# Charakterisierung mesenchymaler Stromazellen in der akuten myeloischen Leukämie

Dissertation

zur Erlangung des Grades des Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Eva Kristin von der Heide

Berlin, 2016

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von April 2011 bis November 2016 unter der Leitung von Frau Prof. Dr. med. Claudia D. Baldus in der Abteilung der Hämatologie und Onkologie (Medizinische Klinik III) des Charité Universitätsklinikums, Campus Benjamin Franklin, Berlin.

- 1. Gutachter: Frau Prof. Dr. Claudia Baldus
- 2. Gutachter: Herr Prof. Dr. Burghardt Wittig

Tag der Disputation: 11.05.2017

# Inhaltsverzeichnis

1.	Ei	nleitung	1
1.1	Di	e Hämatopoese	1
1.2	Di	e akute myeloische Leukämie (AML)	
13	Di	a Mikroumgehung der hämstongetischen Stammzelle (HSC)	8
1.5	Di		0
1.4	Di	e Rolle der HSC-Mikroumgebung in malignen hämatologischen Erkr	ankungen
•			
2.	Zi	elsetzung	
3.	Μ	aterialien und Methoden	21
3.1	Pa	tientenkollektive	
3.2	M	aterialien	23
J <b>.</b> 2	3.2.1	Medien und Nährböden	
	3.2.2	Puffer	
	3.2.3	Zelllinien und Zellstämme	
	3.2.4	Plasmide, Oligonukleotide und <i>small-interfering</i> (si) RNAs	
	3.2.5	Enzyme und Antikörper	
	3.2.6	Chemikalien, vorgefertigte Materialien und Verbrauchsmittel	
	3.2.7	Laborgeräte	
3.3	M	ethoden	
	3.3.1	Zellkultur von primären BM-MSC und Zelllinien	
	3.3.	1.1 Isolation mononukleärer Zellen aus Knochenmarkaspiraten von AML	-Patienten
		und gesunden Spendern	
	3.3.	1.2 Generieren einer primären BM-MSC Kultur und Analyse des	
		Expansionspotentials der BM-MSC	
	3.3.	1.3 Kultur der Zelllinien HS-5, KG-1a und K-562	
	3.3.	1.4 Cryokonservierung von Zelllinien und primären Zellen	
	3.3.2	Färbung von Zellen mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern	
	3.3.3	Differenzierung von BM-MSC in Osteozyten und Adipozyten	
	3.3.4	Färbung von Kalzifizierungen mittels Alizarin Red	
	3.3.5	Färbung von Lipidablagerungen mittels Oil Red O	
	3.3.6	Hochdurchsatzplattformen und statistische Auswertung	
	3.3.	6.1 Gesamtexomsequenzierung (WES) und Validierung	
	3.3.	b.2 Globale Genexpressionsanalyse mittels KNA sequencing (RNAseq)	

	3.3.	6.3 Globale Genexpressionsanalyse mittels eines Affymetrix HG-U133 Plus 2.0	
		GeneChip	39
	3.3.	6.4 Globale DNA-Methylierungsanalyse mittels eines Illumina Infinium	
		HumanMethylation450 BeadChip Array	40
	3.3.7	Genomische Methoden	44
	3.3.	7.1 Modifiziertes Protokoll zur simultanen Isolierung von gDNA und RNA	44
	3.3.	7.2 Polymerasenkettenreaktion (PCR)	44
	3.3.	7.3 Reverse Transkription von total-RNA (cDNA-Synthese)	45
	3.3.	7.4 Quantitantive (q) Real Time (RT)-PCR	45
	3.3.	7.5 Auftrennen von DNA mittels Gelelektrophorese	48
	3.3.	7.6 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren (NanoDrop)	48
	3.3.	7.7 Fluoreszenzbasierte Konzentrationsbestimmung von gDNA	48
	3.3.	7.8 Transformation von E. coli TOP10 Zellen durch Hitzeschock	49
	3.3.	7.9 Untersuchung der klonalen Beschaffenheit einer AML BM-MSC Kultur durch	1
		einen X-Chromosom-gekoppelten Klonalitätstest (HUMARA Assay)	49
	3.3.8	Proteinbiochemische Methoden	52
	3.3.	8.1 Herstellung von Zelllysaten	52
	3.3.	8.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	52
	3.3.	8.3 Transfer von Proteinen auf eine Nitrocellulosemembran (Western Blot)	53
	3.3.9	Zellbiologische Methoden	54
	3.3.	9.1 Transfektion von HS-5 Zellen mittels Lipofektion	54
	3.3.	9.2 Herstellung von stabil-transfizierten HS-5 Kulturen	55
	3.3.	9.3 (si) RNA Knock-down in HS-5 Zellen	56
	3.3.	9.4 Untersuchung der Proliferation von HS-5 Zellen	57
	3.3.	9.5 Detektion von apopotischen Zellen durch Annexin V	58
	3.3.	9.6 Untersuchung der Adhäsion von KG-1a und K-562 Zellen an HS-5 Zellen in	
		einer Kokultur mittels des VYBRANT Adhäsionsassays	59
	3.3.	9.7 Kokultur von KG-1a und K-562 Zellen mit AML BM-MSC unter	
		Wirkstoffbehandlung mit 5-Azazytidin	60
4.	E	rgebnisse	62
11	D:	a Cowinnung und Charaktorigiorung primärer PM MSC von AMI. Patienter	
4.1		d gesunden Spondern	11 62
	4 1 1	Des Expansionspotential der AMI PM MSC im Vergleich zu CS PM MSC	62
	4.1.1 1 1 2	Das Expansionspotential der Avil Divi-Wise im vergleich zu GS DIVI-WISe	02 64
	+.1.2	Die Expression der MSC-Marker CD271 (NCEP) und Nastin (NES) in AMI	04
	4.1.3	BIE EXPRESSION DEL MISC-IMARKEI CD2/1 (MOFR) UND MESUN (MES) IN AMIL BM-MSC	67
	A 1 A	Die in vitro-Differenzierung von BM-MSC in Osteozyten und Adipozyten	69
	<del>т</del> .1. <del>4</del> Л 1 5	Die Klonalität in vitro-expandierter RM-MSC Kulturen	70
	т.1.Ј		10
4.2	M	olekulare Alterationen in AML BM-MSC	71
	4.2.1	Genetische Alterationen in AML BM-MSC	71

	4.2.2	Die numerische Verteilung der genetischen Alterationen zwischen AML BM-	
		MSC und den hämatopoetischen Zellfraktionen77	7
	4.2.3	Die Expression von Plectin in AML BM-MSC	8
	4.2.4	Das aberrante Genexpressionsprofil der AML BM-MSC basierend auf RNAseq-	
		Analysen	9
	4.2.5	Das aberrante Genexpressionsprofil der AML BM-MSC basierend auf einem	
		Affymetrix HG-U133 Plus 2.0 GeneChip	3
	4.2.6	Die aberrante DNA-Methylierungssignatur der AML BM-MSC	4
	4.2.7	Die Assoziation der aberranten Genexpressions- und DNA-	
		Methylierungssignaturen zu zellulären Signalwegen und Molekülgruppen	9
4.3	Ku	lturexpandierte BM-MSC als Keimbahnkontrollen zur Identifizierung von	
	Mu	itationen der AML	2
			_
4.4	Fu	nktionelle Untersuchungen der Kandidatengene PLEC und LUM	4
	4.4.1	Der Effekt von PLEC RNA1 auf HS-5 Zellen	4
	4.4.2	Die Expression des Proteoglycans Lumican in AML BM-MSC und die	_
	4.4.2	Charakterisierung von stabil pCMV-LUM-transfizierten HS-5 Zellen	5
	4.4.3	KG-1a und K-562 Zellen in einem Kokulturansatz mit AML BM-MSC unter 5-	_
		Azozytidinhohondlung	
			/
5.	Di	skussion	/ <b>R</b>
5.	Di	skussion	3
5. 5.1	Di	skussion	3
<b>5.</b> 5.1	Di Die Ide	Azazynumbenandrung	3
5. 5.1	Di Die Ide Sta	Azazynumbenandrung	/ 3 8
<ol> <li>5.1</li> <li>5.2</li> </ol>	Die Die Ide Sta Fu	Azazynumbenandrung       107         skussion       108         e in vitro-Expansion von primären BM-MSC: Kontroversen über die       108         entifizierung, Isolierung und Charakterisierung einer mesenchymalen       108         mmzelle       108         nktionelle Aberrationen in BM-MSC: die remodulierte HSC-Nische bei	/ 8 8
<b>5.</b> 5.1 5.2	Die Die Ide Sta Fu: ma	Azazynumbenandrung	/ 8 8 3
<ol> <li>5.1</li> <li>5.2</li> <li>5.3</li> </ol>	Die Die Ide Sta Fu ma	Azazynumbenandnung       107         skussion       108         e in vitro-Expansion von primären BM-MSC: Kontroversen über die       108         entifizierung, Isolierung und Charakterisierung einer mesenchymalen       108         mmzelle       108         nktionelle Aberrationen in BM-MSC: die remodulierte HSC-Nische bei       113         lignen Erkrankungen der Hämatopoese       113         olekulare Alterationen in AML BM-MSC und die Stroma-Leukämie       107	/ 8 8 3
<ol> <li>5.1</li> <li>5.2</li> <li>5.3</li> </ol>	Di Dia Ida Sta Fu ma Ma Inf	Azazynumbenandnung       107         skussion       108         e in vitro-Expansion von primären BM-MSC: Kontroversen über die       108         entifizierung, Isolierung und Charakterisierung einer mesenchymalen       108         mmzelle       108         nktionelle Aberrationen in BM-MSC: die remodulierte HSC-Nische bei       108         lignen Erkrankungen der Hämatopoese       113         ekulare Alterationen in AML BM-MSC und die Stroma-Leukämie       115	/ 8 8 3 5
<ol> <li>5.1</li> <li>5.2</li> <li>5.3</li> </ol>	Die Die Ide Sta Fu: ma Mo Int 5.3.1	Azazynumbenandrung       107         skussion       108         e in vitro-Expansion von primären BM-MSC: Kontroversen über die       108         entifizierung, Isolierung und Charakterisierung einer mesenchymalen       108         mmzelle       108         nktionelle Aberrationen in BM-MSC: die remodulierte HSC-Nische bei       108         lignen Erkrankungen der Hämatopoese       113         olekulare Alterationen in AML BM-MSC und die Stroma-Leukämie       115         Genetische Alterationen in AML BM-MSC und die genetische Stabilität in vitro-       115	7 8 8 3 5
<ol> <li>5.1</li> <li>5.2</li> <li>5.3</li> </ol>	Die Die Ide Sta Fui ma Mo Int 5.3.1	Azazyuumbenanduung       107         skussion       108         e in vitro-Expansion von primären BM-MSC: Kontroversen über die       108         entifizierung, Isolierung und Charakterisierung einer mesenchymalen       108         mmzelle       108         nktionelle Aberrationen in BM-MSC: die remodulierte HSC-Nische bei       108         lignen Erkrankungen der Hämatopoese       113         olekulare Alterationen in AML BM-MSC und die Stroma-Leukämie       115         Genetische Alterationen in AML BM-MSC und die genetische Stabilität in vitro-       115         genetische Alterationen in AML BM-MSC und die genetische Stabilität in vitro-       115         expandierter BM-MSC       115	<b>8</b> <b>8</b> <b>3</b> <b>5</b> 5
<ol> <li>5.1</li> <li>5.2</li> <li>5.3</li> </ol>	Die Die Ide Sta Fu: ma Mo Int 5.3.1	Azazyuunibenantuung       107         skussion       108         e in vitro-Expansion von primären BM-MSC: Kontroversen über die       108         entifizierung, Isolierung und Charakterisierung einer mesenchymalen       108         mmzelle       108         nktionelle Aberrationen in BM-MSC: die remodulierte HSC-Nische bei       108         lignen Erkrankungen der Hämatopoese       113         olekulare Alterationen in AML BM-MSC und die Stroma-Leukämie       115         genetische Alterationen in AML BM-MSC und die genetische Stabilität <i>in vitro</i> -       115         Genetische Alterationen in AML BM-MSC und die genetische Stabilität <i>in vitro</i> -       115         Die transkriptionellen Alterationen der AML BM-MSC       112	<b>8</b> <b>8</b> <b>3</b> <b>5</b> 5 2
<ol> <li>5.1</li> <li>5.2</li> <li>5.3</li> </ol>	Die Die Ide Sta Fu: ma Mc Int 5.3.1 5.3.2 5.3.2	Azazytumbenandnung       107         skussion       108         e in vitro-Expansion von primären BM-MSC: Kontroversen über die       108         entifizierung, Isolierung und Charakterisierung einer mesenchymalen       108         mmzelle       108         nktionelle Aberrationen in BM-MSC: die remodulierte HSC-Nische bei       113         lignen Erkrankungen der Hämatopoese       113         olekulare Alterationen in AML BM-MSC und die Stroma-Leukämie       115         Genetische Alterationen in AML BM-MSC und die genetische Stabilität <i>in vitro</i> -       115         Die transkriptionellen Alterationen der AML BM-MSC       115         Die transkriptionellen Alterationen der AML BM-MSC       122         Das aberrante DNA-Methylierungsmuster der AML BM-MSC       125	<b>8</b> <b>8</b> <b>3</b> <b>5</b> 525
<ol> <li>5.1</li> <li>5.2</li> <li>5.3</li> </ol>	Die Die Ide Sta Fu: ma Mo Int 5.3.1 5.3.2 5.3.3 5.3.4	Azazyuunnoenanduung       107         skussion       108         e in vitro-Expansion von primären BM-MSC: Kontroversen über die       108         entifizierung, Isolierung und Charakterisierung einer mesenchymalen       108         mmzelle       108         nktionelle Aberrationen in BM-MSC: die remodulierte HSC-Nische bei       108         lignen Erkrankungen der Hämatopoese       113         olekulare Alterationen in AML BM-MSC und die Stroma-Leukämie       115         genetische Alterationen in AML BM-MSC und die genetische Stabilität <i>in vitro</i> -       115         Die transkriptionellen Alterationen der AML BM-MSC       122         Das aberrante DNA-Methylierungsmuster der AML BM-MSC       122         Neuartige Therapieansätze adressieren die Stroma-Leukämie Interaktion       125	<b>8</b> <b>8</b> <b>8</b> <b>7</b> <b>7</b> <b>8</b> <b>8</b> <b>8</b> <b>7</b> <b>7</b> <b>7</b> <b>7</b> <b>7</b> <b>7</b> <b>7</b> <b>7</b> <b>7</b> <b>7</b>
<ol> <li>5.1</li> <li>5.2</li> <li>5.3</li> </ol>	Die Die Ide Sta Fu: ma Mo Int 5.3.1 5.3.2 5.3.3 5.3.4 5.3.5	Azazyuunibenanduung       107         skussion       108         e in vitro-Expansion von primären BM-MSC: Kontroversen über die       108         entifizierung, Isolierung und Charakterisierung einer mesenchymalen       108         mmzelle       108         nktionelle Aberrationen in BM-MSC: die remodulierte HSC-Nische bei       113         lignen Erkrankungen der Hämatopoese       113         olekulare Alterationen in AML BM-MSC und die Stroma-Leukämie       115         Genetische Alterationen in AML BM-MSC und die genetische Stabilität <i>in vitro</i> -       115         Die transkriptionellen Alterationen der AML BM-MSC       115         Die transkriptionellen Alterationen der AML BM-MSC       122         Das aberrante DNA-Methylierungsmuster der AML BM-MSC       125         Neuartige Therapieansätze adressieren die Stroma-Leukämie Interaktion       125         Proteoglycane in der Mikroumgebung und die besondere Rolle von Lumican in       125	7 8 8 8 8 3 5 5 2 5 9
<ol> <li>5.1</li> <li>5.2</li> <li>5.3</li> </ol>	Di Die Ide Sta Fu: ma Mo Int 5.3.1 5.3.2 5.3.3 5.3.4 5.3.5	Azazyuunioenanunung       107         skussion       108         e in vitro-Expansion von primären BM-MSC: Kontroversen über die       108         entifizierung, Isolierung und Charakterisierung einer mesenchymalen       108         mmzelle       108         nktionelle Aberrationen in BM-MSC: die remodulierte HSC-Nische bei       113         lignen Erkrankungen der Hämatopoese       113         olekulare Alterationen in AML BM-MSC und die Stroma-Leukämie       115         genetische Alterationen in AML BM-MSC und die genetische Stabilität <i>in vitro</i> -       115         Die transkriptionellen Alterationen der AML BM-MSC       115         Die transkriptionellen Alterationen der AML BM-MSC       122         Das aberrante DNA-Methylierungsmuster der AML BM-MSC       125         Neuartige Therapieansätze adressieren die Stroma-Leukämie Interaktion       125         Proteoglycane in der Mikroumgebung und die besondere Rolle von Lumican in den Prozessen der Adhäsion, Migration und Proliferation       132	7 8 8 8 8 8 8 8 7 5 5 5 5 7 2 5 9 2
<b>5.</b> 5.1 5.2 5.3	Di Die Ide Sta Fu: ma Mc Int 5.3.1 5.3.2 5.3.3 5.3.4 5.3.5	Azazyuunioenanunung       107         skussion       108         e in vitro-Expansion von primären BM-MSC: Kontroversen über die       108         entifizierung, Isolierung und Charakterisierung einer mesenchymalen       108         mmzelle       108         nktionelle Aberrationen in BM-MSC: die remodulierte HSC-Nische bei       113         lignen Erkrankungen der Hämatopoese       113         olekulare Alterationen in AML BM-MSC und die Stroma-Leukämie       114         eraktion       115         Genetische Alterationen in AML BM-MSC und die genetische Stabilität <i>in vitro</i> - expandierter BM-MSC       115         Die transkriptionellen Alterationen der AML BM-MSC       112         Das aberrante DNA-Methylierungsmuster der AML BM-MSC       122         Neuartige Therapieansätze adressieren die Stroma-Leukämie Interaktion       125         Proteoglycane in der Mikroumgebung und die besondere Rolle von Lumican in den Prozessen der Adhäsion, Migration und Proliferation       132         chlicku Die funktionalle Characterizierung and Proliferation       132	<b>8</b> <b>8</b> <b>8</b> <b>8</b> <b>7</b> <b>7</b> <b>7</b> <b>7</b> <b>7</b> <b>7</b> <b>7</b> <b>7</b> <b>7</b> <b>7</b>
<ol> <li>5.1</li> <li>5.2</li> <li>5.3</li> <li>5.4</li> </ol>	Di Die Ide Sta Fu: ma Mo Int 5.3.1 5.3.2 5.3.3 5.3.4 5.3.5 Au	Skussion       108         e in vitro-Expansion von primären BM-MSC: Kontroversen über die       108         e in vitro-Expansion von primären BM-MSC: Kontroversen über die       108         mmzelle       108         mktionelle Aberrationen in BM-MSC: die remodulierte HSC-Nische bei       108         lignen Erkrankungen der Hämatopoese       113         olekulare Alterationen in AML BM-MSC und die Stroma-Leukämie       114         eraktion       115         Genetische Alterationen in AML BM-MSC und die genetische Stabilität in vitro-       115         Die transkriptionellen Alterationen der AML BM-MSC       112         Die transkriptionellen Alterationen der AML BM-MSC       122         Neuartige Therapieansätze adressieren die Stroma-Leukämie Interaktion       125         Proteoglycane in der Mikroumgebung und die besondere Rolle von Lumican in       132         sblick: Die funktionelle Charakterisierung des Proteoglycans Lumican und die       132	7 8 8 8 3 5 5 2 5 9 2 8

6.	Zusammenfassung	138
7.	Summary	140
8.	Literaturverzeichnis	142
9.	Publikationen	164
10.	Eidesstattliche Versicherung	166
11.	Lebenslauf	167
12.	Abkürzungen	169
13.	Danksagung	173
14.	Anhang	174
15.	Anhang Publikationen	180

# 1. Einleitung

### 1.1 Die Hämatopoese

Sämtliche Zelltypen des peripheren Blutes werden durch das blutbildende System stetig regeneriert. Dieser Prozess der Hämatopoese findet im Knochenmark statt. Dort werden aus multipotenten hämatopoetischen Stammzellen (*hematopoietic stem cells*; HSCs) zunächst Vorläuferzellen (*hematopoietic progenitor cells*; HSPCs) der myeloischen und lymphatischen Zellreihen, welche weiter in die reifen Zelltypen des peripheren Blutes differenzieren. So werden täglich Millionen reife Blutzellen gebildet. Aus lymphatischen Progenitorzellen gehen T- oder B-Lymphozyten sowie natürliche Killerzellen hervor, während die myeloischen Vorläuferzellen in Mono- und Granulozyten sowie Erythro- und Thrombozyten zu differenzieren vermögen (vgl. Abb. 1).<sup>1,2</sup>



Abb. 1: Vereinfachte schematische Darstellung der Hämatopoese und hierarchische Gliederung der Differenzierung einer multipotenten hämatopoetischen Stammzelle (*hematopoietic stem cell*, HSC). HSCs behalten entweder ihren Stammzellcharakter bei und regenerieren die HSC-Gesamtpopulation (Selbsterneuerung, *self-renewal*) oder differenzieren über unterschiedliche Zwischenstadien von Progenitorzellen, welche selbst in hohem Maße proliferieren, schließlich in die maturen myeloischen oder lymphatischen Zellen des peripheren Blutes. Abkürzungen: CLP (*common lymphoblastic progenitor*), CMP (*common myeloid progenitor*), GMLP (*granulocyte macrophage lymphoblastic progenitor*), MEP (*myeloid erythrocyte progenitor*), MPP (*multipotent progenitor*). Modifiziert aus Blank und Karlsson.<sup>3</sup>

Diese Regenerationskapazität muss auf der Grundlage einer verhältnismäßig kleinen multipotenten HSC-Population gewahrt bleiben. Als somatische Stammzellen besitzen HSCs neben einer multipotenten Differenzierungskapazität die Fähigkeit der Selbsterneuerung (*self-renewal*). Hierbei proliferieren HSCs unter Bildung zweier ebenfalls multipotenter HSCs und tragen so zur Aufrechterhaltung der HSC-Gesamtpopulation bei. Ein weiterer Teil der HSC-Population ruht in der G0-Phase des Zellzyklus (Quieszenz).<sup>3, 4</sup> Der hierarchische Prozess der HSC-Differenzierung wird zeitlich, d.h. bspw. durch circadiane Rhythmen, <sup>5</sup> durch in- und extrinsische Faktoren <sup>6</sup> sowie räumlich in der HSC-Mikroumgebung reguliert (vgl. 1.3).

Zu den intrinsischen Faktoren gehören u. a. epigenetische Einflüsse. So nimmt mit zunehmendem Alter die durch den Polycomb-Repressorkomplex vermittelte Histontrimethylierung (H3K27me3) zu. Hiermit gehen eine modulierte Bindung von Transkriptionsfaktoren und reduzierte *transforming growth factor* (TGF)-β Signale einher.<sup>7,8</sup> TGF-β ist ein essentieller Regulator der HSC-Quieszenz (vgl. 1.3).<sup>3</sup> Darüber hinaus ist die essentielle Rolle der DNA-Methyltransferase 3a (DNMT3a) evident, so zeigten Challen et al. in einem Mausmodell mit DNMT3a-deletierten HSCs eine beeinträchtigte HSC-Differenzierung und Hochregulierung von Genen, die mit dem multipotenten Differenzierungspotential der HSC assoziiert sind, <sup>9</sup> wie bspw. GATA3. <sup>10</sup> Die Rekurrenz von Mutationen in DNMT3a in der akuten myeloischen Leukämie<sup>7, 11</sup> spiegelt ebenfalls die maßgebliche Rolle epigenetischer Mechanismen in der Regulation der HSC wider (vgl. 1.2).

In dem Prozess der Selbsterneuerung wird weiterhin zwischen symmetrischer und asymmetrischer Zellteilung unterschieden (vgl. Abb. 1). Die asymmetrische Zellteilung resultiert nicht im Erhalt der Stammzellidentität beider Tochterzellen, sondern bringt eine multipotente Stammzelle und eine weitere Vorläuferzelle hervor. Letztere ist bereits für die Differenzierung in eine Vorläuferzelle der myeloischen oder lymphatischen Zellreihen festgelegt. Dieser Prozess ist u. a. von intrinsischen Faktoren, wie z. B. der Lokalisation bestimmter Proteinkomplexe an der Zellmembran und Polarität der Zelle, abhängig. <sup>12, 13</sup> Müller-Sieburg et al. zeigten eine linienspezifische Differenzierungskapazität von HSCs in lediglich myeloische oder lymphatische Progenitorzellen. So blieb in einer Studie diese Festlegung auf die myeloische Linie in seriellen Transplantationsexperimenten in Mäusen erhalten und resultierte in vermehrter Produktion myeloischer Vorläuferzellen und reduziertem

Ansprechen auf Interleukin (IL)-7, dem maßgeblichen Faktor zur Repopulation von Lymphozyten.<sup>14,15</sup>

Die HSC-Gesamtpopulation umfasst HSCs, die ihr Potential zur HSC-Regenerierung über lange Zeit aufrechterhalten. Diese Langzeit- (*long-term*; LT-) HSCs gehen zunächst in die reiferen Kurzzeit- (*short-term*; ST-) HSCs über, welche eine reduzierte Selbsterneuerungskapazität aufweisen. <sup>16, 17</sup>

In der Regulation der Hämatopoese spielen auch extrinsische Faktoren der Stammzellnische eine wichtige Rolle, bspw. trägt *chemokine (C-X-C motif) ligand 12* (CXCL12) zum Erhalt des Kontakts zur Stammzellnische und der HSC-Quieszenz bei. <sup>18</sup> Andererseits beeinflussen auch HSCs und HSPCs durch sekretierte Faktoren wie Angiopoetin (Ang)-1 die Integrität der vaskulären Strukturen ihrer Mikroumgebung. <sup>19</sup> Die essentielle Rolle der HSC-Mikroumgebung in der Regulation der Hämatopoese wird in 1.3 beschrieben.

Die HSC-Population ist funktionell durch ihre Fähigkeit definiert, in seriellen Transplantationen das hämatopoetische System zu regenerieren. <sup>20, 21</sup> Phänotypisch ist vor allem der Oberflächenmarker (*cluster of differentiation*) CD34 zur Definition und Gewinnung von HSCs etabliert. <sup>22, 23</sup> Die unreifen HSCs sind c-Kit (CD117)-negativ, <sup>24</sup> während für reifere HSCs CD117 sowie bspw. eine niedrige CD4-Expression bekannt ist. <sup>17</sup> Es wurden zahlreiche HSC-Subpopulationen und Marker beschrieben und die Hierarchie der HSC-Differenzierung ist weitreichend charakterisiert. <sup>25, 26</sup>

Zusammenfassend stellt die Hämatopoese den Prozess der Regeneration aller Zelltypen des peripheren Blutes dar, ein komplex kontrollierter, hierarchischer Prozess, der eine Homöostase der Blutbildung sicherstellt. Durch ein klonales Ereignis, einer chromosomalen Aberration und/oder Mutation/en, kann eine Progenitorzelle transformieren. Diese transformierte Zelle zeichnet sich durch schnelle Proliferationsraten aus und besitzt nicht länger die Fähigkeit, in eine funktionelle Zelle zu differenzieren. Im Folgenden akkumulieren neoplastische Zellen im Knochenmark und verdrängen die gesunde Hämatopoese.

## **1.2** Die akute myeloische Leukämie (AML)

Leukämien werden in verschiedene Subtypen klassifiziert. Je nachdem welche – myeloische oder lymphatische – Vorläuferzelle transformiert, wird im akuten Verlauf der Leukämogenese

zwischen der akuten myeloischen Leukämie (AML) und der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) unterschieden. Beim chronischen Verlauf wird zwischen der chronischen myeloischen Leukämie (CML) sowie der chronischen lymphatischen Leukämie (CLL) unterschieden. Im chronischen Verlauf weisen die leukämischen Zellen zumeist reifere Phänotypen auf.<sup>27, 28</sup> Eine t(9;22) reziproke Translokation und das daraus resultierende BCR-ABL1 Fusionsgen, auch als Philadelphia-Chromosom bekannt, ist u. a. mit der CML assoziiert.<sup>29</sup> Neben diesen Leukämien sind auch seltenere biphänotypische akute Leukämien (BAL) und akute undifferenzierte Leukämien (AUL) bekannt. In den nicht zu klassifizierenden Leukämien weisen die leukämischen Zellen distinkte Populationen myeloischer und lymphatischer Progenitorzellen auf (*mixed-phenotype acute leukemia;* MPAL).<sup>30</sup>

Im Folgenden soll der Subtyp der AML fokussiert werden, die häufigste Form der akuten Leukämien bei Erwachsenen. <sup>31</sup> Eine AML geht mit der Infiltration des Knochenmarks, peripheren Blutes und weiterer Gewebe durch AML-Blasten einher <sup>32</sup> und kann auch aus einem myelodysplastischen Syndrom (MDS) oder einer myeloproliferativen Neoplasie (MPN) hervorgehen. In diesem Falle bezeichnet man dies als sekundäre AML (sAML, vgl. Tab. 1). <sup>33,</sup> <sup>34</sup> Das MDS ist ebenfalls eine klonale Erkrankung des blutbildenden Systems und zeichnet sich durch eine defekte Hämatopoese, abnorme Reifegrade myeloischer Zelltypen und periphere Zytopenien aus und wird ebenfalls in unterschiedliche Subtypen klassifiziert. <sup>35, 36</sup>

Myeloische Leukämiezellen exprimieren die Marker Myeloperoxidase (MPO) und CD13 (Aminopeptidase M), <sup>37</sup> CD117 (c-Kit), weitere myeloische Marker wie CD33 (Siglec-3) <sup>38</sup> sowie Glycoproteine wie CD14 und CD34 (vgl. 1.1).

Die Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organization*; WHO) klassifizierte die AML anhand von zyto- und molekulargenetischen Aberrationen sowie histologischen Befunden (*Classification of Tumours and Haematopoeitic and Lymphoid Tissues*, vgl. Tab.1.). <sup>33, 34</sup>

Während des Verfassens der vorliegenden Arbeit wurde für die AML-Klassifikation der WHO eine Revision formuliert, wobei Anpassungen vor allem bzgl. der Erythrozytenleukämie erfolgen, Nucleophosmin-1 (*NPM1*)- mutierte AMLs (s. u.) zukünftig eine eigene Entität darstellen werden sowie *RUNX1*- mutierte AMLs als vorläufige Entität formuliert werden sollen. <sup>39</sup>

AML mit rekurrenten zyto- und molekulargenetischen Aberrationen:	Fusionsgen
AML mit t(8;21)(q22;q22);	RUNX1-RUNX1T1
AML mit inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22);	CBFB-MYH11
APL mit t(15;17)(q22;q12);	PML-RARA
AML mit t(9;11)(p22;q23);	MLLT3-MLL
AML mit t(6;9)(p23;q34);	DEK-NUP214
AML mit inv(3)(q21q26.2) oder t(3;3)(q21;q26.2);	RPN1-EVI1
AML (megakaryoblastisch) mit t(1;22)(p13;q13);	RBM15-MKL1
weitere (vorläufige) Entitäten:	
AML NPM1 mutiert	
AML CEBPA mutiert	
AML mit Veränderung des myelodysplastischen Syndroms	
therapieinduzierte AML	
anderweitig nicht klassifizierte AML	
AML mit minimaler Differenzierung	
AML ohne Maturation	
AML mit Maturation	
Akute myelomonozytäre Leukämie	
Akute monoblastäre/monozytäre Leukämie	
Akute erythrozytäre Leukämie	
Akute megakaryoblastische Leukämie	
Akute basophile Leukämie	
Akute Panmyelose und Myelofibrose	

Tab.1: Auszug aus der AML-Klassifizierung der WHO von 2008 nach Vardiman et al. <sup>33</sup>

In den 1970er Jahren wurden die ersten zytogenetischen Aberrationen in leukämischen Zellen einiger Patienten als Ursache für eine AML identifiziert, so z. B. Translokationen wie t(15;17). <sup>40</sup> Eine Vielzahl weiterer zyto- sowie molekulargenetischer Alterationen wurden fortan in Assoziation mit der Entstehung einer AML beschrieben.

Diese zyto- und molekulargenetischen Alterationen der AML-Zellen sind für die Prognose eines AML-Patienten von außerordentlicher Bedeutung, insbesondere solche mit normalem Karyotyp zeigen eine enorme Heterogenität im klinischen Verlauf.<sup>41-43</sup> Zu den rekurrenten genetischen Alterationen der AML gehören Mutationen in der FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT3), einer in HSCs exprimierten Klasse III-Rezeptortyrosinkinase. <sup>44</sup> FLT3 ist in etwa 23 % AMLs mutiert, hierbei kommen Tandemduplikationen in der *de novo* der Juxtamembrandomäne des Rezeptors am häufigsten vor (FLT3 – internal tandem repeats; FLT3-ITD),<sup>45, 46</sup> was infolge aktivierter JAK-STAT sowie PI3K-AKT Signalwege einen Proliferationsvorteil vermittelt. <sup>32</sup> FLT3-ITD ist prognostisch relevant (vgl. Tab. 2, S. 7). <sup>47</sup> Wesentlich seltener, in etwa 7 % der de novo AMLs, ist die Tyrosinkinasedomäne von FLT3 betroffen (FLT3-TKD), dies resultiert in einer konstitutiv aktivierten Kinase. Jedoch ist die prognostische Relevanz dieser Alteration im Vergleich zu FLT-ITD unklarer. <sup>45, 48, 49</sup> Eine der häufigsten genetischen Läsionen der AML sind Mutationen in NPM1, welches für das shuttle Protein Nucleophosmin codiert. Dieses fungiert u. a. als Transporter von Molekülen zwischen Nukleolus und Nukleoplasma. Als Folge einer Mutation liegt eine aberrante Lokalisation von Nucleophosmin im Zytoplasma vor und führt zur Delokalisation anderer Proteine, z. B. der kleinen GTPase ARF. 32, 50

Neben zytogenetischen Aberrationen werden gegenwärtig Mutationen in *FLT3*, *NPM1* sowie *CEBPA* (CCAAT/*Enhancer Binding Protein Alpha*, biallelisch) <sup>51</sup> als molekulare, prognostisch relevante Marker in der klinischen Praxis eingesetzt (vgl. Tab. 2, S. 7, Empfehlungen des *European Leukemia Net* zur Einschätzung des klinischen Risikos). <sup>32</sup>

Zu erwähnen seien weitere, in der AML rekurrent mutierte Gene: Mutationen in *DNMT3a*, <sup>11</sup> in *Tet Methylcytosin Dioxygenase* 2 (*TET2*), <sup>52</sup> *Additional Sex Combs-Like* 1 (*ASXL1*) sowie *Serine/Arginine-Rich Splicing Factor* 2 (*SFSF2*). <sup>32, 53</sup>

Tab. 2 : Risikostratifizierung	anhand d	er molekularen	und	zytogenetischen	Alterationen	der	AML-Zellen,
Empfehlungen des European Le	eukemia N	et nach Döhner o	et al. <sup>3</sup>	32			

Risikoprofil	Subtyp (zytogenetische Aberration; Fusionsgen)
günstig	t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1
	inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); CBFB-MYH11
	(normaler Karyotyp) NPM1 mutiert ohne FLT3-ITD
	(normaler Karyotyp) CEBPA biallelisch mutiert
intermediär I	NPM1 mutiert und FLT3-ITD (normaler Karyotyp)
	NPM1 Wildtyp und FLT3-ITD (normaler Karyotyp)
	NPM1 Wildtyp ohne FLT3-ITD (normaler Karyotyp)
intermediär II	t(9;11)(p22;q23); MLLT3-KMT2A
	Zytogenetische Abnormalitäten, welche nicht weiter als günstig oder ungünstig klassifiziert sind
ungünstig	inv(3)(q21q26.2) oder t(3;3)(q21;q26.2); GATA2-MECOM (EVI1)
	t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214
	t(v;11)(v;q23); KMT2A rearranged
	-5 oder del(5q); -7; abnl(17p); komplexer Karyotyp

In einer kürzlich veröffentlichten Studie zur molekularen Klassifizierung und Prognose der AML wurden bestimmte Kombinationen genetischer Läsionen, z. B. solche mit dem gemeinsamen Auftreten von Mutationen in *NPM1*, *DNMT3a* und *FLT3-ITD*, mit einer besonders schlechten Prognose assoziiert. <sup>54</sup> Vor allem *NPM1* könnte weiterhin als molekularer Marker für die Determinierung einer minimalen Resterkrankung (*minimal residual disease;* MRD) und der Evaluierung eines Rezidivrisikos dienen. <sup>55</sup>

Zusammenfassend stellt die AML eine zyto- und molekulargenetisch überaus heterogene Erkrankung des blutbildenden Systems dar.

Die Interaktion zwischen leukämischen Zellen und den übrigen Zellpopulationen des Knochenmarks wird gegenwärtig als maßgeblicher Faktor für das Überdauern bestimmter leukämischer Subpopulationen und damit einhergehenden Chemoresistenzen diskutiert (vgl. 1.4 und 5.3.4).

HSCs residieren im Knochenmark in einer einzigartigen Mikroumgebung, der HSC-Nische. Diese besteht aus einer Vielzahl von Zelltypen nicht-mesenchymalen und mesenchymalen Ursprungs.

## 1.3 Die Mikroumgebung der hämatopoetischen Stammzelle (HSC)

Friedenstein et al. beschrieben erstmals eine Zellpopulation, die fibroblastoide Kolonien bei der *in vitro*-Kultivierung von Zellen aus Knochenmarkaspiraten formierte. <sup>56, 57</sup> Dexter sowie Schofield und Kollegen machten diese später als mögliche Regulatoren der Hämatopoese aus und formulierten die These der hämatopoetischen Stammzellnische, welche die HSC reguliere. <sup>58, 59</sup> Im Verlauf der weiteren Jahrzehnte bis zur Gegenwart wurde eine Vielzahl von Subpopulationen (s. u.) identifiziert, die Teil der komplexen Zusammensetzung der HSC-Nische sind. <sup>60, 61</sup>

Eine bedeutende Zellpopulation dieser Mikroumgebung ist die multipotente mesenchymale Stammzelle. Multipotente mesenchymale Stammzellen zeichnen sich durch ihre Fähigkeit, *in vitro* fibroblastoide Kolonien formieren zu können (*colony forming unit – fibroblast*; CFU-F) sowie durch eine spindelartige Morphologie aus. <sup>56</sup> Die Nomenklatur der mesenchymalen Stammzelle ist in der Literatur divergent und der Ursprung dieser multipotenten Zellpopulation <sup>62</sup> ist vor allem das Knochenmark. <sup>63</sup> Jedoch wurden als Quellen auch adultes Fett- und Knorpelgewebe <sup>64</sup> oder das Zahnmark (*dental pulp*) <sup>65</sup> beschrieben. Darüber hinaus ist diese Zellpopulation auch in neonatalen Geweben wie Nabelschnurblut <sup>66-68</sup> und in der Plazenta <sup>69, 70</sup> präsent, jedoch wird der Stammzellcharakter dieser Zellpopulationen je nach Ursprungsgewebe kontrovers diskutiert (vgl. 5.1). <sup>63, 71</sup>

Die *International Society of Celltherapy* (ISCT) und das *Tissue Stem Cell Commitee* empfehlen gegenwärtig den Begriff der **mesenchymalen Stromazelle des Knochenmarks** (*bone marrow-derived mesenchymal stromal cells*; **BM-MSC**) als Bezeichnung für die gesamte kolonieformierende Zellpopulation aus Knochenmarkaspiraten. <sup>72</sup> Eine mesenchymale Stammzelle sei Teil dieser komplexen Zellpopulation, jedoch wäre der Begriff der mesenchymalen Stammzelle einer Subpopulation zuzuschreiben, die die Kriterien einer somatischen Stammzelle - Selbsterneuerung (*"self-renewal"*) sowie Multipotenz – erfülle. <sup>63, 64, 72, 73</sup> So zeigen BM-MSC ein *in vitro*-Differenzierungspotential, <sup>74</sup> die BM-MSC Population kann allerdings auch reifere Zwischenstadien der mesenchymalen Zellreihen enthalten.

Die Minimalkriterien der *in vitro*-kultivierten BM-MSC wurden 2006 durch die ISCT festgelegt: i) ausgeprägte Plastikadhärenz ii) ein adipozytäres, osteozytäres und chondrozytäres Differenzierungspotential iii) die Expression der Antigene CD73 (5'-Nucleotidase), CD90 (Thy-1 Antigen) und CD105 (Endoglin) sowie das Fehlen der hämatopoetischen Oberflächenmarker wie bspw. CD45 (*Leukocyte Common Antigen*), CD34 und CD14.<sup>72</sup>

HSCs sind vor allem im trabekulären Lumen großer und langer Knochen lokalisiert, wo sie in ihrer Nische residieren. <sup>75, 76</sup> Das Konzept der HSC-Nische kann als dynamische Einheit mehrerer Subnischen verstanden werden, in der in einem dreidimensionalen Wirkgefüge HSCs mit Subpopulationen der BM-MSC interagieren. Diese nehmen durch direkten Zell-Zell Kontakt sowie der Sekretion von Wachstumsfaktoren und parakrinen Signalmolekülen (s. u.) Einfluss auf die Quieszenz, Differenzierung und Mobilisierung der HSCs und HSPCs. <sup>77, 78</sup> Zu unterscheiden sind hier die endosteale Nischendomäne nahe der Knochenperipherie und die vaskuläre oder auch perivaskuläre Nische nahe den größeren Blutgefäßen tiefer im Lumen des Knochens. Diese Subdomänen beherbergen unterschiedliche Subpopulationen der BM-MSC (vgl. Abb. 2).



Abb. 2: Konzept der HSC-Mikroumgebung (oder HSC-Nische) im Knochenmark, bestehend aus Subpopulationen der endostealen (osteoblastären) sowie perivaskulären (sinusoidalen) Nischendomänen. Die endosteale Nische beherbergt vor allem Subpopulationen wie Osteoblasten und Osteoklasten und überwiegend quieszente HSCs. Quieszente HSCs sind auch nahe den Arteriolen lokalisiert, wo Makrophagen, endotheliale Zellen und Schwannzellen durch die Sekretion der Faktoren CXCL12, CXCL4 und TGF- $\beta$  diese Quieszenz aufrechterhalten. Perivaskukäre Nestin (Nes)-GFP-niedrig exprimierende und Leptin-Rezeptor (R)<sup>+</sup> MSC sind in der perivaskulären Nische nahe den großen Blutgefäßen (Sinusoid) zusammen mit CXCL12 abundant retikulären-(CAR-) Zellen lokalisiert. Diese perivaskuläre Domäne hat diverse Funktionen im HSC-Support wie die Regulation der Selbsterneuerung (*self-renewal*), Proliferation sowie Mobilisierung und Differenzierung. SCF (*stem cell factor*), NG2 (*neural glial antigen* 2), GFAP (*glial fibrillary acidic protein*). Modifiziert nach Boulais und Frenette.<sup>77</sup>

#### Die endosteale Nische

In der endostealen Nische nahe der Knochenperipherie sind u. a. Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten anzufinden. Osteoblasten sind für die Regulation der HSC-Gesamtpopulation von großer Bedeutung, Calvi et al. zeigten in einem Mausmodell mit durch das parathyroide Hormon (PTH)-stimulierten Osteoblasten eine erhöhte Produktion des Notch Liganden Jagged-1 und darausfolgend eine *in vivo*-Expansion von HSCs. <sup>79</sup> Eine weitere Studie belegte die bedeutende Rolle der Osteoblasten und zeigte durch die konditionelle Deletion des *bone morphogenic protein* (BMP)-*receptor* IA in Mäusen eine Vergrößerung der osteoblastären Zellpopulation und ebenfalls eine HSC-expandierende Funktion dieser Nischenzellen. Das BMP *signaling* trägt also durch Regulation der osteoblastären Nische zur Erhaltung der HSC-Population bei. <sup>80, 81</sup> Osteoblasten bilden während der Osteogenese gemeinsam mit

Osteoklasten entlang des Endosteums eine Linie in Tandems. <sup>82, 83</sup> Osteoblasten produzieren außerdem Osteopontin (OPN), welches die HSC-Expansion wiederum senkt. <sup>84, 85</sup> Auch tragen insbesondere hypoxische Bedingungen <sup>86, 87</sup> sowie die Sekretion von Ang-1 und Thrombopoetin (TPO) zu der HSC-Quieszenz bei. <sup>77, 88, 89</sup> Ang-1 bindet seinen Rezeptor Tie-2 auf HSCs, einer Rezeptortyrosinkinase, und aktiviert β1-Integrin und N-Cadherin. Daraus folgt eine intensivere Zelladhäsion der HSCs in der Nische und die Erhaltung der HSC-Quieszenz. <sup>82, 89</sup>

Osteoklasten sind vorrangig an dem Erhalt der endostealen Nische beteiligt und koordinieren die Knochenformation. <sup>83</sup> Osteoklasten-defiziente Mäuse zeigten in einer Studie schwere Osteopetrose mit fragilem Skelett sowie extramedullärer Hämatopoese. <sup>82, 90</sup>

Während HSCs in der endostealen Nische in Proximität zu Osteoklasten und Osteoblasten also vermehrt in Quieszenz ruhen, wirkt circadian sezerniertes Noradrenalin aus sympathischen Neuronen mobilisierend auf zirkulierende HSCs (vgl. Abb. 2). <sup>91,92</sup> CD34<sup>+</sup> HSCs exprimieren sowohl den Dopamin- als auch β-adrenerge Rezeptoren und beide Neurotransmitter scheinen, in Abhängigkeit der myeloischen Wachstumsfaktoren G-SCF (granulocyte colony stimulating factor) und GM-SCF (granulocyte-makrophage colony stimulating factor), primitive HSCs zu stimulieren. Dies führte zu erhöhter Motilität, Proliferation und Kolonieformierung von HSCs.<sup>81, 93</sup> Darüber hinaus ist das durch Schwannzellen sezernierte TGF-β1 für den Erhalt der Quieszenz in HSCs maßgeblich (vgl. Abb. 2). <sup>77,94</sup>

#### Die perivaskuläre Nische

Die perivaskuläre Nische in Proximität zu Blutgefäßen des Knochenlumens beherbergt unterschiedliche endotheliale Zellpopulationen und perivaskuläre **BM-MSC**: i) Leptin-Rezeptor (LepR)<sup>+</sup> MSC <sup>95</sup> und Nestin<sup>+</sup> MSC <sup>96</sup>, ii) retikuläre Zellen (inkl. CXCL12abundant reticular (CAR-) Zellen)<sup>18</sup> iii) Neural Glial Antigen 2 (NG2)<sup>+</sup> Perizyten. NG2<sup>+</sup> Perizyten fördern die HSC-Quieszenz und eine Depletion von NG2<sup>+</sup> Perizyten führte zu vermehrter HSC-Proliferation, jedoch auch zu einer reduzierten Repopulation von LT-HSCs. <sup>97</sup> Im Gegensatz dazu resultierte die Depletion von Nestin<sup>+</sup> MSC im Mausmodell zu einer drastischen Reduktion der HSC-Gesamtpopulation. <sup>96</sup> Perivaskuläre LepR<sup>+</sup> MSC überlappen lediglich mit Nestin<sup>+</sup> MSC mit niedriger Nestin-Expression, nicht mit solchen mit hoher Nestin-Expression (vgl. Abb. 2).<sup>95</sup> Diese LepR<sup>+</sup>/Nestin<sup>hoch</sup> perivaskulären MSC tragen maßgeblich zum Erhalt und zur Relokalisation zirkulierender HSCs in der Nische (homing) bei. Die Sekretion von CXCL12 (s.u) sowie des *stem cell factor* (SCF, auch bekannt als c-Kit-Ligand) spielt hierbei eine maßgebliche Rolle. <sup>77, 96, 98</sup>

Darüber hinaus seien mature Adipozyten als negative Regulatoren der Hämatopoese <sup>99</sup> sowie CD169<sup>+</sup> Makrophagen als zelluläre Komponenten der HSC-Nische genannt. In einem Depletionsmodell von CD169<sup>+</sup> Makrophagen zeigten Chow et al. eine erhöhte Mobilisierung von HSCs ins periphere Blut und in die Milz, was mit einer CXCL12-Reduktion einherging (vgl. Abb. 2).<sup>100</sup> Außerdem ging der Verlust von Makrophagen mit dem Verlust von Osteoblasten und damit HSC-regulierenden Zytokinen einher. <sup>75, 101</sup> Ebenfalls Teil der HSC-Nische sind Megakaryozyten (vgl. Abb. 2), die durch Sekretion von TGF-β und CXCL4 die HSC-Quieszenz regulieren. <sup>102-104</sup> Insbesondere nach Verletzungen oder auch einer Chemotherapie tragen diese somit maßgeblich zur HSC-Regeneration durch die Stimulierung der Expansion von Osteoblasten bei. <sup>105, 106</sup>

Der Faktor CXCL12 (auch stem cell derived factor- (SDF)-1) nimmt eine besondere Rolle in der HSC-Regulation ein und ist für den Verbleib von HSCs in der vaskulären und perivaskulären Nische maßgeblich. <sup>91, 107, 108</sup> Die hohe Expression und Sekretion von CXCL12 durch BM-MSC, insbesondere CAR-Zellen, spielt eine bedeutende Rolle in der Erhaltung der HSC-Gesamtpopulation. Der chemokine (C-X-C motif) receptor 4 (CXCR4) ist der primäre physiologische Rezeptor für CXCL12, ein heptahelikaler Rezeptor, der an ein Guanosintriphosphat (GTP)- bindendes Protein gekoppelt ist. Im Mausmodell zeigten transgene Mäuse mit CXCR4 knockout (KO) eine gravierende Reduktion der HSC-Gesamtpopulation.<sup>18</sup> Der CXCL12 KO in Mäusen war embryonal letal, bzw. überlebten Mäuse postnatal nur wenige Stunden.<sup>109</sup> CXCR4 scheint auch von großer Bedeutung für die Hämatopoese und das Anwachsen (engraftment und homing) transplantierter HSCs zu sein.<sup>110</sup> Sipkins und Kollegen gelang es 2005 erstmals in vivo die endothelialen Mikrodomänen des murinen Knochenmarks durch konfokale Mikroskopie abzubilden. Die Vaskularität der Mikrodomänen zeigte eine Kolokalisation mit HSCs und anderen HSPCs sowie T-Zellen und außerdem eine hohe Expression des Adhäsionsmoleküls E-Selectin sowie CXCL12 in der endothelialen Mikrodomäne. Sie untersuchten das Anwachsen von leukämischen Zellen (ALL-Zelllinie Nalm-6) in diesen Domänen und zeigten, dass eine Blockierung der Bindung des CXCL12 an seinen Rezeptor CXCR4 dieses engraftment inhibierte.<sup>111</sup> Auch diese Studie stellte die Bedeutung der CXCL12/CXCR4-Achse als maßgeblichen Regulator zum Erhalt der HSC-Gesamtpopulation heraus (vgl. Abb. 3).

Sekretierte Faktoren, wie z. B. Ang-1 oder CXCL12, aber auch Isoformen des fibroblastären Wachstumsfaktors (*fibroblast growth factor*; FGF) sind an der Regulation der HSC in der vaskulär-endothelialen Nische beteiligt. <sup>112</sup> Zusätzlich spielt der physische Kontakt zur Nische eine wichtige Rolle. Dieser Zell-Zell Kontakt kommt zwischen Adhäsionsmolekülen wie bspw. VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) und  $\beta$ 1-Integrinen sowie durch eine Interaktion zwischen N-Cadherinen zustande und ist ein essentieller Kontrollmechanismus der HSC-Selbsterneuerung und -Mobilisierung (vgl. Abb. 3). <sup>112</sup> Die Interaktion zwischen VCAM-1 und Integrin  $\alpha$ 4 $\beta$ 1, auch bekannt als *Very late antigen-*4 (VLA-4), führt zum Verbleib der HSCs in der Nische. <sup>113, 114</sup> Die spezifische Rolle des N-Cadherin (*NCAD*) wird gegenwärtig kontrovers diskutiert, da es zum Erhalt des physischen Kontakts zur Nische beiträgt (s.o.), eine *NCAD*-Deletion in unreifen Osteoblasten jedoch keinen Einfluss auf Selbsterneuerung und Populationsgrößen der HSCs hatte. <sup>78, 115</sup>



**Abb. 3: Die Interaktion zwischen der HSC und ihrer Mikroumgebung.** Gezeigt sind einige Komponenten und extrinsische Signale, welche an dieser Interaktion beteiligt sind, z. B. Chemokine wie CXCL12 (SDF-1) und dessen Rezeptor CXCR4, SCF (bzw. c-Kit Ligand), sowie Ang-1 und Jagged-1, die deren Rezeptoren Tie-2 bzw. Notch auf HSCs binden. Zusätzlich sorgt ein Zell-Zell Kontakt durch verschiedene Adhäsionsmoleküle wie Integrine und N-Cadherine für eine Balance zwischen Mobilisierung und Differenzierung sowie Selbsterneuerung (*self-renewal*) der HSC. Manche Faktoren, wie der fibroblastäre Wachstumsfaktor (FGF), werden vor allem von endothelialen Zellen und weniger von Komponenten der endostealen Nische exprimiert. Aus Li und Li. <sup>112</sup>

Im Gegensatz zu diesen HSC-erhaltenden Faktoren wirkt bspw. G-CSF mobilisierend auf HSCs und mindert auch die CXCL12-Expression in Nestin<sup>+</sup> MSC. <sup>110, 116</sup> G-CSF wird vor allem durch Osteozyten produziert. <sup>117, 118</sup> Weiterhin reguliert auch der Einfluss von Hormonen und parakrinen Faktoren die HSC-Repopulation. Das PTH wurde hinsichtlich seiner HSC-mobilisierenden Wirkung in der endostealen Nische erforscht. Diese Mobilisierung kam nicht direkt durch die Aktivierung des PTH-Rezeptors in Osteozyten zustande, <sup>119</sup> vielmehr durch Stimulierung anderer Zellpopulationen. So aktivierte PTH einer Studie zufolge T-Zellen, die durch Sekretion von Wnt10b wiederum die Produktion von Jagged-1 in Osteoblasten anregten (s.o.) und damit die Expansion muriner ST-HSC stimulierten (vgl. Abb.3). <sup>110, 120</sup>

Der Tatsache, dass all diese Komponenten der Nischendomänen physiologisch sicherlich nicht in diskrete Strukturen zu trennen sind, trägt der Begriff der *hemospheres* Rechnung, diese werden als Orte hoher HSC-Proliferationsaktivität verstanden und dort liegen vor allem CD150<sup>+</sup> CD58<sup>-</sup> HSCs in Kontakt mit sinusoidalen Blutgefäßen und NG2<sup>+</sup>, Nestin<sup>+</sup>, CD146<sup>+</sup> BM-MSC vor. <sup>117, 121</sup>

Obwohl es allgemein anerkannt ist, dass die endosteale Nische vor allem quieszente HSCs beherbergt, <sup>86</sup> wurden auch divergente Daten publiziert, wonach die Mehrzahl inaktiver HSCs perisinusodial lokalisiert waren. Sinusoide liegen im Knochenmark verteilt vor, auch im Endosteum.<sup>122</sup> Kunasaki et al. zeigten HSCs in direktem Kontakt mit Arteriolen des Endosteums. <sup>97</sup> Sinusoide tiefer im Lumen des trabekulären Knochens sind maßgeblich für die Mobilisierung von HSPCs in den Blutkreislauf. <sup>117, 123, 124</sup> Hingegen ist bekannt, dass HSCs überwiegend in Assoziation mit Blutgefäßen vorliegen und die Permeabilität der jeweilig assoziierten Blutgefäße ebenfalls einen Einfluss auf die Aktivierung von HSCs und ihre Mobilisierung durch vermehrte ROS- (*reactive oxygen species-*) Bildung hat. <sup>125</sup>

Zusammenfassend stellen unterschiedliche Zellpopulationen, verschiedene lösliche Faktoren und Hormone, sowie ein Netzwerk aus Blutgefäßen und zumeist hypoxische Bedingungen eine einzigartige HSC-Mikroumgebung dar. Die Lokalisation und Adhäsion der HSCs in distinkten Nischendomänen tragen zum Erhalt und zur Regulierung der HSC-Gesamtpopulation und zur stetigen Regeneration funktioneller Zellen des peripheren Blutes bei.

Alterationen in dieser Mikroumgebung wurden bereits in Assoziation mit dem Entstehen und Fortbestehen maligner hämatologischer Erkrankungen beschrieben.

Einleitung

# 1.4 Die Rolle der HSC-Mikroumgebung in malignen hämatologischen Erkrankungen

Genetische Alterationen in Nischenkomponenten, die zum Entstehen hämatologischer Erkrankungen (MPN, MDS, sAML und AML) führten, wurden ausschließlich im Kontext von Mausmodellen beschrieben.

Die Induktion einer hämatologischen Erkrankung durch die Mikroumgebung wurde in einem Mausmodell mit Retinolsäurerezeptor- $\gamma$  (RAR $\gamma$ )- defizienter HSC-Nische demonstriert; RAR $\gamma$ - defiziente Mäuse entwickelten ein MPN. <sup>126</sup> Eine weitere Studie zeigte diesen Phänotyp bei Mäusen mit Retinoblastoma (Rb)-defizienter HSC-Mikroumgebung, hingegen war die Initiation hier auch von einer Rb-Deletion in HSCs abhängig. <sup>127</sup>

Rupec et al. demonstrierten durch eine Deletion des NF $\kappa$ B-Inhibitors I $\kappa$ B $\alpha$  in fötalen murinen Hepatozyten die Initiation eines MPN, I $\kappa$ B $\alpha$ -defiziente HSCs oder Granulozyten führten hingegen nicht zu diesem Phänotyp. <sup>128, 129</sup> Interessanterweise führte diese Deletion zu hoher Expression von Jagged-1 in Hepatozyten <sup>128</sup> und die besondere Rolle des Notch *signaling* in der HSC-Nische wurde darüber hinaus mit der Deletion von Mib1 (*Mindbomb E3 Ubiquitin Protein Ligase 1*) gezeigt, welche die Notch-vermittelte Signalgebung inhibierte und in einer MPN resultierte (s. u. Abb. 4).<sup>129, 130</sup>

Weitere Studien der 2000er Jahre gingen bereits spezifisch auf die Subpopulation der Osteoblasten ein. Ein transgenes Mausmodell mit konstitutiv aktivem  $\beta$ -Catenin in Osteoblasten führte in Folge erhöhter Expression von Jagged-1 in Osteoblasten und Notch-Aktivierung zur Entstehung eines MDS bzw. einer sAML.<sup>129, 131</sup> Raaijmakers und Kollegen beschrieben den Phänotyp eines homozygoten KO des (micro) RNA-Prozessors Dicer (*DICER1*) in murinen Osteoblasten, welcher zur Entwicklung eines MDS führte (vgl. Abb. 4).

#### Einleitung



Abb. 4: Molekulare Alterationen der HSC-Mikroumgebung, die zur Transformation von hämatopoetischen Progenitorzellen führten und die Initiation myeloproliferativer Erkrankungen (*clonal myeloid disorder*) zur Folge hatten. Die einzelnen Studien sind im Fließtext (S. 15) beschrieben. Während ein konstitutiv aktives  $\beta$ -Catenin und die Deletion von *DICER1* in osteozytären Progenitoren als Initiatoren gezeigt wurden, waren Alterationen der übrigen Gene in endothelialen Zellen (RBP-J $\kappa$ ) und anderen BM-MSC Populationen der Nische verantwortlich für das Entstehen einer MPN, eines MDS und fortfolgend einer sAML. Aus Evans und Calvi.<sup>129</sup>

In einer kürzlich veröffentlichten Studie zeigten Dong et al. <sup>133</sup> eine potentielle Verbindung zwischen *PTPN11*-Mutationen der HSC-Nische und einer Leukämogenese: Keimbahnmutationen in *PTPN11* sind mit dem sogenannten Noonan-Syndrom assoziiert, <sup>134</sup> wonach die Patienten ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung einer Leukämie haben. In dem Mausmodell dieser Studie führte eine aktivierende Mutation in *PTPN11* in Nestin<sup>+</sup> MSC und Osteoprogenitoren zu einer Überproduktion von *chemokine (C-C Motif) ligand* 3 (CCL3) und einer MPN. <sup>133</sup>

Weitere Mausmodelle demonstrierten Effekte der Infiltration des Knochenmarks durch leukämische Blasten, so bspw. Morphologieveränderungen von Nischenkompartimenten, alterierte HSPC-Migration, aberrante HSC-Populationsgrößen und -Differenzierung. <sup>135-137</sup> Einige Studien, welche die Transplantation leukämischer Zellen in die Nische immunodefizienter (NOD/SCID) Mäuse fluoreszenzmikroskopisch visualisierten, erhöhten die Evidenz der Entstehung einer malignen und remodulierten Nische. Dies war bspw. durch erhöhte Produktion von SCF gekennzeichnet. <sup>111, 137</sup> Schepers und Kollegen zeigten in einem CML BCR/ABL-induzierbarem, transgenen Mausmodell, dass CML-Zellen Osteoblasten

remodulierten, was in einer Fibrose der HSC-Nische resultierte. CML-Zellen stimulierten BM-MSC durch Sekretion von CCL3 zu einem aberranten Differenzierungsprogramm mit erhöhter Produktion von remodulierten Osteoblasten. Diese remodulierten, myelofibrotische Osteoblasten zeigten eine reduzierte Produktion von CXCL12, akkumulierten in der Knochenmarkhöhle und beeinträchtigten dadurch die normale Hämatopoese. <sup>138, 139</sup> In einem Mausmodell mit orthotopem Xenograft von BM-MSC aus MDS-Patienten (MDS BM-MSC) wurde gezeigt, dass MDS BM-MSC für die Expansion von Lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> MDS-Zellen essentiell waren, was eine besondere Abhängigkeit des MDS von der Mikroumgebung demonstrierte. Nischenfaktoren wie LIF (leukemic initiating factor) waren hierbei in MDS BM-MSC überexprimiert. Dieser Phänotyp zeigte sich auch in gesunden BM-MSC, die zu MDS Zellen exponiert wurden.<sup>140</sup> Weitere Alterationen in Nischenkomponenten wurden im Kontext AML-induzierter Neuropathie sympathischer Nervenfasern in einem Mausmodell (MLL-AF9 AML) gezeigt. Hierbei führte diese sympathische Neuropathie zu einer starken Reduktion von β-adrenergen Signalen und resultierte in einer vermehrten Expansion von Nestin<sup>+</sup> MSC mit verstärkter osteoblastärer Differenzierung und einer insgesamt osteoblastär dominierten Nische.<sup>141</sup> Neuropathien wurden auch bereits im Zusammenhang mit der Initiation einer MPN beschrieben. 77, 142 Diese Studien in Mausmodellen deuteten auf eine Remodulierung der HSC-Nische durch den Einfluss der Infiltration des Knochenmarks mit neoplastischen Zellen hin.

Im Kontext zu humanen BM-MSC wurde die Expression von *DICER1* als alteriert in MDS BM-MSC beschrieben; so wiesen MDS BM-MSC niedrigere Expressionslevel von *DICER1* sowie *DROSHA* auf. *DROSHA* ist eine weitere Endonuklease, die ebenfalls an der Biogenese von microRNAs beteiligt ist. <sup>61, 143</sup> Auf zytogenetischer Ebene waren in einer AML BM-MSC Kohorte zytogenetische Aberrationen vorhanden, die nicht in den korrespondierenden leukämischen Blasten präsent waren. <sup>144, 145</sup>

Darüber hinaus zeigten Studien funktionelle Alterationen in AML bzw. MDS BM-MSC, die sich in einer reduzierten Kapazität für den Support *in vitro*-expandierter CD34<sup>+</sup> HSC widerspiegelten. <sup>146, 147</sup> Dieser verminderte HSC-Support durch MDS BM-MSC in Langzeitkokulturen mit CD34<sup>+</sup> HSCs wurde auf eine reduzierte SCF-Expression sowie Überexpression des Notch-Liganden Jagged-1 zurückgeführt. <sup>146</sup> Weiterhin wurde eine alterierte HSC-Nischenanatomie mit verstärkter Angiogenese im Knochenmark von Leukämiepatienten und darausfolgend ausgeprägtere Vaskularität beschrieben. <sup>148</sup> Im

Knochenmark von AML-Patienten lag auch nach Erreichen der kompletten Remission gegenüber gesunden Individuen eine deutlich stärkere Vaskularität vor. <sup>148-150</sup> Die vermehrte Ausschüttung von angiogenen Faktoren, wie dem vaskulär-endothelialen Wachstumsfaktor (*vascular endothelial growth factor*; VEGF) scheint hierbei maßgeblich. Erhöhte Expressionslevel des VEGF im Knochenmark von AML-Patienten korrelierten einer Studie zufolge mit der Vaskularität des Knochenmarks. <sup>151</sup> Ein weiterer angiogener Faktor ist Ang-1 (vgl. 1.3), welcher von BM-MSC und AML Zellen sekretiert wird und womöglich eine Hypervaskularisierung verursacht. Eine Überexpression von dessen Rezeptor Tie-2 auf AML-Zellen sowie eine hohe Expression von Ang-2 durch BM-MSC zeigten sich als unabhängige prognostische Faktoren mit kürzeren Überlebenszeiten. <sup>150, 152</sup> Eine Hypervaskularisierung hatte in einer Studie in Ratten wiederum komprimierten Blutfluss und letztlich hypoxische Bedingungen zur Folge und begünstigte das Überleben von AML-Zellen in der HSC-Nische. <sup>153</sup>

Die physische Interaktion zwischen neoplastischen Zellen und ihrer Mikroumgebung spielt in hämatologischen Erkrankungen hinsichtlich der Entstehung von Chemoresistenzen eine zentrale Rolle. Eine Stroma-Leukämie Interaktion und Protektion leukämischer Zellen in der hypoxischen HSC-Nische führte zum Verbleib Leukämie-initiierender Zellen im Knochenmark (vgl. dazu auch 5.3.4). <sup>154-156</sup> Sogenannte leukämische Stammzellen (*leukemic stem cells*; LSCs) können als maligne Einheiten verstanden werden, die *in vivo* Leukämie-initiierende Eigenschaften auch bei serieller Transplantation aufweisen. LSCs überdauern – teils in Quieszenz ruhend – in der HSC-Nische, können erneut expandieren und somit ein Rezidiv der Erkrankung verursachen. <sup>139, 157, 158</sup>

Zusammenfassend wird nach aktuellem Stand der Forschung von zweierlei Konzepten hinsichtlich einer möglichen pathophysiologischen Rolle der HSC-Mikroumgebung in der AML und anderen hämatologischen Erkrankungen ausgegangen:

i) Genetische Läsionen in BM-MSC (evtl. auch nur in spezifischen Subpopulationen) könnten initial zur Entstehung hämatologischer Erkrankungen beitragen. Dieses Modell wird hingegen im Kontext diskutiert, dass solche putativen Mutationen analog zum onkogenen "*first hit*" fungieren würden und zur Initiation der malignen Erkrankung noch weitere Mutationen, vermtl. der Hämatopoese, notwendig wären.

Die Evidenz aus Mausmodellen (s.o.) lässt allerdings bis zum heutigen Tage einen Beweis für eine initiale genetische Alteration in humanen BM-MSC mit der unmittelbaren Konsequenz der Transformation vermissen.<sup>117</sup>

ii) Die Infiltration mit leukämischen Blasten führte zu einer Remodulierung der Nische, was
 Chemoresistenzen und eine erschwerte Wiederherstellung der normalen Hämatopoese zur
 Folge hätte.<sup>117</sup>

Eine molekulare Charakterisierung deregulierter Komponenten der AML-Mikroumgebung würde auch zur Identifizierung neuer Zielmoleküle für die Entwicklung von nischenspezifischen Therapieansätzen beitragen.

# 2. Zielsetzung

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine klonale Erkrankung des blutbildenden Systems, gekennzeichnet durch eine massive Expansion transformierter, myeloischer Progenitorzellen. Diese leukämischen Zellen interagieren mit der Mikroumgebung des Knochenmarks, bestehend u. a. aus der heterogenen Zellpopulation der mesenchymalen Stromazellen (BM-MSC). Diese sind für die feine Regulation der HSCs maßgeblich und beeinflussen durch die stete Sekretion verschiedener Stimulanzen sowohl gesunde hämatopoetische Stammzellen (HSCs) als auch leukämische Zellen. Eine Vielzahl von für AML-Zellen Alterationen sind bereits beschrieben, hingegen sind putativ pathophysiologische, molekulare Alterationen in BM-MSC von AML-Patienten (im Folgenden AML BM-MSC) weitestgehend unbekannt, wären allerdings für die Entwicklung nischenspezifischer Therapieansätze von großem Interesse.

### Für die vorliegende Dissertation lagen die folgenden Fragestellungen vor:

- Welchen Immunophänotyp und welche Expansionskapazitäten haben frühe Passagen der AML BM-MSC *in vitro*-Kultur verglichen mit BM-MSC gesunder Spender (im Folgenden GS BM-MSC)?
- Sind AML BM-MSC im Vergleich zu GS BM-MSC auf den Ebenen der Molekulargenetik, der globalen Genexpression sowie der DNA-Methylierung alteriert? Mittels Hochdurchsatzmethoden sollten genetische Analysen in Einzelbasenauflösung sowie globale Genexpressions- und DNA-Methylierunganalysen durchgeführt werden.
- Sind AML BM-MSC in vitro genetisch stabil?
- Welchen Einfluss hat der Remissionsstatus der Patienten im Verlauf der Erkrankung auf die genetischen, epigenetischen und transkriptionellen Profile der AML BM-MSC?
- Welche zellulären Signalwege werden durch die womöglich vorhandenen molekularen Alterationen der AML BM-MSC beeinflusst?
- Welche funktionelle Rolle spielen deregulierte Komponenten in der AML-Mikroumgebung und haben primäre AML BM-MSC Chemoresistenz-vermittelnde Eigeschaften in einer Kokultur mit Leukämiezelllinien?

# 3. Materialien und Methoden

# 3.1 Patientenkollektive

AML-Patienten des *Study Alliance Leukemia* (Studienallianz Leukämie, SAL) Registers (Ethikkommission Dresden) sowie gesunde Spender (Ethikkommission Berlin) wurden nach schriftlicher Zustimmung und in Vereinbarung mit der Deklaration von Helsinki <sup>159</sup> am Beckenkamm punktiert und Knochenmark aspiriert. Lagen nach der Chemotherapie in der Knochenmarkhistologie < 5 % AML-Zellen vor, so wurde dies als komplette Remission eingestuft, bei > 5 % bis 25 % AML-Zellen als partielle Remission und erreichten Patienten im Verlauf weder eine partielle noch komplette Remission so wurden diese Patienten als refraktär eingestuft. Ein Rezidiv entsprach erneut > 5 % AML-Zellen in der Knochenmarkhistologie nach erfolgter Therapie und einem Erreichen der kompletten Remission (vgl. Tab. 3 bzw. Tab. DiskE1 im Anhang)

AML-Patienten n= 195	Subtyp: n (%) Geschlecht: n (%)	AML AML mit CLL sAML therapieinduzierte AML Extramedulläre AML BAL männlich 112 (57), weiblic	156 (80) 1 (0,5) 31 (16) 5 (2,5) 1 (0,5) 1 (0,5) th 83 (43)
	Alter: Mittelwert (Spanne)	60 Jahre (19-93 Jahre)	
Gesunde Spender n=25	Geschlecht: n (%)	männlich 12 (48), weiblich 13 (52)	
	Alter: Mittelwert (Spanne)	35 Jahre (22-74 Jahre)	
AML BM-MSC Kultur:	n=354 Proben		
je AML-Patient einfache BM-M	ISC Probe: n=195, multiple Pr	oben eines Patienten im Mit	tel 2 (Spanne 1-9)
Erstdiagnose n=159		generiert zwischen 11/2004	4 und 03/2016
Komplette Remission n=140	Verlaufsproben	generiert zwischen 04/201	1 und 03/2016
Partielle Remission n=6	Verlaufsproben	generiert zwischen 04/201	1 und 03/2016
Rezidiv n=28	Verlaufsproben	generiert zwischen 04/201	1 und 03/2016
refräktäre AML n=21	Verlaufsproben	generiert zwischen 04/201	1 und 03/2016

Tab. 3 : Übersicht der AML-Patientenkohorte und generierter AML BM-MSC Kulturen sowie der Kontrollkohorte (GS BM-MSC, s. a. Tab. DiskE1 im Anhang).

Für eine AML-Patientenkohorte (n=5) wurden AML BM-MSC im Krankheitsverlauf bei der Erstdiagnose (ED), in kompletter Remission (REM) und während des Rezidivs (REZ) generiert und diese Proben wurden für eine Analyse durch mehrere Hochdurchsatzplattformen (Illumina) ausgewählt. Ausgehend von dieser Kohorte erfolgte eine Erweiterung der Kohorten. So wurden für AML BM-MSC von Patienten mit refraktärem Verlauf (REF, n=9) sowie weitere Patienten mit gutem Ansprechen auf die Chemotherapie (n=7) WES-Analysen durchgeführt. Die weiteren Kohorten sind in Tab. 4 sowie im Detail in Tab. DiskE1 des Anhangs verzeichnet.

Tab. 4: Übersicht der AML BM-MSC und GS BM-MSC Kohorten, welche durch Illumina Hochdurchsatzplattformen sowie durch einen Affymetrix HG-U133 Plus 2.0 GeneChip analysiert wurden. Für AML BM-MSC, generiert zu den Zeitpunkten der ED, REM sowie des REZ, einer Patientenkohorte (n=5) wurden *whole exome sequencing* (WES), RNA *sequencing* (RNAseq) sowie ein Infinium HumanMethylation 450 Beadchip Array (DNA-Methylierung) durchgeführt (*cross-platform*). Für eine erweiterte Kohorte erfolgten WES-Analysen für AML BM-MSC von Patienten mit refraktärem Verlauf (REF) und solchen mit gutem Ansprechen auf die initiale Chemotherapie (im Verlauf REM). Zusätzlich waren in Vorarbeiten AML BM-MSC (n=19, ED) auf einem Affymetrix HG-U133 2.0 Plus GeneChip hybridisiert worden, im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte das Generieren und Hybridisieren von GS BM-MSC (n=4). Die Verwendung der einzelnen Proben ist im Detail im Anhang Tab. DiskE1 dargestellt.

Patientenkohorte	WES	RNAseq	DNA-Methylierung	Affymetrix
gepaarte BM-MSC Proben von AML-Patienten ( <b>n=5</b> ) im Verlauf	<b>14 Proben</b> je ED/REM/REZ für n=4	<b>15 Proben</b> je ED/REM/REZ für n=5	<b>14 Proben</b> je ED/REM/REZ für n=4	
AML 1 – AML 5 "cross-platform"	je ED/REZ für n=1		je REM/REZ für n=1	
erweiterte Kohorte	n=16 AML 6 - AML 21 davon im Verlauf, REF n=9 REM n=7		weitere n=63, davon gepaart ED/REM n=17 ED/Partielle Remission n=1 REM/REZ n=3 ED/REF n=2	n=19
GS BM-MSC	n=3	n=6	n=12	n=4

# 3.2 Materialien

## 3.2.1 Medien und Nährböden

Dulbecco`s modified Eagle Media, low glucose (DMEM)	Biochrom, Berlin
Iscove's Modified Dulbecco's Media (IMDM)	Biochrom, Berlin
LB-Medium	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
LB-Agar	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Opti-MEM	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Roswell Park Memorial Institute Media (RPMI)	Biochrom, Berlin
SOC Medium (B9020S)	New England Biolabs Inc., MA, USA

### 3.2.2 Puffer

#### Erythrozytenlysepuffer

155 mM NH<sub>4</sub>Cl 10 mM KHCO<sub>3</sub> 1 mM EDTA

#### **RIPA-Puffer für Zelllysate**

50 mM Tris-HCl (pH 7,4) 150 mM NaCl 2 mM EDTA 50 mM NaF 1 % (v/v) NP-40 0,5 % (w/v) Natriumdexycholat 0,1 % (w/v) SDS

#### SDS-Sammelgelpuffer

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

#### **Transfer-Puffer**, Western Blot

25 mM Tris 200 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol

#### Tris-Acetic acid EDTA (TAE) Puffer (10x)

2 M Tris-HCl (pH 8,3) 50 mM EDTA

#### TBS-T

1x TBS 0,1 % (v/v) Tween-20

#### Durchflusszytometrie (FACS)-Puffer

1 x Phosphate Buffered Saline (PBS) 0,5 % BSA 0,1 % (w/v) NaN3

#### SDS-Probenpuffer (Lämmli), 2 x

120 mM Tris-HCl (pH 6,8) 20 % (v/v) Glycerol 4 % (w/v) SDS 0,2 % (w/v) Bromphenolblau

#### SDS-Trenngelpuffer

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

#### 10 x SDS-Laufpuffer

250 mM Tris 2 M Glycin 1 % (w/v) SDS

#### Tris-buffered-Saline (TBS, 10 x)

200 mM Tris Base – HCl (pH 7,6) 1,5 M NaCl

## 3.2.3 Zelllinien und Zellstämme

HS-5 (Homo sapiens, bone marrow/stroma) CRL-11882™	ATCC, Manassas, VA, USA
AML-Zelllinie KG-1a, ACC 421	DSMZ, Braunschweig
CML-Zelllinie K-562, ACC 10	DSMZ, Braunschweig
E. coli TOP10 Zellen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

# 3.2.4 Plasmide, Oligonukleotide und small-interfering (si) RNAs

Human LUM Gene cDNA Clone (full-length ORF Clone), expression ready, untagged, HG-11640-UT	SinoBiological Inc., Peking, China Supplier: Hölzl Diagnostika, Köln
Human – Leer- untagged, HG-11640-UT	mit freundlicher Bereitstellung durch Dr. Lili Mochmann und Jutta Ortiz Tanchez
pMAX-GFP (Amaxa® Cell line Nucleofactor® V Kit)	Lonza, Basel, Schweiz
siRNA <i>PLEC</i> (249900), AllStars Hs Cell Death Control siRNA, AllStars Negative Control siRNA	Qiagen, Hilden
(d) NTPs (10 µM)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Random Hexamer Primer Mix	Bioline, London, UK

Eine Plasmidkarte des Konstrukts HG-11640-UT sowie sämtliche Oligonukleotide sind im Anhang in Abb. A1 bzw. in Tab. A1 und Tab. A2 verzeichnet.

## 3.2.5 Enzyme und Antikörper

DNAse, RNAse frei	Qiagen, Hilden
HhaI (10 U/µl)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Hotstart Mastermix	Peqlab, Erlangen
IQ Mix	Biorad, Hercules, CA, USA
Restriktionsenzym HhaI (10 U/µl)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Reverse Transkriptase (200 U/µl)	Epicentre, Madison, WI, USA
RNAse Inhibitor (40 U/µl), RNasin Plus	Promega, Madison, WI, USA
(Hase) Anti-human Plectin Antikörper (12254)	Cell Signaling, Leiden, Niederlande
(Hase) Anti-human Lumican Antikörper (PAS5-4571) (Western Blot und Durchflusszytometrie)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

ImmunoPure ® (goat) Anti-rabbit IgG (H+L) FITC	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
(Maus) Anti-human CD33-FITC (Klon HUM3-4)	BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA
(Maus) Anti-human CD45-FITC (Klon 5B1)	BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA
(Maus) Anti-human-CD73-APC (Klon AD2)	BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA
(Maus) Anti-human CD105-FITC (Klon 266)	BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA
(Maus) Anti-human CD271-APC (Klon ME20.04-1.H4)	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
(Maus) Anti-human GAPDH (GT-239)	Genetex, San Antonio, TX, USA
(Hase) Anti-β-Actin-HRP (monoklonal, 13E5)	Cell Signaling, Leiden, Niederlande
(Ziege) Anti-Hase IgG-Alexa 488 (ab150077)	Abcam, Cambridge, UK
(Ziege) Anti-Hase IgG – HRP	Cell Signaling, Leiden, Niederlande
(Ziege) Anti-Maus IgG – HRP	Genetex, San Antonio, TX, USA
Molekulargewicht GeneRuler (100 bp) DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Spectra <sup>TM</sup> Multicolor Größenstandard Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

# 3.2.6 Chemikalien, vorgefertigte Materialien und Verbrauchsmittel

7-AAD-Lösung	BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA
Accutase Detachment Media	ebioscience, San Diego, USA
Acrylamid (Rotiphoresegel 40)	Biorad, Hercules, CA, USA
Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf
Alizarin Red	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
AllPrep DNA/RNA Mini bzw. Micro Kit	Qiagen, Hilden
Ampicillin	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ammoniumchlorid	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Amoniumpersulfat (APS)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Antibiotic/Antimycotic (100 x Stock Solution, Gibco)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Annexin-V Kit	BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA
Ascorbinsäure	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Bromphenolblau	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	Biomol, Hamburg
Cryotube	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Dexamethason Dimethylsulfoxid (DMSO) Dithiothreitol (DTT) DNA 1000 Chip Kit (2100Bioanalyzer) Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) Eppendorf Reaktionsgefäß (1,5 bzw. 2 mL) Eppendorf Reaktionsgefäß (5 mL, FACS) Ethanol (> 99 %) Ethanol, vergällt Fötales Kälberserum, Fetal Calf Serum (FCS) Falcon Reaktionsgefäß (15 bzw. 50 mL) **Ficoll Paque** Filterpapier FITC BrdU Flow Kit Formaldehyd β-Glycerophosphat Glycin Glycerol HiPerfect Transfektionsreagenz Hygromycin B (10 mg/mL) Humanes Insulin, rekombinant, (10 mg/mL) humanes Insulin (10mg/ml), rekombinant Isopropanol (2-Propanol, >99%) Kaliumbicarbonat Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent Loading dye (5x) β-Mercaptoethanol Methanol Methylenblau Midori Green Milchpulver

Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA Agilent, Santa Clara, CA, USA Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA Sarstedt, Nümbrecht Sarstedt, Nümbrecht J.T. Baker, Center Valley, USA Roth, Karlsruhe Pan Biotech, Aidenbach BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA GE Healthcare, Little Chalfont, UK Satorius, Göttingen BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA Qiagen, Hilden Roth. Karsruhe Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA Merck, Darmstadt Roth, Karsruhe Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA J.T. Baker, Center Valey, USA Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA Nippon Genetics Europe, Düren Roth, Karlsruhe

Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumdexycholat	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumflourid (NaF)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Nunc <sup>TM</sup> MicroWell <sup>TM</sup> 96 Well (Fluoreszenz)	Nunc, Roskilde, Dänemark
NucleoBond® Plasmid Maxi Prep, Plasmid DNA Kit	Machery und Nagel, Düren
NP-40	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Oil Red O	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Phosphate Buffered Saline (PBS, 1x)	Biochrom, Berlin
Proteaseinhibitor cOmplete <sup>TM</sup> Mini Tabletten	Roche, Basel, Schweiz
PVDF Membran	Biorad, Hercules, CA, USA
QuantiFluor <sup>®</sup> One dsDNA Dye	Promega, Madison, USA
RestoreTM Plus Westernstripping buffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
RWT Puffer	Qiagen, Hilden
Salzsäure (HCl), rauchend 37 %	Roth, Karlsruhe
Serologische Pipette (5, 10, und 25 ml)	BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA
Solution Q	Qiagen, Hilden
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tris Base (Ultra)	Roth, Karlsruhe
Tween-20	Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
VYBRANT <sup>TM</sup> Cell Adhesion Assay Kit (V-13181)	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Whatman Papier	Schleicher&Schuell BioScience GmbH, Dassel
WesternLightning <sup>®</sup> Plus-ECL	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
WST-1 Cell Proliferation Assay Reagenz	Roche, Basel, Schweiz
Zellkulturflasche (25, 75, 175 cm <sup>2</sup> Format)	BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA
Zellkulturplatten mit unterschiedlicher Anzahl Vertiefungen (6-,12-,24-,48- und 96- Well)	BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA

# 3.2.7 Laborgeräte

Agarosegelaparatur	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
2100Bioanalyzer	Agilent, St. Clara, CA, USA
Biofuge	VWR, Radnor, PA, USA
Brutschrank HERACell	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
ELISA Reader, Sunrise <sup>TM</sup>	Tecan, Männedorf, Schweiz
FACS Calibur <sup>TM</sup> Durchflusszytometer	BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA
Fluoreszenzreader (SpectraMax Gemini EM)	Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA
Geldokumentationssystem	VWR, Radnor, PA, USA
Neubauer Zählkammer, 0,1 mm Tiefe	VWR, Radnor, PA, USA
Heizblock	Stuart Bibby Scientific, Staffordshire, UK
Quantus <sup>TM</sup> Fluorimeter	Promega, Madison, WI, USA
Kamera Axiocam 503 (mono) und ZEN Software	Zeiss, Oberkochen
Lumineszenzreader LS400	FujiFilm, Tokio, Japan
Mini PROTEAN Tetra Electrophoresis	Biorad, Hercules, CA, USA
Mikroskop	Leica, Wetzlar
Mikroskop Axiovert 200M	Zeiss, Oberkochen
NanoDrop	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
pH-Meter (HI 2211 pH/ORP Meter)	Hanna Instruments, Woonsocket, RI, USA
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Rotator	VWR, Radnor, PA, USA
Rotorgene Corbett Research Typ RG3000	Corbett Research, inzw. Qiagen, Hilden
Sterilwerkbank	GELAIRE Flow Laboratories, Sydney, Australien
Thermocylcer	Peqlab, Peltier
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
UV-Tisch	VWR, Radnor, PA, USA
Vortexer	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Waagen	Satorius, Göttingen
Wasserbad	Dinkelberg, Gablingen
Zentrifugen und Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg

## 3.3 Methoden

#### 3.3.1 Zellkultur von primären BM-MSC und Zelllinien

### 3.3.1.1 Isolation mononukleärer Zellen aus Knochenmarkaspiraten von AML-Patienten und gesunden Spendern

Aus den Knochenmarkaspiraten wurden mononukleäre Zellen (*mononuclear cells*; MNCs) durch eine Dichtegradientenzentrifugation mittels Ficoll Paque isoliert. Hierzu wurde das Knochenmark in einer 1:4 (v/v) Ratio mit 1 x PBS verdünnt und in einem 50 ml Falcon-Gefäß auf 15 ml Ficoll Paque geschichtet. Nach einem Zentrifugationsschritt mit ausgeschalteter Zentrifugenbremse entstand hierbei ein Dichtegradient, in dem sich MNCs in einer Mittelschicht anreicherten. Mit einer 5 ml serologischen Pipette wurde der Ring der MNCs entnommen und nach Zugabe von 1 x PBS (1:1 (v/v)) zentrifugiert (400 xg, 10 min, 4° C). Die pelletierten Zellen wurden in 5-10 ml Erythrozytenlysepuffer aufgenommen und 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 1 x PBS in einer 1:3 (v/v) Ratio erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (400 xg, 10 min, 4° C). Bei fortbestehender roter Färbung des Zellpellet wurde der Schritt der Erythrozytenlyse wiederholt. Das Pellet der MNCs wurde je nach Ausbeute in einem Volumen von 5-40 ml 1 x PBS aufgenommen und die Zellzahl je ml mittels einer Neubauer Zählkammer unter Trypanblaufärbung (1:2 (v/v)) bestimmt.

Je 1\*10<sup>7</sup> MNCs wurden in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß pelletiert (10000 xg, 2 min, RT) und entweder direkt für die Isolation von RNA und genomischer (g) DNA mittels des AllPrep RNA/DNA Mini oder Micro Kits (vgl. 3.3.7.1) verwendet oder bei -80° C gelagert.

### 3.3.1.2 Generieren einer primären BM-MSC Kultur und Analyse des Expansionspotentials der BM-MSC

Je  $4*10^5$  MNCs je cm<sup>2</sup> wurden zwecks Generierens einer primären BM-MSC Kultur in IMDM-Medium unter Zugabe von 20 % (v/v) FCS und 1 x finaler Konzentration von Antibiotic/Antimycotic in einer Zellkulturflasche (25 cm<sup>2</sup> Format) ausgesäht. Nicht-adhärente Zellen wurden nach einer Inkubation von 24 h bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> entfernt. Nach der Bildung von mindestens zwei Zellkolonien in der initialen Passage (p) Null (p0, mikroskopische Kontrolle) und einer Konfluenz dieser Zellkolonien von 70-80 % wurden die Zellen unter Zugabe von Accutase Detachment Medium und 15 min Inkubation bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> von der Oberfläche gelöst und in eine größere Zellkulturflasche (75 cm<sup>2</sup> Format) transferiert. Mit Erreichen einer Konfluenz von 70-80 % wurden die primären BM-MSC weiterhin stets unter Verdoppelung der Zellkulturoberfläche passagiert. Die Expansion erfolgte bis p4 und die Passagierungszeitintervalle wurden dokumentiert.

Bestehende Seneszenz der BM-MSC Kulturen vor dem Erreichen der p4 wurde mikroskopisch kontrolliert und protokolliert.

Für den Vergleich der Passagierungszeitintervalle wurden lediglich solche Kulturen herangezogen, die mit einer äquivalenten Zellzahl von  $4*10^5$  MNCs je cm<sup>2</sup> initiiert wurden und vollständige Datensätze über sämtliche Passagen aufwiesen (n=233).

#### 3.3.1.3 Kultur der Zelllinien HS-5, KG-1a und K-562

Die plastikadhärente humane Stromazelllinie HS-5 wurde in RPMI-Medium unter Zugabe von 20 % (v/v) FCS und 1 x finaler Konzentration von Antibiotic/Antimycotic bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Kultur wurde jede 48 h unter Zugabe von Accutase Detachment Medium passagiert (15 min, 37° C, 5 % CO<sub>2</sub>), wobei jeweils ein Viertel bis ein Fünftel der gesamten Zellpopulation erneut ausgesäht wurde.

Die AML Zelllinie KG-1a wurde in RPMI-Medium unter Zugabe von 20 % (v/v) FCS und 1 x finaler Konzentration von Antibiotic/Antimycotic bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Zellzahl der Suspensionskultur wurde jede 48 h mittels Trypanblaufärbung (1:2 (v/v)) und einer Neubauer Zählkammer kontrolliert und auf  $5*10^5$  Zellen je ml titriert.

Die CML Zellline K-562 wurde in RPMI-Medium unter Zugabe von 10 % (v/v) FCS und 1 x finaler Konzentration von Antibiotic/Antimycotic bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Zellzahl in der Suspensionskultur wurde jede 48 h mittels Trypanblaufärbung (1:2 (v/v)) und einer Neubauer Zählkammer kontrolliert und auf 2,5\*10<sup>5</sup> Zellen je ml titriert.

#### 3.3.1.4 Cryokonservierung von Zelllinien und primären Zellen

Zur vitalen Cryokonservierung wurden die Zellen in einem 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß pelletiert (800 xg, 5 min, 4° C), in 1,8 ml FCS (10 % (v/v) DMSO) aufgenommen und in ein Cryogefäß überführt. Über Nacht wurden diese Cryogefäße in einem Cryocontainer, der mit
250 ml 2-Propanol befüllt war, bei -80° C aufbewahrt. Anschließend erfolgte die Überführung in Flüssigstickstoff.

# 3.3.2 Färbung von Zellen mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern

BM-MSC wurden in frühen Passagen, ausgehend vom Zeitpunkt initialer Adhäsion und Kolonienbildung (p0) bis zum Zeitpunkt der Zellernte (p4, vgl. 3.3.1.2), mittels Fluorochromkonjugierter Antikörper gegen die Antigene CD33, CD45, CD73, CD105 und CD271 (vgl. 3.2.5) gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Hierzu wurden je  $5*10^4$  BM-MSC in ein 5 ml FACS-Gefäß überführt, je 2 ml FACS-Puffer zugegeben und der Ansatz nach zehnminütiger Inkubation bei RT mit 300 xg bei 4° C für 5 min zentrifugiert. Die Färbung erfolgte stets unter Zugabe der Antikörperlösungen in einem Verhältnis 1:50 (v/v) und der Kombination jeweils FITC- und APC- konjugierter Antikörper für 30 min bei 4° C. Dieser Inkubation folgten zwei Waschschritte unter Zugabe von je 2 ml FACS-Puffer und einer Zentrifugation (300 xg, 5 min, 4° C). Die Überstände wurden dekantiert. Nach Zugabe von 500 µl FACS-Puffer erfolgte die Messung. Zur Analyse wurden tote Zellen per *forward/side scatter* ausgeschlossen und die Zellen in FL1 bzw. FL4 analysiert.

Für die Färbung von HS-5 Zellen (zwischen  $5*10^4$  und  $10^5$  Zellen je Ansatz) gegen das Antigen Lumican zwecks durchflusszytometrischer Analyse wurden zunächst 1 ml FACS-Puffer zu den Zellen gegeben, der Ansatz 10 min bei RT inkubiert, anschließend zentrifugiert (300 xg, 5 min, 4° C) und der Überstand komplett dekantiert. Der Ansatz wurde anschließend in 1 ml Cytofix/Cytoperm<sup>TM</sup> (1 x, BD FITC BrdU Flow Kit) aufgenommen und 15 min bei RT fixiert. Nach einer Zentrifugation (300 xg, 5 min, 4° C) wurde der Überstand komplett dekantiert, die Zellen in 100 µl Cytofix/Cytoperm<sup>TM</sup> aufgenommen und 5 min auf Eis inkubiert. Daraufhin wurde der Erstantikörper (Hase) Anti- Lumican (1:50 (v/v), vgl. 3.2.5) zugegeben und 30 min bei 4° C inkubiert, der Ansatz wurde anschließend mit je 1 ml FACS Puffer versetzt und zentrifugiert (300 xg, 5 min, 4° C). Nach Dekantieren des Überstandes wurden die jeweiligen sekundären Anti-Hase IgG Antikörper (stets 1:200 (v/v), vgl. 3.2.5) zugegeben und weitere 30 min bei 4° C inkubiert. Nach zweifachem Waschen unter Zugabe von je 1 ml FACS-Puffer und Zentrifugation (je 300 xg, 5 min, 4° C) erfolgte die Analyse in FL1 oder FL4.

# 3.3.3 Differenzierung von BM-MSC in Osteozyten und Adipozyten

Die multipotente Differenzierungskapazität von BM-MSC (AML BM-MSC n=5, GS BM-MSC n=3) wurde durch eine Differenzierung *in vitro* in die osteozytäre bzw. adipozytäre Linie untersucht. Hierfür wurden BM-MSC (p4 - p5) zunächst in einer 6-Well Zellkulturplatte in DMEM-Medium (1 g/ml Glucose, stabiles L-Glutamin) ausgesäht und über Nacht bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden AML BM-MSC bzw. GS BM-MSC den jeweiligen Faktoren der osteozytären bzw. adipozytären Differenzierung ausgesetzt. Die Zusammensetzungen der hierzu verwendeten Medien sind in Tab. 5 gezeigt. Die AML bzw. GS BM-MSC wurden über einen Zeitraum von 22-28 Tagen bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> in Triplikaten in den jeweiligen Medien inkubiert. Stets erfolgte eine Kontrolle in Duplikaten in dem in Tab. 5 gezeigten Kontrollmedium. Die Ansätze wurden nach Ablauf der Inkubationszeit einer Färbung mit Alizarin Red (vgl. 3.3.4) zum spezifischen Nachweis von Kalzifizierungen in Osteozyten bzw. einer Färbung mit Oil Red O (vgl. 3.3.5) zum spezifischen Nachweis von Lipidtröpfchen in Adipozyten unterzogen.

Differenzierungsmedium osteozytäre Differenzierung	Differenzierungsmedium adipozytäre Differenzierung	Kontrollmedium
DMEM, 1 g/L Glucose stabiles L-Glutamin	DMEM, 1 g/L Glucose stabiles L-Glutamin	DMEM, 1 g/L Glucose stabiles L-Glutamin
10% (v/v) FCS	10 % (v/v) FCS	10 % (v/v) FCS
1 x Antibiotic/Antimycotic	1 x Antibiotic/Antimycotic	1x Antibiotic/Antimycotic
10 mM β-Glycerophosphat	100 µM Dexamethason	
50 µM Ascorbinsäure	10 μg/ml rekombinantes humanes Insulin	

Tab. 5: Zusammensetzungen der Kultivierungsmedien zur Initiation der osteozytären bzw. adipozytären Differenzierung von BM-MSC, in Anlehnung an Aslan et al. <sup>160</sup>

# 3.3.4 Färbung von Kalzifizierungen mittels Alizarin Red

Durch eine Färbung mit Alizarin Red können Kalzifizierungen in osteozytär-differenzierten BM-MSC nachgewiesen werden. Hierzu wurde der Überstand des Mediums entfernt und die Ansätze zweimal mit 1 x PBS gewaschen. Mit einer Formaldehydlösung (2,5 % (v/v) in 1 x

PBS) wurden die Zellen anschließend für 15 min bei RT fixiert. Die Fixierlösung wurde aspiriert und die Zellen mit 1 x PBS (pH 4,2) gewaschen. Anschließend wurde eine 2 % (w/v) Alizarin Red Lösung mittels eines Papierfilters gefiltert und je 2 ml der gefilterten Lösung den Zellpräparaten zugegeben. Der Ansatz wurde 15 min bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Färbelösung abgenommen und dreimal mit je 2 ml 1 x PBS gewaschen. Das Ergebnis wurde mikroskopisch dokumentiert.

#### 3.3.5 Färbung von Lipidablagerungen mittels Oil Red O

Mittels einer Färbung mit Oil Red O können Lipidablagerung bzw. -tröpfchen in adipozytärdifferenzierten BM-MSC nachgewiesen werden. Hierzu wurde das überstehende Medium aspiriert und zweimal mit je 5 ml 1 x PBS gewaschen. Anschließend wurde je 1 ml einer Formaldehydlösung (10 % (v/v) in 1 x PBS) zu den Ansätzen gegeben und 15 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Fixierlösung aspiriert und die Zellen mit je 1 ml einer 60 % (v/v) 2-Propanollösung gewaschen. Die Färbelösung bestand zu sechs Teilen aus einer Oil Red O-Stammlösung (3 mg/ml in 2-Propanol (> 99 %)) und vier Teilen bidestilliertem H<sub>2</sub>O. Diese Verdünnung ist lediglich 2 h bei RT stabil. Je Ansatz wurden 2 ml dieser Färbelösung zu den Zellen gegeben und 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze mit 60 % (v/v) 2-Propanol gewaschen und der Hintergrund mit bidestilliertem H<sub>2</sub>O geklärt. Für eine Kontrastfärbung wurde eine Trypanblaulösung verwendet (0,2 % (v/v) in H<sub>2</sub>O). Das Ergebnis wurde mikroskopisch dokumentiert.

# 3.3.6 Hochdurchsatzplattformen und statistische Auswertung

In der vorliegenden Arbeit wurden AML BM-MSC und GS BM-MSC mittels mehrerer Hochdurchsatzplattformen analysiert.

Zur folgenden Beschreibung der Datengenerierung und -prozessierung werden englische Bezeichnungen sowohl für kommerzielle Produkte als auch bioinformatische Applikationen (*tools*) und Plattformen <u>nicht</u> kursiv geschrieben.

# 3.3.6.1 Gesamtexomsequenzierung (WES) und Validierung

Die Technologien und Plattformen des *next generation sequencing* (NGS) haben mit dem extensiven parallelen Sequenzieren kurzer DNA-Fragmente in einer Flusszelle die Hochdurchsatzsequenzierung revolutioniert.

AML BM-MSC einer Patientenkohorte (n=5) generiert zu drei Zeitpunkten (ED, REM und REZ) wurden mittels WES (Illumina HiSeq 2000) analysiert. Es erfolgten weiterhin die Analysen für AML BM-MSC von refraktären Patienten (n=9), Patienten mit gutem Ansprechen auf die initiale Chemotherapie und einem Erreichen der REM (n=7) sowie GS BM-MSC (n=3, vgl. Tab. 4, S. 22 sowie Tab. DiskE1). Es wurden 3 µg gDNA je Probe eingesetzt.

Die Probenvorbereitung, Sequenzierung und Auswertung setzen sich aus den folgenden Schritten zusammen.

# 1. Library Präparation

Für die Präparation der *libraries* wurde das Sure Select XT Human All Exon V5 Kit (Agilent Technologies) eingesetzt.

Hierbei folgt der Fragmentierung der gDNA in Fragmente einer Länge von ca. 300 bp mittels Sonifizierung eine Reparation der Enden sowie eine Ligation der Adapter. Diese werden im Folgenden zur Amplifikation der ligierten DNA-Fragmente benötigt. Daraufhin werden exomische Regionen durch die Hybridisierung von Sonden angereichert. Diese Sonden sind biotinyliert. Biotin zeigt eine hohe Affinität zu Streptavidin, sodass biotinylierte DNA-Fragmente an magnetische Streptavidin-*beads* binden. Dadurch kann über eine magnetische Separation die *library* gereinigt werden.<sup>161</sup>

# 2. Cluster generation

Einzelsträngige DNA-Fragmente werden durch die Adapter auf der Oberfläche der Flusszelle immobilisiert, und mittels dNTPs ohne Fluoreszenzmarkierung amplifiziert. Es entstehen während dieser sogenannten *bridge amplification* doppelsträngige DNA-Fragmente mit einem immobilisierten und einem freien Terminus. Durch Denaturierung dieser DNA-Fragmente entstehen erneut einzelsträngige Matrizen, welche sämtlich an der Oberfläche der Flusszelle immobilisiert sind. Die Sequenzierung einer Probe erfolgt durch Synthese von komplementären DNA-Strängen (sequencing by synthesis; SBS) mit fluoreszenzmarkierten dNTPs in der Flusszelle.

# 3. Sequenzierung

Die Illumina SBS-Technologie verwendet fluoreszenzmarkierte dNTPs, deren Emissionen bei Inkorporation in einen DNA-Strang freigesetzt werden. Dies erlaubt eine akkurate Einzelbasenauflösung. Das Resultat ist das Generieren Millionen einzelner Sequenzabschnitte (*reads*) mit inkorporierten dNTPs. Hierbei wird sowohl ausgehend vom 5<sup>-</sup> Ende als auch 3<sup>-</sup> Ende des DNA-Fragmentes sequenziert (*paired-end* Sequenzierung). Dies erlaubt nicht nur das Generieren der doppelten Anzahl von *reads*, sondern auch – bei bekannter Länge der *reads* – einen akkuraten Sequenzabgleich und die Identifizierung von Insertionen und Deletionen. <sup>161</sup>

# 4. Sequenzabgleich und Datenanalyse

Die erhaltenen *reads* werden in der darauffolgenden Datenprozessierung an eine Referenzsequenz angeglichen (*alignment*), <sup>161</sup> es entsteht eine Sequenziertiefe mit einer mehrfachen Sequenzabdeckung.

Die Präparation der *library* sowie Sequenzierung erfolgte in der zentralen Hochdurchsatzsequenzierungseinheit des Deutschen Krebsforschungszentrums in Heidelberg (DKFZ). Die zentrale Hochdurchsatzsequenzierungseinheit des DKFZ bietet generell die Rohdaten in einer FASTQ-Datei. Die Analyse der Rohdaten erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Martin Neumann sowie in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Philipp Greif (Pathogenese der Akuten Leukämie, Experimentelle Leukämie- und Lymphomforschung, ELLF, LMU München). Das manuelle Filtern, Evaluieren mittels des IGV Browser sowie Validieren detektierter Mutationen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt.

Zur Identifizierung genetischer Alterationen in BM-MSC wurden stets die korrespondierenden MNC-Zellfraktionen als Keimbahnkontrolle für sämtliche Proben herangezogen. Die erhaltenen *reads* wurden einem Referenzgenom mittels des BAM/SAM *tools* <sup>162, 163</sup> angeglichen.

Für die Definition einer Variation wurde VarScan2 verwendet <sup>164, 165</sup> und zusätzlich die Kriterien einer mindestens zwanzigfachen Sequenzabdeckung in der zu untersuchenden Probe, einer mindestens dreifachen Sequenzabdeckung in der Keimbahnkontrolle sowie einer Allellast

der Variation (variation allelic frequency; VAF) von mehr als 20 % herangezogen (vgl. Abb. 5). Ein Abgleich mit der NCBI Datenbank für genetische Variation (NCBI data base of genetic variations; dbSNP 134)<sup>166</sup> machte die Annotation dieser Alterationen möglich. Diese dbSNP-annotierten Variationen mit minimalen Allelfrequenzen (*minor allel frequency*; MAF) von >1 % in untersuchten Populationen wurden zwecks einer Einschätzung der genetischer Alterationen im hämatopoetischen sowie Verteilung mesenchymalen Kompartiment und deren genetische Stabilität berücksichtigt. Nicht dbSNP-annotierte Alterationen wurden weiterhin mittels des IGV Browsers in den Rohdaten beurteilt. Technische Limitation wie fehlerhaftes alignment oder schlechte Lesequalität der Basensequenz wurden als Kriterien zur Beurteilung herangezogen. Sämtliche Alterationen sind in Tab. DiskE2 des Anhangs gelistet.



Abb. 5: Prozessierung der Gesamtexomsequenzierungsdaten. In a) ist die reguläre Prozessierung der Gesamtexomdaten der AML bzw. GS BM-MSC dargestellt, hierfür wurden stets die korrespondierenden MNCs als Keimbahnkontrolle verwendet, um somatische Mutationen in den BM-MSC zu identifizieren. In b) ist ein Ansatz gezeigt, in dem verschiedene Keimbahnkontrollen gegenübergestellt werden: i) MNCs der REM (morphologisch, < 5 % AML-Zellen im Knochenmarkausstrich) und ii) AML BM-MSC als Keimbahnkontrolle. Durch die Verwendung von AML BM-MSC als Keimbahnkontrolle können schwelende Mutationen der Hämatopoese während der REM detektiert werden.

Mit einer Gegenüberstellung verschiedener Keimbahnkontrollen sollten Alterationen der Hämatopoese identifiziert werden, welche während der Remissionsphase der Patienten mit >5 % VAF präsent blieben. Hierzu wurden i) MNCs aus Knochenmarkaspiraten im Zustand der REM (morphologische Remission mit < 5 % AML-Zellen) sowie ii) AML BM-MSC generiert zum Zeitpunkt der ED als Keimbahnkontrollen für die Exomsequenzierung der AML-Zellen bei ED der Patienten verwendet (vgl. Abb. 5). Hierfür wurden die Kriterien einer mindestens dreißigfachen Sequenzabdeckung sowie < 5 % VAF in der jeweiligen Kontrolle angelegt. Dies erfolgte für n=9 AML-Patienten mit erreichter REM, für die MNCs (REM) verfügbar waren.

Darüberhinaus erfolgte die Evaluierung von Mutationen refraktärer AMLs (n=9) mittels der Verwendung der korrespondierenden AML BM-MSC als Keimbahnkontrollen.

Zur Überprüfung des *calling*-Algorithmus wurden die Loci proteinalterierender SNVs (*single nucleotide variations;* Einzelbasenvariation) sowie Insertionen und Deletionen zwecks Validierung amplifiziert (n=28). Hierzu wurden zunächst für die Loci der Alterationen Oligonukleotide mittels Exonprimer <sup>167</sup> unter Standardbedingungen mit Amplikongrößen zwischen 200 und 700 bp entwickelt (siehe Anhang Tab. A2). Sämtliche Oligonukleotide wurden in einer Polymerasenkettenreaktion (PCR, vgl. 3.3.7.2) mittels gDNA der Zelllinie HS-5 als Matrize getestet und die Amplikongrößen durch eine Gelelektrophorese (vgl. 3.3.7.5) überprüft. Gegebenenfalls wurde Solution Q verwendet (vgl. Anhang Tab. A2). Bei zureichender Spezifität der Oligonukleotide wurde zwecks Validierung die PCR mit gDNA extrahiert aus den AML BM-MSC der jeweiligen Patienten als Matrize durchgeführt. Die Sanger-Sequenzierung des PCR-Produktes erfolgte durch den ABI-Sequenzierungsservice (M. Meixner, Dienstleistung Sequenzierservice, Charité, Berlin). Die Analyse der Sequenzen erfolgte durch das Programm Genious (Version 6.6) unter Verwendung der jeweiligen Referenzsequenz des Amplikons (gegeben durch den Ensemble Genome Browser, www.Ensemble.org).

Mutationen in der Kohorte der AML 1 – AML 5 (n=57) wurden manuell auf Rekurrenz in den korrespondierenden Verlaufsproben (ED, REM, REZ) der Patienten mittels des IGV Browser in den Primärdaten untersucht.

# 3.3.6.2 Globale Genexpressionsanalyse mittels RNA sequencing (RNAseq)

Die globale Genexpressionsanalyse mittels RNAseq bietet die Möglichkeit der Analyse des gesamten Transkriptoms, der Momentaufnahme transkribierter Gene, sowie eine Quantifizierung von gewöhnlichen, aber auch raren und neuartigen Transkripten. <sup>161</sup> Hierbei wurde die *library* (*complementary* (c) DNA *libary*, mRNAseq) durch die SBS-Technologie (vgl. 3.3.6.1) sequenziert.

AML BM-MSC einer Patientenkohorte (n=5) wurden jeweils zum Zeitpunkt der ED, der REM sowie des REZ mittels RNAseq analysiert. Es erfolgte ein Vergleich zu GS BM-MSC (n=6) (vgl. Tab. 4, S. 22 sowie Tab. DiskE1). Aus den jeweiligen Proben wurde total-RNA mittels des AllPrep DNA/RNA Mini Kits extrahiert und 1 µg für die Probenpräparation eingesetzt.

Probenverarbeitung mittels des TruSeq RNA Library Preparation Kit v2 (mRNAseq, Illumina) sowie Sequenzierung (HiSeq 2500 Plattform) erfolgte in der zentralen Hochdurchsatzsequenzierungseinheit des DKFZ Heidelberg. Die Daten wurden in einer FASTQ-Datei zur Verfügung gestellt und die Analyse der Rohdaten erfolgte in Zusammenarbeit mit Alva Rani James. Hierbei wurden die erhaltenen Sequenzfragmente (trimming) mittels trimmomatic tools <sup>168</sup> nach den Parametern einer *base phred* Qualität von 33 und einer Mindestlänge von 51 bp verkürzt. Die erhaltenen Sequenzen wurden einem Referenzgenom mittels des tools TopHat2 169 unter Standardbedingungen angeglichen (human annotation file, hg19, wgGencodeEncodemerged GRCH37 build). Normalisierung und Expressionsanalyse erfolgte durch eine gene count matrix und das DEseq2 R bio-conducter package. <sup>170</sup> Die Evaluation der Genexpression erfolgte nach Anzahl der erhaltenen reads. Für signifikant differentiell exprimierte Gene in AML BM-MSC gegenüber GS BM-MSC wurden die Grenzwerte wiefolgt definiert:  $\geq$  1,5- fache Hoch- bzw. Herunterregulierung bei einer *false discovery rate* (FDR)  $von \le 0,05$ .

Hierbei wurde für die Analyse der AML BM-MSC Transkriptome die folgenden Vergleiche gezogen: i) ED versus GS BM-MSC, ii) REM versus GS BM-MSC sowie iii) REZ versus GS BM-MSC. In einem gesonderten Vergleich wurden sämtliche AML BM-MSC Proben zusammengefasst (AML BM-MSC Pool, n=15) und mit GS BM-MSC (n=6) verglichen.

Die Identifizierung einer signifikanten Anreicherung von Genen mit Assoziation zu zellulären Signalwegen erfolgte durch GeneSCF<sup>171-173</sup> basierend auf einer statistischen Signifikanz von

p-Wert  $\leq 0.05$  mit dem Hintergrund der KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) Plattform <sup>174</sup> und ausschließlich anhand proteincodierender Gene.

Die erhaltenen Signaturen wurden evaluiert und darüber hinaus ausgewählte Signalwege mittels der Cytoscape 3.4.0 <sup>175</sup> Anwendung ClueGO dargestellt (Lizenz erhalten durch Gabriela Bindea). <sup>176, 177</sup>

# 3.3.6.3 Globale Genexpressionsanalyse mittels eines Affymetrix HG-U133 Plus 2.0 GeneChip

Affymetrix GeneChips sind *microarrays*, welche ein Transkriptionsprofil auf Basis immobilisierter Oligonukleotide erstellen. Der Affymetrix HG-U133 Plus 2.0 GeneChip erfasst 47.000 Transkripte und Variante durch 54.000 *probesets*. <sup>178, 179</sup> AML BM-MSC (n=19) wurden in Vorarbeiten zu der vorliegenden Arbeit auf einem Affymetrix HG-U133 Plus 2.0 GeneChip hybridisiert. Daraufhin wurden zwecks Vergleich und Erstellung eines Genexpressionsprofils im Rahmen der vorliegenden Arbeit GS BM-MSC (n=4; Tab. 4. S. 22) generiert und daraus total-RNA extrahiert (vgl. 3.3.7.1). Die Hybridisierung erfolgte nach Herstellerangaben in Zusammenarbeit mit der Arbeitgruppe von Prof. Dr. Wolf-K. Hofmann (Universitätsklinikum Mannheim). Die Rohdaten wurden in Form von CEL-Dateien zur Verfügung gestellt und mittels Partek Genomic Suite (Version 6.6) analysiert. Eine *robust multiarray average* (RMA)sowie eine Quantil-Normalisierung wurden vorgenommen und differentiell exprimierte *probesets* wurden durch ein 1,5-fach erhöhtes bzw. 1,5- fach reduziertes relatives Signal für hoch- bzw. herunterregulierte Gene definiert (FDR  $\leq$  0,05).

Die Rohdaten wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Martin Neumann ausgewertet, Bewertung und Analyse der erhaltenen Signatur wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit vorgenommen. Die Identifizierung einer signifikanten Anreicherung von Genen mit Assoziation zu zellulären Signalwegen erfolgte auch in dieser Signatur durch das GeneSCF *tool* <sup>171-173</sup> basierend auf einer statistischen Signifikanz von p-Wert  $\leq 0.05$  mit dem Hintergrund der KEGG-Plattform. Ausgewählte Signalwege wurden mittels der Cytoscape 3.4.0 <sup>175</sup> Anwendung ClueGO dargestellt. <sup>176, 177</sup>

# 3.3.6.4 Globale DNA-Methylierungsanalyse mittels eines Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip Array

Die Methylierung des fünften Kohlenstoffatoms im Cytosinring (5-Methylcytosin) eines CpG-Dinukleotids - bestehend aus einem Cytosin (C) und einem Guanin (G) – ist mit einer transkriptionellen Repression assoziiert. Etwa 70-80 % dieser CpG-Dinukleotide (CpGs) liegen im humanem Genom methyliert vor. <sup>180, 181</sup>

Zwecks Erstellung einer DNA-Methylierungssignatur wurden AML BM-MSC (ED: n= 32, REM: n=31, REZ: n=10, REF: n=4) mittels eines Illumina Infinium HumanMethylation 450 Beadchip Arrays analysiert. Als Vergleichskohorte dienten GS BM-MSC (n=12, vgl. Tab. 4, S. 22 sowie Tab. DiskE1).

Hierfür wurden je Probe 500 ng gDNA eingesetzt. Probenbearbeitung und Durchführung unter Berücksichtigung interner Kontrollen sowie Bereitstellung der Rohdaten in Form von IDAT-Dateien erfolgten durch die Hochdurchsatzsequenzierungseinheit des DKFZ Heidelberg. Die Analyse der Rohdaten erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Martin Neumann, Bewertung und Analyse der erhaltenen Signatur wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit vorgenommen.

Der Infinium HumanMethylation450 BeadChip Array für eine globale Methylierungsanalyse deckt 99 % der RefSeq Gene und 96 % der CpG-Inseln ab und vereint zwei unterschiedliche Sondentechnologien (*beads*), die Infinium I sowie die Infinium II Technologie (vgl. Abb. 6, S. 42). Beide Sondentechnologien basieren zunächst auf der Konvertierung eines unmethylierten Cs in ein Uracil durch die Behandlung mit Bisulfit.

Im Falle der Infinium I Technologie wird der Methylierungsstatus des Ziel-CpGs durch die komplementäre Bindung des 3`-Endes wiederum zweierlei unterschiedlicher Sonden bestimmt; entweder i) einer Sonde für methylierte CpGs (**M**), welche keine Bisulfitkonvertierung erfahren haben, oder ii) der Bindung einer Sonde für unmethylierte CpGs (**U**), welche bisulfitkonvertiert vorliegen. Die spezifischen Sonden (50-Mere) für methylierte CpGs binden nicht an unmethylierte CpG-Zielsequenzen und *vice versa*. Nach der Hybridisierung der Sonden erfolgt eine Extension des DNA-Stranges mit fluoreszenzmarkierten Nukleotiden, wobei diese dieselbe Fluoreszenz aufweisen und das Auslesen separat für jeden Sondentyp, M und U, erfolgt. <sup>182-184</sup> Die Bindung einer Sonde setzt den gleichen Methylierungsstatus für alle weiteren

CpGs voraus, die der Sonde unterliegen. Die Proportion der Methylierung wird durch  $\beta = M / (M+U)$  bestimmt.

Die Infinium II Technologie verwendet lediglich einen Sondentyp, eine degenerierende R-Base, welche das 3`- Ende eines Locus komplementär bindet. Nach der Hybridisierung gefolgt von einer Einzelbasenextension mit fluoreszenzmarkierten Adeninen (As) und Guaninen (Gs) mit unterschiedlicher Emission wird entweder i) ein G für einen methylierten Locus oder ii) ein A für einen unmethylierten Locus in der bisulfitkonvertierten gDNA detektiert und die Proportion der Methylierung durch  $\beta$  = Grün (M) / (Rot (U) + Grün (M)) bestimmt (vgl. Abb. 6).<sup>185</sup>

Die Sonden der Infinium II Technologie (ebenfalls 50-Mere) können bis zu drei CpGs innernhalb der Sondensequenz auflösen und dies erlaubt eine Beurteilung unabhängig von Methylierungsstatus benachbarter CpGs. Jedoch ist die Auflösung in CpG-reichen Sequenzen (so z. B. für CpG-Inseln) nicht ausreichend, somit werden diese Sonden in CpG-ärmeren Regionen eingesetzt. Sonden der Infinium I Technologie erfassen Sequenzen hoher CpG-Dichte (vgl. Abb. 6).



Abb. 6: Der Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip Array vereint die Infinium I sowie Infinium II Technologie. Nach erfolgter Bisulfitkonvertierung wird der Methylierungsstatus eines jeden CpG-Dinukleotids (CpG) der Zielsequenz untersucht. Die a) Infinium I Technologie verwendet zweierlei Sonden (beads): Sonden für den methylierten (M) und Sonden für den unmethylierten (U) Locus des Ziel-CpGs, welche je nach Methylierungsstatus spezifisch binden. Dem folgt eine Amplifikation des Locus mit fluoreszenzmarkierten Nukleotiden gleicher Fluoreszenz. Die Intensitäten beider Sonden werden separat ausgelesen und die Proportion der Methylierung durch  $\beta = M / (M + U)$  bestimmt. Hierbei wird für jedes weitere CpG, das der Sonde unterliegt, der gleiche Methylierungsstatus vorausgesetzt. b) Die Infinium II Technologie verwendet lediglich einen Sondentyp, eine degenerierende R-Base, welche 3'- upstream des Ziel-CpGs inkorperiert. Auch hier folgt eine Amplifikation des Locus und die Detektion eines Gs für den methylierten, oder eines As für den unmethylierten Locus durch unterschiedliche Fluoreszenzen und der Methylierungstatus wird durch  $\beta$  = Grün (M) / (Rot (U) + Grün (M)) bestimmt. c) Die Infinium II Technologie hat den Vorteil, dass bis zu drei CpGs mit unbekanntem Methylierungsstatus aufgelöst werden können, hingegen bieten diese Sonden für CpG-reiche Regionen (CpG-Inseln) keine ausreichende Auflösung. Für CpG-Inseln werden mehr Sonden der Infinium I Technologie eingesetzt, für CpG-ärmere Regionen hingegen mehr Infinium II Sonden. Im Verhältnis sind mehr Infinium II Sonden im Assay präsent. Modifiziert nach Maksimovic et al. 185

Die erhaltenen Beta-Werte liegen im Bereich Null bis Eins, die Verteilungen unterscheiden sich hingegen zwischen den Infinium I und II Technologien: Die Signale der Sonden der Infinium I Technologie tendieren dazu, sich verstärkt in den Extremwerte 0 oder 1 zu verteilen (vgl. Abb. 7).



Abb. 7: Gesamtverteilung der  $\beta$ -Werte im Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip Array nach SWAN-Normalisierung mit Werten zwischen 0 (unmethyliert) und 1 (methyliert). Hierbei tendieren die Sonden der Infinium I Technologie mehr zu den Extremwerten, während die Sonden der Infinium Technologie II vor allem hemi-methylierte Targetsequenzen detektieren können. Modifiziert nach Maksimovic et al. <sup>185</sup>

Zum Angleichen der  $\beta$ -Werte wird die sogenannte SWAN-Normalisierung angewandt. Dies geschieht zum einen durch eine Quantilverteilung der Signalintensitäten gruppierter Sonden mit gleichem CpG-Gehalt (1-3 CpGs) beider Sondentypen. Zum zweiten werden die übrigen Sonden - weitaus mehr der Infinium II als der Infinium I Sonden - zu der Verteilung dieser übrigen Sondengruppe linear interpoliert. <sup>185</sup>

Datenprozessierung und statistische Analysen erfolgten durch das Programm Partek Genomic Suite (Version 6.6). Im Vergleich zwischen AML BM-MSC und GS BM-MSC wurden differentiell methylierte CpG-Zielsequenzen (*differentially methylated CpG sites*; DMCs) nach einer statistischen Signifikanz von FDR  $\leq 0,1$  definiert. Differentiell methylierte Gene wurden nach einem Grenzwert von  $\geq 3$  DMCs mit konstanter Hypo- bzw. Hypermethylierung definiert und gefiltert. Eine Anreicherung von Genen mit Assoziation zu zellulären Signalwegen erfolgte auch für diese Signatur durch das GeneSCF *tool*.<sup>171-173</sup> Darüber hinaus wurden ausgewählte Signalwege mittels der Cytoscape 3.4.0<sup>175</sup> Anwendung ClueGO dargestellt.<sup>176, 177</sup>

Material und Methoden

# 3.3.7 Genomische Methoden

#### 3.3.7.1 Modifiziertes Protokoll zur simultanen Isolierung von gDNA und RNA

Genomische DNA sowie total-RNA wurden mittels des AllPrep DNA/RNA Mini bzw. Micro Kits nach Herstellerangaben isoliert. Jedoch wurde der Ethanol-Fällungsschritt mit dem Volumen in einer Ratio von 1:1,5 (v/v) anstelle von 1:1 (v/v) durchgeführt. Weiterhin wurde der Elutionsschritt dreifach statt einfach ausgeführt und der Elutionspuffer auf der AllPrep DNA Mini- oder Microsäule je 5 min bei 37° C in einem Heizblock inkubiert, bevor die Elution durch eine Zentrifugation mit > 10000 xg erfolgte.

Die Isolation von total-RNA mittels des RNeasy Kits erfolgte nach Herstellerangaben mit dem optionalen Zusatzschritt des DNAse Verdaus auf der Silica Membran.

# **3.3.7.2** Polymerasenkettenreaktion (PCR)

Die Polymerasenkettenreaktion (*polymerase chain reaction*; PCR) ist eine Standardmethode zur *in vitro*-Amplifikation eines DNA-Fragments. Eine thermostabile DNA-Polymerase katalysiert die matrizenabhängige Polymerisation von Nukleotiden. Die Matrize wird dabei durch Oligonukleotide (Primer) flankiert. <sup>186, 187</sup> Ein exemplarischer PCR-Ansatz ist in Tab. 6 mit optionaler Zugabe von Solution Q angegeben. Für PCRs zwecks Validierung von Mutationen wurden die Primer spezifisch für den Locus der identifizierten Mutation entwickelt (vgl. 3.3.6.1). Sämtliche verwendeten Primer sind im Anhang Tab. A2 mit Angabe der optionalen Zugabe von Solution Q verzeichnet.

Komponente	Reaktion (1x)	Reaktions (1x) Solution Q
H <sub>2</sub> O	6 µl	5 μ1
Solution Q	-	1 µ1
Hotstart Mastermix (S)	12,5 µl	12,5 µl
(Fw) Primer [10 µM]	1,5 µl	1,5 µl
(Rv) Primer [10 µM]	1,5 µl	1,5 µl
Template [30 ng/µl]	3,5 µl	3,5 µ1
Gesamtvolumen	25 µl	25 µl

Programmschritt	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	95° C	15 min	
Denaturierung	95° C	30 s	34 Zyklen
Annealing	55-60° C	30 s	
Elongation	72° C	60 s	
Finale Elongation	72° C	10 min	

Tab. 6: Exemplarischer Ansatz einer PCR sowie PCR Progamm

# 3.3.7.3 Reverse Transkription von total-RNA (cDNA-Synthese)

Das Generieren von cDNA aus total-RNA mittels reverser Transkription erfolgte durch die Reverse Transkriptase (RT) eines Murinen Leukämievirus (M-MLV) in einem Reaktionsansatz (vgl. Tab. 7) 1 h bei 37° C gefolgt von einer Enzyminaktivierung bei 85° C für 5 min. Hierzu wurden stets 500 ng total-RNA eingesetzt.

Komponente	Reaktion (1x)
dNTP (10 mM)	2 µl
dT20 bzw. random hexamers [10 µM]	2 µl
10 x Puffer	2 µ1
DTT [100 mM]	2 µ1
RNAse inhibitor [40 U/µl]	0,5 µl
M-MLV Reverse Transkriptase [200 U/µl]	0,5 µl
Verdünnte total RNA (500 ng)	in 11 µl
Gesamtvolumen	20 µ1

Tab. 7: Exemplarische Zusammensetzung des Reaktionsansatzes einer cDNA Synthese

# 3.3.7.4 Quantitantive (q) Real Time (RT)-PCR

In der vorliegenden Arbeit wurde die quantitative Expressionsanalyse eines Targetgens auf mRNA Ebene mittels der Methode nach Taqman-Assays basierend auf einer Fluoreszenzdetektion durchgeführt. Das Prinzip basiert auf der 5`- 3` Exonukleaseaktivität der Taq DNA-Polymerase. Die Primer flankieren hierbei eine Sonde, welche mit einem Fluoreszenzfarbstoff (bspw. 6-Carboxy Fluoreszin; FAM) am 5`- und einem Quencher (bspw. BHQ1) am 3`- Ende konjugiert ist. Die Emission des Fluoreszenzsignals wird durch den Quencher unterdrückt, bis es zu seiner Dissoziation bedingt durch die 5` - 3` Exonukleaseaktivität der Taq DNA-Polymerase beim Erreichen der Sondenlokalisation kommt. Die detektierte Fluoreszenz ist demzufolge proportional zur Zunahme des PCR-Produkts in der exponentiellen Phase und zu der im Reaktionsansatz vorliegenden Matrize und somit der Menge der Transkripte und Expression des Zielgens.<sup>188</sup>

Die weitere Besonderheit dieser auf Sonden-basierenden Technologie ist die Möglichkeit der Kombination mit der Amplifikation einer internen Kontrolle im gleichen Reaktionsansatz (Multiplex-PCR). Diese interne Kontrolle (house keeping gene; HKG) dient zur Normalisierung für die Expressionsanalyse des Kandidatengens (gene of interest; GOI). Die Entwicklung der Primer erfolgte hierbei exonübergreifend und targetspezifisch. Die jeweiligen Sonden der vorliegenden Arbeit wurden so entwickelt, dass deren Schmelztemperaturèn 10° C über den Schmelztemperaturen der Primer lagen. Dies stellt eine frühere Bindung der Sonde an die Zielsequenz und somit eine maximale Effizienz der PCR sicher. Für jede qRT-PCR wurde die Effizienz mittels einer Verdünnungsreihe über vier Verdünnungsschritte in einer Multiplex-PCR mit einem HKG überprüft (Analyse durch Rotorgene 6). In der vorliegenden Arbeit wurden sämtliche qRT-PCRs in Multiplex mit dem HKG GUS (
ß-Glucoronidase) durchgeführt und eine Effizienz zwischen 92-99 % erreicht, wobei die Effizienzen der jeweilig kombinierten Amplifikation von GOI und HKG in der Multiplex max. 2 % differierten (Daten nicht gezeigt). Die qRT-PCR des Targetgens NGFR wurde hingegen in Einzelreaktionen im Vergleich zu Einzelreaktionen des HKG GPI (Glucose - 6 - Phosphatisomerase) durchgeführt, da keine ausreichende Effizienz in einer Multiplex erreicht werden konnte (vgl. Tab. 8). Für die Einzelreaktionen wurde jeweils eine Effizienz von > 95% erreicht (Daten nicht gezeigt). Stets erfolgte für Primärmaterial der AML BM-MSC und GS BM-MSC die Expressionsanalysen zum Zeitpunkt der Zellernte (p4, vgl. 3.3.1.2) mit cDNA als Matrize (vgl. 3.3.7.3).

Reaktionsansatz

Multiplex	Reaktionsansatz (1 x)	Einzelreaktion
H <sub>2</sub> O	ad 25 µl	H <sub>2</sub> O
IQ- Mix (2 x)	12,5 µl	<b>IQ- Mix (2 x)</b>
(Fw) Primer GOI [10 µM]	1,5 µl	(Fw) Primer [1
(Rv) Primer GOI [10 µM]	1,5 μl	(Rv) Primer [1
Sonde GOI [10 µM]	0,63 µl	Sonde [10 µM]
(Fw) Primer HKG [10 µM]	0,75 µl	
(Rv) Primer HKG [10 µM]	0,75 µl	
Sonde HKG [10 µM]	0,25 µl	
cDNA Template	2 µl	cDNA Templat
Gesamtvolumen	25 µl	Gesamtvolume

Tah	$8 \cdot \mathbf{F}$	vomplarischer	Peaktionsansatz	fiir aina	APT PCP	mittale	nezifischer S	ondon
1 a.	0. E	xemplarischer	Reaktionsansatz	i fui enne	qri-rur	minuers s	spezifischer S	onden.

	(1 x)
H <sub>2</sub> O	ad 25 µl
IQ- Mix (2 x)	12,5 µl
(Fw) Primer [10 µM]	1,5 µl
(Rv) Primer [10 µM]	1,5 µl
Sonde [10 µM]	0,63 µl
cDNA Template	2 µ1
Gesamtvolumen	25 µl

Programmschritt	Temperatur	Zeit	
Denaturierung	95° C	3 min	
Denaturierung	95° C	15 s	50 Zyklen
Annealing/Elongation	60 °C	1 min	

Zur Datenanalyse wurde nach Baldus et al. <sup>189</sup> zur relativen Expression zum HKG vorgegangen.

Die Expression eines Targetgens relativ zu einem HKG ( $\Delta$ Ct, *Cycling Threshold*) sowie einem Kalibrator bzw. einer Kontrollkohorte (Mittelwert des  $\Delta$ Ct der Kontrollkohorte,  $\Delta\Delta$ Ct-Analyse) wurde anhand folgender Formel bestimmt.<sup>190</sup>

 $\Delta Ct = Ct_{Targetgen} - Ct_{HKG}$  $\Delta \Delta Ct = \Delta Ct_{Targetgen} - \Delta Ct_{Kalibrator}$  $Fold \ change = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ 

Material und Methoden

#### 3.3.7.5 Auftrennen von DNA mittels Gelelektrophorese

Durch eine Agarosegelektrophorese können DNA-Fragmente in Abhängigkeit ihrer Größe in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden. Hierfür wurden 1-2 % (w/v) Agarosegele hergestellt, die Agarose in 1 x TAE Puffer durch Aufkochen in einer Mikrowelle gelöst und 8 min bei RT abgekühlt. Der gelösten Agarose wurde 0,02 % (v/v) Midori Green zugegeben und nach Aushärten des Gels wurden die zu analysierenden Proben mit 6 x DNA-*Loading Dye* unter einfacher Endkonzentration versetzt und das Gel beladen. Die Gelelektrophorese erfolgte anschließend in 1 x TAE bei konstanter Spannung zwischen 100-130 V für 30-45 min und die DNA-Fragmente wurden unter Anregung mit UV-Licht visualisiert.

# 3.3.7.6 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren (NanoDrop)

Die Absorption von UV-Licht durch Nukleinsäuren wird zur Konzentrationsbestimmung genutzt. Konzentrationen von total-RNA und gDNA wurden in der vorliegenden Arbeit mittels eines UV/Vis-Spektralphotometers (NanoDrop) bestimmt, gDNA ggf. fluoreszenzbasiert durch das Quantus System (s. u., 3.3.7.7). Die Reinheit kann durch den Quotienten aus der Absorption von DNA (260 nm) und Proteinen (280 nm) bestimmt werden ( $A_{260}/A_{280}$ ). Bei einer reinen Probe liegt dieser Wert zwischen 1,8 und 1,9. Ein niedrigerer Wert spricht für eine Verunreinigung durch Proteine. Für die Konzentrationsbestimmungen wurden je 1,5 µl RNA oder gDNA eingesetzt.<sup>187</sup>

# 3.3.7.7 Fluoreszenzbasierte Konzentrationsbestimmung von gDNA

Die gDNA-Konzentrationsbestimmung der Proben, welche zur Analyse durch Hochdurchsatzplattformen verwendet wurden, wurde mittels einer fluorimetrischen Methode quantifiziert. Hierzu wurde das Quantus oneDNA System genutzt. Die zu quantifizierenden Proben (je 1  $\mu$ l) wurden mit je 199  $\mu$ l oneDNA versetzt. Für die Leerkontrolle wurde 1  $\mu$ l eines 1 x TE-Puffers mit 199  $\mu$ l oneDNA versetzt. Als Kalibrierung diente eine 400 ng/ $\mu$ l konzentrierte Lambda DNA-Lösung. Hieraus wurden 2  $\mu$ l mit 398  $\mu$ l oneDNA versetzt. Die Kalibierung des Gerätes sowie Bestimmung der Konzentration erfolgte nach Herstellerangaben.

#### 3.3.7.8 Transformation von E. coli TOP10 Zellen durch Hitzeschock

Für die Transformation wurde ein Aliquot (100  $\mu$ l) chemisch kompetenter *E. coli* TOP10 Zellen auf Eis aufgetaut und mit 5-10 ng Plasmid-DNA versetzt. Nach einer dreißigminütigen Inkubation auf Eis folgte ein Hitzeschock (37° C) für 45 s. Die Zellen wurden für weitere 2 min auf Eis inkubiert und anschließend in 900  $\mu$ l SOC-Medium aufgenommen. Dieser Ansatz wurde 45 min bei 37° C geschüttelt und anschließend 10  $\mu$ l der Zellsuspension direkt durch die Dreistrichmethode auf Selektivagar (100  $\mu$ g/ml Ampicillin) aufgebracht.

Im Folgenden wurden Einzelkolonien zum Animpfen einer Kultur (5 ml LB-Selektivmedium mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin) verwendet. Diese wurde als Übernacht-Kultur zum Animpfen einer *E. coli* TOP10 Kultur zur Maxipräparation (200 ml LB-Selektivmedium mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin) verwendet.

Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte mittels eines Plasmid DNA Kits (vgl. 3.2.6) nach Herstellerangaben und die Kontrolle des pCMV-LUM Konstrukts (HG-11640-UT, vgl. 3.2.4) mittels einer Sequenzierung anhand von T7-Primern (ABI-Sequenzierungsservice, M. Meixner, Dienstleistung Sequenzierservice, Charité, Berlin).

# 3.3.7.9 Untersuchung der klonalen Beschaffenheit einer AML BM-MSC Kultur durch einen X-Chromosom-gekoppelten Klonalitätstest (HUMARA Assay)

Vor allem zur Interpretation der generierten Gesamtexomdaten war die klonale Zusammensetzung der AML BM-MSC Kultur von großem Interesse. Die klonale Zusammensetzung einer Zellpopulation kann durch einen Klonalitätstest basierend auf der Amplifikation eines X-chromosomal lokalisierten Locus untersucht werden. Voraussetzungen für die Verwendung eines Locus für einen solchen Klonalitätstest sind i) eine X-chromosomale Codierung und weiterhin ein ii) vorliegender Längenpolymorphismus sowie iii) die Möglichkeit, das maternale vom paternalen Allel zu diskrimieren, z. B. durch den Verdau mittels eines methylsensitiven Restriktionsenzyms.<sup>191</sup> Bei Frauen liegt in somatischen Zellen eines der beiden X-Chromosome hypermethyliert vor (X-chromosomale Inaktivierung (*Barr Body*)). Diese Inaktivierung passiert zufällig und somit kann in einer multiklonalen Population somatischer Zellen ein Mosaik beider transkriptionell aktiver Allele detektiert werden.<sup>192</sup> Ein möglicher X-chromosomaler Klonalitätstest - das sogenannte HUMARA Assay - ist die allelspezifische Amplifikation eines Locus im Exon 1 des humanen androgenen Rezeptors

(AR). <sup>191, 193, 194</sup> In Exon 1 dieses Gens liegt ein polymorphes CAG-*repeat* vor. Dieser Locus wird von Restriktionsstellen des methylsensitiven Restriktionsenzyms HhaI flankiert. Methylierte DNA wird aufgrund der Sensitivität des Enzyms gegenüber der Methylgruppe am Cytosin nicht verdaut und kann durch eine PCR amplifiziert werden. Liegt zwischen maternalem und paternalem Allel ein detektierbarer Polymorphismus vor, so kann dieser durch eine hochauflösende Gelelektrophorese oder durch Analyse mittels eines Agilent 2100Bioanalyzers detektiert werden. Besteht eine Zellpopulation aus mehreren Klonen, so würde hier ein Mosaik beider transkriptionell aktiver Allele detektiert werden. Im Falle einer monoklonalen Beschaffenheit kann lediglich eines der beiden Allele amplifiziert werden und in der Gelelektrophorese erschiene ein Signal bzw. Produkt.

Der Verdau der gDNA aus AML BM-MSC Proben weiblicher Patienten (n=39) sowie GS BM-MSC weiblicher Spender (n=10) erfolgte mittels HhaI für 120 min bei 37° C (vgl. Tab. 9) und stets zum Zeitpunkt der Zellernte (p4, vgl. 3.3.1.2).

	Reaktion (1x)	Volumen unverdaute Kontrolle (1x)
Wasser	16,5 µl	16,5 µl
10 x Puffer Tango	2 µ1	2 µ1
Verdau bzw. Kontrolle	0,5 µl HhaI (10 U/ µl)	0,5 μl H <sub>2</sub> O
gDNA (100-500 ng Total)	1 µ1	1 µ1
Gesamtvolumen	20 µl	20 µl

Tab. 9: Verdau von 100-500 ng gDNA durch das methylsensitive Restriktionsenzym HhaI, 120 min bei 37° C.

Im Anschluss erfolgte die Amplifikation des Locus in Exon 1 des AR mit der HhaI-verdauten sowie der unverdauten gDNA als Matrize (vgl. Tab. 10) nach Uchida et al. <sup>193</sup> Die Primer sind in Tab. A2 des Anhangs verzeichnet.

	Reaktion (1x)
Wasser	6 μ1
Hotstart Mastermix (S)	12,5 µl
(Fw) Primer [10 µM]	1,5 µl
(Rv) Primer [10 µM]	1,5 μl
Template	3,5 µl
Gesamtvolumen	25 µl

Tab. 10: Darstellung eines PCR-Reaktionsansatzes zur Amplifikation des polymorphen Locus in Exon 1 des AR

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden anschließend mittels eines Agilent 2100Bioanalyzers nach Herstellerangaben analysiert (DNA 1000 Chip, vgl. 3.2.6). Ein Signal im Elektropherogramm eines PCR-Produkts ausgehend von einer HhaI-verdauten Matrize entsprach einer monoklonalen Beschaffenheit und zweierlei Signale einer polyklonalen Beschaffenheit (vgl. Abb. 8). Der Ensemble Genome Browser gibt für dieses PCR-Produkt das Amplikon einer Größe von 381 bp an (www.Ensemble.org).



Abb. 8: Exemplarische Elektrophorese eines PCR-Produkts nach Amplifikation eines polymorphen Locus in Exon 1 des X-chromosomal codierten humanen androgenen Rezeptors (AR) mittels des Agilent 2100Bioanalyzers. Die Amplifikation nach Verdau mit dem methylsensitiven Restriktionsenzym Hhal bzw. der Wasserkontrolle erlaubte die Diskriminierung der methylierten (transkriptionell inaktiven) und unmethylierten (transkriptionell aktiven) Allele und darausfolgend die Bestimmung der klonalen Beschaffenheit der Ausgangskultur. FU (*fluorescence units*).

Material und Methoden

# 3.3.8 Proteinbiochemische Methoden

#### 3.3.8.1 Herstellung von Zelllysaten

Zur Herstellung von Proteinlysaten aus Zelllinien sowie primären BM-MSC wurden zwischen  $5*10^3$  und  $5*10^6$  Zellen durch Zentrifugation (10000 xg, 2 min, RT) in einem 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß pelletiert und anschließend bei -80° C zwischengelagert oder direkt in 150-300 µl RIPA-Puffer (Proteaseinhibitorzugabe, 1 x Endkonzentration nach Herstellerangaben) resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Durch Schreddern mit der Pipettenspitze wurden die Zellen vollständig lysiert, die Lysate homogenisiert und anschließend zentrifugiert (11000 xg, 30 min, 4° C). Nach der Zentrifugation wurden die Überstände abgenommen und die gewonnenen Proteinlysate bei -80° C gelagert oder direkt durch eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt.

# 3.3.8.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mittels einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Lämmli 195 können Proteine in einer Matrix aus Polyacrylamid (PAA) in Abhängigkeit ihres Molekulargewichts in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden. Natriumdodecylsulfat (SDS) ist ein anionisches Detergenz, wodurch Ladungen eines Proteins vollständig durch eine negative Ladung ersetzt werden. Diese denaturierten, negativ geladenen Moleküle wandern in einem diskontinuierlichen Gel - bestehen aus Sammel- und Trenngel - in Richtung Anode.<sup>187</sup> In der vorliegenden Arbeit wurde das Mini PROTEAN Tetra System verwendet. Proteinproben wurden mit 2 x SDS-Probenpuffer (Zugabe 0,05 % (v/v) β-Mercaptoethanol) in einfacher Endkonzentration versetzt, 10 min bei 95° C denaturiert und gemeinsam mit einem Größenstandard (Spectra<sup>TM</sup>PageRuler) aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte in 1 x SDS-Laufpuffer bei einer Spannung von 100-120 V für ca. 90-120 min. Die Zusammensetzung eines diskontinuierlichen Gels ist in Tab. 11 gezeigt.

Trenngelkomponente	10 %	12 %	Sammelgelkomponente	Volumen
Tris-HCl, pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml	Tris-HCl, pH 6,8	2,5 ml
Acrylamid	2,5 ml	3,0 ml	Acrylamid	1 ml
Wasser	5,0 ml	4,5 ml	Wasser	6,5 ml
APS 10 % (w/v)	75 µl	75 µl	APS 10 % (w/v)	100 µl
TEMED	7.5 µl	7.5 µl	TEMED	20 µ1

Tab. 11: Zusammensetzung eines diskontinuierlichen SDS-GELs

# **3.3.8.3** Transfer von Proteinen auf eine Nitrocellulosemembran (Western Blot)

Zum spezifischen Nachweis von Proteinen mittels Immunodetektion durch Antikörper wurden Proteine durch einen Western Blot, einem Elektrotransferprozess nach Burnette, <sup>196</sup> auf einer Polyvinyldifluorid- (PVDF-) Membran immobilisiert (Wet Blot). Dazu wurden die Proben zuvor über eine SDS-PAGE (vgl. 3.3.8.2) aufgetrennt. Zum Transfer der linearisierten Moleküle fassen je zwei in Transferpuffer getränkte Lagen Whatman Papier das exakt auf der PVDF-Membran positionierte Gel ein. Die PVDF-Membran wurde zuvor 30 s in Methanol aktiviert und anschließend in Transferpuffer äquilibriert. Der Transfer wurde anschließend in einer Blotkammer bei einer Stromstärke von 35 mA über 1,5 h vorgenommen.

Nach dem Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran wurde die Membran drei Waschschritten unterzogen (je 5 min in 1 x TBS-T, RT). Zwecks Reduzieren unspezifischer Bindungen des Antikörpers wurde die Membran anschließend 1 h bei RT in einer Blockierlösung (5 % (w/v) Milchpulver in TBS-T) geschüttelt. Die Membran wurde anschließend mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4° C auf einem Schüttler inkubiert. Sämtliche primäre Antikörper wurden in TBS-T (1 % (w/v) Milchpulver) nach Herstellerangaben verdünnt.

Nach der Inkubation des Erstantikörpers folgten drei Waschschritte (je 5 min, 1 x TBS-T, RT) sowie eine einstündige Inkubation mit einem *horse radish peroxidase* (HRP)-konjugierten Sekundärantikörper. Nach erfolgter Inkubation und drei Waschschritten (je 5 min in 1 x TBS-T, RT) konnte die Visualisierung der Signale durch einen Chemolumineszenzauslesegerät erfolgen.

Eine PVDF-Membran mit immobilisierten Proteinen kann mehrfach mit unterschiedlichen Antikörpern inkubiert werden. Hierzu ist allerdings das Entfernen der zuvor angewendeten primären und sekundären Antikörper notwendig. Hierfür wurden 5 ml des Westernstripping Puffers (vgl. 3.2.6) direkt auf die Membran gegeben und 15 min bei RT geschwenkt. Anschließend wurde die Membran dreimal (je 1 x TBS-T, 5 min. RT) unter Schwenken gewaschen und weiterhin 1 h in einer Blockierlösung (5 % (w/v) Milchpulver in TBS-T) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen (1 x TBS-T, 5 min, RT) konnte die Membran erneut mit einem primären Antikörper inkubiert werden.<sup>187</sup>

# 3.3.9 Zellbiologische Methoden

#### 3.3.9.1 Transfektion von HS-5 Zellen mittels Lipofektion

Eukaryotische Zellen können durch verschiedene Verfahren gentechnisch verändert werden, bspw. durch eine Einbringung fremder DNA (Transfektion) mittels Lipofektion. Hierbei bilden sich aus kationischen Lipiden und den negativ geladenen Nukleinsäuren Liposomkomplexe, welche mit der Zellmembran fusionieren und so die fremde DNA ins Zellinnere bringen. <sup>197</sup> In der vorliegenden Arbeit wurde die Lipofekion von HS-5 Zellen mittels der Reagenz Lipofectamine® 2000 durchgeführt.

Zwecks Generierens stabil-transfizierter Klone wurde für die vorliegende Arbeit die einzusetzende Menge der Plasmid-DNA und der Transfektionsreagenz für die verwendeten Zellkulturplattenformate speziell für die Zelllinie HS-5 titriert, wobei ein Plasmid zur konstitutiven Expression von GFP (pMAX) verwendet wurde. Anschließend wurden die GFPpositiven Zellpopulationen mittels Durchflusszytometrie quantifiziert und diejenigen Konditionen gewählt, die die beste Transfektionseffizienz von > 80 % GFP<sup>+</sup> Zellen aufzeigten (Daten nicht gezeigt). Demnach wurde für die Transfektion von HS-5 Zellen in 6-Well Platten 2,5 µg Plasmid-DNA und 10 µl Lipofectamine® 2000 je Well eingesetzt.

HS-5 Zellen wurden am Tag vor einer Transfektion in 6-Well Platten in RPMI mit  $5*10^5$  Zellen/Well in RPMI-Medium ausgesäht. Am Tag der Transfektion lagen die Zellen adhärent und mit einer Konfluenz von 70-80 % vor. Plasmid-DNA sowie Lipofectamine® 2000 wurden in je 100 µl Opti-MEM verdünnt und zum Lösen 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze in einem Verhältnis von 1:1 (v/v) vereint und zur Liposomenkomplexausbildung

20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Komplexe im Verhältnis 1:10 (v/v) je Well zugegeben. Die Ansätze wurden unter Schwenken homogenisiert und Zellen und Liposomen und anschließend 6 h bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert, wonach ein Medienwechsel zu Vollmedium (RPMI mit 10 % (v/v) FCS, 1 x Antibiotic/Antimycotic) erfolgte.

#### 3.3.9.2 Herstellung von stabil-transfizierten HS-5 Kulturen

Durch Transfektion mit Plasmiden, die eine Antibiotikaresistenz eines eukaryotischen Selektionsmarkers enthalten, können stabil-transfizierte Zelllinien generiert werden. Hierbei erfolgt eine Integration der fremd eingebrachten Plasmid-DNA in das Genom der transfizierten Zellen. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Konstrukte beeinhalten das Resistenzgen für Hygromycin B (*hyg*) und verleihen eine Resistenz gegen dieses Aminoglycosid Antibiotikum. Zuvor wurden HS-5 Zellen in einer Dosiskurve hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber Hygromycin B untersucht. Eine Konzentration von 100  $\mu$ g/ml Hygromycin B im Kulturmedium war für die Selektion stabil-transfizierter HS-5 Zellen ausreichend (persönliche Information, Dr. Liliana Mochmann)

Die stabil pCMV-LUM (HG-11640-UT, vgl. 3.2.4, bzw. Anhang Abb. A1) transfizierten HS-5 Zellen wurden durch eine Selektion mit 100 µg/ml Hygromycin B generiert. Hierfür wurden HS-5 Zellen (p < 5), wie in 3.3.9.1 beschrieben, in 6-Well Zellkulturplatten zu je vier Replikaten transfiziert und 48 h mit Vollmedium (RPMI mit 20 % (v/v) FCS, 1 x Antibiotic/Antimycotic) bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend begann die Selektion mittels des Selektivmediums (RPMI mit 20 % (v/v) FCS, 1 x Antibiotic/Antimycotic, 100 µg/ml Hygromycin B). Stets erfolgten hierbei Kontrollen nicht-transfizierter HS-5 Zellen. Nach der Selektion von nicht-transfizierten und transient-transfizierten HS-5 Zellen bildeten sich nach einer Inkubationszeit von 10-21 Tagen eine oder mehrere Zellkolonien. Diese Zellen wurden im Folgenden vereinzelt und mit einer Konzentration von 1,5 Zellen je Well in 96-Well Zellkulturplatten in Selektivmedium ausgesäht. Nach Erreichen einer Konfluenz von ca. 80 % wurden die gewonnen HS-5 Kulturen in größere Zellkulturplattenformate expandiert und entweder in Flüssigstickstoff eingefroren (vgl. 3.3.1.4) oder direkt für weitere Experimente eingesetzt.

Aus der Vereinzelung stabil-transfizierter Zellkolonien entstanden hieraus in zwei unabhängigen Transfektionen sechs (pLUM 1 - pLUM 6) bzw. sieben (pLUM 7 – pLUM 13)

stabil pCMV-LUM-transfizierte HS-5 Kulturen. Diese pLUM-Ansätze wurden in adhärenter Zellkultur bis zum Erreichen einer für die Experimente ausreichenden Zellzahl in Selektivmedium kultiviert. Die Leervektorkontrollen der stabil pCMV-Leervektor-transfizierten klonalen HS-5 Kulturen (pLeer 6.3, pLeer 6.4, pLeer 6.5, pLeer 6.6) lagen bereits vor (Bereitstellung durch Dr. Liliana Mochmann).

Zur Bestimmung der *LUM*-Expression wurde total-RNA mittels des RNeasy Kits isoliert und der Schritt des DNAse Verdaus nach Herstellerangaben durchgeführt.

# 3.3.9.3 (si) RNA Knock-down in HS-5 Zellen

Zwecks einer spezifischen Interferenz des Targetgens *PLEC* wurden HS-5 Zellen mit einer *PLEC small-interfering* (si) RNA transfiziert (*PLEC* RNA*interference*; *PLEC* RNAi). Dieser siRNA *knock-down* erfolgte durch reverse Transfektion der Zellen in Suspension ohne vorheriges Aussähen mittels der Transfektionsreagenz HiPerfect (Lipofektion, s.o.). Die Transfektion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 1 ml. Die *PLEC* siRNA wurde in einer 20 nM-Endkonzentration eingesetzt. Ein exemplarischer Reaktionsansatz ist in Tab. 12 gezeigt.

Tab. 12: Exemplarischer Ansatz einer Transfektion von HS-5 Zellen mit siRNA mittels HiPerfect in einem Gesamtvolumen von 1 ml.

	Ansatz für 1 ml Gesamtvolumen
Serumfreies Medium	100 µ1
HiPerfect Transfektionsreagenz	6 µl
siRNA [20 µM]	1 μl

Serumfreies RPMI-Medium, HiPerfect und siRNA wurden gemischt und in die Zellkulturplatte (12-Well) gegeben. Nach einer Inkubation von 10 min bei RT wurde 1 ml einer Zellsuspension  $(1*10^5 \text{ Zellen je ml})$  zu dem Reaktionsansatz gegeben und 6 h bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Bei Transfektion in einer 96-Well Zellkulturplatte (WST-1 Proliferationsassay) wurden je 8,8 µl der gemischten Transfektionsreagenz je Well zu sechs Replikaten aliquotiert. Nach einer Inkubation von 10 min bei RT wurden je Well 100 µl einer Zellsuspension (1\*10<sup>5</sup> Zellen je ml) zugegeben und ebenfalls 6 h bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Stets wurden bei allen Transfektionen Kontrollansätze mit einer AllStars Hs Cell Death Control siRNA

(Positivkontrolle, apoptoseinduzierend) bzw. einer AllStars Negative Control siRNA (Negativkontrolle, *scrambled* siRNA) mitgeführt. Da in diesem Zeitraum keine vollständige Adhärenz der HS-5 Zelllinie sichergestellt werden konnte, erfolgte ein Abbruch der Transfektion durch Zugabe von 10 % (v/v) FCS und 1 x Antibiotic/Antimycotic (finale Konzentration). Nach einer Inkubation über Nacht wurde der Überstand aspiriert und Vollmedium (RPMI mit 20 % (v/v) FCS und 1 x Antibiotic/Antimycotic) zugegeben.

Zu den Zeitpunkten von 48 h bzw. 72 h nach erfolgter Transfektion wurde die Effizienz der *PLEC* RNAi überprüft und die Reduktion der detektierbaren *PLEC*-Transkripte durch qRT-PCR (vgl. 3.3.7.4) bzw. eine Reduktion des Plectin-Proteins auf Proteinebene durch einen Western Blot (vgl. 3.3.8.3) und einen Anti-Plectin Antikörper überprüft.

Für das kalorimetrische Proliferationsassay mittels WST-1 nach *PLEC* RNAi wurden HS-5 Zellen mit entsprechenden Kontrollen in einer 96-Well Zellkulturplatte wie in oben beschrieben transfiziert. Am Folgetag erfolgte ein Mediumwechsel zu Vollmedium (RPMI mit 20 % (v/v) FCS und 1 x Antibiotic/Antimycotic) und 48 h nach erfolgter Transfektion das WST-1 Proliferationsassay (vgl. 3.3.9.4).

#### 3.3.9.4 Untersuchung der Proliferation von HS-5 Zellen

#### Kalorimetrisches WST-1 Proliferationsassay

Die Spaltung des Tetrazoliumsalzes WST-1 zu Formazan ist von mitochondrialen Dehydrogenasen abhängig. Die Bildung von Formazan ist photometrisch detektierbar und das Signal korreliert mit der Anzahl vitaler und metabolisch aktiver Zellen in einer zu untersuchenden Kultur (Quelle: Cell Proliferation Reagent WST-1 Datenblatt, Roche). Hierfür wurde die Substanz WST-1 in einem Verhältnis von 1:1 (v/v) mit RPMI-Medium (20 % FCS, 1 x Antibiotic/Antimycotic) versetzt und 20 µl dieser Mischung je Well zu den Ansätzen in einer 96-Well Zellkulturplatte gegeben. Die Zellkulturplatte wurde 2 h bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert und anschließend mittels eines ELISA Auslesegerätes ausgelesen (Absorption 450 nm, Referenzwellenlänge 620 nm). Die Viabilität bzw. Proliferation der Zellen wurde anhand des erhaltenen Signals und internen Kontrollen bestimmt.

Für pLUM 1 – pLUM 6 sowie entsprechende Leervektorkontrollen wurden  $10^4$  HS-5 Zellen je Well in einer 96-Well Zellkulturplatte zu je sechs Replikaten in RPMI-Medium (20 % FCS, 1 x

Antibiotic/Antimycotic, 100 µg/ml Hygromycin B) ausgesäht und die Absorption (450 nm, Referenzwellenlänge 620 nm) wie oben beschrieben an vier Zeitpunkten gemessen: Der erste Zeitpunkt der Messung erfolgte drei Stunden nach dem Aussähen der Zellen, wobei die HS-5 Zellen hier noch keine vollständige Adhärenz zeigten (mikroskopische Kontrolle, Daten nicht gezeigt). Weiterhin wurde im Zeitverlauf nach 24 h, 48 h und 72 h nach initialem Aussähen das WST-1 Proliferationsassay wie oben beschrieben durchgeführt.

Für die weiteren pLUM 7 – pLUM 13 Ansätze und entsprechende Kontrollen wurden mit einer niedrigeren Zellzahl von  $4*10^3$  Zellen je Well initiiert und das Experiment wie oben beschrieben über einen Zeitraum über 72 h durchgeführt.

#### Bestimmung der Gesamtzellzahl

Zwecks Bestimmung der Gesamtzellzahl wurden die Kulturen pLUM 1 – pLUM 6 zu je  $10^5$ Zellen je Well in einer 24-Well Zellkulturplatte in Duplikaten in RPMI-Medium (20 % FCS, 1 x Antibiotic/Antimycotic, 100 µg/ml Hygromycin B) ausgesäht. Im Folgenden wurde im Zeitverlauf nach je 24 h, 48 h und 72 h nach initialem Aussähen die gesamte Zellfraktion je Well gewonnen (Accutase Detachment Medium, 15 min, 37° C und 5 % CO<sub>2</sub>) und die Gesamtzellzahl mittels Trypanblaufärbung (1:1 (v/v)) und einer Neubauer Zählkammer bestimmt.

Mit den Kulturen pLUM 7 - pLUM 13 und entsprechenden Kontrollen wurden äquivalent verfahren, jedoch wurde initial eine geringere Zellzahl von 2 x  $10^4$  Zellen je Well in einer 24-Well Zellkulturplatte ausgesäht.

Für die beschriebenen Untersuchungen der pLUM 1 – pLUM 6 bzw. pLUM 7 – pLUM 13 Kulturen erfolgte das WST-1 Proliferationsassay und Bestimmung der Gesamtzellzahl stets parallel und ausgehend von derselben Zellsuspension.

#### 3.3.9.5 Detektion von apopotischen Zellen durch Annexin V

Der programmierte Zelltod (Apoptose) ist ein Prozess zur Eliminierung von Zellen, initiiert bspw. nach einer Schädigung der DNA oder in Entwicklungsprozessen. Ein Merkmal im frühen Prozess der Apoptose ist die Translokation von Membran Phosphoidylserinen (PS) vom Zellinneren an die Zelloberfläche. Annexin V ist ein Ca2+ abhängiges Molekül mit hoher Affinität zu PS (Quelle: Annexin V-FITC Datenblatt, BD). In der vorliegenden Arbeit wurde ein Annexin V–FITC Direktkonjugat sowie eine 7-AAD-Lösung zur Detektion von apoptotischen und nekrotischen Zellen mittels Durchflusszytometrie verwendet.

Hierzu wurden  $5*10^3 - 10^5$  Zellen in ein 5 ml Eppendorf-Gefäß gegeben und mit 2 ml kaltem 1 x PBS gewaschen. Der Ansatz wurde zentrifugiert (300 xg, 5 min, 4° C) und der Überstand dekantiert. Anschließend wurden 100 µl eines 1 x Annexin-*binding* Puffer sowie anschließend 2 µl Annexin V-FITC je Ansatz zugegeben. Nach einer Inkubation von 15 min bei 4° C erfolgte die Zugabe von 400 µl des 1 x Annexin-*binding* Puffers sowie 2 µl einer 7-AAD-Lösung. Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte umgehend nach der Färbung in FL1 und FL3. Gegebenenfalls erfolgte eine Kofärbung mit CD73-APC (1:50 (v/v)) gemeinsam mit Annexin V-FITC.

# 3.3.9.6 Untersuchung der Adhäsion von KG-1a und K-562 Zellen an HS-5 Zellen in einer Kokultur mittels des VYBRANT Adhäsionsassays

Um die Adhäsion hämatopoetischer Zellen an stabil pCMV-LUM-transfizierte HS-5 Zellen (pLUM 7 – pLUM 13, vgl. 3.3.9.2) zu untersuchen, wurde ein fluoreszenzbasiertes Adhäsionsassay (VYBRANT<sup>TM</sup> Cell Adhesion Assay Kit, vgl. 3.2.6) durchgeführt.

Hierzu wurden  $10^4$  HS-5 Zellen je Well zu je drei Replikaten in eine 96-Well Zellkulturplatte (Nunc<sup>TM</sup> MicroWell<sup>TM</sup> 96 Well) in RPMI-Medium (20 % FCS, 1 x Antibiotic/Antimycotic) ausgesäht (pLUM mit mindenstens zweifacher *LUM*-Überexpression: n=3; Leervektor-kontrollen: n=4). Am Folgetag wurden KG-1a und K-562 Zellen mittels eines VYBRANT Farbstoffs (Calcein-basiert, 5 µM finale Konzentration) gefärbt und anschließend 5\*10<sup>5</sup> Zellen je Well in serumfreien RPMI-Medium zugegeben. Der Ansatz wurde über Nacht bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Am Folgetag wurden die Zellkulturplatten einem Protokoll aus Waschschritten und Invertierung unterzogen und hierbei die Angaben des Herstellers befolgt. Das anschließend gemessene Fluoreszenzsignal korreliert direkt mit der Anzahl verbliebener und adhärierender Zellen.

Für das Assay wurden die folgenden Einstellungen für die Messung der Fluoreszenz unter Endpunktbestimmung gewählt: Exitation 485 nm und Emission 538 nm.

Material und Methoden

Zur Datenprozessierung erfolgte zunächst die Bestimmung relativer Fluoreszenzsignale zu ungefärbten Kontrollen:

#### (Mittelwert der Fluoreszenzsignale (Test) / Mittelwert der Fluoreszenzsignale (ungefärbte Kontrollen)

Der Anteil adhärierender Zellen wurde anschließend prozentual zum Mittelwert der Fluoreszenzsignale der zugegebenen Zellen berechnet. Die Zellviabilität der kokultivierten Zellen der Zellsuspension wurde mittels der SYTOX-Reagenz des Kits bestimmt. Hierzu wurden in einer separaten Kontrollplatte KG-1a und K-562 Zellen in Triplikaten zu je  $5*10^5$  Zellen je Well ausgesäht und 5 min mit SYTOX (1 µM finale Konzentration) bei RT gefärbt. Ein weiteres Triplikat je Zelllinie wurde für 30 min mit 70 % Methanol behandelt und äquivalent gefärbt. Die Fluoreszenz wurde bestimmt (Exitation 485 nm und Emission 538 nm). Unter der Voraussetzung, dass die methanolbehandelten Zellen zu 100 % nicht mehr vital waren, konnte im Folgenden die Viabilität der Zellen prozentual bestimmt werden.

# 3.3.9.7 Kokultur von KG-1a und K-562 Zellen mit AML BM-MSC unter Wirkstoffbehandlung mit 5-Azazytidin

Zur Überprüfung eines protektiven Effekts der AML BM-MSC auf leukämische Zelllinien unter Wirkstoffbehandlung wurde ein Kokulturansatz mit primären AML BM-MSC und den Zelllinien KG-1a (n=7) und K-562 (n=4) durchgeführt. Dabei wurde nach dem in Abb. 9 verzeichneten experimentellen Aufbau vorgegangen. AML BM-MSC wurden unter Verdopplung der zur Verfügung stehenden Plastikoberfläche in Zellkulturplatten (24-Well Format) in RPMI-Medium (20 % (v/v) FCS, 1 x Antibiotic/Antimycotic) ausgesäht. Am Folgetag wurden  $2*10^5$  Zellen je Well KG-1a bzw. K-562 Zellen im gleichen Kulturmedium zugegeben. Dem folgte über zwei Tage jeweils die Behandlung mit 5-Azazytidin (0,1-10  $\mu$ M Endkonzentration) in Duplikaten. Stets wurden nicht-kokultivierte sowie nicht-behandelte Kontrollen mitgeführt (vgl. Abb. 9). Am fünften Tag des Experiments wurde die gesamte Zellpopulation mittels Accutase Detachment Medium gewonnen (Inkubation 15 min 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>) und weiterhin mit Annexin V-FITC und zusätzlich, zur Identifizierung der AML BM-MSC, CD73-APC gefärbt. Hierbei wurde wie in 3.3.9.5 beschrieben vorgegangen. Die Ansätze wurden anschließend in FL1 bzw. FL4 des Durchflusszytometers analysiert.

#### Material und Methoden



Ratio aus apoptotischen Annexin V<sup>+</sup> CD73<sup>-</sup> Zellen:

#### Kokultur/Monokultur

- > 1 keine Protektion in Kokultur
- = 1 kein Effekt
- < 1 Protektion in Kokultur

Abb. 9: Experimenteller Aufbau einer Kokultur von primären AML BM-MSC und KG-1a und K-562 Zellen unter 5-Azazytidinbehandlung. Das Experiment verlief über einen Zeitraum von fünf Tagen. Nachdem KG-1a und K-562 Zellen über 24 h mit AML BM-MSC kokultiviert wurden, wurden die Kokulturansätze über weitere 48 h mit 5-Azazytidin behandelt und im Folgenden Annexin V-FITC gefärbt. Zwecks Ausschluss der AML BM-MSC Population erfolgte eine CD73-APC Kofärbung. Details des experimentellen Aufbaus sind dem Fließtext zu entnehmen. Der Bestimmung der apoptotischen Zellen mittels Durchflusszytometrie erfolgte die Berechnung der Ratio Annexin V<sup>+</sup>, CD73<sup>-</sup> (Kokultur) / Annexin V<sup>+</sup>, CD73<sup>-</sup> (Monokultur)

# 4. Ergebnisse

# 4.1 Die Gewinnung und Charakterisierung primärer BM-MSC von AML-Patienten und gesunden Spendern

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden AML BM-MSC (n=354) und GS BM-MSC Proben (n=25) gewonnen und untersucht: AML BM-MSC Subkohorten zeigten zahlreiche molekulare Alterationen auf genetischer, epigenetischer und transkriptioneller Ebene. Im Folgenden soll zunächst auf das Expansionspotential sowie den Immunophänotyp der AML BM-MSC Kulturen eingangen werden. Bezüglich ihres Expansionspotentials zeigten AML BM-MSC zu verschiedenen Zeitpunkten des Krankheitsverlaufs äquivalente Zeitintervalle der frühen Passagen.

#### 4.1.1 Das Expansionspotential der AML BM-MSC im Vergleich zu GS BM-MSC

Hinsichtlich der Expansionszeitintervalle der AML BM-MSC Kulturen (n=233, vgl. 3.3.1.2) lagen im Vergleich der einzelnen Zeitpunkte des Krankheitsverlaufs (ED, REM, REZ sowie REF) keine signifikanten Unterschiede vor (vgl. Abb. 10). Jedoch zeigten AML BM-MSC, verglichen mit GS BM-MSC (n=15), ein tendenziell längeres Zeitintervall zwischen initialem Aussähen und Beginn der Passagierung (p0, Abb. 10 a). So waren AML BM-MSC generiert zum Zeitpunkt der ED im Mittel 11 Tage (Spanne 5-21 Tage, n=88) und AML BM-MSC von refraktären Patienten im Mittel 12 Tage (Spanne 8-17 Tage, n=14) bis zum Beginn der Passagierung in Kultur. Dieses p0-Zeitintervall war bei GS BM-MSC Kulturen kürzer (Mittelwert 10 Tage, Spanne 8-13 Tage, n=15, nicht signifikant nach 1-way ANOVA Multitestkorrektur, vgl. Abb. 10 a). Mit fortschreitender Passagierung lagen äquivalente Proliferationsgeschwindigkeiten der Gesamtpopulationen der AML BM-MSC und keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zeitintervallen vor; weder im Vergleich zwischen den einzelnen Zeitpunkten des Krankheitsverlaufs noch im Kontrast zu GS BM-MSC (vgl. Abb. 10 b-d). Aus den 233 AML BM-MSC Kulturen wurden 41 Kulturen vor Erreichen der p4 seneszent (mikroskopische Kontrolle, nicht gezeigt). Aus diesen seneszenten AML BM-MSC Kulturen stammten 21 Kulturen aus Knochenmarkaspiraten zum Zeitpunkt der ED. Die übrigen Kulturen wurden aus Knochenmarkaspiraten von Patienten im Krankheitsverlauf bzw. refraktären Patienten generiert (REM: n=13; REZ: n=5; REF: n=2).

Keine der GS BM-MSC Kulturen wurde vor Erreichen der p4 seneszent. Die durchschnittliche Expansionszeit der nicht-seneszenten AML BM-MSC bis p4 betrug 25 Tage (Spanne 14-56 Tage, n=192) und für GS BM-MSC 24 Tage (Spanne 15-39 Tage, n=15, vgl. Abb. 10 d).



Abb. 10: Passagierungszeitintervalle der *in vitro*-Expansion (AML BM-MSC: n=233, GS BM-MSC: n=15). Gezeigt sind die Expansionszeiträume der AML BM-MSC Kulturen generiert zu verschiedenen Zeitpunkten des Krankheitsverlaufs (ED/REM/REZ) sowie von refraktären Patienten (REF). Aus diesen 233 Kulturen waren 41 Kulturen vor Erreichen der vierten Passage (p) seneszent (mikroskopische Kontrolle, nicht gezeigt); 21 dieser 41 seneszenten AML BM-MSC Kulturen stammten vom Zeitpunkt der ED. a) AML BM-MSC zeigten zu allen dargestellten Zeitpunkten des Krankheitsverlaufs einen Trend zu einem längeren a) Zeitintervall der initialen Adhärenz bis zum Beginn der Passagierung ( $p0 \rightarrow p1$  Zeitintervall, nicht signifikant nach Multitestkorrektur (*1-way* ANOVA)). Mit fortschreitender Expansion (b-d) zeigten AML BM-MSC höhere Varianzen, im Mittel jedoch äquivalente Zeitintervalle und Proliferationsgeschwindigkeiten verglichen mit GS BM-MSC.

# 4.1.2 Der Immunophänotyp der frühen Passagen der in vitro-kultivierten BM-MSC

Wie in 1.3 beschrieben, exprimieren *in vitro*-kultivierte BM-MSC die Marker CD73 und CD105 (> 95 %) und sind negativ für hämatopoetische Marker wie CD33 und CD45 (< 5 %). Darüber hinaus ist CD271 (*nerve growth factor receptor, NGFR*) als Marker für unreife MSC beschrieben (vgl. dazu 4.1.3 bzw. 5.1). Die Immunophänotypisierung der frühen Passagen der AML BM-MSC ergab, dass ab p4 reine BM-MSC Populationen mit > 95 % CD73<sup>+</sup> CD105<sup>+</sup> Zellen vorlagen (vgl. Abb. 11).







c)

d)



Abb. 11: Immunophänotyp der frühen Passagen in vitro-expandierter AML BM-MSC (CD33-CD45-CD73+ CD105+ CD271+/-/niedrig). Gezeigt sind AML die prozentual positiven **BM-MSC** Populationen für jedes Antigen mit Mittelwerten. a) Zum Zeitpunkt der initialen Adhärenz der Zellen und Beginn der Passagierung waren CD45<sup>+</sup> und CD33<sup>+</sup> hämatopoetische Zellen präsent, mit fortschreitender in vitro-Expansion (p1 bis p3, b-d) gingen diese CD45<sup>+</sup> und CD33<sup>+</sup> Zellen verloren. e) In p4 lagen reine BM-MSC Populationen vor (> 95 % CD73<sup>+</sup> CD105<sup>+</sup>). In 18 % bzw. 12 % der untersuchten Proben waren CD33+ bzw. CD45+ Zellen mit makrophagenartiger Morphologie präsent (mikroskopische Kontrolle, nicht gezeigt). Die CD271<sup>+</sup> Population zeigte eine ausgeprägte Varianz (Mittelwert 8 %, Spanne 0-81 %)

Zum Zeitpunkt der p4 waren in 18 % bzw. 12 % der Proben > 5 % CD33<sup>+</sup> bzw. CD45<sup>+</sup> hämatopoetische Zellen präsent. Hierbei handelte es sich überwiegend um Kulturen, die einen hohen Anteil plastikadhärenter Zellen mit makrophagenartiger Morphologie enthielten (mikroskopische Kontrolle, nicht gezeigt). In den AML BM-MSC Kulturen waren die Subpopulation der CD271<sup>+</sup> Zellen hochvariabel (Mittelwert 8 %, Spanne 0-81 % der Gesamtpopulation, vgl. Abb. 11 e).

Darüber hinaus wurden frühe Passagen der GS BM-MSC charakterisiert (vgl. Abb. 12). Bei GS BM-MSC waren bereits ab p3 der *in vitro*-Expansion reine BM-MSC Populationen vorhanden (> 95 % CD73<sup>+</sup> CD105<sup>+</sup>). Der Anteil der CD271<sup>+</sup> Zellen lag zudem bereits in p3 bei < 10 % der Gesamtpopulation (vgl. Abb. 12 d).



a)





b)



d)








Ergebnisse

# 4.1.3 Die Expression der MSC-Marker CD271 (NGFR) und Nestin (NES) in AML BM-MSC

Durchflusszytometrische Untersuchungen früher Passagen der AML BM-MSC zeigten eine ausgeprägte Varianz der CD271<sup>+</sup> Populationen (vgl. 4.1.2). In Abb. 13 a ist die Verteilung dieser CD271<sup>+</sup> Subpopulationen nach den Stati der Patienten im Krankheitsverlauf dargestellt, wobei keine signifikanten Unterschiede vorlagen. In der Kontrollkohorte der GS BM-MSC (n=5) lag in einer der fünf GS BM-MSC Proben der prozentuale Anteil der CD271<sup>+</sup> Zellen bei > 5 % (vgl. Abb. 13 a).

In einer AML BM-MSC Kohorte (ED, n=66) war in 41 % der untersuchten Proben *NGFR*, verglichen mit einer Kontrollkohorte (GS BM-MSC, n=14), zweifach höher exprimiert (vgl. Abb. 13 b). Die *NGFR*-Expression der AML BM-MSC korrelierte mit keinem klinischen Parameter (Daten nicht gezeigt).

Weiterhin exprimierten 37 % einer AML BM-MSC Kohorte (n=54) den MSC-Marker *NES*, einen Marker für perivaskuläre MSC (vgl. 1.3), zweifach höher gegenüber GS BM-MSC (n=7, Abb. 13 c). Die *NES*-Expression korrelierte weder mit klinischen Parametern noch mit der *NGFR*-Expression (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend wurden beide MSC-Marker, *NGFR* sowie *NES*, von AML und GS BM-MSC exprimiert, wobei anteilig in AML BM-MSC höhere Expressionslevel vorlagen.





NES in AML BM-MSC

c)

Abb. 13 : Expression der MSC-Marker CD271 (NGFR) und Nestin (NES) in AML BM-MSC. a) In AML BM-MSC und GS BM-MSC (GS) lagen hochvariable Proportionen von CD271<sup>+</sup> Subpopulationen vor (Mittelwerte für jeden Status des Krankheitsverlaufs und GS). b) Auf mRNA-Ebene exprimierten 41 % einer AML BM-MSC Kohorte (ED, n=66) NGFR zweifach höher gegenüber einer Kontrollkohorte (GS BM-MSC, n=14). c) 37 % einer AML BM-MSC Kohorte (ED, n=54) überexprimierten den MSC-Marker Nestin (NES) zweifach gegenüber GS BM-MSC (n=7). Die NGFR-Expression korrelierte nicht mit der NES-Expression (Daten nicht gezeigt).

## 4.1.4 Die in vitro-Differenzierung von BM-MSC in Osteozyten und Adipozyten

Zum Nachweis eines multipotenten Differenzierungspotentials wurden AML BM-MSC (n=5) und GS BM-MSC (n=3) *in vitro* in osteozytäre und adipozytäre Linien differenziert. In Abb. 14 sind exemplarisch jeweils eine differenzierte AML BM-MSC sowie eine GS BM-MSC Kultur gezeigt. Osteozytär-differenzierte BM-MSC zeigten deutliche Kalzifizierungen, während die adipozytär-differenzierten BM-MSC Lipidtröpfchen gebildet hatten. In der Kohorte der AML BM-MSC (n=5) war die osteozytäre Differenzierung zumeist stärker ausgeprägt als die adipozytäre Differenzierung.



GS

Abb. 14: Exemplarische Ansätze für eine in vitro-Differenzierung von AML BM-MSC (AML) und GS BM-MSC (GS, 10 x Vergrößerung). Abschnitt a) zeigt eine Differenzierung in Osteozyten mit Nachweis von Kalzifizierungen (rot) im Vergleich zu Negativkontrollen. Abschnitt b) zeigt eine Differenzierung in Adipozyten und Bildung von Lipidtröpfchen (rot). Die adipozytäre Differenzierung war in GS BM-MSC stärker ausgeprägt als in AML BM-MSC.

## 4.1.5 Die Klonalität in vitro-expandierter BM-MSC Kulturen

Aus den untersuchten AML BM-MSC sowie GS BM-MSC Kulturen wurden aufgrund eines nicht-vorhandenen oder nicht-detektierbaren Polymorphismus im Exon 1 des humanen androgenen Rezeptors 13 Proben ausgeschlossen (11/39 AML BM-MSC und 2/10 GS BM-MSC Proben, vgl. Abb. 15 a).

AML BM-MSC Kulturen (ED, n=19) waren zu 43 % monoklonaler und zu 53 % polyklonaler Beschaffenheit. AML BM-MSC Kulturen (REM) waren zu 78 % monoklonal, demgegenüber zeigten deutlich mehr GS BM-MSC Kulturen (88 %) eine polyklonale Beschaffenheit (vgl. Abb. 15 b, *corrected* \*p-Wert 0,05, Fisher`s exact Test).



Abb. 15: Die klonalen Beschaffenheit der AML BM-MSC bzw. GS BM-MSC Kulturen. a) Für 11 aus 39 AML BM-MSC sowie zwei aus 10 GS BM-MSC war kein Polymorphismus im ersten Exon des humanen androgenen Rezeptors detektierbar. b) In den übrigen Kulturen lag der Anteil monoklonaler Beschaffenheit der AML BM-MSC Kulturen generiert zum Zeitpunkt der ED (n=19) bei 47 %, polyklonal waren hingegen 53 % dieser Kulturen. BM-MSC generiert zum Zeitpunkt der REM (n=9) zeigten zu 78 % eine monoklonale Beschaffenheit, demgegenüber waren GS BM-MSC (n=8) zu 88 % polyklonaler Beschaffenheit (Multitest-*corrected* \*p-Wert 0,05, Fisher`s exact Test).

Gepaarte AML BM-MSC Proben (ED/REM, n=8) zeigten in drei aus acht Fällen den gleichen Status der Klonalität. Hingegen lagen in vier aus acht Fällen dieser AML BM-MSC Kulturen bei ED polyklonale Kulturen und fortfolgend während der REM monoklonale Kulturen vor (vgl. Tab. 13).

Klonalität (ED/REM)	Anzahl (n=8)
monoklonal/monoklonal	n=2
polyklonal/polyklonal	n=1
monoklonal/polyklonal	n=1
polyklonal/monoklonal	n=4

Tab. 13 : Bestimmung der Klonalität gepaarter AML BM-MSC Proben (ED/REM) durch das HUMARA Assay.

# 4.2 Molekulare Alterationen in AML BM-MSC

Die Profilerstellung molekularer Alterationen auf genetischer, epigenetischer und transkriptioneller Ebene brachte zahlreiche Aberrationen der AML-Mikroumgebung zutage. Zunächst soll die Gesamtexomsequenzierung der AML BM-MSC dargelegt werden. Sämtliche Mutationen sind im Anhang (Tab. DiskE2) gelistet.

#### 4.2.1 Genetische Alterationen in AML BM-MSC

Im Rahmen des WES wurden durchschnittlich  $8,3*10^7$  *reads* je Probe generiert. Es wurden im Mittel 98,4 % der Zielsequenzen abgedeckt und für 95,1 % der Zielsequenzen eine mindestens zehnfache Sequenzabdeckung erreicht. Die durchschnittliche Sequenzabdeckung lag in Zielsequenzen bei 106 *reads* je Basenpaar. Es konnten 93 % der untersuchten Alterationen per Sanger-Sequenzierung validiert werden (n=28, Daten nicht gezeigt).

Die AML BM-MSC, generiert im Krankheitsverlauf (AML 1 - AML 5, vgl. Tab. 4, S. 22), zeigten ein unspezifisches Muster genetischer Alterationen. In dieser Patientenkohorte wurden insgesamt 133 genetische Variationen identifiziert. In einer der Verlaufsproben (AML 2, REM) wurden keine Mutationen detektiert. In den übrigen Proben wurden Alterationen identifiziert. In zwei aus fünf Fällen dieser Patientenkohorte waren in AML BM-MSC Spleißstellen- bzw.

dbSNP-annotierte Mutationen vorhanden, jedoch keine weiteren Alterationen in codierenden Sequenzen. Die numerische Verteilung der identifizierten Alterationen ist in Tab. 14 bzw. in Abb. 16 (S. 73) dargestellt. Drei der AML BM-MSC Proben (AML 1: ED; AML 2: REM; AML 3: ED) zeigten gegenüber den übrigen Verlaufsproben höhere Mutationsraten (> 20 Variationen). Insgesamt unterschieden sich die Mediane der Anzahl detektierter Mutationen je untersuchter Probe nicht signifikant voneinander (vgl. Tab. 14)

Tab. 14: Zusammenfassung der Anzahl genetischer Alterationen (inkl. dbSNP-annotierte und Spleißstellenmutationen) in AML BM-MSC. Gezeigt sind zwei unterschiedliche Kohorten i) AML 1 - AML 5, welche zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten des Krankheitsverlaufs analysiert wurden und ii) eine erweiterte Patientenkohorte mit unterschiedlichem Ansprechen auf die initiale Chemotherapie. Weiterhin wurden GS BM-MSC exomsequenziert.

Kohorte	Status bei Exomsequenzierung	Anzahl der Variationen (Median (Spanne))
AML BM-MSC	ED (n=5)	4 (2-35)
AML 1 – AML 5	REM (n=4)	4 (0-32)
	REZ (n=5)	4 (1-7)
Erweiterte AML BM-MSC Kohorte	ED, refraktärer Verlauf, AML 6 - AML 14	5 (2-77)
AML 6 – AML 21	ED, gutes Ansprechen auf Chemotherapie, AML 15 – AML 21	6 (1-24)
GS BM-MSC	n=3	0 (0-4)

Die Untersuchung einer erweiterten Kohorte (AML 6 – AML 21, vgl. Tab. 4. S. 22) ergab ebenfalls ein unspezifisches Muster genetischer Alterationen. Innerhalb dieser Kohorte wurden in sämtlichen AML BM-MSC Proben Mutationen identifiziert (s. u., Abb. 16).

Innerhalb der refraktären Patientenkohorte zeigte AML 8 mit 77 Alterationen die höchste Anzahl detektierter Mutationen, hier waren 70 dieser 77 Mutationen dbSNP-annotiert (vgl. Anhang Tab. DiskE2) und vermehrt in Chromosom 11- bzw. Chromosom 12- codierten Genen präsent. Der Median der Anzahl genetischer Alterationen je untersuchter Probe der refraktären AML-Patientenkohorte lag bei fünf Variationen mit einer Spanne von 2-77 Mutationen je Probe. In der Patientenkohorte mit Erreichen der REM lag der Median bei sechs Variationen pro untersuchter Probe, die Variabilität der gefundenen Anzahl je Probe betrug hier 1-24 Alterationen (vgl. Tab. 14). Die identifizierten Mutationen umfassten SNVs sowie Indels, Mutationen mit putativem Funktionsverlust (*Loss*) oder -steigerung (*Gain*) des Genprodukts sowie Spleißstellenvariationen (vgl. Abb. 16).



Anzahl der genetischen Alterationen

**Abb. 16: Darstellung der Anzahl genetischer Alterationen je Probe für AML BM-MSC und GS BM-MSC.** Gezeigt sind SNVs ohne Aminosäurenaustausch (still) sowie proteinalterierende Variationen. Diese Darstellung umfasst zusätzlich db-SNP-annotierte Mutationen sowie Spleißstellenmutationen. Für AML 1 - AML 5 wurden AML BM-MSC zum Zeitpunkt der ED, REM und des REZ analysiert. In der refraktären Patientenkohorte (AML 6 - AML 14) lag der Median identifizierter Mutationen bei fünf Variationen je Probe (Spanne 2-77). Die Kohorte der AML 15 - AML 21 erreichte eine REM, hier lag der Median der Mutationsanzahl je Probe bei sechs Variationen (Spanne 1-24 Variationen). In Kontrollen der GS BM-MSC wurden lediglich dbSNP-annotierte Alterationen identifiziert. Sämtliche Mutationen sind im Anhang in Tab. DiskE2 verzeichnet. Rekurrent mutierte Gene mit proteinalterierenden Mutationen wurden identifiziert: Hierbei handelte es sich um dbSNP-annotierte Variationen wie bspw. in *FAM227B* (AML 18: G243V und AML 11: V124I) oder dbSNP-annotierte Variationen in Genen codierend für Keratinassoziierte Proteine und Mucine (vgl. Anhang Tab. DiskE2).

Es proteinalterierende Variationen seien weitere in Genen assoziert mit der Chromatinremodulierung und -organisation genannt: SMARCA2 (T243S in AML 21), HDAC6 (M554L in AML 20) und RUVBL2 (K160I in AML 20). Auch waren Alterationen in Regulatoren der Zytoskelettorganisation vorhanden, so z. B. Dystonin (DST, I4033T in AML 8) sowie in Filamin B (FLNB, D400V in AML 20). Proteinalterierende Mutationen ohne dbSNP-Annotation, die gemeinsam in den jeweiligen AML BM-MSC Proben identifiziert wurden, hatten keinerlei synergistischen Einfluss auf zelluläre Signalwege (Cytoscape 3.4.0 Reactome FI Plugin, Daten nicht gezeigt). <sup>175, 198</sup>

In AML 3 wurde eine Alteration in Plectin (*PLEC*) identifiziert. Diese SNV im *PLEC* Gen (R1801Q) war die einzige Alteration, die in AML BM-MSC zu allen drei Zeitpunkten des Krankheitsverlaufs dieses Patienten mit > 20 % VAF präsent war (vgl. Abb. 17). Darüber hinaus waren *TRPV6* (L113L) in AML 1 bzw. *SNTB2* (A43T) in AML 3 mit  $\geq$  1 *read* der jeweiligen Variation in der jeweils korrespondierenden Rezidivprobe präsent (vgl. Abb. 17). Diese Variationen waren in unabhängigen AML BM-MSC Kulturen der Patienten mit einer VAF < 20 % vorhanden.

Ergebnisse



Abb. 17 : Proteinalterierende und nicht-proteinalterierende Mutationen (n=58) in der Patientenkohorte AML 1 – AML 5 und Prüfung auf Rekurrenz in AML BM-MSC Verlaufsproben. Die einzige Variation, die mit > 20 % VAF in AML BM-MSC aller drei Zeitpunkte des Krankheitsverlaufs (ED/REM/REZ) präsent war, war eine Alteration in *PLEC* (R1801Q, UniProtKB Q15149 in AML 3). Aus den übrigen Alterationen (n=57) wurden in den Verlaufsproben zwei weitere Mutationen (*TRPV6* (L113L) in AML 1 und *SNTB2* (A43T) in AML 3) mit  $\geq$  1 *read* in den korrespondierenden AML BM-MSC generiert zum Zeitpunkt des REZ identifiziert. Die Variation R1801Q war in der zentralen ROD-Domäne des Plectin-Proteins lokalisiert. Die Mutation konnte zu allen drei Zeitpunkten und weiterhin in AML BM-MSC einer frühen Passage der *in vitro*-Expansion (p1) mittels Sanger-Sequenzierung validiert werden (vgl. Abb. 18). Weiterhin konnte diese Variation mittels RNAseq als Aminosäurenaustausch identifiziert (Daten nicht gezeigt) und in AML BM-MSC einer weiteren REZ-Verlaufsprobe dieses Patienten in p1 sowie p4 validiert werden (vgl. Abb. 18).



**Abb. 18: Schematische Darstellung der Plectin-Aminosäuresequenz** und Lokalisation der Mutation R1801Q (AML 3) in der zentralen ROD-Domäne. Diese Mutation wurde zu verschiedenen Zeitpunkten des Krankheitsverlaufs in unabhängigen AML BM-MSC Proben validiert.

In einer unabhängigen AML BM-MSC Kohorte (ED, n=50) wurde diese SNV oder andere Variationen in diesem Locus im *PLEC* Gen nicht identifiziert (Sanger-Sequenzierung, Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend zeigten AML BM-MSC ein unspezifisches Muster genetischer Alterationen mit hoher Varianz in der Mutationsanzahl je Probe.

Aus der Kontrollkohorte der GS BM-MSC wies ein Spender (GS 1) vier dbSNP-annotierte Variationen auf, die in *OTOP1* lokalisiert waren (vgl. Abb. 16, S. 73 sowie Anhang Tab. DiskE2). Die übrigen GS BM-MSC wiesen keinerlei Alterationen auf.

Es lagen insgesamt wesentlich mehr genetische Alterationen in AML BM-MSC als in der Kontrollkohorte der GS BM-MSC vor.

# 4.2.2 Die numerische Verteilung der genetischen Alterationen zwischen AML BM-MSC und den hämatopoetischen Zellfraktionen

Die Anzahl genetischer Alterationen war in den 30 untersuchten Exomen der AML BM-MSC variabel (vgl. 4.2.1). Für 27 aus diesen 30 Exomen waren in den korrespondierenden AML-Zellen bzw. MNCs der REM mehr genetische Alterationen detektiert worden. In den gesunden Spendern wurden in den hämatopoetischen Zellfraktionen keinerlei Mutationen detektiert (vgl. Abb. 19 bzw. Tab. DiskE2). Der Median der Mutationsanzahl je Probe lag bei den korrespondierenden leukämischen Zellen bei 25 Variationen je Probe (Spanne 4-94, inkl. db-SNP-annotierte Variationen).



### Anzahl der genetischen Alterationen

Abb. 19: Numerische Verteilung der genetischen Alterationen zwischen den hämatopoetischen Zellfraktionen (AML-Zellen bzw. MNCs der REM) und den korrespondierenden AML BM-MSC (AML: n=21, GS: n=3). Die Darstellung beinhaltet sämtliche genetische Alterationen in codierenden Sequenzen und Spleißstellen inkl. dbSNP-annotierte Alterationen. AML 1 – AML 5 wurden zum Zeitpunkt der ED, REM sowie des REZ analysiert. AML 6 - AML 14 waren im Verlauf refraktär, während AML 15 - AML 21 auf die Chemotherapie ansprachen. In 27 aus 30 Exomen waren weniger Mutationen in AML BM-MSC vorhanden. In GS BM-MSC waren dbSNP-annotierte Variationen detektiert worden, die MNCs trugen hier keinerlei Mutationen.

AML-Zellen und die korrespondierenden AML BM-MSC zeigten ein distinktes Muster genetischer Alterationen. In 24 Genen wurden verschiedene Variationen in distinkten Patientenproben in beiden Kompartimenten identifiziert, hierbei handelte es sich um dbSNP-annotierte Variationen und solche in hoch-repetitiven Sequenzen wie bspw. Mucin-4 (MUC4, vgl. Tab. DiskE2).

## 4.2.3 Die Expression von Plectin in AML BM-MSC

Im *PLEC* Gen wurde im Rahmen der WES-Analysen eine genetische Alteration detektiert (vgl. 4.2.1). Eine Expressionsanalyse erwies eine signifikante *PLEC*-Überexpression auf mRNA-Ebene in AML BM-MSC (ED, n=60) im Kontrast zu GS BM-MSC (n=14, \*\*\*p-Wert < 0,0001, Mann Whitney U Test, vgl. Abb. 20 a). Ein Western Blot zeigte deutlich intensivere Signale für Plectin in zwei aus acht analysierten AML BM-MSC Proben (vgl. Abb. 20 b).



Abb. 20: *PLEC*-Expression in AML BM-MSC und GS BM-MSC. a) *PLEC* war auf mRNA-Ebene in AML BM-MSC (n=60) gegenüber GS BM-MSC (n=14) signifikant überexprimiert (\*\*\*p-Wert < 0,0001, Mann Whitney U Test, Darstellung der relativen *PLEC*-Expression zum HKG *GUS* mit Mittelwerten und SD). b) In einem Western Blot waren für zwei aus acht analysierten AML BM-MSC Proben intensivere Signale für Plectin zu erkennen (5 min exponiert).



b)

Die *PLEC*-Expression auf mRNA Ebene korrelierte mit keinem klinischen Parameter, bspw. den molekularen oder zytogenetischen Alteration, dem Alter oder Remissionsstatus der Patienten (n=60, siehe Anhang Tab. A3).

Histologische Färbungen von Plectin<sup>+</sup> Zellen in Knochenmarkbiopsien von AML-Patienten sowie Kontrollen (Patienten ohne Befund einer hämatologischen Erkrankung) zeigten eindeutig spindelartige, Plectin<sup>+</sup> Zellen und eine Plectin-Expression in primärem Knochenmark (vgl. Abb. A2 des Anhangs).

# 4.2.4 Das aberrante Genexpressionsprofil der AML BM-MSC basierend auf RNAseq-Analysen

In einem Vergleich der globalen Genexpression in AML BM-MSC (vgl. Tab. 4, S. 22) zur gesunden Kontrollkohorte wurden zum Zeitpunkt der ED insgesamt 348 deregulierte Gene identifiziert (vgl. Abb. 21). Hierunter waren 232 differentiell exprimierte, proteincodierende Gene sowie nicht-codierende Transkripte, wie z. B. *long intergenic* (linc) RNAs (vgl. Anhang Tab. DiskE2).



Abb. 21 : *Heatmap* eines hierarchischen Gliederns der 348 deregulierten Gene in AML BM-MSC (ED, n=5) im Kontrast zu GS BM-MSC (n=6). Eine Liste der Gene ist im Anhang in Tab. DiskE2 verzeichnet.

Die funktionelle Annotation dieser aberranten Genexpressionssignatur zeigte eine signifikante Anreicherung von Genen mit Assoziation zu 19 Signalwegen und Molekülgruppen (vgl. Tab. 15). Diese demonstrierten eine transkriptionelle Deregulierung von Genen des zellulären Metabolismus wie z. B. der Acetylierungs-assoziierten Gene *ACSS3* und *FASN*. Weiterhin lagen Strukturproteine wie bspw. Proteoglycane und Zelladhäsionsmoleküle aberrant exprimiert vor. Diese umfassten z. B. Syndecan-1 (*SDC1*), Decorin (*DCN*) sowie die Integrin Untereinheit  $\alpha$ 5 (*ITGA5*) und Cadherin-4 (*CDH4*, R-Cadherin). Darüber hinaus wurde eine aberrante Interleukin- (IL-) und Zytokinexpression festgestellt (*cytokine-cytokine receptor interactions*, vgl. Tab. 15). Letzteres spiegelte sich z. B. durch eine erhöhte Expression des Interleukin (*IL-*) 7 sowie *CXCL16* wider. Interessanterweise war auch der MSC-Marker *NGFR* in dieser Patientenkohorte ebenfalls hochreguliert (vgl. 4.1.3 sowie Anhang DiskE2). Tab.15: *Gene Ontology*, die Assoziation der in der aberranten Genexpressionssignatur von AML BM-MSC (**ED**) enthaltenen Gene zu Molekülgruppen und zellulären Signalwegen.

Zellulärer Signalweg	Anzahl assoziierter Gene	p-Wert	Gensymbole
Proteoglycans in cancer	7	0,0001	DCN; FGF7; RRAS2; ITGA5; SDC1; WNT7B; COL21A1
Transcriptional misregulation in cancer	6	0,0002	HOXA11; MAF; NGFR; BMI1; SIX1; SLC45A3
Metabolic pathways	15	0,0005	MGAT5B; FASN; GALNT1; MAOB; PGAM1; NANS; POLR2J3; AGPAT4; NDUFA4L2; MAN1C1; NME1-NME2; ACSS3; HYI; PPAP2B; FPGT
HTLV-I infection	6	0,0018	CDKN2A; ADCY4; RRAS2; NFATC2; VAC14; WNT7B
Cytokine-cytokine receptor interaction	6	0,0020	GHR; IL7; NGFR; CXCL16; BMP2; TNFRSF11A
Axon guidance	4	0,0036	SEMA6B; EPHB2; NFATC2; SEMA6D
Regulation of actin cytoskeleton	5	0,0036	VAV3; FGF7; RRAS2; ITGA5; ENAH
Drug metabolism - cytochrome P450	3	0,0055	GSTT2; MAOB; GSTT2B
TGF-β signaling pathway	3	0,0070	FST; DCN; BMP2
Chemical carcinogenesis	3	0,0075	GSTT2; GSTT2B; SULT1A3
Chemokine signaling pathway	4	0,0132	VAV3; ADCY4; CXCL16; RAP1A
Pyrimidine metabolism	3	0,0146	AK3; POLR2J3; NME1-NME2
PI3K-Akt signaling pathway	5	0,0243	FGF7; GHR; IL7; ITGA5; NGFR
Osteoclast differentiation	3	0,0264	NFATC2; ACP5; TNFRSF11A
Ubiquitin mediated proteolysis	3	0,0279	UBE2W; UBE2B; UBE2D1
Cell adhesion molecules (CAMs)	3	0,0321	CDH4; SDC1; SELL
MAPK signaling pathway	4	0,0346	FGF7; RRAS2; NFATC2; RAP1A
Jak-STAT signaling pathway	3	0,0390	SPRY1; GHR; IL7
Purine metabolism	3	0,0485	ADCY4; POLR2J3; NME1-NME2

In AML BM-MSC, generiert zum Zeitpunkt der REM, lagen 650 Gene und zum Zeitpunkt des REZ 435 Gene aberrant exprimiert vor (vgl. Anhang DiskE2). In einer Kombination - einem Pool - aller AML BM-MSC Proben ergab sich eine Signatur von 950 differentiell exprimierten Genen (vgl. Anhang Tab. DiskE2). In einem hierarchischen Gliedern dieser Gene gruppierten sich die jeweiligen Verlaufsproben von vier aus fünf Patienten (vgl. Abb. 22).



Abb. 22: *Heatmap* eines hierarchischen Gliederns der 950 differentiell exprimierten Genen in AML BM-MSC (n=5) zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten des Krankheitsverlaufs (ED, REM, REZ) verglichen mit GS BM-MSC (GS, n=6). Hierbei gruppierten in vier aus fünf Fällen sämtliche Verlaufsproben der Patienten (für eine Liste der 950 Gene s. a. Tab. DiskE2 des Anhangs).

Auch diese aberrante Genexpressionsignatur zeigte eine Anreicherung von Genen mit Assoziation zu zellulären Signalwegen und Molekülgruppen, dies wird in 4.2.7 beschrieben.

Zusammenfassend wiesen AML BM-MSC, im Vergleich zu GS BM-MSC, transkriptionelle Alterationen auf. Die alterierten Komponenten zeigten eine Assoziation zu Signalwegen und Molekülgruppen der Zell-Zell Kommunikation, Zelladhäsion sowie des zellulären Metabolismus. In einem weiteren globalen Genexpressionsprofil wurden ebenfalls transkriptionelle Alterationen in AML BM-MSC identifiziert.

## 4.2.5 Das aberrante Genexpressionsprofil der AML BM-MSC basierend auf einem Affymetrix HG-U133 Plus 2.0 GeneChip

Im Rahmen der Analyse der globalen Genexpression mittels des Affymetrix HG-U133 Plus 2.0 GeneChips waren in AML BM-MSC, verglichen zu GS BM-MSC, 474 *probesets* mit Annotation zu 448 Genen differentiell exprimiert. Hierunter waren 289 *probesets* (annotiert zu 272 Genen) hochreguliert und 183 *probesets* (annotiert zu 175 Genen) herunterreguliert. AML BM-MSC bildeten in einer Hauptkomponentenanalyse (*principle component analysis*; PCA) eine distinkte Gruppe (vgl. Abb. 23 a). Ein hierarchisches Gliedern der *probesets* mit differentieller Expression zeigte eine Separation von AML BM-MSC und GS BM-MSC und machte weiterhin eine ausgeprägte Heterogenität der einzelnen AML BM-MSC Proben erkennbar (vgl. Abb. 23 b).



Abb. 23: Affymetrix-basierte aberrante Genexpressionssignatur der AML BM-MSC (n=19) im Kontrast zu GS BM-MSC (n=4). Abschnitt a) zeigt eine PCA der AML BM-MSC sowie GS BM-MSC mit der Beschreibung von 41,8 % sämtlicher Varianzen (*principle component* (PC) 1: 16,5 %; PC 2: 15,7 %; PC 3: 9,6 %). AML BM-MSC bildeten eine distinkte Gruppe. b) Das hierarchische Gliedern aberrant exprimierter *probesets* (n=474) resultierte in einer Separation der AML und GS BM-MSC Proben und machte eine Heterogenität der AML BM-MSC erkennbar.

Die Schnittmenge der beiden globalen Genexpressionsmuster, der Analyse mittels Illumina RNAseq zum Zeitpunkt der ED (vgl. Abb. 21, S. 80) und dem hier gezeigten Affymetrixbasierten Genexpressionsprofil, enthielt 15 Gene. Diese umfassten u. a. Decorin, ein kleines Leucin-reiches Proteoglycan (*small leucin rich proteoglycan*; SLRP).

Ein weiteres SLRP, Lumican (*LUM*), lag in der differentiellen Genexpressionssignatur des RNAseq während des REZ überexprimiert vor (vgl. Anhang DiskE2). Im Affymetrix-basierten

Genexpressionsprofil wurde *LUM* durch zwei *probesets* repräsentiert und eines dieser *probesets* war ebenfalls überexprimiert. Die Expression von Lumican in AML BM-MSC sowie funktionelle Untersuchungen des Proteoglycans Lumican und der Einfluss einer stabilen Lumican-Überexpression auf die Zelllinie HS-5 wird in 4.4.2 beschrieben.

Ein Vergleich des in Abb. 22 (S. 82) gezeigten RNAseq-basierten Genexpressionsprofils von AML BM-MSC mit dem Affymetrix-basierten Genexpressionsprofil ergab eine Überlappung von 41 Genen, diese umfassten ebenfalls u. a. *DCN* (vgl. DiskE2).

Zusammenfassend demonstrierte die Affymetrix-basierte Genexpressionssignatur globale transkriptionelle Alterationen in AML BM-MSC. Einige Gene - vor allem Proteoglycane - waren in den Signaturen beider Hochdurchsatzplattformen, der RNAseq-basierten Analyse (vgl. 4.2.4) und der Affymetrix-basierten Analyse, vorhanden.

Auf die funktionelle Annotation und Assoziation der in dieser Affymetrix-basierten Genexpressionssignatur enthaltenen Gene zu zellulären Signalwegen wird in 4.2.7 eingegangen.

Um die Regulation einer alterierten Genexpression in AML BM-MSC zu untersuchen, wurden DNA-Methylierungsanalysen durchgeführt.

## 4.2.6 Die aberrante DNA-Methylierungssignatur der AML BM-MSC

Die Analyse des DNA-Methylierungsmusters machte signifikante Unterschiede zwischen AML BM-MSC und GS BM-MSC erkennbar. Eine PCA sämtlicher Proben zeigte, dass einige AML BM-MSC, generiert zum Zeitpunkt der ED, eine ausgeprägte Varianz zu GS BM-MSC aufwiesen (vgl. Abb. 24).



**Abb. 24: Das globale DNA-Methylierungsmuster von AML BM-MSC verglichen mit GS BM-MSC.** Gezeigt ist eine PCA der AML BM-MSC zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Krankheitsverlaufs (ED, n=32, REM n=31, REZ n=10, REF n=4) und GS BM-MSC (n=12). Es werden 18,9 % der DMC-Varianzen beschrieben (PC 1: 10,1 %; PC 2: 4,8 %; PC 3: 3,98 %). Gepaarte Proben sind verbunden dargestellt. Einige der AML BM-MSC, generiert zum Zeitpunkt der ED, zeigten größere Abstände zur Kontrollkohorte der GS BM-MSC, die übrigen Verlaufsproben lagen überwiegend in Proximität zur GS BM-MSC Kohorte vor.

Die DNA-Methylierungsmuster der Verlaufsproben (REM und REZ) ergaben im jeweiligen Vergleich zueinander keine oder lediglich wenige DMCs (FDR  $\leq 0,1$ , Daten nicht gezeigt). Auch das Kontrastieren der AML BM-MSC Verlaufsproben (REM, REZ, REF) zu GS BM-MSC ergab keine DMC-Signaturen (FDR  $\leq 0.1$ , Daten nicht gezeigt).

In einer weiteren PCA (vgl. Abb. 25) stellten sich GS BM-MSC als eine distinkte Gruppe dar, während AML BM-MSC (ED) eine stärkere Variabilität zwischen den einzelnen Proben aufzeigten.



Abb. 25: PCA alleinig der AML BM-MSC generiert zum Zeitpunkt der ED (n=32) sowie GS BM-MSC (n=12) mit einer Beschreibung von 25 % aller DMC-Varianzen (PC1: 13,7 %; PC2: 5,9 %; PC3: 5,4 %). GS BM-MSC gruppierten sich deutlich, während AML BM-MSC höhere Variabilitäten zeigten; einige AML BM-MSC wiesen hingegen eine GS-ähnliche Signatur und Proximität zu der GS BM-MSC Kohorte auf.

Die differentielle DNA-Methylierungssignatur der AML BM-MSC (ED) wies 809 DMCs auf. Ein hierarchisches Gliedern dieser 809 DMCs führte zu einer Separation der AML BM-MSC mit Ausnahme einer AML BM-MSC Probe, welche inmitten der GS BM-MSC Kohorte gruppierte (vgl. Abb. 26).



Abb. 26: Hierarchisches Gliedern von 809 DMCs der differentiellen DNA-Methylierungssignatur der AML BM-MSC (AML BM-MSC: n=32, GS BM-MSC: n=12). AML BM-MSC Proben gruppierten sich hierbei mit Ausnahme einer AML BM-MSC Probe mit einer GS-ähnlichen Signatur. Die identifizierten DMCs lagen überwiegend hypomethyliert vor. Eine Liste der DMCs ist Tab. DiskE2 des Anhangs zu entnehmen.

Das hierarchische Gliedern der DMCs ließ eine überwiegende Hypomethylierung in AML BM-MSC erkennen, ein Volcano Plot (vgl. Abb. 27) zeigte ebenfalls den gegenüber den gesunden Kontrollen überwiegenden hypomethylierten Status der DMCs.



Abb. 27: Volcano Plot der DMCs in AML BM-MSC mit den p-Werten der einzelnen DMCs gegenüber der errechneten  $\beta$ -Werte (Status AML vs. GS), die jeweils Hypo- bzw. Hypermethylierung widerspiegelten. Im hochsignifikanten Bereich (p-Wert < 0,001) lagen die detektierten DMCs überwiegend hypomethyliert vor.

Die 809 identifizierten DMCs waren zu 564 Genen annotiert. Die überwiegende Hypomethylierung spiegelte sich auch in den differentiell methylierten Genen wider: 15 Gene waren in AML BM-MSC differentiell methyliert und lagen einheitlich hypomethyliert vor (vgl. Tab. 16).

Gensymbol	Methylierungsstatus	Anzahl DMCs	
НМ13	hypomethyliert	3	
MARCH1	hypomethyliert	3	
MEST	hypomethyliert	3	
MESI MESTITI	hypomethyliert	2	
		3	
PLAGLI	nypometnyllert	3	
HYMAI	hypomethyliert	3	
H19	hypomethyliert	3	
ZIM2	hypomethyliert	3	
NAP1L5	hypomethyliert	4	
HERC3	hypomethyliert	4	
ZNF331	hypomethyliert	4	
MEG3	hypomethyliert	6	
GNAS	hypomethyliert	10	
KCNQ1	hypomethyliert	11	
KCNQ10T1	hypomethyliert	12	

Tab. 16 : Differentiell methylierte Gene in AML BM-MSC.

Differentiell methylierte Regionen lagen nicht vor, auch war keine signifikante Assoziation zu Promotorregionen vorhanden (Daten nicht gezeigt). In der Signatur der 564 Genen mit  $\geq$  1 DMC lag eine signifikante Anreicherung von Genen mit Assoziation zu bestimmten Signalwegen vor. Diese umfassten u. a. die Prozesse der Antigenprozessierung und - präsentation sowie der Endozytose (vgl. 4.2.7).

Im folgenden Kapitel sollen nun diejenigen Signalwege und Molekülgruppen herausgestellt werden, die in den generierten Signaturen bzw. auf mehreren molekularen Ebenen in AML BM-MSC dereguliert vorlagen.

## 4.2.7 Die Assoziation der aberranten Genexpressions- und DNA-Methylierungssignaturen zu zellulären Signalwegen und Molekülgruppen

Zwecks Integration der generierten Daten aus den oben beschriebenen Hochdurchsatzplattformen wurden die resultierenden Profile auf Anreicherungen von Genen und Assoziationen zu Signalwegen und Molekülgruppen untersucht. Hierbei waren in den Signaturen der aberranten Genexpression sowie im DNA-Methylierungsmuster Gene mit Assoziation zu teils denselben Signalwegen und Molekülgruppen präsent (vgl. Tab. DiskE2).

Diese umfassten: i) Adhäsionsmoleküle der Zell-Zell Interaktion und Komponenten der extrazellulären Matrix (*extracellular matrix*; ECM), ii) Gene mit Assoziation zu den zellulären Prozessen der Endozytose sowie des zellulären Metabolismus sowie iii) Zytokine und Signalmoleküle der Zell-Zell Kommunikation (s. u. Abb. 28).



Abb. 28: Deregulierte Gene und deren Assoziation zu zellulären Signalwegen und Molekülgruppen, die in den aberranten Genexpressionssignaturen sowie im DNA-Methylierungsmuster der AML BM-MSC angereichert waren. Die a) RNAseq-basierte Genexpressionssignatur der gepoolten AML BM-MSC Proben (vgl. Abb. 22, S. 82) zeigte eine signifikante Anreicherung Metabolismus-assoziierter Prozesse, von Adhäsionsmolekülen sowie Proteoglycanen. Endozytose-assoziierte Gene waren hierin ebenfalls präsent (n.s., p-Wert 0,086). b) Affymetrix-basierte Analysen (vgl. Abb. 23, S. 83) spiegelten ebenfalls deregulierte metabolische und endozytotische Prozesse, aberrante Chemokin- sowie Proteoglycanexpression wider (Proteoglycane, p-Wert 0,072). c) Die DNA-Methylierungsignatur (vgl. Abb. 26, S. 87) zeigte eine hochsignifikante (p-Wert < 0,0001) Anreicherung Endozytose-assoziierter Gene, darüber hinaus ebenfalls deregulierte metabolische Prozesse, Zell-Zell Interaktionsmoleküle und eine Deregulation von *major histocompatibility*-Klasse I Molekülen mit einer Assoziation zur Antigenprozessierung und -präsentation. Die Größe der Knoten eines jeden Signalweges ist proportional zur Anzahl involvierter Gene. Die Darstellung umfasst ausgewählte Signalwege und Molekülgruppen (für eine ausführliche Beschreibung s. a. Tab. DiskE2 des Anhangs).

Proteoglycane als wichtige Komponenten der ECM (vgl. 5.3.5) waren Teil der aberranten Genexpressionssignaturen (RNAseq: p-Wert <0,0001; Affymetrix: p-Wert 0,072). Diese umfassten bspw. *DCN* und Syndecan-1 (*SDC1*). Jedoch waren Proteoglycane im aberranten DNA-Methylierungsprofil nicht signifikant angereichert.

Darüber hinaus waren verschiedene Komponenten der Zell-Zell Interaktion wie Integrine (*ITGA5, ITGA3, ITGB3*) und Zelladhäsionsmoleküle (z. B. *SDC1* und *CDH4*) im RNAseqbasierten Profil signifikant angereichert (s. a. Tab. DiskE2). Das Affymetrix-basierte Profil spiegelte eine Anreicherung von *adherens junction*-Molekülen wie PRL3 (*Nectin Cell Adhesion Molecule 3*) wider. Das DNA-Methylierungsmuster beinhaltete Adhärenzmoleküle wie *Catenin Alpha 3* (*CTNNA3*).

Bestimmte Moleküle der Zell-Zell Kommunikation waren ebenfalls Teil dieser Signaturen: *IL-*7 und *CXCL16* waren im RNAseq-basierten Profil überexprimiert (vgl. 4.2.4). Das Affymetrixbasierte Genexpressionsmuster enthielt weitere Chemokine wie bspw. *CXCL2*, welches herunterreguliert vorlag.

Gene, die in dem Prozess der Endozytose involviert sind, waren in der Affymetrix-basierten Genexpressionsanalyse sowie im DNA-Methylierungsprofil signifikant angereichert. Auch im RNAseq-basierte Profil waren weitere Endozytose-assoziierte Gene vertreten (nicht signifikant, p-Wert 0,086).

Desweiteren waren Gene mit Assoziation zu metabolischen Prozessen auf beiden molekularen Ebenen dereguliert: Das RNAseq-Profil demonstrierte bspw. eine Anreicherung von Genen mit Assoziation zum Glycin-, Serin- und Threoninmetabolismus (vgl. Abb. 28 a), das Affymetrix-basierten Profil spiegelte einen aberranten Pyruvatmetabolismus sowie Aminozuckermetabolismus wider (vgl. Abb. 28 b). Das DNA-Methylierungsprofil enthielt Gene zu teils äquivalenten metabolischen Prozessen (vgl. Abb. 28 c).

Zusammenfassend spiegelten beide molekulare Ebenen – die globale Genexpression und DNA-Methylierung - eine Deregulation von

i) Adhäsionsmolekülen der Zell-Zell Interaktion sowie Proteoglycanen

ii) endozytotischen und metabolischen Prozessen sowie

iii) Signalmolekülen (wie bspw. Chemokine)

in AML BM-MSC wider.

# 4.3 Kulturexpandierte BM-MSC als Keimbahnkontrollen zur Identifizierung von Mutationen der AML

Methoden des NGS haben das Spektrum bekannter Mutationen in leukämischen Zellen ernorm vergrößert. Hingegen stellen fehlende Keimbahnkontrollen häufig eine Limitation dar. Die Verwendung von AML BM-MSC (ED) als Keimbahnkontrollen für neun AML-Patienten brachte Mutationen der Hämatopoese zutage, die bei Verwendung der MNCs der REM als Keimbahnkontrolle nicht detektiert wurden (vgl. Abb. 29).



Abb. 29: Eine Gegenüberstellung von Keimbahnkontrollen und Identifizierung somatischer Mutationen der AML-Zellen (MNCs ED, AML-Identifikationsnummern korrespondieren mit Tab. DiskE1). Bei Verwendung der AML BM-MSC als Keimbahnkontrollen wurden insgesamt 41 Mutationen (tabellarische Darstellung) identifiziert, die in der MNCs REM mit über 5 % VAF präsent waren und unter Verwendung dieser Zellfraktion als Keimbahnkontrolle nicht detektiert wurden. Hierunter waren bspw. *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1* und *RUNX1*.

Hierunter befanden sich in der AML rekurrent-mutierte Gene wie DNMT3A, TET2, ASXL1 und RUNX1 (vgl. 1.2). Weiterhin waren Mutationen in bspw. Prospero Homeobox 1 (PROX1), Caspase Recruitment Domain Family Member 8 (CARD8) oder Phospholipase C Epsilon 1 (PLCE1) vorhanden.

Für zwei dieser neun in Abb. 29 beschrieben AML-Patienten lagen ebenfalls WES-Daten der AML-Zellen des korrespondierenden REZ vor (AML 3 und AML 4, vgl. Tab. 4, S. 22). Sämtliche der für AML 3 und AML 4 in Abb. 29 tabellarisch dargestellten Mutationen waren auch in den AML-Zellen des REZ dieser Patienten detektiert worden (vgl. Tab. DiskE2).

Im Falle der neun refraktären Patienten (AML 6 – AML 14, vgl. Tab. 4, S. 22) wurde unter Verwendung der Keimbahnkontrolle der korrespondierenden AML BM-MSC ebenfalls rekurrent-mutierte Gene durch WES der AML-Zellen bei ED identifiziert (vgl. 1.2), hierunter *SRSF2, TET2, DNMT3A, WT1, FLT3* und *RUNX1*. Hierbei lagen in *SRSF2* in drei aus neun Fällen Mutationen vor. Tabelle 17 fasst sämtliche, rekurrent-mutierte Gene der AML-Zellen der beiden beschriebenen Patientenkohorten bei Verwendung der korrespondierenden AML BM-MSC als Keimbahnkontrolle zusammen.

Tab. 17: Zusammenfassung der rekurrent-mutierten Gene, welche durch die Verwendung von AML BM-MSC als Keimbahnkontrolle in zwei unterschiedlichen Patientenkohorten detektiert wurden: AML-Patienten mit gutem Ansprechen auf die initiale Chemotherapie (AML REM) und refraktäre AML-Patienten (AML REF).

Gensymbol	AML REM (n=9)	AML REF (n=9)
SRSF2	n=2	n=3
TET2	n=1	n=2
DNMT3A	n=2	n=1
SLC25A	n=2	
WT1		n=2
FLT3	n=1	n=1
KCNK10	n=1	n=1
RUNX1	n=1	n=1

Zusammenfassend wurden durch die Verwendung von AML BM-MSC als Keimbahnkontrolle Mutationen identifiziert, welche mit > 5 % VAF in den MNCs der REM präsent waren und bei Verwendung dieser Zellfraktion als Keimbahnkontrolle nicht detektiert wurden. Darüber hinaus wurde unter Verwendung von AML BM-MSC als Keimbahnkontrolle eine Rekurrenz von Mutationen in *SRSF2* in den AML-Zellen einer refraktären AML-Patientenkohorte identifiziert.

## 4.4 Funktionelle Untersuchungen der Kandidatengene PLEC und LUM

#### 4.4.1 Der Effekt von PLEC RNAi auf HS-5 Zellen

Eine *PLEC* RNAi in HS-5 und die Untersuchung der *PLEC*-Expression im Zeitverlauf ergab, dass die *PLEC*-Expression auf mRNA-Ebene 48 h nach erfolgter Transfektion um 71 % reduziert und dies der Zeitpunkt der effektivsten *PLEC* RNAi war (vgl. Abb. 30 a). Auch auf Proteinebene war in einem Western Blot das Signal für Plectin 48 h nach erfolgter Transfektion im Vergleich zur Negativkontrolle (NK RNAi) reduziert (vgl. Abb. 30 b).





Abb. 30: PLEC-Expression in HS-5 Zellen nach PLEC RNAi (n=2) (a) Gezeigt ist die relative PLEC-Expression zum HKG GUS an drei Zeitpunkten (24 h, 48 h, 72 h) nach erfolgter Transfektion. Untransfizierte (u) HS-5 Zellen zeigten gegenüber der Negativkontrolle (NK RNAi) eine äquivalente PLEC-Expression, PLEC RNAi führte hingegen an allen drei untersuchten Zeitpunkten zur Interferenz von PLEC-Transkripten. Die effektivste PLEC RNAi lag 48 h nach erfolgter Transfektion vor. (b) Dies wurde auf Proteinebene mittels eines Western Blots bestätigt (5 min exponiert), 48 h nach der Transfektion war eine Reduktion des Signals für Plectin in PLEC RNAi-Ansätzen erkennbar. Mit fortschreitender Kultur wurde das Signal für Plectin intensiver, ebenso waren geringfügig intensivere Signalen für β-Actin erkennbar.

**b**)

In einem WST-1 Proliferationsassay waren die Signale der *PLEC* RNAi-Ansätze äquivalent zu den Negativkontrollen und kein Effekt der *PLEC* RNAi auf die Proliferation und Viabilität der HS-5 Zellen erkennbar. Hingegen war für die apoptoseinduzierende Positivkontrolle eine geringere Proliferation und Zellviabilität der HS-5 Zellen ersichtlich (vgl. Abb. 31).



Abb. 31: WST-1 Proliferationsassay für adhärente HS-5 Zellen 48 h nach erfolgter *PLEC* RNAi. (Mittelwerte und SD aus n=2 Transfektionen). Zwischen der untransfizierten Kontrolle (ut) bzw. der NK RNAi und *PLEC* RNAi bestand kein signifikanter Unterschied. Im Falle der Positivkontrolle (PK RNAi, apoptoseinduzierend) war ein geringeres Signal für die Zellviabilität feststellbar.

Darüber hinaus war 48 h nach erfolgter Transfektion kein Unterschied in der Apoptoserate in Ansätzen der *PLEC* RNAi ersichtlich. Dagegen führte eine apoptoseinduzierende Positivkontrolle zu einer erhöhten Apoptoserate in HS-5 Zellen (vgl. Abb. 32).



Abb. 32: Annexin V-Apoptoseassay für HS-5 Zellen nach *PLEC* RNAi (Mittelwert und SD aus n=2 Transfektionen). HS-5 Zellen zeigten nach erfolgter *PLEC* RNAi geringfügige Unterschiede im prozentualen Anteil apoptotischer (Annexin-V<sup>+</sup>) und nekrotischer Zellen (Annexin V<sup>+</sup> 7-AAD<sup>+</sup>) im Vergleich zu NK RNAi. Hingegen führte die Transfektion von HS-5 Zellen mit einer apoptoseinduzierenden siRNA (PK RNAi) zu einer erhöhten Apoptoserate von > 10 % der Gesamtpopulation.

## 4.4.2 Die Expression des Proteoglycans Lumican in AML BM-MSC und die Charakterisierung von stabil pCMV-LUM-transfizierten HS-5 Zellen

Grundlage zur Identifizierung einer Überexpression des SLRPs Lumican in AML BM-MSC war die globale Genexpressionsanalyse mittels eines Affymetrix HG-U133 Plus 2.0 GeneChips Auch im RNAseq-basierten Profil (REZ) war Lumican signifikant überexprimiert (vgl. 4.2.5, bzw. Tab. DiskE2).

Im Rahmen des Affymetrix-GeneChips wurde für eines der zwei *probesets*, die *LUM* repräsentierten, eine signifikant höhere relative Signalstärke für AML BM-MSC gegenüber den gesunden Kontrollen detektiert (vgl. Abb. 33 a, *probeset* 201744\_s\_at: p-Wert 0,02, *probeset* 229554\_at: p-Wert > 0,05). In einer AML BM-MSC Kohorte (ED, n=76) zeigten 47 % eine zweifach höhere *LUM*-Expression gegenüber GS BM-MSC (n=10, vgl. Abb. 33 b). Auf Proteinebene waren in einem Western Blot überwiegend äquivalente bis geringfügig stärkere Signale für Lumican (ca. 50 kDa) in AML BM-MSC und darüber hinaus weitere Signale zwischen 35 kDa und 100 kDa erkennbar (vgl. Abb. 33 c).



**Abb. 33: Expression von Lumican in AML BM-MSC im Vergleich zu GS BM-MSC.** Abschnitt a) zeigt die Verteilung relativer Signalstärken in einem Affymetrix HG-U133 Plus 2.0 GeneChip, *LUM* wird durch zwei *probesets* repräsentiert: *probeset* 201744\_s\_at zeigte eine signifikant höhere relative Signalstärke für AML BM-MSC (AML, n=19) gegenüber GS BM-MSC (GS, n=4, \*p-Wert 0,02), *probeset* 229554\_at zeigte hingegen keine Signifikanz (p-Wert > 0,05). b) *LUM* war auf mRNA-Ebene in 47 % einer AML BM-MSC Kohorte (ED, n=76) gegenüber der Kontrollkohorte der GS BM-MSC (n=10) zweifach überexprimiert. c) In einem Western Blot (5 min exponiert, AML BM-MSC: n=6, GS BM-MSC: n=2) waren äquivalente bis geringfügig stärkere Signalstärken für Lumican (ca. 50 kDa) in AML BM-MSC Proben feststellbar. Darüber hinaus waren weitere geringfügige Signale zwischen 35 kDa und 100 kDa erkennbar.

Die *LUM*-Expression auf mRNA Ebene in AML BM-MSC korrelierte mit keinem klinischen Parameter (Daten nicht gezeigt). Zwecks funktioneller Untersuchung einer Überexpression von Lumican in der AML-Mikroumgebung wurden, wie in 3.3.9.2 beschrieben, zunächst sechs stabil pCMV-LUM-transfizierte HS-5 Kulturen generiert (pLUM 1 - pLUM 6).

Lumican war in diesen pLUM 1 – pLUM 6 auf mRNA Ebene in frühen Passagen (p < 10) zwischen  $8,3*10^3$ - und  $1,3*10^4$ - fach gegenüber den Leervektorkontrollen überexprimiert (pLeer-Kontrollen, n=2). In späteren Passagen (p > 25) wurde eine geringere Überexpression detektiert ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ :  $0,95*10^2$ - $1,9*10^3$ ; vgl. Abb. 34 a). Auch auf Proteinebene war Lumican in pLUM 2 – pLUM 6 deutlich überexprimiert, hingegen war das Signal für Lumican sowie  $\beta$ -Actin für pLUM 1 in diesem Western Blot schwächer und darüber hinaus waren weitere Signale zwischen 15-140 kDa erkennbar (vgl. Abb. 34 b). Die durchflusszytometrischen Untersuchungen zeigten zum einen eine Überexpression in pLUM 1 – pLUM 6, zum anderen Subpopulationen mit unterschiedlicher Lumican-Alexa488 Signalintensität (vgl. Abb. 34 c).



Abb. 34: Expression von Lumican in stabil pCMV-LUM-transfizierten HS-5 Zellen (pLUM 1 – pLUM 6). Gezeigt ist a) die *LUM*-Expressionsanalyse auf mRNA Ebene gegenüber pLeer-Kontrollen (n=2), mit fortschreitender Kultivierung (> p 25) nahm die *LUM*-Überexpression ab. b) Ein Western Blot zeigte Lumican auf Proteinebene deutlich überexprimiert, das Signal für pLUM 1 war hier schwächer und darüber hinaus waren weitere Signale zwischen 15 und 140 kDa erkennbar (Kontrolle: untransfizierte HS-5 Zellen) c) Die durchflusszytometrische Messung ergab, dass Lumican in pLUM 1 – pLUM 6 gegenüber der pLeer-Kontrolle überexprimiert vorlag, es waren weiterhin Subpopulationen mit unterschiedlicher Intensität für Lumican-Alexa488 präsent.

Ein WST-1 Proliferationsassay der pLUM-Kulturen in einem Zeitverlauf von 72 h zeigte ein stetig steigendes Signal für sämtliche Ansätze binnen der ersten 48 h und ein abfallendes Signal und geringere Proliferation der pLUM-Ansätze im letzten Zeitintervall (vgl. Abb. 35 a, \*\*p-Wert < 0,01, t-Test). In einer Gesamtzellzahlbestimmung waren in dem Zeitraum von 48 h nach Initiation des Experiments eine geringfügige Proliferation der pLUM-Ansätze erkennbar. Darüber hinaus stieg hier die Zellzahl im letzten Zeitintervall. Im Zeitverlauf waren in diesem Ansatz der Gesamtzellzahlbestimmung jedoch zu allen untersuchten Zeitpunkten signifikant geringere Zellzahlen und eine beeinträchtige Proliferation in pLUM-Ansätzen im Vergleich zu pLeer-Kontrollen ersichtlich (\*\*p-Wert < 0,01, \*p-Wert < 0,05, t-Test, vgl. Abb. 35 b).



Abb. 35: Untersuchung der Proliferation in einem Zeitverlauf von 72 h für pLUM 1 – pLUM 6 sowie pLeer-Kontrollen (n=2). In a) ist ein WST-1 Proliferationsassay mit jeweiligen Mittelwerten und SD für pLUM (n=4) und pLeer (n=2) gezeigt; im letzten Zeitintervall des Assays lag ein geringeres Signal für vitale und proliferierende Zellen der pLUM-Ansätze vor. Abschnitt b) zeigt die Gesamtzellzahlbestimmung (pLUM: n=5, pLeer: n=2, Mittelwerte und SD), welche signifikant geringere Zellzahlen und verlangsamte Proliferation der pLUM-Ansätze demonstrierten (\*\*p-Wert < 0,01, \*p-Wert < 0,05, t-Test). In der Gesamtzellzahlbestimmung war eine steigende Zellzahl im letzten Zeitintervall des Experiments erkennbar.

Darüber hinaus ging die Überexpression von Lumican mit einer Alteration der Zellmorphologie einher. Die Zelllinie HS-5 ist gekennzeichnet durch eine spindelartige Morphologie, im Falle sämtlicher pLUM-Ansätze wurde hingegen eine abgerundete bzw. abgeflachte und vergrößerte Morphologie beobachtet. Dies ging mit der Lumican-Expression und der klonalen Beschaffenheit der Kulturen in durchflusszytometrischen Untersuchungen einher (vgl. exemplarisch Abb. 36).



Abb. 36: Exemplarische durchflusszytometrische Untersuchungen sowie mikroskopische Aufnahmen (20 x vergrößert) zweier pLUM-Ansätze sowie einer pLeer-Kontrolle. Abschnitt a) zeigt pLUM 5 mit einer durchflusszytometrischen Untersuchung der Lumican-Expression (blau) im Vergleich zur pLeer-Kontrolle (grün) mit einer heterogenen subklonalen Beschaffenheit sowie eine mikroskopische Aufnahme dieser Kultur. Die Morphologie der Kultur stellte sich heterogen mit sowohl abgerundeten Zellen (schwarzer Pfeil), vergrößerten (roter Pfeil) sowie spindelartigen Zellen dar. Abschnitt b) zeigt pLUM 6 mit einer homogenen *LUM*-überexprimierenden Population in der durchflusszytometrischen Untersuchung, in dieser Kultur war eine annähernd vollständig abgerundete sowie vergrößerte Morphologie, verglichen mit der spindelartigen Morphologie der pLeer-Kontrolle (c), zu erkennen.

Zusammenfassend ging diesen initialen Untersuchungen zufolge die Überexpression von Lumican in HS-5 Zellen mit einer Alteration der Proliferation und Morphologie einher.

Nach diesen Experimenten konnten frühe Passagen der pLUM 1 – pLUM 6 Kulturen nach Cryokonservierung lediglich mit einer Viabilität < 10 % in die adhärente Zellkultur zurückgebracht werden. Für pLeer-Kontrollen lag nach Cryokonservierung hingegen eine Zellviabilität von > 60 % vor (mikroskopische Kontrolle, Daten nicht gezeigt). Wie in 3.3.9.2 beschrieben, wurden weitere stabil pCMV-LUM-transfizierte HS-5 Kulturen (pLUM 7 – pLUM 14) generiert und diese zeigten gegenüber den pLUM 1 - pLUM 6 (s.o.) eine vielfach geringere *LUM*-Überexpression (vgl. Abb. 37).

Für drei dieser Kulturen (pLUM 10, pLUM 11, pLUM 12) wurde auf mRNA-Ebene eine mindestens zweifache *LUM*-Überexpression gegenüber den pLeer-Kontrollen (n=3) festgestellt. Die übrigen pLUM-Ansätze zeigten eine geringe bis fehlende (0,3- bis 1,4-fache) *LUM*-Überexpression im Kontrast zu pLeer-Kontrollen (vgl. Abb. 37 a). Auf Proteinebene wurde eine geringfügige Überexpression festgestellt (vgl. Abb. 37 b). Dieser Western Blot zeigte geringfügig intensivere  $\beta$ -Actinsignale für pLUM 11 – pLUM 13 und keine weiteren Signale. Durchflusszytometrische Untersuchungen demonstrierten eine Lumican-positive Population, auch hier waren Subpopulationen mit fehlender bis geringfügiger Lumican-Überexpression präsent (vgl. Abb. 37 c).


Abb. 37: Expression von Lumican in stabil pCMV-LUM-transfizierte HS-5 Zellen (pLUM 7- pLUM 13). a) einer *LUM*-Expressionsanalyse auf mRNA-Ebene sämtlicher Kulturen gegenüber den pLeer-Kontrollen (n=3) war in pLUM 10, pLUM 11 und pLUM 12 eine >2-fache *LUM*-Expression ersichtlich. b) Ein Western Blot machte ein intensiveres Signal für Lumican (ca. 50 kDa) und geringfügige Überexpression für pLUM 7 - pLUM 13 gegenüber der pLeer-Kontrollen erkennbar, hierbei war das Signal der  $\beta$ -Actin-Kontrolle für pLUM 11 – pLUM 13 ebenfalls intensiver (Kontrolle: untransfizierte HS-5 Zellen). c) Durchflusszytometrische Untersuchungen verdeutlichten, dass in diesen pLUM-Ansätzen Subpopulationen mit fehlender bzw. mit geringfügiger *LUM*-Überexpression präsent waren.

Sämtliche dieser Kulturen zeigten eine verlangsamte Proliferation. In einem WST-1 Proliferationsassay wurde ein stetiger Anstieg des Signals für sämtliche Ansätze in einem Zeitraum über 72 h detektiert, jedoch zeigten pLUM-Kulturen mit mindestens zweifacher *LUM*-Überexpression auf mRNA Ebene (n=3) ein signifikant geringeres Signal gegenüber den pLeer-Kontrollen (n=4, vgl. Abb. 38, \*p-Wert 0,03, Mann Whitney U Test). Selbiges galt für Kulturen mit geringer bis fehlender *LUM*-Überexpression (n=4, vgl. Abb. 38, \*p-Wert < 0,05, Mann Whitney U Test). Die Konfluenz sämtlicher Ansätze betrug 70-90 % bei Abbruch des Versuchs (mikroskopische Kontrolle, Daten nicht gezeigt). Die Gesamtzellzahlbestimmung resultierte in einer niedrigeren Zellzahl für pLUM-Ansätze mit mindestens zweifacher Überexpression (n.s., p-Wert 0,06). Die Gesamtzellzahlbestimmung für pLUM-Ansätze mit 0,3- bis 1,4-facher *LUM*-Überexpression war signifikant verschieden von pLeer-Kontrollen (\*p-Wert < 0,05, Mann-Whitney U Test, vgl. Abb. 38).



Abb. 38: Untersuchung der Proliferation der pLUM 7 – pLUM 13. Diese pLUM-Ansätze sind in der Darstellung unterteilt in pLUM mit > 2-facher *LUM*-Überexpression (n=3) sowie pLUM-Ansätze mit 0,3- bis 1,4-facher *LUM*-Expression (n=4) auf mRNA-Ebene gegenüber den pLeer-Kontrollen (n=3). In zwei pLUM-Ansätzen waren relativ zu den p-Leer-Kontrollen weniger *LUM*-Transkripte detektierbar ( $2^{-\Delta\Delta Ct} < 1$ ). Abschnitte a) und b) zeigen ein WST-1 Proliferationsassay mit einem stetigen Anstieg des Signals für sämtliche Ansätze über den Zeitraum von 72 h. Es waren hierbei signifikant geringere Signale für pLUM-Ansätze bestimmt worden (\*p-Wert < 0,05). Die Abschnitte c) und d) zeigen eine Bestimmung der Gesamtzellzahl über 72 h mit geringeren Zellzahlen und beeinträchtiger Proliferation der pLUM-Ansätze (> 2-fache *LUM*-Expression: n.s. p-Wert 0,06, \*p-Wert < 0,05, Mann Whitney U Test).

Zusammenfassend zeigte sich in beiden - zeitlich unabhängigen – Transfektionen von HS-5 Zellen (pLUM 1 – pLUM 6 bzw. pLUM 7 – pLUM 13) der Phänotyp der beeinträchtigten Proliferation. Die Apoptoseraten in sämtlichen pLUM-Ansätzen waren hierbei nicht signifikant verschieden von pLeer-Kontrollen (vgl. Abb. 39).



Abb. 39: Annexin V- Apoptoseassay für pLUM (n=13) zur Überprüfung der Apoptoserate in HS-5 bei LUM-Überexpression im Vergleich zu pLeer-Kontrollen. Gezeigt sind pLUM-Ansätze generiert aus zwei unterschiedlichen Transfektionen (pLUM 1 – pLUM 6 bzw. pLUM 7 – pLUM 13) mit Mittelwerten und SD. Hierbei war der prozentuale Anteil apoptotischer (Annexin V-FITC<sup>+</sup>) und nekrotischer (Annexin V-FITC<sup>+</sup>/7-AAD<sup>+</sup>) Zellen sowohl für pLeer-Kontrollen als auch pLUM-Ansätze der ersten Transfektion höher als in den Kulturen der zweiten Transfektion (mindestens zweifache *LUM*-Expression (>2); 0,3- bis 1,4-fache *LUM*-Expression (< 2)). Die Überexpression von Lumican hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Apoptoserate in HS-5 Zellen.

Um den Einfluss von Lumican auf die Adhäsion leukämischer Zelllinien an ein Stromabett zu untersuchen, wurde ein Adhäsionsassay in einem Kokulturansatz mit pLUM-Ansätze und fluoreszenzmarkierten KG-1a bzw. K-562 Zellen durchgeführt. KG-1a Zellen zeigten nach Ablauf der Kokultivierung eine Viabilität von 50 % (vgl. Abb. 40 a), K-562 eine Viabilität von 35 % (vgl. Abb. 40 b).

Hierbei war der prozentuale Anteil adhärierender KG-1a und K-562 Zellen in den pLeer-Kontrollen höher im Kontrast zu einem Lumican-überexprimierenden Stromabett. Darüber hinaus lag der prozentuale Anteil adhärierender Zellen in den nicht-kokultivierten Ansätzen (ohne Stromabett) höher als der Anteil der kokultivierten Ansätze. (vgl. Abb. 40 c).



Abb. 40: Vybrant<sup>TM</sup> Adhäsionsassay mit fluoreszenzmarkierten KG -1a sowie K-562 Zellen in Kokultur mit einem Stromabett (pLUM, pLeer-Kontrollen). Gezeigt sind a) die jeweilig relativen Fluoreszenzsignale der initial zugegebenen KG-1a Zellen (*Input*), der adhärierenden Zellen sowie die Viabilität der KG-1a Zellen im Kokulturansatz (50 % vital). Abschnitt b) zeigt die äquivalenten Werte der K-562 Zellen, diese wiesen eine Viabilität von 35 % auf. Abschnitt c) zeigt die prozentualen Anteile adhärierender Zellen im Kokulturansatz sowie im Ansatz ohne Stromabett (w/o HS-5). Hierbei waren die Signale der pLUM-Ansätze und pLeer-Kontrollen nicht signifikant verschieden. Weiterhin zeigten die Ansätze w/o HS-5 einen höheren Anteil adhärierender Zellen als die kokultivierten Ansätze.

Zusammenfassend beeinträchtigte eine *LUM*-Überexpression die Proliferation der HS-5 Zellen und alterierte die Morphologie dieser spindelartigen Zellen, welche abgerundet und abgeflacht sowie teils vergrößert erschien. Eine Überexpression von *LUM* hatte weiterhin keinen signifikanten Einfluss auf eine Apoptoserate in HS-5 Zellen und zeigte im Rahmen der durchgeführten Experimente keine Auswirkung auf die Adhäsion von KG-1a und K-562 Zellen an ein Lumican-überexprimierendes Stromabett.

Ergebnisse

#### 4.4.3 KG-1a und K-562 Zellen in einem Kokulturansatz mit AML BM-MSC unter 5-Azazytidinbehandlung

In einem Kokulturansatz mit primären AML BM-MSC und KG-1a bzw. K-562 Zellen waren in kokultivierten Ansätzen zumeist weniger apoptotische KG-1a bzw. K-562 Zellen vorhanden, als in den monokultivierten Kontrollen.

Für K-562 Zellen waren - mit Ausnahme der 5-Azazytidin Behandlung der AML011 (1  $\mu$ M) sowie der zugehörigen unbehandelten Kontrolle - in sämtlichen 5-Azazytidin-behandelten Kokulturansätzen im Verhältnis zu den monokultivierten Kontrollen weniger apoptotische K-562 Zellen präsent.

Auch für KG-1a Zellen war überwiegend ein protektiver Effekt erkennbar, hierbei ging in vier aus sieben Fällen die Protektion für KG-1a bei steigender Konzentrationen des Wirkstoffs ( $\geq 1 \mu M$  5-Azazytidin) verloren (vgl. Abb. 41).



Abb. 41: Protektion von KG-1a Zellen (n=7) sowie K-562 Zellen (n=4) durch kokultivierte primäre AML BM-MSC unter der Behandlung mit 5-Azazytidin. Es sind weiterhin unbehandelte Kontrollen gezeigt (u). Für KG-1a war überwiegend eine Protektion durch die Kokultur mit AML BM-MSC gegeben (Ratio < 1), hingegen ging diese in vier aus sieben Fällen mit höherer Wirkstoffkonzentration verloren. Für K-562 ergab sich für sämtliche Kokulturansätze eine Protektion der Zellen vor der apoptoseinduzierenden Wirkung von 5-Azazytidin, mit Ausnahme der AML011 (unbehandelt sowie  $[1 \,\mu M]$  5-Azazytidin, AML-Identifikationsnummern sind korrespondierend zu Tab. DiskE1 im Anhang)

### 5. Diskussion

Die Analyse molekularer Alterationen in AML-Zellen hat viele Erkenntnisse über das Spektrum der zyto-und molekulargenetischen Aberrationen der AML erbracht, jedoch blieben molekulare Alterationen der Nischenzellen weitestgehend unergründet. Die vorliegende Arbeit zeigt eine umfassende Analyse von AML BM-MSC und Alterationen auf mehreren molekularen Ebenen. Im Folgenden soll die mögliche Rolle dieser Alterationen in der AML-Pathogenese erläutert werden. Weiterhin werden die genetische Stabilität der AML BM-MSC in der *in vitro*-Kultur und bereits bekannte Targets der Stroma-Leukämie Interaktion diskutiert. Die Gewinnung von BM-MSC - insbesondere der unreifen mesenchymalen Stammzelle - ist Gegenstand aktueller Forschung und die Definition dieser Population anhand von Oberflächenmarkern wird kontrovers diskutiert.

# 5.1 Die *in vitro*-Expansion von primären BM-MSC: Kontroversen über die Identifizierung, Isolierung und Charakterisierung einer mesenchymalen Stammzelle

Nicht nur ihre zentrale Rolle in der Regulation der Hämatopoese (vgl. 1.3), auch ihr Einsatz in der regenerativen Medizin machen MSC zum Gegenstand aktueller Forschung und zahlreicher klinischer Studien. <sup>199, 200</sup> Die Zellpopulation lässt sich durch ihre Eigenschaft der Plastikadhärenz reinigen und *in vitro*-expandieren und darüber hinaus zeigt sie aufgrund ihrer überwiegend immunosuppressiven Eigenschaften ein hohes Potential zur klinischen Anwendung in regenerativen Therapieansätzen. <sup>63, 201, 202</sup> Jedoch brachte die extensive Erforschung Konfusionen über die Begrifflichkeit der unreifen mesenchymalen Stammzelle, ihren Stammzellcharakter und ihren Immunophänotyp mit sich. <sup>63</sup> Wie auch bereits in 1.3 erläutert, ist die mesenchymale Stammzelle eine postnatale, multipotente Zelle, welche die Eigenschaft des *self-renewals* aufzeigt, <sup>62</sup> die vor allem im Knochenmark anzufinden ist und Knochen und Skelett regeneriert. Dies geht mit ihrer Rolle in der Orchestrierung der Hämatopoese einher. <sup>63</sup> Demgegenüber steht die Sichtweise, diese Population sei ubiquitär in Bindegeweben präsent und durch Minimalkriterien definiert. <sup>72</sup> Der Stammzellcharakter sowie das Vorkommen dieser Zellen in unterschiedlichen adulten und neonatalen Geweben wurden hinreichend diskutiert. Mit dem Ursprungsgewebe gingen demnach Varianzen in der Frequenz,

im Potential zur Kolonieformierung und letztlich auch in deren Eigenschaften, ein Rezipientengewebe zu modulieren, einher (vgl. 1.3). <sup>63, 71, 203, 204</sup>

Zur Abgrenzung dieser unreifen Stammzellpopulation von der Gesamtpopulation der *in vitro*expandierten BM-MSC (vgl. 1.3, S. 8) wird im folgenden Kapitel der Begriff der mesenchymalen Stammzelle ausgeschrieben und dargelegt:

- a. welchen Immunophänotyp mesenchymale Stammzellen in vivo und in vitro zeigen,
- b. warum eine Expansion *in vitro* zwecks einer Untersuchung molekularer Alterationen f
  ür AML BM-MSC eine geeignete Methode darstellt und welche Einfl
  üsse die Heterogenit
  ät dieser Kulturen begr
  ünden und
- c. welche weiteren Marker der Selektion klonogener mesenchymaler Stammzellen dienen könnten.

a) Der Immunophänotyp der mesenchymalen Stammzelle ist im Vergleich zu der *in vitro*expandierten Population abweichend: Bspw. koexprimieren unreife mesenchymale Stammzellen den lymphatischen Marker CD45 *in vivo* (CD45<sup>niedrig</sup> CD271<sup>hoch</sup>). <sup>205</sup> Hingegen exprimieren BM-MSC *in vitro* keinerlei hämatopoetische Marker wie bspw. CD31 (PECAM-1), CD34, CD45 und CD133 (Prominin-1). <sup>206</sup> Weiterhin wurde die Expression von CD44 (HCAM) durch mesenchymale Stammzellen *in vivo* einer Studie zufolge widerlegt. <sup>207</sup> Kultivierte BM-MSC exprimieren jedoch das Antigen CD44 sowie u. a. CD29 (Integrin  $\beta$ -1), CD73, CD90 und CD105 (vgl. 1.3). <sup>206</sup> Für den *in vivo*-Immunophänotyp der mesenchymalen Stammzelle wurde das Antigen CD271 (*NGFR*) am besten charakterisiert. <sup>208-212</sup> CD271 könnte also als ein möglicher Oberflächenmarker für eine Selektion mesenchymaler Stammzellen verwendet werden.

b) Zu Beginn der vorliegenden Arbeit wurden Experimente zur CD271<sup>+</sup> immunoselektiven Anreicherung, basierend auf magnetische *beads*, durchgeführt (CD271 *microbeads* nach Miltenyi Biotec, Daten nicht gezeigt). Bei der spezifischen Anreicherung der CD271<sup>+</sup> Zellen lag die Limitation in der Untersuchung des malignen Knochenmarks und der Infiltration durch leukämische Zellen. CFU-Fs der mesenchymalen Stammzellen liegen mit einer Frequenz von 1-10 pro 100.000 MNCs im humanen Knochenmark vor. <sup>213, 214</sup> Durch die AML und die ernorme Blastenlast, insbesondere bei ED und einem REZ, wurde diese Frequenz vermutlich

Diskussion

beeinflusst, sodass ein solcher immunoselektiver Ansatz limitiert war. CD271<sup>+</sup> Zellen konnten demzufolge nicht in hoher Reinheit gewonnen werden (Daten nicht gezeigt).

Eventuell stellten auch die hochvariablen Frequenzen von CD271<sup>+</sup> Zellen, welche sich im Laufe der Charakterisierung der frühen Passagen der AML BM-MSC Kultur zeigten, eine Limitation bei der Gewinnung dieser Zellpopulation dar (vgl. 4.1.3). Obschon hinreichend gezeigt wurde, dass die Expression von CD271 in einer *in vitro*-Kultur graduell verloren geht, <sup>208, 215, 216</sup> war die CD271-Expression der im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten AML BM-MSC verglichen mit der Expression der maturen Marker CD73 und CD105 wesentlich variabler (vgl. Abb. 11, S. 65, zur Rolle alterierter Proportionen von BM-MSC Subpopulationen s. a. 5.2.1).

Gegenüber diesem immunoselektiven Ansatz stellte eine Reinigung und Expansion klonogener BM-MSC *in vitro* durch ihre Eigenschaft der Plastikadhärenz das geeignete Mittel dar, um ein breites Spektrum an AML BM-MSC Proben gewinnen und charakterisieren zu können. Die CD33<sup>-</sup> CD45<sup>-</sup> CD73<sup>+</sup> CD105<sup>+</sup> CD271<sup>+/-</sup> BM-MSC konnten in hoher Reinheit (> 95 %) gewonnen werden (vgl. 4.1.2.). Die Charakterisierung der frühen BM-MSC Passagen der vorliegenden Arbeit ergab, dass ab dem Zeitpunkt p4 - den in 1.3 beschriebenen Minimalkriterien zufolge <sup>72</sup> - reine BM-MSC Populationen vorlagen (vgl. Abb. 11, S. 65). Zudem konnte bei Expansion bis p4 eine ausreichende Ausbeute für nachfolgende Experimente gewonnen werden. Diese Expansionszeit von ca. vier Wochen ging mit einer kürzlich veröffentlichten Studie zur Kultivierung von MSC für die klinische Anwendung einher.<sup>217</sup>

In 18 % der AML BM-MSC Kulturen waren CD33<sup>+</sup> Zellen mit makrophagenartiger Morphologie präsent (vgl. Abb. 11, S. 65). CD33 wird von Makrophagen exprimiert. <sup>218</sup> Makrophagen zeichnen sich durch eine ausgeprägte Plastikadhärenz aus, was die negative Selektion dieser Zellpopulation erschwerte. Der Heterogenität der AML BM-MSC Kulturen - bspw. hinsichtlich der variablen CD271<sup>+</sup> Population oder Präsenz von Makrophagen – könnten die folgenden Einflüsse zugrunde liegen: i) der Donor selbst und Qualität des Aspirats, ii) das heterogene Zeitintervall der initialen Adhärenz, iii) der Zeitpunkt des Entfernens nicht-adhärenter Zellen sowie der Einfluss der Kultivierung selbst und iv) funktionelle Heterogenität der einzelnen Subpopulationen der BM-MSC. <sup>63, 219-221</sup> In einer Studie hatten Whitfield und Kollegen durch fluoreszenzmarkierte Kulturen in Einzelzellauflösung gezeigt, dass durch unterschiedliche Proliferationsraten einige der Kultur-initiierenden Klone die BM-MSC Kultur

dominierten und dieser selektive Druck andere Subklone verdrängte.<sup>219</sup> Die Untersuchung der klonalen Beschaffenheit der Kulturen mittels des HUMARA Klonalitätsassay ließ Heterogenität der Kulturen der vorliegenden Arbeit mit vorwiegender Multiklonalität in Proben gesunder Spender erkennen (vgl. 4.1.5). Dieses Assay reflektierte einen selektiven Druck, der möglicherweise in den AML BM-MSC Kulturen vorlag. Eine vermutlich reduzierte Anzahl Kultur-initiierender BM-MSC Klone in den Knochenmarkaspiraten von AML-Patienten (s. a. 5.2.) könnte sich ebenfalls in der resultierenden Klonalität nach erfolgter in vitro-Expansion widerspiegeln. Die allelspezifische Amplifikation dieses Klonalitätsassays berücksichtigt jedoch nicht i) eine möglicherweise divergente Effizienz der Amplifikation verschiedener Allelgrößen <sup>191</sup> ii) die Möglichkeit einer oligoklonalen Beschaffenheit der Kultur mit demselben aktiven Allel und iii) Klone niedriger Frequenz, welche eventuell nicht detektiert werden. Außerdem könnte dieses Assay durch den Einfluss der in vitro-Kultur auf den Methylierungsstatus des X-Chromosoms limitiert gewesen sein. Änderungen des DNA-Methylierungsstatus des X-Chromsoms durch eine in vitro-Expansion wurden bereits beschrieben.<sup>222</sup> Die genauere Auflösung der Klonalität wäre mit der Amplifikation mehrerer polymorpher Loci höher, wie bspw. eine Arbeit von Mossner et al. zeigte. <sup>223</sup> Die Heterogenität und Bedeutung der klonalen Zusammensetzung im Kontext der identifizierten Mutationen wird in 5.3.1 diskutiert.

c) Wie oben erläutert, stellt CD271 einen Marker für klonogene unreife mesenchymale Stammzellen dar, jedoch scheinen auch CD271<sup>+</sup> Zellen keine homogene Population zu sein. So wurden CD271<sup>+</sup>CD140a<sup>-</sup> (PDGFRα) Zellen gegenüber einer CD271<sup>+</sup>CD140a<sup>+</sup> Subpopulation eine höhere Kapazität für den HSC-Support *ex vivo* nachgewiesen. <sup>201, 224</sup> Darüber hinaus korrelierte die Koexpression von CD146 (MCAM), einem Marker für perivaskuläre MSC, mit dem Alter. So waren CD271<sup>hoch</sup> CD146<sup>-</sup> Zellen überwiegend in Erwachsenen präsent, während die CD271<sup>hoch</sup> CD146<sup>+</sup> Subpopulation überwiegend in kindlichem und fötalem Knochenmark anzufinden war. <sup>225</sup>

Neben CD271 wurden weitere Marker beschrieben, die klonogene mesenchymale Stammzellen anzureichern vermögen: MSCA-1 (*mesenchymal stem cell antigen-1*) lag einer Studie zufolge koexprimiert auf CD271<sup>+</sup> CD56<sup>+/-</sup> (NCAM) Zellen vor und kennzeichnete eine Population mit hohem Proliferationspotential. <sup>226</sup> MSCA-1 wurde in einer weiteren Studie als identisch zu der Alkalinen Phosphatase (*tissue nonspecific alkaline phosphatase*; TNAP) gezeigt. <sup>227</sup>

Weiterhin wurde CD146 als Marker für eine Selektion beschrieben. Ungefähr 50 % der CD146<sup>+</sup> CFU-F waren in einer Studie kongruent mit multipotenten mesenchymalen Stammzellen, die eine Selbsterneuerungskapazität aufzeigten. <sup>63, 228</sup> STRO-1 wurde als ein weiterer Marker zur Selektion klonogener BM-MSC gezeigt, dieser Marker scheint allerdings auch von MNC-Subpopulationen exprimiert zu werden. <sup>229</sup>

Für sämtliche dieser Marker für die prospektive Gewinnung einer mesenchymalen Stammzellpopulation ist jedoch davon auszugehen, dass diese eventuell auch durch reifere mesenchymale Subpopulationen exprimiert werden. <sup>63</sup> Eine kürzlich veröffentlichte Studie definierte eine CD45<sup>-</sup> Ter119<sup>-</sup> CD31<sup>-</sup> CD166<sup>-</sup> CD146<sup>-</sup> *Stem cell antigens* (Sca)-1<sup>+</sup> Population als mesenchymale Vorläuferzellen und diskutierte die mögliche Rolle des Sca-1 in der Hierarchie der Differenzierung der mesenchymalen Linien. Lediglich Sca-1<sup>+</sup> Zellen konnten demnach CXCL12-produzierende Zellen hervorbringen, die korrespondierenden CD146<sup>+</sup> bzw. CD166<sup>+</sup> Zellen formierten nach Transplantation lediglich Knochenzellen. Sca-1<sup>+</sup> Zellen lokalisierten in der perivaskulären Nische, überlappten jedoch nicht mit maturen CAR-Zellen oder Nestin<sup>+</sup> Zellen dieser Nischendomäne. <sup>230</sup> Diese Studie berücksichtigte jedoch keinen der weiteren beschriebenen Marker für unreife mesenchymale Stammzellen wie CD271 oder MSCA-1 (s. o.).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass für die vergleichende molekulare Charakterisierung von AML BM-MSC einer größeren Patientenkohorte die *in vitro*-Expansion nach Reinigung durch Plastikadhärenz ein geeignetes Mittel darstellte, um diese Zellpopulation in hoher Reinheit und mit ausreichender Ausbeute zu gewinnen. Eine immunoselektive Isolation von BM-MSC würde die genaue Charakterisierung einer Startpopulation erlauben und unerwünschte Interaktion mit kokultivierten hämatopoetischen Zellen ausschließen. Einige bereits identifizierte Marker (s. o.) vermögen klonogene unreife mesenchymale Stammzellen anzureichern, jedoch wird die Definition eines allgemeinen mesenchymalen Progenitor kontrovers diskutiert und Studien greifen hier auf unterschiedliche Kombinationen von Oberflächenmarkern zurück.

Ein Ansatz der Gewinnung einer CD45<sup>niedrig</sup> CD271<sup>+</sup> MSCA-1<sup>+</sup> Population mittels Durchflusszytometrie-basierter Sortierung mit anschließender Gesamtgenomamplifizierung wird im Ausblick ausführlicher diskutiert (vgl. 5.4).

# 5.2 Funktionelle Aberrationen in BM-MSC: die remodulierte HSC-Nische bei malignen Erkrankungen der Hämatopoese

Die Infiltration des Knochenmarks durch leukämische Zellen beeinflusst nicht nur - wie in 5.1 erläutert - die Frequenz der BM-MSC, sondern Studien wiesen auch darauf hin, dass durch die Einflüsse von Neoplasien die Eigenschaften der HSC-Nische remoduliert werden. Die Hypothese, dass mit einer malignen hämatologischen Erkrankung drastische Veränderungen der HSC-Mikroumgebung einhergingen, die wiederum die Progression der Erkrankung begünstigten, wird zunehmend untermauert.

Studien zu dieser *"self-reinforcing"* malignen HSC-Nische beschrieben funktionelle und morphologische Veränderung, <sup>137, 138, 140</sup> welche das Fortbestehen und womöglich auch die klonale Expansion von LSCs begünstigten (vgl. 1.4).<sup>139, 231</sup> LSCs lokalisierten Studien zufolge sowohl in der endostealen Nische <sup>232</sup> als auch in der vaskulären Nische. <sup>111</sup>

Als eine mögliche Folge der Infiltration mit neoplastischen Zellen wurden abnorme Proportionen bestimmter BM-MSC Subpopulationen beschrieben. Eine Studie zeigte ein ausgedehntes Netzwerk von CD271<sup>+</sup> Zellen anhand von Immunohistofärbungen der Knochenmarkausstriche von MDS-Patienten. Diese CD271<sup>+</sup> Zellen sekretierten CXCL12 hochgradig, was zu einer Imbalance dieses wichtigen Nischenfaktors (vgl. 1.3) führen könnte.<sup>233</sup> Dies wäre im Kontext der hochvariablen CD271<sup>+</sup> Populationen der durchflusszytometrischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit evident und wiese auf variable Frequenzen immaturer CD271<sup>+</sup> Zellen in den Knochenmarkaspiraten von Patienten mit myeloischen Neoplasien hin (vgl. Abb. 13, S. 68).

Für BM-MSC von AML-, T-Zell ALL- sowie MDS-Patienten wurde niedrigere Kapazitäten zur Kolonieformierung (CFU-F) und somit reduzierte Proliferationskapazitäten gezeigt. <sup>146, 234-237</sup> Auch in der vorliegenden Arbeit war für AML BM-MSC eine längere initiale Phase der *in vitro*-Kultur (p0) beobachtet worden (vgl. 4.1.1, S. 62). Darüber hinaus waren 18 % der evaluierten AML BM-MSC Kulturen der vorliegenden Arbeit bereits vor dem Erreichen der p4 seneszent (vgl. 4.1.1). Zunehmende Zellgröße sowie Zellgranularität kennzeichnen beginnende oder bereits ausgeprägte Seneszenz und diese morphologische Veränderung wurden bereits in AML BM-MSC Kulturen beobachtet. <sup>237-239</sup> Auch andere Studien beschrieben seneszente BM-MSC in Knochenmarkaspiraten von AML-und T-ALL-Patienten. <sup>235, 236</sup>

Die Daten dieser Studien sowie die in der vorliegenden Arbeit gezeigten heterogenen Zeitintervalle der *in vitro*-Expansion sowie vermehrte Seneszenz in AML BM-MSC Kulturen wiesen auf eine alterierte Proliferationskapazität, insbesondere zum Zeitpunkt der ED, hin.

Darüber hinaus zeigten AML BM-MSC der vorliegenden Arbeit in einer Kohorte von fünf AML-Patienten stets eine ausgeprägte osteozytäre Differenzierungskapazität (vgl. Abb. 14, S. 69). Andere in vitro-Studien im Kontext myeloischer Neoplasien beobachteten hingegen ein vermindertes osteozytäres Differenzierungspotential. <sup>146, 234</sup> Eine weitere Studie beschrieb ebenfalls verstärkte adipozytäre Differenzierung.<sup>238</sup> Diese Diskrepanz, angesichts einer kleinen Präsenz Kohorte, könnte auf die heterogene bestimmter Vorläuferzellen in Knochenmarkaspiraten sowie Heterogenität der BM-MSC Kulturen (s. o. bzw. 5.1) zurückgeführt werden.

Alterationen in AML BM-MSC der vorliegenden Arbeit korrelierten mit keinem klinischen Parameter (Daten nicht gezeigt). Kim et al. brachten eine remodulierte Nische erstmals in Verbindung mit dem klinischen Verlauf von AML-Patienten. In dieser Studie war eine CD146<sup>+</sup> perivaskuläre BM-MSC Subpopulation in abnormer Proportion vorhanden und die daraus entstehende Imbalance aus sekretierten Faktoren wie CXCL12 und JAG-1 konnte mit einer verkürzten Überlebenszeit korreliert werden.<sup>236</sup>

Zusammenfassend demonstrierten Studien morphologische und funktionelle Remodulierungen der HSC-Nische im Kontext bestimmter Neoplasien, d. h. hinsichtlich der Proliferations- und Differenzierungskapazitäten der BM-MSC und der Proportionen bestimmter BM-MSC Subpopulationen. Auch die in der vorliegenden Arbeit evaluierten AML BM-MSC Kulturen zeigten eine vermehrte Seneszenz und eine hohe Heterogenität hinsichtlich der Präsenz einer CD271<sup>+</sup> Subpopulation. Auch könnten solche Alterationen mit einem aberranten HSC-Support einhergehen. Alterierte Kapazitäten zum HSC-Support *ex vivo* wurde bereits für Langzeit-Kokulturen von HSCs mit sowohl MDS BM-MSC als auch AML BM-MSC demonstriert. <sup>146,</sup> <sup>234</sup>

Die Erschließung der globalen genetischen, transkriptionellen und epigenetischen Alterationen in AML BM-MSC, die diesem Funktionsverlust weiter zugrunde liegen könnten, würde die Identifizierung alterierter Nischenkomponenten und putativer Targets erlauben. Im Folgenden

Diskussion

soll die mögliche Rolle der in der vorliegenden Arbeit identifizierten molekularen Alterationen der AML BM-MSC erläutert werden.

### 5.3 Molekulare Alterationen in AML BM-MSC und die Stroma-Leukämie Interaktion

Um zukünftig die Stroma-Leukämie Interaktion therapeutisch adressieren zu können, sind insbesondere solche Komponenten und Molekülgruppen von Interesse, die an der direkten Zell-Zell Kommunikation beteiligt sind: z. B. Zytokine wie CXCL12, Adhäsionsmoleküle wie VCAM-1 (vgl. 1.3 bzw. 5.3.4) oder strukturelle Komponenten der Nische, wie das Zytoskelett-Linkerprotein Plectin. Ebenfalls entscheidend sind die Integrität der Nische sowie die genetische Stabilität der zellulären Komponenten der HSC-Mikroumgebung.

#### 5.3.1 Genetische Alterationen in AML BM-MSC und die genetische Stabilität *in vitro*expandierter BM-MSC

Die vorliegende Arbeit beschreibt als erste Studie genetische Alterationen in AML BM-MSC in Einzelbasenauflösung. Die identifizierten genetischen Alterationen in AML BM-MSC zeigten ein unspezifisches Muster ohne rekurrente, nicht dbSNP-annotierte Mutationen (vgl. Tab. DiskE2). Es konnten keine Assoziationen zwischen der Anzahl genetischer Variationen und i) dem Status der Patienten im klinischen Verlauf oder ii) dem Ansprechen der Patienten auf die Initiation der Chemotherapie geschlussfolgert werden (vgl. Abb. 16, S. 73).

Die Mutation (R1801Q) in Exon 31 des *PLEC* Gens war die einzige Mutation im mesenchymalen Kompartiment, die in Verlaufsproben eines Patienten präsent war (AML 3, vgl. Abb. 17, S. 75). *PLEC* codiert für das Zytoskelett-Linkerprotein Plectin, welches in der Organisation des Zytoskeletts eine zentrale Rolle spielt: Durch eine N-terminale Actin-Bindedomäne und eine C-terminale Interaktion mit intermediären Filamenten ist Plectin für zelluläre Prozesse wie die Migration, Proliferation und den Metabolismus bedeutend zu sein. <sup>242</sup> Keimbahnmutationen in *PLEC* wurden im Zusammenhang mit der Erkrankung *Epidermylosis bullosa simplex* (EBS) beschrieben. <sup>243-245</sup> Der Phänotyp dieser Erkankung umfasst Blasenbildung bis zur Ablösung der Epidermis. Charlesworth et al. beschrieben hierzu Mutationen in Exon 31 spezifisch für EBS mit Pylorus Atresie. <sup>246</sup> Deletion des *PLEC* Gens

war postnatal lethal, <sup>247</sup> ein konditionaler *Knockout* (K5-Cre *PLEC*) von *PLEC* in Mäusen resultierte in einem Phänotyp von Blasenbildung, fragiler Epidermis und Anzeichen eines abnormen Metabolismus und Nährstoffmangels. <sup>248</sup> Ein isoformspezifischer, konditionaler KO von *PLEC1a* und *PLEC1d* resultierte in Alterationen wie mitochondrialer Aggregation und reduzierter Zellatmungskapazität. <sup>249</sup> Ein transienter KD in HS-5 Zellen hatte im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch weder einen Effekt auf die Proliferation dieser Zellen noch auf die Apoptoseinduktion (vgl. 4.4.1).

Die gefundene Mutation in *PLEC* war in der zentralen ROD-Domäne des Genprodukts lokalisiert. Die betroffenen AML BM-MSC Proben dieses Patienten zeigten der Definition in Tab. A3 (Anhang S. 178) zufolge eine niedrige *PLEC*-Expression. Bei Sanger-Sequenzierung des spezifischen Locus für acht der 17 in Tab. A3 gezeigten AML BM-MSC mit niedriger *PLEC*-Expression war die *PLEC* Mutation (R1801Q) nicht identifiziert worden (Daten nicht gezeigt). Vermutlich nahm demnach die gefundene Mutation keinen Einfluss auf die *PLEC*-Expression (zur Implikation der identifizierten *PLEC*-Überexpression in der AML-Mikroumgebung, s. a. 5.3.2).

#### Die genetische Stabilität in vitro-expandierter BM-MSC

Neben *PLEC* waren zwei weitere Mutationen in seriellen AML BM-MSC Kulturen im Krankheitsverlauf identifiziert worden (vgl. Abb. 17, S. 75), was darauf schließen ließe, dass diese Mutationen in frühen mesenchymalen Progenitorzellen in diesen Patienten auftraten. Die übrigen genetischen Läsionen gingen also entweder verloren oder wurden im Verlauf der Erkrankung akquiriert. Dem könnte zugrundeliegen, dass i) diese somatischen Mutationen in Subklonen der Nische vorhanden waren, ii) die betroffenen mutierten BM-MSC durch einen selektiven Druck in der *in vitro*-Kultur in weiteren Verlaufsproben nicht mehr präsent waren oder iii) diese Mutationen auch durch eine *in vitro*-Expansion induziert werden könnten. Die Anzahl identifizierter Mutationen (vgl. Abb. 16, S. 73) korrelierte hingegen weder mit Alter der Patienten noch mit der *in vitro*-Kultivierungszeit der AML BM-MSC (Daten nicht gezeigt).

Hinsichtlich der determinierten Klonalität der BM-MSC Kulturen (vgl. Abb. 15, S. 70) müsste davon ausgegangen werden, dass BM-MSC Kulturen teils einem selektiven Druck unterlagen, ein oder wenige Klon/e die Zellpopulation dominierten und rückschlüssig daraus genetische Variationen in wenigen Klonen akkumulieren könnten. Demgegenüber ließe die Verteilung der

Diskussion

VAFs sämtlicher Mutationen (Median 33 %; Spanne 20-75 %, vgl. Anhang Tab. DiskE2) wiederum auf eine subklonale Architektur der Kultur schließen.

Lediglich eine Studie demonstrierte bislang genetische Alterationen von BM-MSC eines einzelnen gesunden Spenders in Einzelbasenauflösung in einer Gesamtgenomsequenzierung (*whole genome sequencing*; WGS). Diese zeigte die Zunahme molekulargenetischer Alterationen im Verlauf der *in vitro*-Expansion. Die BM-MSC dieses Spenders wurden zu den Zeitpunkten der p1, p8 sowie p13 mittels WGS untersucht. Diese Studie zeigte eine deutliche Zunahme von SNVs sowie Indels in p13; dieser Studie zufolge wäre von einer überwiegenden genetischen Stabilität der *in vitro*-Kultur in frühen Passagen (< p8) auszugehen. <sup>250</sup> Die genetische Stabilität während einer *in vitro*-Expansion im Hinblick auf womöglich akquirierte Mutationen könnte durch einen Vergleich zwischen primär-gewonnenen Zellen mit den korrespondierenden *in vitro*-kultivierten Zellen adressiert werden. Dies wurde bereits für MDS BM-MSC in vier Fällen gezeigt, in der CD271<sup>+</sup> Zellen durch durchflusszytometrische Sortierung gewonnen und mittels eines vergleichenden DNA-Hybridisierungsarrays (*microarray-based comparative genomic hybridization* (a-CGH) und Fluoreszenz- *in situ*-Hybridisierung analysiert wurden. In dieser Studie wurden dieselben Variation in unkultivierten (CD271<sup>+</sup> Zellen) und den korrespondierenden *in vitro*-kultivierten Zelle wurden dieselben Variation in unkultivierten

Insbesondere im Kontext der klinischen Verwendung in regenerativen Therapieansätzen wurde die genetische Stabilität *in vitro*-expandierter MSC auf zytogenetischer Ebene untersucht und hinsichtlich des Risikos der Reimplantation zytogenetisch alterierter MSC diskutiert. Eine spontane Transformation von MSC ist in Langzeitkulturen gezeigt. <sup>252</sup> Darüber hinaus beschrieben Wang et al. tumorinduzierende Eigenschaften von MSC bei Retransplantation in immunodefiziente NOD/SCID Mäuse. <sup>253</sup> Demgegenüber stehen andere Studien, die eine Transformation von MSC in Langzeitkulturen negierten, <sup>254-256</sup> jedoch wurde auch das Akquirieren chromosomaler Aberrationen beschrieben. Ben-David und Kollegen beschrieben in einer Studie zur genetischen Stabilität verschiedener somatischer Stammzellen die Entstehung und Akkumulierung zytogenetischer Aberrationen in MSC durch eine *in vitro*-Expansion. <sup>257</sup> Wang et al. zeigten ebenfalls in einem Vergleich zwischen frühen und späten Passagen eine Zunahme von *copy number variations* und Herunterregulierung der zellulären DNA-Reparationsmechanismen. <sup>255</sup> Demgegenüber steht eine Studie über MSC *in vitro*-Kulturen für die klinische Anwendung, in denen chromosomale Aberrationen detektiert

wurden, die hingegen keinen Wachstumsvorteil vermittelten und demnach vor dem Erreichen der kompletten Seneszenz der Zellen nicht mehr detektierbar waren. <sup>258, 259</sup> In einem Vergleich von seriellen Passagen von BM-MSC mittels Karyotypisierung und a-CHG wurden Variationen identifiziert, die im Laufe der *in vitro*-Expansion auftraten. <sup>260</sup> Binato et al. fanden zytogenetische Aberrationen in BM-MSC (> p4), welche jedoch in der weiteren Passagierung verloren gingen. <sup>261</sup>

Zusammenfassend liegen hinsichtlich der genetischen Stabilität von MSC in einer *in vitro*-Kultur divergente Daten vor; MSC wurden zumeist zytogenetisch untersucht und sowohl das Akquirieren von Aberrationen als auch überwiegend gegebene genetische Stabilität berichtet. <sup>262, 263</sup>

Der Frage, inwieweit genetische Alterationen durch eine *in vitro*-Kultur induziert werden, könnte in einem direkten Vergleich einer molekulargenetischen Analyse (in Einzelbasenauflösung) einer mittels Durchflusszytometrie gewonnenen CD45<sup>niedrig</sup>CD271<sup>+</sup>MSCA-1<sup>+</sup> Population und der korrespondierenden *in vitro*-expandierten Population nachgegangen werden. Dieser Ansatz wird im Ausblick (vgl. 5.4) dargelegt.

#### Die genetische Stabilität der AML BM-MSC im Vergleich zu GS BM-MSC

Die Untersuchung in Einzelbasenauflösung der vorliegenden Arbeit demonstrierte mehr Mutationen in AML BM-MSC im Vergleich zu GS BM-MSC, angesichts einer variablen Anzahl genetischer Läsionen je Probe (vgl. Abb. 16, S. 73). Song et al. evaluierten MDS BM-MSC hinsichtlich zytogenetischer Aberrationen und fanden Alterationen in 15 aus 22 Fällen, während sieben GS BM-MSC keine zytogenetische Aberrationen aufwiesen.<sup>264</sup>

Den vermehrt auftretenden genetischen Läsionen in AML BM-MSC sowie deren unspezifischem Muster könnte eine verstärkte genetische Instabilität verglichen mit GS BM-MSC zugrunde liegen. Genetische Instabilität, nicht nur in Tumorgeweben, sondern auch im assoziierten Tumorstroma, ist ein Hauptmerkmal maligner Erkrankungen und deren Progression. Hierbei spielen hypoxische Bedingungen, oxidativer Stress, reduzierte Telomerasenaktivität und Mutationen in Genen, die in DNA-Reparationsmechanismen involviert sind, eine maßgebliche Rolle. <sup>265-267</sup>

Diskussion

Für solide Tumore wurde die genetische Stabilität des assoziierten Tumorstromas, so z. B. in tumor-assoziierten stromalen Fibroblasten, als Konsequenz der reziproken Interaktion mit dem schnell proliferierenden malignen Gewebe diskutiert. <sup>268</sup> Gerade im Kontext zu Brustkrebsstroma - hauptsächlich bestehend aus Fibroblasten, Adipozyten und endothelialen Zellen - wurden in einigen Studien genetische Alterationen im Tumorstroma beschrieben. <sup>269,</sup> <sup>270</sup> Die WES-Daten der AML BM-MSC der vorliegenden Arbeit ließen vermuten, dass AML BM-MSC - angesichts einer kleinen Kontrollkohorte - eine ausgeprägtere Neigung zum Akquirieren genetischer Läsionen haben könnten.

Zwecks Einschätzung der genetischen Stabilität der AML BM-MSC, gerade im Vergleich zu den AML-Zellen, wurden auch dbSNP-annotierte Alterationen berücksichtigt. Zahlreiche Studien beschrieben bereits die Assoziation bestimmter SNP-Varianten mit malignen Erkrankungen.<sup>271-273</sup> Eine Rolle der identifizierten dbSNP-annotierten Variationen in AML BM-MSC, hier mutmaßlich somatisch in diesen Zellen vorliegend, wäre vermutlich unwahrscheinlich. Obschon eine ausreichende Sequenzabdeckung für Zielsequenzen erreicht wurde (vgl. 4.2.1), könnte ein vermehrtes Auftreten von dbSNP-annotierten Alterationen in AML BM-MSC (vgl. Abb. 16, S. 73) hier dennoch auf technische Limitationen von partiell niedrigeren Sequenzabdeckung in der Keimbahnkontrolle zurückzuführen sein.

AML BM-MSC trugen, verglichen mit den korrespondierenden hämatopoetischen bzw. leukämischen Zellfraktionen, in 27 aus 30 sequenzierten Exomen weniger Mutationen (vgl. Abb. 19, S. 78). Auch in Remissionskontrollen waren in drei aus vier Fällen weniger Alterationen in AML BM-MSC detektiert worden. Es sei zu betonen, dass auch unter Nichterfassen der dbSNP-annotierten Variationen überwiegend (29/30 Exomen) weniger Alterationen in AML BM-MSC präsent waren (vgl. Tab. DiskE2). Die Gesamtpopulation *in vitro*-expandierter AML BM-MSC wäre in diesem Vergleich zur hämatopoetischen bzw. leukämischen Zellfraktion als genetisch stabiler zu bewerten, was sicherlich auch im Kontext der verhältnismäßig langsam proliferierenden BM-MSC Population <sup>221</sup> zu betrachten ist.

AML BM-MSC sowie AML-Zellen zeigten weiterhin distinkte Mutationsmuster. In diesem Zusammenhang wurde bereits über zytogenetische Aberrationen in AML BM-MSC berichtet, die teils exklusiv waren, teils aber auch in korrespondierenden AML-Blasten auftraten. <sup>274</sup> In einem MLL-AF9+ B-ALL Modell wurde die Expression des Fusionsgens auch in den korrespondierenden BM-MSC nachgewiesen. <sup>275</sup> Blau et al. beschrieben hingegen

chromosomale Aberrationen in AML BM-MSC, welche nicht in der hämatopoetischen Fraktion vorhanden waren. <sup>144, 145</sup> Im hiesigen Datenset in Einzelbasenauflösung ist trotz kleiner Schnittmengen hinsichtlich dbSNP-annotierter Variationen in distinkten Patientenproben (vgl. 4.2.1) jedoch von einem unterschiedlichen Spektrum genetischer Alterationen beider Kompartimente auszugehen.

#### Die Verwendung der AML BM-MSC als Keimbahnkontrolle

Die Verwendung der AML BM-MSC als Keimbahnkontrolle bot die Möglichkeit der Dissektion schwelender Mutationen der Hämatopoese, welche während der Remissionzeiten überdauerten und potentiell rezidiv-initiierend sein könnten (vgl. 4.3, S. 92). Gesamtexomoder gar Gesamtgenomsequenzierungen des NGS haben das Spektrum bekannter genetischer Marker der AML in den vergangenen Jahren enorm vergrößert (vgl. 1.2), jedoch liegt hierbei die Limitation häufig in fehlenden Keimbahnkontrollen.<sup>276</sup> Hautzellen oder vielmehr MNCs der REM würden mögliche Keimbahnkontrollen darstellen. Sprechen Patienten nicht auf die Chemotherapie an, so stehen Verlaufsproben der REM nicht zur Verfügung und hier stellt die Verwendung der AML BM-MSC als Keimbahnkontrolle eine Option dar.

Zu den Mutationen, die mit > 5% VAF in den Remissionskontrollen präsent waren und unter Verwendung der BM-MSC identifiziert wurden, gehörten bspw. *DNMT3A* und *TET2*. Dies sind zwei in der AML rekurrent-mutierte Gene (vgl. 1.2). Diese wurden weiterhin auch in Verlaufsproben detektiert (vgl. 4.3), was nahelegt, dass diese Variationen in rezidivinitiierenden Klonen präsent waren. *DNMT3a*-Mutationen gehören weiterhin zu frühen *hits* der Leukämogenese.  $^{277, 278}$ 

Zu den weiteren Mutationen gehörte bspw. *CARD8 (Caspase Recruitment Domain Family Member 8)*, ein Regulator des NFkB-Signalweges.<sup>279</sup>

Die Verwendung von AML BM-MSC könnte also der Dissektion insbesondere solcher "präleukämischen" Mutationen und Targets dienen, die im Besonderen mit Chemoresistenz verbunden sein könnten.

Die genetischen Alterationen der refraktären AML zu ergründen, wäre angesichts der überaus schlechten Prognose dieser Patienten von großem Interesse und gerade die hohe Frequenz von Mutationen in *SRSF2*, einer Komponente des RNA-Spleißosoms, war hier augenscheinlich.

Mutationen in *SRSF2* waren einer Studie zufolge im MDS mit schlechter Prognose sowie höherem Risiko der sAML-Progression verbunden, <sup>280</sup> auch im MPN waren Mutationen in *SRSF2* mit leukämischer Transformation assoziiert und ein prognostischer Faktor. <sup>281</sup> Papaemmanuil et al. zeigten in einer kürzlich publizierten Studie ebenfalls die Rekurrenz und prognostische Relevanz von Mutationen in *SRSF2* in *de novo* AMLs. <sup>54</sup>

Zusammenfassend waren überwiegend niedrigere Mutationsraten in *in vitro*-expandierten AML BM-MSC als in den korrespondierenden hämatopoetischen Fraktionen erkennbar. AML BM-MSC eignen sich als Keimbahnkontrollen zur Identifikation spezifischer Mutationen der AML, die während der Remission im Knochenmark überdauern oder können dem Erweitern des Spektrums bekannter Mutationen der refraktären AML nutzen. Im Kontrast zu GS BM-MSC zeigten AML BM-MSC jedoch mehr genetische Alterationen. Das unspezifische Muster dieser Mutationen sowie fehlende Rekurrenz mutierter Genen ließen im Kontext genetischer Instabilität zellulärer Komponenten der Tumormikroumgebung auf eine womöglich höhere Wahrscheinlichkeit für das Akquirieren von Mutationen in der AML-Mikroumgebung schließen.

# Welche Rolle könnten diese genetischen Alterationen hinsichtlich der Leukämie Pathogenese spielen?

Wie in 1.4 (S. 18/19) erläutert, wird gegenwärtig von zweierlei Hypothesen zur Rolle der BM-MSC in der Pathogenese leukämischer Erkrankungen ausgegangen: i) genetische Läsionen der Mikroumgebung könnten initial zur Transformation beitragen und ii) die Infiltration durch neoplastische Zellen führte zur Remodulierung der Nische.

Die genetischen Alterationen der AML BM-MSC von 21 Patienten der vorliegenden Arbeit wiesen durch das Fehlen rekurrenter Mutationen sowie eines synergistischen Effekts von gemeinsam auftretenden Mutationen auf zelluläre Signalwege (vgl. 4.2.1) nicht auf funktionell relevante, genetische Läsionen der AML-Mikroumgebung in diesen Patienten hin.

Jedoch traten auf der Ebene der Genexpression in AML BM-MSC globale Alterationen auf. Diese aberranten Signaturen zeigten Anreicherungen u. a. von Adhäsionsmolekülen und Strukturproteinen, welche für die Stroma-Leukämie Interaktion relevant sein könnten.

#### 5.3.2 Die transkriptionellen Alterationen der AML BM-MSC

Interessanterweise war das Zytoskelett-Linkerprotein Plectin in AML BM-MSC überexprimiert (vgl. Abb. 20, S. 79). Plectin gilt als Marker für Pankreaskarzinome und eine Überexpression wurde bereits für andere maligne Gewebe, bspw. Osöphagus-, Magen-, oder Lungenkarzinome, beschrieben. <sup>282</sup> Plectin wurde außerdem als putatives Target für einen, auf Nanopartikel basierenden, Therapieansatz in einem Modell mit Pancreas-Adenokarzinomzellen (*pancreas ductal adenocarcinoma cells*; PDACs) identifiziert. <sup>283</sup> Die Expression von Plectin in unkultivierten BM-MSC konnte in einer Kooperation mit dem pathologischen Institut des Charité Universitätsklinikums anhand von Knochenmarkhistologien nachgewiesen werden (siehe Anhang Abb. A2). Dies ginge mit verfügbaren Daten zur gewebsspezifischen Expression von Plectin einher (vgl. Human Integrated Protein Expression Database (HIPED), <sup>284-287</sup> welche die höchste *PLEC*-Expression für BM-MSC zeigten. Die mögliche Relevanz einer Überexpression von Plectin in AML BM-MSC läge in der strukturellen Integrität der HSC-Nischenzellen. Hingegen hatte ein transienter KD weder einen Einfluss auf die Morphologie (Daten nicht gezeigt) noch auf die Apoptoserate und das Wachstum von HS-5 Zellen (vgl. 4.4.1).

#### Die global alterierte Genexpression und deregulierte Signalwege in AML BM-MSC

Die in der vorliegenden Arbeit generierten Genexpressionssignaturen brachten eine global alterierte Genexpression in AML BM-MSC zutage. Das hierarchische Gliedern deregulierter Gene in Verlaufsproben ließe darauf schließen, dass spezifische differentielle Genexpressionsmuster der AML BM-MSC erhalten blieben; unabhängig i) des Patientenstatus im Krankheitsverlauf und ii) der möglichen Einflüsse einer *in vitro*-Expansion (vgl. Abb. 22, S. 82 bzw. 5.1).

Die beiden in der vorliegenden Arbeit generierten globalen Genexpressionsignaturen mittels RNAseq bzw. Affymetrix GeneChips (vgl. 4.2.4 und 4.2.5) zeigten hinsichtlich der enthaltenen Gene wenige Überschneidungen. Jedoch spiegelten die zu den Signaturen assoziierten Signalwege und Molekülgruppen die Relevanz i) alterierter Zyto- und Chemokinexpression, ii) aberranter Expression von Adhäsionsmolekülen und Proteoglycanen sowie iii) Deregulation der Prozesse der Endozytose und bestimmten Prozessen des zellulären Metabolismus in der AML-Mikroumgebung und der Stroma-Leukämie Interaktion wider (vgl. Abb. 28, S. 90). Einige Genexpressionsprofile von AML BM-MSC sind bereits in der Literatur beschrieben. So fanden Huang und Kollegen differentiell exprimierte Zytokine in AML BM-MSC, u. a. eine reduzierte Expression von MCP-1 (*Monocyte Chemotactic Protein-1*). <sup>274</sup> Darüber hinaus wurde mittels eines GeneChip Human Gene 1.0 ST Arrays in einer Kohorte von 10 AML BM-MSC im Kontrast zu 13 GS BM-MSC 55 aberrant exprimierte Gene identifiziert, u. a. *CCL2*. <sup>288</sup> *CCL2* wurde einer weiteren Studie zufolge durch eine Kokultur mit leukämischen Zellen in BM-MSC hochreguliert. <sup>289</sup> Auch in der RNAseq-basierten aberranten Genexpressionssignatur der vorliegenden Arbeit war *CCL2* hochreguliert (vgl. Abb. 22, S. 82 bzw. Tab. DiskE2).

Zu weiteren c*ross talk*-Molekülen, die dereguliert vorlagen und zu einer aberranten Stroma-Leukämie Interaktion beitragen könnten, gehörte bspw. die Überexpression von *IL-7. IL-7* ist ein wichtiger Nischenfaktor, der von Nestin<sup>+</sup> MSC <sup>75, 96</sup> und Osteoblasten exprimiert wird und maßgeblich für die B- und T-Zellmaturation ist. <sup>81, 290</sup> Auch *CXCL16* war in AML BM-MSC hochreguliert (vgl. 4.2.4). In einer Studie war die *CXCL16*-Expression sowohl in Lungenkarzinomzellen als auch deren Tumorstroma mit einer besseren Prognose für die Patienten assoziiert. <sup>291</sup> Demgegenüber steht eine Studie zu Pankreaskarzinomen, die eine aggressivere Progression des Tumors bei hoher *CXCL16*-Expression zeigte. <sup>292</sup> Auch waren verschiedene *FGF*-Isoformen in AML BM-MSC der vorliegenden Arbeit überexprimiert; FGFs nehmen eine wichtige Rolle in der *in vitro*-Expansion von HSCs ein. <sup>112, 293</sup> Deregulierte Zytokinexpression wurde außerdem in einer kürzlich beschriebenen Studie für primäre CD271<sup>+</sup> Zellen von MDS-Patienten gezeigt. <sup>294</sup>

Neben Zytokinen spielen auch Adhäsionsmoleküle und die Zell-Zell Interaktion in der AML-Mikroumgebung sowie in der Stroma-Leukämie Interaktion eine zentrale Rolle. So war in den AML BM-MSC der vorliegenden Arbeit die Integrin Untereinheit  $\alpha 5$  (*ITGA5*, auch VLA-5A) herunterreguliert (vgl. 4.2.4). Für dieses  $\beta$ 1-Integrin, einem Fibronectinrezeptor, wurde für Kolokteralkarzinome eine aberrante Expression beschrieben.<sup>295</sup> Allerdings werden diese Integrine in der Regel durch HSCs exprimiert und interagieren als Rezeptoren mit weiteren Adhäsionsmolekülen der Mikroumgebung.<sup>112</sup> Andere  $\beta$ 1-Integrine wurden bereits als Komponenten in der adhäsionsvermittelten Chemoresistenz leukämischer Zellen identifiziert, so z. B. Integrin  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 (auch CD49d oder VLA-4, vgl. 1.3 bzw. 5.3.4).<sup>296</sup>

Die Implikation einer differentiellen Expression von Integrinen in AML BM-MSC läge auch in deren Rolle in der MSC-Differenzierung. Dies wurde im Rahmen einer Interaktion zwischen

Osteopontin (vgl. 1.3) und einem  $\alpha$ 5 $\beta$ 1-Integrin gezeigt, welche essentiell zur Linienspezifizierung der Osteogenese war.<sup>297</sup> In diesem Zusammenhang ist auch die aberrante Expression des Syndecan-1 (*SDC1*) augenscheinlich (vgl. 4.2.4), denn Syndecane (Heparansulfat Proteoglycane) fördern die Integrin-vermittelte Adhäsion und wirken zusätzlich als Rezeptoren für extrazelluläre Liganden.<sup>298</sup>

Die differentielle Expression von Cadherin-4, auch bekannt aus R-Cadherin (vgl. 4.2.4 bzw. 4.2.7) wäre ebenfalls implizierend: Im Rahmen einer Studie wurde eine R-Cadherin Expression für CD166 (ALCAM)<sup>-</sup> Sca-1<sup>+</sup> MSC nachgewiesen und weitere Cadherine als mögliche Targets für Nischen-spezifische Therapien diskutiert. Dieser Studie zufolge vermittelte insbesondere N-Cadherin (vgl. 1.3) die Adhäsion von HSCs, induzierte langsamere HSC-Proliferation und beugte so einer Ausschöpfung des HSC-Pools bei seriellen Transplantationen in Mäusen vor.<sup>299</sup>

Sowohl die Genexpressions- als auch DNA-Methylierungssignaturen der AML BM-MSC enthielten Gene, welche eine Assoziation zum zellulären Prozess der Endozytose zeigten (vgl. 4.2.7 sowie 5.3.3). Nicht nur die Sekretion von Botenstoffen und Wachstumsfaktoren ist für die Integrität der HSC-Nische und *homing* der HSC bedeutend, sondern auch die zelluläre Internalisierung von Botenstoffen, Metaboliten, Rezeptoren und Adhäsionsmolekülen der Nischenzellen. Der komplexe Prozess der Endozytose umfasst nach aktuellem Stand der Forschung nicht nur die reine Aufnahme von Nähr-und Botenstoffen und endo-und lysosomale Prozessierung, sondern ist auch für die Homöostase von Signalkaskaden und die Zellpolarität essentiell. <sup>300, 301</sup> Eine deregulierte Endozytose in malignen Geweben umfasste Studien zufolge u. a. aberrantes Integrinrecycling und eine abnorme Integrininternalisierung im Kontext einer verstärkten Migration und Invasion von Tumorzellen und Metastasierung von Tumorgeweben. <sup>300-302</sup> In einer weiteren Studie wurde die Induktion eines proangiogenen Phänotyps im Stromabett aus endothelialen Zellen durch die Endozytose von Mikrovesikeln gezeigt, welche durch A375-SM Melanomazellen sezerniert wurden, <sup>303</sup> was die Remodulierung von zellulären Komponenten der Tumormikroumgebung durch endozytotische Prozesse widerspiegelte.

Zu den Hauptmerkmalen maligner Gewebe mit hochgradiger Proliferation, welche die notwendigen Metaboliten zur Biosynthese benötigen, gehören auch alterierte Prozesse des zellulären Metabolismus (kürzlich erläutert durch Pavlova und Thompson <sup>304</sup>, vgl. 4.2.7). Hierzu gehört der sogenannte Warburg-Effekt, die durch Otto Warburg erstmals beschriebene Beobachtung, dass Krebszellen vornehmlich aerobe Glycolyse statt mitochondriale oxidative

Phosphorylierung betrieben. <sup>305, 306</sup> Insbesondere im Kontext des Brustkrebsstromas wurde der sogenannte reverse Warburg Effekt diskutiert, wonach tumorassoziierte Fibroblasten durch Glycolyse die Krebszellen mit Metaboliten versorgten. Dies führte zu oxidativem Stress in den Fibroblasten. Diese Fibroblasten zeigten fortan reduzierte mitochondriale Aktivität, erhöhte Glucoseaufnahme, vermehrte ROS-Bildung und Metabolitenproduktion, was wiederum die Progression des Tumors begünstigte. <sup>307-310</sup> Der kürzlich gezeigte Transfer von Mitochondrien aus BM-MSC zu AML-Blasten <sup>311</sup> unterstreicht zusätzlich die Relevanz einer Imbalance bestimmter metabolischer Prozesse in der AML-Mikroumgebung (vgl. 4.2.7)

Zusammenfassend wurden für die Genexpressionsprofile der AML BM-MSC zahlreiche transkriptionelle Alterationen, wie z. B. Deregulation von *cross talk-* und Adhäsionsmolekülen, identifiziert, welche in der Stroma-Leukämie Interaktion eine Rolle spielen könnten. Alterierte endozytotische und metabolische Prozesse könnten ebenfalls aufgrund ihrer Rolle in der Pathophysiologie anderer maligner Erkrankungen in einer alterierten AML-Mikroumgebung bedeutend sein.

Um die Grundlage der aberranten Genexpression zu ergründen, war auch die Charakterisierung der zugrundeliegenden Regulationsmechanismen von großer Bedeutung. Hierzu gehörte eine Profilerstellung der DNA-Methylierung in AML BM-MSC.

#### 5.3.3 Das aberrante DNA-Methylierungsmuster der AML BM-MSC

Die Methylierung des fünften Kohlenstoffatoms im Cytosin (5mC) von CpGs ist neben anderen wie epigenetischen Modifikationen Histonacetylierungen, -methylierung und Proteinkomplexen zur Chromatinremodulierung einer der wichtigsten Schlüsselprozesse zur Transkriptionskontrolle. <sup>312, 313</sup> DNMTs katalysieren in Eukaryoten die Übertragung der Methylgruppe und tragen sowohl zur Erhaltung des DNA-Methylierungsstatus nach DNA-Replikation als auch zur de novo DNA-Methylierung bei. <sup>314</sup> Diese Reaktion ist reversibel, TET Enzyme (Ten-eleven-translocation) oxidieren 5mC zu 5-Hydroxymethylcytosin und vermögen außerdem DNA-Hydroxymethylmodifikation auch direkt zu entfernen. <sup>315, 316</sup> Beide Enzymklassen tragen u. a. zur Erhaltung der Balance aus DNA-Methylierung und demethylierung bei <sup>317</sup> und Variationen in DNMT3a und TET1 sowie TET2 gehören zu den bekannten, rekurrenten Mutationen in AML-Zellen (vgl. 1.2).<sup>11, 52, 54</sup> Mutationen in DNMT3a führten zu einer global alterierten DNA-Methylierung im hämatopoetischen Kompartiment mit überwiegender Hypomethylierung. <sup>11, 318</sup>

Mutationen in DNA-methylierenden und -demethylierenden Enzymen waren in der vorliegenden Arbeit zwar in den leukämischen Zellfraktionen präsent (vgl. 4.3), allerdings waren in AML BM-MSC keinerlei Mutationen in Genen detektiert worden, die direkt an DNA-Methylierung oder -demethylierung beteiligt sind, welche womöglich noch stärker alterierte DNA-Methylierungsmuster im mesenchymalen Kompartiment zur Folge gehabt hätten.

Für die AML BM-MSC Proben mit deutlich alteriertem DNA-Methylierungsmuster (vgl. Abb. 25, S. 86) waren weiterhin keine signifikanten Unterschiede in erhobenen Daten aus der in vitro-Expansion der AML BM-MSC ersichtlich. Auch war keine signifikante Schnittmenge zwischen der aberranten DNA-Methylierung und dem globalen Genexpressionsmuster der AML BM-MSC hinsichtlich der enthaltenen Gene vorhanden. Keines der in Tab. 16 (S. 88) gezeigten, differentiell methylierten Gene waren in den Genexpressionsprofilen der AML BM-MSC differentiell exprimiert (vgl. Anhang Tab. DiskE2). Für acht Gene der in Tab. 16 gezeigten, differentiell methylierten Gene wurden epigenetisch geprägte/erbliche (imprinted) DNA-Methylierungsmuster beschrieben (Quelle: GeneCards der jeweiligen Gene<sup>284</sup>). Darunter waren bspw. PLAGL1, HYMAI sowie KCNO1 und KCNO1T1, welche als imprinted cluster vorliegen <sup>319</sup> und in der hier gezeigten Signatur von teils denselben DMCs betroffen waren (vgl. Tab. DiskE2). Genomisches imprinting ist in Säugern vor allem in Entwicklungsprozessen maßgeblich und die meisten epigenetischen Markierungen werden früh in der parentalen Keimbahn gesetzt und beibehalten.<sup>319</sup> Einerseits sind die Einflüsse eines *loss*of-imprinting in malignen Erkrankungen bspw. für H19 und IGF-2 hinreichend beschrieben. <sup>320-322</sup> Dies ging allerdings mit einer Hypermethylierung des *H19*-Promotors einer erhöhten Expression *IGF-2* einher.<sup>323</sup> *H19* lag im Datensatz der vorliegenden Arbeit hypomethyliert vor.

Da die hier gezeigte DNA-Methylierungssignatur mit überwiegender Hypomethylierung weiterhin keine differentiell methylierten Regionen oder Assoziation zu Promotorregionen aufwies (Daten nicht gezeigt), könnte die detektierte differentielle Methylierung in den Genen mit *imprinting*-Mustern auch auf die DNA-Methylierungsmodifikationen der Allele in den Individuen zurückzuführen sein.

### Der Effekt der *in vitro*-Kultur auf DNA-Methylierungsmuster und die vermehrte Hypomethylierung in AML BM-MSC

Bentivegna et al. untersuchten den Einfluss der *in vitro*-Kultur auf die Methylierung von Genen mit *imprinting*- Mustern mittels eines MeDIP-CGI-Arrays für frühe (p3-p6) und späte Passagen (p9-p12) der MSC *in vitro*-Kultur. Sie fanden u. a., dass der Methylierungsstatus von *KCNQ1* und *MEST* (vgl. Tab. 16, S. 88) stabil blieb, während ca. 38 % der in dieser Studie untersuchten Gene mit *imprinting*-Mustern ihren Methylierungsstatus änderten. <sup>222</sup>

Auch scheinen andere Aspekte des zellulären Alterns wie die Präsenz seneszenter Zellen, zunehmende Maturation und nachlassende Differenzierungskapazität während der *in vitro*-Expansion auf den DNA-Methylierungsstatus Einfluss zu nehmen. <sup>263</sup> In einer Langzeitkultur war einer weiteren Studie zufolge die DNA-Methylierungssignatur stabil, änderte sich hingegen signifikant für spezifische CpG-Zielsequenzen, insbesondere Homöobox Gene, und suggerierte nachlassende Differenzierungskapazitäten. <sup>324</sup> Im Hinblick auf die vermehrte Seneszenz in AML BM-MSC ist zu bemerken, dass eine weitere Studie sowohl Hyper- als auch Hypomethylierung in Assoziation mit repressiven H3K9me3, H3K27me3 sowie Targets von EZH2 in Verbindung mit Seneszenz in MSC *in vitro*-Kulturen beschrieb. <sup>262, 325</sup> Allerdings lagen auch für bspw. *HOXB3* im Datenset der vorliegenden Arbeit ein hypomethyliertes DMC vor.

Mit dem Hintergrund der in Krebszellen häufigen, generellen Hypomethylierung wurde auch für *in vitro*-expandierte MSC eine globale Hypomethylierung in Verbindung mit Transformation und Bildung von Sarcomas beschrieben <sup>326</sup>

#### DNA-Methylierungsmuster von BM-MSC in myeloischen Neoplasien

Für die AML BM-MSC Proben mit deutlich alteriertem DNA-Methylierungsmuster (vgl. Abb. 25, S. 86) waren keine Gemeinsamkeiten hinsichtlich klinischer Parameter der Patienten erkennbar. Die überwiegende Proximität gepaarter Proben der Patienten (vgl. Abb. 24, S. 85) ließe auf ähnliche DNA-Methylierungsmuster und auf den Erhalt bestimmter DNA-Methylierungssignaturen in AML BM-MSC dieser Patienten schließen. Wie bereits für die aberrante Genexpression in AML BM-MSC erläutert (vgl. 5.3.2), zeigten auch die DNA-Methylierungsmuster die deutlicheren Unterschiede gegenüber den gesunden Kontrollen als etwa im Vergleich der einzelnen Zeitpunkte des Krankheitsverlaufs (ED, REM, REZ, REF).

Geyh et al. verglichen die globalen DNA-Methylierungsmuster von AML BM-MSC<sup>146</sup> mit gesunden Kontrollen analog zur vorliegenden Arbeit mittels des Illumina Infinium HumanMethylation 450 BeadChip Arrays. Es wurde eine AML BM-MSC Kohorte von acht Patienten mit acht gesunden Spendern gleichen Alters und Geschlechts verglichen und eine Hypermethylierung entwicklungsrelevanter Gene wie TBX15, HOXB1 und PITX2 festgestellt. Diese Signatur ergab 2666 DMCs, welche in 1104 Genen lokalisiert waren.<sup>146</sup> Hierbei waren 82 dieser 1104 Gene auch in dem DNA-Methylierungsmuster der vorliegenden Arbeit enthalten. Dies beschränkte sich jedoch auf Gene mit maximal 1-2 DMCs, darunter bspw. auch HOXB3, welches allerdings in dem DNA-Methylierungsprofil der vorliegenden Arbeit hypomethyliert vorlag (s. a. Anhang Tab. DiskE2). Überlappende, differentiell methylierte Gene beider Datensets waren nicht vorhanden. <sup>146</sup> In einer weiteren Studie mittels eines Illumina's HumanHT Expression BeadChip Microarrays war kein signifikanter Unterschied zwischen AML BM-MSC und GS BM-MSC detektierbar. In dieser Studie wurde lediglich der Unterschied zwischen gewebsspezifische BM-MSC und der korrespondierenden hämatopoetischen Zellfraktion in einer PCA herausgestellt. 274

### Die Assoziation der aberranten DNA-Methylierungssignatur zu zellulären Signalwegen und der Ansatz einer Datenintegration

DNA-Methylierungssignatur enthielt zahlreiche Gene codierend Die für *major* histocompatibility complex Klasse-I (MHC-I) Moleküle (vgl. Abb. 28, S. 90). Diese Anreicherung von Genen mit Assoziation zur Graft-vs.-Host Krankheit und Antigenpräsentation und -prozessierung wäre im Kontext zu den hinreichend charakterisierten, immunomodulatorischen Eigenschaften von BM-MSC von Interesse. BM-MSC begünstigen anti-inflammatorische Signale, inhibieren die Proliferation natürlicher Killerzellen (NK), von T-Zellen und die Reifung dendritischer Zellen durch die Sekretion von bspw. TGF-β1, IL-10, Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), und HGF (Hepatocyte Growth Factor). <sup>327, 328</sup> Auch wurde beschrieben, dass MSC apoptotische Zellen phagozytieren und in einer Kokultur mit apoptotischen Zellen CD4<sup>+</sup> T-Zellen zur Bildung von T-Helfer-17 Zellen anregen. <sup>329</sup> Es ist allgemein anerkannt, dass BM-MSC - wie die meisten kernhaltigen Zellen 330, 331 - MHC-I Moleküle konstitutiv exprimieren. Hingegen werden MHC-Klasse II (MHC-II) Moleküle nur inflammatorischen Bedingungen exprimiert. zeigten **BM-MSC** unter Auch antigenpräsentierende Eigenschaften unter Interferon-y Behandlung. 332-334 Fibroblasten 335

sowie endotheliale Zellen exprimierten Studien zufolge ebenfalls MHC-II Moleküle unter inflammatorischen Bedingungen. <sup>334, 336</sup> Hingegen sollte hierbei in Betracht gezogen werden, dass die Expression von MHC-I und MHC-II Molekülen weniger durch DNA-Methylierung, sondern vor allem durch Transkriptionsfaktoren wie NFκB oder cis-regulatorische Elemente reguliert wird. <sup>331</sup>

Eine Datenintegration aus RNAseq- sowie Affymetrix-basierten Genexpressionsprofilen und dem DNA-Methylierungsmuster der AML BM-MSC war insofern limitiert, als die verwendeten Kohorten weitestgehend nicht kongruent waren. Auch waren im DNA-Methylierungsprofil keine differentiell methylierten (Promotor-) Regionen detektiert worden (Daten nicht gezeigt). Jedoch unterstrich die Assoziation der Signaturen beider molekularer Ebenen zu spezifischen Signalwegen und Molekülgruppen die putative Rolle deregulierter Adhäsionsmoleküle sowie deregulierten endozytotischen und metabolischen Prozessen in der AML-Mikroumgebung. Die funktionelle Implikation alterierter endozytotischer und metabolischer Prozesse in der AML-Mikroumgebung wurde bereits in 5.3.2 erläutert, im Folgenden soll auf die Stroma-Leukämie Interaktion und bereits identifizierte Targets und Therapieansätze im Hinblick auf die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Daten eingegangen werden.

#### 5.3.4 Neuartige Therapieansätze adressieren die Stroma-Leukämie Interaktion

Der Therapieerfolg für AML-Patienten, bspw. der Hochrisikogruppen, bleibt weiterhin unbefriedigend. Auch von ungünstiger Prognose betroffen sind Patienten, die aufgrund von Alter und Schwäche keine intensive Chemotherapie erhalten können. Dies macht effektive Therapieansätze notwendig, die für diese Patienten tolerierbar sind und u. a. die Interaktion zwischen leukämischen Zellen, vor allem LSCs, und ihrer Nische adressieren. <sup>154</sup>

Die Kokultur primärer AML BM-MSC mit den Zelllinien KG-1a und K-562 ging mit einer überwiegend Apoptose-inhibierenden Wirkung einher (vgl. Abb. 41, S. 107). Bei der Vermittlung von Chemoresistenzen war der direkte Zell-Zell Kontakt der leukämischen Zelle mit der Mikroumgebung verschiedenen Studien zufolge maßgeblich <sup>155, 337, 338</sup> und spiegelte sich auch dem Kokulturkulturexperiment der vorliegenden Arbeit wider.

entwickelte nischenspezifische Therapieansätze nehmen Komponenten der Bereits Mikroumgebung zum Ziel, die am direkten Zell-Zell-Kontakt sowie an der Mobilisierung normaler HSCs beteiligt sind und somit auch LSCs aus der protektiven Nische mobilisieren und für weitere Chemotherapeutika zugänglich machen könnten. Die Daten der globalen Genexpression und DNA-Methylierung in AML BM-MSC der vorliegenden Arbeit unterstrichen die Relevanz von Adhärenzmolekülen und Chemokinen als Schlüsselspieler der Stroma-Leukämie Interaktion (vgl. 4.2.7).

AML BM-MSC



Genexpressions-und DNA-Methylierungsmuster zeigen eine Anreicherung von Genen mit Assoziation zu Molekülgruppen und Signalwegen mit Implikation in einer Stroma-Leukämie Interaktion :

- cross talk-Moleküle wie z.B. Chemokine
- Adhäsionsmoleküle und (extrazelluläre) Proteoglycane
- alterierte endozytotische und metabolische Prozesse

Abb. 42: Alterationen in AML BM-MSC mit putativer Implikation in einer Stroma-Leukämie Interaktion. Gerade Adhäsionsmoleküle und (extrazelluläre) Proteoglycane könnten in einer aberranten Stroma-Leukämie Interaktion eine Rolle spielen und in nachfolgenden Studien als mögliche Targets funktionell charakterisiert werden.

Einige dieser deregulierten Adhärenzmoleküle wurden bereits in 5.3.2 erläutert. Ein Beispiel einer Modulation eines Zell-Zell Kontaktmoleküls ist VLA-4 (vgl. auch 1.3 bzw. 5.3.2). VCAM-1 und Fibronectin sind Liganden von VLA-4. Diese VLA-4/VCAM-1 Achse wird in der normalen Hämatopoese, bedingt durch die Stimulierung durch CXCL12, angeregt und führt zu verstärkter Adhäsion und einem Verbleib der HSCs in der Nische (vgl. 1.3). <sup>339-341</sup> Die VLA-4/VCAM-1 Achse beeinflusst auch die Adhäsion von AML-Zellen an endotheliale Zellen und führte in Studien durch Aktivierung des PI3K/Akt/BCl2 Signalweges <sup>342</sup> sowie einer NKkB-Aktivierung im Stromakompartment<sup>343</sup> zum Erwerb von Chemoresistenzen. Allerdings war die Expression von VLA-4 in der kindlichen AML klinisch mit niedrigeren Rezidivraten verbunden. <sup>344</sup> Bei adulten AML-Patienten war die Expression von VLA-4 nicht von prognostischer Bedeutung, allerdings war eine vermehrte Bindung von löslichem VCAM-1 an VLA-4 mit längeren Überlebenszeiten assoziiert. <sup>345</sup> Hingegen hatte die Anwendung des VLA-4 Antikörpers AS101 in einem Xenograft-Mausmodell bereits eine Steigerung der Chemosensitivitäten der AML-Zellen zur Folge. <sup>339, 346</sup>

E (Endothelial)-Selectin, ein von endothelialen Zellen der vaskulären HSC-Nische exprimiertes Adhäsionsmolekül, zeigte ebenfalls funktionelle Relevanz: Winkler und Kollegen zeigten in einem Mausmodell mit homozygoter E-Selectin Deletion ein erhöhtes Potential der Selbsterneuerung der HSC-Population.<sup>347</sup>

Zu weiteren bereits bekannten Targets der Stroma-Leukämie Interaktion gehört die Abrogation der für die HSC-Regulation essentiellen CXCL12/CXCR4 Achse (vgl. 1.3). Der Einsatz von CXCR4-Inhibitoren wie Plerixafor (AMD3100) und einem weiteren CXCR4-Inhibitor (AMD3465) führte zur Desensibilierung von CXCR4<sup>+</sup> Zellen gegenüber CXCL12, zur Mobilisierung leukämischer Zellen und gesteigerten Effektivität von Chemotherapeutika.<sup>348, 349</sup> Eine niedrige CXCR4-Expression bzw. CXCR4-negative AML-Zellen wurden bereits mit längeren Remissionszeiten sowie besserer Prognose korreliert. <sup>350, 351</sup> Eine klinische Studie der Phase 1/2 mit Kombinationstherapien aus Zytostatika der konventionellen Chemotherapie und Plerixafor für rezidivierte und refraktäre AML-Patienten zeigte eine Steigerung der Mobilisierung von AML-Blasten. <sup>352</sup>

Zusammenfassend sind adhäsionsvermittelnde und HSC-mobilisierende Faktoren hinsichtlich einer Mobilisierung der LSCs aus der protektiven Nische als künftige therapeutische Zielmoleküle von großer Bedeutung und laufende klinische Studien hinsichtlich CXCR4-Inhibitoren und VLA-4 Antagonisten tragen dieser Rechnung.<sup>154, 339, 353</sup> Auch lösliche Faktoren der HSC-Regulation wurden adressiert, so z. B. PTH (vgl. 1.3).<sup>354, 355</sup> Die aberranten Genexpressions- und DNA-Methylierungsmuster der vorliegenden Arbeit beinhalten zahlreiche Nischenkomponenten und lösliche Faktoren (vgl. 4.2.7 und Tab. DiskE2) und bieten eine Plattform zur Identifizierung neuer putativer Targets, auch für eine funktionelle Charakterisierung, wie am Beispiel des Proteoglycans Lumican im Folgenden diskutiert werden soll.

Diskussion

# 5.3.5 Proteoglycane in der Mikroumgebung und die besondere Rolle von Lumican in den Prozessen der Adhäsion, Migration und Proliferation

Ein zentrales Ergebnis der aberranten Genexpressionsprofile der AML BM-MSC war die Deregulation bestimmter Proteoglycane. Proteoglycane sind hochgradig glycosylierte Proteine. Sie sind entweder auf der Zelloberfläche oder in der ECM lokalisiert, liegen aber auch in löslicher Form vor. Sie bestehen aus einem *core*-Protein und langen, unverzweigten Seitenketten aus Glucosaminglycanen. Proteoglycane sind polar und nehmen eine wichtige Funktion der ECM-Organisation ein, was insbesondere im Kontext zu soliden Tumoren eine wichtige Rolle in der Tumormatrixorganisation spielt. <sup>356-358</sup>

In den globalen Genexpressionsprofilen der vorliegenden Arbeit waren einige Proteoglycane dereguliert, u. a. die SLRPs Decorin (*DCN*) und Lumican (vgl. 4.2.4 bzw. 4.2.5). In einer Studie zeigten *DCN*-defiziente Mäuse vergrößerte Milzen und abnorme Proportionen einer Lin<sup>-</sup> Sca-1<sup>+</sup> c-Kit<sup>hoch</sup> CD34<sup>-</sup>, Flk-2<sup>-</sup>, CD150<sup>+</sup> HSC-Population mit reduziertem Differenzierungspotential. Diese Studie machte Decorin als einen möglichen Regulator für bestimmte HSC-Subpopulationen, deren Lokalisation und Linienspezifität aus. <sup>359</sup>

Lumican ist ein Keratansulfat-Proteoglycan und enthält eine N-terminale, tandemartige Aminosäuresequenzwiederholung, welche reich an Leucin und für die Bindung anderer extrazellulärer Komponenten maßgeblich ist. <sup>360, 361</sup> Lumican war im Transkriptom der AML BM-MSC überexprimiert (vgl. Abb. 33, S. 97). Lumican wurde als ubiquitär exprimiert beschrieben, zeigte allerdings eine hohe Expression in mesenchymalen Geweben. <sup>358, 362, 363</sup> Darüber hinaus zeigte Lumican im Tumorstroma beim Brustkrebs eine Kolokalisation zu fibroblastartigen Zellen und eine signifikant höhere Expression im Vergleich zu gesundem Stromagewebe. <sup>364, 365</sup> Weitere solide Tumore wie Melanomen, <sup>366, 367</sup> Lungen-, <sup>368</sup> Osöphagus-<sup>369</sup> und Pankreaskarzinomen demonstrierten eine aberrante *LUM*-Expression. <sup>363, 370</sup> Lumican wäre also als aberrant exprimierte Komponente der AML-Mikroumgebung impliziert.

In hämatologischen Erkrankungen spielt der direkte Zell-Zell Kontakt zwischen transformierten Zellen und ihrer Mikroumgebung eine besondere Rolle in der Vermittlung von Chemoresistenzen (vgl. 5.3.4). Lumican wäre als Bestandteil der AML-Mikroumgebung besonders in seiner adhäsionsvermittelnden Funktion von Interesse. Lumican wird, in Analogie zu Decorin, eine antimetastasierende Eigenschaft zugeschrieben. <sup>370, 371</sup> Es wurde einerseits eine verstärkte Migration von Kolonkarzinom LS180 Zellen bei Lumican-Überexpression

beobachtet. <sup>372</sup> Andererseits deuteten zahlreiche Studien auf eine Modulation von Integrinen und Fokalen Adhäsionsmolekülen <sup>373-375</sup> und eher antiinvasive und adhäsionsinitiierende Eigenschaften von Lumican an der Grenzfläche zwischen Tumor und Tumormatrix hin. Dies ist insbesondere im Kontext von Melanomen <sup>376, 377</sup> und Osteosarcomen <sup>378</sup> beschrieben. Darüber hinaus war die Lumican-Überexpression der Tumormikroumgebung *in vivo* mit kleiner Tumorgröße und verminderter Vaskularisierung verbunden. <sup>371, 379</sup>

Eine intrinsische Überexpression von Lumican in HS-5 Zellen hatte im Rahmen der durchgeführten Experimente (vgl. Abb. 40, S. 106) keinen Einfluss auf die Adhäsion kokultivierter KG-1a bzw. K-562 Zellen.

Hierbei war allerdings das gemessene Fluoreszenzsignal für Ansätze ohne Stromabett höher und weiterhin ersichtlich, dass die Konfluenz der pLUM-Ansätze stark reduziert war (mikroskopische Kontrolle, Daten nicht gezeigt). Weitere mögliche experimentelle Herangehensweisen, den Einfluss von Lumican auf die Adhäsion leukämischer Zellen an Nischenzellen zu untersuchen, werden im Ausblick 5.4 erläutert.

# Die Überexpression von Lumican in HS-5 Zellen und der Effekt auf die Proliferation und Morphologie der Zelllinie

Die intrinsische Überexpression in HS-5 Zellen hatte in der vorliegenden Arbeit eine inhibierende Auswirkung auf die Proliferation der Zelllinie HS-5 (vgl. Abb. 35, S. 100 bzw. Abb. 38, S. 104). Die Beobachtungen einer verminderten Proliferation waren in den durchgeführten Experimenten jedoch unabhängig von den *LUM*-Überexpressionsniveaus. Auch pLUM-Kulturen, in denen äquivalent, geringfügig oder gar weniger *LUM*-Transkripte gegenüber den pLeer-Kontrollen detektierbar waren, zeigten diesen Phänotyp. Die generierten pLUM-Kulturen erschienen hierbei von subklonaler Beschaffenheit, sodass langsam proliferierende Subklone – mutmaßlich mit geringerer *LUM*-Überexpression - durch proliferativen Vorteil diejenige Subklone verdrängten, welche hochgradig *LUM* exprimierten. Obschon beide, zeitlich unabhängigen Transfektionen äquivalent durchgeführt wurden, könnten unterschiedliche Kopienanzahlen integrierter Plasmid-DNA oder auch abweichende Zellzyklusstadien während der Transfektion Gründe für die stark differenten Expressionlevel in diesen Kulturen (pLUM 1 – pLUM 6 bzw. pLUM 7 – pLUM 13) sein. Die stabile Überexpression eines Moleküls mit relativ hohem Expressionslevel, hier vergleichbar mit dem verwendeten HKG *GUS* (Daten nicht gezeigt), könnte durch einen Saturationseffekt limitiert sein. Ein Effekt auf die Proliferationskapazität der HS-5 Zellen könnte bereits bei geringfügiger *LUM*-Überexpression auftreten. In den im Rahmen dieser Arbeit gezeigten Experimenten kann dieser Effekt jedoch nicht zweifelsfrei auf das Target Lumican zurückgeführt werden, da auch solche Kulturen mit geringerer bzw. fehlender *LUM*-Überexpression diesen Phänotyp zeigten. Hierbei sollte jedoch in Betracht gezogen werden, dass zum einen die qRT-PCR die mittlere *LUM*-Expression in der Kultur detektierte und somit auch Klone mit stärkerer *LUM*-Überexpression in der Kultur enthalten sein könnten, die diesen Phänotyp hervorriefen. Zum anderen könnte die Ursache zur beeinträchtigten Proliferation von HS-5 Zellen auch auf einen, der *LUM*-Überexpression nachfolgendem Effekt zurückzuführen sein.

#### Der Effekt von Lumican auf Proliferation und Morphologie

In einer Studie wurden sowohl BM-MSC als auch endotheliale Progenitorzellen (EPs) mittels tube-like formation Assays hinsichtlich der Auswirkung einer Zugabe rekombinanten Lumicans auf die Morphologie, Proliferation und Migration dieser Zellen untersucht. BM-MSC verloren unter Zugabe rekombinanten Lumicans ihre spindelartige, extendierte Morphologie, währenddessen die Morphologie der EPs nicht alteriert wurde. <sup>380</sup> Dies ginge mit der alterierten Morphologie, welche im Rahmen der vorliegenden Arbeit nach Lumican-Überexpression in HS-5 Zellen beobachtet wurde, einher (vgl. Abb. 36, S. 101). Weiterhin hatte die intrinsische Überexpression von Lumican in der vorliegenden Arbeit einen signifikanten, inhibierenden Einfluss auf die Proliferation der HS-5 Zellen (vgl. 4.4.2). In der Studie von Malinowski et al. wurden weder BM-MSC noch EPs in ihrer Proliferation durch Lumican beeinflusst, jedoch zeigten BM-MSC auf Lumican-behandelter Oberfläche eine reduzierte Migrationskapazität. Diese Studie brachte die verminderte Migration von BM-MSC mit einer Lumican-induzierten Herunterregulierung der Metallomatrixprotease (MMP)-14 in Verbindung. <sup>380</sup> Lumican gilt als Inhibitor für MMP-14. <sup>381</sup> MMPs sind Zink-abhängige Enzyme, die ECM-Moleküle sowohl unter normalen als auch unter pathologischen Bedingungen degradieren, hingegen in malignen Geweben zu Invasion und Metastasierung beitragen. <sup>382</sup> Lumican ist selbst als Target für die membrangebundene MMP-1 gezeigt, die Lumican spaltet und eine Aktivierung von p21/WAF-1 zur Folge hatte, einem Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinase. Diese Spaltung und einhergehende Reduktion von Lumican führte nachfolgend zu vermehrter Kolonieformierung von HT1080 Fibrosarcomazellen in Soft Agar, <sup>383</sup> was die antiproliferative Wirkung von Lumican nochmals unterstreicht.

#### Der Effekt von Lumican auf die Apoptoseinduktion

In einem LUM (-/-) KO Mausmodell zeigten embryonale Fibroblasten aus der Maus (*mouse embryonic fibroblasts*; MEFs) sowie Fibroblasten der Cornea eine erhöhte Proliferation, Keratozyten des Corneastromas zeigten hingegen erhöhte Apoptose in der postnatalen Cornea-Maturation. Außerdem wurde eine erhöhte p21/WAF1 und verminderte p53-Aktivität sowie Reduktion von Apoptose-induzierendem Fas (CD95) in *LUM* (-/-) MEFs beobachtet. Demnach scheint Lumican auch Regulator für die Fas-Fas Ligand vermittelte Apoptose zu sein. <sup>384</sup> Die *LUM*-Überexpression in HS-5 hatte im Rahmen der vorliegenden Arbeit keinen Einfluss auf deren Apoptoserate (vgl. Abb. 39, S. 105).

Zusammenfassend wäre Lumican in der Tumormatrixorganisation und Metastasierung solider Tumore impliziert: Lumican interagiert mit Integrinen und fokalen Adhäsionen der Tumor-ECM und moduliert Adhäsionseigenschaften. Darüber hinaus zeigte Lumican Auswirkungen auf Migrationseigenschaften verschiedener Zelltypen *in vitro* und *in vivo*. Eine Implikation für eine Überexpression von Lumican in der AML-Mikroumgebung läge womöglich in dessen Einfluss auf Proliferations- und womöglich Migrationseigenschaften zellulärer Komponente der HSC-Nische. Wie weitere möglicherweise pathophysiologische Eigenschaften von Lumican in der AML-Mikroumgebung untersucht werden könnten, wird im folgenden Ausblick diskutiert.

#### 5.4 Ausblick: Die funktionelle Charakterisierung des Proteoglycans Lumican und die Isolation einer CD271<sup>+</sup> Population

Hinsichtlich einer weiteren funktionellen Untersuchung des Kandidatengens *LUM* in der AML-Mikroumgebung könnte ein induzierbares *LUM*-Expressionsystem für die adhärente Zellkultur der HS-5 Zelllinie angestrebt werden, um den inhibierenden Effekt auf die Proliferation, Morphologie und evtl. die Migration der HS-5 Zellen besser charaktisieren zu können. Für die weitere Untersuchung der proliferationsinhibierenden Wirkung von Lumican könnte hier ein CFSE-basiertes Experiment oder ein Zellzyklusassay mit Bromdesoxyuridin (BrdU) in Betracht gezogen werden, was eine Diskriminierung einzelner Zellpopulationen in Zellzyklusphasen ermöglichen würde. Die adhärenzmodulierenden Eigenschaften von Lumican im Kontext einer aberranten Stroma-Leukämie Interaktion mit einer Lumican-überexprimierenden Mikroumgebung wären weiterhin von Interesse. Zwar zeigten hier initiale Untersuchungen keine Auswirkungen auf die Adhäsion der Leukämiezellen an ein Lumican-überexprimierendes Stromabett, der Einfluss von Lumican auf die Chemosensitivität könnte allerdings in weiteren Kokulturexperimenten unter Einwirkung verschiedener Zytostatika oder weiterer Wirkstoffe (z. B. *small compound library*) getestet werden.

Die molekulare Charakterisierung zellulärer Komponenten der AML-Mikroumgebung ist zwecks Identifizierung neuer Targets für nischenspezifische Therapieansätze fundamental.

Die aberranten Genexpressions- und DNA-Methylierungssignaturen der im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten AML BM-MSC könnten auch hierfür eine Plattform bieten. Jedoch wäre es von großem Interesse, zwecks weiterer Interpretation der gezeigten Alterationen, den Ursprung der alterierten Nischenzellen anhand einer Subpopulation der unreifen mesenchymalen Stammzelle zu untersuchen. Die Gewinnung und darauffolgende Gesamtgenomamplifizierung sowie Exomsequenzierung einer CD45<sup>niedrig</sup> CD271<sup>+</sup> MSCA-1<sup>+</sup> Zellpopulation (vgl. 5.1) aus gesunden Spendern und ein Vergleich zu den korrespondierenden *in vitro*-kultivierten BM-MSC würde über die folgenden Aspekte weitere Erkenntnisse bringen: i) welche somatischen Mutationen in unreifen mesenchymalen Stammzellen auftreten und demnach womöglich in die mesenchymalen Linien getragen werden und ii) inwieweit durch die *in vitro*-Expansion genetische Alterationen akquiriert werden.

Eine Färbung der raren CD45<sup>niedrig</sup> CD271<sup>+</sup> MSCA-1<sup>+</sup> Zellpopulation konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit etabliert werden (Daten nicht gezeigt), der durchflusszytometrischen Gewinnung ging zusätzlich eine positive Selektion über CD271 *microbeads* voran (Miltenyi Biotec, Daten nicht gezeigt). Zusätzlich musste hierbei eine evtl. aberrante Frequenz von CD271<sup>+</sup> Zellen in der AML-Mikroumgebung bedacht werden (vgl. 4.1.3, S. 67). Aus diesem Grunde wurde zum Ende der experimentellen Phase der vorliegenden Arbeit eine CD45<sup>niedrig</sup>CD271<sup>+</sup>MSCA-1<sup>+</sup> Population aus gesundem Spendermaterial gewonnen, welche im Folgenden gesamtgenomamplifiziert werden wird (*whole genome amplification*; WGS). Dem wird die Exomsequenzierung dieser gewonnenen Population sowie der korrespondierenden *in vitro*-kultivierten BM-MSC Population des gleichen Spenders folgen. Diese prospektive

Untersuchung wird weitere Erkenntnisse über die genetische Stabiliät der *in vitro*-expandierten BM-MSC erbringen.

Zusammenfassend ist die vergleichende molekulare Charakterisierung von Nischenzellen myeloischer Neoplasien fundamental für die Entwicklung neuartiger, nischenspezifischer Therapieansätze. Die Gewinnung und Charakterisierung einer frühen mesenchymalen Stammzellpopulation würde hier eine Erweiterung der Erkenntnisse aus den globalen molekularen Datensätzen der *in vitro*-expandierten AML BM-MSC Population darstellen.

## 6. Zusammenfassung

Hämatopoetische Stammzellen (HSCs) lokalisieren in einer komplex-zusammengesetzten Mikroumgebung, die essentiell für die HSC-Regulation ist. Bei einer akuten myeloischen Leukämie (AML) resultiert aus einer klonalen Transformation eine Expansion maligner Progenitorzellen, die das Knochenmark infiltrieren und mit mesenchymalen Stromazellen (BM-MSC) der Mikroumgebung interagieren. Zahlreiche Studien untersuchten Aberrationen in AML-Zellen, während molekulare Alterationen in BM-MSC von AML-Patienten (AML BM-MSC) und deren putativ pathophysiologische Rolle weitestgehend unergründet blieben.

Um molekulare Alteration der AML-Mikroumgebung zu untersuchen, wurden AML BM-MSC zu verschiedenen Zeitpunkten des AML-Krankheitsverlaufs isoliert und *in vitro* expandiert. AML BM-MSC wurden auf genetischer, transkriptioneller und epigenetischer (DNA-Methylierung) Ebene mittels Hochdurchsatzplattformen (Illumina und Affymetrix) untersucht und mit Kontrollen gesunder Spender (GS BM-MSC) verglichen.

Die Gesamtexomsequenzierung der AML BM-MSC von 21 Patienten zeigte ein unspezifisches Muster genetischer Alterationen. In AML BM-MSC wurden, verglichen mit GS BM-MSC, mehr Mutationen identifiziert. Hingegen trugen AML BM-MSC eine geringere Mutationslast als die korrespondierenden hämatopoetischen Zellen.

Die aberranten Genexpressions- und DNA-Methylierungsmuster der AML BM-MSC zeigten eine signifikante Anreicherung zellulärer Komponenten mit einer Implikation in der Stroma-Leukämie-Interaktion: Chemokine, Zelladhäsionsmoleküle und Proteoglycane. Beide molekulare Ebenen, die globale Genexpression und die DNA-Methylierung der AML BM-MSC, spiegelten eine Deregulierung zellulärer Prozesse der Endozytose und des Metabolismus wider. Die generierten Genexpressions- und DNA-Methylierungssignaturen zeigten zudem deutlichere Aberrationen im Kontrast zu GS BM-MSC als im Vergleich zwischen Verlaufsproben von Patienten in der AML-Progression.

Eine überexprimierte Komponente der AML-Mikroumgebung, welche aus den transkriptionellen Profilen hervorging, war das Proteoglycan Lumican. Eine stabile Überexpression von Lumican alterierte die Proliferation und Morphologie der Stromazelllinie HS-5, hatte hingegen keinen Einfluss auf die Apoptoserate in HS-5 Zellen.
Weiterhin wurden der Immunophänotyp (CD33<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup>CD73<sup>+</sup>CD105<sup>+</sup>CD271<sup>+/-</sup>) sowie die Proliferationskapazitäten der frühen Passagen der AML BM-MSC *in vitro* Kultur untersucht. Eine CD271<sup>+</sup> Population war hierbei hochvariabel (0-81 % der Gesamtpopulationen). AML BM-MSC zeigten gegenüber GS BM-MSC keine signifikant verschiedenen *in vitro*-Expansionszeiten.

Die vorliegende Arbeit präsentiert eine umfassende Analyse genetischer, transkriptioneller und epigenetischer Alterationen in AML BM-MSC. Die aberranten molekularen Signaturen der AML BM-MSC zeichnen das Bild einer global alterierten AML-Mikroumgebung und bieten eine Plattform für die Identifizierung neuer putativer Zielmoleküle für nischenspezifische Therapieansätze.

## 7. Summary

Hematopoeitic stem cells (HSCs) are sheltered in the bone marrow (BM) microenvironment, a multicellular compartment containing mesenchymal stromal cells (BM-MSC), which are essential for HSC repopulation and differentiation. In acute myeloid leukemia (AML), a clonal transformation event gives rise to the accumulation of malignant myeloid progenitors that infiltrate the bone marrow cavity and interact with BM-MSC. Numerous studies have focused on molecular aberrations of AML cells, while molecular alterations in BM-MSC derived from AML patients (AML BM-MSC) and their putative pathophysiological role in leukemogenesis remain elusive.

In order to unravel molecular alterations in the AML microenvironment, AML BM-MSC were isolated and expanded *in vitro* from different time points of disease progression. In addition, healthy donor controls (HD BM-MSC) were obtained. Both AML BM-MSC and HD BM-MSC were molecularly profiled on genetic, transcriptional, and epigenetic (DNA methylation) levels using Illumina and Affymetrix high throughput platforms.

Whole exome sequencing of AML BM-MSC of 21 patients revealed a nonspecific mutational pattern and a higher frequency of genetic lesions in AML BM-MSC than in HD BM-MSC. Moreover, AML BM-MSC exhibited less genetic lesions than the hematopoietic counterparts (AML cells).

Aberrant transcriptional patterns of AML BM-MSC were enriched in putative stroma-leukemia interaction molecules: chemokines, adhesion molecules and proteoglycans. Both molecular levels, aberrant gene expression and DNA methylation, were enriched in genes associated with endocytosis and metabolic pathways indicating an imbalance of these processes in the AML microenvironment.

Compared to patient-matched serial AML BM-MSC samples in the course of the disease, AML BM-MSC showed the most significant changes in contrast to HD BM-MSC.

Proteoglycan Lumican, a putative target with significant overexpression in AML BM-MSC transcriptional profiles, was chosen for further investigations. Lumican overexpression

impaired the proliferation and altered the morphology of stromal cell line HS-5 but did not influence the apoptotic rate in HS-5 cells.

Furthermore, AML BM-MSC were characterized with regard to immunophenotype (CD33<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup>CD73<sup>+</sup>CD105<sup>+</sup>CD271<sup>+/-</sup>) and to expansion capacities of the early *in vitro* culture. A CD271<sup>+</sup> population was highly variable (0-81 % of total cell population). AML BM-MSC showed similar expansion times compared to HD BM-MSC.

The thesis provides a comprehensive analysis of genetic, transcriptional, and DNA methylation alterations in AML BM-MSC. Furthermore, this approach provides a platform for the identification of putative targets for future niche directed therapies.

## 8. Literaturverzeichnis

- 1. Seita, J. und Weissman, I.L., *Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation*. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med, 2010, 2(6): S. 640-53.
- 2. Weissman, I.L., *Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution.* Cell, 2000, 100(1): S. 157-68.
- 3. Blank, U. und Karlsson, S., *TGF-beta signaling in the control of hematopoietic stem cells*. Blood, 2015, 125(23): S. 3542-50.
- 4. Ogawa, M., *Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells*. Blood, 1993, 81(11): S. 2844-53.
- 5. Mendez-Ferrer, S., Chow, A., Merad, M., *et al.*, *Circadian rhythms influence hematopoietic stem cells*. Curr Opin Hematol, 2009, 16(4): S. 235-42.
- 6. Zon, L.I., *Intrinsic and extrinsic control of haematopoietic stem-cell self-renewal*. Nature, 2008, 453(7193): S. 306-13.
- 7. Jung, J., Buisman, S., und de Haan, G., *Hematopoiesis during development, aging, and disease*. Exp Hematol, 2016, 44(8): S. 689-95.
- 8. Sun, D., Luo, M., Jeong, M., et al., Epigenomic profiling of young and aged HSCs reveals concerted changes during aging that reinforce self-renewal. Cell Stem Cell, 2014, 14(5): S. 673-88.
- 9. Challen, G.A., Sun, D., Jeong, M., et al., Dnmt3a is essential for hematopoietic stem cell differentiation. Nat Genet, 2012, 44(1): S. 23-31.
- 10. Chen, D. und Zhang, G., *Enforced expression of the GATA-3 transcription factor affects cell fate decisions in hematopoiesis.* Exp Hematol, 2001, 29(8): S. 971-80.
- 11. Ley, T.J., Ding, L., Walter, M.J., *et al.*, *DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia*. N Engl J Med, 2010, 363(25): S. 2424-33.
- Ting, S.B., Deneault, E., Hope, K., et al., Asymmetric segregation and self-renewal of hematopoietic stem and progenitor cells with endocytic Ap2a2. Blood, 2012, 119(11): S. 2510-22.
- 13. Knoblich, J.A., *Mechanisms of asymmetric stem cell division*. Cell, 2008, 132(4): S. 583-97.
- Muller-Sieburg, C.E., Cho, R.H., Thoman, M., et al., Deterministic regulation of hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. Blood, 2002, 100(4): S. 1302-9.
- 15. Muller-Sieburg, C.E., Cho, R.H., Karlsson, L., *et al.*, *Myeloid-biased hematopoietic* stem cells have extensive self-renewal capacity but generate diminished lymphoid progeny with impaired IL-7 responsiveness. Blood, 2004, 103(11): S. 4111-8.
- 16. Yang, L., Bryder, D., Adolfsson, J., et al., Identification of Lin(-)Sca1(+)kit(+)CD34(+)Flt3- short-term hematopoietic stem cells capable of rapidly reconstituting and rescuing myeloablated transplant recipients. Blood, 2005, 105(7): S. 2717-23.
- 17. Morrison, S.J. und Weissman, I.L., *The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype*. Immunity, 1994, 1(8): S. 661-73.
- 18. Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M., et al., Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. Immunity, 2006, 25(6): S. 977-88.

- 19. Zhou, B.O., Ding, L., und Morrison, S.J. *Hematopoietic stem and progenitor cells regulate the regeneration of their niche by secreting Angiopoietin-1*. Elife, 2015, DOI: 10.7554/eLife.05521.
- 20. Szilvassy, S.J., Humphries, R.K., Lansdorp, P.M., et al., Quantitative assay for totipotent reconstituting hematopoietic stem cells by a competitive repopulation strategy. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990, 87(22): S. 8736-40.
- 21. Orkin, S.H. und Zon, L.I., *Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology*. Cell, 2008, 132(4): S. 631-44.
- 22. Tindle, R.W., Nichols, R.A., Chan, L., et al., A novel monoclonal antibody BI-3C5 recognises myeloblasts and non-B non-T lymphoblasts in acute leukaemias and CGL blast crises, and reacts with immature cells in normal bone marrow. Leuk Res, 1985, 9(1): S. 1-9.
- 23. Civin, C.I., Strauss, L.C., Brovall, C., et al., Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. J Immunol, 1984, 133(1): S. 157-65.
- 24. Ortiz, M., Wine, J.W., Lohrey, N., et al., Functional characterization of a novel hematopoietic stem cell and its place in the c-Kit maturation pathway in bone marrow cell development. Immunity, 1999, 10(2): S. 173-82.
- 25. Schroeder, T., *Hematopoietic stem cell heterogeneity: subtypes, not unpredictable behavior.* Cell Stem Cell, 2010, 6(3): S. 203-7.
- 26. Eaves, C.J., *Hematopoietic stem cells: concepts, definitions, and the new reality.* Blood, 2015, 125(17): S. 2605-13.
- 27. Khalidi, H.S., Brynes, R.K., Medeiros, L.J., et al., The immunophenotype of blast transformation of chronic myelogenous leukemia: a high frequency of mixed lineage phenotype in "lymphoid" blasts and A comparison of morphologic, immunophenotypic, and molecular findings. Mod Pathol, 1998, 11(12): S. 1211-21.
- 28. Hallek, M., Cheson, B.D., Catovsky, D., et al., Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. Blood, 2008, 111(12): S. 5446-56.
- 29. Deininger, M.W., Goldman, J.M., und Melo, J.V., *The molecular biology of chronic myeloid leukemia*. Blood, 2000, 96(10): S. 3343-56.
- 30. Weinberg, O.K. und Arber, D.A., *Mixed-phenotype acute leukemia: historical overview and a new definition*. Leukemia, 2010, 24(11): S. 1844-51.
- 31. Dores, G.M., Devesa, S.S., Curtis, R.E., et al., Acute leukemia incidence and patient survival among children and adults in the United States, 2001-2007. Blood, 2012, 119(1): S. 34-43.
- 32. Dohner, H., Weisdorf, D.J., und Bloomfield, C.D., *Acute Myeloid Leukemia*. N Engl J Med, 2015, 373(12): S. 1136-52.
- 33. Vardiman, J.W., Thiele, J., Arber, D.A., et al., The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. Blood, 2009, 114(5): S. 937-51.
- 34. Swerdlow, S.H., Campo, E., Harris, N.L., Jaffe, E.S., Pileri, S.A., Stein, H., Thiele, J., Vardiman, J.W, *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon, France, IARC, 2008.
- 35. Corey, S.J., Minden, M.D., Barber, D.L., et al., Myelodysplastic syndromes: the complexity of stem-cell diseases. Nat Rev Cancer, 2007, 7(2): S. 118-29.

- 36. Bejar, R. und Steensma, D.P., *Recent developments in myelodysplastic syndromes*. Blood, 2014, 124(18): S. 2793-803.
- 37. Konikova, E., Glasova, M., Kusenda, J., et al., Intracellular markers in acute myeloid leukemia diagnosis. Neoplasma, 1998, 45(5): S. 282-91.
- 38. Olsen, R.J., Chang, C.C., Herrick, J.L., *et al.*, *Acute leukemia immunohistochemistry: a systematic diagnostic approach*. Arch Pathol Lab Med, 2008, 132(3): S. 462-75.
- 39. Arber, D.A., Orazi, A., Hasserjian, R., et al., The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood, 2016, 127(20): S. 2391-405.
- 40. Rowley, J.D., Golomb, H.M., und Dougherty, C., *15/17 translocation, a consistent chromosomal change in acute promyelocytic leukaemia.* Lancet, 1977, 1(8010): S. 549-50.
- 41. Martelli, M.P., Sportoletti, P., Tiacci, E., et al., Mutational landscape of AML with normal cytogenetics: biological and clinical implications. Blood Rev, 2013, 27(1): S. 13-22.
- 42. Grimwade, D., Ivey, A., und Huntly, B.J., *Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance*. Blood, 2016, 127(1): S. 29-41.
- 43. Grimwade, D. und Mrozek, K., *Diagnostic and prognostic value of cytogenetics in acute myeloid leukemia*. Hematol Oncol Clin North Am, 2011, 25(6): S. 1135-61, vii.
- 44. Lyman, S.D., James, L., Johnson, L., et al., Cloning of the human homologue of the murine flt3 ligand: a growth factor for early hematopoietic progenitor cells. Blood, 1994, 83(10): S. 2795-801.
- 45. Wander, S.A., Levis, M.J., und Fathi, A.T., *The evolving role of FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia: quizartinib and beyond.* Ther Adv Hematol, 2014, 5(3): S. 65-77.
- 46. Marcucci, G., Haferlach, T., und Dohner, H., *Molecular genetics of adult acute myeloid leukemia: prognostic and therapeutic implications.* J Clin Oncol, 2011, 29(5): S. 475-86.
- 47. Thiede, C., Steudel, C., Mohr, B., et al., 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): S. 4326-35.
- 48. Moreno, I., Martin, G., Bolufer, P., et al., Incidence and prognostic value of FLT3 internal tandem duplication and D835 mutations in acute myeloid leukemia. Haematologica, 2003, 88(1): S. 19-24.
- 49. Yamamoto, Y., Kiyoi, H., Nakano, Y., et al., Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. Blood, 2001, 97(8): S. 2434-9.
- 50. Verhaak, R.G., Goudswaard, C.S., van Putten, W., et al., Mutations in nucleophosmin (NPM1) in acute myeloid leukemia (AML): association with other gene abnormalities and previously established gene expression signatures and their favorable prognostic significance. Blood, 2005, 106(12): S. 3747-54.
- 51. Nerlov, C., *C/EBPalpha mutations in acute myeloid leukaemias*. Nat Rev Cancer, 2004, 4(5): S. 394-400.
- 52. Chou, W.C., Chou, S.C., Liu, C.Y., et al., TET2 mutation is an unfavorable prognostic factor in acute myeloid leukemia patients with intermediate-risk cytogenetics. Blood, 2011, 118(14): S. 3803-10.
- 53. Komanduri, K.V. und Levine, R.L., *Diagnosis and Therapy of Acute Myeloid Leukemia in the Era of Molecular Risk Stratification*. Annu Rev Med, 2016, 67: S. 59-72.

- 54. Papaemmanuil, E., Gerstung, M., Bullinger, L., *et al.*, *Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia*. N Engl J Med, 2016, 374(23): S. 2209-21.
- 55. Ivey, A., Hills, R.K., Simpson, M.A., *et al.*, *Assessment of Minimal Residual Disease in Standard-Risk AML*. N Engl J Med, 2016, 374(5): S. 422-33.
- 56. Friedenstein, A.J., Chailakhjan, R.K., und Lalykina, K.S., *The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells*. Cell Tissue Kinet, 1970, 3(4): S. 393-403.
- 57. Friedenstein, A.J., Petrakova, K.V., Kurolesova, A.I., et al., Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. Transplantation, 1968, 6(2): S. 230-47.
- 58. Schofield, R., *The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell*. Blood Cells, 1978, 4(1-2): S. 7-25.
- 59. Dexter, T.M., Wright, E.G., Krizsa, F., *et al.*, *Regulation of haemopoietic stem cell proliferation in long term bone marrow cultures*. Biomedicine, 1977, 27(9-10): S. 344-9.
- 60. Kfoury, Y. und Scadden, D.T., *Mesenchymal cell contributions to the stem cell niche*. Cell Stem Cell, 2015, 16(3): S. 239-53.
- 61. Hoggatt, J., Kfoury, Y., und Scadden, D.T., *Hematopoietic Stem Cell Niche in Health and Disease*. Annu Rev Pathol, 2016, 11: S. 555-81.
- 62. Caplan, A.I., *Mesenchymal stem cells*. J Orthop Res, 1991, 9(5): S. 641-50.
- 63. Bianco, P., "Mesenchymal" stem cells. Annu Rev Cell Dev Biol, 2014, 30: S. 677-704.
- 64. Horwitz, E.M., Le Blanc, K., Dominici, M., et al., Clarification of the nomenclature for *MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 2005, 7(5): S. 393-5.
- 65. Huang, G.T., Gronthos, S., und Shi, S., *Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine.* J Dent Res, 2009, 88(9): S. 792-806.
- 66. Majore, I., Moretti, P., Stahl, F., et al., Growth and differentiation properties of mesenchymal stromal cell populations derived from whole human umbilical cord. Stem Cell Rev, 2011, 7(1): S. 17-31.
- 67. Wang, H.S., Hung, S.C., Peng, S.T., et al., Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. Stem Cells, 2004, 22(7): S. 1330-7.
- 68. Lee, O.K., Kuo, T.K., Chen, W.M., et al., Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. Blood, 2004, 103(5): S. 1669-75.
- 69. Leyva-Leyva, M., Barrera, L., Lopez-Camarillo, C., et al., Characterization of mesenchymal stem cell subpopulations from human amniotic membrane with dissimilar osteoblastic potential. Stem Cells Dev, 2013, 22(8): S. 1275-87.
- 70. In 't Anker, P.S., Scherjon, S.A., Kleijburg-van der Keur, C., et al., Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. Stem Cells, 2004, 22(7): S. 1338-45.
- 71. Bianco, P., Robey, P.G., und Simmons, P.J., *Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays.* Cell Stem Cell, 2008, 2(4): S. 313-9.
- 72. Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., *et al.*, *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement.* Cytotherapy, 2006, 8(4): S. 315-7.
- 73. Keating, A., *Mesenchymal stromal cells: new directions*. Cell Stem Cell, 2012, 10(6): S. 709-16.

- 74. Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., *et al.*, *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. Science, 1999, 284(5411): S. 143-7.
- 75. Ehninger, A. und Trumpp, A., *The bone marrow stem cell niche grows up: mesenchymal stem cells and macrophages move in.* J Exp Med, 2011, 208(3): S. 421-8.
- 76. Lo Celso, C., Wu, J.W., und Lin, C.P., *In vivo imaging of hematopoietic stem cells and their microenvironment.* J Biophotonics, 2009, 2(11): S. 619-31.
- 77. Boulais, P.E. und Frenette, P.S., *Making sense of hematopoietic stem cell niches*. Blood, 2015, 125(17): S. 2621-9.
- 78. Calvi, L.M. und Link, D.C., *Cellular complexity of the bone marrow hematopoietic stem cell niche*. Calcif Tissue Int, 2014, 94(1): S. 112-24.
- 79. Calvi, L.M., Adams, G.B., Weibrecht, K.W., et al., Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. Nature, 2003, 425(6960): S. 841-6.
- 80. Zhang, J., Niu, C., Ye, L., et al., Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. Nature, 2003, 425(6960): S. 836-41.
- 81. Hoffman, C.M. und Calvi, L.M., *Minireview: complexity of hematopoietic stem cell regulation in the bone marrow microenvironment*. Mol Endocrinol, 2014, 28(10): S. 1592-601.
- 82. Tabe, Y. und Konopleva, M., Advances in understanding the leukaemia microenvironment. Br J Haematol, 2014, 164(6): S. 767-78.
- 83. Schroder, H.C., Wang, X.H., Wiens, M., et al., Silicate modulates the cross-talk between osteoblasts (SaOS-2) and osteoclasts (RAW 264.7 cells): inhibition of osteoclast growth and differentiation. J Cell Biochem, 2012, 113(10): S. 3197-206.
- 84. Nilsson, S.K., Johnston, H.M., Whitty, G.A., *et al.*, *Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells*. Blood, 2005, 106(4): S. 1232-9.
- 85. Stier, S., Ko, Y., Forkert, R., et al., Osteopontin is a hematopoietic stem cell niche component that negatively regulates stem cell pool size. J Exp Med, 2005, 201(11): S. 1781-91.
- 86. Nombela-Arrieta, C. und Silberstein, L.E., *The science behind the hypoxic niche of hematopoietic stem and progenitors*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2014, 2014(1): S. 542-7.
- 87. Parmar, K., Mauch, P., Vergilio, J.A., et al., Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(13): S. 5431-6.
- 88. Qian, H., Buza-Vidas, N., Hyland, C.D., et al., Critical role of thrombopoietin in maintaining adult quiescent hematopoietic stem cells. Cell Stem Cell, 2007, 1(6): S. 671-84.
- 89. Arai, F., Hirao, A., Ohmura, M., et al., *Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates* hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. Cell, 2004, 118(2): S. 149-61.
- 90. Mansour, A., Abou-Ezzi, G., Sitnicka, E., et al., Osteoclasts promote the formation of hematopoietic stem cell niches in the bone marrow. J Exp Med, 2012, 209(3): S. 537-49.
- 91. Mendez-Ferrer, S., Lucas, D., Battista, M., *et al.*, *Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations*. Nature, 2008, 452(7186): S. 442-7.
- 92. Katayama, Y., Battista, M., Kao, W.M., et al., Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. Cell, 2006, 124(2): S. 407-21.

- 93. Spiegel, A., Shivtiel, S., Kalinkovich, A., et al., Catecholaminergic neurotransmitters regulate migration and repopulation of immature human CD34+ cells through Wnt signaling. Nat Immunol, 2007, 8(10): S. 1123-31.
- 94. Yamazaki, S., Ema, H., Karlsson, G., et al., Nonmyelinating Schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche. Cell, 2011, 147(5): S. 1146-58.
- 95. Ding, L., Saunders, T.L., Enikolopov, G., et al., Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. Nature, 2012, 481(7382): S. 457-62.
- 96. Mendez-Ferrer, S., Michurina, T.V., Ferraro, F., *et al.*, *Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche*. Nature, 2010, 466(7308): S. 829-34.
- 97. Kunisaki, Y., Bruns, I., Scheiermann, C., et al., Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence. Nature, 2013, 502(7473): S. 637-43.
- 98. Garcia-Garcia, A., de Castillejo, C.L., und Mendez-Ferrer, S., *BMSCs and hematopoiesis*. Immunol Lett, 2015, 168(2): S. 129-35.
- 99. Naveiras, O., Nardi, V., Wenzel, P.L., et al., Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. Nature, 2009, 460(7252): S. 259-63.
- 100. Chow, A., Lucas, D., Hidalgo, A., et al., Bone marrow CD169+ macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche. J Exp Med, 2011, 208(2): S. 261-71.
- 101. Winkler, I.G., Sims, N.A., Pettit, A.R., et al., Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs. Blood, 2010, 116(23): S. 4815-28.
- 102. Bruns, I., Lucas, D., Pinho, S., et al., Megakaryocytes regulate hematopoietic stem cell quiescence through CXCL4 secretion. Nat Med, 2014, 20(11): S. 1315-20.
- 103. Reagan, M.R. und Rosen, C.J., *Navigating the bone marrow niche: translational insights and cancer-driven dysfunction.* Nat Rev Rheumatol, 2016, 12(3): S. 154-68.
- 104. Zhao, M., Perry, J.M., Marshall, H., et al., Megakaryocytes maintain homeostatic quiescence and promote post-injury regeneration of hematopoietic stem cells. Nat Med, 2014, 20(11): S. 1321-6.
- 105. Yu, V.W. und Scadden, D.T., *Heterogeneity of the bone marrow niche*. Curr Opin Hematol, 2016, 23(4): S. 331-8.
- 106. Olson, T.S., Caselli, A., Otsuru, S., et al., Megakaryocytes promote murine osteoblastic HSC niche expansion and stem cell engraftment after radioablative conditioning. Blood, 2013, 121(26): S. 5238-49.
- 107. Greenbaum, A., Hsu, Y.M., Day, R.B., et al., CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. Nature, 2013, 495(7440): S. 227-30.
- 108. Christopher, M.J., Liu, F., Hilton, M.J., et al., Suppression of CXCL12 production by bone marrow osteoblasts is a common and critical pathway for cytokine-induced mobilization. Blood, 2009, 114(7): S. 1331-9.
- 109. Nagasawa, T., Hirota, S., Tachibana, K., et al., Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. Nature, 1996, 382(6592): S. 635-8.
- 110. Calvi, L.M. und Link, D.C., *The hematopoietic stem cell niche in homeostasis and disease*. Blood, 2015, 126(22): S. 2443-51.

- 111. Sipkins, D.A., Wei, X., Wu, J.W., et al., In vivo imaging of specialized bone marrow endothelial microdomains for tumour engraftment. Nature, 2005, 435(7044): S. 969-73.
- 112. Li, Z. und Li, L., *Understanding hematopoietic stem-cell microenvironments*. Trends Biochem Sci, 2006, 31(10): S. 589-95.
- 113. Lo Celso, C. und Scadden, D.T., *The haematopoietic stem cell niche at a glance*. J Cell Sci, 2011, 124(Pt 21): S. 3529-35.
- Priestley, G.V., Scott, L.M., Ulyanova, T., et al., Lack of alpha4 integrin expression in stem cells restricts competitive function and self-renewal activity. Blood, 2006, 107(7): S. 2959-67.
- Greenbaum, A.M., Revollo, L.D., Woloszynek, J.R., et al., N-cadherin in osteolineage cells is not required for maintenance of hematopoietic stem cells. Blood, 2012, 120(2): S. 295-302.
- 116. Petit, I., Szyper-Kravitz, M., Nagler, A., et al., G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. Nat Immunol, 2002, 3(7): S. 687-94.
- 117. Sanchez-Aguilera, A. und Mendez-Ferrer, S. *The hematopoietic stem-cell niche in health and leukemia*. Cell Mol Life Sci, 2016, DOI: 10.1007/s00018-016-2306-y.
- 118. Fulzele, K., Krause, D.S., Panaroni, C., et al., Myelopoiesis is regulated by osteocytes through Gsalpha-dependent signaling. Blood, 2013, 121(6): S. 930-9.
- 119. Calvi, L.M., Bromberg, O., Rhee, Y., et al., Osteoblastic expansion induced by parathyroid hormone receptor signaling in murine osteocytes is not sufficient to increase hematopoietic stem cells. Blood, 2012, 119(11): S. 2489-99.
- 120. Li, J.Y., Adams, J., Calvi, L.M., et al., PTH expands short-term murine hemopoietic stem cells through T cells. Blood, 2012, 120(22): S. 4352-62.
- 121. Wang, L., Benedito, R., Bixel, M.G., et al., Identification of a clonally expanding haematopoietic compartment in bone marrow. EMBO J, 2013, 32(2): S. 219-30.
- 122. Acar, M., Kocherlakota, K.S., Murphy, M.M., et al., Deep imaging of bone marrow shows non-dividing stem cells are mainly perisinusoidal. Nature, 2015, 526(7571): S. 126-30.
- 123. Kiel, M.J., Yilmaz, O.H., Iwashita, T., et al., SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. Cell, 2005, 121(7): S. 1109-21.
- 124. Morrison, S.J. und Scadden, D.T., *The bone marrow niche for haematopoietic stem cells*. Nature, 2014, 505(7483): S. 327-34.
- 125. Itkin, T., Gur-Cohen, S., Spencer, J.A., et al., Distinct bone marrow blood vessels differentially regulate haematopoiesis. Nature, 2016, 532(7599): S. 323-8.
- 126. Walkley, C.R., Olsen, G.H., Dworkin, S., et al., A microenvironment-induced myeloproliferative syndrome caused by retinoic acid receptor gamma deficiency. Cell, 2007, 129(6): S. 1097-110.
- 127. Walkley, C.R., Shea, J.M., Sims, N.A., et al., Rb regulates interactions between hematopoietic stem cells and their bone marrow microenvironment. Cell, 2007, 129(6): S. 1081-95.
- 128. Rupec, R.A., Jundt, F., Rebholz, B., et al., Stroma-mediated dysregulation of myelopoiesis in mice lacking I kappa B alpha. Immunity, 2005, 22(4): S. 479-91.
- 129. Evans, A.G. und Calvi, L.M., Notch signaling in the malignant bone marrow microenvironment: implications for a niche-based model of oncogenesis. Ann N Y Acad Sci, 2015, 1335: S. 63-77.

- 130. Kim, Y.W., Koo, B.K., Jeong, H.W., et al., Defective Notch activation in microenvironment leads to myeloproliferative disease. Blood, 2008, 112(12): S. 4628-38.
- 131. Kode, A., Manavalan, J.S., Mosialou, I., et al., Leukaemogenesis induced by an activating beta-catenin mutation in osteoblasts. Nature, 2014, 506(7487): S. 240-4.
- 132. Raaijmakers, M.H., Mukherjee, S., Guo, S., et al., Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia. Nature, 2010, 464(7290): S. 852-7.
- 133. Dong, L., Yu, W.M., Zheng, H., et al. Leukaemogenic effects of Ptpn11 activating mutations in the stem cell microenvironment. Nature, 2016, DOI: 10.1038/nature20131.
- Tartaglia, M., Mehler, E.L., Goldberg, R., et al., Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome. Nat Genet, 2001, 29(4): S. 465-8.
- 135. Price, T. und Sipkins, D.A., *Rewiring the niche: sympathetic neuropathy drives malignant niche transformation.* Cell Stem Cell, 2014, 15(3): S. 261-2.
- 136. Hu, X., Shen, H., Tian, C., et al., *Kinetics of normal hematopoietic stem and progenitor cells in a Notch1-induced leukemia model*. Blood, 2009, 114(18): S. 3783-92.
- 137. Colmone, A., Amorim, M., Pontier, A.L., *et al.*, *Leukemic cells create bone marrow niches that disrupt the behavior of normal hematopoietic progenitor cells.* Science, 2008, 322(5909): S. 1861-5.
- 138. Schepers, K., Pietras, E.M., Reynaud, D., *et al.*, *Myeloproliferative neoplasia remodels the endosteal bone marrow niche into a self-reinforcing leukemic niche*. Cell Stem Cell, 2013, 13(3): S. 285-99.
- 139. Schepers, K., Campbell, T.B., und Passegue, E., *Normal and leukemic stem cell niches: insights and therapeutic opportunities.* Cell Stem Cell, 2015, 16(3): S. 254-67.
- 140. Medyouf, H., Mossner, M., Jann, J.C., et al., Myelodysplastic cells in patients reprogram mesenchymal stromal cells to establish a transplantable stem cell niche disease unit. Cell Stem Cell, 2014, 14(6): S. 824-37.
- 141. Hanoun, M., Zhang, D., Mizoguchi, T., et al., Acute myelogenous leukemia-induced sympathetic neuropathy promotes malignancy in an altered hematopoietic stem cell niche. Cell Stem Cell, 2014, 15(3): S. 365-75.
- 142. Arranz, L., Sanchez-Aguilera, A., Martin-Perez, D., et al., Neuropathy of haematopoietic stem cell niche is essential for myeloproliferative neoplasms. Nature, 2014, 512(7512): S. 78-81.
- 143. Santamaria, C., Muntion, S., Roson, B., et al., Impaired expression of DICER, DROSHA, SBDS and some microRNAs in mesenchymal stromal cells from myelodysplastic syndrome patients. Haematologica, 2012, 97(8): S. 1218-24.
- 144. Blau, O., Baldus, C.D., Hofmann, W.K., et al., Mesenchymal stromal cells of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia patients have distinct genetic abnormalities compared with leukemic blasts. Blood, 2011, 118(20): S. 5583-92.
- 145. Blau, O., Hofmann, W.K., Baldus, C.D., et al., Chromosomal aberrations in bone marrow mesenchymal stroma cells from patients with myelodysplastic syndrome and acute myeloblastic leukemia. Exp Hematol, 2007, 35(2): S. 221-9.
- 146. Geyh, S., Rodriguez-Paredes, M., Jager, P., et al. Functional inhibition of mesenchymal stromal cells in acute myeloid leukemia. Leukemia, 2015, DOI: 10.1038/leu.2015.325.
- 147. Chandran, P., Le, Y., Li, Y., et al., Mesenchymal stromal cells from patients with acute myeloid leukemia have altered capacity to expand differentiated hematopoietic progenitors. Leuk Res, 2015, 39(4): S. 486-93.

- 148. Padro, T., Ruiz, S., Bieker, R., et al., Increased angiogenesis in the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia. Blood, 2000, 95(8): S. 2637-44.
- 149. Weidenaar, A.C., ter Elst, A., Koopmans-Klein, G., et al., High acute myeloid leukemia derived VEGFA levels are associated with a specific vascular morphology in the leukemic bone marrow. Cell Oncol (Dordr), 2011, 34(4): S. 289-96.
- 150. Cogle, C.R., Bosse, R.C., Brewer, T., et al., Acute myeloid leukemia in the vascular niche. Cancer Lett, 2016, 380(2): S. 552-60.
- 151. Padro, T., Bieker, R., Ruiz, S., et al., Overexpression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its cellular receptor KDR (VEGFR-2) in the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia. Leukemia, 2002, 16(7): S. 1302-10.
- 152. Schliemann, C., Bieker, R., Padro, T., et al., Expression of angiopoietins and their receptor Tie2 in the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia. Haematologica, 2006, 91(9): S. 1203-11.
- 153. Jensen, P.O., Mortensen, B.T., Hodgkiss, R.J., *et al.*, *Increased cellular hypoxia and reduced proliferation of both normal and leukaemic cells during progression of acute myeloid leukaemia in rats.* Cell Prolif, 2000, 33(6): S. 381-95.
- 154. Bernasconi, P., Farina, M., Boni, M., et al. Therapeutically targeting self-reinforcing leukemic niches in acute myeloid leukemia (AML): A worthy endeavour? Am J Hematol, 2016, DOI: 10.1002/ajh.24312.
- 155. Konopleva, M., Konoplev, S., Hu, W., et al., Stromal cells prevent apoptosis of AML cells by up-regulation of anti-apoptotic proteins. Leukemia, 2002, 16(9): S. 1713-24.
- 156. Krause, D.S. und Scadden, D.T., A hostel for the hostile: the bone marrow niche in hematologic neoplasms. Haematologica, 2015, 100(11): S. 1376-87.
- 157. Goardon, N., Marchi, E., Atzberger, A., et al., Coexistence of LMPP-like and GMP-like leukemia stem cells in acute myeloid leukemia. Cancer Cell, 2011, 19(1): S. 138-52.
- 158. Passegue, E., Jamieson, C.H., Ailles, L.E., *et al.*, *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: S. 11842-9.
- 159. Rickham, P.P., Human Experimentation. Code of Ethics of the World Medical Association. Declaration of Helsinki. Br Med J, 1964, 2(5402): S. 177.
- Aslan, H., Zilberman, Y., Kandel, L., et al., Osteogenic differentiation of noncultured immunoisolated bone marrow-derived CD105+ cells. Stem Cells, 2006, 24(7): S. 1728-37.
- 161. Illumina. Inc. 2016, An Introduction to Next-Generation Sequencing Technology, erhältlich über: <u>http://www.illumina.com/content/dam/illumina-</u> marketing/documents/products/illumina\_sequencing\_introduction.pdf.
- 162. Li, H., A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. Bioinformatics, 2011, 27(21): S. 2987-93.
- 163. Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., et al., The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. Bioinformatics, 2009, 25(16): S. 2078-9.
- 164. Koboldt, D.C., Zhang, Q., Larson, D.E., et al., VarScan 2: somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. Genome Res, 2012, 22(3): S. 568-76.
- 165. Koboldt, D.C., Chen, K., Wylie, T., et al., VarScan: variant detection in massively parallel sequencing of individual and pooled samples. Bioinformatics, 2009, 25(17): S. 2283-5.

- 166. Sherry, S.T., Ward, M.H., Kholodov, M., et al., dbSNP: the NCBI database of genetic variation. Nucleic Acids Res, 2001, 29(1): S. 308-11.
- 167. Helmholtz. Zentrum München, ExonPrimer, erhältlich über: https://ihg.helmholtzmuenchen.de/ihg/ExonPrimer.html.
- 168. Bolger, A.M., Lohse, M., und Usadel, B., *Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data*. Bioinformatics, 2014, 30(15): S. 2114-20.
- 169. Kim, D., Pertea, G., Trapnell, C., et al. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. Genome Biol, 2013, DOI: 10.1186/gb-2013-14-4-r36.
- 170. Love, M.I., Huber, W., und Anders, S., *Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2*. Genome Biol, 2014, 15(12): S. 550.
- 171. Subhash, S. und Kanduri, C. GeneSCF: a real-time based functional enrichment tool with support for multiple organisms. BMC Bioinformatics, 2016, DOI: 10.1186/s12859-016-1250-z.
- 172. Mondal, T., Subhash, S., Vaid, R., *et al. MEG3 long noncoding RNA regulates the TGFbeta pathway genes through formation of RNA-DNA triplex structures*. Nat Commun, 2015, DOI: 10.1038/ncomms8743.
- 173. Subhash S, GeneSCF: Gene set clustering based on functional annotation. <u>http://github.com/santhilalsubhash/geneSCF.git</u>. 2014.
- 174. Kanehisa, M. und Goto, S., *KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes*. Nucleic Acids Res, 2000, 28(1): S. 27-30.
- 175. Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., *et al.*, *Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks*. Genome Res, 2003, 13(11): S. 2498-504.
- Bindea, G., Galon, J., und Mlecnik, B., *CluePedia Cytoscape plugin: pathway insights using integrated experimental and in silico data*. Bioinformatics, 2013, 29(5): S. 661-3.
- 177. Bindea, G., Mlecnik, B., Hackl, H., et al., ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. Bioinformatics, 2009, 25(8): S. 1091-3.
- 178. Affymetrix. Inc., 2003, Data Sheet GeneChip® Human Genome Arrays, erhältlich über: http://media.affymetrix.com/support/technical/datasheets/human\_datasheet.pdf.
- 179. Affymetrix. Inc. 2003, Data Sheet GeneChip® Human Genome U133 Arrays, erhältlich über:

http://media.affymetrix.com/support/technical/datasheets/hgu133arrays\_datasheet.pdf.

- 180. Bock, C., *Analysing and interpreting DNA methylation data*. Nat Rev Genet, 2012, 13(10): S. 705-19.
- 181. Ehrlich, M., Gama-Sosa, M.A., Huang, L.H., et al., Amount and distribution of 5methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. Nucleic Acids Res, 1982, 10(8): S. 2709-21.
- 182. Bibikova, M., Barnes, B., Tsan, C., et al., High density DNA methylation array with single CpG site resolution. Genomics, 2011, 98(4): S. 288-95.
- 183. Illumina. Inc. 2015, Illumina Methylation BeadChips Achieve Breadth of Coverage Using 2 Infinium Chemistries, erhältlich über: <u>http://www.illumina.com/documents/products/technotes/technote\_hm450\_data\_analys</u> <u>is\_optimization.pdf</u>.
- 184. Illumina contributed by Daniel J. Weisenberger, D.V.D.B., Fei Pan, Benjamin P. Berman, Peter W. Laird. Inc., Comprehensive DNA Methylation Analysis on the

Illumina® Infinium® Assay Platform, erhältlich über: <u>http://www.illumina.com/documents/products/appnote\_dna\_methylation\_an</u> alysis\_infinium.pdf.

- 185. Maksimovic, J., Gordon, L., und Oshlack, A. SWAN: Subset-quantile within array normalization for illumina infinium HumanMethylation450 BeadChips. Genome Biol, 2012, DOI: 10.1186/gb-2012-13-6-r44.
- 186. Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., *et al.*, *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1986, 51 Pt 1: S. 263-73.
- 187. Eva Kristin von der Heide. *Charakterisierung potentieller Interaktionspartner der cAMP-abhängigen Proteinkinase*. Diplomarbeit, eingereicht am Institut für Biologie der Universität Kassel im November 2010.
- 188. Arya, M., Shergill, I.S., Williamson, M., *et al.*, *Basic principles of real-time quantitative PCR*. Expert Rev Mol Diagn, 2005, 5(2): S. 209-19.
- 189. Baldus, C.D., Tanner, S.M., Ruppert, A.S., et al., BAALC expression predicts clinical outcome of de novo acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics: a Cancer and Leukemia Group B Study. Blood, 2003, 102(5): S. 1613-8.
- 190. Livak, K.J. und Schmittgen, T.D., Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods, 2001, 25(4): S. 402-8.
- 191. Agarwal, N., Nussenzveig, R.H., Swierczek, S.I., et al., Does HUMARA assay for assessment of clonal hematopoiesis have shortcomings? Blood, 2009, 114(11): S. 2357-8; author reply 2358-9.
- 192. Lyon, M.F., X-chromosome inactivation. Curr Biol, 1999, 9(7): S. R235-7.
- 193. Uchida, T., Ohashi, H., Aoki, E., et al., Clonality analysis by methylation-specific PCR for the human androgen-receptor gene (HUMARA-MSP). Leukemia, 2000, 14(1): S. 207-12.
- 194. Busque, L., Zhu, J., DeHart, D., et al., An expression based clonality assay at the human androgen receptor locus (HUMARA) on chromosome X. Nucleic Acids Res, 1994, 22(4): S. 697-8.
- 195. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature, 1970, 227(5259): S. 680-5.
- 196. Burnette, W.N., "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. Anal Biochem, 1981, 112(2): S. 195-203.
- 197. Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., et al., Lipofection: a highly efficient, lipidmediated DNA-transfection procedure. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987, 84(21): S. 7413-7.
- 198. Wu, G., Feng, X., und Stein, L. *A human functional protein interaction network and its application to cancer data analysis*. Genome Biol, 2010, DOI: 10.1186/gb-2010-11-5-r53.
- 199. Squillaro, T., Peluso, G., und Galderisi, U., *Clinical Trials With Mesenchymal Stem Cells: An Update*. Cell Transplant, 2016, 25(5): S. 829-48.
- 200. Frenette, P.S., Pinho, S., Lucas, D., et al., Mesenchymal stem cell: keystone of the hematopoietic stem cell niche and a stepping-stone for regenerative medicine. Annu Rev Immunol, 2013, 31: S. 285-316.

- 201. Mo, M., Wang, S., Zhou, Y., et al., Mesenchymal stem cell subpopulations: phenotype, property and therapeutic potential. Cell Mol Life Sci, 2016, 73(17): S. 3311-21.
- 202. Zaher, W., Harkness, L., Jafari, A., et al., An update of human mesenchymal stem cell biology and their clinical uses. Arch Toxicol, 2014, 88(5): S. 1069-82.
- 203. Hass, R., Kasper, C., Bohm, S., et al. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. Cell Commun Signal, 2011, DOI: 10.1186/1478-811X-9-12.
- 204. Nombela-Arrieta, C., Ritz, J., und Silberstein, L.E., *The elusive nature and function of mesenchymal stem cells*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011, 12(2): S. 126-31.
- 205. Jones, E.A., English, A., Kinsey, S.E., *et al.*, *Optimization of a flow cytometry-based protocol for detection and phenotypic characterization of multipotent mesenchymal stromal cells from human bone marrow*. Cytometry B Clin Cytom, 2006, 70(6): S. 391-9.
- 206. Harichandan, A. und Buhring, H.J., *Prospective isolation of human MSC*. Best Pract Res Clin Haematol, 2011, 24(1): S. 25-36.
- 207. Qian, H., Le Blanc, K., und Sigvardsson, M., Primary mesenchymal stem and progenitor cells from bone marrow lack expression of CD44 protein. J Biol Chem, 2012, 287(31): S. 25795-807.
- Jones, E.A., Kinsey, S.E., English, A., et al., Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. Arthritis Rheum, 2002, 46(12): S. 3349-60.
- 209. Quirici, N., Soligo, D., Bossolasco, P., *et al.*, *Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies*. Exp Hematol, 2002, 30(7): S. 783-91.
- 210. Buhring, H.J., Battula, V.L., Treml, S., et al., Novel markers for the prospective isolation of human MSC. Ann N Y Acad Sci, 2007, 1106: S. 262-71.
- 211. Kuci, S., Kuci, Z., Kreyenberg, H., et al., CD271 antigen defines a subset of multipotent stromal cells with immunosuppressive and lymphohematopoietic engraftment-promoting properties. Haematologica, 2010, 95(4): S. 651-9.
- 212. Alvarez-Viejo, M., Menendez-Menendez, Y., und Otero-Hernandez, J., *CD271 as a marker to identify mesenchymal stem cells from diverse sources before culture.* World J Stem Cells, 2015, 7(2): S. 470-6.
- 213. Jones, E. und McGonagle, D., *Human bone marrow mesenchymal stem cells in vivo*. Rheumatology (Oxford), 2008, 47(2): S. 126-31.
- 214. Castro-Malaspina, H., Gay, R.E., Resnick, G., et al., Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. Blood, 1980, 56(2): S. 289-301.
- 215. Boxall, S.A. und Jones, E. *Markers for characterization of bone marrow multipotential stromal cells*. Stem Cells Int, 2012, DOI: 10.1155/2012/975871.
- 216. Sivasubramaniyan, K., Lehnen, D., Ghazanfari, R., et al., Phenotypic and functional heterogeneity of human bone marrow- and amnion-derived MSC subsets. Ann N Y Acad Sci, 2012, 1266: S. 94-106.
- 217. Lechanteur, C., Briquet, A., Giet, O., *et al. Clinical-scale expansion of mesenchymal stromal cells: a large banking experience.* J Transl Med, 2016, DOI: 10.1186/s12967-016-0892-y.
- 218. Koller, M., Willheim, M., Krugluger, W., et al., Immunophenotyping of human bone marrow-derived macrophages. Scand J Immunol, 1996, 43(6): S. 626-32.

- 219. Whitfield, M.J., Lee, W.C., und Van Vliet, K.J., *Onset of heterogeneity in culture-expanded bone marrow stromal cells*. Stem Cell Res, 2013, 11(3): S. 1365-77.
- 220. Jones, E. und Schafer, R. *Where is the common ground between bone marrow mesenchymal stem/stromal cells from different donors and species?* Stem Cell Res Ther, 2015, DOI: 10.1186/s13287-015-0144-8.
- 221. Cordeiro-Spinetti, E., de Mello, W., Trindade, L.S., *et al. Human bone marrow mesenchymal progenitors: perspectives on an optimized in vitro manipulation*. Front Cell Dev Biol, 2014, DOI: 10.3389/fcell.2014.00007.
- 222. Bentivegna, A., Roversi, G., Riva, G., et al. The Effect of Culture on Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells: Focus on DNA Methylation Profiles. Stem Cells Int, 2016, DOI: 10.1155/2016/5656701.
- 223. Mossner, M., Nolte, F., Hutter, G., et al., Skewed X-inactivation patterns in ageing healthy and myelodysplastic haematopoiesis determined by a pyrosequencing based transcriptional clonality assay. J Med Genet, 2013, 50(2): S. 108-17.
- 224. Li, H., Ghazanfari, R., Zacharaki, D., et al., Low/negative expression of PDGFR-alpha identifies the candidate primary mesenchymal stromal cells in adult human bone marrow. Stem Cell Reports, 2014, 3(6): S. 965-74.
- 225. Maijenburg, M.W., Kleijer, M., Vermeul, K., et al., The composition of the mesenchymal stromal cell compartment in human bone marrow changes during development and aging. Haematologica, 2012, 97(2): S. 179-83.
- 226. Battula, V.L., Treml, S., Bareiss, P.M., et al., Isolation of functionally distinct mesenchymal stem cell subsets using antibodies against CD56, CD271, and mesenchymal stem cell antigen-1. Haematologica, 2009, 94(2): S. 173-84.
- 227. Sobiesiak, M., Sivasubramaniyan, K., Hermann, C., et al., The mesenchymal stem cell antigen MSCA-1 is identical to tissue non-specific alkaline phosphatase. Stem Cells Dev, 2010, 19(5): S. 669-77.
- Sacchetti, B., Funari, A., Michienzi, S., et al., Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. Cell, 2007, 131(2): S. 324-36.
- 229. Simmons, P.J. und Torok-Storb, B., *Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody*, *STRO-1*. Blood, 1991, 78(1): S. 55-62.
- 230. Hu, X., Garcia, M., Weng, L., et al. Identification of a common mesenchymal stromal progenitor for the adult haematopoietic niche. Nat Commun, 2016, DOI: 10.1038/ncomms13095.
- 231. Krause, D.S. und Van Etten, R.A., *Right on target: eradicating leukemic stem cells*. Trends Mol Med, 2007, 13(11): S. 470-81.
- 232. Ishikawa, F., Yoshida, S., Saito, Y., et al., Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region. Nat Biotechnol, 2007, 25(11): S. 1315-21.
- 233. Flores-Figueroa, E., Varma, S., Montgomery, K., et al., Distinctive contact between CD34+ hematopoietic progenitors and CXCL12+ CD271+ mesenchymal stromal cells in benign and myelodysplastic bone marrow. Lab Invest, 2012, 92(9): S. 1330-41.
- 234. Geyh, S., Oz, S., Cadeddu, R.P., et al., Insufficient stromal support in MDS results from molecular and functional deficits of mesenchymal stromal cells. Leukemia, 2013, 27(9): S. 1841-51.
- 235. Lim, M., Pang, Y., Ma, S., et al. Altered mesenchymal niche cells impede generation of normal hematopoietic progenitor cells in leukemic bone marrow. Leukemia, 2015, DOI: 10.1038/leu.2015.210.

- 236. Kim, J.A., Shim, J.S., Lee, G.Y., et al., Microenvironmental remodeling as a parameter and prognostic factor of heterogeneous leukemogenesis in acute myelogenous leukemia. Cancer Res, 2015, 75(11): S. 2222-31.
- 237. Zhao, Z.G., Liang, Y., Li, K., et al., Phenotypic and functional comparison of mesenchymal stem cells derived from the bone marrow of normal adults and patients with hematologic malignant diseases. Stem Cells Dev, 2007, 16(4): S. 637-48.
- 238. Chen, Q., Yuan, Y., und Chen, T., Morphology, differentiation and adhesion molecule expression changes of bone marrow mesenchymal stem cells from acute myeloid leukemia patients. Mol Med Rep, 2014, 9(1): S. 293-8.
- 239. Wagner, W., Horn, P., Castoldi, M., et al. Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process. PLoS One, 2008, DOI: 10.1371/journal.pone.0002213.
- 240. Andra, K., Nikolic, B., Stocher, M., et al., Not just scaffolding: plectin regulates actin dynamics in cultured cells. Genes Dev, 1998, 12(21): S. 3442-51.
- 241. Foisner, R., Leichtfried, F.E., Herrmann, H., et al., Cytoskeleton-associated plectin: in situ localization, in vitro reconstitution, and binding to immobilized intermediate filament proteins. J Cell Biol, 1988, 106(3): S. 723-33.
- 242. Castanon, M.J., Walko, G., Winter, L., *et al.*, *Plectin-intermediate filament partnership in skin, skeletal muscle, and peripheral nerve.* Histochem Cell Biol, 2013, 140(1): S. 33-53.
- 243. Bolling, M.C., Jongbloed, J.D., Boven, L.G., et al., Plectin mutations underlie epidermolysis bullosa simplex in 8% of patients. J Invest Dermatol, 2014, 134(1): S. 273-6.
- 244. Winter, L., Turk, M., Harter, P.N., et al. Downstream effects of plectin mutations in epidermolysis bullosa simplex with muscular dystrophy. Acta Neuropathol Commun, 2016, DOI: 10.1186/s40478-016-0314-7.
- 245. Rezniczek, G.A., Walko, G., und Wiche, G., *Plectin gene defects lead to various forms* of epidermolysis bullosa simplex. Dermatol Clin, 2010, 28(1): S. 33-41.
- 246. Charlesworth, A., Chiaverini, C., Chevrant-Breton, J., et al., Epidermolysis bullosa simplex with PLEC mutations: new phenotypes and new mutations. Br J Dermatol, 2013, 168(4): S. 808-14.
- 247. Andra, K., Lassmann, H., Bittner, R., et al., Targeted inactivation of plectin reveals essential function in maintaining the integrity of skin, muscle, and heart cytoarchitecture. Genes Dev, 1997, 11(23): S. 3143-56.
- 248. Ackerl, R., Walko, G., Fuchs, P., et al., Conditional targeting of plectin in prenatal and adult mouse stratified epithelia causes keratinocyte fragility and lesional epidermal barrier defects. J Cell Sci, 2007, 120(Pt 14): S. 2435-43.
- 249. Winter, L., Kuznetsov, A.V., Grimm, M., et al., Plectin isoform P1b and P1d deficiencies differentially affect mitochondrial morphology and function in skeletal muscle. Hum Mol Genet, 2015, 24(16): S. 4530-44.
- 250. Cai, J., Miao, X., Li, Y., et al., Whole-genome sequencing identifies genetic variances in culture-expanded human mesenchymal stem cells. Stem Cell Reports, 2014, 3(2): S. 227-33.
- 251. Lopez-Villar, O., Garcia, J.L., Sanchez-Guijo, F.M., et al., Both expanded and uncultured mesenchymal stem cells from MDS patients are genomically abnormal, showing a specific genetic profile for the 5q- syndrome. Leukemia, 2009, 23(4): S. 664-72.

- 252. Rosland, G.V., Svendsen, A., Torsvik, A., et al., Long-term cultures of bone marrowderived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation. Cancer Res, 2009, 69(13): S. 5331-9.
- 253. Wang, Y., Huso, D.L., Harrington, J., et al., Outgrowth of a transformed cell population derived from normal human BM mesenchymal stem cell culture. Cytotherapy, 2005, 7(6): S. 509-19.
- 254. Chen, G., Yue, A., Ruan, Z., et al. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells do not undergo malignant transformation during long-term culturing in serum-free medium. PLoS One, 2014, DOI: 10.1371/journal.pone.0098565.
- 255. Wang, Y., Zhang, Z., Chi, Y., et al. Long-term cultured mesenchymal stem cells frequently develop genomic mutations but do not undergo malignant transformation. Cell Death Dis, 2013, DOI: 10.1038/cddis.2013.480.
- 256. Bernardo, M.E., Zaffaroni, N., Novara, F., et al., Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. Cancer Res, 2007, 67(19): S. 9142-9.
- 257. Ben-David, U., Mayshar, Y., und Benvenisty, N., *Large-scale analysis reveals acquisition of lineage-specific chromosomal aberrations in human adult stem cells.* Cell Stem Cell, 2011, 9(2): S. 97-102.
- 258. Sensebe, L., Tarte, K., Galipeau, J., *et al.*, *Limited acquisition of chromosomal aberrations in human adult mesenchymal stromal cells*. Cell Stem Cell, 2012, 10(1): S. 9-10; author reply 10-1.
- 259. Tarte, K., Gaillard, J., Lataillade, J.J., *et al.*, *Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation*. Blood, 2010, 115(8): S. 1549-53.
- 260. Redaelli, S., Bentivegna, A., Foudah, D., et al. From cytogenomic to epigenomic profiles: monitoring the biologic behavior of in vitro cultured human bone marrow mesenchymal stem cells. Stem Cell Res Ther, 2012, DOI: 10.1186/scrt138.
- 261. Binato, R., de Souza Fernandez, T., Lazzarotto-Silva, C., *et al.*, *Stability of human mesenchymal stem cells during in vitro culture: considerations for cell therapy*. Cell Prolif, 2013, 46(1): S. 10-22.
- 262. Bentivegna, A., Miloso, M., Riva, G., et al. DNA Methylation Changes during In Vitro Propagation of Human Mesenchymal Stem Cells: Implications for Their Genomic Stability? Stem Cells Int, 2013, DOI: 10.1155/2013/192425.
- 263. Wagner, W., Ho, A.D., und Zenke, M., *Different facets of aging in human mesenchymal stem cells*. Tissue Eng Part B Rev, 2010, 16(4): S. 445-53.
- 264. Song, L.X., Guo, J., He, Q., et al., Bone marrow mesenchymal stem cells in myelodysplastic syndromes: cytogenetic characterization. Acta Haematol, 2012, 128(3): S. 170-7.
- 265. Bindra, R.S., Schaffer, P.J., Meng, A., et al., Alterations in DNA repair gene expression under hypoxia: elucidating the mechanisms of hypoxia-induced genetic instability. Ann N Y Acad Sci, 2005, 1059: S. 184-95.
- 266. Negrini, S., Gorgoulis, V.G., und Halazonetis, T.D., *Genomic instability--an evolving hallmark of cancer*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010, 11(3): S. 220-8.
- 267. Hanahan, D. und Weinberg, R.A., *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011, 144(5): S. 646-74.

- 268. Palumbo, A., Jr., Da Costa Nde, O., Bonamino, M.H., et al. Genetic instability in the tumor microenvironment: a new look at an old neighbor. Mol Cancer, 2015, DOI: 10.1186/s12943-015-0409-y.
- 269. Moinfar, F., Man, Y.G., Arnould, L., et al., Concurrent and independent genetic alterations in the stromal and epithelial cells of mammary carcinoma: implications for tumorigenesis. Cancer Res, 2000, 60(9): S. 2562-6.
- 270. Eng, C., Leone, G., Orloff, M.S., et al., Genomic alterations in tumor stroma. Cancer Res, 2009, 69(17): S. 6759-64.
- 271. Cowper-Sal lari, R., Zhang, X., Wright, J.B., *et al.*, *Breast cancer risk-associated SNPs modulate the affinity of chromatin for FOXA1 and alter gene expression*. Nat Genet, 2012, 44(11): S. 1191-8.
- 272. Papaemmanuil, E., Hosking, F.J., Vijayakrishnan, J., et al., Loci on 7p12.2, 10q21.2 and 14q11.2 are associated with risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. Nat Genet, 2009, 41(9): S. 1006-10.
- 273. Wang, Y. und Armstrong, S.A., *Genome-wide SNP analysis in cancer: leukemia shows the way.* Cancer Cell, 2007, 11(4): S. 308-9.
- Huang, J.C., Basu, S.K., Zhao, X., et al. Mesenchymal stromal cells derived from acute myeloid leukemia bone marrow exhibit aberrant cytogenetics and cytokine elaboration. Blood Cancer J, 2015, DOI: 10.1038/bcj.2015.17.
- 275. Menendez, P., Catalina, P., Rodriguez, R., et al., Bone marrow mesenchymal stem cells from infants with MLL-AF4+ acute leukemia harbor and express the MLL-AF4 fusion gene. J Exp Med, 2009, 206(13): S. 3131-41.
- 276. Gray, P.N., Dunlop, C.L., und Elliott, A.M., Not All Next Generation Sequencing Diagnostics are Created Equal: Understanding the Nuances of Solid Tumor Assay Design for Somatic Mutation Detection. Cancers (Basel), 2015, 7(3): S. 1313-32.
- 277. Wouters, B.J. und Delwel, R., *Epigenetics and approaches to targeted epigenetic therapy in acute myeloid leukemia.* Blood, 2016, 127(1): S. 42-52.
- 278. Shlush, L.I., Zandi, S., Mitchell, A., et al., Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. Nature, 2014, 506(7488): S. 328-33.
- 279. Razmara, M., Srinivasula, S.M., Wang, L., et al., CARD-8 protein, a new CARD family member that regulates caspase-1 activation and apoptosis. J Biol Chem, 2002, 277(16): S. 13952-8.
- 280. Thol, F., Kade, S., Schlarmann, C., et al., Frequency and prognostic impact of mutations in SRSF2, U2AF1, and ZRSR2 in patients with myelodysplastic syndromes. Blood, 2012, 119(15): S. 3578-84.
- 281. Zhang, S.J., Rampal, R., Manshouri, T., et al., Genetic analysis of patients with leukemic transformation of myeloproliferative neoplasms shows recurrent SRSF2 mutations that are associated with adverse outcome. Blood, 2012, 119(19): S. 4480-5.
- 282. Bausch, D., Thomas, S., Mino-Kenudson, M., et al., Plectin-1 as a novel biomarker for pancreatic cancer. Clin Cancer Res, 2011, 17(2): S. 302-9.
- 283. Sanna, V., Nurra, S., Pala, N., et al., Targeted Nanoparticles for the Delivery of Novel Bioactive Molecules to Pancreatic Cancer Cells. J Med Chem, 2016, 59(11): S. 5209-20.
- 284. Safran, M., Chalifa-Caspi, V., Shmueli, O., et al., Human Gene-Centric Databases at the Weizmann Institute of Science: GeneCards, UDB, CroW 21 and HORDE. Nucleic Acids Res, 2003, 31(1): S. 142-6.
- 285. Gene. Cards und HIPED für PLEC, erhältlich über: <u>http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PLEC</u>.

- 286. Wilhelm, M., Schlegl, J., Hahne, H., et al., Mass-spectrometry-based draft of the human proteome. Nature, 2014, 509(7502): S. 582-7.
- 287. Fishilevich, S., Zimmerman, S., Kohn, A., *et al. Genic insights from integrated human proteomics in GeneCards*. Database (Oxford), 2016, DOI: 10.1093/database/baw030.
- 288. Binato, R., de Almeida Oliveira, N.C., Du Rocher, B., et al., The molecular signature of AML mesenchymal stromal cells reveals candidate genes related to the leukemogenic process. Cancer Lett, 2015, 369(1): S. 134-43.
- 289. Civini, S., Jin, P., Ren, J., et al. Leukemia cells induce changes in human bone marrow stromal cells. J Transl Med, 2013, DOI: 10.1186/1479-5876-11-298.
- 290. Wu, J.Y., Purton, L.E., Rodda, S.J., et al., Osteoblastic regulation of B lymphopoiesis is mediated by Gs{alpha}-dependent signaling pathways. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(44): S. 16976-81.
- 291. Hald, S.M., Kiselev, Y., Al-Saad, S., et al. Prognostic impact of CXCL16 and CXCR6 in non-small cell lung cancer: combined high CXCL16 expression in tumor stroma and cancer cells yields improved survival. BMC Cancer, 2015, DOI: 10.1186/s12885-015-1446-z.
- 292. Ha, H.K., Lee, W., Park, H.J., et al., Clinical significance of CXCL16/CXCR6 expression in patients with prostate cancer. Mol Med Rep, 2011, 4(3): S. 419-24.
- 293. de Haan, G., Weersing, E., Dontje, B., et al., In vitro generation of long-term repopulating hematopoietic stem cells by fibroblast growth factor-1. Dev Cell, 2003, 4(2): S. 241-51.
- 294. Chen, S., Zambetti, N.A., Bindels, E.M., et al. Massive parallel RNA sequencing of highly purified mesenchymal elements in low-risk MDS reveals tissue-contextdependent activation of inflammatory programs. Leukemia, 2016, DOI: 10.1038/leu.2016.91.
- 295. Denadai, M.V., Viana, L.S., Affonso, R.J., Jr., et al. Expression of integrin genes and proteins in progression and dissemination of colorectal adenocarcinoma. BMC Clin Pathol, 2013, DOI: 10.1186/1472-6890-13-16.
- 296. Singh, V., Erb, U., und Zoller, M., *Cooperativity of CD44 and CD49d in leukemia cell homing, migration, and survival offers a means for therapeutic attack.* J Immunol, 2013, 191(10): S. 5304-16.
- 297. Chen, Q., Shou, P., Zhang, L., et al., An osteopontin-integrin interaction plays a critical role in directing adipogenesis and osteogenesis by mesenchymal stem cells. Stem Cells, 2014, 32(2): S. 327-37.
- 298. Kwon, M.J., Jang, B., Yi, J.Y., et al., Syndecans play dual roles as cell adhesion receptors and docking receptors. FEBS Lett, 2012, 586(16): S. 2207-11.
- 299. Hosokawa, K., Arai, F., Yoshihara, H., et al., Cadherin-based adhesion is a potential target for niche manipulation to protect hematopoietic stem cells in adult bone marrow. Cell Stem Cell, 2010, 6(3): S. 194-8.
- 300. Mosesson, Y., Mills, G.B., und Yarden, Y., *Derailed endocytosis: an emerging feature of cancer*. Nat Rev Cancer, 2008, 8(11): S. 835-50.
- 301. Sigismund, S., Confalonieri, S., Ciliberto, A., et al., Endocytosis and signaling: cell logistics shape the eukaryotic cell plan. Physiol Rev, 2012, 92(1): S. 273-366.
- 302. Caswell, P.T., Spence, H.J., Parsons, M., et al., Rab25 associates with alpha5beta1 integrin to promote invasive migration in 3D microenvironments. Dev Cell, 2007, 13(4): S. 496-510.

- 303. Kawamoto, T., Ohga, N., Akiyama, K., et al. Tumor-derived microvesicles induce proangiogenic phenotype in endothelial cells via endocytosis. PLoS One, 2012, DOI: 10.1371/journal.pone.0034045.
- 304. Pavlova, N.N. und Thompson, C.B., *The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism*. Cell Metab, 2016, 23(1): S. 27-47.
- 305. Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., und Thompson, C.B., *Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation*. Science, 2009, 324(5930): S. 1029-33.
- 306. Warburg, O., On the origin of cancer cells. Science, 1956, 123(3191): S. 309-14.
- 307. Balliet, R.M., Capparelli, C., Guido, C., et al., Mitochondrial oxidative stress in cancerassociated fibroblasts drives lactate production, promoting breast cancer tumor growth: understanding the aging and cancer connection. Cell Cycle, 2011, 10(23): S. 4065-73.
- 308. Carito, V., Bonuccelli, G., Martinez-Outschoorn, U.E., et al., Metabolic remodeling of the tumor microenvironment: migration stimulating factor (MSF) reprograms myofibroblasts toward lactate production, fueling anabolic tumor growth. Cell Cycle, 2012, 11(18): S. 3403-14.
- 309. Jezierska-Drutel, A., Rosenzweig, S.A., und Neumann, C.A., *Role of oxidative stress* and the microenvironment in breast cancer development and progression. Adv Cancer Res, 2013, 119: S. 107-25.
- 310. Martinez-Outschoorn, U.E., Lin, Z., Trimmer, C., et al., Cancer cells metabolically "fertilize" the tumor microenvironment with hydrogen peroxide, driving the Warburg effect: implications for PET imaging of human tumors. Cell Cycle, 2011, 10(15): S. 2504-20.
- 311. Moschoi, R., Imbert, V., Nebout, M., et al., Protective mitochondrial transfer from bone marrow stromal cells to acute myeloid leukemic cells during chemotherapy. Blood, 2016, 128(2): S. 253-64.
- 312. Jones, P.A., *Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond.* Nat Rev Genet, 2012, 13(7): S. 484-92.
- 313. Shen, H. und Laird, P.W., *Interplay between the cancer genome and epigenome*. Cell, 2013, 153(1): S. 38-55.
- 314. Schermelleh, L., Haemmer, A., Spada, F., et al., Dynamics of Dnmt1 interaction with the replication machinery and its role in postreplicative maintenance of DNA methylation. Nucleic Acids Res, 2007, 35(13): S. 4301-12.
- 315. Ito, S., D'Alessio, A.C., Taranova, O.V., et al., Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. Nature, 2010, 466(7310): S. 1129-33.
- 316. Wu, H. und Zhang, Y., *Reversing DNA methylation: mechanisms, genomics, and biological functions.* Cell, 2014, 156(1-2): S. 45-68.
- 317. Gore, A.V. und Weinstein, B.M., *DNA methylation in hematopoietic development and disease*. Exp Hematol, 2016, 44(9): S. 783-90.
- 318. Hajkova, H., Markova, J., Haskovec, C., et al., Decreased DNA methylation in acute myeloid leukemia patients with DNMT3A mutations and prognostic implications of DNA methylation. Leuk Res, 2012, 36(9): S. 1128-33.
- 319. Ishida, M. und Moore, G.E., *The role of imprinted genes in humans*. Mol Aspects Med, 2013, 34(4): S. 826-40.
- 320. Randhawa, G.S., Cui, H., Barletta, J.A., *et al.*, *Loss of imprinting in disease progression in chronic myelogenous leukemia*. Blood, 1998, 91(9): S. 3144-7.

- 321. Cui, H., Onyango, P., Brandenburg, S., et al., Loss of imprinting in colorectal cancer linked to hypomethylation of H19 and IGF2. Cancer Res, 2002, 62(22): S. 6442-6.
- 322. Fukuzawa, R., Heathcott, R.W., Morison, I.M., et al., Imprinting, expression, and localisation of DLK1 in Wilms tumours. J Clin Pathol, 2005, 58(2): S. 145-50.
- 323. Steenman, M.J., Rainier, S., Dobry, C.J., et al., Loss of imprinting of IGF2 is linked to reduced expression and abnormal methylation of H19 in Wilms' tumour. Nat Genet, 1994, 7(3): S. 433-9.
- 324. Bork, S., Pfister, S., Witt, H., *et al.*, *DNA methylation pattern changes upon long-term culture and aging of human mesenchymal stromal cells*. Aging Cell, 2010, 9(1): S. 54-63.
- 325. Schellenberg, A., Lin, Q., Schuler, H., et al., Replicative senescence of mesenchymal stem cells causes DNA-methylation changes which correlate with repressive histone marks. Aging (Albany NY), 2011, 3(9): S. 873-88.
- 326. Wild, L., Funes, J.M., Boshoff, C., *et al.*, *In vitro transformation of mesenchymal stem cells induces gradual genomic hypomethylation*. Carcinogenesis, 2010, 31(10): S. 1854-62.
- Bruno, S., Deregibus, M.C., und Camussi, G., *The secretome of mesenchymal stromal cells: Role of extracellular vesicles in immunomodulation*. Immunol Lett, 2015, 168(2): S. 154-8.
- 328. Gao, F., Chiu, S.M., Motan, D.A., et al. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. Cell Death Dis, 2016, DOI: 10.1038/cddis.2015.327.
- 329. Tso, G.H., Law, H.K., Tu, W., et al., Phagocytosis of apoptotic cells modulates mesenchymal stem cells osteogenic differentiation to enhance IL-17 and RANKL expression on CD4+ T cells. Stem Cells, 2010, 28(5): S. 939-54.
- 330. van den Elsen, P.J., Holling, T.M., Kuipers, H.F., *et al.*, *Transcriptional regulation of antigen presentation*. Curr Opin Immunol, 2004, 16(1): S. 67-75.
- 331. van den Elsen, P.J. *Expression regulation of major histocompatibility complex class I and class II encoding genes*. Front Immunol, 2011, DOI: 10.3389/fimmu.2011.00048.
- 332. Stagg, J., Pommey, S., Eliopoulos, N., et al., Interferon-gamma-stimulated marrow stromal cells: a new type of nonhematopoietic antigen-presenting cell. Blood, 2006, 107(6): S. 2570-7.
- 333. Chan, J.L., Tang, K.C., Patel, A.P., et al., Antigen-presenting property of mesenchymal stem cells occurs during a narrow window at low levels of interferon-gamma. Blood, 2006, 107(12): S. 4817-24.
- 334. Hoogduijn, M.J. Are mesenchymal stromal cells immune cells? Arthritis Res Ther, 2015, DOI: 10.1186/s13075-015-0596-3.
- 335. Geppert, T.D. und Lipsky, P.E., Antigen presentation by interferon-gamma-treated endothelial cells and fibroblasts: differential ability to function as antigen-presenting cells despite comparable Ia expression. J Immunol, 1985, 135(6): S. 3750-62.
- 336. Bagai, R., Valujskikh, A., Canaday, D.H., et al., Mouse endothelial cells cross-present lymphocyte-derived antigen on class I MHC via a TAP1- and proteasome-dependent pathway. J Immunol, 2005, 174(12): S. 7711-5.
- 337. Garrido, S.M., Appelbaum, F.R., Willman, C.L., *et al.*, *Acute myeloid leukemia cells are protected from spontaneous and drug-induced apoptosis by direct contact with a human bone marrow stromal cell line (HS-5).* Exp Hematol, 2001, 29(4): S. 448-57.
- 338. Bendall, L.J., Daniel, A., Kortlepel, K., et al., Bone marrow adherent layers inhibit apoptosis of acute myeloid leukemia cells. Exp Hematol, 1994, 22(13): S. 1252-60.

- 339. Rashidi, A. und DiPersio, J.F., *Targeting the leukemia-stroma interaction in acute myeloid leukemia: rationale and latest evidence.* Ther Adv Hematol, 2016, 7(1): S. 40-51.
- 340. Peled, A., Kollet, O., Ponomaryov, T., et al., The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34(+) cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice. Blood, 2000, 95(11): S. 3289-96.
- 341. Hidalgo, A., Sanz-Rodriguez, F., Rodriguez-Fernandez, J.L., et al., Chemokine stromal cell-derived factor-1alpha modulates VLA-4 integrin-dependent adhesion to fibronectin and VCAM-1 on bone marrow hematopoietic progenitor cells. Exp Hematol, 2001, 29(3): S. 345-55.
- 342. Matsunaga, T., Takemoto, N., Sato, T., et al., 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): S. 1158-65.
- 343. Jacamo, R., Chen, Y., Wang, Z., et al., Reciprocal leukemia-stroma VCAM-1/VLA-4dependent activation of NF-kappaB mediates chemoresistance. Blood, 2014, 123(17): S. 2691-702.
- 344. Walter, R.B., Alonzo, T.A., Gerbing, R.B., et al., High expression of the very late antigen-4 integrin independently predicts reduced risk of relapse and improved outcome in pediatric acute myeloid leukemia: a report from the children's oncology group. J Clin Oncol, 2010, 28(17): S. 2831-8.
- 345. Becker, P.S., Kopecky, K.J., Wilks, A.N., et al., Very late antigen-4 function of myeloblasts correlates with improved overall survival for patients with acute myeloid leukemia. Blood, 2009, 113(4): S. 866-74.
- 346. Layani-Bazar, A., Skornick, I., Berrebi, A., et al., Redox modulation of adjacent thiols in VLA-4 by AS101 converts myeloid leukemia cells from a drug-resistant to drug-sensitive state. Cancer Res, 2014, 74(11): S. 3092-103.
- 347. Winkler, I.G., Barbier, V., Nowlan, B., et al., Vascular niche E-selectin regulates hematopoietic stem cell dormancy, self renewal and chemoresistance. Nat Med, 2012, 18(11): S. 1651-7.
- 348. Zeng, Z., Shi, Y.X., Samudio, I.J., et al., Targeting the leukemia microenvironment by CXCR4 inhibition overcomes resistance to kinase inhibitors and chemotherapy in AML. Blood, 2009, 113(24): S. 6215-24.
- 349. Nervi, B., Ramirez, P., Rettig, M.P., et al., Chemosensitization of acute myeloid leukemia (AML) following mobilization by the CXCR4 antagonist AMD3100. Blood, 2009, 113(24): S. 6206-14.
- 350. Spoo, A.C., Lubbert, M., Wierda, W.G., *et al.*, *CXCR4 is a prognostic marker in acute myelogenous leukemia.* Blood, 2007, 109(2): S. 786-91.
- 351. Konoplev, S., Rassidakis, G.Z., Estey, E., et al., Overexpression of CXCR4 predicts adverse overall and event-free survival in patients with unmutated FLT3 acute myeloid leukemia with normal karyotype. Cancer, 2007, 109(6): S. 1152-6.
- 352. Uy, G.L., Rettig, M.P., Motabi, I.H., et al., A phase 1/2 study of chemosensitization with the CXCR4 antagonist plerixafor in relapsed or refractory acute myeloid leukemia. Blood, 2012, 119(17): S. 3917-24.
- 353. Rashidi, A. und Uy, G.L., *Targeting the microenvironment in acute myeloid leukemia*. Curr Hematol Malig Rep, 2015, 10(2): S. 126-31.
- 354. Bakker, E., Qattan, M., Mutti, L., *et al.*, *The role of microenvironment and immunity in drug response in leukemia*. Biochim Biophys Acta, 2016, 1863(3): S. 414-26.

- 355. Calvi, L.M., *Osteoblastic activation in the hematopoietic stem cell niche*. Ann N Y Acad Sci, 2006, 1068: S. 477-88.
- 356. Iozzo, R.V., *Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function*. Annu Rev Biochem, 1998, 67: S. 609-52.
- 357. Kjellen, L. und Lindahl, U., *Proteoglycans: structures and interactions*. Annu Rev Biochem, 1991, 60: S. 443-75.
- 358. Iozzo, R.V. und Schaefer, L., *Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans.* Matrix Biol, 2015, 42: S. 11-55.
- 359. Ichii, M., Frank, M.B., Iozzo, R.V., et al., The canonical Wnt pathway shapes niches supportive of hematopoietic stem/progenitor cells. Blood, 2012, 119(7): S. 1683-92.
- 360. Kao, W.W., Funderburgh, J.L., Xia, Y., *et al.*, *Focus on molecules: lumican*. Exp Eye Res, 2006, 82(1): S. 3-4.
- 361. Nikitovic, D., Katonis, P., Tsatsakis, A., et al., Lumican, a small leucine-rich proteoglycan. IUBMB Life, 2008, 60(12): S. 818-23.
- 362. Grover, J., Chen, X.N., Korenberg, J.R., *et al.*, *The human lumican gene. Organization, chromosomal location, and expression in articular cartilage.* J Biol Chem, 1995, 270(37): S. 21942-9.
- 363. Ishiwata, T., Cho, K., Kawahara, K., et al., Role of lumican in cancer cells and adjacent stromal tissues in human pancreatic cancer. Oncol Rep, 2007, 18(3): S. 537-43.
- 364. Leygue, E., Snell, L., Dotzlaw, H., et al., Expression of lumican in human breast carcinoma. Cancer Res, 1998, 58(7): S. 1348-52.
- 365. Leygue, E., Snell, L., Dotzlaw, H., et al., Lumican and decorin are differentially expressed in human breast carcinoma. J Pathol, 2000, 192(3): S. 313-20.
- 366. Brezillon, S., Venteo, L., Ramont, L., *et al.*, *Expression of lumican, a small leucine-rich proteoglycan with antitumour activity, in human malignant melanoma.* Clin Exp Dermatol, 2007, 32(4): S. 405-16.
- 367. Sifaki, M., Assouti, M., Nikitovic, D., et al., Lumican, a small leucine-rich proteoglycan substituted with keratan sulfate chains is expressed and secreted by human melanoma cells and not normal melanocytes. IUBMB Life, 2006, 58(10): S. 606-10.
- 368. Matsuda, Y., Yamamoto, T., Kudo, M., *et al.*, *Expression and roles of lumican in lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma*. Int J Oncol, 2008, 33(6): S. 1177-85.
- 369. Kashyap, M.K., Marimuthu, A., Peri, S., et al., Overexpression of periostin and lumican in esophageal squamous cell carcinoma. Cancers (Basel), 2010, 2(1): S. 133-42.
- 370. Iozzo, R.V. und Sanderson, R.D., *Proteoglycans in cancer biology, tumour microenvironment and angiogenesis.* J Cell Mol Med, 2011, 15(5): S. 1013-31.
- 371. Nikitovic, D., Papoutsidakis, A., Karamanos, N.K., et al., Lumican affects tumor cell functions, tumor-ECM interactions, angiogenesis and inflammatory response. Matrix Biol, 2014, 35: S. 206-14.
- 372. Radwanska, A., Litwin, M., Nowak, D., et al., Overexpression of lumican affects the migration of human colon cancer cells through up-regulation of gelsolin and filamentous actin reorganization. Exp Cell Res, 2012, 318(18): S. 2312-23.
- 373. Zeltz, C., Brezillon, S., Kapyla, J., et al., Lumican inhibits cell migration through alpha2beta1 integrin. Exp Cell Res, 2010, 316(17): S. 2922-31.
- 374. Brezillon, S., Pietraszek, K., Maquart, F.X., et al., Lumican effects in the control of tumour progression and their links with metalloproteinases and integrins. FEBS J, 2013, 280(10): S. 2369-81.

- 375. D'Onofrio, M.F., Brezillon, S., Baranek, T., *et al.*, *Identification of beta1 integrin as mediator of melanoma cell adhesion to lumican*. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 365(2): S. 266-72.
- 376. Vuillermoz, B., Khoruzhenko, A., D'Onofrio, M.F., et al., The small leucine-rich proteoglycan lumican inhibits melanoma progression. Exp Cell Res, 2004, 296(2): S. 294-306.
- 377. Brezillon, S., Zeltz, C., Schneider, L., *et al.*, *Lumican inhibits B16F1 melanoma cell lung metastasis.* J Physiol Pharmacol, 2009, 60 Suppl 4: S. 15-22.
- Nikitovic, D., Chalkiadaki, G., Berdiaki, A., et al., Lumican regulates osteosarcoma cell adhesion by modulating TGFbeta2 activity. Int J Biochem Cell Biol, 2011, 43(6): S. 928-35.
- Williams, K.E., Fulford, L.A., und Albig, A.R., Lumican reduces tumor growth via induction of fas-mediated endothelial cell apoptosis. Cancer Microenviron, 2010, 4(1): S. 115-26.
- 380. Malinowski, M., Pietraszek, K., Perreau, C., *et al. Effect of lumican on the migration of human mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells: involvement of matrix metalloproteinase-14.* PLoS One, 2012, DOI: 10.1371/journal.pone.0050709.
- 381. Pietraszek, K., Chatron-Colliet, A., Brezillon, S., *et al.*, *Lumican: a new inhibitor of matrix metalloproteinase-14 activity*. FEBS Lett, 2014, 588(23): S. 4319-24.
- 382. Seiki, M., Membrane-type matrix metalloproteinases. APMIS, 1999, 107(1): S. 137-43.
- 383. Li, Y., Aoki, T., Mori, Y., et al., Cleavage of lumican by membrane-type matrix metalloproteinase-1 abrogates this proteoglycan-mediated suppression of tumor cell colony formation in soft agar. Cancer Res, 2004, 64(19): S. 7058-64.
- 384. Vij, N., Roberts, L., Joyce, S., et al., Lumican suppresses cell proliferation and aids Fas-Fas ligand mediated apoptosis: implications in the cornea. Exp Eye Res, 2004, 78(5): S. 957-71.

## 9. Publikationen

### <u>Teile der in dieser Arbeit gezeigten Daten sind Inhalt der folgenden Publikationen</u> (vgl. 15. Anhang Publikationen)

von der Heide EK, Neumann M, Vosberg S, James AR, Schroeder MP, Ortiz Tanchez J, Isaakidis K, Schlee C, Luther M, Jöhrens K, Anagnostopoulos I, Mochmann LH, Nowak D, Hofmann WK, Greif PA, Baldus CD. *Molecular alterations in bone marrow mesenchymal stromal cells derived from acute myeloid leukemia patients*, Leukemia. 2017 May; 31(5): S. 1069-1078 (DOI:10.1038/leu.2016.324. Epub 2016 Nov 11).

Konferenzbeitrag: "Molecular alterations in refractory acute myeloid leukemia and persistent preleukemic lesions are disclosed using mesenchymal stromal cells as germline control" Neumann M, Vosberg S, von der Heide EK, Schlee S, Ortiz Tanchez J, Isaakidis K, Mochmann LH, Fransecky L, Graf A, Krebs S, Blum H, Greif PA, Baldus CD, Posterpräsentation American Society of Hematology's Annual Meeting 2014, San Francisco, CA, USA, Manuskript in Bearbeitung.

### Sonstige Publikationen

Hermann JS, Skroblin P, Bertinetti D, Hanold LE, **von der Heide EK**, Wagener EM, Zenn HM, Klussmann E, Kennedy EJ, Herberg FW. *Neurochondrin is an atypical RIIα-specific Akinase anchoring protein.*, Biochim Biophys Acta. 2015, Oct;1854(10 Pt B): S. 1667-75

Neumann M, Seehawer M, Schlee C, Vosberg S, Heesch S, **von der Heide EK**, Graf A, Krebs S, Blum H, Gökbuget N, Schwartz S, Hoelzer D, Greif PA, Baldus CD. *FAT1 expression and mutations in adult acute lymphoblastic leukemia*. Blood Cancer J. 2014, DOI: 10.1038/bcj.2014.44.

Mochmann LH, Neumann M, **von der Heide EK**, Nowak V, Kühl AA, Ortiz-Tanchez J, Bock J, Hofmann WK, Baldus CD. *ERG induces a mesenchymal-like state associated with chemoresistance in leukemia cells*. Oncotarget. 2014 Jan 30;5(2):351-62.

Coskun E, **von der Heide EK**, Schlee C, Kühnl A, Gökbuget N, Hoelzer D, Hofmann WK, Thiel E, Baldus CD. *The role of microRNA-196a and microRNA-196b as ERG regulators in acute myeloid leukemia and acute T-lymphoblastic leukemia*. Leuk Res. 2011 Feb;35(2):208-13

### Konferenzbeiträge

"Molecular Alterations of Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells of Acute Myeloid Leukemia Patients", von der Heide EK, Vosberg S, Neumann M, Mochmann LH, Rani James A, Ortiz Tanchez J, Schlee C, Isaakidis K, Luther M, Graf A, Krebs S, Blum H, Greif PA, Baldus CD, Teilnahme und Kategorisierung *Oral Presentation*, Vortrag durch Prof. Dr. Claudia D. Baldus, American Society of Hematology's Annual Meeting 2014, San Francisco, CA, USA

"*Characterization of Bone Marrow-Mesenchymal Stromal Cells derived from Acute Myeloid Leukemia Patients*" **von der Heide EK**, Neumann M, Blau O, Ortiz Tanchez J, Schlee C, Luther M, Hofmann WK, Mochmann LH, Baldus CD, Teilnahme und Posterpräsentation, EMBO/EMBL Symposium: *Tumour microenvironment and signalling*, 2014, Heidelberg

#### Sonstige Konferenzbeiträge

*"Mesenchymal stroma protection of leukemia involves epigenetic and metabolic processes"* Mochmann LH, Treue D, **von der Heide EK**, Isaakidis K, Stehr S, Schroeder M, Busch C, Bastian L, Neumann M, Fransecky L, Klauschen F, Baldus CD, Modern Trends in Human Leukemia and Cancer, Wilsede, 2016

"*FAT1 Expression and Mutation Status In Adult Acute Lymphoblastic Leukemia*" Neumann M, Seehawer M, Schlee C, Vosberg S, Heesch S, **von der Heide EK**, Graf A, Krebs S, Blum H, Gökbuget N, Schwartz S, Hoelzer D, Greif PA, Baldus CD, American Society of Hematology`s Annual Meeting 2013, New Orleans, CA, USA

"*The Role of Microrna-196a-1 and Microrna-196b in Acute T-Lymphoblastic Leukemia and Acute Myeloid Leukemia*" Coskun E, **von der Heide EK**, Schlee C, Goekbuget N, Hoelzer D, Hofmann WK, Thiel E, Baldus CD American Society of Hematology's Annual Meeting 2009, New Orleans, CA, USA

# **10. Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere an Eides Statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig, ohne fremde Hilfe und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln verfasst habe. Diese Arbeit ist nicht Teil eines weiteren Promotionsverfahren.

Berlin, den

Eva Kristin von der Heide

# 11. Lebenslauf

Der Lebenslauf ist aus Datenschutzgründen in der Online-Veröffentlichung nicht enthalten.

Der Lebenslauf ist aus Datenschutzgründen in der Online-Veröffentlichung nicht enthalten.

# 12. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AML	Akute Myeloische Leukämie
AML BM-MSC	Mesenchymale Stromazellen des Knochenmarks (Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells) von AML-Patienten
APC	Allophycocyanin
bp	Basenpaare
bspw.	beispielsweise
d	days (Tage)
d.h.	das heißt
dbSNP	Single nucleotide polymorphism data base
(g) DNA	genomic deoxyribonucleic acid
DMC	differentially methylated CpG site/ Probeset
DTT	Dithiothreitol
dNTP	2'-Desoxynucleosid-5'-Triphosphat
ED	Erstdiagnose
E. coli	Escherischia coli
FACS	Fluorescence-activated cell sorting (Durchflusszytometrie)
FAM	6-Carboxy Fluoreszin
FDR	false discovery rate
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
Fw	forward
g	Gramm
ggf.	gegebenfalls
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GFP	Green Fluorescent Protein
GUS	β-glucuronidase
GS	Gesunde Spender
GS BM-MSC	Mesenchymale Stromazellen des Knochenmarks (Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells) von Gesunden Spendern
h	Stunde

#### Abkürzungen

HKG	house keeping gene
H <sub>2</sub> O	Wasser
HRP	Horse Radish Peroxidase
HSC	hematopoietic stem cell, hämatopoetische Stammzelle
Indel	Insertion oder Deletion
kB	Kilopaarenpaare
KD	Knock-down
kDa	Kilo Dalton
КО	Knock-out
m	milli
mM	Millimolar
min	Minute
MNCs	Mononuclear cells
n.s.	nicht signifikant
NK (RNAi)	AllStars Negative Control siRNA, Negativkontrolle
OD	Optische Dichte
р	Passage (der in vitro-Kultur)
PCA	principle component analysis
PK RNAi	AllStars Hs Cell Death Control siRNA, Positivkontrolle
pLeer-	stabil pCMV-Leervektor (HG-11640-UT) transfizierte HS-5 Kultur
pLUM-	stabil pCMV-LUM (HG-11640-UT) transfizierte HS-5 Kultur
(qRT-) PCR	(quantitative Real Time-) polymerase chain reaction
PLEC RNAi	PLEC small-interfering RNATransfektion, PLEC RNAinterference
PVDF	Polyvinylidenfluorid
REM	(komplette) Remission
REF	Refraktär
rv	reverse
REZ	Rezidiv
(m) RNA	(messenger) Ribonucleic Acid
RNASeq	RNA sequencing (Illumina)
RT	Raumtemperatur

#### Abkürzungen

S	Sekunde
s. a.	siehe auch
S. O.	siehe oben
s. u.	siehe unten
SD	standard deviation, Standardabweichung
SLRP	small leucin-rich proteoglycan
SNV	single nucleotide variation
SOC	Super Optimal Broth with Catabolite repression
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus
TEMED	N, N, N`, N`Tetramethylethylendiamin
TBS	Tris-buffered Sodium
TBS-T	Tris buffered Sodium, 1 % (v/v) Tween
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
U	Unit (µmol/min)
u.A.	unter Anderem
vgl.	vergleiche
v/v	volume per volumen (Volumen pro Volumen)
W	Watt
WES	whole exome sequencing, Gesamtgenomsequenzierung (Illumina)
w/v	weight per volume (Gewicht pro Volumen)
V	Volt
VAF	Variant allelic frequency (Variationsallelfrequenz)
xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung
z.B.	zum Beispiel
μ	mikro
μΜ	mikromolar

#### Abkürzungen

### Einbuchstabencode für Aminosäuren

A Alanin	G Glycin	Y Tyrosin
M Methionin	S Serin	R Arginin
C Cystein	H Histidin	V Valin
N Asparagin	T Threonin	K Lysin
D Aspartat	I Isoleucin	W Tryptophan
P Prolin	F Phenylalanin	L Leucin
E Glutamat	Q Glutamin	

## 13. Danksagung

Mein erster Dank gilt Prof. Dr. Claudia Baldus für die Möglichkeit der Dissertation in ihrer Arbeitsgruppe sowie die stetige Unterstützung und Diskussionsbereitschaft. Ihre wissenschaftlichen Anregungen haben meiner Arbeit im Besonderen Impulse gegeben. Vielen Dank für diese außerordentliche Betreuung.

Bei Herrn Prof. Dr. Burghardt Wittig möchte ich mich für die Bereitschaft, das Zweitgutachten zu übernehmen, bedanken.

Dr. Philipp Greif, Sebastian Vosberg, Prof. Dr. Wolf K. Hofmann sowie Prof. Dr. Ioannis Anagnostopoulos und dem Institut für Pathologie danke ich für die kollegialen Kooperationen.

Ich möchte mich sehr bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die gute Zusammenarbeit bedanken. Ein besonderer Dank geht an Dr. Martin Neumann für immer offene Ohren, die stetige Unterstützung und Hilfsbereitschaft, ...und all den guten Kaffee! Dr. Lili Mochmann, thank you for all your support and positivity. Meinen Labormitstreitern, Dr. Isabelle Bartram, Frauke Liebertz, Paty Silva, Alva Rani James, vielen Dank and thanks für alle Unterstützung und Zugkraft und Spaß im Laboralltag. Danke der "Haus 2 bioinformatic core unit" Dr. Michael Schröder und besonders Alva Rani James für alle Unterstützung. Ein großer Dank an Jutta Ortiz Tanchez, Conny Schlee und Konstandina Isaakidis für ihre unersetzbare Arbeit und Organisation im Labor und sehr viele lustige Momente. Lieben Dank auch an Dr. Lars Fransecky und Dr. Lorenz Bastian für fachliche und methodische Unterstützung.

Ein riesiger Dank geht an Indra, Eva und Kathrin sowie Verena für eine bis zwei Dekaden dicker Freundschaft. Auch an Tini, mit Brandon, lieben Dank für alle Unterstützung und Freundschaft. Danke auch an Leonie und Christin, an Jutta, an Inga und Claudia, an Annika und meine Kasseler und Marburger Leutchen, die mich allesamt sehr bestärkt haben.

Joost, thank you for being there, your patience, support and encouragement.

Der herzlichste Dank geht an meine Familie, ganz besonders an meine Eltern und meine Schwester. Unermesslicher Dank für eure beständige Ermutigung, eure bedingungslose Hilfe und Unterstützung in allen Lebenslagen!

# 14. Anhang



Abb. A1: Plasmid Karte des pCMV-LUM Konstruktes (HG 11640-UT) basierend auf einem pCMV3-untagged Kontrukt zur stabilen Transfektion von HS-5 Zellen mittels des Selektionsmarker Hygromycin B. Das Plasmid hat eine Größe von 7,1 kb und enthält das Resistenzgen für Hygromycin B (*hyg*, Hygro(R)) zur Selektion von eukaryotischen Zellen (Quelle: Sino Biological Inc., Plasmid-Datenblatt).

Gensymbol	Primersequenz
GUS	Fw-5`-GAAAATATGTGGTTGGAGAGCTCATT
	Rv-5`-CCGAGTGAAGATCCCCTTTTTA
	Sonde 5`-HEX-CCAGCACTCTCGTCGGTGACTGTTCA-BHQ1-3`
GPI	Fw-5`-TCTTCGATGCCAACAAGGAC-3`
	Rv-5`-GCATCACGTCCTCCGTCAC-3`
	Sonde 5`-Joe-TTCAGCTTGACCCTCAACACCAAC- TAMRA-3`
LUM	Fw-5`CCTGGAGGTCAATCAACTTGA-3`
	Rv-5`-CGTTAGCAACACGTAGACATTCA-3`
	Sonde 5`-FAM-TCTGCAAGATCCTGGGGGCCATTATC-BHQ1-3`
NGFR	Fw-5`-GAGGCACCTCCAGAACAAGA-3`
	Rv-5`GCTGTTCCACCTCTTGAAGG-3`
	Sonde 5`-FAM- ACCACCGACAACCTCATCCCTGTCT-BHQ1-3`
NES	Fw-5`-CAGGAGAAACAGGGCCTACA-3`
	Rv-5`-AAGCTGAGGGAAGTCTTGGAG-3`
	Sonde 5`-FAM-ATCGCTCAGGTCCTGGAAGGTCG—BHQ1-3`
NGF	Fw-5`-ACTGAGGTGCATAGCGTAATGTC-3`
	Rv-5`-TCAAGGGAATGCTGAAGTTTAGT-3`
	Sonde 5`-FAM-TCAGAGAGCAATGTCCCTGCAGGAC-BHQ1-3`
	Forsetzung Tab. A1
------	---
PLEC	Fw-5`-CAACCCCAAGCTGACCCTT-3` Rv-5`-AGCTGGAGGTGAAGTTGTCG-3` Sonde 5`-FAM-TCGGAGGACATGACGGCCAAGGAGA-BHQ1-3`

Tab. A2: weitere Oligonukleotide für Whole Exome Sequencing Validierung sowie HUMARA Assay

Gensymbol	Oligonukleotide WES-Validierung	Solution Q
PLEC	Fw – 5`-AGCAGAAGAGCCTGGCG-3`	nein
(ED/REM/REZ)	Rv – 5`-TCCGCCTCCGTCTTGAG-3`	
ADCY10	Fw- 5`- ACCGCGTCTGGCCTAAAG – 3`	nein
	Rv- 5`- CTGGAGCTTCCTTCTGGCTC – 3`	
AFF1	Fw – 5`-GGTTAGATGGCTGCTTTTCTG-3`	nein
	Rv – 5`-ATGGTTGCAAAAGCAAGAAG-3`	
ATXN1	Fw – 5`-ACACAAGGCTGAGCAGCAG-3`	nein
	Rv – 5`-GTTGGGCAGGACCATCAC-3`	
CDH10	Fw-5`- ACATGTTTTGCTTTTGGCTATTC-3`	nein
	Rv – 5`-TGGATCATTCATGAGCGAAG-3`	
CDS1	Fw – 5`-TTGAATGATTAAGCACAAATGTAAAC-3`	nein
	Rv – 5`-TGACTGATCAAGACGCTTCC-3`	
CIAPIN1	Fw – 5`-GTGGGCGGTTACAAGTTAGG-3`	nein
	Rv – 5`-GCAACACTCCCATGGAAAC-3`	
CNTN1	Fw – 5`-TTATGATGGATCTTGAGCCC-3`	ja
	Rv – 5`-TCCCAGGACTACCCTGAAAC-3`	
CPVL	Fw-5`-TTTCTTGCATGTAAAAGGGC-3`	nein
	Rv – 5`-TAGTGACAGGCGAGACTTCG-3`	
CYP2F1	Fw-5`-AATCCACACTGACCCCATTC-3`	nein
	Rv – 5`-GGCAGCAGGAGAATTTCAG-3`	
DNAH14	Fw-5`-TGTGGCTTTTGTTTGTAAGTATAGG-3`	nein
	Rv – 5`-GCAGAGATTTTAAATAATGACGTTG-3`	
DST	Fw – 5`-GGAAAACAATTGCATTAAAGATG-3`	nein
	Rv – 5`-TTCCATGCTATTTTGGTCTTG-3`	
FBXL4	Fw-5`-ACTCTAAACAGTTTGCATGTCTGAG-3`	nein
	Rv – 5`-TGAGATTGGCTTTTCTGTCAAG-3`	
FLNB	Fw-5`-AAGGAACTGCAGCTTATGGC-3`	nein
	Rv – 5`-GGAAGCCCTGTAATCCTCAG-3`	
HDAC6	Fw-5`-ACCAGGGAGGGGACAGAC-3`	nein
	Rv – 5`-CCTCCAGAAACAGCAGATGG-3`	
L		

Fortsetzung Tab. A2				
ITIH3	Fw – 5`-CAGCTGCAGCATCAGTGG-3`	nein		
	Rv – 5`-CATTGGAGCCCAGCCAG-3`			
LRRC7	Fw – 5`-CCAGAGCATGGTATGTCCAG-3`	nein		
	Rv – 5`-TCACTGTAACGCTGCTTTGG-3`			
MPP1	Fw – 5`-CAGGACATGCTCTGATGCTG-3`	nein		
	GAAGCTAAGTTATTTGTGGCAGG-3`			
MYO18B	Fw – 5`-ATAACCATGCTTCCAAGCCC-3`	nein		
	Rv – 5`-TGCAAACTGGACAGAGAGAGC-3`			
RPL13	Fw – 5`-ATTGCTGAGGCTTTTCATCC-3`	nein		
	Rv – 5`-GAGCCAAGCCTCACTGTCC-3`			
SMARCA1	Fw – 5`-GCCTTTGCGAGATAGTGGAC-3`	nein		
	Rv – 5`-TGAGAGTCACTGGTAAGATATACTGTC-3`			
ТАСС3	Fw – 5`-AAATGGCCAGCTCCTCG-3`	nein		
	Rv – 5`-TCCTGGACCACATACACTGC-3`			
TRPV6	Fw – 5`-ATGGGGCAATTGCTTGG-3`	ja		
	Rv – 5`-CCAAGTTTAGCCAGAGCCAG-3`			
WDR6	Fw – 5`-TTTCCAACCAGCTCTTGGTC-3`	nein		
	Rv – 5`-GCTCCCAGCACTTGACCTC-3`			
TNRC18	Fw-5`- GAGGCATGGGTTGGTCC-3`	ja		
	Rv- 5`-GGAGCAGGGTCTCCGTG- 3`			
MTHFD2	Fw- 5`- GAGACCTAATCCAATCCCAGC-3`	nein		
	Rv-5`GCGAATTCTAAGATGAGGGG-3`			
AR (REF. 193)	Fw- 5`- TAGGTGGAAGATTCAGCCAAGC- 3`	nein		
	Rv-5`-TGTGAAGGTTGCTGTTCCTC- 3`			

Tab. A3: *PLEC*-Expression auf mRNA-Ebene in AML BM-MSC (n=60). Beschreibung der klinischen Daten der AML-Patienten mit hoher und niedriger *PLEC*-Expression. Eine hohe *PLEC*-Expression wurde wiefolgt definiert: AML BM-MSC *PLEC*-Expression > Mittelwert der *PLEC*-Expression in GS BM-MSC (n=14) in Addition zu der vierfachen SD; dies resultierte in die gezeigten Gruppen mit hoher (n=43) und niedriger *PLEC* Expression (n=17). Es sind Subtyp, Geschlecht, Alter und Informationen zu zyto-und molekulargenetischen Alterationen der AML-Zellen sowie das Ansprechen auf die Chemotherapie angegeben. Die Darstellung der durch Gesamtexomsequenzierung identifizierten Alterationen umfasst sämtliche, <u>auch dbSNP-annotierte und Spleißstellenalterationen</u> der jeweilige Subkohorte und fassen die Anzahl detektierter Alterationen sowie in der AML rekurrente Variationen zusammen.

PLEC Expression		PLEC hoch n=43	PLEC niedrig n=17			
AML	n (%)	<i>de novo</i> AML 40 (93)	<i>de novo</i> AML 16 (94)			
		sAML 2 (5)	sAML 1 (6)			
		tAML 1 (2)				
Geschlecht	n (%)	männlich 28 (65)	männlich 11 (65)			
		weiblich 15 (35)	weiblich 6 (35)			
Alter (Jahre)	Mittelwert (Spanne)	61 (19-92)	51 (19-74)			
AML Zytogenetik	n (%)	aberrant 16 (37)	aberrant 8 (47)			
	n (%)	normal 19 (44)	normal 6 (35)			
	n (%)	unbekannt 8 (18)	unbekannt 3 (18)			
FLT3-ITD	n (%)	Wildtyp 34 (79)	Wildtyp 14 (82)			
	n (%)	mutiert 4 (9)	mutiert 1 (6)			
	n (%)	unbekannt 5 (12)	unbekannt 2 (12)			
FLT3-TKD	n (%)	Wildtyp 36 (84)	Wildtyp 15 (88)			
	n (%)	mutiert 3 (7)	mutiert 0			
	n (%)	unbekannt 4 (9)	unbekannt 2 (12)			
NPM1	n (%)	Wildtyp 30 (70)	Wildtyp 12 (71)			
	n (%)	mutiert 8 (19)	mutiert 2 (12)			
	n (%)	unbekannt 5 (12)	unbekannt 3 (18)			
erreichte REM	n (%)	ja 23 (62)	ja 8 (47)			
(n=54 mit intensiver	n (%)	nein 12 (32)	nein 9 (53)			
Chemotherapie)	n (%)	unbekannt 2 (5)				
Whole exome sequencing in AML BM-MSC						
	n	5	4			
Totale Mutationslast	Mutationen	70 (76)	22 (24)			
n=92	n (%)	14 (3-34)	6 (1-13)			
	Mittelwert (Spanne)					

Fortsetzung Tab. A3						
Whole exome sequencing in korrespondierenden AML-Blasten						
Totale Mutationslast	Mutationen	133 (66)	70 (34)			
n=203	n (%)					
	Mittelwert (Spanne)	27 (21-35)	18 (5-27)			
rekurrente Mutationen	<i>SFSF2</i> n (%)	3 (75)	1 (25)			
	<i>RUNX1</i> n (%)	-	2 (100)			
	<i>FLT3</i> n (%)	2 (100)				
	<i>AQP7</i> n (%)	2 (100)				
	PRAMEF7 n (%)	1 (50)	1(50)			
	<i>UHRF1BP1</i> n (%)	2 (100)				
	<i>CDC</i> 27 n (%)	1 (50)	1(50)			
	<i>LTBP3</i> n (%)	1 (50)	1(50)			
	<i>MUC4</i> n (%)	3 (43)	4 (57)			



AML Patient

Kontrolle

Abb. A2: Exemplarische immunohistologische Färbung von Plectin (braun) in Knochenmarkbiopsien eines AML-Patienten (links) sowie eines Patienten ohne Befund einer hämatologischen Erkrankung (400x Vergrößerung). Diese Färbung mittels eines (Hase) Anti-human Plectin Antikörper AB32528 (Abcam, Cambridge, UK) wurde durch das Institut für Pathologie (Charité Universitätsmedizin) angefertigt und zur Verfügung gestellt. Die braune Färbung an runden Zellen korrespondiert zu Plectin-exprimierenden myeloischen Zellen und betraf hauptsächlich die Granulopoese. Teils wurde Plectin-Expression durch neoplastische Zellen beobachtet, jedoch waren insgesamt sehr viel mehr spindelartige Plectin<sup>+</sup> spindelartige Zellen des Stromas sichtbar.

Die beiliegende Disk enthält: Tab. DiskE1 (Darstellung der Patientenkohorte und der gesunden Spender), Tab.DiskE2 mit sämtlichen Listen zu den generierten Datensätzen der Hochdurchsatzplattformen, sowie die Supplementary Table 2 aus dem Manuskript "Molekular Alterations in Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells derived from Acute Myeloid Leukemia Patients" (s. a. 9. Publikationen bzw. 15. Anhang Publikationen).

## **15. Anhang Publikationen**

## 1. Manuskript

von der Heide EK, Neumann M, Vosberg S, James AR, Schroeder MP, Ortiz Tanchez J, Isaakidis K, Schlee C, Luther M, Jöhrens K, Anagnostopoulos I, Mochmann LH, Nowak D, Hofmann WK, Greif PA, Baldus CD. *Molecular alterations in bone marrow mesenchymal stromal cells derived from acute myeloid leukemia patients*, Leukemia. 2017 May; 31(5): S. 1069-1078

Das akzeptierte Manuskript nach peer-review (44 Seiten) ist in der Online-Version nicht enhalten.

https://doi.org/10.1038/leu.2016.324

## 2. Konferenzbeitrag:

"Molecular Alterations in Refractory Acute Myeloid Leukemia and Persistent Preleukemic Lesions Are Disclosed Using Mesenchymal Stromal Cells As Germline Control",

Martin Neumann, Sebastian Vosberg, Eva K. Von Der Heide, Cornelia Schlee, Jutta Ortiz Tanchez, Konstandina Isaakidis, Liliana H. Mochmann, Lars R.Fransecky, Alexander Graf, Stefan Krebs, Helmut Blum, Philipp A. Greif and Claudia D. Baldus

## Blood 2015 126:3843, vol. 126 no. 23 3843

Der Konferenzbeitrag (drei Seiten) ist in der Online-Version nicht enthalten.

http://www.bloodjournal.org/content/126/23/3843?sso-checked=true