

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Univ.-Prof. Dr. Eckhard Wolf

Angefertigt im
Labor für Stammzellphysiologie
III. Medizinische Klinik und Poliklinik
Klinikum Rechts der Isar
Technische Universität München
(PD Dr. Robert A.J. Oostendorp)

Etablierung der intrahepatischen Stammzelltransplantation bei neugeborenen Mäusen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Sylke Gitzelmann
aus Krefeld

München 2011

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Wolf

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Hermanns

Tag der Promotion:

30.07.2011

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I. Einleitung	1
II. Literaturübersicht	3
2.1 Das hämatopoetische System	3
2.1.1 Embryonale Hämatopoese	4
2.1.2 Adulte Hämatopoese	5
2.1.3 Hämatopoetische Stammzellen	5
2.1.4 Die Stammzellnische	7
2.2 Transplantationsversuche im Mausmodell	8
2.3 Akute myeloische Leukämie	11
2.3.1 Die Rolle von FLT3-ITD in der akuten myeloischen Leukämie	12
2.4 Retroviren	14
2.4.1 Gentransfer mit Hilfe retroviraler Vektoren	15
2.5 Grün fluoreszierendes Protein (GFP)	17
2.6 Zielsetzungen	17
III. Material und Methoden	19
3.1 Material	19
3.1.1 Mausstämme	19
3.1.2 Zelllinien	19
3.1.3 Bakterienstämme	20
3.1.4 Antikörper	20

3.1.5 Chemikalien	22
3.1.6. Medien und Puffer	24
3.1.7 Zytokine	28
3.1.8 Retrovirale Konstrukte	28
3.1.9 Verbrauchsmaterial	29
3.1.10 Geräte	30
3.2 Methoden	31
3.2.1 Euthanasierung der Spendermäuse	31
3.2.2 Isolation der Spenderzellen	31
3.2.2.1 Knochenmark	31
3.2.2.2 Milz	32
3.2.2.3 Fötale Leberzellen	33
3.2.2.4 Aufreinigung Lineage negativer Zellen	33
3.2.3 Transformation kompetenter E.coli Zellen	34
3.2.4 Plasmidisolierung aus transformierten Bakterien	35
3.2.5 Kultivierung und Passagierung der Phoenixzellen	35
3.2.6 Retrovirale Transfektion der Phoenixzellen und Infektion der Spenderzellen	35
3.2.7 Transplantationsmethoden	36
3.2.8 Sekundärtransplantation	38
3.2.9 Transplantationsmethoden Leukämiemodell	39
3.2.10 Blut- und Organanalysen	40

3.2.11 Analyse der Mäuse aus dem Leukämiemodell	40
3.2.12 Durchflusszytometrie	41
3.2.13 Färben der Zellen mit Antikörpern	42
3.2.14 Zellsortierung	43
3.2.15 Gesundheitliche Überwachung der Mäuse	43
IV. Ergebnisse	47
4.1 Etablierung einer neuen Transplantationsmethode bei der Maus	47
4.1.1 Praktikabilität	48
4.1.2 Überlebensrate der Mäuse	49
4.1.3 Differentialblutbild	50
4.1.4 Engraftment der transplantierten Zellen	54
4.2 Vergleich der langzeitrepopulierenden Stammzellen i.h. transplantierten Tiere mit denen i.v. transplantierten Tiere	67
4.2.1 Heraussortieren der Cd150+ LSKs	69
4.2.2 Differentialblutbild	71
4.2.3 Engraftment der transplantierten Zellen	72
4.3 Etablierung eines juvenilen Leukämiemodells	81
4.3.1 Transduktion der fötalen Leberzellen und Ermittlung der GFP+ Spenderzellen	84
4.3.2 Engraftment der GFP+ Spenderzellen, Differentialblutbild und klinisches Bild der Mäuse Woche 4 post Tx	85
4.3.3 Engraftment der GFP+ Spenderzellen, Differentialblutbild und klinisches Bild der Mäuse Woche 12 post Tx	86

4.3.4 Engraftment der GFP+ Spenderzellen, Differentialblutbild und klinisches Bild der Mäuse Woche 24 post Tx	88
V. Diskussion	96
5.1 Intrahepatische Transplantation bei neugeborenen Mäusen	96
5.1.1 Engraftment der Spenderzellen	96
5.1.2 Differenzierung der Spenderzellen in die verschiedenen Blutzelllinien und Vorhandensein hämatopoetischer Stammzellen im Knochenmark	99
5.2 Vergleich der langzeitrepopulierenden Stammzellen i.h. transplantierte Tiere mit denen i.v. transplantierte Tiere	101
5.2.1 Transplantation herausortierter Cd150+ LSKs	101
5.3 Etablierung eines juvenilen Leukämiemodells	104
5.4 Perspektiven für die Zukunft	106
5.5 Schlusswort	107
VI. Zusammenfassung	109
VII. Summary	111
VIII. Literaturverzeichnis	113
IX. Abkürzungsverzeichnis	118
X. Danksagung	120

I. Einleitung

Leukämien sind mit einem Anteil von ca. 1/3 die häufigsten Krebserkrankungen im Kindesalter. Die häufigste kindliche Leukämieform ist die Akute Lymphatische Leukämie (ALL), mit einer Inzidenz von 3,3 Erkrankungen/100.000 Einwohner (Deutschland) < 15 Jahre, gefolgt von der Akuten Myeloischen Leukämie (AML) mit einer Inzidenz von 0,7 Erkrankungen/100.000 Einwohner (Deutschland) < 15 Jahre. Häufigkeitsgipfel der AML bei Kindern sind die ersten beiden Lebensjahre und die Zeit zwischen dem 12. und 16. Lebensjahr. Weiterhin ist die AML die häufigste Leukämieform bei Säuglingen.

Seit vielen Jahren gibt es erfolgreich etablierte adulte Knochenmarktransplantationsmodelle der Maus, welche sich mit der Entstehung, den Ursachen und den Behandlungsmöglichkeiten der AML beschäftigen (Kelly, Liu et al. 2002; Gilliland 2003; Grundler, Miething et al. 2005). In diesen werden transduzierte Knochenmarkzellen 8-10 Wochen alter Spendermäuse intravenös (i.v.) in erwachsene Tiere transplantiert. Durch die Transduktion mit retroviralen Konstrukten können spezifisch Gene verändert werden, so dass die gezielte Untersuchung einer bestimmten Genveränderung oder -mutation möglich wird (Bernardi, Grisendi et al. 2002).

Es gibt jedoch bisher keine juvenilen Leukämiemodelle, die helfen, die Pathophysiologie juveniler Leukämien zu verstehen und zu erforschen. Es wird angenommen, dass bei kindlichen Leukämien eine onkogene Aktivierung bereits während der Embryogenese stattfindet, die sich nach der Geburt zu einer Leukämie entwickeln kann. Um diese Voraussetzungen nachahmen zu können,

ist es nötig, transduzierte fötale Stammzellen (hier aus der fötalen Leber) in neugeborene Tiere zu transplantieren.

In dieser Studie soll die Grundlage zur Etablierung eines juvenilen Leukämiemodells geschaffen werden, indem zunächst eine Transplantationsmethode für neugeborene Tiere etabliert wird (intrahepatische (i.h.) Transplantation) und deren Effizienz anschließend mit verschiedenen Parametern der bereits etablierten intravenösen Transplantationsmethode für erwachsene Tiere verglichen wird. Weiterhin werden die Qualität und das Selbsterneuerungspotential der Stammzellen aus den verschiedenen Methoden durch sekundäre Transplantation derselben miteinander verglichen. Abschließend wird ein bereits publiziertes Leukämiemodell mit FLT3-ITD für erwachsene Tiere (Grundler, Miething et al. 2005) in ein juveniles Modell umgewandelt, indem transduzierte fötale Leberzellen intrahepatisch in neugeborene Mäuse transplantiert werden.

II. Literaturübersicht

2.1. Das hämatopetische System

Alle zellulären Blutbestandteile entwickeln sich aus hämatopoetischen Stammzellen (HSCs), die sich bei adulten Säugetieren vorwiegend im Knochenmark von Sternum, Rippen, Schädelknochen, Wirbelkörpern, Beckenknochen, Humerus und Femur befinden.

Pluripotente hämatopoetische Stammzellen haben die Fähigkeit, sich entweder selbst zu erneuern oder Vorläuferzellen zu bilden, welche sich zu lymphatischen oder myeloischen Zellen differenzieren. Aus myeloischen Progenitorzellen entwickeln sich Granulozyten und Monozyten/Makrophagen sowie Erythrozyten und Thrombozyten. Aus lymphatischen Progenitorzellen entwickeln sich Lymphozyten, welche sich in B- und T-Lymphozyten untergliedern. Granulozyten, Monozyten/Makrophagen, B- und T-Lymphozyten gehören zum Immunsystem, dem biologischen Abwehrsystem der höheren Lebewesen, welches Gewebeschädigungen durch Krankheitserreger verhindert. Monozyten, welche die Vorläufer der im Gewebe lokalisierten Makrophagen und einem Teil der dendritischen Zellen sind, und Granulozyten fungieren als Hauptbestandteile des angeborenen Immunsystems. B- und T-Lymphozyten sind dagegen Teil des adaptiven Immunsystems. Beide Mechanismen besitzen einen zellulären und einen humoralen Anteil. Die humoralen Bestandteile bezeichnen verschiedene Plasmaproteine, welche passiv im Blut, der Lymph- und der Gewebeflüssigkeit zirkulieren. Die Aufgabe der Erythrozyten besteht darin, den in den Lungenkapillaren aufgenommenen Sauerstoff über das arterielle Blutgefäßsystem bis in die arteriellen Kapillaren der einzelnen Gewebe und

Organe des Körpers zu transportieren, wo er an die Zellen abgegeben wird. Das anfallende CO₂ transportieren sie anschließend über das venöse Blutsystem zurück zur Lunge. Die Fähigkeit, die beiden Gase zu binden und zu transportieren, verdanken die Erythrozyten dem Hämoglobin in ihrem Inneren. Thrombozyten spielen eine wichtige Rolle bei der Blutgerinnung, indem sie bei einer Gefäßverletzung innerhalb kürzester Zeit aggregieren und so einen ersten Wundverschluss herbeiführen. Die Aktivierung des plasmatischen Gerinnungssystems führt dann zu einer Konsolidierung des Verschlusses durch das bei der Gerinnung entstehende Fibrin. Durch ihr Potential zur Selbsterneuerung sind HSCs in der Lage, die Hämatopoese in einem Organismus ein Leben lang aufrecht zu erhalten (Akala and Clarke 2006).

2.1.1. Embryonale Hämatopoese

Die ersten hämatopoetischen Stammzellen werden bei Mausembryonen in der Aorta-Gonaden-Mesonephros-Region (AGM-Region) aus spezialisierten Endothelzellen (hemogenic endothelial cells) gebildet, welche die Aorta auskleiden (de Bruijn, Ma et al. 2002). Hier findet jedoch keine Differenzierung in reife Blutzellen statt. Weiterhin werden HSCs im Dottersack und in der Plazenta gebildet (Rhodes, Gekas et al. 2008). 11,5-12,5 Tage nach der Befruchtung wandern die HSCs aus der AGM-Region, dem Dottersack und der Plazenta über den Blutkreislauf in die fötale Leber (Mikkola and Orkin 2006). Hier kommt es für 5-6 Tage zu einer schnellen Vermehrung der HSCs und zu einer Differenzierung in verschiedene Progenitorzellen. Erst ein bis zwei Tage vor Ende der Trächtigkeit wandern die HSCs und die verschiedenen Progenitorzellen ins Knochenmark ein und reduzieren ihre Teilungsaktivität drastisch. Die fötale Milz ist wie die fötale Leber zeitweise ein

hämatopoetisches Organ; bei der Maus vom letzten Drittel der Trächtigkeit bis mehrere Wochen nach der Geburt. Hier findet allerdings weniger eine Vermehrung der HSCs oder der Progenitorzellen statt, sondern hauptsächlich eine Differenzierung zu reifen Blutzellen (Cumano and Godin 2007).

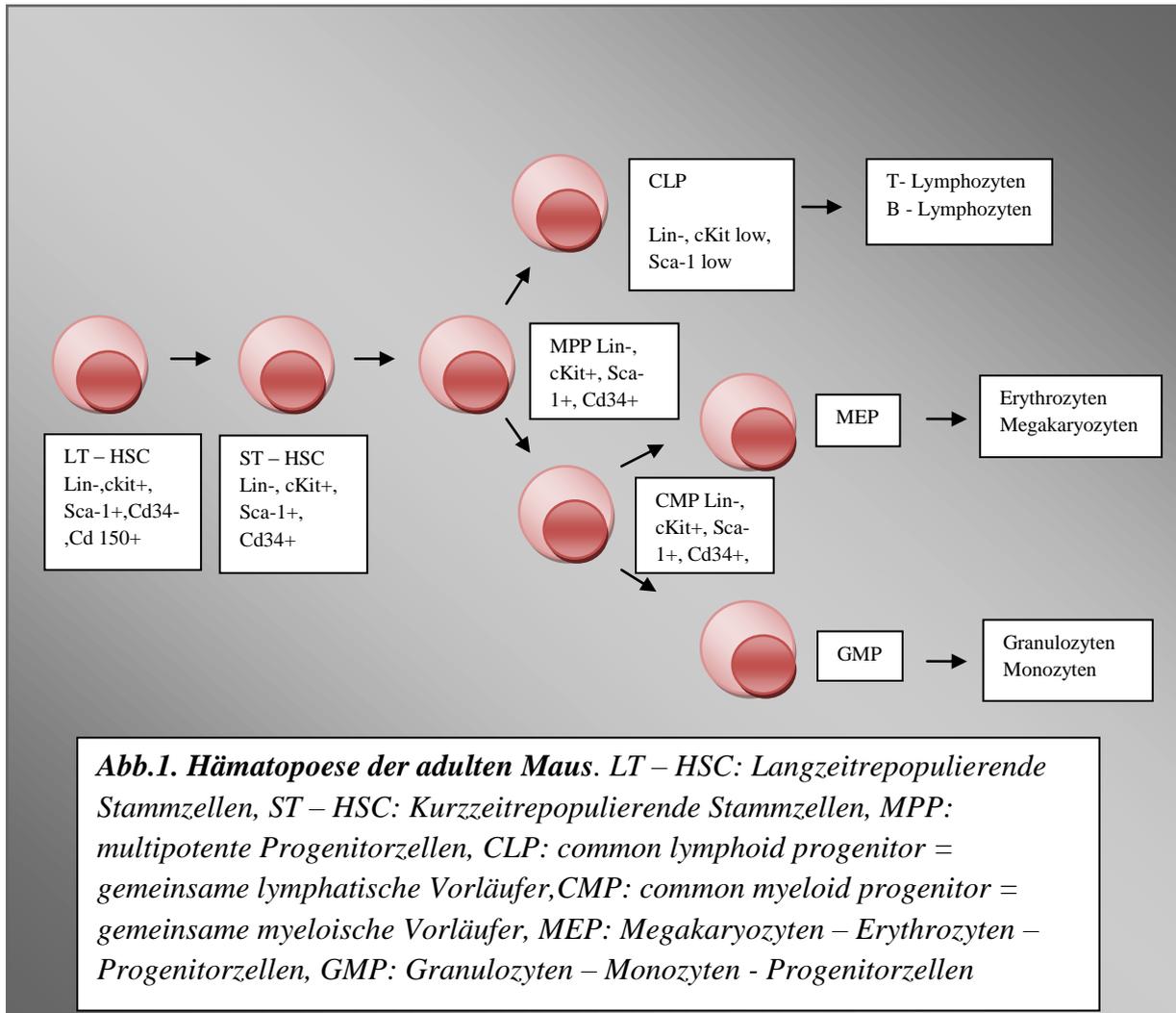
2.1.2. Adulte Hämatopoese

Die adulte Hämatopoese beginnt bereits ab dem Zeitpunkt der Geburt, sie wird jedoch so bezeichnet, um den Vorgang von der embryonalen Hämatopoese abzugrenzen. Die adulte Hämatopoese findet im Knochenmark statt. Wie bereits erwähnt entwickeln sich alle zellulären Blutbestandteile aus HSCs. Es gibt pluripotente Stammzellen, die in myeloische und lymphatische Zellen ausreifen können und schon weiter ausgereifte determinierte Progenitorzellen, die sich entweder zu myeloischen oder zu lymphatischen Zellen differenzieren. Nach dem Heranreifen im Knochenmark treten sie ins Blut über.

2.1.3. Hämatopoetische Stammzellen

Hämatopoetische Stammzellen können über die Anwesenheit (+) bzw. Abwesenheit (-) verschiedener Oberflächenmarker durch immunphänotypische Analyse voneinander unterschieden werden (Abb.1) und damit in die Stammzellhierarchie eingeordnet werden. In dieser Hierarchie stehen pluripotente Stammzellen mit uneingeschränkter Selbsterneuerungskapazität an der Spitze, danach erfolgt eine immer stärkere Determinierung der Zellen und die Selbsterneuerungskapazität nimmt ab. Bei hämatopoetischen Stammzellen fehlen die Oberflächenmarker Cd3, B220, Ter119, Gr-1 und Cd11b (Lin-), die

hauptsächlich auf reifen Blutzellen exprimiert werden, die Marker Sca1 und cKit werden hingegen stark exprimiert (LSK-Zellen) (Spangrude, Heimfeld et al. 1988). Bei LSK Zellen kann zwischen langzeitrepopulierenden Stammzellen (LRSZ) (Sca1+, cKit+, Cd34-, Cd150+), welche ganz oben in der Hierarchie der Stammzellen stehen (siehe Abb.1) und eine nicht limitierte Selbsterneuerungskapazität besitzen, und kurzzeitrepopulierenden Stammzellen (KRSZ) (Sca1+, cKit+, Cd34+), welche keine Selbsterneuerungskapazität mehr besitzen, unterschieden werden. Während sich die LRSZ in einer Art Ruhephase befinden und sich nur sehr selten teilen, teilen sich die aus ihnen entstehenden KRSZ häufiger und differenzieren zu multipotenten Progenitorzellen (MPP) (Lin-, Sca1+, cKit+), welche sich dann weiter zu CLPs (common lymphoid precursor = gemeinsame lymphatische Vorläufer) und CMPs (common myeloid precursor = gemeinsame myeloische Vorläufer) entwickeln. Während die LRSZ die Hämatopoese ein Leben lang aufrecht erhalten können, können die KRSZ dies nur über einige Wochen (Weissman, Anderson et al. 2001), da sie sich nicht selbst erhalten können.



2.1.4. Die Stammzellnische

Hämatopoetische Stammzellen befinden sich beim Adulten im Knochenmark in der Nähe der dem Endost angelagerten Osteoblasten (endostale Nische) (Nilsson, Johnston et al. 2001) oder in direkter Nachbarschaft zu Endothelzellen sinusoidaler Gefäße (perivaskuläre Nische) (Heissig, Hattori et al. 2002). Diese Zelle bilden eine sogenannte Mikroumgebung und werden als hämatopoetische Stammzellnische bezeichnet (Morrison and Spradling 2008). Diese Nische ist für die Selbsterneuerung und die Differenzierung der Stammzellen essentiell, da

die Anwesenheit bestimmter Oberflächenmoleküle und die Abgabe von Signalmolekülen Selbsterneuerung und Differenzierung regulieren. Diese Regulation ist für die Hämatopoese von höchster Bedeutung, da einerseits der Stammzellpool durch Selbsterneuerung erhalten werden muss, andererseits auch eine ausreichende Differenzierung stattfinden muss, um die Zahl aller hämatopoetischen Zellen konstant zu halten. Dies ist deshalb von Bedeutung, da die verschiedenen Blutzellen eine unterschiedliche Lebensdauer haben (Erythrozyten 30-120 Tage, Thrombozyten 3-10 Tage, Leukozyten wenige Tage bis mehrere Monate, je nach Zelltyp) und deshalb bei einem erwachsenen Menschen pro Tag Milliarden reife Blutzellen gebildet werden müssen (Laird, von Andrian et al. 2008). Dysregulationen, die das Überleben der Zellen oder deren Proliferation betreffen, können zu myeloproliferativen Erkrankungen oder Leukämien führen.

2.2. Transplantationsversuche im Mausmodell

Transplantationsversuche sind für die funktionale Untersuchung hämatopoetischer Stammzellen (HSCs) essentiell, da ihre Untersuchung im Gegensatz zu Progenitorzellen, die auch gut in Kolonie-Assays untersucht werden können, nur *in vivo* möglich ist (Metcalf 1989). Es wurde bereits gezeigt, dass die kongene Transplantation von Knochenmark (BMT = bone marrow transplantation) in eine letal ganzkörperbestrahlte Maus das hämatopoetische System der Empfängermaus ersetzen kann (Akashi, Traver et al. 2000; Reya, Morrison et al. 2001), und zwar mit vollständig funktionsfähigen Zellen aller Blutzelllinien (Domen and Weissman 1999). In der humanen Leukämieforschung werden besonders häufig Mausmodelle eingesetzt, um das Verhalten leukämischer Stammzellen zu untersuchen. Im Unterschied zur

normalen hämatopoetischen Stammzelle bildet die leukämische Stammzelle nur einen Teil der lebensnotwendigen Blutzellen und die entstehenden Zellen sind nicht funktionsfähig, da sie nicht vollständig ausdifferenzieren. Das Blut wird so mit großen Mengen unreifer Blutzellen überschwemmt, während die funktionsfähigen Zellen verdrängt werden. Ursache hierfür können genetische Veränderungen in der leukämischen Stammzelle sein, die zu einer Heraufregulierung von Onkogenen oder einer Herunterregulierung von Tumorsuppressorgenen führen. Im Mausmodell können spezifisch Gene verändert werden, so dass die gezielte Untersuchung einer bestimmten Genveränderung oder -mutation möglich ist (Bernardi, Grisendi et al. 2002). So konnte z.B. die bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) häufig vorkommende interne Tandemduplikation (ITD) der Fms-like Rezeptor Tyrosinkinase 3 (FLT3) im Mausmodell untersucht werden (Kelly, Liu et al. 2002) (siehe 2.3.1).

Die konventionelle Methode zur Knochenmarktransplantation ist die intravenöse (i.v.) Injektion von Knochenmarkzellen in die Schwanzvene oder die intravenöse retrobulbäre Injektion. Bei der retrobulbären Transplantation werden die Knochenmarkzellen in den retrobulbären Venenplexus appliziert. Diese Methode findet nur am narkotisierten Tier Anwendung. Nach der Injektion ins periphere Blut wandern die HSCs durch den Blutkreislauf ins Knochenmark und suchen dort ihre „Nische“, um sich niederzulassen. Dieser Prozess wird „Homing“ genannt. Es konnte gezeigt werden, dass HSCs in der Maus mit einer Effizienz von 90% engraften, jedoch nur 25 % der engrafteten HSCs an der Langzeithämatopoese beteiligt sind (Benveniste, Cantin et al. 2003). Es ist weiterhin bekannt, dass bei dieser Methode die Höhe des Engraftments der Spenderzellen von der Anzahl der transplantierten Zellen und der Höhe der Bestrahlung der Tiere abhängig ist (Goebel, Yoder et al. 2002). Hier konnten

Goebel *et al.* zeigen, dass das Engraftment bei einer letalen Bestrahlung der Tiere signifikant höher ist als bei einer subletalen Bestrahlung. Eine weitere, in der Literatur beschriebene Transplantationsmethode, ist die intramedulläre Transplantation, bei der die Spenderzellen direkt ins Knochenmark des Femur oder der Tibia transplantiert werden (Mazurier, Doedens et al. 2003). Diese Methode hat den Vorteil, dass die Stammzellen nicht erst durch den Blutkreislauf wandern müssen und dort eventuell in Lunge oder Leber verloren gehen, sondern direkt in ihre Nische transplantiert werden. Dies erlaubt die Transplantation und Untersuchung kleinerer Zellzahlen. In Xenotransplantationsmodellen wird mit dieser Methode der Homing-Defekt humaner Stammzellen umgangen.

Beide Methoden der Knochenmarktransplantation sind jedoch nur bei adulten Mäusen erfolgreich etabliert. Daher stellte sich die Frage, ob es Alternativen gibt, die auch bei juvenilen bzw. neugeborenen Mäusen Anwendung finden können. Eine solche Alternativmethode wäre für die Untersuchung der kindlichen Hämatopoese geeignet und könnte im nächsten Schritt zur Etablierung eines juvenilen Leukämiemodells führen.

Das **1. Ziel dieser Arbeit** war daher, eine alternative Methode zur Knochenmarktransplantation zu etablieren und mit der konventionellen Methode (in dieser Arbeit Injektion in die Schwanzvene) zu vergleichen. Als mögliche Alternative wurde die intrahepatische (i.h.) Injektion in neugeborene Mäuse untersucht (auf Basis von (Traggiai, Chicha et al. 2004)). Traggiai et al. zeigten in einem Xenotransplantationsmodell die vollständige *de novo* Synthese humaner B- und T-Zellen sowie dendritischer Zellen in Rag2^{-/-}-gammac^{-/-}-neugeborenen Mäusen. Diese Zellen sind schließlich in der Lage, eine kompetente Immunantwort in den Mäusen zu vermitteln. Daraus entstand die

Hypothese, dass mit dieser Methode in einem kongenen Transplantationsmodell eine Rekonstitution aller Blutzelllinien erreicht werden kann. Zu diesem Zweck wurden in dieser Arbeit 1-4 Tage alte Mäuse sublethal bestrahlt (3,5 Gray, KD2 Mevatron, (Siemens, Deutschland)) und die Spenderzellen in die durch die Haut gut sichtbare Leber transplantiert. Das **2. Ziel dieser Arbeit** war, die Qualität und die Selbsterneuerung der transplantierten Stammzellen aus beiden Methoden durch sekundäre Transplantation herausortierter Cd150+ LSKs (Lin-, cKit+, Sca-1+ Zellen) zu vergleichen.

2.3. Akute myeloische Leukämie

Der Begriff Leukämie bedeutet „weißes Blut“ und wurde 1845 von Prof. Virchow geprägt. (Virchow R. 1845) Er entstand aus der Beobachtung einer häufigen Vermehrung weißer Blutkörperchen bei betroffenen Patienten. Akute Leukämien sind maligne Erkrankungen, bei denen mehr als 30 % des Knochenmarkraumes aus unreifen, nicht funktionsfähigen Zellen (Blasten) besteht. Die akuten Leukämien lassen sich in 2 große Gruppen einteilen: Akute lymphatische Leukämien (ALL) und akute myeloische Leukämien. Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine maligne Erkrankung der Myelopoese, die durch klonale Vermehrung von myeloischen Vorläuferzellen entsteht und durch Differenzierungsstörung, verminderte Apoptose und gesteigerte Proliferationsaktivität gekennzeichnet ist. Sie tritt in Deutschland mit einer Inzidenz von etwa 3,7 Neuerkrankungen pro 100000 Einwohner/Jahr auf und ist überwiegend eine Erkrankung des höheren Lebensalters (medianes Alter bei Diagnosestellung: 68 Jahre) (Deschler and Lubbert 2006). 80% der akuten Leukämien im Erwachsenenalter sind akute myeloische Leukämien. Bei Kindern sind Leukämien mit einem Anteil von ca. einem Drittel die häufigsten Krebserkrankungen, 15 – 20 % der kindlichen Leukämien sind akute myeloische

Leukämien. Häufigkeitsgipfel bei Kindern sind die ersten beiden Lebensjahre sowie zwischen dem 12. und 16. Lebensjahr. Weiterhin ist die AML die häufigste Leukämieform bei Säuglingen.

2.3.1 Die Rolle von FLT3-ITD in der akuten myeloischen Leukämie

Die Fms-like tyrosin kinase 3 (FLT3) gehört zur Klasse 3 der Rezeptortyrosinkinasen (RTK), welche durch eine extrazelluläre Domäne, (bestehend aus 5 Immunglobulin-ähnlichen Domänen), eine transmembrane Domäne, eine juxtamembrane Domäne und eine zweigeteilte Kinasedomäne charakterisiert sind (Rosnet and Birnbaum 1993) (Abb.2).

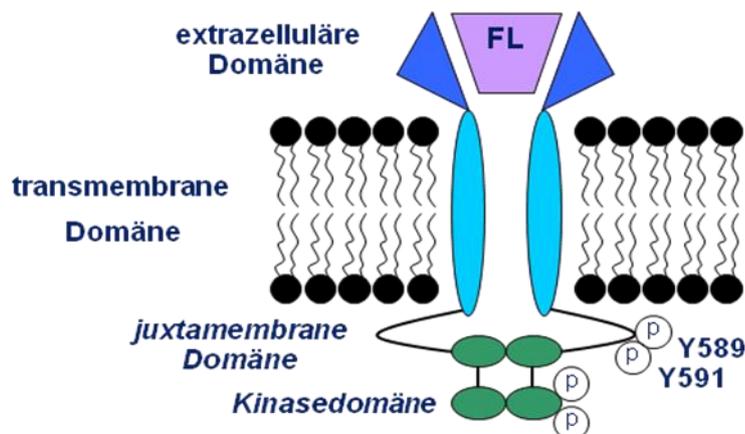


Abb.2 Aufbau der Fms-like receptor tyrosin kinase (FLT3), bestehend aus einer extrazellulären Domäne (bestehend aus 5 Immunglobulin-ähnlichen Domänen), einer transmembranen Domäne, einer juxtamembranen Domäne und einer zweigeteilten Kinasedomäne

Das FLT3- Gen liegt beim Menschen auf Chromosom 13q12 und codiert für ein Protein aus 993 Aminosäuren (Rosnet, Mattei et al. 1991; Rosnet, Stephenson et

al. 1993). Bei der Maus liegt dieses Gen auf Chromosom 5 und codiert für ein Protein aus 1000 Aminosäuren (Rosnet, Mattei et al. 1991; Rosnet, Stephenson et al. 1993). Auf Proteinebene besteht eine 85%ige Homologie zwischen der humanen und murinen FLT3 (Rosnet, Stephenson et al. 1993). Die Aktivierung des FLT3 Rezeptors durch seinen Liganden (FLT3-Ligand) spielt eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Proliferation, Differenzierung und Apoptose früher hämatopoetischer Progenitorzellen. In der normalen Hämatopoese kann FLT3 vorwiegend auf frühen myeloischen und lymphatischen Progenitorzellen nachgewiesen werden.

Bei ca. 30% der erwachsenen AML Patienten liegen aktivierende Mutationen der FLT3 Tyrosinkinase vor (Gilliland and Griffin 2002), wobei 20-27% interne Tandemduplikationen der juxtamembranen Domäne (Yokota, Kiyoi et al. 1997; Thiede, Steudel et al. 2002) und 7% Punktmutationen in der Aktivierungsschleife der zweiten Tyrosinkinasedomäne darstellen (Yamamoto, Kiyoi et al. 2001). Auch bei kindlicher AML konnte die interne Tandemduplikation detektiert werden, wenn auch weniger häufig als bei Erwachsenen (16,5%) (Meshinchi, Woods et al. 2001). Beide Mutationen führen zu einer konstitutiven Aktivierung der FLT3 Tyrosinkinase. Da diese eine wichtige Rolle bei der Proliferation, Differenzierung und Apoptose früher hämatopoetischer Progenitorzellen spielt, kommt es damit zu einer erhöhten Zellproliferation, einer Differenzierungsblockierung sowie zu einer Apoptosehemmung im hämatopoetischen System. In dieser Arbeit lag der Focus auf der internen Tandemduplikation, da diese mit einer schlechten Prognose für die betroffenen Patienten verbunden ist (Abu-Duhier, Goodeve et al. 2000; Kottaridis, Gale et al. 2001; Meshinchi, Woods et al. 2001). Im Vergleich zu schon etablierten und publizierten Leukämiemodellen mit erwachsenen Mäusen war das **3. Ziel dieser Arbeit**, die Etablierung eines juvenilen

Leukämie-modells, in welchem fötale Leberzellen mit schon bekannten publizierten retroviralen Vektoren transduziert (FLT3-Wildtyp (WT), FLT3-ITD) und in neugeborene Mäuse transplantiert wurden.

2.4. Retroviren

Retroviren (Retro: Reverse Transkriptase Onkoviren) sind behüllte einzelsträngige RNA-Viren, deren als RNA vorliegende Erbinformation als DNA in das Wirtsgenom integriert wird. Sie haben einen Durchmesser von 80-100 nm, ein ikosaedrisches Kapsid (bestehend aus dem Kapsidprotein CA), in dem sich der Kern mit verschiedenen Kern-Proteinen und das RNA-Genom befinden. Die Hülle ist mit viralen Glycoproteinen durchsetzt. Die RNA der Retroviren ist diploid angelegt und enthält die drei Gene *gag*, *pol* und *env*, sowie zwei Long Terminal Repeats (LTR), die die Expression der viralen Gene steuern. *Gag* codiert die Matrix-, die Kapsid- und die Nukleokapsidproteine, *pol* die viralen Enzyme reverse Transkriptase, Protease und Integrase und *env* die Hüllenproteine. ψ ist eine regulatorische Sequenz im 5' Bereich, welche ein Signal für das Verpacken der Virus-RNA, eine Primerbindungsstelle für die entsprechende t-RNA und ein Promotor ist.



Abb.3 Aufbau der RNA eines Retrovirus: die 3 Gene *gag*, *pol* und *env*, 2 Long Terminal Repeats (LTR) und die regulatorische Sequenz ψ

2.4.1. Gentransfer mit Hilfe retroviraler Vektoren

Die Entwicklung rekombinanter Retroviren für den Gentransfer erfolgt hauptsächlich auf der Basis des *Moloney Murine Leukemia Virus* (MoMLV). Bei murinen Retroviren kann zwischen 3 Wirtsbereichen unterschieden werden, 2 davon sind für die Arbeit mit Mäusen relevant: Ecotrope murine Retroviren infizieren nur Zellen von Mäusen und Ratten, wohingegen amphotrope murine Retroviren ein breiteres Wirtsspektrum haben, das humane Zellen einschließt. Retroviren infizieren ausschließlich proliferierende Zellen, da der Präintegrationskomplex der Retroviren die Kernmembran von in der Ruhephase befindlichen Zellen nicht passieren kann.

Das retrovirale Gentransfersystem setzt sich aus 2 Komponenten zusammen:

1. dem retroviralen Vektor
2. der Verpackungszelllinie

Der retrovirale Vektor ist ein Plasmid, welches über das Verpackungssignal ψ und die retroviralen 5'- und 3'-LTR verfügt, sowie ggf. über einen Selektionsmarker. Die Verpackungszelllinie stellt die retroviralen Proteine zur Verfügung, die für die Verpackung der Vektor-RNA und somit zur Erzeugung retroviraler Partikel notwendig sind (in dieser Arbeit Φ NX (Phoenix) Eco, welche von der humanen Zelllinie 293T abstammen (Swift, Lorens et al. 2001)). Weiterhin enthält die Verpackungszelllinie die retroviralen Gene *gag*, *pol* und *env*. Transfiziert man die Verpackungszelllinie mit dem retroviralen Vektor, wird das retrovirale Gen durch das gewünschte Transgen ersetzt und es kommt zur Entstehung replikationsinkompetenter Viruspartikel, die Zielzellen einmalig

infizieren können (Abb.4). Da jedoch die retroviralen Gene fehlen, sind sie nicht mehr in der Lage, sich intrazellulär zu vermehren.

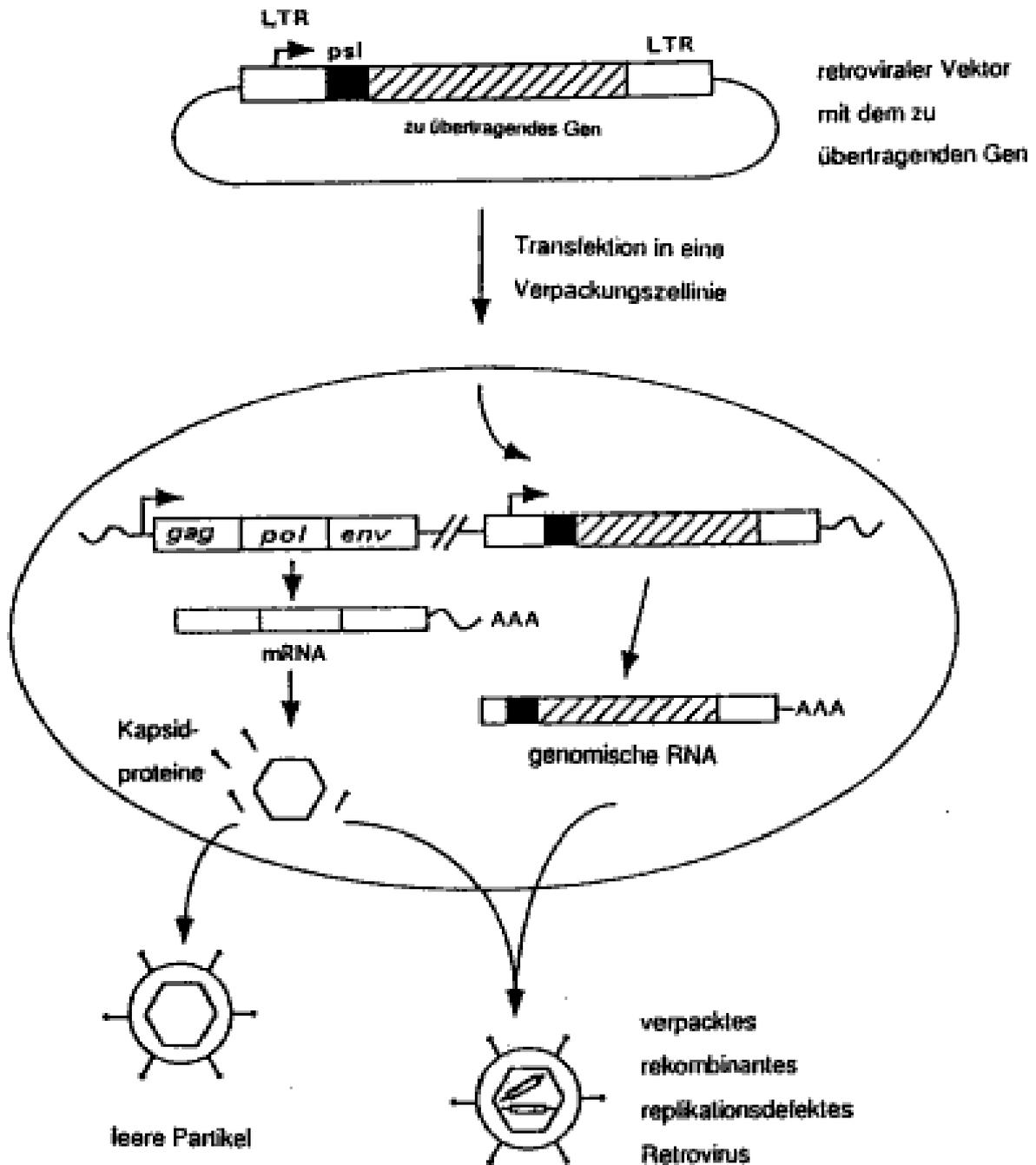


Abb.4 Herstellung rekombinanter replikationsdefekter Viren (Mitani and Caskey 1993)

2.5. Grün fluoreszierendes Protein

Das grün fluoreszierende Protein (GFP) ist ein natürliches Protein aus der Qualle *Aequorea victoria*, das 1961 erstmals von Osamu Shimomura beschrieben wurde (Shimomura, Johnson et al. 1962; Shimomura 2005) und bei Anregung mit ultraviolettem Licht der Wellenlänge 395 nm fluoresziert. An retrovirale Vektoren gekoppelt, eignet es sich zur Detektion transduzierter Knochenmark- oder fötaler Leberzellen, zur Verifizierung der Transduktionseffizienz und zur durchflusszytometrischen Analyse des Verbleibs und der Differenzierung transduzierter Zellen im peripheren Blut oder in verschiedenen Organen der Maus.

2.6. Zielsetzung

Leukämien bei Kindern sind mit einem Anteil von ca. einem Drittel die häufigsten Krebserkrankungen. Die akute myeloische Leukämie ist die häufigste Leukämieform bei Säuglingen, bei Kindern im Allgemeinen macht sie einen Anteil von 15-20% aller Leukämien aus. Seit vielen Jahren gibt es erfolgreich etablierte adulte Knochenmarktransplantationsmodelle der Maus, welche sich mit der Entstehung, den Ursachen und den Behandlungsmöglichkeiten von AML beschäftigen (Kelly, Liu et al. 2002; Gilliland 2003; Grundler, Miething et al. 2005). Es gibt jedoch keine juvenilen Leukämiemodelle, die helfen, die Pathophysiologie juveniler Leukämien zu verstehen und zu erforschen. Es wird angenommen, dass bei kindlichen Leukämien eine onkogene Aktivierung bereits während der Embryogenese stattfindet, die sich nach der Geburt zu einer Leukämie entwickeln kann. Daher war das Fernziel dieser Arbeit die Etablierung eines juvenilen Leukämiemodells, welches den unterschiedlichen

Bedingungen in einer erwachsenen und einer juvenilen Umgebung Rechnung tragen soll.

Um dies zu erreichen, musste im ersten Schritt eine neue, für juvenile Tiere anwendbare Transplantationsmethode etabliert und deren Effizienz mit einer bereits etablierten Methode verglichen werden. Dazu wurde die intrahepatische Transplantation von murinen Knochenmarkzellen und murinen fötalen Leberzellen in neugeborene Mäuse etabliert (auf Basis von (Traggiari, Chicha et al. 2004)) und mit der intravenösen Transplantation in die Schwanzvene erwachsener Mäuse verglichen. Um die Qualität und die Selbsterneuerung der transplantierten Stammzellen zu vergleichen, wurden nach 16 Wochen die CD150+ LSKs aus dem Knochenmark der Mäuse heraussortiert und sekundär weitertransplantiert. Zuletzt wurde untersucht, ob sich die neu etablierte Methode für ein juveniles Leukämiemodell eignet, indem ein bereits etabliertes und publiziertes adultes Leukämiemodell mit FLT3-ITD (Gilliland 2003; Grundler, Miething et al. 2005) in ein juveniles Modell umgewandelt wurde. Hierbei wurden transduzierte fötale Leberzellen, durch deren Verwendung die intra-uterine onkogene Aktivierung nachgeahmt werden soll, in sublethal bestrahlte neugeborene Mäuse transplantiert.

III. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Mäusstämme

B6.SJL-*Ptprc*^a *Pepc*^b/BoyJ (Cd45.1)

C57BL/6.J (B6, B6.Cd45.2)

Alle Mäuse stammen aus eigener Zucht. Sie wurden im Alter von 8-10 Wochen und im Alter von 1-4 Tagen nach der Geburt für die Versuche verwendet. Die Mäuse wurden gemäß den FELASA-Richtlinien in IVC-Käfigen unter SPF-Bedingungen gehalten. Die Versuche wurden von der Regierung Oberbayern genehmigt (Az.: 55,2-1-54-2531-132/06 und 85/10).

3.1.2 Zelllinien

Als „Producer“-Zelllinie wurde die □NX (Phoenix) Eco Zelllinie verwendet. Sie basiert auf der humanen 293T Zelllinie, die aus humanen embryonalen Nierenzellen und DNA-Teilen des Adenovirus E1a geschaffen wurde. Die Zellen wurden stabil mit Konstrukten transfiziert, die die Gene gag, pol und env enthalten, und damit die Proteine für ecotrope und amphotrope Retroviren produzieren. Vorteil dieser Zelllinie ist, dass sie sehr leicht transfizierbar ist, die Transfektionseffizienz liegt bei über 50%, und eine stabile Virusproduktion innerhalb weniger Tage möglich ist (Swift, Lorens et al. 2001).

3.1.3 Bakterienstämme

Escherichia coli (E.coli) DH5 α -Bakterien.

3.1.4 Antikörper

Zur Färbung der Zelloberfläche für Durchflusszytometrie und Zellsortierung wurden folgende Antikörper verwendet:

Antigen	Spezies	Klon	Farbe
Cd 3e	Armenischer Hamster	145-2C11	biotinyliert
Cd 4	Ratte	GK1.5	PE-Cy5
Cd 8a	Ratte	53-6.7	PE-Cy5
Cd 11b	Ratte	M1/70	APC-Cy7, APC
Cd34	Ratte	RAM34	APC-Cy7, FITC
Cd45.1	Maus	A20	PE, FITC, APC- eFluor780
Cd45.2	Maus	104	PE, FITC,
Cd 45R (B220)	Ratte	RA3-6B2	PE-Cy7

Cd 117 (c-Kit)	Ratte	2B8	PE
Cd 150	Ratte	9D1	PE
Gr-1	Ratte	RB6-8C5	eFluor450
Lineage (Cd3, B220, Ter119, Gr-1, Cd11b)		17A2, RA3-6B2, M1/70, TER-119, RB6-8C5	eFluor450
Sca-1	Ratte	D7	PE-Cy7

Hersteller: eBioscience, Frankfurt am Main, Deutschland

Sekundärantikörper:

Streptavidin eFluor® 450 (Pacific Blue® replacement)

Streptavidin APC

(Hersteller: eBioscience, Frankfurt am Main, Deutschland)

3.1.5 Chemikalien

Albumin Fraktion V; $\geq 98\%$, pulv., bovine (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland, Katalognr. 8076.5)

ACK Lysispuffer (Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland, 280-320 mol/l, Katalognr. A1049201)

Alpha MEM (Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland, Katalognr. A1049001)

Ampicillin (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland, Katalognr. A9393)

Dimethylsulfoxide (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland, Katalognr. 39757.01)

DMEM (Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland, Katalognr. 21063029)

Fetal calf serum (FCS) (PAA, Cölbe, Deutschland, Katalognr. A15-108)

Glutamax (Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland, Katalognr. A1286001)

HBSS (Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland, Katalognr. 14175137)

Hepes (Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland, Katalognr. 15630049)

IMDM (Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland, Katalognr. 31980022)

Isofluran (Forene® 100%, Abbott GmbH & Co. KG, Taufkirchen, Deutschland, Katalognr. 4831867)

Lineage Cell Depletion Kit mouse (MACS, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland, Katalognr. 130-090-858)

- Lineage Biotin Antibody Cocktail

- Anti-Biotin MicroBeads

Lipofectamine 2000 (Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland, Katalognr. 11668019)

Mercaptoethanol (Invitrogen GmbH, Darmstadt Deutschland, Katalognr. 31350010)

NaCl ($\geq 99.5\%$ p.a., Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)

Opti-MEM Reduced Serum Medium (Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland, Katalognr. 11058021)

Dulbecco's PBS (PAA, Cölbe, Deutschland, Katalognr. H15-001)

Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) (Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland, Katalognr. 15140148)

Pepton (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)

Polybrene[®] (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland, Katalognr. 107689)

Propidium-Jodid (PI) (Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland, Katalognr. P1304MP)

Trypsin (Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland, Katalognr. 15400054)

3.1.6 Medien und Puffer

HiSpeed® Plasmid Maxi Kit (QIAGEN, Hilden, Deutschland, Katalognr. 12663):

1. Puffer P1 (Resuspensionspuffer):

50 mM TrisCl (Tris(hydroxymethyl)-aminomethanchlorid), pH 8.0

10 nM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)

100µg/ml RNase A

2. Puffer P2 (Lysepuffer):

200mM Natriumhydroxid (NaOH)

1% Natriumlaurylsulfat (SDS) (w/v)

3. Puffer P3 (Neutralisationspuffer):

3.0 M Kaliumacetat, pH 5.5

4. Puffer FWB2 (QIA Filter Waschpuffer):

1 M Kaliumacetat, pH 5.0

5. Puffer QBT (Ausgleichspuffer):

750 nM Natriumchlorid (NaCl)

50 nM (N-Morpholino) Propansulfonsäure (MOPS), pH 7.0

15% Isopropanol (v/v)

0,15% Triton® X-100(v/v)

6. Puffer QC (Waschpuffer):

1.0 M (Natriumchlorid) NaCl

50 nM (N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS), pH 7.0

15% Isopropanol (v/v)

7. Puffer QF (Elutionspuffer):

1.25 M Natriumchlorid (NaCl)

50 mM (Tris(hydroxymethyl)aminomethanchlorid) (TrisCl), pH 8.5

15% Isopropanol (v/v)

8. Puffer QN (Elutionspuffer):

1.6 M Natriumchlorid (NaCl)

50 nM MOPS, pH 7.0

15% Isopropanol (v/v)

9. Puffer TE (Elutionspuffer):

10 mM (Tris(hydroxymethyl)-aminomethanchlorid) (TrisCl), pH 8.0

1 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)

10. Puffer STE (Elutionspuffer):

100 mM Natriumchlorid (NaCl)

10 mM (Tris(hydroxymethyl)-aminomethanchlorid) (TrisCL), pH 8.0

1 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)

Kulturmedium Phoenix:

DMEM

10% FCS

LB-Medium:

6 g Pepton (Gemisch aus Aminosäuren und Peptiden, entsteht durch Hydrolyse tierischer oder pflanzlicher Proteine durch das Enzym Pepsin, gute Nährlösung für Bakterien)

3 g Hefeextrakt

1,5 g Natriumchlorid (NaCl)

Ampicillin (50µg/ml)

300 ml H₂O

Basales Knochenmark Medium (BBMM):

325 ml IMDM

150 ml FCS

2,5 g BSA

5 ml L–Glutamin

2,5 ml Penicillin/Streptavidin

1 ml Mercaptoethanol

HF2+ Puffer:

1X HBSS

2% FCS

1% 1M Hepes

1% Penicillin/Streptomycin

FACS-Puffer:

1 x PBS

0,5% Albumin Fraktion V; $\geq 98\%$, pulv., bovine (Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland)

Einfriermedium:

FCS

10% Dimethylsulfoxide (DMSO)

3.1.7 Zytokine

Stammzellfaktor (SCF) (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland)

FLT-3 Ligand (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland)

Interleukin-3 (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland)

Interleukin-6 (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland)

3.1.8 Retrovirale Konstrukte

MigRI retroviraler Vektor, der GFP koexprimiert (Cell Biolabs, Inc., USA)

Mig FLT-3 WT/D838Y „low“ (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Hubert Serve, Münster, Deutschland, publiziert von Grundler *et al.*, 2005)

Mig FLT-3 ITD/D838Y/Δ839/839M+R „high” (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Hubert Serve, Münster, Deutschland, publiziert von Grundler *et al.*, 2005)

3.1.9 Verbrauchsmaterial

Fantasia Tattoo Farben (Lite Blue, Hot Pink, bezogen bei Magic Moon Shop Tattooing GmbH, Erkelenz, Deutschland)

Hamilton-Spritzen 100µl (Modell 1710 TLLX mit Stop; Hamilton Company, Nevada, USA)

Hamilton-Nadeln ((90130) KF730 NDL 6/PK (30/2"/2); 30 gauge; Hamilton Company, Nevada, USA)

BD Microlance™ Nadeln 30 gauge (BD, Heidelberg, Deutschland)

BD Microlance™ Nadeln 27 gauge (BD, Heidelberg, Deutschland)

BD Plastipak™ 1 ml Spritzen mit Nadel (BD, Heidelberg, Deutschland)

S-Monovette® (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland)

Supra Blutlanzetten (megro GmbH & Co KG, Wesel, Deutschland)

Zellkulturplatten 60 mm/10 mm (Corning Incorporated, Corning, NY, USA)

Zellkulturflaschen 250 ml/550 ml (Cellstar®, USA)

6/12-Well-Zellkulturplatten (Cellstar®, USA)

MACS® Trennsäulen (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland)

0,45 µm Filter (Whatman GmbH, Dassel, Deutschland)

30 µm Filter (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland)

70 µm Filter (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland)

100 µm Filter (BD Falcon™, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland)

3.1.10 Geräte

Blutmessgerät	Scil Vet Abc™ Animal Blood Counter (Scil vet academy GmbH, Viernheim, Deutschland)
Brutschrank	Hera Cell 240 (Heraeus, Hanau, Deutschland)
Durchflusszytometer	CyAn ADP Lx P8 (BeckmanCoulter, USA)
Eismaschine	S.-No: 061244, Ziegra Eismaschinen GmbH (Isernhagen, Deutschland)
Mikroskop	Axiovert 25 (Carl Zeiss, Jena, Deutschland)
Sterilbank	Typ ANTAES 48/72 BIOHIT, Deutschland
Strahlenquelle Mäuse	KD2 Mevatron, (Siemens, München, Deutschland)
Wasserbad	SUB Wasserbad (Grant, UK)

Vortexer	IKA®, MS1 Minishaker (IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen im Breisgau, Deutschland)
Zählkammer	Neubauer improved, Tiefe 0,100mm, Marienfeld
Zellsortierer	MoFlo High Speed cell sorter (BeckmanCoulter, USA)
Zentrifuge	Megafuge 3.0 RS, Multifuge 3S (Heraeus, Hanau, Deutschland)

3.2. Methoden

3.2.1 Euthanasierung der Spendermäuse

Die Spendermäuse wurden mittels cervicaler Dislokation unter Isoflurannarkose (Forene® 100%, Abbott GmbH & Co. KG, Deutschland) gemäß den geltenden Tierschutzregeln euthanasiert (Tierschutzgesetz, Dritter Abschnitt: Töten von Tieren, §4).

3.2.2. Isolation der Spenderzellen

In dieser Arbeit wurden murine Knochenmarkzellen, murine Milzzellen und murine fötale Leberzellen als Spenderzellen verwendet.

3.2.2.1 Knochenmark

Die Knochenmarkzellen wurden bei 8-10 Wochen alten männlichen Spendermäusen aus Femur und Tibia mit Hilfe von HF2+ Puffer und einer 27 gauge Kanüle (BD Biosciences, Deutschland) herausgespült. Dazu wurden Femur und Tibia herauspräpariert, die Knochenenden mit einer Schere entfernt und so die Knochenmarkkanäle zum Herausspülen des Knochenmarks freigelegt. Anschließend wurden die Zellen durch einen 30 µm Filter (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) gefiltert, zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml HF2+ Puffer resuspendiert. Die Zellzahl wurde mit Trypan-Blau und Türks-Lösung in einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Trypanblau reichert sich in Zellen mit defekter Zellmembran, d.h. in nicht-vitalen Zellen, an. So konnten die ungefärbten, vitalen Zellen, aber auch die blau gefärbten nicht-vitalen Zellen gezählt werden. Türks-Lösung lysiert in der Zellsuspension enthaltene Erythrozyten, die das Ergebnis verfälschen würden. Allerdings ist bei dieser Methode keine Unterscheidung zwischen vitalen und nicht-vitalen Zellen möglich. Knochenmarkzellen wurden sofort nach der Isolation aus der Spendermaus zur Transplantation verwendet.

3.2.2.2 Milz

Aus den Spendermäusen wurden weiterhin die Milzen herauspräpariert, welche zerdrückt und mit HF2+ Puffer durch einen 100 µm Filter (BD Falcon™, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) gespült wurden. Die Zellsuspension wurde nochmals durch einen 30 µl Filter (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) gefiltert, zentrifugiert, der Überstand dekantiert und in 1 ml HF2+ Puffer resuspendiert. Die Zellzahl wurde mit Trypan-Blau und Türks-Lösung in einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Milzzellen dienen bei der sekundären Transplantation als Helferzellen.

3.2.2.3 Fötale Leberzellen

Männliche und weibliche Tiere wurden am späten Nachmittag verpaart. An den darauffolgenden Tagen wurde das weibliche Tier jeweils morgens und abends auf einen vaginalen Propf untersucht. Der Tag, an dem ein Propf festzustellen war, galt als Tag 0,5 der Trächtigkeit. Am Tag 14,5 wurde das weibliche Tier euthanasiert, die Föten entnommen und aus den Föten die Leber isoliert. Es wurde Tag 14,5 gewählt, da sich zu diesem Zeitpunkt der Embryogenese die höchste Stammzellendichte mit der höchsten Teilungsaktivität in der fötalen Leber befindet (Jordan, McKearn et al. 1990; Harrison, Zhong et al. 1997). Die fötalen Lebern wurden zerdrückt und mit HF2+ Puffer durch einen 70 µm Filter (BD Biosciences, Deutschland) gespült. Anschließend wurde die Zellsuspension nochmals durch einen 30 µm Filter (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) gefiltert und abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 1 ml HF2+ Puffer resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl (siehe 3.2.2.1) wurden die Zellen entweder sofort in die Empfängermäuse transplantiert oder im Einfriermedium für spätere Experimente eingefroren.

3.2.2.4 Aufreinigung Lineage negativer Zellen

Fötale Leberzellen wurden aufgereinigt, um eine Anreicherung hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen (Lineage-negative Zellen) zu erhalten. Dazu wurden die Zellen mit Hilfe des Lineage Cell Depletion Kits (MACS, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) markiert und die Lineage-negativen Zellen mit Magnetic Cell Sorting (MACS) Trennsäulen separiert. Um die Zellen separieren zu können wurden die Lineage-positiven

Zellen mit einem Cocktail Biotin-konjugierter monoklonaler Antikörper (CD5, CD45R (B220), CD11b, Anti-Gr-1 (Ly-6G/C), 7-4, Ter119 und IL7R) (eBioscience, Frankfurt am Main, Deutschland) markiert. Bei diesen Antikörpern handelt es sich um linienspezifische Antikörper, die nur auf determinierten oder reifen Blutzellen exprimiert werden. Cd 5 wird auf B- und T-Lymphozyten exprimiert, Cd45R auf B-Zellen, Cd11b auf Monozyten, Gr-1 auf Granulozyten, 7-4 auf neutrophilen Granulozyten, Ter119 auf Erythrozyten und IL7R auf CLPs. An diese markierten Zellen binden im zweiten Schritt die Streptavidin-konjugierten Microbeads, welche die Lineage positiven Zellen durch magnetische Anziehung in der Trennsäule auffangen, während die Lineage negativen Zellen durch die Säule hindurch laufen. Die Reinheit beider Zellfraktionen wurde per FACS-Analyse verifiziert. Dazu wurden die Zellen mit den Antikörpern Lineage cocktail, Sca-1, cKit, Cd34 (eBioscience, Deutschland) angefärbt, um den Anteil an Lineage negativen Zellen, Stamm- und Progenitorzellen zu verifizieren.

3.2.3 Transformation kompetenter E.coli-Zellen

50 µl der kompetenten Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut, danach vorsichtig mit 25-100 ng der Plasmid-DNA gemischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach folgte ein Hitzeschock für 90 Sekunden bei 42°C. Unter Zugabe von 250 ml LB-Medium wurden die Zellen für 60 min bei 37°C und 180 U/min kultiviert. 100 µl der bakteriellen Suspension wurden mit 50 µg/ml Ampicillin (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland), (vektoriell codierte Antibiotikaresistenz) auf vorgewärmte LB-Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2.4 Plasmidisolierung aus transformierten Bakterien

Zur Isolation rekombinanter Plasmid-DNA wurde der Qiagen® Plasmid Maxi Kit (Kat.-Nr.: 12162) nach Herstellerprotokoll verwendet. Die Methode basiert auf der alkalischen Lyse von Bakterien (Birnboim and Doly 1979), der selektiven Bindung von Plasmid-DNA an ein Anionen-Tauscher-Resin und der Elution unter jeweils bestimmten Salzkonzentrationen. Die eingesetzte Menge an Bakterien und die Ausbeute an Plasmid-DNA (200 ml/2 ml Kulturvolumen; maximal 500 µg/20 µg Plasmid-DNA) definiert sich über die Bindungskapazität der Säulen.

3.2.5 Kultivierung und Passagierung der Phoenixzellen

Die im Flüssigstickstoff gelagerten Zellen wurden bei 37°C aufgetaut und in T75 Zellkulturflaschen bei 37°C und 5%CO₂ kultiviert. In den folgenden 2 Tagen wurden die Phoenixzellen im Abstand von 24 Stunden passagiert. Am dritten Tag wurden 4x10⁶ Zellen auf 10 cm-Platten in 10 ml Kulturmedium ausplattiert und über Nacht bei 37°C und 5%CO₂ kultiviert. Am nächsten Morgen erfolgte die Transfektion.

3.2.6 Retrovirale Transfektion der Phoenixzellen und Infektion der Spenderzellen

10 µg DNA (Mig), 20 µg DNA (Flt-3 WT) und 40 µg DNA (Flt-3 ITD) wurden mit Lipofectamin 2000 (Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland) im

Optimem-Medium (Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland) gemischt, 30-40 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und auf die passagierten Phoenixzellen gegeben. Der Überstand mit Viruspartikeln wurde im Abstand von 12 Stunden 4 mal abgenommen und durch einen sterilen Filter (0,45 µm, Whatman®, Dassel, Deutschland) gefiltert.

Die Lineage aufgereinigten fötalen Leberzellen (siehe 3.2.2.4) wurden vor der Infektion auf eine 12-well-Platte mit 2,5 ml/well BBMM und den Wachstumsfaktoren SCF (50 ng/ml), IL3 (ng/ml) und IL6 (10 ng/ml) (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) ausplattiert und über Nacht bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert.

Der Virusüberstand wurde mit Wachstumsfaktoren und Polybrene® (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) angereichert und direkt auf die zu infizierenden fötalen Leberzellen gegeben. Anschließend wurden die fötalen Leberzellen 1,5 Stunden bei 32°C und 2400 U/min zentrifugiert und darauffolgend bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Infektion wurde 4-mal im Abstand von 12 Stunden wiederholt. Nach den 4 Infektionen wurden die Zellen geerntet und per FACS-Analyse auf den Anteil GFP⁺ Zellen untersucht.

3.2.7 Transplantationsmethoden

Vor der Transplantation wurden die intravenös (i.v.) zu transplantierenden, 8-10 Wochen alten B6.SJL-*Ptprc*^a *Pepc*^b/BoyJ (Cd45.1) Mäuse beiderlei Geschlechts mit 9 Gray letal bestrahlt (KD2 Mevatron, Siemens, München, Deutschland). Die 1-4 Tage alten intrahepatisch (i.h.) zu transplantierenden Jungtiere wurden mit 3,5 Gray subletal bestrahlt, in einem späteren Versuch auch noch einmal mit

3,5; 5 und 8 Gray, um einen Bestrahlungsvergleich durchzuführen. Am darauffolgenden Tag wurden jeweils 2×10^5 Ly-5.2 (B6) Knochenmarkzellen bzw. 4×10^5 Ly-5.2 fötale Leberzellen in PBS aufgenommen und transplantiert. Die intravenöse Transplantation erfolgte in die Schwanzvene (0,25 ml/Tier) und die intrahepatische Transplantation in die durch die Haut gut sichtbare Leber der Jungtiere (20 μ l/Tier). Aufgrund des geringen Volumens, das in die Leber der neugeborenen Mäuse transplantiert wird, werden spezielle Spritzen benötigt, mit denen eine so geringe Flüssigkeitsmenge abgemessen werden kann (Hamilton-Spritzen).



Abb.5 Intrahepatische Transplantation einer neugeborenen Maus mit einer Hamilton-Spritze („Uwe Thiel, AG Richter/Burdach, Kinderklinik der TU München“) und intravenöse Transplantation in die Schwanzvene einer erwachsenen Maus

Alle transplantierten Mäuse erhielten bis 6 Wochen nach der Bestrahlung und Transplantation Antibiotika über das Trinkwasser (Baytril: Wirkstoff Enrofloxacin, 25,00 mg/ml, 1 ml in 250 ml Trinkwasser), um Infektionen vorzubeugen.

3.2.8 Sekundärtransplantation

Ziel der sekundären Transplantation war es, die Qualität und das Selbsterneuerungspotential der i.v. transplantierten Stammzellen mit dem der i.h. transplantierten Stammzellen zu vergleichen. Dazu wurden c-Kit⁺, Sca1⁺, Cd34⁻, Cd150⁺ Zellen aus dem Knochenmark aller i.v. und i.h. transplantierten Mäuse herausortiert. Cd150⁺ LSK Zellen sind Stammzellen mit einem uneingeschränkten Selbsterneuerungspotential, je stärker der Oberflächenmarker Cd150 exprimiert wird, desto besser ist das Selbsterneuerungs- und das Differenzierungspotential (Morita, Ema et al. 2010). Zunächst wurde das Knochenmark der i.v. und i.h. transplantierten Tiere separat gepooled, was zum Erhalt zwei verschiedener Zellsuspensionen führte: einer Zellsuspension mit Knochenmark aus i.v. transplantierten Tieren und einer Zellsuspension mit Knochenmark aus i.h. transplantierten Tieren. Aus beiden Zellsuspensionen wurden anschließend die Lineage negativen Zellen isoliert (siehe 3.2.2.4). Diese wurden dann mit den Antikörpern c-Kit, Sca1, Cd34 und Cd150 gefärbt (eBioscience, Frankfurt am Main, Deutschland, siehe Methoden 3.2.13). 300 bzw. 150 Cd150⁺ herausortierte Lineage-negative cKit⁺ Sca1⁺ (LSK) Zellen wurden zusammen mit 1×10^5 Knochenmark- und 5×10^5 Milz-Helferzellen (s. Methoden 3.2.2.2) von Ly5.1 Mäusen in letal bestrahlte Ly 5.1 Empfängermäuse intravenös transplantiert. Die CD150⁺ LSKs aus der i.h. Gruppe konnten aufgrund der geringen Anzahl nicht weiter transplantiert werden. 5 und 10 Wochen nach der Transplantation wurde allen Mäusen Blut aus der Vena facialis entnommen und dieses analysiert (siehe Methoden 3.2.10). 16 Wochen nach der Transplantation wurden alle Tiere euthanasiert und Blut, Knochenmark und Milz (siehe Methoden 3.2.10) untersucht.

3.2.9 Transplantationsmethoden Leukämiemodell

Zurzeit gibt es keine juvenilen Leukämiemodelle, die helfen, die Pathophysiologie juveniler Leukämien zu verstehen und zu erforschen. Es wird angenommen, dass bei kindlichen Leukämien eine onkogene Aktivierung bereits während der Embryogenese stattfindet, die sich nach der Geburt zu einer Leukämie entwickeln kann. Daher war das Ziel dieser Arbeit die Etablierung eines juvenilen Leukämiemodells, welches den unterschiedlichen Bedingungen in einer erwachsenen und einer juvenilen Umgebung Rechnung tragen soll. C57BL/6J-Empfängermäuse beiderlei Geschlechts wurden mit 3,5 Gy subletal bestrahlt (KD2 Mevatron, Siemens, München, Deutschland) und intrahepatisch transplantiert. Dazu wurden fötale Leberzellen zunächst mit retroviralen Konstrukten infiziert (siehe Methoden 3.2.6). Die transduzierten Zellen wurden mittels FACS-Analyse aufgrund ihrer GFP-Expression bestimmt. Für MIG (Leervektor), FLT3-Wildtyp und FLT3-ITD wurden in C57BL/6J jeweils 5×10^3 und 5×10^4 GFP⁺ Zellen transplantiert. Die Zahl der transplantierten Zellen wurde niedriger gewählt als in publizierten Erwachsenenmodellen beschrieben, da die Annahme bestand, dass neugeborene Tiere empfindlicher auf die Onkogene reagieren. Weiterhin sollte sich der Krankheitsverlauf langsamer entwickeln, um zu vermeiden, dass die Tiere in einem zu frühen Alter euthanasiert werden müssen, was die Analyse erheblich erschwert hätte. Die Empfängertiere wurden durch Tätowierung der rechten Vorderpfote mit verschiedenen Farben (blau, pink, keine Tätowierung, siehe Material 3.1.9) markiert.

3.2.10 Blut- und Organanalysen

Allen transplantierten Tieren wurde nach 10 Wochen Blut aus der Vena facialis entnommen und dieses in heparinisierten S-Monovetten® (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) gesammelt. Zunächst wurde das Blut am Blutmessgerät analysiert, anschließend zur Erythrozytenlyse mit 5 ml ACK-Puffer versetzt und 2 x 15 min auf Eis inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde das Blut bei 2100 U/min zentrifugiert und die Zellen mit monoklonalen Antikörpern für die Durchflusszytometrie gefärbt. Am Blutmessgerät wurde ein großes Blutbild erstellt, per Durchflusszytometrie wurde das Engraftment der Spenderzellen analysiert und deren weitere Differenzierung in die verschiedenen Blutzelllinien. Besonderes Augenmerk lag auf der Differenzierung in B-Lymphozyten, T-Lymphozyten, Granulozyten (hier wurde nicht zwischen neutrophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten unterschieden) und Monozyten. Nach 16 Wochen wurden alle Mäuse euthanasiert und Blut, Knochenmark, Milz und Leber per FACS-Analyse analysiert. Zusätzlich zum großen Blutbild und zur Differenzierung in die reifen Blutzellen wurden in Woche 16 post transplantationem Knochenmark und Milz auf das Vorhandensein von Stammzellen und Progenitorzellen untersucht.

3.2.11 Analyse der Mäuse aus dem Leukämiemodell

4, 12, und 18 Wochen nach der Transplantation wurde Blut aus der Vena facialis entnommen und analysiert (siehe Methoden 3.2.10). Nach 24 Wochen wurden die Mäuse euthanasiert und analog zum Methodenvergleich analysiert.

Zusätzlich wurden Blutausstriche angefertigt und diese mit einer Pappenheim-Färbung angefärbt. Die gefärbten Blutausstriche wurden auf das Vorhandensein von leukämischen Zellen untersucht.

3.2.12 Durchflusszytometrie

Die immunphänotypische Analyse der Zellproben aus peripherem Blut, Knochenmark, Milz und Leber erfolgte mit einem CyAn ADP Lx P8 Durchflusszytometer (BeckmanCoulter, USA). Bei der Durchflusszytometrie werden die Eigenschaften der zu untersuchenden Zellen während der Bewegung in einem Flüssigkeitsstrom gemessen. Dabei fließen die Zellen als Einzelpartikel durch einen Laserlichtstrahl und senden unmittelbar nach Kontakt mit diesem Photonen aus und streuen so das Licht. Dieses fällt dann auf spezifische Detektoren, die elektrische Impulse abgeben. Anschließend werden die Daten digitalisiert. Das Ergebnis wird mit Hilfe des Programmes FlowJo als so genannter Dot Plot dargestellt, in dem jede einzelne Zelle der Probe als Punkt in einem Koordinatensystem wiedergegeben wird. Alternativ werden die Ergebnisse auch als Histogramme dargestellt.

Folgende Zelleigenschaften werden dabei untersucht:

1. *Vorwärtsstreulicht (FSC)*: Die Vorwärtsstreuung ist ungefähr proportional zur Zellgröße. Dieser Parameter wird gemessen, wenn das Licht entlang der Achse des Laserstrahls gestreut wird.
2. *Zellgranularität (SSC)*: Dieser Parameter korreliert mit den Zellgranula innerhalb der Zellen. Dieser Parameter wird gemessen, wenn das Licht im rechten Winkel zum Laserstrahl gestreut wird.

Durch die FSC- und SSC-Werte lassen sich Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten voneinander unterscheiden.

3. *Zusammensetzung der Oberflächenproteine:* Nach vorheriger Färbung mit spezifischen Antikörpern, die an Fluorochrome gebunden sind, werden die Oberflächenantigene erkannt und die Zellen können genauer einer bestimmten Zellgruppe zugeordnet werden. So können z.B. B- von T-Lymphozyten unterschieden werden.

3.2.13 Färben der Zellen mit Antikörpern

Um das Antigenespektrum der zu untersuchenden Zellen durchflusszytometrisch zu analysieren, wurden die Zellen zuvor mit monoklonalen Antikörpern, die mit fluoreszierenden Farbstoffen konjugiert sind, markiert (siehe Material 3.1.4). Dazu wurden die Zellen mit verdünnten Antikörpern sättigend 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit FACS-Puffer (siehe Material 3.1.6) gewaschen, um überschüssigen, ungebundenen Antikörper zu entfernen. Waren weitere sekundäre Antikörperfärbungen nötig, wurden diese Schritte entsprechend wiederholt. Die markierten Zellen wurden in FACS-Puffer mit Propidium-Jodid (PI) (Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland, Konzentration 1 mg/ml) im Verhältnis 1:1000 aufgenommen. PI dient dazu, bei der Messung im Durchflusszytometer tote Zellen zu detektieren, indem es die defekte Zellmembran durchdringt und sich im Zytoplasma ansammelt. Die Eigenfluoreszenz von PI kann im FL-3 Kanal gemessen werden.

3.2.14 Zellsortierung

In dieser Arbeit wurde für die Zellsortierung der „MoFlo“ (Modular Flow) High Speed Cell Sorter von BeckmanCoulter verwendet. Bei der Zellsortierung wird analog zur Durchflusszytometrie eine FACS Färbung durchgeführt und es werden zusätzlich bestimmte Zellpopulationen heraussortiert. Dazu verfügt der MoFlo über 11 Detektoren, die eine simultane Detektion von neun Farben sowie FSC- und SSC-Signal erlauben. Das „4-way sorting module“ ermöglicht die simultane Sortierung von bis zu 4 Subpopulationen, welche mit Hilfe des „Cyclone“, eines computergesteuerten Roboterarms, in laborübliche Röhrchen sortiert werden können. Mit Hilfe der zur Verfügung stehenden „Nozzles“ (=Düsen) können Zellen unterschiedlicher Größe sortiert werden. Für die sekundäre Transplantation im Rahmen des Methodenvergleiches dieser Arbeit wurden die Cd 150+ LSK Zellen heraussortiert (siehe Methoden 3.2.8).

3.2.15 Gesundheitliche Überwachung der Mäuse

Alle transplantierten Mäuse wurden nach einem Belastungsscore Punktesystem überwacht. Beobachtete Hauptkriterien waren Körpergewicht, Leukämieentwicklung, mögliche Nebenwirkungen der Bestrahlung, Körperhaltung und Verhalten sowie sichtbare Zeichen einer Infektion. Die Mäuse wurden täglich auf alle Hauptkriterien untersucht, bei Abweichungen vom Normalzustand wurden für das jeweilige Kriterium Punkte vergeben und diese addiert. Errechneten sich für eine einzelne Maus mehr als 20 Punkte, galt die Belastung als zu groß und die Maus wurde gemäß den geltenden Tierschutzregeln euthanasiert (Tierschutzgesetz, Dritter Abschnitt: Töten von Tieren, §4).

<u>Beobachtung</u>	<u>Punkte</u>
---------------------------	----------------------

I Körpergewicht

-Gewichtsreduktion <5%	0
-Gewichtsreduktion 5-10%	5
-Gewichtsreduktion 11-20%	10
-Gewichtsreduktion >20%	20

II Leukämieentwicklung

- Leukozytenzahl im peripheren Blut < 15 x 10 ³ / µl	0
- Leukozytenzahl im peripheren Blut 15 - 30 x 10 ³ / µl	5
- Leukozytenzahl im peripheren Blut 30 – 50 x 10 ³ / µl	10
- Leukozytenzahl im peripheren Blut > 50 x 10 ³ / µl	20

III Mögliche Nebenwirkungen der Bestrahlung

- keine erkennbaren Nebenwirkungen	0
- Durchfall, neu aufgetreten; Dehydratationsgrad 1 (leicht, 3-6% der KM); Blässe der Haut und Schleimhaut infolge unzureichender Rekonstitution der Blutzellen (Anämie)	5

- Durchfall bis zu 3 Tagen; Dehydratationsgrad (mittel, 6-8% der KM) 10
- Durchfall anhaltend, länger als 3 Tage; Dehydratationsgrad 3 (schwer, >8% der KM) anhaltend; petechiale Blutungen, Atemnot als Folge unzureichender Rekonstitution der Blutzellen (Trombozytopenie, Anämie) 20

IV Körperhaltung und Verhalten

- normales Verhalten (Schlafen, Reaktion auf Anblasen und Berührung, Neugier, Sozialkontakte) 0
- leicht aufgekrümmter Rücken, eingeschränkte Motorik oder Hyperkinetik, ungewöhnliches Verhalten 5
- stark aufgekrümmter Rücken, Lethargie, Absonderung von der Gruppe, Koordinationsstörungen 10
- Autoagression, Seitenlage 20

V Sichtbare Zeichen einer Infektion

- Leukozytenzahl im peripheren Blut siehe II
- deutlicher Ascites, nach außen aufbrechende Abszesse 20

Bewertung, Maßnahmen Punkte

Belastungsgrad 0 = keine Belastung	0
Belastungsgrad 1 = geringe Belastung, sorgfältig weiter beobachten	1-9
Belastungsgrad 2 = mäßige Belastung; medizinisch verantwortliche Person konsultieren	10-19
Belastungsgrad 3 = erhebliche Belastung; sofort Versuch abbrechen	20

Bei transplantierten Neugeborenen wurde zusätzlich die Entwicklung der Jungtiere überwacht.

IV. Ergebnisse

4.1 Etablierung einer neuen Transplantationsmethode bei der Maus

Das **1. Ziel dieser Arbeit** war die Etablierung der intrahepatischen (i.h.) Transplantation, bei der die zu transplantierenden Zellen in die Leber neugeborener Tiere injiziert werden. Anschließend wurde die Effizienz dieser Methode mit der bereits etablierten Transplantation in die Schwanzvene (intravenöse (i.v.) Transplantation) verglichen (siehe Abb.5). Die Versuche wurden je 2 x mit Knochenmarkzellen (KM) und 2 x mit fötalen Leberzellen (FL) durchgeführt. Beide Methoden wurden auf ihre Praktikabilität, die Überlebensrate der Mäuse, das Differentialblutbild, das Engraftment der transplantierten Zellen und die Unterschiede in der Differenzierung der Spenderzellen in die verschiedenen Blutzelllinien untersucht und miteinander verglichen.

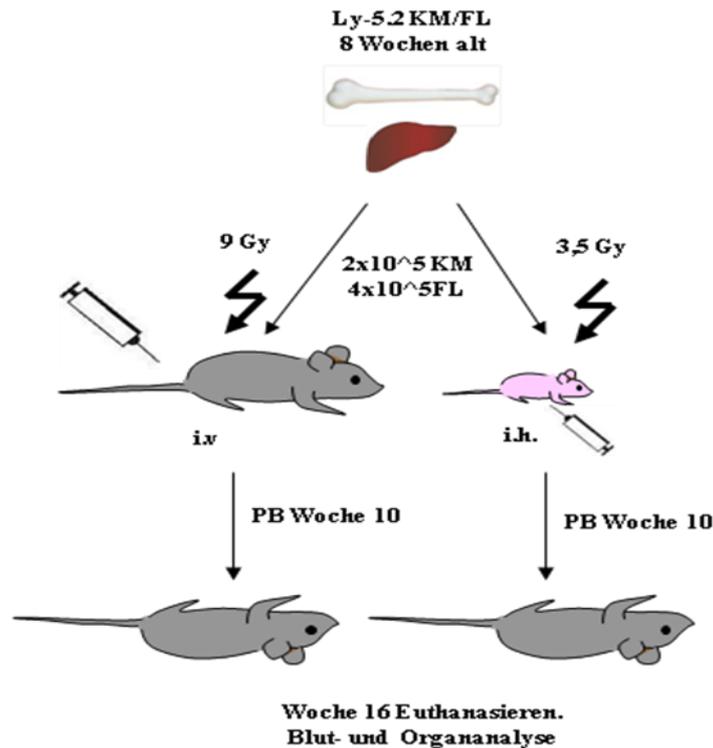


Abb.6 Versuchsaufbau Methodenvergleich i.v. vs. i.h.

4.1.1 Praktikabilität

Neugeborene Mäuse können zwischen Tag 1 und 4 nach der Geburt (P1-P4) bestrahlt und die Zellen in die durch die Haut gut sichtbare Leber transplantiert werden (siehe Abb. 5). Zu beachten ist, das Muttertier so wenig wie möglich in Disstress zu versetzen, indem die Neugeborenen zur Bestrahlung in ihrem Nest belassen und nicht berührt werden, um keine fremden Gerüche in das Nest zu bringen. Anderenfalls besteht die Gefahr des Kannibalismus, da das Muttertier durch die Abwesenheit der Jungtiere während der Bestrahlung schon erhöhtem Disstress ausgesetzt ist. Dieser zeigt sich in Form von Rastlosigkeit sowie unerschöpflichem Graben und Suchen nach den Neugeborenen. Weiterhin ist ein wenig Erfahrung nötig, um beurteilen zu können, wie tief die Kanüle

eingestochen werden muss, um die Zellen in der Leber zu platzieren. Insgesamt handelt es sich jedoch um eine schnell zu erlernende und zeitsparende Transplantationsmethode (siehe Abb.5).

Die intravenöse Transplantation ist technisch anspruchsvoller und durch das vorherige Anwärmen der Schwanzvene zeitintensiver als die intrahepatische Transplantation. Es ist jedoch leichter zu beurteilen, ob die Zellen in der Vene angekommen sind oder nicht (siehe Abb.5).

4.1.2 Überlebensrate der Mäuse

Die Überlebensrate der intrahepatisch mit Knochenmark transplantierten Tiere lag mit 94,44 % (17/n=18) (siehe Abb.7) nach 16 Wochen noch über der Überlebensrate der i.v. transplantierten Tiere (6/n=7). Eine Maus verstarb 12 Wochen nach der Transplantation plötzlich und ohne erkennbare Ursache. Bei der i.v. Transplantation überlebten 85,71 % (6/n=7) (siehe Abb.7) der Mäuse bis zum Alter von 16 Wochen. Auch hier verstarb eine Maus plötzlich und ohne erkennbare Ursache 14 Wochen nach der Transplantation.

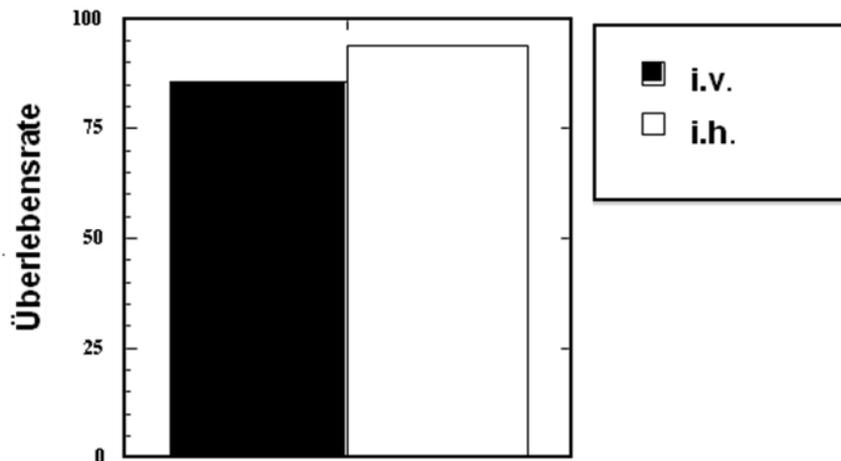


Abb.7 Überlebensrate der Mäuse im Methodenvergleich i.v. vs. i.h. 16 Wochen nach der Transplantation (%)

Bei dem Vergleichsversuch mit fötaler Leber lag die Überlebensrate bei beiden Methoden 10 Wochen nach der Transplantation bei 100%, Woche 16 konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr untersucht werden.

4.1.3 Differentialblutbild

10 Wochen nach der Transplantation wurde den transplantierten Mäusen zum ersten Mal Blut aus der Vena facialis entnommen. Im großen Blutbild zeigten sich zwischen i.h. und i.v. mit Knochenmark transplantierten Tieren kaum Unterschiede (gemessen am Scil Vet Abc™ Animal Blood Counter (Scil Vet academy GmbH, Viernheim, Deutschland; hier nicht gezeigt). Die Blutwerte lagen jedoch bei beiden Methoden im Normbereich nicht transplantiertes gesunder Mäuse (siehe Tabelle 1), einzig der Hämatokrit war bei beiden Methoden leicht erhöht (51,87% bei i.v. transplantierten Tieren, 50,35% bei i.h. transplantierten Tieren).

Parameter	Einheit	Richtwert Maus
Hämatokrit	%	36-49
Leukozyten	$10^3/\mu\text{l}$	4-12,5
Lymphozyten	%	55-95
Monozyten	%	0-3
Granulozyten	%	10-45
Erythrozyten	$10^6/\mu\text{l}$	7-11,5
Thrombozyten	$10^3/\mu\text{l}$	400-980

Tabelle 1 (Anja Ewringmann, Barbara Glöckner: Leitsymptome bei Hamster, Ratte, Maus und Rennmaus, Verlag: Enke)

Nach 16 Wochen wurden die Tiere euthanasiert und Blut direkt aus dem Herzen entnommen. Auch jetzt zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen i.h. und i.v. transplantierten Tieren. Bei den i.h. transplantierten Mäusen war die Anzahl der Leukozyten, der Erythrozyten und der Prozentsatz des Hämatokrits leicht höher, bei den Thrombozyten hingegen verhielt es sich umgekehrt (siehe Abb.8). Sowohl nach 10 als auch nach 16 Wochen lag die Thrombozytenzahl der i.v. transplantierten Mäuse deutlich über dem der i.h. transplantierten Mäuse (siehe Abb.8). Auffällig war, dass nach 16 Wochen der Thrombozytenwert der

i.v. transplantierten Mäuse auch deutlich über dem Normwert gesunder nicht transplantierte Mäuse lag (siehe Tabelle 1).

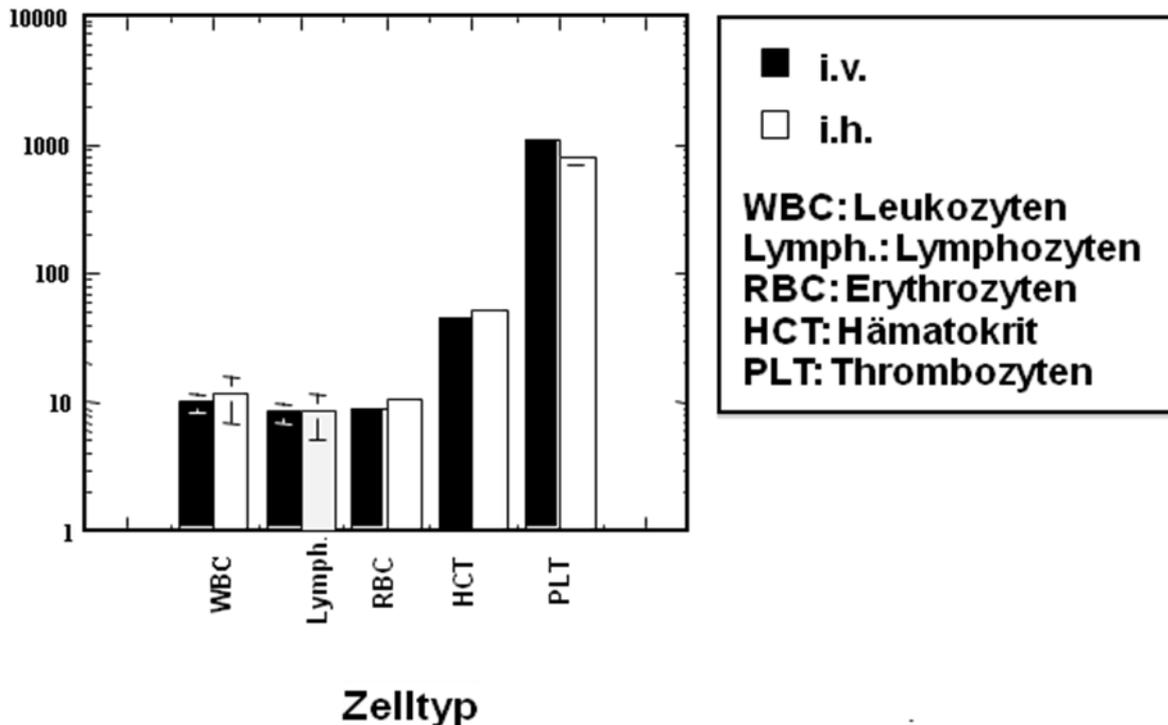


Abb.8 Anteil der verschiedenen Blutzellen im peripheren Blut (Woche 16) i.v. vs i.h. mit KM transplantierte Tiere; gemessen am Scil Vet Abc™ Animal Blood Counter (Scil Vet academy GmbH, Viernheim, Deutschland); Einheiten: Hämatokrit :%; Leukozyten, Lymphozyten, Thrombozyten: $10^3/\mu\text{l}$; Erythrozyten: $10^6/\mu\text{l}$

Den mit fötaler Leber transplantierten Tieren wurde ebenfalls 10 Wochen nach der Transplantation Blut aus der Vena facialis entnommen. Hier zeigten sich signifikante Unterschiede im weißen Blutbild zwischen beiden Transplantationsmethoden (siehe Abb.9). Bei i.v. transplantierten Tieren lag die Zahl der Leukozyten, Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten signifikant höher, als bei i.h. transplantierten Tieren. Der Leukozytenwert der i.v.

transplantierten Tiere lag auch deutlich über dem Leukozytenwert gesunder nicht transplantierte Mäuse (siehe Tabelle 1).

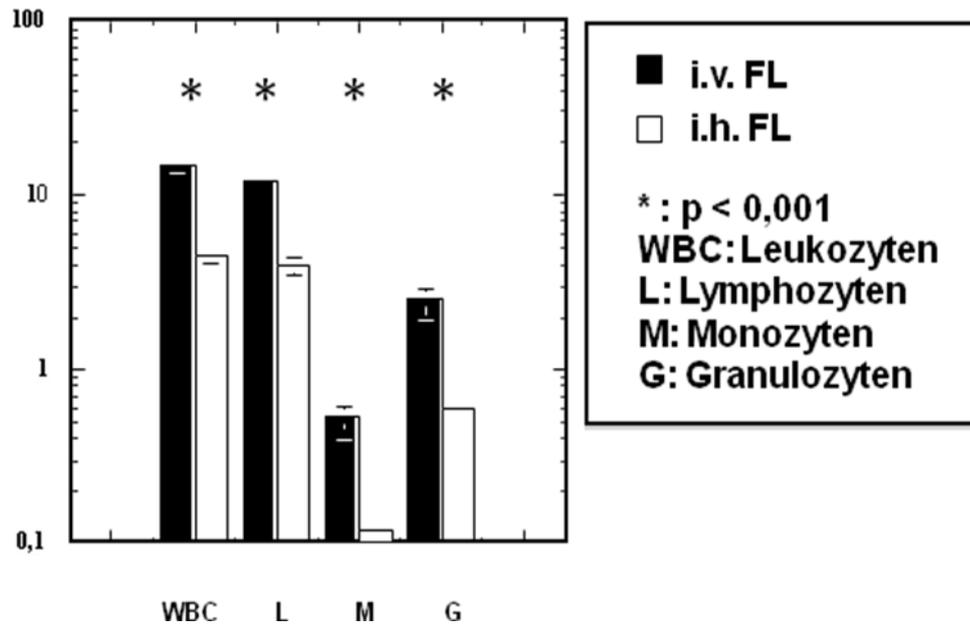


Abb.9 Anteil der verschiedenen Blutzellen im peripheren Blut (Woche 10) i.v. vs i.h. mit fötaler Leber transplantierte Tiere; gemessen am Scil Vet Abc™ Animal Blood Counter (Scil Vet academy GmbH, Viernheim, Deutschland); Einheiten: Leukozyten, Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten: $10^3/\mu\text{l}$

Bei der Anzahl der Erythrozyten, der Thrombozyten und beim Hämatokrit zeigten sich dagegen keine nennenswerten Unterschiede (hier nicht gezeigt). Woche 16 konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr untersucht werden.

4.1.4 Engraftment der transplantierten Zellen

10 Wochen nach der Transplantation wurde das aus der Vena facialis entnommene Blut mit Antikörpern versetzt und per Durchflusszytometrie untersucht. Die Spenderzellen unterscheiden sich von den Empfängerzellen durch Expression unterschiedlicher Allele der Tyrosinphosphatase Cd45 (CD45.2 und CD 45.1), welche - mit Ausnahme von Erythrozyten - auf allen hämatopoetischen Zellen exprimiert wird. Spendermäuse waren homozygot für Cd45.2 (Ly-5.2), Empfängermäuse für Cd45.1 (Ly-5.1), wodurch zunächst Spenderzellen von Empfängerzellen unterschieden werden konnten. Die reifen Blutzelllinien der Spenderzellen wurden durch Expression von Cd45R (B220) für B-Zellen, Cd4/Cd8a für T-Zellen, GR-1 für Granulozyten und Cd11b für Monozyten detektiert (siehe Abb.10). Dadurch sollte verifiziert werden, ob die Transplantationsmethode Einfluss auf die linienspezifische Entwicklung der Blutzellen hat.

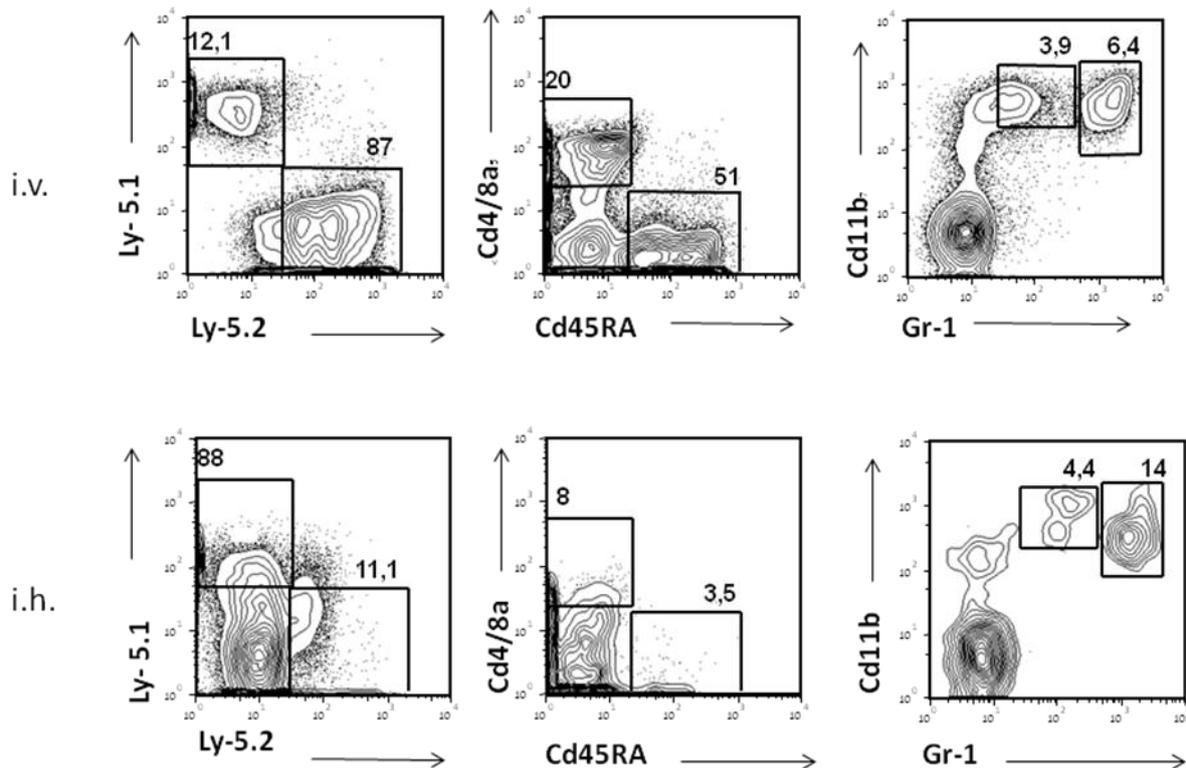


Abb.10 Unterscheidung Spender- (Ly-5.2 Knochenmark)/Empfängerzellen (Ly-5.1 Knochenmark) sowie die Differenzierung der Spenderzellen in die verschiedenen Blutzelllinien 10 Wochen nach der Transplantation (Cd45RA: B-Lymphozyten, Cd4/8a: T-Lymphozyten, Gr1+Cd11b+: Granulozyten, Gr1+Cd11b med: Monozyten)

Signifikante Unterschiede zeigten sich im Engraftment der Spenderzellen (Ly-5.2 Knochenmark). Während die i.v. transplantierten Tiere nach 10 Wochen im Mittel 74,80 % Spenderzellen im peripheren Blut hatten, waren es bei den i.h. transplantierten Mäusen wesentlich weniger (7,23 %, siehe Abb.11).

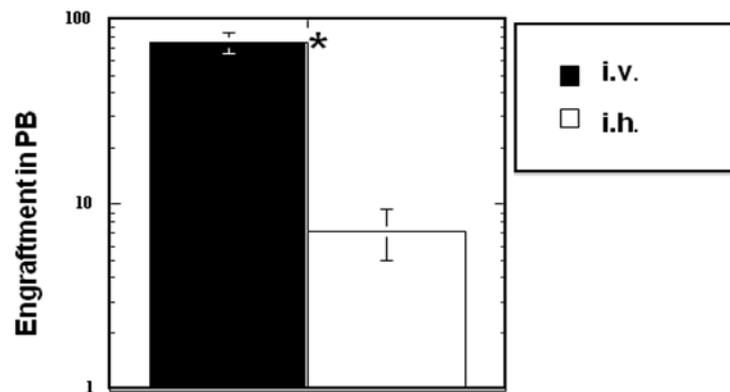


Abb.11 Engraftment der Knochenmark-Spenderzellen in % im peripheren Blut 10 Wochen nach der Transplantation i.v. vs i.h. Versuch 1

Auch bei der Differenzierung in B-Zellen zeigten sich signifikante Unterschiede. Bei den i.h. transplantierten Mäusen differenzierten 7,59 % der Spenderzellen zu B-Zellen, bei den i.v. transplantierten Mäusen hingegen 34,92 % ($p < 0,001$, siehe Abb.12). Die Differenzierung zu T-Zellen (7,17 i.h./ 7,66 i.v.) sowie zu Granulozyten (3,57 i.h./3,71 i.v.) war nach 10 Wochen nahezu identisch (siehe Abb.12). Bei den Monozyten zeigten sich wieder deutlichere Unterschiede, differenzierten bei den i.h. transplantierten Mäusen 13,84 % der Spenderzellen zu Monozyten, waren es bei den i.v. transplantierten Mäusen nur 7,77 % ($p = 0,3$; siehe Abb.12).

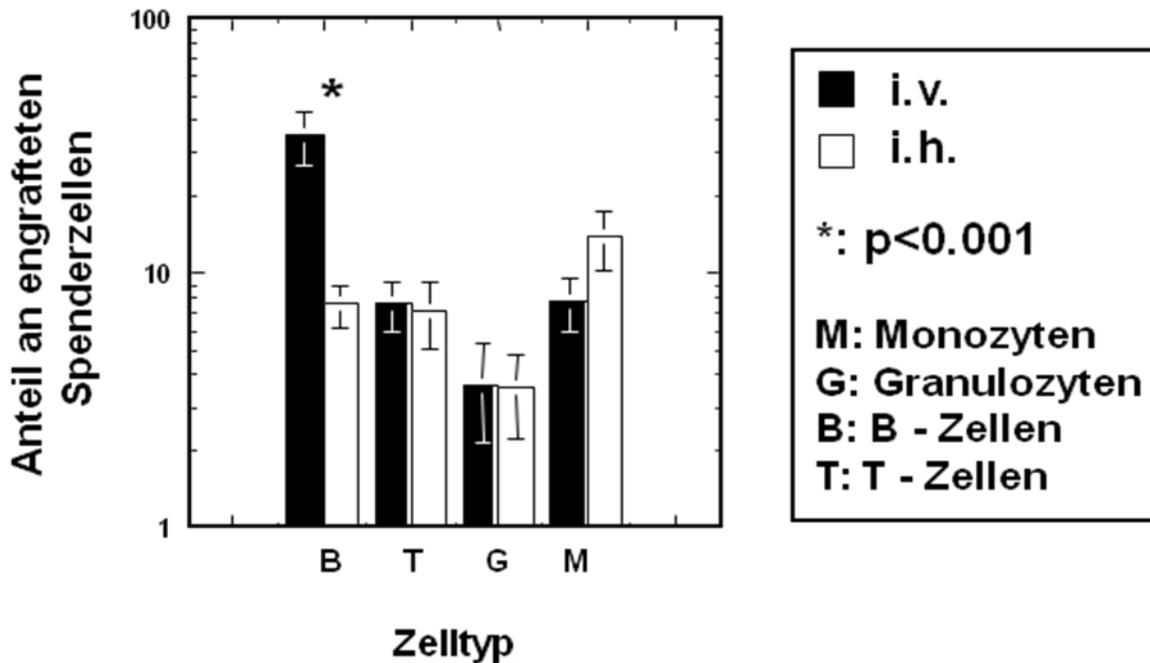


Abb. 12 Anteil der verschiedenen Blutzellen an der Gesamtzahl der Knochenmark-Spenderzellen (Woche 10)

Zusammenfassend ist nach 10 Wochen festzustellen, dass das Engraftment der Knochenmark-Spenderzellen in den Empfängermäusen bei i.v. transplantierten Tieren 10,35-mal höher ($p < 0,001$) war als bei i.h. transplantierten Tieren. Weiterhin gab es deutliche Unterschiede bei der Differenzierung zu B-Zellen, deren Anzahl bei i.v. transplantierten Mäusen 4,6-mal ($p < 0,001$) höher lag, als bei i.h. transplantierten Mäusen und bei der Differenzierung in Monozyten, deren Anzahl bei den i.h. transplantierten Mäusen 1,78-mal ($p=0,3$) so hoch war, wie bei i.v. transplantierten Mäusen.

Bei den mit fötaler Leber transplantierten Tieren lag das Engraftment der Spenderzellen nach 10 Wochen bei 94,46% bei i.v. transplantierten Tieren und bei 28,48% bei i.h. transplantierten Tieren (siehe Abb.13). Wie auch schon bei

der Transplantation mit Knochenmark blieb also der Unterschied im Engraftment zwischen beiden Methoden signifikant ($p < 0,001$), unabhängig von der Art der transplantierten Zellen.

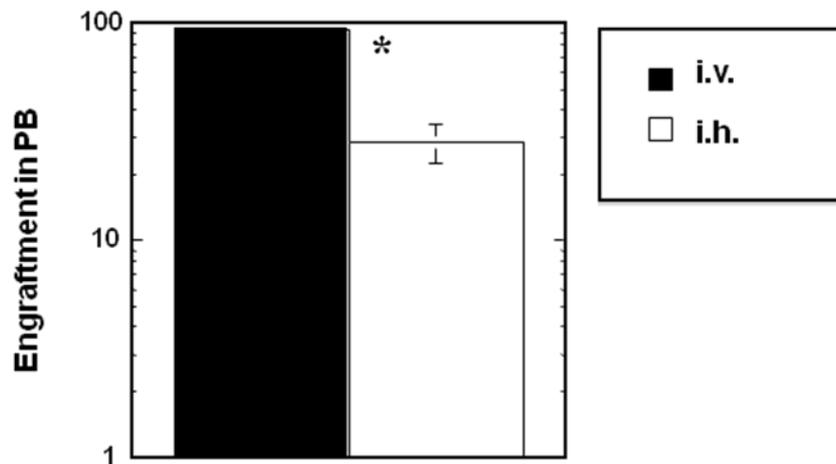


Abb.13 Engraftment der Spenderzellen aus fötaler Leber in % im peripheren Blut 10 Wochen nach der Transplantation i.v. vs i.h.

Auffällig war, dass das Engraftment der Spenderzellen der mit fötaler Leber transplantierten Tiere nach 10 Wochen deutlich über dem Engraftment von mit Knochenmarkzellen transplantierten Tieren lag, und das bei beiden Transplantationsmethoden. Lag das Engraftment der Spenderzellen bei i.v. mit Knochenmarkzellen transplantierten Tieren nach 10 Wochen bei 74,8%, lag es bei mit fötalen Leberzellen transplantierten Tieren bei 94,46%, also 26,28% höher ($p = 0,07$). Bei i.h. transplantierten Tieren lag der Wert für Knochenmark-Spenderzellen nach 10 Wochen bei 7,23%, für Spenderzellen aus der fötalen Leber bei 28,48%, das heißt 3,94 x höher ($p < 0,001$). Die FACS Analyse stellte sich wie folgt dar (siehe Abb.14):

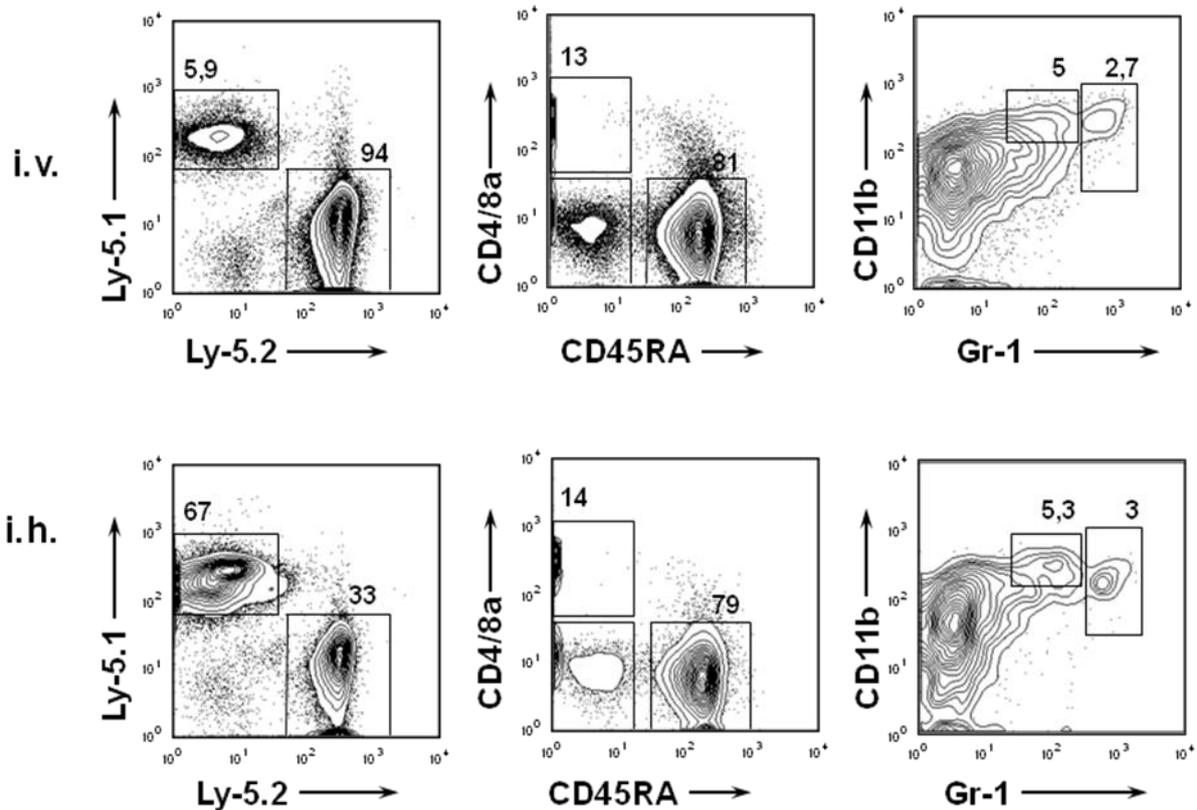


Abb.14 Unterscheidung Spender- (Ly-5.2 fötale Leberzellen)/Empfängerzellen (Ly-5.1) sowie die Differenzierung der Spenderzellen in die verschiedenen Blutzelllinien 10 Wochen nach der Transplantation (Cd45RA: B-Lymphozyten, Cd4/8a: T-Lymphozyten, Gr1+Cd11b+: Granulozyten, Gr1+Cd11b med: Monozyten)

Bei der Differenzierung in die verschiedenen Blutzelllinien gab es zwischen beiden Methoden keine signifikanten Unterschiede (siehe Abb.15). Auffällig war jedoch, dass der Anteil der B-Lymphozyten bei i.h. transplantierten Tieren 1,04-mal höher war (84,29%), als bei i.v. transplantierten Tieren (81,26%). Beim Vergleichsversuch mit Knochenmark (siehe Abb.12) war der Anteil der B-Zellen bei i.h. transplantierten Tieren signifikant niedriger ($p < 0,001$).

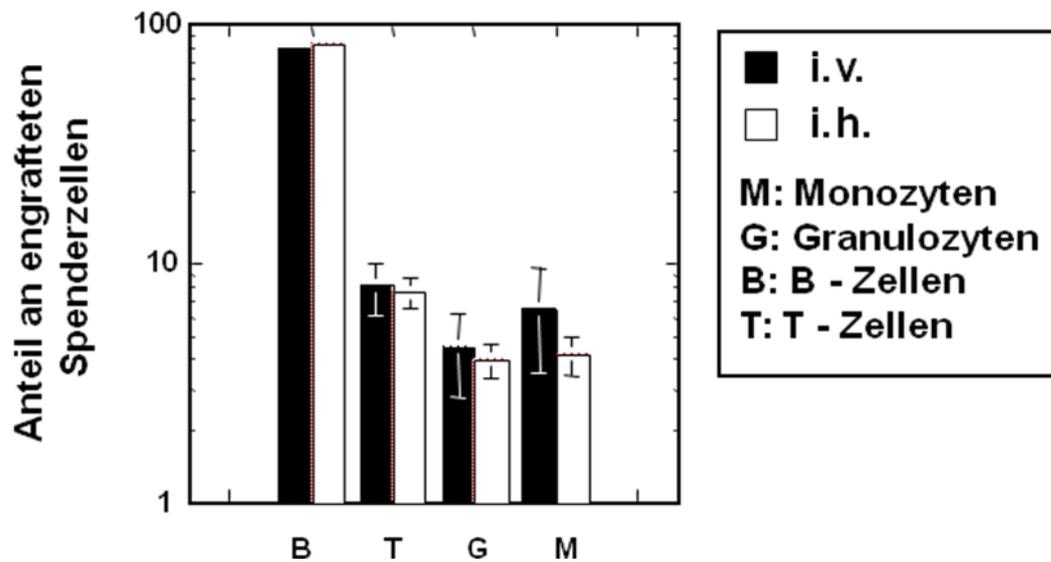


Abb. 15 Anteil der verschiedenen Blutzellen an der Gesamtzahl der Spenderzellen aus der fötalen Leber in % (Woche 10)

Nach 16 Wochen wurden peripheres Blut, Knochenmark, Milz und Leber analysiert. Bei der Euthanasie der Mäuse fiel auf, dass i.h. transplantierte Mäuse deutlich grösser und schwerer waren, als i.v. transplantierte Mäuse. In den meisten Fällen konnte das Erscheinungsbild der Mäuse durchaus als adipös bezeichnet werden, was sich auch beim Eröffnen des Bauchraumes durch massiv erhöhte Fettdepots im Bauchraum und an den inneren Organen zeigte. Die FACS Analyse stellte sich nach 16 Wochen im peripheren Blut wie folgt dar (Abb.16):

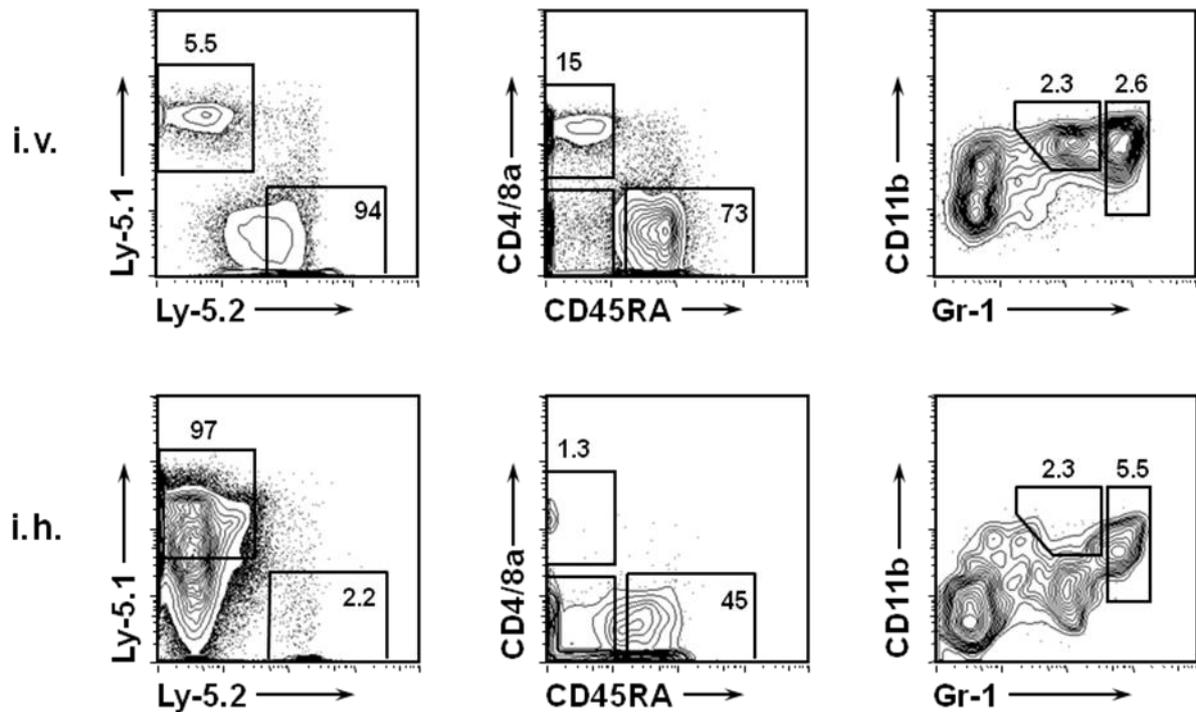


Abb.16 Unterscheidung Spender- (Ly-5.2 Knochenmark)/Empfängerzellen (Ly-5.1) sowie die Differenzierung der Spenderzellen in die verschiedenen Blutzelllinien 16 Wochen nach der Transplantation

Auffällig war, dass das Engraftment der Spenderzellen im peripheren Blut i.h. transplantierter Mäuse im Mittel nur noch 4,15 % betrug, während es bei i.v. transplantierten Mäusen im Mittel noch 71,41 % betrug. Das heißt, dass das Engraftment bei i.h. transplantierten Mäusen zwischen Woche 10 und Woche 16 um 42,6 % zurückging, während es bei i.v. transplantierten Mäusen nur um 4,5% zurückging (Abb.17).

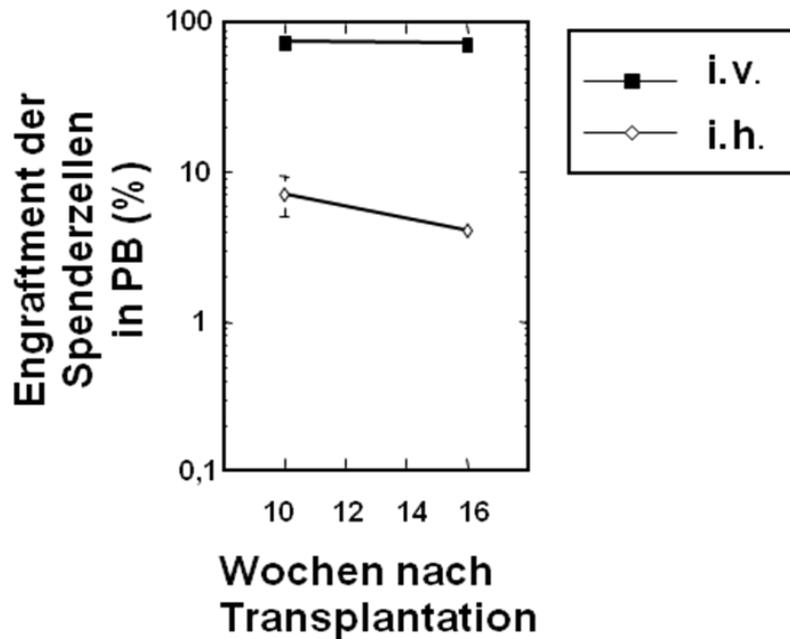


Abb.17 Entwicklung des Engraftments der Knochenmark-Spenderzellen im peripheren Blut der Empfängermaus nach 10 und 16 Wochen in %

Der Anteil der B-Zellen, die aus den Spenderzellen differenzierten, stieg bei i.h. transplantierten Mäusen zwischen Woche 10 und Woche 16 von 7,59 % auf 24,82 %, also um das 3,3 fache, bei den i.v. transplantierten Mäusen von 34,92% auf 63,42 %, also um das 1,8 fache. Insgesamt haben die i.v. transplantierten Mäuse im Vergleich zu den i.h. transplantierten Mäusen nach 16 Wochen signifikant mehr B-Lymphozyten (2,56 % mehr, $p < 0,001$, Abb.18), nach 10 Wochen waren es ebenfalls signifikant mehr (4,6 % mehr, $p < 0,001$, Abb.12). Bei der Differenzierung zu T-Lymphozyten zeigte sich bei den i.h. transplantierten Mäusen zwischen Woche 10 und Woche 16 eine Steigerung von 7,17 % auf 18,86 %, also um das 2,6 fache, während sich die Anzahl der T-Zellen bei i.v. transplantierten Mäusen nur noch in geringem Maße veränderte (7,46 % Woche 10/ 8,41 % Woche 16). Der Anteil der myeloischen Zellen veränderte sich wie folgt: Der Anteil der Granulozyten bei i.h. transplantierten

Mäusen stieg von 3,57 % in Woche 10 (Abb.12) auf 9,36 % in Woche 16 (Abb.18), also um das 2,6 fache, bei den i.v. transplantierten Tieren sogar von 3,71 % auf 11,83 %, also um das 3,2 fache (Abb.18). Während der Anteil der Monozyten bei i.h. transplantierten Mäusen von 13,84 % in Woche 10 auf 4,52 % in Woche 16 fiel, stieg er bei i.v. transplantierten Mäusen von 7,77 % auf 14,62 %, also fast um das Doppelte. Daher zeigten i.v. transplantierte Mäuse nach 16 Wochen signifikant mehr Monozyten ($p < 0,001$) im peripheren Blut als i.h. transplantierte Tiere.

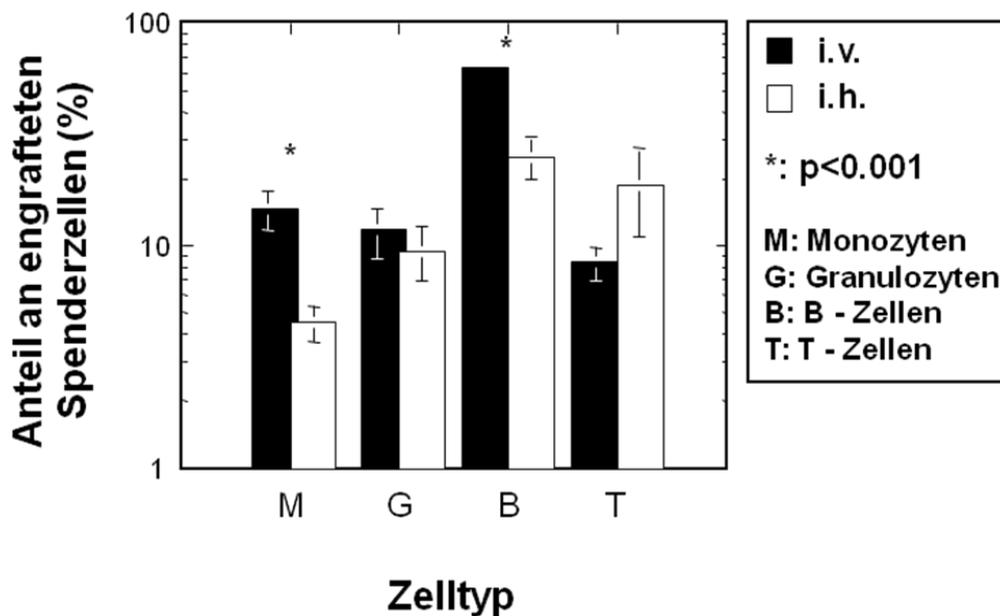


Abb. 18 Anteil der verschiedenen Blutzellen an der Gesamtzahl der Spenderzellen (Woche 16)
(%)

In Knochenmark und Milz wurden zusätzlich zu Engraftment und Differenzierung in die reifen Blutzellen auch das Vorhandensein von hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen untersucht. Diese sind einerseits

durch das Nichtvorhandensein linienspezifischer Oberflächenmarker wie Cd3, B220, Ter119, Gr-1 und Cd11b (Lin-), welche hauptsächlich auf reifen Blutzellen zu finden sind, sowie durch die starke Expression von Sca1 und cKit (Lin-, Sca1+, cKit+ = LSK-Zellen) identifizierbar. Aus diesen entwickeln sich dann MPP-Zellen (multipotente Progenitorzellen). Nach 16 Wochen zeigte sich bei der Analyse des Knochenmarks ein signifikanter Unterschied zwischen i.h. und i.v. transplantierten Tieren im Engraftment der Spenderzellen ($p < 0,001$, Abb. 19 a). Bei den Stamm- und Progenitorzellen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede, allerdings fiel bei den i.h. transplantierten Tieren auf, dass die Cd 34-LSKs eine sehr hohe Varianz aufwiesen. Diese kam dadurch zu Stande, dass nur bei 44% der Tiere die langzeitrepopulierenden Stammzellen engraftet waren (Abb. 19b).

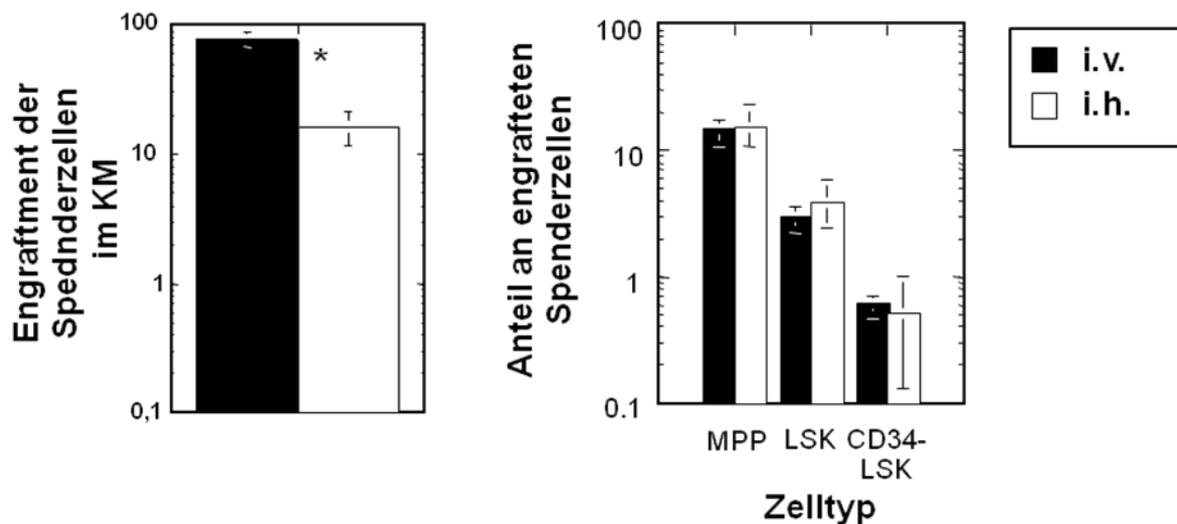


Abb.19 a (links) und b (rechts): a. Anteil der Knochenmark-Spenderzellen im Knochenmark 16 Wochen nach der Transplantation; b. Anteil der Stamm- und Progenitorzellen aus den Spenderzellen 16 Wochen nach der Transplantation

Zusammenfassend ist nach 16 Wochen und der Analyse von peripherem Blut, Knochenmark, Milz und Leber festzustellen, dass die i.h. Transplantation in subletal bestrahlte neugeborene Mäuse etabliert werden konnte. In Bezug auf Praktikabilität der Methode und Überlebensrate der Mäuse liegt die i.h. Transplantation sogar leicht vor der bereits etablierten i.v. Transplantation. Das Engraftment ist jedoch im peripheren Blut sowie in allen untersuchten Organen signifikant niedriger ($p < 0,001$), auch wenn auffällt, dass bei i.h. transplantierten Tieren mit jedem weiteren Versuch eine Verbesserung des Engraftments erzielt werden konnte (siehe Abb. 20). Es scheint also bei der Etablierung der intrahepatischen Transplantationsmethode auch ein Lerneffekt des Transplantierenden von Bedeutung zu sein, welcher sich in einem prozentual höheren Engraftment der Spenderzellen zeigt. Dieser Lerneffekt lässt sich graphisch wie folgt als Lernkurve darstellen (siehe Abb. 20):

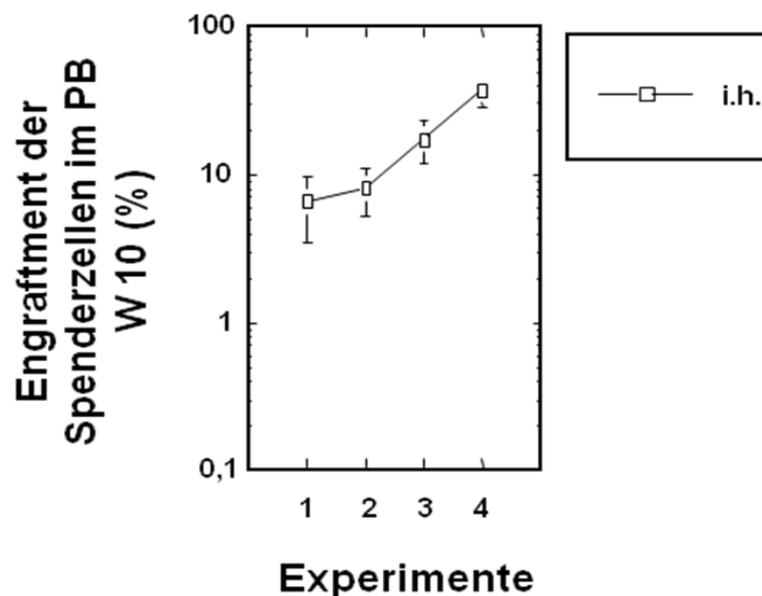


Abb.20 Lernkurve: Engraftment i.h. transplantiertter Mäuse 10 Wochen nach der Transplantation in den Versuchen 1-4 (%)

Auch bei der Differenzierung in die verschiedenen Blutzelllinien gab es zum Teil signifikante Unterschiede. So war bei den i.v. transplantierten Mäusen die Zahl der B-Lymphozyten und der Monozyten signifikant höher ($p < 0,001$), die Zahl der T-Lymphozyten war bei i.h. transplantierten Tieren höher ($p = 0,4$). Bei der Analyse des Knochenmarks fiel auf, dass nur bei 44% der i.h. transplantierten Mäuse Cd34- LSKs nachgewiesen werden konnten, während diese bei 100% der i.v. transplantierten Tiere vorhanden waren. Dies könnte mit der Tatsache im Zusammenhang stehen, dass das Engraftment zwischen Woche 10 und 16 um 42,6 % zurückgeht (Abb.17), während es bei i.v. transplantierten Tieren nur um 4,5% zurückgeht (Abb.17).

Aufgrund des im Vergleich zur i.v. Transplantation niedrigen Engraftments der Spenderzellen bei intrahepatisch transplantierten Mäusen entstand die Vermutung, dass dies auf die subletale Bestrahlungsdosis von 3,5 Gray zurückzuführen sein könnte, konnten doch Goebel, Yoder et al. (Goebel, Yoder et al. 2002) zeigen, dass bei i.v. Transplantationen die Höhe des Engraftments der Spenderzellen von der Anzahl der transplantierten Zellen und der Höhe der Bestrahlung abhängig ist. Daher wurde im Anschluss an den Methodenvergleich ein Bestrahlungsvergleich bei intrahepatisch transplantierten Mäusen durchgeführt. Dazu wurden 1-4 Tage alte C57BL/6.J Mäuse mit 3,5, 5 und 8 Gray bestrahlt und mit 2×10^5 Knochenmarkzellen intrahepatisch transplantiert.

Die mit 8 Gray bestrahlten Tiere litten unter massiven Wachstums- und Entwicklungsstörungen. Da 1 Woche nach Bestrahlung weder Größen- und Fellwachstum eingesetzt hatten, noch eine eigenständige Mobilität zu erkennen war, mussten die Tiere euthanasiert werden. Die mit 5 Gray bestrahlten Tiere entwickelten sich zunächst scheinbar normal, jedoch fiel bei der ersten

Blutabnahme 10 Wochen nach der Transplantation ein mittelgradiger Bewegungstremor beider Hintergliedmaßen auf. Im Engraftment der transplantierten Zellen zeigten sich signifikante Unterschiede zu den Empfänger-mäusen, die eine 3,5 Gray Ganzkörperdosis bekommen hatten (3,5 Gray: 54%, 5 Gray 72,5%, $p=0,03$).

Nach 16 Wochen wurden die Tiere euthanasiert und erneut auf ihr äußeres Erscheinungsbild, Verhalten und das Engraftment der Spenderzellen untersucht. Es fiel erneut die Adipositas der mit 3,5 Gray bestrahlten Mäuse auf, wohingegen die mit 5 Gray bestrahlten Tiere leicht unter Durchschnittsgröße- und Gewicht von intravenös transplantierten Mäusen lagen (hier nicht gezeigt). Diese Tatsache deutet auf eine gering ausgeprägte, aber vorhandene Entwicklungsstörung hin. Weiterhin zeigten die mit 5 Gray bestrahlten Mäuse noch immer den Bewegungstremor der Hintergliedmaßen, der sich über die letzten 6 Wochen noch verstärkt hatte. Das Erscheinungsbild der Mäuse legte die Annahme nahe, dass eine Bestrahlungsdosis von 5 Gray für 1-4 Tage alte Jungtiere zu hoch ist.

16 Wochen nach der Transplantation zeigten sich im Engraftment keine signifikanten Unterschiede mehr zwischen beiden Bestrahlungsmethoden.

Engraftment in %	3,5 Gray	5 Gray	p-Wert
peripheres Blut	22,11	36,86	$p=0,3$
Knochenmark	26,1	26,3	$p=0,99$

Tabelle 2 Mittelwerte des Engraftments der Spenderzellen im peripheren Blut und im Knochenmark 16 Wochen nach der Transplantation bei mit 3,5 Gray und mit 5 Gray bestrahlten Mäusen; der p-Wert beschreibt den Standardfehler

Aufgrund der vorhandenen Entwicklungsstörung, der Ausbildung eines sich verschlimmernden Bewegungstremors und des geringen Unterschiedes im Engraftment der Knochenmark-Spenderzellen wurden die Tiere des Bestrahlungsvergleichs nicht näher analysiert und der Versuch nicht wiederholt.

4.2 Vergleich der langzeitrepopulierenden Stammzellen i.h. transplantiertter Tiere mit denen i.v. transplantiertter Tiere

Nach der erfolgreichen Etablierung der i.h. Transplantation war das **2. Ziel dieser Arbeit** ein Qualitätsvergleich der langzeitrepopulierenden Stammzellen aus der i.h. Transplantation mit denen aus der bereits etablierten i.v. Transplantation. Dazu wurden aus dem Knochenmark der i.h. und i.v. mit 2×10^5 Knochenmarkzellen transplantierten Mäuse 16 Wochen nach der Transplantation die Cd150+ LSKs heraussortiert (siehe Methoden 3.2.14) und diese in Ly-5.1 Empfängermäuse sekundär intravenös transplantiert (siehe Abb.21). Cd150 ist ein Oberflächenmarker für langzeitrepopulierende Stammzellen mit Selbsterneuerungspotential. Je stärker die Zellen positiv für Cd150 sind, desto ausgeprägter ist das Selbsterneuerungspotential (Morita, Ema et al. 2010). Bei den intrahepatisch transplantierten Tieren war die Zahl der Cd150+ LSKs so gering, dass diese nicht sekundär transplantiert werden konnten. Bei den i.v. transplantierten Tieren wurde der Versuch einmal mit 150 Cd150+ LSKs und einmal mit 300 Cd150+ LSKs durchgeführt. Auch hier wurden Differentialblutbild, Engraftment der transplantierten Zellen und Unterschiede in der Differenzierung der Spenderzellen in die verschiedenen Blutzelllinien untersucht.

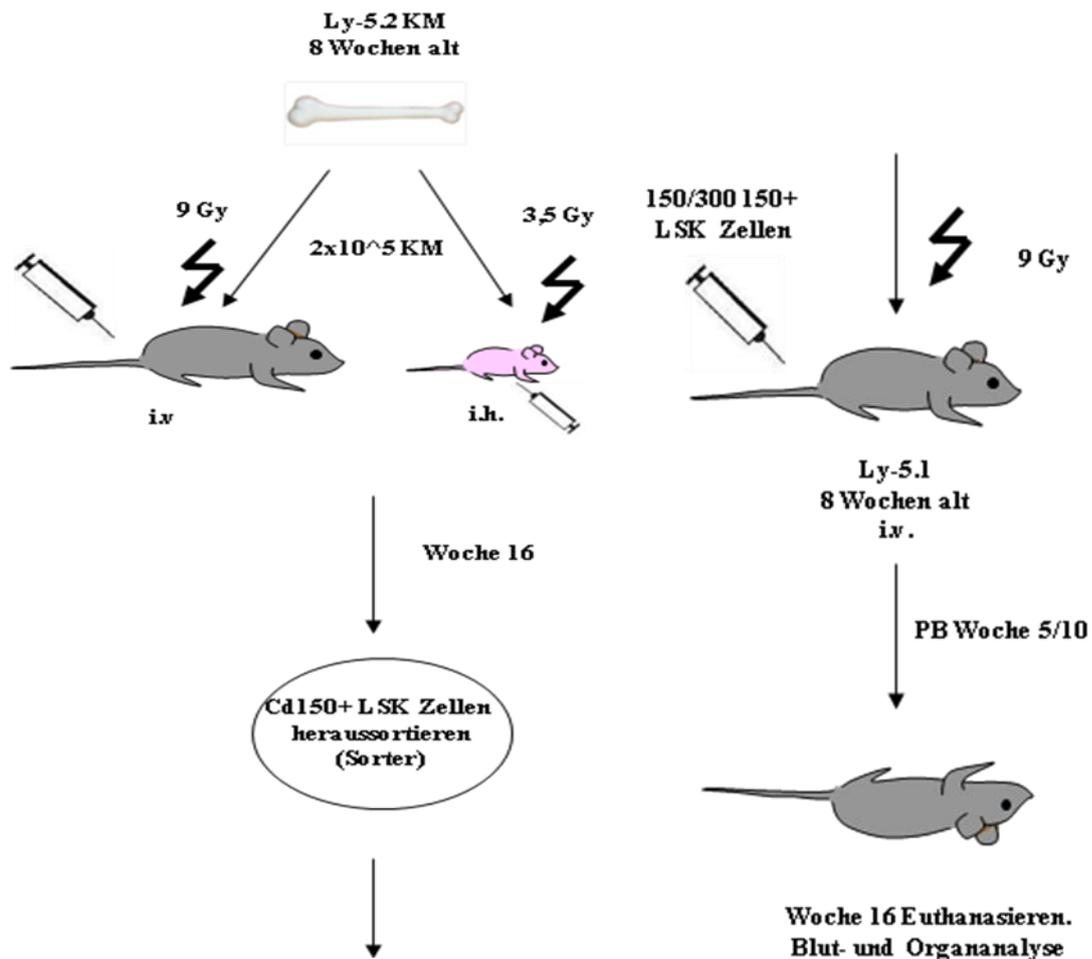


Abb.21 Versuchsaufbau sekundäre Transplantation Cd150+ LSKs i.v. und i.h. transplantiertes Tiere

4.2.1 Heraussortieren der Cd150+ LSKs

Nachdem das Knochenmark der i.h. und i.v. transplantierten Mäuse separat gepooled, lineage aufgereinigt und mit Antikörpern gefärbt worden war (siehe Methoden 3.2.2.4 und 3.2.13), wurden im „MoFlo“ (Modular Flow) High Speed Cell Sorter von BeckmanCoulter die Cd150+ Spender-LSKs herausortiert (siehe Methoden 3.2.14). Dabei wurden aus dem Lineage aufgereinigten Knochenmark mit den Antikörpern Lineage Cocktail und Cd117 (Abb. 22) die

lineage negativen Zellen gated und aus diesen die Cd117+ und Sca-1+ LSKs (Abb.22). Aus diesen LSKs wurden dann die Cd150+ Ly-5.2+ Zellen (Spenderzellen der primären Transplantation, Abb.22) gated und diese herausortiert. Wie aus Abb. 22 ersichtlich, lagen bei primär i.v. transplantierten Tieren 4,6 % Cd150+ Spender-LSKs im Empfängerknochenmark vor (ca. 1200 Zellen), während bei primär i.h. transplantierten Tieren 0 % Cd150+ Spender-LSKs im Empfängerknochenmark vorhanden waren.

Da aus der Literatur keine Hinweise über die Stammzell-Qualität Cd150+ LSK Zellen aus primär transplantierten Tieren bekannt waren, wurden die herausortierten Zellen in zwei unterschiedlichen Zellmengen in erwachsene Empfänger sekundär transplantiert.

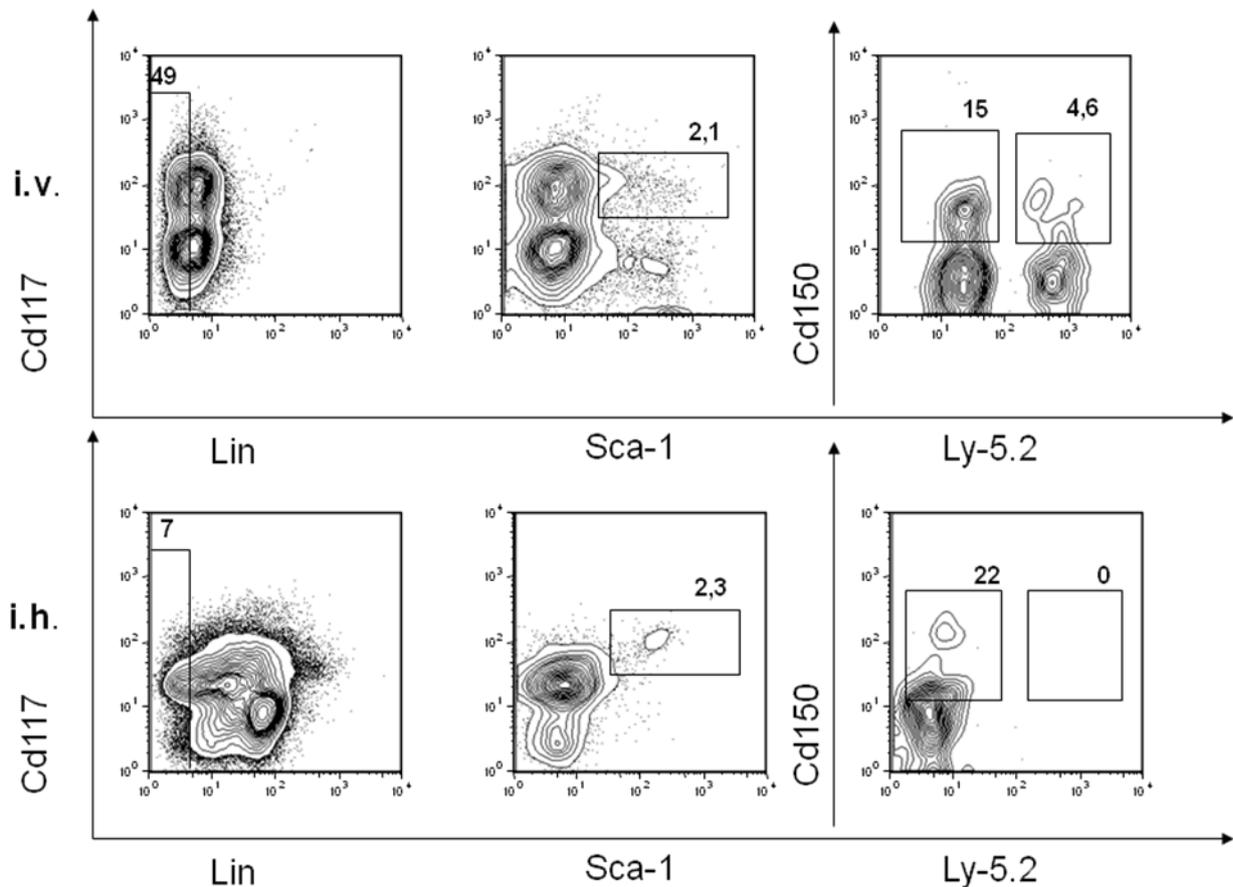


Abb.22 Heraussortieren der Cd150+ Spenderzellen; links: lineage negative Zellen; Mitte: Cd117+Sca-1+ LSKs aus den lineage negativen Zellen; rechts: Cd150+Ly-5.2 – LSKs (Empfängerzellen) und Cd150+ Ly-5.2+ LSKs (Spenderzellen) aus den Cd117+Sca-1+ LSKs

4.2.2 Differentialblutbild

Aus den i.h. transplantierten Empfängern konnte keine ausreichende Menge CD150+ LSK Zellen gewonnen werden, um diese mit den gleichen Zellen aus i.v. transplantierten Tieren zu vergleichen. Daher beziehen sich die folgenden Ergebnisse nur auf die CD150+ LSK Zellen, die aus i.v. transplantierten Primärempfängertieren gewonnen wurden.

5 Wochen nach der Transplantation wurde den Mäusen zum ersten Mal Blut aus der Vena facialis entnommen. Bei den sekundär transplantierten Mäusen waren die Werte aller Blutzellen deutlich niedriger als bei primär transplantierten Mäusen, unabhängig davon, ob 150 oder 300 Cd150+ LSKs transplantiert wurden (hier nicht gezeigt). Nach 5 Wochen lagen die Werte von Erythrozyten, Thrombozyten und Hämatokrit auch deutlich unter dem Normwert gesunder nicht transplanzierter Mäuse (hier nicht gezeigt, siehe Tabelle 1). Nach 10 und 16 Wochen lagen die Werte wieder im Normbereich gesunder nicht transplanzierter Mäuse und sind nahezu mit den primär transplantierten Mäusen vergleichbar (hier nicht gezeigt).

4.2.3 Engraftment der transplantierten Zellen

Bei den mit 150 Cd150+ LSKs transplantierten Tieren zeigte sich 5 Wochen nach der Transplantation kein Engraftment der Spenderzellen (siehe Abb.23), wohingegen bei den Tieren, die mit 300 Cd150+ LSKs transplantiert wurden, bei 3 von 4 Mäusen Engraftment nachzuweisen war (siehe Abb.24). Der Wert 0,003 % Spenderzellen bei den mit 150 Cd150+ LSKs transplantierten Tieren ist zu gering, um als Engraftment bezeichnet zu werden. Der Mittelwert der Spenderzellen bei mit 300 Cd150+ LSKs transplantierten Mäusen lag bei 7,66%. Der hohe Anteil der Empfängerzellen (siehe Abb.23 und 24) trotz letaler Bestrahlung ist durch die zusätzliche Gabe von 1×10^5 Knochenmark-Helferzellen (Ly-5.1) und 5×10^5 Milz-Helferzellen (Ly-5.1) zu erklären. Helferzellen sind Zellen mit dem gleichen Allel (hier Cd45.1), die mit den Cd150+ LSKs kotransplantiert werden, die selbst aber keine oder nur sehr wenige Stammzellen enthalten. Da sie jedoch in der Lage sind, über einen Zeitraum von ca. 2-3 Wochen immunkompetente Zellen zur Verfügung zu

stellen, sichern sie das Überleben der Mäuse im kritischen Zeitraum nach der Bestrahlung.

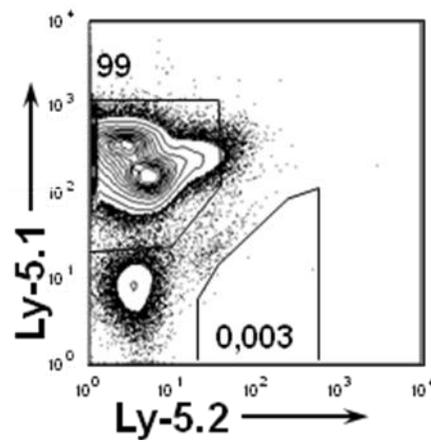


Abb.23 Unterscheidung Spender- (Ly-5.2, 0,003%) und Empfängerzellen (Ly5.1, 99%) im peripheren Blut Woche 5 nach der Transplantation mit 150 Cd150+ LSKs; hier kein Engraftment der Spenderzellen (da 0,003% zu gering, um als Engraftment bezeichnet zu werden)

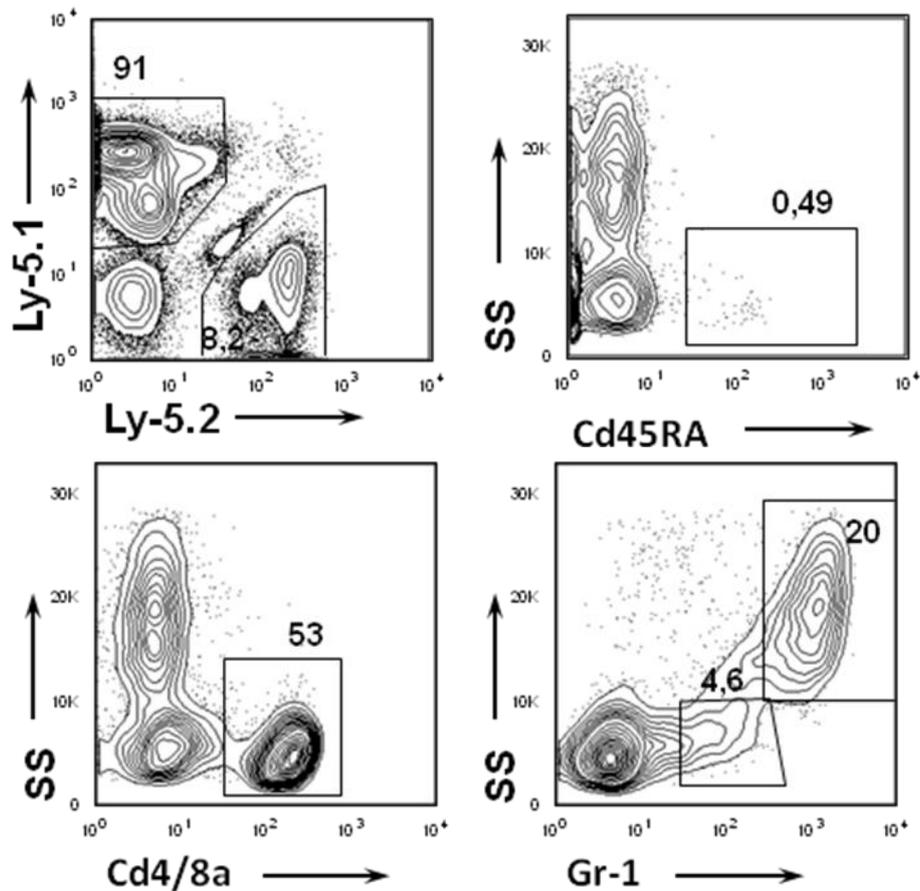


Abb.24 Unterscheidung Spender- (Ly-5.2, 8,2%) und Empfängerzellen (Ly5.1, 91%) im peripheren Blut und die Differenzierung der Spenderzellen in die verschiedenen Blutzelllinien (Cd45RA=B-Zellen, Cd4/8a=T-Zellen, Gr-1=Granulozyten) Woche 5 nach der Transplantation mit 300 Cd150+ LSKs

Die zweite Blutabnahme erfolgte 10 Wochen nach der Transplantation. Bei den mit 150 Cd150+ LSKs transplantierten Tieren zeigte wiederum keine Maus Engraftment (siehe Abb. 25, 0,002%), während bei den mit 300 Cd150+ LSKs transplantierten Tieren erneut 3 von 4 Mäusen Engraftment zeigten (siehe Abb.26). Der Mittelwert der Spenderzellen war allerdings von 7,66% auf 5% zurückgegangen, das heißt um 34,73% (siehe Abb.29).

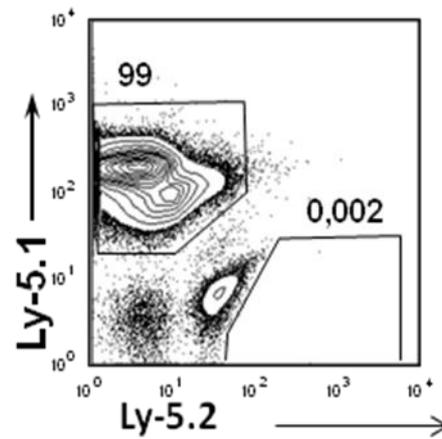


Abb.25 Unterscheidung Spender- (Ly-5.2, 0,002%) und Empfängerzellen (Ly5.1, 99%) im peripheren Blut Woche 10 nach der Transplantation mit 150 Cd150+ LSKs; hier kein Engraftment der Spenderzellen (da 0,002% zu gering, um als Engraftment bezeichnet zu werden)

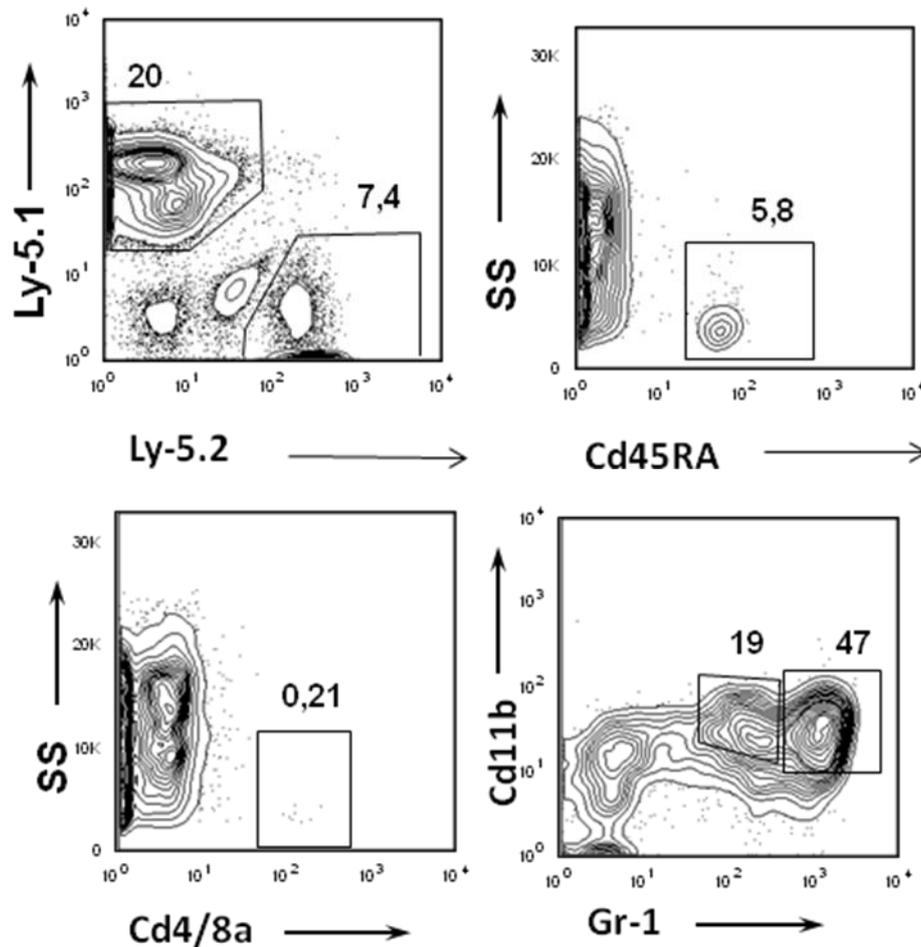


Abb.26 Unterscheidung Spender- (Ly-5.2, 7,4%) und Empfängerzellen (Ly5.1, 20%) im peripheren Blut und die Differenzierung der Spenderzellen in die verschiedenen Blutzelllinien (Cd45RA=B-Zellen, Cd4/8a=T-Zellen, Gr-1+Cd11b+=Granulozyten, Gr-1+Cd11bmed=Monozyten) Woche 10 nach der Transplantation mit 300 Cd150+ LSKs

Nach 16 Wochen wurden zusätzlich zum peripheren Blut Knochenmark und Milz durchflusszytometrisch untersucht. Von den mit 150 Cd150+ LSK Zellen transplantierten Mäusen zeigte auch nach 16 Wochen keine Maus Engraftment, weder im peripheren Blut noch in Knochenmark oder Milz (Abb.27). Bei den mit 300 Cd150+LSKs transplantierten Mäusen zeigten weiterhin 3 von 4 Mäusen in allen untersuchten Organen Engraftment (Abb.28). Auffällig war

hier, dass die 3 Mäuse eine komplett unterschiedliche Differenzierung der Stammzellen in die verschiedenen Blutzelllinien zeigten (Abb.28) und dass das mittlere Engraftment im peripheren Blut erneut von 5% in Woche 10 auf 2,77% in Woche 16 zurückging, also nochmal um 44,6% (siehe Abb. 29).

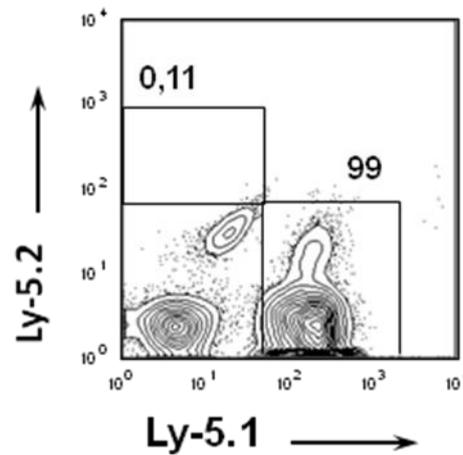


Abb.27 Unterscheidung Spender- (Ly-5.2, 0,11%) und Empfängerzellen (Ly5.1, 99%) im peripheren Blut Woche 16 nach der Transplantation mit 150 Cd150+ LSKs; hier kein Engraftment der Spenderzellen (da 0,11% zu gering, um als Engraftment bezeichnet zu werden)

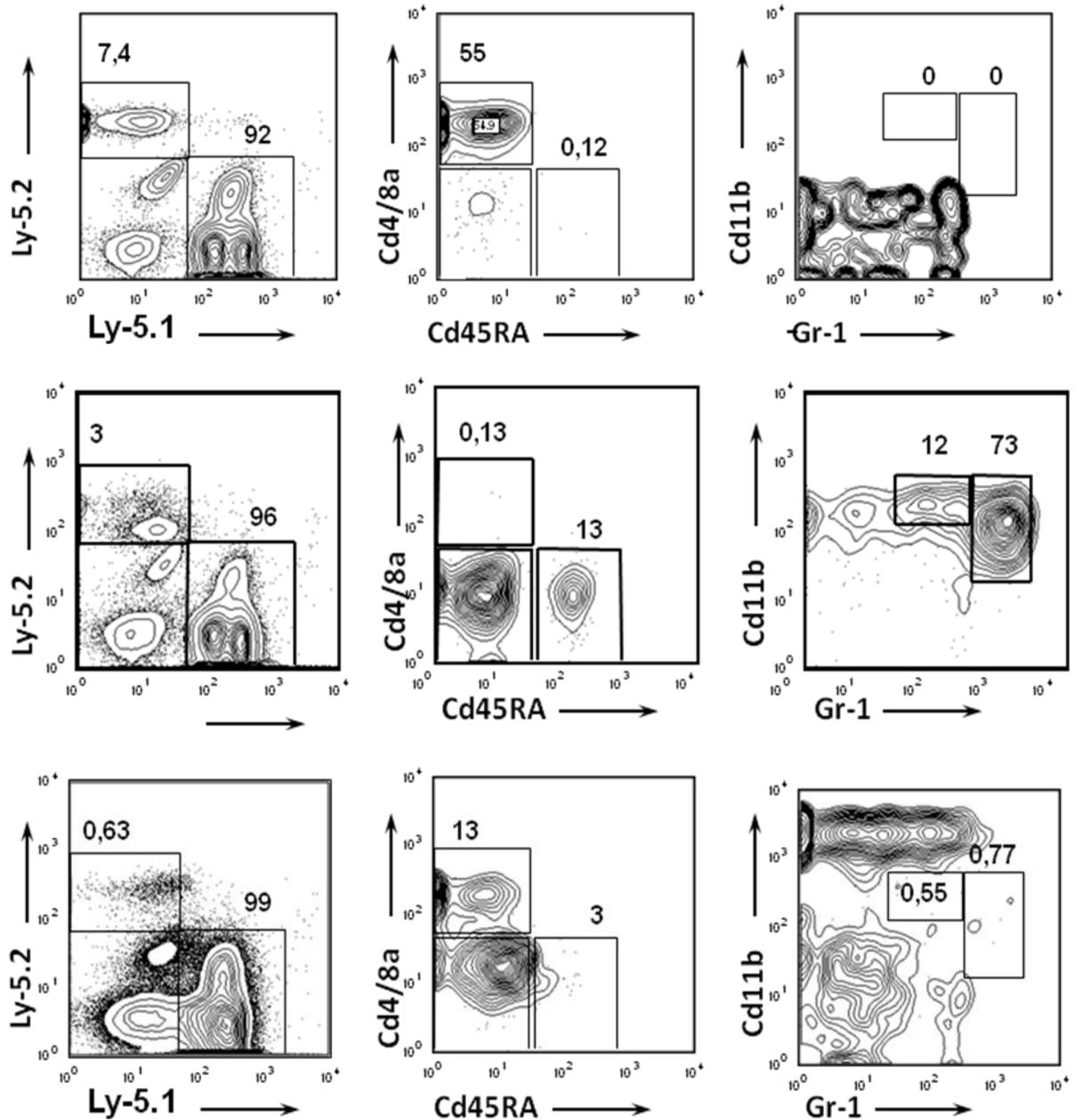


Abb.28 Unterscheidung Spender- (Ly-5.2) und Empfängerzellen (Ly5.1) im peripheren Blut und die Differenzierung der Spenderzellen in die verschiedenen Blutzelllinien (Cd45RA=B-Zellen, Cd4/8a=T-Zellen, Gr-1=Granulozyten, Cd11b=Monozyten) Woche 16 nach der Transplantation mit 300 Cd150+ LSKs (Maus 0, Maus2, Maus 3)

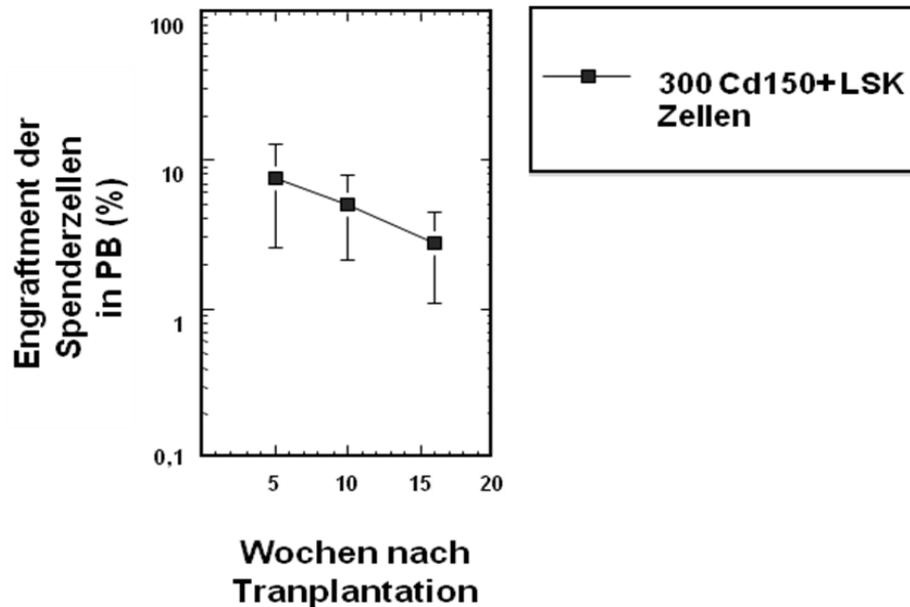


Abb.29 Entwicklung des Engraftments der 300 Cd150+LSK Spenderzellen im peripheren Blut der Empfängermäuse nach 5, 10 und 16 Wochen (%)

Erstaunlicherweise, und wie bereits erwähnt, gab es deutliche Unterschiede bei der Differenzierung der Stammzellen in die verschiedenen Blutzelllinien. Während Maus 0 hauptsächlich T-Lymphozyten ausbildete (55% der Spenderzellen), sehr wenig B-Lymphozyten (0,12% der Spenderzellen) und keine Granulozyten oder Monozyten (0% der myeloischen Zellen), differenzierten bei Maus 2 der Hauptteil der Zellen zu Granulozyten (73% der myeloischen Zellen) und Monozyten (12% der myeloischen Zellen), ein geringer Anteil zu B-Lymphozyten (13% der Spenderzellen) und ein geringer Anteil zu T-Lymphozyten (0,13% der Spenderzellen). Die Differenzierung der Zellen in Maus 3 erinnerten an Maus 0, hier waren ebenfalls die T-Lymphozyten mit 13% die häufigsten Zellen, gefolgt von B-Lymphozyten mit 3 % und sehr wenig Granulozyten (0,77%) und Monozyten (0,55%).

In Knochenmark und Milz wurden zusätzlich zu Engraftment und Differenzierung in die reifen Blutzellen auch das Vorhandensein von hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen untersucht. Im Knochenmark lag ein mittleres Engraftment der Spenderzellen von 0,97% vor (Abb. 30a). Der Anteil der multipotenten Progenitorzellen (MPPs) an den Spenderzellen betrug 9,4% (Abb.30b), der Anteil der LSKs 0,16% (Abb.30b). Bei den Cd34- LSKs betrug der Anteil an den Gesamt-LSKs im Mittel 0,1% (Abb.30b), die hohe Varianz ergab sich daraus, dass nur bei 1 von 4 Mäusen Cd34-LSKs im Knochenmark nachzuweisen waren.

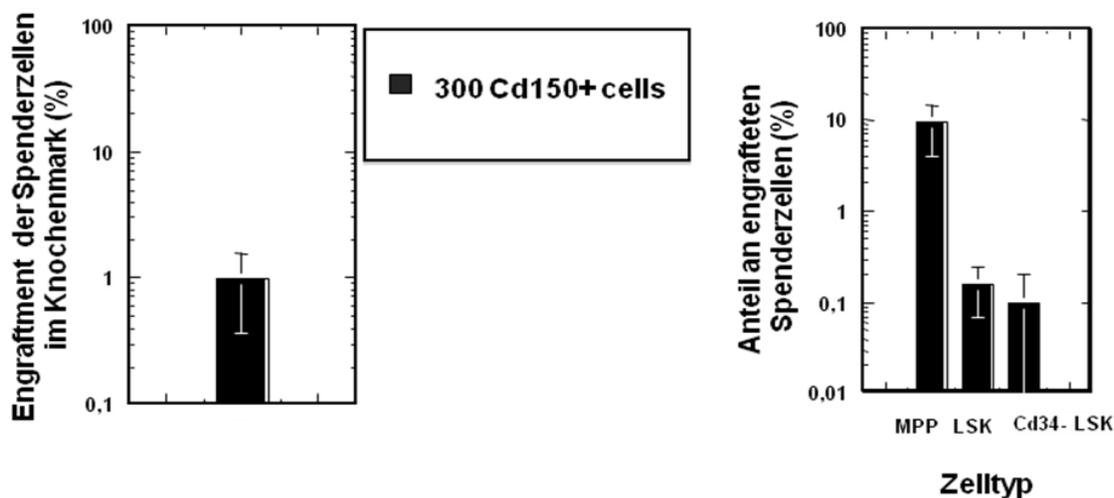


Abb.30a und b: a. Anteil der Cd150+ LSK Spenderzellen im Knochenmark (%) 16 Wochen nach der Transplantation; b. Anteil der Stamm- und Progenitorzellen aus den Spenderzellen (%)

Zusammenfassend ist nach 16 Wochen und der Analyse von peripherem Blut, Knochenmark und Milz festzustellen, dass eine Transplantation von aus primär transplantierten Mäusen heraussortierten Cd150+ LSKs möglich ist und ein Engraftment der Spenderzellen erreicht werden kann. Es konnte gezeigt werden,

dass eine Transplantation von 150 Cd150+ LSKs quantitativ nicht ausreicht, um ein Engraftment der Spenderzellen zu erreichen. Bei der Anzahl von 300 Cd150+ LSKs lag bei 3 von 4 transplantierten Mäusen Engraftment vor, allerdings waren nicht bei jeder Maus alle Blutzelllinien vorhanden (siehe Abb.28). Auch die langzeitrepopulierenden Stammzellen konnten nur bei 1 von 4 Mäusen im Knochenmark nachgewiesen werden. Die eigentliche Fragestellung des Versuches, der Vergleich der langzeitrepopulierenden Stammzellen primär i.h. transplantiertes Tiere mit denen primär i.v. transplantiertes Tiere konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht beantwortet werden, da die Anzahl der langzeitrepopulierenden Stammzellen primär i.h. transplantiertes Tiere zu gering war, um sekundär weitertransplantiert zu werden.

4.3 Etablierung eines juvenilen Leukämiemodells

Daueraktivierende Mutationen der Fms-like Tyrosinkinase 3 (FLT-3), wie die interne Tandemduplikation (ITD), sind die häufigsten genetischen Veränderungen bei akuter myeloischer Leukämie (AML). Die interne Tandemduplikation der juxtamembranen Domäne liegt bei ca. 20-27% der erwachsenen AML-Patienten vor und führt zu einer konstitutiven Aktivierung der FLT3 Tyrosinkinase. Da diese eine wichtige Rolle bei der Proliferation und Differenzierung früher hämatopoetischer Progenitorzellen spielt, kommt es damit zu einer erhöhten Zellproliferation, einer Differenzierungsstörung sowie zu einer Apoptosehemmung im hämatopoetischen System. Bei juveniler AML ist die Mutation etwas weniger häufig, sie liegt bei 11,5% der Patienten vor (Zwaan, Meshinchi et al. 2003).

Nach der erfolgreichen Etablierung der intrahepatischen Transplantation, war das **3. Ziel dieser Arbeit** die Anwendung dieser Methode zur Etablierung eines juvenilen Leukämie-modells. Dazu wurde ein Modell, das bei adulten Tieren schon erfolgreich etabliert und publiziert wurde (Kelly, Liu et al. 2002; Grundler, Miething et al. 2005), in ein juveniles Modell umgewandelt, indem subletal bestrahlte (3,5 Gray) neugeborene C57BL/6.J (B6, B6.Cd45.2) Mäuse mit transduzierten fötalen Leberzellen aus B6.SJL-*Ptprc*^a *Pepc*^b/BoyJ (Cd45.1, Ly-5.1) Mäusen transplantiert wurden. Fötale Leberzellen wurden aufgrund der Annahme verwendet, dass bei kindlichen Leukämien eine onkogene Aktivierung bereits während der Embryogenese stattfindet, die sich nach der Geburt zu einer Leukämie entwickeln kann. Verglichen wurde die Transplantation mit MIG (Leervektor), einem FLT3-Wildtyp niedrig exprimierenden Konstrukt (FLT3-WT^{low}) und einem FLT3-ITD hoch exprimierendem Konstrukt (FLT3-ITD^{high}) transduzierten Zellen und deren unterschiedliche Auswirkungen in der Maus.

Aus dem Erwachsenenmodell mit transduzierten Knochenmark-Zellen ist bekannt, dass FLT3-ITD eine myeloproliferative Erkrankung (MPD) verursacht (Kelly, Liu et al. 2002) und dass die Entwicklung der Krankheit und deren Latenzzeit von der Anzahl der transplantierten Zellen und Intensität der Expression des FLT3-ITD Proteins abhängen (Grunder, Miething et al. 2005). Um festzustellen, ob sich auch im juvenilen Modell eine MPD entwickelt, wurde der Vektor FLT3-ITD mit hoher Expressionsintensität des Proteins verwendet (FLT3-ITD^{high}) und eine Zellzahl von 5×10^3 GFP+ Zellen im ersten Versuch (n=3) und 5×10^4 GFP+ Zellen im zweiten Versuch (n=6) transplantiert. Die Zellzahl wurde aufgrund der Annahme, dass der kindliche Organismus empfindlicher gegenüber Onkogenen ist, niedriger angesetzt als aus dem Erwachsenenmodell bekannt. Weiterhin sollte die Dauer der Entwicklung einer Krankheit verlängert werden, um die Tiere erst im ausgewachsenen Zustand

untersuchen zu müssen. Als Kontrollen fungierten in beiden Versuchen ein Leervektor (MIG) und FLT3-WT^{low} (siehe Abb.31).

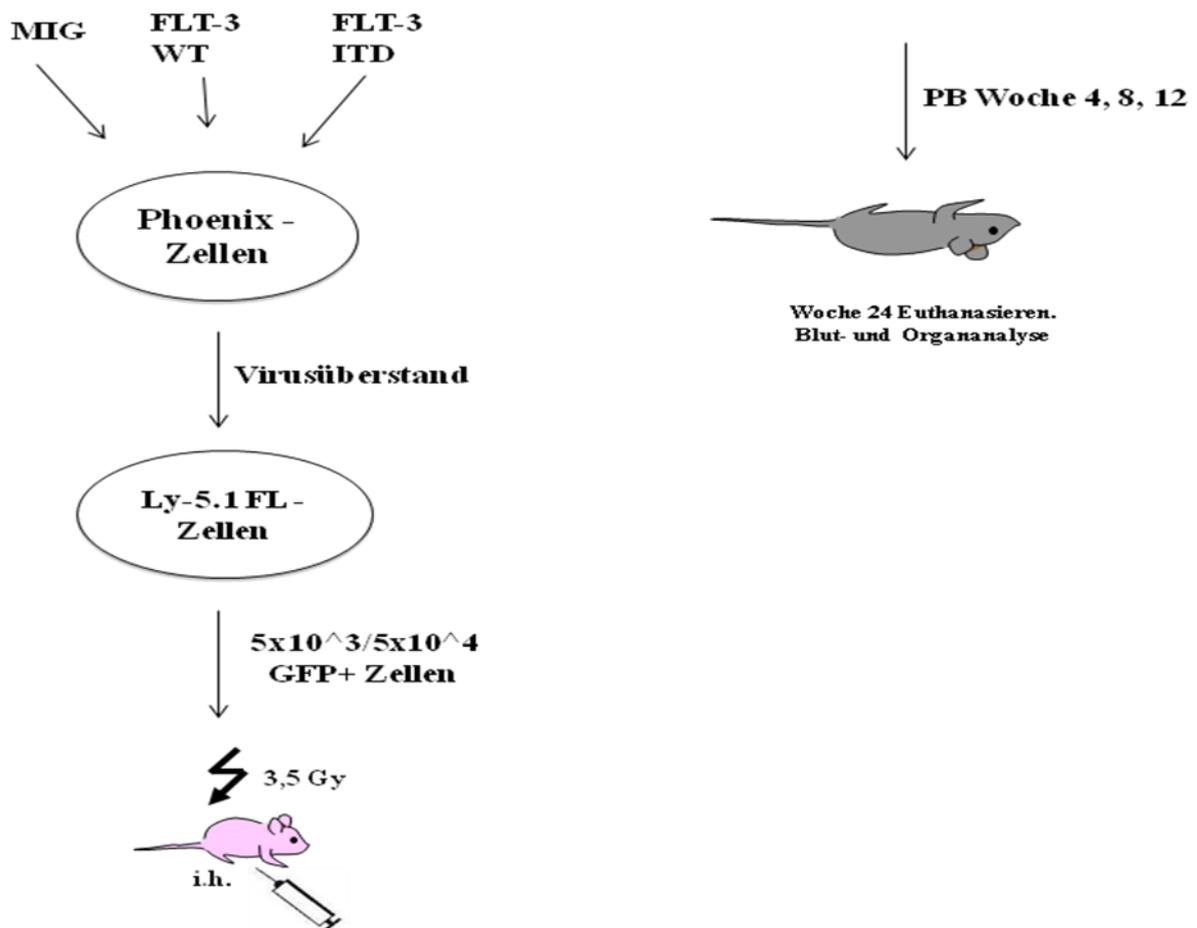


Abb.31 Versuchsaufbau Leukämie-Modell

4.3.1 Transduktion der fötalen Leberzellen und Ermittlung der GFP+ Spenderzellen

Zur Transduktion der fötalen Leberzellen wurden retrovirale Konstrukte benutzt, welche zusätzlich zu FLT3-WT^{low} und FLT3-ITD^{high} das angereicherte grün-fluoreszierende Protein (GFP) koexprimieren (siehe Literaturübersicht 2.5, Methoden 3.2.6). Nach erfolgter Transduktion der fötalen Leberzellen wurden diese durchflusszytometrisch auf die Zahl der GFP+ Zellen untersucht, was als Beweis der Integration der Virus-DNA in das Genom der Zielzellen gewertet wurde. GFP kann aufgrund seiner grünen Fluoreszenz im FITC-Kanal detektiert werden (siehe Abb.32).

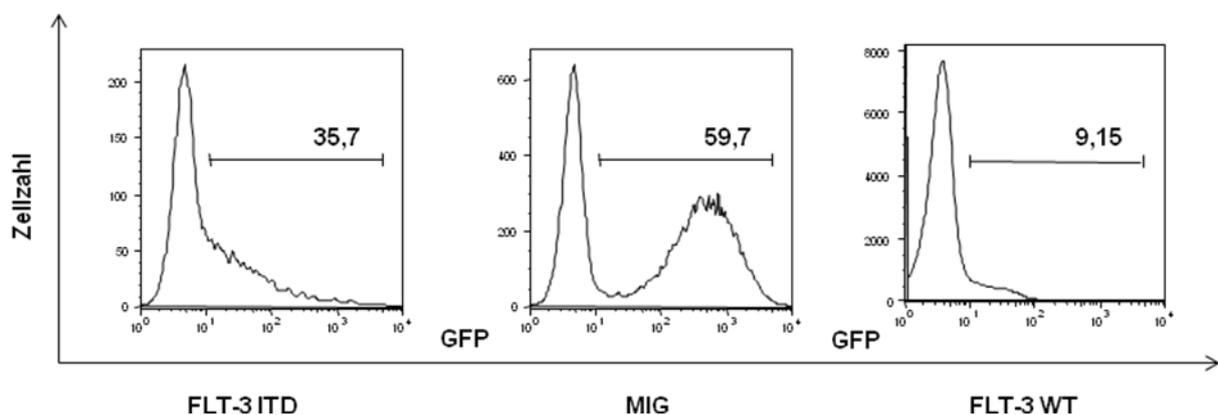


Abb. 32 Durchflusszytometrische Analyse: Anzahl der GFP+ fötalen Leberzellen in % nach durchgeführter Transduktion mit FLT3-ITD^{high}, MIG (Leervektor) und FLT3-WT^{low}

Trotz der unterschiedlichen Anzahl GFP+ Zellen wurden für MIG (Leervektor), FLT3-WT^{low} und FLT3-ITD^{high} die gleiche Anzahl GFP+ Zellen in die Empfängermause transplantiert: 5×10^3 im ersten Versuch und 5×10^4 im zweiten Versuch.

4.3.2 Engraftment der GFP+ Spenderzellen, Differentialblutbild und klinisches Bild der Mäuse 4 Wochen nach der Transplantation

4 Wochen nach der Transplantation wurde den Mäusen zum ersten Mal Blut aus der Vena facialis entnommen und dieses am Blutmessgerät und durchflusszytometrisch auf das Vorhandensein von GFP+ Zellen untersucht. Die mit dem Leervektor transplantierten Mäuse (MIG) zeigten ein mittleres Engraftment von GFP+ Spenderzellen von 1,07%, Mäuse mit FLT3-WT^{low} 0,6 % und Mäuse mit FLT3-ITD^{high} 0,2% (siehe Abb.33).

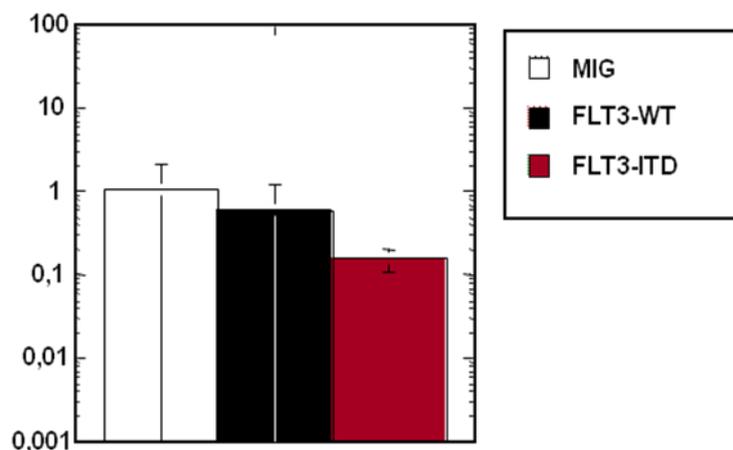


Abb.33 Engraftment der GFP+ Spenderzellen im peripheren Blut 4 Wochen nach der Transplantation in %

Zu diesem Zeitpunkt zeigten die mit FLT3-ITD transplantierten Mäuse weder Verhaltensauffälligkeiten oder Krankheitssymptome noch Entwicklungsstörungen, auch bei der Untersuchung des Blutbildes gab es keine Auffälligkeiten (gemessen am Scil Vet Abc™ Animal Blood Counter (Scil Vet academy GmbH, Viernheim, Deutschland,) hier nicht gezeigt). Bei der FACS-

Analyse fiel jedoch bei allen Mäusen, unabhängig vom transplantierten Konstrukt auf, dass GFP⁺ Zellen sich hauptsächlich zu T-Zellen (MIG:51%, FLT3-WT: 13%, FLT3-ITD 32%,) und myeloischen Zellen ausdifferenzierten und in der letzten Gruppe die Population der GR1⁺Cd11b⁻ Zellen mit Abstand die Größte war (MIG: 51,28%, FLT3-WT:43,2%, FLT3-ITD: 32%) (hier nicht gezeigt). Interessanterweise fand jedoch kaum eine Differenzierung zu B-Lymphozyten statt (MIG: 1,07%, FLT3-WT: 0%, FLT3-ITD: 21,98%), obwohl die i.h. Transplantation von nicht transduzierten fötalen Leberzellen gezeigt hatte, dass die Zahl der B-Zellen 10 Wochen nach der Transplantation bei 84,29% (siehe Abb.15) lag.

4.3.3 Engraftment der GFP⁺ Spenderzellen, Differentialblutbild und klinisches Bild der Mäuse 12 Wochen nach der Transplantation

Bei der 2. Blutabnahme 12 Wochen nach der Transplantation zeigte sich, dass das Engraftment der Spenderzellen für MIG (Leervektor) und FLT3-WT gesunken war. GFP⁺ Spenderzellen des Leervektors (MIG) befanden sich nur noch zu 0,012% im peripheren Blut, FLT3-WT zu 0,026%. Für FLT3-ITD stieg die Zahl der GFP⁺ Spenderzellen im Mittel sehr stark an, von 0,2% nach 4 Wochen auf 6,16% 12 Wochen nach der Transplantation (siehe Abb.34).

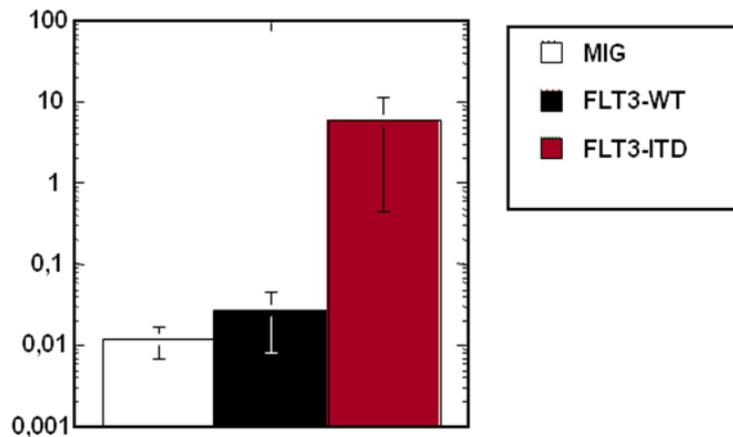


Abb.34 Engraftment der GFP+ Spenderzellen im peripheren Blut 12 Wochen nach der Transplantation in %

Der Anstieg der GFP+ FLT3-ITD Spenderzellen kam jedoch durch das hohe Engraftment der Spenderzellen insgesamt (51,2%) und der GFP+ Spenderzellen (2,28%) in einer Maus (Maus 10 FLT3-ITD) zustande, bei den 8 übrigen mit FLT3-ITD transplantierten Tieren sank das Engraftment im Mittel auf 0,03%. Bei keinem der Tiere zeigten sich Verhaltensauffälligkeiten, Krankheitssymptome oder Auffälligkeiten im Blutbild (gemessen am Scil Vet Abc™ Animal Blood Counter (Scil Vet academy GmbH, Viernheim, Deutschland), es fiel jedoch auf, dass Maus 10 FLT3-ITD kleiner und schlanker war, als die übrigen Mäuse.

Bei der Differenzierung in die verschiedenen Blutzelllinien zeigte sich folgendes Bild: Die Differenzierung zu B-Zellen blieb vergleichsweise niedrig (MIG: 0%, FLT3-WT: 19,51%, FLT3-ITD: 4,79%), der Anteil der T- Zellen sank (MIG: 1,89%, FLT3-WT: 7,76%, FLT3-ITD: 2,14%). Der größte Anteil der Zellen differenzierte sich zu myeloischen Zellen, innerhalb dieser Gruppe blieb der Anteil der GR1+Cd11b- Zellen weiter dominant (MIG: 60,44%, FLT3-WT: 32,44%, FLT3-ITD: 62,3%, hier nicht gezeigt). Zusammenfassend ist nach 12

Wochen festzustellen, dass es bei einer Maus (Maus 10 FLT3-ITD) Hinweise auf die Entwicklung einer Krankheit gab (Größe, Gewicht), alle anderen Mäuse zeigten keine Auffälligkeiten.

4.3.4 Engraftment der GFP+ Spenderzellen, Differentialblutbild und klinisches Bild der Mäuse Woche 24 post Tx

24 Wochen nach der Transplantation wurden alle Mäuse euthanasiert und zusätzlich zum peripheren Blut auch Milz und Knochenmark durchflusszytometrisch untersucht. Die Milzen wurden auf Größe und Gewicht untersucht (siehe Tabelle 2). Weiterhin wurden Blutausstriche angefertigt und auf das Vorhandensein leukämischer Zellen untersucht.

Vektor	Milzgewicht
MIG	0,077 g (SD 0,01)
FLT3-WT	0,075 g (SD 0,01)
FLT3-ITD	0,089 g (SD 0,03)
Maus 10	0,154 g

Tabelle 2 Milzgewichte 24 Wochen nach der Transplantation; MIG: 5 Tiere, FLT3-WT: 5 Tiere, FLT3-ITD: 9 Tiere

Die Milzgewichte liegen damit insgesamt sehr niedrig, liegt doch das normale Milzgewicht einer gesunden Maus bei ca. 0,15 g. In Relation zu den hier gemessenen Gewichten liegt jedoch das Milzgewicht von Maus 10 FLT3-ITD 1,7 x über dem mittleren Wert der ITD Mäuse.

Bei der Analyse des Blutbildes zeigte sich, dass die Anzahl der Leukozyten bei mit FLT3-ITD transplantierten Tieren im Mittel leicht höher lag ($11,41 \times 10^3/\mu\text{l}$ (4,22-19,18)) als bei mit FLT3-WT transplantierten Tieren ($9,43 \times 10^3/\mu\text{l}$ (5,88-13,46)) oder mit MIG transplantierten Tieren ($8,6 \times 10^3$ (6,8-11,25)). Bei der durchflusszytometrischen Analyse zeigte sich, dass das Engraftment der GFP+ Spenderzellen im peripheren Blut im Vergleich zu Woche 12 angestiegen war, insgesamt jedoch relativ niedrig blieb (Mig: 0,58%, FLT3-WT: 0,08%, FLT3-ITD: 1,08 %, siehe Abb. 35).

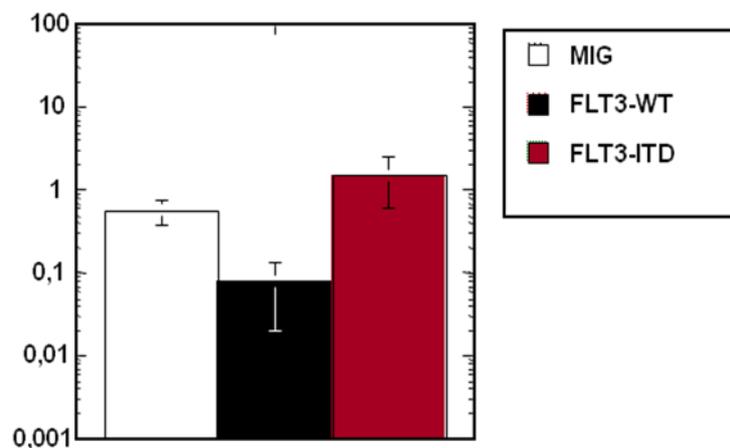


Abb.35 Engraftment der GFP+ Spenderzellen im peripheren Blut 24 Wochen nach der Transplantation in %

Einzige Ausnahme war erneut Maus 10 FLT3-ITD, bei der das Engraftment der Spenderzellen insgesamt 58,7% im peripheren Blut und das der GFP+

Spenderzellen 1,6% betrug. Der Verlauf des Engraftments der GFP+ Spenderzellen stellte sich folgendermaßen dar (siehe Abb.36):

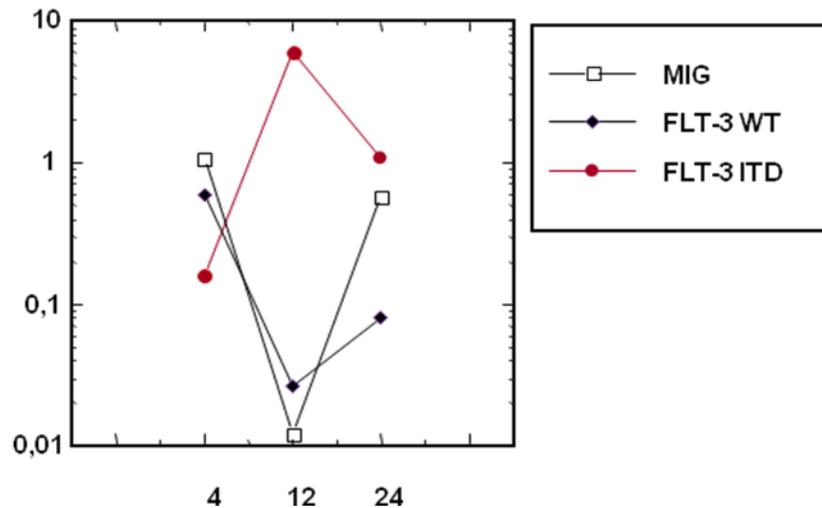


Abb.36 Entwicklung des Engraftments der GFP+Spenderzellen im peripheren Blut der Empfängermäuse nach 4, 12 und 24 Wochen

Interessanterweise sank der Prozentsatz des Engraftments von GFP+MIG- und GFP+ FLT3-WT Spenderzellen zwischen Woche 4 und 12 deutlich von 1,07% MIG/0,6% FLT3-WT auf 0,012% MIG (um 89%) /0,026% FLT3-WT (um 23%), während der Anteil GFP+FLT3-ITD Spenderzellen von 0,2% auf 6,16%, also um das 30,8 fache anstieg. Zwischen Woche 12 und Woche 24 verhielt es sich genau umgekehrt, der Anteil GFP+MIG- und GFP+ FLT3-WT Spenderzellen stieg von 0,012% MIG/0,026% FLT3-WT auf 0,58% MIG (48,3 x höher)/0,08% FLT3-WT (3,08 x höher), während der Anteil GFP+FLT3-ITD Spenderzellen von 6,16 auf 1,08% sank (5,5 x niedriger).

Anzeichen einer Erkrankung zeigten sich nur bei Maus 10 FLT3-ITD und diese vorwiegend im deutlich reduzierten Ernährungszustand. Das Körpergewicht dieser Maus reduzierte sich zwischen Woche 12 nach der Transplantation (Alter:

12 Wochen) und dem Tag der Euthanasie (Alter 24 Wochen) von 23 g auf 19 g, also um 17,4%. Laut Belastungsscore Punktesystem (siehe Methoden 3.2.15) hätte die Maus bei einem Gewichtsverlust $< 20\%$ euthanasiert werden müssen. Desweiteren war das Verhalten der Maus als ungewöhnlich ruhig zu bezeichnen. Weitere Auffälligkeiten zeigten sich bei der durchflusszytometrischen Untersuchung des Knochenmarks (Abb.37). Hier wurde zusätzlich zur Färbung mit Cd45.1 für die Spenderzellen, Cd45RA für B-Zellen, Cd4/8a für T-Zellen, Gr1 für Granulozyten und CD11b für Monozyten auch Cd117 gefärbt, da dies auf Progenitorzellen exprimiert wird und daher bei der möglichen Entwicklung einer Leukämie auf unreifen myeloischen Zellen vermehrt nachgewiesen werden könnte.

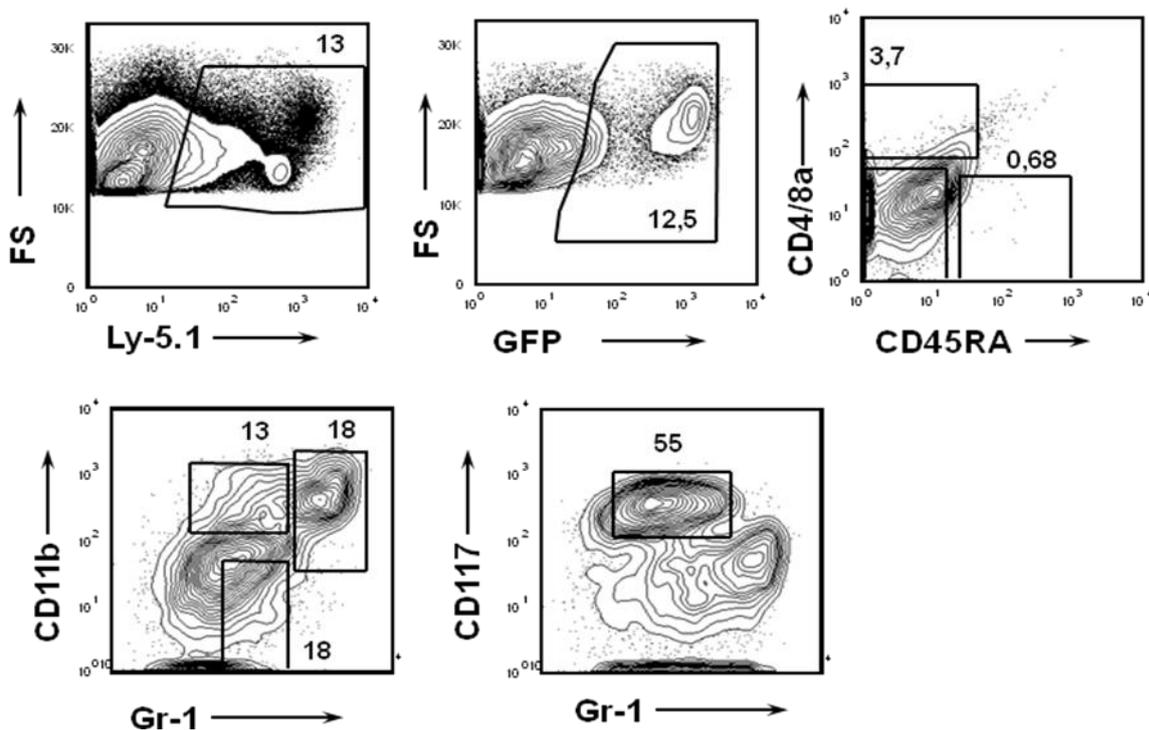


Abb.37 Durchflusszytometrie Maus 10 FLT3-ITD; Anteil der transplantierten Spenderzellen (Ly5.1) insgesamt (13%), davon GFP+ (12,5%), Anteil der B- (0,68%) und T- Lymphozyten

(3,7%) aus den GFP+ Spenderzellen, Anteil der Granulozyten (18%), Monozyten (13%) und Gr1+Cd11-Zellen (18%) aus den GFP+ Spenderzellen, Anteil der Gr1+Cd117+Zellen (55%)aus den GFP+ Spenderzellen

Bei Maus 10 FLT3-ITD war im Knochenmark eine deutliche Population GFP+ Spenderzellen zu erkennen (12,5% aus 13% Spenderzellen insgesamt). Eine so deutliche Population war bei keiner anderen Maus in diesen Versuchen zu detektieren. Auffällig war, dass die GFP+ Spenderzellen hauptsächlich zu myeloischen Vorläufern und myeloischen Zellen ausdifferenzierten und 55% der GR-1+ Zellen auch Cd117+ waren. Dies ist ein Hinweis darauf, dass ein großer Teil der myeloischen Zellen im Knochenmark unreife Zellen waren und somit eine myeloproliferative Erkrankung vorliegen könnte. Diese Veränderungen konnten zum Zeitpunkt der Euthanasie nur im Knochenmark detektiert werden. Im Blut lag die Leukozytenzahl mit $12,72 \times 10^3 / \mu\text{l}$ an der oberen Grenze, aber noch im Referenzbereich. Eine myeloproliferative Erkrankung ist per Definition eine Erkrankung, die im Knochenmark beginnt, dann ins periphere Blut übergehen kann und möglicherweise verschiedene Organe, wie Milz und Leber, infiltriert. Das leicht erhöhte Milzgewicht von Maus 10 gegenüber dem Mittelwert könnte auf eine beginnende Infiltration mit unreifen Zellen hindeuten.

Im Vergleich zu Maus 10 FLT3-ITD stellten sich die FACS-Analysen von FLT3-WT (siehe Abb.38) und MIG (Leervektor) (siehe Abb.39) wie folgt dar:

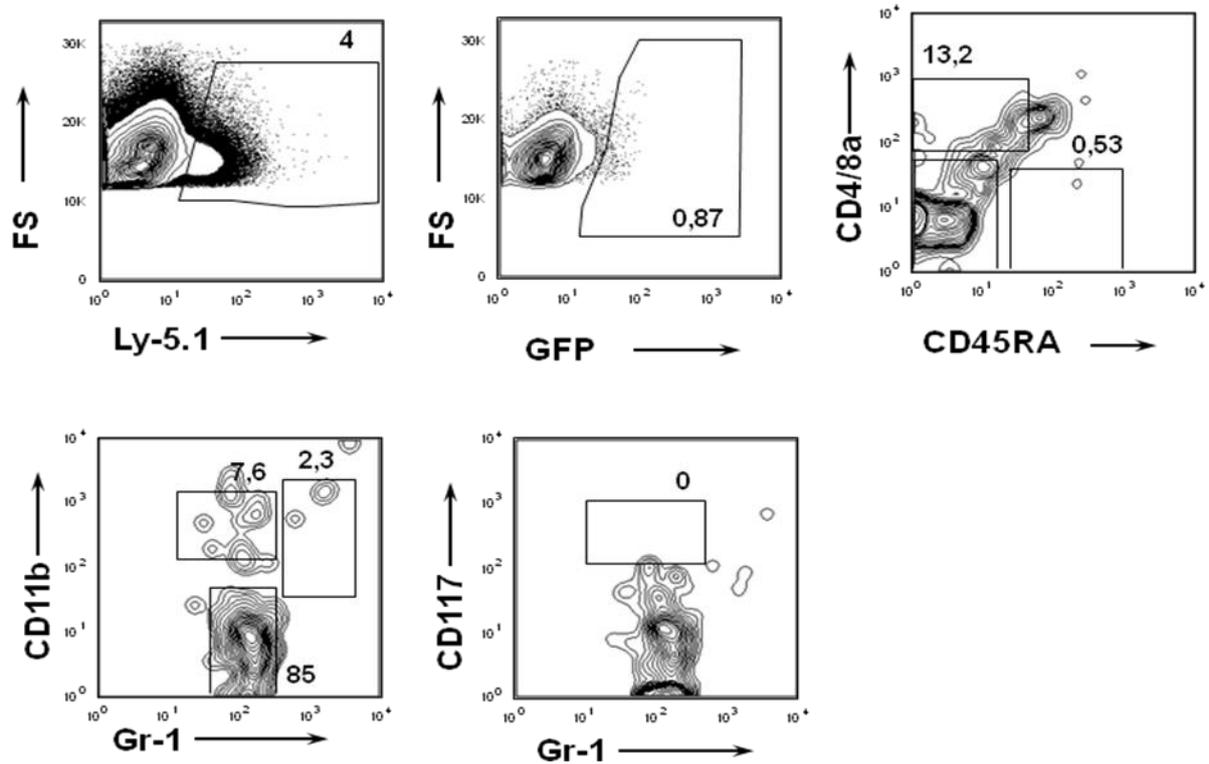


Abb.38 Durchflusszytometrie einer mit FLT3-WT transplantierten Maus; Anteil der transplantierten Spenderzellen (Ly5.1) insgesamt (4%), davon GFP+ (0,87%), Anteil der B- (0,53%) und T- Lymphozyten (13,2%) aus den GFP+ Spenderzellen, Anteil der Granulozyten (2,3%), Monozyten (7,6%) und Gr1+Cd11-Zellen (85%) aus den GFP+ Spenderzellen, Anteil der Gr1+Cd117+Zellen (0%) aus den GFP+ Spenderzellen

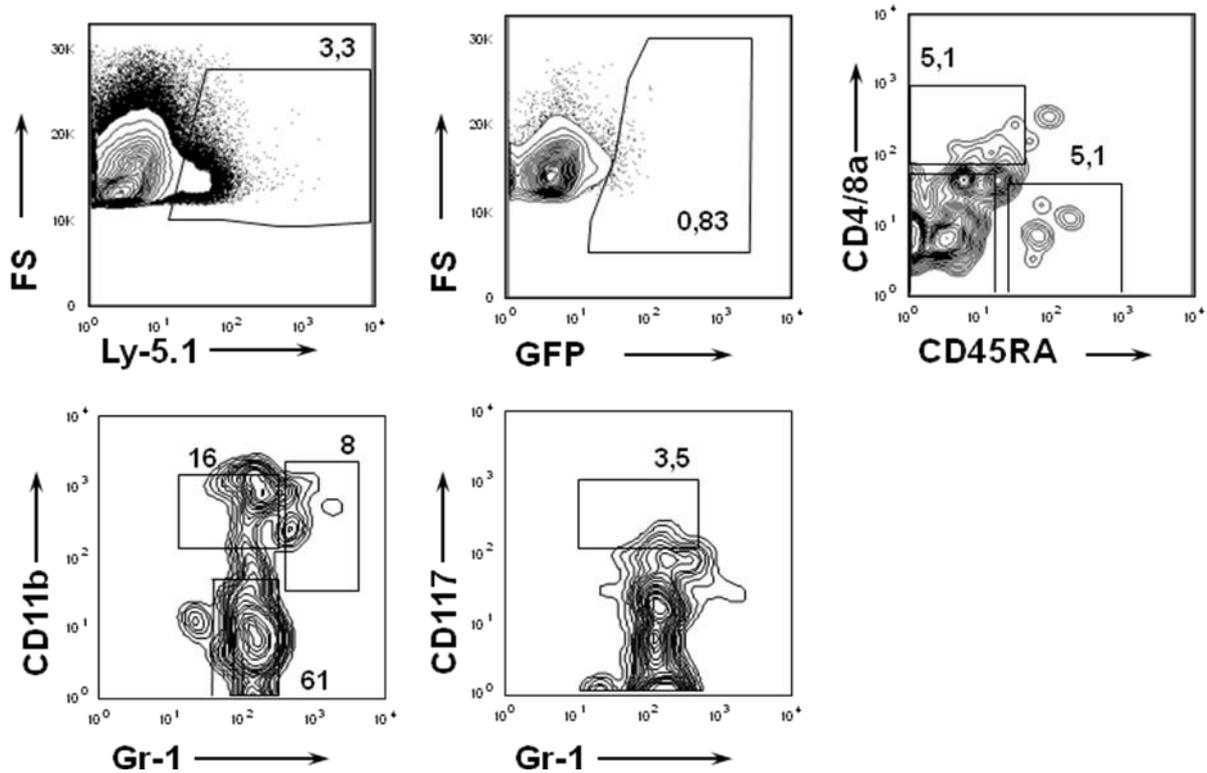


Abb.39 Durchflusszytometrie einer mit MIG (Leervektor) transplantierten Maus; Anteil der transplantierten Spenderzellen (Ly5.1) insgesamt (3,3%), davon GFP+ (0,83%), Anteil der B- (5,1%) und T- Lymphozyten (5,1%) aus den GFP+ Spenderzellen, Anteil der Granulozyten (8%), Monozyten (16%) und Gr1+Cd11-Zellen (61%) aus den GFP+ Spenderzellen, Anteil der Gr1+Cd117+Zellen (3,5%) aus den GFP+ Spenderzellen

Hier war der Anteil der GFP+ Spenderzellen deutlich geringer und stellte sich nicht als eigenständige Population dar. Der Großteil der Zellen differenzierte zwar auch zu myeloischen Zellen, allerdings machten hier die GR-1+Cd11b-Zellen einen deutlich größeren Teil aus.

Insgesamt konnte nach 24 Wochen festgestellt werden, dass ein juveniles Leukämiemodell mit FLT3-ITD grundsätzlich möglich ist, da sich bei 1 von 9 mit FLT3-ITD transplantierten Mäusen eine Erkrankung zu entwickeln begann

(11,1%). Dieser Prozentsatz ist jedoch für ein konsistentes Krankheitsmodell zu niedrig, so dass es in Folgestudien modifiziert werden muss.

V. Diskussion

Die Untersuchung hämatopoetischer Stammzellen (HSCs) ist, im Gegensatz zu Progenitorzellen, die auch erfolgreich in Kolonieassays untersucht werden können, ausschließlich *in vivo* möglich (Metcalf 1989), daher sind Transplantationsversuche hierzu unerlässlich. Schon vor langer Zeit konnte gezeigt werden, dass die kongene Transplantation von Knochenmark (BMT = bone marrow transplantation) in eine letal ganzkörperbestrahlte Maus das hämatopoetische System der Empfängermaus ersetzen kann (Akashi, Traver et al. 2000; Reya, Morrison et al. 2001), und zwar mit vollständig funktionsfähigen Zellen aller Blutzelllinien (Domen and Weissman 1999). Daher werden Transplantationsversuche sehr häufig in der Leukämieforschung eingesetzt, um das Verhalten leukämischer Stammzellen zu untersuchen. Bisher sind jedoch nur Leukämiemodelle für adulte Tiere etabliert. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass mit der intrahepatischen (i.h.) Transplantation transduzierter fötaler Leberzellen eine Grundlage zur Etablierung eines juvenilen Leukämiemodells geschaffen werden konnte.

5.1 Intrahepatische Transplantation neugeborener Mäuse

5.1.1 Engraftment der Spenderzellen

Das **1. Ziel dieser Arbeit**, die Etablierung der intrahepatischen Transplantation bei Neugeborenen und deren Vergleich mit der konventionellen intravenösen Transplantationsmethode bei erwachsenen Tieren, führte zu dem Ergebnis, dass unabhängig von der Art der transplantierten Zellen (Knochenmark oder fötale Leberzellen) und bei identischer Zahl der Spenderzellen, das Engraftment der Spenderzellen i.h. transplantiertter Tiere signifikant niedriger war ($p < 0,001$), als das i.v. transplantiertter Tiere. Dies könnte verschiedene Gründe haben. Ein

wahrscheinlicher Grund ist, dass die neugeborenen Tiere subletal (3,5 Gray) bestrahlt wurden, während die erwachsenen Tiere einer letalen (9 Gray) Bestrahlung unterzogen wurden. Durch die subletale Bestrahlung bleibt ein größerer Anteil der eigenen hämatopoetischen Zellen repopulations- und funktionsfähig, was möglicherweise dazu führt, dass die transplantierten Zellen mit den Empfängerzellen konkurrieren und dadurch nicht vollständig engraften können. Dies zeigt sich an der deutlich größeren Zahl der Empfängerzellen bei i.h. transplantierten Tieren (Mittelwert aller Versuche: 77,96%) gegenüber i.v. transplantierten Tieren (Mittelwert aller Versuche: 14,32%). Aus der Literatur ist bekannt, dass bei der i.v. Transplantation die Höhe des Engraftments der Spenderzellen von der Höhe der Bestrahlung und der Anzahl der transplantierten Zellen abhängig ist (Goebel, Yoder et al. 2002). Daher wurde ein Bestrahlungsvergleich bei neugeborenen Tieren mit 3,5; 5 und 8 Gray durchgeführt, um festzustellen, ob hier mit einer Erhöhung der Strahlendosis ebenfalls eine Optimierung des Engraftments erreicht werden kann. Dieser hat gezeigt, dass eine Bestrahlungsdosis von 5 Gray nach 16 Wochen zu keinem signifikant höheren Engraftment, jedoch zu Entwicklungsstörungen der Tiere führt. Die höhere Dosis von 8 Gray führte zu unzulässigen Entwicklungsstörungen der Tiere, so dass diese eine Woche nach der Bestrahlung euthanasiert werden mussten. Grund dafür ist die Tatsache, dass Neugeborene und Heranwachsende strahlenempfindlicher sind als Erwachsene. Dies hängt möglicherweise mit einer erhöhten Absorption aufgrund des höheren Wassergehaltes bei Neugeborenen zusammen (Fendel, H., F.-E. Stieve (Hrsg.) Strahlenschutz in der Kinderradiologie. H.Hoffmann Verlag, Berlin 1983). Eine weitere Möglichkeit das Engraftment zu steigern, wäre eine Erhöhung der Spenderzellzahl. Hier könnte durch die Methode der „limitierten Verdünnung“ die optimale Spenderzellzahl für die Transplantation in neugeborene Tiere

ermittelt werden (Ploemacher, van der Sluijs et al. 1991). Zu beachten ist allerdings, dass die Zellzahl durch das geringe transplantierbare Volumen von 20 μ l limitiert sein dürfte. Diese Versuche zur Bestimmung der optimalen Spenderzellzahl könnten Inhalt zukünftiger Arbeiten sein.

Die Transplantationen mit fötalen Leberzellen zeigen in Woche 10 nach der Transplantation, dass hier ein deutlich höheres Engraftment sowohl bei i.v., als auch bei i.h. transplantierten Tieren erreicht werden konnte. Dies überrascht nicht, denn die Literatur zeigt, dass sich die fötalen Stammzellen sowohl phänotypisch als auch funktional von denen aus adultem Knochenmark unterscheiden. Der phänotypische Unterschied liegt in der Expression der Oberflächenmarker Mac-1 und AA4.1, welche auf langzeitrepopulierenden Stammzellen des adulten Knochenmarks nicht exprimiert werden (Morrison, Hemmati et al. 1995; Christensen and Weissman 2001). Der funktionale Unterschied liegt im schneller ablaufenden Zellzyklus und der Tatsache dass die HSCs eine stärkere und stabilere Rekonstitution des hämatopoetischen Systems des Empfängers bewirken (Jordan, McKearn et al. 1990; Rebel, Miller et al. 1996; Holyoake, Nicolini et al. 1999). Während der Stammzellpool adulter HSCs vorwiegend aus kurzzeitrepopulierenden Stammzellen und MPPs besteht, besteht er in der fetalen Leber am Tag 14,5 nach der Befruchtung zum Großteil aus langzeitrepopulierenden Stammzellen (Harrison, Zhong et al. 1997).

Transplantiert man fötale Leberzellen intrahepatisch in neugeborene Tiere, spielt wahrscheinlich zusätzlich die Tatsache eine Rolle, dass die HSCs in ihre physiologische Nische zurückgelangen. Normalerweise wandern die Stammzellen aus der fötalen Leber ein bis zwei Tage vor Ende der Trächtigkeit ins Knochenmark ein. Wahrscheinlich ist dieser Prozess mit der Geburt noch nicht ganz abgeschlossen so dass die transplantierten Stammzellen zusammen

mit den eigenen Stammzellen ins Knochenmark einwandern. Transplantiert man hingegen Knochenmarkzellen in die fötale Leber, so gelangen diese in eine fremde Nische mit möglicherweise anderen Signalwegen und Signalmolekülen, was das Überleben und die Einwanderung ins Knochenmark erschweren könnte und somit das Engraftment.

Aufgrund der funktionalen Eigenschaften der fötalen Leber und der Transplantation in die physiologische Nische ist für die intrahepatische Transplantation die Verwendung fötaler Leberzellen zu empfehlen. Dadurch kann möglicherweise auch der Abfall des Engraftments zwischen Woche 10 und 16, wie er bei mit Knochenmark transplantierten Tieren beobachtet werden konnte, verringert oder ganz ausgeschlossen werden.

5.1.2 Differenzierung der Spenderzellen in die verschiedenen Blutzelllinien und Vorhandensein hämatopoetischer Stammzellen im Knochenmark

16 Wochen nach der Transplantation fiel auf, dass bei den intravenös mit Knochenmark transplantierten Tieren der Anteil der B-Zellen und der Monozyten signifikant höher lag, als bei den intrahepatisch transplantierten Tieren ($p < 0,001$). Der Anteil der T-Zellen ($p = 0,4$) lag dagegen bei i.h. transplantierten Tieren höher, der Anteil der Granulozyten war nahezu identisch. Aus der Literatur ist bekannt, dass nur die sogenannten „myeloid-biased“ oder „b-type“ langzeitrepopulierenden Stammzellen in der Lage sind, über einen Zeitraum von 6-12 Wochen hinaus myeloische Zellen zu repopulieren (Morrison and Weissman 1994; Dykstra, Kent et al. 2007; Kent, Copley et al. 2009), während kurzzeitrepopulierende („ δ -type“ (Dykstra, Kent et al., 2007))

Stammzellen nach diesem Zeitraum vorwiegend lymphatische Linien repopulieren. Da bei den i.h. transplantierten Tieren nur bei 44% der Tiere langzeitrepopulierende Stammzellen (Lin-, cKit+, Sca-1+, Cd34-) im Knochenmark nachgewiesen werden konnten (siehe 4.1.4), müsste dies zur Folge haben, dass auch nur bei 44% der Tiere myeloische Zellen nachgewiesen werden können. Tatsächlich waren aber nur bei 1 von 17 Tieren (5,88%) keine myeloischen Zellen im peripheren Blut nachweisbar. Bei den restlichen 16 Tieren lag sowohl der Anteil der Monozyten als auch der Anteil der Granulozyten konstant über 1 %, d.h. es müssen theoretisch auch langzeitrepopulierende Stammzellen in den Tieren vorhanden sein, bei denen sie im Knochenmark nicht nachgewiesen werden konnten. Zusätzlich zum Knochenmark wurde auch die Milz auf das Vorhandensein von Stamm- und Progenitorzellen untersucht. Auch hier fanden sich bei 44% der Tiere keine langzeitrepopulierenden Stammzellen. Da auch in der Leber dieser Tiere keine Spenderzellen gefunden wurden, scheidet auch die Theorie, dass die Stammzellen in der Leber verblieben sind, aus. Man könnte spekulieren, dass die kurzzeitrepopulierenden Stammzellen in einer juvenilen Nische länger in der Lage sind, alle Blutzellen zu repopulieren, als in einer adulten Mikroumgebung. Die Zahl der kurzzeitrepopulierenden (Sca1+, cKit+, Cd34+) Stammzellen und der MPPs lag bei i.h. transplantierten Tieren prozentual sogar leicht höher, als bei i.v. transplantierten Tieren. Dafür spricht auch, dass die Zahl der Spenderzellen zwischen Woche 10 und 16 deutlich sank, dies dürfte bei einem Vorhandensein langzeitrepopulierender Stammzellen nicht in dieser Deutlichkeit auftreten. Dies ist jedoch mit Hilfe der momentan veröffentlichten Literatur nicht zu untermauern.

Bei den mit fötaler Leber transplantierten Tieren konnte im Rahmen dieser Arbeit nur Woche 10 nach der Transplantation untersucht werden. Hier zeigten

sich im Unterschied zu den mit Knochenmark transplantierten Tieren (signifikant weniger B-Zellen, $p=0,001$) keine signifikanten Unterschiede bei der Differenzierung in die verschiedenen Blutzelllinien. Aufgrund der funktionalen Unterschiede des fötalen Stammzellpools (Jordan, McKearn et al. 1990; Rebel, Miller et al. 1996; Holyoake, Nicolini et al. 1999) und dem wesentlich höheren Anteil langzeitrepopulierender Stammzellen (Harrison, Zhong et al. 1997) ist nach 16 Wochen zu erwarten, dass diese bei allen Tieren im Knochenmark nachgewiesen werden können und dass das Engraftment konstanter bleibt.

5.2 Vergleich der langzeitrepopulierenden Stammzellen i.h. transplantiertes Tiere mit denen i.v. transplantiertes Tiere

Die eigentliche Fragestellung, ob die Transplantationsmethode Einfluss auf die Stammzellqualität und die Repopulationsfähigkeit der Stammzellen hat, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht beantwortet werden. Grund dafür war, dass die Anzahl der Cd150+ LSK Zellen aus primär intrahepatisch transplantierten Tieren zu gering war, um sekundär transplantiert werden zu können. Dies überrascht nicht, da nur bei 44% der i.h. transplantierten Tiere langzeitrepopulierende Stammzellen im Knochenmark detektiert werden konnten.

5.2.1 Transplantation heraussortierter Cd150+ LSKs

Bei primär i.v. transplantierten Tieren konnten ausreichende Zahlen Cd150+ LSKs heraussortiert werden (siehe Methoden 3.2.14), so dass im 1. Versuch ($n=3$) 150 Cd150+ LSKs und im 2. Versuch ($n=4$) 300 Cd150+ LSKs i.v. in Ly5.1 Mäuse sekundär transplantiert werden konnten. Hier zeigte sich, dass bei

den mit 150 Cd150+ LSK Zellen transplantierten Mäusen in keinem Tier zu keinem Zeitpunkt und in keinem untersuchten Organ Engraftment nachzuweisen war. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass 150 Cd 150+ LSKs quantitativ nicht ausreichen, um Engraftment zu erzielen. Unter normalen Umständen, d.h. bei der Transplantation von Zellen aus nicht bestrahlten und transplantierten Spendertieren, sollten 150 langzeitrepopulierende Stammzellen mehr als ausreichen, um eine Repopulierung in der Maus zu erreichen (Spangrude, Heimfeld et al. 1988), gibt es doch genug Beispiele erfolgreicher Rekonstitutionen durch Einzelzelltransplantationen (Morita, Ema et al. 2010). Möglicherweise wird ein gewisser Prozentsatz der Zellen beim Vorgang des Heraussortierens beschädigt, so dass diese nicht mehr funktionsfähig sind oder absterben. Auch das Homing in der Empfängermaus könnte durch Veränderungen oder Beschädigungen beeinträchtigt sein. Weiterhin stellt sich durch die in dieser Arbeit gesammelten Ergebnisse die Frage, ob der Oberflächenmarker Cd150 für das Heraussortieren früher Stammzellen aus Empfängern eines vorherigen Transplantats geeignet ist.

Dass Sekundärtransplantationen von herausortierten Cd150+LSKs grundsätzlich aber funktionieren, zeigt der 2. Versuch, in dem 300 Zellen pro Tier transplantiert wurden. Hier zeigte sich bei 3 von 4 Tieren ein mittleres Engraftment im peripheren Blut von 7,66% nach 5 Wochen, 5% nach 10 Wochen und 2,77% nach 16 Wochen. Dennoch ist das Engraftment für i.v. transplantierte Tiere ungewöhnlich niedrig und auch das Sinken des Engraftments der Spenderzellen zwischen Woche 5 und 16 ist überraschend, wurde doch bei der primären Transplantation gezeigt, dass das Engraftment bei i.v. mit Knochenmark transplantierten Tieren zwischen Woche 10 und Woche 16 nur um 4,5% (siehe Abb.17) zurückging. Hier geht es jedoch zwischen

Woche 5 und 10 nach der Transplantation um 34,7% zurück und zwischen Woche 10 und 16 nach der Transplantation nochmals um 44,6%.

Die Ursache dieses Phänomens könnte in der kompetitiven Transplantation mit 1×10^5 Ly5.1 Knochenmarkzellen liegen, die mit den Cd150+ LSKs kotransplantiert wurden, um ein Überleben der Mäuse zu gewährleisten. Kompetitiv bedeutet, dass die beiden kotransplantierten Zellfraktionen miteinander im Wettbewerb stehen und sich möglicherweise gegenseitig verdrängen. Die kotransplantierten Knochenmarkzellen zeigen ein gutes Engraftment, was sich an dem für letal bestrahlte Mäuse ungewöhnlich hohen Prozentsatz der Empfängerzellen zeigt (87,4% nach 16 Wochen). Diese Zellen könnten die Cd150+ LSKs von Beginn an und mit der Zeit immer weiter verdrängt haben. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass die transplantierten Zellen ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung verloren haben, oder es sich von Beginn an um kurzzeitrepopulierende Stammzellen gehandelt hat. Dafür spricht auch, dass nur bei 1 von 3 Mäusen langzeitrepopulierende Stammzellen (lin-, cKit+, Sca-1+, Cd34-) im Knochenmark nachgewiesen werden konnten.

Überraschend war auch das Ergebnis, dass bei den 3 engrafteten Mäusen die Differenzierung in die verschiedenen Blutzelllinien nach 16 Wochen sehr unterschiedlich war. Bei einer Maus überwogen die Granulozyten und Monozyten, was dafür spricht, dass es sich bei den transplantierten Zellen tatsächlich um langzeitrepopulierende Stammzellen gehandelt hat, genauer gesagt stark positive Cd150+ Zellen (Morita, Ema et al. 2010). Diese Maus war auch die Einzige, bei der langzeitrepopulierende Stammzellen (Lin-, cKit+, Sca-1+, Cd34-) im Knochenmark nachgewiesen werden konnten. Bei einer Maus überwogen die lymphatischen Zellen, die sich hauptsächlich zu T-Zellen ausdifferenzierten. Bei dieser Maus fanden sich weder Granulozyten noch

Monozyten, was dafür spricht, dass es sich bei den transplantierten Zellen um Cd150- Zellen mit stark eingeschränktem Selbsterneuerungspotential oder sogar um kurzzeitrepopulierende Stammzellen gehandelt hat. Dies unterstützt die Hypothese, dass verschiedene Stammzellen möglicherweise verschiedene festgelegte Differenzierungswege einschlagen und nicht jede Stammzelle zwangsläufig alle Blutzellen bildet. Diese Hypothese wurde schon in verschiedenen Veröffentlichungen untersucht und bestätigt (Muller-Sieburg, Cho et al. 2002; Morita, Ema et al. 2010). Bei der dritten Maus differenzierten aus den transplantierten Spenderzellen alle Blutzelllinien, allerdings lagen sowohl der Granulozyten- als auch der Monozytenwert unter 1 %. Dies spricht wiederum für die Transplantation von Cd150- Zellen oder nur ganz schwach positiver Cd150+ LSK Zellen. Laut Morita, Ema *et al.* 2010 unterscheiden sich die Differenzierungswege schon innerhalb des Cd150+ Zellpools, je nachdem, ob die Zellen stark, mittel oder schwach positiv sind (Cd150+^{high}, Cd150+^{med}, Cd150+^{low}). Dies wirft die Frage auf, ob der Oberflächenmarker Cd150 überhaupt geeignet ist, um Stammzellen aus Primärempfängern herauszusortieren und sie anschließend sekundär zu transplantieren. Desweiteren wäre eine erneute Erhöhung der transplantierten Zellzahl zu empfehlen.

5.3 Etablierung eines juvenilen Leukämiemodells

Bei der Umwandlung eines bereits etablierten Leukämiemodells für erwachsene Tiere in ein juveniles Modell wurde der retrovirale Vektor FLT3-ITD und die Kontrollen FLT3-WT und MIG (Leervektor) benutzt. Hier wurde die zu transplantierende Zellzahl aufgrund der Annahme reduziert, dass der juvenile Organismus empfindlicher auf Onkogene reagiert. Weil aber obenstehende Versuche teilweise parallel durchgeführt wurden, wurde außer Acht gelassen, dass die Zellen in intrahepatisch transplantierten Tieren signifikant schlechter

engraften. Daher ist das Engraftment der GFP⁺ Spenderzellen sowohl bei mit 5×10^3 , als auch bei 5×10^4 GFP⁺ transplantierten Tieren zu gering, um eine ähnliche Inzidenz einer myeloproliferativen Erkrankung (MPD) auszulösen, wie beim Erwachsenenmodell. Dass ein juveniles Modell mit dem hier verwendeten retroviralen Konstrukt grundsätzlich möglich ist, zeigt die Tatsache, dass eine Maus, die mit 5×10^4 FLT3-ITD GFP⁺ Zellen transplantiert wurde, Anzeichen einer Krankheit entwickelt hat. Diese Maus zeigt jedoch trotz gleicher Zahl der transplantierten Spenderzellen ein deutlich höheres Engraftment in allen untersuchten Organen. Dass dies für die Entwicklung der Krankheit zwingend nötig ist, zeigte sich schon im Erwachsenenmodell (Grundler, Miething et al. 2005). Weiterhin kam es bei dieser Maus zu einem sehr langsamen Krankheitsverlauf, nach 24 Wochen ist die Krankheit fast ausschließlich im Knochenmark nachweisbar. Hier kann spekuliert werden, dass sich die Krankheit noch im Anfangsstadium befindet, da eine Leukämie oder eine MPD laut Definition im Knochenmark beginnen.

Daraus ergibt sich die Konsequenz, dass für den erfolgreichen Einsatz eines juvenilen Modells mindestens die gleiche Anzahl GFP⁺ Zellen transplantiert werden muss, wie im Erwachsenenmodell publiziert und dass dennoch mit einer längeren Entwicklungszeit und einem langsameren Verlauf gerechnet werden muss. Ein mögliches Problem könnte hier sein, dass die Transplantation großer GFP⁺ Zellzahlen entweder eine hohe Transduktionseffizienz oder ein separates Zellsortieren der GFP⁺ Zellfraktion nötig macht, da die zu transplantierende Zellzahl aufgrund der geringen Flüssigkeitsmenge, die i.h. transplantiert werden kann (20 μ l), limitiert ist. Traggiai *et al.* 2004 publizierten eine transplantierbare Zellzahl von $1,2 \times 10^5$ Zellen, in dieser Arbeit wurden bis zu 4×10^5 Zellen transplantiert. Wo jedoch die optimale Zellzahl für ein bestmögliches Engraftment liegt, müsste, wie bereits erwähnt, mit Hilfe der limitierten

Verdünnung ermittelt werden. Eine weitere Möglichkeit wäre das Heraussortieren GFP+ Zellen aus den transduzierten Zellen und die ausschließliche Transplantation dieser.

5.4 Perspektiven für die Zukunft

Da das Engraftment bei i.h. transplantierten Tieren in allen Versuchen signifikant niedriger war als bei i.v. transplantierten Tieren, wäre die Ermittlung der optimalen zu transplantierenden Zellzahl mittels der Methode der „limitierten Verdünnung“ (Ploemacher, van der Sluijs et al. 1991), auch im Hinblick auf das juvenile Leukämiemodell, für diese Methode sinnvoll.

Das sekundäre Transplantieren der aus den Primärempfängern herausortierten Cd 150+ LSK Zellen sollte mit 300 Spenderzellen wiederholt werden, um das hier vorliegende Ergebnis zu bestätigen oder zu widerlegen. Sollten Wiederholungsversuche das vorliegende Ergebnis bestätigen, ist eine Zellzahl von 300 Cd150+ LSKs für eine vollständige Rekonstitution des hämatopoetischen Systems des Empfängers nicht ausreichend. Daher wäre auch hier die Methode der limitierten Verdünnung (Ploemacher, van der Sluijs et al. 1991) sinnvoll, um die optimale Zellzahl für eine vollständige Rekonstitution zu ermitteln. Alternativ wäre es interessant, den Versuch mit primär mit fötalen Leberzellen transplantierten Tieren durchzuführen. Durch den hauptsächlich aus langzeitrepopulierenden Stammzellen bestehenden Stammzellpool (Harrison, Zhong et al. 1997) und das bessere Engraftment der primär transplantierten Tiere (Jordan, McKearn et al. 1990; Rebel, Miller et al. 1996; Holyoake, Nicolini et al. 1999) ist eine höhere Zahl Cd150+ Stammzellen sowie eine bessere Rekonstitution der sekundär transplantierten Tieren zu erwarten. Möglicherweise ist dann auch ein Vergleich der Stammzellen aus i.v. und i.h. transplantierten Tieren möglich. Versuche wie in dieser Arbeit durchgeführt

sind, sind neu und wurden auch noch nicht in der Literatur beschrieben. Daher ist die während der Versuche aufgekommene Frage, ob der Oberflächenmarker Cd150 für solche Versuche überhaupt geeignet ist, noch zu beantworten.

Zur Weiterentwicklung des juvenilen Leukämie-modells sollten mindestens so viele GFP+ Zellen, wie im Erwachsenenmodell publiziert, transplantiert werden. Wird dann die zu transplantierende Zellzahl aufgrund niedriger Transduktionseffizienz zu hoch, wäre auch die ausschließliche Transplantation herausortierter GFP+ Zellen denkbar. Auch Untersuchungen anderer Genveränderungen, z.B. des bei kindlicher ALL vorkommenden Fusionsgens Bcr-Abl, wären sinnvoll. Inzwischen wurden solche Versuche mithilfe der hier etablierten Techniken erfolgreich durchgeführt. Auch hier war zu beobachten, dass die Latenzzeit im juvenilen Modell wesentlich länger war als im etablierten und publizierten adulten Tiermodell, und sich von 2-3 Wochen im adulten Modell, auf 6-8 Wochen im juvenilen Modell verlängerten (Christina Eckl, Robert Oostendorp, unveröffentlichten Daten).

5.5 Schlusswort

Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, dass die hier untersuchte Methode der i.h. Transplantation in neugeborene Empfängermäuse grundsätzlich funktioniert, wobei die Methode 10 Wochen nach der Transplantation mit Spenderzellen aus der fötalen Leber ein besseres Engraftment zeigt, als mit Spenderzellen aus dem adulten Knochenmark. Die Methode ist auch geeignet für eine weitere Entwicklung eines juvenilen Leukämie-modells. Allerdings sollte dabei nicht die nur wenig vorkommende und bekanntlich schwach onkogene Mutation FLT3-ITD studiert werden, sondern vielmehr die als stärker bekannten, und häufiger

bei kindlichen Leukämien vorkommenden Onkogene Bcr-Abl und MLL-AF9 in Betracht gezogen werden.

VI. Zusammenfassung

Leukämien sind mit einem Anteil von 1/3 die häufigsten Krebserkrankungen im Kindesalter. Zurzeit gibt es keine Tiermodelle, welche es ermöglichen, die Ursachen und die Pathophysiologie juveniler Leukämien zu untersuchen. Um die Leukämie-Entstehung im Kindesalter nachzuahmen wurde in der vorliegenden Arbeit die Entwicklung leukämischer Zellen im neonatalen Alter untersucht.

Dazu wurde zunächst eine neue Methode etabliert, bei der Stammzellen aus dem adulten Knochenmark in die Leber neugeborener Tiere transplantiert wurden. Die Effizienz der neuen Methode wurde mit der konventionellen intravenösen Transplantationsmethode in die Schwanzvene adulter Empfänger verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass Stammzellen aus dem adulten Knochenmark in neugeborenen Tieren signifikant weniger anwachsen als in erwachsenen Tieren. Im Gegensatz dazu, wuchsen fötale hämatopoetische Stammzellen in neugeborenen Tieren wesentlich besser an. Somit wurde die Transplantation fötaler Leberzellen in neonatale Empfänger als Grundlage für ein kindliches Leukämie-Maus-Modell verwendet.

Im zweiten Schritt, wurde ein bereits etabliertes adultes Leukämiemodell mit einem onkogenen Konstrukt (Grundler, Miething et al. 2005) in ein kindliches Modell umgewandelt, indem transduzierte fötale Leberzellen in neugeborene Mäuse transplantiert wurden. Im Erwachsenenmodell, führte das exprimierte Onkogen in allen Tieren zu einer myeloproliferativen Erkrankung. Im Gegensatz dazu erkrankten im kindlichen Modell nur 10% der Tiere. Interessanterweise dauerte die Entwicklung der Krankheit im kindlichen Modell deutlich länger als im Erwachsenenmodell. Die Mechanismen der geringeren Effizienz des

Onkogens in neugenborenen Empfängertieren konnten nicht weiter untersucht werden. Die neue Methode scheint jedoch für ein kindliches Leukämiemodell grundsätzlich geeignet.

VII. Summary

Establishment of the intrahepatic stem cell transplantation in newborn mice

With the incidence of 35%, leukemia is the most common malignancy in childhood. At the moment, there is no animal model, which enables the study of the pathophysiology of childhood leukemia. To study leukemic development in children, we have started to establish a model of leukemia in neonates.

The first step in this model was to establish a new method of transplantation of hematopoietic stem cells (HSC), in which donor cells were transplanted into the liver of neonates (intra-hepatic, i.h. transplantation). The efficiency of engraftment was compared with the conventional intravenous (i.v.) transplantation methodology. These experiments demonstrated that adult marrow cells engrafted less in the i.h. transplanted neonates, compared with engraftment after i.v. transplantation in adult recipients. Vice versa is engraftment of fetal liver cells more successful after i.h. transplantation in neonates. Thus, we took the transplantation of fetal liver cells as basis for the second step in the establishment of a model for childhood leukemia.

For this purpose, we modified an already established model for adult leukemia, using a retroviral oncogenic construct (Grundler, Miething et al. 2005), by transducing fetal liver cells with subsequent i.h. transplantation in neonates. In the control model, retroviral transduced adult cells caused a myeloproliferative disease. In contrast, the transduced fetal liver cells caused myeloproliferation in only 10% of the i.h. transplanted neonates. In addition, the lag-time for the emergence of disease was much longer than in the conventional adult model.

Thus, although the efficiency and the kinetics of leukemia development in neonates are clearly different from the conventionally established adult model, it seems feasible to induce leukemia in this manner.

VIII. Literaturverzeichnis

- Abu-Duhier, F. M., A. C. Goodeve, et al. (2000). "FLT3 internal tandem duplication mutations in adult acute myeloid leukaemia define a high-risk group." *Br J Haematol* 111(1): 190-195.
- Akala, O. O. und M. F. Clarke (2006). "Hematopoietic stem cell self-renewal." *Curr Opin Genet Dev* 16(5): 496-501.
- Akashi, K., D. Traver, et al. (2000). "A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages." *Nature* 404(6774): 193-197.
- Benveniste, P., C. Cantin, et al. (2003). "Hematopoietic stem cells engraft in mice with absolute efficiency." *Nat Immunol* 4(7): 708-713.
- Bernardi, R., S. Grisendi, et al. (2002). "Modelling haematopoietic malignancies in the mouse and therapeutical implications." *Oncogene* 21(21): 3445-3458.
- Birnboim, H. C. und J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." *Nucleic Acids Res* 7(6): 1513-1523.
- Christensen, J. L. und I. L. Weissman (2001). "Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(25): 14541-14546.
- Cumano, A. und I. Godin (2007). "Ontogeny of the hematopoietic system." *Annual Review of Immunology* 25: 745-785.
- de Bruijn, M. F. T. R., X. Q. Ma, et al. (2002). "Hematopoietic stem cells localize to the endothelial cell layer in the midgestation mouse aorta." *Immunity* 16(5): 673-683.
- Deschler, B. und M. Lubbert (2006). "Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology." *Cancer* 107(9): 2099-2107.
- Domen, J. und I. L. Weissman (1999). "Self-renewal, differentiation or death: regulation and manipulation of hematopoietic stem cell fate." *Mol Med Today* 5(5): 201-208.

- Dykstra, B., D. Kent, et al. (2007). "Long-term propagation of distinct hematopoietic differentiation programs in vivo." *Cell Stem Cell* 1(2): 218-229.
- Ewringmann, A. und Glöckner, B. (2008). „Leitsymptome bei Hamster, Ratte, Maus und Rennmaus.“ Enke Verlag in MVS Medizinverlage Stuttgart GmbH und Co. KG
- Fendel, H., Stieve, F.-E. (1983). „Strahlenschutz in der Kinderradiologie.“ H. Hoffmann Verlag, Berlin
- Gilliland, D. G. (2003). "FLT3-activating mutations in acute promyelocytic leukaemia: a rationale for risk-adapted therapy with FLT3 inhibitors." *Best Pract Res Clin Haematol* 16(3): 409-417.
- Gilliland, D. G. und J. D. Griffin (2002). "The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia." *Blood* 100(5): 1532-1542.
- Goebel, W. S., M. C. Yoder, et al. (2002). "Donor chimerism and stem cell function in a murine congenic transplantation model after low-dose radiation conditioning: effects of a retroviral-mediated gene transfer protocol and implications for gene therapy." *Exp Hematol* 30(11): 1324-1332.
- Grundler, R., C. Miething, et al. (2005). "FLT3-ITD and tyrosine kinase domain mutants induce 2 distinct phenotypes in a murine bone marrow transplantation model." *Blood* 105(12): 4792-4799.
- Harrison, D. E., R. K. Zhong, et al. (1997). "Relative to adult marrow, fetal liver repopulates nearly five times more effectively long-term than short-term." *Exp Hematol* 25(4): 293-297.
- Heissig, B., K. Hattori, et al. (2002). "Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand." *Cell* 109(5): 625-637.
- Holyoake, T. L., F. E. Nicolini, et al. (1999). "Functional differences between transplantable human hematopoietic stem cells from fetal liver, cord blood, and adult marrow." *Exp Hematol* 27(9): 1418-1427.
- Jordan, C. T., J. P. McKearn, et al. (1990). "Cellular and developmental properties of fetal hematopoietic stem cells." *Cell* 61(6): 953-963.

- Kelly, L. M., Q. Liu, et al. (2002). "FLT3 internal tandem duplication mutations associated with human acute myeloid leukemias induce myeloproliferative disease in a murine bone marrow transplant model." *Blood* 99(1): 310-318.
- Kent, D. G., M. R. Copley, et al. (2009). "Prospective isolation and molecular characterization of hematopoietic stem cells with durable self-renewal potential." *Blood* 113(25): 6342-6350.
- Kottaridis, P. D., R. E. Gale, et al. (2001). "The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials." *Blood* 98(6): 1752-1759.
- Laird, D. J., U. H. von Andrian, et al. (2008). "Stem cell trafficking in tissue development, growth, and disease." *Cell* 132(4): 612-630.
- Mazurier, F., M. Doedens, et al. (2003). "Rapid myeloerythroid repopulation after intrafemoral transplantation of NOD-SCID mice reveals a new class of human stem cells." *Nat Med* 9(7): 959-963.
- Meshinchi, S., W. G. Woods, et al. (2001). "Prevalence and prognostic significance of Flt3 internal tandem duplication in pediatric acute myeloid leukemia." *Blood* 97(1): 89-94.
- Metcalf, D. (1989). "The molecular control of cell division, differentiation commitment and maturation in haemopoietic cells." *Nature* 339(6219): 27-30.
- Mikkola, H. K. A. und S. H. Orkin (2006). "The journey of developing hematopoietic stem cells." *Development* 133(19): 3733-3744.
- Mitani, K. und C. T. Caskey (1993). "Delivering therapeutic genes--matching approach and application." *Trends Biotechnol* 11(5): 162-166.
- Morita, Y., H. Ema, et al. (2010). "Heterogeneity and hierarchy within the most primitive hematopoietic stem cell compartment." *J Exp Med* 207(6): 1173-1182.
- Morrison, S. J., H. D. Hemmati, et al. (1995). "The purification and characterization of fetal liver hematopoietic stem cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(22): 10302-10306.

- Morrison, S. J. und A. C. Spradling (2008). "Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life." *Cell* 132(4): 598-611.
- Morrison, S. J. und I. L. Weissman (1994). "The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype." *Immunity* 1(8): 661-673.
- Muller-Sieburg, C. E., R. H. Cho, et al. (2002). "Deterministic regulation of hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation." *Blood* 100(4): 1302-1309.
- Nilsson, S. K., H. M. Johnston, et al. (2001). "Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cell niches." *Blood* 97(8): 2293-2299.
- Ploemacher, R. E., J. P. van der Sluijs, et al. (1991). "Use of limiting-dilution type long-term marrow cultures in frequency analysis of marrow-repopulating and spleen colony-forming hematopoietic stem cells in the mouse." *Blood* 78(10): 2527-2533.
- Rebel, V. I., C. L. Miller, et al. (1996). "The repopulation potential of fetal liver hematopoietic stem cells in mice exceeds that of their liver adult bone marrow counterparts." *Blood* 87(8): 3500-3507.
- Reya, T., S. J. Morrison, et al. (2001). "Stem cells, cancer, and cancer stem cells." *Nature* 414(6859): 105-111.
- Rhodes, K. E., C. Gekas, et al. (2008). "The emergence of hematopoietic stem cells is initiated in the placental vasculature in the absence of circulation." *Cell Stem Cell* 2(3): 252-263.
- Rosnet, O. und D. Birnbaum (1993). "Hematopoietic receptors of class III receptor-type tyrosine kinases." *Crit Rev Oncog* 4(6): 595-613.
- Rosnet, O., M. G. Mattei, et al. (1991). "Isolation and chromosomal localization of a novel FMS-like tyrosine kinase gene." *Genomics* 9(2): 380-385.
- Rosnet, O., D. Stephenson, et al. (1993). "Close physical linkage of the FLT1 and FLT3 genes on chromosome 13 in man and chromosome 5 in mouse." *Oncogene* 8(1): 173-179.

- Shimomura, O. (2005). "The discovery of aequorin and green fluorescent protein." *J Microsc* 217(Pt 1): 1-15.
- Shimomura, O., F. H. Johnson, et al. (1962). "Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*." *J Cell Comp Physiol* 59: 223-239.
- Spangrude, G. J., S. Heimfeld, et al. (1988). "Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells." *Science* 241(4861): 58-62.
- Swift, S., J. Lorens, et al. (2001). "Rapid production of retroviruses for efficient gene delivery to mammalian cells using 293T cell-based systems." *Curr Protoc Immunol* Chapter 10: Unit 10 17C.
- Thiede, C., C. Steudel, et al. (2002). "Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis." *Blood* 99(12): 4326-4335.
- Traggiai, E., L. Chicha, et al. (2004). "Development of a human adaptive immune system in cord blood cell-transplanted mice." *Science* 304(5667): 104-107.
- Weissman, I. L., D. J. Anderson, et al. (2001). "Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations." *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 387-403.
- Yamamoto, Y., H. Kiyoi, et al. (2001). "Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies." *Blood* 97(8): 2434-2439.
- Yokota, S., H. Kiyoi, et al. (1997). "Internal tandem duplication of the FLT3 gene is preferentially seen in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome among various hematological malignancies. A study on a large series of patients and cell lines." *Leukemia* 11(10): 1605-1609.
- Zwaan, C. M., S. Meshinchi, et al. (2003). "FLT3 internal tandem duplication in 234 children with acute myeloid leukemia: prognostic significance and relation to cellular drug resistance." *Blood* 102(7): 2387-2394.

IX. Abkürzungsverzeichnis

AGM-Region: Aorta-Gonaden-Mesonephros Region

ALL: Akute Lymphatische Leukämie

AML: Akute Myeloische Leukämie

BMT: bone marrow transplantation = Knochenmarkstransplantation

Cd: cluster of differentiation

CLP: common lymphoid precursor = gemeinsame lymphoide Vorläufer

CMP: common myeloid precursor = gemeinsame myeloide Vorläufer

CO₂: Kohlendioxid

DNA: Desoxyribonukleinsäure

FL = fötale Leber

FLT3: Fms-like tyrosin kinase 3

GFP: grün fluoreszierendes Protein

GMP: Granulozyten – Monozyten – Progenitorzellen

Gy: Gray

HSC: hematopoietic stem cells (hämatopoetische Stammzellen)

i.h.: intrahepatisch

i.v.: intravenös

ITD: interne Tandemduplikation

KM = Knochenmark

KRSZ: kurzzeitrepulierende Stammzellen

LRSZ: langzeitrepulierende Stammzellen

LSK: Zellen, die laut Definition lineage negativ, cKit⁺ und Sca-1⁺, also unreif sind

LTR: long terminal repeats

MDS: myelodysplastisches Syndrom

MEP: Megakaryozyten – Erythrozyten – Progenitorzellen

MoMLV: Moloney Murine Leukemia Virus

MPD: myeloproliferative disease = myeloproliferative Erkrankung

MPP: multipotente Progenitorzellen

nm: Nanometer

RNA: Ribonukleinsäure

RTK: Rezeptortyrosinkinase

WT: Wildtyp

X. Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Eckhard Wolf für die Übernahme des Themas an die Tierärztliche Fakultät und die Durchsicht des Manuskripts bedanken.

Bei PD Dr. Robert Oostendorp möchte ich mich ganz besonders für die Überlassung des Themas, die wunderbare Betreuung und Unterstützung und das mir entgegengebrachte Vertrauen bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Christian Peschel für die Möglichkeit und das Vertrauen, meine Arbeit an seinem Institut durchführen zu dürfen.

Bei Dr. Rouzanna Istvanffy möchte ich mich besonders und von ganzem Herzen für Ihre Zeit, Ihre immerwährende Unterstützung und Hilfe und den Einblick in „biologisches Denken“ bedanken. Ohne Ihre Geduld und Ihre wunderbar plastischen Erklärungen wäre ich oft verzweifelt.

Auf keinen Fall unerwähnt bleiben dürfen Christina Eckl, Baiba Vilne und Franziska Bock für Ihre Hilfe, Unterstützung und Ihre offenen Ohren, auch und besonders in schwierigen Zeiten, aber auch für die vielen schönen Mittagspausen. Vielen Dank!

Herzlicher Dank geht auch an die Tierpfleger des ZPF und hier besonders an Susanne Frank, die sich weit über das normale Maß hinaus und mit besonders viel Feingefühl um meine Mäuse gekümmert hat.

Weiterhin möchte ich mich bei der AG Busch für die Bereitstellung der FACS-Geräte und bei der Klinik für Strahlentherapie für die spontanen Bestrahlungstermine bedanken.

Ein großes Dankeschön geht auch an meine sehr gute Freundin Dr. Eva Drews, die meine Arbeit trotz großen beruflichen Stresses korrigiert und mir in schwierigen Zeiten zugehört hat.

Von ganzem Herzen bedanken möchte ich mich auch bei meinen Eltern, bei meiner Oma und bei Horst Bosman, für Ihre Unterstützung, sei es finanzieller oder emotionaler Art. Ohne Euch wäre das alles nicht möglich gewesen.

Christoph – Dir danke ich besonders und von ganzem Herzen für das Ertragen schlechter Launen, das oft nötige Aufmuntern und Motivieren und dafür das es Dich gibt und Du immer für mich da bist.

