

**Aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin I
(Direktor: Prof. Dr. Martin Schrappe)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel**

**IN VITRO UNTERSUCHUNGEN ZUR ROLLE DES MER-TYROSINKINASE-
REZEPTORS BEI DER LEUKÄMIE / ZNS INTERAKTION DER AKUTEN
LYMPHATISCHEN LEUKÄMIE (ALL) IM KINDESALTER**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

CHRISTIAN MARKUS KARL WILHELM JOHANNES PFEIFFER

aus **BERLIN**

Kiel 2017

1. Berichterstatter: PD Dr. Denis Martin Schewe
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Valerius

Tag der mündlichen Prüfung:: 13.12.2018

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 22.08.2018

gez.: Prof. Dr. Markus Bleich

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

1 Inhaltsverzeichnis

1	INHALTSVERZEICHNIS	2
2	DANKSAGUNG.....	5
3	EINLEITUNG	7
3.1	Die akute lymphatische Leukämie im Kindesalter	7
3.2	ZNS-Beteiligung im Rahmen der Akuten Lymphatischen Leukämie im Kindesalter	9
3.3	Die Mer-Tyrosinkinase (Mer-TK) als Marker maligner hämatologischer Erkrankungen	12
3.4	Fragestellung.....	15
4	MATERIAL UND METHODEN	17
4.1	Materialien	17
4.1.1	Reagenzien, Analysekits, Medikamente	17
4.1.2	Rezepte zur Zubereitung von Lösungen.....	19
4.1.3	Zelllinien	21
4.1.4	Bakterien	23
4.1.5	Patientenkohorte	23
4.1.6	Antikörper	23
4.1.7	Primer.....	24
4.1.8	Vektoren, Plasmide und Oligonukleotide	24
4.1.9	Verbrauchsmaterial.....	25
4.1.10	Technische Hilfsmittel	25
4.1.11	Software	26
4.2	Methoden	26
4.2.1	Zellkultur	26
4.2.2	Zellquantifizierung und Vitalitätsbestimmung.....	26
4.2.3	Anlegen der Kokulturen	27
4.2.4	Durchflusszytometrie	27
4.2.5	Zellzyklusanalyse mit der Bromdesoxyuridin (<i>BrdU</i>) Färbung	27

4.2.6	Proteinanalyse mit dem Western Blot	28
4.2.7	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	29
4.2.8	Ermittlung der mRNA-Expression mit der qPCR	29
4.2.9	Knockdown durch Transfektion von Hairpin-Expressionsvektoren	30
4.3	Statistische Auswertung.....	32
5	ERGEBNISSE	33
5.1	ZNS Kokulturmodelle	33
5.1.1	Die Mer Protein Level sind in 697 Zellen hoch, in REH Zellen intermediär und in HL-60 Zellen niedrig... 33	
5.1.2	Leukämiezellen mit hoher Mer Expression geraten im U343 ZNS Modell in einen Wachstumsarrest und zeigen sich resistent gegen Methotrexat	34
5.1.3	Die Korrelation von leukämischer Viabilität und Mer Expression bestätigt sich im NRA-ZNS Modell.....	37
5.1.4	Ein Mer Knockdown in 697 Zellen antagonisiert den Wachstumsarrest und erhöht die Chemosensitivität im Kokulturmodell	40
5.1.5	Eine Mer-Inhibition mit UNC569 erhöht die MTX Sensitivität von 697 im U343 ZNS Modell	42
5.2	Liganden-abhängige Aktivierung der Mer-TK in ALL Zellen im ZNS.....	44
5.2.1	Der Wachstumsarrest im U343 Kokulturmodell mit 697 Zellen erfordert keinen direkten Zellkontakt ..	44
5.2.2	Der Mer Ligand Gas-6 wird im U343 Kokulturmodell nur gering sezerniert.....	45
5.2.3	Die Sekretion von Galectin-3 (Gal-3) wird im U343 Kokulturmodell hochreguliert.....	46
5.2.4	Die Gal-3 mRNA Expression korreliert nicht mit klinischen Parametern in Patienten mit t(1;19) ⁺ B-Zell Vorläufer ALL.....	48
6	DISKUSSION	50
6.1	Zusammenfassung	50
6.2	Die Mer-TK vermittelt das Überleben von t(1;19)⁺ ALL Zellen im In-vitro-ZNS-Modell	51
6.3	Eine Mer-Inhibition mit UNC569 erhöht die MTX Sensitivität von 697 Zellen im U343-ZNS Modell	55
6.4	Galectin-3 (Gal-3) ist ein möglicher Mediator der Leukämie-ZNS-Interaktion im In-vitro-ZNS-Modell	56
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	59
8	EINHEITENVERZEICHNIS.....	62

9 LITERATURVERZEICHNIS..... 63

10 LEBENSLAUF..... FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.

2 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen herzlichen Dank nachstehenden Personen entgegen bringen, ohne deren Hilfe diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer und Leiter der Max-Eder-Nachwuchsgruppe Herrn PD Dr. med. Denis Martin Schewe für die Überlassung dieses spannenden Promotionsthemas. Ich danke vielmals für das Engagement bei der erfolgreichen Beantragung des Promotionsstipendiums, für die bereichernde, intensive und engagierte Begleitung während der experimentellen Arbeit und die zahlreichen detaillierten Korrekturen bei der Verfassung dieser Arbeit. Die zahlreichen Gespräche, Diskussionen und Anregungen während dieser prägenden Zeit werden mir immer als bereichernder und konstruktiver Austausch in Erinnerung bleiben.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Martin Schrappe für die Möglichkeit, diese Arbeit an der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin I am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel der Christian-Albrechts-Universität anfertigen zu dürfen.

Besonderen Dank richte ich auch an Frau Dr. rer. nat. Sarah Habig für eine hervorragende Einarbeitung und die konstruktiven Anregungen und Diskussionen während der Durchführung dieser Arbeit. Vielen Dank für die intensive Zusammenarbeit.

Mein Dank gilt auch Dr. rer. nat. Ameera Alsadeq, Juliane Schmäh und Dr. rer. nat. Henning Fedders, die bei Problemen bei der Durchführung von Experimenten immer ein offenes Ohr hatten und viele hilfreiche Ratschläge gaben.

Katrin Timm-Richert, Katrin Neumann, Christian Bretscher, Fabian Meyersieck, Nele Belau, Annika Brauer danke ich vielmals für das gute Arbeitsklima und die tatkräftige Hilfe während der Anfertigung dieser Arbeit.

Auch für die konstruktive Zusammenarbeit mit anderen Arbeitsgruppen möchte ich mich bedanken. Ich danke Herrn Prof. Dr. rer. nat. Rolf Mentlein für die Bereitstellung der U343 Zellen, Prof. Dr. rer. nat. Ralph Lucius für die neonatalen Ratten Astrozyten (NRA-Zellen) und Jonas Waizenegger für die Durchführung eines Gas-6 ELISAs.

Einen ganz persönlichen Dank richte ich an meine Lebensgefährtin Florans Madjidyar, die mich während dieser Arbeit und während meines Medizinstudiums liebevoll unterstützt und vielfach

ermutigt hat. Die Fertigstellung dieser Arbeit wäre ohne sie nicht möglich gewesen. Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern Marit Imgrüth und Richard Pfeiffer, meinen Schwestern Anni und Jasmin Uhlig, sowie meinen Großeltern Ingrid Pfeiffer und Roswitha Mütschele für ihre Liebe und Motivation.

3 Einleitung

3.1 Die akute lymphatische Leukämie im Kindesalter

Die akute lymphatische Leukämie (ALL) ist die häufigste bösartige Erkrankung im Kindesalter und erreicht ihren Inzidenzgipfel zwischen dem 2. und 5. Lebensjahr [1]. Pathogenetisch kommt es zu einer malignen Transformation hämatopoetischer Vorläuferzellen mit unkontrollierter klonaler Proliferation entarteter Zellen. Bei der ALL handelt es sich um eine biologisch heterogene Erkrankung. Die Unterteilung in verschiedene Subgruppen geschieht u.a. durch den immunphänotypischen Nachweis von spezifischen Zellproteinen, die die jeweilige Zellreihe bzw. den Reifungsgrad anzeigen. Untersucht werden dabei die Expressionsmuster bestimmter Zielstrukturen auf der Zelloberfläche, den sog. CD-Markern (CD: Cluster of differentiation). So erfolgt mit Hilfe monoklonaler Antikörper die Differenzierung von B- und T-Zell ALL [2, 3]. Darüber hinaus erfolgt eine Unterteilung über den Nachweis zytogenetischer und molekulargenetischer Veränderungen [4].

Das klinische Bild ergibt sich hauptsächlich aus einer Verdrängung der normalen Hämatopoese. In der Folge kann es zu Anämie, Granulopenie, Thrombopenie mit Petechien und Hämatomneigung, Leistungsminderung und Infektneigung kommen [5]. Knochenschmerzen und andere muskuloskelettale Beschwerden werden in der Praxis gelegentlich als Wachstumsschmerzen oder als rheumatologische Beschwerden fehlinterpretiert. Eine ALL kann sich darüber hinaus auch durch einen extramedullären Organbefall mit Hepato-, Splenomegalie oder Hodenvergrößerung manifestieren. Ein Mediastinaltumor, der gelegentlich im Rahmen einer T-ALL beobachtet wird, kann Luftnot oder eine obere Einflusstauung verursachen [6].

Noch in den 50er Jahren des vergangenen Jahrhunderts führte die ALL innerhalb weniger Monate zum Tod. Heutzutage liegt die 5-Jahres-Überlebensrate der Kinder dank risikoadaptierter Therapieschemata bei fast 90 % [7]. In der Entscheidung über den Umfang der Therapie werden neben klassischen klinischen Risikofaktoren (Alter, Geschlecht, Leukozytenzahl, ZNS-Befall und Zeitpunkt des Therapieansprechens) auch biologische Merkmale der Blasten berücksichtigt. So weist die Zugehörigkeit einer ALL zur T-Zellreihe eine schlechtere Prognose als die deutlich häufigere B-Vorläufer ALL auf [8]. Zu den häufigen genetischen Veränderungen mit insgesamt günstiger Prognose zählen die Translokationen $t(12;21)(p13;q22)$ (mit dem ETV6-RUNX1

Fusionsgen) und t(1;19)(q23;p13.3) (mit dem TCF3-PBX1 Fusionsgen), sowie ein hyperdiploider Chromosomensatz [4, 9]. Ein Rearrangement des KMT2A-Gens am Genort 11q23, eine Translokation t(9;22)(q34;q11) (mit dem BCR-ABL Fusionsgen) und ein BCR-ABL like Subtyp sind Beispiele für Genveränderungen, die mit einer insgesamt schlechteren Prognose assoziiert sind [4]. Der wichtigste prognostische Parameter ist inzwischen die sog. minimale Resterkrankung (MRD: minimal residual disease). Bei diesem durchflusszytometrischen bzw. PCR-basierten Verfahren werden auch nach Erreichen der morphologisch kompletten Remission (unter 5 % Blasten im Knochenmark) sehr kleine Mengen maligner Zellen erfasst [10].

In Deutschland werden fast alle Patienten entsprechend den Therapieschemata der beiden kooperativen Studiengruppen ALL-BFM (Berlin-Frankfurt-Münster) und COALL (Cooperative-ALL-Studiengruppe) behandelt. Wobei der ganz überwiegende Anteil nach ALL-BFM behandelt wird. Grob können hierbei die Therapiephasen Remissionsinduktion und -konsolidierung, Re-Intensivierung und Erhaltungstherapie unterschieden werden, wobei ein multimodales Therapiekonzept, bestehend aus Chemotherapie, intrathekalen Gabe von Methotrexat und ggf. Radiatio zur Anwendung kommt [11]. Die Erforschung der genetischen Grundlagen der ALL und die damit verbundene Entwicklung zielgerichteter Therapieansätze haben das Potenzial, die etablierten Therapiepläne zu ergänzen. Ein Beispiel hierfür ist der Einsatz von Tyrosinkinaseinhibitoren wie Imatinib bei der BCR-ABL⁺ ALL, die im Kindesalter 3-5 % und im Erwachsenenalter 25 % aller ALL Patienten ausmacht und vor dem Einsatz zielgerichteter Therapieansätze Überlebensraten unter 50 % aufwies. Der Einsatz von Imatinib konnte in dieser Subgruppe das Outcome verbessern und führte dazu, dass seltener die Notwendigkeit für den Einsatz der hämatopoetischen Stammzelltransplantation besteht. In der Literatur finden sich erste Hinweise, dass dieser Erfolg bei Patienten mit dem im Kindesalter häufigeren BCR-ABL like Subtyp wiederholt werden kann. So finden sich Fallberichte, in denen ein dramatisches Ansprechen einer chemotherapieresistenten BCR-ABL like⁺ ALL auf Imatinib geschildert wird [12]. Noch größere Fortschritte als in der zielgerichteten ALL Therapie („targeted therapy“) konnten im Bereich der Immuntherapie erzielt werden. So konnten in den vergangenen Jahren Phase I und Phase II Studien publiziert werden, die die Wirksamkeit des bispezifischen CD-19/CD-3 Antikörpers Blinatumomab bei Patienten mit therapierefraktärer oder rezidivierender B-Zell-Vorläufer ALL nachwiesen [14, 15]. Ein weiterer immuntherapeutischer Therapieansatz basiert auf modifizierten T-Zellen mit chimärem Antigenrezeptor (Abkürzung CAR; engl. chimeric antigen receptor), die ebenfalls auf das Oberflächenantigen CD19 abzielen. Der

Therapieansatz, der in den USA bereits in der ALL Therapie zugelassen wurde (Stand 2017) zeigte in klinischen Studien hohe Remissionsraten. Interessanterweise waren diese sogenannten CAR-T Zellen auch in der Lage die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden und interagierten mit leukämischen Zellen im ZNS [16, 17].

3.2 ZNS-Beteiligung im Rahmen der Akuten Lymphatischen Leukämie im Kindesalter

Ein Anteil von 15-20 % der ALL-Patienten erleidet ein Rezidiv [18]. Die meisten Rezidive ereignen sich im Knochenmark. Daneben gibt es aber auch extramedulläre Rezidive. Diese finden sich insbesondere im zentralen Nervensystem (ZNS) und im Hoden [19]. Ein ZNS-Befall kann aber auch schon initial bei Erstdiagnose der Leukämie vorliegen. Die Diagnosestellung der ZNS-Beteiligung erfolgt beim Nachweis von lymphoblastischen Leukämiezellen im Liquor (siehe Tabelle 3-1). Die meisten Patienten mit ZNS-Beteiligung sind klinisch asymptomatisch. Beobachtet werden aber auch Hirnnervenausfälle, Symptome einer Rückenmarkskompression (Rückenschmerzen, Parästhesien, Blasen- /Mastdarmstörungen) und die klinischen Zeichen einer Hirnblutung (epileptische Anfälle, Wesensveränderungen, Kopfschmerzen, weitere fokalneurologische Defizite) [20].

Klassifikation	Blasten im Liquor (Zytospin)	Leukozytenzahl im Liquor (Zellen/ μ l)
ZNS 1	Keine	
ZNS 2	Vorhanden	<5
ZNS 3	Vorhanden	\geq 5
TLP	Vorhanden	Beliebig

Tabelle 3-1: Klassifikation der ZNS Beteiligung der ALL; TLP: traumatische Lumbalpunktion mit >10 Erythrozyten im Liquor (Zellen/ μ l) (Quelle: Frishman-Levy, Izraeli 2017 [21])

Gemäß den aktuellen Studienprotokollen erhalten alle Patienten mit neu diagnostizierter ALL eine prophylaktische intrathekale und systemische Therapie mit Methotrexat [22]. Durch die

Einführung der prophylaktischen Therapie konnte die Inzidenz von ZNS-Rezidiven von über 65 % in den 60er Jahren auf 3-8 % je nach Studie gesenkt werden [20, 21]. Der Erfolg der ZNS-Prophylaxe wird allerdings mit bedeutenden kurz- und langfristigen neurotoxischen Nebenwirkungen erkauft. Aufgrund der hohen Heilungsraten und dementsprechend hohen Zahl an Patienten, die die ALL im Kindesalter überleben und das Erwachsenenalter erreichen, stellen diese langfristigen Nebenwirkungen ein ernstzunehmendes Problem dar [21]. Die ZNS-Bestrahlung war in früheren Jahren das Mittel der Wahl in der prophylaktischen ZNS-gerichteten ALL Therapie. Aktuelle Studien favorisieren aber, aufgrund der geringeren Spätschäden, die ZNS-gerichtete Chemotherapie ohne Radiatio [22, 23]. Ein kleiner Anteil von ALL Patienten mit erhöhtem Risiko für eine ZNS Beteiligung erhält immer noch eine prophylaktische Bestrahlung der Neuroachse. Hierzu zählen, je nach Protokoll, Patienten mit einem T-Zell Immunphänotyp, einem ZNS 3 Status, zytogenetischen Risikofaktoren und einem schlechten Ansprechen auf die Induktionstherapie [20].

Die Pathophysiologie des ZNS-Befalls ist noch nicht abschließend verstanden. Dennoch gibt es einige Theorien über dessen Entstehung. Diskutiert werden eine Zellmigration aus dem Schädelknochenmark über Brückenvenen in den Subarachnoidalraum, ein Migrationsweg über den Plexus choroideus, über Hirnkapillaren oder auch über Läsionen, ggf. auch iatrogen im Rahmen einer traumatischen Lumbalpunktion [20, 24]. Interessanterweise finden sich ZNS Rezidive hauptsächlich bei Patienten, die initial als ZNS negativ klassifiziert wurden. Dies lässt vermuten, dass Blasten, die therapieresistent oder empfänglich für nischenspezifische Überlebenssignale sind, die Fähigkeit haben, für längere Zeit in der ZNS Nische zu überleben [25]. Eine aktuelle Studie zeigt in einem präklinischen Modell, dass die Fähigkeit zur Überwindung der Blut Hirn Schranke (BHS) als universelle Eigenschaft von ALL-Blasten anzusehen ist [26]. Im gleichen Jahr erschien aber auch eine Studie die zeigte, dass Patienten mit späterem ZNS Rezidiv schon bei Diagnosestellung Leukämiezell-Subpopulationen mit einem „ZNS Protein Profil“ aufweisen. Dieses „ZNS Protein Profil“ beinhaltet die Expression der Stearoyl-CoA Desaturase (SCD), einem Protein, das eine Rolle beim Lipidstoffwechsel, in der Zellmigration und in der Karzinogenese spielt und eine erhöhte Expression von Osteopontin, (OPN bzw. SPP1) das ebenfalls die Zellmigration und Zelladhäsion beeinflusst. Diese Daten suggerieren, dass innerhalb einer Leukämiezellpopulation einige Zellen mit ZNS Markern die Möglichkeit haben in das ZNS zu gelangen während andere ohne ZNS Marker dies nicht können [27]. Denkbar ist also einerseits, dass Blasten grundsätzlich in das ZNS gelangen und nur solche

mit aktivierten nischenspezifischen Überlebenssignalwegen die Therapie überdauern. Möglich ist aber andererseits auch, dass nur Leukämiezellen mit prädisponierenden Markern die BHS überwinden und dann in der ZNS Nische Überlebenssignalwege aktivieren [25].

In diversen Studien konnten klinische Faktoren mit dem Auftreten eines ZNS-Befalls assoziiert werden. Dazu zählen das Vorhandensein eines T-Zell-Immunphänotyps, eines BCR-ABL1-Fusionsgens, eines KMT2A-(MLL)-Rearrangements, einer Hyperleukozytose und eines ZNS 3 Status bei Erstdiagnose [20, 21]. Das TCF3/PBX1 Fusionsgen, welches aus der Translokation t(1;19)(q23;p13) resultiert, zählt mit einem Anteil von 3-5 % zu den selteneren Translokationen der B-Zell Vorläufer ALL und ist ebenfalls mit einem erhöhten Risiko von ZNS-Rezidiven assoziiert [9]. Trotz des höheren Anteils von ZNS-Rezidiven ist diese Genveränderung mit einer insgesamt günstigen Prognose verbunden [9]. Daneben werden zunehmend Studien publiziert, die in präklinischen Modellsystemen untersuchen, durch welche molekularen Eigenschaften ALL Zellen in der ZNS Nische überleben. Frishman-Levy et al. fanden im Mausmodell einen Zusammenhang zwischen der Interleukin 15 (IL-15) Expression in Leukämiezellen und der Aktivierung von natürlichen Killerzellen (NK Zellen). Aktivierte NK Zellen reduzierten zwar die Ausbreitung leukämischer Zellen in der Peripherie, eine ZNS Leukämie konnte dadurch aber nicht verhindert werden, da NK Zellen nicht in das ZNS gelangen. Cario et al. hatten zuvor schon im Rahmen einer Fall-Kontroll-Studie eine Assoziation der IL-15 Expression in Knochenmarksblasten und dem Auftreten von ZNS-Rezidiven gefunden [28, 29]. Eine andere Arbeitsgruppe konnte in einem Zellkulturmodell wachstumsfördernde Effekte von IL-15 nachweisen. Dieser Effekt war unter Kulturbedingungen mit geringem Serumgehalt, vergleichbar mit dem geringen Serumgehalt im ZNS, besonders ausgeprägt [30]. Eine weitere *in vivo* Studie beschrieb einen möglichen Eintrittsmechanismus von T-ALL Zellen in das ZNS. Eine Interaktion zwischen dem Chemokinrezeptor CCR7, der in Leukämiezellen exprimiert wird und seinem Liganden CCL19, der von Endothelzellen des Plexus choroideus gebildet wird, ermöglicht in diesem Modell eine transendotheliale Migration von T-ALL Zellen [31]. Eine neuere Arbeit stellt einen Zusammenhang zwischen der CCR7/ CXCR4-Chemokinrezeptor Aktivität und der Expression der Zeta-chain-associated Proteinkinase 70 (ZAP70) her. Eine hohe Expression der Tyrosinkinase ZAP70 in Leukämiezellen korrelierte im Mausmodell mit einer ZNS Infiltration durch Leukämiezellen und zeigte in einer Patientenkohorte eine Assoziation mit dem Auftreten einer ZNS Leukämie bei Diagnosestellung [32].

In den letzten Jahren konzentrierte sich eine zunehmende Zahl an Arbeitsgruppen auf die Frage, warum Leukämiezellen trotz gezielter Therapie im ZNS überleben. So demonstrierte eine *in vitro* Studie aus dem Jahr 2011, dass ZNS Zellen (untersucht wurden humane Astrozyten, Plexus-choroideus Zellen und Meningealzellen) bei Exposition von ALL Zellen mit den gängigen Chemotherapeutika aus der ZNS-Prophylaxe (Dexamethason, Cytarabin und Methotrexat) chemoprotektive Effekte induzieren [33]. *In vivo* Studien fanden im Mausmodell einen Zusammenhang zwischen dem Überleben von Leukämiezellen im ZNS und der Aktivierung der Fms-Like-Tyrosinkinase-3 (FLT3), die mit dem Vorliegen eines KMT2A-Rearrangements korreliert [34, 35]. Dieses Gen kennzeichnet einen ALL-Subtyp, der ein höheres Risiko für eine ZNS-Infiltration und ZNS-Rezidive mit sich bringt [21]. Eine aktuelle Studie fand erhöhte PBX1 Proteinniveaus in B-Vorläufer ALL Zellen, die zuvor mit murinen Plexus choroideus Zellen kokultiviert wurden. Diese Beobachtung bestätigte sich in einem murinen Xenograft Modell. *In vitro* vermittelte PBX1 chemoprotektive Effekte gegenüber Methotrexat und Cytarabin, die in der ZNS-gerichteten Therapie der ALL Anwendung finden. PBX1 bildet mit TCF3 die TCF3-PBX1 Fusion im Rahmen der Translokation t(1;19) (dessen Rolle im Rahmen der ZNS ALL oben beschrieben wurde) und spielt als Transkriptionsfaktor eine Rolle in der Hämatopoese und in der Biologie zahlreicher Tumorerkrankungen und Leukämien [36].

Angesichts der Toxizität der ZNS-Prophylaxe und der immer noch bedeutenden Inzidenz und vergleichsweise ungünstigen Prognose von ZNS-Rezidiven ist die Erforschung weiterer diagnostischer Marker und therapeutischer Targets der ZNS-Leukämie erforderlich.

3.3 Die Mer-Tyrosinkinase (Mer-TK) als Marker maligner hämatologischer Erkrankungen

Die Mer-Tyrosinkinase (Mer-TK) ist, neben Tyro-3 und Axl, ein Zelloberflächenrezeptor aus der TAM-(Tyro-3/Axl/Mer)-Familie. Im Rahmen der physiologischen Hämatopoese hemmen TAM-Rezeptoren inflammatorische Prozesse in dendritischen Zellen und Makrophagen, initiieren die Phagozytose apoptotischer Zellen und membranöser Organellen und spielen eine Rolle bei der Ausreifung von natürlichen Killerzellen (NK Zellen) [37, 38]. TAM-Rezeptoren werden daneben aber auch mit verschiedenen malignen Erkrankungen in Verbindung gebracht. So wurde eine Überexpression von TAM-Rezeptoren bzw. von Komponenten der TAM-Signalwege bei

Leukämien, Gliomen, kolorektalen Karzinomen, Brustkrebs, gastrointestinalen Stromatumoren, hepatozellulären Karzinomen, Melanomen, Pankreas- und Prostatatumoren beobachtet [39]. Im Rahmen der myeloischen und lymphatischen Leukämien aktivieren TAM-Rezeptoren pro-proliferative und überlebensfördernde Signaltransduktionswege wie die AKT- oder ERK1/2-Signalkaskade [37, 40]. So wurde zum Beispiel eine hohe Expression des TAM-Rezeptors Axl als unabhängiger prognostischer Faktor und potentiell therapeutisches Target bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) und der chronisch-lymphatischen Leukämie (CLL) identifiziert [41, 42]. Neuere präklinische Daten zeigen, dass eine Axl Inhibition auch bei der chronisch-myeloischen Leukämie (CML) wirksam ist. Dies konnte sowohl für die BCR-ABL Tyrosinkinase Inhibitor sensible, als auch für die resistente Form der CML gezeigt werden [43].

Auch die Mer-TK ist in die Pathogenese zahlreicher Tumorentitäten involviert. Die Aktivierung des Mer-TK Rezeptors erfolgt durch die extrazelluläre Bindung der Liganden Gas-6, Protein S, Tubby, tubby-like Protein 1 (Tulp1), und Galectin-3, deren Signal er über Autophosphorylierung ins Zellinnere weiterleitet und dort anti-apoptotische, pro-proliferative und pro-migratorische Signalproteine aktiviert und damit Chemoresistenz und Tumorstromung vermittelt (Abbildung 3-1 und [44–49]). Unter den Mer Liganden ist Gas-6 (Abkürzung; engl. Growth arrest-specific gene 6) am längsten bekannt und spielt eine Rolle als prognostischer Faktor bei der AML. Im Rahmen dieser Erkrankung konnte gezeigt werden, dass Gas-6 in der Knochenmarksnische das Überleben von AML Zellen fördert und als therapeutisches Target in Frage kommt [41, 46]. Nachdem Protein S, Tubby, und tubby-like Protein 1 (Tulp1) als weitere Mer Liganden beschrieben wurden, identifizierten zuletzt Caberoy et al. im Jahr 2012 Galectin-3 (Gal-3) als Mer-spezifisches Apoptosesignal („eat-me Signal“) für Makrophagen und retinale Pigmentepithelzellen [48].

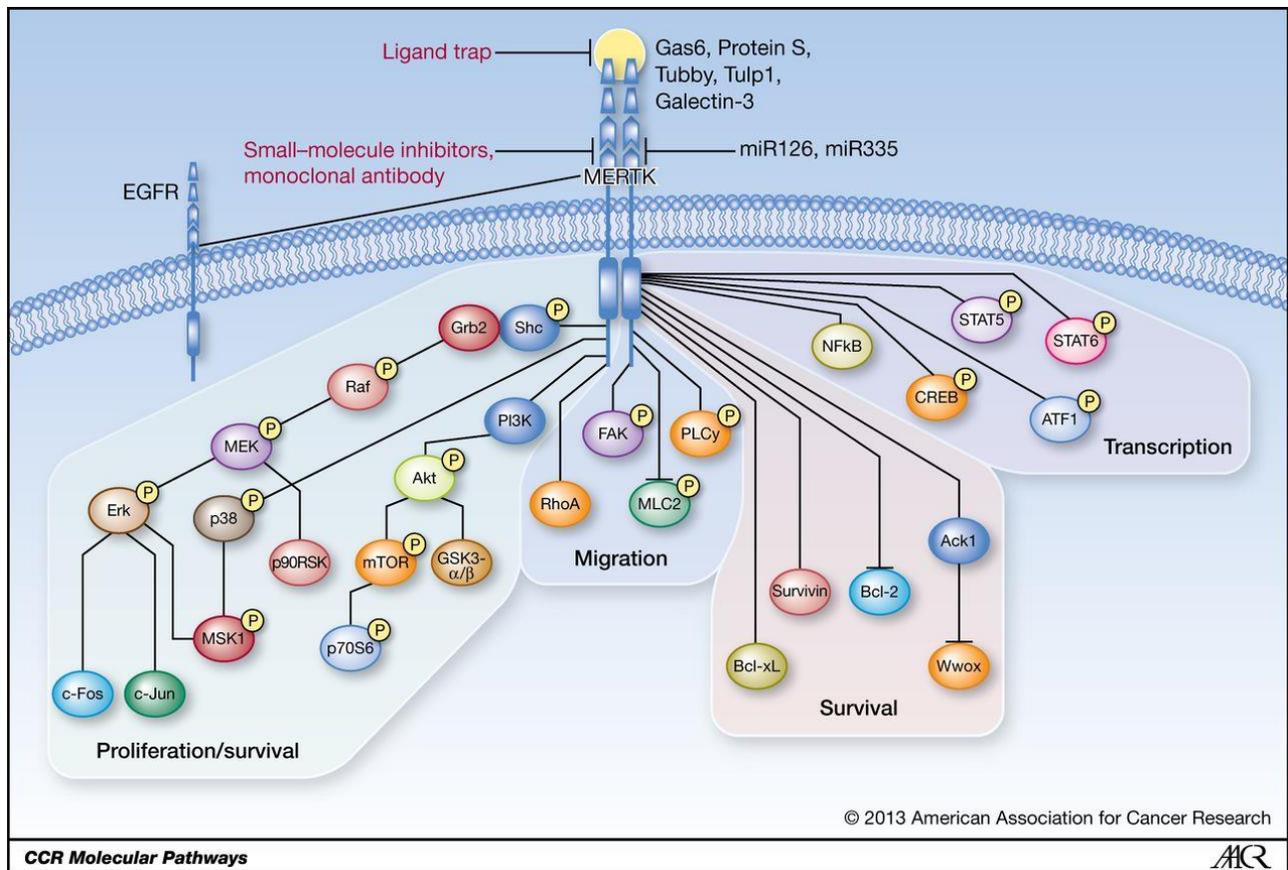


Abbildung 3-1: Mer-TK Signaltransduktion (Quelle: Cummings et al. 2013 [44])

Unter physiologischen Bedingungen zeigen Vorläuferzellen der myeloischen Reihe keine bzw. sehr niedrige Mer-Expressionsniveaus. In Zellen der physiologischen Lymphopoese konnte bei keinem Schritt der Ausreifung eine Mer-Expression nachgewiesen werden [50, 51]. 2013 zeigten Lee-Sherick et al., dass in der Mehrzahl der untersuchten pädiatrischen und adulten AML-Blasten eine aberrante Mer-Expression stattfindet. Ein, zur Untersuchung der phänotypischen Effekte der Mer-Expression, durchgeführter Mer small hairpin RNA (Abk.: shRNA) Knockdown erhöhte in vitro den Anteil apoptotischer Zellen und reduzierte die Koloniebildung. Im murinen Xenograft-Modell konnte ein Mer-Knockdown das Überleben signifikant verlängern [50]. Im Gegensatz zum TAM-Rezeptor Axl konnte in AML Patienten allerdings keine prognostische Relevanz dieses Faktors nachgewiesen werden [41]. Im selben Jahr erschienen zwei weitere Studien, die die Rolle der Mer-TK im Rahmen der T- und B-Zell Vorläufer ALL untersuchten. Beide Studien konnten eine aberrante Mer-Expression in einigen ALL-Zelllinien nachweisen [52, 53]. In B-Vorläufer ALL Zellen zeigte sich eine Assoziation der Mer-Expression mit dem E2A-PBX1

Fusionsprotein, das aus der t(1;19)(q23;p13)-Chromosomentranslokation resultiert und trotz einer vergleichsweise günstigen Prognose mit einem erhöhten Risiko von ZNS-Rezidiven einhergeht [9, 52, 54]. Auch in B-Vorläufer und T-ALL Zellen zeigten sich bei Mer-Inhibition erhöhte Apoptoseraten und eine Chemosensibilisierung *in vitro*, sowie verlängerte Überlebenszeiten in murinen Xenograft-Modellen [52, 53]. Mittlerweile befinden sich erste Mer-selektive Tyrosinkinaseinhibitoren in der präklinischen Testung. UNC569, ein gegen die Mer-TK gerichteter kleinmolekularer Inhibitor, zeigte bereits antineoplastische Eigenschaften in ALL-Modellen und könnte etablierte Therapieschemata der t(1;19)⁺ ALL im Kindesalter zukünftig ergänzen [55].

3.4 Fragestellung

Die Behandlung der ALL im Kindesalter erreicht mittlerweile hohe Heilungsraten. Auch die Inzidenz von ZNS-Rezidiven, die früher ein bedeutender Anteil der ALL-Patienten erlitt, konnte durch die prophylaktische ZNS-gerichtete Therapien deutlich gesenkt werden. Der Erfolg der ZNS-Prophylaxe wird allerdings mit kurz- und langfristigen neurotoxischen Nebenwirkungen erkauft. Aufgrund der hohen Heilungsraten und dementsprechend hohen Lebenserwartung der ALL-Patienten stellen diese langfristigen Nebenwirkungen ein ernstzunehmendes Problem dar [20, 21]. Ein manifester ZNS-Befall an sich geht darüber hinaus mit einer ungünstigen Prognose einher [20].

Die Mer-TK wurde in zahlreichen Studien mit Überlebenssignalwegen von soliden und hämatologischen Tumorerkrankungen in Verbindung gebracht [44]. Linger et al. fanden in B-Vorläufer ALL Zellen mit dem E2A-PBX1-Fusionsprotein eine Überexpression der Mer-TK [52]. Darüber hinaus zeigte sich, dass das E2A-PBX1-Fusionsprotein, welches aus der t(1;19)(q23;p13)-Translokation resultiert, trotz einer insgesamt vergleichsweise günstigen Prognose ein erhöhtes Risiko von ZNS-Rezidiven mit sich bringt [9, 54].

Mit der vorliegenden Arbeit sollte daher die Frage beantwortet werden, ob sich *in vitro* Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen einer ZNS-Beteiligung und der Expression der Mer-TK im Rahmen der t(1;19)⁺ B-Zell-Vorläufer ALL finden.

Es konnten erste Erkenntnisse über die Mer-TK als Marker für einen ZNS Befall der t(1;19)⁺ ALL im Kindesalter gewonnen werden. Zu diesem Zweck wurde ein Kokulturmodell etabliert, in dem die ZNS-Nische durch Glia Zellen (U343: Gemischtes Astrozytom/Oligodendrogliom und NRA: Neonatale Ratten-Astrozyten) imitiert und das Verhalten von B-Vorläufer ALL Zellen mit unterschiedlichen Mer-Expressionsniveaus untersucht wurde.

Im Speziellen sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- 1) Welche Prä-B-ALL Zellen weisen welches Mer-Expressionsniveau auf?
- 2) Wie verhalten sich leukämische Zellen in Bezug auf Zellwachstum, Teilungsaktivität (Untersuchung mittels Bromdesoxyuridin [BrdU] Verfahren) und Zelltod unter Anwesenheit von Neuroglia? Gibt es einen Einfluss des Mer-Expressionsniveaus auf dieses Verhalten?
- 3) Zeigen sich Mer-positive Zellen im ZNS-Modell resistent gegenüber Methotrexat, dem wichtigsten Medikament der ZNS-gerichteten ALL Therapie?
- 4) Wie beeinflusst eine Mer-Inhibition mittels RNA Interferenz (Abk. RNAi) und mittels medikamentöser Mer-Inhibition mit UNC569 *in vitro* das Verhalten der Leukämiezellen in der ZNS Nische?
- 5) Welche Rolle spielen die in der Literatur beschriebenen Mer-Liganden in diesem *in vitro* Modell?

4 Material und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 Reagenzien, Analysekits, Medikamente

Chemikalien, Analysekits, Medikamente	Bezugsquelle
4x Laemmli Probenpuffer (4x Dye)	Bio-Rad, Hercules (USA)
7-AAD: 7-Aminoactinomycin	eBioscience, San Diego (USA)
Accutase®	Biowest, Nuaille (Frankreich)
Acrylamid/Bis	Geyer, Hamburg
Adenosintriphosphat (ATP)	Invitrogen, Carlsbad (USA)
Alkalische Phosphatase	New England Biolabs, Ipswich (USA)
APC BrdU Flow Kit®	Becton Dickinson (USA)
APS : Ammoniumpersulfat (N ₂ H ₈ S ₂ O ₈) 10 %	AppliChem, Darmstadt
Beta-Glycerolephosphat (Beta-GP)	Geyer, Hamburg
BioRad-Protein-Assay®	BioRad, Hercules (USA)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
CutSmart® Puffer	New England Biolabs, Ipswich (USA)
Cytofix/Cytoperm® Puffer	BD Biosciences (USA)
Cytoperm® Permeabilisierungs Puffer	BD Biosciences (USA)
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen, Carlsbad (USA)
DMSO: Dimethylsulfoxid (C ₂ H ₆ OS)	Geyer, Hamburg
DNase: Desoxyribonuklease	Sigma-Aldrich (USA)
ECL	Geyer, Hamburg
Ethanol	Merck Millipore, Billerica (USA)
FACS Puffer	BD Biosciences (USA)
Fetales Kälberserum (FCS)	Invitrogen, Carlsbad (USA)

Chemikalien, Analysekits, Medikamente	Bezugsquelle
Flow Cytometry staining buffer (FACS Färbepuffer)	eBioscience, San Diego (USA)
Formaldehydlösung (4 %)	Merck Millipore, Billerica (USA)
Galectin-3 ELISA Kit	R&D Systems, Mc Kinley Place (USA)
Gas-6 ELISA Kit	R&D Systems, Mc Kinley Place (USA)
Glycin	Sigma-Aldrich (USA)
HpaI Restriktionsenzym	New England Biolabs, Ipswich (USA)
LB-Medium	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Mercaptoethanol (C ₂ H ₆ OS)	Geyer, Hamburg
Methanol	Merck Millipore, Billerica (USA)
Methotrexat	Apotheke des UKSH
MgCl	Apotheke des Universitätsklinikums Schlewig-Holstein, Kiel
Milli-Q® Wasser (destilliertes Wasser)	Merck Millipore, Billerica (USA)
NaCl	Apotheke des Universitätsklinikums Schlewig-Holstein, Kiel
Natriumfluorid (NaF)	Sigma-Aldrich (USA)
Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)	Sigma-Aldrich (USA)
NEBuffer-3®	New England Biolabs, Ipswich (USA)
Perm/Wash® Puffer	BD Biosciences (USA)
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Biochrom, Berlin
Polybren	Merck Millipore, Billerica (USA)
PV (Pervanadat)	Sigma-Aldrich (USA)
QIAprep Spin Miniprep Kit®	Qiagen, Venlo (Niederlande)
QIAquick Gel Extraction Kit®	Qiagen, Venlo (Niederlande)
QuantiNova SYBR Green PCR Kit®	Qiagen, Venlo (Niederlande)
QuantiTect Reverse Transcription Kit®	Qiagen, Venlo (Niederlande)

Chemikalien, Analysekits, Medikamente	Bezugsquelle
RIPA ⁺ -Puffer	Roche AG, Schweiz
RNeasy Mini Kit®	Qiagen, Venlo (Niederlande)
SDS	Sigma-Aldrich (USA)
Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder®	Thermo Scientific (USA)
T4 DNA Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot
TEMED: Tetramethylethyldiamin (C ₆ H ₁₆ N ₂)	Geyer, Hamburg
Tris	Sigma-Aldrich (USA)
Trypanblau	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Trypsin-EDTA	Gibco, Carlsbad (USA)
Turbofect® Transfektionsreagens	Thermo Scientific (USA)
Tween 20 (Polysorbat 20)	Geyer, Hamburg
UNC569	Axon Medchem
XhoI Restriktionsenzym	New England Biolabs, Ipswich (USA)
Zellkulturmedium DMEM	PAN-Biotech Aidenbach
Zellkulturmedium McCoy's	PAN-Biotech Aidenbach
Zellkulturmedium MEM	PAN-Biotech Aidenbach
Zellkulturmedium RPMI 1640	PAN-Biotech Aidenbach

Tabelle 4-1: Reagenzien, Analysekits, Medikamente

4.1.2 Rezepte zur Zubereitung von Lösungen

Lösung	Inhaltsstoffe	Menge
Erythrozytenlysepuffer	0,82 % Ammoniumchlorid 0,1 % Kaliumbikarbonat 0,05 % EDTA-Lösung (0,5M)	beliebig
Gefärbte Proteinlösung (Dye)	950µl Laemmli Puffer (4x Dye) + 50µl Mercaptoethanol	1ml

Lösung	Inhaltsstoffe	Menge
Kryokonservierungsmedium	90 % Fetales Kälberserum 10 % DMSO	beliebig
Laufpuffer	25mM Tris; pH 7,5-8,0 mit HCl 190mM Glycin 0,1 % SDS	beliebig
Ligase Puffer	50mM Tris; pH 7,5 mit HCl 10mM MgCl 1mM ATP 10mM DTT	beliebig
RIPA ⁺⁺ Puffer	830µl RIPA-buffer + 100µl RIPA ⁺ -buffer + 10µl Natriumfluorid (NaF) + 50µl Beta-Glycerolphosphat (Beta-GP) + 10µl Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)	1ml
Sammelgel	1,8ml Destilliertes Wasser + 0,9ml Stapelpuffer + 0,4ml Acrylamid + 30µl Ammoniumpersulfat + 3µl Tetramethylethyldiamin	1 Gel
Sammelpuffer	60,5g Tris (0,5M); pH 6,8 mit HCl 4,0g SDS (0,4 %) Destilliertes Wasser bis 1l	1l
Separierungsgel (8 % Acrylamid)	3,6ml destilliertes Wasser + 2ml Separierungspuffer + 2,1ml Acrylamid + 75µl Ammoniumpersulfat + 7,5µl Tetramethylethyldiamin	1 Gel

Lösung	Inhaltsstoffe	Menge
Separierungspuffer	187g Tris (1,5M); pH 8,8 mit HCl 4g SDS (0,4 %) Destilliertes Wasser bis 1l	1l
TBST	20mM Tris 150mM NaCl 0,1 % Tween	beliebig
TE-Puffer (Tris-EDTA-Puffer)	10mM Tris 50mM NaCl 1mM EDTA	beliebig
Transfer Puffer	25mM Tris 190mM Glycin 20 % Methanol	beliebig

Tabelle 4-2: Rezepte zur Zubereitung von Lösungen

4.1.3 Zelllinien

Zelllinie	Spezifität	Bezugsquelle/Zitat	Zellkulturmedium
697	Akute Leukämie, B-Zell-Vorläuferzellen	DSMZ*	RPMI1640 + 10% FCS + 1% Penicillin/ Streptomycin
HL-60	Akute Promyelozyten-leukämie	Prof. Dr. Martin Stanulla, MHH, Hannover/ [56]	RPMI1640 + 10% FCS + 1% Penicillin/ Streptomycin
MHH-CALL-3	Akute Leukämie, B-Zell-Vorläuferzellen	Prof. Dr. Martin Stanulla, MHH, Hannover / [57]	RPMI1640 + 20 % FCS + 1 % Penicillin/ Streptomycin

Zelllinie	Spezifität	Bezugsquelle/Zitat	Zellkulturmedium
MSC	Immortalisierte mesenchymale Stammzellen	Prof. Dr. Dario Campana, Memphis, USA / [58]	RPMI1640 + 10 % FCS + 1 % Penicillin/ Streptomycin + 1 µM Hydrokortison
NRA: Neonatale Ratten-Astrozyten	Astrozyten, gewonnen von gesunden neonatalen Ratten	Prof. Dr. Ralph Lucius CAU, Kiel / [59]	RPMI1640 + 20 % FCS + 1 % Penicillin/ Streptomycin
REH	Akute Leukämie, B-Zell-Vorläuferzellen	DSMZ*	RPMI1640 + 10 % FCS + 1 % Penicillin/ Streptomycin
RS4;11	Akute Leukämie, B-Zell-Vorläuferzellen Akute Leukämie, B-Zell-Vorläuferzellen	DSMZ*	A-MEM + 10 % FCS + 1 % Penicillin/ Streptomycin
SUP-B15	Akute Leukämie, B-Zell-Vorläuferzellen	DSMZ*	McCoy's SA + 20 % FCS + 1 % Penicillin/ Streptomycin
U343	Gemischtes Astrozytom/Oligodendrogliom	Prof. Dr. Rolf Mentlein, CAU, Kiel / [60]	DMEM + 10 % FCS + 1 % Penicillin/ Streptomycin + 25mM HEPES + 1,8mM L-Glutamin

Zelllinie	Spezifität	Bezugsquelle/Zitat	Zellkulturmedium
UOCB6	Akute Leukämie, B-Zell-Vorläuferzellen	Dr. Marketa Kubricanova-Zaliova, CLIP, Prag, Tschechien / [61, 62]	RPMI1640 + 10 % FCS + 1 % Penicillin/ Streptomycin

Tabelle 4-3: Zelllinien; *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

4.1.4 Bakterien

Bakterien	Bezugsquelle
One Shot TOP10 Chemically Competent E. coli®	Invitrogen, Carlsbad (USA)

Tabelle 4-4: Bakterien

4.1.5 Patientenkohorte

Es wurde eine Patientenkohorte von 64 Patienten mit $t(1;19)^+$ B-Zell-Vorläufer ALL untersucht, die nach dem ALL Berlin-Frankfurt-Münster (BFM) 2000 Protokoll behandelt wurden. Die Einwilligung für die Verwendung des Materials wurde gemäß den ethischen Standards der Deklaration von Helsinki innerhalb des ALL-BFM 2000 Protokolls eingeholt. Die Probenentnahme erfolgte nach Aufklärung und Zustimmung der Patienten bzw. deren gesetzlichen Vertretern unter einem genehmigten Ethikantrag (Ethikvotum Nr. 2522 der Medizinischen Hochschule Hannover).

4.1.6 Antikörper

Antikörper	Bezugsquelle
Anti-BrdU-APC	eBioscience (USA)
Anti-GAPDH	Cell Signalling, Danvers (USA)
Anti-Mer	Cell Signalling, Danvers (USA)

Antikörper	Bezugsquelle
CD19-FITC	eBioscience (USA)
CD19-PE	eBioscience (USA)
IgG1-APC	eBioscience (USA)
IgG1-PE	eBioscience (USA)
Mer-APC	R&D Systems, Mc Kinley Place (USA)

Tabelle 4-5: Antikörper

4.1.7 Primer

Antikörper	Bezugsquelle
Galectin-3 (Hs_LGALS3_1_SG)	Qiagen, Venlo (Niederlande)
GAPDH (Hs_GAPDH_1_SG)	Qiagen, Venlo (Niederlande)

Tabelle 4-6: Primer

4.1.8 Vektoren, Plasmide und Oligonukleotide

Vektor / Oligonukleotid	Bezugsquelle
Gag/Pol-Plasmid	Addgene, Cambridge (USA)
pSicoR-Ef1a-mCh Vektor (Katalognummer: 31847 und 31849)	Addgene, Cambridge (USA)
Rev-Plasmid	Addgene, Cambridge (USA)
SK-Mer-FW Oligonukleotid (Sequenz: tCCTGCATACTTACTTACTTTtcaagagaAAGTAAG TAAGTATGCAGGTTTTTTC)	Eurofins Genomics, Ebersberg
SK-Mer-RV Oligonukleotid (Sequenz: tcgagaaaaaCCTGCATACTTACTTACTTTTCTCTTG AAAAGTAAGTAAGTATGCAGGA)	Eurofins Genomics, Ebersberg
VSV-G-Envelope-Plasmid	Addgene, Cambridge (USA)

Tabelle 4-7: Vektoren, Plasmide und Oligonukleotide

4.1.9 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
Amicon® Zentrifugenfilter	Merck Millipore, Billerica (USA)
BD Transwell Insert 0,4µm Porengröße PET	BD, Franklin Lakes (USA)
Hybond® Membran	GE Healthcare, Little Chalfont (UK)
LB Agar Ampicillin Kulturschale	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Parafilm®	Pechiney Plastic Packaging
Pipetten, Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Sarstedt, Nümbrecht
Zellkultur Platten	Sarstedt, Nümbrecht
Zellsieb Nylon 70µm	BD, Franklin Lakes (USA)
Zentrifugenfilter; 0,45µm	Merck Millipore, Billerica (USA)

Tabelle 4-8: Verbrauchsmaterial

4.1.10 Technische Hilfsmittel

Apparat	Bezugsquelle
ABI 7900 HT®	ThermoFisher, Waltham (USA)
Brutschrank für Zellkultur INC 153®	Memmert, Schwabach
Centrifuge 5810	Eppendorf, Hamburg
Cytospin 3®	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
FACS-Gerät BD Accuri C6®	BD Biosciences, Heidelberg
Laborabzug Scanlaf Mars Safety Class 2®	Labogene, Lynge (Dänemark)
Lichtmikroskop Axioskop 40®	Zeiss, Oberkochen
Neubauer® Zählkammer	Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim
Photometer	Eppendorf, Hamburg
Vortex Genius 3®	IKA, Staufen

Apparat	Bezugsquelle
Wasserbad	Thermo Fisher scientific, Waltham (USA)

Tabelle 4-9: Technische Hilfsmittel

4.1.11 Software

Software	Bezugsquelle
BD CSampler® Software	BD Biosciences (USA)
GraphPad Prism 5®	GraphPad Software, La Jolla (USA)
RQ Manager®	Applied Biosystems (USA)

Tabelle 4-10: Software

4.2 Methoden

4.2.1 Zellkultur

Die Zelllinien 697, REH, UOCB6, SUP-B15, RS4;11, HL-60 und MHH-CALL-3 wurden nach den Empfehlungen der Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH kultiviert. Die Kulturbedingungen für die MSC Zelllinie wurden dem Protokoll von [58] entnommen. Die Kultivierung der U343 Zelllinie wurde in Anlehnung an Krisch et al. [63] vorgenommen. Die Gewinnung der neonatalen Ratten-Astrozyten (NRA Zellen) erfolgte gemäß der Darstellung von Wilms et al. [59] im Institut für Anatomie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. Für die Kultur der NRA Zellen wurde RPMI1640 + 20 % FCS verwendet.

4.2.2 Zellquantifizierung und Vitalitätsbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgte in einer Neubauerzählkammer mit dem Kammerfaktor ($\times 10^4$). Zur Vitalitätsbestimmung wurde die Färbung mit Trypanblau gewählt.

4.2.3 Anlegen der Kokulturen

Die Kokulturen wurden angelegt, indem zunächst die adhärente Zelllinie, also U343 Zellen oder NRA Zellen, in einer Konzentration von $0,25 \times 10^6/2\text{ml}$ für 12h bei 37°C im jeweiligen Medium (siehe Tabelle 4-3) präinkubiert wurde. Im Folgenden wurde das Medium vorsichtig abpipettiert, die Zellen mit *PBS* gewaschen und die Suspension mit Leukämiezellen in einer Konzentration von $1,25 \times 10^6/2\text{ml}$ hinzugefügt. Für die meisten Leukämie Zelllinien erfolgte die Koinkubation für 48h bei 37°C . Für REH Zellen wurde, aufgrund von langsamerem Wachstum, eine Koinkubation für 72h erforderlich.

4.2.4 Durchflusszytometrie

Für eine Analyse mittels Durchflusszytometrie (Abkürzung FACS; engl. fluorescence-activated cell sorting) wurde eine Zellkultur im entsprechenden Medium angelegt. Zur Analyse wurden adhärente Zellen mit Accutase® abgelöst. Nach einem Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in FACS-Puffer resuspendiert und in ein 96-Well-Analyse-Gefäß überführt. Die Inkubation mit einem fluoreszenz-markiertem Antikörpern erfolgte für 30min lichtgeschützt bei Raumtemperatur. Um in Kokultur Versuchen Leukämiezellen von adhären Zellen abgrenzen zu können, wurde zusätzlich eine Inkubation mit einem CD19- bzw. CD45-Antikörper vorgenommen. Die Analyse erfolgte nach Resuspension in FACS-Puffer mit dem FACS-Gerät BD Accuri C6.

4.2.5 Zellzyklusanalyse mit der Bromdesoxyuridin (*BrdU*) Färbung

Die BrdU Färbung erfolgte in Anlehnung an das „BrdU Flow Kits Instruction Manual“ des Herstellers Becton Dickinson (USA). Für dieses Verfahren wurde eine Zellkultur je nach Fragestellung angelegt. Die Zellsuspension wurde mit $10\mu\text{M}$ BrdU versetzt und für 30min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen von den Kulturplatten abgelöst und mit PBS-Puffer gewaschen. Zur Detektion der Leukämiezellen erfolgte eine FACS Oberflächenfärbung mittels CD19-FITC. Es folgten Fixierung, Permeabilisierung und Refixierung gemäß den Angaben des Herstellerprotokolls und anschließend eine Inkubation mit DNase (300mg/l) für 1h bei 37°C . Zur Anfärbung des BrdU Antigens erfolgte nach Entfernung der DNase eine

einstündige Inkubation mit Anti-BrdU-APC und zusätzlich eine Gegenfärbung mit 7-Aminoactinomycin (7-AAD) zur DNA Färbung. Nach Resuspension in FACS Färbepuffer erfolgte die Messung der Fluoreszenz.

4.2.6 Proteinanalyse mit dem Western Blot

Für dieses Verfahren erfolgte zunächst die Freisetzung der Proteine durch eine Inkubation in RIPA⁺⁺-Puffer für 10min auf Eis und anschließend für mindestens 30min bei -80°C. Mit Hilfe von BSA und BioRad-Protein-Assay®-Lösung als Indikator wurde eine Verdünnungsreihe mit dem Spektrum der erwarteten Proteinkonzentration hergestellt. Unter Verwendung des Photometers wurde daraus eine Standardkurve erstellt. Anschließend wurden die eigentlichen Proben gemessen und die Proteinkonzentration extrapoliert.

Für die Gelelektrophorese wurden Gele vorbereitet, die sich aus einem Separierungsgel und einem Sammelgel zusammensetzten. Nach Standardisierung auf eine Proteinkonzentration von 1g/l, wurden die Proben in das Elektrophoresegel eingebracht. Zur Bestimmung der Größe des detektierten Proteins wurde zusätzlich der Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder® in das Gel eingebracht. Danach erfolgte die Elektrophorese in Laufpuffer bei einer Spannung von 80-100V für 20min im Sammelgel und mit einer Spannung von 120V für 70-90min im Separierungsgel. Im nächsten Schritt wurden die Proteine auf eine mit Methanol aktivierte Hybond® Membran übertragen. Dieser Prozess erfolgte unter ständiger Kühlung in Transferpuffer für eine Stunde unter einer Spannung von 100V. Zur Vermeidung von unspezifischem Hintergrundleuchten der Membran bei der Entwicklung wurde die Membran für 1h in 5 % BSA in TBST geschwenkt (Blocking). Die Markierung des Zielproteins erfolgte mit einem Antikörper, der in einem zweiten Schritt durch einen sekundären fluoreszierenden Antikörper gebunden wurde. Die Inkubation mit dem Antikörper erfolgte unter ständigem Schwenken über Nacht bei 4°C. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung des Gels wurde die Membran zusätzlich in einem GAPDH-Antikörper inkubiert (Ladekontrolle). Die Inkubation in einem Sekundärantikörper erfolgte nach einem Waschvorgang für 1h bei Raumtemperatur. Zur Visualisierung des Proteinsignals wurde die Membran zunächst mit Hilfe des Chemilumineszenzkatalysators ECL fluoreszenzaktiviert und dann das Proteinsignal im

Fotolabor entwickelt. Der relative Proteingehalt wurde dann mittels der Intensitätsunterschiede im Bandenmuster ermittelt.

4.2.7 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

ELISA ist eine Methode zum immunologischen Nachweis löslicher Proteine. Hier wurde das Galectin-3 ELISA Kit® nach den Vorgaben des Herstellers verwendet. Der Test basiert auf dem „Sandwich-ELISA-Verfahren“, bei dem ein erster spezifischer Antikörper für das Zielprotein am Boden des Reagiergefäßes fixiert ist und ein zweiter spezifischer Antikörper später hinzugefügt wird, der dann detektiert wird.

Um die Überstände der Kokulturen zu erhalten, erfolgte nach Trypsinierung ein Zentrifugationsvorgang. Neben den eigentlichen Proben wurde die ELISA-Platte auch mit einer Verdünnungsreihe zur Ermittlung der Proteinkonzentration bestückt. Nach Durchführung des ELISA-Protokolls erfolgte die Messung bei einer Wellenlänge von 450nm. Anhand der Verdünnungsreihe und einer daraus abgeleiteten Standardgeraden wurden dann die Proteinkonzentrationen berechnet.

4.2.8 Ermittlung der mRNA-Expression mit der qPCR

Alle Schritte erfolgten in Anlehnung an die vom Hersteller vorgeschlagenen Protokolle. Die RNA-Isolierung aus *in vitro* Zellmaterial erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit® (Qiagen). Ausgehend von der RNA wurde mit Hilfe des QuantiTect Reverse Transcription Kit® (Qiagen) cDNA synthetisiert. Im nächsten Schritt, der eigentlichen PCR, wurde ein Thermocycler (ABI 7900 HT®) eingesetzt, der mittels einer Fluoreszenzsonde den Fluorophor SYBR Green® detektierte. Zum Ansetzen der entsprechenden Proben wurde das QuantiNova SYBR Green PCR Kit® (Qiagen) verwendet. Der in diesem Kit enthaltene Fluorophor bindet an doppelsträngige DNA (dsDNA) und fluoresziert in gebundener Form nach Anregung mit Licht. Durch Messung der Intensität wird der Gehalt an PCR-Produkten relativ zur Referenzprobe ermittelt. Die auswertende Software RQ-Manager® (Applied Biosystems) erstellt dabei aus den gemessenen Intensitäten eine Amplifikationskurve. Zur Quantifizierung wurde ein Zykluszahlenwert c^T (cycle threshold) im Bereich des aufsteigenden Anteils festgelegt, der für alle Proben bei der gleichen

Zahl an PCR-Zyklen liegt. Die Fluoreszenzintensitäten bei diesem Zykluszahlenwert bilden die Grundlage für die Berechnung der RNA Expression in den verschiedenen Proben.

Es wurde ein spezifischer Galectin-3 Primer (Hs_LGALS3_1_SG) eingesetzt. Zur Kontrolle wurde neben dem Zielgen auch GAPDH (Primer: Hs_GAPDH_1_SG) als Referenzgen (housekeeping gene) in die Auswertung einbezogen. Daneben wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, die nur destilliertes Wasser (im Folgenden: NTC: no template control) enthielt.

4.2.9 Knockdown durch Transfektion von Hairpin-Expressionsvektoren

Ziel des hier beschriebenen Verfahrens war die stabile Unterdrückung der Expression des Zielgens (Knockdown). Hierfür wurde eine gegen Mer gerichtete shRNA (TRCN0000000865) in den pSicoR-Ef1a-mCh Vektor (Addgene, Katalognummer: 31847) kloniert. Als Kontrolle wurde ein pSicoR-Ef1a-mCh Vektor gegen grün fluoreszierendes Protein (Abkürzung GFP; engl. green fluorescent protein) verwendet (Addgene, Katalognummer: 31849). Die Klonierung erfolgte in Anlehnung an das Protokoll des Plasmidvertreibers Addgene.

Zunächst wurden die Oligonukleotide (Sense und Antisense Strang) hybridisiert. Die Ansätze aus 1µl 100µM Sense-Oligonukleotid, 1µl 100µM Antisense-Oligonukleotid und 18µl TE-Puffer wurden nach folgendem Schema erhitzt:

90°C	5min
70°C	10min
-0.5°C	20sec
bis 37°C	
72°C	5min
20°C	1h
4°C	45min

Im nächsten Schritt erfolgte ein Restriktionsverdau mit den Restriktionsenzymen XhoI und HpaI. Hierfür wurde ein Ansatz aus 2µg Plasmid-DNA, 2µl CutSmart® Puffer, 1µl HpaI, 1µl XhoI, 1µl FCS und ddH₂O bis zu einem finalem Volumen von 50µl für 2h bei 37°C inkubiert.

Zur Klonierung in den pSicoR-Ef1a-mCh Vektor wurde ein Ligationsansatz aus 100ng linearisiertem pSicoR-Ef1a-mCh Vektor, 1µl 10× Ligase Puffer, 1µl T4 Ligase und 1µl hybridisierten Oligonukleotiden pipettiert, der durch ddH₂O bis zu einem totalen Volumen von 10µl ergänzt und über Nacht bei 37°C inkubiert wurde. Die Transformierung der Plasmide erfolgte in E. coli (One Shot TOP10 Chemically Competent E. coli®). Hierfür wurden 5µl des

Ligationsansatzes mit 50µl Bakteriensuspension für 30min auf Eis, dann für 90sec bei 42°C und schließlich für weitere 2min auf Eis inkubiert. Eine Kontrolle ohne Insert wurde parallel mitgeführt. Nach Zugabe von 250µl LB-Medium erfolgte für 45min unter ständigem Schwenken ein weiterer Inkubationsschritt bei 37°C. Zur Selektion wurden 200µl dieses Ansatzes auf einer mit Ampicillin beschichteten Agarplatte ausgestrichen und für 16h bei Raumtemperatur inkubiert. Einige Bakterienkolonien wurden anschließend von der Agarplatte entnommen und in Ampicillin-haltigem LB-Medium für weitere 12h bei 37°C unter ständigem Schwenken inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde nach Herstellerprotokoll mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit® isoliert und die DNA-Konzentration photometrisch ermittelt.

Nach Auftrennung der DNA in einem 1 % Agarosegel erfolgte eine Aufreinigung mit dem QIAquick Gel Extraction Kit® nach dem Herstellerprotokoll. Die aufgereinigte DNA wurde in 38µl ddH₂O gelöst und mit 10µl NEBuffer-3® sowie 1µl alkalischer Phosphatase für 15min bei 37°C geschwenkt. Nach erneuter Zugabe von 1µl alkalischer Phosphatase und erneutem Schwenken für 15min erfolgte eine Inkubation für 45min bei 4°C. Anschließend erfolgte ein weiterer Ligations- und Transformationsschritt (siehe oben) um größere DNA-Mengen zu erhalten.

Zur Virusproduktion wurden 293T Zellen verwendet. Dafür wurden 293T mit einer Konfluenz von 50 – 70 % in 10ml DMEM vorbereitet und mit einem Ansatz aus 24µl Turbofect® Transfektionsreagens, 2,5µg Plasmid-DNA, 2,5µg Rev-Plasmid, 5µg Gag/Pol-Plasmid, 1,25µg VSV-G-Envelope-Plasmid und 1ml DMEM (ohne FCS) versetzt. Nach leichtem Schwenken erfolgte bei 37°C und 5 % CO₂ eine Inkubation für 72h. In einem parallelen Ansatz wurde als Kontrolle das Plasmid gegen GFP mitgeführt. Im nächsten Schritt wurde das Plasmid aus dem Medium isoliert. Hierfür wurde der Überstand aus der Zellkultur zunächst mittels eines 0,45µm Filters und dann mehrmals mit einem Amicon® Zentrifugenfilter ultrafiltriert bis 200 - 250µl Virusfiltrat zur Verfügung standen.

Anschließend erfolgte die Transduktion der Zielzelllinie 697. Hierfür wurden 697 Zellen in einer Konzentration von $0,5 \times 10^6/3\text{ml}$ ausgesät und mit 8µg/µl Polybren, sowie 30µl Viruskonzentrat versetzt und für 72 – 96h inkubiert. Der Transfektionserfolg wurde mittels FACS und qPCR dokumentiert.

4.3 Statistische Auswertung

In der vorliegenden Arbeit hat sich insbesondere die Frage nach signifikanten Unterschieden zwischen zwei experimentell dargestellten Bedingungen gestellt. Dementsprechend wurde für die statistische Auswertung auf Zwei-Stichproben-T-Tests zurückgegriffen. Hierbei wurden jeweils die Mittelwerte beider Gruppen verglichen. Gemäß der allgemein gebräuchlichen Definition war ein Unterschied signifikant bei einem p-Wert $\leq 0,05$. In den im Ergebnisteil aufgeführten Graphiken bezeichnet „n.s.“ keinen signifikanten Unterschied. Während „*“, „**“, „***“ signifikante Unterschiede mit p-Werten von $\leq 0,05$, $\leq 0,01$ und $\leq 0,0001$ kennzeichnen.

5 Ergebnisse

5.1 ZNS Kokulturmodelle

In den im Folgenden dargestellten Versuchen sollte die ALL-ZNS-Interaktion *in vitro* modelliert werden. Dabei sollte eine mögliche Modulation der Mer Expression im ZNS-Kokulturmodell gemessen werden, um die Rolle der Mer-Tyrosinkinase (Mer-TK) im Rahmen der ALL-ZNS-Interaktion zu untersuchen. Die folgenden Versuche sollten die Hypothese untersuchen, ob Mer-exprimierende Leukämiezellen in Gegenwart von ZNS Zellen einen Überlebensvorteil besitzen. Damit sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen der Mer Expression in Leukämiezellen und einem ZNS Befall hergestellt werden.

5.1.1 Die Mer Protein Level sind in 697 Zellen hoch, in REH Zellen intermediär und in HL-60 Zellen niedrig

Der in diesem Kapitel dargestellte Versuch sollte die Mer Expression verschiedener B-Vorläufer-ALL Zelllinien untersuchen. Zu diesem Zweck wurde ein Western Blot durchgeführt, in dem neben den B-Vorläufer-ALL Zelllinien 697, REH, UOCB6, SUP-B15 und RS4;11 auch die AML Zelllinie HL-60 untersucht wurde. Als Ladekontrolle wurde das Protein GAPDH verwendet. Die B-Vorläufer-ALL Zelllinien weisen unterschiedliche Chromosomenaberrationen auf. Die 697 Zelllinie ist hierbei Trägerin der Translokation t(1;19) [64]. REH und UOCB6 tragen die Translokation t(12;21) [62, 65]. Die Sup-B15 Zelllinie trägt die Philadelphia Translokation t(9;22) [66]. RS4;11 trägt die Translokation t(4;11) [67].

Der Western Blot der Mer Expression ergab deutliche Unterschiede der Expressionslevel. Die t(1;19)⁺ 697 Zellen zeigten im Vergleich der B-ALL-Zelllinien die höchste Expression, REH und UOCB6 eine mittlere Expression, SUP-B15 und RS4;11 ein geringes Expressionsniveau, während in der AML Zelllinie HL-60 im Vergleich keine relevante Expression nachgewiesen werden konnte (Abbildung 5-1).

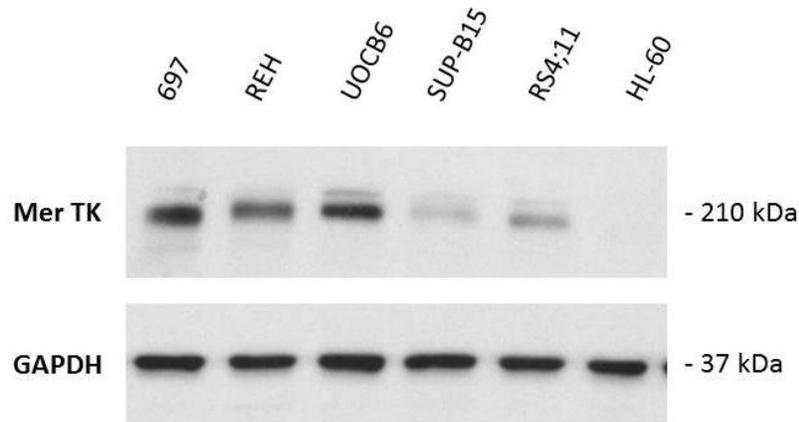


Abbildung 5-1: Western Blot der Mer-TK Expression verschiedener B-Vorläufer-ALL Zelllinien und HL-60; GAPDH bezeichnet die verwendete Ladekontrolle

5.1.2 Leukämiezellen mit hoher Mer Expression geraten im U343 ZNS Modell in einen Wachstumsarrest und zeigen sich resistent gegen Methotrexat

Der postulierte Zusammenhang zwischen Mer Expression und ZNS Beteiligung in der betrachteten Entität sollte mit einem *in vitro* Modell untersucht werden. Als Modell des ZNS dienten U343 Zellen, die aus Tumorzellen eines gemischten Astrozytoms/Oligodendroglioms etabliert wurden [60]. Die Hypothese dieser Versuchsreihe bestand darin, dass die ZNS Zellen das Wachstum Mer-exprimierender Leukämiezellen hemmen und über einen Wachstumsarrest das Überleben in der ZNS-Nische fördern. Die Kokultur von Leukämiezellen und U343 Zellen erfolgte für 48h bzw. 96h. Anschließend wurde lichtmikroskopisch mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer die Zahl der lebenden Zellen und der Anteil der toten Zellen bestimmt. Die Zellviabilität wurde mittels einer Trypanblau Färbung bestimmt.

Es zeigte sich bei allen untersuchten Zelllinien in Gegenwart der U343 eine Reduktion der Zahl der lebenden leukämischen Zellen. Dieser Effekt war in Zelllinien mit hoher Mer Expression wie der $t(1;19)^+$ Zelllinie 697 am ausgeprägtesten, während er in der Mer-negativen Zelllinie HL-60 nahezu aufgehoben war (Abbildung 5-2 A).

Der Rückgang der Anzahl lebender Zellen wurde nicht durch einen proportionalen Anstieg toter Zellen begleitet (Abbildung 5-2 B). Dieser Rückgang scheint angesichts des geringen Anteils toter Zellen durch einen Wachstumsarrest und nicht durch Apoptose oder Nekrose erklärt.

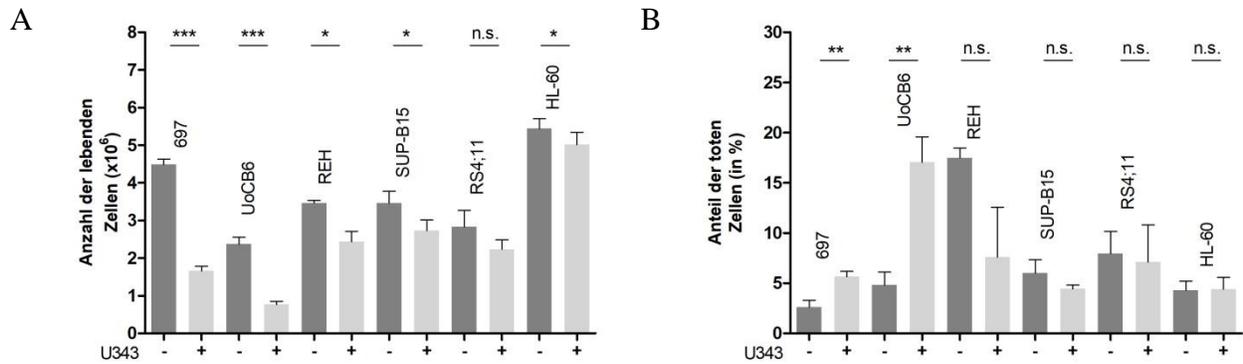
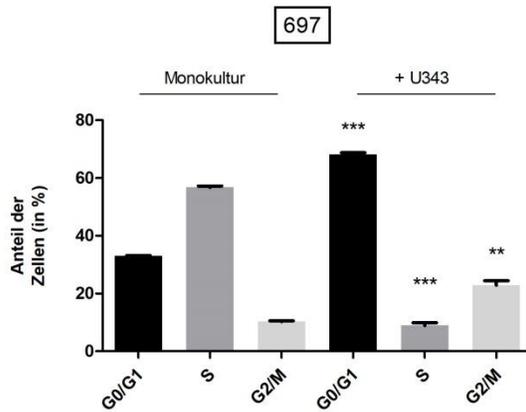


Abbildung 5-2: A: Trypanblau Zählung der lebenden leukämischen Zellen in Monokultur (-) bzw. in Kokultur mit U343 Zellen (+); Die Kokultur erfolgte für 48h; B: Trypanblau Zählung der toten leukämischen Zellen in Monokultur (-) bzw. in Kokultur mit U343 Zellen (+); Die Kokultur erfolgte für 48h bzw 96h in REH

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde eine Zellzyklusanalyse mittels BrdU von 697 Zellen mit und ohne Kokultur mit U343 durchgeführt. Die Daten zeigten in der Kokultur eine Verdopplung der Zellen im Zyklusarrest (G0/G1-Phase) und einen noch stärkeren Abfall, näherungsweise um den Faktor 3, der Zellen in der Synthesephase (Abbildung 5-3 A). Dieses Ergebnis zeigt, dass 697 Zellen in der Kokultur mit U343 in einen G0/G1-Arrest geraten. Das Experiment wurde auch in Kokultur mit Mer-negativen HL-60 Zellen durchgeführt. Hier zeigte die Kokultur nur geringen Einfluss auf den Zellzyklus. Zwar zeigte sich auch in diesem Versuch ein Anstieg der Zellen im Zyklusarrest (G0/G1-Phase) und ein Abfall der Zellen in der Synthesephase, im Vergleich zum Versuch in 697 waren diese Effekte aber reduziert (Abbildung 5-3 B),

Das Ergebnis bestätigt damit die Hypothese, dass die U343 Zellen in diesem Versuch einen Wachstumsarrest induzieren. Dieser Effekt fand sich deutlich in den Mer-positiven 697 Zellen, weniger deutlich jedoch in den Mer-negativen HL-60 Zellen.

A



B

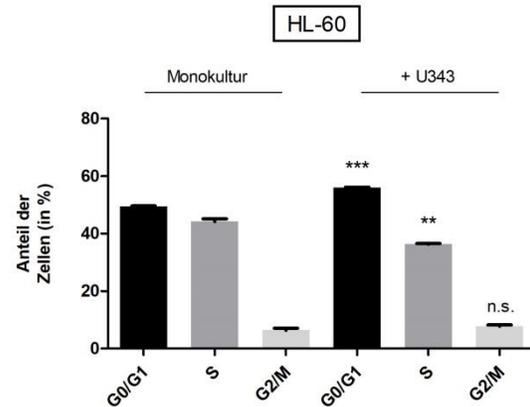


Abbildung 5-3: BrdU Analyse eines Kokultur Modells mit 697 Zellen (A) bzw. HL-60 Zellen (B) und U343 Zellen; G0, G1, G2, S, M bezeichnen die Zellzyklusphasen; diese Analyse wurde von Sarah Krause, Max-Eder-Nachwuchsgruppe Kiel, erstellt

In der folgenden Versuchsreihe sollten, durch das gleiche *in vitro* Modell, die Auswirkungen des in der Kokultur beobachteten Wachstumsarrests auf eine chemotherapeutische Behandlung mit Methotrexat (MTX) untersucht werden. MTX ist als ZNS-gerichtete Therapie fester Bestandteil aktueller Therapieprotokolle der ALL (siehe Einleitung).

Da MTX vor allem auf teilungsaktive Zellpopulationen wirkt, bestand die Versuchshypothese darin, dass durch die Anwesenheit von U343 und den hierdurch induzierten Wachstumsarrest die Wirksamkeit der Therapie reduziert wird. Die Wirksamkeit der MTX Therapie wurde durch den Anteil toter Zellen in der Vitalitätsprüfung mittels Trypanblau festgestellt.

Während die Viabilität von U343 Zellen alleine von MTX in der gewählten Konzentration unbeeinflusst blieb (Abbildung 5-4 A), zeigten sich 697 Zellen in der gewählten Konzentration MTX-sensitiv. Im Kokulturmodell zeigte sich in Gegenwart von U343 Zellen eine signifikante Reduktion des Anteils toter 697 Zellen unter Therapie mit MTX. Dieser Effekt war in HL-60-Zellen nicht zu beobachten (Abbildung 5-4 B). Das Ergebnis bestätigt damit die Hypothese, dass die U343 Zellen in diesem Versuch chemoprotektiv wirken, wobei sich dieser Effekt lediglich in den Mer-positiven 697 Zellen, nicht jedoch in den Mer-negativen HL-60 Zellen fand.

Zusammenfassend zeigen die hier dargestellten Daten, dass eine hohe Expression von Mer mit einem Wachstumsarrest von ALL Zellen im Kokulturmodell mit U343 Zellen einhergeht.

Darüber hinaus zeigte sich in 697 Zellen, einer ALL-Zelllinie mit hoher Mer Expression, eine U343-induzierte Chemoresistenz gegenüber der Behandlung mit MTX.

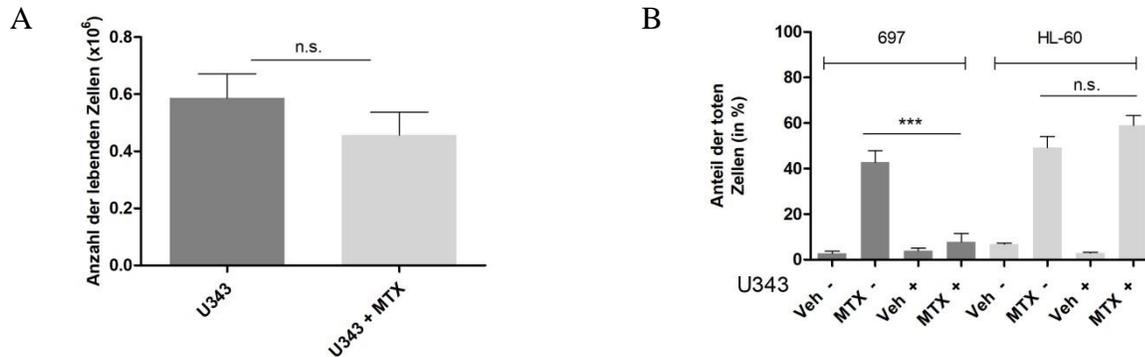


Abbildung 5-4: A: Trypanblau Zählung der lebenden U343 Zellen unter Behandlung mit 100nM MTX mit einer Inkubationszeit von 48h; MTX: Methotrexat; B: Trypanblau Zählung der toten leukämischen Zellen unter Behandlung mit 100nM MTX mit einer Inkubationszeit von 48h in Monokultur (-) und Kokultur mit U343 Zellen (+); Veh (Vehikel): Negativkontrolle mit Kochsalzlösung als Lösungsmittel des Wirkstoffs

5.1.3 Die Korrelation von leukämischer Viabilität und Mer Expression bestätigt sich im NRA-ZNS Modell

In den unter 5.1.2 beschriebenen Versuchen wurde ein Kokulturmodell mit U343 Zellen etabliert. U343 Zellen sind von einem gemischten Astrozytom/Oligodendrogliom abgeleitet [60]. Somit handelt es sich um eine maligne Zelllinie. Es sollte nun überprüft werden, ob die beobachteten Effekte auch bei Verwendung nicht maligner Gliazellen als ZNS Modell reproduziert werden können. Hierfür wurden neonatale Ratten-Astrozyten (NRA) von Dr. Ralph Lucius CAU, Kiel zur Verfügung gestellt [59]. Astrozyten sind die stoffwechselaktivsten Zellen des ZNS und machen zahlenmäßig den größten Anteil der Zelltypen im ZNS aus [68]. Damit soll eine Annäherung an die Bedingungen im gesunden ZNS-Milieu geschaffen werden. Die Durchführung der Versuche erfolgte, soweit möglich, analog zu den in U343 durchgeführten Versuchen.

Da die Zellen aus entsprechend aufbereiteten Gehirnen neugeborener Ratten hergestellt wurden, befand sich in der Kultur ein Anteil von Zellen, die nicht der Astrozytenpopulation zuzuordnen sind. Aufgrund der zahlenmäßigen Anteile und des Herstellungsvorgangs, verblieben neben

Astrozyten auch Mikroglia in der gewonnenen Zellkultur. Um den Anteil der Mikroglia in der Kultur zu quantifizieren, wurde eine FACS-Analyse mit einem CD11b/c-Antikörper durchgeführt, dessen Zielstruktur auf der Zelloberfläche von Mikroglia exprimiert wird [69]. Die Analyse ergab einen Prozentanteil von 8.88 % (Siehe Abbildung 5-5). Das NRA-Modell ist also ein gemischtes ZNS-Modell mit einem hohen Anteil an Astrozyten.

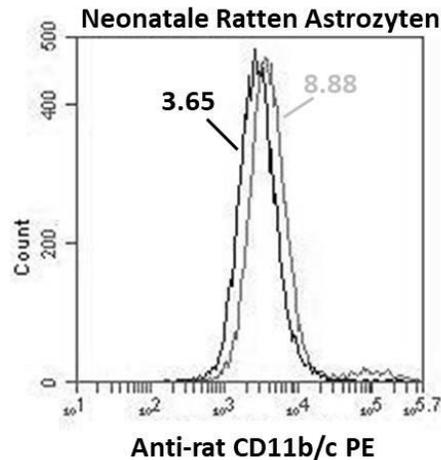


Abbildung 5-5: FACS-Analyse des Anteils CD11b/c-positiver Mikroglia (graue Kurve) und der IgG2a Isotyp positiven Zellen (schwarze Kurve)

Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit der NRA, wurde das Experiment nur in 697, REH und HL-60 Zellen wiederholt.

Wie bei der Kokultivierung mit U343 Zellen, bewirkte auch die NRA-Kokultur einen signifikanten Rückgang der Anzahl lebender Leukämiezellen, wobei sich dieser Effekt lediglich in Zellen mit hoher Mer-Expression zeigte (Siehe Abbildung 5-6 A). Der Rückgang der lebenden Zellen konnte nicht durch einen proportionalen Anstieg toter Zellen erklärt werden (Siehe Abbildung 5-6 B) was auf einen Wachstumsarrest der Leukämiezellen in diesem Modell hindeutet. Die BrdU-Analyse zeigte mit einem Anstieg der G0/G1-Phase-Zellen und einem Abfall der S-Phase-Zellen einen Zyklusarrest der 697 Zellen (Abbildung 5-6 C).

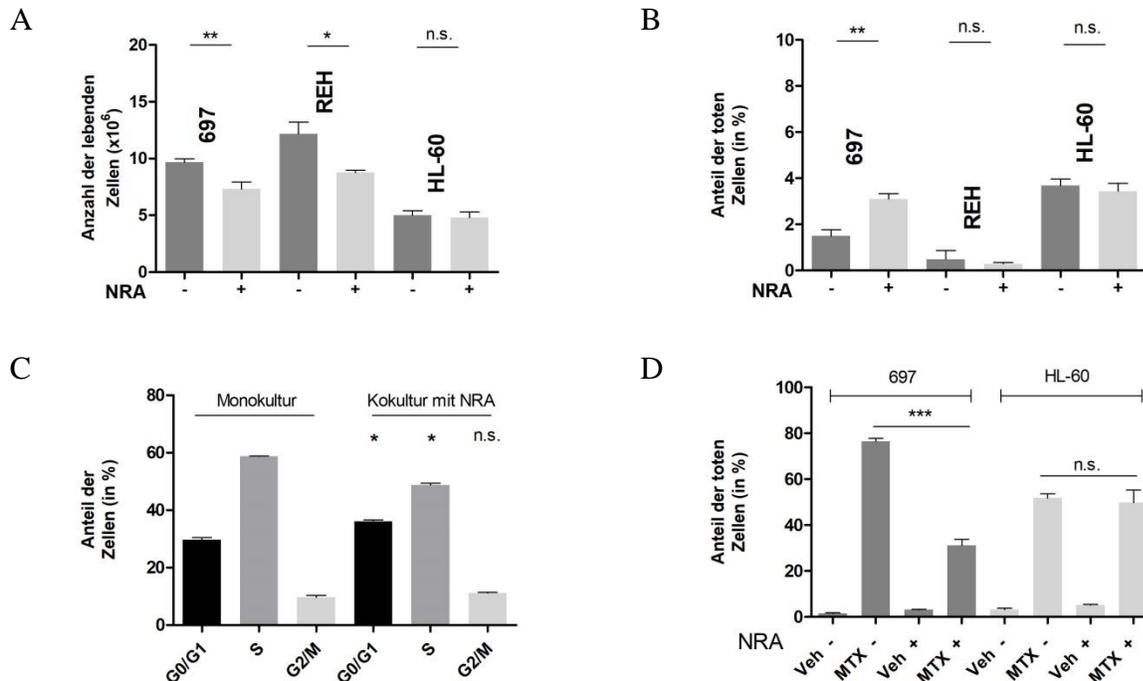


Abbildung 5-6: A: Trypanblau Zählung der lebenden leukämischen Zellen in Monokultur (-) bzw. in Kokultur mit NRA Zellen (+); Die Kokultur erfolgte für 48h in 697 und HL-60 bzw. 96h in REH; B: Trypanblau Zählung der toten leukämischen Zellen in Monokultur (-) bzw. in Kokultur mit NRA Zellen (+); Die Kokultur erfolgte für 48h in 697 und HL-60 bzw. 96h in REH; C: BrdU Analyse eines Kokultur Modells mit 697 Zellen und NRA Zellen. G0, G1, G2, S, M bezeichnen die Zellzyklusphasen; D: Trypanblau Zählung der toten leukämischen Zellen unter Behandlung mit 100nM MTX mit einer Inkubationszeit von 48h in Monokultur (-) und Kokultur mit NRA (+)

Unter der Therapie mit MTX zeigte sich im NRA-Modell erneut eine Abnahme der toten Leukämiezellen in Kokultur mit NRA Zellen. Dieser Effekt war wiederum nur in 697 Zellen erkennbar, nicht jedoch in HL-60 Zellen (Abbildung 5-6 D).

Diese Daten zeigen, dass die Auswirkungen von U343 Zellen auf Leukämiezellen im NRA-Modell ähnlich ausfallen. Insbesondere ging erneut eine hohe Expression von Mer mit einem Wachstumsarrest und einer Chemoresistenz von ALL Zellen im Kokulturmodell einher. Diese Ergebnisse zeigen, dass der Wachstumsarrest und die Chemoresistenz von ALL Zellen in einem Kokulturmodell mit einer nicht-malignen Zelllinie reproduziert werden können.

5.1.4 Ein Mer Knockdown in 697 Zellen antagonisiert den Wachstumsarrest und erhöht die Chemosensitivität im Kokulturmodell

Um den Nachweis zu erbringen, dass Wachstumsarrest und Chemoresistenz im Kokulturmodell auf die hohe Expression der Mer-TK in 697 Zellen zurückzuführen sind, wurde die Mer-TK in diesen Zellen mittels lentiviralen shRNA Vektorkonstrukten herunterreguliert. Abbildung 5-9 zeigt eine verminderte Mer-Expression mittels qPCR (Abbildung 5-7 A) und FACS (Abbildung 5-7 B) und bestätigt damit die Effektivität des Knockdowns.

Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die chemoprotektiven und antiproliferativen Effekte des ZNS-Milieus auf die ALL Zellen durch den Knockdown der Mer-TK in 697 Zellen reduziert oder aufgehoben werden können.

In einem ersten Versuch wurden 697 Zellen mit und ohne Mer Knockdown für 48h mit U343 kokultiviert. Anschließend wurden die Leukämiezellen aus der Kokultur entnommen und allein in einer Konzentration von $1 \times 10^6/2\text{ml}$ in frischem Zellmedium neu ausgesät. Die Zahl der Leukämiezellen wurde dann nach 48h und 96h bestimmt. Im Sinne einer Negativ-Kontrolle wurde der Versuch parallel mit 697 Zellen durchgeführt, die mit einem unspezifischen Vektor (Abkürzung ntv; engl. non-targeting vector) transfiziert wurden.

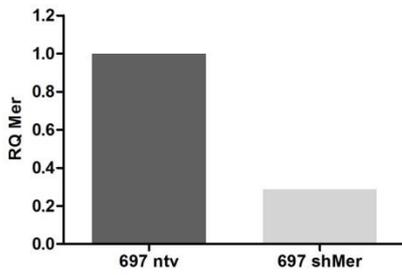
697 Zellen mit Mer Knockdown zeigten nach 48h und 96h eine höhere Proliferation als 697 Zellen ohne Knockdown (Abbildung 5-7 C). Damit zeigte sich, dass 697 Zellen mit Mer Knockdown das Wachstum zu einem früheren Zeitpunkt wieder aufnehmen als 697 Zellen, die mit dem unspezifischen Vektor transfiziert wurden.

In einem zweiten Experiment sollten die Auswirkungen des Mer Knockdowns auf die MTX Sensitivität untersucht werden. Es sollte nachgewiesen werden, dass der Mer Knockdown die chemoprotektiven Effekte des ZNS Milieus reduziert oder aufhebt. Hierzu wurde im U343 Kokulturmodell mit 697 Zellen, mit und ohne Herunterregulation von Mer, eine MTX-Behandlung in einer Konzentration von 100nM vorgenommen. Während U343 Zellen in 697 ohne Mer Knockdown chemoprotektive Effekte induzierten, zeigte sich im gleichen Modell mit 697 Zellen mit Mer Knockdown dieser protektive Effekt gegenüber MTX nicht mehr (Abbildung 5-7 D).

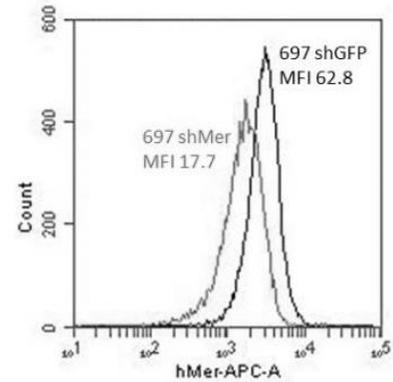
Diese Daten zeigen, dass Wachstumsarrest und Chemoresistenz gegenüber MTX durch den Knockdown von Mer in 697 Zellen verringert werden können. Somit zeigte sich, dass sowohl

Wachstumsarrest als auch Chemoresistenz in diesem Modell durch die Mer-TK vermittelt werden.

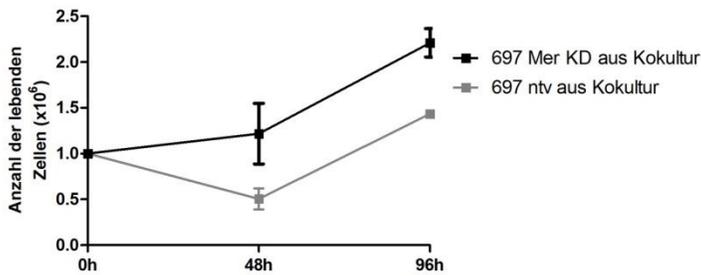
A



B



C



D

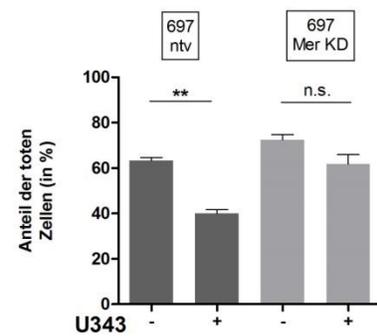


Abbildung 5-7: A: qPCR-Nachweis der Effizienz des Mer-Knockdowns in 697 Zellen; 697 ntv bezeichnet 697 Zellen, die mit einem unspezifischen Vektor (Abkürzung ntv; engl. non-targeting vector) transfiziert wurden; 697 Mer KD bezeichnet 697 Zellen, bei denen ein spezifischer Mer-Knockdown durchgeführt wurde; RQ Mer bezeichnet den relativen Quantifikationswert der Mer-Expression und somit die relative Expression im Vergleich zum Kalibrator; Der Versuch wurde von Dr. Aameera Alsadeq und Sarah Krause, Max-Eder-Nachwuchsgruppe Kiel durchgeführt; B: FACS-Nachweis der Effizienz des Mer-Knockdowns in 697 Zellen; MFI (Mean fluorescence intensity) bezeichnet die Menge an gebundenem Fluoreszenzfarbstoff pro Zelle; Der Versuch wurde von Dr. Aameera Alsadeq und Sarah Krause, Max-Eder-Nachwuchsgruppe Kiel durchgeführt; C: Trypanblau Zählung der lebenden 697 Zellen nach Kokultur mit U343; Die Zellen wurden für 48h mit U343 kultiviert. Anschließend wurden die Leukämiezellen aus der Kokultur entnommen und allein in einer Konzentration von jeweils $1 \times 10^6/2\text{ml}$ in frischem Zellmedium ausgesät; Die Auswertung erfolgte nach 48h bzw. 96h; D: Trypanblau Zählung der toten leukämischen Zellen in Monokultur (-) bzw. in Kokultur mit U343 Zellen (+) nach Behandlung mit 100nM MTX; Die Kokultur erfolgte für 48h

5.1.5 Eine Mer-Inhibition mit UNC569 erhöht die MTX Sensitivität von 697 im U343 ZNS Modell

Die folgenden Experimente sollten die Frage beantworten, ob der kleinmolekulare Mer-Inhibitor UNC569 in der Lage ist, analog zum shRNA-vermittelten Knockdown von Mer, die durch die Mer-TK vermittelte Chemoresistenz gegenüber MTX zu reduzieren. Der Versuch wurde mit dem U343-Modell, 697 Zellen und einer Behandlung mit Methotrexat +/- UNC569 konzipiert.

In einem ersten Schritt wurde zunächst eine Titrierung von UNC569 durchgeführt, wobei die Parameter Konzentration und Inkubationszeit variiert wurden. Dabei sollte eine Dosis ermittelt werden, die als Monotherapie noch keinen Einfluss auf Viabilität und Wachstumsverhalten der Leukämiezellen zeigte. Während die U343 Zellen nicht durch den Inhibitor in ihrem Wachstum beeinflusst wurden, kam es in 697 unter Behandlung ab einer Konzentration von 1200nM zu einer deutlichen Abnahme lebender Zellen. Mer negative HL-60 Zellen zeigten ein ähnliches Wachstumsverhalten, was die Vermutung nahe legt, dass hohe Inhibitorkonzentrationen unspezifische toxische Effekte verursachen (Abbildung 5-8 A-C). Um toxische Effekte durch hohe Konzentrationen zu vermeiden, wurde für die folgenden Versuche mit einer Konzentration von 800nM gearbeitet. Bei dieser Konzentration konnte in der Literatur in 697 und Jurkat Zellen eine signifikante Mer-Inhibition gezeigt werden [55].

Im nächsten Schritt wurde ein Kokulturversuch im U343 Modell mit 697 Zellen bzw. HL-60 Zellen unter Behandlung mit MTX +/- UNC569 durchgeführt. Es zeigte sich unter zusätzlicher Behandlung mit UNC569 eine Zunahme der toten leukämischen Zellen in der Trypanblau-Färbung. In HL-60 als Mer-negativer Kontrolle zeigte sich dagegen eine leichte Abnahme toter Zellen. Die Kontrolle ohne Inhibitor und ohne MTX zeigte einen Anteil toter Zellen im einstelligen Prozentbereich (Abbildung 5-8 D).

Diese Daten zeigen, dass die Chemoresistenz von 697 Zellen gegenüber MTX durch Inhibition von Mer mit UNC569 verringert werden kann. Auch dieser Versuch legt nahe, dass die Chemoresistenz in diesem Modell durch die Mer-TK vermittelt wurde.

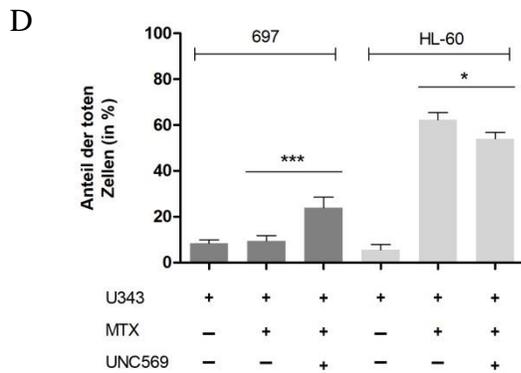
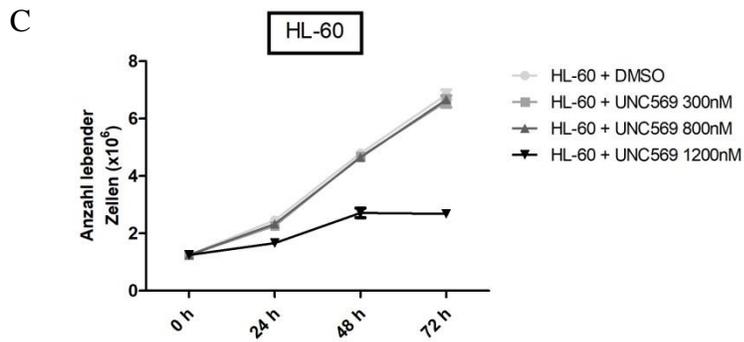
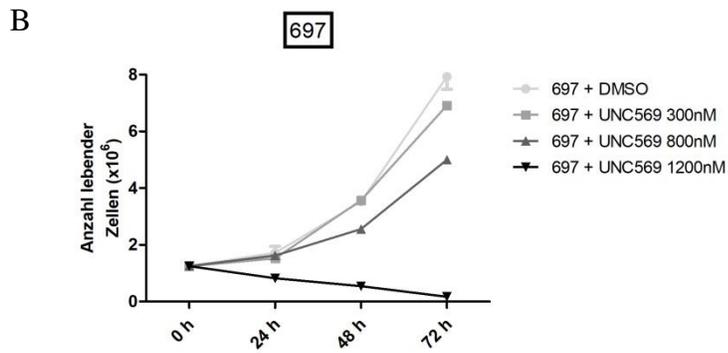
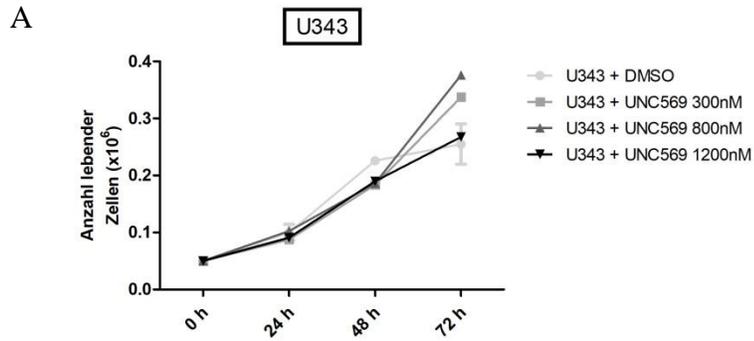


Abbildung 5-8: A-C: Trypanblau Zählung der lebenden Zellen unter Behandlung mit UNC569 in unterschiedlichen Konzentrationen und unterschiedlichen Inkubationszeiten; DMSO bezeichnet die Trägersubstanz ohne Wirkstoff; D:

Trypanblau Zählung der toten leukämischen Zellen unter Behandlung mit 100nM MTX bzw. 800nM UNC569 mit einer Inkubationszeit von 48h

5.2 Liganden-abhängige Aktivierung der Mer-TK in ALL Zellen im ZNS

Um die Mechanismen einer potenziellen Nischen-abhängigen Aktivierung der Mer-TK in ALL Zellen im ZNS zu erforschen, wurden als nächstes parakrin sezernierte Mer Liganden im U343 Kokulturmodell untersucht. In der Literatur konnten fünf extrazelluläre Signalmoleküle als Liganden der Mer-TK identifiziert werden. Protein S und Gas-6 sind dabei am längsten bekannt und entsprechend charakterisiert [46, 70]. Tubby und Tubby-Like Protein 1 (Tulp1) kamen später hinzu [71]. Zuletzt wurde der Mer Ligand Galectin-3 (Gal-3) entdeckt [48]. Zur Untersuchung parakrin sezernierter Mer-Liganden wurde erneut das U343-Kokulturmodell mit 697 Zellen herangezogen. Dabei war die Hypothese, dass einer der Mer Liganden über eine Aktivierung der Mer-TK in diesem Modell zu Wachstumsarrest und Chemoresistenz führt.

5.2.1 Der Wachstumsarrest im U343 Kokulturmodell mit 697 Zellen erfordert keinen direkten Zellkontakt

Grundsätzlich sind zwei Möglichkeiten der Mer Aktivierung im U343 Kokulturmodell denkbar. Zum einen könnte diese über lösliche Signalmoleküle oder aber über den direkten Zellkontakt vermittelt sein.

697, REH und HL-60 Zellen wurden zur Beantwortung dieser Frage räumlich von der U343 Zelllinie getrennt. Zum Einsatz kam ein Transwell®-System, das mittels einer Mikroporusmembran zwei Kompartimente trennt und dadurch den direkten Zell-Zell Kontakt unterband. Für den Versuch wurde eine Porengröße von 0,4µm gewählt, die eine Diffusion der meisten biologisch aktiven Moleküle erlaubt, eine Zellmigration in das andere Kompartiment aber verhindert. Alle anderen Versuchsbedingungen wurden, zur Vergleichbarkeit mit den vorangegangenen Kokulturversuchen, beibehalten.

Insgesamt konnten mit diesem Versuchsansatz die Ergebnisse aus Kapitel 5.1.2. bestätigt werden, da sich wiederum ein Wachstumsarrest der Leukämiezellen zeigte, der in den im direkten

Kontakt befindlichen und in den räumlich getrennten Zellen identisch ausgeprägt war (Abbildung 5-9 A und B). Diese Daten lassen die Schlussfolgerung zu, dass im U343 Kokulturmodell mit 697 Zellen der direkte Zellkontakt nicht erforderlich ist, um einen Wachstumsarrest hervorzurufen. Dieser Effekt wird daher am ehesten von einem löslichen Faktor vermittelt, der in das umgebende Medium sezerniert wird.

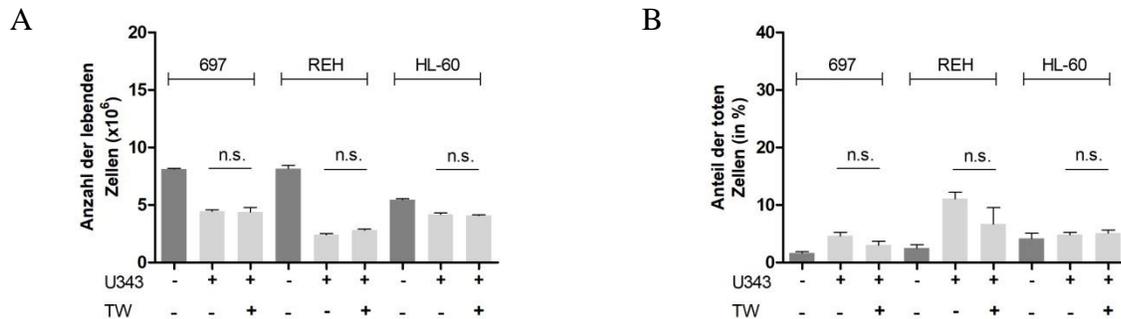


Abbildung 5-9: A: Trypanblau Zählung der lebenden leukämischen Zellen in Monokultur bzw. in Kokultur mit U343 Zellen, sowie mit und ohne Transwell®-System (TW); Die Kokultur erfolgte für 48h in 697 und HL-60 bzw. 96h in REH; B: Trypanblau Zählung der toten leukämischen Zellen in Monokultur bzw. in Kokultur mit U343 Zellen, sowie mit und ohne Transwell®-System (TW); Die Kokultur erfolgte für 48h in 697 und HL-60 bzw. 96h in REH

5.2.2 Der Mer Ligand Gas-6 wird im U343 Kokulturmodell nur gering sezerniert

Der bekannteste Vertreter unter den Mer-Liganden ist Gas-6 (Abkürzung; engl. Growth arrest-specific gene 6), dessen Rolle in der Gas-6/TAM Achse schon Ende der 90er Jahre beschrieben wurde [45]. Gas-6 wurde in der Literatur ein Einfluss auf die Teilungsaktivität von Tumorzellen zugeschrieben. Die Datenlage über die Art dieses Einflusses ist allerdings uneinheitlich. So zeigten Studien, die die Wirkung von Gas-6 in der Knochenmarks-nische untersuchten, einen wachstumshemmenden Effekt auf Prostata Karzinom Zellen, während auf AML-Zellen ein proliferativer Effekt beobachtet wurde [41, 72]. In $t(1;19)^+$ B-Vorläufer ALL Zellen führte die Exposition mit Gas-6 über die Induktion eines dormanten Phänotyps zu einem Homing und Überleben in der Knochenmarks-nische [73]. In diesem Kapitel soll die Rolle des Mer Liganden Gas-6 im U343 Kokulturmodell erläutert werden. Die Hypothese lautete aufgrund der Datenlage zur Gas-6/Mer Achse bei der $t(1;19)^+$ ALL und des beobachteten Wachstumsarrests der Leukämiezellen im U343 Kokulturmodell, dass Gas-6 hier ebenfalls verstärkt sezerniert wird.

Die Gas-6 Konzentrationen wurden nach 24h, 48h, 72h und 96h per ELISA in den Überständen der Zellkultur bestimmt. Als Positivkontrolle wurde der Versuch auch in MSC Zellen durchgeführt. MSC Zellen sind eine mesenchymale Zelllinie, die Bedingungen wie im Knochenmark modellieren sollen [58]. Dementsprechend wurde von einer hohen Gas-6 Sekretion der MSC Zellen ausgegangen. Mittels ELISA konnte eine hohe Gas-6 Sekretion durch MSC Zellen bestätigt werden, während U343 Zellen nur geringe Mengen sezernierten (Abbildung 5-10 A). Auch in Kokultur mit den Leukämiezelllinien 697, UOCB6 und HL-60 konnte keine verstärkte Sekretion nachgewiesen werden (Abbildung 5-10 B).

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass Gas-6 in diesem Modell nicht in nennenswerten Konzentrationen zu finden ist. Auch die Kokultur aus Gliazellen und Leukämiezellen führte nicht zu einer Induktion der Gas-6 Sekretion. Die Abwesenheit dieses wachstumsmodulierenden Faktors deutet darauf hin, dass in diesem Modell andere Faktoren für die Vermittlung der beobachteten Effekte relevant sind.

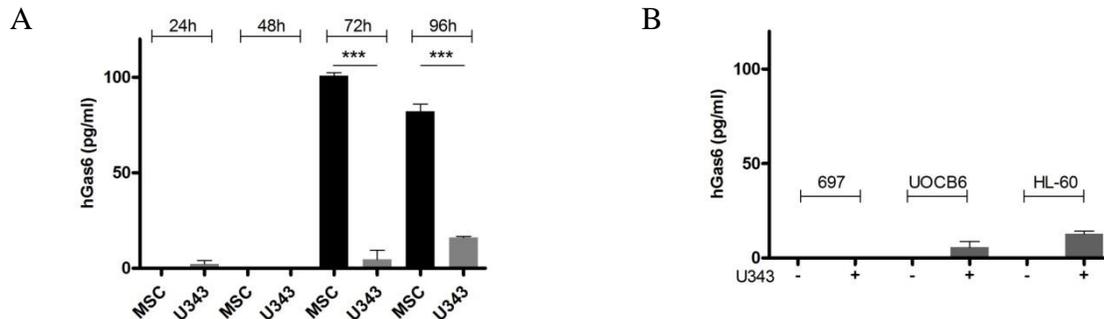


Abbildung 5-10: A: ELISA zur Bestimmung der von U343- und MSC Zellen ins Medium sezernierten Menge an Gas-6; Die Bestimmung erfolgte nach 24h, 48h, 72h und 96h; B: ELISA zur Bestimmung der von 697, UOCB- und HL-60 Zellen ins Medium sezernierten Menge an Gas-6; Die Bestimmung erfolgte nach 72h in Monokultur (-) bzw. in Kokultur mit U343 Zellen (+); Der Versuch entstand in Zusammenarbeit mit Jonas Waizenegger, AG Loges, 2. Med. Klinik, UKE Hamburg

5.2.3 Die Sekretion von Galectin-3 (Gal-3) wird im U343 Kokulturmodell hochreguliert

Im Weiteren sollte untersucht werden, welcher der bekannten Mer Liganden (siehe Kapitel 5.2) im U343 Kokulturmodell eine Mer Aktivierung vermitteln könnte. Zu diesem Zweck wurde

zunächst die mRNA Expression der in der Literatur bekannten Mer Liganden Gas-6, Protein S, Tubby, Tulp1 und Gal-3 in U343 Zellen untersucht. Es zeigte sich eine geringe mRNA Expression von Gas-6, Protein S, Tubby und Tulp1. Gal-3 war dagegen in U343 sechsfach höher exprimiert als in MSC Zellen, die als Kalibrator eingesetzt wurden (siehe Abbildung 5-11 A).

In einem zweiten Schritt sollte die Frage beantwortet werden, ob die Gal-3 Sekretion im U343 Kokulturmodell durch die Anwesenheit Mer positiver Leukämiezellen beeinflusst wird. Daneben sollte auch untersucht werden, ob ein Mer Knockdown in 697 Zellen die Gal-3 Sekretion beeinflusst. Hierzu wurde eine ELISA-Analyse der Gal-3-Sekretion im U343-Kokulturmodell mit 697 Mer Knockdown Zellen und 697 Zellen ohne Mer Knockdown durchgeführt. Es zeigte sich, dass 697 Zellen allein kein Gal-3 sezernieren. Auch ein Mer Knockdown in 697 Zellen führte nicht zu einer Gal-3 Induktion. In der Kokultur von 697 und U343 Zellen wurden höhere Gal-3 Konzentrationen als in der U343 Monokultur nachgewiesen. Die Gal-3 Sekretion in der Kokultur wurde durch einen Mer-Knockdown in 697 Zellen signifikant gesenkt (Abbildung 5-11 B). Diese Daten zeigen, dass die Gal-3 Sekretion im U343 Kokulturmodell hochreguliert wird. Die Höhe der Gal-3 Sekretion ist abhängig von der Mer Expression in 697 Zellen. Zusammenfassend ergeben sich somit Hinweise, dass der Mer Ligand Gal-3 als Mer Aktivator in diesem Modell fungiert.

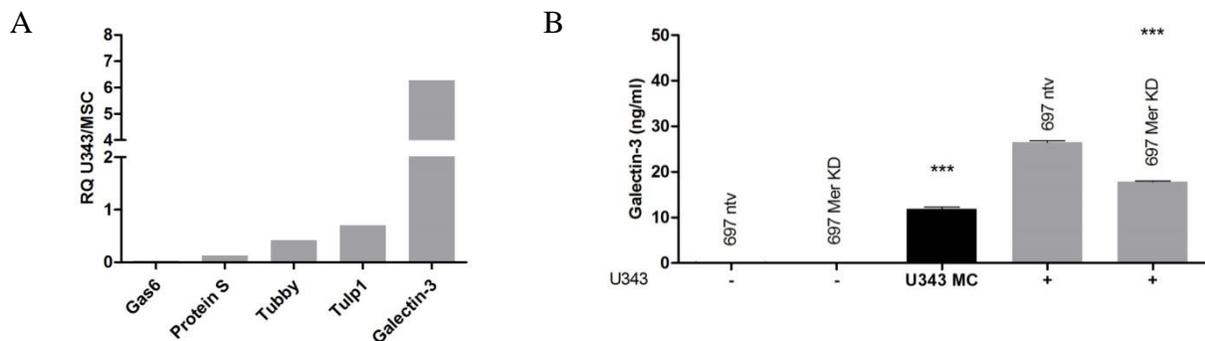


Abbildung 5-11: A: Bestimmung der Menge an mRNA in U343 der angegebenen Mer Liganden mittels qPCR; Als Kalibrator wurde die Expression in MSC Zellen verwendet; RQ U343/MSC bezeichnet den relativen Quantifikationswert der Expression und somit die relative Expression im Vergleich zum Kalibrator; Der Versuch wurde von Sarah Krause, Max-Eder-Nachwuchsgruppe Kiel durchgeführt; B: ELISA zur Bestimmung der ins Medium sezernierten Menge an Galectin-3 (Gal-3); Die Bestimmung erfolgte nach Monokultur (-) bzw. nach Kokultur mit U343 Zellen (+) jeweils für 72h; 697 ntv bezeichnet 697 Zellen, die mit einem unspezifischen non-

targeting Vektor behandelt wurden; 697 Mer KD bezeichnet 697 Zellen, bei denen ein spezifischer Mer-Knockdown durchgeführt wurde; U343 MC bezeichnet U343 Zellen in Monokultur

5.2.4 Die Gal-3 mRNA Expression korreliert nicht mit klinischen Parametern in Patienten mit t(1;19)⁺ B-Zell Vorläufer ALL

Auf der Grundlage der zuvor dargestellten Ergebnisse wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Gal-3 Expression in Patienten mit t(1;19)⁺ B-Zell Vorläufer ALL als diagnostischer Marker des ZNS Befalls in Frage kommt. Zur gleichen Fragestellung existieren bereits publizierte Daten der Arbeitsgruppe in denen die Mer mRNA Expression von Patienten mit t(1;19)⁺ B-Zell Vorläufer ALL untersucht wurde. In der untersuchten Kohorte von 64 Patienten die nach dem ALL-Berlin-Frankfurt-Münster (BFM) 2000 Protokoll behandelt wurden, zeigte sich eine Korrelation zwischen der Höhe der Mer Expression und dem Auftreten einer ZNS Leukämie [74]. In der gleichen Kohorte sollten dieses Mal die Gal-3 Niveaus mit klinischen Parametern wie der Prednisone Response, der MRD (Abkürzung; engl. minimal residual disease) Risikogruppe und dem ZNS Status korreliert werden. Patienten mit einer Gal-3 Expression über dem Median wurden als Gal-3^{hoch} (n=32) und solche mit einer Expression unterhalb des Medians als Gal-3^{gering} (n=32) klassifiziert. Jeweils ein Patient mit hoher Gal-3 Expression und ein Patient mit geringer Gal-3 Expression erlitt einen Rückfall und erlag den Folgen der Erkrankung. Im Rahmen der hier angewandten Methode zeigte sich in der untersuchten Kohorte keine signifikante Korrelation für Parameter, die mit der Prognose zusammenhängen (Prednisone response, MRD Risikogruppe, Patientenalter bei Erstdiagnose, Geschlecht). Auch der ZNS Status und Parameter, die mit dem ZNS Status in Verbindung stehen wie die Anwesenheit von Blasten im Liquor ergab in dieser Kohorte keine Korrelation mit der Gal-3 Expression (siehe Tabelle 5-1). Diese Daten zeigen, dass ein Screening der Gal-3 mRNA Expression in Leukämiezellen mit t(1;19)⁺ B-Zell Vorläufer ALL nicht als diagnostischer Marker der ZNS-Leukämie geeignet ist.

	Gal-3 ^{gering} , n=32	Gal-3 ^{hoch} , n=32	P
Geschlecht*			,3152
Männlich	17	12	
Weiblich	15	20	
Durchschnittl. Alter (95% KI) bei Diagnose**	8,1 (6,5-9,7)	8,4 (6,7-10,2)	,7491
Leukozytenzahl*			1,0000
<50.000/μl	23	22	
≥50.000/μl	9	10	
Prednison Response*†			,3020
Gut	29	25	
Schlecht	3	7	
Risiko Gruppe***‡			,9948
MRD SR	23	15	
MRD IR	4	10	
MRD HR	4	7	
Durchschnittl. Leukozytenzahl in diagnostischer LP***	8,1	3,7	,3985
Blasten im Liquor*			,2974
Nein	18	23	
Ja	14	9	
ZNS Status*** 			,7424
ZNS 1	18	21	
ZNS 2	10	8	
ZNS 3	4	3	
Rezidiv und Tod*‡			1,0000
Nein	31	31	
Ja	1	1	

Tabelle 5-1: Gal-3 qPCR von Patientin mit t(1;19) Translokation mit hoher oder geringer Gal-3 Expression und Korrelation mit klinischen Daten; KI: Konfidenzintervall; HR: High Risk; IR: Intermediate Risk; LP: Lumbalpunktion; SR: Standard Risk; *Exakter Test nach Fisher, zweiseitiger Test; **Ungepaarter t-Test mit Welsh-Korrektur; ***Chi-Quadrat-Test; ****Mann-Whitney-Test, einseitiger Test; †Gut: <1000/μl leukämische Blasten im Blut zum 8. Behandlungstag, Schlecht: >1000/μl; ‡Risiken gemäß MRD Risikogruppen: MRD-SR = Zeitpunkt 1+2 negativ, MRD-IR = Zeitpunkt 1 und/oder Zeitpunkt 2 <10³, MRD-HR = Zeitpunkt 2 ≥10³, Patienten mit schlechter Prednison response wurden zur MRD-HR gezählt; || Der ZNS-Status wurde definiert wie in [21]; †Beide Rezidive waren isolierte Knochenmarksrezidive

6 Diskussion

6.1 Zusammenfassung

Fragestellung: Die Mer-TK wurde in zahlreichen Studien mit Überlebenssignalwegen von soliden und hämatologischen Tumorerkrankungen in Verbindung gebracht. In B-Vorläufer ALL Zellen mit der t(1;19) Translokation fand sich eine Überexpression der Mer-TK. Darüber hinaus zeigte sich, dass die t(1;19)⁺ ALL trotz einer insgesamt vergleichsweise günstigen Prognose ein erhöhtes Risiko für ZNS-Rezidive aufweist. Mit der vorliegenden Arbeit sollte daher die Frage beantwortet werden, ob sich *in vitro* Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen einer ZNS-Beteiligung und der Expression der Mer-TK im Rahmen der t(1;19)⁺ ALL finden.

Material und Methoden: Es wurde ein Kokulturmodell etabliert, in dem die ZNS-Nische durch Glia Zellen (U343: Gemischtes Astrozytom/Oligodendrogliom und NRA: Neonatale Ratten-Astrozyten) imitiert und das Verhalten von B-Vorläufer ALL Zellen mit unterschiedlichen Mer-Expressionsniveaus in diesem Modell untersucht wurde. Zellwachstum und Zellüberleben wurden mittels Trypanblau Exklusion und BrdU Inkorporation untersucht. Darüber hinaus wurde in diesem Modell die Chemosensitivität gegenüber Methotrexat getestet, das in der ZNS-gerichteten Therapie eine wichtige Rolle spielt. Zusätzlich wurden in 697 Zellen die Effekte einer Mer-Inhibition mittels stabilem lentiviralem Gentransfer von shRNAs und durch den kleinmolekularen Inhibitor UNC569 gemessen. In einem zweiten Abschnitt wurde mittels ELISA untersucht, welche Mer-Liganden in diesem Modell von Bedeutung sind. Abschließend wurde mit Hilfe einer qPCR die Gal-3 Niveaus in einer Kohorte von 64 Patienten mit t(1;19)⁺ ALL mit klinischen Charakteristika korreliert.

Ergebnisse: Im U343 ZNS Modell zeigte sich, dass B-Vorläufer ALL Zellen mit einer hohen Mer Expression in Kokultur mit U343 Zellen in einen Wachstumsarrest geraten und eine Resistenz gegenüber der Behandlung mit Methotrexat entwickeln. Diese Effekte konnten in Kokultur mit einer nicht-malignen ZNS Zelllinie reproduziert werden. Ein Mer Knockdown in der Mer-positiven B-Vorläufer-ALL Zelllinie 697 konnte den Wachstumsarrest verringern und die Methotrexatresistenz komplett aufheben. Eine Mer-Inhibition durch den kleinmolekularen Inhibitor UNC569 reduzierte die U343-induzierte Chemoresistenz von 697 Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass der Mer-Ligand Gas-6 in diesem Modell nur in geringem Umfang sezerniert

wird und stattdessen der erst kürzlich entdeckte Mer-Ligand Galectin-3 hochreguliert wird. Die Höhe der Galectin-3 Sekretion zeigte sich abhängig von der Mer-Expression in 697 Zellen. Ein Galectin-3 Screening von Zellen einer Patientenkohorte mit t(1;19) Translokation zeigte allerdings im Gegensatz zur, in der analogen Kohorte gemessenen, Mer Expression keine signifikante Korrelation mit klinischen Parametern wie dem ZNS-Status, dem Therapieansprechen und anderen prognostischen Faktoren.

Schlussfolgerung: Die erhobenen *in vitro* Daten liefern erste Erkenntnisse über die Mer-TK als diagnostischen Marker und therapeutisches Target für einen ZNS Befall der t(1;19)⁺ B-Zell-Vorläufer ALL im Kindesalter. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der Mer-Ligand Galectin-3 hochreguliert wird und damit als Mer-Aktivator in diesem Modell in Frage kommt.

6.2 Die Mer-TK vermittelt das Überleben von t(1;19)⁺ ALL Zellen im In-vitro-ZNS-Modell

Es wurde ein ZNS Modell etabliert, in dem die ZNS-Nische durch Glia Zellen imitiert wurde. Es zeigte sich, dass t(1;19)⁺ B-Vorläufer-ALL Zellen mit hoher Mer-Expression in Gegenwart von Glia Zellen in einen Wachstumsarrest geraten und eine Resistenz gegenüber der Behandlung mit Methotrexat entwickeln. Ein Mer-Knockdown in 697 Zellen konnte den Wachstumsarrest reduzieren und die Chemoresistenz komplett aufheben.

Als Modell des ZNS dienten U343 Zellen, die aus Tumorzellen eines gemischten Astrozytoms/Oligodendroglioms etabliert wurden [60]. Es handelt sich damit um maligne Zellen, was die Repräsentativität dieses Modells in Frage stellt. Es wurden daher die Effekte einer Kokultur mit „gesunden“, aus neonatalen Ratten gewonnen, Astrozyten (NRA Zellen) [59] untersucht. Da sich die Beobachtungen der vorangegangenen Versuche bestätigten, kann davon ausgegangen werden, dass Wachstumsarrest und Chemoresistenz nicht in der Malignität der U343 begründet sind.

Während in der Literatur zahlreiche *in vitro* Modelle der ALL-Knochenmark Interaktion beschrieben wurden, ist über die Rolle der ZNS-Nische im Rahmen der ALL deutlich weniger bekannt. In den vergangenen Jahren wurden jedoch zunehmend Versuche unternommen, die ZNS-Nische mittels präklinischer Modelle zu charakterisieren. So fanden Akers et al. im

Kokultur Modell mit Zelllinien des Subarachnoidalraums, dass Astrozyten, Plexus choroideus Zellen und Meningealzellen ALL Zellen vor der Therapie ZNS-gerichteter Chemotherapeutika schützen [33]. Ähnliche experimentelle Ansätze wurden genutzt, um die Migration von Leukämiezellen über die Blut-Hirn-Schranke (BHS) oder die Blut-Liquor-Schranke (BLS) nachzuvollziehen. So wurde z.B. die B-Zell Migration über die BHS mit Hilfe von humanen Hirndothelzellen (Abkürzung HBEC; engl. brain-derived endothelial cells) und Endothelzellen des Hirn-Mikrogefäßsystems (Abkürzung HBMEnd; engl. brain-derived microvasculature endothelial cells) modelliert [75, 76]. Darüber hinaus wurden *in vitro* Modelle der BLS beschrieben, die auch zur Untersuchung der ZNS-Leukämie herangezogen werden könnten. Denkbar wäre etwa ein Modellsystem mit primären Plexus choroideus Zellen oder von immortalisierten Plexus Choroideus Zelllinien wie z.B. Z310 oder ECPC4 [77, 78]. In dieser Arbeit wurde ein Kokulturmodell mit Glia-Zellen untersucht um die Mer-TK als nischenspezifisches Überlebenssignal zu charakterisieren. Modelle der BHS oder der BLS könnten vielleicht die Frage beantworten, ob die Mer-TK darüber hinaus auch als Eintrittsmechanismus von Leukämiezellen in das ZNS in Frage kommt.

Da die Komplexität der Mikroumgebung des ZNS durch die beschriebenen *in vitro* Modelle nur näherungsweise abgebildet werden kann, sollten die vorgenommenen Untersuchungen durch ein *in vivo* Modell ergänzt werden. Zu diesem Zweck wurde in der Arbeitsgruppe ein NOD scid gamma (NSG) Xenograft Modell der ALL-ZNS Interaktion in der Maus etabliert und die Mer-Expression leukämischer Zellen mit dem Krankheitsverlauf und dem histopathologisch erhobenen ZNS-Befall korreliert [74].

In den *in vitro* Kokultur Experimenten zeigte sich ein Wachstumsarrest, der durch U343 Zellen induziert wurde. Dieser Wachstumsarrest war in $t(1;19)^+$ 697 Zellen, die eine hohe Mer-Expression aufwiesen, besonders deutlich. Ein Kokultur-induzierter Rückgang der lebenden Zellen war aber auch in $t(12;21)^+$ REH und UoCB6 Zellen zu beobachten, die geringere Mer-Expressionslevel aufwiesen. Mechanistisch könnte eine Hochregulation von Mer diesen wachstumshemmenden Effekt erklären. Publierte Daten der Arbeitsgruppe konnten eine U343-vermittelte Mer-Induktion in diesen Zelllinien nachweisen. In der Mer-negativen AML Zelllinie HL-60 zeigten sich dagegen, in Gegenwart von U343 Zellen, keine erhöhten Mer-Expressionslevel [74].

Schon zuvor wurde die Mer-TK im Kontext hämatologischer Neoplasien untersucht. So zeigten Guttridge et al., dass die Mer-TK in der murinen Leukämiezelllinie 32D anti-apoptotisch und anti-proliferativ wirkt und sich damit funktionell von bisher bekannten Rezeptortyrosinkinasen unterscheidet, die pro-proliferativ wirken [79]. Zwei weitere Arbeiten konnten eine ektope Mer-Expression auf T- und B-Zell-Vorläufer- ALL Zellen nachweisen. Dabei fand sich eine Mer-Expression auf allen untersuchten ALL Zellen mit der t(1;19) Translokation. Sie konnte aber auch auf Zellen nachgewiesen werden, die diese Chromosomenveränderung nicht aufwiesen [51, 52]. Diese Beobachtung deckt sich mit den Daten dieser Arbeit, die zeigen, dass Mer auch in Zellen mit der t(12;21), der t(9;22) und der t(4;11) Translokation nachgewiesen werden kann. Linger et al. zeigten darüber hinaus, dass ein shRNA-Mer Knockdown in 697 und REH Zellen Überlebenssignalwege hemmt und synergistisch pro-apoptotisch mit den Chemotherapeutika Methotrexat, Vincristin und L-Asparaginase wirkt und schlagen daher Mer als therapeutische Zielstruktur der B-Zell-Vorläufer ALL vor [52]. Weitere Arbeiten zeigen, dass die t(1;19) Translokation, für die eine erhöhte Mer Expression gezeigt wurde [52], das nischenspezifische Überleben von ALL Zellen fördert. So zeigte eine aktuelle Arbeit von Gaynes et al. in einem Plexus-Choroideus Kokulturmodell, dass PBX1, der Translokationspartner von TCF3 im Rahmen der t(1;19) Translokation, in ALL Zellen hochreguliert wird und eine Chemoresistenz gegenüber Cytarabin vermittelt [36]. Jeha et al. waren die ersten, die eine Assoziation zwischen dem Vorliegen einer t(1;19) Translokation und einem erhöhten Risiko für ZNS-Rezidive nachwiesen [9]. Neuere Daten einer taiwanesischen Kohorte unterstützten die Beobachtungen von Jeha et al. obgleich der Zusammenhang in der untersuchten Kohorte keine statistische Signifikanz erreichte [80]. Die angesprochenen Arbeiten zeigten einen direkten oder indirekten Zusammenhang zwischen der Mer-Expression und dem Überleben von ALL Zellen. Dies ist jedoch die erste Arbeit, die eine Verbindung zwischen der Mer-Expression und dem Überleben von B-Vorläufer-ALL Zellen in der ZNS-Nische aufzeigt.

Im nächsten Schritt soll diskutiert werden, welche Mechanismen hinter der Mer-Aktivierung in diesem Modell stehen könnten. In der Literatur existieren Studien, die das Wissen über zugrundeliegende Mechanismen um Aspekte erweitern, die auch in diesem Modell eine Rolle spielen könnten. So wurde beobachtet, dass die Liganden-abhängige Mer-Aktivierung durch die Anwesenheit von apoptotischen Zellen induziert wird. Dabei kommt es zu einer Phosphatidylserin-abhängigen Bindung von apoptotischen Zellen an die Mer-TK, bei der Mer-Liganden als „Brückenmoleküle“ fungieren [81]. Interessanterweise zeigen eigene publizierte

Daten der Arbeitsgruppe, dass in Kokulturen aus Leukämiezellen und der ZNS-Zelllinie U343 mehr apoptotische Zellen als in Kokulturen aus Leukämiezellen und der mesenchymalen Zelllinie MSC nachzuweisen sind [74]. Dies deutet darauf hin, dass die Mer-Aktivierung in diesem Modell zumindest teilweise durch die Anwesenheit von apoptotischen Zellen vermittelt wird. Eine weitere Studie untersuchte in leukämischen Zellen den Effekt einer prolongierten Exposition mit dem Mer-Liganden Gas-6. Dabei wurde unter kontinuierlicher Mer-Aktivierung ein Rückgang der Mer-Expression auf der Zelloberfläche und die Expression einer partiell glykosylierten Mer-Unterform beobachtet, die präferentiell im Nukleus lokalisiert war. Die Autoren vermuteten, dass der Mer-TK neben der Rolle als Zelloberflächenrezeptor, ein direkter oder indirekter Einfluss auf die Genexpression zukommen könnte [82]. Ein solcher Mer-Subtyp könnte auf Ebene der Genexpression den dormanten Phänotyp leukämischer Zellen im U343-ZNS Modell vermitteln.

Die *in vitro* Ergebnisse dieser Arbeit müssen auch mit weiteren publizierten Daten der Arbeitsgruppe diskutiert werden. So wurde in einem NSG Xenograft Modell in der Maus der ZNS-Befall *post mortem* histopathologisch mit der Höhe der Mer-Expression korreliert. Dabei zeigte sich, dass eine hohe Mer-Expression *in vivo* mit einem erhöhten Risiko für eine ZNS Infiltration assoziiert ist. Ein Mer-Knockdown konnte die ZNS-Infiltration im Mausmodell nahezu komplett verhindern. Schließlich wurde mittels qPCR die Mer-mRNA-Expression von $t(1;19)^+$ B-Vorläufer ALL Zellen einer Patientenkohorte mit klinischen Parametern korreliert. Dabei fand sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Höhe der Mer-Expression und einer leukämischen ZNS-Beteiligung bei Erstdiagnose [74].

In der Zusammenschau der Ergebnisse der Arbeitsgruppe und den eigenen Ergebnissen ergeben sich damit erste Erkenntnisse über die Mer-TK als ZNS Marker der $t(1;19)^+$ B-Zell-Vorläufer ALL. Mit Hilfe dieser spezifischen und leicht messbaren Zielstruktur könnte die Identifikation von Patientengruppen gelingen, die:

- 1) Aufgrund ihrer Prädisposition eine intensivere ZNS-gerichtete Therapie erhalten sollten
- 2) Aufgrund ihres geringen Risikos weniger ZNS-gerichtete Therapie benötigen

In weiterführenden Arbeiten könnte, zum Beispiel in einem prospektivem Studiendesign, die Mer Expression in größeren Kohorten gemessen und anschließend mit klinischen Parametern korreliert werden. In die untersuchten Kohorten sollten auch Patienten mit anderen und vielleicht

auch häufigeren ALL Subtypen eingeschlossen werden, da bisher unklar ist, ob sich der dargestellte Mechanismus auf andere ALL-Subtypen übertragen lässt.

6.3 Eine Mer-Inhibition mit UNC569 erhöht die MTX Sensitivität von 697 Zellen im U343-ZNS Modell

Im U343-ZNS Modell zeigte sich, dass Wachstumsarrest und Chemoresistenz von 697 Zellen gegenüber MTX durch Inhibition von Mer mit dem kleinmolekularen Inhibitor UNC569 reduziert werden können.

Dies wurde bisher nur in 697 Zellen und in HL-60 Zellen als Kontrollzelllinie gezeigt. Damit kann dieses Ergebnis nur einen Hinweis auf die Wirksamkeit in dem untersuchten Kontext geben. Christoph et al. untersuchten ebenfalls *in vitro* die Auswirkungen von UNC569 auf ALL Zellen und zeigten dabei, analog zu den eigenen Ergebnissen, dass eine Mer Inhibition mit UNC569 die MTX-Empfindlichkeit von ALL Zellen erhöht [55]. Anders als in der Arbeit von Christoph et al. wurde in dieser Arbeit der Effekt einer Mer-Inhibition im U343-ZNS Modell, also in einem Kokulturmodell, untersucht.

Bisher existieren keine Studien, die eine Mer-Inhibition im Menschen untersuchen. Daher ist bisher auch unklar, in welchem Umfang eine Mer-Inhibition mit immunologischen Prozessen im Menschen interagiert. Zahlreiche Studien belegen die Bedeutung der Mer-TK für das Immunsystem [39]. Interessanterweise konnte aber auch gezeigt werden, dass eine Mer-Inhibition durch die Aktivierung von T und NK Zellen Antitumoreffekte vermittelt [83, 84]. Darüber hinaus wurde im Rahmen der pädiatrischen ALL eine Zelllyse durch aktivierte NK-Zellen beobachtet. Dieser Effekt war in einigen Subtypen wie der BCR-ABL⁺ ALL deutlicher als in anderen [85]. Allerdings zeigten Frishman-Levy et al. dass aktivierte NK Zellen zwar peripher-systemisch wirken aber nicht in das ZNS übertreten und damit keinen Einfluss auf die ZNS-Leukämie entfalten [29]. Andererseits konnte aber auch gezeigt werden, dass Leukämiezellen akuter Leukämien durch die Sekretion von Matrix-Metalloproteinase-2 und -9 Tight Junctions der Blut-Hirn-Schranke (BHS) durchbrechen und damit die Permeabilität der BHS erhöhen [86], was eine Immunzellmigration in diesem Kontext ermöglichen könnte. Möglicherweise existiert im Menschen also ein zusätzlicher immunologischer Wirkmechanismus der Mer-Inhibition, der in den bestehenden Modellen nicht abgebildet wird.

Um zu klären, ob sich eine Mer-Inhibition mit UNC569 zur ZNS-gerichteten Therapie eignet, müsste geklärt werden, ob dieser Inhibitor in der Lage ist, die BHS zu überwinden. Für eine ZNS-Gängigkeit von UNC569 sprechen lipophile Eigenschaften des Inhibitors wie die Präsenz von Kohlenwasserstoff-Verbindungen in Form von Benzol-Verbindungen und einer Butyl-Seitenkette [87] sowie die Abwesenheit lipophober Verbindungen [88]. Wie schon erwähnt, ist die Integrität der BHS im Kontext von ZNS-Leukämien gestört [86], was die ZNS-Gängigkeit dieses Wirkstoffs gegebenenfalls erhöhen könnte.

Zusätzlich zu den eigenen *in vitro* Experimenten wurden in der Arbeitsgruppe die Effekte einer Mer-Inhibition mit UNC569 als Monotherapie in einem NSG Xenograft Modell in der Maus gemessen. Neben einem verzögerten Ausbrechen der Leukämie, ermittelt durch die Anzahl von Blasten im peripheren Blut, kam es unter der Therapie zu verlängerten Überlebenszeiten und vor allem zu reduzierter ZNS-Infiltration in der histopathologischen Beurteilung [74]. Damit ergeben sich in der Zusammenschau der eigenen Daten und der *in vivo* Ergebnisse der Arbeitsgruppe Hinweise für die Mer-Inhibition als vielversprechendes „targeted therapy“ Konzept der $t(1;19)^+$ B-Zell-Vorläufer ZNS-ALL.

6.4 Galectin-3 (Gal-3) ist ein möglicher Mediator der Leukämie-ZNS-Interaktion im In-vitro-ZNS-Modell

Es konnte gezeigt werden, dass der Mer-Ligand Gas-6 in diesem Modell nur in geringem Umfang sezerniert wird und stattdessen der erst kürzlich entdeckte Mer-Ligand Galectin-3 hochreguliert wird. Die Höhe der Galectin-3 Sekretion zeigte sich abhängig von der Mer-Expression in 697 Zellen. Ein Galectin-3 Screening von Leukämiezellen einer Patientenkohorte mit $t(1;19)$ Translokation zeigte allerdings keine signifikante Korrelation mit klinischen Parametern wie dem ZNS-Status, dem Therapieansprechen und anderen prognostischen Faktoren.

Die erhobenen Daten zeigen, dass ein qPCR-Screening der Gal-3 mRNA Expression in Leukämiezellen als prognostischer Parameter der $t(1;19)^+$ B-Zell-Vorläufer ALL ungeeignet ist. Dieses Negativergebnis könnte allerdings durch die Wahl des Probenmaterials bedingt sein. Denkbar ist etwa, dass die Untersuchung von Liquor bzw. Serum oder auch die Wahl einer anderen Methode, wie z.B. ELISA oder FACS zu einem anderen Ergebnis führt. So fanden Fei et al. mittels ELISA erhöhte Gal-3 Level im Plasma von Knochenmarksproben und mittels FACS

auf Leukämiezellen von Patienten mit B-Zell-Vorläufer ALL [89]. Die Bestimmung der Galectin-3 Niveaus im Liquor erscheint in diesem Kontext besonders vielversprechend, unterliegt aber einer Vielzahl methodischer Probleme. Es existieren Studien, die sich im Kontext von neurologischen und neuropädiatrischen Erkrankungen mit der Galectin-3 Konzentration im Liquor beschäftigen. So zeigte sich dieser Marker im Liquor von Patienten mit amyotropher Lateralsklerose (ALS) sowie im Liquor von Neugeborenen mit Asphyxie erhöht [90, 91]. Entsprechende Daten zur ZNS-ALL stehen bisher aus. Die Herausforderung für folgende Studien wird einerseits darin bestehen, Liquorproben von ALL-Patienten zu akquirieren und andererseits vorliegendes Material adäquat zu analysieren, da es in primären Liquorproben nach der Lumbalpunktion zu einer raschen Zelldegradation kommt.

In früheren Veröffentlichungen wurde gezeigt, dass TAM-Liganden nischenspezifische Überlebenssignale aktivieren. So fanden Shiozawa et al., dass die Gas-6/Mer Achse das Homing und Überleben der $t(1;19)^+$ B-Zell-Vorläufer ALL in der Knochenmarksnische vermittelt [73]. Demgegenüber zeigen die eigenen Daten, dass Gas-6 im U343-ZNS Modell nur gering sezerniert wird und stattdessen der Mer-Ligand Gal-3 hochreguliert wird.

Zu der Frage, ob Gal-3 überhaupt in ALL Zellen nachgewiesen werden kann, gibt es in der Literatur widersprüchliche Angaben. Yamamoto et al. fanden zwar eine hohe Gal-3 Expression in CML Zellen und sahen einen Zusammenhang mit Chemoresistenz und Homing in der Knochenmarksnische, konnten aber in ALL Zellen keine Gal-3 Expression nachweisen [92]. Dazu im Widerspruch steht eine aktuellere Studie von Fei et al, die Gal-3 in ALL Zellen aus dem Knochenmark und im Knochenmarksplasma adulter Patienten nachwies. Fei et al. fanden darüber hinaus eine Assoziation von erhöhter Gal-3 Expression und einer Vincristin- und Nilotinibresistenz in B-Vorläufer ALL Zellen [89]. Die eigenen Daten zeigen zwar, dass Gal-3 von 697 Zellen nicht sezerniert wird, die Kokultur aus 697 und U343 Zellen aber eine Gal-3 Induktion bewirkt. In ALL Zellen aus dem Knochenmark konnte, vereinbar mit den Daten von Fei et al., Gal-3 in einigen Patienten nachgewiesen werden, die Expression war aber, im Vergleich zur Expression in U343, gering.

Gal-3 könnte als Überlebenssignal in der ZNS-Nische in Betracht kommen, da dessen Expression in Glia Zellen, darunter in Mikroglia, Astrozyten und Oligodendrozyten beschrieben wurde. Funktionell wird Gal-3 in diesem Kontext eine Rolle im Rahmen von neuroinflammatorischen Prozessen zugeschrieben [93]. Dass Gal-3 die Interaktion von Tumorzellen und den Tumorzell-

fördernden Zellen der Mikroumgebung vermittelt, wurde unter anderem im Rahmen der ALL, der CML und von Neuroblastomen gezeigt, wo Gal-3 zelluläre Überlebensprozesse aktiviert und unter anderem Einfluss auf die Onkogene RAS, BCL2 und MYC ausübt [94].

Fei, et al. haben sich in einer weiteren Studie mit den Mechanismen einer Gal-3 Aktivierung in B-Vorläufer ALL Zellen beschäftigt. Dabei zeigte sich, dass das Gal-3 in und auf ALL Zellen von Stromazellen im Knochenmark stammt und die Transkription von LGALS3 mRNA in ALL Zellen induziert. Dementsprechend fördert Gal-3 das Überleben von ALL Zellen über eine Gal-3 Auto-Induktion. Sekundär wurde im Rahmen der Gal-3 Induktion eine Aktivierung von Überlebenssignalwegen, wie dem NFκB (Abkürzung: nukleärer Faktor κB) Signalweg, beobachtet [95]. Ob sich dieser Mechanismus auch auf die B-Zell-Vorläufer ALL im ZNS übertragen lässt ist bisher nicht untersucht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit suggerieren, dass der Mer-Ligand Gal-3 als Mer-Aktivator im U343-ZNS Modell in Frage kommt. Zukünftige Untersuchungen könnten dies mit Hilfe eines transienten oder permanenten Knockdowns von Gal-3 in U343 bzw. 697 Zellen bestätigen. Darüber hinaus könnte eine pharmakologische Gal-3 Inhibition *in vitro* und *in vivo* Daten liefern, die helfen könnten, Gal-3 als therapeutisches Target der t(1;19)⁺ B-Zell-Vorläufer ALL im ZNS zu implementieren. Dafür kommen einige Kandidatensubstanzen in Frage, die sich aktuell in der präklinischen und teilweise schon in der klinischen Testung befinden. In einem *in vitro* ALL Modell konnte gezeigt werden, dass der Gal-3 Inhibitor KB1019.7 eine durch Stromazellen induzierte Vincristin Resistenz reduziert [96]. Sogenannte „Modified citrus pectins“ (MCP), zu denen auch der Galectin-3 Inhibitor GCS-100 zählt, wurden erfolgreich in präklinischen Modellen von Leukämien, Lymphomen, des multiplen Myeloms und zahlreicher solider Tumoren eingesetzt. TD139 und GM-CT-01 konnte ein Einfluss auf immunologische Prozesse bzw. auf die Entwicklung von Lebererkrankungen und Fibrose zugeschrieben werden. Die Inhibitoren GM-CT-01 und GR-MD-12 werden aktuell im Rahmen des malignen Melanoms klinisch getestet [94]. Keiner der genannten Wirkstoffe wurde bisher im Kontext der ZNS-ALL getestet.

7 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Beschreibung
7-AAD	7-Aminoactinomycin
AG	Arbeitsgruppe
ALL	Akute lymphatische Leukämie
ALS	Amyotropher Lateralsklerose
AML	Akute myeloische Leukämie
BFM	Berlin-Frankfurt-Münster
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BLS	Blut-Liquor-Schranke
BrdU	Bromdesoxyuridin
CAR	Chimeric antigen receptor
CAU	Christian-Albrechts Universität Kiel
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure; engl. Complementary deoxyribonucleic acid
CLIP	Childhood Leukaemia Investigation Prague
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
CML	Chronische myeloische Leukämie
COALL	Cooperative-ALL-Studiengruppe
ddH2O	Doppelt destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure; engl. Deoxyribonucleic acid
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
ELISA	Antikörperbasiertes Nachweisverfahren; engl. Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FACS	Durchflusszytometrie (Abkürzung; engl. Fluorescence-activated cell sorting)
FLT3	Fms-Like-Tyrosinkinase-3

Abkürzung	Beschreibung
Gal-3	Galectin 3
Gas-6	Growth arrest-specific gene 6
GFP	Green fluorescent protein
HBEC	Brain-derived endothelial cells
IL-15	Interleukin 15
KD	Knockdown
KK	Kokultur
MCP	Modified citrus pectins
MFI	Mean fluorescence intensity
MHH	Medizinische Hochschule Hannover
MK	Monokultur
MRD	Minimal residual disease
MTX	Methotrexat
n.s.	Nicht signifikant
NFκB	nukleärer Faktor κB
NK Zellen	Natürliche Killerzellen
NRA	Neonatale Rattenastrozyten
NSG	NOD scid gamma
NTV	Non-targeting vector
PCR	Polymerasekettenreaktion; engl. Polymerase chain reaction
qPCR	Quantitative Polymerasekettenreaktion; engl. Quantitative polymerase chain reaction
RNA	Ribonukleinsäure; engl. ribonucleic acid
RNAi	RNA Interferenz
SCD	Stearoyl-CoA Desaturase
shRNA	Small hairpin RNA
TAM	Akronym der Rezeptoren Tyro3, Axl, Mer

Abkürzung	Beschreibung
TK	Tyrosinkinase
TLP	Traumatische Lumbalpunktion
Tulp1	Tubby-like Protein 1
TW	Transwell®
Veh	Vehikel (Trägersubstanz der entsprechenden Pharmaka)
ZAP70	Zeta-chain-associated Proteinkinase 70
ZNS	Zentrales Nervensystem

8 Einheitenverzeichnis

Abkürzung	Beschreibung
μ	Mikro
d	Dies (Tag)
Da	Dalton
g	Gramm
h	Horis (Stunden)
k	Kilo
l	Liter
M	Molar (mol/l)
n	Nano
V	Volt

9 Literaturverzeichnis

- 1 Ries LAG, Smith MA, Gurney JG, Linet M, Tamra T, Young JL, Bunin GR: Cancer Incidence and Survival among Children and Adolescents: United States SEER Program 1975-1995, National Cancer Institute, SEER Program. NIH Pub 1999.
- 2 Pui CH, Behm FG, Crist WM: Clinical and biologic relevance of immunologic marker studies in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1993;82:343–362.
- 3 Loken MR, Shah VO, Dattilio KL, Civin CI: Flow cytometric analysis of human bone marrow. II. Normal B lymphocyte development. *Blood* 1987;70:1316–1324.
- 4 Taylor J, Xiao W, Abdel-Wahab O: Diagnosis and classification of hematologic malignancies on the basis of genetics. *Blood* DOI: 10.1182/blood-2017-02-734541.
- 5 N. Gökbuget, A. Ganser und R.F. Schlenk: Akute Leukämien. Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie 2005.
- 6 Terwilliger T, Abdul-Hay M: Acute lymphoblastic leukemia: A comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer Journal* 2017;7:e577.
- 7 Jones L, Carol H, Evans K, Richmond J, Houghton PJ, Smith MA, Lock RB: A review of new agents evaluated against pediatric acute lymphoblastic leukemia by the Pediatric Preclinical Testing Program. *Leukemia* 2016;30:2133–2141.
- 8 Raetz EA, Teachey DT: T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2016;2016:580–588.
- 9 Jeha S, Pei D, Raimondi SC, Onciu M, Campana D, Cheng C, Sandlund JT, Ribeiro RC, Rubnitz JE, Howard SC, Downing JR, Evans WE, Relling MV, Pui CH: Increased risk for CNS relapse in pre-B cell leukemia with the t(1;19)/TCF3-PBX1. *Leukemia* 2009;23:1406–1409.
- 10 Borowitz MJ, Devidas M, Hunger SP, Bowman WP, Carroll AJ, Carroll WL, Linda S, Martin PL, Pullen DJ, Viswanatha D, Willman CL, Winick N, Camitta BM: Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study. *Blood* 2008;111:5477.

- 11 Gabriele Escherich, Martin Schrappe, Ursula Creutzig: S1-Leitlinie 025/014: Akute lymphoblastische- (ALL) Leukämie im Kindesalter, 2016.
- 12 Roberts KG, Li Y, Payne-Turner D, Harvey RC, Yang Y-L, Pei D, McCastlain K, Ding L, Lu C, Song G, Ma J, Becksfort J, Rusch M, Chen S-C, Easton J, Cheng J, Boggs K, Santiago-Morales N, Iacobucci I, Fulton RS, Wen J, Valentine M, Cheng C, Paugh SW, Devidas M, Chen I-M, Reshmi S, Smith A, Hedlund E, Gupta P, Nagahawatte P, Wu G, Chen X, Yergeau D, Vadodaria B, Mulder H, Winick NJ, Larsen EC, Carroll WL, Heerema NA, Carroll AJ, Grayson G, Tasian SK, Moore AS, Keller F, Frei-Jones M, Whitlock JA, Raetz EA, White DL, Hughes TP, Guidry Auvil JM, Smith MA, Marcucci G, Bloomfield CD, Mrozek K, Kohlschmidt J, Stock W, Kornblau SM, Konopleva M, Paietta E, Pui C-H, Jeha S, Relling MV, Evans WE, Gerhard DS, Gastier-Foster JM, Mardis E, Wilson RK, Loh ML, Downing JR, Hunger SP, Willman CL, Zhang J, Mullighan CG: Targetable kinase-activating lesions in Ph-like acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2014;371:1005–1015.
- 13 Hunger SP, Mullighan CG: Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *N Engl J Med* 2015;373:1541–1552.
- 14 Gore L, Locatelli F, Zugmaier G, Zwaan CM, Bhojwani D, Handgretinger R, Bader P, O'Brien MM, Trippett TM, Brethon B, Rizzari C, DuBois SG, Schlegel PG, Barnette P, Messina C, Hu K, Mergen N, Fischer A, Whitlock J, Stackelberg A von: Initial Results from a Phase 2 Study of Blinatumomab in Pediatric Patients with Relapsed/Refractory B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood* 2014;124:3703.
- 15 Stackelberg A von, Locatelli F, Zugmaier G, Handgretinger R, Trippett TM, Rizzari C, Bader P, O'Brien MM, Brethon B, Bhojwani D, Schlegel PG, Borkhardt A, Rheingold SR, Cooper TM, Zwaan CM, Barnette P, Messina C, Michel G, DuBois SG, Hu K, Zhu M, Whitlock JA, Gore L: Phase I/Phase II Study of Blinatumomab in Pediatric Patients With Relapsed/Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Clin Oncol* 2016;34:4381–4389.
- 16 Maus MV, Grupp SA, Porter DL, June CH: Antibody-modified T cells: CARs take the front seat for hematologic malignancies. *Blood* 2013;123:2625–2635.
- 17 Maude SL, Frey N, Shaw PA, Aplenc R, Barrett DM, Bunin NJ, Chew A, Gonzalez VE, Zheng Z, Lacey SF, Mahnke YD, Melenhorst JJ, Rheingold SR, Shen A, Teachey DT,

- Levine BL, June CH, Porter DL, Grupp SA: Chimeric Antigen Receptor T Cells for Sustained Remissions in Leukemia. *N Engl J Med* 2014;371:1507–1517.
- 18 Mitchell C, Richards S, Harrison CJ, Eden T: Long-term follow-up of the United Kingdom medical research council protocols for childhood acute lymphoblastic leukaemia, 1980-2001. *Leukemia* 2010;24:406–418.
- 19 Stackelberg A von, Volzke E, Kuhl J-S, Seeger K, Schrauder A, Escherich G, Henze G, Tallen G: Outcome of children and adolescents with relapsed acute lymphoblastic leukaemia and non-response to salvage protocol therapy: a retrospective analysis of the ALL-REZ BFM Study Group. *Eur J Cancer* 2011;47:90–97.
- 20 Pui C-H, Howard SC: Current management and challenges of malignant disease in the CNS in paediatric leukaemia. *The Lancet Oncology* 2008;9:257–268.
- 21 Frishman-Levy L, Izraeli S: Advances in understanding the pathogenesis of CNS acute lymphoblastic leukaemia and potential for therapy. *British Journal of Haematology* 2017;176:157–167.
- 22 Vora A, Andreano A, Pui C-H, Hunger SP, Schrappe M, Moericke A, Biondi A, Escherich G, Silverman LB, Goulden N, Taskinen M, Pieters R, Horibe K, Devidas M, Locatelli F, Valsecchi MG: Influence of Cranial Radiotherapy on Outcome in Children With Acute Lymphoblastic Leukemia Treated With Contemporary Therapy. *J Clin Oncol* 2016;34:919–926.
- 23 Pui C-H, Campana D, Pei D, Bowman WP, Sandlund JT, Kaste SC, Ribeiro RC, Rubnitz JE, Raimondi SC, Onciu M, Coustan-Smith E, Kun LE, Jeha S, Cheng C, Howard SC, Simmons V, Bayles A, Metzger ML, Boyett JM, Leung W, Handgretinger R, Downing JR, Evans WE, Relling MV: Treating childhood acute lymphoblastic leukemia without cranial irradiation. *N Engl J Med* 2009;360:2730–2741.
- 24 Bürger B, Zimmermann M, Mann G, Kühl J, Löning L, Riehm H, Reiter A, Schrappe M: Diagnostic Cerebrospinal Fluid Examination in Children With Acute Lymphoblastic Leukemia: Significance of Low Leukocyte Counts With Blasts or Traumatic Lumbar Puncture. *Journal of Clinical Oncology* 2003;21:184–188.
- 25 Alsadeq A, Schewe DM: Acute lymphoblastic leukemia of the central nervous system: On the role of PBX1. *Haematologica* 2017;102:611–613.

- 26 Williams MTS, Yousafzai YM, Elder A, Rehe K, Bomken S, Frishman-Levy L, Tavor S, Sinclair P, Dormon K, Masic D, Perry T, Weston VJ, Kearns P, Blair H, Russell LJ, Heidenreich O, Irving JAE, Izraeli S, Vormoor J, Graham GJ, Halsey C: The ability to cross the blood-cerebrospinal fluid barrier is a generic property of acute lymphoblastic leukemia blasts. *Blood* 2016;127:1998–2006.
- 27 van der Velden VHJ, Launaij D de, Vries JF de, Haas V de, Sonneveld E, Voerman JSA, Bie M de, Revesz T, Avigad S, Yeoh AEJ, Swagemakers SMA, Eckert C, Pieters R, van Dongen JJM: New cellular markers at diagnosis are associated with isolated central nervous system relapse in paediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology* 2016;172:769–781.
- 28 Cario G, Izraeli S, Teichert A, Rhein P, Skokowa J, Moricke A, Zimmermann M, Schrauder A, Karawajew L, Ludwig W-D, Welte K, Schunemann HJ, Schlegelberger B, Schrappe M, Stanulla M: High interleukin-15 expression characterizes childhood acute lymphoblastic leukemia with involvement of the CNS. *J Clin Oncol* 2007;25:4813–4820.
- 29 Frishman-Levy L, Shemesh A, Bar-Sinai A, Ma C, Ni Z, Frenkel S, Muench V, Bruckmueller H, Vokuhl C, Debatin K-M, Eckert C, Stanulla M, Schrappe M, Campbell KS, Loewenthal R, Schewe DM, Hochman J, Meyer LH, Kaufman D, Cario G, Porgador A, Izraeli S: Central nervous system acute lymphoblastic leukemia: Role of natural killer cells. *Blood* 2015;125:3420.
- 30 Williams MTS, Yousafzai Y, Cox C, Blair A, Carmody R, Sai S, Chapman KE, McAndrew R, Thomas A, Spence A, Gibson B, Graham GJ, Halsey C: Interleukin-15 enhances cellular proliferation and upregulates CNS homing molecules in pre-B acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2014;123:3116–3127.
- 31 Buonamici S, Trimarchi T, Ruocco MG, Reavie L, Cathelin S, Mar BG, Klinakis A, Lukyanov Y, Tseng J-C, Sen F, Gehrie E, Li M, Newcomb E, Zavadil J, Meruelo D, Lipp M, Ibrahim S, Efstratiadis A, Zagzag D, Bromberg JS, Dustin ML, Aifantis I: CCR7 signalling as an essential regulator of CNS infiltration in T-cell leukaemia. *Nature* 2009;459:1000–1004.
- 32 Alsadeq A, Fedders H, Vokuhl C, Belau NM, Zimmermann M, Wirbelauer T, Spielberg S, Vossen-Gajcy M, Cario G, Schrappe M, Schewe DM: The role of ZAP70 kinase in acute

lymphoblastic leukemia infiltration into the central nervous system. *Haematologica* 2017;102:346–355.

- 33 Akers SM, Rellick SL, Fortney JE, Gibson LF: Cellular elements of the subarachnoid space promote ALL survival during chemotherapy. *Leuk Res* 2011;35:705–711.
- 34 Johnson RM, Papp E, Grandal I, Kowalski PE, Nutter L, Wong RCC, Joseph-George AM, Danska JS, Guidos CJ: MuLV-related endogenous retroviral elements and Flt3 participate in aberrant end-joining events that promote B-cell leukemogenesis. *Genes Dev* 2014;28:1179–1190.
- 35 Fedders H, Alsadeq A, Schmah J, Vogiatzi F, Zimmermann M, Mörücke A, Lenk L, Zur Stadt U, Horstmann MA, Pieters R, Schrappe M, Stanulla M, Cario G, Schewe DM: The role of constitutive activation of FMS-related tyrosine kinase-3 and NRas/KRas mutational status in infants with KMT2A-rearranged acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2017;102:e438-e442.
- 36 Gaynes JS, Jonart LM, Zamora EA, Naumann JA, Gossai NP, Gordon PM: The central nervous system microenvironment influences the leukemia transcriptome and enhances leukemia chemo-resistance. *Haematologica* 2017;102:e136-e139.
- 37 Brandao L, Migdall-Wilson J, Eisenman K, Graham DK: TAM receptors in leukemia: expression, signaling, and therapeutic implications. *Crit Rev Oncog* 2011;16:47–63.
- 38 Lemke G, Rothlin CV: Immunobiology of the TAM receptors. *Nat Rev Immunol* 2008;8:327–336.
- 39 Lemke G: Biology of the TAM Receptors. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2013;5:a009076.
- 40 Linger RMA, Keating AK, Earp HS, Graham DK: TAM receptor tyrosine kinases: biologic functions, signaling, and potential therapeutic targeting in human cancer. *Adv Cancer Res* 2008;100:35–83.
- 41 Ben-Batalla I, Schultze A, Wroblewski M, Erdmann R, Heuser M, Waizenegger JS, Riecken K, Binder M, Schewe D, Sawall S, Witzke V, Cubas-Cordova M, Janning M, Wellbrock J, Fehse B, Hagel C, Krauter J, Ganser A, Lorens JB, Fiedler W, Carmeliet P, Pantel K, Bokemeyer C, Loges S: Axl, a prognostic and therapeutic target in acute myeloid leukemia

mediates paracrine crosstalk of leukemia cells with bone marrow stroma. *Blood* 2013;122:2443–2452.

- 42 Ghosh AK, Secreto C, Boysen J, Sassoon T, Shanafelt TD, Mukhopadhyay D, Kay NE: The novel receptor tyrosine kinase Axl is constitutively active in B-cell chronic lymphocytic leukemia and acts as a docking site of nonreceptor kinases: implications for therapy. *Blood* 2011;117:1928–1937.
- 43 Ben-Batalla I, Erdmann R, Jørgensen H, Mitchell R, Ernst T, Amsberg G von, Schafhausen P, Velthaus JL, Rankin S, Clark RE, Koschmieder S, Schultze A, Mitra S, Vandenberghe P, Brümmendorf TH, Carmeliet P, Hochhaus A, Pantel K, Bokemeyer C, Helgason GV, Holyoake TL, Loges S: Axl Blockade by BGB324 Inhibits BCR-ABL Tyrosine Kinase Inhibitor–Sensitive and -Resistant Chronic Myeloid Leukemia. *Clinical Cancer Research* 2017;23:2289.
- 44 Cummings CT, DeRyckere D, Earp HS, Graham DK: Molecular Pathways: MERTK Signaling in Cancer. *Clin Cancer Res* 2013;19:5275.
- 45 Chen J, Carey K, Godowski PJ: Identification of Gas6 as a ligand for Mer, a neural cell adhesion molecule related receptor tyrosine kinase implicated in cellular transformation. *Oncogene* 1997;14:2033–2039.
- 46 Nagata K, Ohashi K, Nakano T, Arita H, Zong C, Hanafusa H, Mizuno K: Identification of the product of growth arrest-specific gene 6 as a common ligand for Axl, Sky, and Mer receptor tyrosine kinases. *J Biol Chem* 1996;271:30022–30027.
- 47 Caberoy NB, Zhou Y, Li W: Tubby and tubby-like protein 1 are new MerTK ligands for phagocytosis. *EMBO J* 2010;29:3898–3910.
- 48 Caberoy NB, Alvarado G, Bigcas J-L, Li W: Galectin-3 is a new MerTK-specific eat-me signal. *Journal of cellular physiology* 2012;227:401–407.
- 49 Lierman E, van Miegroet H, Beullens E, Cools J: Identification of protein tyrosine kinases with oncogenic potential using a retroviral insertion mutagenesis screen. *Haematologica* 2009;94:1440–1444.
- 50 Lee-Sherick AB, Eisenman KM, Sather S, McGranahan A, Armistead PM, McGary CS, Hunsucker SA, Schlegel J, Martinson H, Cannon C, Keating AK, Earp HS, Liang X,

DeRyckere D, Graham DK: Aberrant Mer receptor tyrosine kinase expression contributes to leukemogenesis in acute myeloid leukemia. *Oncogene* 2013;32:5359–5368.

- 51 Graham DK, Salzberg DB, Kurtzberg J, Sather S, Matsushima GK, Keating AK, Liang X, Lovell MA, Williams SA, Dawson TL, Schell MJ, Anwar AA, Snodgrass HR, Earp HS: Ectopic expression of the proto-oncogene Mer in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res* 2006;12:2662–2669.
- 52 Linger RMA, Lee-Sherick AB, DeRyckere D, Cohen RA, Jacobsen KM, McGranahan A, Brandão LN, Wings A, Sawczyn KK, Liang X, Keating AK, Tan AC, Earp HS, Graham DK: Mer receptor tyrosine kinase is a therapeutic target in pre-B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2013;122:1599–1609.
- 53 Brandao LN, Wings A, Christoph S, Sather S, Migdall-Wilson J, Schlegel J, McGranahan A, Gao D, Liang X, DeRyckere D, Graham DK: Inhibition of MerTK increases chemosensitivity and decreases oncogenic potential in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood Cancer Journal* 2013;3:e101.
- 54 Hunger SP, Galili N, Carroll AJ, Crist WM, Link MP, Cleary ML: The t(1;19)(q23;p13) results in consistent fusion of E2A and PBX1 coding sequences in acute lymphoblastic leukemias. *Blood* 1991;77:687–693.
- 55 Christoph S, DeRyckere D, Schlegel J, Frazer JK, Batchelor LA, Trakhimets AY, Sather S, Hunter DM, Cummings CT, Liu J, Yang C, Kireev D, Simpson C, Norris-Drouin J, Hull-Ryde EA, Janzen WP, Johnson GL, Wang X, Frye SV, Earp HS, Graham DK: UNC569, a Novel Small-Molecule Mer Inhibitor with Efficacy against Acute Lymphoblastic Leukemia In Vitro and In Vivo. *Molecular Cancer Therapeutics* 2013;12:2367–2377.
- 56 Gallagher R, Collins S, Trujillo J, McCredie K, Ahearn M, Tsai S, Metzgar R, Aulakh G, Ting R, Ruscetti F, Gallo R: Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1979;54:713–733.
- 57 Tomeczkowski J, Yakisan E, Wieland B, Reiter A, Welte K, Sykora KW: Absence of G-CSF receptors and absent response to G-CSF in childhood Burkitt's lymphoma and B-ALL cells. *British Journal of Haematology* 1995;89:771–779.
- 58 Mihara K, Imai C, Coustan-Smith E, Dome JS, Dominici M, Vanin E, Campana D: Development and functional characterization of human bone marrow mesenchymal cells

immortalized by enforced expression of telomerase. *British Journal of Haematology* 2003;120:846–849.

- 59 Wilms H, Sievers J, Rickert U, Rostami-Yazdi M, Mrowietz U, Lucius R: Dimethylfumarate inhibits microglial and astrocytic inflammation by suppressing the synthesis of nitric oxide, IL-1beta, TNF-alpha and IL-6 in an in-vitro model of brain inflammation. *Journal of Neuroinflammation* 2010;7:30.
- 60 Nister M, Heldin CH, Westermark B: Clonal variation in the production of a platelet-derived growth factor-like protein and expression of corresponding receptors in a human malignant glioma. *Cancer Research* 1986;46:332–340.
- 61 Zhang LQ, Downie PA, Goodell WR, McCabe NR, LeBeau MM, Morgan R, Sklar J, Raimondi SC, Miley D, Goldberg A: Establishment of cell lines from B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1993;7:1865–1874.
- 62 Kim DH, Moldwin RL, Vignon C, Bohlander SK, Suto Y, Giordano L, Gupta R, Fears S, Nucifora G, Rowley JD: TEL-AML1 translocations with TEL and CDKN2 inactivation in acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Blood* 1996;88:785–794.
- 63 Krisch B, Feindt J, Mentlein R: Immunoelectronmicroscopic Analysis of the Ligand-induced Internalization of the Somatostatin Receptor Subtype 2 in Cultured Human Glioma Cells. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 1998;46:1233–1242.
- 64 Barker PE, Carroll AJ, Cooper MD: t(1;19)(q23;p13) in pre-B acute lymphocytic leukemia cell line 697. *Cancer Genet Cytogenet* 1987;25:379–380.
- 65 Uphoff CC, MacLeod RA, Denkmann SA, Golub TR, Borkhardt A, Janssen JW, Drexler HG: Occurrence of TEL-AML1 fusion resulting from (12;21) translocation in human early B-lineage leukemia cell lines. *Leukemia* 1997;11:441–447.
- 66 Naumovski L, Morgan R, Hecht F, Link MP, Glader BE, Smith SD: Philadelphia Chromosome-positive Acute Lymphoblastic Leukemia Cell Lines without Classical Breakpoint Cluster Region Rearrangement. *Cancer Res* 1988;48:2876.
- 67 Stong RC, Korsmeyer SJ, Parkin JL, Arthur DC, Kersey JH: Human acute leukemia cell line with the t(4;11) chromosomal rearrangement exhibits B lineage and monocytic characteristics. *Blood* 1985;65:21–31.

- 68 Jäkel S, Dimou L: Glial Cells and Their Function in the Adult Brain: A Journey through the History of Their Ablation. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 2017;11:24.
- 69 Hooper C, Taylor DL, Pocock JM: Pure albumin is a potent trigger of calcium signalling and proliferation in microglia but not macrophages or astrocytes. *Journal of Neurochemistry* 2005;92:1363–1376.
- 70 Stitt TN, Conn G, Goret M, Lai C, Bruno J, Radzlejowski C, Mattsson K, Fisher J, Gies DR, Jones PF, Masiakowski P, Ryan TE, Tobkes NJ, Chen D, Distefano PS, Long GL, Basilico C, Goldfarb MP, Lemke G, Glass DJ, Yancopoulos GD: The anticoagulation factor protein S and its relative, Gas6, are ligands for the Tyro 3/Axl family of receptor tyrosine kinases. *Cell* 1995;80:661–670.
- 71 Caberoy NB, Maignel D, Kim Y, Li W: Identification of tubby and tubby-like protein 1 as eat-me signals by phage display. *Experimental cell research* 2009;316:245–257.
- 72 Shiozawa Y, Pedersen EA, Patel LR, Ziegler AM, Havens AM, Jung Y, Wang J, Zalucha S, Loberg RD, Pienta KJ, Taichman RS: GAS6/AXL Axis Regulates Prostate Cancer Invasion, Proliferation, and Survival in the Bone Marrow Niche. *Neoplasia (New York, N.Y.)* 2009;12:116–127.
- 73 Shiozawa Y, Pedersen EA, Taichman RS: GAS6/Mer axis regulates the homing and survival of the E2A/PBX1-positive B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia in the bone marrow niche. *Exp Hematol* 2010;38:132–140.
- 74 Krause S, Pfeiffer C, Strube S, Alsadeq A, Fedders H, Vokuhl C, Loges S, Waizenegger J, Ben-Batalla I, Cario G, Moricke A, Stanulla M, Schrappe M, Schewe DM: Mer tyrosine kinase promotes the survival of t(1;19)-positive acute lymphoblastic leukemia (ALL) in the central nervous system (CNS). *Blood* 2015;125:820–830.
- 75 Alter A, Duddy M, Hebert S, Biernacki K, Prat A, Antel JP, Yong VW, Nuttall RK, Pennington CJ, Edwards DR, Bar-Or A: Determinants of human B cell migration across brain endothelial cells. *J Immunol* 2003;170:4497–4505.
- 76 Akers SM, O'Leary HA, Minnear FL, Craig MD, Vos JA, Coad JE, Gibson LF: VE-cadherin and PECAM-1 enhance ALL migration across brain microvascular endothelial cell monolayers. *Exp Hematol* 2010;38:733–743.

- 77 Monnot AD, Zheng W: Culture of Choroid Plexus Epithelial Cells and In Vitro Model of Blood–CSF Barrier. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 2013;945:13–29.
- 78 Lazarevic I, Engelhardt B: Modeling immune functions of the mouse blood–cerebrospinal fluid barrier in vitro: Primary rather than immortalized mouse choroid plexus epithelial cells are suited to study immune cell migration across this brain barrier. *Fluids and Barriers of the CNS* 2016;13:2.
- 79 Guttridge KL, Luft JC, Dawson TL, Kozłowska E, Mahajan NP, Varnum B, Earp HS: Mer receptor tyrosine kinase signaling: Prevention of apoptosis and alteration of cytoskeletal architecture without stimulation or proliferation. *J Biol Chem* 2002;277:24057–24066.
- 80 Yen H-J, Chen S-H, Chang T-Y, Yang C-P, Lin D-T, Hung I-J, Lin K-H, Chen J-S, Hsiao C-C, Chang T-T, Chang T-K, Peng C-T, Lin M-T, Jaing T-H, Liu H-C, Jou S-T, Lu M-Y, Cheng C-N, Sheen J-M, Chiou S-S, Hung G-Y, Wu K-H, Yeh T-C, Wang S-C, Chen R-L, Chang H-H, Yang Y-L, Chen S-H, Cheng S-N, Chang Y-H, Chen B-W, Hsieh Y-L, Huang F-L, Ho W-L, Wang J-L, Chang C-Y, Chao Y-H, Lin P-C, Chen Y-C, Liao Y-M, Lin T-H, Shih L-Y, Liang D-C: Pediatric acute lymphoblastic leukemia with t(1;19)/TCF3-PBX1 in Taiwan. *Pediatr Blood Cancer* 2017;64.
- 81 Tsou W-I, Nguyen K-QN, Calarese DA, Garforth SJ, Antes AL, Smirnov SV, Almo SC, Birge RB, Kotenko SV: Receptor tyrosine kinases, TYRO3, AXL, and MER, demonstrate distinct patterns and complex regulation of ligand-induced activation. *J Biol Chem* 2014;289:25750–25763.
- 82 Migdall-Wilson J, Bates C, Schlegel J, Brandao L, Linger RMA, DeRyckere D, Graham DK: Prolonged exposure to a Mer ligand in leukemia: Gas6 favors expression of a partial Mer glycoform and reveals a novel role for Mer in the nucleus. *PLoS One* 2012;7:e31635.
- 83 Paolino M, Choidas A, Wallner S, Pranjic B, Uribealago I, Loeser S, Jamieson AM, Langdon WY, Ikeda F, Fededa JP, Cronin SJ, Nitsch R, Schultz-Fademrecht C, Eickhoff J, Menninger S, Unger A, Torka R, Gruber T, Hinterleitner R, Baier G, Wolf D, Ullrich A, Klebl BM, Penninger JM: The E3 ligase Cbl-b and TAM receptors regulate cancer metastasis via natural killer cells. *Nature* 2014;507:508–512.

- 84 Cook RS, Jacobsen KM, Wofford AM, DeRyckere D, Stanford J, Prieto AL, Redente E, Sandahl M, Hunter DM, Strunk KE, Graham DK, Earp HS: MerTK inhibition in tumor leukocytes decreases tumor growth and metastasis. *J Clin Invest* 2013;123:3231–3242.
- 85 Torelli GF, Peragine N, Raponi S, Pagliara D, Propriis MS de, Vitale A, Bertaina A, Barberi W, Moretta L, Basso G, Santoni A, Guarini A, Locatelli F, Foa R: Recognition of adult and pediatric acute lymphoblastic leukemia blasts by natural killer cells. *Haematologica* 2014;99:1248–1254.
- 86 Feng S, Cen J, Huang Y, Shen H, Yao L, Wang Y, Chen Z: Matrix metalloproteinase-2 and -9 secreted by leukemic cells increase the permeability of blood-brain barrier by disrupting tight junction proteins. *PLoS One* 2011;6:e20599.
- 87 Zhang W, Zhang D, Stashko MA, DeRyckere D, Hunter D, Kireev D, Miley MJ, Cummings C, Lee M, Norris-Drouin J, Stewart WM, Sather S, Zhou Y, Kirkpatrick G, Machius M, Janzen WP, Earp HS, Graham DK, Frye SV, Wang X: Pseudo Cyclization through Intramolecular Hydrogen Bond Enables Discovery of Pyridine Substituted Pyrimidines as New Mer Kinase Inhibitors. *Journal of medicinal chemistry* 2013;56:9683–9692.
- 88 Liu J, Yang C, Simpson C, DeRyckere D, van Deusen A, Miley MJ, Kireev D, Norris-Drouin J, Sather S, Hunter D, Korboukh VK, Patel HS, Janzen WP, Machius M, Johnson GL, Earp HS, Graham DK, Frye SV, Wang X: Discovery of Small Molecule Mer Kinase Inhibitors for the Treatment of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *ACS Medicinal Chemistry Letters* 2012;3:129–134.
- 89 Fei F, Abdel-Azim H, Lim M, Arutyunyan A, Itzstein M von, Groffen J, Heisterkamp N: Galectin-3 in pre-B acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2013;27:2385–2388.
- 90 Sävman K, Heyes MP, Svedin P, Karlsson A: Microglia/Macrophage-Derived Inflammatory Mediators Galectin-3 and Quinolinic Acid are Elevated in Cerebrospinal Fluid from Newborn Infants After Birth Asphyxia. *Translational Stroke Research* 2012;4:228–235.
- 91 Zhou J-Y, Afjehi-Sadat L, Asress S, Duong DM, Cudkowicz M, Glass JD, Peng J: Galectin-3 Is a Candidate Biomarker for Amyotrophic Lateral Sclerosis: Discovery by a Proteomics Approach. *Journal of Proteome Research* 2010;9:5133–5141.
- 92 Yamamoto-Sugitani M, Kuroda J, Ashihara E, Nagoshi H, Kobayashi T, Matsumoto Y, Sasaki N, Shimura Y, Kiyota M, Nakayama R, Akaji K, Taki T, Uoshima N, Kobayashi Y,

Horiike S, Maekawa T, Taniwaki M: Galectin-3 (Gal-3) induced by leukemia microenvironment promotes drug resistance and bone marrow lodgment in chronic myelogenous leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:17468–17473.

93 Shin T: The pleiotropic effects of galectin-3 in neuroinflammation: A review. *Acta Histochem* 2013;115:407–411.

94 Ruvolo PP: Galectin 3 as a guardian of the tumor microenvironment. *Biochim Biophys Acta* 2016;1863:427–437.

95 Fei F, Joo EJ, Tarighat SS, Schiffer I, Paz H, Fabbri M, Abdel-Azim H, Groffen J, Heisterkamp N: B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia and stromal cells communicate through Galectin-3. *Oncotarget* 2015;6:11378–11394.

96 Samadzadeh Tarighat S, Fei F, Bum-Erdene K, Blanchard H, Groffen J, Heisterkamp N: Galectin-3 Inhibition As a Novel Therapeutic Approach in Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL). *Blood* 2015;126:2047.