „IGF2 high“, 56% der AML Remission: „IGF2 high“).

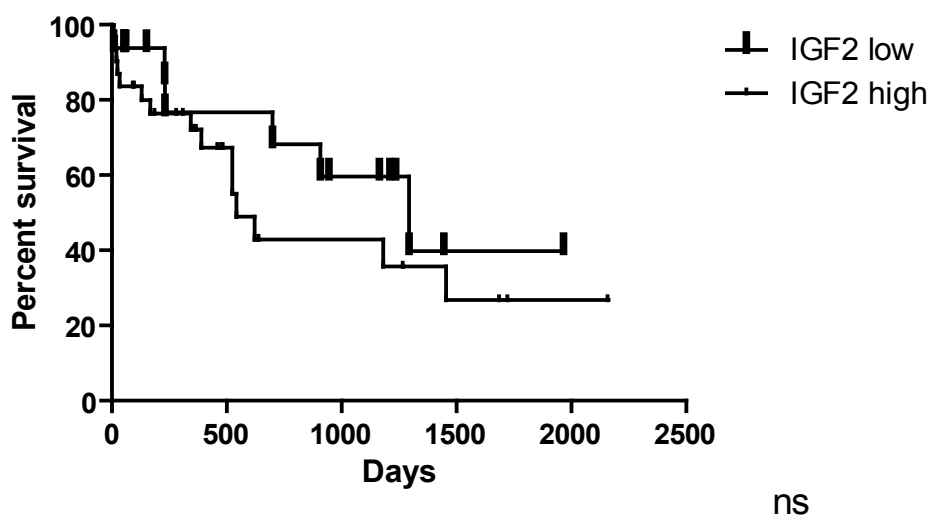
Zudem wurde die IGF2-Expression mit prognostisch relevanten Markern wie einer NPM1- und FLT3-Mutation korreliert, es zeigte sich jedoch kein Zusammenhang zwischen hoher oder niedriger IGF2-Expression und Mutationsstatus (Tab. 13). Auch für den Mutationsstatus weiterer für die AML prognostisch relevanter Gene wie WT1 und Translokationen wie t8\_21 konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen „IGF2 high“ und „IGF2 low“ beobachtet werden (Daten hier nicht dargestellt).

Auch für die IGF2-Expression in den AML-BM-MSK zum Zeitpunkt der Remission ließen sich keine statistisch signifikanten Korrelationen mit der Ausprägung klinischer Merkmale zeigen.

<b>klinischer Parameter</b>	<b>Total</b> (bezogen auf alle betrachteten Patienten) n = 43 - 56	<b>IGF2 high</b> (bezogen auf Patienten mit hoher Expr.) n = 29 - 38	<b>IGF2 low</b> (bezogen auf Patienten mit hoher Expr.) n = 14 - 18	<b>p-Wert</b>
Alter > 60 Jahre	43 %	44 %	41 %	0,814
Geschlecht	46% weiblich, 54% männlich	40% weiblich, 60% männlich	59% weiblich, 41% männlich	0,418
NMP1-Mutation	23%	24%	21%	0,844
FLT3-Mutation				
ITD	20%	20%	21%	0,913
TKD	4%	3%	6%	0,609

**Tab. 13: Korrelation der IGF2-Expression mit der Ausprägung klinischer Parameter.** Gezeigt ist, wie viel Prozent der AML-Patienten ED jeweils positiv für ein Merkmal sind. IGF2 high: Patienten, die IGF2 in den BM-MSC hoch exprimieren ( $>$  Expressionsniveau der gesunden NP + 2 x SD) n = 29 - 38, IGF2 low: Patienten, die IGF2 in den BM-MSC niedrig exprimieren ( $\leq$  Expressionsniveau der gesunden NP + 2 x SD) n = 14 - 18.

Bei dem Zusammenhang zwischen IGF2-Expression und Überlebenszeit konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen „IGF2 high“ und „IGF2 low“ festgestellt werden, allerdings zeigte sich ein Trend zu erhöhter IGF2-Expression bei Erstdiagnose und verkürzter Überlebenszeit (s. Abb. 13). Für die IGF2-Expression zum Zeitpunkt der Remission konnte dies nicht beobachtet werden.



**Abb. 13: Korrelation von IGF2-Expression und Überlebenszeit.** Gezeigt ist eine Kaplan-Meier-Überlebenskurve für AML-Patienten ED mit hoher (n= 31) und niedriger (n= 16) IGF2-Expression in den BM-MSC. IGF2 high: Patienten, die IGF2 in den BM-MSC hoch exprimieren ( $>$  Expressionsniveau der gesunden NP + 2 x SD), IGF2 low: Patienten, die IGF2 in den BM-MSC niedrig exprimieren ( $\leq$  Expressionsniveau der gesunden NP + 2 x SD).

## V Diskussion

Die AML besitzt insbesondere bei Älteren und Hochrisikopatienten noch eine sehr schlechte Prognose [1, 19]. Daher ist es wichtig, hier neue Therapieansätze zu entwickeln.

Für das Tumor-Microenvironment konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass es zu Progression [22], Therapieresistenz [41] und wahrscheinlich auch Initiation [28] der Erkrankung beizutragen scheint und dass eine Beeinflussung des Stromas und eine Hemmung der Interaktion von Stroma und Tumorzellen einen erfolgversprechenden neuen Therapieansatz bei malignen Erkrankungen darstellt [22, 84, 86]. Die der Stroma-Malignom-Interaktion zugrundeliegende Mechanismen sind aber, insbesondere für hämatologische Neoplasien, noch unzureichend verstanden.

Mesenchymale Stromazellen haben eine wichtige Bedeutung in der Hämatopoese [31, 67] sowie im Tumor-Microenvironment [39-42]. So wäre es auch denkbar, dass weiterhin bestehende pathologische Veränderungen im Stroma in der Leukämie nach allogener Stammzelltransplantation zu dem vereinzelt beobachteten erneuten Auftreten einer Leukämie in den Spenderzellen (donor cell leukemia) beitragen könnte [31].

Daher wurde in dieser Arbeit die Genexpression in MSC des Knochenmarks, dem Microenvironment der hämatopoetischen und vermutlich auch leukämischen Stammzelle, von Patienten mit AML im Vergleich zu gesunden Normalpersonen analysiert. Es sollten Gene identifiziert werden, deren veränderte Expression die Leukämie beeinflussen könnte und die somit potentielle Zielstrukturen für neue Therapien darstellen. Anschließend wurden für einen Kandidaten, den Wachstumsfaktor IGF2, funktionelle Analysen angeschlossen.

### **Aberrationen in der globalen Genexpression mesenchymaler Stromazellen in der AML**

Globale Genexpressionsdaten der BM-MSK von 19 Patienten mit AML (ED) und 4 gesunden Normalpersonen (Abb. 5), die aus zuvor durch die Arbeitsgruppe durchgeführten Microarray-Versuchen stammten, wurden mit Hilfe bioinformatischer Analysen (David bioinformatics) und Literaturrecherche analysiert. Hier konnte gezeigt werden, dass die in den AML-BM-MSK differentiell exprimierten Gene in Prozesse involviert waren wie Proliferation, Differenzierung und Immunantwort sowie auch eine Bedeutung im Zusammenhang mit Lysosomen besaßen (Tab. 6 - 9).

Dies steht im Einklang mit anderen Studien, die zeigen konnten, dass Genexpression sowie DNA-Methylierung von BM-MSK in der Leukämie verändert sind. Auch dort waren Gene im Rahmen der Immunantwort [30], Proliferation und Differenzierung [9] betroffen. Zusätzlich konnte auch eine Bedeutung der differentiell exprimierten Gene für Quieszenz [64], Zelladhäsion [30] und Skelettentwicklung [9] gezeigt werden.

Die veränderte Expression von für die Zelldifferenzierung relevanten Genen könnte daraufhin deuten, dass die Differenzierung von BM-MSK in der AML verändert ist. So konnte auch in funk-

tionellen Assays beobachtet werden, dass BM-MSC in der Leukämie eine Tendenz in Richtung einer adipozytären Differenzierung zu besitzen scheinen [129, 130], während die Differenzierung in Osteoblasten vermindert war [9, 25]. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind aber noch weitestgehend unverstanden und es gibt auch Arbeiten, in denen kein Unterschied für die Differenzierung von BM-MSC zwischen Patienten und Gesunden beobachtet werden konnte [64].

Bei unserer Untersuchung zeigte sich bei der Betrachtung der einzelnen Gene, dass bei den in den AML-BM-MSC vermindert exprimierten Genen Gene betroffen waren, die sonst die Osteogenese stimulieren wie TGF $\beta$ 1 [53] und LRRc17 [131]. Dies könnte also eventuell die Beobachtung anderer Gruppen einer in AML-BM-MSC gestörten Osteogenese stützen.

Pathophysiologisch wäre dies sehr interessant, weil wie schon unter 2.2.2.1 erläutert, Osteoblasten die Hämatopoese vermutlich fördern können, während Adipozyten diese zu hemmen scheinen [72]. Zudem konnten Raaijmakers et al. zeigen, dass Veränderungen in Osteoprogenitoren, die zu einer verminderten Differenzierung in Osteoblasten führen, in der Maus zu einer gestörten Hämatopoese, zu MDS und dem Auftreten einer sekundären Leukämie führen können [28]. Es wäre also denkbar, dass primäre Veränderungen in den BM-MSC vorliegen, die zu einer verminderten Osteogenese führen und dass dies zur hämatopoetischen Insuffizienz und Leukämogenese beitragen könnte.

Des Weiteren gibt es aber auch Arbeiten, die zeigen, dass eine verminderte Osteogenese direkt durch die leukämischen Zellen induziert werden könnte [9, 25]. Demnach könnte dies einen Mechanismus darstellen, über den auch die leukämischen Zellen zur hämatopoetischen Insuffizienz beitragen, wie auch Ergebnisse anderer Studien nahelegen [26, 27].

Zudem zeigte sich in unseren Ergebnissen eine in den AML-BM-MSC veränderte Expression von in die Immunantwort involvierten Genen. Das Immunsystem kann die Entwicklung von Malignomen sowohl fördern als auch hemmen. So scheint es, wie unter 2.2.1 beschrieben, zu Initiation, Progression sowie Chemotherapieresistenz beizutragen [44]. Kürzlich wurde gezeigt, dass eine Chemotherapieresistenz beispielsweise durch eine reziproke Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs in BM-MSC und leukämischen Zellen vermittelt werden könnte [41]. Unsere Daten zeigten eine verminderte Genexpression für NF- $\kappa$ B inhibitor alpha, der NF- $\kappa$ B/REL-Komplexe hemmt. Dies könnte also einen Mechanismus darstellen, durch den es zu einer erhöhten Aktivität des NF- $\kappa$ B-Signalwegs in den Stromazellen kommt.

Auf der anderen Seite besitzt das Immunsystem bei soliden Tumoren sowie auch in der Leukämie eine wichtige Bedeutung für die Bekämpfung maligner Zellen. In der Leukämie zeigt sich dies insbesondere beim GvL-Effekt nach allogener Stammzelltransplantation und nach der Gabe von Donorlymphozyten [44, 83]. Die Blasten können der Immunantwort aber auf verschiedene Weisen entgehen [44, 83, 85] und auch die BM-MSC können, wie zuvor erläutert, ein immunsuppressives Umfeld fördern [132]. Ein Mechanismus, über den sich leukämische Zellen vor der Immunantwort schützen können, ist die Expression von immunologischen Checkpoint-Regulatoren wie PD-L1.

Dies könnte auch zu einem Rezidiv nach allogener Stammzelltransplantation beitragen [83]. Daher ist der Einsatz von den unter 2.2.2.3 beschriebenen Checkpoint-Inhibitoren, die sich u.a. gegen PD-1 und seinen Liganden PD-L1 richten, ein sehr interessanter neuer Ansatz. Auch unsere Daten zeigten eine differentielle Expression von PD-L1 in AML-BM-MS, allerdings war dieser hier herunterreguliert und in anschließenden qRT-PCR-Versuchen konnte kein signifikanter Expressionsunterschied festgestellt werden. Dies müsste in einer größeren Stichprobe weiter untersucht werden. Allerdings gibt es auch Hinweise in der Literatur, dass eine fehlende PD-L1-Expression im Tumorstroma (im Gegensatz zu der Expression auf Tumorzellen) eine negative prognostische Bedeutung haben könnte [115].

Wichtig bei der Betrachtung der Ergebnisse der bioinformatischen Analyse ist es zu beachten, dass „Proliferation“, „Differenzierung“ oder „Immunantwort“ recht große Kategorien darstellen und häufig auch bei Genen einer Kategorie sowohl diese Funktion hemmende als auch fördernde Gene betroffen sind. So sind beispielsweise bei den für die Immunantwort relevanten Genen in unseren Untersuchungen proinflammatorische Zytokine wie IL-1 $\beta$  und IL-8 herunterreguliert, aber auch Gene wie NF- $\kappa$ B inhibitor alpha, was wie zuvor erläutert eher einen proinflammatorischen Effekt hätte.

Zudem ist es wichtig, bei der Interpretation der Ergebnisse zu berücksichtigen, dass die Kategorien teilweise unterschiedlich spezifisch sind. Eine große Anzahl von differentiell exprimierten Genen in einer Kategorie muss nicht zwingend mit der Relevanz der Funktion korrelieren, sondern kann auch darin begründet sein, dass diese unspezifischer als andere Kategorien ist.

Insgesamt gab es bei unseren Ergebnissen eine relativ große Streuung hinsichtlich der verschiedenen Kategorien und bei den spezifischeren Kategorien waren teilweise nur recht wenige Gene enthalten und nach Benjamini-Hochberg statistisch nicht signifikant. Zudem müssen auch Limitationen der Microarray-Methode selbst wie der Batch-Effekt bedacht werden, da AML-Patienten und NP zu verschiedenen Zeitpunkten verarbeitet wurden.

Die Microarray-Analyse diente in dieser Arbeit jedoch vor allem als Screening-Methode, um Kandidatengene zu identifizieren, deren Expression anschließend mittels qRT-PCR-Versuchen untersucht werden sollte.

### **Validierung von Kandidatengen**

Da die Analyse der Microarray-Daten wie zuvor ausgeführt in dieser Arbeit vor allem als Screening-Methode genutzt wurde, um interessante Kandidaten zu identifizieren, sollten die Ergebnisse anschließend mit einer anderen Methode validiert werden. Dafür wurde die Expression für ausgewählte Kandidatengene in einer unabhängigen Kohorte AML-Patienten (ED) im Vergleich zu gesunden Normalpersonen mittels qRT-PCR bestimmt.

Für IGF2, einen Wachstumsfaktor, für den bereits eine wichtige Bedeutung bei verschiedenen Malignomen gezeigt wurde [92-94], konnte eine deutliche Überexpression in den AML-BM-MSC beobachtet werden (AML ED n = 63, NP n = 9, p = 0,003; Abb. 8).

Eine IGF2-Überexpression wird häufig durch ein LOI (loss of imprinting) hervorgerufen [13] und auch in leukämischen Zellen konnte mehrfach ein LOI mit IGF2-Überexpression beobachtet werden [98, 133]. Im Stroma hingegen wurde in der Leukämie bisher noch keine IGF2-Überexpression gezeigt.

Beachtet werden muss dabei, dass die Patienten deutlich älter als die Probanden der gesunden Kontrollgruppe waren (AML ED Median: 53 Jahre, NP Median: 25 Jahre), so dass es theoretisch denkbar wäre, dass auch die unterschiedliche Altersstruktur zu der verschiedenen IGF2-Expression beigetragen haben könnte. Allerdings zeigte sich bei der Betrachtung der IGF2-Expression in den AML-BM-MSC kein Zusammenhang zwischen erhöhter Expression und Alter der Patienten (Tab.13).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass auch in der Remission eine IGF2-Überexpression vorliegt, wenn auch etwas geringer ausgeprägt als bei den Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose (Abb. 9). Dies könnte aber auch auf die Heterogenität der AML und die Auswahl der Patienten zurückzuführen sein, da die Patienten für AML ED und AML Remission nur teilweise aus derselben Kohorte stammten.

Die Untersuchung weiterer Kandidaten zeigte in den qRT-PCR-Versuchen jedoch meist keinen so deutlichen Unterschied zwischen AML- und NP-BM-MSC wie in den Microarray-Daten (exemplarische Darstellung einzelner Kandidaten s. Abb. 6, Abb. 7 und Abb. 8).

Die mangelnde Reproduzierbarkeit der Ergebnisse aus den Microarray-Versuchen kann vermutlich teilweise durch Limitationen der Microarray-Methode selbst wie den Batch-Effekt erklärt werden. Allerdings konnten die qRT-PCR-Versuche aufgrund des begrenzten Materials auch nur in Duplikaten und ohne Wiederholung und insbesondere nur an einer kleinen Stichprobe durchgeführt werden. Dies könnte auch mit ursächlich dafür sein, dass einige Unterschiede in unseren qRT-PCR-Versuchen nicht dargestellt werden konnten. So konnte für Kandidaten, für die in den qRT-PCR-Läufen kein Unterschied gesehen wurde, in anderen Arbeiten inzwischen ein Expressionsunterschied und eine funktionelle Bedeutung auch im Stroma der Leukämie gezeigt werden. Für Galectin-3 (LGALS3) beispielweise wurde in AML-BM-MSC eine erhöhte Expression beobachtet, die zudem bei rezidivierten und refraktären Patienten höher war als bei Erstdiagnose [124] und einen unabhängigen negativen prognostischen Marker darstellt [121].

Die Diskrepanz zu unseren Ergebnissen ist zudem auch durch unterschiedliche Versuchsbedingungen und Methoden zu erklären. Beispielsweise wurde sowohl mit den Microarray- als auch den qRT-PCR-Versuchen nur die RNA-Expression bestimmt; viele andere Arbeiten beziehen sich hingegen auf die Proteinmenge. Die Regulation der Menge an Genprodukt findet auf Transkriptions- sowie Translationsebene und auch posttranslational statt. So könnte die Menge des Genpro-



dukts verändert sein, obwohl wir auf RNA-Ebene keinen Unterschied beobachten konnten und theoretisch müsste auch umgekehrt eine veränderte RNA-Konzentration nicht zwingend mit einer veränderten Menge Protein korrelieren.

Zudem sind die Heterogenität der Ergebnisse in der Literatur sowie die mangelnde Reproduzierbarkeit vermutlich auch darin begründet, dass die AML an sich eine sehr heterogene Erkrankung ist. So gibt es viele verschiedene Mutationen, die in den Blasten vorliegen können; je nach Patient sind unterschiedliche relevant und auch innerhalb eines Patienten sind verschiedene Subklone mit unterschiedlichen Mutationen möglich [4, 134]. Da die Veränderungen im Stroma, wie zuvor erläutert, wahrscheinlich auch durch die leukämischen Zellen selbst hervorgerufen werden können [9, 25-27, 30], könnten sich diese Unterschiede in der Leukämie eventuell direkt in den Stromazellen widerspiegeln.

Aber auch die gesunden Normalpersonen wiesen sowohl in den Microarray- als auch PCR-Ver suchen keine homogene Genexpression auf. Dies zeigt, dass neben der Erkrankung zusätzliche Gründe vorliegen müssen. So sind MSC möglicherweise nicht nur durch die Erkrankung heterogen, sondern auch als Gruppe in sich.

In Anlehnung an die Definition von MSC durch die „International Society for Cellular Therapy“ [32] waren unsere BM-MSK durch ihre Plastikadhärenz, ihr Differenzierungspotential und die Oberflächenmarker CD73+/CD105+/CD271dim/-/CD45-/ CD33- gekennzeichnet. Allerdings ist die Zellpopulation, die diese Kriterien erfüllt, recht heterogen und noch unzureichend charakterisiert [135]. So scheint es verschiedene Subtypen von BM-MSK mit unterschiedlichen Aufgaben in der Hämatopoese zu geben [10, 75] und verschiedene Nischen im Knochenmark mit einer unterschiedlichen Zusammensetzung an Zellen [65, 66]. Somit wäre es prinzipiell also denkbar, dass die Proben zufällig unterschiedliche Verteilungen an MSC-Subtypen enthielten und diese unterschiedliche Zusammensetzung Einfluss auf die Gesamtgenexpression hatte.

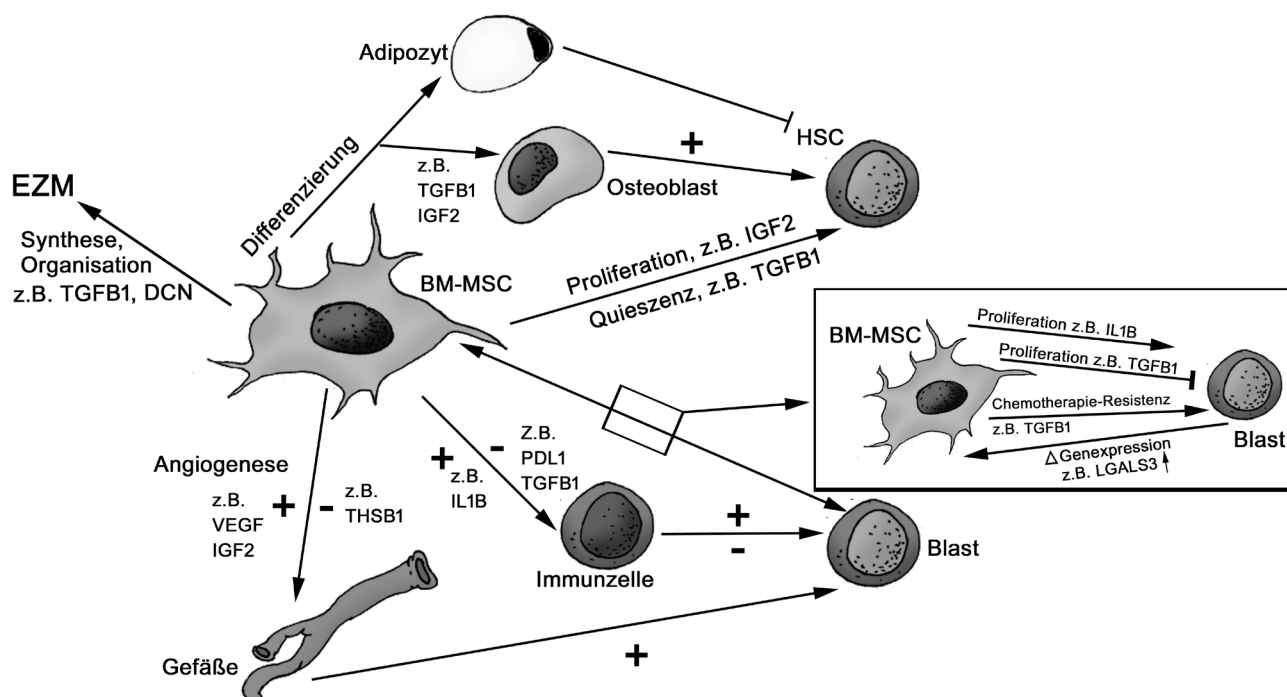
Auch die Kulturbedingungen könnten zum einen dazu führen, dass Artefakte durch die Kultivierung auftreten [136]. Andererseits werden aber wahrscheinlich auch viele Veränderungen, die in der Leukämie bestehen, nicht gesehen, weil in der Kultur andere Bedingungen vorliegen und die Interaktion mit den anderen Stromakomponenten fehlt. Beispielsweise wurde für Gene wie LGALS3, CCL28 und TGFB1 gezeigt, dass die Expression durch Hypoxie, wie sie für das Tumorstroma typisch ist, nicht aber in Kultur vorliegt, induziert werden kann [102, 108, 124].

Des Weiteren wurde die Beobachtung, dass in Remission Veränderungen teilweise reversibel waren, auf die Abwesenheit der Blasten zurückgeführt [9, 121]. Auch in Kultur, wo die MSC bei uns über 4 Passagen expandiert wurden, fehlt diese Interaktion mit den Blasten.

Die Kultivierung ist jedoch notwendig, um genügend Zellen für die Analysen zu erhalten sowie für eine ausreichende Reinheit der Zellen. Auch andere Gruppen verwenden für ihre Studien BM-MSK aus Passage 2 bis 4 [9, 30, 64, 129].

Eine wichtige Frage in diesem Zusammenhang ist jedoch, wodurch die einzelnen Veränderungen hervorgerufen wurden und wie stabil sie sind. Für IGF2 konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Expression über die Passagen 1-4 relativ konstant zu sein scheint und auch in Remission konnte eine IGF2-Überexpression beobachtet werden (Abb. 9). Vermutlich ist aber nur ein Teil der Veränderungen im Stroma so stabil. Diese Veränderungen wären dann jedoch besonders interessant, da sie durch ihre Persistenz in Remission eventuell mitverantwortlich für das Auftreten eines Rezidivs sein könnten.

Die Stroma-Leukämie-Interaktion ist also sehr komplex, denkbare Interaktionen sind für eine Auswahl der für die Validierung verwendeten Kandidaten in Abb.14 zusammengefasst.



**Abb. 14: Modell: Stroma-Leukämie-Interaktion.** Gezeigt ist, welchen Einfluss die BM-MSCs auf andere Stroma-Komponenten sowie HSC und Blasten ausüben könnten und wie hier identifizierte Kandidatengene darin möglicherweise involviert sind. So können BM-MSCs EZM synthetisieren und organisieren, wichtige Faktoren sind hierfür TGF-β1 (Genprodukt von TGFβ1) und DCN. Über VEGF und IGF2 können BM-MSCs die Angiogenese fördern, über THSB1 hemmen. Eine erhöhte Vaskularisierung im Knochenmark scheint eine Progression der Leukämie zu fördern. Über Faktoren wie IL-1β (Genprodukt von IL1β) und PD-L1 sowie TGF-β1 können BM-MSCs Immunzellen sowohl hemmen als auch stimulieren, die selbst wahrscheinlich eine Progression der Leukämie sowohl fördern als auch hemmen können. Zudem können BM-MSCs in Adipozyten und Osteoblasten differenzieren und diese dann Einfluss auf die Hämatopoese nehmen. Zusätzlich zu diesen indirekten Effekten sind auch direkte Effekte von BM-MSCs auf HSC und Blasten denkbar wie die Stimulierung oder Hemmung der Proliferation dieser und die Förderung einer Chemotherapieresistenz. Aber auch die Blasten können vermutlich einen direkten Einfluss auf die BM-MSCs ausüben und so etwa die LGALS3-Expression in den BM-MSCs stimulieren.

EZM: Extrazellulärmatrix, BM-MSCs: mesenchymale Stromazellen des Knochenmarks, HSC: hämatopoetische Stammzelle. TGFβ1: Transforming growth factor beta 1, DCN: Decorin, VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor, IGF2: Insulin-like growth factor 2, THSB1: Thrombospondin-1, IL1β: Interleukin-1β, PDL1: Programmed death-ligand 1, LGALS3: Galectin-3.



## **Bedeutung der IGF2-Überexpression**

IGF2 ist ein Wachstumsfaktor, wirkt insbesondere mitogen, antiapoptotisch und reguliert wichtige Prozesse wie Differenzierung und Metabolismus. Der IGF-Signalweg spielt eine wichtige Rolle bei Karzinogenese, Progression, Metastasierung und Chemotherapieresistenz [92-94] und es konnte eine Korrelation zwischen verminderter Aktivität des Signalwegs und einer erhöhten Lebenserwartung sowie verminderter Rate an Malignomen beobachtet werden [137].

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die IGF2-Expression in AML-BM-MSc erhöht ist (Abb. 8, Abb. 9). Die Bedeutung von IGF2 in AML und Stroma ist aber noch unzureichend verstanden, so dass nachfolgend funktionelle Analysen angeschlossen wurden.

Zunächst wurde die Expression von Rezeptoren für IGF2 in Blasten in der AML betrachtet (Abb. 10). Bereits in kleineren Studien konnte gezeigt werden, dass AML-Blasten den Insulin- und den IGF1-Rezeptor exprimierten, wobei die Expression recht heterogen war [128]. In dieser Arbeit wurde die Rezeptorexpression in einer größeren Kohorte betrachtet (AML n = 130, NP n = 13). Hierfür wurden Microarray-Daten von leukämischen Blasten bzw. CD34+ hämatopoetischen Zellen aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe [99, 100] analysiert.

Hier konnte, analog zu den Ergebnissen der vorherigen Arbeiten, gezeigt werden, dass die Blasten in der AML die Rezeptoren für IGF2 exprimieren; eine Grundvoraussetzung, damit IGF2 einen direkten Effekt auf die Blasten ausüben kann. Allerdings war der IGF-1R, einer der Rezeptoren, über den IGF2 seinen Effekt vermitteln kann, in den Blasten signifikant herunterreguliert ( $p < 0,0001$ ). Aber auch der IGF-2R, der den Signalweg über eine Degradation von IGF2 hemmen kann [96], wurde in den Blasten signifikant vermindert exprimiert ( $p < 0,0001$ ), was wiederum zu einer verstärkten Wirkung von IGF2 auf die Blasten führen könnte.

Die Stärke der Rezeptorexpression war aber, insbesondere bei den Blasten, sehr heterogen, so dass es auch Patienten gab, die den IGF-1R im Vergleich zu den Normalpersonen überexprimierten und Patienten, die den IGF-2R vermindert exprimierten.

In den Microarray-Daten der 19 AML-BM-MSc und 4 NP-BM-MSc, die für die vorherigen Analysen verwendet worden waren, zeigte sich keine veränderte Rezeptorexpression in der AML (Abb. 11).

Die verminderte Expression des IGF-1R in den Blasten einiger Patienten ist auch unter therapeutischem Gesichtspunkt interessant, da es bereits Möglichkeiten gibt, den IGF-Signalweg zu hemmen. Hier werden insbesondere IGF-1R-Antikörper und Rezeptortyrosinkinase hemmende „small molecule tyrosine kinase inhibitor“ eingesetzt; zudem gibt es auch Antikörper gegen die Liganden IGF1 und IGF2 [94]. Klinische Studien für den Einsatz bei verschiedenen Tumorentitäten zeigen allerdings, dass nur ein Teil der Patienten gut auf die Therapie anspricht. Auch unsere Daten für die Rezeptorexpression deuten daraufhin, dass zumindest bei einem Teil der untersuchten AML-Patienten der Einsatz von IGF-1R-Antikörpern wirkungslos sein könnte. Hier wären vermutlich direkte IGF2-Antikörper sinnvoller, wie der Antikörper BI 836845, der in vitro beispielsweise beim

Multiples Myelom und in Tierversuchen einen Antitumoreffekt gezeigt hat [138] und zurzeit bei Patienten mit Lungen-Karzinom in Kombination mit einem Tyrosinkinase-Inhibitor getestet wird (NCT02191891) [139].

Da bereits für viele Tumorentitäten gezeigt wurde, dass IGF2 die Proliferation der malignen Zellen fördern kann [93], wurde anschließend in einem Proliferations-Assay (WST-1) die Auswirkung verschiedener Konzentrationen IGF2 auf leukämische Zelllinien sowie primäre AML-Blasten untersucht. Hier konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen Zellen mit und ohne IGF2-Zusatz beobachtet werden (Abb. 12). Mögliche Gründe hierfür sind zum einen Versuchsbedingungen wie die gewählte IGF2-Konzentration. Für die hier dargestellten Versuche wurden 10 – 200 ng IGF2/ ml eingesetzt, andere Gruppen hingegen benutzten für ihre Versuche teilweise höhere Konzentrationen, z.B. 1 µg/ml für die Stimulation der Proliferation von HSC [140]. Aber auch bei niedrigeren Konzentrationen konnten Effekte auf die Proliferation beobachtet werden, so beispielsweise bei 200 ng IGF2/ ml in der DS-AMKL (Down syndrome acute megakaryoblastic leukemia) [141] oder 30 ng/ml für embryonale Stammzellen [142]. Des Weiteren könnte auch das Read out ursächlich gewesen sein. Zwar ist IGF2 ein potentes Mitogen, aber die Rolle von IGF2 scheint stark kontextabhängig zu sein und auch andere Arbeiten konnten nicht immer einen Effekt auf die Proliferation zeigen. Bei Osteosarkomzellen beispielsweise wurde durch IGF2 nicht die Proliferation stimuliert, sondern die Apoptose gehemmt und ein Eintreten der Zellen in einen Ruhezustand gefördert [143]. Dies könnte zu einer Chemotherapieresistenz beitragen, würde aber mit dem in dieser Arbeit verwendeten Proliferations-Assay vermutlich nicht gesehen werden. Dieser misst die Menge an durch die Zellen umgesetztem WST-1, so dass die Signalstärke von der Zellzahl, aber auch von der Stoffwechselaktivität der Zellen abhängt, die bei Zellen im Ruhezustand stark reduziert ist.

Für jeden Zeitpunkt wurde daher auch die Zellzahl bestimmt (Daten hier nicht gezeigt), aber auch hier konnte kein Unterschied beobachtet werden. Allerdings erfolgte nur eine orientierende Bestimmung mit der Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop. Genauer wären beispielsweise Apoptoseassays mittels Durchflusszytometrie.

Zudem könnte auch die Inkubationszeit zu kurz gewesen sein, um einen Effekt zu sehen, aber auch bei einer Inkubationszeit von 7 Tagen konnte kein Unterschied gezeigt werden. Hier muss aber auch bedacht werden, dass IGF2 nach einer gewissen Zeit eventuell nicht mehr in ausreichender Konzentration vorhanden ist.

Auch wäre es denkbar, dass eine Proliferation der Blasten allgemein durch die Kulturbedingungen gehemmt wurde. So konnte im Gegensatz zu den Zelllinien über die Zeit keine Zunahme des Signals beobachtet werden.

Neben den Versuchsbedingungen muss aber auch hier wieder beachtet werden, dass nur eine recht kleine Stichprobe untersucht wurde und die AML eine sehr heterogene Erkrankung ist sowie auch das Krankheitsstadium eine Bedeutung für das Ansprechen haben kann. So wurde beispielsweise

für TGF- $\beta$  gezeigt, dass sich seine Funktion im Laufe einer Tumorerkrankung verändern kann [22]. Auch wenn die in dieser Arbeit untersuchten Proben alle von Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose stammten, war die Erkrankung zu dem Zeitpunkt doch unterschiedlich weit fortgeschritten. Zusammen mit den schon zu Beginn vorliegenden unterschiedlichen Mutationen in den leukämischen Zellen könnte das dazu führen, dass einige Blasten unabhängig von bestimmten vom Stroma produzierten Faktoren werden, worauf auch die Ergebnisse einiger Studien hinweisen [75, 144]. Es wäre also denkbar, dass IGF2 nur bei einem Teil der Patienten relevant ist und möglicherweise die untersuchten Blasten unabhängig von IGF2 waren.

Zudem wären auch indirekte Effekte von IGF2 auf die Blasten über die Beeinflussung anderer Stromakomponenten denkbar wie der Differenzierung von BM-MSK [145, 146] oder einer Stimulation der Neovaskularisierung [147].

Auch wäre es möglich, dass nicht die Blasten, sondern die HSC beziehungsweise LSC die relevanten Zielzellen für den Effekt von IGF2 in der Leukämie sind. LSC sind HSC sehr ähnlich und unsere Beobachtung, dass in den Blasten der IGF-1R im Vergleich zu den CD34+ Zellen bei NP, den HSC, signifikant herunterreguliert war (Abb. 10), könnte auch dahingehend interpretiert werden, dass die Blasten weniger empfindlich für IGF2 sind als HSC und möglicherweise LSC.

Auch andere Arbeiten zeigen, dass IGF2 einen Effekt auf HSC hat. So konnte die Hinzugabe von IGF2 die Proliferation von HSC fördern [140]. Andere Studien hingegen zeigen, dass eine Blockade des Signalwegs keine große Auswirkung auf HSC hatte [148, 149]. Dies muss jedoch nicht im Widerspruch zu den anderen Ergebnissen stehen, sondern könnte möglicherweise auch daraufhin deuten, dass der IGF2-Signalweg in den HSC normalerweise wenig aktiv ist, so dass eine Blockade nur einen geringen Effekt hat, aber eine erhöhte IGF2-Konzentration zu vermehrter Proliferation führen kann. In diese Richtung geht auch die Beobachtung, dass in VSELS (very-small embryonic-like stem cells), Zellen, die in verschiedenen Geweben wie z.B. dem Knochenmark vorkommen und dort in HSC differenzieren können, physiologisch ein Erasure of imprinting vorliegt. Dieses führt zu einer verminderten Aktivität des IGF-Signalwegs in den Zellen und die Autoren stellen die Hypothese auf, dass dies wichtig für die Quieszenz der Zellen und eine Aufrechterhaltung eines Pools an pluripotenten Stammzellen sein könnte. Eine vermehrte Stimulation des IGF-Signalwegs könnte zu einer erhöhten Proliferation und malignen Transformation der Zellen beitragen [97, 150, 151].

Diese These wird auch gestützt durch die Beobachtung, dass bei Lungen-Karzinomen, bei denen die IGF2-Expression NF-kB-abhängig erhöht war, der Anteil an Tumorzellen mit CSC-Eigenschaften erhöht war, was auf die erhöhte IGF2-Expression zurückgeführt wurde [152]. Interessant ist in dem Zusammenhang auch, dass in unseren Microarray-Daten der NF-kB inhibitor alpha herunterreguliert war, so dass eine erhöhte Aktivität des NF-kB-Signalwegs auch in den Stromazellen zu der erhöhten IGF2-Expression führen könnte.

Somit könnte also möglicherweise das vom Stroma produzierte IGF2 zu einer malignen Transformation der HSC in LSC beitragen. So konnten auch verschiedene Arbeiten zeigen, dass eine Hemmung des IGF-Signalwegs bei Mäusen vor allem zu einer verminderten Anfälligkeit für eine Transformation in eine Leukämie führte, nach Krankheitsausbruch aber der Verlauf vergleichbar mit dem der Kontrollgruppe war [148, 153].

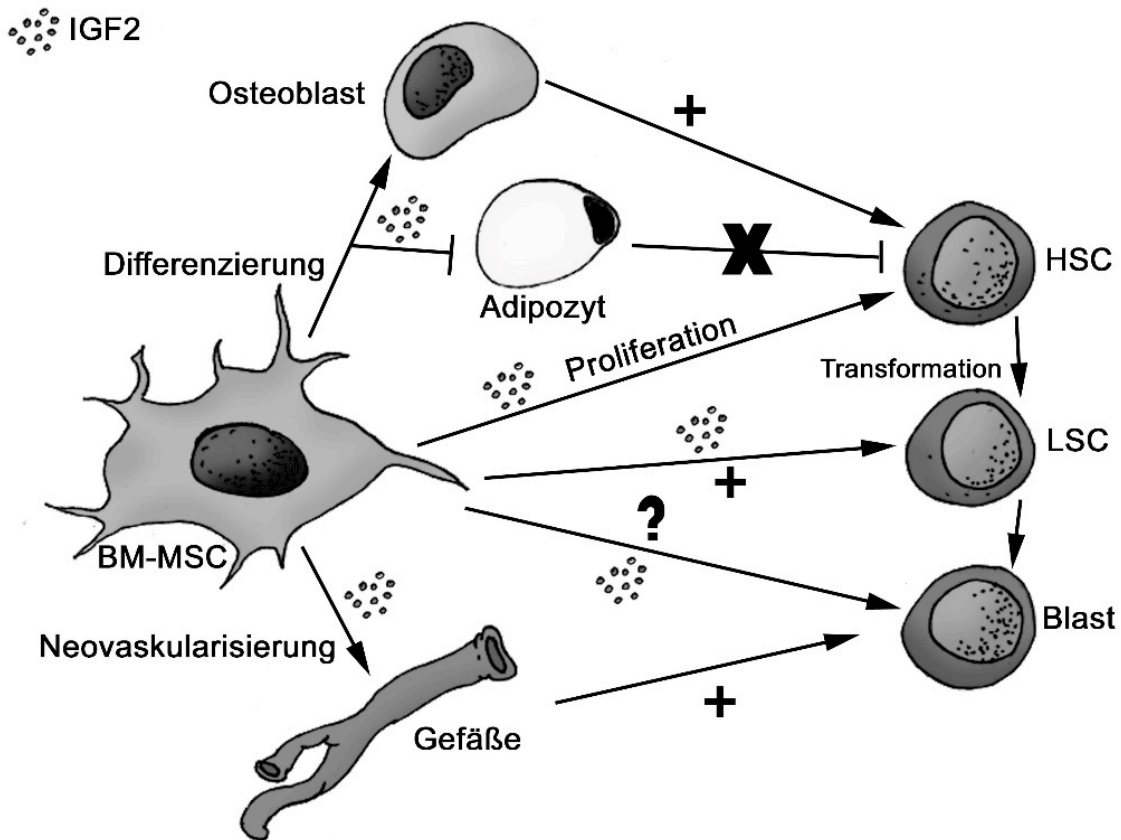
Wäre IGF2 also besonders für die Leukämogenese und die LSC relevant, würde dies einerseits erklären, warum bei der Hinzugabe von IGF2 zu den Blasten kein Effekt gezeigt werden konnte. Aber auch unter therapeutischen Gesichtspunkten wäre es interessant, weil LSC für Therapieresistenz, MRD und Rezidive verantwortlich gemacht werden und mit aktuell verfügbaren Therapien nicht ausreichend getroffen werden. Die Hemmung von IGF2 könnte hier einen möglichen Ansatz darstellen, während HSC durch die Blockade wie zuvor ausgeführt vermutlich nicht signifikant beeinträchtigt würden.

Abschließend wurde untersucht, ob für die IGF2-Expression in den AML-BM-MSc eine prognostische Bedeutung gezeigt werden kann. Hierfür wurden die Patienten nach IGF2-Expression in den BM-MSc in die 2 Gruppen „IGF2 high“ und „IGF2 low“ eingeteilt und die IGF2-Expression mit der Ausprägung klinischer Merkmale wie FLT3-, NPM1-Mutation und Überlebenszeit korreliert (Tab. 13, Abb. 13). Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede beobachtet werden, jedoch ein Trend zu kürzerer Überlebenszeit bei IGF2-Überexpression.

Für andere Tumorentitäten wie das Ovarial-Karzinom konnte bereits gezeigt werden, dass eine erhöhte IGF2-Expression mit einer verkürzten Überlebenszeit korreliert [154]. Allerdings war auch hier unsere Stichprobengröße eventuell zu gering, um statistisch signifikante Effekte zu sehen.

Zudem konnte, wie zuvor erläutert, auch bei Mäusen eine Auswirkung einer IGF-Signalweghemmung auf das Auftreten einer Leukämie, nicht aber den klinischen Verlauf gezeigt werden [148, 153]. So könnte die IGF2-Expression in BM-MSc möglicherweise eher mit dem Auftreten einer Leukämie beziehungsweise die Expression in Remission mit dem Auftreten eines Rezidivs korrelieren. Dies konnte hier aufgrund der kleinen Fallzahlen nicht untersucht werden.

IGF2 stellt also einen sehr interessanten Kandidaten dar, insbesondere, weil es auch schon therapeutische Möglichkeiten zur Blockade von IGF2 gibt. Die Bedeutung von IGF2 in der AML müsste aber noch weiter untersucht werden. Die hier erläuterten denkbaren Effekte von IGF2 auf die Leukämie sind in Abb. 15 zusammengefasst.



**Abb. 15: Modell: Bedeutung von IGF2 für die Leukämie.** Gezeigt ist, wie IGF2 die Leukämie direkt und indirekt beeinflussen könnte. Von BM-MSc sezerniertes IGF2 kann vermutlich deren Differenzierung in Osteoblasten fördern, in Adipozyten hingegen hemmen. Adipozyten könnten dann die Hämatopoese nicht mehr hemmen, während Osteoblasten die Hämatopoese fördern würden. Von BM-MSc sezerniertes IGF2 könnte wahrscheinlich auch direkt die Proliferation von HSC stimulieren sowie die Existenz von LSC und die Neovaskularisierung fördern. Eine erhöhte Vaskularisierung des Knochenmarks scheint wiederum die AML-Progression zu begünstigen. Auch ein direkter Einfluss auf die AML-Blasten wäre denkbar, wobei noch genauer untersucht werden müsste, worin dieser besteht.

BM-MSc: mesenchymale Stromazellen des Knochenmarks, HSC: hämatopoetische Stammzelle, LSC: leukämische Stammzelle.

### Zusammenfassung und Ausblick

Da die Prognose der AML insbesondere für Ältere und Hochrisikopatienten noch immer sehr schlecht ist [1, 19] und das Microenvironment bei malignen Neoplasien ein interessantes neues Therapietarget darstellt [22, 28, 41, 78-80, 120], wurde hier die Genexpression mesenchymaler Stromazellen des Knochenmarks von Patienten mit AML im Vergleich zu gesunden Normalpersonen untersucht. Es wurden in den AML-BM-MSc differentiell exprimierte Gene identifiziert, die eine Bedeutung für die Leukämie haben könnten und so eine potentielle Zielstruktur für neue Therapien darstellen.

Analog zu vorherigen Studien konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Genexpression in AML-BM-MSc im Vergleich zu NP-BM-MSc verändert ist. Bioinformatische Analysen (David

bioinformatics) von Microarray-Daten von 19 AML-BM-MSD ED und 4 NP-BM-MSD zeigten, dass differentiell exprimierte Gene in Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und die Immunantwort involviert waren. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen anderer Arbeiten [9, 30]. Pathophysiologisch sind diese Kategorien sehr interessant, da beispielsweise eine gestörte Differenzierung der MSD in Osteoblasten in Verbindung gebracht wurde mit der Leukämogenese [28] und hämatopoetischen Insuffizienz [26, 27, 72]. Auch für die Immunantwort konnte eine wichtige Bedeutung in der Leukämie gezeigt werden [44, 83] und zurzeit sind verschiedene therapeutische Strategien in Erforschung, um die Immunantwort auch in der Leukämie therapeutisch zu nutzen [86, 90, 91].

Die Analyse der Microarray-Daten diente in dieser Arbeit vor allem als Screening-Methode, um interessante Kandidatengene zu identifizieren, die anschließend an einer unabhängigen Kohorte AML ED und NP mittels qRT-PCR validiert werden sollten.

Für viele Kandidaten zeigte sich in den qRT-PCR-Versuchen jedoch kein so deutlicher Unterschied zwischen AML- und NP-BM-MSD wie in den Microarray-Daten.

Andere Arbeiten hingegen konnten inzwischen eine differentielle Expression und prognostische Bedeutung für einige dieser Kandidaten in AML-BM-MSD zeigen, wie beispielsweise für LGALS3 [121, 124].

Ursächlich für die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen aus den qRT-PCR-Versuchen und den Microarray-Analysen sowie den Ergebnissen anderer Arbeiten sind vermutlich unter anderem, dass die AML eine sehr heterogene Erkrankung ist und auch die MSD selbst eine recht heterogene Zellpopulation bilden. Die Kohortengröße für die qRT-PCR-Analysen war aufgrund des begrenzten Materials für das erste Screening recht klein (AML  $n = 4 - 7$ , NP  $n = 4 - 9$ ). Hier müssten also noch weitere Untersuchungen, insbesondere an einer deutlich größeren Kohorte, angeschlossen werden, um auch Unterschiede zu sehen, die nur einen Teil der Patienten betreffen. Zudem sollten die BM-MSD noch genauer charakterisiert sowie geeignete Standards für Isolierung und Kultivierung von BM-MSD eingeführt werden, um die Ergebnisse verschiedener Arbeiten besser vergleichbar zu machen.

Auch muss beachtet werden, dass sowohl die Microarray- als auch die qRT-PCR-Versuche nur die RNA-Expression bestimmen, die nicht zwingend mit der Proteinmenge korrelieren muss. Die Ergebnisse anderer Arbeiten hingegen beziehen sich häufig auf die Proteinmenge. Daher sollte die Expression der Kandidaten auch auf Proteinebene bestimmt werden, beispielsweise mittels Durchflusszytometrie oder ELISA.

Für den Wachstumsfaktor IGF2 konnte eine deutliche Überexpression mittels qRT-PCR sowohl in den AML-BM-MSD ED als auch in den AML-BM-MSD Rem bestätigt werden. Um die funktionelle Bedeutung von IGF2 in der AML zu untersuchen, wurden weitere Analysen angeschlossen. Zunächst wurde an einer Kohorte von 130 AML gezeigt, dass die Blasten die Rezeptoren für IGF2 exprimieren, eine Grundvoraussetzung, damit IGF2 einen direkten Effekt auf Blasten ausüben



kann. Da bereits für viele Tumorentitäten gezeigt werden konnte, dass IGF2 die Proliferation der malignen Zellen fördert [93], wurde anschließend in einem Proliferations-Assay (WST1) die Auswirkung verschiedener Konzentrationen IGF2 auf die Proliferation leukämischer Zelllinien und primärer Blasten untersucht. Hier konnte kein signifikanter Unterschied zwischen unbehandelten Zellen und Zellen mit IGF2-Zusatz beobachtet werden. Auch hier muss allerdings wieder beachtet werden, dass die AML eine sehr heterogene Erkrankung ist und die Stichprobe recht klein war. Zudem könnten auch Versuchsbedingungen wie die IGF2-Konzentration ungeeignet gewesen sein. Des Weiteren scheint die Wirkung von IGF2 stark kontextabhängig zu sein; bei Osteosarkomzellen beispielsweise wurde keine mitogene Wirkung von IGF2 beobachtet, sondern die Förderung eines Ruhezustands der Zellen [143]. Dies würde die Blasten möglicherweise vor einer Chemotherapie schützen können, hätte aber in unserem Proliferationsassay nicht gesehen werden können. Auch wäre es denkbar, dass der Effekt von IGF2 auf die leukämischen Zellen indirekt über eine Veränderung des Stromas wie eine Induktion der Neovaskularisierung [147] oder Differenzierung der BM-MSK [145, 146] vermittelt wird. Zudem gibt es Arbeiten, die daraufhin deuten, dass möglicherweise nicht die Blasten, sondern die LSC die relevanten Zielzellen für den Effekt von IGF2 in der Leukämie sein könnten [97, 148, 150, 151, 153]. Dies wäre besonders interessant, weil LSC nach dem Cancer-Stem-Cell-Modell für Therapieresistenz, MRD und Rezidive verantwortlich gemacht werden und mit bisherigen Therapien nicht ausreichend getroffen werden.

Um die Auswirkungen der IGF2-Überexpression im Stroma der Leukämie genauer zu eruieren, sollten also noch weitere Untersuchungen angeschlossen werden. Wichtig wäre es, zunächst die IGF2-Überexpression auch auf Proteinebene zu bestätigen und die funktionellen Analysen in der AML an einer größeren Kohorte durchzuführen. Ggf. könnten Versuchsbedingungen wie die IGF2-Konzentration verändert, andere Read outs wie beispielsweise Apoptoseassay getestet werden (eventuell auch in Kombination mit Chemotherapien wie Ara-C) oder der Einfluss von IGF2 auf andere Zellen untersucht werden.

Abschließend wurde in dieser Arbeit untersucht, ob eine Korrelation der IGF2-Expression in AML-BM-MSK mit der Ausprägung klinischer Merkmale wie NPM1-, FLT3-Mutation oder Überlebenszeit beobachtet werden kann. Hier zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der Gruppe mit hoher und der Gruppe mit niedriger IGF2-Expression. Allerdings konnte ein Trend zu einer kürzeren Überlebenszeit bei erhöhter IGF2-Expression beobachtet werden. Jedoch war auch hier die Stichprobe vermutlich zu klein („IGF2 high“ n = 29 - 38, „IGF2 low“ n = 14 -18), so dass Unterschiede, die nur einen Teil der Patienten betreffen, nicht gesehen wurden. Zudem gibt es Arbeiten, die daraufhin deuten, dass IGF2 in der AML wichtiger für die Initiation der Erkrankung als für die Progression sein könnte [148, 153]. Interessant wäre also die Untersuchung einer größeren Kohorte sowie eventuell auch anderer Parameter wie z.B. der Zusammenhang zwischen IGF2-Expression in Remission und der Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs.

Zusammenfassend sollte also der Einfluss des Knochenmark-Stromas und speziell von IGF2 auf die AML weiter charakterisiert werden, um neue Therapien zu entwickeln, die die Stroma-Leu-

kämie-Interaktion beeinflussen können. Diese könnten dabei besser verträglich sein als beispielsweise Chemotherapien und somit auch für ältere Patienten geeignet, die aufgrund eines schlechten Allgemeinzustandes aggressive Therapien nicht tolerieren. Zudem könnten sie möglicherweise auch LSC treffen, die von den bisher verfügbaren Therapien in der Regel weitestgehend verschont bleiben und eine Chance bei durch das Stroma vermittelter Therapieresistenz sowie MRD bieten. Insbesondere für IGF2 gibt es Hinweise, dass mit dessen Blockade LSC getroffen werden könnten, während die physiologische Hämatopoese wahrscheinlich weitestgehend verschont bliebe.



## VI Literaturverzeichnis

1. Bornhauser, M. and G. Ehninger, [Diagnostics and therapy of acute myeloid leukemia]. *Dtsch Med Wochenschr*, 2009. 134(39): p. 1935-41.
2. Fey, M.F. and C. Buske, Acute myeloblastic leukaemias in adult patients: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 2013. 24 Suppl 6: p. vi138-43.
3. Deschler, B. and M. Lubbert, Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. *Cancer*, 2006. 107(9): p. 2099-107.
4. Ferrara, F. and C.A. Schiffer, Acute myeloid leukaemia in adults. *Lancet*, 2013. 381(9865): p. 484-95.
5. Gilliland, D.G. and J.D. Griffin, The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood*, 2002. 100(5): p. 1532-42.
6. Gale, R.E., C. Green, C. Allen, A.J. Mead, A.K. Burnett, R.K. Hills, and D.C. Linch, The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, 2008. 111(5): p. 2776-84.
7. Thiede, C., C. Steudel, B. Mohr, M. Schaich, U. Schakel, U. Platzbecker, M. Wermke, M. Bornhauser, M. Ritter, A. Neubauer, G. Ehninger, and T. Illmer, Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood*, 2002. 99(12): p. 4326-35.
8. Dohner, H. and V.I. Gaidzik, Impact of genetic features on treatment decisions in AML. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2011. 2011: p. 36-42.
9. Geyh, S., M. Rodriguez-Paredes, P. Jager, C. Khandanpour, R.P. Cadeddu, J. Gutekunst, C.M. Wilk, R. Fenk, C. Zilkens, D. Hermsen, U. Germing, G. Kobbe, F. Lyko, R. Haas, and T. Schroeder, Functional inhibition of mesenchymal stromal cells in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 2016. 30(3): p. 683-91.
10. Tabe, Y. and M. Konopleva, Advances in understanding the leukaemia microenvironment. *Br J Haematol*, 2014. 164(6): p. 767-78.
11. Riether, C., C.M. Schurch, and A.F. Ochsenbein, Regulation of hematopoietic and leukemic stem cells by the immune system. *Cell Death Differ*, 2015. 22(2): p. 187-98.
12. Lancet, J.E. and J.E. Karp, Novel postremission strategies in adults with acute myeloid leukemia. *Curr Opin Hematol*, 2009. 16(2): p. 105-11.
13. Leick, M.B., C.J. Shoff, E.C. Wang, J.L. Congress, and G.I. Gallicano, Loss of imprinting of IGF2 and the epigenetic progenitor model of cancer. *Am J Stem Cells*, 2012. 1(1): p. 59-74.
14. Lapidot, T., C. Sirard, J. Vormoor, B. Murdoch, T. Hoang, J. Caceres-Cortes, M. Minden, B. Paterson, M.A. Caligiuri, and J.E. Dick, A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*, 1994. 367(6464): p. 645-8.
15. Passegue, E., C.H. Jamieson, L.E. Ailles, and I.L. Weissman, Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100 Suppl 1: p. 11842-9.
16. Dohner, H., E. Estey, D. Grimwade, S. Amadori, F.R. Appelbaum, T. Buchner, H. Dombret, B.L. Ebert, P. Fenau, R.A. Larson, R.L. Levine, F. Lo-Coco, T. Naoe, D. Niederwieser, G.J. Ossenkoppele, M. Sanz, J. Sierra, M.S. Tallman, H.F. Tien, A.H. Wei, B. Lowenberg, and C.D. Bloomfield, Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*, 2017. 129(4): p. 424-447.

17. Ravandi, F., M.L. Alattar, M.R. Grunwald, M.A. Rudek, T. Rajkhowa, M.A. Richie, S. Pierce, N. Daver, G. Garcia-Manero, S. Faderl, A. Nazha, M. Konopleva, G. Borthakur, J. Burger, T. Kadia, S. Deltasala, M. Andreeff, J. Cortes, H. Kantarjian, and M. Levis, Phase 2 study of azacytidine plus sorafenib in patients with acute myeloid leukemia and FLT-3 internal tandem duplication mutation. *Blood*, 2013. 121(23): p. 4655-62.
18. Burnett, A.K., R.K. Hills, D. Milligan, L. Kjeldsen, J. Kell, N.H. Russell, J.A. Yin, A. Hunter, A.H. Goldstone, and K. Wheatley, Identification of patients with acute myeloblastic leukemia who benefit from the addition of gemtuzumab ozogamicin: results of the MRC AML15 trial. *J Clin Oncol*, 2011. 29(4): p. 369-77.
19. Erba, H.P., Has there been progress in the treatment of older patients with acute myeloid leukemia? *Best Pract Res Clin Haematol*, 2010. 23(4): p. 495-501.
20. Juliusson, G., P. Antunovic, A. Derolf, S. Lehmann, L. Mollgard, D. Stockelberg, U. Tidefelt, A. Wahlin, and M. Hoglund, Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry. *Blood*, 2009. 113(18): p. 4179-87.
21. Junttila, M.R. and F.J. de Sauvage, Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature*, 2013. 501(7467): p. 346-54.
22. Fang, H. and Y.A. Declerck, Targeting the tumor microenvironment: from understanding pathways to effective clinical trials. *Cancer Res*, 2013. 73(16): p. 4965-77.
23. Kidd, S., E. Spaeth, K. Watson, J. Burks, H. Lu, A. Klopp, M. Andreeff, and F.C. Marini, Origins of the tumor microenvironment: quantitative assessment of adipose-derived and bone marrow-derived stroma. *PLoS One*, 2012. 7(2): p. e30563.
24. Battula, V.L., K.W. Evans, B.G. Hollier, Y. Shi, F.C. Marini, A. Ayyanan, R.Y. Wang, C. Brisken, R. Guerra, M. Andreeff, and S.A. Mani, Epithelial-mesenchymal transition-derived cells exhibit multilineage differentiation potential similar to mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 2010. 28(8): p. 1435-45.
25. Frisch, B.J., J.M. Ashton, L. Xing, M.W. Becker, C.T. Jordan, and L.M. Calvi, Functional inhibition of osteoblastic cells in an in vivo mouse model of myeloid leukemia. *Blood*, 2012. 119(2): p. 540-50.
26. Zhang, B., Y.W. Ho, Q. Huang, T. Maeda, A. Lin, S.U. Lee, A. Hair, T.L. Holyoake, C. Huettner, and R. Bhatia, Altered microenvironmental regulation of leukemic and normal stem cells in chronic myelogenous leukemia. *Cancer Cell*, 2012. 21(4): p. 577-92.
27. Kim, J.A., J.S. Shim, G.Y. Lee, H.W. Yim, T.M. Kim, M. Kim, S.H. Leem, J.W. Lee, C.K. Min, and I.H. Oh, Microenvironmental remodeling as a parameter and prognostic factor of heterogeneous leukemogenesis in acute myelogenous leukemia. *Cancer Res*, 2015. 75(11): p. 2222-31.
28. Raaijmakers, M.H., S. Mukherjee, S. Guo, S. Zhang, T. Kobayashi, J.A. Schoonmaker, B.L. Ebert, F. Al-Shahrour, R.P. Hasserjian, E.O. Scadden, Z. Aung, M. Matza, M. Merckenschlager, C. Lin, J.M. Rommens, and D.T. Scadden, Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia. *Nature*, 2010. 464(7290): p. 852-7.
29. Droujinine, I.A., M.A. Eckert, and W. Zhao, To grab the stroma by the horns: from biology to cancer therapy with mesenchymal stem cells. *Oncotarget*, 2013. 4(5): p. 651-64.
30. Binato, R., N.C. de Almeida Oliveira, B. Du Rocher, and E. Abdelhay, The molecular signature of AML mesenchymal stromal cells reveals candidate genes related to the leukemogenic process. *Cancer Lett*, 2015. 369(1): p. 134-43.
31. Zhao, K. and Q. Liu, The clinical application of mesenchymal stromal cells in hematopoietic stem cell transplantation. *J Hematol Oncol*, 2016. 9(1): p. 46.
32. Dominici, M., K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, A. Keating, D. Prockop, and E. Horwitz, Minimal criteria for defining multipotent

- mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 2006. 8(4): p. 315-7.
33. Quante, M., S.P. Tu, H. Tomita, T. Gonda, S.S. Wang, S. Takashi, G.H. Baik, W. Shibata, B. Diprete, K.S. Betz, R. Friedman, A. Varro, B. Tycko, and T.C. Wang, Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the mesenchymal stem cell niche and promote tumor growth. *Cancer Cell*, 2011. 19(2): p. 257-72.
  34. Dotto, G.P., R.A. Weinberg, and A. Ariza, Malignant transformation of mouse primary keratinocytes by Harvey sarcoma virus and its modulation by surrounding normal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. 85(17): p. 6389-93.
  35. Berdiel-Acer, M., R. Sanz-Pamplona, A. Calon, D. Cuadras, A. Berenguer, X. Sanjuan, M.J. Paules, R. Salazar, V. Moreno, E. Batlle, A. Villanueva, and D.G. Mollevi, Differences between CAFs and their paired NCF from adjacent colonic mucosa reveal functional heterogeneity of CAFs, providing prognostic information. *Mol Oncol*, 2014. 8(7): p. 1290-305.
  36. Teng, F., W.Y. Tian, Y.M. Wang, Y.F. Zhang, F. Guo, J. Zhao, C. Gao, and F.X. Xue, Cancer-associated fibroblasts promote the progression of endometrial cancer via the SDF-1/CXCR4 axis. *J Hematol Oncol*, 2016. 9: p. 8.
  37. De Francesco, E.M., R. Lappano, M.F. Santolla, S. Marsico, A. Caruso, and M. Maggiolini, HIF-1alpha/GPER signaling mediates the expression of VEGF induced by hypoxia in breast cancer associated fibroblasts (CAFs). *Breast Cancer Res*, 2013. 15(4): p. R64.
  38. Fullar, A., I. Kovalszky, M. Bitsche, A. Romani, V.H. Schartinger, G.M. Sprinzl, H. Riechelmann, and J. Dudas, Tumor cell and carcinoma-associated fibroblast interaction regulates matrix metalloproteinases and their inhibitors in oral squamous cell carcinoma. *Exp Cell Res*, 2012. 318(13): p. 1517-27.
  39. Konopleva, M., S. Konoplev, W. Hu, A.Y. Zaritskey, B.V. Afanasiev, and M. Andreeff, Stromal cells prevent apoptosis of AML cells by up-regulation of anti-apoptotic proteins. *Leukemia*, 2002. 16(9): p. 1713-24.
  40. Tavor, S., I. Petit, S. Porozov, A. Avigdor, A. Dar, L. Leider-Trejo, N. Shemtov, V. Deutsch, E. Naparstek, A. Nagler, and T. Lapidot, CXCR4 regulates migration and development of human acute myelogenous leukemia stem cells in transplanted NOD/SCID mice. *Cancer Res*, 2004. 64(8): p. 2817-24.
  41. Jacamo, R., Y. Chen, Z. Wang, W. Ma, M. Zhang, E.L. Spaeth, Y. Wang, V.L. Battula, P.Y. Mak, K. Schallmoser, P. Ruvolo, W.D. Schober, E.J. Shpall, M.H. Nguyen, D. Strunk, C.E. Bueso-Ramos, S. Konoplev, R.E. Davis, M. Konopleva, and M. Andreeff, Reciprocal leukemia-stroma VCAM-1/VLA-4-dependent activation of NF-kappaB mediates chemoresistance. *Blood*, 2014. 123(17): p. 2691-702.
  42. Matsunaga, T., N. Takemoto, T. Sato, R. Takimoto, I. Tanaka, A. Fujimi, T. Akiyama, H. Kuroda, Y. Kawano, M. Kobune, J. Kato, Y. Hirayama, S. Sakamaki, K. Kohda, K. Miyake, and Y. Niitsu, Interaction between leukemic-cell VLA-4 and stromal fibronectin is a decisive factor for minimal residual disease of acute myelogenous leukemia. *Nat Med*, 2003. 9(9): p. 1158-65.
  43. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011. 144(5): p. 646-74.
  44. Isidori, A., V. Salvestrini, M. Ciciarello, F. Loscocco, G. Visani, S. Parisi, M. Lecciso, D. Ocadlikova, L. Rossi, E. Gabucci, C. Clissa, and A. Curti, The role of the immunosuppressive microenvironment in acute myeloid leukemia development and treatment. *Expert Rev Hematol*, 2014. 7(6): p. 807-18.
  45. Qian, B.Z. and J.W. Pollard, Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*, 2010. 141(1): p. 39-51.

46. de Visser, K.E., L.V. Korets, and L.M. Coussens, De novo carcinogenesis promoted by chronic inflammation is B lymphocyte dependent. *Cancer Cell*, 2005. 7(5): p. 411-23.
47. Joshi, A., Cao D., TGF-beta signaling, tumor microenvironment and tumor progression: the butterfly effect. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2010. 1;15:180-94
48. Tabe, Y., Y.X. Shi, Z. Zeng, L. Jin, M. Shikami, Y. Hatanaka, T. Miida, F.J. Hsu, M. Andreeff, and M. Konopleva, TGF-beta-Neutralizing Antibody 1D11 Enhances Cytarabine-Induced Apoptosis in AML Cells in the Bone Marrow Microenvironment. *PLoS One*, 2013. 8(6): p. e62785.
49. Safina, A., E. Vandette, and A.V. Bakin, ALK5 promotes tumor angiogenesis by upregulating matrix metalloproteinase-9 in tumor cells. *Oncogene*, 2007. 26(17): p. 2407-22.
50. Yang, P., Q.J. Li, Y. Feng, Y. Zhang, G.J. Markowitz, S. Ning, Y. Deng, J. Zhao, S. Jiang, Y. Yuan, H.Y. Wang, S.Q. Cheng, D. Xie, and X.F. Wang, TGF-beta-miR-34a-CCL22 signaling-induced Treg cell recruitment promotes venous metastases of HBV-positive hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell*, 2012. 22(3): p. 291-303.
51. Liu, Y., L. Lai, Q. Chen, Y. Song, S. Xu, F. Ma, X. Wang, J. Wang, H. Yu, X. Cao, and Q. Wang, MicroRNA-494 is required for the accumulation and functions of tumor-expanded myeloid-derived suppressor cells via targeting of PTEN. *J Immunol*, 2012. 188(11): p. 5500-10.
52. Marcoe, J.P., J.R. Lim, K.L. Schaubert, N. Fodil-Cornu, M. Matka, A.L. McCubbrey, A.R. Farr, S.M. Vidal, and Y. Laouar, TGF-beta is responsible for NK cell immaturity during ontogeny and increased susceptibility to infection during mouse infancy. *Nat Immunol*, 2012. 13(9): p. 843-50.
53. Zhao, L. and B.M. Hantash, TGF-beta1 regulates differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *Vitam Horm*, 2011. 87: p. 127-41.
54. Pickup, M., S. Novitskiy, and H.L. Moses, The roles of TGFbeta in the tumour microenvironment. *Nat Rev Cancer*, 2013. 13(11): p. 788-99.
55. Leask, A. and D.J. Abraham, TGF-beta signaling and the fibrotic response. *Faseb j*, 2004. 18(7): p. 816-27.
56. Bogdahn, U., P. Hau, G. Stockhammer, N.K. Venkataramana, A.K. Mahapatra, A. Suri, A. Balasubramaniam, S. Nair, V. Oliushine, V. Parfenov, I. Poverennova, M. Zaaroor, P. Jachimczak, S. Ludwig, S. Schmaus, H. Heinrichs, and K.H. Schlingensiepen, Targeted therapy for high-grade glioma with the TGF-beta2 inhibitor trabedersen: results of a randomized and controlled phase IIb study. *Neuro Oncol*, 2011. 13(1): p. 132-42.
57. Kewitz, S., L. Kurch, I. Volkmer, and M.S. Staeger, Stimulation of the hypoxia pathway modulates chemotherapy resistance in Hodgkin's lymphoma cells. *Tumour Biol*, 2016. 37(6): p. 8229-37.
58. Ferrara, N. and R.S. Kerbel, Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature*, 2005. 438(7070): p. 967-74.
59. Hegde, P.S., A.M. Jubb, D. Chen, N.F. Li, Y.G. Meng, C. Bernaards, R. Elliott, S.J. Scherrer, and D.S. Chen, Predictive impact of circulating vascular endothelial growth factor in four phase III trials evaluating bevacizumab. *Clin Cancer Res*, 2013. 19(4): p. 929-37.
60. Kuzu, I., M. Beksac, M. Arat, H. Celebi, A.H. Elhan, and S. Erekul, Bone marrow microvessel density (MVD) in adult acute myeloid leukemia (AML): therapy induced changes and effects on survival. *Leuk Lymphoma*, 2004. 45(6): p. 1185-90.
61. Shih, T.T., H.A. Hou, C.Y. Liu, B.B. Chen, J.L. Tang, H.Y. Chen, S.Y. Wei, M. Yao, S.Y. Huang, W.C. Chou, S.C. Hsu, W. Tsay, C.W. Yu, C.Y. Hsu, H.F. Tien, and P.C. Yang, Bone marrow angiogenesis magnetic resonance imaging in patients with acute myeloid leukemia: peak enhancement ratio is an independent predictor for overall survival. *Blood*, 2009. 113(14): p. 3161-7.



62. Schuch, G., M. Machluf, G. Bartsch, Jr., M. Nomi, H. Richard, A. Atala, and S. Soker, In vivo administration of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its antagonist, soluble neuropilin-1, predicts a role of VEGF in the progression of acute myeloid leukemia in vivo. *Blood*, 2002. 100(13): p. 4622-8.
63. Morrison, S.J. and D.T. Scadden, The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature*, 2014. 505(7483): p. 327-34.
64. Chandran, P., Y. Le, Y. Li, M. Sabloff, J. Mehic, M. Rosu-Myles, and D.S. Allan, Mesenchymal stromal cells from patients with acute myeloid leukemia have altered capacity to expand differentiated hematopoietic progenitors. *Leuk Res*, 2015. 39(4): p. 486-93.
65. Ding, L. and S.J. Morrison, Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. *Nature*, 2013. 495(7440): p. 231-5.
66. Kunisaki, Y. and P.S. Frenette, Influences of vascular niches on hematopoietic stem cell fate. *Int J Hematol*, 2014. 99(6): p. 699-705.
67. Mendez-Ferrer, S., T.V. Michurina, F. Ferraro, A.R. Mazloom, B.D. Macarthur, S.A. Lira, D.T. Scadden, A. Ma'ayan, G.N. Enikolopov, and P.S. Frenette, Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*, 2010. 466(7308): p. 829-34.
68. Krause, D.S. and D.T. Scadden, A hostel for the hostile: the bone marrow niche in hematologic neoplasms. *Haematologica*, 2015. 100(11): p. 1376-87.
69. Zhang, J., C. Niu, L. Ye, H. Huang, X. He, W.G. Tong, J. Ross, J. Haug, T. Johnson, J.Q. Feng, S. Harris, L.M. Wiedemann, Y. Mishina, and L. Li, Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature*, 2003. 425(6960): p. 836-41.
70. Calvi, L.M., G.B. Adams, K.W. Weibrecht, J.M. Weber, D.P. Olson, M.C. Knight, R.P. Martin, E. Schipani, P. Divieti, F.R. Bringhurst, L.A. Milner, H.M. Kronenberg, and D.T. Scadden, Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*, 2003. 425(6960): p. 841-6.
71. Ding, L., T.L. Saunders, G. Enikolopov, and S.J. Morrison, Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature*, 2012. 481(7382): p. 457-62.
72. Naveiras, O., V. Nardi, P.L. Wenzel, P.V. Hauschka, F. Fahey, and G.Q. Daley, Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. *Nature*, 2009. 460(7252): p. 259-63.
73. Konopleva, M., Y. Tabe, Z. Zeng, and M. Andreeff, Therapeutic targeting of microenvironmental interactions in leukemia: mechanisms and approaches. *Drug Resist Updat*, 2009. 12(4-5): p. 103-13.
74. Scadden, D.T., The stem cell niche in health and leukemic disease. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2007. 20(1): p. 19-27.
75. Schepers, K., T.B. Campbell, and E. Passegue, Normal and leukemic stem cell niches: insights and therapeutic opportunities. *Cell Stem Cell*, 2015. 16(3): p. 254-67.
76. Sipkins, D.A., X. Wei, J.W. Wu, J.M. Runnels, D. Cote, T.K. Means, A.D. Luster, D.T. Scadden, and C.P. Lin, In vivo imaging of specialized bone marrow endothelial microdomains for tumour engraftment. *Nature*, 2005. 435(7044): p. 969-73.
77. Ishikawa, F., S. Yoshida, Y. Saito, A. Hijikata, H. Kitamura, S. Tanaka, R. Nakamura, T. Tanaka, H. Tomiyama, N. Saito, M. Fukata, T. Miyamoto, B. Lyons, K. Ohshima, N. Uchida, S. Taniguchi, O. Ohara, K. Akashi, M. Harada, and L.D. Shultz, Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region. *Nat Biotechnol*, 2007. 25(11): p. 1315-21.
78. Hurwitz, H.I., L. Fehrenbacher, J.D. Hainsworth, W. Heim, J. Berlin, E. Holmgren, J. Hambleton, W.F. Novotny, and F. Kabbinavar, Bevacizumab in combination with fluorouracil and leucovorin: an active regimen for first-line metastatic colorectal cancer. *J Clin*

- Oncol, 2005. 23(15): p. 3502-8.
79. Perren, T.J., A.M. Swart, J. Pfisterer, J.A. Ledermann, E. Pujade-Lauraine, G. Kristensen, M.S. Carey, P. Beale, A. Cervantes, C. Kurzedder, A. du Bois, J. Sehouli, R. Kimmig, A. Stahle, F. Collinson, S. Essapen, C. Gourley, A. Lortholary, F. Selle, M.R. Mirza, A. Leminen, M. Plante, D. Stark, W. Qian, M.K. Parmar, and A.M. Oza, A phase 3 trial of bevacizumab in ovarian cancer. *N Engl J Med*, 2011. 365(26): p. 2484-96.
  80. Sandler, A., R. Gray, M.C. Perry, J. Brahmer, J.H. Schiller, A. Dowlati, R. Lilenbaum, and D.H. Johnson, Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*, 2006. 355(24): p. 2542-50.
  81. Ossenkoppele, G.J., G. Stussi, J. Maertens, K. van Montfort, B.J. Biemond, D. Breems, A. Ferrant, C. Graux, G.E. de Greef, C.J. Halkes, M. Hoogendoorn, R.M. Hollesteyn, M. Jongen-Lavrencic, M.D. Levin, A.A. van de Loosdrecht, M. van Marwijk Kooij, Y. van Norden, T. Pabst, H.C. Schouten, E. Vellenga, G.E. Verhoef, O. de Weerd, P. Wijermans, J.R. Passweg, and B. Lowenberg, Addition of bevacizumab to chemotherapy in acute myeloid leukemia at older age: a randomized phase 2 trial of the Dutch-Belgian Cooperative Trial Group for Hemato-Oncology (HOVON) and the Swiss Group for Clinical Cancer Research (SAKK). *Blood*, 2012. 120(24): p. 4706-11.
  82. Trujillo, A., C. McGee, and C.R. Cogle, Angiogenesis in acute myeloid leukemia and opportunities for novel therapies. *J Oncol*, 2012. 2012: p. 128608.
  83. Norde, W.J., F. Maas, W. Hobo, A. Korman, M. Quigley, M.G. Kester, K. Hebeda, J.H. Falkenburg, N. Schaap, T.M. de Witte, R. van der Voort, and H. Dolstra, PD-1/PD-L1 interactions contribute to functional T-cell impairment in patients who relapse with cancer after allogeneic stem cell transplantation. *Cancer Res*, 2011. 71(15): p. 5111-22.
  84. Teague, R.M. and J. Kline, Immune evasion in acute myeloid leukemia: current concepts and future directions. *J Immunother Cancer*, 2013. 1(13).
  85. Bakker, E., M. Qattan, L. Mutti, C. Demonacos, and M. Krstic-Demonacos, The role of microenvironment and immunity in drug response in leukemia. *Biochim Biophys Acta*, 2016. 1863(3): p. 414-26.
  86. Bryan, L.J. and L.I. Gordon, Blocking tumor escape in hematologic malignancies: the anti-PD-1 strategy. *Blood Rev*, 2015. 29(1): p. 25-32.
  87. Ansell, S.M., A.M. Lesokhin, I. Borrello, A. Halwani, E.C. Scott, M. Gutierrez, S.J. Schuster, M.M. Millenson, D. Cattray, G.J. Freeman, S.J. Rodig, B. Chapuy, A.H. Ligon, L. Zhu, J.F. Grosso, S.Y. Kim, J.M. Timmerman, M.A. Shipp, and P. Armand, PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*, 2015. 372(4): p. 311-9.
  88. Blockade of PD-1 in Conjunction With the Dendritic Cell/AML Vaccine Following Chemotherapy Induced Remission (NCT01096602). Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01096602>
  89. Ipilimumab or Nivolumab in Treating Patients With Relapsed Hematologic Malignancies After Donor Stem Cell Transplant (NCT01822509) Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01822509>
  90. Bargou, R., E. Leo, G. Zugmaier, M. Klinger, M. Goebeler, S. Knop, R. Noppeney, A. Viardot, G. Hess, M. Schuler, H. Einsele, C. Brandl, A. Wolf, P. Kirchinger, P. Klappers, M. Schmidt, G. Riethmuller, C. Reinhardt, P.A. Baeuerle, and P. Kufer, Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody. *Science*, 2008. 321(5891): p. 974-7.
  91. Batlevi, C.L., E. Matsuki, R.J. Brentjens, and A. Younes, Novel immunotherapies in lymphoid malignancies. *Nat Rev Clin Oncol*, 2016. 13(1): p. 25-40.
  92. Iams, W.T. and C.M. Lovly, Molecular Pathways: Clinical Applications and Future Direc-

- tion of Insulin-like Growth Factor-1 Receptor Pathway Blockade. *Clin Cancer Res*, 2015. 21(19): p. 4270-7.
93. Brouwer-Visser, J. and G.S. Huang, IGF2 signaling and regulation in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2015. 26(3): p. 371-7.
  94. King, E.R. and K.K. Wong, Insulin-like growth factor: current concepts and new developments in cancer therapy. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, 2012. 7(1): p. 14-30.
  95. Zielinska, H.A., A. Bahl, J.M. Holly, and C.M. Perks, Epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer: a role for insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor-binding protein 3? *Breast Cancer (Dove Med Press)*, 2015. 7: p. 9-19.
  96. Livingstone, C., IGF2 and cancer. *Endocr Relat Cancer*, 2013. 20(6): p. R321-39.
  97. Ratajczak, M.Z., D.M. Shin, G. Schneider, J. Ratajczak, and M. Kucia, Parental imprinting regulates insulin-like growth factor signaling: a Rosetta Stone for understanding the biology of pluripotent stem cells, aging and cancerogenesis. *Leukemia*, 2013. 27(4): p. 773-9.
  98. Wu, H.K., R. Weksberg, M.D. Minden, and J.A. Squire, Loss of imprinting of human insulin-like growth factor II gene, IGF2, in acute myeloid leukemia. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997. 231(2): p. 466-72.
  99. Kuhn, A., M. Kaiser, M. Neumann, L. Fransecky, S. Heesch, M. Radmacher, G. Marcucci, C.D. Bloomfield, W.K. Hofmann, E. Thiel, and C.D. Baldus, High expression of IGFBP2 is associated with chemoresistance in adult acute myeloid leukemia. *Leuk Res*, 2011. 35(12): p. 1585-90.
  100. Haferlach, T., A. Kohlmann, L. Wiczorek, G. Basso, G.T. Kronnie, M.C. Bene, J. De Vos, J.M. Hernandez, W.K. Hofmann, K.I. Mills, A. Gilkes, S. Chiaretti, S.A. Shurtleff, T.J. Kipps, L.Z. Rassenti, A.E. Yeoh, P.R. Papenhausen, W.M. Liu, P.M. Williams, and R. Foa, Clinical utility of microarray-based gene expression profiling in the diagnosis and subclassification of leukemia: report from the International Microarray Innovations in Leukemia Study Group. *J Clin Oncol*, 2010. 28(15): p. 2529-37.
  101. Hayashi, T., T. Hideshima, A.N. Nguyen, O. Munoz, K. Podar, M. Hamasaki, K. Ishitsuka, H. Yasui, P. Richardson, S. Chakravarty, A. Murphy, D. Chauhan, L.S. Higgins, and K.C. Anderson, Transforming growth factor beta receptor I kinase inhibitor down-regulates cytokine secretion and multiple myeloma cell growth in the bone marrow microenvironment. *Clin Cancer Res*, 2004. 10(22): p. 7540-6.
  102. Zhang, H., H.O. Akman, E.L. Smith, J. Zhao, J.E. Murphy-Ullrich, and O.A. Batuman, Cellular response to hypoxia involves signaling via Smad proteins. *Blood*, 2003. 101(6): p. 2253-60.
  103. Benus, G.F., A.T. Wierenga, D.J. de Gorter, J.J. Schuringa, A.M. van Bennekum, L. Drenth-Diephuis, E. Vellenga, and B.J. Eggen, Inhibition of the transforming growth factor beta (TGFbeta) pathway by interleukin-1beta is mediated through TGFbeta-activated kinase 1 phosphorylation of SMAD3. *Mol Biol Cell*, 2005. 16(8): p. 3501-10.
  104. Touhami, M., F. Fauvel-Lafeve, N. Da Silva, C. Chomienne, and C. Legrand, Induction of thrombospondin-1 by all-trans retinoic acid modulates growth and differentiation of HL-60 myeloid leukemia cells. *Leukemia*, 1997. 11(12): p. 2137-42.
  105. Lawler, J., Thrombospondin-1 as an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *J Cell Mol Med*, 2002. 6(1): p. 1-12.
  106. Touhami, M., J.F. Bourge, and C. Legrand, Increased adhesion of the promyelocytic leukaemia cell line, NB4, to fibronectin and thrombospondin upon all-trans-retinoic acid treatment. *Br J Haematol*, 1999. 104(4): p. 706-14.
  107. Pan, J., E.J. Kunkel, U. Gossler, N. Lazarus, P. Langdon, K. Broadwell, M.A. Vierra, M.C. Genovese, E.C. Butcher, and D. Soler, A novel chemokine ligand for CCR10 and

- CCR3 expressed by epithelial cells in mucosal tissues. *J Immunol*, 2000. 165(6): p. 2943-9.
108. Facciabene, A., X. Peng, I.S. Hagemann, K. Balint, A. Barchetti, L.P. Wang, P.A. Gimotty, C.B. Gilks, P. Lal, L. Zhang, and G. Coukos, Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and T(reg) cells. *Nature*, 2011. 475(7355): p. 226-30.
  109. Karlsson, C., A. Baudet, N. Miharada, S. Soneji, R. Gupta, M. Magnusson, T. Enver, G. Karlsson, and J. Larsson, Identification of the chemokine CCL28 as a growth and survival factor for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*, 2013. 121(19): p. 3838-42, s1-15.
  110. O’Gorman, M.T., N.A. Jatoi, S.J. Lane, and B.P. Mahon, IL-1beta and TNF-alpha induce increased expression of CCL28 by airway epithelial cells via an NFkappaB-dependent pathway. *Cell Immunol*, 2005. 238(2): p. 87-96.
  111. Lewis, A.M., S. Varghese, H. Xu, and H.R. Alexander, Interleukin-1 and cancer progression: the emerging role of interleukin-1 receptor antagonist as a novel therapeutic agent in cancer treatment. *J Transl Med*, 2006. 4: p. 48.
  112. Guo, B., S. Fu, J. Zhang, B. Liu, and Z. Li, Targeting inflammasome/IL-1 pathways for cancer immunotherapy. *Sci Rep*, 2016. 6: p. 36107.
  113. Ezaki, K., M. Tsuzuki, I. Katsuta, F. Maruyama, H. Kojima, M. Okamoto, T. Nomura, M. Wakita, H. Miyazaki, R. Sobue, and et al., Interleukin-1 beta (IL-1 beta) and acute leukemia: in vitro proliferative response to IL-1 beta, IL-1 beta content of leukemic cells and treatment outcome. *Leuk Res*, 1995. 19(1): p. 35-41.
  114. Dolen, Y. and G. Esendagli, Myeloid leukemia cells with a B7-2(+) subpopulation provoke Th-cell responses and become immuno-suppressive through the modulation of B7 ligands. *Eur J Immunol*, 2013. 43(3): p. 747-57.
  115. Miyoshi, H., J. Kiyasu, T. Kato, N. Yoshida, J. Shimono, S. Yokoyama, H. Taniguchi, Y. Sasaki, D. Kurita, K. Kawamoto, K. Kato, Y. Imaizumi, M. Seto, and K. Ohshima, PD-L1 expression on neoplastic or stromal cells is respectively a poor or good prognostic factor for adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood*, 2016. 128(10): p. 1374-81.
  116. Neill, T., L. Schaefer, and R.V. Iozzo, Decorin: a guardian from the matrix. *Am J Pathol*, 2012. 181(2): p. 380-7.
  117. Merline, R., K. Moreth, J. Beckmann, M.V. Nastase, J. Zeng-Brouwers, J.G. Tralhao, P. Lemarchand, J. Pfeilschifter, R.M. Schaefer, R.V. Iozzo, and L. Schaefer, Signaling by the matrix proteoglycan decorin controls inflammation and cancer through PDCD4 and MicroRNA-21. *Sci Signal*, 2011. 4(199): p. ra75.
  118. Zhu, J.X., S. Goldoni, G. Bix, R.T. Owens, D.J. McQuillan, C.C. Reed, and R.V. Iozzo, Decorin evokes protracted internalization and degradation of the epidermal growth factor receptor via caveolar endocytosis. *J Biol Chem*, 2005. 280(37): p. 32468-79.
  119. Iozzo, R.V., S. Buraschi, M. Genua, S.Q. Xu, C.C. Solomides, S.C. Peiper, L.G. Gomella, R.C. Owens, and A. Morrione, Decorin antagonizes IGF receptor I (IGF-IR) function by interfering with IGF-IR activity and attenuating downstream signaling. *J Biol Chem*, 2011. 286(40): p. 34712-21.
  120. Nemani, N., L. Santo, H. Eda, D. Cirstea, Y. Mishima, C. Patel, E. O’Donnell, A. Yee, and N. Raje, Role of decorin in multiple myeloma (MM) bone marrow microenvironment. *J Bone Miner Res*, 2015. 30(3): p. 465-70.
  121. Gao, N., W.Z. Yu, N.J. Guo, X.X. Wang, and J.R. Sun, Clinical significance of galectin-3 in patients with adult acute myeloid leukemia: a retrospective cohort study with long-term follow-up and formulation of risk scoring system. *Leuk Lymphoma*, 2017. 58(6): p. 1394-1402.
  122. Ruvolo, P.P., Galectin 3 as a guardian of the tumor microenvironment. *Biochim Biophys*



- Acta, 2016. 1863(3): p. 427-37.
123. Hu, K., Y. Gu, L. Lou, L. Liu, Y. Hu, B. Wang, Y. Luo, J. Shi, X. Yu, and H. Huang, Galectin-3 mediates bone marrow microenvironment-induced drug resistance in acute leukemia cells via Wnt/beta-catenin signaling pathway. *J Hematol Oncol*, 2015. 8: p. 1.
  124. Ruvolo, P., Y. Qiu, V. Ruvolo, R.-Y. Wang, Z. Zeng, J. Burks, R. Pan, N. Hail, T. McQueen, S.-Y. Yoo, S.M. Kornblau, and M. Andreeff, Role of Mesenchymal Stem Cell Galectin 3 in the AML Tumor Microenvironment. *Blood*, 2015. 126(23): p. 1198-1198.
  125. Pena, C., L. Mirandola, J.A. Figueroa, N. Hosiriluck, N. Suvorava, K. Trotter, A. Reidy, R. Rakhshanda, D. Payne, M. Jenkins, F. Grizzi, L. Littlefield, M. Chiriva-Internati, and E. Cobos, Galectins as therapeutic targets for hematological malignancies: a hopeful sweetness. *Ann Transl Med*, 2014. 2(9): p. 87.
  126. Fontanini, G., L. Boldrini, A. Calcinai, S. Chine, M. Lucchi, A. Mussi, C.A. Angeletti, F. Basolo, and G. Bevilacqua, Thrombospondins I and II messenger RNA expression in lung carcinoma: relationship with p53 alterations, angiogenic growth factors, and vascular density. *Clin Cancer Res*, 1999. 5(1): p. 155-61.
  127. von der Heide, E.K., M. Neumann, S. Vosberg, A.R. James, M.P. Schroeder, J. Ortiz-Tanchez, K. Isaakidis, C. Schlee, M. Luther, K. Johrens, I. Anagnostopoulos, L.H. Mochmann, D. Nowak, W.K. Hofmann, P.A. Greif, and C.D. Baldus, Molecular alterations in bone marrow mesenchymal stromal cells derived from acute myeloid leukemia patients. *Leukemia*, 2017. 31(5): p. 1069-1078.
  128. Doepfner, K.T., O. Spertini, and A. Arcaro, Autocrine insulin-like growth factor-I signaling promotes growth and survival of human acute myeloid leukemia cells via the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Leukemia*, 2007. 21(9): p. 1921-30.
  129. Chen, Q., Y. Yuan, and T. Chen, Morphology, differentiation and adhesion molecule expression changes of bone marrow mesenchymal stem cells from acute myeloid leukemia patients. *Mol Med Rep*, 2014. 9(1): p. 293-8.
  130. Vicente Lopez, A., M.N. Vazquez Garcia, G.J. Melen, A. Entrena Martinez, I. Cubillo Moreno, J. Garcia-Castro, M.R. Orellana, and A.G. Gonzalez, Mesenchymal stromal cells derived from the bone marrow of acute lymphoblastic leukemia patients show altered BMP4 production: correlations with the course of disease. *PLoS One*, 2014. 9(1): p. e84496.
  131. Kim, T., K. Kim, S.H. Lee, H.S. So, J. Lee, N. Kim, and Y. Choi, Identification of LRRc17 as a negative regulator of receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL)-induced osteoclast differentiation. *J Biol Chem*, 2009. 284(22): p. 15308-16.
  132. Fujisaki, J., J. Wu, A.L. Carlson, L. Silberstein, P. Putheti, R. Larocca, W. Gao, T.I. Saito, C. Lo Celso, H. Tsuyuzaki, T. Sato, D. Cote, M. Sykes, T.B. Strom, D.T. Scadden, and C.P. Lin, In vivo imaging of Treg cells providing immune privilege to the haematopoietic stem-cell niche. *Nature*, 2011. 474(7350): p. 216-9.
  133. Randhawa, G.S., H. Cui, J.A. Barletta, L.Z. Strichman-Almashanu, M. Talpaz, H. Kantarjian, A.B. Deisseroth, R.C. Champlin, and A.P. Feinberg, Loss of imprinting in disease progression in chronic myelogenous leukemia. *Blood*, 1998. 91(9): p. 3144-7.
  134. Grimwade, D., A. Ivey, and B.J. Huntly, Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. *Blood*, 2016. 127(1): p. 29-41.
  135. Bianco, P., "Mesenchymal" stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2014. 30: p. 677-704.
  136. Bara, J.J., R.G. Richards, M. Alini, and M.J. Stoddart, Concise review: Bone marrow-derived mesenchymal stem cells change phenotype following in vitro culture: implications for basic research and the clinic. *Stem Cells*, 2014. 32(7): p. 1713-23.
  137. Ikeno, Y., G.B. Hubbard, S. Lee, L.A. Cortez, C.M. Lew, C.R. Webb, D.E. Berryman, E.O. List, J.J. Kopchick, and A. Bartke, Reduced incidence and delayed occurrence of

- fatal neoplastic diseases in growth hormone receptor/binding protein knockout mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2009. 64(5): p. 522-9.
138. Friedbichler, K., M.H. Hofmann, M. Kroez, E. Ostermann, H.R. Lamche, C. Koessl, E. Borges, M.N. Pollak, G. Adolf, and P.J. Adam, Pharmacodynamic and antineoplastic activity of BI 836845, a fully human IGF ligand-neutralizing antibody, and mechanistic rationale for combination with rapamycin. *Mol Cancer Ther*, 2014. 13(2): p. 399-409.
  139. BI 836845 Plus Afatinib in Patients With Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Mutant Non-small Cell Lung Cancer (NSCLC) (NCT02191891). Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02191891>
  140. Zhang, C.C. and H.F. Lodish, Insulin-like growth factor 2 expressed in a novel fetal liver cell population is a growth factor for hematopoietic stem cells. *Blood*, 2004. 103(7): p. 2513-21.
  141. Klusmann, J.H., F.J. Godinho, K. Heitmann, A. Maroz, M.L. Koch, D. Reinhardt, S.H. Orkin, and Z. Li, Developmental stage-specific interplay of GATA1 and IGF signaling in fetal megakaryopoiesis and leukemogenesis. *Genes Dev*, 2010. 24(15): p. 1659-72.
  142. Bendall, S.C., M.H. Stewart, P. Menendez, D. George, K. Vijayaragavan, T. Werbowetski-Ogilvie, V. Ramos-Mejia, A. Rouleau, J. Yang, M. Bosse, G. Lajoie, and M. Bhatia, IGF and FGF cooperatively establish the regulatory stem cell niche of pluripotent human cells in vitro. *Nature*, 2007. 448(7157): p. 1015-21.
  143. Shimizu, T., E. Sugihara, S. Yamaguchi-Iwai, S. Tamaki, Y. Koyama, W. Kamel, A. Ueki, T. Ishikawa, T. Chiyoda, S. Osuka, N. Onishi, H. Ikeda, J. Kamei, K. Matsuo, Y. Fukuchi, T. Nagai, J. Toguchida, Y. Toyama, A. Muto, and H. Saya, IGF2 preserves osteosarcoma cell survival by creating an autophagic state of dormancy that protects cells against chemotherapeutic stress. *Cancer Res*, 2014. 74(22): p. 6531-41.
  144. Lane, S.W., Bad to the bone. *Blood*, 2012. 119(2): p. 323-5.
  145. Kleiman, A., E.C. Keats, N.G. Chan, and Z.A. Khan, Elevated IGF2 prevents leptin induction and terminal adipocyte differentiation in hemangioma stem cells. *Exp Mol Pathol*, 2013. 94(1): p. 126-36.
  146. Ding, W., J. Li, J. Singh, R. Alif, R.I. Vazquez-Padron, S.A. Gomes, J.M. Hare, and L.A. Shehadeh, miR-30e targets IGF2-regulated osteogenesis in bone marrow-derived mesenchymal stem cells, aortic smooth muscle cells, and ApoE<sup>-/-</sup> mice. *Cardiovasc Res*, 2015. 106(1): p. 131-42.
  147. Maeng, Y.S., H.J. Choi, J.Y. Kwon, Y.W. Park, K.S. Choi, J.K. Min, Y.H. Kim, P.G. Suh, K.S. Kang, M.H. Won, Y.M. Kim, and Y.G. Kwon, Endothelial progenitor cell homing: prominent role of the IGF2-IGF2R-PLCbeta2 axis. *Blood*, 2009. 113(1): p. 233-43.
  148. Medyouf, H., S. Gusscott, H. Wang, J.C. Tseng, C. Wai, O. Nemirovsky, A. Trumpp, F. Pflumio, J. Carboni, M. Gottardis, M. Pollak, A.L. Kung, J.C. Aster, M. Holzenberger, and A.P. Weng, High-level IGF1R expression is required for leukemia-initiating cell activity in T-ALL and is supported by Notch signaling. *J Exp Med*, 2011. 208(9): p. 1809-22.
  149. Xie, J., X. Chen, J. Zheng, C. Li, S. Stacy, M. Holzenberger, X. Hu, and C.C. Zhang, IGF-IR determines the fates of BCR/ABL leukemia. *J Hematol Oncol*, 2015. 8: p. 3.
  150. Ratajczak, J., D.M. Shin, W. Wan, R. Liu, M.M. Masternak, K. Piotrowska, B. Wiszniewska, M. Kucia, A. Bartke, and M.Z. Ratajczak, Higher number of stem cells in the bone marrow of circulating low Igf-1 level Laron dwarf mice--novel view on Igf-1, stem cells and aging. *Leukemia*, 2011. 25(4): p. 729-33.
  151. Yang, B., J. Wagner, N. Damaschke, T. Yao, S.M. Wuerzberger-Davis, M.H. Lee, J. Svaren, S. Miyamoto, and D.F. Jarrard, A novel pathway links oxidative stress to loss of insulin growth factor-2 (IGF2) imprinting through NF-kappaB activation. *PLoS One*, 2014. 9(2): p. e88052.

152. Murayama, T., T. Nakaoku, M. Enari, T. Nishimura, K. Tominaga, A. Nakata, A. Tojo, S. Sugano, T. Kohno, and N. Gotoh, Oncogenic Fusion Gene CD74-NRG1 Confers Cancer Stem Cell-like Properties in Lung Cancer through a IGF2 Autocrine/Paracrine Circuit. *Cancer Res*, 2016. 76(4): p. 974-83.
153. Jenkins, C.R., O.O. Shevchuk, V. Giambra, S.H. Lam, J.M. Carboni, M.M. Gottardis, M. Holzenberger, M. Pollak, R.K. Humphries, and A.P. Weng, IGF signaling contributes to malignant transformation of hematopoietic progenitors by the MLL-AF9 oncoprotein. *Exp Hematol*, 2012. 40(9): p. 715-723.e6.
154. Dong, Y., J. Li, F. Han, H. Chen, X. Zhao, Q. Qin, R. Shi, and J. Liu, High IGF2 expression is associated with poor clinical outcome in human ovarian cancer. *Oncol Rep*, 2015. 34(2): p. 936-42.

## VII Abkürzungsverzeichnis

ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
BiTE	Bispecific T cell Engager
BM-MSC	bone marrow mesenchymal stroma cells (mesenchymale Stromazellen des Knochenmarks)
CAF	carcinoma-associated fibroblasts
CAR-T-Zellen	chimeric antigen receptor-T-Zellen
cDNA	complementary DNA (Desoxyribonukleinsäure)
CML	chronische myeloische Leukämie
CSC	cancer stem cells
CT-Wert	cycle threshold
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ED	Erstdiagnose
EZM	Extrazellulärmatrix
FCS	fötales Kälberserum (fetal calf serum)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GOI	gene of interest
GvL-Effekt	Graft-versus-leukemia-Effekt
HSC	hämatopoetische Stammzelle
LSC	leukämische Stammzelle
MDS	myelodysplastisches Syndrom
MVD	microvessel density
NP	Normalperson(en)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
qRT-PCR	quantitative real-time PCR
Rem	Remission
rhIGF2	rekombinanter Insulin-like growth factor 2
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
SD	standard deviation (Standardabweichung)
WST	water soluble tetrazolium salt

## VIII Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Marlene Luise Luther, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Identifizierung und Charakterisierung von differentiell exprimierten Genen im Knochenmarkstroma bei der akuten myeloischen Leukämie“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an erfolgten Publikationen

Marlene Luther hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

**Publikation 1:**

von der Heide, E.K., M. Neumann, S. Vosberg, A.R. James, M.P. Schroeder, J. Ortiz-Tanchez, K. Isaakidis, C. Schlee, M. Luther, K. Jöhrens, I. Anagnostopoulos, L.H. Mochmann, D. Nowak, W.K. Hofmann, P.A. Greif, C.D. Baldus, *Molecular alterations in bone marrow mesenchymal stromal cells derived from acute myeloid leukemia patients*. *Leukemia*, 2017. 31(5): p. 1069-1078.

Beitrag: Datenanalyse und qRT-PCR-Versuche zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene im AML-Knochenmarkstroma

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

## **IX Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen  
in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Berlin, 14.09.2018

Marlene Luise Luther





## **X Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Zunächst möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Claudia D. Baldus bedanken für die Überlassung des Themas, die große Freiheit bei der Ausgestaltung und die herausragende Betreuung dieser Arbeit. Stets ein offenes Ohr, immer ansprechbar und wertvolle Diskussionen und Ratschläge, auch über die Doktorarbeit hinaus.

Sehr dankbar bin ich auch insbesondere Dr. Liliana Mochmann sowie Jutta Ortiz Sanchez und Dr. Eva von der Heide für die nette Einführung in die völlig neue Welt des Labors, die gute Einarbeitung und Hilfsbereitschaft während aller Phasen dieser Arbeit. Eva von der Heide möchte ich zudem für die Isolierung der Blasten und BM-MSC und Bereitstellung der BM-MSC-RNA danken.

Auch den anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe und hier besonders Sven Liebig, Frauke Liebertz und Konstandina Isaakidis möchte ich für die sehr nette Zeit im Labor und die ein oder andere helfende Hand, falls dies mein Stundenplan nötig machte, ganz herzlich danken.

Ein großer Dank gilt zudem PD Dr. Martin Neumann, der mir stets mit Rat und Tat, insbesondere bei der Datenauswertung, zur Seite stand.

Abschließend möchte ich mich bei der gesamten AG Baldus ganz herzlich bedanken für eine einfach wunderschöne Zeit!