

Aus der III. Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Untersuchungen zum Engraftment primärer humaner akuter myeloischer
Leukämieblasten in einem immundefizienten Mausmodell

Inauguraldissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität zu Mainz

vorgelegt von

Dirk Tomsitz

aus Rodalben

Mainz, 2012

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion:

03. Juli 2012

Widmung

Ich widme diese Arbeit meinem Vater.

Inhaltsverzeichnis

| | Seite |
|---|-------|
| Abkürzungsverzeichnis | 9 |
| 1. Einleitung und Ziel der Dissertation | 11 |
| 1.1 Einleitung | 11 |
| 1.2 Ziel der Dissertation | 11 |
| 2. Literaturdiskussion | 13 |
| 2.1 Die Hämatopoese | 13 |
| 2.2 Die akute myeloische Leukämie | 15 |
| 2.3 Die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation | 20 |
| 2.4 Die Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion | 23 |
| 2.5 Die Transplantat-gegen-Leukämie-Reaktion | 26 |
| 2.6 Humanisierte Mausmodelle | 27 |
| 3. Material und Methoden | 29 |
| 3.1 Material | 29 |
| 3.1.1 Technische Geräte und Hilfsmittel | 29 |
| 3.1.2 Verbrauchsmaterialien | 30 |
| 3.1.3 Chemikalien | 31 |
| 3.1.4 Lösungen und Puffer | 32 |
| 3.1.4.1 Ammoniumchloridlösung | 32 |
| 3.1.4.2 FACS-Puffer | 32 |
| 3.1.5 Zellkulturen und Zusätze | 32 |

| | |
|---|----|
| 3.1.6 Medien | 33 |
| 3.1.6.1 Auftaumedium | 33 |
| 3.1.6.2 Einfriermedium | 33 |
| 3.1.6.3 Präpariermedium | 33 |
| 3.1.6.4 Leukämiemedium | 34 |
| 3.1.7 Antikörper | 34 |
| 3.1.8 Humane primäre akute myeloische Leukämien | 34 |
| 3.1.9 Mausstamm | 35 |
| 3.1.10 Software | 36 |
| 3.2 Methoden | 37 |
| 3.2.1 Allgemeines | 37 |
| 3.2.2 Gewinnung primärer akuter myeloischer Blasten | 37 |
| 3.2.3 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen | 37 |
| 3.2.4 Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung | 38 |
| 3.2.5 Bestrahlung der Versuchstiere | 39 |
| 3.2.6 Transplantation menschlicher Leukämieblasten in NSG-Mäuse | 39 |
| 3.2.7 Überwachung der transplantierten NSG-Mäuse | 39 |
| 3.2.8 Blutabnahme | 40 |
| 3.2.9 Sektion, Organentnahme und Aufbereitung von Milz, Knochenmark und Blut für die durchflusszytometrische Untersuchung | 40 |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| 3.2.10 Färben von Oberflächenantigenen | 41 |
| 3.2.11 Immunphäotypisierung | 41 |
| 3.2.12.1 Magnetische Zellsortierung | 44 |
| 3.2.12.2 T-Zell-Depletion mittels CD3 MicroBeads | 46 |
| 3.2.13 Intraperitoneale Medikamentenapplikation | 46 |
| 4. Ergebnisse | 47 |
| 4.1.1 Untersuchungen des Wachstums verschiedener humaner akuter myeloischer Leukämien in NSG-Mäusen | 47 |
| 4.1.2 Bedeutung des FLT3-Status als prognostischer Faktor für das Engraftment humaner akuter myeloischer Leukämien in transplantierten NSG-Mäusen | 51 |
| 4.2 Erstellung von zwei Wachstumskinetiken für die humanen primären akuten myeloischen Leukämien MZ667 und MZ308 nach Transplantation in NSG-Mäuse | 53 |
| 4.2.1 Erstellung einer Wachstumskinetik für MZ667 | 54 |
| 4.2.2 Erstellung einer Wachstumskinetik für MZ308 | 57 |
| 4.3 Untersuchungen zur Optimierung des Engraftments humaner primärer akuter myeloischer Leukämien durch selektive Inhibition humaner T-Lymphozyten in der xenotransplantierten NSG-Maus | 61 |
| 4.3.1 Ermittlung der dosisabhängigen Toxizität verschiedener humaner T-Lymphozyteninhibitoren in der NSG-Maus | 62 |
| 4.3.2 Untersuchung des Einflusses von Cyclosporin A | |

| | |
|---|----|
| auf humane T-Lymphozyten in einer Leukämie-Kultur | 66 |
| 4.3.3.1 Selektive Inhibition des T-Lymphozytenwachstums in xenotransplantierten Mäusen | 69 |
| 4.3.3.2 Hemmung des Wachstums humaner T-Lymphozyten in der xenotransplantierten NSG-Maus unter Verwendung von Cyclosporin A | 70 |
| 4.3.3.3 Hemmung des Wachstums humaner T-Lymphozyten in der NSG-Maus durch immunomagnetische T-Zelldepletion des Transplantats vor der Injektion | 73 |
| 5. Diskussion | 77 |
| 5.1 Untersuchungen zum Engraftment verschiedener primärer akuter myeloischer Leukämien | 78 |
| 5.2 Primäres Zielgewebe der leukämischen Stammzellen | 79 |
| 5.3 Einfluss der Versuchsdauer und der Zelldosis auf die Höhe des Engraftments | 81 |
| 5.4 Bedeutung der FLT3-Längenmutation für das Engraftment | 83 |
| 5.5 Co-Engraftment humaner T-Lymphozyten | 85 |
| 5.6 Einfluss der T-Zell-Depletion auf das Transplantat | 87 |
| 5.7 Bedeutung der T-Lymphozyten für das Engraftment | 88 |
| 6. Zusammenfassung | 90 |
| 7. Literaturverzeichnis | 92 |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|------------|-----|
| Danksagung | 103 |
| Lebenslauf | 104 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|---|
| µl | Mikroliter |
| Abb. | Abbildung |
| AML | Akute myeloische Leukämie |
| CD | Cluster of Differentiation (Unterscheidungsgruppen) |
| CyA | Cyclosporin A |
| d.h. | das heißt |
| et al. | et alii (und andere) |
| FAB | French American British Association |
| G-CSF | Granulocyte-Colony Stimulating Factor (Granulozyten-Koloniestimulierender Faktor) |
| GvHD | Graft versus Host Disease (Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion) |
| GvL | Graft versus Leukemia (Transplantat-gegen-Leukämie-Reaktion) |
| HLA | Humanes Leukozytenantigen |
| HSZT | hämatopoetische Stammzelltransplantation |
| IL | Interleukin |
| kg | Kilogramm |
| LD ₅₀ | letale Dosis, bei der 50% der Versuchstiere Sterben |
| MACS | Magnetic Cell Separation (Magnetische Zellseparation) |
| mg | Milligramm |
| MHC | Major Histocompatibility Complex (Haupt-Histokompatibilitätskomplex) |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------|---|
| MiHC | Minor Histocompatibility Complex (Minor-Histokompatibilitätskomplex) |
| ml | Milliliter |
| MMF | Mycophenolat-Mofetil |
| NK | Natürliche Killerzelle |
| nm | Nanometer |
| NOD | Non Obese Diabetes (nicht-Fettleibigkeitsdiabetes) |
| pH | potentia hydrogenii (negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration) |
| scid | Severe combined Immunodeficiency (schwerer kombinierter Immundefekt) |
| SF | Steel Factor (Stammzellfaktor) |
| Tab. | Tabelle |
| vgl. | vergleiche |
| Vol% | Volumenprozent |
| WHO | World Health Organisation (Weltgesundheitsorganisation) |

1. Einleitung und Ziel der Dissertation

1.1 Einleitung

Die akute myeloische Leukämie (AML) stellt ein äußerst heterogenes hämatologisches Krankheitsbild dar, welches durch die unkontrollierte Proliferation unausdifferenzierter und gleichzeitig nicht-funktioneller hämatopoetischer Zellen gekennzeichnet ist. Die Erkrankung kann aus sämtlichen Vorstufen der myeloischen Reihe der Hämatopoese entspringen und ist aufgrund möglicher chromosomaler Aberrationen sowie genetischer Mutationen in ihrer Aggressivität und in ihrem Verlauf divers. Diese multivariaten Faktoren gehen in der Regel mit einem unterschiedlich prognostizierbaren Krankheitsverlauf einher und können bisher mit einem einheitlichen Therapieschema nicht in allen Fällen optimal behandelt werden. Eine molekulare Therapie ist bisher nur für die akute Promyelozyten-Leukämie etabliert, die dadurch im Vergleich zu den anderen Subtypen eine höhere Heilungsrate zeigt. Um weitere zielgerichtete Therapiestrategien zu entwickeln ist ein stabiles Krankheitsmodell unabdingbar. Versuche an Menschen sind aus ethischen Gründen limitiert, weshalb sich humanisierte Mausmodelle anbieten. Frühere Generationen von immundefizienten Mäusen zeigten nur niedrige Wachstumsraten humaner AML. Außerdem waren Untersuchungen durch die kurze Lebensdauer eingeschränkt. Mit der Zucht neuer, robuster und immuninkompetenter Mausstämmen ist eine wichtige Voraussetzung für ein besseres Tiermodell zum Studium der AML erfüllt worden.

1.2 Ziel der Dissertation

Im Rahmen dieser Arbeit sollen weitere Erkenntnisse der biologischen Prozesse, die in AML-transplantierten Mäusen ablaufen, gewonnen werden. Dazu werden im ersten Teil mehrere humane primäre AMLs in immuninkompetente NSG-Mäuse transplantiert, um deren Wachstumsverhalten im murinen Organismus näher zu charakterisieren. Anschließend sollen zudem Faktoren identifiziert werden, welche ein Ansiedeln der Leukämie in den Mäusen begünstigen. Aus vorherigen Versuchen ist bekannt, dass nach der Transplantation humaner Leukämien nicht nur die

1. Einleitung und Ziel der Dissertation

Leukämiezellen in den Empfängertieren engraften, sondern dass in einigen Fällen auch humane T-Lymphozyten im Mausorganismus auswachsen. Dieses Phänomen wird im zweiten Teil der Arbeit näher untersucht, indem eine Leukämie, welche intramurin von einem T-Zell-Engraftment begleitet wird, einer Leukämie gegenübergestellt wird, welche T-Zell-frei wächst. Methoden, welche dieses Wachstum verhindern ohne das Ansiedeln der Leukämie zu stören, werden im letzten Abschnitt der hier vorgelegten Dissertationsschrift erarbeitet. Ihre Wirksamkeit soll in einem in-vitro-Modell getestet und abschließend evaluiert werden.

2. Literaturdiskussion

2.1 Die Hämatopoese

Die zellulären Bestandteile des menschlichen Bluts haben eine begrenzte Lebensdauer. So sind beispielsweise Erythrozyten zwischen 100 und 120 Tage im Blutkreislauf nachzuweisen, während Thrombozyten lediglich maximal zehn Tage im Blut zirkulieren bevor sie zugrunde gehen. Um eine funktionale Integrität des Blutgewebes gewährleisten zu können, müssen die Blutzellen ständig neu gebildet werden. Dieser Vorgang wird als Hämatopoese bezeichnet.

Die Hämatopoese findet im embryonalen Organismus zunächst im Dottersack und in der AGM-Region statt. Diese Region, ein funktionaler Zusammenschluss der dorsalen Aorta, den Gonaden und dem Mesonephros, stellt die Quelle der Stammzellen des Embryos dar, eine Ausdifferenzierung der Zellen findet hier jedoch nicht statt (1). Die fetale Leber übernimmt vorübergehend die Blutbildung, bis die adulten hämatopoetischen Organe Milz, Knochenmark und Thymus ausgebildet und funktionstüchtig sind (2).

Die Blutbildung geht von pluripotenten Knochenmarkstammzellen aus, die mesenchymalen Ursprungs sind (3). Es handelt sich dabei um Zellen, die das Potenzial besitzen, in alle hämatopoetischen Zellen auszdifferenzieren. Dies konnte eindrucksvoll in Versuchen der japanischen Arbeitsgruppe von Osawa verdeutlicht werden: Es gelang, das blutbildende System einer letal bestrahlten Maus mit der Transplantation einer einzigen Stammzelle zu rekonstituieren (4). Die Hämatopoese wird untergliedert in die Lymphopoese, die die Genese der Natürlichen Killerzellen sowie der Lymphozyten beinhaltet und in die Myelopoese, die die Bildung der Erythrozyten, Thrombozyten, Granulozyten, Makrophagen und Mastzellen zusammenfasst (5).

Die Myelopoese findet ausschließlich im Knochenmark statt. Verschiedene Wachstumsfaktoren und Zytokine steuern die Ausdifferenzierung der Stammzellen in die verschiedenen Vorläuferzellen (6, 7). Diese noch unreifen Vorläuferzellen werden auch als Blasten bezeichnet. Wenn die Zellen ausgereift sind, treten sie aus dem

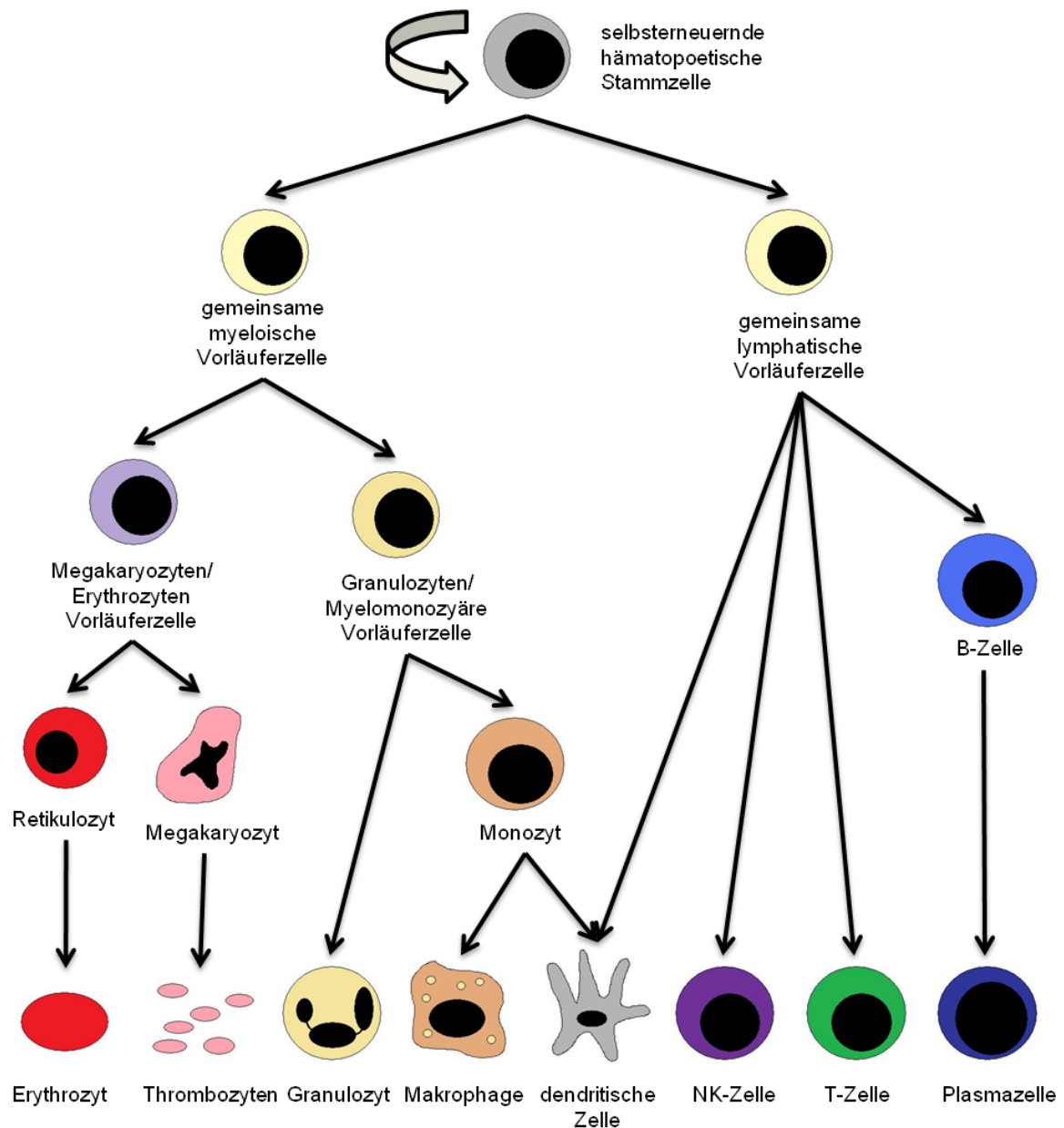


Abb. 2-1 Die Hämatopoese im Überblick. Aus einer sich ständig selbst erneuernden hämatopoetischen Stammzelle geht die Myelo- und die Lymphopoese über gemeinsame myeloische Vorläuferzellen (common myeloid progenitor cells, CMP) bzw. gemeinsame lymphatische Vorläuferzellen (common lymphoid progenitor cells, CLP) hervor. Die CMPs differenzieren über Megakaryozyten/Erythrozyten Vorläuferzellen (megakaryotic erythroid progenitor cells, MEP) in Retikulozyten, die sich in Erythrozyten umwandeln und Megakaryozyten, welche Thrombozyten bilden. Aus CMPs entstehen über Granulozyten/Myelomonozytäre Vorläuferzellen (granulo/myelomonocytic progenitor cells, GMP) auch Granulozyten und Monozyten, die sich im Gewebe zu Makrophagen und dendritischen Zellen weiterentwickeln. CLPs differenzieren zu dendritischen Zellen, NK-Zellen (natürliche Killerzellen), T-Zellen und B-Zellen, welche sich im aktivierten Zustand in Plasmazellen umwandeln. Modifiziert nach (8)

2. Literaturdiskussion

Knochenmark in den Blutstrom über und übernehmen dort ihre jeweiligen Funktionen. Eine Übersicht der Hämatopoese gibt Abb. 2-1.

Stammzellen können anhand unterschiedlicher Oberflächenmoleküle identifiziert werden, wobei die Definition geeigneter Stammzellmarker kontrovers diskutiert wird (9-11). Aktuell werden das Vorhandensein bzw. die Abwesenheit von CD34, CD38, CD43 und CD45 als Oberflächenmarker für humane hämatopoetische Stammzellen angesehen. Eine Mutation der Stammzellen kann zu malignen hämatologischen Erkrankungen, wie der akuten myeloischen Leukämie, führen (8, 12). Es wird davon ausgegangen, dass die Pathogenese von einer einzigen leukämischen Stammzelle eingeleitet wird (13). Diese besitzt die Fähigkeit, sich ständig zu replizieren (14) und dabei eine Vielzahl undifferenzierter Klone zu bilden, die konsekutiv die funktionstüchtigen Zellen des Knochenmarks verdrängen. Untersuchungen zeigten, dass die meisten Leukämiezellen nur eine begrenzte Kapazität zur Proliferation besitzen und ständig von anderen Leukämiezellen ersetzt werden. Im Vergleich zu diesen Zellen sind die Leukämienstammzellen selten: auf 250.000 Blasten kommt im Schnitt eine Stammzelle (15).

2.2 Die akute myeloische Leukämie

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine maligne Erkrankung der Myelopoese und wurde 1827 zuerst von Alfred-Armand-Louis-Marie Velpeau beschrieben (16), einem französischen Anatom und Chirurg. Rudolf Virchow prägte daraufhin 1845 den Namen der Leukämie, die griechische Bezeichnung für weißes Blut, nachdem er das Blut eines Leukämiepatienten unter dem Mikroskop betrachtete und ein Überschuss an weißen Blutzellen feststellte (17).

Die Erkrankung besitzt eine Inzidenz von 2,5 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr und ist somit vergleichsweise selten. Sie kann zwar in jedem Alter auftreten, stellt aber mit einem Durchschnittsalter von 68 Jahren bei Diagnosestellung eher eine Erkrankung des älteren Menschen dar (18).

2. Literaturdiskussion

Einer de-novo AML liegt ätiologisch häufig eine Schädigung des Knochenmarks zu Grunde. Diese ist entweder bedingt durch langjährige Belastung des Organismus mit Benzol (19), Zytostatika aus der Gruppe der Alkylantien oder der Topoisomerase II-Inhibitoren, welche unter anderem Therapeutika in der Behandlung des Brustkrebses darstellen (20), oder ionisierender Strahlung. Dies wurde besonders durch die Folgen der Atombombenexplosionen in Hiroshima und Nagasaki 1945 belegt. Bei den Überlebenden des Angriffs wurde eine erhöhte Prävalenz an Leukämie-Neuerkrankungen im Vergleich zur Normalpopulation festgestellt (21). Ebenfalls konnte die Bedeutung ionisierter Strahlung bei Menschen gezeigt werden, die kumuliert niedrigen Dosen an Strahlung ausgesetzt worden sind, wie beispielsweise Radiologen und radiologische Helfer (22). Genetische Faktoren spielen bei der Erkrankung eine Rolle. Patienten mit Trisomie 21 (23) oder Klinefelter-Syndrom (24) erleiden häufiger eine AML als Patienten mit anderen Erbkrankheiten. Entsteht eine AML aus einer anderen hämatologischen Erkrankung wird sie als sekundäre AML bezeichnet, die im Vergleich zur de-novo AML eine schlechtere Prognose zeigt. Sie kann aus einem myelodysplastischen Syndrom (25), einer Osteomyelofibrose (26), einer Polycythaemia vera (27) oder einer paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie (28) entstehen.

Infolge der Knochenmarkläsionen werden die genetischen Informationen der Zellen beschädigt. Eine hämatopoetische Stammzelle transformiert sich in eine neoplastische leukämische Stammzelle, die sich nicht mehr weiter ausdifferenziert, sondern in ihrem unreifen Entwicklungsstadium verweilt. Die ständig neugebildeten Blasten verdrängen die gesunden hämatopoetischen Zellen des Knochenmarks und werden in das periphere Blut ausgeschwämmt. Die Symptome der AML sind die Folgen dieser Verdrängung und der daraus resultierenden Knochenmarkinsuffizienz. Es kommt zu einem Abfall der Erythrozytenzahl und gleichzeitig zu einem Sinken des Hämoglobinwerts im Blut, was zu Blässe, Müdigkeit und Dyspoe führt. Ein Absinken der neutrophilen Granulozyten unterhalb des Referenzwerts geht mit einer erhöhten Infektanfälligkeit einher. Entzündungen an den Schleimhautübergängen und Besiedlungen der Schleimhaut mit opportunistischen Erregern sind häufig. Eine erhöhte Blutungsneigung ist bedingt durch eine Thrombozytopenie. Fieber unklarer Ursache, Nachtschweiß, hypertrophe Gingivitiden, Lymphknotenschwellungen,

2. Literaturdiskussion

Splenomegalie, leukämische Hautinfiltrationen und Knochenschmerzen vervollständigen die spektrenreiche Symptomvielfalt der AML. Labordiagnostisch ist die Anämie, Thrombozytopenie und Granulozytopenie für die Diagnosestellung wegweisend. Als Folge des erhöhten Zellumsatzes sind Harnsäure und Laktatdehydrogenase im Serum erhöht. Pathognomonisch für eine akute Leukämie sind unreifzellige Elemente im Blut. Die zytochemische, zytogenetische und durchflusszytometrische Untersuchung eines Knochenmarkbiopsats sichert die Diagnose der AML.

Es gibt zwei Klassifizierungsmodelle zur Einteilung der AML, nämlich das der French-American-British (FAB) co-operative group (29) und das der Weltgesundheitsorganisation (WHO) (30). Die häufig genutzte FAB-Klassifikation (Tab. 2.1) unterteilt die Erkrankung in acht Subtypen, die sich in dem ursprünglichen Zelltyp, aus dem die Leukämie entstanden ist und dessen Reifegrad unterscheiden. Die Einteilung gemäß WHO (Tab. 2.2) ist klinisch orientiert und lässt anhand der Gruppenzuteilung Aussagen über die Prognose der Erkrankungen treffen.

Der zu erwartende Verlauf der AML-Erkrankung lässt sich in prognostisch günstig, intermediär und ungünstig unterteilen. In Folge der zytochemischen und zytogenetischen Klassifizierung der AML lässt sich die optimale Therapie auswählen. Prognostisch günstig sind Leukämien mit einer Translokation von Chromosom 15 und 17, bzw. 8 und 21, sowie mit einer Inversion von Chromosom 16 (31). Zu der Gruppe gehören auch isolierte NPM1- und CEPBA-Mutationen. Von mittlerer Prognose sind AMLs mit normalem Karyotyp bzw. mit einer Trisomie 8 (32). Ein schlechter Verlauf wird bei komplexen Chromosomenaberrationen, einer Monosomie 7 (33) sowie Anomalien an Chromosom 3 (31) erwartet. Im Rahmen der Entwicklung moderner Verfahren der DNS-Sequenzierung, werden ständig neue Mutationen der AML entdeckt und auf ihre prognostischen Einflüsse untersucht. Die Mutation des Zytokinrezeptors FLT3, die bei 30 Prozent der AML-Patienten vorhanden ist (34), wurde bereits 1992 mit einem schlechten Verlauf der Krankheit in Verbindung gebracht (35). Es folgte die Untersuchung von CEPBA 2001 (36) und NPM1 2005 (37). Aktuell stehen die kürzlich von Ley entdeckten Mutationen von IDH1 und DNMT3a im Mittelpunkt der Aufmerksamkeit, wobei IDH1 vermutlich kein

2. Literaturdiskussion

prognostischer Faktor darstellt (38), während DNMT3a wahrscheinlich mit einer negativen Prognose verbunden ist (39). Anhand der WHO-Klassifikation lassen sich momentan ungefähr 30 Prozent der AMLs einteilen. Der Bedarf nach einer neuen Klassifikation wurde 2010 von Döhner geäußert, der mit dem Europäischen Leukämienetzwerk ein modifiziertes Einteilungssystem vorschlug, in dem die aktuellen Erkenntnisse der AML-Forschung enthalten sind (40).

| AML-Subtyp | Name |
|-------------------|---|
| M0 | Minimal differenzierte akute myeloische Leukämie |
| M1 | Akute myeloische Leukämie ohne Ausreifung |
| M2 | Akute myeloische Leukämie mit Ausreifung |
| M3 | Akute Promyelozyten-Leukämie |
| M4 | Akute myelomonozytäre Leukämie |
| M4eo | - mit Eosinophilie |
| M5 | Akute monozytäre Leukämie a) undifferenziert b) differenziert |
| M6 | Akute Erythroleukämie |
| M7 | Akute megakaryozytäre Leukämie |

Tab. 2-1 FAB-Klassifikation der AML. Die Einteilung erfolgt nach der primären Zelle, aus der die AML hervorgegangen ist und Differenzierungsgrad. Es gibt acht Klassen, von M0 – M7, teilweise mit weiteren Untergruppierungen. Modifiziert nach (29).

2. Literaturdiskussion

| Kategorie | Bezeichnung |
|-----------|---|
| I | AML mit definierten zytogenetischen Chromosomenbefunden |
| II | AML mit multilinearer Dysplasie |
| III | AML und myelodysplastische Syndrome, therapiebedingt |
| IV | Andere Formen der AML |

Tab. 2-2 WHO-Klassifikation der AML. Die Einteilung der AML erfolgt in vier Gruppen mit jeweiligen Untergruppen (nicht gezeigt). Je nach Gruppenzuordnung lässt sich die Prognose der Leukämie abschätzen. Modifiziert nach (30).

In der Therapie der AML werden Chemotherapeutika angewendet. Das Ziel der Chemotherapie ist es, sämtliche Leukämiezellen im peripheren Blut zu vernichten und den Anteil der Blasten im Knochenmark auf unter fünf Prozent zu reduzieren. Gleichzeitig soll eine Normalisierung des Blutbilds sowie der krankheitsassoziierten Symptome erreicht werden. Dieser Zustand wird als komplette Remission bezeichnet. Eingeleitet wird die Therapie mit der Remissionsinduktionstherapie. Standardchemotherapeutika, die in dieser Phase eingesetzt werden, sind Cytarabin und Daunorubicin (41). Die zytostatische Wirkung ist bei schnell teilenden Zellen, wie Krebszellen, besonders ausgeprägt, aber auch Zellen der Schleimhaut, des Haarwachstums und des blutbildenden Systems werden betroffen. Ist die Remission erreicht, so wird diese mit der Postremissionstherapie aufrechterhalten. Je nach Risikoprofil der AML und Gesundheitszustand des Patienten werden individualisierte Behandlungsstrategien angewendet. Patienten mit prognostisch ungünstigen Leukämien werden bei Vorhandensein eines passenden Spenders transplantiert, während man bei Patienten mit guter Prognose nach der ersten Remission darauf verzichtet. Im Falle eines Rezidivs wird eine allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation angestrebt (42).

Klinische Studien konnten zeigen, dass die Heilungsrate der AML zwischen 20 und 45 Prozent liegt (34, 43). Diese Werte müssen kritisch interpretiert werden, da das Studienkollektiv jünger und gesünder als der durchschnittliche Leukämiepatient ist

2. Literaturdiskussion

und deshalb auch eine aggressivere Chemotherapie toleriert. Für bestimmte Subtypen, wie zum Beispiel der akuten Promyelozyten-Leukämie wird eine Remission in 90 Prozent und eine Heilung in 80 Prozent der Fälle erreicht (44).

2.3 Die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation

Bei der hämatopoetischen Stammzelltransplantation (HSZT) handelt es sich um ein medizinisches Verfahren, bei dem einem Patienten Stammzellen injiziert werden. Diese Stammzellen können entweder vom Patienten selbst stammen, somit wären Spender und Empfänger identisch und es handelt sich um eine autologe HSZT. Sind Spender und Empfänger zwei unterschiedliche Personen, spricht man von einer allogenen HSZT (45).

Die erste Knochenmarktransplantation wurde 1959 vom französischen Onkologen Georges Mathé durchgeführt. Bei den Empfängern handelte es sich um jugoslawische Reaktorarbeiter, deren Knochenmark im Rahmen eines nuklearen Unfalls bestrahlt wurde und anschließend insuffizient geworden ist. Unglücklicherweise wurden damals alle Transplantate abgestoßen (46). Pionier im Bereich der HSZT war Edward Donnall Thomas, dem 1990 für seine Arbeiten am Fred Hutchinson Cancer Research Center in Washington der Nobelpreis verliehen wurde. Er optimierte das Verfahren, indem er die aus Tierversuchen gewonnenen Erkenntnisse am Menschen anwendete und einen Patienten mit fortgeschrittener Leukämie durch Transplantation des Knochenmarks seines Zwillingsbruders in eine drei Monate andauernde Remission brachte (47). Heute, über fünfzig Jahren nach den ersten Transplantationen durch Mathé, hat sich die HSZT zu einem wichtigen Pfeiler in der Therapie hämatologischer Erkrankungen entwickelt. Eine Studie, die 2010 veröffentlicht wurde, zeigte, dass 2006 weltweit 50.417 Transplantationen durchgeführt wurden, wovon 21.516 in einem allogenen Ansatz stattfanden (48).

Die kurative Wirkung der allogenen HSZT ist in besonderem Maße für die Therapie der AML belegt und wird im Rahmen dieser Erkrankung auch am häufigsten durchgeführt. Eine Anwendung erfolgt in selteneren Fällen bei der Behandlung der akuten lymphatischen Leukämie, der chronischen lymphatischen und myeloischen

2. Literaturdiskussion

Leukämie, des Multiplen Myeloms, der aplastischen Anämie, des myelodysplastischen Syndroms, der Sichelzellanämie, des Neuroblastoms, des Ewing Sarkoms, des Hodgkin Lymphoms sowie des Non-Hodgkin-Lymphoms und seltenen Autoimmunerkrankungen (48–52).

Um eine aus immunologischer Sicht möglichst komplikationslose Transplantation zu gewährleisten, müssen Spender und Empfänger identische humane Leukozytenantigene (HLA) besitzen. Diese Antigene liegen auf Chromosom 6 und werden als Haplotyp vererbt (53). Die Wahrscheinlichkeit unter den Geschwistern einen HLA-identen Donor zu finden beträgt 25 Prozent, während die Wahrscheinlichkeit einen passenden Spender in der Normalbevölkerung ausfindig zu machen, bedeutend geringer ausfällt. Außerdem dürfen sich die Lymphozyten in der gemischten Kultur, bestehend aus Spender- und Empfängerlymphozyten, nicht gegenseitig stimulieren (54). Die zu transplantierenden Stammzellen können entweder aus dem Knochenmark, dem peripheren Blut oder aus Nabelschnurblut stammen. Für die Knochenmarktransplantation wird dem Spender unter Vollnarkose Knochenmark aus dem Beckenkamm entnommen (55). Im Vergleich hierzu stellt die Gewinnung von Stammzellen aus dem peripheren Blut ein deutlich weniger traumatisches und belastendes Verfahren dar (56). Zunächst wird dem Spender Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor (G-CSF) über mehrere Tage subkutan appliziert, was die hämatopoetischen Stammzellen zu einer Expansion aus dem Knochenmark ins Blut anregt (57). Daraufhin folgt die Stammzellgewinnung mittels Leukapherese. Hierzu wird dem Stammzellspender peripheres Blut entnommen, was durch eine Leukapherese-Maschine geleitet wird, welche die weißen Blutkörperchen aus dem Blut filtert. Das restliche Blut wird dem Spender wieder zugeführt. Das entnommene Leukapherasat wird dann in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Die Stammzellen können auch direkt aus der Nabelschnur extrahiert werden. Dieses Verfahren gilt im Rahmen der Leukämietherapie nicht als Standard, sondern wird nur in Situationen eingesetzt, in denen kein HLA-identer Spender vorhanden ist (58).

Vor der eigentlichen HSZT findet beim AML-Patient eine myeloablative Konditionierung statt, die aus einer intensiven Chemotherapie kombiniert mit einer anschließenden fraktionierten Ganzkörperbestrahlung mit zehn Gray besteht. Das

2. Literaturdiskussion

Ziel dieser Behandlung ist die Beseitigung der verbliebenen Leukämiezellen, sowie die Immunsuppression des Patienten. Unter diesen Voraussetzungen können sich nach der intravenösen Infusion des Spenderzellgemischs die darin enthaltenen Stammzellen im Knochenmark des Patienten ansiedeln, ohne dass sie vom Immunsystem detektiert und bekämpft werden können (59). Als Alternative zum myeloablativen Konditionierungsverfahren können auch toxisitätsreduzierte Konditionierungsprotokolle eingesetzt werden (60). Hierbei wird auf die Ganzkörperbestrahlung nach der Chemotherapie verzichtet. Es kommt ebenfalls zu einem Anwachsen der intravenös injizierten Stammzellen. Im Falle eines Rezidivs können im Sinne einer adoptiven Immuntherapie Spenderlymphozyten zur Rezidivbehandlung eingesetzt werden. Im Vergleich zur myeloablativen Konditionierung zeigt dieses Verfahren eine niedrigere therapiebedingte Mortalität und wird somit auch von älteren Patienten toleriert (61), wobei zudem eine höhere Abstoßungsrate des Transplantats vorliegt (62).

Abgesehen von einer Abstoßungsreaktion können bei allogener HSZT weitere Komplikationen auftreten. Mukositiden stellen die häufigste Nebenwirkung des myeloablativen Regimes dar und werden durch die Gabe von Methotrexat als GvHD-Prophylaxe noch verstärkt (63). Sie sind sehr schmerzhaft und können bei oropharyngealen Beteiligungen bis zur Intubationspflicht führen. In Studien konnte die Wirkung von rekombinanten humanen Keratinozytenwachstumsfaktoren gegen Chemotherapie-assoziierte Mukositiden gezeigt werden (63). Die zweithäufigste Komplikation ist die venooklussive Krankheit, die sich durch schmerzhafte Hepatomegalie, Ikterus und Flüssigkeitsretention auszeichnet und kausal nicht therapiert werden kann (64). Bedingt durch die Immunsuppression kommt es vor allem in der drei Wochen andauernden aplastischen Phase gehäuft zu Infektionen. Besonders gefährlich für den Patienten ist die interstitielle Pneumonie, die durch das Cytomegalovirus ausgelöst wird und eine Letalität von 15 Prozent aufweist (64). Nach einem Jahr hat sich das Immunsystem des transplantierten Patienten in der Regel wieder stabilisiert. Die bedeutendste Komplikation der allogenen HSZT stellt jedoch nach wie vor die Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion dar.

2.4 Die Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion

Bei der Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (Graft-versus-Host Disease, GvHD) handelt es sich um eine Immunreaktion, ausgelöst durch Spenderlymphozyten, die im Transplantat enthalten sind und sich gegen den Wirtsorganismus richten. Sie ist ein Phänomen des Zeitalters der Organ- und Stammzelltransplantation und wurde erstmals 1962 von Barnes und Loutit beschrieben, die eine GvHD bei transplantierten Mäusen feststellten (65). Der Begriff der GvHD wurde jedoch erst später durch Simonsen geprägt, der die Wirkung immunkompetenter Zellen in immuninkompetenten Patienten untersuchte (66). Rupert Billingham, ein amerikanischer Arzt und Wissenschaftler, legte 1966 drei Bedingungen fest, die obligat für eine Entstehung einer GvHD sind. Die erste Voraussetzung lautet, dass das Transplantat immunkompetente Zellen besitzen muss. Zweitens benötigt der Wirt bestimmte Antigene, welche das Transplantat nicht besitzt, sodass der Wirtsorganismus dem Transplantat fremd erscheint. Die dritte und letzte Bedingung besagt, dass der Wirt unfähig sein muss, eine Immunantwort gegen das Transplantat ausrichten zu können (67). Aufgrund des unterschiedlichen zeitlichen Auftretens nach der HSZT und der klinischen Manifestation wird die GvHD in eine akute und in eine chronische Form unterteilt (68).

Die akute GvHD tritt per Definition innerhalb der ersten einhundert Tage nach erfolgter HSZT auf, insbesondere zwischen der zweiten und sechsten Woche (69). Von dieser Reaktion sind 35 bis 50 Prozent der transplantierten Patienten betroffen (70). Pathophysiologisch beginnt die Vorphase der akuten GvHD bereits während der Konditionierung vor der geplanten HSZT. Durch die aggressive myeloablative Therapie werden körpereigene Gewebe, wie die Darmmukosa oder das Lebergewebe, bereits massiv geschädigt und schütten unreguliert Zytokine aus (71), welche die Anzahl an Adhäsionsmolekülen und MHC-Molekülen hochregulieren. Dadurch steigt die Menge der histoinkompatiblen Antigene, welche später durch die Donorlymphozyten erkannt werden können (72). Nach der erfolgten HSZT wird die Immunreaktion durch Spender-T-Zellen ausgelöst. Dies geschieht in erster Linie via MHC-Klasse I- durch $CD8^+$ -Lymphozyten, aber auch via MHC-Klasse II-Moleküldisparitäten durch $CD4^+$ -Lymphozyten (73). Sind Empfänger und Spender

2. Literaturdiskussion

nicht HLA-ident, tritt eine übermäßige GvHD auf. Gleiches konnte in klinischen Studien gezeigt werden, wenn sich nur ein HLA-Molekül unterschieden hatte (74, 75). Eine GvHD kann selbst bei HLA-identem Spender ausgelöst werden. In diesem Fall ist sie durch nicht-identische Minorhistokompatibilitätsantigene (MiHC) begründet (76). Die Spenderlymphozyten stoßen eine Immunkaskade durch exzessive Ausschüttung von Interferon-Gamma, Interleukin 2, Tumornekrosefaktor-Alpha und etlichen weiteren Interleukinen an. In Folge der ungebremsten Immunreaktion kommt es zu starken Gewebsschädigungen (77, 78) welche zu einer Schädigung von Haut, Darm und Leber führen. Die Hautbeteiligung zeigt sich in der Regel zuerst und äußert sich morphologisch in einem makulopapulösen Exanthem und einer Erythrodermie (79). Die Schädigung der Darmmukosa führt zu Enteritiden mit schwerwiegenden Diarrhöen mit einer Frequenz von mehr als zwanzig Stuhlgängen pro Tag, welche beim Patienten zu einem enormen Wasserverlust führen können und von Tenesmen begleitet werden (80). Zusätzlich führen die Immunreaktionen zu Entzündungen der Leber mit Ikterus (81). Die aktuelle Stadieneinteilung der Organbeteiligung und Gradeinteilung der akuten GvHD wird in Tab. 2.3 gezeigt. Zur Prävention einer akuten GvHD werden die Calcineurininhibitoren Cyclosporin A oder Tacrolimus zusammen mit dem Folsäureantagonisten Methotrexat eingesetzt (83). Sofern es sich beim Spender um eine nichtverwandte Person handelt, empfiehlt es sich die Prophylaxe um Antithymozytenglobulin zu erweitern (84). Im Falle einer Erkrankung werden zusätzlich zur prophylaktischen Medikation Steroide gegeben, die erst dann ausschleichend abgesetzt werden sollen, wenn die Symptome abgeklungen sind (85, 86). Zusätzlich wird eine supportive Therapie mit Flüssigkeit und Elektrolyten eingeleitet.

Im Gegensatz zur akuten Form, tritt die chronische GvHD per Definition später als hundert Tage, selten aber später als 500 Tage nach der HSZT auf (87). Die Pathogenese ist noch größtenteils unverstanden, jedoch handelt es sich hier ebenfalls um eine durch Spender-T-Lymphozyten ausgelöste Reaktion, die bei 40-70% der transplantierten Patienten auftritt (88). Zusätzlich zu den Symptomen der akuten GvHD, können auch exokrine Drüsen, die Lunge sowie die Gelenke betroffen sein. Trockene Augen (89) und Mundschleimhäute sind bedingt durch eine Störung der exokrinen Drüsenfunktion. Die Lungenbeteiligung äußert sich im Auftreten idio-

2. Literaturdiskussion

| Stadium | Haut (makulopapulöser Ausschlag) | Leber (Serumbilirubin) | Gastrointestinaltrakt (Stuhlvolumen pro Tag) |
|----------------|--|----------------------------------|--|
| 0 | kein Ausschlag | <2 mg/dl | <500 ml |
| 1 | <25% der BSA | 2-3 mg/dl | 500-999 ml |
| 2 | 25-50% der BSA | 3,1-6 mg/dl | 1000-1500 ml |
| 3 | generalisiert | 6,1-15 mg/dl | >1500 ml |
| 4 | generalisiert + bullöse Erscheinungen | >15 mg/dl | starke abdominelle Schmerzen ± Ileus |

Grad der GvHD

| | | | |
|-----|--------|----------|-----|
| I | 1-2 | - | - |
| II | 3 oder | 1 oder | 1 |
| III | - | 2-3 oder | 2-4 |
| IV | 4 oder | 4 | - |

Tab. 2-3 Stadien der Organsysteme und Gradeinteilung bei der akuten GvHD. Im oberen Teil der Tabelle werden die verschiedenen Stadieneinteilungen der akuten GvHD der Organe Haut, Leber und Gastrointestinaltrakt aufgelistet. Anhand der unterschiedlichen Ausprägung der Erkrankung an den verschiedenen Geweben, ergibt sich der Schweregrad der GvHD, was im unteren Teil der Tabelle ersichtlich ist. Abkürzungen: BSA = Körperoberfläche. Nach (82).

pathischer Pneumonien. Durch eine Schädigung des Bindegewebes kommt es zu den Gelenkproblemen (90). Die Konsensuskonferenz für die Behandlung der chronischen GvHD in Regensburg hat 2010 den Einsatz von Steroiden als

2. Literaturdiskussion

Therapeutikum erster Wahl festgelegt (91). Bei steroidrefraktärer Erkrankung wird ein Vorgehen gemäß der Versuchs-und-Irrtums Methode empfohlen, bis ein wirksames Medikament gefunden ist. Zur Auswahl stehen Calcineurininhibitoren, Zytostatika (Mycophenolat-Mofetil, Methotrexat, Cyclophosphamid, Pentostatin) und immunmodulatorische Pharmaka (mTor-Inhibitoren, Thalidomid, Hydroxychloroquin, Vitamin A-Analoga, Clofazimin) (92).

Aktuell wird im Rahmen von klinischen Phase-1-Studien die immunmodulatorische Wirkung mesenchymaler Stromazellen (Mesenchymal Stromal Cells, MSCs) in der Behandlung therapierefraktärer akuter und chronischer GvHD getestet. In Hinsicht auf Effektivität und Sicherheit wird die Transfusion von allogenen MSCs momentan als erfolgsversprechend eingeschätzt (147-149).

2.5 Die Transplantat-gegen-Leukämie-Reaktion

Während die GvHD eine bedeutende Nebenwirkung der HSZT darstellt, äußert sich der immuntherapeutisch gewünschte Effekt in Form der Transplantat-gegen-Leukämie-Reaktion (graft versus leukemia, GvL), die für die Eradikation der AML-Blasten nach der Transplantation verantwortlich ist. Obwohl die Induktionstherapie die Leukämiezellen im Blut und im Knochenmark größtenteils zerstört, genügt eine überlebende leukämische Stammzelle, die leukemia-inducing-cell, um die Erkrankung erneut auszulösen (13, 151). Mausexperimente zeigten, dass eine Ganzkörperbestrahlung nicht ausreicht, um eine Leukämie zu eliminieren (93). Um eine Heilung der Leukämie zu ermöglichen, benötigt man Zellen, die gezielt Leukämiezellen erkennen und bekämpfen. Wie bei der GvHD, wird die GvL-Reaktion durch CD4⁺- (94) und CD8⁺-Spender-T-Lymphozyten (95), sowie durch NK-Zellen (96) vermittelt, die im HLA-identen Ansatz MiHC-Moleküle erkennen und eine Immunantwort einleiten (97). Dadurch werden die Leukämieblasten zerstört und eine Heilung der AML erreicht.

Ursprünglich war man der Ansicht, dass die GvHD nicht von der GvL-Reaktion zu trennen sei (98). Durch Immunsuppression des Patienten nach der allogenen HSZT war sowohl das Ausmaß der GvHD, also auch der GvL verringert. Durch

2. Literaturdiskussion

Identifizierung und Erforschung der MiHC-Antigene gelang man zur Erkenntnis, dass sie nicht in allen Geweben gleichverteilt sind. HA-1 (99), HA-2 (100), HB-2 (101) und HCL2A1 (102) werden nur auf hämatopoetischen Zellen exprimiert und stellen Ziele der GvL-Reaktion dar, während andere Antigene ubiquitär vorkommen und sowohl eine GvL- als auch eine GvH-Aktivität einleiten können. MiHC-Antigene stehen momentan im Fokus der Forschung und es werden ständig neue Antigene gefunden und analysiert (103, 104), mit dem Ziel ein modifiziertes HSZT-Regime zu entwickeln, welches eine effektive GVL ohne Ausbildung einer GvHD bewirkt (105).

2.6 Humanisierte Mausmodelle

Zur Untersuchung komplexer biologischer Prozesse werden in der Wissenschaft in vivo-Modelle herangezogen, anhand derer viele Erkenntnisse gewonnen werden können. Die Erforschung der humanen Biologie am Menschen wird jedoch durch ethische und technische Grenzen beschränkt. Zur Überwindung dieser Grenzen wurden immundefiziente Mausmodelle entwickelt, in denen humane Zellen zum Engraftment gebracht werden können. Der daraus abgeleitete Terminus „humanisierte Mausmodelle“ bedeutet in diesem Fall, dass die Mäuse durch gezielte Insertion menschliche Gene tragen oder in ihnen sich durch eine angeborene Immuninkompetenz menschliche Zellen und Gewebe ansiedeln lassen (106).

Der erste Durchbruch in der Geschichte der humanisierten Mausmodelle gelang mit der Entwicklung der scid-Maus (107). Durch die Prkdc^{scid}-Mutation wurde die Bildung einer Proteinkinase verhindert, die wichtig für die Ausdifferenzierung von B- und T-Lymphozyten notwendig ist. Aufgrund der Immundefizienz konnten sich humane Gewebe in murinen Modellen ansiedeln, wenn auch nur in geringem Maße (108–110).

Als zweiter Meilenstein kann die Züchtung der NOD-scid Maus erachtet werden (111). Bei diesem Mausstamm ist eine angeborene diabetische Stoffwechselstörung verantwortlich für die Abwesenheit eines funktionierenden Komplementsystems, sowie für eine defekte dendritische Zell- und Makrophagenfunktion. Im Vergleich zu

2. Literaturdiskussion

den scid-Mäusen konnte in NOD-scid-Mäusen höhere Anteile an transplantierten menschlichen Geweben erreicht werden (112–114).

Aus diesem Mausstamm wurde schließlich die NSG-Maus (NOD.Cg-*Prkdc*^{scid} *Il2rg*^{tm1Wjl}/SzJ -Maus) entwickelt, die zusätzlich zu der NOD- und der *Prkdc*^{scid}-Mutation homozygot für ein mutiertes Gen der Interleukin-2-Rezeptor γ -Kette ist (115). Die Interleukin-2-Rezeptor γ -Kette ist wichtiger Bestandteil der Rezeptoren für IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 und IL-21 (116). Die Mutation bewirkt somit eine schwerwiegende Beeinträchtigung in der B- und T-Lymphozytenfunktion und verhindert darüber hinaus eine NK-Zelldifferenzierung (117). NSG-Mäuse dienen durch ihre Immuninkompetenz als geeignetes humanisiertes Mausmodell für die Untersuchung menschlicher Gewebe, müssen aber verstärkt unter hohen Hygieneanforderungen in einer SPF („specific pathogen free“) ähnlichen Umgebung gehalten werden.

3. Material und Methoden

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Technische Geräte und Hilfsmittel

| Produkt | Hersteller |
|--|---------------------------------------|
| Autoklav | KGS-Sterilisatoren, Olching, D |
| Bestrahlungsgerät <i>Typ CDCK 4905</i> | Buchler, Braunschweig, D |
| Binokuläres Mikroskop <i>Wilovert S</i> | Hund, Wetzlar, D |
| Brutschrank <i>Heracell 150</i> | Heraeus Instruments, Hanau, D |
| Eismaschine | Ziegra-Eismaschinen, Isernhagen, D |
| Durchflusszytometer <i>Canto 1</i> | Becton Dickinson, Heidelberg, D |
| Kühl-Gefrierschrank-Kombination | Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe, D |
| Mausinjektionskäfig <i>Typ A</i> | G&P Kunststofftechnik, Kassel, D |
| <i>MACS Midi-Magnet</i> | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D |
| <i>MACS Multi-Stand</i> | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D |
| Neubauer improved-Zählkammer | Brand, Melsungen, D |
| Pinzette, anatomisch | Fine Science Tools, Heidelberg, D |
| Pinzette, chirurgisch | Fine Science Tools, Heidelberg, D |
| Pipettierhilfe Pipetus | Hirschmann, Ebnerstadt, D |
| Pipettierhilfe <i>Transferpipette S</i> | Brand, Melsungen, D |
| Schere, anatomisch | Fine Science Tools, Heidelberg, D |
| Schere, spitz | Fine Science Tools, Heidelberg, D |
| Sterile Werkbank <i>2F180-II GS Technoflow</i> | Integra Biosciences, Fernwald, D |

3. Material und Methoden

| | |
|--|--------------------------------|
| Sterile Werkbank <i>Herasafe</i> | Heraeus Instruments, Hanau, D |
| Stickstofftank | Taylor Wharton, Mildstedt, D |
| Tischzentrifuge <i>Centrifuge 5810 R</i> | Eppendorf, Hamburg, D |
| Tischzentrifuge <i>Megafuge 3.0 R</i> | Heraeus Instruments, Hanaus, D |
| Vortex-Mixer <i>VF 2</i> | IKA Labortechnik, Staufen, D |
| Wärmelampe Infraphil HP 3616 | Philips, Hamburg, D |
| Wasserbad <i>SW 22</i> | Julabo, Seelbach, D |

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

| Produkt | Hersteller |
|----------------------------------|---------------------------------------|
| 24 Well Platte | Greiner Bio-One, Frickenhausen, D |
| Deckglas | Becton Dickinson, Heidelberg, D |
| Einfrier-Röhrchen | Nunc, Wiesbaden, D |
| Einmal-Feindosierungsspritze 1ml | Braun, Melsungen, D |
| Einmal-Injektionskanüle | Braun, Melsungen, D |
| Einmal-Skalpell <i>Nr. 11</i> | Feather Safety Razor Co, Osaka, JAP |
| Konisches Röhrchen 15 ml/ 50 ml | Greiner Bio-One, Frickenhausen, D |
| <i>MACS LD Säule</i> | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D |
| Pipettenspitze | Starlab, Ahrensburg, D |
| Pipette, steril | Greiner Bio-One, Frickenhausen, D |
| Reaktionsgefäß 0,5 ml/ 1,5 ml | Eppendorf, Hamburg, D |
| Rundbodenröhrchen | Becton Dickinson, Heidelberg, D |

3. Material und Methoden

Zellsieb 100µm

Becton Dickinson, Heidelberg, D

3.1.3 Chemikalien

| Produkt | Hersteller |
|--|---------------------------------------|
| 7-AAD (7-Amino-Actinomycin) | Beckman Coulter, Krefeld, D |
| Ammoniumchlorid | Applichem, Darmstadt, D |
| Aqua destillata | Braun, Melsungen, D |
| <i>autoMACS Rinsing Solution</i> | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D |
| BSA (bovines Serumalbumin) | Gibco Invitrogen, Karlsruhe, D |
| Cyclosporin A <i>Sandimmun i.v.</i> 50 mg/ml | Novartis Pharma, Nürnberg, D |
| EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) | Applichem, Darmstadt, D |
| Ethanol 70% <i>Alkopharm 70</i> | Nedalco, Heilbronn, D |
| FACS Clean Solution | Becton Dickinson, Heidelberg, D |
| FACS Flow Sheath Fluid | Becton Dickinson, Heidelberg, D |
| FACS Lysing Solution | Becton Dickinson, Heidelberg, D |
| Glucose 5% Infusionslösung | Braun, Melsungen, D |
| Heparin-Natrium 25000 Einheiten | Ratiopharm, Ulm, D |
| Humane CD3 <i>MicroBeads</i> | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D |
| Kaliumhydrogencarbonat | Applichem, Darmstadt, D |
| <i>MACS BSA Stock Solution</i> | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D |
| Mycophenolat-Mofetil <i>Cellcept</i> 500 mg | Roche Diagnostics, Mannheim, D |
| Natriumazid | Applichem, Darmstadt, D |

3. Material und Methoden

| | |
|---------------------------------------|--------------------------------|
| PBS (Phosphate Buffered Saline) | Gibco Invitrogen, Karlsruhe, D |
| PFA (Paraformaldehyd) 4% | Applichem, Darmstadt, D |
| PHA (Phytohämagglutinin) | Biocrom, Berlin, D |
| Tacrolimus <i>Prograf i.v.</i> 5mg/ml | Astellas Pharma, München, D |
| Trypanblau | Applichem, Darmstadt, D |

3.1.4 Lösungen und Puffer

3.1.4.1 Ammoniumchloridlösung

Die Ammoniumchloridlösung wurde zur Lyse von Erythrozyten in Milz- und Knochenmarkzellsuspensionen verwendet. Sie bestand aus 31 mmol Ammoniumchlorid, 2 mmol Kaliumhydrogencarbonat und 0,02 mmol EDTA, gelöst und steril filtriert in einem Liter Aqua destillata. Unter Kontrolle eines pH-Meters wurde mit Salzsäure oder Natronlauge ein pH von 7,29 eingestellt.

3.1.4.2 FACS-Puffer

Der FACS-Puffer wurde nach der Inkubation mit Antikörpern zum Entfernen ungebundener Antikörper eingesetzt. Zur Herstellung wurden 0,01% Natriumazid, 1% BSA und 98,99% PBS gemischt.

3.1.5 Zellkulturmedien und Zusätze

| Produkt | Hersteller |
|---------|--------------------------------|
| AIM V | Gibco Invitrogen, Karlsruhe, D |
| DMEM | Gibco Invitrogen, Karlsruhe, D |

3. Material und Methoden

| | |
|---|--|
| DMSO (Dimethylsulfoxid) | Apotheke der Universitätsmedizin Mainz, Mainz, D |
| DNase | Roche Diagnostics, Mannheim, D |
| FCS (fötales Kälberserum) | Gibco Invitrogen, Karlsruhe, D |
| HS (Humanserum) von gesunden Spendern | mittels Spende von verschiedenen freiwilligen Spendern gewonnen |
| Penicillin/Streptomycin <i>Penstrep</i> | Gibco Invitrogen, Karlsruhe, D |

3.1.6 Medien

3.1.6.1 Auftaumedium

Zum Auftauen von tiefgefrorenen Zellen wurden dem Grundmedium *DMEM* 0,1 mg/ml DNase hinzugefügt. Da es beim Auftauen zum Untergang von Zellen und somit zum Freisetzen von DNS-Strängen kam, verhinderte die DNase das Verklumpen der Zellsuspension mit der freien DNS.

3.1.6.2 Einfriermedium

Das Einfriermedium wurde zum Kryokonservieren von Zellen verwendet und setzte sich aus 90 % FCS und 10 % DMSO zusammen. DMSO verhinderte beim Einfrieren die intra- und extrazelluläre Kristallbildung sowie die Dehydratation des Zytoplasmas, wirkte jedoch bei Raumtemperatur zytotoxisch. Um die Zellen nicht zu gefährden, musste der Einfriervorgang zügig durchgeführt werden.

3.1.6.3 Präpariermedium

Im Präpariermedium wurden Zellen kurzzeitig aufbewahrt. Es bestand aus 98 % *DMEM*, 1 % FCS und 1 % Penicillin/ Streptomycin.

3. Material und Methoden

3.1.6.4 Leukämiemedium

Das Leukämiemedium diente zum längerfristigen Halten einer Leukämieinie in Kultur. Hierfür wurden 90 % *AIM V* mit 10 % Humanserum gemischt.

3.1.7 Antikörper

| Antigen | Konjugat | Klon | Hersteller |
|-------------------|----------|-------------|-----------------------------|
| Humanes CD3 | FITC | UCHT1 | Beckman Coulter, Krefeld, D |
| Humanes CD4 | FITC | SFCI12T4D11 | Beckman Coulter, Krefeld, D |
| Humanes CD8 | PE | B9.11 | Beckman Coulter, Krefeld, D |
| Humanes CD33 | PE | D3HL60.251 | Beckman Coulter, Krefeld, D |
| Humanes CD45 | APC | J.33 | Beckman Coulter, Krefeld, D |
| Isotypenkontrolle | FITC | 679.1Mc7 | Beckman Coulter, Krefeld, D |
| Isotypenkontrolle | PE | 679.1Mc7 | Beckman Coulter, Krefeld, D |
| Isotypenkontrolle | APC | 679.1Mc7 | Beckman Coulter, Krefeld, D |

3.1.8 Humane primäre akute myeloische Leukämien

| Leukämie | FAB-Klassifikation | FLT3 ITD-Status |
|----------|--------------------|-----------------|
| MZ237 | M4eo | positiv |
| MZ251 | M4eo | negativ |
| MZ308 | M1 | positiv |
| MZ418 | M5b | negativ |
| MZ484 | M5a | positiv |

3. Material und Methoden

| | | |
|-------|------|----------------|
| MZ561 | M5 | nicht bestimmt |
| MZ580 | M4 | positiv |
| MZ625 | M0/1 | negativ |
| MZ653 | M5 | negativ |
| MZ667 | M1 | positiv |
| MZ683 | M2 | positiv |
| MZ804 | M0/1 | negativ |
| MZ987 | M4 | positiv |

3.1.9 Mausstamm

Als Versuchstiere wurden Mäuse des NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ-Stamms (NSG) verwendet, die ursprünglich von Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine, USA) erworben worden waren. Sie wurden in der zentralen Versuchstiereinrichtung der Universitätsmedizin Mainz gezüchtet und gehalten. Dort unterlagen die Tiere einem Tag-Nacht-Rhythmus von jeweils zwölf Stunden und erhielten Trockenfutter sowie Trinkwasser ad libitum. Zweimal in der Woche wurden die Käfige gereinigt, sowie Streu, Futter und Trinkwasser gewechselt. Die Temperatur betrug jederzeit 20 Grad Celsius bei einer Luftfeuchtigkeit zwischen 38 und 42 Prozent. 200 mg Sulfadoxin und 40 mg Trimethoprim wurden der Trinkwasserflasche als Antibiotikaprophylaxe zugeführt.

Insgesamt wurden 332 Mäuse in den nachfolgend aufgeführten Versuchen eingesetzt:

| Versuch | Anzahl der verwendeten Mäuse |
|---|------------------------------|
| Transplantationen verschiedener humaner AMLs (vgl. 4.1.1) | 203 |
| Wachstumskinetik von MZ667 (vgl. 4.2.1) | 45 |
| Wachstumskinetik von MZ308 (vgl. 4.2.2) | 45 |

3. Material und Methoden

| | |
|---|-----|
| Toxizitätsuntersuchung verschiedener T-Lymphozytenhemmer (vgl. 4.3.1) | 24 |
| Verhinderung des T-Lymphozytenwachstums mittels | |
| • Cyclosporin A (vgl. 4.3.3.2) | 7 |
| • Magnetischer Zellsortierung (vgl. 4.3.3.3) | 5 |
| Kontrollen (vgl. 4.3.3.1) | 3 |
| <hr/> | |
| Insgesamt | 332 |
| <hr/> | |

3.1.10 Software

Becton Dickinson *FACSDiva*

GraphPad Software *Prism 5*

Microsoft Office *Excel 2007*

Microsoft Office *Power Point 2007*

Microsoft Office *Word 2007*

Microsoft *Windows Vista*

Swiss Academic Software *Citavi 3*

3.2 Methoden

3.2.1 Allgemeines

Alle durchgeführten Tierversuche wurden im Rahmen eines genehmigten Tierversuchsantrags und unter Einhaltung des Tierschutzgesetzes durchgeführt. Alle Zentrifugationsschritte, die im Folgenden auch als „waschen“ bezeichnet werden, fanden jeweils für fünf Minuten bei 1500 Umdrehungen pro Minuten und vier Grad Celsius statt. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in Medium resuspendiert.

3.2.2 Gewinnung primärer humaner akuter myeloischer Leukämieblasten

Die in den Versuchen verwendeten Zellen stammen von Patienten, bei denen eine noch nicht antherapierte akute myeloische Leukämie diagnostiziert wurde. Nach informierter Einwilligung wurden die aus den therapeutischen Leukapheresen gewonnenen Zellen aliquotiert und anschließend entweder sofort weiterverwendet oder zur Aufbewahrung eingefroren. Außerdem wurde das Vorhandensein einer FLT3-ITD-Mutation überprüft, sowie die Leukämie zytomorphologisch nach der French-American-British-Klassifikation eingeteilt. Die Gewinnung der Leukämieblasten sowie die anfänglichen Analysen wurden von der Transfusionszentrale der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt.

3.2.3 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Zum längerfristigen Aufbewahren von Zellen diente das Einfrieren. Dabei wurden zunächst die Einfrierröhrchen beschriftet und bei -20 Grad Celsius für 30 Minuten vorgekühlt. Die einzufrierenden Zellen wurden gewaschen, je 10^7 bis 5×10^7 Zellen in einem Milliliter Einfriermedium resuspendiert und in das gekühlte Einfrierröhrchen überführt. Dies musste zeitlich unmittelbar geschehen, da DMSO bei Raumtemperatur zytotoxisch ist. Das Röhrchen wurde 24 Stunden bei -80 Grad Celsius zwischengelagert und dann in einem Tank mit flüssigem Stickstoff bei -147 Grad Celsius aufbewahrt.

3. Material und Methoden

Das Auftauen tiefgefrorener Zellen fand im Wasserbad bei 37 Grad Celsius statt. Sobald der Inhalt des Einfrierröhrchens begann in die flüssige Phase überzutreten, wurde dieses dem Wasserbad entnommen und der Inhalt mit zehn Milliliter ebenfalls im Wasserbad vorgewärmtem Auftaumedium verdünnt. Nach dem Waschen der Zellen wurde das Pellet in Präpariermedium aufgenommen.

3.2.4 Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung

Die Zellzahl einer Suspension wurde mit Hilfe einer Neubauer improved-Zählkammer ermittelt (Abb. 3-1a). Nach dem Auflegen des Deckglases auf die Kammer war darauf zu achten, dass Newtonsche Ringe erschienen. Sie zeigten an, dass die Tiefe der Kammer richtig eingestellt worden ist. 20 µl eines Gemischs aus Zellsuspension und Trypanblaulösung (Verhältnis 1:10) wurden in die Kammer überführt. Dies geschah durch Ansetzen der Pipettenspitze an die Kante der Zählkammer, wodurch die Flüssigkeit durch Kapillarkräfte zwischen Deckglas und Kammer gesogen wurde. Nun wurden die Zellen unter dem Mikroskop betrachtet. Die Trypanblaulösung drang in die avitalen Zellen ein und färbte diese blau an. Vitale Zellen erschienen hell und wurden in 16 Eckquadraten gezählt (Abb. 3-1.b).



Abb. 3-1 a) Abbildung einer Neubauer improved-Zählkammer **b)** Ansicht der Zählkammer unter einem Mikroskop. Beim Auszählen der Zellen werden nur die Zellen in den großen Eckquadraten berücksichtigt.

Es wurden auch jene Zellen mitgezählt, die die linke oder obere Linie eines Eckquadrats berührte. Unter Berücksichtigung der Verdünnung musste die ermittelte Zahl mit zehn multipliziert werden. Da die Kammer eine Tiefe von 0,1 mm besaß, wurde diese Zahl mit 10^4 multipliziert, um die Zellmenge pro Milliliter Suspension zu

3. Material und Methoden

erhalten. Durch Multiplikation mit dem Volumen der Zellsuspension erhielt man die absolute Zellmenge.

3.2.5 Bestrahlung der Versuchstiere

Die NSG-Mäuse wurden einen Tag vor der Transplantation mit 1,5 Gray subletal bestrahlt, um das Knochenmark partiell zu zerstören und somit das Einwandern der leukämischen Blasten zu begünstigen. Im Abstand von 24 Stunden erfolgte die Transplantation.

3.2.6 Transplantation menschlicher Leukämieblasten in NSG-Mäuse

Die Leukämieblasten wurden aufgetaut und gewaschen. Die gewünschte Zellmenge pro Maus wurde eingestellt und in je 200 µl PBS aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in einer Einmal-Feindosierungsspritze blasenfrei aufgezogen. In der Zwischenzeit wurden die Mäuse für fünf Minuten unter einer Wärmelampe im Käfig aufgewärmt um die Durchblutung zu fördern und somit die Injektion zu erleichtern. Die Tiere wurden nacheinander ihrem Käfig entnommen und in einen Injektionskäfig gesperrt, in dem sie sich nicht bewegen konnten, ihre Schwänze aber zugänglich waren. Nach gründlicher Desinfektion eines Schwanzes mit 70 Vol% Ethanol wurde die laterale Schwanzvene aufgesucht, mit der Einmal-Injektionskanüle punktiert und die Zellsuspension injiziert. Danach wurde die Einstichstelle manuell komprimiert bis eine Blutstillung erfolgte. Anschließend wurde die Maus der Vorrichtung entnommen und wieder zurück in den Käfig gesetzt.

3.2.7 Überwachung der transplantierten NSG-Mäuse

Nach der erfolgten Transplantation wurden die Versuchstiere regelmäßig überwacht: Zweimal wöchentlich fand eine visuelle Inspektion statt, die Mäuse wurden gewogen und deren Gewicht notiert. Einmal pro Woche wurde peripheres Blut aus der Schwanzvene abgenommen und auf humane Leukämie- und T-Zellen überprüft.

3. Material und Methoden

Hierfür wurden die Blutproben mit Fluorochrom-gekoppelten-Antikörpern gegen die humanen Oberflächenantigene CD3, CD33 und CD45 markiert und anschließend durchflusszytometrisch untersucht.

3.2.8 Blutabnahme

Zur Vorbereitung der Blutabnahme wurde die Maus für fünf Minuten unter einer Wärmelampe aufgewärmt. Danach wurde sie ihrem Käfig entnommen und in den Injektionskäfig eingespannt. Der Schwanz wurde mit 70 Vol% Ethanol desinfiziert. Nach Aufsuchen der lateralen Schwanzvene wurde diese mit einem Einmalskalpell punktiert. Die Blutropfen wurden in einem Reaktionsgefäß mit 50 µl Heparin aufgefangen. Nach Abnahme der gewünschten Blutmenge wurde das Reaktionsgefäß geschlossen und geschüttelt, sowie die Punktionsstelle bis zur erfolgten Blutstillung manuell komprimiert. Danach wurde die Maus der Vorrichtung entnommen und zurück in ihren Käfig gesetzt.

3.2.9 Sektion, Organentnahme und Aufbereitung von Milz, Knochenmark und Blut für die durchflusszytometrische Untersuchung

Die Versuchstiere wurden tierschutzgerecht durch zervikale Dislokation euthanasiert. Thorax, Abdomen und Bauchfell wurden mit einer anatomischen Schere eröffnet. Die Herzventrikel wurden mit einer spitzen Schere aufgeschnitten und das sich darin befindliche Blut wurde mit einer Pipette in ein Reaktionsgefäß mit 50 µl Heparin überführt, gemischt und auf Eis zwischengelagert. Die Milz wurde von ihren Bändern gelöst und durch ein Zellsieb mit einer Porengröße von 100 nm in ein konisches Röhrchen mit drei ml Präpariermedium gerieben. Der Femur wurde freipräpariert und die Knochenenden mit einer anatomischen Schere abgeschnitten. Mittels Einmal-Injektionskanüle wurde das Knochenmark aus dem Knochen mit Präpariermedium auf ein Zellsieb mit einer Porengröße von 100 nm gespült und dann in ein konisches Röhrchen mit drei ml Präpariermedium gerieben. Die Röhrchen, die die zerriebene Milz und das Knochenmark enthielten, wurden gewaschen und in fünf ml

3. Material und Methoden

Erythrozytenlyse resuspendiert. Nach drei Minuten wurde die Suspension mit Präpariermedium verdünnt und gewaschen. Die Pellets wurden in Präpariermedium resuspendiert. Dabei war das Volumen des Mediums so zu wählen, dass sich pro geplanter Färbung 10^6 Zellen in einem Volumen von 50 μl befanden. Die konischen Röhren wurden anschließend auf Eis zwischengelagert.

3.2.10 Färben von Oberflächenantigenen

Zunächst wurden die gewählten Antikörper in die zuvor beschrifteten Rundbodenröhren pipettiert. Anschließend wurden die zu analysierenden Zellsuspensionen hinzugefügt und mit einem Vortexmixer gemischt. Es wurden pro Mikrogramm gereinigtem Antikörper 10^6 Zellen in einem Volumen von 50 μl eingesetzt. Das Antikörper-Zellsuspension-Gemisch wurde anschließend für 15 Minuten bei acht Grad Celsius inkubiert. Dies fand im Dunkeln statt um eine photochemische Inaktivierung der Fluoreszenzfarbstoffe zu vermeiden. Nichtgebundene Antikörper wurden durch das Waschen mit einem ml FACS-Puffer entfernt. Danach wurde die Probe mit 300 μl vierprozentiger Paraformaldehydlösung fixiert. Bei Blutproben wurden vor dem Waschschrift die sich in der Suspension befindlichen Erythrozyten mit 300 μl *FACS Lysing Solution* lysiert. Sobald die Flüssigkeit sich zu entfärben begann, konnte mit dem Waschschrift fortgefahren werden. Bis zur Messung wurden die Proben kühl und dunkel gelagert.

3.2.11 Immunphänotypisierung

Das Durchflusszytometer diente zur Analyse und Differenzierung von Zellen in einer Zellsuspension. Die Zellen wurden aus den Rundbodenröhren aufgesaugt und hydrodynamisch fokussiert, indem der langsam fließende Transportstrom einem schnell fließenden Probenstrom zugemischt wurde. Dies gewährleistete, dass die Zellen einzeln an einem Laserstrahl mit einer Wellenlänge von 488 bzw. 633 nm vorbeigeleitet wurden. Das Laserlicht wurde in der Zelle gestreut und von einem Detektorsystem aus Bildverstärkerröhren aufgenommen. Das eingehende Signal

3. Material und Methoden

wurde in ein digitales Signal umgewandelt und mit Hilfe eines Computers verarbeitet (Abb. 3-2). Dabei diente das Vorwärtsstreulicht als Maß für die Größe und das Seitwärtsstreulicht als Maß für die Granularität einer Zelle. Zusätzlich konnten Oberflächenmoleküle durch Antikörper erkannt werden, welche an Fluorochrome gekoppelt waren. Die Fluorochrome wurden durch den Laserstrahl ebenfalls angeregt und emittierten Licht einer jeweiligen Wellenlänge, welches detektiert und digital umgewandelt wurde.

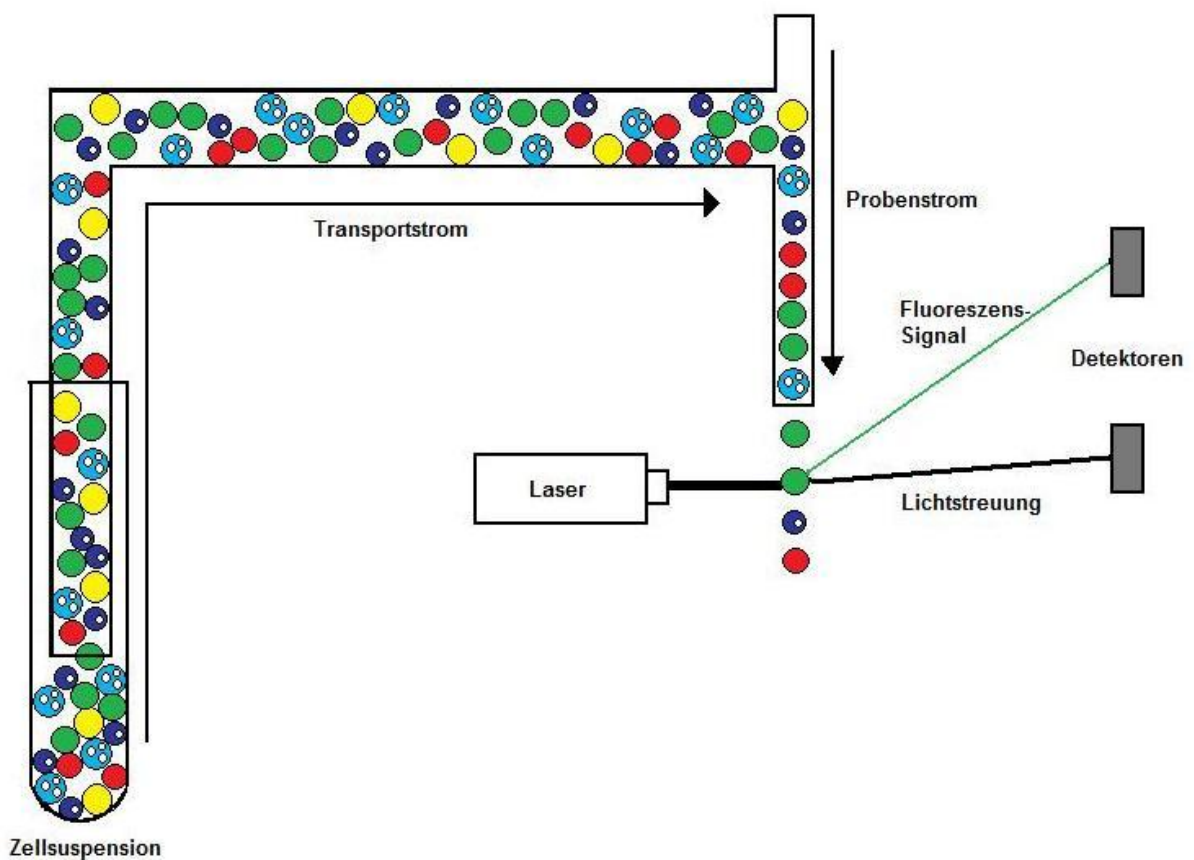


Abb. 3-2 Technisches Prinzip der Durchflusszytometrie. Die Zellen einer Zellsuspension werden aus dem Aufbewahrungsgefäß abgesaugt und über den Transportstrom in den Probenstrom geleitet. Dort werden die Zellen hydrodynamisch fokussiert und einzeln an einem Laser vorbeigeführt. Der Laserstrahl wird in der Zelle gebrochen und von Detektoren ermittelt. Aufgrund unterschiedlicher Größe, Granularität und Oberflächenmolekülen können die Zellen somit unterschieden werden.

3. Material und Methoden

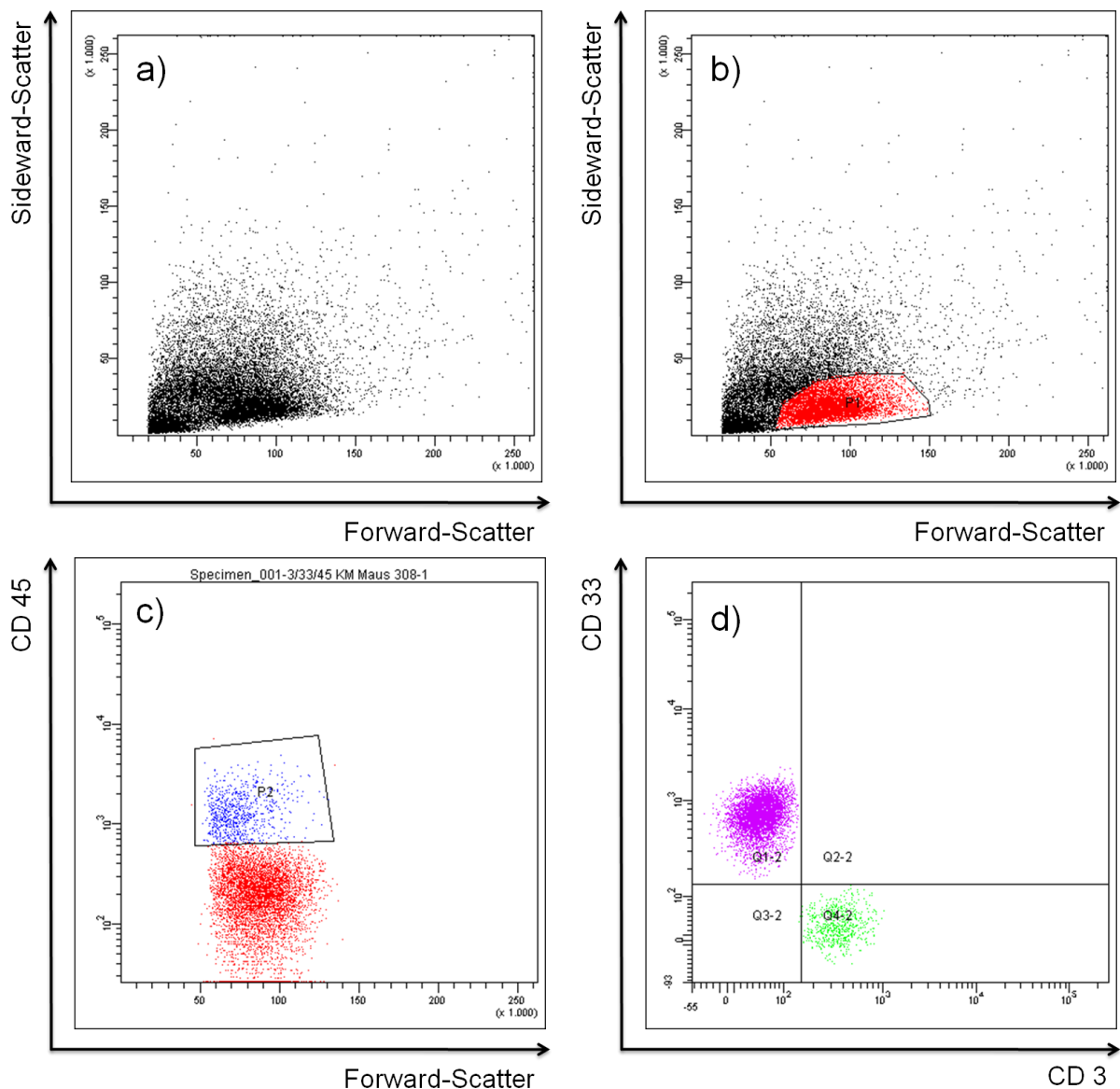


Abb. 3-3 Beispiel einer durchflusszytometrischen Analyse a) Punktwolkendiagramm einer Knochenmarkszellsuspension einer xenotransplantierten NSG-Maus. Die Granularität der Zellen im Vorwärtsstreulicht auf der Ordinate wurde gegen die Zellgröße im Seitwärtsstreulicht auf der Abszisse aufgetragen. b) Die gesuchten Zellen besitzen eine bestimmte Größe und Granularität. Anhand der bekannten Eigenschaften, konnte mit Hilfe eines Gates der Bereich, in dem die Zellen lagen, eingegrenzt werden. c) Die Zellen aus dem Gate wurden in einem neuen Punktwolkendiagramm angezeigt. Das Oberflächenantigen CD45 auf der Ordinate wurde gegen die Zellgröße auf der Abszisse aufgetragen. Die gesuchten Zellen besitzen das Oberflächenmolekül CD45. Ein weiteres Gate wurde so gelegt, dass sich alle CD45⁺-Zellen darin befanden. d) Die Zellen aus dem Gate wurden in einem neuen Punktwolkendiagramm angezeigt. Das Oberflächenantigen CD33 auf der Ordinate wurde gegen das Oberflächenantigen CD3 auf der Abszisse aufgetragen. Die violetten Zellen waren folglich Zellen, die sowohl CD45 als auch CD33 auf ihrer Oberfläche besaßen, während die grünen Zellen positiv für CD45 und CD3 waren.

3. Material und Methoden

Mit Hilfe der *FACSDiva* Software wurden die Daten ausgeworfen. Die Darstellung der ermittelten Daten erfolgte als Punktwolkendiagramm, in dem die Größe der Zellpopulationen (Vorwärtsstreulicht) gegen die Granularität (Seitwärtsstreulicht) bzw. gegen einen spezifischen Oberflächenmarker aufgetragen wurde. Im nächsten Schritt konnten Zellpopulationen in einem Feld ausgewählt („gegatet“) und in einem neuen Punktwolkendiagramm auf weitere Oberflächenmarker hin qualitativ und quantitativ untersucht werden (Abb. 3-3).

In den durchgeführten Versuchen wurden verschiedene Zellen voneinander unterschieden. Zur Messung humaner akuter myeloischer Leukämiezellen wurden CD33⁺CD45⁺-Zellen gegatet. Humane T-Lymphozyten wurden anhand ihrer Expression von CD3 und CD45 identifiziert. Diese konnten weiter unterteilt werden in CD4⁺-T-Helferzellen und CD8⁺-zytotoxische T-Zellen.

Die Vitalität von Zellen konnte mittels Durchflusszytometrie ebenfalls bestimmt werden. Hierfür wurden die Proben nach dem Färben der Oberflächenantigene mit fluorochrombeladenen Antikörpern regulär gewaschen, jedoch nicht mit PFA fixiert. Stattdessen wurden sie in 300 µl PBS aufgenommen. Jeder Probe wurden fünf µl 7-AAD zugefügt. Es drang in tote Zellen ein und interkalierte dort mit der DNS. In der durchflusszytometrischen Analyse besitzt 7-AAD einen eigenen Kanal. Wegen der fehlenden Fixierung der Zellen muss die Messung sofort nach dem Färbeschritt stattfinden.

3.2.12.1 Magnetische Zellsortierung

Aus Zellsuspensionen können Zellen mit gleichen Oberflächenmolekülen isoliert oder depletiert werden. Dabei werden kleine supermagnetische Partikel eingesetzt. Diese sind mit Antikörpern konjugiert, welche entweder direkt an die entsprechenden Oberflächenmoleküle oder indirekt an die Oberflächenmoleküle binden, indem sie Antikörper erkennen, welche direkt mit diesen verbunden sind. Nach der Inkubation der magnetischen Kügelchen mit der Zellsuspension wird das Gemisch über eine Säule gegeben, die eine Matrix aus Stahlwolle enthält und in der ein Magnetfeld erzeugt wird. Die markierten Zellen bleiben in der Säule hängen, während die nicht

3. Material und Methoden

markierten Zellen die Säule durchlaufen und als Negativfraktion aufgefangen werden können. Die markierten Zellen lassen sich nach Entfernen des Magnetfelds aus der Säule ausspülen (Abb. 3-4).

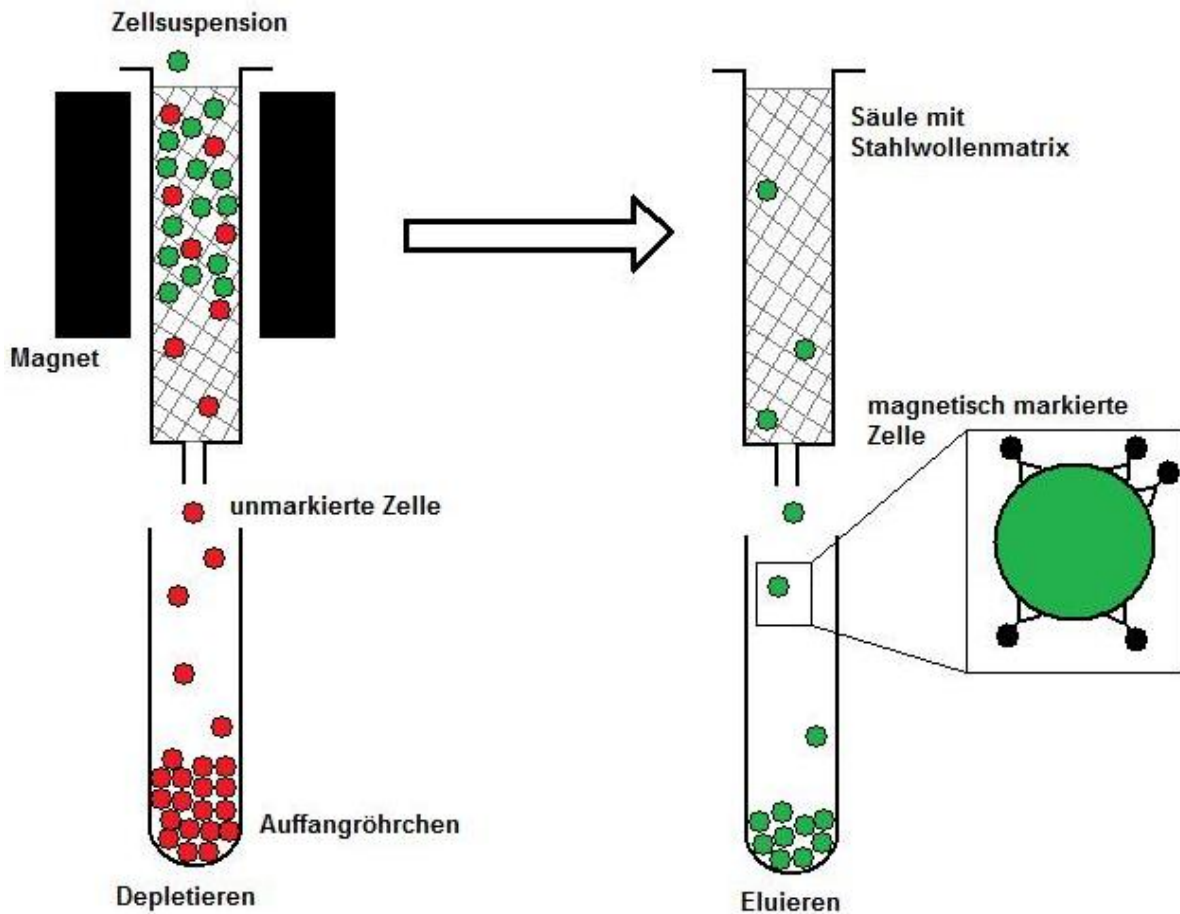


Abb. 3-4 Schemazeichnung der magnetischen Zellsortierung. Über eine Säule, die eine Stahlwollenmatrix enthält, wird ein Magnetfeld erzeugt. Die nicht markierten Zellen der Zellsuspension durchlaufen die Säule und werden aufgefangen. Die magnetisch markierten Zellen bleiben in der Matrix hängen. Nach dem Entfernen des Magnetfelds können auch die markierten Zellen die Säule durchlaufen und aufgefangen werden.

3.2.12.2 T-Zell Depletion mittels CD3 MicroBeads

Zu Beginn wurde eine Pufferlösung hergestellt, indem *MACS BSA Stock Solution* mit *autoMACS Rinsing Solution* im Verhältnis 1:20 gemischt wurde. Die zu depletierenden Zellen wurden gezählt und anschließend gewaschen. Pro 10^7 Zellen wurde das Pellet in 80 μ l Pufferlösung resuspendiert und 20 μ l *CD3 MicroBeads* hinzugefügt. Nach gründlichem Mischen wurde das Antikörper-Zellsuspensions-Gemisch für 15 Minuten bei acht Grad Celsius inkubiert. Je 10^7 Zellen wurden 2 ml Puffer hinzugefügt und danach gewaschen. Das Pellet wurde in 500 μ l Puffer pro 10^8 Zellen resuspendiert. Über einer LD-Säule wurde ein magnetisches Feld erzeugt. 2ml Puffer wurden in die Säule gegeben, anschließend folgte die Zellsuspension. Die nicht markierten Zellen elluierten durch die Säule und wurden gesammelt, im Anschluss wurde die Säule mit zwei Millilitern Puffer gewaschen.

3.2.13 Intraperitoneale Medikamentenapplikation

Zunächst wurde das zu injizierende Medikament mit PBS verdünnt, bis die gewünschte Stoffmenge erreicht worden ist. Das Injektionsvolumen entsprach 200 μ l und wurde blasenfrei in eine Einmal-Feindosierungsspritze aufgezogen. Um das Medikament zu verabreichen, musste die Maus ausreichend stark festgehalten werden. Die linke Hand fixierte dabei mit Daumen und Zeigefinger das Nackenfell, während Ringfinger und kleiner Finger den Schwanzansatz festhielten. Die Maus wurde mit dem Kopf nach unten gekippt. Dabei rutschten die Bauchorgane nach kranial, wodurch die Gefahr einer Verletzung der Darmorgane reduziert wurde. Mit der rechten Hand punktierte man im flachen Winkel mit einer Einmal-Injektionskanüle den rechten Unterbauch auf der Höhe des Leistenbands parallel zum Hinterbein und injizierte nach Aspiration den Inhalt der Spritze.

4. Ergebnisse

Im ersten Teil der hier vorgestellten Arbeit wurde das Engraftment verschiedener humaner akuter myeloischer Leukämien in NSG-Mäusen überprüft, dazu wurde die Engraftmentrate in den unterschiedlichen Kohorten miteinander verglichen. Um die zeitlichen und konzentrationsabhängigen Determinanten des AML-Wachstums bestimmen zu können, erfolgte im Anschluss gesondert eine Bestimmung der Wachstumskinetiken von zwei Leukämien, die sich in Hinsicht ihres Engraftmentverhaltens und T-Lymphozytenwachstums im Vorversuch unterschieden. Desweiteren wurden zwei Methoden zum Verhindern eines T-Zell-Wachstums in der xenotransplantierten NSG-Maus entwickelt und an einer Leukämie getestet.

4.1.1 Untersuchungen des Wachstums verschiedener humaner primärer akuter myeloischer Leukämien in der NSG-Maus

In dieser Versuchsreihe wurden primäre AMLs von 13 unterschiedlichen Spendern in NSG-Mäusen getestet um zu überprüfen, welche Leukämien davon das Potenzial besitzen sich im Knochenmark oder einem anderen Gewebe der Tiere anzusiedeln. Dazu wurden 203 Tiere eingesetzt, denen unterschiedlich hohe Zellmengen (zwischen 10^6 und 10^7 Zellen) der jeweiligen Leukämien transplantiert wurden.

Der Versuch wurde beendet, wenn entweder seit dem Zeitpunkt der Transplantation der Leukämie zwölf Wochen vergangen waren oder die Maus bei der Inspektion Zeichen für einen schlechten Gesundheitszustand anzeigte. Dazu zählte ein deutlicher Haar- und/oder Gewichtsverlust, die Ausbildung eines struppigen Fells sowie die dauerhafte Einnahme einer buckeligen Haltung der Tiere. Abb. 4-1 fasst den zeitlichen Ablauf des Versuchs zusammen.

Die Werte, die im Folgenden für die humanen Leukämie- bzw. T-Zellen angegeben werden, verstehen sich als Anteil der jeweiligen Zellen an der gesamten Zellsuspension der Organe. Der Grenzwert, der für ein erfolgreiches Anwachsen dieser Zellen festgelegt wurde, lag bei 0,1 %.

4. Ergebnisse

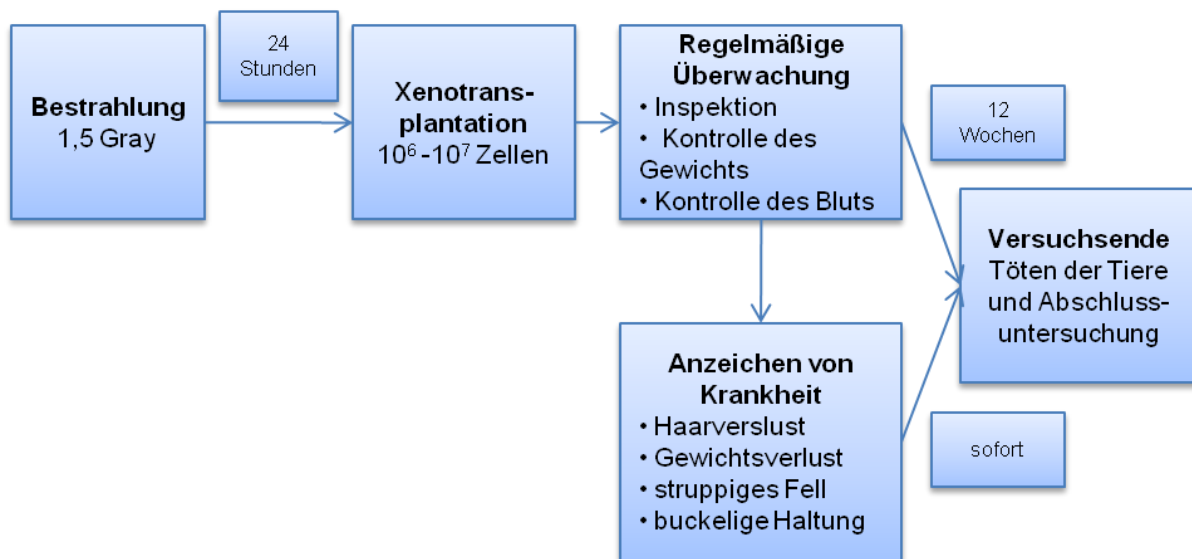


Abb. 4-1 Schematische Zusammenfassung des Versuchsablaufs. Die Versuchstiere wurden zunächst mit 1,5 Gray bestrahlt. Ein Tag danach wurden den Mäusen die primären Leukämien transplantiert. Die Tiere wurden im Versuchszeitraum regelmäßig kontrolliert. Sofern kein Anhalt für einen schlechten Gesundheitszustand bestand, wurden sie zwölf Wochen nach der Xenotransplantation getötet und untersucht. Bei Krankheit wurden die Tiere schon früher euthanasiert.

Von den 13 getesteten primären AMLs konnten acht mit differierender Erfolgsquote in den Mäusen zum Engraftment gebracht werden. Die höchste Anwachsrate erzielte die AML MZ308. Bei sämtlichen Tieren konnten bei Versuchsende humane leukämische Zellen nachgewiesen werden. MZ580 siedelte sich in 95,7 % der Fälle an. 89,5 % der Versuchstiere zeigten ein erfolgreiches Engraftment bei den Versuchen mit MZ667. Bei MZ683 fiel die Quote mit 42,9 % deutlich niedriger aus. Ähnliche Ergebnisse zeigten die Versuche mit MZ484: in 40,0 % der Fälle ließ sich die AML nachweisen. MZ987 erzielte in 30,0 % ein Leukämiewachstum. MZ625 engraftete bei 16,7 % und MZ561 bei 8,3 % der Tiere an. Die primären Leukämien MZ237, MZ251, MZ418, MZ653 und MZ804 konnten in keinem Gewebe der eingesetzten Versuchstiere nachgewiesen werden.

Bei sieben Versuchsreihen ließen sich humane T-Lymphozyten in einzelnen Versuchstieren nachweisen. Ähnlich dem Engraftment der leukämischen Zellen, zeigte sich auch bei den T-Zellen kein einheitliches Wachstum in den NSG-Mäusen. Alle Tiere der Versuchsreihe MZ237 zeigten T-Zellen in den untersuchten Organen.

4. Ergebnisse

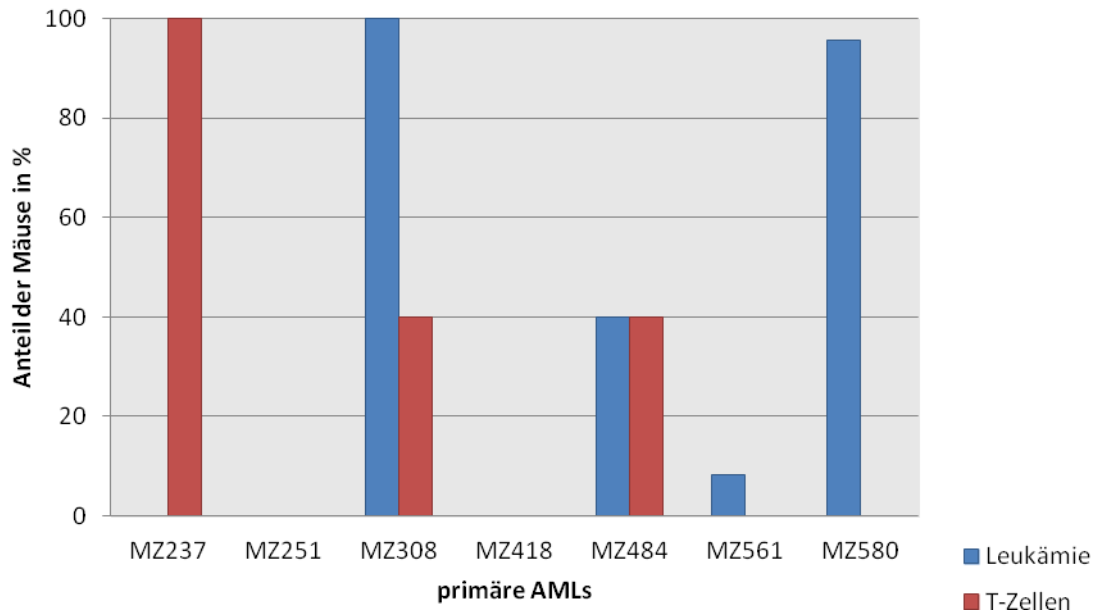
Bei MZ683 siedelten sich bei 57,1% der Mäuse T-Lymphozyten an. Bei MZ625 und MZ987 ließen sich in 50,0 % der Fälle CD3⁺CD45⁺-Zellen nachweisen. Für MZ308 und MZ484 lag die Quote bei 40,0 % und für MZ667 bei 3,5 %. MZ251, MZ418, MZ561, MZ653 und MZ804 zeigten keine humanen T-Lymphozyten in den Versuchstieren. Tab. 4-1 zeigt eine Übersicht der Ergebnisse. Abb. 4-2 stellt die Ergebnisse grafisch dar.

| AML | Anzahl der Tiere | AML positiv (in %) | T-Zellen positiv (in %) |
|-------|------------------|--------------------|-------------------------|
| MZ237 | 5 | 0 | 100,0 |
| MZ251 | 5 | 0 | 0 |
| MZ308 | 10 | 100,0 | 40,0 |
| MZ418 | 36 | 0 | 0 |
| MZ484 | 5 | 40,0 | 40,0 |
| MZ561 | 24 | 8,3 | 0 |
| MZ580 | 23 | 95,7 | 0 |
| MZ625 | 6 | 16,7 | 50,0 |
| MZ653 | 6 | 0 | 0 |
| MZ667 | 57 | 89,5 | 3,5 |
| MZ683 | 7 | 42,9 | 57,1 |
| MZ804 | 9 | 0 | 0 |
| MZ987 | 10 | 30,0 | 50,0 |

Tab. 4-1 Übersicht der getesteten primären Leukämien mit Angabe der Anzahl der eingesetzten Versuchstiere, sowie des Anteils der Tiere, in denen ein Ansiedeln humaner leukämischer Zellen bzw. Auswachsen humaner T-Lymphozyten nachgewiesen wurde.

4. Ergebnisse

a)



b)

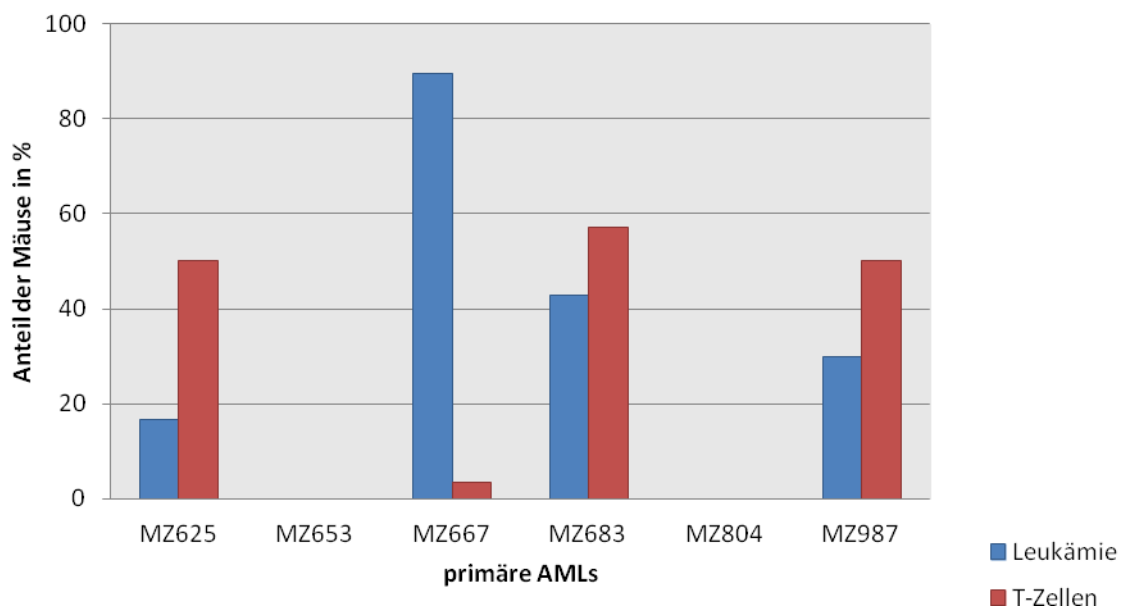


Abb. 4-2 a+b Grafische Darstellung der Ergebnisse. Die blauen Säulen entsprechen dem Anteil der Mäuse einer Versuchsreihe, in denen humane leukämische Zellen detektiert wurden, während die roten Säulen dem Anteil der Mäuse entspricht, in denen humanen T-Zellen ausgewachsen sind.

4. Ergebnisse

4.1.2 Bedeutung des FLT3-Status als prognostischer Faktor für das Engraftment humaner akuter myeloischer Leukämien in transplantierten NSG-Mäusen

Das Vorhandensein einer internen Tandemduplikations-Mutation (ITD) des FLT3-Gens beim menschlichen Leukämiepatienten ist mit einer höheren Aggressivität und einem ungünstigen Krankheitsverlauf assoziiert. Ein Zusammenhang zwischen vorhandener Mutation der Leukämie und verbessertem Anwachsverhalten in der NSG-Maus wurde untersucht. Es zeigten sich folgende Ergebnisse:

Fünf getestete Leukämien trugen keine FLT3-ITD-Mutation (MZ251, MZ418, MZ625, MZ653 und MZ804). Davon konnte eine erfolgreich in der Maus nachgewiesen werden (MZ625), während die restlichen vier nicht angewachsen sind (MZ251, MZ418, MZ653 und MZ804).

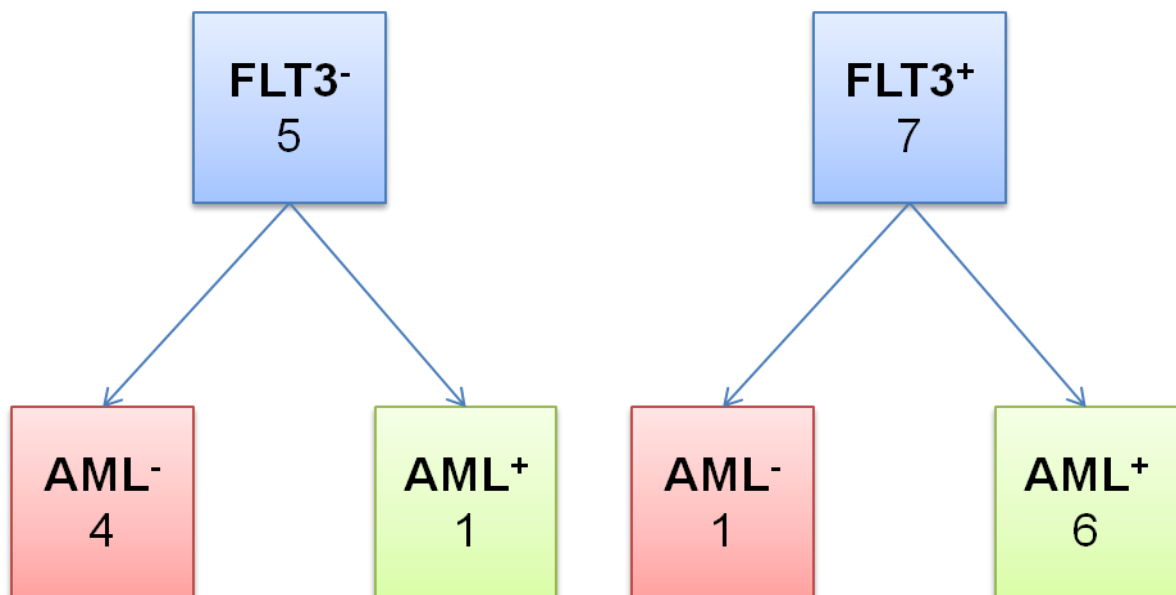


Abb. 4-3 Grafische Darstellung des Zusammenhangs zwischen FLT3-Status und dem Anwachsen der Leukämie in der Maus. Die Zahlen in den Kästchen entsprechen der Anzahl der getesteten Leukämien. Abkürzungen: FLT3⁻ = Abwesenheit der FLT3-ITD-Mutation, FLT3⁺ = Vorhandensein der FLT3-ITD-Mutation, AML⁻ = nicht erfolgreiches Anwachsen der Leukämie, AML⁺ = erfolgreiches Anwachsen der Leukämie

4. Ergebnisse

Sieben der eingesetzten Leukämien trugen eine FLT3-ITD-Mutation (MZ237, MZ308, MZ484, MZ580, MZ667, MZ683 und MZ987). Sechs dieser Leukämien engrafteten in der Maus (MZ308, MZ484, MZ580, MZ667, MZ683 und MZ987), eine konnte nicht nachgewiesen werden (MZ237). Der FLT3-Status von MZ561 wurde nicht bestimmt. Abb. 4-3 fasst die Ergebnisse schematisch zusammen.

Die Ergebnisse stützen die Vermutung, dass das Vorhandensein einer FLT3-ITD-Mutation ein Prädiktor für das erfolgreiche Engraftment einer Leukämie in der NSG-Maus darstellen könnte. Diese Behauptung wurde statistisch mittels Erstellung einer Vierfeldertafel näher untersucht (Abb. 4-4).

| | FLT3 ⁺ | FLT3 ⁻ | |
|--------------------------------------|-------------------|-------------------|--------------|
| erfolgreiches Anwachsen der Leukämie | FN 1 | RP 6 | $\Sigma = 7$ |
| kein Anwachsen der Leukämie | RN 4 | FP 1 | $\Sigma = 5$ |
| | $\Sigma = 5$ | $\Sigma = 7$ | |

Abb. 4-4 Vierfeldertafel zur Überprüfung der Vorhersagekraft einer FLT3-Mutation bezüglich erfolgreichem Anwachsen der Leukämie in der NSG-Maus. Abkürzungen: FLT3⁺ = Vorhandensein einer FLT3-ITD-Mutation, FLT3⁻ = Abwesenheit einer FLT3-ITD-Mutation, FN = Falsch Negative, RP = Richtig Positive, RN = Richtig Negative, FP = Falsch Positive, Σ = Summe

4. Ergebnisse

Aus den Werten der Vierfeldertafel (Abb. 4-4) wurden Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer prädiktiver Wert, sowie Effizienz des Testverfahrens berechnet:

$$\text{Sensitivität: } \frac{\text{Richtig Positive}}{\text{Richtig Positive} + \text{Falsch Negative}} \times 100 = 85,7 \%$$

$$\text{Spezifität: } \frac{\text{Richtig Negative}}{\text{Richtig Negative} + \text{Falsch Positive}} \times 100 = 80,0 \%$$

$$\text{Positiver prädiktiver Wert: } \frac{\text{Richtig Positive}}{\text{Richtig Positive} + \text{Falsch Positive}} \times 100 = 85,7 \%$$

$$\text{Negativer prädiktiver Wert: } \frac{\text{Richtig Negative}}{\text{Richtig Negative} + \text{Falsch Negative}} \times 100 = 80,0 \%$$

$$\text{Effizienz: } \frac{\text{Richtig Positive} + \text{Richtig Negative}}{\text{Richtig Positive} + \text{Falsch Positive} + \text{Richtig Negative} + \text{Falsch Negative}} \times 100 = 83,3 \%$$

4.2 Erstellung von zwei Wachstumskinetiken für die humanen primären akuten myeloischen Leukämien MZ667 und MZ308 nach Transplantation in NSG-Mäuse

Der vorherige Versuch konnte zeigen, welche primären humanen AMLs das Potenzial besitzen, erfolgreich nach Transplantation in der NSG-Maus zum Engraftment gebracht werden zu können. Für die folgende Versuchsreihe wurden von den getesteten Leukämien zwei Proben herausgesucht, die sich in ihrem Wachstumsverhalten unterschieden und welche näher untersucht werden sollten. Es wurde überprüft, welche Auswirkung die Injektionsdosis und die Versuchszeit auf das Engraftment der AML in der NSG-Maus besitzen. Dazu wurde zunächst MZ667, die nahezu T-Zell-frei und stabil heranwächst, analysiert. Im Anschluss wurde MZ308 untersucht, eine Leukämie, die, transplantiert, häufig mit T-Zellwachstum und gelegentlich mit Morbidität und Mortalität der NSG-Mäuse einhergeht.

Für diese Versuchsreihe wurden pro untersuchte Leukämie je 45 NSG-Mäuse eingesetzt. Je neun Tieren wurden 10^5 , 5×10^5 , 10^6 , 5×10^6 sowie 10^7 Zellen pro Maus der Leukämie MZ667 bzw. MZ308 injiziert. Aus jeder Gruppe mit der gleichen Zellkonzentration wurden je drei Mäuse nach vier, acht und zwölf Wochen untersucht. Der Versuchsablauf ist in Abb. 4-5 veranschaulicht.

4. Ergebnisse

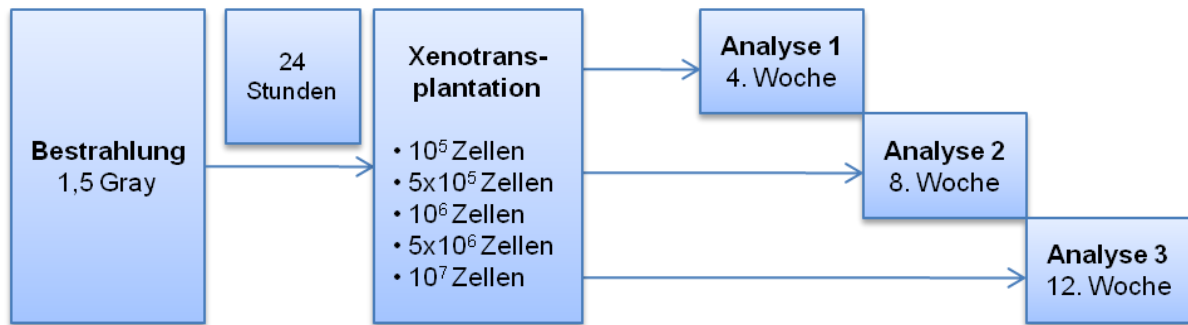


Abb. 4-5 Schematische Zusammenfassung des Versuchsablaufs. Zunächst wurden die Versuchstiere mit 1,5 Gray bestrahlt. Vierundzwanzig Stunden danach fand die Xenotransplantation in fünf verschiedenen Dosierungen statt. Die abschließenden Untersuchungen fanden nach vier, acht und zwölf Wochen statt.

4.2.1 Erstellung einer Wachstumskinetik für MZ667

Die AML MZ667 zeigte in den ersten Versuchen ein homogenes Wachstumsbild in der NSG-Maus. Während der Erstellung der Kinetik sind zwei Versuchstiere vor Ablauf des Experiments verstorben und konnten somit für den weiteren Versuchsablauf nicht mehr berücksichtigt werden.

Vier Wochen nach der Xenotransplantation ließen sich in keiner Maus humane leukämische Zellen im Blut oder der Milz nachweisen. Im Gegensatz dazu war ein erfolgreicher Nachweis menschlicher Leukämie im Knochenmark sämtlicher Mäuse möglich: Der Anteil $CD33^+CD45^+$ -Zellen am gesamten Knochenmark variierte zwischen 0,1 % und 48,6 %. Im Mittel waren die Anteile umso größer, je mehr Zellen zu Beginn transferiert wurden. In keiner Maus waren menschliche T-Lymphozyten nachweisbar.

Nach acht Wochen konnten bei zwölf Tieren sowohl im Blut als auch in der Milz leukämische Zellen gefunden werden. Die Maximalwerte waren 2,1 % im Blut und 5,7 % in der Milz. Im Vergleich dazu waren die Leukämieanteile im murinen Knochenmark deutlich höher und es wurden Werte von bis zu 73,3 % erreicht. Vergleichbar mit den Ergebnissen der Analyse nach der vierten Woche stiegen die

4. Ergebnisse

Anteile humaner Leukämie in der Maus mit der Erhöhung der Injektionsdosis. T-Zellen waren in keinem Organ nachweisbar.

Zwölf Wochen nach der Xenotransplantation waren in allen untersuchten Organen humane leukämische Blasten nachweisbar. Die größten Werte, die gemessen wurden, betragen 3,1 % im Blut, 14,0 % in der Milz und 95,3 % im Knochenmark. Tendenziell waren die Werte bei steigender Injektionsdosis größer, obwohl etliche „Ausreißer“ zu beobachten waren. T-Lymphozyten ließen sich in keinem untersuchten Gewebe nachweisen. Abb. 4-6, Abb. 4-7 und Abb. 4-8 stellen die Ergebnisse grafisch dar.

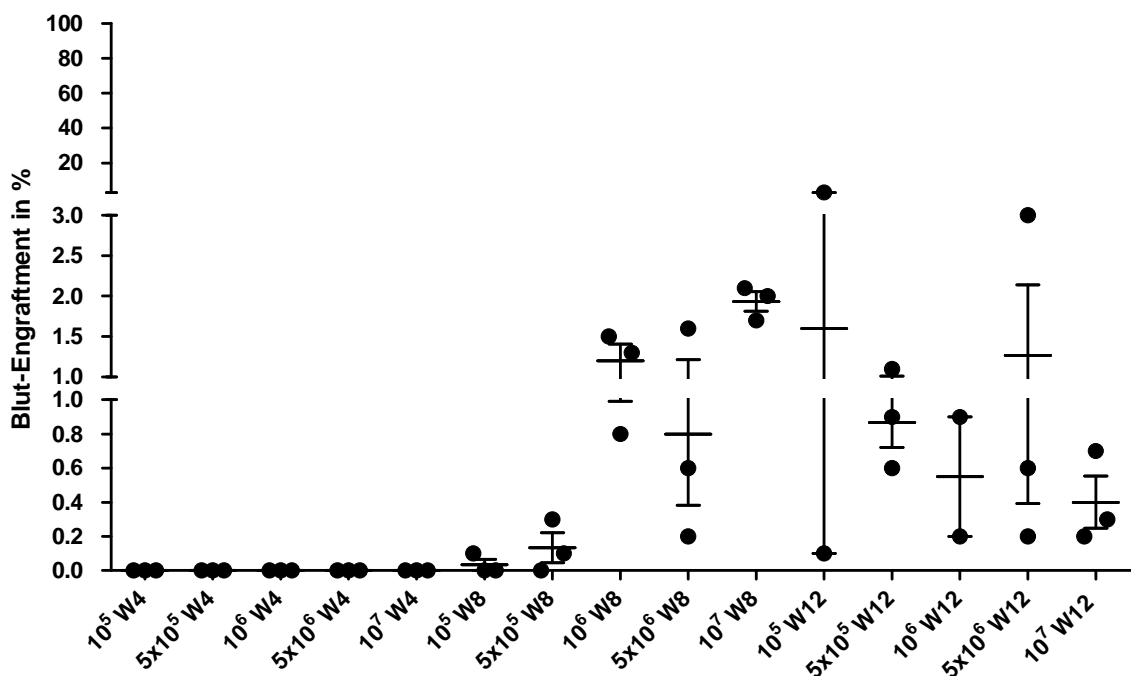


Abb. 4-6 Punktdiagramm des Leukämie-Engraftments der AML MZ667 im Blut. Gezeigt werden die Anteile CD33⁺CD45⁺-Zellen im murinen Blut bei Injektionsdosen zwischen 10⁵ und 10⁷ Zellen nach 4 (W4), 8 (W8) und 12 Wochen (W12) mit Angabe des Mittelwerts (großer horizontaler Strich) und der Standardabweichung (kleine horizontale Striche).

4. Ergebnisse

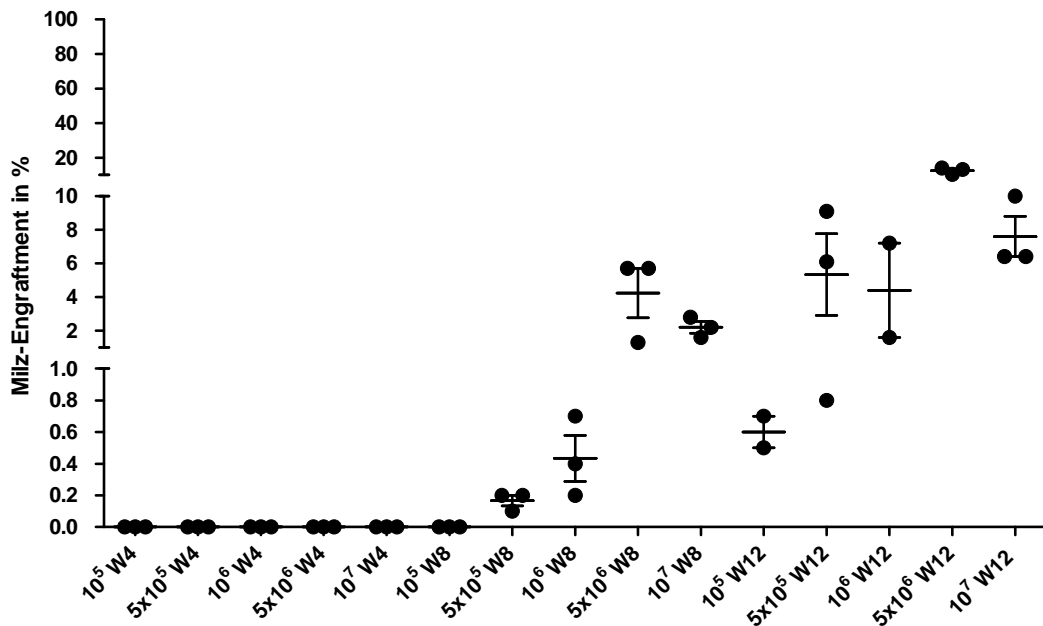


Abb. 4-7 Punktdiagramm des Leukämie-Engraftments der AML MZ667 in der Milz. Gezeigt werden die Anteile CD33⁺CD45⁺-Zellen in der murinen Milz bei Injektionsdosen zwischen 10^5 und 10^7 Zellen nach 4 (W4), 8 (W8) und 12 Wochen (W12) mit Angabe des Mittelwerts (großer horizontaler Strich) und der Standardabweichung (kleine horizontale Striche).

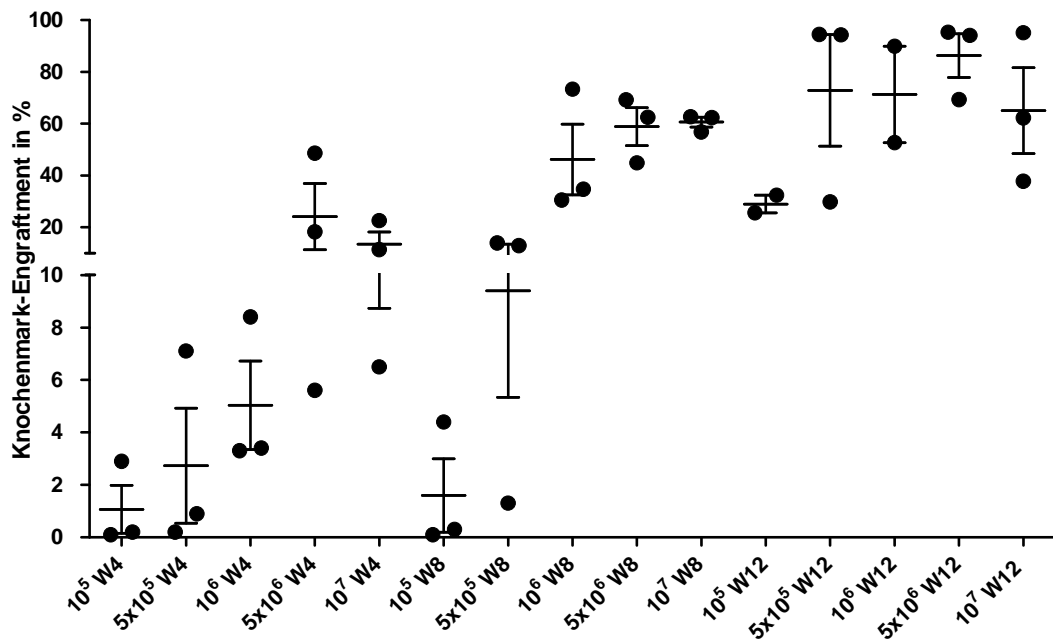


Abb. 4-8 Punktdiagramm des Leukämie-Engraftments der AML MZ667 im Knochenmark. Gezeigt werden die Anteile CD33⁺CD45⁺-Zellen im murinen Knochenmark bei Injektionsdosen zwischen 10^5 und 10^7 Zellen nach 4 (W4), 8 (W8) und 12 Wochen (W12) mit Angabe des Mittelwerts (großer horizontaler Strich) und der Standardabweichung (kleine horizontale Striche).

4.2.2 Erstellung einer Wachstumskinetik für MZ308

Im Vergleich zum Engraftment der homogen wachsenden MZ667 stellte MZ308 in den ersten Versuchen ein schwieriger zu interpretierendes Gesamtbild dar. Während der Erstellung der Kinetik sind sechs Mäuse gestorben, bevor eine Untersuchung stattfinden konnte.

Vier Wochen nach der Leukämietransplantation waren weder im Blut noch in der Milz leukämische Zellen auffindbar. Dahingegen zeigten vierzehn Tiere im Knochenmark Werte zwischen 0,1 und 5,0 %. Je höher die Injektionsdosen gewählt wurden, umso größer war auch der Anteil leukämischer Zellen im Gewebe. Alle Organe waren frei von humanen T-Helfer- und zytotoxischen T-Zellen.

Nach acht Wochen post transplantationem zeigte lediglich eine Maus in ihrem Blut Spuren humaner Leukämiezellen. Ein Nachweis von Leukämiewachstum in der Milz war für fünf Mäuse positiv. Dabei handelte es sich um Versuchstiere, die hohe Injektionsdosen (5×10^6 und 10^7) erhalten hatten. Bei 0,2 % bis maximal 17,0 % der Zellen der untersuchten Milzen dieser fünf Mäuse handelte es sich um humane leukämische Blasten. Im Knochenmark wurden bei 14 Tieren Leukämiezellen detektiert. Die Werte bewegten sich zwischen 0,1 % und 90,3 %. Humane T-Lymphozyten waren in vier NSG-Mäusen nachweisbar. Es handelte sich dabei um Tiere, denen entweder 5×10^6 oder 10^7 Leukämieblasten transplantiert wurden. Bei den zwei Mäusen mit der Injektionsdosis von 5×10^6 Zellen waren CD4⁺- und CD8⁺-Zellen lediglich in geringer Zahl, d.h. zwischen 0,1 % und 0,6 % und ausschließlich im Knochenmark nachweisbar. Bei den zwei Tieren mit der Dosis von 10^7 Zellen wurden humane T-Zellen in allen untersuchten Geweben gefunden. Zwischen 0,3 % und 16,6 % T-Helferzellen und zwischen 1,1 % und 9,8 % zytotoxische T-Zellen wurden gemessen. Im Vergleich zu den T-Zell-freien Tieren der gleichen Transplantationsgruppe wurden in den T-Zell-befallenen Tieren deutlich höhere Werte für humane leukämische Leukämiezellen gemessen.

Zum Zeitpunkt der dritten Untersuchung zwölf Wochen nach erfolgter Transplantation waren sechs Versuchstiere gestorben. Dabei handelte es sich um alle Mäuse, die Leukämieblasten in Höhe von 5×10^6 und 10^7 erhalten hatten. Im Blut und im

4. Ergebnisse

Milzparenchym war bei den Tieren, die 10^5 Zellen injiziert bekamen, keine Leukämie nachweisbar. In den übrigen Mäusen bewegte sich der Anteil leukämischer Zellen zwischen 0,6% und 4,8 % im Blut, sowie zwischen 1,6 % und 15,6 % in der Milz. Jedes untersuchte Knochenmark enthielt $CD33^+CD45^+$ -Zellen. Werte von 2,4 % bis maximal 50,5 % wurden gemessen. In den überlebenden Mäusen konnte kein Anhalt für die Präsenz humaner zytotoxischer T- bzw. T-Helferzellen gefunden werden. Eine veranschaulichende Darstellung des Leukämie- bzw. T-Zellwachstums bei variierenden Injektionsdosen der Leukämie zeigen Abb. 4-9 bis 4-14.

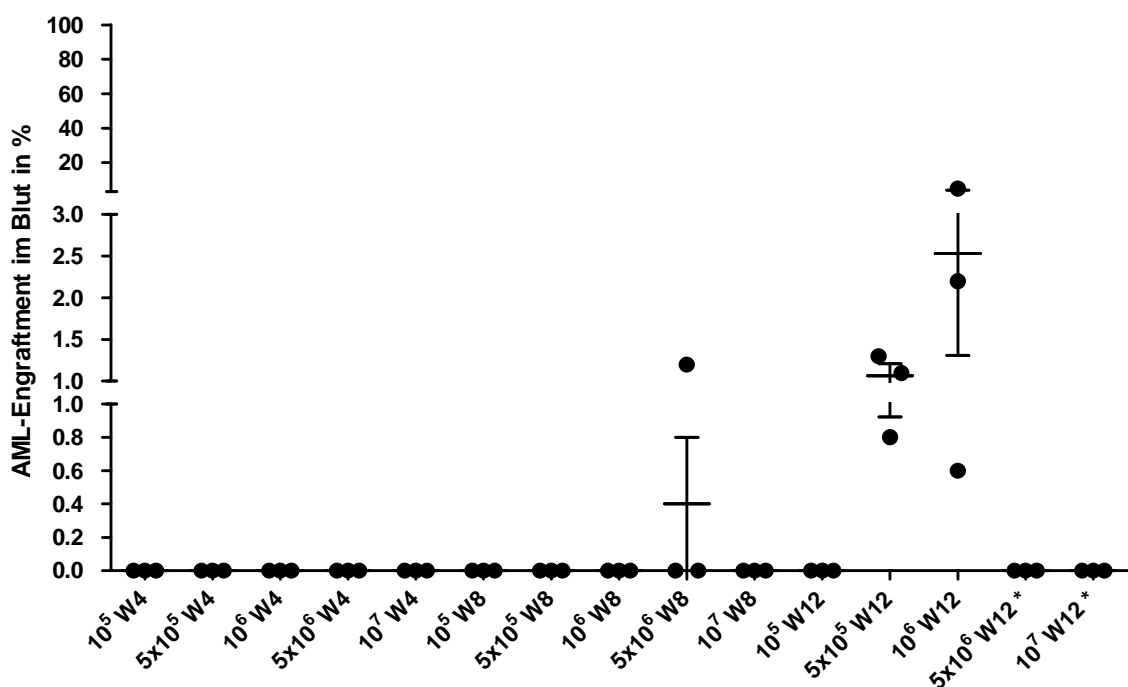


Abb. 4-9 Punktdiagramm des Leukämie-Engraftments der AML MZ308 im Blut. Gezeigt werden die Anteile $CD33^+CD45^+$ -Zellen im murinen Blut bei Injektionsdosen zwischen 10^5 und 10^7 Zellen nach 4 (W4), 8 (W8) und 12 Wochen (W12) mit Angabe des Mittelwerts (großer horizontaler Strich) und der Standardabweichung (kleine horizontale Striche). *=vor Auswertung gestorben

4. Ergebnisse

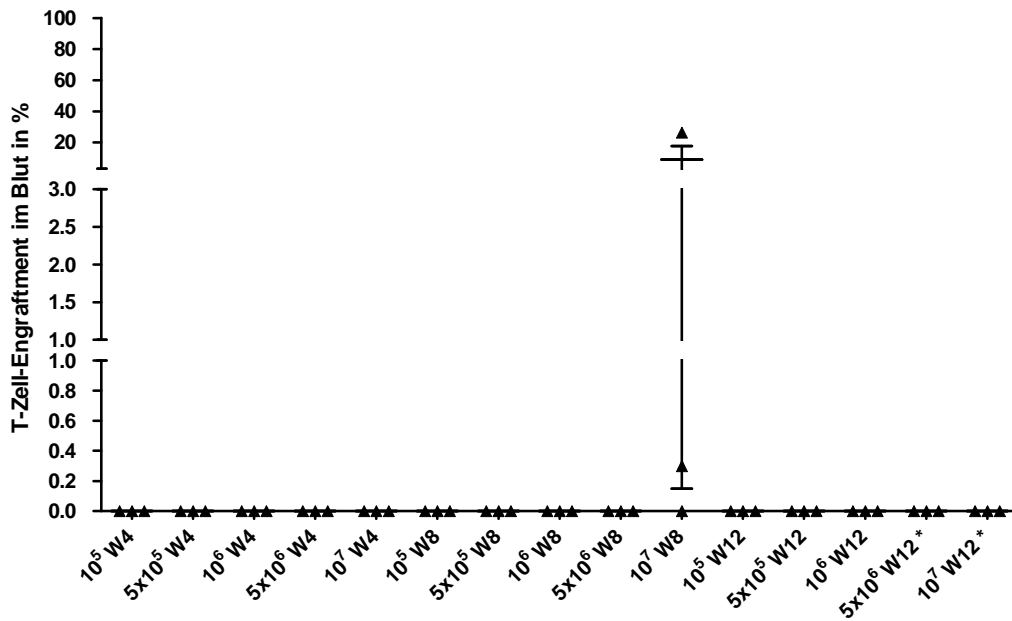


Abb. 4-10 Punktdiagramm des T-Zell-Engraffments der AML MZ308 im Blut. Gezeigt werden die Anteile CD3⁺CD45⁺-Zellen im murinen Blut bei Injektionsdosen zwischen 10⁵ und 10⁷ Zellen nach 4 (W4), 8 (W8) und 12 Wochen (W12) mit Angabe des Mittelwerts (großer horizontaler Strich) und der Standardabweichung (kleine horizontale Striche). *=vor Auswertung gestorben

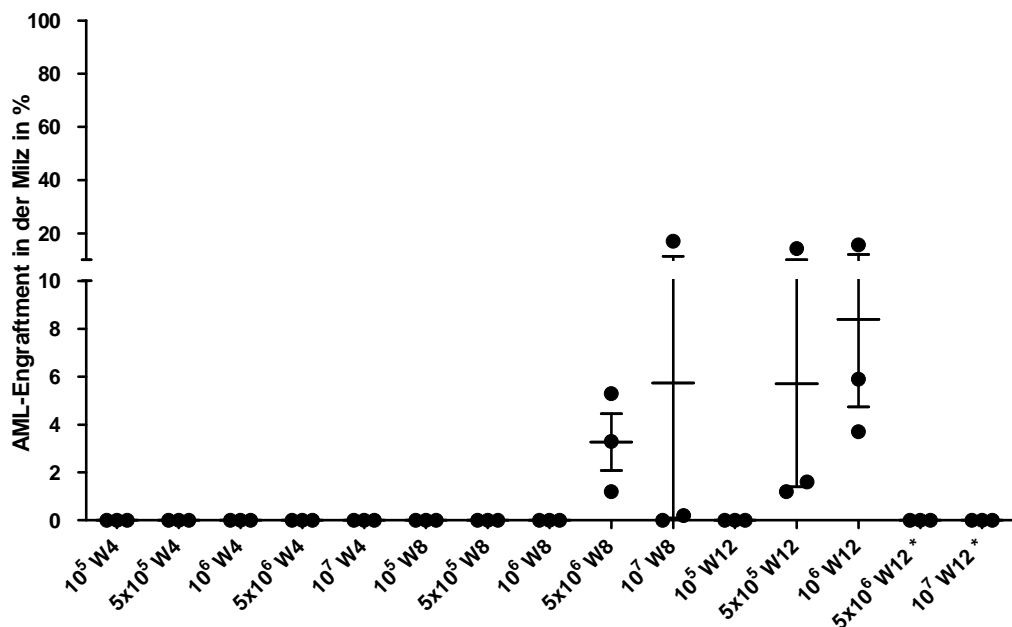


Abb. 4-11 Punktdiagramm des Leukämie-Engraffments der AML MZ308 in der Milz. Gezeigt werden die Anteile CD33⁺CD45⁺-Zellen in der murinen Milz bei Injektionsdosen zwischen 10⁵ und 10⁷ Zellen nach 4 (W4), 8 (W8) und 12 Wochen (W12) mit Angabe des Mittelwerts (großer horizontaler Strich) und der Standardabweichung (kleine horizontale Striche). *=vor Auswertung gestorben

4. Ergebnisse

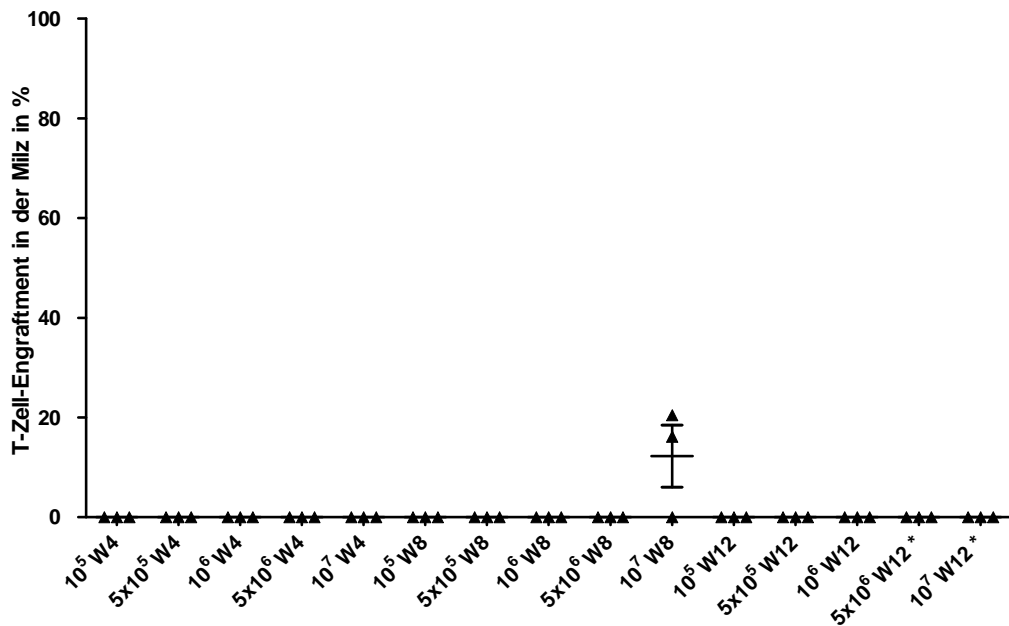


Abb. 4-12 Punktdiagramm des T-Zell-Engraфтments der AML MZ308 in der Milz. Gezeigt werden die Anteile CD3⁺CD45⁺-Zellen in der murinen Milz bei Injektionsdosen zwischen 10⁵ und 10⁷ Zellen nach 4 (W4), 8 (W8) und 12 Wochen (W12) mit Angabe des Mittelwerts (großer horizontaler Strich) und der Standardabweichung (kleine horizontale Striche). *=vor Auswertung gestorben

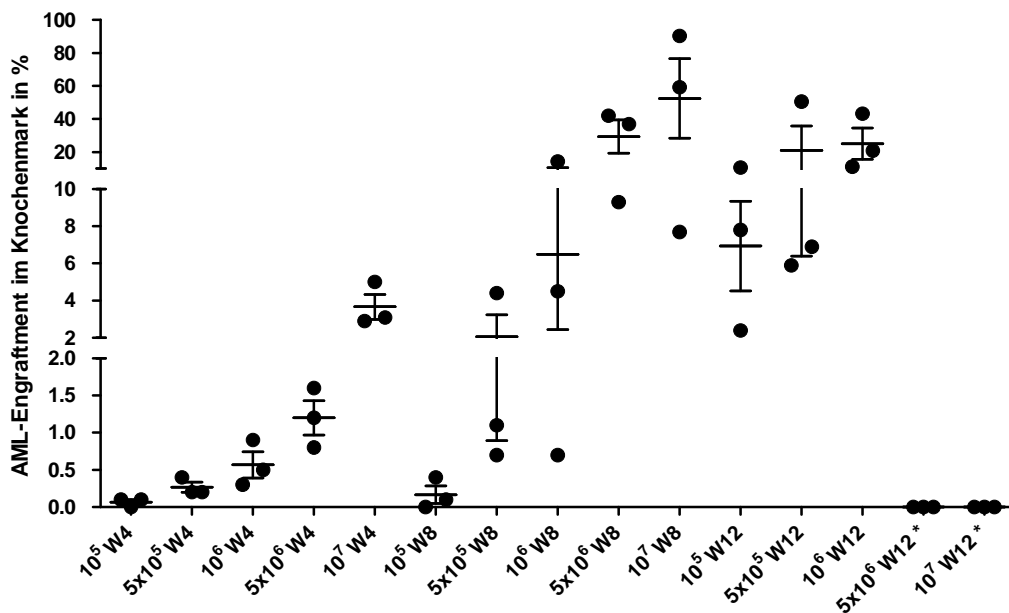


Abb. 4-13 Punktdiagramm des Leukämie-Engraфтments der AML MZ308 im Knochenmark. Gezeigt werden die Anteile CD3⁺CD45⁺-Zellen im murinen Knochenmark bei Injektionsdosen zwischen 10⁵ und 10⁷ Zellen nach 4 (W4), 8 (W8) und 12 Wochen (W12) mit Angabe des Mittelwerts (großer horizontaler Strich) und der Standardabweichung (kleine horizontale Striche). *=vor Auswertung gestorben

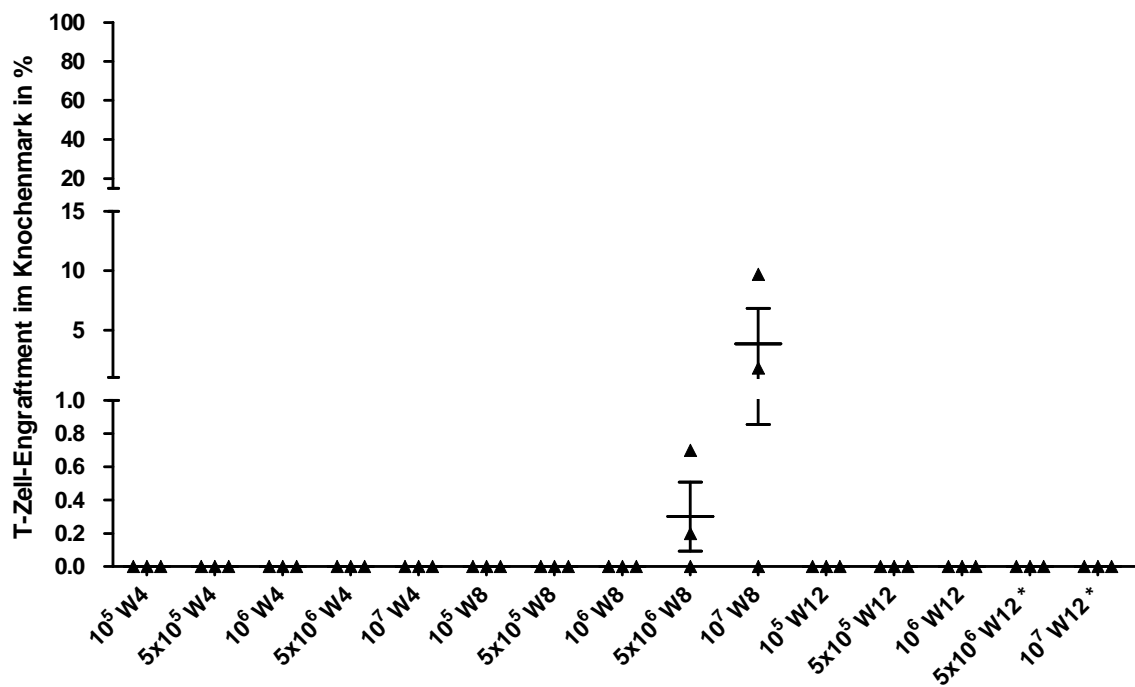


Abb. 4-14 Punktdiagramm des T-Zell-Engraftments der AML MZ308 im Knochenmark. Gezeigt werden die Anteile CD3⁺CD45⁺-Zellen im murinen Knochenmark bei Injektionsdosen zwischen 10⁵ und 10⁷ Zellen nach 4 (W4), 8 (W8) und 12 Wochen (W12) mit Angabe des Mittelwerts (großer horizontaler Strich) und der Standardabweichung (kleine horizontale Striche). * = vor Auswertung gestorben

4.3 Untersuchungen zur Optimierung des Engraftments humaner primärer akuter Leukämien durch selektive Inhibition humaner T-Lymphozyten in der xenotransplantierten NSG-Maus

Aus den Kinetiken der AML MZ308 (vgl. 4.2.2) wurde das Engraftment bei Hochdosis-Transplantationen von einem Auswachsen humaner T-Zellen in den NSG-Mäusen begleitet, was mit einer erhöhten Sterblichkeit der Tiere einherging. In diesem Teil der hier vorgestellten Arbeit wurden zwei Methoden am Beispiel der MZ308 getestet, welche ein solches T-Lymphozytenwachstum in den xenotransplantierten Mäusen unterbinden sollten. Das erste Verfahren bestand darin, eine Aktivierung bzw. Teilung der transplantierten T-Zellen zu verhindern. Zur Auswahl standen Cyclosporin A, Tacrolimus und Mycophenolat-Mofetil. Die zweite

4. Ergebnisse

Methode sollte die Transplantate vor der Injektion in die NSG-Mäuse mittels CD3-Depletion von den T-Lymphozyten reinigen.

4.3.1 Ermittlung der dosisabhängigen Toxizität verschiedener humaner T-Lymphozyteninhibitoren in der NSG-Maus

Zur Medikamentengabe der drei T-Lymphozytenhemmer Cyclosporin A, Mycophenolat-Mofetil und Tacrolimus bei NSG-Mäusen lagen bei Versuchsbeginn keine Daten vor. Bevor weitere Versuche geplant werden konnten, musste die Toxizität der Wirkstoffe untersucht werden. Es sollte jenes Medikament ermittelt werden, welches auch nach wiederholter Gabe die geringste Letalität aufweist. Dabei orientierten sich die getesteten Wirkstoffmengen an den LD₅₀-Werten der Medikamente bei Hausmäusen (*Mus musculus*), d.h. den Konzentrationen, bei denen 50 % der Versuchstiere nach Einmalgabe des Medikaments sterben (118).

Für Cyclosporin A lautete der LD₅₀-Wert 148 mg/kg. Für eine 20 Gramm schwere Maus errechnete sich eine Stoffmenge von 2,96 mg. Tacrolimus hatte eine LD₅₀ von 57 mg/kg bzw. 1,14 mg pro Maus. Die LD₅₀ von Mycophenolat-Mofetil lag bei 450 mg/kg, d.h. 9 mg pro Maus. Um die gesuchte Dosierung zu ermitteln, wurde eine Dosiskinetik mit folgenden Konzentrationen durchgeführt: Cyclosporin A: 2 mg, 1 mg, 500 µg; Tacrolimus: 1 mg, 500 µg, 250 µg, sowie Mycophenolat-Mofetil: 8 mg, 4 mg und 2 mg. Eine Übersicht zeigt Tabelle 4-2.

In Kohorten, bestehend aus jeweils zwei Mäusen, wurden die verschiedenen Stoffmengen intraperitoneal drei Mal im Abstand von zwei Tagen verabreicht. Zur Injektion wurden Cyclosporin A, Tacrolimus und Mycophenolat-Mofetil in den jeweiligen Dosen in 200 µl PBS gelöst. Die Kontrollgruppe, bestehend aus sechs Mäusen, erhielt an den Injektionstagen 200 µl reines PBS intraperitoneal appliziert. Täglich wurde das Überleben der Versuchstiere dokumentiert. Nach der letzten Injektion galt der Versuch als beendet. Der Ablauf ist in Abb. 4-15 dargestellt.

4. Ergebnisse

| Medikament | LD ₅₀ -Wert | LD ₅₀ -Wert (20g-Maus) | getestete Stoffmengen | Anzahl der Versuchstiere |
|------------|------------------------|--------------------------------------|-----------------------|-----------------------------|
| CyA | 148 mg/kg | 2,96 mg | 2 mg | 2 |
| | | | 1 mg | 2 |
| | | | 500 µg | 2 |
| Tacrolimus | 57 mg/kg | 1,14 mg | 1 mg | 2 |
| | | | 500 µg | 2 |
| | | | 250 µg | 2 |
| MMF | 450 mg/kg | 9mg | 8 mg | 2 |
| | | | 4 mg | 2 |
| | | | 2 mg | 2 |

Tab. 4-2 Übersicht über die LD₅₀-Werte aus der Literatur, den angepassten LD₅₀-Werten sowie den ermittelten zu testenden Stoffmengen mit der dazugehörigen Anzahl an Versuchstieren. Abkürzungen: CyA = Cyclosporin A, MMF = Mycophenolat-Mofetil

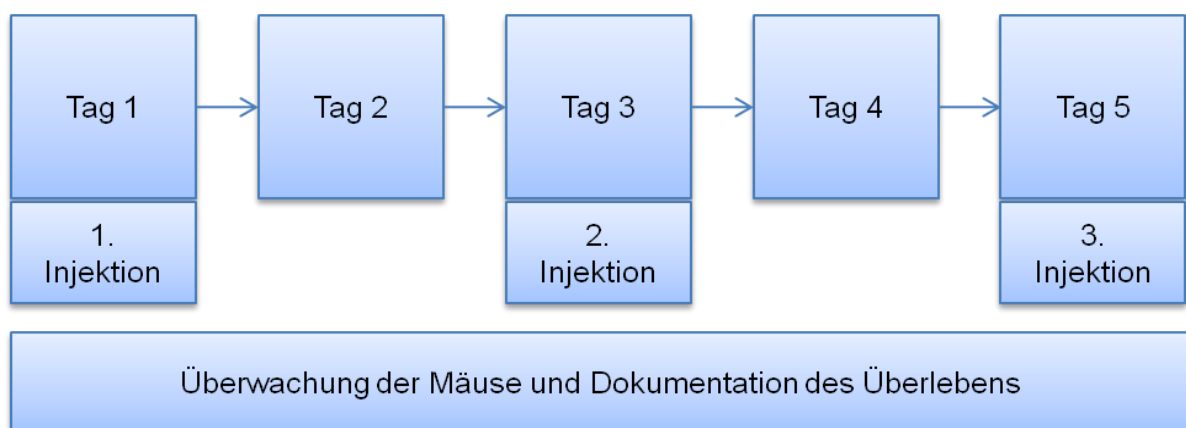


Abb. 4-15 Versuchsablauf des Experiments. Die intraperitoneale Applikation der zu testenden Medikamente in der jeweiligen Konzentration fand am ersten, dritten und fünften Tag statt. Das Überleben der Versuchstiere wurde täglich überprüft und dokumentiert.

4. Ergebnisse

Im Versuch sind von den 24 Versuchstieren insgesamt sieben gestorben. Die höchste Letalität zeigte die Verwendung von Mycophenolat-Mofetil. So zeigte sich, dass sowohl 8mg als auch 4mg intraperitoneal für NSG-Mäuse toxisch waren (Abb. 4-16).

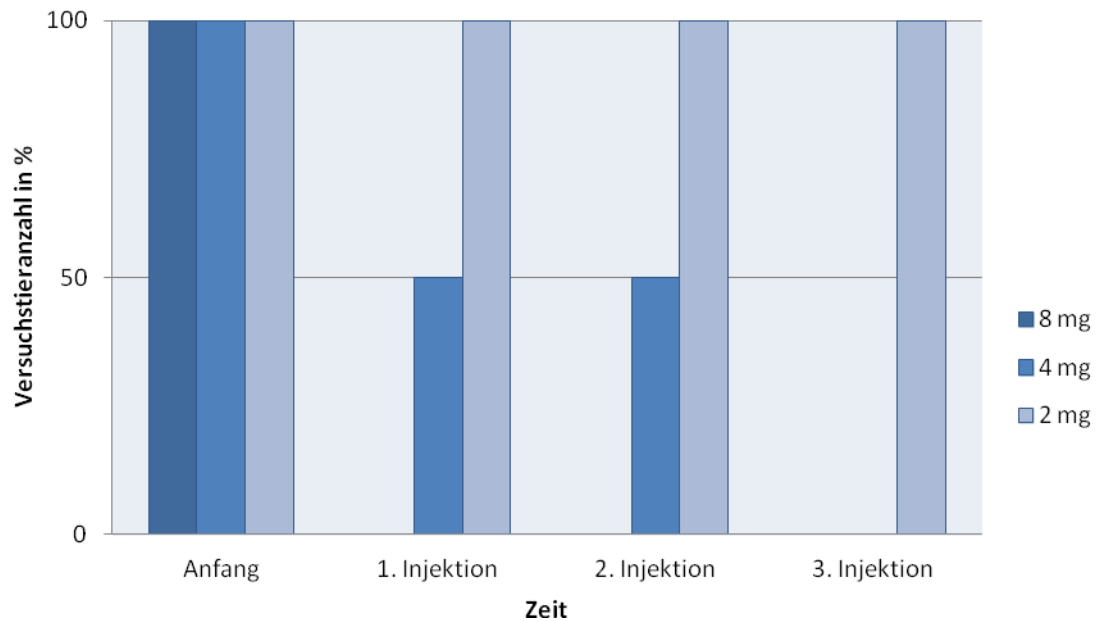


Abb. 4.16 Überleben der Versuchstiere bei Mycophenolat-Mofetil-Gabe in verschiedenen Dosierungen.

Unter der Verwendung von Tacrolimus sind jene beiden Mäuse gestorben, welche die höchste Medikamentendosis (1 mg) injiziert bekamen. Die restlichen Tiere haben überlebt (Abb. 4.17).

4. Ergebnisse

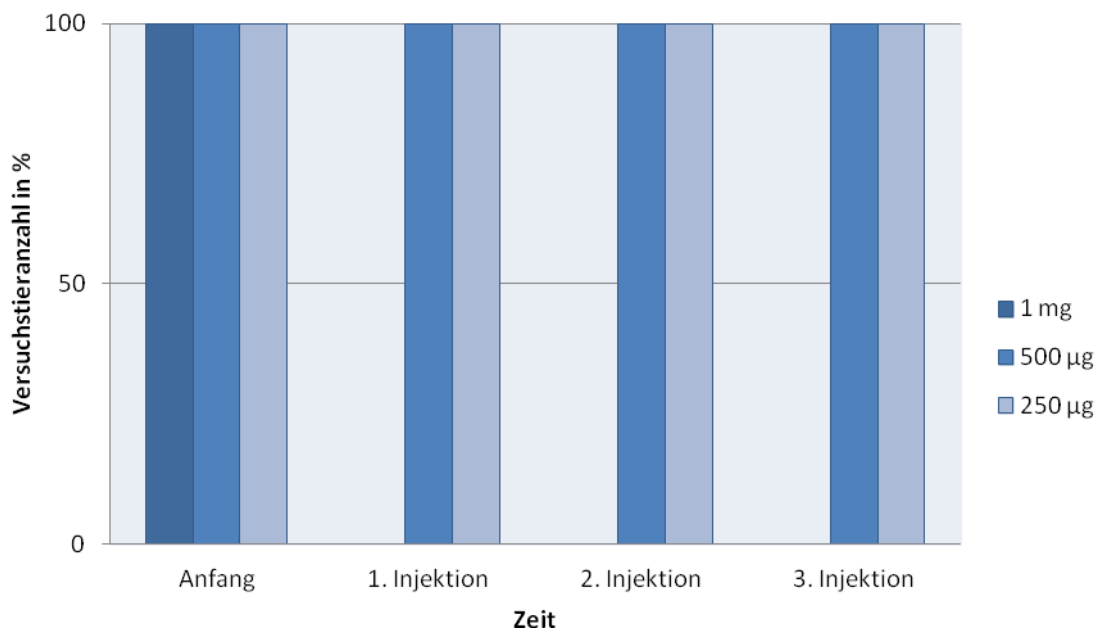


Abb. 4-17 Überleben der Versuchstiere bei Tacrolimus-Gabe in verschiedenen Dosierungen.

Die niedrigste Letalität ergab sich unter der Therapie mit Cyclosporin A. Eine Maus, die mit der Dosis von 500 µg behandelt wurde ist gestorben (Abb. 4-18).

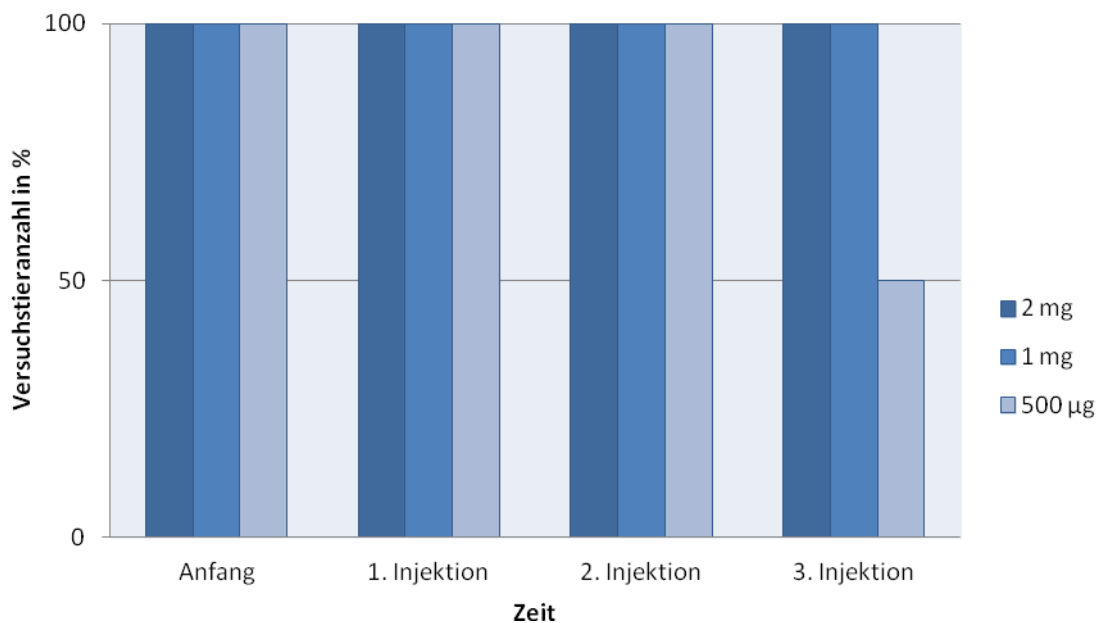


Abb. 4-18 Überleben der Versuchstiere bei Cyclosporin A-Gabe in verschiedenen Dosierungen.

4. Ergebnisse

Aus der Vergleichsgruppe hatten alle Tiere die Behandlung überlebt (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse des Versuchs zeigten, dass Cyclosporin A in den getesteten Dosen mit der niedrigsten Tiersterblichkeit einher ging und wurde aus diesen Gründen in den weiteren Experimenten auf seine Wirksamkeit untersucht.

4.3.2 Untersuchung des Einflusses von Cyclosporin A auf humane T-Lymphozyten in einer Leukämie-Kultur

Aus dem Toxizitätsversuch der verschiedenen T-Lymphozyteninhibitoren (vgl. 4.3.1) trat Cyclosporin A als der Wirkstoff hervor, der mit der niedrigsten Sterblichkeit bei NSG-Mäusen einher ging. In diesem Versuch sollte die Effektivität von Cyclosporin A in einer in vitro-Ansatz mit der Leukämie MZ308 überprüft werden. Diese Leukämie wurde ausgewählt, da im Kinetikversuch (vgl. 4.2.2) gezeigt wurde, dass in höheren Transplantationsdosen die Gefahr eines Auswachsens humaner T-Zellen besteht.

Für den Versuch wurden jeweils 5×10^5 Zellen der AML MZ308 in 500 μ l Leukämiemedium pro Well in eine 24 Well Platte gefüllt. Je vier Wells wurden 24 Stunden entweder mit 100 ng/ml, 1 mg/ml oder 10 mg/ml Cyclosporin A im Brutschrank bei 37° Celsius inkubiert. Zwei Kontrollgruppen, welche Leukämiezellen in Medium ohne Wirkstoff enthielten, wurden parallel im Brutschrank kultiviert. Nach der Inkubationszeit wurden alle Wells gewaschen und die Zellen in 500 μ l Leukämiemedium resuspendiert. Zur Stimulation der T-Lymphozytenproliferation wurde 1,5 μ l Phytohämagglutinin hinzugegeben. Einer der beiden Kontrollgruppen wurde ebenfalls 1,5 μ l Phytohämagglutinin hinzugefügt, die zweite blieb unstimuliert. Nach weiteren sechs Tagen wurden die Zellen geerntet und durchflusszytometrisch auf den Anteil der noch lebenden CD4⁺-T-Helfer- und CD8⁺-T-Effektorsubpopulationen untersucht. Abb. 4-19 gibt den zeitlichen Ablauf des Experiments wieder. In Abb. 4-20 a-c wird das Vorgehen der durchflusszytometrischen Untersuchung erläutert.

4. Ergebnisse

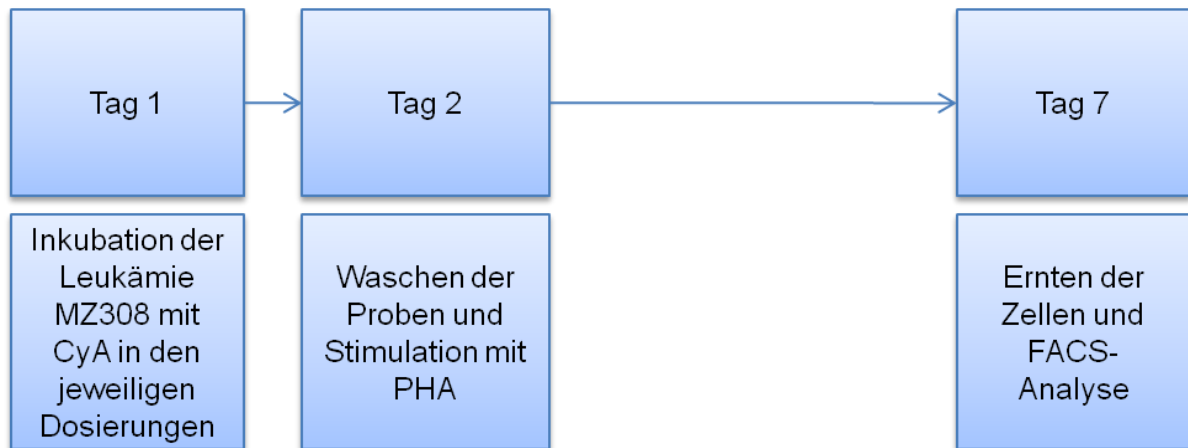


Abb. 4-19 Zeitlicher Ablauf des Experiments. Nach der vierundzwanzigstündigen Inkubation der Leukämie mit Cyclosporin A wurde das Medikament ausgewaschen und anschließend die Proben mit Phytohämagglutinin stimuliert. Nach sieben Tagen wurden die Proben durchflusszytometrisch untersucht. Abkürzungen: CyA = Cyclosporin A, PHA = Phytohämagglutinin, FACS = Durchflusszytometrie

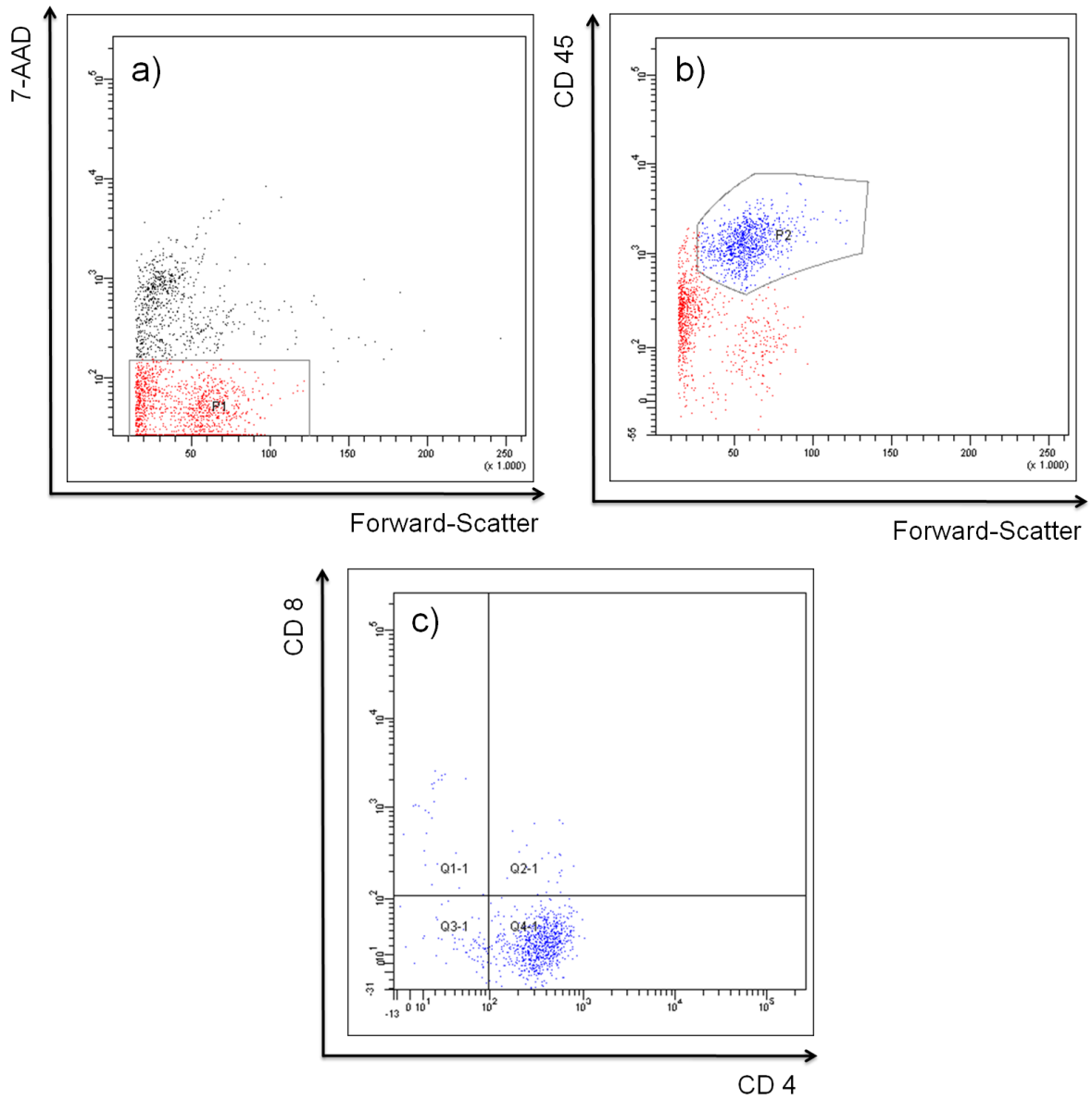
Bei der Endanalyse wurden insgesamt fünf Ansätze mit je vier Proben analysiert.

Die nicht-stimulierte Kontrollgruppe zeigte ein geringes Auswachsen von T-Lymphozyten mit einem Anteil von 1,8 % T-Helferzellen und 0,4 % zytotoxische T-Zellen. Die stimulierte Kontrollgruppe erfuhr eine deutlich größere T-Zellproliferation: Im Mittel bestanden 20,6 % der Zellsuspension aus CD4⁺- und 1,0 % aus CD8⁺-Zellen. Die niedrige und die mittlere Cyclosporin A-Konzentrationen hatten beide eine ähnliche Auswirkung auf die Zellen. 14,6 % CD4⁺- und 1,5 % CD8⁺-T-Zellen wurden bei 100 ng/ml bzw. 15,4 % CD4⁺- und 1,3 % CD8⁺-T-Zellen wurden bei 1 µg/ml ermittelt. Den deutlichsten Einfluss erzielte Cyclosporin A bei einer Konzentration von 10 mg/ml: 10,1 % T-Helferzellen und 0,7 % zytotoxische T-Zellen wurden in der Zellsuspension gemessen. Abb. 4-21 verdeutlicht die Ergebnisse grafisch.

Die hier vorliegenden Versuche zeigen, dass unter Stimulation mit Phytohämagglutinin in vitro T-Lymphozyten auswachsen. Dabei wurden mehr CD4⁺-T-Helferzellen als CD8⁺-zytotoxische T-Zellen zur Proliferation gebracht. Die

4. Ergebnisse

Hemmung des T-Lymphozytenwachstums mittels Cyclosporin A war dosisabhängig stärker für CD4⁺-T-Zellen zu beobachten.



4. Ergebnisse

Abb. 4-20 a-c Ablauf der durchflusszytometrischen Untersuchung a) Die geernteten Zellen wurden im Punktwolkendiagramm dargestellt. Auf der Ordinate wurden positive Signale für 7-AAD angezeigt. Es wurden solche Zellen weiteruntersucht, welche nicht mit 7-AAD markiert waren, um die noch lebenden Zellpopulationen zu erhalten. b) Im nächsten Analyseschritt wurde die Zellgröße gegen CD45 aufgetragen. Jene Zellpopulation wurde ausgewählt, welche das Oberflächenantigen CD45 auf ihrer Oberfläche trug. c) Im dritten Punktwolkendiagramm wurden CD4⁺-Zellen als T-Helferzellen von CD8⁺-zytotoxischen T-Zellen diskriminiert und deren jeweiliger Anteil an der gesamten Zellmenge bestimmt.

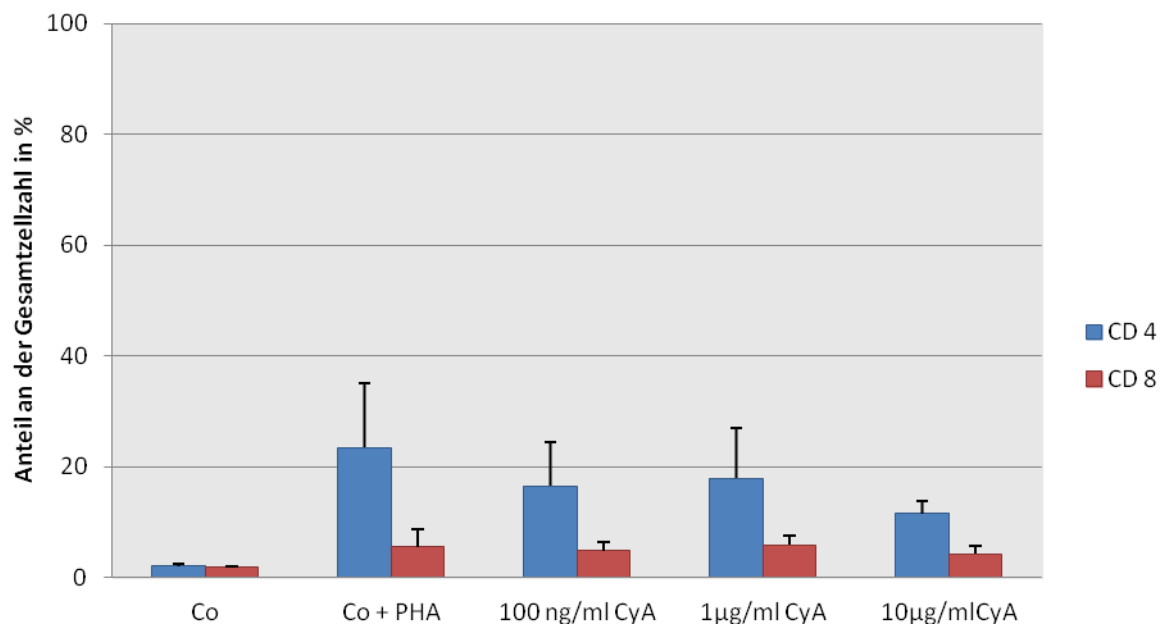


Abb. 4-21 Grafische Darstellung der Ergebnisse. CD4⁺-T-Helferzellen sind als blaue Säulen, die CD8⁺-zytotoxischen T-Zellen sind in Form von roten Säulen als Anteil an der Gesamtzellzahl unter variierender Medikamentendosierung gezeigt. Abkürzungen: Co = nicht stimulierte Kontrollgruppe, Co + PHA = stimulierte Kontrollgruppe, CyA = Cyclosporin A

4.3.3.1 Selektive Inhibition des T-Lymphozytenwachstums in xenotransplantierten Mäusen

In den nachfolgenden Versuchen wurden zwei Methoden getestet, die ein Auswachsen humaner T-Zellen in xenotransplantierten NSG-Mäusen verhindern sollten. Für eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse, wurden für beide Experimente MZ308 in einer Konzentration von 10^7 verwendet, da in 4.2.2 gezeigt

4. Ergebnisse

werden konnte, dass bei dieser Zellmenge ein Auswachsen humaner T-Lymphozyten zu erwarten ist. Um eine durch zu hohes Leukämie-Engraftment bedingte Letalität zu verringern, wurde die Versuchsdauer auf zehn Wochen beschränkt. Abb. 4-22 demonstriert grafisch die Ergebnisse der Kontrollgruppe, die keine Therapie erfahren hatte.

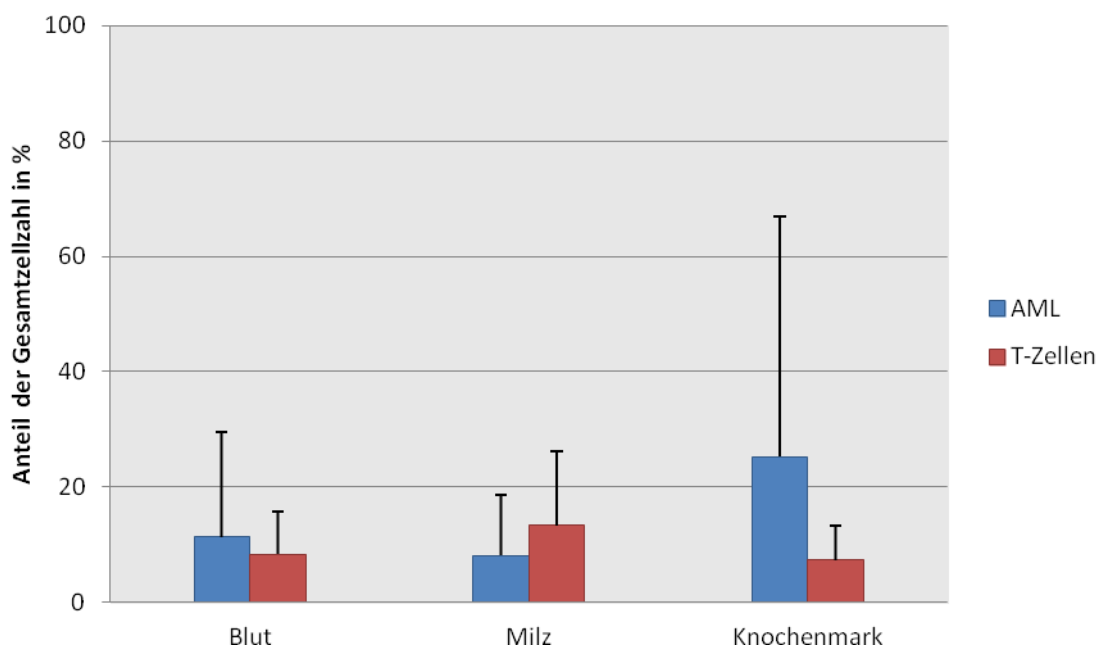


Abb. 4-22 Engraftment der Kontrollgruppe. Graphische Darstellung der ermittelten Anteile humaner leukämischer Blasten (blau) und T-Zellen (rot) in den unterschiedlichen Geweben.

4.3.3.2 Hemmung des Wachstums humaner T-Lymphozyten in der xenotransplantierten NSG-Maus unter Verwendung von Cyclosporin A

Cyclosporin A erwies sich in den vorangegangenen Versuchen (vgl. 4.3.1 und 4.3.2) als Medikament, welches eine vergleichsweise niedrige Toxizität und gleichzeitig hohe Potenz bei der Inhibition der T-Lymphozytenaktivierung in vitro besitzt. In einem in vivo-Ansatz wurde getestet, ob eine Cyclosporin A-Therapie sowohl das Wachstum

4. Ergebnisse

der leukämischen, als auch der im Transplantat befindlichen T-Zellen in der xenotransplantierten NSG-Maus beeinflusst.

Dazu wurden sieben NSG-Mäuse subletal mit 1,5 Gray bestrahlt. Vierundzwanzig Stunden danach wurden jeder Maus 10^7 Zellen der Leukämie MZ308 in die Schwanzvene injiziert. Die Tiere erhielten für zwei Wochen alle zwei Tage intraperitoneale Injektionen von je 500 μg Cyclosporin A gelöst in 200 μl PBS. Zehn Wochen nach der Xenotransplantation wurden die Mäuse getötet und analysiert. Blut, Milzen und Knochenmark wurden durchflusszytometrisch auf leukämische Zellen sowie T-Zellen untersucht. Abb. 4-23 zeigt schematisch den Ablauf des Experiments.

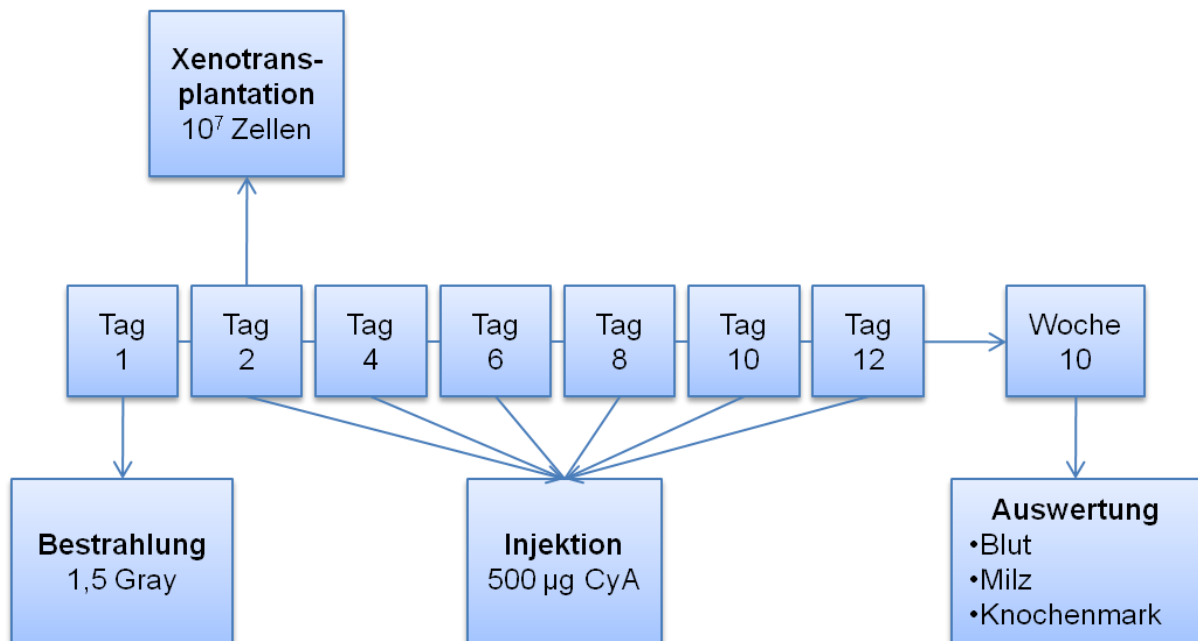


Abb. 4-23 Zeitlicher Versuchsablauf. Ein Tag nach der Bestrahlung mit 1,5 Gray wurden den Mäusen 10^7 Zellen der Leukämie MZ308 injiziert. Am zweiten, vierten, sechsten, achten, zehnten und zwölften Tag des Experiments wurden jeweils 500 μg Cyclosporin A intraperitoneal appliziert. Nach zehn Wochen wurden die Mäuse getötet und deren Gewebe durchflusszytometrisch untersucht. Abkürzungen: CyA = Cyclosporin A.

4. Ergebnisse

Im Versuchsverlauf waren fünf Tiere gestorben. In den beiden überlebenden Mäusen konnten keine T-Zellen mehr nachgewiesen werden. 5,5 % bzw. 2,1 % des Bluts bestanden aus humanen leukämischen Zellen, in der Milz fanden sich 32,3 % bzw. 25,7 % AML-Blasten. Im Knochenmark ließen sich keine Leukämiezellen detektieren. Abb. 4-24 zeigt graphisch die in den Mäusen gemessenen Werte. In Abb. 4-25 a+b wird das durchflusszytometrisch ermittelte Punktwolkendiagramm der Knochenmarksuspension einer Versuchsmaus dem Knochenmark einer Kontrollmaus gegenübergestellt.

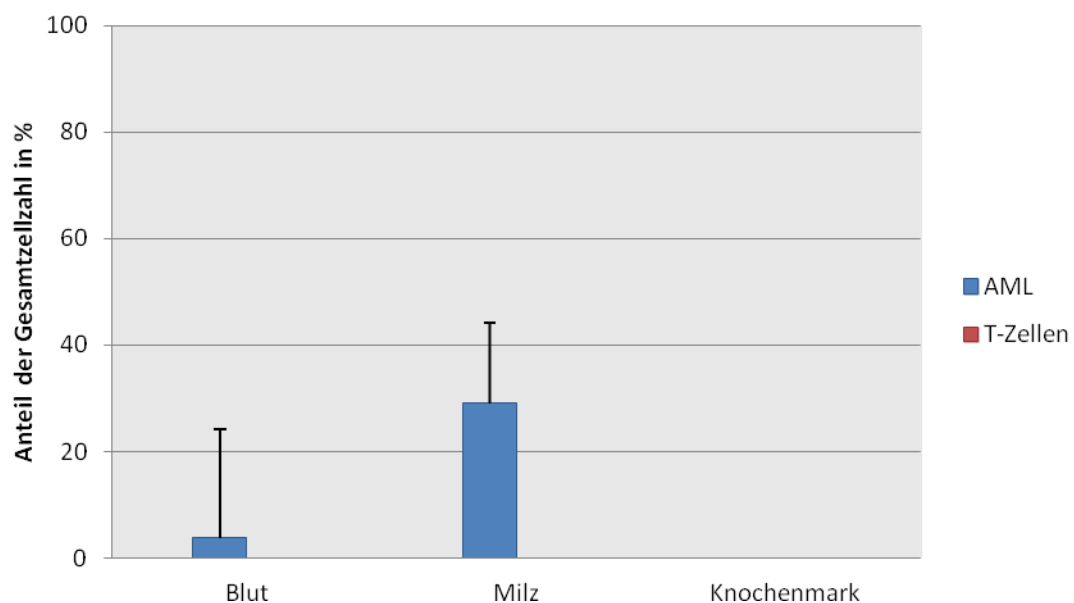


Abb. 4-24 Engraftment der Tiere, die mit Cyclosporin A behandelt worden sind. Graphische Darstellung der ermittelten Anteile humaner leukämischer Blasten (blau) und T-Zellen (rot) in den unterschiedlichen Geweben.

4. Ergebnisse

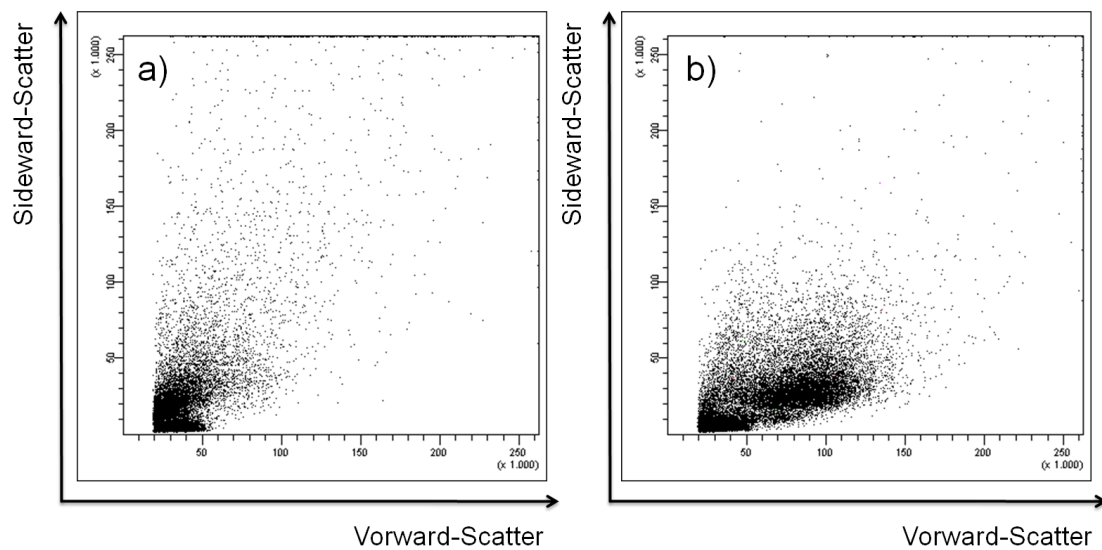


Abb. 4-25 a+b Punktwolkendiagramme durchflusszytometrisch untersuchter Knochenmarkssuspensionen. Das Seitwärtsstreulicht ist gegen das Vorwärtsstreulicht aufgetragen. a) Punktwolkendiagramm des Knochenmarks einer xenotransplantierten Maus, welche nach erfolgter Transplantation mit Cyclosporin A therapiert wurde. b) Punktwolkendiagramm des Knochenmarks einer xenotransplantierten Maus, welche nicht mit Cyclosporin A behandelt wurde. Es lässt sich eine deutliche Zellpopulation erkennen, welche in der Versuchsmaus nicht vorhanden war. Es handelte sich hierbei um humane leukämische Blasten.

4.3.3.3 Hemmung des Wachstums humaner T-Lymphozyten in der xenotransplantierten NSG-Maus durch immunomagnetische T-Zelldepletion des Transplantats vor der Injektion

In diesem Experiment wurde ein weiteres Verfahren zur selektiven Inhibition des Engraftments humaner T-Zellen in xenotransplantierten NSG-Mäusen getestet. Dabei wurden Leukämiezellen vor der Transplantation in die Maus von T-Lymphozyten mittels immunomagnetischer Separation aufgereinigt. Hierfür wurde die Leukämie MZ308 mit anti-humanen CD-3-Beads inkubiert und zweimal über eine MACS[®]-LD-Säule separiert. Anschließend wurde eine Reinheitsfärbung mit anti-humanen CD3- und CD45-Antikörpern durchgeführt und im Durchflusszytometer gemessen. Die Messung ergab eine Reduktion von 1,3% vor der Depletion auf 0,1% CD3⁺CD45⁺-Zellen nach der Depletion, folglich eine Reduktion der humanen T-Zellen um 92,3 % des Ausgangswerts (vgl. Abb. 4-26 a+b).

4. Ergebnisse

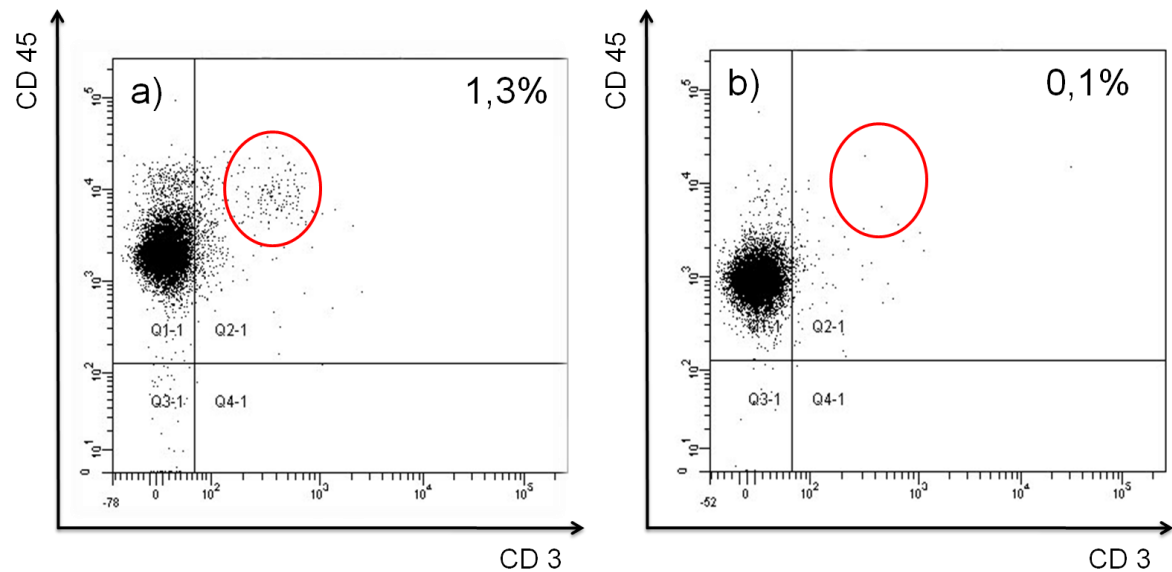


Abb. 4-26 a+b Durchflusszytometrisch ermittelte Reinheitsfärbung. CD45 wurde gegen CD3 aufgetragen. a) Vor der Depletion: 1,3 % der Leukämie MZ308 bestand aus T-Lymphozyten. b) Nach der Depletion ist der Anteil CD3⁺CD45⁺-Zellen auf 0,1 % gesunken.

Je 10^7 Zellen der CD3-depletierten Zellsuspension wurden in fünf NSG-Mäuse injiziert, welche vierundzwanzig Stunden vorher mit 1,5 Gray bestrahlt worden sind. Nach zehn Wochen wurden die Tiere getötet und auf das Anwachsen der humanen Leukämie sowie der T-Zellen untersucht. Der Ablauf des Experiments wurde in Abb. 4-27 grafisch dargestellt.

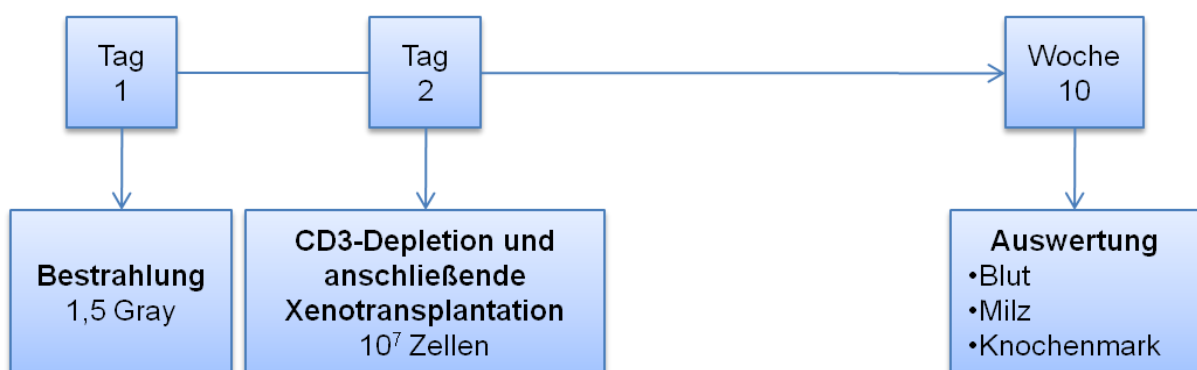


Abb. 4-27 Grafische Darstellung des Ablaufs des Experiments. Nach zweimaliger CD3-Depletion von MZ308 wurden 24 Stunden nach Bestrahlung mit 1,5 Gray 10^7 Zellen nahezu T-Zell-freie Leukämie transplantiert. Nach zehn Wochen wurden die Gewebe der Tiere durchflusszytometrisch untersucht.

4. Ergebnisse

Nach zehn Wochen waren sämtliche untersuchten Gewebe T-Zell-frei. Im Blut lag der Anteil der Leukämiezellen zwischen 2,4 % und 12,1%. In den Milzen ergab sich ein Engraftment zwischen 15,2 % und maximal 48,8 %. In drei Knochenmarkproben konnten keine Leukämiezellen nachgewiesen werden, während die beiden übrigen Proben 29,7 % und 43,1 % CD33⁺CD45⁺ Zellen enthielten. Die Ergebnisse sind in Abb. 4-28 grafisch zusammengefasst. Abb. 4-29 a+b stellt die per Durchflusszytometer ermittelten Punktwolkendiagramme des leukämiefreien Knochenmarks einer Versuchsmaus dem Knochenmark einer Kontrollmaus gegenüber.

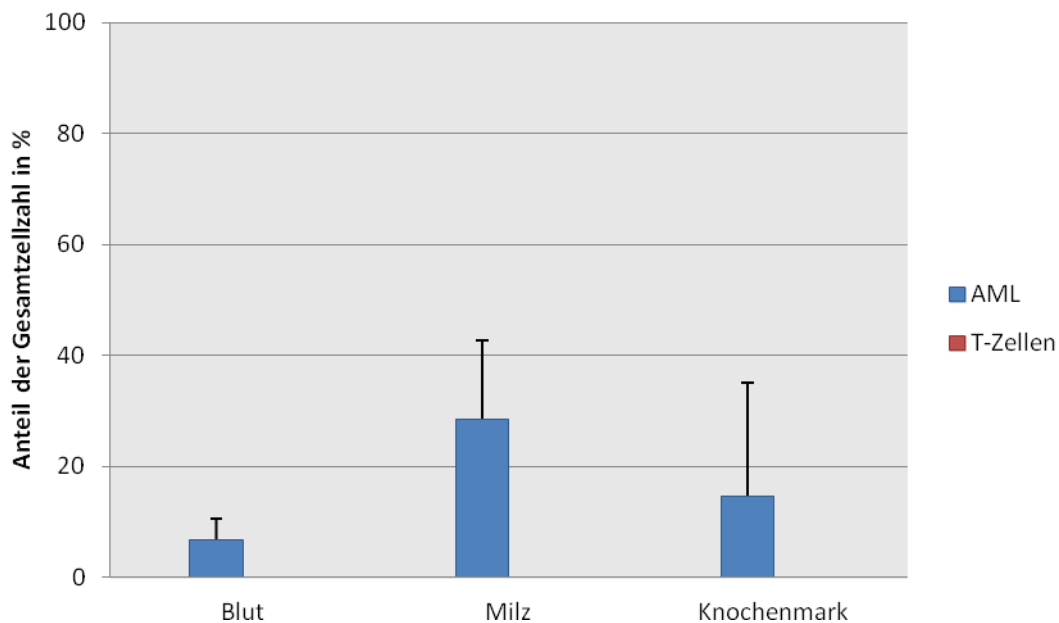


Abb. 4-28 Engraftment der Tiere, die immunomagetisch aufgereinigte Leukämie injiziert bekamen. Graphische Darstellung der ermittelten Anteile humaner leukämischer Blasten (blau) und T-Zellen (rot) in den unterschiedlichen Geweben.

4. Ergebnisse

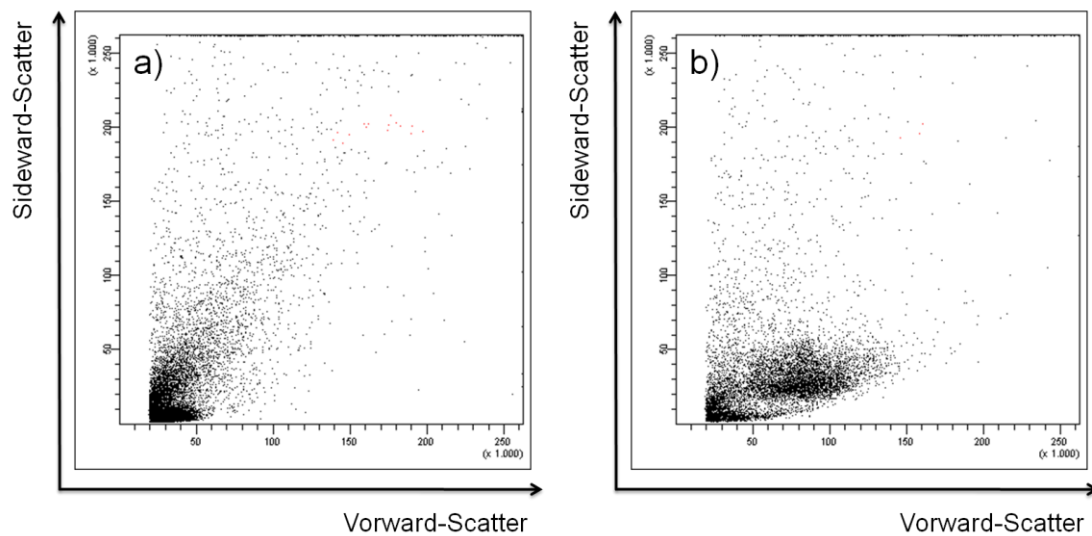


Abb. 4-29 a+b Punktwolkendiagramme durchflusszytometrisch untersuchter Knochenmarkssuspensionen. Das Seitwärtsstreulicht ist gegen das Vorwärtsstreulicht aufgetragen. a) Punktwolkendiagramm des Knochenmarks einer xenotransplantierten Maus, welche CD3-depletierte Leukämie transplantiert bekommen hat. b) Punktwolkendiagramm des Knochenmarks einer xenotransplantierten Maus, welche unbehandelte Leukämie injiziert bekam. Im Vergleich lässt sich deutlich eine Zellpopulation erkennen, welche im Knochenmark der Versuchsmaus nicht vorhanden war. Es handelte sich hierbei um humane leukämische Blasten.

5. Diskussion

Für das bessere Verständnis der komplexen biologischen Prozesse der akuten myeloischen Leukämie im Menschen, sowie für die Entwicklung neuer Therapieansätze ist die Etablierung eines stabilen und reproduzierbaren Tiermodells obligat. Für die Funktionalität des Modells wird das Erfüllen mehrerer Bedingungen vorausgesetzt. Zum einen ist eine ausreichend lange Lebensdauer der Versuchstiere essenziell, denn selbst nach erfolgtem Ausbruch der Erkrankung sollen die Tiere noch lange genug weiterleben, um an ihnen verschiedene Therapieformen testen und evaluieren zu können. Außerdem ist es wichtig, dass die Erkrankung in ausreichend hohem Maße im Versuchstier ausgeprägt und somit mit der Krankheit im Menschen vergleichbar ist, damit Rückschlüsse für das humane Modell gezogen werden können. Dies wird ermöglicht durch das Kompromittieren des Immunsystems des Versuchstiers, sodass Abstoßungs- bzw. Abwehrreaktionen des Wirtsorganismus nicht gegen die körperfremden Leukämiezellen ausgelöst und durchgeführt werden, die ein gewünschtes Engraftment gefährden. Zudem ist es von Vorteil, wenn eine ökonomische Haltung und Handhabung der eingesetzten Tiere möglich ist.

Nach sorgfältiger Prüfung der oben genannten Prämissen, fiel im Rahmen dieser Arbeit die Wahl auf die Verwendung von Mäusen aus dem NSG-Stamm, da sie die Erwartungen, die an das Tiermodell gestellt worden sind, am besten erfüllen: Ihre Lebensspanne beträgt mehr als 90 Wochen und zeichnet sich im Vergleich zu NOD-scid-Mäusen, die zuvor für einen langen Zeitraum in der Leukämieforschung eingesetzt wurden, mit einer geringeren Strahlensensibilität und einer damit verbundenen niedrigeren Mortalität aufgrund strahlungsbedingter Thymombildung aus (119). Durch die Abwesenheit einer integeren zellulären sowie humoralen Immunantwort können sich transplantierte Leukämiezellen im Wirtsorganismus entsprechend ansiedeln, ohne dass die Zellen einer Abwehrreaktion ausgesetzt werden. Zudem sind Mäuse günstig und platzsparend in ihrer Haltung und können selbst bei großem Tierbedarf ausreichend schnell reproduziert werden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung des Wachstumsverhaltens verschiedener primärer AMLs in dem ausgewählten NSG-

5. Diskussion

Mausstamm sowie die Identifizierung von Ursachen problematischer Transplantationsfolgen, an denen Methoden zur Optimierung des Engraftments ansetzen können.

5.1 Untersuchungen zum Engraftment verschiedener primärer akuter myeloischer Leukämien

NSG-Mäusen wurden 13 verschiedene primäre AML-Blasten von Patienten transplantiert, die jeweils unterschiedlichen Subtypen gemäß der FAB-Klassifikation entsprachen. Nach zwölf Wochen konnten acht Leukämien (61,5 %) in mindestens einem Versuchstier nachgewiesen werden. Innerhalb der Kohorten der jeweils getesteten Leukämien waren in 8,3 bis 100,0 % der Mäuse humane Leukämiezellen im Knochenmark engraftet. Diese Ergebnisse sind mit den bisher veröffentlichten Daten zu xenotransplantierten Mäusen kongruent. 2009 zeigten Sanchez et al. in 68,6 % der 35 von ihnen untersuchten AML-Proben nach zwölf Wochen ein Wachstum leukämischer Zellen im Knochenmark von NSG-Mäusen (120). Bevor NSG-Mäuse als Transplantationsmodell verwendet wurden, stellte die Verwendung von NOD-scid-Mäusen den Goldstandard in den Versuchen zum Engraftment von Leukämien dar: In den Versuchen von Pearce engrafteten 49,1 % der getesteten AMLs in den NOD-scid-Mäusen (121). Ailles und Kollegen erreichten in ihren 1999 publizierten Ergebnissen sogar eine Rate von 70,0 % (122). Die Identifikation der humanen leukämischen Zellen erfolgte hier jedoch einzig und allein anhand der CD45-Expression auf den Oberflächen der untersuchten Organzellsuspensionen. Vermutlich sind die somit erzielten Werte nach unten zu korrigieren, da CD45, ein Marker hämatopoetischer Zellen (123), sowohl auf Zellen der myeloischen als auch auf Zellen der lymphatischen Reihe exprimiert wird. Ohne die Messung weiterer spezifischer Oberflächenantigene wie CD33 (124) oder CD13 (125), die bei bestimmten AML-Typen nicht auf der Oberfläche der Zellen exprimiert werden (126), können AML-Zellen nicht eindeutig von anderen humanen Zellen diskriminiert werden. Feuring-Buske et al. erzielten ebenfalls durch die alleinige Verwendung von CD45 als Identifikationsmerkmal ein erfolgreiches Engraftment in 70,0 % der untersuchten Leukämien (127). Wie zuvor ist auch dieses Ergebnis genauso kritisch

5. Diskussion

zu werten. Den größten Transplantationserfolg erzielte die Forschungsgruppe von Lumkul, die 76,9 % der 13 untersuchten AMLs in ihren Versuchstieren nachweisen konnten (128).

Beim Vergleich der Rate der engrafteten AMLs in den NOD-scid-Mäusen mit den Anteilen der in den NSG-Mäusen angesiedelten Leukämien, liegt die Vermutung nahe, dass sich trotz der deutlich stärker ausgeprägten Immundefizienz in den NSG-Mäusen nicht mehr Leukämien erfolgreich transplantieren lassen als in ihrem Vorgänger-Stamm. Diesen Zusammenhang untersuchten auch Risueño und Kollegen, die 23 unterschiedliche AML-Proben sowohl in NOD-scid- also auch in NSG-Mäuse transplantierten. Nach der Analyse der Ergebnisse kamen sie zu dem Ergebnis, dass genau dieselben 14 Leukämien (60,8 %) in Mäusen aus beiden Stämmen anwachsen. Der Anteil der im Knochenmark engrafteten Leukämiezellen war in den NSG-Mäusen jedoch um ein vielfaches größer als in den NOD-scid-Mäusen (129). Diese Erkenntnis wird von Agliano et al. gestützt, die ein stärkeres Wachstum transplanteder akuter myeloischer und lymphatischer Leukämien in NSG-Mäusen im Vergleich zu den Proliferationsraten in anderen immundefizienten Mausstämmen beobachteten (130).

5.2 Primäres Zielgewebe der leukämischen Stammzellen

Aus den 13 getesteten AMLs wurden die Leukämien MZ308 und MZ667 aufgrund ihrer differierenden Engraftment-Charakteristika ausgewählt um ihr Wachstumsverhalten in der NSG-Maus näher zu untersuchen. Bereits in der vierten Woche nach der Transplantation konnten mit Ausnahme eines Exemplars humane leukämische Zellen im Knochenmark aller Tiere nachgewiesen werden, noch bevor Spuren im peripheren Blut oder in der Milz detektierbar waren. Bis zur achten bzw. spätestens zwölften Woche fand eine Besiedlung des Bluts und des Milzgewebes mit AML-Blasten in allen Tieren mit MZ667 und in 66,6 % der Tiere mit MZ308 statt. Die nachgewiesenen Anteile der Leukämiezellen waren in allen Tieren ausnahmslos zu allen untersuchten Zeitpunkten im Knochenmark am größten. Die durch diese Versuche gewonnenen Erkenntnisse stützen die Vermutung, dass das Knochenmark

5. Diskussion

das Organ darstellt, in dem die AML-Zellen sich nach der Transplantation als erstes ansiedeln. Bei einer erfolgreichen Bevölkung des Gewebes verdrängen sie dort die murinen Zellen und schwämmen wiederum ins Blut aus, um von dort weitere Organe zu besiedeln.

Bei einer erfolgreichen Transplantation gesunder hämatopoetischer Stammzellen in einen Organismus laufen mehrere Prozesse nacheinander ab. Die Stammzellen verlangsamen ihre Fließgeschwindigkeit („rolling“) in Höhe der sinusoidalen Knochenmarkgefäße, interagieren dort mit den Endothelzellen und transmigrieren durch das Endothel in das Markgewebe („homing“). Aufgrund der Gewährleistung einer optimalen Versorgung durch die Zellen der Knochenmarknische siedeln sich die Stammzellen dort an, differenzieren aus und schütten differenzierte Tochterzellen ins Blut aus, um dort die Integrität des Gewebes aufrechtzuerhalten (131–133).

In den hier durchgeführten Versuchen waren in den transplantierten AML-Proben leukämische Stammzellen enthalten, die gesunden Stammzellen in der Variabilität ihrer Oberflächenmoleküle und ihren Bedürfnissen für die Aufrechterhaltung ihrer Funktion ähneln (134). Folglich repräsentiert das murine Knochenmark für diese Zellen die optimale Nische, wo sie am besten versorgt werden und sie sich ansiedeln können (135). Ishikawa et al. fanden heraus, dass viele leukämischen Stammzellen dort in einem G₀-Stadium des Zellzyklus verharren, was sie vor chemotherapeutischen Einflüssen schützt (136). Diese Zellen seien dann nach einer abgeschlossenen Therapie für die Rezidivbildung verantwortlich.

Auch Ailles und Kollegen beschrieben ein Anreichern leukämischer Zellen im Blut und in der Milz, nachdem das Knochenmark bereits infiltriert wurde (122). Sanchez et al. halten deshalb die Untersuchung des Milzgewebes für notwendig um die komplette Tumormasse der transplantierten Mäuse zu bestimmen. So kann besonders im Falle einer Knochenmarkfibrose, die durch eine Infiltration durch leukämische Zellen bedingt ist, das Wachstum in die Milz verschoben werden und dort stärker als sonst ausgeprägt sein (120).

Aufgrund der oben genannten Erkenntnisse kann davon ausgegangen werden, dass eine Transplantation leukämischer Zellen der von gesunden hämatopoetischen

Stammzellen entspricht, bei deren primärem Ziel des Homings es sich ebenfalls um das Knochenmark handelt. Ein markanter Unterschied zur therapeutischen HSZT stellt bei der AML-Transplantation jedoch die massive und ungebremste Bildung undifferenzierter Klone und deren Ausschwämmen ins Blut und in andere Gewebe dar.

5.3 Einfluss der Versuchsdauer und der Zelldosis auf die Höhe des Engraftments

Nach der Analyse der erstellten Wachstumskinetiken der Leukämien MZ308 und MZ667 fiel auf, dass die Höhe des Leukämie-Engraftments im Knochenmark innerhalb der eingeteilten Kohorten variierte. Beim Vergleich der Mäuse, denen die gleiche Injektionsmenge appliziert wurde, war ein Tumoranteil nachzuweisen, der umso höher war, je mehr Zeit seit der Transplantation vergangen war. Vice versa war die Menge an Blasten in den Mäusen bei gleich langer Versuchszeit umso größer, wenn mehr Leukämiezellen bei Beginn injiziert worden waren. Somit ist ein positiver Zusammenhang zwischen applizierter Zellmenge, Beobachtungszeit und Höhe der angesiedelten Leukämiezellen im Knochenmark wahrscheinlich.

Der zeitliche Zusammenhang liegt der Tatsache zugrunde, dass mit der längeren Versuchsdauer auch mehrere Zellteilungen durchlaufen wurden und somit mehr Klone produziert worden sind. Dieses Phänomen wurde auch bei der Xenotransplantation von humanen Melanomzellen in NSG-Mäuse von Quintana et al. publiziert (137) und von Sanchez et al. für die Transplantation von humanen AML-Zellen übernommen (120).

Nicht alle Zellen in den AML-Proben haben die Fähigkeit sich zu teilen und im Knochenmarkgewebe der NSG-Maus anzuwachsen. Die Anzahl der leukämischen Stammzellen, die dieses Potenzial besitzen, variiert innerhalb der verschiedenen Proben. Sarry und Kollegen ermittelten kürzlich, dass pro Leukämienstammzelle zwischen 150.000 und 4.500.000 Nicht-Stammzellen in ihren elf untersuchten AML-Proben enthalten sind (138). Die Erhöhung der AML-Zellen im Knochenmark ist

5. Diskussion

somit mit einer Steigerung der absoluten Leukämienstammzellenzahl im Transplantat verbunden.

In der Literatur sind weitere beeinflussbare Faktoren beschrieben worden, die mit einer höheren Wachstumsrate der AML im xenogenen Transplantationsmodell einhergehen. Zunächst konnte durch die Verwendung permissiverer Empfänger-Mäuse das Leukämiewachstum deutlich gesteigert werden. Eine große Differenz zeigt sich hier beim direkten Vergleich von NOD-scid-Mäusen mit NSG-Mäusen (129), aber auch innerhalb des NSG-Stamms sind neonatale Tiere empfänglicher für ein exzessives Auswachsen der Leukämiezellen als ihre adulten Stammesgenossen (136). Außerdem zeigten Versuche in denen NSG-Mäusen humane hepatozelluläre Karzinomzellen transplantiert worden sind, dass diese stärker in den weiblichen Versuchstieren angewachsen sind (139). Der Grund für das höhere Engraftment in diesen Mäusen liegt vermutlich in einer noch stärker ausgeprägten Immundefizienz bei neugeborenen und weiblichen NSG-Mäusen. Dem Applikationsweg des Transplantats wird bezüglich des Transplantationserfolgs ebenfalls eine Bedeutung beigemessen. Im direkten Vergleich von intravenöser mit intraperitonealer Injektion der Leukämiezellen erzielte erstere bedeutend bessere Ergebnisse (128). Ein sogar noch größeres Engraftment lässt sich mittels intramedullärer Injektion der AML-Blasten erzielen (150).

Die beeinflussbaren Faktoren werden von nichtbeeinflussbaren intrinsischen Parametern der akuten myeloischen Leukämien ergänzt, die mit einem starken Auswachsen in den Versuchstieren verbunden sind. Dazu gehören bestimmte Subpopulationen der FAB-Klassifikation. In Versuchen zeigten minimal differenzierte akute myeloische Leukämien (FAB-Klasse M0) sowie akute myeloische Leukämien ohne Ausreifung (FAB-Klasse M1) ein stärkeres Wachstum als andere FAB-Klassen (128, 140). Zudem zeigten bestimmte akute myeloische Leukämien, die bei Patienten mit einer schlechten Prognose verbunden sind, ein besseres Engraftment in Mäusen (122): eine AML, die sekundär aus einer anderen hämatologischen Erkrankung entstanden ist, wächst effektiver in den Versuchstieren als primäre Leukämien. Gleiches gilt für Leukämien, die einen prognostisch schlechten Karyotyp besitzen. Einen weiteren Einfluss zeigte die Anzahl der Leukozyten des Patienten bei

5. Diskussion

Diagnosestellung der Leukämie: je größer sie war, umso stärker äußerte sich auch das Wachstum in der Maus (140). Dabei wurde davon ausgegangen, dass es sich bei diesen Leukämien um sehr stark proliferierende Zellen handelt, die sich folglich auch in den Empfängertieren vermehrt teilen (128).

Alle oben genannten Faktoren und Kriterien, konnten in Versuchen ein stärkeres Auswachsen einer Leukämie beeinflussen, sofern diese in einer Maus prinzipiell engraftete. Dabei bleibt jedoch unberücksichtigt, dass sich bestimmte AMLs nicht in den Versuchstieren ansiedeln ließen. Eine Prognose bezüglich Engraftbarkeit einer Leukämie liefern diese Faktoren somit nicht. Die Erstellung eines Kriterienkatalogs, der das Anwachsen einer AML prognostizieren könnte wäre in der Leukämieforschung in jedem Fall äußerst dienlich.

5.4. Bedeutung der FLT3-Längenmutation für das Engraftment

Die 13 getesteten AMLs wurden in zwei Gruppen unterteilt, nämlich in „Engrafter“ und „Non-Engrafter“ sowie retrospektiv miteinander verglichen. Bei der Engrafter-Gruppe wurde in 85,7 % der Leukämien eine interne Tandemduplikation (ITD) der Juxtamembrandomäne des FLT3-Rezeptors festgestellt, während diese Mutation in 80,0 % der nicht-engraftenden Leukämien nicht vorhanden war. Mittels Vierfeldertest wurde die Vorhersagekraft dieser Mutation in Bezug auf das Engraftment berechnet mit dem Ergebnis, dass das Vorhandensein der FLT3-ITD-Mutation mit einer Sensitivität von 85,7 %, einer Spezifität von 80,0 % und einer Effizienz von 83,3 % ein sehr gutes Instrument für die Vorhersagekraft eines Engraftments darstellt.

Gestützt wird diese Aussage von Rombouts et al., die bei Transplantationen von AMLs mit einer FLT3-Mutation in NOD-scid-Mäusen höhere Engraftmentraten feststellten als in Versuchen mit Leukämien, die keine Mutation trugen (141). Gleiche Ergebnisse wurden von Sanchez und Kollegen erzielt (120). Eine Aussage darüber, ob Leukämien prinzipiell häufiger engrafteten, wenn sie mutierte FLT-3-Rezeptoren tragen, fehlt bei beiden Gruppen jedoch. Lumkul et al. stellten ein Engraftment bei 80% der FLT3-mutierten Leukämien fest, untersuchten jedoch nur fünf AMLs (128). Pearce et al. untersuchten den Zusammenhang zwischen FLT3-Mutationen bei

5. Diskussion

Engraftern und Non-Engraftern, stellte aber bei beiden Gruppen keinen Unterschied bezüglich des Vorkommens einer Mutation fest (121).

Auch wenn die Kenntnis über gewisse Merkmale, die mit einem Engraftment einhergehen hilfreich erscheint, so stellt das Ziel der Forschung ein Mausmodell dar, in dem sich alle Leukämien unabhängig ihrer Merkmale erfolgreich ansiedeln lassen. Verschiedene Arbeitsgruppen haben sich dem Problem der nicht-engraftbaren akuten myeloischen Leukämien angenommen und haben versucht das Tiermodell zu optimieren:

Unter der Hypothese, dass eine Anreicherung der leukämischen Stammzellen in den Transplantaten nicht-engraftende Leukämien zum Anwachsen bringen, scheiterten Pearce und Kollegen. Anstelle aus peripherem Blut gewannen sie die injizierten Transplantate aus dem Knochenmark der AML-Patienten, da sie davon ausgingen, dass dort die Dichte der Leukämienstammzellen größer sei (121). Monaco et al. versuchten die Anzahl engraftbarer Leukämien ebenfalls durch eine Anreicherung von Leukämienstammzellen zu erhöhen. Sie markierten ihre AML-Proben mit magnetischen Beads, die an CD34-Moleküle banden und isolierten die CD34-Fraktion aus dem Probengemisch durch Fluoreszenz-aktiviertes Zellsortieren und injizierten die aufgereinigten AML-Proben in NOD-scid-Mäuse. Ein eindeutiger Erfolg dieser Methode blieb aus, lediglich sechs der elf verwendeten Leukämien konnten in den Mäusen angesiedelt werden (142).

Im Rahmen der Stammzellforschung wurden für ein erfolgreiches Homing von Stammzellen die Notwendigkeit der Interaktion zwischen dem stromalen Chemokin SDF1 und seinem auf Stammzellen exprimierten CXCR4-Rezeptor entdeckt (143). In Versuchen wurde durch die Blockierung von CXCR4 mit Antikörpern ein Ansiedeln im Knochenmark von NOD-scid Mäusen verhindert (144), während eine Überexpression des Rezeptors auf der Oberfläche der Stammzellen mit einem effektiverem und stärkeren Engraftment in den Tieren einherging (145). Auf dieser Grundlage fußten Lumkul et al. ihre Vermutung, dass ein Nicht-Engraftment bestimmter AML-Proben aus den Folgen eines gescheiterten Homings der leukämischen Stammzellen resultiere. Sie stimulierten über 48 Stunden ihre Leukämiekulturen mit dem Stammzellfaktor (SF), um die Anzahl der CXCR4-

5. Diskussion

Moleküle auf der Oberfläche der CD34⁺-Zellen hochzuregulieren. Die Steigerung der CXCR4-Expression scheiterte jedoch und ein verbessertes Engraftment blieb aus (128). Auch Pearce und Kollegen untersuchten den Einfluss von CXCR4 auf die Engraftbarkeit von AMLs und fanden heraus, dass selbst Leukämien mit einer niedrigen CXCR-4-Expression engrafteten, während vice versa unter den Non-Engraftern CD34⁺-Zellen mit überexprimiertem CXCR4 vorhanden waren (121).

Ailles et al. versuchten die Anzahl der engraftbaren Leukämien in ihrem Modell zu erhöhen, indem sie ihre transplantierten Mäuse regelmäßig mit IL-3 und Stammzellofaktor versorgten. Während sich ein Effekt auf engraftbare AMLs uneinheitlich in Form von erhöhtem Auswachsen leukämischer Zellen im Knochenmark mancher Tiere zeigte, verfehlte die Behandlung ihre Wirkung bei nicht-engraftbaren Leukämien (122). Wunderlich und Kollegen griffen den Ansatz Ailles auf und entwickelten einen neuen Mausstamm, der zusätzlich zu den Eigenschaften der NSG-Maus humanes IL-3, SF sowie G-CSF produziert. In ersten Versuchen konnten in diesem Maustyp aus dem NSGS-genannten Stamm Leukämien engrafteten, deren Anwachsen in NSG-Mäusen scheiterte (146). Diese Ergebnisse beweisen, dass zumindest partiell nicht anwachsende AML-Proben durch Bereitstellung von Wachstumsfaktoren und Interleukinen in NSG-Mäusen zum Engraftment gebracht werden können. Offensichtlich ist eine Substitution nur dann erfolgreich, wenn sie kontinuierlich und nicht punktuell stattfindet. Inwiefern die NSGS-Maus die Leukämieforschung revolutioniert und ob auch alle nicht-engraftende Leukämien in ihr ansiedelbar sind, ist in weiteren Versuchen noch zu zeigen.

5.5 Co-Engraftment humaner T-Lymphozyten

In der Untersuchung der 14 AML-Proben in den NSG-Mäusen fiel neben einem Anwachsen CD33⁺CD45⁺-Zellen bei sieben untersuchten Leukämien ein Nachweis von CD3⁺CD45⁺-Zellen auf. Dabei handelte es sich um humane T-Lymphozyten, die in den jeweiligen Leukämiegruppen in 3,5 % bis 100,0 % der Versuchstiere nachweisbar waren. Ein gleichzeitiger Nachweis humaner Leukämiezellen war in den

5. Diskussion

meisten Zellen vorhanden, jedoch erfolgte bei MZ237 ein alleiniges Auswachsen der T-Zellen, während in den Versuchstieren bei MZ683 entweder CD3⁺- oder CD33⁺-Zellen in der CD45⁺-Population vorhanden waren.

Im Kinetikversuch der MZ308 wurde nachgewiesen, dass es sich bei diesen T-Zellen sowohl um CD4⁺-T-Helferzellen also auch CD8⁺-zytotoxische T-Lymphozyten handelt, wobei die Anzahl ersterer in den meisten Fällen überwog. Überraschenderweise war dieses T-Zell-Auswachsen ein Phänomen der Tiere, denen hohe Zelldosen (5×10^6 und 10^7 Zellen) der Leukämie transplantiert worden waren und war sowohl im murinen Knochenmark als auch im Blut und in der Milz der Mäuse feststellbar. Während in der vierten Woche noch kein Anhalt für das Vorhandensein von T-Lymphozyten in den Tieren messbar war, konnten sie in der achten Woche registriert werden. Alle Tiere, die 5×10^6 Zellen sowie 10^7 Zellen injiziert bekamen, sind bis zur zwölften Woche gestorben, während die anderen Mäuse keine Anzeichen von Krankheit zeigten. Der Exitus letalis der Tiere ist vermutlich bedingt durch das Auswachsen der humanen T-Zellen, die im murinen Organismus eine Immunreaktion im Sinne einer GvHD auslösen. Aufgrund des beobachteten Auftretens der T-Lymphozyten in der xenotransplantierten Maus, wird vermutet, dass ihr Erscheinen sowohl konzentrationsabhängig als auch zeitabhängig ist. Bemerkenswert ist ebenfalls das Phänomen, dass in den meisten Mäusen, in denen ein Wachstum lymphatischer Zellen beobachtet wurde, das Knochenmarkengraftment der Leukämie größer war, als in Mäusen, in denen lediglich leukämische Zellen nachgewiesen wurden.

Sanchez und Kollegen beschrieben in ihrer Arbeit ebenfalls ein Auswachsen humaner T-Lymphozyten. Durch sekundäre Transplantation des Knochenmarks der von T-Zellen befallenen Mäuse, konnten sie nachweisen, dass die T-Zellen in ihrer differenzierten Form aus den injizierten Leukämieproben der Patienten stammten und nicht aus Stammzellen der lymphatischen Reihe hervorgingen, die in der Maus entgraftet sind (120). Risueño et al. berichten in ihren Versuchen ebenfalls von einem Nachweis humaner T-Lymphozyten in einigen xenotransplantierten NSG-Mäusen. Aufgrund des Nachweises ihrer Monoklonalität, schrieben sie die T-Zellen dem Ansiedeln lymphatischer Zellen zu (129), was jedoch zu den von Sanchez

5. Diskussion

beschriebenen nichtmöglichen sekundären Transplantation der T-Lymphozyten kontrovers ist.

Ein Auswachsen humaner T-Lymphozyten bei xenotransplantierten Mäusen ist bei NOD-scid-Mäusen bisher noch nicht beschrieben worden (13, 121, 122, 128, 140, 141), es handelt sich hierbei offenbar um ein Phänomen, das bei Tieren des NSG-Stamms auftritt.

5.6 Einfluss der T-Zell-Depletion auf das Transplantat

Während der Kinetikerstellung für MZ308 sind sechs Versuchstiere gestorben, was vermutlich dem Einfluss der ausgewachsenen humanen T-Lymphozyten zuzuschreiben ist. Um die Letalität der xenotransplantierten Mäuse zu erniedrigen wurden zwei Verfahren getestet und miteinander verglichen, die ein T-Zell-Wachstum in den NSG-Mäusen verhindern sollen, ohne ein Engraftment der Leukämiezellen zu gefährden. Die zur Auswahl stehenden Calcineurininhibitoren Cyclosporin A und Tacrolimus, sowie das Immunsuppressivum Mycophenolat-Mofetil wurden zu diesem Zweck in gesunden NSG-Mäusen getestet. Cyclosporin A zeigte die niedrigste toxizitätsbedingte Sterblichkeit in den Versuchstieren und wurde somit als verträglichstes Medikament ausgewählt. Nachdem seine T-Zell-inhibierende Wirkung in mit Phytohämagglutinin stimulierten Leukämiekulturen verifiziert worden war, wurden mit MZ308 transplantierte Mäuse über einen Zeitraum von zwei Wochen regelmäßig mit Cyclosporin A behandelt. Am Ende des Versuchs sind 71,4 % der Versuchstiere gestorben, die restlichen Tiere zeigten keinen Anhalt für T-Zell-Wachstum, während in allen Kontrollen humane T-Lymphozyten nachweisbar waren.

Die zweite Methode um ein Wachstum der CD3⁺-Zellen zu verhindern erfolgte durch eine magnetische CD3-Depletion der MZ308-Transplantate mit anschließender Injektion der Zellen. Alle eingesetzten Versuchstiere haben ohne besondere Vorkommnisse den gesamten Zeitraum des Experiments überlebt. Am Ende des Versuchs konnte in keiner NSG-Maus ein Vorhandensein humaner T-Lymphozyten nachgewiesen werden.

5. Diskussion

Vergleicht man die beiden angewandten Verfahren, so stellt sich die CD3-Depletion mittels MACS-Technologie als das deutlich schonendere dar, was sich in einer Letalität von 0 % der Mäuse äußerte. Im Gegensatz zu den Cyclosporin A-Injektionen ist der zeitliche Aufwand bedeutend geringer, da die Depletion pro injizierter AML-Probe lediglich einmal vor der Transplantation durchgeführt werden muss, während die Medikamentengabe über mehrere Wochen bei jedem Tier einzeln erfolgt. In Bezug auf die Effektivität sind die untersuchten Verfahren gleich, da beide scheinbar äußerst wirksam ein Auswachsen humaner T-Zellen verhindern.

5.7 Bedeutung der T-Lymphozyten für das Engraftment

Während sowohl durch die medikamentöse Therapie mit Cyclosporin A, als auch durch die CD3-Depletion des Transplantats vor der Injektion erfolgreich ein Verhindern des Auswachsens humaner T-Lymphozyten gelungen ist, erzielten die beiden Anwendungen einen bemerkenswerten Einfluss auf das Engraftmentverhalten der Leukämie: Obwohl 28,6 % der Tiere ein normales Verteilungs- und Wachstumsmuster mit primärer Besiedlung im murinen Knochenmark, gefolgt von AML-Zellen in Milz und Blut zeigten, so war bei den restlichen 71,4 % das Knochenmark frei von humanen leukämischen Zellen. Zusätzlich war der durchschnittliche Anteil von CD33⁺CD45⁺-Zellen in der Milz bedeutend größer als in der Vergleichsgruppe, was auf die Vermutung schließen lässt, dass sich aufgrund eines gescheiterten Homings das Engraftment vom Knochenmark in die Milz verlagert hat. Offenbar spielen die im Transplantat befindlichen T-Lymphozyten eine Rolle beim Homingvorgang der Leukämiezellen ins Knochenmark, sei es durch Zerstörung der murinen Zellen des Knochenmarks im Sinne einer GvHD-ähnlichen Reaktion, durch Versorgung der AML-Zellen mit Zytokinen oder auf eine andere Art und Weise.

Eventuell lässt sich dieses Phänomen für die Transplantation von nicht-engraftenden Leukämien nutzen, indem jedem Transplantat Mengen an humanen T-Lymphozyten beigefügt werden, die weder die Leukämiezellen angreifen, noch das Leben der

5. Diskussion

Maus gefährden. Primär gilt es jedoch die Funktion der humanen T-Lymphozyten beim Vorgang des Engraftments zu analysieren.

6. Zusammenfassung

Die akute myeloische Leukämie stellt 180 Jahre nach der Erstbeschreibung immer noch ein Krankheitsbild dar, welches schwierig zu therapieren ist. Diese maligne Neoplasie resultiert aus einer entarteten Stammzelle der myeloischen Reihe, welche sich unentwegt teilt und ständig funktionsunfähige, unreife Blasten bildet, welche die Zellen des Knochenmarks verdrängen und ins periphere Blut auswandern. Sowohl die unterschiedliche Zellherkunft, als auch zytogenetische Aberrationen und molekulargenetische Mutationen sorgen für eine große Diversität der Erkrankung. In der Therapie kommen Chemotherapeutika zum Einsatz, welche die Leukämie in eine komplette Remission bringen sollen. Der einzige kurative Ansatz besteht aus der allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation. Abgesehen von den gewünschten kurativen Effekten, induzieren die im Transplantat befindlichen Spender-T-Lymphozyten ebenfalls die Transplantat-gegen-Wirt Erkrankung – eine Hauptursache von Mortalität und Morbidität nach erfolgter allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation. Da bei vielen Patienten aufgrund ihres Alters und ihrer Begleiterkrankungen eine Transplantation nicht tolerieren und da viele akuten myeloischen Leukämien trotz Chemotherapie progredient sind, schlägt die Therapie fehl und es gibt keine Chance auf Heilung.

Zur Erforschung der pathologischen Prozesse der akuten myeloischen Leukämie sowie für die Entwicklung neuer Therapiekonzepte bedarf es stabiler Tiermodelle, die die maligne Erkrankung des Menschen darstellen können. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Engraftments humaner primärer akuter myeloischer Leukämien in immuninkompetenten NSG-Mäusen. Die Untersuchungen zeigten, dass lediglich 61,5% der getesteten Leukämien in den Versuchstieren nach der Xenotransplantation nachgewiesen werden konnten. Die Gründe hierfür sind noch nicht ausreichend geklärt, beinhalten jedoch vermutlich Elemente des Homings, des Überlebens der Zelle in der fremden murinen Knochenmarknische, der Abwesenheit spezifischer humaner Wachstumsfaktoren, sowie intrinsische Unterschiede unter den verschiedenen Leukämieproben. Leukämien, die mit einer schlechten Prognose beim Patienten verbunden sind, wachsen in den Tieren stärker an. In den Versuchen konnte gezeigt werden, dass Leukämien mit einer Längenmutation des FLT3-

6. Zusammenfassung

Rezeptors eher häufiger in den NSG-Mäusen anwachsen, als wenn diese Mutation fehlt. Die Analyse der erstellten Wachstumskinetiken zweier Leukämien ergab, dass die Höhe des Engraftments in den einzelnen Organen sowohl von der transplantierten Zellmenge, als auch von der Höhe der angesetzten Versuchszeit abhängt. Zudem wurde ein Wachstum humaner T-Lymphozyten in den xenotransplantierten Mäusen beobachtet, welches sowohl mit einem höheren Engraftment der Leukämie in der Maus verbunden war, als auch mit einer höheren Tiersterblichkeit vergesellschaftet war.

Zum Verhindern dieses Wachstums wurden zwei unterschiedliche Methoden angewendet und miteinander verglichen. Dabei erzielten sowohl die medikamentöse Behandlung der Tiere mit dem Calcineurininhibitor Cyclosporin A, als auch die CD3-Depletion der Leukämie vor der Transplantation ein T-Zell-freies Wachstum in den Mäusen, letzteres erwies sich jedoch als das schonendere Verfahren. In den T-Zell-freien Tieren konnte bei dem Großteil der Tiere kein Engraftment im Knochenmark festgestellt werden, was auf einen positiven Einfluss der humanen T-Lymphozyten beim Vorgang des Engraftments schließen lässt.

7. Literaturverzeichnis

1. Cumano A, Godin I. Ontogeny of the Hematopoietic System. *Annu. Rev. Immunol.* 2007; 25 (1): 745–85.
2. Mikkola HKA. The journey of developing hematopoietic stem cells. *Development.* 2006; 133 (19): 3733–44.
3. Fehling HJ. Tracking mesoderm induction and its specification to the hemangioblast during embryonic stem cell differentiation. *Development.* 2003; 130 (17): 4217–27.
4. Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science.* 1996; 273 (5272): 242–5.
5. Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell.* 2000; 100 (1): 157–68.
6. Watowich SS, Wu H, Socolovsky M, Klingmuller U, Constantinescu SN, Lodish HF. Cytokine receptor signal transduction and the control of hematopoietic cell development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 1996; 12: 91–128.
7. Mora-Garcia P, Cheng J, Crans-Vargas HN, Countouriotis A, Shankar D, Sakamoto KM. Transcriptional regulators and myelopoiesis: the role of serum response factor and CREB as targets of cytokine signaling. *Stem Cells.* 2003; 21 (2): 123–30.
8. Passegué E, Jamieson CHM, Ailles LE, Weissman IL. 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: 11842–9.
9. Zhou H, Yang X, Tao L, Chang Y, Dai R. Characterization of human embryonic stem cell-derived hematopoietic progenitor phenotype. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Animal.* 2010; 46 (9): 733–7.
10. Vodyanik MA. Leukosialin (CD43) defines hematopoietic progenitors in human embryonic stem cell differentiation cultures. *Blood.* 2006; 108 (6): 2095–105.
11. Ogawa M. Changing phenotypes of hematopoietic stem cells. *Exp. Hematol.* 2002; 30 (1): 3–6.
12. Laird DJ, Andrian UH von, Wagers AJ. Stem Cell Trafficking in Tissue Development, Growth, and Disease. *Cell.* 2008; 132 (4): 612–30.
13. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* 1997; 3 (7): 730–7.
14. Lessard J, Sauvageau G. Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. *Nature.* 2003; 423 (6937): 255–60.
15. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature.* 1994; 367 (6464): 645–8.
16. Velpeau A. Sur la resorption du puseat sur l'altération du sang dans les maladies clinique de persection nenemant. *Rev Med.* 1827 (2): 216.

7. Literaturverzeichnis

17. Virchow RL. Weisses Blut. N.Notiz.Geb.Natur.u Heilk. 1845 (36): 151–6.
18. Hayat MJ, Howlader N, Reichman ME, Edwards BK. Cancer statistics, trends, and multiple primary cancer analyses from the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program. *Oncologist*. 2007; 12 (1): 20–37.
19. Austin H, Delzell E, Cole P. Benzene and leukemia. A review of the literature and a risk assessment. *Am. J. Epidemiol.* 1988; 127 (3): 419–39.
20. Cole M, Strair R. Acute myelogenous leukemia and myelodysplasia secondary to breast cancer treatment: case studies and literature review. *Am. J. Med. Sci.* 2010; 339 (1): 36–40.
21. Bizzozero OJ, Johnson KG, Ciocco A. Radiation-related leukemia in Hiroshima and Nagasaki, 1946-1964. I. Distribution, incidence and appearance time. *N. Engl. J. Med.* 1966; 274 (20): 1095–101.
22. Yoshinaga S, Mabuchi K, Sigurdson AJ, Doody MM, Ron E. Cancer risks among radiologists and radiologic technologists: review of epidemiologic studies. *Radiology*. 2004; 233 (2): 313–21.
23. Rabson AB. Trisomy 21 leukemias: finding the hits that matter. *Oncogene*. 2010; 29 (46): 6099–101.
24. Keung Y, Buss D, Chauvenet A, Pettenati M. Hematologic malignancies and Klinefelter syndrome. a chance association? *Cancer Genet. Cytogenet.* 2002; 139 (1): 9–13.
25. Audeh MW. MDS and secondary AML: an evolutionary perspective. *Cancer Treat. Res.* 2001; 108: 267–78.
26. Mesa RA, Li C, Ketterling RP, Schroeder GS, Knudson RA, Tefferi A. Leukemic transformation in myelofibrosis with myeloid metaplasia: a single-institution experience with 91 cases. *Blood*. 2005; 105 (3): 973–7.
27. Finazzi G, Caruso V, Marchioli R, Capnist G, Chisesi T, Finelli C et al. Acute leukemia in polycythemia vera: an analysis of 1638 patients enrolled in a prospective observational study. *Blood*. 2005; 105 (7): 2664–70.
28. Harris JW, Kosciak R, Lazarus HM, Eshleman JR, Medof ME. Leukemia arising out of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Leuk. Lymphoma*. 1999; 32 (5-6): 401–26.
29. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br. J. Haematol.* 1976; 33 (4): 451–8.
30. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*. 2002; 100 (7): 2292–302.
31. Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, Walker H, Chatters S, Goldstone AH et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood*. 2010; 116 (3): 354–65.

7. Literaturverzeichnis

32. Grimwade D, Hills RK. Independent prognostic factors for AML outcome. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009: 385–95.
33. Breems DA, van Putten WLJ, Greef GE de, van Zelderen-Bhola SL, Gerssen-Schoorl KBJ, Mellink CHM et al. Monosomal karyotype in acute myeloid leukemia: a better indicator of poor prognosis than a complex karyotype. *J. Clin. Oncol*. 2008; 26 (29): 4791–7.
34. Stone RM, O'Donnell MR, Sekeres MA. Acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2004: 98–117.
35. Birg F, Courcoul M, Rosnet O, Bardin F, Pébusque MJ, Marchetto S et al. Expression of the FMS/KIT-like gene FLT3 in human acute leukemias of the myeloid and lymphoid lineages. *Blood*. 1992; 80 (10): 2584–93.
36. Pabst T, Mueller BU, Zhang P, Radomska HS, Narravula S, Schnittger S et al. Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein-alpha (C/EBPalpha), in acute myeloid leukemia. *Nat. Genet*. 2001; 27 (3): 263–70.
37. Döhner K, Schlenk RF, Habdank M, Scholl C, Rücker FG, Corbacioglu A et al. Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood*. 2005; 106 (12): 3740–6.
38. Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, Larson DE, McLellan MD, Chen K et al. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N. Engl. J. Med*. 2009; 361 (11): 1058–66.
39. Ley TJ, Ding L, Walter MJ, McLellan MD, Lamprecht T, Larson DE et al. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med*. 2010; 363 (25): 2424–33.
40. Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2010; 115 (3): 453–74.
41. Fernandez HF. New trends in the standard of care for initial therapy of acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2010; 2010: 56–61.
42. Zander AR, Bacher U, Finke J. Allogeneic stem cell transplantation in acute myeloid leukemia: establishment of indications on the basis of individual risk stratification. *Dtsch Arztebl Int*. 2008; 105 (39): 663–9.
43. Rubnitz JE, Gibson B, Smith FO. Acute myeloid leukemia. *Hematol. Oncol. Clin. North Am*. 2010; 24 (1): 35–63.
44. Sanz MA, Lo-Coco F. Modern approaches to treating acute promyelocytic leukemia. *J. Clin. Oncol*. 2011; 29 (5): 495–503.
45. Kessinger A. Autologous and allogeneic transplantation with peripheral blood stem cells. *Prog. Clin. Biol. Res*. 1992; 377: 603-10; discussion 611-3.
46. Mathe G, Jammet H, Pendic B, Schwarzenberg L, Duplan JF, Maupin B et al. Transfusions et greffes de moelle osseuse homologue chez des humains irradiés à haute dose accidentellement. *Rev Fr Etud Clin Biol*. 1959; 4 (3): 226–38.

7. Literaturverzeichnis

47. Thomas ED, Lochte HL, Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N. Engl. J. Med.* 1957; 257 (11): 491–6.
48. Gratwohl A, Baldomero H, Aljurf M, Pasquini MC, Bouzas LF, Yoshimi A et al. Hematopoietic stem cell transplantation: a global perspective. *JAMA.* 2010; 303 (16): 1617–24.
49. Hołowiecki J. Indications for hematopoietic stem cell transplantation. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 2008; 118 (11): 658–63.
50. Daikeler T, Hügler T, Farge D, Andolina M, Gualandi F, Baldomero H et al. Allogeneic hematopoietic SCT for patients with autoimmune diseases. *Bone Marrow Transplant.* 2009; 44 (1): 27–33.
51. Buchholz S, Dammann E, Koenecke C, Stadler M, Franzke A, Blasczyk R et al. Allogeneic stem cell transplantation from related and unrelated donors for aplastic anaemia in adults--a single-centre experience. *Ann. Hematol.* 2008; 87 (7): 551–6.
52. Bacher U, Haferlach C, Kröger N, Schnittger S, Kern W, Wiedemann B et al. Diagnostic tools in the indications for allogeneic stem cell transplantation in myelodysplastic syndromes. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2010; 16 (1): 1–11.
53. Horton R, Wilming L, Rand V, Lovering RC, Bruford EA, Khodiyar VK et al. Gene map of the extended human MHC. *Nat. Rev. Genet.* 2004; 5 (12): 889–99.
54. Jeras M. The role of in vitro alloreactive T-cell functional tests in the selection of HLA matched and mismatched haematopoietic stem cell donors. *Transpl. Immunol.* 2002; 10 (2-3): 205–14.
55. Buckner CD, Clift RA, Sanders JE, Stewart P, Bensinger WI, Doney KC et al. Marrow harvesting from normal donors. *Blood.* 1984; 64 (3): 630–4.
56. Lane TA. Allogeneic marrow reconstitution using peripheral blood stem cells: the dawn of a new era. *Transfusion.* 1996; 36 (7): 585–9.
57. Bishop MR, Tarantolo SR, Jackson JD, Anderson JR, Schmit-Pokorny K, Zacharias D et al. Allogeneic-blood stem-cell collection following mobilization with low-dose granulocyte colony-stimulating factor. *J. Clin. Oncol.* 1997; 15 (4): 1601–7.
58. Ruggeri A, Ciceri F, Gluckman E, Labopin M, Rocha V. Alternative donors hematopoietic stem cells transplantation for adults with acute myeloid leukemia: Umbilical cord blood or haploidentical donors? *Best Pract Res Clin Haematol.* 2010; 23 (2): 207–16.
59. Alyea EP, Kim HT, Ho V, Cutler C, DeAngelo DJ, Stone R et al. Impact of conditioning regimen intensity on outcome of allogeneic hematopoietic cell transplantation for advanced acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2006; 12 (10): 1047–55.
60. Shimoni A, Hardan I, Shem-Tov N, Yeshurun M, Yerushalmi R, Avigdor A et al. Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation in AML and MDS using myeloablative versus reduced-intensity conditioning: the role of dose intensity. *Leukemia.* 2006; 20 (2): 322–8.

7. Literaturverzeichnis

61. Forman SJ. What is the role of reduced-intensity transplantation in the treatment of older patients with AML? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009: 406–13.
62. Mattsson J, Ringdén O, Storb R. Graft failure after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant*. 2008; 14 (1 Suppl 1): 165–70.
63. Copelan EA. Hematopoietic stem-cell transplantation. *N. Engl. J. Med*. 2006; 354 (17): 1813–26.
64. DeLeve LD, Shulman HM, McDonald GB. Toxic injury to hepatic sinusoids: sinusoidal obstruction syndrome (veno-occlusive disease). *Semin. Liver Dis*. 2002; 22 (1): 27–42.
65. Barnes DW, Loutit JF, Micklem HS. "Secondary disease" of radiation chimeras: a syndrome due to lymphoid aplasia. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 1962; 99: 374–85.
66. Simonsen M. Graft versus host reactions and their possible implications in man. *Bibl Haematol*. 1965; 23: 115–21.
67. Billingham RE. The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey Lect*. 1966; 62: 21–78.
68. Sullivan KM, Mori M, Sanders J, Siadak M, Witherspoon RP, Anasetti C et al. Late complications of allogeneic and autologous marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 1992; 10 Suppl 1: 127–34.
69. Goker H, Haznedaroglu IC, Chao NJ. Acute graft-vs-host disease: pathobiology and management. *Exp. Hematol*. 2001; 29 (3): 259–77.
70. Jacobsohn DA, Vogelsang GB. Acute graft versus host disease. *Orphanet J Rare Dis*. 2007; 2: 35.
71. Xun CQ, Thompson JS, Jennings CD, Brown SA, Widmer MB. Effect of total body irradiation, busulfan-cyclophosphamide, or cyclophosphamide conditioning on inflammatory cytokine release and development of acute and chronic graft-versus-host disease in H-2-incompatible transplanted SCID mice. *Blood*. 1994; 83 (8): 2360–7.
72. Ferrara JL, Levy R, Chao NJ. Pathophysiologic mechanisms of acute graft-vs.-host disease. *Biol. Blood Marrow Transplant*. 1999; 5 (6): 347–56.
73. Chao NJ. Graft-versus-host disease: the viewpoint from the donor T cell. *Biol. Blood Marrow Transplant*. 1997; 3 (1): 1–10.
74. Beatty PG, Hansen JA, Longton GM, Thomas ED, Sanders JE, Martin PJ et al. Marrow transplantation from HLA-matched unrelated donors for treatment of hematologic malignancies. *Transplantation*. 1991; 51 (2): 443–7.
75. Weisdorf D, Hakke R, Blazar B, Miller W, McGlave P, Ramsay N et al. Risk factors for acute graft-versus-host disease in histocompatible donor bone marrow transplantation. *Transplantation*. 1991; 51 (6): 1197–203.
76. den Haan JM, Sherman NE, Blokland E, Huczko E, Koning F, Drijfhout JW et al. Identification of a graft versus host disease-associated human minor histocompatibility antigen. *Science*. 1995; 268 (5216): 1476–80.

7. Literaturverzeichnis

77. Ferrara JLM, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet*. 2009; 373 (9674): 1550–61.
78. Sun Y, Tawara I, Toubai T, Reddy P. Pathophysiology of acute graft-versus-host disease: recent advances. *Transl Res*. 2007; 150 (4): 197–214.
79. Johnson ML, Farmer ER. Graft-versus-host reactions in dermatology. *J. Am. Acad. Dermatol*. 1998; 38 (3): 369-92; quiz 393-6.
80. Martin PJ, McDonald GB, Sanders JE, Anasetti C, Appelbaum FR, Deeg HJ et al. Increasingly frequent diagnosis of acute gastrointestinal graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant*. 2004; 10 (5): 320–7.
81. McDonald GB. Review article: management of hepatic disease following haematopoietic cell transplant. *Aliment. Pharmacol. Ther*. 2006; 24 (3): 441–52.
82. Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P, Klingemann HG, Beatty P, Hows J et al. 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. *Bone Marrow Transplant*. 1995; 15 (6): 825–8.
83. Storb R, Deeg HJ, Fisher L, Appelbaum F, Buckner CD, Bensinger W et al. Cyclosporine v methotrexate for graft-v-host disease prevention in patients given marrow grafts for leukemia: long-term follow-up of three controlled trials. *Blood*. 1988; 71 (2): 293–8.
84. Socié G, Schmoor C, Bethge WA, Ottinger HD, Stelljes M, Zander AR et al. Chronic graft-versus-host disease: long-term results from a randomized trial on GvHD prophylaxis with or without anti-T-cell globulin ATG-fresenius. *Blood*. 2011.
85. Ruutu T, Niederwieser D, Gratwohl A, Apperley JF. A survey of the prophylaxis and treatment of acute GVHD in Europe: a report of the European Group for Blood and Marrow, Transplantation (EBMT). Chronic Leukaemia Working Party of the EBMT. *Bone Marrow Transplant*. 1997; 19 (8): 759–64.
86. Bacigalupo A, van Lint MT, Frassoni F, Podesta' M, Veneziano G, Avanzi G et al. High dose bolus methylprednisolone for the treatment of acute graft versus host disease. *Blut*. 1983; 46 (3): 125–32.
87. Sullivan KM, Agura E, Anasetti C, Appelbaum F, Badger C, Bearman S et al. Chronic graft-versus-host disease and other late complications of bone marrow transplantation. *Semin. Hematol*. 1991; 28 (3): 250–9.
88. Vogelsang GB. How I treat chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2001; 97 (5): 1196–201.
89. Westeneng AC, Hettinga Y, Lokhorst H, Verdonck L, van Dorp S, Rothova A. Ocular graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Cornea*. 2010; 29 (7): 758–63.
90. Griffith LM, Pavletic SZ, Lee SJ, Martin PJ, Schultz KR, Vogelsang GB. Chronic Graft-versus-Host Disease--implementation of the National Institutes of Health Consensus Criteria for Clinical Trials. *Biol. Blood Marrow Transplant*. 2008; 14 (4): 379–84.

7. Literaturverzeichnis

91. Wolff D, Gerbitz A, Ayuk F, Kiani A, Hildebrandt GC, Vogelsang GB et al. Consensus conference on clinical practice in chronic graft-versus-host disease (GVHD): first-line and topical treatment of chronic GVHD. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2010; 16 (12): 1611–28.
92. Wolff D, Schleuning M, Harsdorf S von, Bacher U, Gerbitz A, Stadler M et al. Consensus Conference on Clinical Practice in Chronic GVHD: Second-Line Treatment of Chronic Graft-versus-Host Disease. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2011; 17 (1): 1–17.
93. BURCHENAL JH, OETTGEN HF, HOLMBERG EA, HEMPHILL SC, REPERT JA. Effect of total-body irradiation on the transplantability of mouse leukemias. *Cancer Res.* 1960; 20: 425–30.
94. Zheng H, Matte-Martone C, Li H, Anderson BE, Venketesan S, Sheng Tan H et al. Effector memory CD4+ T cells mediate graft-versus-leukemia without inducing graft-versus-host disease. *Blood.* 2008; 111 (4): 2476–84.
95. Bonnet D, Warren EH, Greenberg PD, Dick JE, Riddell SR. CD8(+) minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T lymphocyte clones eliminate human acute myeloid leukemia stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999; 96 (15): 8639–44.
96. Pegram HJ, Ritchie DS, Smyth MJ, Wiernik A, Prince HM, Darcy PK et al. Alloreactive natural killer cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Leuk. Res.* 2011; 35 (1): 14–21.
97. Kolb H. Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. *Blood.* 2008; 112 (12): 4371–83.
98. Nash RA, Storb R. Graft-versus-host effect after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: GVHD and GVL. *Curr. Opin. Immunol.* 1996; 8 (5): 674–80.
99. den Haan JM, Meadows LM, Wang W, Pool J, Blokland E, Bishop TL et al. The minor histocompatibility antigen HA-1: a diallelic gene with a single amino acid polymorphism. *Science.* 1998; 279 (5353): 1054–7.
100. Pierce RA, Field ED, Mutis T, Golovina TN, Kap-Herr C von, Wilke M et al. The HA-2 minor histocompatibility antigen is derived from a diallelic gene encoding a novel human class I myosin protein. *J. Immunol.* 2001; 167 (6): 3223–30.
101. Bleakley M, Riddell SR. Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect. *Nat. Rev. Cancer.* 2004; 4 (5): 371–80.
102. Akatsuka Y, Nishida T, Kondo E, Miyazaki M, Taji H, Iida H et al. Identification of a polymorphic gene, BCL2A1, encoding two novel hematopoietic lineage-specific minor histocompatibility antigens. *J. Exp. Med.* 2003; 197 (11): 1489–500.
103. Stumpf AN, van der Meijden ED, van Bergen CAM, Willemze R, Falkenburg JHF, Griffioen M. Identification of 4 new HLA-DR-restricted minor histocompatibility antigens as hematopoietic targets in antitumor immunity. *Blood.* 2009; 114 (17): 3684–92.
104. Griffioen M, van der Meijden ED, Slager EH, Honders MW, Rutten CE, van Luxemburg-Heijs SAP et al. Identification of phosphatidylinositol 4-kinase type II beta

7. Literaturverzeichnis

- as HLA class II-restricted target in graft versus leukemia reactivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008; 105 (10): 3837–42.
105. Li J, Giver CR, Lu Y, Hossain MS, Akhtari M, Waller EK. Separating graft-versus-leukemia from graft-versus-host disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Immunotherapy.* 2009; 1 (4): 599–621.
106. Shultz LD, Ishikawa F, Greiner DL. Humanized mice in translational biomedical research. *Nat. Rev. Immunol.* 2007; 7 (2): 118–30.
107. Bosma GC, Custer RP, Bosma MJ. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature.* 1983; 301 (5900): 527–30.
108. Mosier DE, Gulizia RJ, Baird SM, Wilson DB. Transfer of a functional human immune system to mice with severe combined immunodeficiency. *Nature.* 1988; 335 (6187): 256–9.
109. McCune JM, Namikawa R, Kaneshima H, Shultz LD, Lieberman M, Weissman IL. The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function. *Science.* 1988; 241 (4873): 1632–9.
110. Lapidot T, Pflumio F, Doedens M, Murdoch B, Williams DE, Dick JE. Cytokine stimulation of multilineage hematopoiesis from immature human cells engrafted in SCID mice. *Science.* 1992; 255 (5048): 1137–41.
111. Shultz LD, Schweitzer PA, Christianson SW, Gott B, Schweitzer IB, Tennent B et al. Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *J. Immunol.* 1995; 154 (1): 180–91.
112. Hesselton RM, Greiner DL, Mordes JP, Rajan TV, Sullivan JL, Shultz LD. High levels of human peripheral blood mononuclear cell engraftment and enhanced susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection in NOD/LtSz-scid/scid mice. *J. Infect. Dis.* 1995; 172 (4): 974–82.
113. Lowry PA, Shultz LD, Greiner DL, Hesselton RM, Kittler EL, Tiarks CY et al. Improved engraftment of human cord blood stem cells in NOD/LtSz-scid/scid mice after irradiation or multiple-day injections into unirradiated recipients. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 1996; 2 (1): 15–23.
114. Pflumio F, Izac B, Katz A, Shultz LD, Vainchenker W, Coulombel L. Phenotype and function of human hematopoietic cells engrafting immune-deficient CB17-severe combined immunodeficiency mice and nonobese diabetic-severe combined immunodeficiency mice after transplantation of human cord blood mononuclear cells. *Blood.* 1996; 88 (10): 3731–40.
115. Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, Suzue K, Kawahata M, Hioki K et al. NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood.* 2002; 100 (9): 3175–82.
116. Sugamura K, Asao H, Kondo M, Tanaka N, Ishii N, Ohbo K et al. The interleukin-2 receptor gamma chain: its role in the multiple cytokine receptor complexes and T cell development in XSCID. *Annu. Rev. Immunol.* 1996; 14: 179–205.

7. Literaturverzeichnis

117. DiSanto JP, Müller W, Guy-Grand D, Fischer A, Rajewsky K. Lymphoid development in mice with a targeted deletion of the interleukin 2 receptor gamma chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1995; 92 (2): 377–81.
118. Knox C, Law V, Jewison T, Liu P, Ly S, Frolkis A et al. DrugBank 3.0: a comprehensive resource for 'omics' research on drugs. *Nucleic Acids Res.* 2011; 39 (Database issue): D1035-41.
119. Shultz LD, Lyons BL, Burzenski LM, Gott B, Chen X, Chaleff S et al. Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. *J. Immunol.* 2005; 174 (10): 6477–89.
120. Sanchez PV, Perry RL, Sarry JE, Perl AE, Murphy K, Swider CR et al. A robust xenotransplantation model for acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2009; 23 (11): 2109–17.
121. Pearce DJ, Taussig D, Zibara K, Smith L, Ridler CM, Preudhomme C et al. AML engraftment in the NOD/SCID assay reflects the outcome of AML: implications for our understanding of the heterogeneity of AML. *Blood.* 2006; 107 (3): 1166–73.
122. Ailles LE, Gerhard B, Kawagoe H, Hogge DE. Growth characteristics of acute myelogenous leukemia progenitors that initiate malignant hematopoiesis in nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice. *Blood.* 1999; 94 (5): 1761–72.
123. Trowbridge IS, Thomas ML. CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development. *Annu. Rev. Immunol.* 1994; 12: 85–116.
124. Nguyen DH, Ball ED, Varki A. Myeloid precursors and acute myeloid leukemia cells express multiple CD33-related Siglecs. *Exp. Hematol.* 2006; 34 (6): 728–35.
125. Riemann D, Kehlen A, Langner J. CD13--not just a marker in leukemia typing. *Immunol. Today.* 1999; 20 (2): 83–8.
126. Kraguljac N, Marisavljevic D, Jankovic G, Radosevic N, Pantic M, Donfrid M et al. Characterization of CD13 and CD33 surface antigen-negative acute myeloid leukemia. *Am. J. Clin. Pathol.* 2000; 114 (1): 29–34.
127. Feuring-Buske M, Gerhard B, Cashman J, Humphries RK, Eaves CJ, Hogge DE. Improved engraftment of human acute myeloid leukemia progenitor cells in beta 2-microglobulin-deficient NOD/SCID mice and in NOD/SCID mice transgenic for human growth factors. *Leukemia.* 2003; 17 (4): 760–3.
128. Lumkul R, Gorin N, Malehorn MT, Hoehn GT, Zheng R, Baldwin B et al. Human AML cells in NOD/SCID mice: engraftment potential and gene expression. *Leukemia.* 2002; 16 (9): 1818–26.
129. Risueño RM, Campbell CJV, Dingwall S, Levadoux-Martin M, Leber B, Xenocostas A et al. Identification of T-lymphocytic leukemia-initiating stem cells residing in a small subset of patients with acute myeloid leukemic disease. *Blood.* 2011.
130. Agliano A, Martin-Padura I, Mancuso P, Marighetti P, Rabascio C, Pruneri G et al. Human acute leukemia cells injected in NOD/LtSz-scid/IL-2Rgamma null mice

7. Literaturverzeichnis

- generate a faster and more efficient disease compared to other NOD/scid-related strains. *Int. J. Cancer*. 2008; 123 (9): 2222–7.
131. Chute JP. Stem cell homing. *Curr. Opin. Hematol.* 2006; 13 (6): 399–406.
132. Whetton AD, Graham GJ. Homing and mobilization in the stem cell niche. *Trends Cell Biol.* 1999; 9 (6): 233–8.
133. Williams B, Nilsson SK. Investigating the interactions between haemopoietic stem cells and their niche: methods for the analysis of stem cell homing and distribution within the marrow following transplantation. *Methods Mol. Biol.* 2009; 482: 93–107.
134. Dick JE, Lapidot T. Biology of normal and acute myeloid leukemia stem cells. *Int. J. Hematol.* 2005; 82 (5): 389–96.
135. Lane SW, Scadden DT, Gilliland DG. The leukemic stem cell niche: current concepts and therapeutic opportunities. *Blood*. 2009; 114 (6): 1150–7.
136. Ishikawa F, Yoshida S, Saito Y, Hijikata A, Kitamura H, Tanaka S et al. Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region. *Nat. Biotechnol.* 2007; 25 (11): 1315–21.
137. Quintana E, Shackleton M, Sabel MS, Fullen DR, Johnson TM, Morrison SJ. Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature*. 2008; 456 (7222): 593–8.
138. Sarry J, Murphy K, Perry R, Sanchez PV, Secreto A, Keefer C et al. Human acute myelogenous leukemia stem cells are rare and heterogeneous when assayed in NOD/SCID/IL2R γ c-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 2011; 121 (1): 384–95.
139. Martin-Padura I, Agliano A, Marighetti P, Porretti L, Bertolini F. Sex-related efficiency in NSG mouse engraftment. *Blood*. 2010; 116 (14): 2616–7.
140. Rombouts WJ, Martens AC, Ploemacher RE. Identification of variables determining the engraftment potential of human acute myeloid leukemia in the immunodeficient NOD/SCID human chimera model. *Leukemia*. 2000; 14 (5): 889–97.
141. Rombouts WJ, Blokland I, Löwenberg B, Ploemacher RE. Biological characteristics and prognosis of adult acute myeloid leukemia with internal tandem duplications in the *Flt3* gene. *Leukemia*. 2000; 14 (4): 675–83.
142. Monaco G, Konopleva M, Munsell M, Leysath C, Wang R, Jackson CE et al. Engraftment of acute myeloid leukemia in NOD/SCID mice is independent of CXCR4 and predicts poor patient survival. *Stem Cells*. 2004; 22 (2): 188–201.
143. Lapidot T, Kollet O. The essential roles of the chemokine SDF-1 and its receptor CXCR4 in human stem cell homing and repopulation of transplanted immune-deficient NOD/SCID and NOD/SCID/B2m(null) mice. *Leukemia*. 2002; 16 (10): 1992–2003.
144. Peled A, Petit I, Kollet O, Magid M, Ponomaryov T, Byk T et al. Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science*. 1999; 283 (5403): 845–8.

7. Literaturverzeichnis

145. Kahn J, Byk T, Jansson-Sjostrand L, Petit I, Shivtiel S, Nagler A et al. Overexpression of CXCR4 on human CD34+ progenitors increases their proliferation, migration, and NOD/SCID repopulation. *Blood*. 2004; 103 (8): 2942–9.
146. Wunderlich M, Chou F, Link KA, Mizukawa B, Perry RL, Carroll M et al. AML xenograft efficiency is significantly improved in NOD/SCID-IL2RG mice constitutively expressing human SCF, GM-CSF and IL-3. *Leukemia*. 2010; 24 (10): 1785–8.
147. Bahr L von, Sundberg B, Lönnies L, Sander B, Karbach H, Hägglund H et al. Long-Term Complications, Immunologic Effects, and Role of Passage for Outcome in Mesenchymal Stromal Cell Therapy. *Biol. Blood Marrow Transplant*. 2011.
148. Baron F, Storb R. Mesenchymal Stromal Cells: A New Tool against Graft-versus-Host Disease? *Biol. Blood Marrow Transplant*. 2011.
149. Herrmann R, Sturm M, Shaw K, Purtill D, Cooney J, Wright M et al. Mesenchymal stromal cell therapy for steroid-refractory acute and chronic graft versus host disease: a phase 1 study. *International journal of hematology*. 2011.
150. Malaisé M, Neumeier M, Botteron C, Döhner K, Reinhardt D, Schlegelberger B et al. Stable and reproducible engraftment of primary adult and pediatric acute myeloid leukemia in NSG mice. *Leukemia*. 2011; 25 (10): 1635–9.
151. Buss EC, Ho AD. Leukemia stem cells. *Int. J. Cancer*. 2011; 129 (10): 2328–36.

Danksagung

Danksagung

Lebenslauf

Lebenslauf

| | |
|-------------------|--|
| Name | Tomsitz |
| Vorname | Dirk |
| Geburtsdatum | 27.11.1985 |
| Geburtsort | Rodalben |
| 08/1992 – 06/1996 | Grundschule Winzeln/Gersbach/Windsberg |
| 08/1996 – 03/2005 | Leibniz Gymnasium Pirmasens, Abschluss mit Abitur |
| 03/2005 – 09/2005 | Studium der molekularen Biologie an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz |
| 10/2005 – 11/2011 | Studium der Humanmedizin an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz mit Abschluss Staatsexamen |
| 11/2011 | Erteilung der Approbation als Arzt |
| seit 02/2012 | wissenschaftlicher Mitarbeiter der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie an der Charité Universitätsmedizin Berlin |