

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

betreut am
Zentrum der Inneren Medizin
Medizinische Klinik II (Hämatologie, Onkologie, Hämostaseologie, Rheumatologie,
Infektiologie)
Direktor: Prof. Dr. Hubert Serve

**Bedeutung der Glukoseaufnahme und Glykolyse für die
Leukämogenese in der adulten
Akuten Lymphatischen Leukämie der B-Zellen**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Tabea Sabine Thomas
aus Heppenheim (Bergstraße)

Frankfurt am Main, 2021

Dekan:	Prof. Dr. Stefan Zeuzem
Referent:	Prof. Dr. Michael A. Rieger
Korreferent:	Prof. Dr. Peter Bader
Tag der mündlichen Prüfung:	31.01.2022

Inhaltsverzeichnis

Schriftliche Erklärung.....	- 0 -
Abbildungsverzeichnis.....	- 1 -
Tabellenverzeichnis	- 10 -
Abkürzungsverzeichnis.....	- 4 -
1. Einleitung	- 7 -
1.1 Grundlagen der Blutbildung.....	- 7 -
1.1.1 Allgemeine Hämatopoese.....	- 7 -
1.1.2 Entwicklung zur reifen B-Zelle.....	- 8 -
1.2 Akute lymphatische Leukämie – Klinische Gesichtspunkte	- 12 -
1.2.1 Allgemeine Informationen	- 12 -
1.2.2 Diagnostik	- 13 -
1.2.3 Risikostratifikation und prognosebeeinflussende Faktoren	- 14 -
1.2.4 Therapie.....	- 15 -
1.2.5 Mögliche Folgen für den Patienten	- 17 -
1.3 Akute lymphatische Leukämie – im Fokus der Forschung	- 17 -
1.4 Zielsetzung der Dissertation	- 22 -
2. Material und Methodik.....	- 24 -
2.1 Verwendete Materialien.....	- 24 -
2.1.1 Allgemeine Lösungen	- 24 -
2.1.2 Zellkulturmedien.....	- 24 -
2.1.3 Antikörper für Durchflusszytometrie	- 25 -
2.1.4 Chemikalien und Kits	- 26 -
2.1.5 Ausstattung des Laboratoriums	- 26 -
2.1.6 Mauslinien.....	- 28 -
2.1.7 Software.....	- 28 -
2.2 Patient-derived long-time cultures (PDLTCs) = aus primärem Patientenmaterial gewonnene Langzeitkulturen (LZK).....	- 28 -
2.3 Seahorse-Messungen	- 31 -
2.3.1 Allgemeines Verfahren.....	- 31 -
2.3.2 Metabolische Analyse der drei Langzeitkulturen BV, CR und PH.....	- 33 -
2.4 Western-Blot.....	- 33 -

2.4.1	Nachweis von Hypoxie-induzierbarem Faktor 1 (HIF - 1)	34 -
2.5	Durchflusszytometrie und FACS (Fluorescence-activated cell sorting) ...	35 -
2.5.1	Allgemeine Informationen	35 -
2.5.2	Glukoseaufnahme und –affinitätsbestimmung der Langzeitkulturen unter Zuhilfenahme von 2 – NBDG	37 -
2.5.3	Evaluation der Expression des Glukosetransporters GLUT – 1	41 -
2.5.4	Analyse der Glukoseaufnahme und GLUT – 1 Expression nach Cobaltchlorid-Behandlung der Zellen	42 -
2.6	Xenotransplantation.....	44 -
2.6.1	Allgemeines Regime	44 -
2.6.2	Transplantation der Zellen anhand deren Glukose-aufnahmeverhalten	46 -
2.6.3	serielle Transplantation der Langzeitkultur CR	47 -
2.6.4	Transplantation GLUT – 1 positiver versus GLUT – 1 negativer Zellen	48 -
3.	Ergebnisse	51 -
3.1	B-ALL-Zellen weisen höhere Glykolyseaktivität als gesunde Knochenmarkszellen auf	51 -
3.2	Glukoseaufnahme und –affinität der Langzeitkulturen.....	52 -
3.2.1	Schnelle Glukoseaufnahme geht mit höherem leukämogenem Potential einher	52 -
3.2.2	2 – NBDG weist keine Toxizität gegenüber den Zellen der LZK auf .	55 -
3.2.3	Es existieren drei unterscheidbare 2 – NBDG – Subpopulationen....	57 -
3.2.4	Die hochaffinen Kulturen generieren die ursprüngliche LZK.....	59 -
3.3	Eine höhere Glukoseaufnahme ist durch vermehrte Expression des Glukosetransporters GLUT – 1 bedingt.....	60 -
3.4	Aggressivität der B-ALL ist durch normoxische Stabilisierung von HIF und Nutzung von dessen Genprodukten gekennzeichnet	61 -
3.4.1	Stabilisierung von HIF unter Normoxie ermöglicht die GLUT – 1 - Expression und als Folge eine erhöhte Glukoseaufnahme	62 -
3.5	Transplantation anhand des Glukoseaufnahmeverhaltens.....	64 -
3.5.1	Höhere Glukoseaffinität kommt als potentieller Aggressivitätsmarker aller CR-Zellen in Betracht.....	65 -
3.5.2	Seriell transplantierte 2 – NBDG negative CR – Zellen initiieren aggressivere Leukämie	69 -

3.5.3	Seriell initiierte Leukämien bilden aggressiveren Krankheitsverlauf aus	- 72 -
3.5.4	In den Zellen des Patienten PH erscheint geringere Glukoseaffinität vorteilhaft für die Leukämiezellen.....	- 74 -
3.5.5	CD 34-/38+-B-ALL-Zellen spielen besondere Rolle in Initiation und Progress der Leukämie.....	- 76 -
3.6	GLUT – 1 negativ transplantierte Zellen initiieren aggressivere Leukämie	- 80 -
4.	Diskussion.....	- 84 -
4.1	Glukoseaufnahme und Oberflächenexpression von GLUT – 1 definieren unterschiedlich aggressive Leukämieformen.....	- 84 -
4.2	Veränderter Kohlenhydratstoffwechsel begünstigt Proliferation der Tumorzellen.....	- 86 -
4.3	Stabilisierung von HIF – 1 unter normoxischen Bedingungen wirkt sich auf Proteinebene und funktionell aus	- 90 -
4.4	Glukoseaufnahme und GLUT – 1 Expression als potentieller Marker verschieden aggressiver Leukämien	- 92 -
4.5	CD 34-/38+ - Zellen weisen entscheidende Rolle im Rahmen der Akuten lymphatischen Leukämie auf	- 93 -
5.	Zusammenfassung.....	- 96 -
5.1	Deutsche Version	- 96 -
5.2	English version	- 98 -
	Literaturverzeichnis	- 100 -

Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Bedeutung der Glukoseaufnahme und Glykolyse für die Leukämogenese in der adulten Akuten Lymphatischen Leukämie der B-Zellen“

in der Medizinische Klinik II (Hämatologie, Onkologie, Hämostaseologie, Rheumatologie, Infektiologie) des Universitätsklinikums Frankfurt am Main unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. Michael A. Rieger mit Unterstützung durch Dr. Bartosch Wojcik ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht*. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Ergebnisse der Dissertation wurden bisher nicht veröffentlicht.

(Ort, Datum)

(Unterschrift)

*) im Falle des Nichtzutreffens entfernen

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht der allgemeinen Hämatopoese.....	- 8 -
Abbildung 2: Ablauf des allgemeinen Regimes zur Therapie der Akuten lymphatischen Leukämie	- 16 -
Abbildung 3: Modell der linearen Abfolge gegenüber dem Modell der verzweigenden Entwicklung	- 20 -
Abbildung 4: HIF - 1 α Degradation unter normoxischen Bedingungen infolge der Hydroxylierung und Ubiquitylierung durch das VHL (Von-Hippel-Lindau-Protein) durch das Proteasom vergleichend zur Dimerisierung mit HIF - 1 β und anschließender Delokalisierung in den Zellkern zur Initiation der Transkription der durch HRE (Hypoxie-responsiblen Elemente) markierten Gene	- 21 -
Abbildung 5: Gewinnung aus Knochenmarkszellen unbehandelter ALL-Patienten bestehender Langzeitkulturen und Etablierung dieser durch Nijmeijer et al.	- 29 -
Abbildung 6: Darstellung der Übertragung der Zellen und durchgeführter Analysen nach dem Ableben.....	- 45 -
Abbildung 7: Die Zellen der LZK zeigen ein erhöhtes Aktivitätslevel der anaeroben Glykolyse.....	- 51 -
Abbildung 8: Expression des GLUT – 1 und Glukoseaffinität der Zellen zeigen positive Zusammenhänge mit dem Auftreten einer aggressiveren Leukämie.	- 54 -
Abbildung 9: 2 – NBDG beeinflusst nicht die Viabilität der LZK Zellen.....	- 56 -
Abbildung 10: Existenz der drei 2 – NBDG – Subpopulationen und Nachweis der Viabilität der 2 – NBDG hochaffinen Zellen.....	- 58 -
Abbildung 11: Hochaffine Zellen können drei Subpopulationen repopulieren.	- 59 -
Abbildung 12: LZK PH und CR stabilisieren unter Normoxie HIF - 1 α . HIF - 1 α Expression in den drei LZK vergleichend unter normoxischen Bedingungen und nach Induktion chemischer Hypoxie mittels CoCl ₂	- 62 -
Abbildung 13: Die Stabilisierung von HIF-1 unter Normoxie führt zur Expression von Zielgenen, wie GLUT - 1, was zur vermehrten Glukoseaufnahme beiträgt. ..	- 63 -
Abbildung 14: Übersicht zur durchgeführten primären Transplantation unter Verwendung von CR-Zellen.	- 65 -
Abbildung 15: Größere Glukoseaffinität stellt einen potentiellen Aggressivitätsmarker der CR-Zellen da.....	- 66 -

Abbildung 16: 4000 hochaffine Zellen initiieren eine humane Leukämie.....	- 68 -
Abbildung 17: Übersicht zur durchgeführten seriellen Transplantation.	- 69 -
Abbildung 18: Seriell transplantierte als 2 – NBDG negativ klassifizierte CR- Zellen weisen höheres leukämogenes Potential auf.	- 71 -
Abbildung 19: Seriell transplantierte CR – Zellen initiieren einen aggressiveren Leukämiephänotyp.	- 73 -
Abbildung 20: Übersicht zur durchgeführten Transplantation mit Zellen des Patienten PH..	- 75 -
Abbildung 21: Eine geringere Glukoseaffinität erscheint in PH-Zellen als vorteilhaft für den Leukämieprogress.	- 76 -
Abbildung 22: Anteil der CD 34 / CD 38 - Subpopulationen in den LZK.....	- 77 -
Abbildung 23: B-ALL-Zellen mit dem Expressionsmuster CD 34-/38+ fördern Initiation und Progress und fördern Initiation und Progress und sind somit ein potentieller Anhaltspunkt für die Aggressivität der LZK CR.....	- 78 -
Abbildung 24: CD 34-/CD 38+ B-ALL-Zellen sind signifikant höher in Milz und Knochenmark exprimiert als die anderen Subpopulationen	- 78 -
Abbildung 25: Vergleichsweise geringerer Anteil der CD34-/38+ - Zellen initiiert weniger aggressive Leukämie in den mit PH-Zellen transplantierten Mäusen:	- 79 -
Abbildung 26: CD34-/38+ - Zellen sind in signifikant größerer Anzahl vorhanden	- 80 -
Abbildung 27: Übersicht zur durchgeführten GLUT – 1 Transplantation unter Verwendung von CR-Zellen.	- 81 -
Abbildung 28: GLUT – 1 negative Zellen rufen aggressivere Leukämie hervor, welche in signifikant kürzerem Überleben mündet.	- 82 -

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Puffer und Lösungen	- 24 -
Tabelle 2: Antikörper und Reagenzien für die Durchflusszytometrie	- 25 -
Tabelle 3: Chemikalien und Kits	- 26 -
Tabelle 4: verwendete Geräte	- 26 -
Tabelle 5: Laborausstattung	- 27 -
Tabelle 6: Software	- 28 -
Tabelle 7: Kennzeichen der verwendeten LZK.....	- 30 -

Abkürzungsverzeichnis

2 – NBDG	2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Deoxyglukose)
ALL	Akute lymphatische Leukämie
APc	Allphycocyanin
APc-Cy 7	Kombination aus APC und Cyanin-Farbstoff 7
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Area under the curve = Fläche unter der Kurve eines Graphen
AZ	Allgemeinzustand
BLNK	B-Zell-Linker Protein
CD	cluster of differentiation = Gruppen immunphänotypischer Oberflächenmerkmale von Zellen
CLP	common lymphoid progenitor = gemeinsame lymphatische Vorläuferzelle
CML	Chronische myeloische Leukämie
CNA	copy number of abnormalities = Kopienanzahl der Abweichungen
CoCl ₂	Kobaltchlorid
CR	complete remission = komplette Remission
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EBF	early B-cell factor = früher B-Zell-Faktor
ECAR	extracellular acidification rate = extrazelluläre Rate der Ansäuerung
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group = östliche Kooperationsgruppe der Onkologie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELP	early lymphoid progenitor = frühe lymphatische Vorläuferzelle
EWALL	European Working Group for Adult ALL = europäische

	Arbeitsgruppe für adulte ALL
FACS	Fluorescent-activated cell sorting = Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung
FBS	fetal bovine serum = Fetales Kälberserum
FCCP	Carbonylcyanid- <i>p</i> -trifluoromethoxyphenylhydrazon
FITC	Fluorescein isothiocyanat
FSC	forward scatter = Vorwärtsstreulicht
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor = Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GMALL	German Multicenter Study Group for Adult ALL = deutsche Arbeitsgruppe für adulte ALL
Gy	Gray (SI-Einheit ionisierender Strahlung)
HGF	human growth factor = humaner Wachstumsfaktor
HIF	hypoxia inducible factor = Hypoxie-induzierbarer Faktor
HRE	hypoxia responsible element = Hypoxie responsible Elemente
IL	Interleukin
iv	intravenös
KMZ	Knochenmarkszelle
LBL	lymphoblastisches Lymphom
LDH	Laktatdehydrogenase
LIC	leukaemia-inducing cell(s)
LIZ	Leukämie-induzierende Zelle(n)
LZK	Langzeitkultur
MPP	multipotent progenitor cell = multipotente Vorläuferzelle
MRD	minimal residual disease = minimale Resterkrankung
mRNA	messenger RNA = Boten Ribonukleinsäure
NaN ₃	Natriumazid
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
OCR	oxygen consumption rate = Rate des verbrauchten

	Sauerstoffs
PBS	phosphat buffered saline = Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	polymerase-chain-reaction = Polymerase-Ketten-Reaktion
PDLTC	Patient-derived long time culture = aus primärem Patientenmaterial gewonnene Langzeitkultur
PE	Phycoerythrin
PH+-ALL	Philadelphia-Chromosom-positive ALL
SCF	stem cell factor = Stammzellfaktor
SDS	sodium dodecyl sulfate = Natriumdodecylsulfat
slgM	surface IgM = an der Oberfläche exprimiertes Immunglobulin M
SILAC	stable isotope labeling by amino acids in cell culture
SSC	side scatter = Seitenstreulicht
SZT	Stammzelltransplantation
TBS -T	Tris-buffered saline with Tween20 → bestehend aus Tris als Puffer, Natriumchlorid und Tween 20 (Tensid; Polysorbat)
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
VHL – Protein	Von-Hippel-Lindau-Protein
WHO	World Health Organization = Weltgesundheitsorganisation
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 Grundlagen der Blutbildung

1.1.1 Allgemeine Hämatopoese

Die Hämatopoese umfasst eine Folge von Proliferations- und Differenzierungsschritten, die zur Generierung sämtlicher reifer, naiver Blutzellen aus hämatopoetischen Stammzellen dienen. Dieser kontinuierliche und komplexe Prozess findet im Erwachsenen größtenteils im Knochenmark statt und dient der Sicherstellung der Existenz der reifen Zellen des Blutes in ausreichender Anzahl. Hierbei wird die Produktion von Erythrozyten, Granulozyten, Monozyten, Thrombozyten und Lymphozyten unterschieden, wobei sich deren Entwicklung über teils gemeinsame Vorläuferzellen ereignet (siehe Abbildung 1). Ausgangspunkt der Hämatopoese ist die multipotente Blutstammzelle, die sich durch ihre Fähigkeit der Selbsterneuerung und der über lange Zeit anhaltenden Potenz zur Generierung neuer reifer Blutzellen auszeichnet [1]. Aufgrund ihrer Funktion als lebenslanger Ausgangspunkt der Hämatopoese ist die Blutstammzelle in speziellen Nischen des Knochenmarks lokalisiert [2, 3], die sie vor schädlichen Einflüssen, wie beispielsweise reaktiven Sauerstoffspezies schützen und somit unter anderem das Auftreten von Mutationen verhindern sollen. Die Stammzellen sind durch die Expression von Oberflächenmarkern, klassifiziert nach dem CD-System (CD = cluster of differentiation), wie CD 34, CD 49f, und cKit/CD 117 charakterisiert, wobei sie CD 38 negativ sind und keinerlei linienspezifischen Marker aufweisen [1, 4, 5]. Im Rahmen der Hämatopoese gehen aus einer kleinen Zahl Stammzellen eine große Anzahl reifer Blutzellen hervor [6], da es neben der Differenzierung auf den unterschiedlichen Stufen der Vorläuferzellen zu zusätzlicher Proliferation kommt.

Beim ersten Schritt der Differenzierung einer Stammzelle entsteht eine multipotente Vorläuferzelle (MPP = multipotent progenitor cell), welche sich entweder zur gemeinsamen Vorläuferzelle der myeloischen Zelllinien oder zur gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzelle entwickelt (siehe Abbildung 1). Diese unterscheiden sich unter anderem von der hämatopoetischen Stammzelle dahingehend, dass sie kein Selbsterneuerungspotential mehr aufweisen [1]. Die Entwicklungsrichtung wird unter anderem durch das Expressionslevel des Transkriptionsfaktors PU.1 beeinflusst. Liegt dieser in

niedrigen Konzentrationen vor, fördert dies die Entwicklung zur gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzelle CLP (CLP = common lymphoid progenitor) [7, 8].

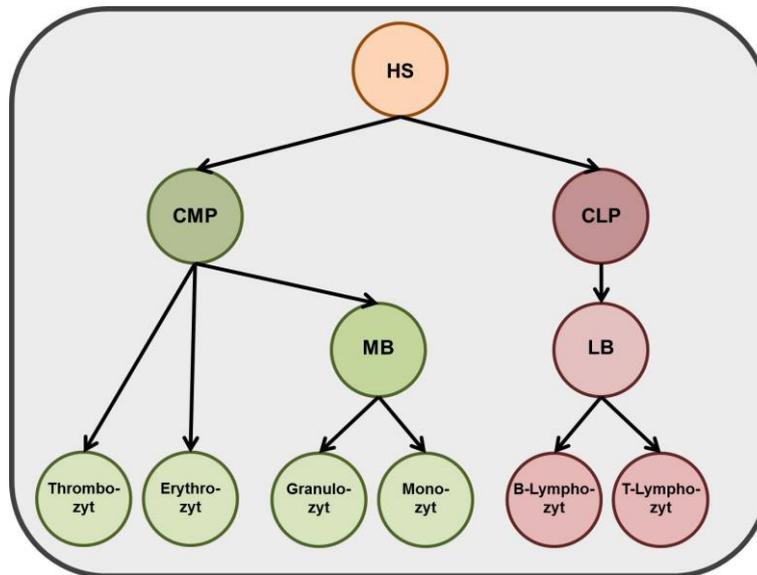


Abbildung 1: Übersicht der allgemeinen Hämatopoese (CMP = common myeloid progenitor, MB = Myeloblast, CLP = common lymphoid progenitor, LB = Lymphoblast)

Die myeloische Vorläuferzelle dient als Quelle der Differenzierung in Erythrozyten, Thrombozyten, Granulozyten und Monozyten (Myelopoese). Die Zellen des Immunsystems sowie natürliche Killerzellen (NK-Zellen) gehen aus der lymphatischen Vorläuferzelle hervor (Lymphopoese) (siehe Abbildung 1). Mit zunehmender Spezialisierung der Zwischenstufen in der Entwicklung zur reifen Blutzelle ist ebenfalls der Verlust der Potenz Zellen anderer Linien hervorzubringen verbunden. Die Entwicklung der unterschiedlichen Zelllinien wird maßgeblich durch das Vorliegen verschiedener Zytokine, wie beispielsweise dem Stammzellefaktor, sowie den Interleukinen 2, 3, 6 und 7 beeinflusst. Hinzu kommen Wachstumsfaktoren, die linienspezifisch nur die Entwicklung der entsprechenden reifen Blutzellen fördern.

1.1.2 Entwicklung zur reifen B-Zelle

Die Entwicklung der B-Zellen aus der CLP wird als B-Zell-Lymphopoese bezeichnet und erstreckt sich vom Lymphoblasten über Pro- und Prä-B-Zelle zur naiven reifen B-Zelle. Die Lymphopoese findet vornehmlich im Knochenmark statt, woran sich die Ausbreitung der naiven B-Zelle über das Blut in periphere Gewebe, wie Lymphknoten oder die Milz anschließt. Dort kommt es in Kooperation mit T-Zellen zur endgültigen Reifung der B-Zelle und

folgender Differenzierung zur Antikörperproduzierenden Plasmazelle [9]. Zunächst entstehen die schwere Kette des B-Zell-Rezeptors und der später durch die Plasmazelle zu produzierende Antikörper, woran sich die Ausformung der jeweiligen leichten Ketten anschließt. Diese Prozesse beruhen auf einer Reihe von Genumlagerungen der hierfür kodierenden Genabschnitte [10].

Im Knochenmark wirken die nicht-lymphatischen Stromazellen des Bindegewebes durch Interaktion mit den lymphozytären Vorläuferzellen auf die Entwicklung der Lymphozyten ein. Sie bilden über Zelladhäsionsmoleküle und deren Liganden Kontaktstellen aus und produzieren außerdem Zyto- und Chemokine, die die Differenzierung der heranwachsenden Lymphozyten kontrollieren.

MPPs exprimieren die Rezeptortyrosinkinase FLT3, welche den entsprechenden Liganden der Stromazellen bindet. Dies induziert die Differenzierung zur CLP über die Stufe der frühen lymphatischen Vorläuferzelle ELP (ELP = early lymphoid progenitor) [11]. Die CLP unterscheidet sich unter anderem durch die Expression des Oberflächenantigens CD 10 von der hämatopoetischen Stammzelle [4], welches als Marker der B- und T-Vorläuferzellen angesehen wird. Da aus der CLP ebenfalls die NK-Zellen hervorgehen, erfolgt als nächstes die Auftrennung dieser beiden Differenzierungswege. Hierbei übt der Transkriptionsfaktor Ikaros einen entscheidenden Einfluss aus. Fehlt dieser werden vermehrt NK-Zellen gebildet, was den Schluss nahelegt, dass er die Lymphopoese von B- und T-Zellen indirekt fördert [7, 12].

Essenziell für das Wachstum der frühen B-Zell-Vorläufer ist der Stammzellfaktor SCF, welcher mit der Rezeptortyrosinkinase Kit auf der Oberfläche der Vorläuferzelle interagiert. Außerdem ist die Expression des Chemokins CXCL12 durch die Stromazellen für die regelkonforme Entwicklung vonnöten, da dieses die frühen B-Zell-Vorläufer in der Umgebung des Knochenmarks hält [11]. Aus der CLP geht die Pro-B-Zelle als erste Stufe der spezialisierten B-Zell-Entwicklung hervor, wobei die endgültige Festlegung auf diese Zelllinie durch die Induktion der Transkriptionsfaktoren Pax 5 und E2A sowie des frühen B-Zell-Faktors EBF (EBF = early B-cell factor) erfolgt [7, 11, 13]. Diese steuern unter anderem die Expression von speziellen Proteinen dieses Entwicklungsstadiums, welche essenziell für die erfolgenden Genumlagerungen

sind. E2A fördert des Weiteren die Bildung von Pax 5 und EBF, was sich in E2A-defizienten Zellen in deren verminderter Expression zeigt [14]. In anderen Zelllinien erfolgt eine Inhibition des Promotors von Pax 5 und somit dessen Expression, welche im Rahmen der B-Zell-Lymphopoese durch die Bindung von EBF aufgehoben wird [15]. Dies führt zur Unterdrückung der Expression multipler, unter anderem myeloider Gene bis zum Stadium der reifen B-Zelle [13] und trägt somit maßgeblich zur Entwicklung zur B-Zelle bei. Dies wird durch die positive Wirkung von E2A auf die Bildung von Pax 5 gefördert, was sich gegensätzlich in der Entwicklung pluripotenter Zellen im Falle Pax 5- bzw. E2A-defizienter Zellen zeigt [14, 16, 17]. Außerdem induziert die Expression von Pax 5 die Migration der Vorläuferzellen innerhalb des Knochenmarks in eine spezifische Nische, welche durch das Vorliegen von IL-7 exprimierenden CXCL12⁺ Stromazellen gekennzeichnet ist [18].

Analysiert man die Oberfläche der Pro-B-Zelle, fällt auf, dass die Antigene CD 19 und CD 38 ab diesem Entwicklungsstadium ebenfalls exprimiert werden. CD 19 sowie das im weiteren Verlauf der Entwicklung gebildete CD 20 dienen als klassische Marker zur B-Zellidentifikation. CD 38 wird hingegen ebenfalls von T-Zellen exprimiert und deshalb als Erkennungsmerkmal für beide Immunzelllinien verwendet [11, 19, 20]. Man unterscheidet im Laufe der Entwicklung ein Stadium der frühen von der späten Pro-B-Zelle, welche auf den erfolgenden Umlagerungen der für die schwere Kette codierenden Genloci fußt. Auf diesem Prinzip beruhend erfolgt in den folgenden Entwicklungsstadien eine weitergehende Unterteilung in die große und kleine Prä-B-Zelle, gefolgt von der naiven, reifen B-Zelle. Im Stadium der Pro-B-Zelle kommt es zu zwei Umlagerungen (D-J- und V-DJ-Umlagerung), die die Ausbildung einer schweren Kette ermöglichen. Zur Prüfung der Funktionalität bildet die Pro-B-Zelle zunächst vorläufige „Ersatzproteine“, die anstatt der noch nicht generierten leichten Ketten angelagert werden. Ist dies erfolgreich, entsteht der Prä-B-Zellrezeptor, welcher die gelungene Umlagerung der für die schweren Ketten codierenden Gene signalisiert und damit den Übergang der Vorläuferzelle vom Stadium der Pro- in die Prä-B-Zelle ermöglicht [10]. Für diesen Übergang ist außerdem das Vorliegen des Transkriptionsfaktors Pax 5, dessen Produktion ebenfalls durch E2A und EBF induziert wird, vonnöten. Pax 5 induziert zum einen die Expression des B-Zell-Linker Proteins (BLNK), welches für die weitere

Entwicklung und die Signalgebung des späteren reifen B-Zell-Rezeptors benötigt wird [11] und wirkt zum anderen zusammen mit Ikaros fördernd auf die Expression akzessorischer Proteine zur Bildung des Prä- und definitiven B-Zellrezeptors ein [7].

Der Übergang von der Pro-B-Zelle zur großen Prä-B-Zelle geht mit mehreren Teilungszyklen einher, so dass aus einer Pro-B-Zelle schlussendlich zahlreiche kleine Prä-B-Zellen resultieren. Die Umlagerung der Genloci der leichten Kette beginnt erst im Stadium der kleinen Prä-B-Zelle, so dass nach den erfolgten Teilungen aus einer ehemaligen Pro-B-Zelle viele Zellen mit unterschiedlichsten Antigenpezifitäten entstehen können. Außerdem kommt es zum Verlust des Oberflächenantigens CD 34, was die zunehmende Entfremdung von der hämatopoetischen Stammzelle durch Differenzierung unterstreicht [19–21]. Im Verlauf der beiden Prä-B-Zell-Stadien steht die Umlagerung der Gene der leichten Kette im Vordergrund. Ferner sind für die Bildung des endgültigen B-Zell-Rezeptors weitere Proteine erforderlich, deren Expression im Stadium der Prä-B-Zelle beginnt. Dazu gehören die beiden invarianten Proteine CD 79 α und CD 79 β , welche Signale des Rezeptors über ihre zytoplasmatischen Anteile durch Interaktion mit intrazellulären Tyrosinkinasen weiterleiten. Diese können im weiteren Sinne ebenfalls als B-Zellmarker angesehen werden, da sie nur von diesem Zelltyp exprimiert werden [11]. Für die Aktivierung der Transkription von CD 79 α sind unter anderem die Transkriptionsfaktoren E2A, EBF und Pax 5 erforderlich [7, 22].

Mit Ausbildung funktioneller leichter Ketten und deren Assoziation mit der schweren Kette, kann das erste Immunglobulin IgM auf der Oberfläche (sIgM = surface IgM) exprimiert werden, was zum Übergang der Zellen ins Stadium der naiven B-Zelle führt [23]. Das sIgM bildet zusammen mit CD 79 α und CD 79 β einen funktionsfähigen B-Zell-Rezeptor-Komplex aus. Die durch CD 79 α vermittelten Signale entscheiden zusätzlich darüber, ob die naive B-Zelle aus dem Knochenmark ins Blut übertreten kann [11, 24]. Darüber hinaus nimmt die Anzahl der auf der Oberfläche befindlichen Proteine durch die zusätzliche Expression von CD 20, CD 21 und CD 22 merklich zu [11, 19, 25].

1.2 Akute lymphatische Leukämie – Klinische Gesichtspunkte

1.2.1 Allgemeine Informationen

Die akute lymphatische Leukämie (ALL) ist eine plötzlich auftretende Erkrankung des Knochenmarks, welche sich stark progredient verhält und nach kurzer Zeit unbehandelt zum Tode führen kann. Die Erkrankung weist eine Inzidenz von 1,1 Fällen pro 100.000 Einwohnern pro Jahr [26] auf. Außerdem ist eine leichte Prädominanz zum männlichen Geschlecht erkennbar (1,4 : 1,0) [26]. Bei der adulten ALL sinkt mit dem Erkrankungsalter die 5 – Jahresüberlebensrate von 30 – 40 Prozent bei Patienten unter 60 Jahren auf unter 5 Prozent nach dem 70. Lebensjahr [27].

Das entstehende Krankheitsbild beruht auf einer malignen Veränderung lymphatischer Vorläuferzellen im Knochenmark, welche zu einer Blockade der Differenzierung dieser Blasten und zu starker Zunahme der Vorläufer führt. Hierbei sind mit 65 Prozent die somatischen Mutationen, vor allem chromosomale Translokationen, eine sehr häufige Ursache [28]. Der so entstehende Zellklon vermehrt sich rapide, was zu einer fortschreitenden Verdrängung der physiologischen Blutbildung und schlussendlich zu einer hämatopoetischen Insuffizienz des Knochenmarks führt [26]. Aus der entstehenden Knochenmarksinsuffizienz resultieren meist die ersten akut auftretenden und unspezifischen Symptome. Infolge mangelnder Erythropoese entwickelt sich eine Anämie mit Müdigkeit und Blässe. Außerdem berichten die Betroffenen von einem auffällig erhöhten Auftreten von Hämatomen oder vermehrtem Zahnfleischbluten, hervorgerufen durch die Thrombozytopenie, sowie über erhöhte Infektanfälligkeit, welche durch die Neutropenie bedingt ist. Mehr als die Hälfte der Patienten weist zudem vergrößerte Lymphknoten auf. Anderweitige Symptome sind abhängig vom Vorliegen weiterer Organmanifestationen zum Beispiel im ZNS (Zentrales Nervensystem) oder der Haut.

Die WHO (World Health Organization = Weltgesundheitsorganisation) grenzt die ALL von dem lymphoblastischen Lymphom (LBL) ab. Entscheidend für die Differenzierung dieser beiden Krankheitsbilder ist der prozentuale Anteil der Blasten an allen vorhandenen Knochenmarkszellen. Finden sich mehr als 25% Blasten im Knochenmark wird die Diagnose der ALL gestellt; liegen weniger als 25 % Vorläuferzellen vor, spricht man von einem LBL [26, 29]. Im Vergleich sind

die Neoplasien der B-Zellen mit 76 % deutlich häufiger als die T-Zell-Leukämien [26].

1.2.2 Diagnostik

Entscheidender Schritt der Basisdiagnostik ist das Differenzialblutbild, wobei mehr als 90 % der Patienten Blasten aufweisen, sowie bei über 50 % eine Leukozytose mit mehr als 10.000 Leukozyten/ μ l Blut vorliegt [26]. Die Verdachtsdiagnose wird durch eine Knochenmarkspunktion durch Anhäufung von Vorläuferzellen bestätigt, wobei sich im Akutstadium der ALL bei circa 97 % der Patienten eine Infiltration des Knochenmarks mit mehr als 50% Lymphoblasten nachweisen lässt [26]. Die weitergehenden Untersuchungen dienen zum einen der Definition des Krankheitsstadiums (Staging) und zum anderen der Typusbestimmung. Zum Staging wird u.a. bildgebende Diagnostik zur Evaluation vorliegender Organmanifestationen, wie einer Splenomegalie (pathologische Größenzunahme der Milz) oder Beteiligung der Lebern verwendet. Mittels Immunphänotypisierung der malignen Blasten werden exprimierte Oberflächenmarker detektiert, welche die Zuordnung zu den verschiedenen Subgruppen der ALL ermöglichen. Sie stellen außerdem potentielle Strukturen für eine zielgerichtete, individualisierte Therapie des Patienten dar. Außerdem werden zytogenetische Analysen, welche mögliche Chromosomenveränderungen, ob strukturell oder in deren Anzahl nachweisen können und molekulargenetische Untersuchungen der Erkrankung durchgeführt. Häufig nachweisbare Veränderungen sind die Bcr-Abl- Mutation (Translokation zwischen Chromosom 9 und 22) oder das Vorliegen der MLL-AF4-Mutation (Translokation zwischen Chromosom 4 und 11). Die Bestimmung der Minimalen Resterkrankung (minimal residual disease [MRD]) nach erfolgter Therapie erlaubt den Nachweis leukämischer Blasten mit einer Sensitivität von 0,01%, was dem Nachweis einer Vorläuferzelle in 10.000 normalen Zellen entspricht [26, 30]. Zu den verwendeten Verfahren gehört unter anderem die durchflusszytometrische Analyse der Zellen. Die größte Sensitivität weist der Nachweis patienten- bzw. krankheitsspezifischer Gen-Veränderungen auf, welche mittels real-time-PCR (polymerase-chain-reaction = Polymerase-Ketten-Reaktion) detektierbar sind [30]. Außerdem weist die PCR weitere Vorteile, wie zum Beispiel die hohe Stabilität der DNA als Analyseobjekt, sowie das hohe

Maß der Standardisierung und die Anwendbarkeit bei einem großen Teil der Erkrankten [31–33] auf.

1.2.3 Risikostratifikation und prognosebeeinflussende Faktoren

Anhand standardisierter Faktoren werden die Patienten in drei Risikogruppen eingeteilt: Standardrisiko, hohes Risiko und höchstes Risiko.

Erkrankte mit einem Standardrisiko erlangen in weniger als drei Wochen Therapie eine komplette Remission (CR = complete remission) und weisen nach initialer CR weniger als 30.000 Leukozyten/ μ l Blut auf. Sind mehr Leukozyten nachweisbar oder ist der Patient an einer pro-B-ALL erkrankt, wird er der Kohorte mit hohem Risiko zugeordnet. Weitere Faktoren dafür sind das Vorliegen der MLL-AF4-Mutation oder das Nichterreichen einer kompletten Remission im Rahmen der dreiwöchigen Therapie. Patienten, die positiv für ein Philadelphia-Chromosom (Bcr-Abl-Mutation) sind, gehören grundsätzlich zu den Patienten mit höchstem Risiko [29, 34].

Mittlerweile sind weitere ungünstige Prognosefaktoren, wie die Mutation oder Deletion des Gens Ikaros, bekannt, welche beim Auftreten mit einer schlechteren Prognose einhergehen und das Rezidivrisiko sowie das Risiko für Komplikationen signifikant erhöhen [35, 36]. Diese Assoziation ist unabhängig vom Patientenalter, der Anzahl der im Blut zirkulierenden Leukozyten bei Diagnosestellung und dem zytogenetischen Subtyp der Erkrankung sowie des Bcr-Abl-Status [36]. Besonders ungünstig auf das Langzeitüberleben des Patienten wirkt sich ein Therapieversagen aus, welches mit einem erhöhten Risiko des generellen Rezidivs einhergeht [26, 37]. Außerdem zeigt sich ein signifikant höheres 5-Jahresüberleben der Patienten mit konstanter CR (molekulare CR 74% \pm 3% versus molekulares Versagen 35% \pm 5%) [26, 38]. Aktuell geht man von einem Langzeitüberleben von 80 % bei Vorliegen einer reifzelligen B-ALL und 60-70 % im Falle einer Standardrisiko-ALL aus. Hochrisikopatienten weisen ein Überleben von 30-50 % auf, wobei Patienten mit einer Bcr-Abl-Mutation durch suffiziente Therapiemaßnahmen ein Überleben von 50-60 % erreichen [26]. Das Erlangen der molekularen Remission wird negativ durch eine Zunahme des Patientenalters beeinflusst. Erreichen in der Kohorte der Patienten bis zu 25 Jahren 53 % der Betroffenen

eine CR, zeigen Studien, dass dies bei älteren Patienten nur noch in bis zu 37 % der Fälle gelingt [39]. Der Stammzelltransplantation (SZT) kommt eine entscheidende Bedeutung für das Überleben der Betroffenen zu, da Patienten ohne SZT in der Regel ein Jahr nach Auftreten ihres Rezidivs nicht mehr am Leben sind. Im Vergleich dazu beträgt die Überlebensrate der Patienten, die eine SZT erhalten haben, mehr als 38 % [39].

Die Standardtherapie induziert zwar in bis zu 90% der Patienten eine primäre zytogenetische „Remission“ [26], jedoch erreichen 30 % dieser keine molekulare CR [38]. Dies kann erklärend für die bei bis zu 50 % der Patienten [38, 40] auftretenden Rezidive angesehen werden, die mit einer Heilungschance von weniger als 20 % einhergehen. Hierbei erleiden ein Drittel der Patienten mit Standardrisiko und bis zu zwei Drittel der Hochrisikopatienten ein Rezidiv [39].

1.2.4 Therapie

1.2.4.1 *allgemeines Therapieregime*

Die Therapie der adulten ALL erfolgt als zyklische Kombinationstherapie verschiedener Chemotherapeutika, die auf dem etablierten Regime pädiatrischer ALL-Therapien basiert. Die Etablierung einer unabhängigen, standardisierten Behandlung erwachsener Patienten ist bisher nicht erfolgt. Die Therapie ist sehr zeit- und dosisintensiv und wird deswegen mit bestmöglicher Supportivtherapie ergänzt. Während der gesamten Therapiezeit wird die MRD überwacht und die aktuelle Behandlung gegebenenfalls an den individuellen Verlauf des Patienten angepasst. Bei Patienten der Hochrisiko-Kohorte wird grundsätzlich eine SZT in Erwägung gezogen.

Die Therapie gliedert sich in drei voneinander unterscheidbare Phasen: zunächst die Induktionstherapie, gefolgt von der Konsolidierung- und abschließend die Erhaltungstherapie [26] (siehe Abbildung 2). Die Induktionstherapie wird primär mit dem Ziel des Erreichens einer primären Remission durchgeführt. Insgesamt erfolgt die Induktionstherapie über sechs bis sieben Wochen, wobei das Erreichen einer möglichen Remission nach jeder einzelnen Phase analysiert wird. Die Frühmortalität beträgt fünf Prozent, wobei die Patienten größtenteils an einer Infektion versterben [41, 42]. Die

abschließende Phase der Erhaltungstherapie erfolgt in der Regel ambulant über einen Zeitraum von zweieinhalb Jahren.

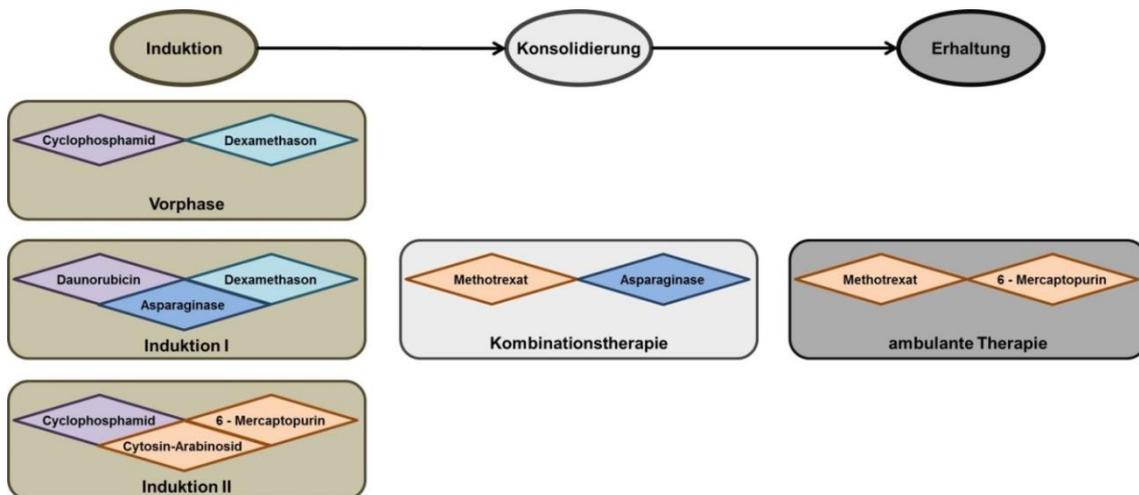


Abbildung 2: Ablauf des allgemeinen Regimes zur Therapie der Akuten lymphatischen Leukämie (Farbcode: brombeere → Zytostatikum, türkis → Glukokortikoid, blau → Hemmung der Zellteilung und orange → DNS-Synthesehemmung)

Neben den durchgeführten chemotherapeutischen Phasen der Therapie erhält jeder Patient eine medikamentöse Prophylaxe zur Vermeidung möglicher ZNS-Rezidive. Die GMALL empfiehlt hierzu eine weitere systemische Therapie mit ZNS-gängigen Substanzen, eine intrathekale Therapie (Applikation der Therapeutika in das das Rückenmark umgebende Nervenwasser) und eine Schädelbestrahlung (mindestens 24 Gy [Gray]).

Die Indikation zur SZT besteht nach aktuellen Empfehlungen der GMALL bei 50 % der Patienten. Sie wird in der Regel im Zustand der kompletten Remission, bevorzugt nach den Phasen der Induktions- und der ersten Konsolidierungstherapie durchgeführt [26].

1.2.4.2 Therapie der ALL im höheren Patientenalter

In der ALL wird häufig von der Therapie der „jungen“ Patienten gesprochen, wobei definitionsgemäß in dieser Patientengruppe alle Erkrankten zusammengefasst werden, die von einem pädiatrisch-basierten Therapieregime profitieren. Gegensätzlich dazu existiert jedoch keinerlei Definition der „älteren“ Patienten. Generell lässt sich feststellen, dass die Verteilung der verschiedenen Inzidenzen und deren Verlauf sich mit zunehmendem Lebensalter verändert. Beispielsweise findet sich bei Patienten älter als 60 Jahre ein Anstieg der B-Zell-ALL von 59-66 % bei jüngeren Betroffenen auf 75-89 %. Außerdem treten häufiger Chromosomen-Aberrationen auf (PH+ 24-36 % im Vergleich zu

lediglich 15-16% im jüngeren Patientenkollektiv) [43–45]. Tendenziell erscheint der Progress der Krankheit langsamer vonstatten zu gehen und die Patienten weisen weniger anderweitige Organmanifestationen auf [46, 47]. Das frühzeitige Vorliegen der MRD sowie deren Verlauf stellen auch im höheren Patientenalter einen wichtigen Prognosefaktor dar. Es zeigte sich, dass lediglich 11 % der „älteren“ Patienten mit molekularem Versagen im Anschluss an die erste Konsolidierungstherapie den Status der CR noch erreichen im Vergleich zu denjenigen die primär eine molekulare Remission erlangten (68%) [43, 48].

1.2.5 Mögliche Folgen für den Patienten

Die hohen Dosen unter anderem der Chemotherapeutika und der erfolgten Bestrahlung des Schädels können im weiteren Verlauf der Patientengeschichte zu verschiedenen Spätfolgen, wie zum Beispiel dem frühen Auftreten eines Grauen Stars führen. Des Weiteren kann es zu Infertilität oder Knochennekrosen sowie der Entstehung von Zweitmalignomen kommen. Hormonelle Störungen oder das Auftreten psychischer Erkrankungen können ebenfalls mit der erfolgten ALL-Therapie assoziiert sein, wurden aber vor allem bei pädiatrischen Patienten beobachtet [26]. Außerdem besteht das bereits angesprochene Risiko des Rezidivs, welches ein 5-Jahresüberleben nach Auftreten von weniger als 10 % aufweist [40, 49]. In Folge dessen sind regelmäßige Kontrollen des Blutbildes und des Knochenmarks sowie die Bestimmung der MRD als wichtiger Prognosefaktor obligat.

1.3 Akute lymphatische Leukämie – im Fokus der Forschung

Eine optionale Erklärung für das bestehende Rezidivrisiko wird in der vermutlich unvollständigen Elimination der Leukämie-induzierenden Zellen (LIZ) im Rahmen des primären Therapieregimes gesehen. Diese Zellen weisen die besondere funktionale Fähigkeit auf, eine Leukämie beispielsweise im Mausmodell zu initiieren und Ausbreitung und Fortschritt der resultierenden Krankheit zu fördern. Sie können in ihren Eigenschaften den hämatopoetischen Stammzellen ähneln [1], was aber keine Voraussetzung für ihre leukämieinduzierenden Fähigkeiten sein muss [50]. Man findet sie ebenfalls im Knochenmark, wobei die Bedeutung der Existenz einer Nische für die LIZ nicht

eindeutig ist. Hierbei ist unklar, ob die LIZ dieselben Nischen nutzen wie normale Stammzellen oder eigene Nischen generieren, beziehungsweise ob sie im Vergleich weniger nischenabhängig sind. Eine Option entdeckten Medyouf, Mossner et al 2014 als sie das Phänomen der Reprogrammierung der Stromazellen des Knochenmarks durch myelodysplastische Zellen identifizierten, welche zur Erschaffung einer für die Tumorzellen individuellen Nische führte [51]. Dieses Phänomen resultierte in einem schnelleren Anwachsen der transplantierten myelodysplastischen Zellen bei Kotransplantation mit patienteneigenen Stromazellen im Vergleich zu normalen Stromazellen. Die Beschreibung der Biologie und des Immunphänotyps der LIZ der ALL gestaltet sich schwierig, was sich in den bisherigen widersprüchlichen Publikationen zu diesen Themen widerspiegelt [49, 52]. Diese beschreiben unterschiedliche Kombinationen von Oberflächenmarkern des CD-Systems zu deren Identifizierung. Diese Unsicherheit erschwert weitergehende molekulare Analysen zur Charakterisierung der LIZ erheblich, da die hierzu gewünschte Verwendung reiner Populationen verhindert wird [53]. Die ersten LIZ der ALL wurden in CD34+/CD19- Subgruppen detektiert [54–57], jedoch zeigten weitere Analysen, dass das Potential zur Induktion der Leukämie nicht abhängig vom CD34 Status der Zellen ist. Dies spiegelte sich unter anderem in der MLL-AF4 positiven ALL [58], sowie anhand von Transplantationsversuchen primären Patientenmaterials pädiatrischer ALL [59] wieder. Betrachtet man außerdem den Einfluss des Oberflächenmarkers CD 38, ist die Leukämieinduktion ebenfalls unabhängig von dessen Expression, wie Blatt et al. mittels erfolgreicher Transplantation von CD34+/CD38+ und CD34+/CD38- Zellen zeigten [53]. Des Weiteren gestaltet sich die Oberflächenexpression von CD34 und CD38 als hoch variabel; die Marker werden zum Teil innerhalb weniger Stunden hoch- oder runterreguliert, so dass diese nur eingeschränkt zur Identifizierung von LIZ einsetzbar sind [60, 61]. Bezüglich der Beziehung der LIZ zur restlichen Population werden mittlerweile zwei konkurrierende Theorien vertreten. Zum einen existiert die Hypothese, dass leukämische Zellen, die fähig sind eine ALL *in vivo* zu induzieren, einen individuell zu definierenden Zelltyp innerhalb einer hierarchisch organisierten Gesamtpopulation (Modell der steilen Hierarchie) darstellen, welcher sich in seinen Eigenschaften unter anderem durch Vorliegen eines Selbsterneuerungspotenzials von den anderen

Zellen unterscheidet. Demgegenüber geht das Modell der flachen Hierarchie davon aus, dass die Fähigkeit zur Initiation eine funktionale Option aller zur leukämischen Population gehörenden Blasten ist. Besonders interessant zeigt sich die Erkenntnis, dass nicht nur unreife Blasten, sondern auch bereits anteilig differenzierte Vorläuferzellen (zum Beispiel CD34-/CD19+) zur erneuten Krankheitsinitiation fähig sind [54, 59, 62], was das Modell der flachen Hierarchie unterstützen würde.

Im Krankheitsverlauf kann es zur Entstehung weiterer genetischer Abweichungen kommen, so dass sich die nach einem Rezidiv führende Zellpopulation von dem im Rahmen der Erstdiagnose dominierenden Klon unterscheidet. Dies kann sich beispielsweise durch Veränderungen der Anzahl oder Art der DNA CNAs (CNA = copy number of abnormalities = Kopienanzahl der Abweichungen) manifestieren. Beispielhaft fand sich in einer B-ALL eine signifikante Zunahme der Deletionsanzahl im Vergleich zwischen Rezidiv und Primärerkrankung [63]. Im Übrigen waren die das Rezidiv initiierenden Zellen teilweise bereits im Rahmen der Primärdiagnostik der Erkrankung als kleine Subpopulation nachweisbar beziehungsweise entwickelten sich in 34 % der Fälle nachweislich aus dem primär vorherrschenden Klon [63, 64]. Der Nachweis der Rezidiv-initiiierenden Zellen bereits im Rahmen der ersten Diagnostik, legt die Annahme nahe, dass diese eine geringere Sensitivität gegenüber den verwendeten Therapeutika aufweisen [64] und dementsprechend durch die Primärtherapie nicht eliminiert wurden.

Die folglich anzunehmende Heterogenität der leukämischen Subpopulationen wurde bereits 2004 durch Pui et al. [65] beschrieben und 2011 durch „next generation sequencing“ bestätigt, welches offenbarte, dass Gesamtpopulationen einer ALL aus multiplen Subgruppen in einem Patienten bestehen, welche großen Variationen bezüglich ihrer Zellgröße und ihrem Genom unterliegen können. Ferner zeigten sich diese als unterschiedlich resistent gegenüber antileukämischen Arzneimitteln [66].

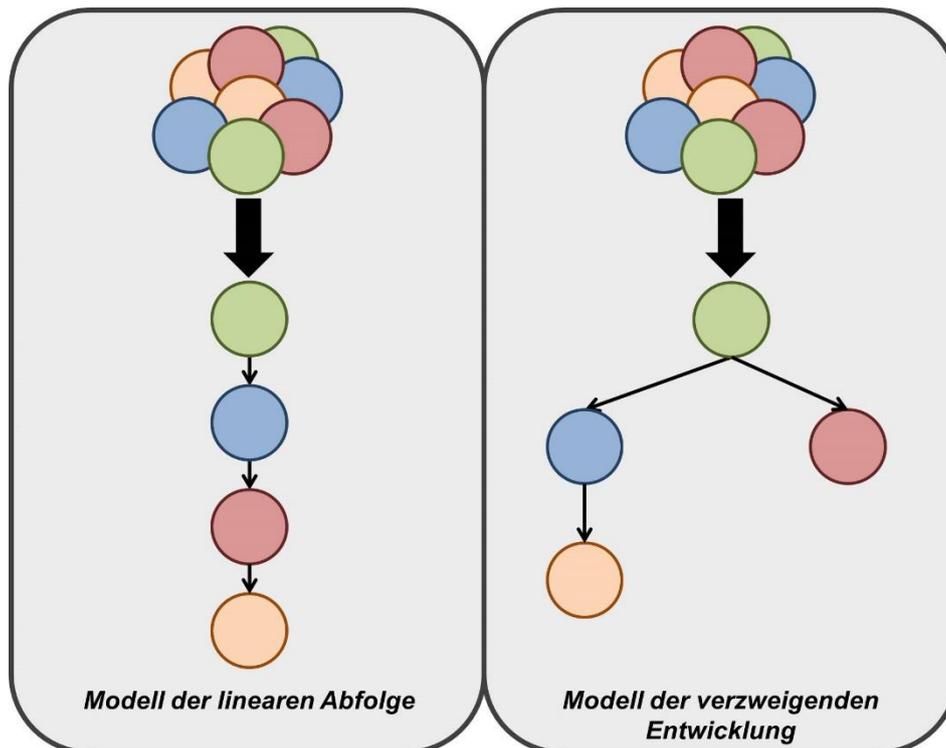


Abbildung 3: Modell der linearen Abfolge gegenüber dem Modell der verzweigenden Entwicklung

Diese Erkenntnis kann durch zwei unterschiedliche Entwicklungsmodelle erklärt werden: zum einen das Modell der sich verzweigenden Entwicklung, bei dem aus einem gemeinsamen Vorläufer unterschiedliche Zweige hervorgehen, die im Laufe der Zeit verschiedene weitere Mutationen und Veränderungen durchlaufen. Eine andere Erklärung findet sich in dem Modell der linearen Abfolge, welches die schrittweise Entwicklung hervorgehend aus einem eindeutigen Vorläufer entlang einer einheitlichen Reihenfolge von Schritten beschreibt, wobei das Vorliegen der heterogenen Zellpopulationen in den leukämischen Zellen durch das parallele Auftreten aller Entwicklungsstufen zu erklären wäre (siehe Abbildung 3). Unterschiedliche Studien zeigen das Vorliegen multipler Subgruppen leukämischer Zellen innerhalb eines Patienten und legen nahe, dass das Modell der sich verzweigenden Entwicklung der Realität näher kommt [67–71].

Betrachtet man nun bestimmte Eigenschaften, wie den Metabolismus von ALL-Zelllinien, weisen diese Stoffwechselveränderungen auf, die eine gesteigerte Aktivität der Glykolyse mit folgendem anaeroben Metabolismus des Pyruvats erkennbar machen [72]. Diese wurden in ähnlicher Weise bereits 1924 durch Otto Warburg (Warburg-Effekt) in Zellen von Gewebstumoren beschrieben,

welche in Anwesenheit von Sauerstoff ihre Energie größtenteils mittels Glykolyse gewinnen [73–75]. Folglich fällt die pro Glukosemolekül generierte Energiemenge durch den geringen Anteil der Atmungskette verhältnismäßig klein aus [76].

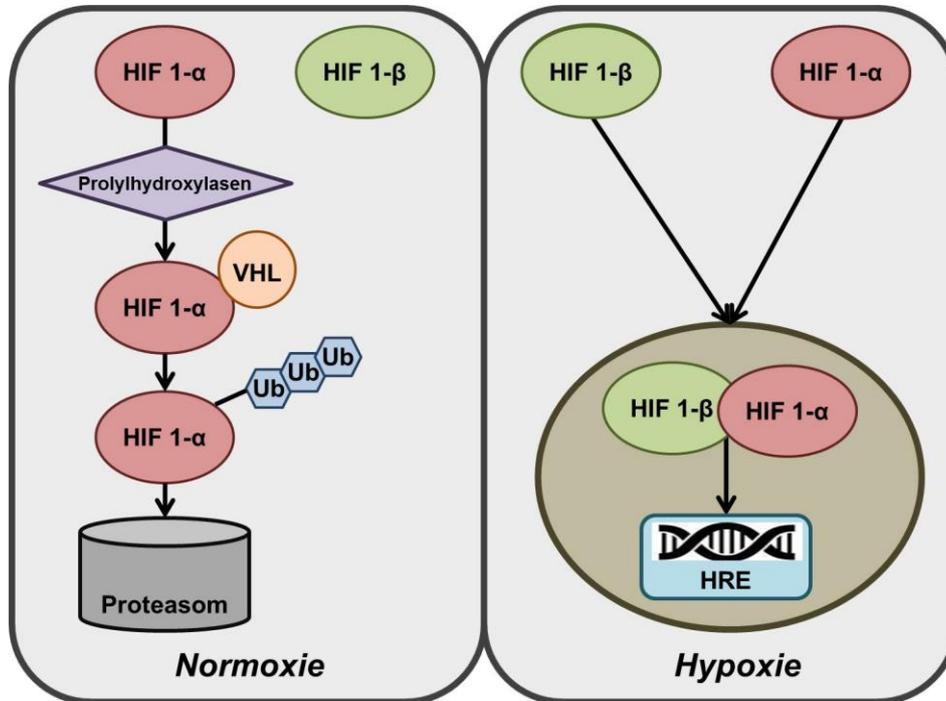


Abbildung 4: HIF - 1 α Degradation unter normoxischen Bedingungen infolge der Hydroxylierung und Ubiquitinylierung durch das VHL (Von-Hippel-Lindau-Protein) durch das Proteasom vergleichend zur Dimerisierung mit HIF - 1 β und anschließender Delokalisierung in den Zellkern zur Initiierung der Transkription der durch HRE (Hypoxie-responsiblen Elemente) markierten Gene

Physiologisch stellt der Transkriptionsfaktor HIF 1, welcher sich aus den zwei Untereinheiten α und β zusammensetzt, eine Schaltstelle des Glukosestoffwechsels dar. Infolge seiner Aktivierung wird die Transkription verschiedenster Gene zur Regulation des Stoffwechsels beim Vorliegen einer Hypoxie hervorgerufen [77]. Hierzu gehören unter anderem auch Enzyme der Glykolyse und Glukosetransporter, so dass bei Vorliegen von HIF 1 vermehrt Glykolyse zur Energieproduktion betrieben wird [78, 79]. Die beiden Untereinheiten von HIF 1 werden kontinuierlich produziert, wobei die α -Untereinheit sauerstoffabhängig abgebaut wird.

Unter normoxischen Bedingungen im Umfeld der Zelle wird durch Hydroxylierung der Proline 402 und 564 die zu degradierende α -Untereinheit gekennzeichnet und nach erfolgter Ubiquitinylierung durch das Proteasom abgebaut [80–83]. Dies kann jedoch nur in Anwesenheit von Sauerstoff

stattfinden, da das zuständige Enzym diesen als Kosubstrat benötigt. Außerdem löst sich das für die Degradierung benötigte Von-Hippel-Lindau-Protein von der Sauerstoff-abhängigen-Degradierungs-Domäne des HIF - 1 α bei Sauerstoffmangel [82]. Folglich wird HIF - 1 α bei vorliegender Hypoxie nicht mehr degradiert und kann ein Heterodimer mit der β -Untereinheit bilden, welches in den Kern der Zelle transloziert und dort die Transkription seiner Zielgene induziert [80, 83–85]. Da sich die leukämischen Zellen zur Initiation der Erkrankung primär im Knochenmark vermehren, könnte der Warburg-Effekt einen Expansionsvorteil dieser gegenüber den physiologisch vorliegenden Zellen des Knochenmarks darstellen, so dass diese selbst in hypoxischen Nischen große Energiemengen generieren könnten.

1.4 Zielsetzung der Dissertation

Eine eindeutige Identifizierung der LIZ über die Expression von Oberflächenmarkern, wie es Dominique Bonnet und John E. Dick bereits 1997 für die AML gelungen ist [86], scheint in der ALL mit aktuellem Wissen nicht möglich zu sein, so dass die detailliertere Analyse der Eigenschaften der LIZ erschwert ist. Jedoch ist im Rahmen von Stoffwechselanalysen ein von physiologischen Knochenmarkszellen abweichendes Verhalten detektiert worden, was zu der Überlegung führte, dass die Aufklärung der funktionellen und metabolischen Veränderungen bezüglich Glukoseaffinität und -aufnahme sowie der Glykolyse in der adulten ALL eine weitergehende Charakterisierung der LIZ ermöglichen könnte. Wir stellten die Hypothese auf, dass die größere Glukoseaffinität und folglich vermehrte Aufnahme zur Deckung des Energiebedarfs der Zelle mittels Glykolyse im Zusammenhang mit höherer Aggressivität der initiierten Leukämie steht. In der Erwartung, weitere relevante Angriffspunkte für die Entwicklung neuer Therapiestrategien aufdecken zu können, wird dieser Aspekt in der folgenden Dissertationsschrift näher beleuchtet.

Hierbei wurde der Fokus zunächst auf die Analyse potentieller Unterschiede in der Glukoseaffinität zwischen verschiedenen aggressiven ALL-Subtypen gelegt. Die bereits durch „next generation sequencing“ bekannte Heterogenität der Leukämie innerhalb eines Patienten sollte bezüglich der Affinität zur Glukose

weitergehend untersucht werden. Die hierbei gewonnenen Erkenntnisse wurden anschließend mittels eines Transplantationsexperimentes evaluiert. Als übergeordnetes Ziel ist der Versuch einer potentiellen Identifizierung und Definition der LIZ anhand ihres Kohlenhydratmetabolismus anzusehen, repräsentiert durch die relativ einfach zu detektierende Messgröße des Aufnahmeverhaltens der Zelle gegenüber Glukose.

2. Material und Methodik

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Allgemeine Lösungen

Tabelle 1: Puffer und Lösungen

	Hersteller
Kulturmedium <ul style="list-style-type: none">• Iscove Basal medium• Hessen-Bräu• 1% Penicillin-Streptomycin• 1% L-Glutamin	<ul style="list-style-type: none">• Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland• gibco by LifeTechnologies, Darmstadt, Deutschland• gibco by LifeTechnologies, Darmstadt, Deutschland
PBS (Phosphat buffered saline)	<ul style="list-style-type: none">• gibco by LifeTechnologies, Darmstadt, Deutschland
FACS-Puffer (gelagert bei 4 °C) <ul style="list-style-type: none">• PBS• 10 % FBS (fetal bovine serume)• 1 mM EDTA• 0,1 % NaN₃	<ul style="list-style-type: none">• gibco by LifeTechnologies, Darmstadt, Deutschland• gibco by LifeTechnologies, Darmstadt, Deutschland
humanes Pancoll	<ul style="list-style-type: none">• PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland

2.1.2 Zellkulturmedien

Das Kulturmedium Iscove Basal wurde mit 4 % Hessen-Bräu (nach Nijmeijer [87]), ein Prozent Penicillin-Streptomycin und ein Prozent L-Glutamin angereichert. Das Einfriermedium setzte sich aus folgenden zwei Medien zusammen: Medium 1 bestand aus 80 % RPMI (v/v) und 20 % FBS (v/v). Medium 2 bestand aus 80 % RPMI (v/v) und 20 % DMSO (v/v).

2.1.3 Antikörper für Durchflusszytometrie

Tabelle 2: Antikörper und Reagenzien für die Durchflusszytometrie

Antigen	Träger	Klon	Hersteller	Artikelnr.	Konjugat
humaner GLUT – 1	monoklonal Maus IgG _{2B}	202915	R & D Systems	FAB1418P	PE
Isotyp-Kontrolle	monoklonal Maus IgG _{2B}	133303	R & D Systems	IC0041P	PE
humanes CD 45	Maus IgG _{1, K}	2D1	BD Horizon	642275	V450
murines CD 45.1	Maus IgG _{2A, K}	A20	BioLegend	110728	PerCP – Cy5.5
humanes CD 20	Maus IgG _{2B, K}	2H7	eBioscience	9011-0209	FITC
humanes CD 34	Maus BALB/c IgG _{1, K}	8G12	BD Horizon	345804	APC
humanes CD 38	Maus IgG _{1, K}	HB7	eBioscience	12-0388-42	PE
2 – NBDG			ThermoFisher	N13195	FITC
Lebend- farbstoff			eBioscience	65-0865-14	APC-Cy7

Antigen	Klon	Hersteller
HIF1 α aufgereinigt, Reakt.: Hu, 150 μ g	54/HIF1 α	BD Bioscience
Goat anti-mouse IgG, HRP konjugiert		Merck, Millipore
β -Aktin	AC-15	Sigma-Aldrich

2.1.4 Chemikalien und Kits

Tabelle 3: Chemikalien und Kits

	Hersteller
Cobaltchlorid CoCl_2	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
BD Pharm Lyse	BD bioscience, Franklin Lakes, USA

2.1.5 Ausstattung des Laboratoriums

Tabelle 4: verwendete Geräte

	Hersteller
BD FACS AriaIII cell sorter	BD, Franklin Lakes, USA
BD FACS Fortessall	BD, Franklin Lakes, USA
Gefrierschrank (-80°C) Heraeus	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr, Bulle, Schweiz
Kühlschrank	Liebherr, Bulle, Schweiz
Inkubator für Zellkultur Heraeus	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Päparationsbesteck	Heiland, Hamburg, Deutschland
Sterilwerkbank, HERAsafe KSP	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Vortex Minishaker	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Waage	Kern und Sohn GmbH, Deutschland
Zellzähler TC20	BioRad, Hercules, Berkeley, USA
Zentrifuge Heraeus Megafuge 1.0R	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zentrifuge Rotana 460R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge, tabletop (Rotanta 200, 220R)	Hettich, Tuttlingen, Deutschland

Tabelle 5: Laborausstattung

	Hersteller
Aspirationspipetten (2 ml)	BD, Franklin Lakes, USA
Einfrierbox	NeoLab, Heidelberg, Deutschland
FACS Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Falcon, sterile Zentrifugenröhrchen (5, 15 und 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Gewebekulturplatten (6, 12, 24, 96 wells)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Insulinspritze (BD)	Franklin Lakes, USA
Kombitips plus (1, 5 und 10 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Konische Polystyrolröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Kryoröhrchen (2 ml)	Sigma, St.Louis, USA
Microvette zur Blutentnahme	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Nylonmembran	Merck Millipore, Billerica, USA
Pasteurpipetten (Glas)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pipettenspitzen (10, 100, 200 und 1000 µl)	Gilson, Limburg-Offheim, Deutschland
Reaktionsröhrchen (0,1, 0,2, 1,5 und 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Schutzhandschuhe (Latex, Nitril)	Meditrade, Kiefersfelden, Deutschland
Skalpelle	Mediware Servoprax, Wesel, Deutschland
Silikon Aussparungen	IBIDI, München, Deutschland
Spritzen (5, 10 und 20 ml)	Braun, Melsungen, Deutschland
Sterile Zellsiebe	BD, Franklin Lakes, USA
Sterile Filter (0,22 und 0,50 µm)	Merck Millipore, Billerica, USA
Sterile Pipetten (2, 5, 10 und 25 ml)	Sterile pipettes (2, 5, 10 and 25 ml)
Zählkammern C-Chip, Neubauer verbessert	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Zellkulturflaschen (25, 75 und 175 cm ²)	BD, Franklin Lakes, USA

2.1.6 Mauslinien

Für die durchgeführten Transplantationsexperimente wurden Tiere der NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ – Linie verwendet. Diesen wurde jeweils im Alter von 6-8 Wochen die entsprechenden Zellen intravenös in die Schwanzvene injiziert. Infolge der zuchtbedingten starken Immunsuppression der Tiere, wurden sie unter spezifischen pathogenfreien Bedingungen gezüchtet und gehalten. Die Versuche wurden nach den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt und von der relevanten Prüfstelle (Regierungspräsidium Darmstadt) genehmigt.

2.1.7 Software

Tabelle 6: Software

	Produzent
BD FACS DIVA 7/8	BD Bioscience
GraphPad Prism 6/7	GraphPad
MS Office 2013	Microsoft GmbH, Deutschland

2.2 Patient-derived long-time cultures (PDLTCs) = aus primärem Patientenmaterial gewonnene Langzeitkulturen (LZK)

Generelle Schlüsse aus Untersuchungen der Leukämie-Entstehung in der adulten ALL zu ziehen, gestaltete sich bis vor wenigen Jahren schwierig, da es sich hierbei, um ein komplexes Krankheitsbild mit großer Heterogenität zwischen verschiedenen Patienten handelt. Bis zur Etablierung eines einzigartigen zellulären Modells durch Nijmeijer et al. [87] war lediglich die Nutzung langjährig bekannter ALL-Zelllinien möglich, die jedoch die Heterogenität der Erkrankung nicht widerspiegeln können.

Dieses Modell basiert auf primär gewonnenem Knochenmarksmaterial unbehandelter Patienten, welches über einen längeren Zeitraum kultivierbar ist (siehe Abbildung 5). Zur Entwicklung des Modells wurden zunächst 34 Patienten ausgewählt, deren Proben in mehreren Ansätzen unter unterschiedlichen Bedingungen dem Versuch der längerfristigen Kultivierung unterzogen wurden. Die Kulturmedien unterschieden sich hierbei in ihrem Gehalt an Serum und Wachstumsfaktoren (serumfrei, Medium mit 10%

humanem Serum, Medium mit den Wachstumsfaktoren HGF [human growth factor], IL-3 und IL-7) [87].

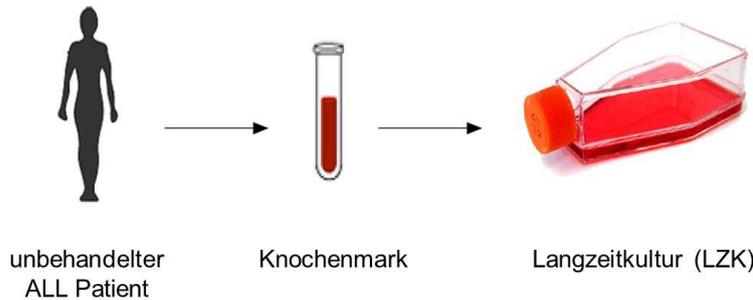


Table 2. Patient characteristics and culture outcome

Patient	Age (y)	Immune phenotypic subtype ^a	Cytogenetics ^b	Floidy ^c	In vitro expansion	
1	BV	37	2	t(9;22)	46	yes
2	CM	32	2 (BP)	t(9;22)	46	yes
3	WD	58	2	t(9;22)	47	yes
4	KW	20	2	t(9;22)	48	yes
5	PH	37	2	t(9;22)	46	yes
6	VB	53	2 (BP)	t(9;22)	46	yes
7	EM	19	2	t(9;22)	46	
8	BL	59		t(9;22)	46	
9	SW	20	2	t(9;22)	57	
10	VD	54	3	t(9;22)	45-46	
11	LK	70	2	t(9;22)	45-46	
12	VG	62	2	etv6-abl	45	yes
13	KR	22	2	t(1;19)	46	yes
14	RL	36	3	t(1;19)	46	yes
15	DR	16	3	t(1;19)	46	
16	WL	34	1	t(4;11)	46	
17	BT	26	1	t(4;11)	46-47	
18	GD	33	2	t(4;11)	46	
19	SK	19	1	t(11;19)	46	yes
20	CR	60	4		41	yes
21	HP	23	2		47	yes
22	AM	28	2		45	
23	TP	23	2		55	
24	RN	23	2		45	
25	HN	42	3		47-91	
26	MM	21	2		47	
27	RR	56	1		85-88	
28	HK	19	2		47	
29	SH	22	3		46	
30	ES	40	1		46	
31	LW	25			46	
32	SM	19			53-59	
33	ER	26			46	
34	GB	39	2		46	

Nijmeijer et al. 2005

Abbildung 5: Gewinnung aus Knochenmarkszellen unbehandelter ALL-Patienten bestehender Langzeitkulturen und Etablierung dieser durch Nijmeijer et al.

Es zeigte sich, dass zwölf der verwendeten Patientenproben über einen längeren Zeitraum von bis zu einem Jahr kultivierbar waren, wobei dies jedoch lediglich im serumfreien Medium möglich war. Durch das Fehlen von Serum wird zudem eine Differenzierung der Zellen während des Zeitraums der Kultivierung unterbunden. Weitere Analysen der resultierenden zwölf Langzeitkulturen (LZK) zeigten, dass die Zellen in Bezug auf ihren Karyo- und Phänotyp über sechs Monate hinweg stabil bleiben, was sich unter anderem durch durchflusszytometrische Analysen unmittelbar nach Probengewinnung im Vergleich zu kultivierten Proben der LZK bestätigte. Außerdem ließ sich die Stabilität des leukämogenen Potentials der Kulturen über die Kulturzeit in vergleichender Xenotransplantation nachweisen [87]. Die verwendeten zwölf LZK weisen untereinander genetische Übereinstimmungen von weniger als einem Prozent auf, was sich im Vorliegen unterschiedlicher Subpopulationen innerhalb der Kulturen äußert und die 2004 beschriebene Heterogenität der Erkrankung aufgreift [65]. Im Rahmen dieser Dissertation kommen drei der Kulturen (BV, CR und PH) zum Einsatz. Diese unterscheiden sich in Immunphänotyp, Zytogenetik und ihrem Teilungsverhalten bei identischen

Kulturbedingungen (siehe Tabelle 7). Während der Arbeit mit den drei LZK fällt die deutlich niedrigere Generationszeit von nur 48 Stunden der CR - Zellen auf, welche sich *in vitro* durch eine deutlich höhere Teilungsrate im Vergleich zu den beiden anderen Langzeitkulturen bemerkbar macht. Die längste Teilungszeit weisen die Zellen der LZK BV auf. Die längerfristige Kultivierung der Zellen ist unter Durchführung der partiellen Abteilung einiger Zellen und des teilweisen Ersatzes des Nährmediums zur Einstellung der Zielzellzahl von 1×10^6 Zellen/ml Medium zweimal wöchentlich möglich.

Tabelle 7: Kennzeichen der verwendeten LZK

Patient	Zytogenetik	Immunphänotyp
BV	t (9,22)	Common B – ALL
PH	t (9,22)	Common B – ALL
CR	Komplex	CD 10+ - pro B – ALL

BESTIMMUNG DER ZELLZAHL

Zur Bestimmung der aktuellen Zellzahl und zur Viabilitätskontrolle der kultivierten Zellen werden Neubauerkammern verwendet. Hierzu werden jeweils 10 µl Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau vermischt. Der verwendete Farbstoff kann nur in nicht mehr intakte Zellen eindringen und folglich diese anfärben. Mithilfe eines Lichtmikroskops werden die nicht gefärbten als vitale Zellen detektiert, wobei jeweils mindestens zwei der vier Quadranten der Neubauerkammer ausgewertet werden.

KRYOKONSERVIERUNG DER LZK

Eine längerfristige Lagerung der Zellen ist mittels Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff möglich. Hierfür wird zunächst die im Medium befindliche Zellzahl bestimmt und die Einfrierportionen von 2×10^7 - 5×10^7 Zellen abgetrennt. Anschließend werden die Zellen mittels Zentrifugation (290 x g für sieben Minuten bei 4°C) vom Kulturmedium getrennt und der das Kulturmedium enthaltene Überstand entnommen sowie die Zellen in PBS resuspendiert. Es schloss sich eine weitere, wie oben beschriebene Zentrifugation zur Waschung der Zellen an. Die Zellen wurden jeweils in 0,5 ml des ersten Einfriermediums

gelöst. Folgend wird die Suspension vorsichtig mit 0,5 ml des zweiten Einfriermediums bedeckt. Die verwendeten Kryoröhrchen werden unmittelbar in eine Kryobox eingeführt und für drei Tage bei -80°C eingefroren, bevor die endgültige Lagerung im flüssigen Stickstoff erfolgt.

AUFTAUEN DER LZK

Die Zellen können unmittelbar durch ein auf 37°C temperiertes Wasserbad aufgetaut werden. Sie wurden infolge langsam tropfenweise mit purem RPMI – Medium resuspendiert. Um das sich auf den Zellen befindliche Gemisch der Einfriermedien zu entfernen, werden diese einmalig mit PBS gewaschen. Nach Abnahme des Überstandes werden die Zellen anschließend im Kulturmedium gelöst und in entsprechende Kulturflaschen überführt.

2.3 Seahorse-Messungen

2.3.1 Allgemeines Verfahren

Die Nutzung des Seahorse XF-Analyzers ermöglicht die Analyse des bioenergetischen Status der Zelle durch zeitgleiche Detektion der Aktivität der Glykolyse und der mitochondrialen Respiration als wichtige Stoffwechselwege der Energieproduktion. Hierbei wird der Sauerstoffverbrauch der Zelle sowie deren Protonenproduktion mittels Analyse des sie umgebenden Mediums bestimmt. Die Detektion der Protonenproduktion ECAR (ECAR = extracellular acidification rate = extrazelluläre Rate der Ansäuerung) erlaubt Rückschlüsse auf die aktuelle Aktivität der Glykolyse. Wohingegen zeitgleich mittels Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs der Zellen OCR (OCR = oxygen consumption rate = Rate des verbrauchten Sauerstoffs) das Tätigkeitslevel der oxidativen Phosphorylierung analysiert wird.

Zunächst werden die zu untersuchenden Zellen in Kulturplatten, zum Beispiel 96-well, ausgesät und diese mit einem speziellen Deckel verschlossen. Dieser weist für jede Aussparung der Platte „Stifte“ auf, die in die Zellsuspension hineinragen und jeweils zwei Detektionsfluorophore beinhalten. Diese unterscheiden sich anhand ihrer Sensitivität voneinander. Während ein Fluorophor sensitiv für Sauerstoff ist, reagiert das andere auf die Anwesenheit von Protonen im umgebenden Medium. In diese Stifte werden im Analysegerät Faseroptiken eingeführt, welche durch emittiertes Licht die Fluorophore zu einer

basalen Lichtemission anregen, welche detektiert wird. Diese Emission ändert sich in Abhängigkeit zur Anwesenheit des jeweiligen sensitiven Stoffes. Aus der Messung der Unterschiede zwischen basaler Lichtemission der Fluorophore und dem Verlauf dessen während der Messungen wird die jeweilige momentane Konzentration von Sauerstoff und Protonen im Medium berechnet. Durch die Zugabe von Substraten, Inhibitoren und Stimulantien der beiden zu analysierenden Stoffwechselwege und direkt erfolgende Messung der Protonenkonzentration beziehungsweise des Sauerstoffverbrauchs kann die Reaktion des Stoffwechsels der Zelle beurteilt werden.

Zur Analyse der Glykolyseaktivität wird zunächst die Protonenproduktion der Zelle durch weitere Stoffwechselwege neben der Glykolyse bestimmt. In diesem Schritt befinden sich die Zellen in einem glukosefreien Nährmedium, so dass keine Glykolyse abläuft. Im nächsten Schritt wird durch Zugabe von Glukose eine gesättigte Glukoselösung im Nährmedium hergestellt, was den Zellen die Aufnahme dieser und die Energieproduktion mittels Glykolyse ermöglicht. In diesem Schritt wird anhand der ECAR die Basalrate der Glykolyse ermittelt. Zur Bestimmung der maximalen Glykolysekapazität der Zelle wird Oligomycin, ein Inhibitor des Komplex V der Atmungskette = ATP-Synthase, hinzugefügt, was in einer Blockade der ATP-Produktion (ATP = Adenosintriphosphat) mittels oxidativer Phosphorylierung resultiert. Dies führt folglich zur alleinigen Energieproduktion der Zelle mittels Glykolyse und resultiert physiologischerweise in einem Anstieg der ECAR. Durch Subtraktion der glykolytischen Basalrate von ihrer Kapazität kann die glykolytische Reserve ermittelt werden. Im letzten Schritt wird 2 – Desoxyglukose in einer hohen Konzentration hinzugegeben, was zu einer Inhibition der Hexokinase, dem geschwindigkeitsbestimmenden Enzym der Glykolyse, führt und somit in einer kompletten Blockade dieses Stoffwechselweges resultiert.

Des Weiteren kann zeitgleich das Aktivitätsniveau der oxidativen Phosphorylierung über die Aufnahme von Sauerstoff durch die Zelle, die sogenannte OCR gemessen werden. Zunächst wird die Basalrate des Sauerstoffverbrauchs durch die physiologisch ablaufende mitochondriale Respiration bestimmt. Durch die darauffolgende Zugabe von Oligomycin, einem Inhibitor der ATP-Synthase, kommt es zur Hemmung der ATP-Produktion mittels oxidativer Phosphorylierung, was in einer Abnahme der OCR resultiert.

Im nächsten Schritt wird FCCP (Carbonylcyanid-*p*-trifluoromethoxyphenylhydrazon) hinzugefügt, welches die Funktion eines sogenannten Entkopplers der Atmungskette erfüllt. Dies führt zu einem von der ATP-Synthese unabhängigen Transport der Protonen von der mitochondrialen Matrix ins Innere des Mitochondriums, so dass der durch den Elektronentransport entlang der Atmungskette aufgebaute Protonengradient abgebaut wird. Infolgedessen können die Komplexe der Atmungskette ihre maximale Elektronentransportkapazität nutzen, was zum maximalen Sauerstoffverbrauch durch Komplex IV führt und somit die Detektion der maximalen Kapazität der oxidativen Phosphorylierung ermöglicht. Mittels Subtraktion der ermittelten Basalrate der Aktivität von der maximalen Kapazität wird die Respirationsreserve berechnet. Im letzten Schritt wird durch die Addition von Rotenon, Inhibitor des Komplex I und Antimycin A als Komplex III-Inhibitor die Blockierung der mitochondrialen Respiration vollendet. Dies ermöglicht die Detektion respiratorischer Prozesse außerhalb des Mitochondriums durch Analyse der OCR.

2.3.2 Metabolische Analyse der drei Langzeitkulturen BV, CR und PH

Zur metabolischen Charakterisierung der Langzeitkulturen wurden die oben beschriebenen Analysen in unserem Labor mit allen drei Langzeitkulturen im Vergleich mit Knochenmarkszellen durchgeführt (Kooperation mit Prof. Dr. Stefanie Dimmeler, Institut für kardiovaskuläre Regeneration, Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt) [61].

2.4 Western-Blot

Unter einem Western-Blot versteht man allgemein den Nachweis von Proteinen durch Übertragung und Fixierung auf eine Trägermembran. In der Regel ist diesem Verfahren eine Gelelektrophorese zur Auftrennung der in der lysierten Probe enthaltenen Proteine vorgeschaltet. Bei dieser werden nach Einbringen einer einheitlich negativen Ladung durch Bindung von zum Beispiel SDS (SDS = sodium dodecyl sulfate = Natriumdodecylsulfat) die primär als Zwitterionen vorliegenden Proteine anhand ihrer Größe und proportional zu ihrer Masse aufgetrennt. Erst durch den Vorgang des Blottens als endgültige und dauerhafte

Fixierung des zerlegten Proteingemisches auf einer Membran werden weitere Analysen zur Identifikation der enthaltenen Proteine zum Beispiel unter Verwendung spezifischer Antikörper möglich.

2.4.1 Nachweis von Hypoxie-induzierbarem Faktor 1 (HIF - 1)

2.4.1.1 *Behandlung der Zellen mit CoCl₂*

Um die in den Zellen enthaltene HIF – 1 Menge vergleichen zu können, werden die LZK jeweils in drei unterschiedliche Proben unterteilt. Die ersten Zellen werden weiterhin unter normoxischen Bedingungen kultiviert, während Gruppe zwei mit Kobaltchlorid zur Induktion einer chemischen Hypoxie versetzt wird. Diese Behandlung zeichnet sich durch eine einer vorliegenden Hypoxie entsprechenden Wirkung auf das zur Degradierung von HIF – 1 benötigten Von-Hippel-Lindau-Proteins aus, so dass sich VHL von HIF-1 löst [82] (siehe 1.3). Die Zellen der dritten Gruppe werden einer tatsächlichen Hypoxie ausgesetzt. Die Behandlung erfolgt über vier Stunden bei 37 °C.

2.4.1.2 *Proteinisolierung*

Als Vorbereitung zum Nachweis des möglicherweise in den Zellen enthaltenen HIF – 1, müssen diese zunächst aufgeschlossen und die enthaltenen Proteine von den restlichen Zellbestandteilen isoliert werden. Hierzu werden die Proben in zwei Gruppen unterteilt. Die erste Gruppe wird mit 80 µl Triton pro Probe versetzt und für zehn Minuten bei 4°C inkubiert. Die restlichen Proben werden mit 200 µl SDS versetzt, zur Denaturierung auf 95°C erhitzt und abschließend ebenfalls inkubiert. Da lediglich ein Teil der Proteine durch die Behandlung mit Triton freigesetzt werden kann, werden die bereits gelösten Proteine durch Zentrifugation von den restlichen Zellbestandteilen getrennt und das entstehende Zellpellet in einem zweiten Schritt mit SDS behandelt. Schlussendlich wird das sich in der Flüssigkeit befindliche Protein mittels Zentrifugation abgetrennt, die jeweilig enthaltene Proteinmenge nach Bradford bestimmt und die für den Western-Blot benötigten Volumina mit 40 µg Protein kalkuliert.

2.4.1.3 *Gelelektrophorese und Western-Blot*

Nach dem Erhitzen der Proben für fünf Minuten auf 95 °C, erfolgt die Beladung des Gels und der Start der Elektrophorese mit einer Stromstärke von 30 mA für

30 Minuten, woran sich nach erster, erkennbarer Trennung des Markerproteingemischs eine Zeitperiode von 60 Minuten mit einer Auftrennung mit 50 mA anschließt.

Danach werden die in den Proben enthaltenen Proteine in einem circa 90 Minuten andauernden Transferprozess mit konstanter Stromstärke von 250 mA von dem Gel auf eine Membran übertragen. Zur Kontrolle wird Ponceau S verwendet.

Die nicht durch Protein besetzte Oberfläche der Membran wird vor Zugabe des primären HIF – 1 spezifischen Antikörpers mittels dreiprozentiger Boviner Serumalbumin Lösung geblockt. Der Primärantikörper wird hinzugefügt und die Proben über Nacht bei 4°C inkubiert. Dieser wird am folgenden Tag durch mehrmalige Waschung mit TBS-T (Tris-buffered saline with Tween20) entfernt und der sekundäre Antikörper, der gegen das tierspezifische Antigen des Primärantikörpers gerichtet ist, ergänzt. Dieser wirkt bei Raumtemperatur für 90 Minuten ein und wird ebenfalls durch Waschung entfernt. Zur abschließenden Visualisierung der Banden auf der Membran wird Elektrochemolumineszenz-Lösung für eine Minute zu den Membranen gegeben und anschließend eine entsprechende fotografische Aufnahme angefertigt.

2.5 Durchflusszytometrie und FACS (Fluorescence-activated cell sorting)

2.5.1 Allgemeine Informationen

Die Durchflusszytometrie ermöglicht es dem Anwender kontinuierlich verschiedene Merkmale der sich in einer Flüssigkeitssuspension befindlichen Zellen unter anderem auf deren Größe und intrazelluläre Komplexität zu analysieren. Das Durchflusszytometer besteht generell aus drei großen Einheiten:

Zunächst wäre das Flüssigkeitssystem zu nennen, welches die Aufgabe des Transports der Zellen innerhalb einer Flüssigkeitssäule durch die Analyseeinheiten und entlang der zur Analyse verwendeten Laser, besitzt. Des Weiteren findet man das optische System, welches Detektoren zur Aufzeichnung von SSC (side scatter = Seitwärtsstreulicht), FSC (forward scatter = Vorwärtsstreulicht) und Fluoreszenzsignalen beinhaltet. Als Drittes schließt sich das elektronische System an, das die detektierten Signale in elektrische

Impulse umwandelt und diese zur weiteren Verarbeitung und Zuordnung der Signale zur jeweiligen Zelle nutzbar macht. Prinzipiell ruft jede Zelle beim Durchqueren des Laserstrahls zunächst einen Anstieg der zu messenden Spannung bis zum Maximum (gesamter Laser trifft auf analysierenden Partikel) mit folgender Abnahme hervor, so dass jeweils ein charakteristischer umgekehrt parabelförmiger Verlauf resultiert. Die detektierten Spannungen werden mittels Software in Bezug auf ihre Impulshöhe, Fläche und Impulsweite hin analysiert.

Der FSC repräsentiert unter anderem die Größe der analysierten Zelle, so dass folglich die Zunahme der Zellgröße beziehungsweise des Brechungsindex des Partikels zu einem Anstieg des FSC-Signals führt. Der SSC hingegen hängt von der Ablenkung des Laserstrahls infolge der intrazellularen Komplexität ab. Viele Zellorganellen oder Granula im Zytoplasma erhöhen diese und resultieren in einem Anstieg des SSC.

Neben der Bestimmung der oben genannten Parameter ermöglicht die Durchflusszytometrie jedoch primär die Analyse vorhandener Eigenfluoreszenz der Zelle. Zusätzlich ist der Einsatz fluoreszenz-markierter Antikörper zur Detektion exprimierter Oberflächenproteine oder intrazellulärer Marker optional. Diese Antikörper beinhalten ein Fluorochrom, welches die im Laserstrahl einer bestimmten Wellenlänge enthaltene Energie absorbiert und Photonen mit geringerer Energie und höherer Wellenlänge emittiert.

In einem FACS-Gerät ist den beschriebenen Fluoreszenzdetektoren der Vibrator zur Unterteilung des Flüssigkeitsstroms in Einzelltropfen nachgeschaltet. Dieser Vorgang nennt sich hydrodynamische Fokussierung. Die Tropfen treten auf die Analyseeinheit folgend in den Sortiermechanismus ein, der mittels Elektroden den Tropfen einer zu sortierenden Zelle polarisiert und mithilfe eines elektrischen Feldes diesen anhand der Sortierkriterien ablenkt.

Die durchgeführten Analysen dieser Dissertation wurden mit einem Durchflusszytometer BD LSRFortessa und einem FACS BD Aria durchgeführt.

2.5.2 Glukoseaufnahme und –affinitätsbestimmung der Langzeitkulturen unter Zuhilfenahme von 2 – NBDG

Eine wichtige Voraussetzung zur eingehenden Analyse der Glukoseaufnahme und –affinität der Zellen besteht in der vorherigen Etablierung eines Verfahrens zur Quantifizierung des Zellverhaltens.

Eine bereits bekannte Option ist die Verwendung von Glukose-Analoga, wie 2 – Desoxyglukose, die von Zellen im selben Maße wie Glukose aufgenommen und in den Kohlenhydratstoffwechsel eingeschleust werden. Den ersten wichtigen Stoffwechselweg stellt die Glykolyse dar. Hierbei wird die durch einen passiven Transport entlang des Konzentrationsgefälles aufgenommene Glukose beziehungsweise deren Analoga zunächst durch die Hexokinase am sechsten Kohlenstoffatom phosphoryliert und somit dem Transportgleichgewicht entzogen. Diese Phosphorylierung dient der Aufrechterhaltung des Konzentrationsgefälles der Glukose zwischen intra- und extrazellulär und verhindert außerdem dass die Glukose die Zelle wieder verlassen kann. Im Normalfall erfolgt anschließend der Abbau der Glukose zu Pyruvat mittels Glykolyse und dessen weitere Nutzung zur Energiegewinnung. 2-Desoxyglukose-6-phosphat kann jedoch nicht unmittelbar weitergehend entlang der Glykolyse abgebaut werden und reichert sich in Folge dessen zunächst in der Zelle an; es wird erst zeitverzögert unter anderem über den Pentosephosphatweg abgebaut. Die Anreicherung des Analogons führt zu einer Inhibition zum einen der Glykolyse und zum anderen als negative Rückkopplung der Hexokinase. Die Anreicherung des 2-Desoxyglukose-6-phosphats in den Zellen ermöglicht den qualitativen Nachweis und die Bestimmung der Lokalisation des Analogons innerhalb der Zelle, falls dieses mit einem detektierbaren Substrat verbunden ist. Dieses Verfahren wird unter anderem in der bildgebenden Diagnostik von Malignomen durch Kopplung des Analogons an radioaktives Fluor eingesetzt [88, 89].

Zum quantitativen Nachweis des Verhaltens der verwendeten LZK wurde 2-NBDG (2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Deoxyglukose) von ThermoFisher verwendet. Es zeigte sich, dass Säugetierzellen das Analogon genauso in sich aufnehmen und verwenden, wie das bereits seit Jahrzehnten etablierte ¹⁸F-DG [90] und es bereits in multiplen Zell- oder Tiermodellen zur Beobachtung der Glukoseaufnahme dienlich war [91–94]. Außerdem konkurriert

es bezüglich der Aufnahme in die Zelle suffizient mit Glukose [94, 95]. Hierbei handelt es sich um ein mit einem Fluorophor gekoppeltes Analogon, basierend auf 2-Desoxyglukose. Dieses Fluorophor (FITC = Fluorescein isothiocyanat) kann durch einen Laser mit der Wellenlänge von 488 nm zur Emission von Licht mit einer Wellenlänge von 520 nm angeregt werden. Dies wurde nach Herstellerangaben in DMSO (Dimethylsulfoxid) in einer Konzentration von $14,6 \times 10^3 \mu\text{Mol}$ gelöst, in Portionen von jeweils 30 μl unterteilt und bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Man etablierte folgendes generelles Verfahren:

Zunächst wird die benötigte Menge 2 – NBDG aufgetaut und entsprechend der berechneten Konzentration in dem Kulturmedium der Zellen gelöst. Das so hergestellte Medium wird im Verhältnis 1:1 mit den Zellen gemischt und dieser Ansatz für den Versuchszeitraum bei 37°C unter Ausschluss von Lichteinfall inkubiert. Um die Aufnahme des Analogons durch die Zellen zu beenden, wird dem Ansatz PBS hinzugefügt und die Zellen durch Zentrifugation (1200/min, 7 Minuten, $20 \text{ }^\circ\text{C}$) gewaschen. Nach Abnahme des Überstandes können weitere Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper zum Beispiel zur Bestimmung der Viabilität der genutzten Zellen ergänzt werden. Die Färbung erfolgt dunkel bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ für 30 Minuten. Zur Entfernung der Antikörper erfolgt ein weiterer, wie oben beschriebener Waschgang mit PBS. Abschließend werden die Zellen nach Abnahme des Überstandes in 200 μl FACS-Puffer resuspendiert. In der sich anschließenden durchflusszytometrischen Analyse werden die Proben vergleichend zu ungefärbten sowie zu lediglich mit Lebendfarbstoff inkubierten Ansätzen untersucht. Hierbei erfolgt die Abgrenzung einer vorhandenen Hintergrundstrahlung von einem positiven 2 – NBDG-Signal anhand des Signals der unbehandelten und der mit Lebendfarbstoff versetzten Probe. Das hierzu genutzte Gate, welches ein positives 2 –NBDG – Signal kennzeichnet, weist maximal 0,5 % der Zellen der nicht mit dem Analogon behandelten Probe auf. Die Intensität des positiven 2 – NBDG-Signals wird durch Analyse der MFI (mean fluorescent intensity = mittlere Fluoreszenzintensität) der sich in diesem Gate befindlichen Zellen bewertet und repräsentiert semiquantitativ die Analogonkonzentration pro Zelle.

2.5.2.1 Toxizitäts- und Proliferationsanalysen von 2 – NBDG

Aufgrund der bekannten inhibitorischen Effekte von 2 – Desoxyglukose auf den Kohlenhydratstoffwechsel, welche in hohen Konzentration zelltoxisch wirken können, wird vor weiteren evaluatorischen Messungen die Wirkung des Analogons auf die Viabilität der Zellen der LZK untersucht. Hierzu werden diese zum einen über einen Zeitraum von vier Stunden mit 2 – NBDG-Medium in einer Endkonzentration von 80 μMol inkubiert. Hiermit wird die Aufnahme des Analogons durch alle in den Proben enthaltenen Zellen sichergestellt, was durch eine durchflusszytometrische Analyse der Zellen überprüft wird. Durch Zugabe von PBS und anschließender Zentrifugation (1200/min, 7 Minuten, 20 °C) wird das 2 – NBDG entfernt. Die Zellen werden nach der Abnahme des Überstandes in ihrem Kulturmedium aufgenommen und für eine Woche kultiviert. Im Verlauf der nächsten sieben Tage wird die Viabilität der behandelten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kultur beobachtet. Hierzu wird jeweils der prozentuale Anteil der lebendigen Zellen an der Gesamtzahl der vorhandenen Zellen bestimmt.

Um die Proliferationsfähigkeit der Zellen nach Behandlung mit dem Glukoseanalogon zu testen, werden die Proben 15 Minuten lang mit dem Analogon in einer Konzentration von 20 μMol inkubiert. Durch Zugabe von PBS und anschließender Zentrifugation (1200/min, 7 Minuten, 20 °C) wird das 2 – NBDG entfernt und die Zellen nach Abnahme des Überstandes in Kulturmedium resuspendiert. Daran schließt sich die Kultivierung der Zellen im Vergleich zu unbehandelten Proben über acht Tage an. Im Verlauf des Beobachtungszeitraums wird regelmäßig die in den beiden Kulturen vorliegende Zellzahl bestimmt.

2.5.2.2 Aufnahmeverhalten der Langzeitkulturen im zeitlichen Verlauf

Zur primären Etablierung des Verfahrens wurde das Verhalten der LZK gegenüber verschiedener Konzentrationen des 2 – NBDG im Rahmen von vier Stunden analysiert. Es kamen zunächst Gesamtkonzentrationen von 5, 10, 20, 40 und 80 μMol zum Einsatz. Daran schloss sich die Untersuchung der Aufnahme im Verlauf des Zeitfensters von vier Stunden vergleichend zwischen 20 und 40 μMol an. Hierbei wurde die Behandlung der Zellen nach 5, 15, 30, 45, 60 und 240 Minuten durch die Zugabe von PBS und anschließender

Zentrifugation (1200/min, 7 Minuten, 20°C) beendet. Infolge der detektierten größten Unterschiede im Aufnahmeverhalten der LZK innerhalb der ersten 30 Minuten der Behandlung, wird dieser Zeitraum genauer analysiert. Hierbei werden die Zellen mit 2 – NBDG in einer Endkonzentration von 20 µMol über fünf, zehn, 15 und 30 Minuten behandelt.

2.5.2.3 Detektion dreier Subpopulationen abhängig von deren 2 – NBDG-Affinität und prospektive Isolierung der hochaffinen Subpopulation

In der durchgeführten Zeitkinetik über 30 Minuten lässt sich neben der oben beschriebenen Unterscheidung zwischen 2 – NBDG negativen und positiven Zellen eine weitere Population detektieren, die durch ihre hohe Signalintensität gekennzeichnet ist. Diese Zellen zeigen somit eine besonders hohe Affinität zu dem verwendeten Glukoseanalogon. Um die Eigenschaften der hochaffinen Subpopulationen genauer untersuchen zu können, wird diese prospektiv aus der Gesamtpopulation isoliert und unabhängig kultiviert. Zur Evaluation der Kultivierungsfähigkeit der hochaffinen Subpopulation nach prospektiver Sortierung wird in einem ersten Isolationsdurchgang lediglich die Population mit der höchsten 2 – NBDG-Affinität von den restlichen Zellen getrennt. Hierzu werden zunächst 10^6 Zellen in entsprechend benötigtem Volumen den Langzeitkulturen entnommen und diesen PBS zugefügt. Im folgenden Zentrifugationsschritt (1200/min, 7 Minuten, 20°C) werden die Zellen von Rückständen des alten Mediums gereinigt und nach Abnahme des Überstandes jeweils in 1000 µl 2 – NBDG-Medium der Endkonzentration von 20 µMol resuspendiert. Die Behandlung der Zellen mit dem Analogon wird nach zehn Minuten durch erneute Zugabe von PBS und Zentrifugation beendet. Die Zellen werden daraufhin mit Lebendfarbstoff (1 µl / Probe) für 30 Minuten (dunkel; 4°C) inkubiert und dieser mittels Zugabe von PBS und Zentrifugation entfernt. Abschließend werden die Proben jeweils in 500 µl FACS-Puffer aufgenommen. Parallel wird eine 96-well-Platte mit je fünf Aussparungen pro Kultur à 100 µl Kulturmedium präpariert. Während des nun erfolgenden Sortiervorganges werden zunächst die lebenden von den toten Zellen separiert, um eine möglichst hohe Viabilität in der resultierenden Kultur zu erhalten. Die Abgrenzung zwischen der Subpopulation mit besonders hoher Analogonaffinität zu den restlichen Zellen erfolgt anhand der detektierbaren Unterschiede der

Signalintensität im FITC-Kanal anhand bekannter Erfahrungswerte. In den darauf folgenden zwei Wochen, einschließlich Tag 15 nach Sortierung, wird regelmäßig die Anzahl der vitalen Zellen in der Kultur der als hochaffin prospektiv isolierten Zellen bestimmt.

Die über einen längeren Zeitraum der Kultivierung resultierenden LZK der sortierten Zellen werden außerdem auf ihr Verhalten gegenüber dem Analogon 2 – NBDG untersucht. Um diese Analyse durchzuführen, werden die Zellen wie unter Punkt 2.5.2 für zehn Minuten mit dem 2-NBDG in einer Gesamtkonzentration von 20 µMol behandelt, mit Lebendfarbstoff inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch untersucht. Die Auswertung wird zur Unterscheidung der Subpopulationen anhand folgender Methode durchgeführt: Zunächst wird mithilfe der unbehandelten und der lediglich mit Lebendfarbstoff gefärbten Zellen die Abgrenzung zwischen einem positiven 2 – NBDG-Signals von der Hintergrundstrahlung vorgenommen. Hierbei wird ein positives Signal als jenes der maximal 0,5 % intensitätsstärksten Zellen der nicht mit dem Analogon behandelten Proben definiert. Folglich werden alle behandelten Zellen mit einem Signal geringerer Intensität als 2 – NBDG negativ gewertet. Die zusätzliche Unterscheidung zwischen normalpositiven und Zellen mit besonders hoher Affinität zum Analogon erfolgt anhand des Intensitätsunterschiedes und bekannter Erfahrungswerte.

2.5.3 Evaluation der Expression des Glukosetransporters GLUT – 1

Die Analyse der Expression des Glukosetransporters GLUT – 1 auf der Oberfläche der Zellen der drei LZK wird mit dem Verfahren der Durchflusszytometrie durchgeführt. Hierzu wurde ein Fluoreszenz-gekoppelter Antikörper der Firma R&D ausgewählt; dieser wird durch einen Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und emittiert daraufhin Licht in einem Wellenlängenspektrum zwischen 565 und 605 nm (PE = Phycoerythrin). Zur Abgrenzung des detektierten Signals von möglicherweise vorliegender Hintergrundstrahlung kommt außerdem die entsprechende Isotyp-Kontrolle des Herstellers zum Einsatz.

Als Erstes werden die zu analysierenden Zellen der Langzeitkultur entnommen und zwecks Entfernung des Kulturmediums PBS hinzugefügt. Die Zellen werden in Folge dessen durch Zentrifugation (1200/min, 7 Minuten, 20 °C)

gewaschen. Nach Abnahme des Überstandes werden die Zellen in einer Lösung mehrerer Fluoreszenz-gekoppelter Antikörper resuspendiert. Man unterscheidet hierbei zwei unterschiedliche Lösungen, die sich im Vorliegen des Antikörpers (GLUT – 1 versus Isotyp-Kontrolle) unterscheiden.

Diese bestehen aus den folgenden Komponenten:

- GLUT – 1 Antikörper / Isotyp-Kontrolle (PE) 10 µl / Probe
- Lebend-Farbstoff (APc-Cy7) 1 µl / Probe
- F_c-Blocker 1µl / Probe
- FACS-Puffer 38 µl / Probe

Daraus ergibt sich ein Gesamtvolumen von 50 µl pro Probe.

Die Zellen werden mit dieser Färbelösung für 30 Minuten (Ausschluss von Licht und bei 4 °C) inkubiert. Zur Entfernung der Antikörper erfolgt ein weiterer, wie oben beschriebener Waschgang mit PBS. Abschließend werden die Zellen nach der erneuten Abnahme des Überstandes in 200µl FACS-Puffer aufgenommen.

Als letzter Schritt wird die durchflusszytometrische Analyse durchgeführt, bei deren Auswertung von einem positiven Signal bezüglich der GLUT – 1 Expression ausgegangen wird, wenn dieses eine stärkere Intensität als das Signal der Isotyp-Kontrolle in der selben LZK aufweist. Beide Signale werden jeweils in der Kohorte der lebenden Zellen bestimmt.

2.5.4 Analyse der Glukoseaufnahme und GLUT – 1 Expression nach Cobaltchlorid-Behandlung der Zellen

Zur Analyse der Auswirkungen von Hypoxie auf den Glukosestoffwechsel der verwendeten Kulturen nutzt man Kobaltchlorid (CoCl₂), welches chemisch einen hypoxischen Stoffwechselzustand unter normoxischen Bedingungen induziert. Dieser Effekt wird durch die Stabilisierung hypoxie-assoziiierter Proteine wie HIF - 1α infolge der Bindung von CoCl₂ an Sauerstoff-detektierende Domänen der Zelle hervorgerufen. Die Zelle kann infolge dieser Bindung die Anwesenheit von Sauerstoff in ihrer Umgebung nicht mehr wahrnehmen und passt ihren Stoffwechsel an den imitierten Sauerstoffmangel an.

Die Zellen werden mit der Chemikalie in einer Konzentration von 150 µMol behandelt, welche nach 1:1-Verdünnung eines CoCl₂-Ansatzes des Nährmediums der Zellen (300 µMol) und benötigtem Kulturvolumen der LZK

resultiert. Zur Herstellung der angesprochenen CoCl_2 -Lösung im Kulturmedium werden zunächst 0,02379 g CoCl_2 in 1000 μl destilliertem Wasser gelöst, wobei ein Ansatz mit einer Konzentration von 100 mMol entsteht. Diesem wird entsprechend des benötigten Volumens des CoCl_2 -Nährmediums die berechnete Menge entnommen und mit dem Kulturmedium auf 300 μMol verdünnt. Die Behandlung der Zellen mit der entsprechenden Lösung wird innerhalb verschiedener Zeiträume (vier und 24 Stunden) durchgeführt. Diese wird mittels Zugabe von PBS nach Ablauf der Zeit und folgender Zentrifugation (1200/min, 7 Minuten, 20 °C) beendet und die Chemikalie entfernt.

Daran schließen sich unterschiedliche, weitergehende Analysen jeweils im Vergleich zu bisher unbehandelten Proben der LZK an. Zu diesen gehören zum einen die Bestimmung der Oberflächenexpression des Glukosetransporters GLUT - 1 sowie zum anderen das Verhalten der Zellen bezüglich des Glukoseanalogons 2 – NBDG.

Hierzu werden die Proben im Falle der Expressionsdetektion von GLUT – 1 zunächst für vier Stunden mit der CoCl_2 –Lösung inkubiert. Nach deren Entfernung mittels Waschung schließt sich eine Wartezeit von 24 Stunden an. Anschließend werden die Zellen in der oben beschriebenen Antikörperlösung resuspendiert und die Färbung durchgeführt (Dunkelheit, 4°C, 30 Minuten). Die Lösung wird mittels Waschung mit PBS entfernt und die Zellen in 200 μl FACS-Puffer erneut gelöst.

Fügt sich an die CoCl_2 -Behandlung ein Versuch zur Glukoseaufnahme und Affinität der Zellen an, werden diese nach Entfernung der Chemikalie in unbehandeltem Nährmedium resuspendiert. Hieran schließt sich eine 2-NBDG-Behandlung für 30 Minuten (Konzentration von 20 μmol) an. In den nach einer Behandlungsdauer mit Kobaltchlorid über vier Stunden und sich anschließender Wartezeit von 24 Stunden durchgeführten durchflusszytometrischen Messung zeigen sich vergleichend zwischen behandelten und unbehandelten Zellen keinerlei Unterschiede im prozentualen Anteil der 2 – NBDG positiven Zellen an der Gesamtpopulation zwischen den beiden jeweiligen Proben der Kulturen. Wir verlängern infolgedessen den Behandlungsintervall auf die gesamten 24 Stunden des Versuchszeitraumes.

2.6 Xenotransplantation

2.6.1 Allgemeines Regime

Aufgrund fehlender *in vitro* Modelle zur Leukämie-Induktion in der ALL ist die Untersuchung des leukämogenen Potentials und der Kontrolle des Vorhandenseins von LIZ in den verwendeten Langzeitkulturen bisher nur mittels der Durchführung einer Xenotransplantation möglich. Man bedient sich hierfür, auf Basis der großen Übereinstimmung des hämatopoetischen Systems zwischen dem humanen und murinen Organismus, dem Mausmodell. Hierzu werden immunkomprimierte Mäuse der Linie NOD scid gamma (NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ) verwendet.

Die Empfängermäuse werden am Vortag subletal mit 2,5 Gy bestrahlt. Die Transplantation erfolgt mittels intravenöser Applikation (iv) der veranschlagten Zellzahl, gelöst in 100 µl PBS pro Maus. Nach erfolgreicher Transplantation werden die Mäuse engmaschig überwacht, was zum einen die subjektive Einschätzung ihres AZ anhand ihres Verhaltens und Aussehens und zum anderen die regelmäßige Blutabnahme zur objektiven Beurteilung des Krankheitsverlaufes beinhaltet (siehe Abbildung 6).

Das entnommene Blut wird zur durchflusszytometrischen Analyse der Oberflächen-Proteine der humanen Zellen (CD 20, CD 34, CD 38) und der Leukämie-Entwicklung in der Maus (Relation zwischen humanem und murinem CD 45) verwendet. Hierbei wird von einer erfolgreichen Transplantation und Anwachsen der Zellen innerhalb des murinen Organismus ausgegangen, wenn mindestens ein Prozent der lebendigen, sich im Blut der Maus befindlichen weißen Blutzellen humanen Ursprunges sind.

Primär werden die Erythrozyten durch Zugabe eines Puffers (1:10 Verdünnung von BD Pharm Lyse mit Wasser) lysiert. Hierzu werden sie jeweils mit 1 ml des Puffers für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zwecks Entfernung des Lyse-Puffers wird nach Ablauf der Inkubationszeit PBS hinzugefügt und die Zellen zentrifugiert (7 Minuten, 1200 /min, 4°C), woran sich das Abnehmen des Überstandes anschließt.

Zur Detektion der Oberflächenmarker wird eine Antikörperlösung angesetzt und die Zellen in dieser resuspendiert. Die Färbung erfolgt unter Ausschluss von Lichteinfall bei 4°C über 30 Minuten. Die Lösung setzt sich wie folgt zusammen:

- humaner CD 45 (BV 450) 5 µl / Probe
- humaner CD 20 (FITC) 5 µl / Probe
- humaner CD 34 (APc) 2,5 µl / Probe
- humaner CD 38 (PE) 2,5 µl / Probe
- muriner CD 45 (PerCP-Cy5.5) 2 µl / Probe
- Lebend-Farbstoff (APc-Cy7) 1 µl / Probe
- FACS-Puffer 32 µl / Probe

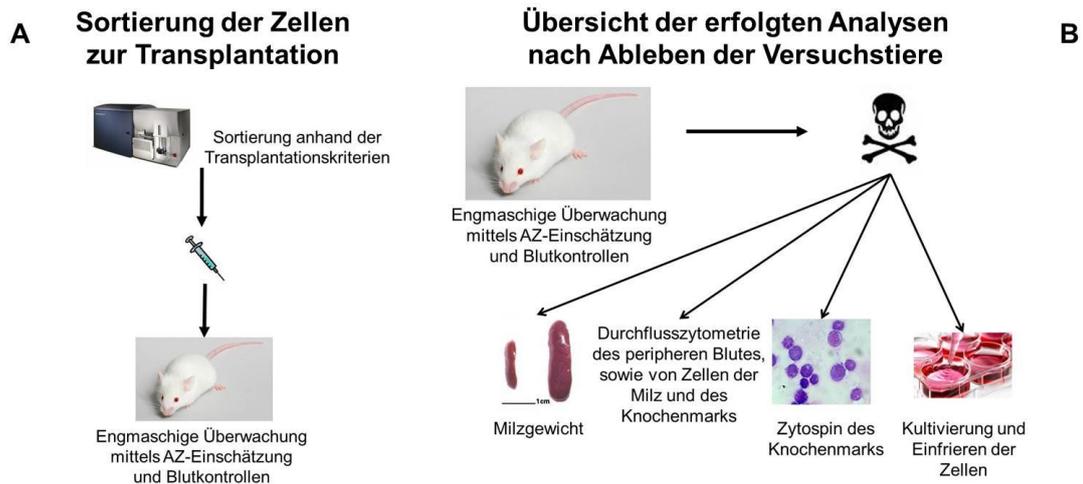


Abbildung 6: Darstellung der Übertragung der Zellen und durchgeführter Analysen nach dem Ableben. **A:** Allgemeines Schema der im Rahmen einer Xenotransplantation zur ALL-Analyse durchzuführenden Arbeitsschritte: Zunächst Aufreinigung und Sortierung der Zellen anhand der zu analysierenden Kriterien. Hieran schließt sich die Implantation der Zellen in den Empfängerorganismus an. Dieser wird im zeitlichen Verlauf der Transplantation engmaschig überwacht und dessen Zustand anhand des AZ eingeschätzt. Des Weiteren erfolgt die Überwachung der Expansion der leukämischen Zellen mittels Blutanalysen. **B:** Übersicht der nach dem Ableben der Empfängermäuse durchgeführten Maßnahmen: Gewichtsbestimmung der Milz und durchflusszytometrische Analyse des Blutes und der Zellen von Milz und Knochenmark zur Bestätigung der humanen Leukämie als Todesursache.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wird erneut ein Waschvorgang unter Zuhilfenahme von PBS durchgeführt und der Überstand entfernt. Die in der Blutprobe enthaltenen Zellen werden anschließend in 200 µl FACS-Puffer gelöst.

Bei Erreichen der Abbruchkriterien werden die Versuchstiere nach Einleitung einer Narkose getötet und ihnen Knochenmark und Milz sowie wenn möglich erneut Blut entnommen. Die gewonnenen Proben werden mittels beschriebener durchflusszytometrischer Analyse abschließend untersucht. Zudem wird die Gesamtzellzahl von Knochenmark und Milz sowie das aktuelle Gewicht und die Größe der Milz zum Nachweis der vorliegenden Splenomegalie bestimmt und eine fotografische Aufnahme dieser angefertigt. Zur Evaluation des Vorliegens

humaner Lymphoblasten als Nachweis der humanen Leukämie werden Zytospins des Knochenmarks hergestellt und nach erfolgter Färbung fotomikroskopisch ausgewertet. Dazu werden jeweils 1×10^5 und 2×10^5 Knochenmarkszellen in einem jeweiligen Gesamtvolumen von 200 μl PBS gelöst und mithilfe eines Zentrifugationsschrittes (800/min; 5 Minuten) auf einem Objektträger fixiert. Die restlichen Zellen werden eingefroren und die Kultivierung der Zellen in bekanntem Kulturmedium begonnen (siehe Abbildung 6).

2.6.2 Transplantation der Zellen anhand deren Glukose-aufnahmeverhalten

Basierend auf dem Wissen um den Warburg-Effekt könnte eine größere Affinität zu Glukose und der damit verbundenen schnelleren Aufnahme in stärker leukämogenen Zellen vorliegen. Um die Bedeutung des Aufnahmeverhaltens als LIZ-Marker zu evaluieren, transplantieren wir Zellen der Patienten CR und PH vergleichend in vier verschiedenen Gruppen. Hierbei unterscheidet man 2 – NBDG negative von 2 – NBDG positiven Zellen sowie als weitere Gruppierung Zellen mit besonders hoher Glukoseaffinität. Die vierte Transplantationsgruppe weist jeweils die Gesamtpopulation zur Kontrolle auf.

Zunächst werden die Zellen ihrer jeweiligen Langzeitkultur entnommen und PBS hinzugefügt. Mittels Zentrifugation (1200/min, 7 Minuten, 20°C) wird das Medium entfernt und die Zellen daran anschließend in 3000 μl (CR) beziehungsweise 6000 μl (PH) des bekannten Kulturmediums resuspendiert. Als zweiter Schritt werden die Proben zur Auftrennung der unterschiedlichen Glukoseaffinitäten für jeweils 15 Minuten mit 2 – NBDG – Medium in einer Gesamtkonzentration von 20 μMol versetzt. Nach Ablauf der Zeit wird erneut PBS zugegeben und das Medium mittels Zentrifugation entfernt. In diesem Zentrifugationsschritt werden des Weiteren die als Kontrolle gedachten Zellen der Gesamtpopulation der LZK mittels Waschung mit PBS von ihrem Medium getrennt. Nach Abnahme des Überstandes werden die Zellen in einer Färbelösung, bestehend aus Lebendfarbstoff und FACS-Puffer, gelöst und für 30 Minuten inkubiert (4°C , unter Ausschluss von Lichteinfall). Um den Färbvorgang zu beenden, wird die Lösung mit PBS verdünnt und ungebundener Antikörper mittels Zentrifugation (1200/min, 7 Minuten 4°C) von

den Zellen separiert. Es erfolgt als Nächstes die Resuspension in 300 µl FACS-Puffer der unbehandelten und 1000 µl Volumen der behandelten Proben als letzten Schritt vor der Sortierung.

Um zwischen 2 – NBDG positiven und negativen Zellen differenzieren zu können, werden zunächst ungefärbte und unbehandelte Zellen analysiert, wobei deren Signal gleich dem Hintergrundsignal angesehen wird. Die Abgrenzung des positiven Signals im FITC-Kanal wird definiert als welches, dass lediglich maximal 0,5% der unbehandelten Zellpopulationen mit dem intensivsten Signal beinhaltet. Anhand dieser Grenze wird im folgenden Sortiervorgang zwischen 2 – NBDG negativen und positiven Zellen unterschieden. Die Zellpopulation mit besonders hoher Glukoseaffinität zeichnet sich durch Abgrenzung zur sonstigen positiven Population durch ihr besonders starkes Signal aus und kann anhand vorliegender Erfahrungswerte unterschieden werden.

Die Sortierung erfolgt in FACS-Röhrchen mit Kulturmedium. Um dieses nach Abschluss des Sortiervorganges wieder zu entfernen, erfolgt ein erneuter Waschschrift mithilfe von PBS und Resuspension in 1 ml PBS. Zur Bestimmung der in den jeweiligen Röhrchen enthaltenen Zellen werden diese abschließend mehrmals mithilfe von Neubauer-Zählkammern gezählt und das jeweils für die Transplantation benötigte Volumen kalkuliert. Die Transplantation der 2 – NBDG-negativen und positiven Zellen sowie der Gesamtpopulation erfolgt im Rahmen von 1×10^5 Zellen pro Maus, wobei jede Gruppierung in jeweils fünf Mäuse transplantiert wird. Das intravenöse Transplantationsvolumen beträgt unabhängig von der enthaltenen Zellzahl jeweils 100 µl PBS, so dass pro Gruppe 5×10^5 Zellen in 500 µl PBS verwendet werden. Die Transplantation der hochaffinen Zellen erfolgt in geringerer Zellanzahl wie folgend: 2.600 Zellen pro Maus im Falle von PH in fünf Mäuse und 4.000 Zellen pro Maus von CR in vier Mäuse (siehe Abbildung 14 und Abbildung 20).

2.6.3 serielle Transplantation der Langzeitkultur CR

Es wird eine serielle Transplantation der humanen Leukämiezellen des Knochenmarks zwecks Analyse einer zwischen den verschiedenen Transplantationsgruppen vorliegenden Hierarchie bezüglich ihres leukämogenen Potentials durchgeführt. Diese erfolgt im Anschluss an die

Analyse der mit Zellen der Langzeitkultur CR transplantierten Mäuse. Hierzu werden jeweils die Knochenmarkszellen einer getöteten Maus jeder Kohorte angereichert und in einer Anzahl von 1×10^5 Zellen pro Maus in jeweils drei immunkomprimierte Empfängermause übertragen.

Im Rahmen der Aufarbeitung wird in diesem Fall zunächst das Knochenmark steril entnommen und die Gesamtzellzahl mithilfe von Neubauer-Zählkammern bestimmt. Als Nächstes werden die entsprechenden Volumina zur durchflusszytometrischen Analyse und Anfertigung der Zytospins entnommen. Es erfolgt anschließend die Vorlage von 15 ml Pancoll in einem 50 ml Falcon, worauf die restlichen Zellen langsam aufgetragen werden. Zur Auftrennung der verschiedenen im Knochenmark enthaltenen Zellen erfolgt eine Dichtegradientenzentrifugation (30 Minuten, 400 G, 20°C) bei deaktivierter Abbremsfunktion der Zentrifuge. Dieses Verfahren wird in der Regel zur Auftrennung von Blutbestandteilen anhand ihrer unterschiedlichen Dichten verwendet, so dass theoretisch folgende Schichten (von oben nach unten) resultieren: Plasma, mononukleäre Zellen (buffy-coat genannt), Ficoll-Paque und Erythrozyten und Granulozyten als Zellpellet am Boden. Bei der Zentrifugation der Knochenmarkszellen sammeln sich die humanen Lymphozyten in der Schicht der mononukleären Zellen als sichtbarer weißer Ring, der entnommen wird. Dieser wird anschließend unter Addition von PBS in einer Zentrifugation (1000/min, 5 Minuten, 4°C) vom Pancoll gereinigt. Es folgt die Resuspension in 1000 µl PBS und die erneute Bestimmung der Zellzahl. Abschließend wird das benötigte Volumen kalkuliert und in einem Gesamtvolumen von 300 µl PBS gelöst, so dass sich 1×10^5 Zellen pro 100 µl in der Lösung befinden (siehe Abbildung 14).

2.6.4 Transplantation GLUT – 1 positiver versus GLUT – 1 negativer Zellen

Zur Evaluation der Expression des Glukosetransporters GLUT – 1 auf der Zelloberfläche als potentieller Marker der LIZ werden Zellen des Patienten CR transplantiert. Man unterscheidet die GLUT – 1 positiven von den negativen Zellen der Gesamtpopulation und transplantiert als Kontrolle die gemischte Population in toto (siehe Abbildung 27).

Als Erstes werden die Zellen der Langzeitkultur entnommen und in drei Gruppen aufgetrennt. Hierbei wird nach den Färbungen differenziert: GLUT - 1 und Vitalitäts-Antikörper, Färbung mit Isotyp-Kontrolle und Lebendfarbstoff und als Drittes die Kontrollzellen, welche lediglich mit Lebendfarbstoff inkubiert werden. Als nächstes werden die Zellen mittels Addition von PBS und anschließender Zentrifugation (1200/min, 7 Minuten, 20°C) von ihrem Kulturmedium gereinigt, worauf nach Abnahme des Überstandes diese in der zugewiesenen Färbelösung resuspendiert werden. Die Lösungen setzen sich wie oben beschrieben zusammen. Nach der Inkubationszeit von 30 Minuten unter Ausschluss von Licht bei 4°C wird der Vorgang durch erneute Zugabe von PBS beendet und die Antikörper mittels Zentrifugation entfernt. Anschließend werden die Zellen in 500 µl FACS-Puffer resuspendiert, ausnehmend der zur Kontrolle des GLUT - 1 Signals mit Isotyp-Kontrolle und der lediglich mit Lebendfarbstoff gefärbten Zellen (Volumen lediglich 300 µl).

Erster Schritt der durchflusszytometrischen Analyse stellt die Trennung zwischen lebenden und toten Zellen dar; weitere Analysen und Sortierungsvorgänge werden lediglich mit lebendigen Zellen durchgeführt. Zur Abgrenzung zwischen Hintergrund- und positivem GLUT – 1 Signal wird zunächst die Analyse der Isotyp-Kontrollzellen durchgeführt, deren Signal mit dem Vorliegen eines negativen GLUT – 1-Signals gleichgesetzt wird. Um das Vorliegen falsch-positiver Zellen in den zur Transplantation angedachten Probe zu verhindern, nehmen wir die Sortierung mittels FACS wie folgt vor: die GLUT – 1 negative Gruppe wird als die 50 negativsten Prozent der Population und die GLUT – 1 positiven Zellen als die 10 positivsten Prozent definiert. Folglich werden die dazwischen liegenden 40 % der Gesamtpopulation verworfen.

Um mögliche Proliferationsnachteile durch die Behandlung der Zellen mit Antikörper und anschließende mechanische Kräfte durch den Sortiervorgang im Vergleich zu der Transplantation der gesamten CR-Population auszuschließen, führen wir diese Zellen zur Auftrennung zwischen lebenden und toten Zellen ebenfalls durch das Sortiergerät.

Die Sortierung erfolgt in FACS-Röhrchen, die bereits 500 µl Kulturmedium enthalten. Um dieses nach Abschluss des Sortiervorganges wieder zu entfernen, erfolgt ein erneuter Waschschrift mithilfe von PBS und Resuspension in 1 ml PBS. Die nun vorliegende Zellzahl wird mithilfe von Neubauer-

Zählkammern ermittelt und das für die Transplantation benötigte Volumen entnommen. Die Transplantation erfolgt mit 5×10^4 Zellen pro Maus, wobei jede der drei Gruppen aus fünf Mäusen besteht. Es werden folglich $2,5 \times 10^5$ Zellen pro Gruppe benötigt, die in einem Gesamtvolumen von 500 μ l PBS gelöst werden.

3. Ergebnisse

3.1 B-ALL-Zellen weisen höhere Glykolyseaktivität als gesunde Knochenmarkszellen auf

Da eine Verwertung von Glukose im Rahmen der anaeroben Glykolyse einen potentiellen Selektionsvorteil der Leukämiezellen gegenüber physiologischen Knochenmarkszellen darstellen könnte, haben wir den Kohlenhydratstoffwechsel der LZK vergleichend zu Knochenmarkszellen analysiert (siehe 2.3). Hierzu setzten wir das Seahorseverfahren ein, das eine Analyse des Metabolismus und die Beurteilung der glykolytischen Aktivität der Zellen ermöglicht.

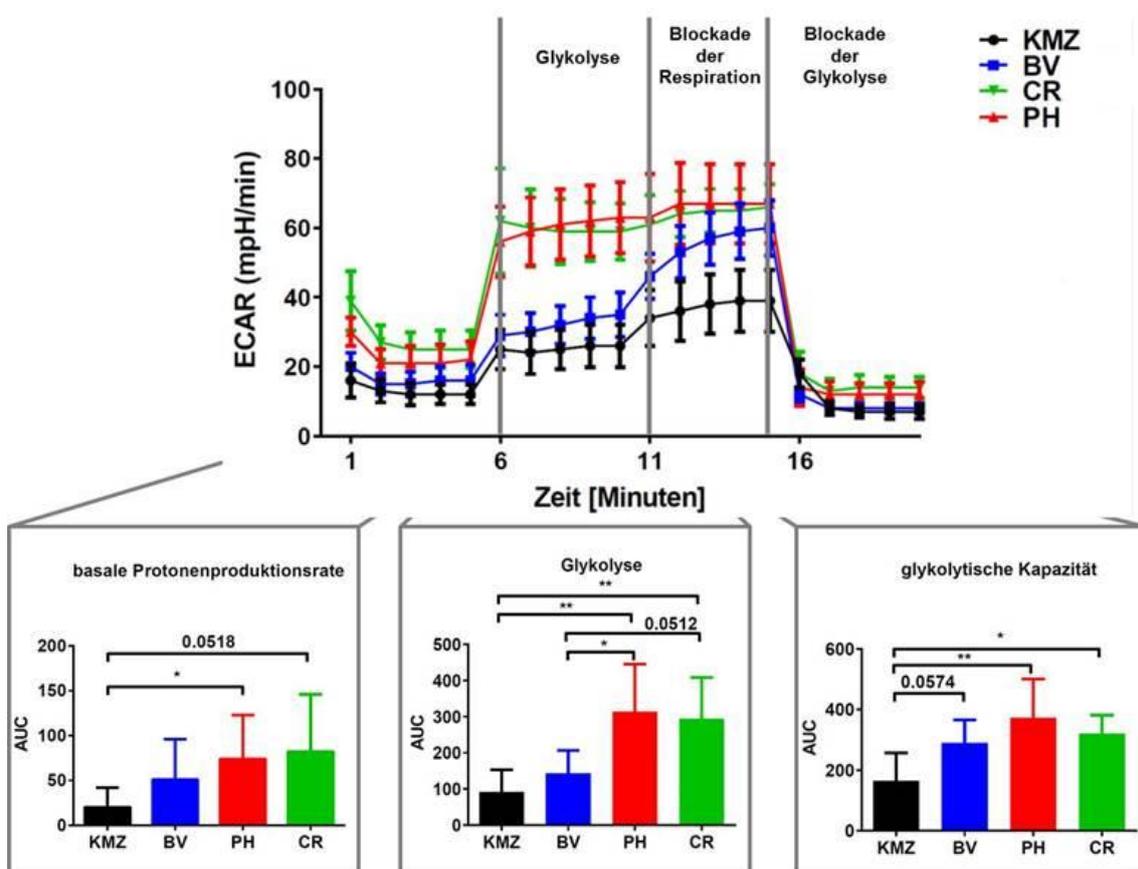


Abbildung 7: Die Zellen der LZK zeigen ein erhöhtes Aktivitätslevel der anaeroben Glykolyse. Darstellung der Ergebnisse der Analyse der basalen Protonenproduktion, Glykolyse und glykolytischen Kapazität mithilfe des Seahorse-Verfahrens (ECAR = extracellular acidification rate = extrazelluläre Rate der Ansäuerung; AUC = area under the curve = Fläche unter der Kurve; n=6 unabhängige Experimente für die LZK und n=4 unabhängige Experimente bzgl. der KMZ; Abbildung der Mittelwerte mit * = P<0,05; ** = P<0,01) nach [61]

Die Ergebnisse dieser Messungen sind bereits in der Dissertationsschrift von Herrn Dr. Bartosch Wojcik veröffentlicht worden [61], so dass ich diese im Folgenden lediglich subsummieren werde. Der erste Abschnitt der Analyse habe die von der Glykolyse unabhängige Protonenproduktion der Zellen und

deren Transport nach extrazellulär durch anderweitige Stoffwechselwege repräsentiert. Diese als Basalrate bezeichnete AUC (AUC = area under the curve = Fläche unter der Kurve) habe in den Langzeitkulturen über dem Niveau gesunder Knochenmarkszellen gelegen, was im Falle von PH signifikant gewesen sei. Nach Zugabe von Glukose (100 mM) und dadurch ausgelöster Aktivierung der Glykolyse sei die ECAR in allen Proben angestiegen, wobei die Rate der Protonenproduktion vor allem in CR und PH beträchtlich zugenommen habe und dadurch in Relation zu den Knochenmarkszellen signifikant erhöht gewesen sei. In Schritt drei der Messung sei die oxidative Phosphorylierung mittels Zugabe von Oligomycin (100 μ M) unterbunden worden, so dass die Zellen ihre Energie lediglich im Rahmen der Glykolyse herstellen haben können und somit die maximal mögliche Kapazität analysiert werden konnte. Dies habe aufgrund der geringeren ATP - Ausbeute pro verwendetem Glukosemolekül unter physiologischen Bedingungen zu einer Zunahme der Glykolyseaktivität geführt. Dieses Verhalten sei in der Probe der Knochenmarkszellen sowie der LZK BV detektierbar gewesen. Die anderen beiden Kulturen (CR und PH) haben auf diese veränderte Stoffwechsellage lediglich mit einem minimalen Aktivitätsanstieg reagiert, wobei das Aktivitätslevel der Glykolyse weiterhin in Relation zu den Knochenmarkszellen signifikant erhöht gewesen sei (siehe Abbildung 7). Die Analyse habe ein in allen drei Kulturen grundsätzlich erhöhtes Aktivitätslevel des Kohlenhydratstoffwechsels gezeigt, wobei vor allem die aggressiveren LZK die anaerobe Glykolyse zur Energiegewinnung genutzt hätten.

3.2 Glukoseaufnahme und –affinität der Langzeitkulturen

3.2.1 Schnelle Glukoseaufnahme geht mit höherem leukämogenem Potential einher

Nach oben beschriebenem allgemeinen Transplantationsregime (siehe 2.6.1) waren in mehreren Vorversuchen die drei LZK in einer Zahl von 5×10^6 Zellen pro Maus intravenös transplantiert und deren Überlebensdauer analysiert worden (siehe Abbildung 6). Hierbei hatte sich eine hohe Reproduzierbarkeit der Überlebensdauer infolge der initiierten Leukämie zwischen den Mäusen, die mit dem Zellmaterial desselben Patienten transplantiert wurden, gezeigt. Die Mäuse, die mit CR - Zellen transplantiert worden waren, hatten eine mediane

Überlebensdauer von 54 Tagen im Vergleich zu PH-Mäusen mit 119 Tagen aufgewiesen. Die längste Lebensdauer von 180 Tagen war durch die von den Zellen des Patienten BV propagierte Leukämie hervorgerufen worden (siehe Abbildung 8B) [61].

Nachdem sich in den Seahorse-Analysen die unter 3.1 ausgeführten Unterschiede im Kohlenhydratstoffwechsel der Zellen dargestellt hatten, formulierten wir die Hypothese, dass die hierbei vorliegende Aktivierung der Glykolyse durch die Zellen der Patienten PH und CR im Vergleich zu BV eine schnellere beziehungsweise suffizientere Aufnahme von Glukose durch diese notwendig mache. Dies könne folglich als potentieller Marker für die Aggressivität einer Leukämie dienen. Zur Analyse unserer Hypothese setzten wir das Glukoseanalogon 2 – NBDG ein. Hierbei stieg mit zunehmender Zeitspanne der Behandlung in allen drei Kulturen der prozentuale Anteil der 2 – NBDG positiven Zellen an, so dass jede der drei Kulturen zu einem bestimmten Zeitpunkt den Zustand fast vollständiger Sättigung der gesamten Probe mit einem Anteil von über 85 % 2 – NBDG positiver Zellen erreichte. Es fiel auf, dass die Zellen des Patienten CR diesen Zustand im Vergleich zu den anderen beiden Kulturen schneller erreichten. Es deuteten sich vor allem innerhalb der ersten 30 Minuten der Behandlung mit 2 – NBDG Unterschiede im Aufnahmeverhalten der LZK an, so dass wir dieses Zeitfenster anschließend weitergehend mit einer Analogonkonzentration von 20 μ M untersuchten. Bereits in diesem Zeitraum stellten sich zwischen den drei LZK signifikante Unterschiede im prozentualen Anteil der 2 – NBDG positiven Zellen an der Gesamtpopulation dar (siehe Abbildung 8C).

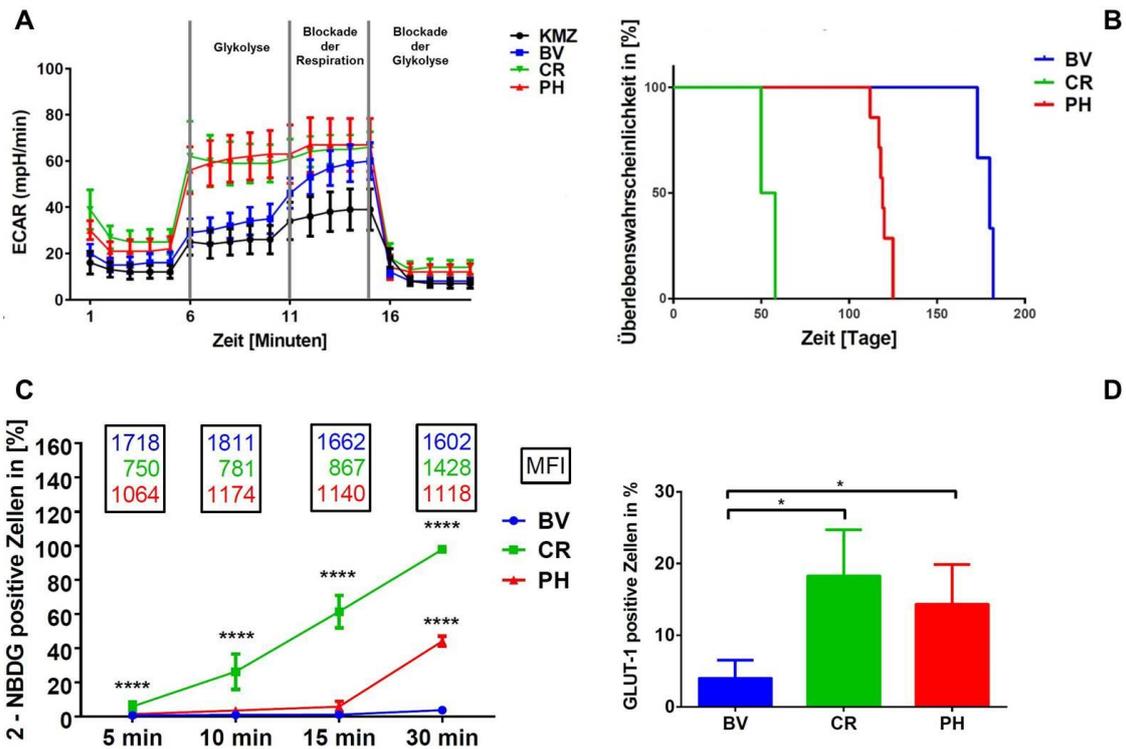


Abbildung 8: Expression des GLUT – 1 und Glukoseaffinität der Zellen zeigen positive Zusammenhänge mit dem Auftreten einer aggressiveren Leukämie. **A:** ECAR als Maß für die Glykolyseaktivität der drei LZK vergleichend zu physiologischen Knochenmarkszellen (ECAR = extracellular acidification rate = extrazelluläre Rate der Ansäuerung; n=6 unabhängige Experimente für die LZK und n=4 unabhängige Experimente bzgl. der KMZ; Abbildung der Mittelwerte mit * = P<0,05; ** = P<0,01). **B:** Überlebensdauer der transplantierten Empfängermäuse nach Transplantation von 5×10^6 Zellen pro Maus in Tagen (Log-rank [Mantel-Cox] - Test mit * = P<0,05; ** = P<0,01). **C:** prozentualer Anteil der 2 – NBDG positiven Zellen an der Gesamtpopulation der LZK nach der Behandlung der Zellen mit dem Analogon in einer Konzentration von $20 \mu\text{M}$ für jeweils 5, 10, 15 und 30 Minuten (2-way ANOVA **** = P<0,0001). Außerdem Darstellung der jeweiligen MFI der 2 – NBDG positiven Zellen zum Detektionszeitpunkt als Maß für die durchschnittliche intrazellulär vorliegende Analogonkonzentration (n = 3 unabhängige Versuche). **D:** prozentualer Anteil der GLUT – 1 positiven Zellen an der Gesamtpopulation der drei LZK zum Analysezeitpunkt (n = 3 unabhängige Versuche; unpaired t- test * = P<0,05)

Parallel wurde die mittlere 2 – NBDG-Konzentration pro Zelle bestimmt, welche semiquantitativ durch die MFI des detektierbaren FITC-Signals der Analogon positiven Zellen repräsentiert wurde. In unserer Analyse war zum einen der Anstieg der Messgröße durch einen zunehmenden Anteil 2 – NBDG positiver Zellen in den jeweiligen Proben und zum anderen durch weitere Anreicherung nach Erreichen einer relativen Sättigung nachweisbar. Der weitere Anstieg der MFI im Zustand relativer Sättigung wurde in den Proben der Patienten PH und CR nach einer kürzeren Zeitspanne detektiert. Auffällig stellte sich des Weiteren ein Abfall der MFI im Zeitraum zwischen 10 und 15 Minuten dar, welcher sich besonders deutlich in den Zellen des Patienten BV abzeichnete (siehe Abbildung 8). Da eine hohe MFI mit einer vergleichsweise hohen Konzentration

des Analogons pro Zelle gleichzusetzen ist, liegt folgende Erklärung für dieses Phänomen nahe. Nach kurzer Behandlungsdauer waren lediglich wenige Zellen 2 – NBDG positiv, so dass der Einfluss jeder Zelle auf die messbare MFI aller zu diesem Zeitpunkt 2 – NBDG positiven Zellen sehr groß war. Mit zunehmendem Anteil der Analogon-positiven Zellen an der Gesamtpopulation nahm der Einfluss jeder einzelnen Zelle auf die MFI ab. Folglich ist davon auszugehen, dass zunächst zwar nur wenige Zellen das Analogon inkorporierten, diese jedoch eine in Relation gesehen große Menge aufgenommen haben. Dies führte uns zu dem Schluss, dass sich die Gesamtpopulation der LZK aus einer heterogenen Ansammlung von Zellen bezüglich ihrer Glukoseaffinität und ihres Aufnahmeverhaltens zusammensetzen muss. Neben einer großen Masse relativ gleichartiger Zellen ist auch eine kleine Population besonders hochaffiner Zellen enthalten, welche für eine primär relativ hohe detektierbare MFI verantwortlich zu sein scheint.

Die in den Analysen detektierten Unterschiede zwischen den drei LZK in der Zunahme des prozentualen Anteils 2 – NBDG positiver Zellen über die Zeit, waren auf die unterschiedliche Glukoseaffinität der beinhaltenen Zellen und die damit verbundene Aufnahmegeschwindigkeit zurückzuführen. Ruft man sich die bekannten medianen Überlebenszeiten der mit den drei Kulturen transplantierten Mäuse in Erinnerung (siehe Abbildung 8B), erkennt man Parallelen zwischen der Aggressivität der propagierten Leukämie in der Maus und der detektierten Glukoseaffinität der Zellen, welche die Hypothese nahelegt, dass eine höhere Glukoseaffinität in Kombination mit einer schnelleren Glukoseaufnahme mit einer höheren Malignität der induzierten ALL einhergehen könne. Hierbei zeigen vor allem die Zellen des Patienten CR eine Assoziation zwischen ihrer hohen Glukoseaufnahme und ihrem leukämogenen Potential.

3.2.2 2 – NBDG weist keine Toxizität gegenüber den Zellen der LZK auf

Um die Glukoseaufnahme in Zellen mittels Durchflusszytometrie zu messen, haben wir das fluoreszierende Glukoseanalogon 2 - NBDG verwendet. Als Voraussetzung weiterer Analysen zum Glukoseaufnahmeverhalten und der Affinität der LZK gegenüber Glukose war es zunächst notwendig, negative

Einflüsse auf die Zellen durch das verwendete Analogon zu analysieren. Zum Ausschluss möglicher zytotoxischer Effekte analysierten wir primär die Viabilität der mit einer Konzentration von 80 μM behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Hierfür bestimmten wir den Prozentsatz der lebendigen Zellen in den jeweiligen Kulturen an Tag drei und Tag sieben nach der Behandlung. Hierbei sind keine Unterschiede zwischen beiden Ansätzen detektierbar, so dass dieser Versuch lediglich einmalig durchgeführt wurde.

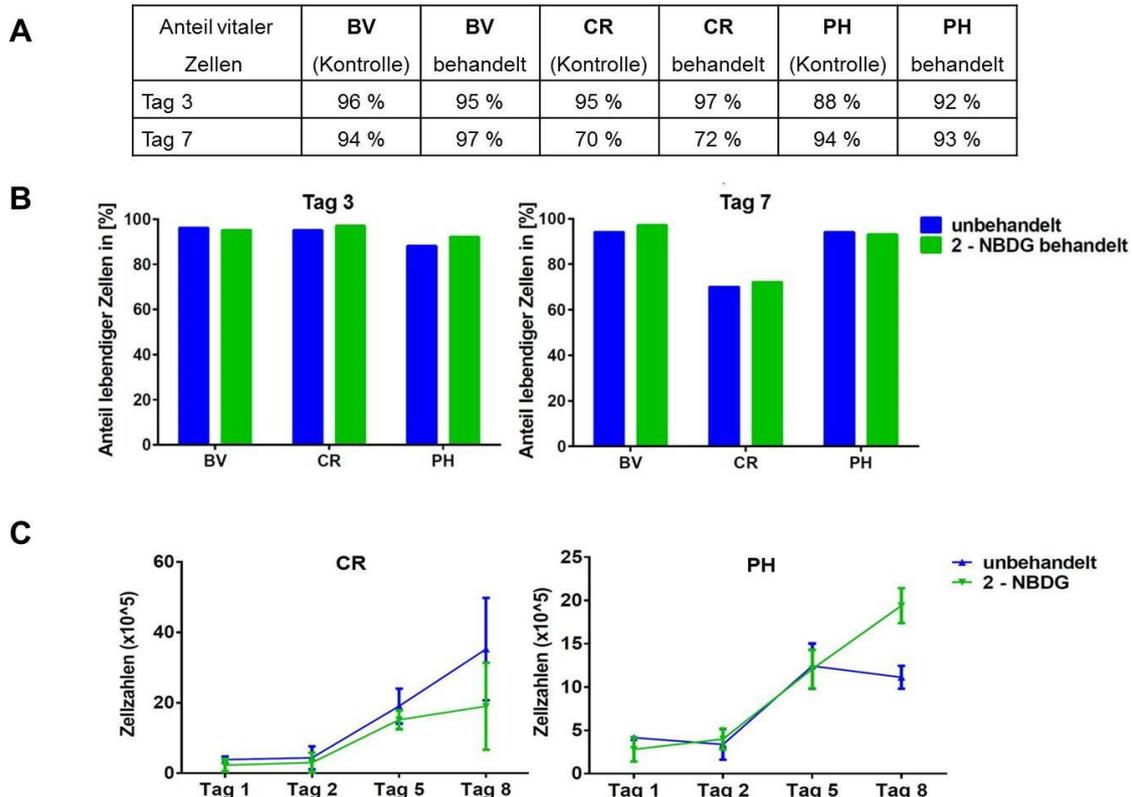


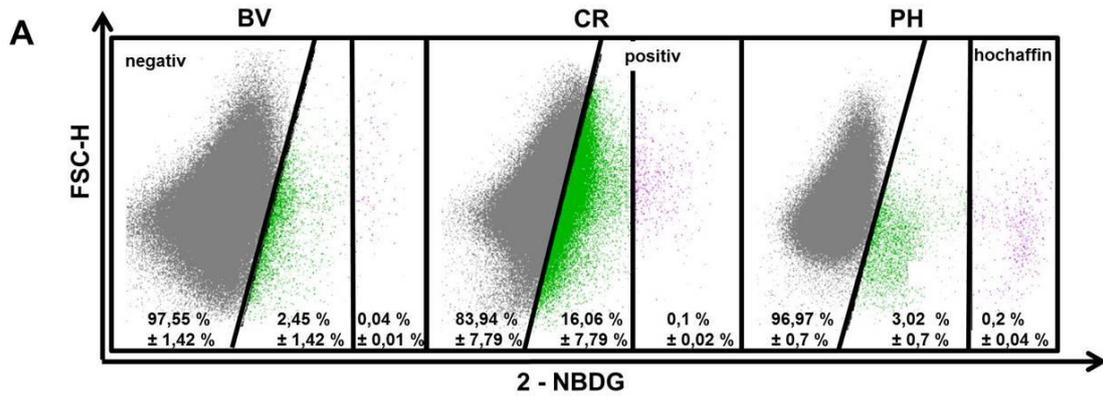
Abbildung 9: 2 – NBDG beeinflusst nicht die Viabilität der LZK Zellen. A + B: Entwicklung des prozentualen Anteils der vitalen Zellen in den LZK CR und PH nach Kultivierung der Zellen mit 80 μM 2 – NBDG für vier Stunden im Vergleich zu unbehandelten Zellen ($n = 1$). **C:** Proliferationsverhalten der Zellen der Patienten CR und PH nach Behandlung der Zellen mit 2 – NBDG in einer Konzentration von 20 μM für 15 Minuten ($n = 3$ technische Replikate)

Zur Detektion möglicher proliferationsbeeinflussender Effekte des Analogons auf die Zellen der Patienten CR und PH, untersuchten wir deren Wachstumsverhalten im Vergleich zwischen mit 2 – NBDG behandelten und unbehandelten Zellen über einen Zeitraum von acht Tagen (siehe Abbildung 9). Die behandelten Zellen des Patienten PH zeigten keinerlei Reaktion, die auf eine hemmende Wirkung des 2 – NBDG schließen ließ. In den Proben der LZK CR waren innerhalb der ersten Tage der Kultivierung ebenfalls keine Unterschiede in der Teilungsrate oder der absoluten Zellzahl der beiden

Ansätze nachweisbar, jedoch detektierten wir ab Tag fünf einen leichten Proliferationsnachteil der behandelten Zellen. Die Ergebnisse zeigten, dass kein negativer Einfluss auf die Viabilität der Zellen durch dieses Glukoseanalogon besteht. Jedoch zeigte sich eine geringe Reduktion der Proliferation der Zellen der LZK CR.

3.2.3 Es existieren drei unterscheidbare 2 – NBDG – Subpopulationen

Nachdem sich die drei LZK mehrmalig mit unterschiedlichem Aufnahmeverhalten gegenüber dem Glukoseanalogon präsentiert hatten, gingen wir davon aus, dass die detektieren Unterschiede zwischen den verschiedenen Zellen der drei Kulturen auch unabhängig von der vorliegenden Zellzahl sind. Um dies zu bestätigen, analysierten wir die drei LZK weitergehend im Rahmen größerer Zellvolumina (10^6 Zellen) durchflusszytometrisch nach deren Behandlung mit dem Analogon für zehn Minuten in einer Konzentration von 20 μ M. Hierbei detektieren wir reproduzierbar drei unterschiedliche Subpopulationen, die sich durch ihr Aufnahmeverhalten gegenüber des Glukoseanalogons unterscheiden: 2 – NBDG negativ versus 2 – NBDG positiv versus hochaffine Zellen (siehe Abbildung 10A). Dies bestätigt unsere Annahme, dass sich die LZK jeweils aus einer heterogenen Zellmasse bezüglich der Glukoseaffinität zusammensetzen und sich deren Anteile Patientenkulturabhängig charakteristisch abbilden lassen.



B

LZK	Tag 5	Tag 8	Tag 9	Tag 10	Tag 11	Tag 12	Tag 15
BV	27,8	50,8	53,2	58,6	88,8	100	138,5
CR	49,2	83,8	96,8	111,8	182	241,4	624,4
PH	103,2	208	228,6	268	316,2	337,8	419,4

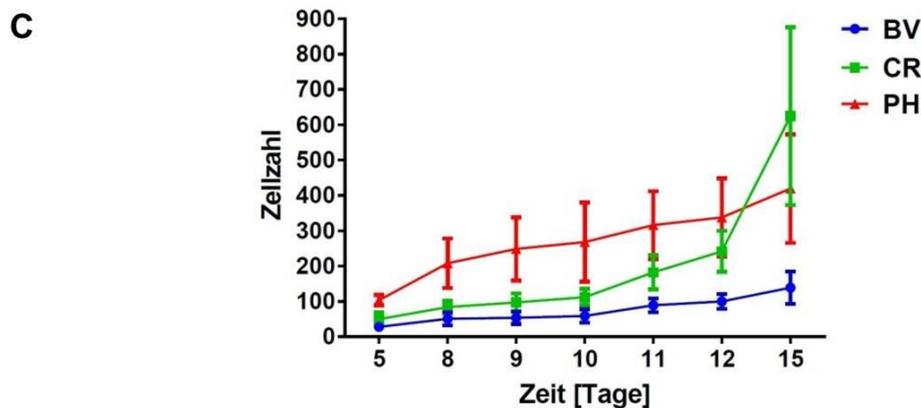


Abbildung 10: Existenz der drei 2 – NBDG – Subpopulationen und Nachweis der Viabilität der 2 – NBDG hochaffinen Zellen. A: Auftrennung der drei Subpopulationen der LZK anhand ihrer Glukoseaffinität nach der Behandlung der Zellen mit 20 μ M 2 – NBDG für 10 Minuten. **B + C:** Expansionsverhalten der hochaffinen Zellen im zeitlichen Verlauf für 15 Tage nach Isolation (n = 5 technische Replikate).

Es stellte sich aufgrund der geringen Anzahl der hochaffinen Zellen die Frage, ob diese über den Zeitpunkt der 2 – NBDG –Messung hinaus lebensfähig bleiben und infolgedessen proliferieren können. Um diesen Aspekt zu untersuchen, führten wir einen Sortierungsvorgang der Zellen der drei LZK anhand ihrer Glukoseaffinität durch, um die vitalen Zellen der kleinsten Subpopulation von den restlichen Zellen zu isolieren und anschließend deren Expansions- und Proliferationsverhalten über einen Zeitraum von zwei Wochen engmaschig zu überwachen. Nach gelungener Isolierung der Zellen aller drei Kulturen, erfolgte die Kultivierung dieser zunächst jeweils parallel in fünf Aussparungen einer 96 – well-Kulturplatte. Im Verlauf der detaillierten Proliferationsanalyse über 15 Tage zeigten sich die Zellen aller drei Kulturen als

kultivier- und folglich auch expandierbar (siehe Abbildung 10 B+C). Die Zellen der beiden LZK CR und PH konnten ihre Teilungsrate und ihre Viabilität im weiteren zeitlichen Verlauf auf einem hohen Maß stabilisieren und ermöglichten schlussendlich die jeweilige Etablierung einer LZK.

3.2.4 Die hochaffinen Kulturen generieren die ursprüngliche LZK

Es kam nun die Frage auf, ob diese beiden Kulturen auch über einen längeren Kultivierungszeitraum lediglich aus den Zellen mit besonders hoher Analogonaffinität bestehen werden. Folglich wurden die Zellen nach einiger Zeit der Kultivierung auf ihre Affinität und ihr Aufnahmeverhalten bezüglich des Glukoseanalogons 2 – NBDG analysiert.

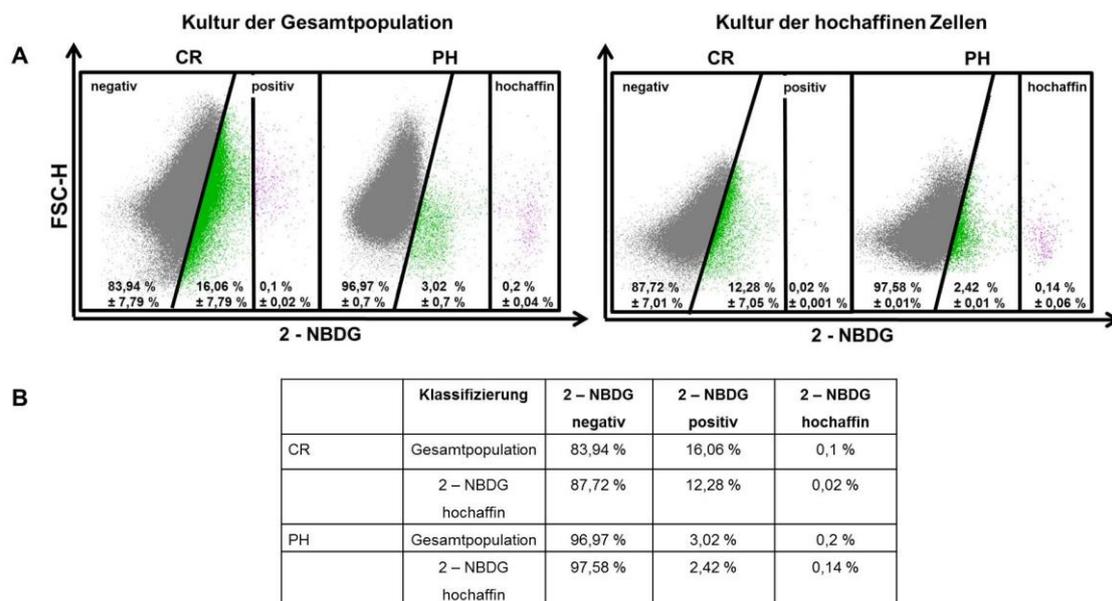


Abbildung 11: Hochaffine Zellen können drei Subpopulationen repopulieren. A + B: vergleichende Darstellung der prozentualen Anteile der drei 2 - NBDG Subpopulationen in den Kulturen der CR- und PH-Zellen zwischen der Gesamtpopulation und den kultivierten hochaffinen Zellen nach Behandlung dieser mit dem Analogon in einer Konzentration von 20 μM für 10 Minuten ($n = 2$)

Die durchgeführten Messungen nach Behandlung der neuen LZK unter identischen Bedingungen (2 – NBDG 20 μM für 10 Minuten) bildeten die bereits bekannten drei Subpopulationen ab. Bei genauerer Analyse der jeweiligen Anteile der Gruppierungen 2 – NBDG negativer, positiver und hochaffiner Zellen kristallisierte sich heraus, dass sich deren prozentuale Verteilung innerhalb der neu etablierten Kulturen nicht wesentlich von der der ursprünglichen LZK unterschied (siehe Abbildung 11). Es zeigte sich somit, dass eine Kultur der

hochaffinen Zellen alle drei Subpopulationen generieren kann und hierbei die ursprüngliche LZK erneut hervorbringt.

3.3 Eine höhere Glukoseaufnahme ist durch vermehrte Expression des Glukosetransporters GLUT – 1 bedingt

Beruhend auf den Erkenntnissen der metabolischen Analysen der Seahorsemessung (siehe 3.1), ging man davon aus, dass die zwei LZK CR und PH eine vergleichsweise größere Menge Glukose innerhalb des identischen Zeitraums verwerten müssen, um ihren Energieverbrauch zu decken. Dies bedingt folglich eine größere aufgenommene Glukosemenge pro Zeiteinheit, was potentiell durch eine größere Anzahl sich in der Zellmembran befindlicher Glukosetransporter bewerkstelligt wird. Folglich analysierten wir die Expression des Glukosetransporters GLUT – 1 auf der Oberfläche der drei LZK. Hierzu bestimmten wir den prozentualen Anteil der GLUT – 1 positiven Zellen in der jeweiligen Gesamtpopulation (siehe 2.5.3). Es zeigte sich, dass die Zellen des Patienten BV mit ihrem eher physiologischen Kohlenhydratstoffwechsel das geringste Expressionslevel mit durchschnittlich vier Prozent aufwiesen, worauf die PH – Zellen mit 14 Prozent folgten (siehe Abbildung 8D) Die Zellen der LZK CR, welche die höchste Glukoseaffinität und folglich das schnellste Aufnahmeverhalten präsentierten, wiesen ebenfalls die höchste Expression des Glukosetransporters 1 von durchschnittlich 18 Prozent auf. Dies ist als Voraussetzung zur Aufnahme größerer Glukosemengen in der selben Zeit anzusehen. Alles in allem bestätigten die Analysen, dass eine vermehrte Aufnahme von Glukose in einem identischen Zeitraum unter anderem durch eine vermehrte Expression des Glukosetransporters GLUT – 1 auf der Zelloberfläche hervorgerufen wird. Zieht man die bekannten Transplantationsergebnisse hinzu (siehe Abbildung 8B und 3.2.1), fallen erneut Parallelen zwischen der Aggressivität der induzierten Leukämie in der Maus und dem prozentualen Anteil der GLUT – 1 positiven Zellen in den Gesamtpopulationen der LZK auf. Diese stellen sich in analoger Weise zu den Seahorsemessungen und der durchflusszytometrischen Analyse des Glukoseaufnahmeverhaltens der Zellen dar. Die Zellen des Patienten CR, welche die ALL mit der kürzesten Überlebensdauer der transplantierten

Empfängertiere propagieren, fielen durch ein deutlich höheres GLUT – 1 Expressionslevel auf.

3.4 Aggressivität der B-ALL ist durch normoxische Stabilisierung von HIF und Nutzung von dessen Genprodukten gekennzeichnet

Die Abweichungen des Kohlenhydratstoffwechsels der LZK von dem Stoffwechselprofil physiologischer Knochenmarkszellen präsentierte vor allem ein erhöhtes Aktivitätslevel der Glykolyse in den aggressiveren Kulturen CR und PH (siehe 3.1 und Abbildung 7). Nun stellte sich die Frage, ob es eine gemeinsame Ursache für die detektierten Unterschiede zwischen den LZK geben könnte. Dies führte uns zu folgender Überlegung: eine aggressivere Leukämie könnte unter anderem durch eine hohe Glykolyseaktivität und damit einer prinzipiell von Sauerstoff unabhängigen Energiegewinnung gekennzeichnet sein. Dies bedingt ebenfalls eine vergleichsweise hohe Aufnahmerate des Substrates in das Zellinnere und eine große Glukoseaffinität, um die zur korrekten Zellfunktion benötigte Energiemenge generieren zu können.

Eine mögliche Erklärung für die bisherigen Ergebnisse könnte eine unter normoxischen Bedingungen vorhandene Aktivität von HIF sein, wie sie als sogenannte „Pseudohypoxie“ beschrieben wurde [96, 97]. Um diesen Aspekt näher zu beleuchten, untersuchte Dr. Bartosch Wojcik das Expressionslevel des HIF - 1 α unter normoxischen Bedingungen und nach der Behandlung der Zellen mit Kobaltchlorid, was den Vergleich der vorliegenden Proteinmenge zwischen normoxischen und hypoxischen Umgebungsbedingungen ermöglichte.

Hierbei rief das Vorliegen der chemisch-induzierten Hypoxie in den Zellen der BV-Kultur einen Anstieg der detektierbaren HIF - 1 α Menge hervor, wie man es anhand bekannter Stoffwechselanalysen physiologischer Zellen erwarten würde (siehe Abbildung 12).

Ein gegensätzliches Bild stellte der Western-Blot für die beiden aggressiveren LZK dar, welche auf die chemische Hypoxie lediglich mit einem leichten Anstieg der nachweisbaren HIF - 1 α - Menge reagierten. Vergleicht man die durch HIF - 1 α hervorgerufenen Banden der drei Kulturen, war augenscheinlich in den

Zellen des Patienten BV unter normoxischen Bedingungen kaum HIF - 1 α nachweisbar. Nach Kobaltchloridbehandlung näherte sich die nachweisbare HIF - 1 α Menge denen der beiden anderen LZK unabhängig vom Vorliegen von Sauerstoff in seiner Intensität stark an (siehe Abbildung 12) [61]. Dies legte den Schluss nahe, dass die beiden aggressiveren LZK CR und PH die Fähigkeit besitzen HIF - 1 α unter normoxischen Bedingungen zu stabilisieren und folglich die codierten Genprodukte nutzen zu können.

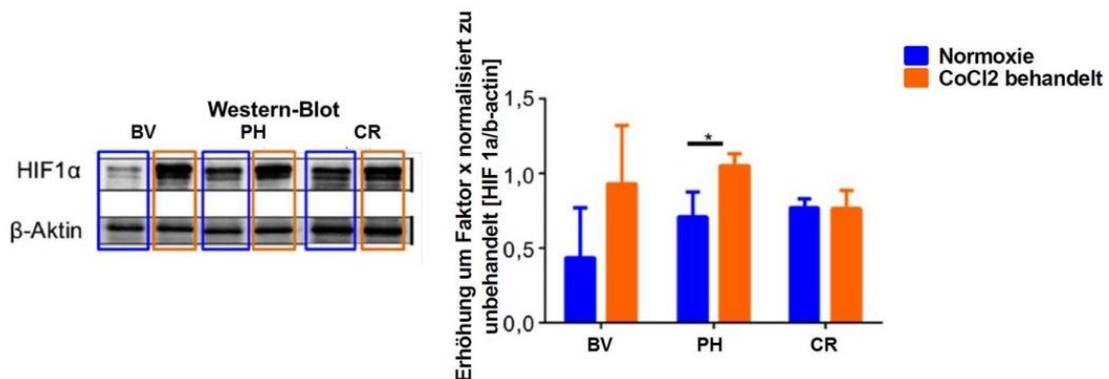


Abbildung 12: LZK PH und CR stabilisieren unter Normoxie HIF - 1 α . HIF - 1 α Expression in den drei LZK vergleichend unter normoxischen Bedingungen und nach Induktion chemischer Hypoxie mittels CoCl₂ (n = 3 unabhängige Experimente; * = P<0,05) nach „Charakterisierung leukämieinduzierender Zellen bei der humanen adulten B-Zell akuten lymphatischen Leukämie“ [61]

3.4.1 Stabilisierung von HIF unter Normoxie ermöglicht die GLUT – 1 - Expression und als Folge eine erhöhte Glukoseaufnahme

Um die Auswirkungen der unterschiedlichen HIF - 1 α Mengen auf dessen Zielgene analysieren zu können, untersuchten wir das Expressionslevel von GLUT 1 der drei Kulturen im Vergleich von unbehandelten Zellen und Zellen, die für vier Stunden mit Kobaltchlorid behandelt wurden. Hierbei gingen wir davon aus, dass das Vorliegen des Transkriptionsfaktors zu einer vermehrten Expression des Glukosetransporters führt. Die durchflusszytometrischen Messungen fanden nach einer Wartezeit von 24 Stunden statt, um den Zellen ausreichend Zeit zur Durchführung der Transkription und Translation der für GLUT – 1-kodierenden Gene einzuräumen.

Zunächst betrachteten wir lediglich das native GLUT – 1 Expressionslevel, welches den Anteil GLUT – 1 positiver Zellen der drei LZK unter normoxischen Bedingungen repräsentierte. Hierbei spiegelte sich die bekannte Verteilung GLUT – 1 positiver Zellen zwischen den drei Kulturen wieder (siehe 3.1 und

Abbildung 8D). Nach Behandlung mit Kobaltchlorid präsentierten die Zellen des Patienten BV einen deutlichen Anstieg des Anteils GLUT – 1 positiver Zellen um den Faktor 1,7. Wohingegen dieser in den Zellen der aggressiveren LZK CR und PH nicht beziehungsweise nur geringgradig anstieg (siehe Abbildung 13A).

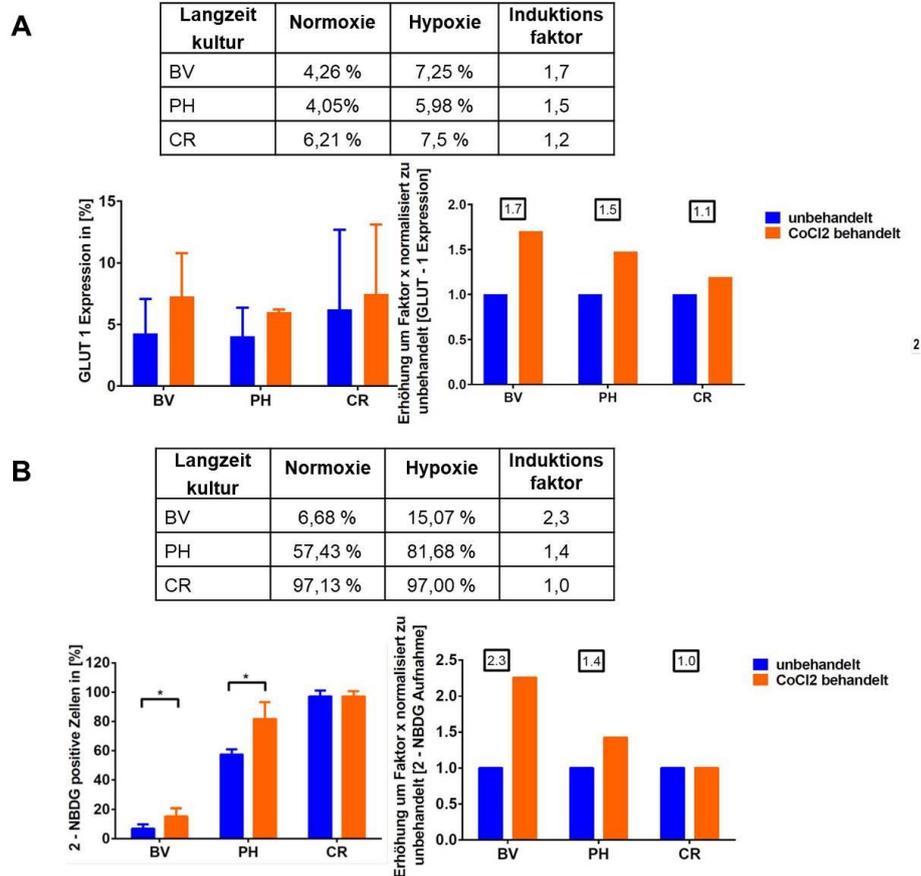


Abbildung 13: Die Stabilisierung von HIF-1 unter Normoxie führt zur Expression von Zielgenen, wie GLUT - 1, was zur vermehrten Glukoseaufnahme beiträgt. A: prozentualer Anteil GLUT – 1 positiver Zellen in den Gesamtpopulationen der LZK im Vergleich zwischen normoxischen Bedingungen und nach Behandlung mit CoCl₂ für vier Stunden (n = 3 unabhängige Versuche). **B:** prozentualer Anteil 2 – NBDG positiver Zellen in den drei Kulturen vergleichend zwischen unbehandelten Zellen und nach Induktion chemischer Hypoxie mittels CoCl₂ (n = 4 unabhängige Versuche; Paired t-test: * = P<0,05)

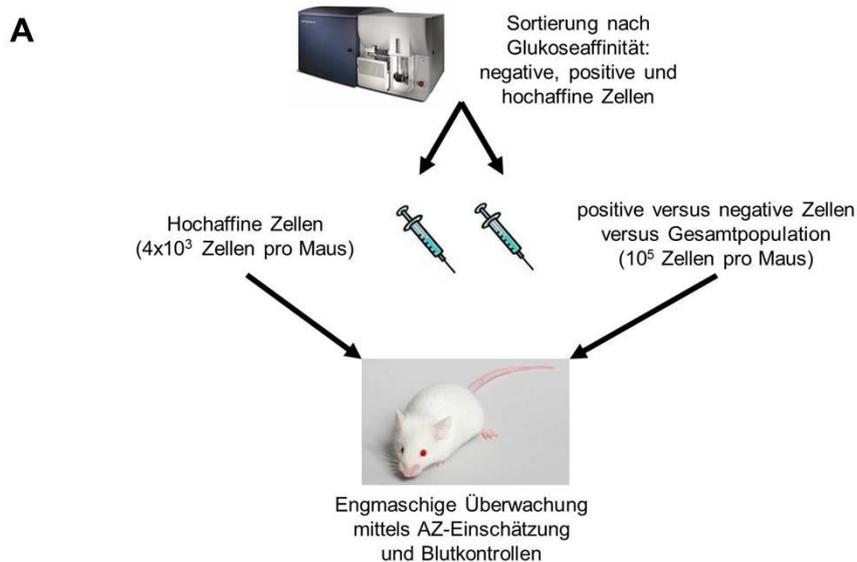
Infolgedessen stellte sich die Frage, ob sich dies auf die Glukoseaufnahme der Zellen auswirken und in funktionellen Unterschieden münden würde. Dieser Fragestellung widmeten wir uns unter Zuhilfenahme des etablierten 2 – NBDG-Assays mittels Durchflusszytometrie. Die in Abbildung 13B dargestellten Ergebnisse zeigen zum einen das bereits bekannte Aufnahmeverhalten der Kulturen gegenüber dem Glukoseanalogon unter normoxischen Bedingungen (siehe 3.1 und Abbildung 8C) und bilden zum anderen die Reaktion der Zellen auf die vorliegende chemische Hypoxie ab. Nach erfolgter Behandlung der Zellen mit der Chemikalie über einen Zeitraum von 24 Stunden nahm der

prozentuale Anteil 2 – NBDG positiver Zellen vor allem in den Zellen des Patienten BV zu. Dies führte zu einer Induktion der Glukoseaufnahme um den Faktor 2,3 beruhend auf der vermehrten Energieproduktion mittels anaerober Glykolyse. In den Zellen des Patienten PH wird ein Anstieg um 40% hervorgerufen. Lediglich die Zellen des Patienten CR zeigen keinerlei Reaktion in ihrem Aufnahmeverhalten auf die Behandlung mit Kobaltchlorid (siehe Abbildung 13B). Dies beruht auf der bereits unter normoxischen Bedingungen bestehenden maximalen Aufnahmeeffizienz zur schnellstmöglichen Deckung ihres Glukosebedarfes. Die im Vergleich dieser drei Kulturen als Induktoren der aggressivsten Leukämie bekannten Zellen des Patienten CR unterstrichen mit ihrem Verhalten den optionalen Zusammenhang zwischen Leukämieaggressivität und hoher Glukoseaufnahme sowie stetig hoher Aktivität der Glykolyse.

Damit konnten wir zeigen, dass die Stabilisierung des Transkriptionsfaktors HIF - 1 α in den beiden aggressiveren LZK CR und PH unter normoxischen Bedingungen Einfluss auf die Genexpression sowie Transkription und Translation der untergeordneten Gene nimmt. Dies resultierte in einer vergleichsweise hohen Expression des GLUT - 1 bei Normoxie und nur geringgradiger Zunahme der exprimierten Transporter unter hypoxischen Bedingungen. Außerdem manifestierte sich dies auf funktionellem Niveau.

3.5 Transplantation anhand des Glukoseaufnahmeverhaltens

Im Vergleich der hochaffinen Subpopulationen zwischen den LZK stellten sich die PH-Zellen als die diskreteste Population dar (siehe 3.2.3 und Abbildung 11). Des Weiteren zeigten die bereits erhobenen Daten die größte Analogonaffinität in den Zellen des Patienten CR (siehe 3.2.1 und Abbildung 8C). Um nun funktionell zu überprüfen, ob Leukämiesubpopulationen mit unterschiedlichem Glukoseaufnahmeverhalten konkret definierbare Eigenschaften in der Leukämogenese besitzen, haben wir diese prospektiv mit FACS angereichert und in Empfängermäuse transplantiert (siehe Abbildung 14A).



B

<u>Primäre Transplantation</u>	Gesamt-population	2 – NBDG negativ	2 – NBDG positiv	2 – NBDG hochaffin
Zensierte Subjekte	0	0	0	1
Einschluss nach Ableben	5	5	5	3
medianes Überleben [Tage]	72	77	73	139

Abbildung 14: Übersicht zur durchgeführten primären Transplantation unter Verwendung von CR-Zellen. A: Sortierung der Zellen anhand ihrer Glukoseaffinität (Gesamtpopulation, 2 – NBDG negativ und positiv à 10^5 Zellen pro Maus; 2 – NBDG hochaffine Zellen à 4×10^3 Zellen pro Maus). **B:** tabellarische Darstellung der eingeschlossenen Versuchstiere

3.5.1 Höhere Glukoseaffinität kommt als potentieller Aggressivitätsmarker aller CR-Zellen in Betracht

In den folgenden Betrachtungen werde ich zunächst lediglich auf die drei Transplantationsgruppen der Gesamtpopulation, der 2 – NBDG negativen und 2 – NBDG positiven Zellen eingehen, da diese mit identischer Zellzahl transplantiert wurden. Zunächst zeigte sich, dass alle drei 2 – NBDG – Subpopulationen zur Initiation einer Leukämie fähig waren.

Das durchgeführte Transplantationsexperiment umfasste eine Gesamtdauer von 78 Tagen. Um diesen Zeitraum überblicken zu können, betrachten wir zunächst den Verlauf des prozentualen Anteils humaner Zellen an allen weißen Blutzellen (siehe Abbildung 15A). Die Zellen der Gesamtpopulation und der 2 – NBDG positiven Subpopulation riefen über den gesamten Beobachtungszeitraum einen steileren Anstieg im Vergleich zu dem in den mit 2 – NBDG negativen Zellen transplantierten Mäusen hervor. Bis Tag 70

entwickelte sich zwischen diesen beiden lediglich ein geringer Unterschied im medianen Anteil der humanen Zellen von 2,8 %. Prinzipiell konnte jedoch in allen drei Gruppen ein analog verlaufendes Ausbreitungsverhalten beobachtet werden.

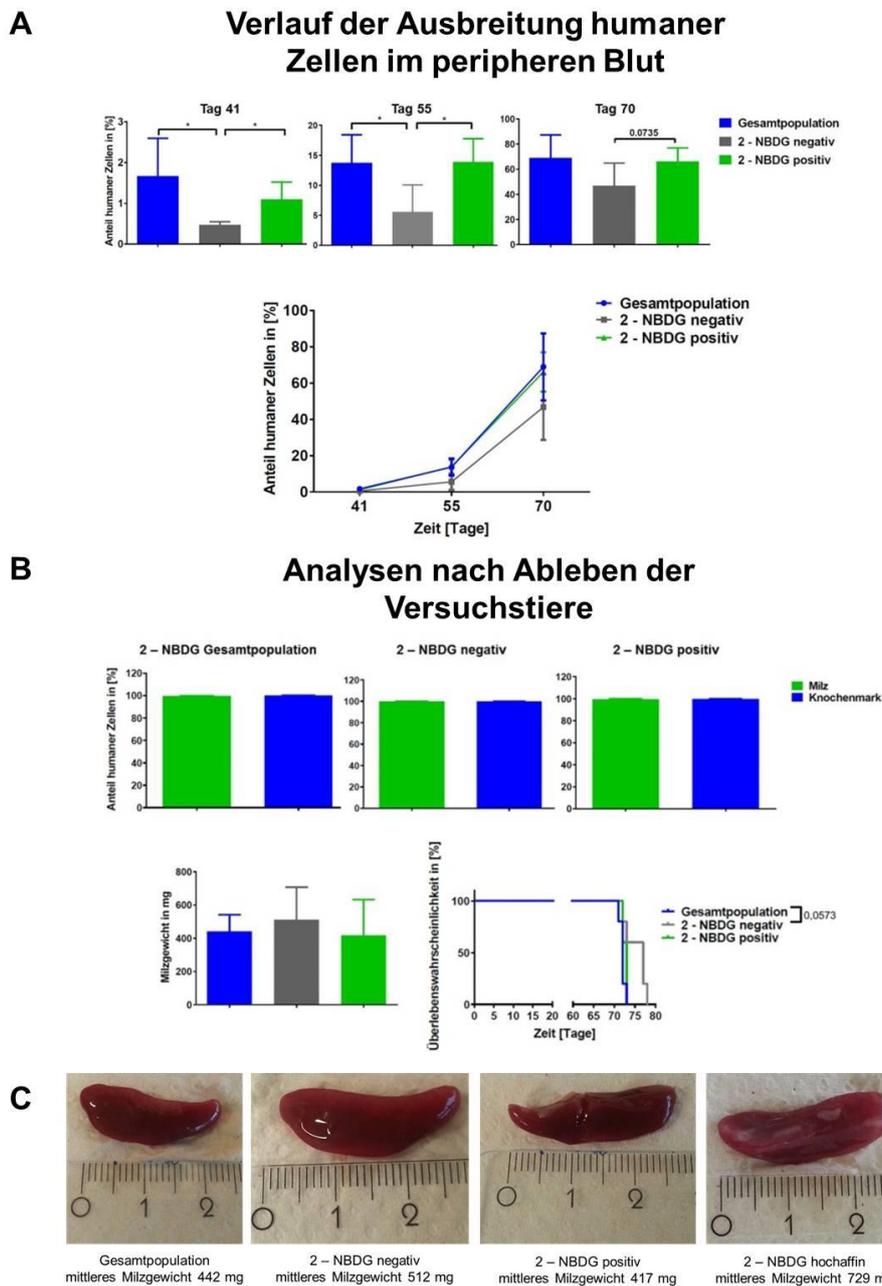


Abbildung 15: Größere Glukoseaffinität stellt einen potentiellen Aggressivitätsmarker der CR-Zellen dar. **A:** Entwicklung des prozentualen Anteils der humanen Zellen im peripheren Blut des Empfängertieres im zeitlichen Verlauf vergleichend zwischen den Gruppen der Gesamtpopulation, 2 - NBDG negativ und 2 - NBDG positiv (unpaired t-test; * = $P < 0,05$). **B:** Anteil humaner Zellen in Milz und Knochenmark der Versuchstiere sowie Ausmaß der vorliegenden Splenomegalie nach Ableben (Gewicht in mg), und Darstellung der Überlebensdauer der Mäuse (Log-rank [Mantel-Cox] – Test; * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$); **C:** Abbildung der Splenomegalien vergleichend zwischen den vier Transplantationsgruppen anhand repräsentativer Beispiele

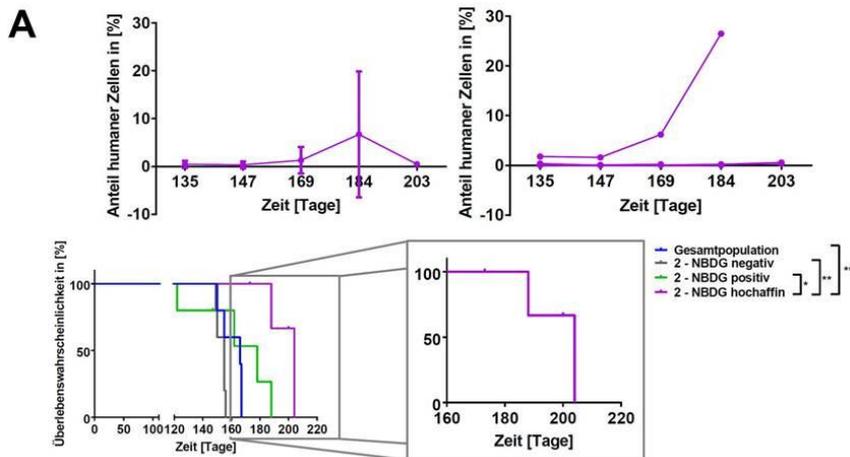
Analysiert man die Überlebensdauer der transplantierten Mäuse, fiel das mediane Überleben der 2 – NBDG positiven Mäuse mit 73 Tagen minimal kürzer aus als das der mit 2 – NBDG negativen Zellen transplantierten Tiere, welche ein medianes Überleben von 77 Tagen aufwiesen. Das Überleben der Mäuse, die mit der gesamten Population der Zellen transplantiert wurden, fiel mit 72 Tagen am kürzesten aus (siehe Abbildung 15B). Dieses Verhalten lässt sich unter anderem auf den durch das Analogon hervorgerufenen Proliferationsnachteil der Zellen in den mit 2 – NBDG positiven Zellen transplantierten Tieren zurückführen (siehe 3.2.2 und Abbildung 9). Mittels Analyse der prozentualen Anteile der humanen Zellen an den Organen der verstorbenen Tiere ließ sich infolge des fast 100-prozentigen Anteils der humanen an allen vitalen Zellen von Milz und Knochenmark die Leukämie als Todesursache bestätigen, wobei kein Unterschied zwischen den Experimentalgruppen bestand. Das erlaubte den Schluss, dass der hervorgerufene Phänotyp der Leukämie unabhängig von der Glukoseaffinität der Zellen war.

Die Analysen der Blutproben ermöglichten primär den Schluss auf eine potentiell existierende Verbindung zwischen dem Vorliegen einer höheren Glukoseaffinität und einem stärkeren leukämogenen Potential dieser Zellen, welches sich durch den schnelleren Anstieg des prozentualen Anteils der humanen Zellen im Blut zeigte. Daraus müsste ein kürzeres medianes Überleben der mit 2 – NBDG positiven Zellen transplantierten Mäuse resultieren (siehe Abbildung 15B), welche median früher als die mit 2 – NBDG negativen Zellen transplantierten Tiere verstarben. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant und konnte folglich die oben getätigte Annahme nicht suffizient bestätigen (siehe Abbildung 15).

Anschließend gehe ich auf das Expansionsverhalten der als 2 – NBDG hochaffin klassifizierten Zellen im Empfängerorganismus ein, wobei die geringere Anzahl transplantierte Zellen (4.000 Zellen pro Maus) zu beachten ist. Aus diesem Grund sind vergleichende Analysen zwischen diesen Tieren und den anderen Transplantationsgruppen nur eingeschränkt möglich. Überblickt man zunächst das gesamte Teilerperiment fällt die Dauer von insgesamt 209 Tagen auf. Außerdem stellte sich der Ausbreitungsverlauf der

humanen Zellen im peripheren Blut der drei eingeschlossenen Empfängertiere unterschiedlich dar. Der zeitlich verzögerte Ausbreitungsbeginn der humanen Zellen im dritten Tier führte zu einem längeren Gesamtüberleben nach Transplantation und einer medianen Lebensdauer von 139 Tagen (siehe Abbildung 16).

Verlauf der Ausbreitung humaner Zellen im peripheren Blut



Analysen nach Ableben der Versuchstiere

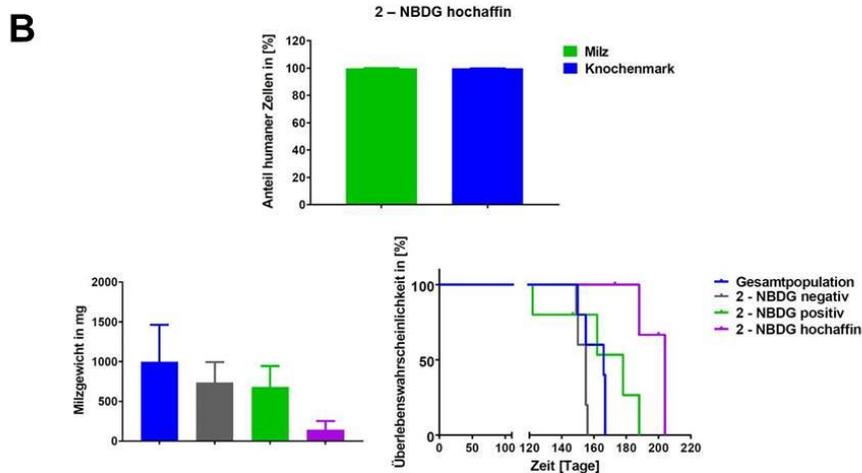
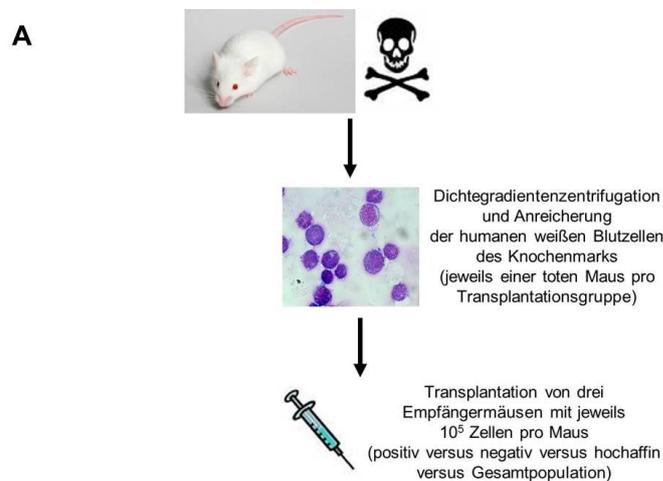


Abbildung 16: 4000 hochaffine Zellen initiieren eine humane Leukämie *in vivo*. **A:** Illustration der Ausbreitung der Zellen im peripheren Blut und den peripheren Organen (unpaired t-test; * = $P < 0,05$). **B:** Darstellung des Überlebens der in diesem Teilerperiment eingeschlossenen Versuchstiere (Log-rank [Mantel-Cox] – Test; * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$).

3.5.2 Seriell transplantierte 2 – NBDG negative CR – Zellen initiieren aggressivere Leukämie

Infolge der unzureichenden Erkenntnisse aus dem ersten Transplantationsexperiment zur Bedeutung der Glukoseaffinität als potentiell Aggressivitätsmarker der initiierten Leukämie, schlossen wir eine serielle Transplantation der Zellen an. Diesbezüglich ist zunächst anzumerken, dass bereits erfolgreiche serielle Transplantationen von primärem ALL - Patientenmaterial beschrieben sind [98, 99], jedoch bisher keine Übertragung von Zellen der LZK von Maus zu Maus stattgefunden hatte. Somit war zuvor nicht bekannt, ob diese Zellen zu einer erneuten Leukämieinitiation im Rahmen einer seriellen Transplantation fähig sind, so dass bereits die Erkenntnis, dass es in allen in diesem Versuch eingeschlossenen Mäusen zur Ausbildung einer humanen Leukämie kam, einen ersten Wissenszuwachs darstellte. Im Rahmen dieser seriellen Transplantation wurden humane Zellen aus dem Knochenmark einer verstorbenen Maus jeder primären Transplantationsgruppe in jeweils drei weitere Versuchstiere übertragen (siehe 2.6.3 und Abbildung 17).



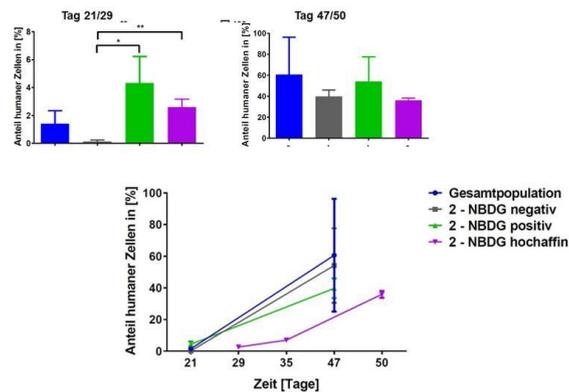
B

<u>Serielle Transplantation</u>	Gesamt-population	2 – NBDG negativ	2 – NBDG positiv	2 – NBDG hochaffin
Zensierte Subjekte	1	0	0	1
Einschluss nach Ableben	2	3	3	2
medianes Überleben [Tage]	54	57	63	69

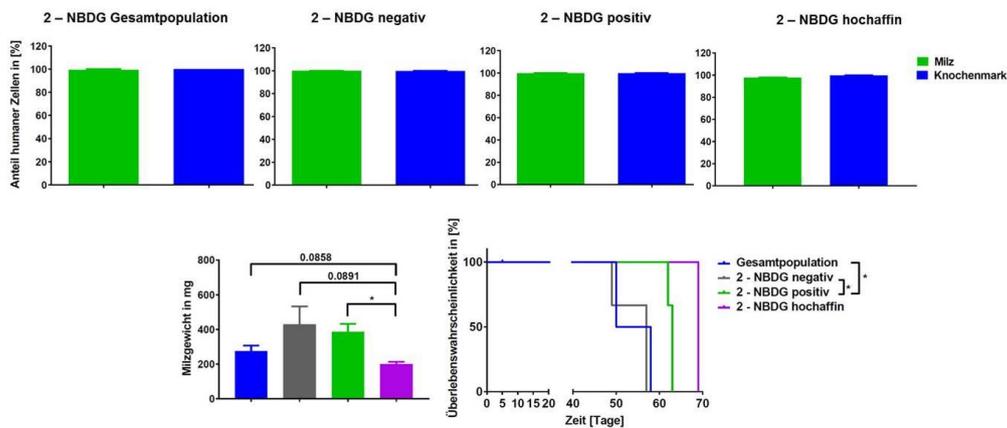
Abbildung 17: Übersicht zur durchgeführten seriellen Transplantation. A: Abbildung der Arbeitsschritte zur Übertragung der humanen Zellen aus dem Knochenmark des primären Empfängertieres in die Mäuse der seriellen Transplantation (10^5 Zellen pro Maus). **B:** tabellarische Darstellung der eingeschlossenen Versuchstiere

Verschafft man sich mittels der ausgewerteten Daten des peripheren Blutes einen Überblick der Leukämieprogression, erkennt man, dass sich im Rahmen der seriellen Transplantation die Zunahme der humanen Zellen eher zwischen den Tieren, die mit 2 – NBDG negativen Zellen, sowie mit Zellen der Gesamtpopulation transplantiert wurden, ähnelten. Beide Gruppen zeigten einen schnellen Anstieg zwischen Tag 21 und 47 nach Transplantation, welcher schlussendlich in einer Differenz des medianen Anteils von 6,45 % mündete. Im selben Zeitfenster nahm der prozentuale Anteil der humanen Zellen im Blut der 2 –NBDG positiv transplantierten Mäuse nur in einem geringeren Maße zu. Besonders auffällig gestaltete sich jedoch die Zunahme der Zellen in den mit 2 – NBDG hochaffinen Zellen seriell transplantierten Mäusen, da dieser zeitlich verzögert begann, jedoch anschließend einen ähnlichen Progress wie ihn die mit 2 – NBDG positiven Zellen transplantierten Mäuse zeigten, aufwies. Dieses Verhalten führte an Tag 47/50 zu einem vergleichbaren Niveau humaner Zellen in beiden Transplantationsgruppen (siehe Abbildung 18). Die serielle Transplantation wies eine Gesamtdauer von 69 Tagen auf und führte in allen Transplantationsgruppen zum Ableben infolge der initiierten Leukämie.

A Verlauf der Ausbreitung humaner Zellen im peripheren Blut



B Analysen nach Ableben der Versuchstiere



C

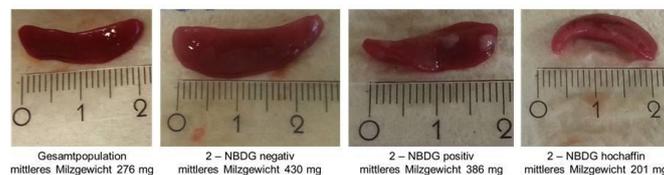


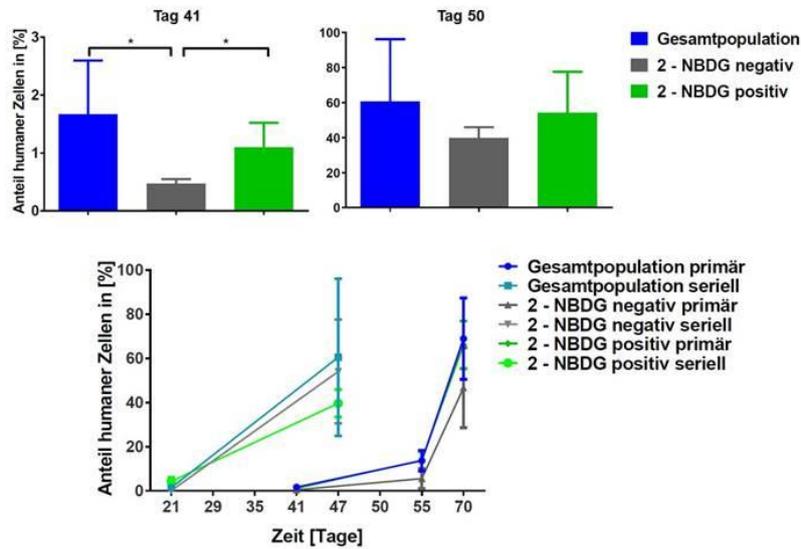
Abbildung 18: Seriell transplantierte als 2 – NBDG negativ klassifizierte CR-Zellen weisen höheres leukärogenes Potential auf. A: Ausbreitung der humanen Zellen im peripheren Blut der Empfängermaus im Verlauf der seriellen Transplantation vergleichend zwischen den Gruppen der Gesamtpopulation, 2 – NBDG negativ, 2 – NBDG positiv und 2 – NBDG hochaffin (unpaired t – test; * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$). **B:** prozentualer Anteil humaner Zellen in Milz und Knochenmark sowie Ausmaß der vorliegenden Milzvergrößerung nach dem Tod (Gewicht in mg) und Darstellung der Überlebensdauer der Tiere (Log-rank [Mantel-Cox] - Test; * = $P < 0,05$). **C:** Abbildung der Splenomegalien vergleichend zwischen den vier Transplantationsgruppen anhand repräsentativer Beispiele.

Das aus diesem Versuch resultierende Ergebnis, welches ein signifikant kürzeres Überleben der 2-NBDG negativ transplantierten Tiere beinhaltete, erweckte den Eindruck, dass diese ein größeres leukärogenes Potential aufweisen. Insgesamt widerlegte es jedoch die aufgestellte Hypothese dahingehend, dass Zellen einer Subpopulation mit höherer Glukoseaffinität zwangsläufig eine aggressivere Leukämie initiieren.

3.5.3 Seriell initiierte Leukämien bilden aggressiveren Krankheitsverlauf aus

Abschließend folgt der Vergleich zwischen der primären und der angeschlossenen seriellen Transplantation (siehe Abbildung 19). Bezüglich dem Krankheitsverlauf und daraus resultierendem medianen Überleben wurde in bisherigen Transplantationsexperimenten eine Verkürzung der Zeitspanne bis zum Anwachsen der Zellen und Ausbrechen der Leukämie im Rahmen serieller Transplantationen [99] beschrieben. Die Ergebnisse unserer Xenotransplantation zeigten eine raschere Ausbreitung humaner Zellen in den murinen Organismen der seriellen Transplantation unabhängig von der Transplantationsgruppe. Außerdem lag der prozentuale Anteil der humanen Zellen im Blut der zur seriellen Transplantation gehörenden Mäuse zu vergleichbaren Zeitpunkten nach Transplantation grundsätzlich höher.

A Verlauf der Ausbreitung humaner Zellen im peripheren Blut



Analysen nach Ableben der Versuchstiere

B

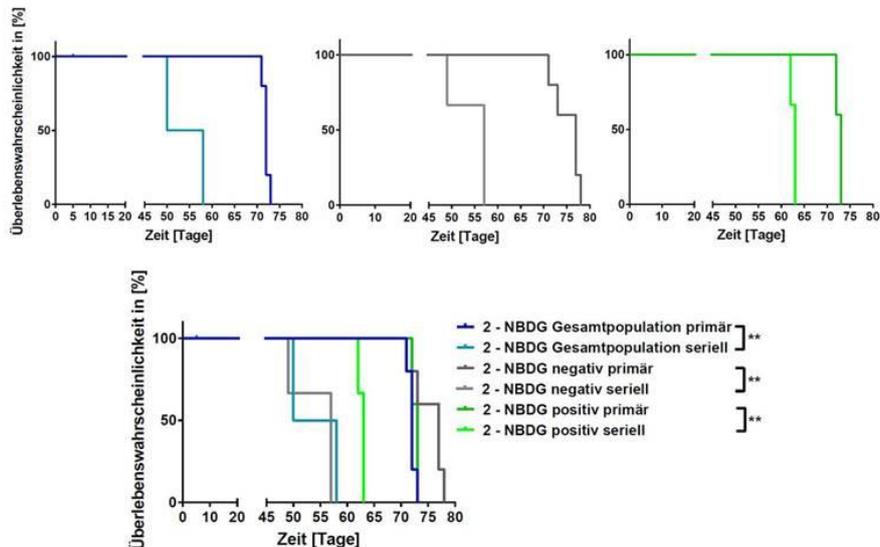


Abbildung 19: Seriell transplantierte CR – Zellen initiieren einen aggressiveren Leukämiephänotyp. A: Vergleich des prozentualen Anteils humaner Zellen im peripheren Blut zwischen primärer und serieller Transplantation der Zellen des Patienten CR sowie dessen zeitlicher Verlauf (unpaired t – test; * = $P < 0,05$); **B:** Darstellung der Überlebensraten zwischen primärer und serieller Transplantation der Gruppe der Gesamtpopulation, 2 – NBDG negativen und 2 – NBDG positiven Zellen (Log-rank [Mantel-Cox] – Test; * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$)

Befasst man sich des Weiteren mit den mittleren Überlebensraten der jeweiligen Empfängertiere vergleichend zwischen beiden durchgeführten Transplantations- versuchen (siehe Abbildung 19) fiel auf, dass sämtliche in der seriellen Transplantation eingeschlossenen Versuchstiere ein kürzeres

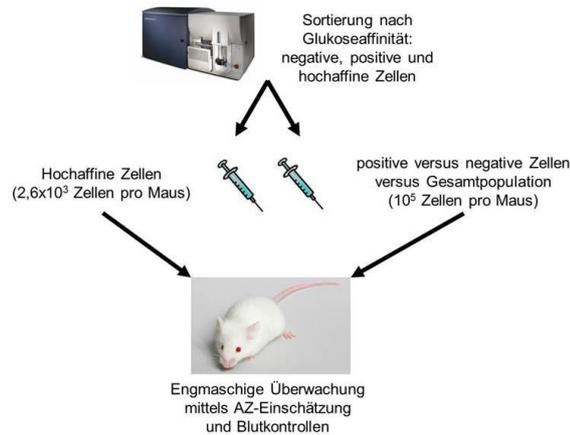
Überleben (mit maximal 69 Tagen) aufwiesen. Außerdem zeigte sich das mediane Überleben der drei seriell transplantierten Mausgruppen (Gesamtpopulation, 2 – NBDG negativ, 2 – NBDG positiv) jeweils als hochsignifikant kürzer. Dies unterstrich zusätzlich die höhere Aggressivität der initiierten Leukämie und gab Hinweis auf ein höheres leukämogenes Potential der Zellen im Rahmen der seriellen Übertragung. Das beobachtete Verhalten ist zum einen durch Selektion humaner Zellen bezüglich ihres leukämogenen Potentials in der primären Transplantation erklärbar, so dass die zur seriellen Transplantation verwendeten Zellen zwar die selbe Anzahl jedoch eine abweichende Zusammensetzung aufgewiesen haben könnten. Zum anderen könnten die transplantierten Zellen sich mittels Adaptionsvorgänge an den murinen Organismus angepasst haben, so dass sie nach der Übertragung in die zweite Maus umgehend mit der Ausbreitung beginnen konnten.

3.5.4 In den Zellen des Patienten PH erscheint geringere Glukoseaffinität vorteilhaft für die Leukämiezellen

Um unsere Hypothese weitergehend zu untersuchen, trennten wir die Zellen der LZK PH ebenfalls in deren Glukoseaffinität – Subpopulationen auf und transplantierten diese (siehe Abbildung 20). Die hierbei übertragenen Zellen waren zur Initiation einer Leukämie fähig.

A

Sortierung der Zellen zur Transplantation



B

	Gesamt-population	2 – NBDG negativ	2 – NBDG positiv	2 – NBDG hochaffin
Zensierte Subjekte	0	0	1	3
Einschluss nach Ableben	5	5	4	2
medianes Überleben [Tage]	166	155	178	204

Abbildung 20: Übersicht zur durchgeführten Transplantation mit Zellen des Patienten PH.
A: Sortierung der PH – Zellen anhand deren Glukoseaffinität im Rahmen der Transplantation (Gesamtpopulation, 2 – NBDG negativ und positiv à 10^5 Zellen pro Maus; 2 – NBDG hochaffine Zellen à $2,6 \times 10^3$ Zellen pro Maus); **B:** tabellarische Darstellung der eingeschlossenen Versuchstiere in die PH – Transplantation.

Im Vergleich der medianen Überlebensdauern wiesen die mit 2 – NBDG – negativen Zellen transplantierten Mäuse die kürzeste Lebensspanne (155 Tage), gefolgt von der Gesamtpopulation (medianes Überleben von 166 Tagen), auf. Gegensätzlich dazu gestaltete sich die Überlebensdauer der mit 2 – NBDG positiven Zellen transplantierten Empfängertiere mit 178 Tagen am längsten (siehe Abbildung 21). Dieses Phänomen lässt sich jedoch nicht durch einen potentiellen Proliferationsnachteil der 2 – NBDG positiven Zellen (siehe 3.2.2 und Abbildung 9) erklären.

Das längere mediane Überleben der mit 2 – NBDG positiven Zellen transplantierten Tiere kann als möglicher Hinweis auf ein geringeres leukämogenes Potential der 2-NBDG positiven Zellen angesehen werden, was primär die Assoziation einer Korrelation zwischen einer höheren Glukoseaffinität und der Initiation einer aggressiveren Leukämie negieren würde. Behält man unsere Hypothese bei, ist davon auszugehen, dass die mit der Gesamtpopulation transplantierten Mäuse eine Leukämie ausbilden, welche in einer medianen Lebensdauer zwischen den anderen

Transplantationsgruppen der 2 – NBDG negativen und positiven Zellen enden müsste. Dies ließ sich im Rahmen dieser Transplantation bestätigen (siehe Abbildung 21). Infolgedessen kann diese Transplantation die Frage des Zusammenhangs zwischen der Glukoseaffinität der Zellen und der Aggressivität der durch diese initiierten Leukämie ebenfalls nicht eindeutig beantworten.

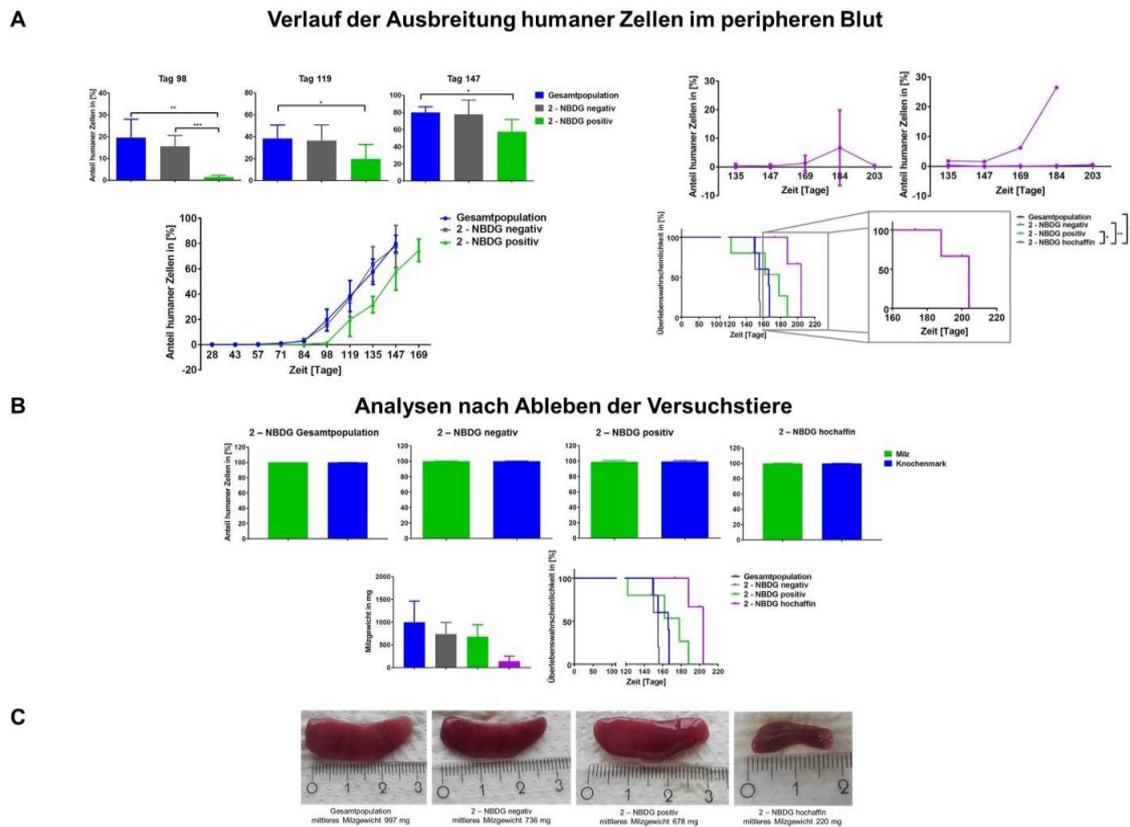


Abbildung 21: Eine geringere Glukoseaffinität erscheint in PH-Zellen als vorteilhaft für den Leukämieprogress. A: Entwicklung des prozentualen Anteils der humanen Zellen im peripheren Blut des Empfängertieres im zeitlichen Verlauf vergleichend zwischen den Gruppen der Gesamtpopulation, 2 – NBDG negativ, 2 – NBDG positiv und 2 – NBDG hochaffin (unpaired t – test; * = P<0,05; ** = P<0,01); **B:** Anteil humaner Zellen in Milz und Knochenmark der Versuchstiere sowie Ausmaß der vorliegenden Splenomegalie nach Ableben (Gewicht in mg) und Darstellung der Überlebensdauer der Mäuse (Log-rank [Mantel-Cox] – test; * = P < 0.05; ** = P < 0.01; *** = P < 0.001); **C:** Abbildung der Splenomegalien vergleichend zwischen den vier Transplantationsgruppen anhand repräsentativer Beispiele

3.5.5 CD 34-/38+-B-ALL-Zellen spielen besondere Rolle in Initiation und Progress der Leukämie

Nachdem Dominique Bonnet und John E. Dick die LIZ der Akuten myeloischen Leukämie mittels deren Expressionsmuster CD 34+/CD38- definieren konnten [86], stellt sich die Frage, ob es möglicherweise ähnliche spezifische Expressionsmuster im Rahmen der B - ALL geben könnte. Die Verteilung der

vier durch die Oberflächenmarker CD 34 und 38 definierten Subpopulationen in den LZK wurde bereits durch Dr. Bartosch Wojcik mittels durchflusszytometrischer Messungen analysiert. Hierbei konnten reproduzierbar die verschiedenen LZK durch individuelle Expressionsmuster charakterisiert werden, wobei die LZK des Patienten PH vorwiegend aus CD34+ - Zellen bestanden (CD34+CD38- 42,4 % [+/- 20,5 %], CD34+CD38+ 39,5 % [+/- 17,1 %]), wohingegen der Großteil der CR-Zellen CD 34-/CD38+ war [99,2 % +/- 0,9 %] [61]. Demzufolge war vom Vorliegen dieser Verteilung zum Zeitpunkt der Transplantation der Zellen in den murinen Organismus auszugehen (siehe Abbildung 22).

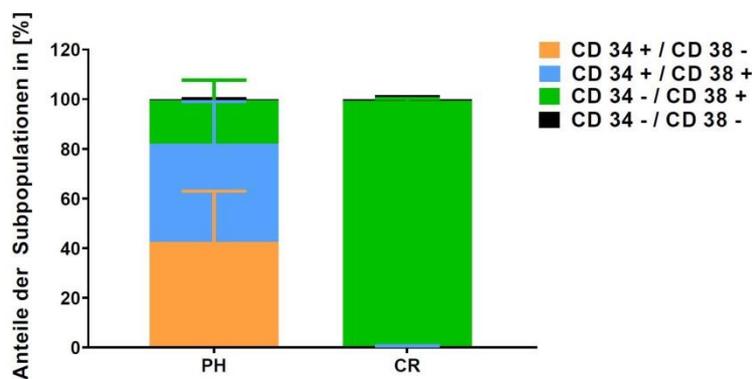


Abbildung 22: Anteil der CD 34 / CD 38 - Subpopulationen in den LZK CR und PH vor Transplantation

Infolgedessen analysierten wir die prozentualen Anteile der humanen Zellen in den Empfängerorganismen im Verlauf des Beobachtungszeitraums sowie nach dem Tod der Tiere. Aufgrund der Differenzen zwischen den vier verschiedenen Versuchsgruppen, gehe ich zunächst jeweils nur auf die mit identischer Zellzahl transplantierten Mäuse ein.

Vergleicht man die drei Gruppen der CR – Transplantation ergab sich ein relativ homogenes Bild; lediglich in der Blutanalyse an Tag 41 sind Differenzen bezüglich der Anteile der CD34-/38+ und der doppelt-negativen Zellen detektierbar (siehe Abbildung 23). Man ermittelte eine Dominanz der CD 34-/38+ Zellen über den gesamten Beobachtungszeitraum, was als Charakteristikum des Leukämiepropagierenden Zellklons des Patienten CR anzusehen ist und bereits in den Analysen der gesamten LZK nachweisbar war [61].

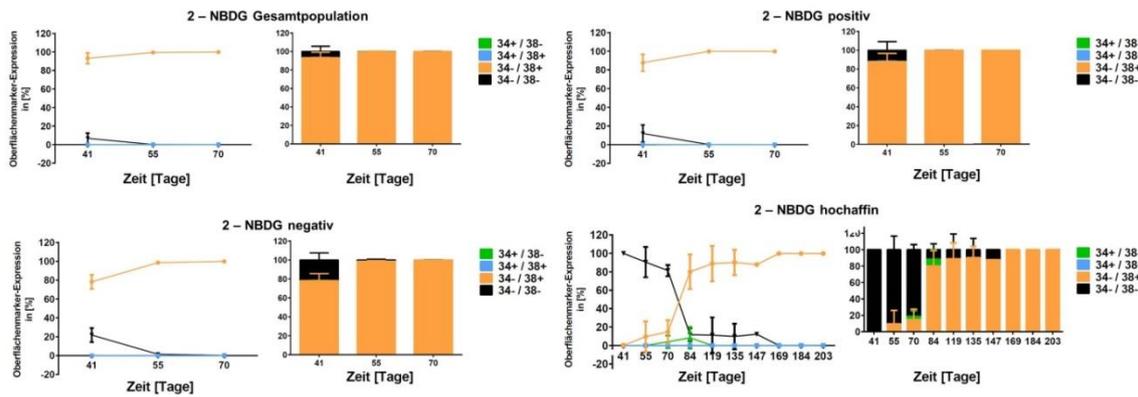


Abbildung 23: B-ALL-Zellen mit dem Expressionsmuster CD 34-/38+ fördern Initiation und Progress und sind somit ein potentieller Anhaltspunkt für die Aggressivität der LZK CR. Darstellung der Entwicklung der unterschiedlichen Subgruppierungen bezüglich ihrer Expression der Oberflächenmarker CD 34 und 38 vergleichend zwischen den vier Transplantationsgruppen (unpaired t – test; * = P<0,05; ** = P<0,01, *** = P<0,001; **** = P<0,0001)

Nach dem Ableben der Mäuse fiel ein vollkommenes Fehlen von Unterschieden zwischen den Transplantationsgruppen bezüglich der Expression der beiden Oberflächenmarker in den analysierten Geweben (Milz und Knochenmark) auf. Der prozentuale Anteil der CD34-/38+ Kohorte liegt in allen Versuchsgruppen gewebeunabhängig mit einem Durchschnitt von mehr als 99 % hochsignifikant höher als der Anteil der anderen Subpopulationen. Die Messungen nach dem Tod der Mäuse, welche mit 2 – NBDG hochaffinen Zellen transplantiert wurden, weisen dieselben Ergebnisse auf (siehe Abbildung 24). Die restlichen Zellen weisen im Hauptanteil eine Expression von CD 34 und 38 auf oder exprimieren keinen der beiden Marker.

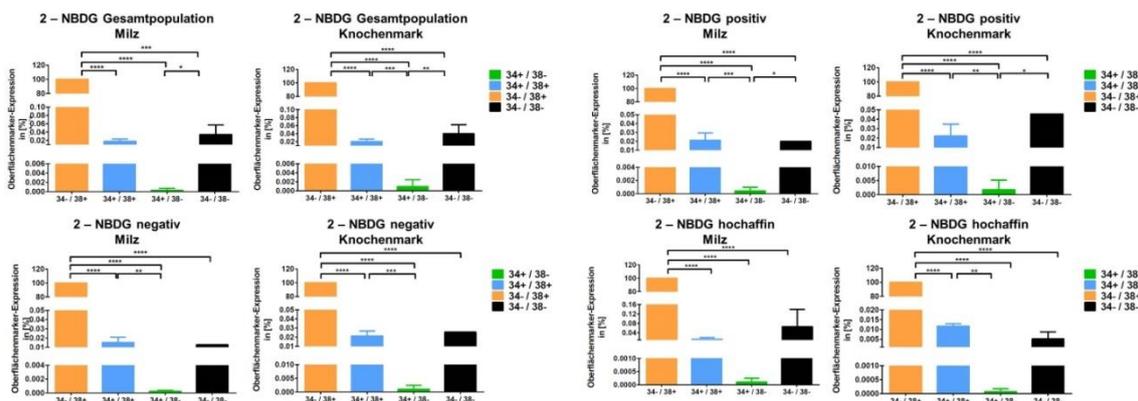


Abbildung 24: CD 34-/CD 38+ B-ALL-Zellen sind signifikant höher in Milz und Knochenmark exprimiert als die anderen Subpopulationen. Ausprägung der Expression von CD 34 und 38 in Milz und Knochenmark nach dem Tod der Empfängertiere (unpaired t – test; * = P<0,05; ** = P<0,01, *** = P<0,001; **** = P<0,0001)

Verfolgt man den Verlauf des Anteils der vier Subpopulationen an allen vitalen humanen Zellen im Blut der mit 2 – NBDG hochaffinen Zellen transplantierten

Mäuse, fällt zunächst sehr prominent der starke Abfall der doppelt-negativen Zellen zwischen Tag 70 und 84 auf, der zeitnah mit der beginnenden Ausbreitung der humanen Zellen im murinen Organismus einhergeht (siehe Abbildung 23). Konträr dazu steigt der Anteil der Zellen, die ausschließlich CD 38 auf ihrer Oberfläche exprimieren stark an. Dies könnte als Hinweis auf die Rolle der doppelt-negativen Zellen im Rahmen der Leukämie-Initiation gewertet werden, welche im Laufe der Expansion der humanen Zellen von den CD34-/38+ - Zellen verdrängt werden. Die Expression der beiden anderen Subpopulationen zeigt sich innerhalb des gesamten Transplantationszeitraums als gering.

Zusammenfassend zeigt sich in den Mäusen der CR-Transplantation eine hervorstechende Dominanz des prozentualen Anteils der CD 34-/38+ Zellen zunächst im peripheren Blut der Empfängertiere, welche sich nach dem Tod in der Analyse der Zellen aus Knochenmark und Milz widerspiegelt.

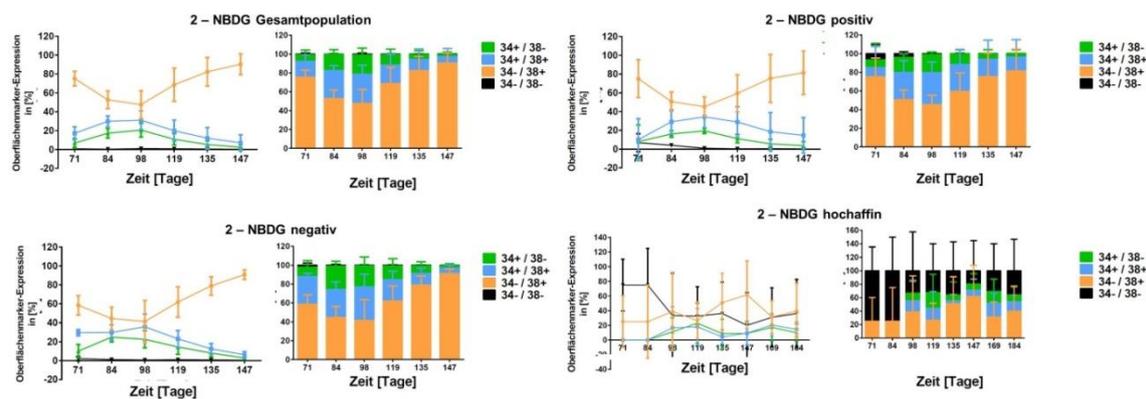


Abbildung 25: Vergleichsweise geringerer Anteil der CD34-/38+ - Zellen initiiert weniger aggressive Leukämie in den mit PH-Zellen transplantierten Mäusen. Darstellung der Entwicklung der unterschiedlichen Subgruppierungen bezüglich der Expression der Oberflächenmarker CD 34 und 38 vergleichend zwischen den vier Transplantationsgruppen. (unpaired t - test; * = P<0,05; ** = P<0,01; *** = P<0,001; **** = P<0,0001)

In den Ergebnissen der Analysen im Rahmen der PH-Transplantation fiel auf, dass der Anteil der CD34-/CD38+ Zellen an allen humanen Zellen über den gesamten Beobachtungszeitraum mindestens 45 % betrug. Er stieg jedoch bis zum Ableben der Tiere auf durchschnittlich 88 % im Knochenmark und 92 % in den Milzzellen an (siehe Abbildung 25). Die Zellen, welche für beide Oberflächenmarker positiv sind, stellten zu Beginn des Zeitraums die zweitgrößte Subpopulation dar. Mit zunehmendem Transplantationszeitraum nahm ihr Anteil immer weiter ab, was beispielsweise in einem prozentualen

Anteil von weniger als einem Prozent in der Milz resultiert. Ein ähnliches Verhalten zeigten die Zellen mit dem Expressionsmuster CD34+/CD38-. Der Anteil der CD34-/CD38- Zellen war grundsätzlich äußerst gering, was sich nach dem Ableben der Empfängertiere mit einem Anteil von weniger als einem Prozent aller Zellen von Milz und Knochenmark widerspiegelte (siehe Abbildung 26).

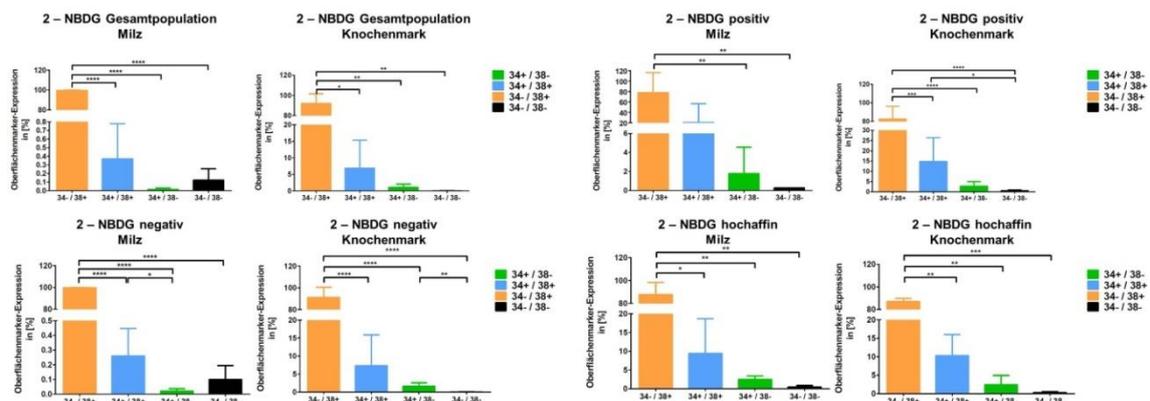


Abbildung 26: CD34-/38+ - Zellen sind in signifikant größerer Anzahl vorhanden. Prozentuale Anteile der möglichen CD34/38 – Subpopulationen an den Zellen von Milz und Knochenmark nach dem Tod der Empfängertiere (unpaired t – test; * = P<0,05; ** = P<0,01, *** = P<0,001; **** = P<0,0001)

Zusammenfassend stellten die CD34-/38+ Zellen in der PH-Transplantation meist die dominante Subpopulation dar, was die sich bereits in der Analyse der CR-Zellen abzeichnende große Bedeutung dieser Subpopulation für den Progress der Leukämie unterstrich. Zur weitergehenden Beurteilung der Rolle der CD 34-/38+ Zellen rufe man sich die bekannten Daten zum medianen Überleben der transplantierten Tiere als Marker für die Aggressivität der initiierten Leukämie ins Gedächtnis (siehe Abbildung 8B). Die CR-Zellen riefen eine im Vergleich zu den Zellen der LZK PH aggressivere Leukämie hervor, was die Schlussfolgerung nahelegte, dass die CD34-/38+ Zellen für den Progress aggressiver Leukämien verantwortlich sind.

3.6 GLUT – 1 negativ transplantierte Zellen initiieren aggressivere Leukämie

Infolge der detektierten Unterschiede bezüglich des Anteils GLUT – 1 positiver Zellen der drei LZK (siehe 3.3 und Abbildung 8D) und der Induzierbarkeit des Glukosetransporters durch CoCl₂ (siehe 3.4.1 und Abbildung 13A), stellten wir die Hypothese auf, dass eine aggressivere Leukämie durch eine höhere Expression des Glukosetransporters 1 gekennzeichnet sei. Folglich

beschlossen wir die beiden Subpopulationen GLUT – 1 positiv und negativ ebenfalls im Vergleich zur Gesamtpopulation der Zellen des Patienten CR zu transplantieren (siehe 2.6.4 und Abbildung 27).

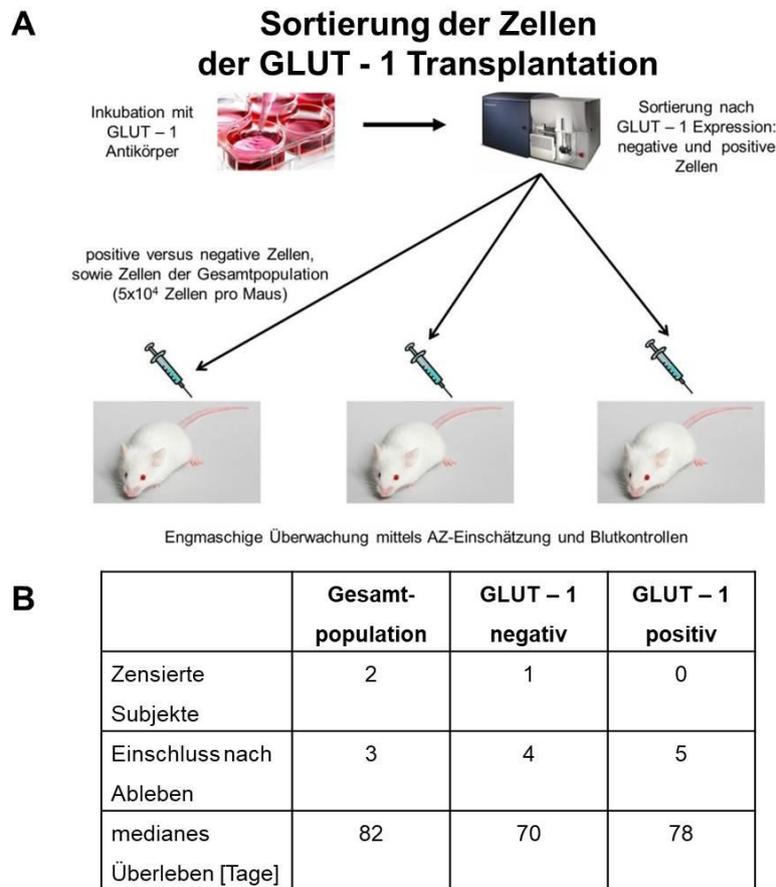
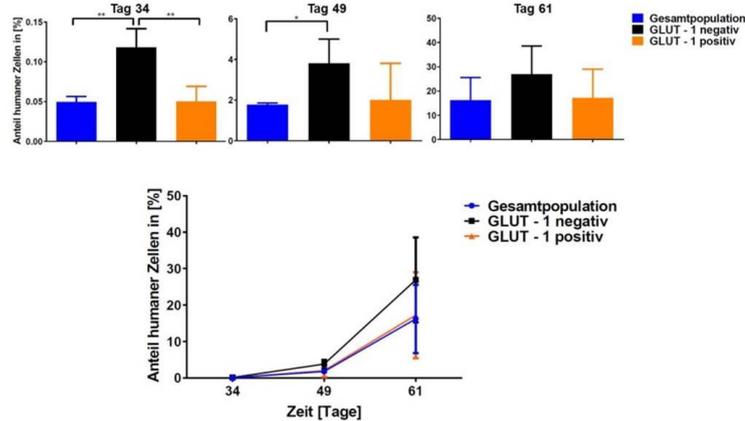


Abbildung 27: Übersicht zur durchgeführten GLUT – 1 Transplantation unter Verwendung von CR-Zellen. A: Sortierung der CR – Zellen anhand deren Expression des Glukosetransporters 1 (GLUT – 1 negativ und positiv à 5×10^4 Zellen pro Maus) zur Transplantation vergleichend zur Gesamtpopulation; **B:** tabellarische Darstellung der eingeschlossenen Versuchstiere

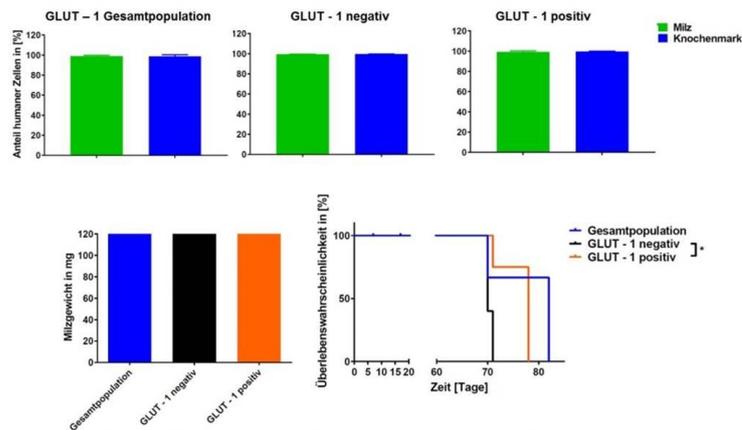
Im Überblick zeigte sich eine über den gesamten Zeitraum bestehende Dominanz der mit als GLUT – 1 negativ klassifizierten Zellen transplantierten Mäuse bezüglich der Ausbreitung humaner Zellen im murinen Organismus. Da zur Auftrennung der beiden GLUT – 1 Subpopulationen ein fluoreszenzmarkierter Antikörper verwendet wurde, ließ sich dieses Verhalten jedoch nicht mittels eines Proliferationsnachteils erklären. Der Antikörper band ausschließlich zeitlich begrenzt an sein Antigen auf der Oberfläche der Zellen und konnte somit keinen längerfristigen Einfluss auf die Viabilität oder das Proliferationsverhalten der Zellen ausüben. Folglich legte das beobachtete dominante Expansionsverhalten der GLUT – 1 negativen Zellen die Annahme

nahe, dass diese Zellen entgegen unserer Hypothese ein höheres leukämogenes Potential aufwiesen. Dieser Trend setzte sich in der Analyse der medianen Lebensdauer der transplantierten Mäuse fort, wobei die mit GLUT – 1 negativen Zellen transplantierten Tiere durchschnittlich acht Tage früher verstarben (siehe Abbildung 28).

A Verlauf der Ausbreitung humaner Zellen im peripheren Blut



B Analysen nach Ableben der Versuchstiere



C



Abbildung 28: GLUT – 1 negative Zellen rufen aggressivere Leukämie hervor, welche in signifikant kürzerem Überleben mündet. A + B: Zeitlicher Verlauf des prozentualen Anteils der humanen Zellen im peripheren Blut des Empfängertieres und Anteil humaner Zellen in Milz und Knochenmark der Versuchstiere vergleichend zwischen den Experimentalgruppen sowie Abbildung der Splenomegalie nach Ableben (Gewicht in mg) und Darstellung der Überlebensdauer der Tiere (unpaired t – test; * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$; Log-rank [Mantel-Cox] - Test * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$); **C:** Abbildung der Splenomegalien vergleichend zwischen den drei Transplantationsgruppen

Diese Erkenntnis bestärkte die Negierung der untersuchten Hypothese, dass Zellen mit einer höheren GLUT – 1 Expression ein höheres leukämogenes Potential aufwiesen, sondern deutete auf einen bestehenden Zusammenhang

zwischen geringerer Expression des Glukosetransporters 1 und der Initiation einer aggressiveren Form der Leukämie hin. Da die Gesamtpopulation Zellen mit hoher sowie mit niedriger GLUT – 1 Expression enthielt, gingen wir davon aus, dass die durch diese Zellen initiierte Leukämie in einem medianen Überleben enden müsste, welches zwischen den Resultaten der beiden anderen Gruppen liegen würde. Dies bestätigte sich im Rahmen dieser Transplantation jedoch nicht, denn das mediane Überleben der Tiere stellte sich als am längsten (82 Tage) dar. Jedoch sei zu bedenken, dass im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen lediglich drei Empfängermäuse in die abschließende Beurteilung eingeschlossen werden konnten, von denen die erste bereits an Tag 70, wie drei der GLUT – 1 negativ transplantierten Tiere, verstarb. Die anderen beiden Mäuse lebten bis Tag 82. Infolgedessen ist eine suffiziente Beurteilung der Potenz der initiierten Leukämie in der Vergleichsgruppe nur erschwert möglich.

4. Diskussion

Nachdem die Seahorse-Messungen zeigten, dass die aggressiveren Leukämiezellen der LZK PH und CR ihren Energiebedarf kontinuierlich und sauerstoffunabhängig über Glykolyse decken (siehe 3.1 und Abbildung 7), beschäftigt sich diese Dissertation *in vitro* und *in vivo* mit der Frage, ob die Initiation einer aggressiveren Leukämie mit einer schnelleren Glukoseaufnahme und einer höheren Expression des GLUT – 1 einhergeht. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass es sich im Rahmen dieser Arbeit um die Untersuchung isolierter Krankheitsfälle handelt. Eine Aussage bezüglich der Gesamtheit der adulten ALL ist hieraus nicht ableitbar. Weitere Versuche, u.a. bezüglich der Auswirkungen von Glukosedepprivation auf die Zellen, könnte die Bedeutung dessen für die Proliferation und Aggressivität der malignen Zellen weitergehend evaluieren.

4.1 Glukoseaufnahme und Oberflächenexpression von GLUT – 1 definieren unterschiedlich aggressive Leukämieformen

In dieser Dissertation wird gezeigt, dass aggressivere Leukämien eine höhere Glukoseaufnahme und eine vermehrte Oberflächenexpression von GLUT – 1 aufweisen (siehe 3.2.1 und 3.3). Dies ist in soliden Tumoren schon längere Zeit bekannt. Murakami et al. berichten bereits 1992, dass die maligne Transformation kultivierter Säugetierzellen mit einer massiven Zunahme des Glukosetransportes und der GLUT – 1 Expression mittels Interaktion mit dem GLUT – 1 Promoter einhergehe [100]. Weiterhin sind beispielhaft Karzinomzellen des Endometriums zu nennen, welche stark glukoseabhängig sind. Sie zeigen eine deutlich höhere Glukoseaufnahme und Proliferationsrate sowie vermehrte GLUT – 1 Expression und Glykolyse unter Kulturbedingungen mit hohen Glukosespiegeln (17 mmol/l) im Vergleich zu physiologischen Zellen, wohingegen deren Apoptoserate bereits bei mittlerer Glukosekonzentration im Medium (5 mmol/l) deutlich ansteigt [101]. Im Rahmen unserer weiteren durchflusszytometrischen Analysen der drei LZK zeigte sich eine Aufspaltung der jeweiligen Gesamtpopulation in drei Subgruppierungen: 2 – NBDG negative, 2 – NBDG positive und 2 – NBDG hochaffine Zellen konnten in ihrer Existenz reproduzierbar bestätigt werden (siehe 3.2.3 und Abbildung 10). Das Vorliegen einer Heterogenität der ALL – Zellen innerhalb eines Patienten ist seit

2011 unter anderem durch Mullighan et al. [66] bekannt (siehe 1.3). Die Erkenntnis, dass unsere LZK aus unterschiedlich glukoseaffinen Zellen zusammengesetzt sind, führte unsere Hypothese, dass die Beschreibung der LIZ anhand ihres Glukoseaufnahmeverhaltens möglich sein könnte, weiter. Die Annahme, dass eine erhöhte Glukoseaufnahme mit einer schlechteren Prognose des Leukämie-Patienten einhergeht, stützt sich zudem auf bekannte Daten multipler anderer Tumorentitäten [102]. Dies findet sich u.a. mit signifikanter Assoziation in Studien mit Zellen kleinzelliger Bronchialkarzinome [103]. Der Eindruck, dass hohe GLUT – 1 Expression und erhöhte Glukoseaufnahme einen wichtigen Anteil in der Entwicklung zur Tumorzelle darstellen, zeigt sich auch in weiteren Untersuchungen. 2014 beschreiben beispielsweise Morani et al. den Glukosetransporter 1 als die am häufigsten vorkommende Isoform in besonders aggressiven und gering differenzierten Schilddrüsenkarzinomen [104]. Außerdem zeigen Rivenzon-Segal et al. in humanen Brustkrebszellen (T-47D), dass diese im Rahmen der Differenzierung in einen geringer malignen Phänotyp mit einer deutlichen Reduktion der GLUT – 1 Expression und der Glukosetransportrate reagieren [105]. In Zusammenschau unserer Ergebnisse und der einschlägigen Literatur ist die Überlegung, dass die Blockade des GLUT – 1 bzw. der Glukoseaufnahme ein potentieller Angriffspunkt neuer Therapieregime der ALL darstellen könnte, gerechtfertigt. Die Glukoseaufnahme und die Oberflächenexpression von GLUT – 1 sind durch Chemotherapeutika, wie Cisplatin, 5-Fluoruracil oder Epirubicin bereits in soliden Tumoren angreifbar. Bisherige Ergebnisse zeigen eine signifikante Abnahme der Glukoseaufnahme drei Stunden nach Applikation von Cisplatin und zeitlich verzögert das Absterben Cisplatin-sensitiver ovarieller Krebszellen. Des Weiteren reduziert die Therapie das Expressionslevel der mRNA multipler glykolytischer Enzyme und des GLUT – 1, wessen Oberflächenexpression in der Zellwand zusätzlich reduziert wird [106]. Die Arbeitsgruppe von Yao-Dong Wang berichtet, dass Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches durch eine Blockade des GLUT – 1 deutlich chemosensitiver werden, was darauf schließen lässt, dass dieser Transporter eine entscheidende Rolle für die Glukoseaufnahme der Zellen spielt [107]. Ähnliche Effekte lassen sich in ösophago-gastralen Adenokarzinomen nachweisen [108]. Der bereits durch Dr. Bartosch Wojcik dargestellte

Zusammenhang zwischen Aggressivität der initiierten Leukämie und deutlich erhöhter Glykolyse-Aktivität wird durch die Beschreibung vermehrter Aktivität glykolytischer Enzyme in malignen Geweben, u.a. kolorektalen Karzinomen [109, 110], unterstrichen. Dies wird zudem durch die Analyse der Aktivität der Laktatdehydrogenase als entscheidendes Enzym zur Regeneration des für die anaerobe Glykolyse benötigten NAD⁺ im Sinne eines prognostischen Markers u.a. in Leukämien und Lymphomen deutlich [111].

4.2 Veränderter Kohlenhydratstoffwechsel begünstigt Proliferation der Tumorzellen

Infolge der metabolischen Analysen der Seahorsemessung gehen wir davon aus, dass die Zellen der Patienten CR und PH unter physiologischen Bedingungen ihre Energie hauptsächlich aus der aeroben Glykolyse gewinnen. Demzufolge können sie pro aufgenommenem Glukosemolekül vergleichsweise wenig ATP generieren (siehe 3.1, Abbildung 7 und [61]). Bereits 1924 hat Otto Warburg Zellen von Gewebstumoren beschrieben, welche in Anwesenheit von Sauerstoff ihre Energie größtenteils mittels Glykolyse gewinnen (Warburg-Effekt; siehe 1.3) [73–75]. Weiterführende Studien widerlegten die getätigten Annahmen, dass der Warburg-Effekt nur bei Defekten im Citratzyklus aufträte und/oder die aerobe Glykolyse eine Spezialität von Tumorzellen darstelle. Beispielsweise berichtet Brand 1985, dass primär proliferierende Lymphozyten im Vergleich zu ruhenden Zellen mehr als 90 % ihrer Glukose mittels aerober Glykolyse in Laktat überführen [112]. Des Weiteren wird dies in proliferierenden Fibroblasten im Zusammenhang mit hohen Proliferationsraten beobachtet [113]. Ergänzend hierzu zeigt sich in der vergleichenden Analyse von metastasierten und nicht-metastasierten murinen Brust-Tumoren, dass der metastasierte, aggressivere Phänotyp bei gleichen Sauerstoffverhältnissen mehr Glukose pro Zelle aufnimmt [95]. Zudem detektieren weitere Untersuchungen, dass viele der stark proliferierenden Tumore keine Defekte der oxidativen Phosphorylierung oder des Citratzykluses aufweisen, jedoch trotzdem ihre Energie zu großen Teilen über aerobe Glykolyse gewinnen [114]. Bis heute lässt sich die Frage, warum maligne Zellen meist auf aerobe Glykolyse zurückgreifen, nur eingeschränkt beantworten. Bekanntermaßen ist das Knochenmark in Nischen eingeteilt, welche potentiell durch hypoxische Bedingungen gekennzeichnet

sind. Medyouf et al berichten 2014, dass myelodysplastische Zellen die sie umgebenden Stromazellen zur Schaffung einer individuellen Nische für die Tumorzellen anregen [52] (siehe 1.3). Folglich ist es denkbar, dass die sauerstoffunabhängige Energieproduktion der Leukämiezellen einen der entscheidenden Proliferations- bzw. Selektionsvorteile gegenüber den physiologischen Knochenmarkszellen darstellt. 2004 beschreiben Robert A. Gatenby und Robert J. Gillies die kontinuierliche Energiegewinnung durch vermehrte Glykolyseaktivität als Adaptation der malignen Vorläuferzellen im Sinne einer evolutionären Anpassung an intermittierend auftretende Hypoxie. Im Rahmen der durch hypoxische Krebszellen vermehrten Glykolyse entwickelt sich eine lokale Azidose [115], an welche sich die Zellen mittels Aktivierung pH-regulierender Systeme durch HIF – 1 adaptieren können [116]. Die hierbei vorliegende Kombination aus sauerstoffunabhängiger Energieproduktion und Resistenz gegenüber sauren Umgebungsbedingungen verleiht den Zellen einen Wachstumsvorteil gegenüber den physiologischen Zellen des jeweiligen Organs [117]. In Studien mit Zellen des Pankreaskarzinoms zeigt sich, dass die Transkription der für glykolytische Enzyme und Glukose- sowie Laktattransporter codierenden Gene unter Hypoxie bis zum 7-fachen hochreguliert ist. Als Hinweis auf eine enge Assoziation mit der Malignität der Erkrankung präsentieren diese Zellen im Vergleich eine deutlich höhere metabolische Aktivität, welche mit einem deutlich aggressiveren Tumor-Phänotyp einhergeht [118]. Dies wird durch Sundfør et al bestätigt, die von einer Assoziation zwischen hoher Metastasierungsinzidenz und geringer Oxygenierung des Primärtumors in Plattenepithelkarzinomen des Gebärmutterhalses berichten [119]. Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Hockel, dass einige Tumore durch bisherige Diagnostik bezüglich ihrer Malignität unterschätzt wurden und infolge von Oxygenierungsanalysen als aggressiver einzustufen seien, unterstützen dies ebenfalls [120]. In weiteren Untersuchungen wird beobachtet, dass das Auftreten von Hypoxie, wie beispielsweise in Nekroseherden, die GLUT – 1 Spiegel und die Glukoseaufnahme weiter steigen lässt [102, 121], was einen zusätzlichen Proliferationsvorteil der Zellen durch schnellere Energieproduktion darstellt. Die dauerhafte Anpassung des Kohlenhydratstoffwechsels, wie durch Dr. Bartosch Wojcik mittels Seahorse-Analysen detektiert [61], zeigt sich ebenfalls in

Proteomanalysen von Zellen des Pankreaskarzinoms [122]. Die Abkehr vom physiologischen Metabolismus mit Citratzyklus und oxidativer Phosphorylierung hin zur aeroben Glykolyse resultiert 2006 in der Beschreibung vermehrter Expression und höherer Aktivität glykolytischer Enzyme, v.a. der Hexokinase und der Phosphofruktokinase-I, in hepatischen AS 30 – D und HeLa-Zellen durch eine mexikanische Arbeitsgruppe [123]. Infolge der kontinuierlich starken Glykolyseaktivität unserer aggressiveren LZK müssen diese eine größere Menge Glukose innerhalb eines identischen Zeitintervalls aufnehmen und verwerten. Die durchflusszytometrischen Analysen unterstreichen die Bedeutung der Glukoseaufnahme mittels GLUT – 1 v.a. durch die hochaggressiven CR-Zellen, welche die höchste Transporterexpression und schnellste Glukoseaufnahme aufweisen (siehe 3.2 und 3.3). Daraus resultierend nimmt die extrazelluläre Glukosekonzentration in der Umgebung der Leukämiezellen bei Vorliegen einer definierten Glukosemenge schnell ab, was bereits durch Schroeder et al. als Verteilung geringer extrazellulärer Glukose- und hoher Laktatkonzentration infolge hoher Glykolyseaktivität in hypoxischen und perinekrotischen Bereichen solider Tumore (R3230Ac Fibrosarkoma und FSA Mamma-Karzinom der Ratte) beschrieben wird und auf deren hohe Glykolyseaktivität schließen lässt [124]. Laktat als Stoffwechselprodukt der Glykolyse ist in metastasierten Tumoren des Gebärmutterhalses ebenfalls in signifikant höheren Konzentrationen nachweisbar als in Zellen nicht-metastasierter Malignome. Diese Patientinnen weisen außerdem eine höhere Rezidivrate beziehungsweise eine höhere Wahrscheinlichkeit für das Eintreten des Todes auf, wohingegen die Betroffenen der nicht-metastasierten Tumore ein signifikant längeres krankheitsfreies sowie Gesamtüberleben zeigen [125]. Demgegenüber präsentieren HIF-1 α -defiziente T-Zellen eine deutliche Reduktion der Laktatproduktion unter normoxischen Bedingungen, was darauf schließen lässt, dass die durch HIF-1 α induzierte Glykolyse unabhängig vom bestehenden Sauerstoffstatus der Zelle zum Tragen kommt [126]. Außerdem zeigen Analysen von Pankreaskarzinomen eine im Vergleich mit physiologischen Zellen deutlich höhere metabolische und glykolytische Aktivität, einhergehend außerdem mit einem deutlich aggressiveren Tumor-Phänotyp [118]. Dies hebt die Bedeutung der Energiegewinnung mittels Glykolyse für die Aggressivität

des hervorgerufenen Tumorleidens und die Langzeitprognose des Patienten hervor.

Da bisher keine suffiziente Therapiemöglichkeit für die adulte B-Zell-ALL besteht, kommt es trotz primärer zytogenetischer „Remission“ bei bis zu 50 % der Patienten [39, 41] zum Auftreten eines Rezidivs. Davon ausgehend, dass sich das Rezidiv aus die primäre Therapie überstehenden leukämischen Klonen heraus generiert, stellt sich die Frage, warum diese in vielen Fällen die Tumorzellen nur unzureichend eliminiert. Eine potentielle Erklärung liegt in der Absiedlung der leukämischen Zellen in individuellen Knochenmarksnischen und Generierung einer hypoxischen Umgebung mittels aerober Glykolyse. In soliden Tumoren zeigte sich eine Verbindung zwischen bestehender Hypoxie im Tumor und schlechterer Langzeitprognose [127], was sich beispielsweise in Form eines signifikant kürzeren krankheitsfreien und 5-Jahresüberleben von Patientinnen mit Gebärmutterhalskrebs manifestiert [120, 127, 128]. Da die etablierten Strahlen- und Chemotherapien auf die Anwesenheit von Sauerstoff angewiesen sind, wird deren Effektivität durch Vorliegen von Tumorphypoxie oder sauren Umgebungsbedingungen nachweislich eingeschränkt [114]. Daraus resultierend steigt die Wahrscheinlichkeit, dass die vorliegenden leukämischen Klone zum einen nach deren Präsentationsort (Blut, peripher lymphatisches Gewebe bzw. Organe und Knochenmark) und zum anderen v.a. anhand ihrer Umgebungsbedingungen selektiert werden. Nach Beendigung der primären Therapiemaßnahmen besteht folglich das Risiko, dass die noch vorhandenen Zellklone eine erneute Leukämie initiieren. Das Sauerstoffmangel das Ansprechen und folglich die Prognose einer Bestrahlung verschlechtert, wird u.a. in Patientenkohorten mit metastasierten Tumoren der Kopf-Hals-Region, mit Karzinomen des Gebärmutterhalses und mit Weichteilsarkomen gezeigt [20, 115, 127, 129, 130]. Folglich wäre der Einsatz anderweitiger und spezifischer Therapien zur Vermeidung von Sekundärschäden durch die Tumortherapie und/oder Auftreten von Rezidiven v.a. im Zusammenhang mit dem Vorliegen hypoxischer Nischen dringend erforderlich. Diesbezüglich existieren bereits in anderen leukämischen Entitäten selektivere Therapiemöglichkeiten, die das Wissen bezüglich des Warburg-Effektes als Teil der Behandlungsstrategie verwenden. Beispielsweise negiert Imatinib in BCR-Abl positiven CML - Zellen den Warburg-Effekt mittels indirekter Hemmung der

Glukose-Aufnahme via GLUT – 1, Reduktion der glykolytischen Aktivität und Förderung des Citratzyklus [131].

4.3 Stabilisierung von HIF – 1 unter normoxischen Bedingungen wirkt sich auf Proteinebene und funktionell aus

Die Seahorse-Messungen zeigen, dass lediglich der Kohlenhydratstoffwechsel der BV-Zellen in ähnlicher Weise wie der gesunder Knochenmarkszellen strukturiert ist; die Zellen der aggressiveren Leukämieformen PH und CR decken ihren Energiebedarf kontinuierlich und sauerstoffunabhängig hauptsächlich über Glykolyse (siehe 3.1 und Abbildung 7). HIF zeigt sich potentiell zur Erklärung dessen als äußerst potent, was sich im Western-Blot bestätigen lässt (siehe 3.4 und Abbildung 12) [61]. Die chemische Hypoxie induziert, beruhend auf dem Sauerstoffmangel, in den Zellen der LZK BV einen Anstieg der detektierbaren HIF - 1 α Menge. Wohingegen die beiden aggressiveren Kulturen ausschließlich mit einer leichten Zunahme des HIF - 1 α auf die chemische Hypoxie reagieren (siehe 3.4 und Abbildung 12). Da die Zellen des Patienten BV erst in Abwesenheit von Sauerstoff eine ähnlich große Menge an HIF - 1 α stabilisieren können, liegt der Schluss nahe, dass die aggressiveren Kulturen CR und PH die Degradierung von HIF - 1 α in hohem Maße bereits unter normoxischen Bedingungen unterbinden, so dass dieses stabilisiert wird und infolgedessen eine Zunahme der HIF - 1 α -Expression unter Hypoxie nicht möglich ist. Aufgrund dessen agiert HIF - 1 α in den aggressiveren LZK auch in Anwesenheit von Sauerstoff als Transkriptionsfaktor und fördert die Transkription und Translation seiner Zielgene. Die von HIF-1 regulierten Gene codieren u.a. Glukosetransporter, glykolytische Enzyme und die Laktatdehydrogenase A (LDH – A) [132]. Eine Assoziation mit malignen Erkrankungen zeigt sich in der vermehrten Expression der LDH-A in Karzinomzellen des Pankreas [122], welches die niedrigste Überlebensrate unter allen Krebserkrankungen in Deutschland aufweist [133] und somit die aggressivste Tumorentität darstellt. Die konstitutive Aktivität von HIF-1 α wirkt sich in unseren Analysen erwartungsgemäß auf die Expression des GLUT – 1 aus: die Oberflächenexpression der BV-Zellen erhöht sich merklich, wohingegen die aggressiveren Kulturen die GLUT – 1 Konzentration an ihrer

Zelloberfläche nur unwesentlich steigern, da sie bereits unter Normoxie infolge der Stabilisierung von HIF - 1 α eine erhöhte Expression zeigen (siehe 3.4.1 und Abbildung 12). Bereits seit 1995 ist bekannt, dass es im Promoter der mRNA des GLUT – 1 ein Hypoxie-responsibles Element (HRE) gibt [134], welches den Effekt erklären kann. Hierbei bindet HIF-1 an eine am 5´-Ende lokalisierte Bindungsstelle des GLUT – 1 Gens [100, 134]. Mutationen, wie in dem Onkogen Ras [135] erhöhen zusätzlich zu hypoxischen Bedingungen die HIF-1 α – Level, da es durch Bindung an das bekannte HRE die Aktivität des GLUT – 1 Promotors steigert [136] und neben der GLUT - 1-Expression auch die weiterer glykolytischer Enzyme erhöht [137]. Somit erscheint eine weitergehende Evaluation potentieller Einflussfaktoren auf die GLUT – 1 Expression sinnvoll. Die veränderte GLUT – 1 Expression wirkt sich schlussendlich auch auf dem funktionellen Niveau der Glukoseaufnahme aus. Die Behandlung mit Kobaltchlorid führt zu der relativ größten Zunahme des prozentualen Anteils 2 – NBDG positiver Zellen an der Gesamtpopulation in der LZK BV (siehe 3.4.1 und Abbildung 12). Wohingegen die Zellen des Patienten CR keinerlei Reaktion in ihrem Aufnahmeverhalten auf die Behandlung mit Kobaltchlorid zeigen, was aus dem Faktum resultiert, dass diese bereits unter normoxischen Bedingungen die maximale Transportrate und Transporteffizienz zur schnellstmöglichen Deckung ihres Glukosebedarfes nutzen. Da HIF – 1 ebenfalls eine intrazelluläre Anpassung des Glukosestoffwechsels hervorruft, so dass eine konstant hohe ATP-Produktion möglich und infolge das Überleben der Zelle in Stresssituationen, wie unter Hypoxie, gesichert wird [126], stellt dieser übergeordnete Faktor einen potentiellen Angriffspunkt metabolischer Therapieansätze dar. Der HIF-1 α – Inhibitor EF-24 mindert signifikant die Aufnahme von Glukose in die Zelle, reduziert die Glykolyserate und die damit assoziierte Laktatproduktion in Karzinomzellen des Ovars [138]. Zhang et al. zeigen außerdem mittels Xenotransplantation, dass ein therapeutischer Einsatz des Inhibitors das Tumorwachstum und die Metastasierung der SKOV-3 Zellen ins Peritoneum und die Lunge reduziert, wobei sich GLUT – 1 in Folge von HIF-1 α als wichtiger Wirkungsort darstellt. Demzufolge wäre eine weitergehende Evaluation der Wirkung des EF-24 auf die Glukoseaufnahme und Fähigkeit zu Leukämieinitiation und –progress der etablierten LZK von Interesse.

4.4 Glukoseaufnahme und GLUT – 1 Expression als potentieller Marker verschieden aggressiver Leukämien

Die in den beiden primären Transplantationsversuchen gewonnenen Überlebensdaten können die untersuchte Hypothese, dass eine höhere Glukoseaffinität in einer aggressiveren Leukämie mündet und dadurch zu einer kürzeren Lebensdauer führt, nicht bestätigen. Eine mögliche Erklärung kann sich anteilig in der Vorbehandlung der Zellen und der Aufnahme des Glukoseanalogons finden. Der im Rahmen der Proliferationsanalysen detektierte leichte Proliferationsnachteil der behandelten Zellen in vitro ab Tag 5 (siehe 3.2.2 und Abbildung 9), könnte ebenfalls im murinen Organismus auftreten. Geht man nun jedoch hypothetisch davon aus, dass die CR - Zellen mit höherer Glukoseaffinität eine Leukämie mit höherem leukämogenen Potential initiieren, wäre die von uns erwartete kürzere Überlebenszeit der Mäuse, transplantiert mit 2 – NBDG positiven Zellen bei Nichtvorliegen des Proliferationsnachteils der Zellen, beobachtbar. Um dies zu analysieren, würden im Zusammenhang eines wiederholten Transplantationsversuches alle zu transplantierten Zellen unter identischen Bedingungen mit dem Glukoseanalogon behandelt werden.

Beurteilt man die Ergebnisse der seriellen CR - Transplantation können die bisher bekannten Faktoren, die das Ergebnis des ersten Transplantationsversuches entgegen unserer Hypothese verändert hatten, ausgeschlossen werden. Des Weiteren können äußere Faktoren die Fähigkeit der Leukämieinitiation oder –progression nicht beeinflusst haben, da mit allen zur seriellen Transplantation verwendeten Mäuse identisch verfahren wurde. Alles in allem erscheint die Glukoseaffinität als potentieller Marker zur Unterscheidung unterschiedlich aggressiver Subpopulationen innerhalb einer ALL-Gesamtpopulation nicht dienen zu können. Jedoch kann das Aufnahmeverhalten der gesamten LZK gegenüber dem Glukoseanalogon zur Unterscheidung von Gesamtpopulationen mit unterschiedlichem leukämogenem Potential zu Rate gezogen werden.

Zur endgültigen Beurteilung der Transplantationsergebnisse ist anzumerken, dass bisherige Untersuchungen zeigten, dass GLUT - 1 auf hämatopoetischen Vorläuferzellen nur in geringer Anzahl exprimiert wird. In der Erythropoese

findet er sich erst in späten Entwicklungsstadien. Leal et al berichten des Weiteren, dass sie keine GLUT - 1 auf CD34+CD38- humanen Stammzellen oder differenzierteren CD34+CD38+ Vorläuferzellen nachweisen konnten [139]. Außerdem handelt es sich bei der Expression von Oberflächenmarkern und Transportern, wie GLUT – 1, um einen dynamischen Prozess. Dies resultiert in Erythrozyten in einer Halbwertszeit des Transporters von 13 Stunden bei Körpertemperatur [140]. Folglich ist keine definitive Zuordnung der Zellen zu einer bestimmten Subpopulation möglich. Die mittels Durchflusszytometrie durchgeführte Unterscheidung zwischen GLUT – 1 negativen und positiven Zellen stellt eine Momentaufnahme des aktuellen Expressionsmusters innerhalb der Gesamtpopulation der LZK dar. Es ist davon auszugehen, dass beispielsweise eine als GLUT – 1 negativ klassifizierte Zelle die Expression des Transporters jederzeit hochregulieren und infolgedessen die Eigenschaften einer GLUT – 1 positiven Zelle entfalten kann. Aufgrund dieser Dynamik ist die Differenzierung zwischen verschiedenen aggressiven Subpopulationen nicht denkbar. Der prozentuale Anteil GLUT – 1 positiver Zellen an der Gesamtpopulation ist andererseits über die Zeit stabil, so dass die Unterscheidung der analysierten LZK in verschiedenen aggressive Populationen suffizient möglich ist. Alles in allem stehen mit der Analyse der GLUT – 1 Expression und der funktionellen Messung des Aufnahmeverhaltens von 2 – NBDG zwei adäquate Mittel zur Detektion unterschiedlich aggressiver ALL-Formen im Rahmen unserer LZK zur Verfügung. Eine verlässliche Aussage bezüglich der Gültigkeit der gewonnenen Erkenntnisse für das Gros der adulten ALL ist aufgrund der Analyse einzelner Patientenfälle jedoch nicht möglich.

4.5 CD 34-/38+ - Zellen weisen entscheidende Rolle im Rahmen der Akuten lymphatischen Leukämie auf

Im Verlauf der CR-Transplantation stellt sich nach relativ kurzem Zeitraum die Vorherrschaft der Zellen mit dem Expressionsprofil CD34-/38+ ein, welche infolgedessen den Eindruck erwecken, eine besondere Rolle in der Initiation und dem Progress der Leukämie innezuhaben (siehe 3.5.5). Hierbei handelt es sich anhand der Unterscheidung der Vorläuferzellen der B-Zell-Lymphopoese um teilweise differenzierte Zellen, die sich in ihrem Entwicklungsstadium mit Pro-B-Zellen vergleichen lassen [20]. Dies ist auf den Verlust des

Stammzellmarkers CD34 zurückzuführen. Das Vorliegen einer hohen Anzahl CD34-/38+-Zellen stellt ein Charakteristikum der aggressiveren CR-Zellen dar, was den Gedanken nahelegt, dass diese ein höheres leukämogenes Potential aufweisen könnten. Auch im Verlauf der PH-Transplantation bildet sich eine Dominanz der CD34-/38+-Zellen (siehe 3.5.4 und Abbildung 25) aus, so dass der Eindruck entsteht, dass diese Zellen grundsätzlich die für den Progress der Leukämie verantwortlichen Antrieb innehaben und somit entscheidend für das Voranschreiten der Erkrankung sind. Zieht man die Verteilung aller CD34/CD38-Subpopulationen nach dem Ableben der Empfängertiere hinzu, welche einen signifikant höheren Anteil der CD34-/38+-Zellen in den analysierten Geweben zeigt, wird die besondere Rolle dieser deutlich (siehe Abbildung 24 und Abbildung 26). Der restliche Teil weist zum einen CD34+/38+-Zellen auf, die einem früheren Entwicklungsstadium der B-Zellen, aufgrund ihrer Expression als Stammzellmarker, entsprechen [20]. Außerdem finden sich doppelt-negative Zellen, die als eine Art Reservepool leukämischer Zellen anzusehen sind und innerhalb kürzester Zeit durch Expression der entsprechenden Oberflächenmarker alle drei anderen Subpopulationen ausbilden können. Dies lässt sich gut mit der Annahme vereinbaren, dass zum einen hämatopoetische Stammzellen, zum anderen aber auch Vorläufer- bzw. differenzierte Zellen durch Eintreten von Mutationen zu einer LIZ transformiert werden können [2]. Die bisher publizierte einschlägige Literatur hingegen beschreibt die Markerkombination CD34+/38- als typisch für LIZ der ALL. Beispielsweise berichten El-Menshawey et al., dass Patienten der Hochrisikogruppe der Philadelphia-Chromosom-positiven ALL durch die Oberflächenexpression CD34+/CD38-/CD58- gekennzeichnet seien. Diese erreichen erst nach längerer Therapiedauer eine komplette Remission. Diese ist signifikant seltener im Vergleich zu anderen Patientenkohorten und die Betroffenen erleiden häufiger ein Rezidiv [141]. Außerdem zeigt sich, dass Patienten, deren Zellen die als LIZ-Typus definierte Markerkombination CD34+/CD38-/CD58- aufweisen, sich grundsätzlich in einem schlechteren Allgemeinzustand befinden (nach ECOG-Klassifikation: 52,9 % Status 1-2 versus 81,2 % in anderen Kohorten) [141]. Ein ähnliches Bild zeichnen Long et al. für die pädiatrische ALL, da sie eine Assoziation zwischen einem hohen Tumoranteil an CD34+/CD38- Zellen und einer schlechteren Prognose

beschreiben [142]. Demgegenüber steht die Beobachtung im Rahmen der Analysen der 2 – NBDG hochaffinen Mäusen, dass die Zellen, welche ausschließlich für CD38 positiv sind, neben den doppelt-negativen die ersten nachweisbaren humanen Zellen darstellen. Dies akzentuiert ihre besondere Stellung innerhalb der Gesamtpopulation, da sie zum einen an der primären Initiation der Leukämie beteiligt sind und wie oben beschrieben zum anderen den zum Tode führenden Progress der Erkrankung fördern. Diese Vorstellung unterstreicht ihr im Vergleich zu den anderen Zellen höher anzusiedelndes leukämogenes Potential. Es steht nun die Frage im Raum, ob es anhand der Analyse der Expression dieser beiden Oberflächenmarker möglich sein könnte, eine Einschätzung der Aggressivität einer ALL zu tätigen. Hierbei ist zu bedenken, dass in unterschiedlichen Publikationen [59, 60] bereits gezeigt wurde, dass die Fähigkeit der Initiation der Leukämie unter anderem unabhängig von deren CD34 Status ist. Des Weiteren gestaltet sich die Oberflächenexpression von CD34 und CD38 als hoch variabel; die Marker werden zum Teil innerhalb weniger Stunden hoch- oder runterreguliert [1, 61]. Wie bereits publiziert, zeigt sich die bekannte intraleukämische Heterogenität [66] der Markerexpression ebenfalls in Analysen der LZK PH, welche sich in unterschiedlich aggressiven Subpopulationen anhand ihrer CD34/CD38-Expression unterscheiden lässt [1, 61]. Insgesamt werden die beiden Marker im Rahmen der ALL als nicht eindeutig beurteilt und sind nur eingeschränkt zur Identifizierung von LIZ einsetzbar.

5. Zusammenfassung

5.1 Deutsche Version

In der Akuten Lymphatischen Leukämie (ALL) im Erwachsenenalter beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate trotz verbesserter Therapien unter 40%. Die Prognose wird durch das Auftreten von Rezidiven signifikant verschlechtert. ALL entsteht durch genetische Veränderungen lymphatischer Vorläuferzellen im Knochenmark, welche zu einem Differenzierungsblock und zu starker Zunahme der Vorläuferzellen führen. Eine mögliche Erklärung für das bestehende hohe Rezidiv-Risiko wird in der unvollständigen Elimination von Leukämie-induzierenden Zellen (LIZ) durch die Primärtherapie gesehen. Die Identifizierung und Charakterisierung von LIZ in der ALL anhand spezifischer Oberflächenmarker war bisher nicht möglich, daher ist die molekulare und funktionelle Charakterisierung von LIZ für die Entwicklung moderner Therapieansätze unabdingbar. Metabolische Analysen primärer ALL-Langzeitkulturen (LZK) in Vorarbeiten zeigten eine deutliche Abweichung des Kohlenhydratstoffwechsels vom physiologischen metabolischen Profil einer Knochenmarkszelle hin zur Nutzung der Glykolyse mit zunehmendem leukämogenen Potential der etablierten LZK. Folglich ist in dieser Dissertation der Zusammenhang zwischen höherer Glukoseaffinität, schnellerer Glukoseaufnahme und dem Vorliegen eines höheren leukämogenen Potentials der Zellen und damit einer Definition der LIZ anhand ihres Energiestoffwechsels untersucht worden.

Hierfür wurden Tests im Mausmodell *in vivo* und *in vitro* mit drei ALL-LZK CR, PH und BV durchgeführt. Wir etablierten unter Verwendung des fluoreszenzmarkierten Glukoseanalogons 2-NBDG sowie eines gegen den GLUT-1 gerichteten Antikörpers jeweils ein durchflusszytometrisches Verfahren zur quantitativen Messung der Glukoseaufnahme. Anhand dieser Parameter erfolgte die FACS-Anreicherung unterschiedlicher Zellpopulationen der LZK und die Xenotransplantation zur Evaluation potentieller Unterschiede des leukämogenen Potentials.

Durch durchflusszytometrische Messungen konnten in den drei LZK jeweils drei Subpopulationen von Zellen anhand ihrer Glukoseaffinität unterschieden werden (2-NBDG negativ, 2-NBDG positiv und 2-NBDG hochaffin). Auch

zeigten sich Unterschiede in der Kinetik der Glukoseaufnahme der drei getesteten LZK, wobei CR Zellen mit Abstand am schnellsten 2-NBDG aufnahmen, gefolgt von PH. Die schnellere Glukoseaufnahme der LZK CR und PH wurde durch eine vermehrte Expression des GLUT-1 Rezeptors und einen höheren Anteil an GLUT-1 positiver Zellen hervorgerufen. Interessanterweise bestand auch eine Korrelation zwischen höherem leukämogenem Potential mit schnellerer Glukoseaufnahme und stärkerer GLUT-1 Expression. Hierbei zeigte sich, dass die HIF-1 α Stabilisierung unter Normoxie in einer vermehrten GLUT-1 Expression und daraufhin vermehrter Glukoseaufnahme resultierte. Die prospektive Anreicherung von distinkten Zellsubpopulationen der LZK CR und PH aufgrund ihrer Glukoseaufnahme (gemessen durch 2-NBDG) und Transplantation der sortierten Zellpopulationen in NSG Empfängermäuse zeigte keine kohärente Beziehung zwischen der Glukoseaffinität der Zellen und der Entwicklung der Leukämie. Während es bei CR Zellen initial zu einer beschleunigten Expansion der 2-NBDG-positiv sortierten Leukämiezellen kommt, was sich aber nicht signifikant auf das Gesamtüberleben der Empfängermäuse auswirkt, zeigte die serielle Transplantation von 2-NBDG negativen Zellen ein schnelleres Ableben der Tiere. Bei der LZK PH expandierten 2-NBDG-negative Zellen schneller in primären Empfängermäusen als positive Zellen. Dabei konnten zelltoxische Effekte durch die Verwendung von 2-NBDG ausgeschlossen werden. Auch die Transplantation von GLUT-1 positiven bzw. negativen CR Zellen zeigte, dass GLUT-1 negative Zellen schneller in den Mäusen expandierten, eine aggressivere Leukämie verursachten und zu einem früheren Ableben der Mäuse führte.

Diese Ergebnisse zeigen keine unmittelbare Korrelation von Glukoseaufnahme oder GLUT-1 Expression und der Leukämogenität der untersuchten ALL Zellen. Daher können diese Eigenschaften nicht dazu verwendet werden LIZ in ALL prospektiv anzureichern. Im Rahmen dieser Dissertation zeigte sich aber auch, dass sich die LZK in ihrer jeweiligen Gesamtpopulation bezüglich ihres Glukoseaufnahmeverhaltens und ihrem Anteil GLUT-1-positiver Zellen unterschieden. Weiterführende Untersuchungen sind nötig, um den Grund der differentiellen Expression von GLUT-1 und der damit zusammenhängenden gesteigerten Glukoseaufnahme einzelner Zellen in der ALL zu ermitteln.

5.2 English version

In face of improved therapies the 5-year survival rate of acute lymphatic leukaemia in adulthood constitutes fewer than 40% and the prognosis is downgraded significant by relapses. The disease originates from malignant gene mutations in lymphatic precursor cells which leads to a block in differentiation and an increase of precursor cell numbers. One potential explanation for the high rate of relapse is the incomplete elimination of leukaemia-inducing cells (LIC) by standard therapies. Until now it is not possible to identify and characterize LIC in ALL on the basis of specific surface marker expression, hence, functional and molecular characterization of LIC is indispensable for the development of advanced therapies. Metabolic analyses of patient-derived long-term cultures (PDLTCs) in the research group showed differences in carbohydrate metabolism in comparison to the metabolic profile of physiological bone marrow cells. Therefore, this dissertation analyses the association between higher glucose affinity, faster glucose uptake and higher leukemic potential of the cells, trying to define LICs by their carbohydrate metabolism.

We performed xenotransplantation experiments *in vivo* and *in vitro* assays with three ALL-PDLTCs CR, PH and BV. First, we established FACS analyses by using an antibody against GLUT-1 and the fluorescent glucose analogue 2 – NBDG to measure glucose-uptake quantitatively. Thereby we enriched diverse populations in the PDLTCs by FACS and used them in a xenotransplantation to evaluate functional differences of their leukemic potential.

We separated three subpopulations in the PDLTCs (2 – NBDG negative, 2 – NBDG positive and 2 – NBDG high affine) according to their glucose affinity via FACS. In addition we detected differences in the kinetics of glucose uptake between the three PDLTCs in which CR cells showed the fastest uptake, followed by PH. This faster uptake was provoked by higher expression of GLUT-1 receptors and higher percentage of GLUT-1 positive cells. Interestingly, we detected an association between higher leukemic potential, faster glucose uptake and higher GLUT-1 expression. The stabilization of HIF-1 α under normoxic conditions resulted in higher GLUT-1 expression and accordingly faster glucose uptake. The prospective enrichment of distinct subpopulations of

CR und PH along their glucose uptake (measured by 2 – NBDG) and transplantation of sorted subpopulations in NSG-mice did not show a coherent relationship between glucose affinity of the cells and the development of leukaemia in mice. In the first round of transplantations, the 2 – NBDG positive sorted CR cells engrafted faster, which did not influence the overall survival of the mice significantly. In contrast, the serial transplantation showed shorter life-spans in mice which were transplanted with 2 – NBDG negative sorted cells. In the PH transplantation, the 2 – NBDG negative sorted cells engrafted faster than the positive ones. In all transplantation experiments we could exclude toxic effects by 2 – NBDG. The transplantation of GLUT-1 positive and negative CR cells showed a faster engraftment of GLUT-1 negative cells in mice. They initiated a more aggressive leukaemia which resulted in a shorter span of life.

Our results do not show a direct correlation between glucose uptake or GLUT -1 expression and leukaemic potential of the investigated ALL-PDLTCs. Therefore it seems unlikely to utilize these features to enrich for LIC in ALL. We revealed a considerable heterogeneity of leukaemia cells within PDLTCs regarding their glucose uptake and their proportion of GLUT-1 positive cells. Future analyses are warranted to decipher the the reason of differential GLUT – 1 expression and the resulting higher glucose uptake of single leukaemic cells in ALL.

Literaturverzeichnis

- 1 Passegue E, Jamieson CHM, Ailles LE, et al. Normal and leukemic hematopoiesis: Are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003;100 Suppl 1:11842–11849. doi:10.1073/pnas.2034201100.
- 2 Morrison SJ, Spradling AC. Stem cells and niches: Mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell* 2008;132(4):598–611. doi:10.1016/j.cell.2008.01.038.
- 3 Hoggatt J, Scadden DT. The stem cell niche: Tissue physiology at a single cell level. *The Journal of clinical investigation* 2012;122(9):3029–3034. doi:10.1172/JCI60238.
- 4 Rieger MA, Schroeder T. Hematopoiesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2012;4(12):a008250-a008250. doi:10.1101/cshperspect.a008250.
- 5 Morrison SJ, Uchida N, Weissman IL. The biology of hematopoietic stem cells. *Annual review of cell and developmental biology* 1995;11:35–71. doi:10.1146/annurev.cb.11.110195.000343.
- 6 Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: An evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* 2008;132(4):631–644. doi:10.1016/j.cell.2008.01.025.
- 7 Ramírez J, Lukin K, Hagman J. From hematopoietic progenitors to B cells: Mechanisms of lineage restriction and commitment. *Current Opinion in Immunology* 2010;22(2):177–184. doi:10.1016/j.coi.2010.02.003.
- 8 Dekoter RP, Singh H. Regulation of B Lymphocyte and Macrophage Development by Graded Expression of PU.1. *Science* 2000;288(5470):1439–1441. <http://science.sciencemag.org/content/sci/288/5470/1439.full.pdf>.
- 9 Cambier JC, Gauld SB, Merrell KT, et al. B-cell anergy: From transgenic models to naturally occurring anergic B cells? *Nature reviews. Immunology* 2007;7(8):633–643. doi:10.1038/nri2133.
- 10 Pieper K, Grimbacher B, Eibel H. B-cell biology and development. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2013;131(4):959–971. doi:10.1016/j.jaci.2013.01.046.

- 11 Janeway C, Murphy KP. Janeway Immunologie, 7th edn. Heidelberg: Spektrum, Akad. Verl. 2009.
- 12 Papathanasiou P, Attema JL, Karsunky H, et al. Self-renewal of the long-term reconstituting subset of hematopoietic stem cells is regulated by Ikaros. *Stem cells* (Dayton, Ohio) 2009;27(12):3082–3092. doi:10.1002/stem.232.
- 13 Fuxa M, Busslinger M. Reporter Gene Insertions Reveal a Strictly B Lymphoid-Specific Expression Pattern of Pax5 in Support of Its B Cell Identity Function. *The Journal of Immunology* 2007;178(5):3031–3037. doi:10.4049/jimmunol.178.5.3031.
- 14 Ikawa T, Kawamoto H, Wright LYT, et al. Long-Term Cultured E2A-Deficient Hematopoietic Progenitor Cells Are Pluripotent. *Immunity* 2004;20(3):349–360. doi:10.1016/S1074-7613(04)00049-4.
- 15 Decker T, Di Pasca Magliano M, McManus S, et al. Stepwise activation of enhancer and promoter regions of the B cell commitment gene Pax5 in early lymphopoiesis. *Immunity* 2009;30(4):508–520. doi:10.1016/j.immuni.2009.01.012.
- 16 Nutt SL, Heavey B, Rolink AG, et al. Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. *Nature* 1999;401(6753):556–562. doi:10.1038/44076.
- 17 Schaniel C, Bruno L, Melchers F, et al. Multiple hematopoietic cell lineages develop in vivo from transplanted Pax5-deficient pre-B I-cell clones. *Blood* 2002;99(2):472–478.
- 18 Delogu A, Schebesta A, Sun Q, et al. Gene repression by Pax5 in B cells is essential for blood cell homeostasis and is reversed in plasma cells. *Immunity* 2006;24(3):269–281. doi:10.1016/j.immuni.2006.01.012.
- 19 LeBien TW. Fates of human B-cell precursors. *Blood* 2000;96(1):9–23.
- 20 Loken MR, Shah VO, Dattilio KL, et al. Flow cytometric analysis of human bone marrow. II. Normal B lymphocyte development. *Blood* 1987;70(5):1316–1324.
- 21 LeBien TW, Wörmann B, Villablanca JG, et al. Multiparameter flow cytometric analysis of human fetal bone marrow B cells. *Leukemia* 1990;4(5):354–358.

- 22 Sigvardsson M, Clark DR, Fitzsimmons D, et al. Early B-Cell Factor, E2A, and Pax-5 Cooperate To Activate the Early B Cell-Specific mb-1 Promoter. *Molecular and Cellular Biology* 2002;22(24):8539–8551. doi:10.1128/MCB.22.24.8539-8551.2002.
- 23 Herzog S, Reth M, Jumaa H. Regulation of B-cell proliferation and differentiation by pre-B-cell receptor signalling. *Nature Reviews Immunology* 2009;9(3):195. <https://www.nature.com/articles/nri2491.pdf>.
- 24 Müller-Esterl W, Brandt U. *Biochemie: Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*, 2nd edn. Heidelberg: Spektrum, Akad. Verl. 2011.
- 25 Stashenko P, Nadler LM, Hardy R, et al. Characterization of a human B lymphocyte-specific antigen. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)* 1980;125(4):1678–1685.
- 26 Gökbüget N. Aktuelle Therapie der akuten lymphatischen Leukämie des Erwachsenen. *Der Internist* 2015;56(4):344–353. doi:10.1007/s00108-014-3595-6.
- 27 Rowe JM, Goldstone AH. How I treat acute lymphocytic leukemia in adults. *Blood* 2007;110(7):2268–2275. doi:10.1182/blood-2007-05-038950.
- 28 Rowley JD, Aster JC, Sklar J. The clinical applications of new DNA diagnostic technology on the management of cancer patients. *JAMA* 1993;270(19):2331–2337.
- 29 Arastéh K, ed. *Innere Medizin*, 3rd edn. Stuttgart: Thieme 2013.
- 30 Gökbüget N, Ottmann O. Aktuelle Therapie der akuten lymphatischen Leukämie des Erwachsenen. *Onkologie* 2012;18(12):1093–1104. doi:10.1007/s00761-012-2351-6.
- 31 Gaipa G, Cazzaniga G, Valsecchi MG, et al. Time point-dependent concordance of flow cytometry and real-time quantitative polymerase chain reaction for minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2012;97(10):1582–1593. doi:10.3324/haematol.2011.060426.
- 32 Malec M, van der Velden VHJ, Björklund E, et al. Analysis of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia: comparison between RQ-PCR analysis of Ig/TcR gene rearrangements and multicolor

- flow cytometric immunophenotyping. *Leukemia* 2004;18(10):1630–1636. doi:10.1038/sj.leu.2403444.
- 33 Neale GAM, Coustan-Smith E, Stow P, et al. Comparative analysis of flow cytometry and polymerase chain reaction for the detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2004;18(5):934–938. doi:10.1038/sj.leu.2403348.
- 34 Nowell PC, Hungerford DA. Chromosome Studies on Normal and Leukemic Human Leukocytes. *J Natl Cancer Inst* 1960;25(1):85–109. <https://academic.oup.com/jnci/article-pdf/25/1/85/3055287/25-1-85.pdf>.
- 35 Chen I-M, Harvey RC, Mullighan CG, et al. Outcome modeling with CRLF2, IKZF1, JAK, and minimal residual disease in pediatric acute lymphoblastic leukemia: A Children's Oncology Group Study. *Blood* 2012;119(15):3512–3522. doi:10.1182/blood-2011-11-394221.
- 36 Mullighan CG, Su X, Zhang J, et al. Deletion of IKZF1 and Prognosis in Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med* 2009;360(5):470–480. doi:10.1056/NEJMoa0808253.
- 37 Bassan R, Spinelli O, Oldani E, et al. Improved risk classification for risk-specific therapy based on the molecular study of minimal residual disease (MRD) in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Blood* 2009;113(18):4153–4162. doi:10.1182/blood-2008-11-185132.
- 38 Gokbuget N, Kneba M, Raff T, et al. Adult patients with acute lymphoblastic leukemia and molecular failure display a poor prognosis and are candidates for stem cell transplantation and targeted therapies. *Blood* 2012;120(9):1868–1876. doi:10.1182/blood-2011-09-377713.
- 39 Gokbuget N, Stanze D, Beck J, et al. Outcome of relapsed adult lymphoblastic leukemia depends on response to salvage chemotherapy, prognostic factors, and performance of stem cell transplantation. *Blood* 2012;120(10):2032–2041. doi:10.1182/blood-2011-12-399287.
- 40 Fielding AK, Richards SM, Chopra R, et al. Outcome of 609 adults after relapse of acute lymphoblastic leukemia (ALL); an MRC UKALL12/ECOG 2993 study. *Blood* 2007;109(3):944–950. doi:10.1182/blood-2006-05-018192.

- 41 Sive JI, Buck G, Fielding A, et al. Outcomes in older adults with acute lymphoblastic leukaemia (ALL): Results from the international MRC UKALL XII/ECOG2993 trial. *Br J Haematol* 2012;157(4):463–471. doi:10.1111/j.1365-2141.2012.09095.x.
- 42 Gökbuget N. Treatment of Older Patients with Acute Lymphoblastic Leukaemia. *Drugs & Aging* 2018;35(1):11–26. doi:10.1007/s40266-017-0503-5.
- 43 Gokbuget N. How I treat older patients with ALL. *Blood* 2013;122(8):1366–1375. doi:10.1182/blood-2012-07-379016.
- 44 Thomas X, Olteanu N, Charrin C, et al. Acute lymphoblastic leukemia in the elderly: The Edouard Herriot hospital experience. *Am. J. Hematol.* 2001;67(2):73–83. doi:10.1002/ajh.1083.
- 45 LEGRAND O, MARIE J-P, MARJANOVIC Z, et al. Prognostic factors in elderly acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 1997;97(3):596–602. doi:10.1046/j.1365-2141.1997.952909.x.
- 46 Tucci A, Ferrari S, Bottelli C, et al. A comprehensive geriatric assessment is more effective than clinical judgment to identify elderly diffuse large cell lymphoma patients who benefit from aggressive therapy. *Cancer* 2009;115(19):4547–4553. doi:10.1002/cncr.24490.
- 47 Zielinski C, Jäger U, Raderer M. Abstracts. Basel etc.: S. Karger 2008.
- 48 Gökbuget N, Beck J, Brüggemann M, et al. Moderate Intensive Chemotherapy Including CNS-Prophylaxis with Liposomal Cytarabine Is Feasible and effective in Older Patients with Ph-Negative Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL): Results of a Prospective Trial From the German Multicenter Study Group for Adult ALL (GMALL). *Blood* 2012;120(21).
- 49 Ottmann OG, Pfeifer H. First-line treatment of Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia in adults. *Current opinion in oncology* 2009;21 Suppl 1:6. doi:10.1097/01.cco.0000357476.43164.6b.
- 50 Shlush LI, Zandi S, Mitchell A, et al. Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. *Nature* 2014;506(7488):328–333. doi:10.1038/nature13038.

- 51 Medyouf H, Mossner M, Jann J-C, et al. Myelodysplastic cells in patients reprogram mesenchymal stromal cells to establish a transplantable stem cell niche disease unit. *Cell Stem Cell* 2014;14(6):824–837. doi:10.1016/j.stem.2014.02.014.
- 52 Cobaleda C, Sánchez-García I. B-cell acute lymphoblastic leukaemia: towards understanding its cellular origin. *BioEssays news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 2009;31(6):600–609. doi:10.1002/bies.200800234.
- 53 Blatt K, Menzl I, Eisenwort G, et al. Phenotyping and Target Expression Profiling of CD34+/CD38- and CD34+/CD38+ Stem- and Progenitor cells in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Neoplasia (New York, N.Y.)* 2018;20(6):632–642. doi:10.1016/j.neo.2018.04.004.
- 54 Hotfilder M, Rottgers S, Rosemann A, et al. Leukemic stem cells in childhood high-risk ALL/t(9;22) and t(4;11) are present in primitive lymphoid-restricted CD34+CD19- cells. *Cancer research* 2005;65(4):1442–1449. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1356.
- 55 Cox CV, Evely RS, Oakhill A, et al. Characterization of acute lymphoblastic leukemia progenitor cells. *Blood* 2004;104(9):2919–2925. doi:10.1182/blood-2004-03-0901.
- 56 Castor A, Nilsson L, Astrand-Grundstrom I, et al. Distinct patterns of hematopoietic stem cell involvement in acute lymphoblastic leukemia. *Nature medicine* 2005;11(6):630–637. doi:10.1038/nm1253.
- 57 Cobaleda C, Gutierrez-Cianca N, Perez-Losada J, et al. A primitive hematopoietic cell is the target for the leukemic transformation in human philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000;95(3):1007–1013.
- 58 Aoki Y, Watanabe T, Saito Y, et al. Identification of CD34+ and CD34- leukemia-initiating cells in MLL-rearranged human acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2015;125(6):967–980. doi:10.1182/blood-2014-03-563304.
- 59 Le Viseur C, Hotfilder M, Bomken S, et al. In childhood acute lymphoblastic leukemia, blasts at different stages of immunophenotypic maturation have stem cell properties. *Cancer cell* 2008;14(1):47–58. doi:10.1016/j.ccr.2008.05.015.

- 60 Lang F, Wojcik B, Bothur S, et al. Plastic CD34 and CD38 expression in adult B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia explains ambiguity of leukemia-initiating stem cell populations. *Leukemia* 2017;31(3):731–734. doi:10.1038/leu.2016.315.
- 61 Wojcik B. Charakterisierung leukämieinduzierender Zellen bei der humanen adulten B-Zell akuten lymphatischen Leukämie. Dissertation. Frankfurt am Main 2017.
- 62 Bomken S, Fiser K, Heidenreich O, et al. Understanding the cancer stem cell. *British journal of cancer* 2010;103(4):439–445. doi:10.1038/sj.bjc.6605821.
- 63 Mullighan CG, Phillips LA, Su X, et al. Genomic analysis of the clonal origins of relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Science (New York, N.Y.)* 2008;322(5906):1377–1380. doi:10.1126/science.1164266.
- 64 Mullighan CG. Genomic characterization of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Seminars in hematology* 2013;50(4):314–324. doi:10.1053/j.seminhematol.2013.10.001.
- 65 Pui C-H, Relling MV, Downing JR. Acute lymphoblastic leukemia. *The New England journal of medicine* 2004;350(15):1535–1548. doi:10.1056/NEJMra023001.
- 66 Mullighan CG, Zhang J, Kasper LH, et al. CREBBP mutations in relapsed acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 2011;471(7337):235–239. doi:10.1038/nature09727.
- 67 Anderson K, Lutz C, van Delft FW, et al. Genetic variegation of clonal architecture and propagating cells in leukaemia. *Nature* 2011;469(7330):356–361. doi:10.1038/nature09650.
- 68 Schmitz M, Breithaupt P, Scheidegger N, et al. Xenografts of highly resistant leukemia recapitulate the clonal composition of the leukemogenic compartment. *Blood* 2011;118(7):1854–1864. doi:10.1182/blood-2010-11-320309.
- 69 Soverini S, Benedittis C de, Machova Polakova K, et al. Unraveling the complexity of tyrosine kinase inhibitor-resistant populations by ultra-deep

- sequencing of the BCR-ABL kinase domain. *Blood* 2013;122(9):1634–1648. doi:10.1182/blood-2013-03-487728.
- 70 Landau DA, Carter SL, Getz G, et al. Clonal evolution in hematological malignancies and therapeutic implications. *Leukemia* 2014;28(1):34–43. doi:10.1038/leu.2013.248.
- 71 Gawad C, Koh W, Quake SR. Dissecting the clonal origins of childhood acute lymphoblastic leukemia by single-cell genomics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2014;111(50):17947–17952. doi:10.1073/pnas.1420822111.
- 72 Boag JM, Beesley AH, Firth MJ, et al. Altered glucose metabolism in childhood pre-B acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia* 2006;20(10):1731–1737. doi:10.1038/sj.leu.2404365.
- 73 Warburg O. On the Origin of Cancer Cells. *Science* 1956;123(3191):309–314. doi:10.1126/science.123.3191.309.
- 74 Hsu PP, Sabatini DM. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell* 2008;134(5):703–707. doi:10.1016/j.cell.2008.08.021.
- 75 Warburg O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 1956;124(3215):269–270.
- 76 DeBerardinis RJ, Mancuso A, Daikhin E, et al. Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007;104(49):19345–19350.
- 77 Takubo K, Goda N, Yamada W, et al. Regulation of the HIF-1alpha level is essential for hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* 2010;7(3):391–402. doi:10.1016/j.stem.2010.06.020.
- 78 Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature reviews. Cancer* 2003;3(10):721–732. doi:10.1038/nrc1187.
- 79 Semenza GL. HIF-1: Upstream and downstream of cancer metabolism. *Current opinion in genetics & development* 2010;20(1):51–56. doi:10.1016/j.gde.2009.10.009.

- 80 Dang CV, Kim J-w, Gao P, et al. The interplay between MYC and HIF in cancer. England 2008 Jan.
- 81 Gordan JD, Simon MC. Hypoxia-inducible factors: Central regulators of the tumor phenotype. *Current opinion in genetics & development* 2007;17(1):71–77. doi:10.1016/j.gde.2006.12.006.
- 82 Yu F, White SB, Zhao Q, et al. HIF-1 α binding to VHL is regulated by stimulus-sensitive proline hydroxylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001;98(17):9630–9635. doi:10.1073/pnas.181341498.
- 83 DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, et al. The biology of cancer: Metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell metabolism* 2008;7(1):11–20. doi:10.1016/j.cmet.2007.10.002.
- 84 Semenza GL. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene* 2010;29(5):625–634. doi:10.1038/onc.2009.441.
- 85 Hu C-J, Wang L-Y, Chodosh LA, et al. Differential Roles of Hypoxia-Inducible Factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in Hypoxic Gene Regulation. *Mol. Cell. Biol.* 2003;23(24):9361–9374. doi:10.1128/MCB.23.24.9361-9374.2003.
- 86 Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature medicine* 1997;3(7):730–737.
- 87 Nijmeijer BA, Szuhai K, Goselink HM, et al. Long-term culture of primary human lymphoblastic leukemia cells in the absence of serum or hematopoietic growth factors. *Experimental hematology* 2009;37(3):376–385. doi:10.1016/j.exphem.2008.11.002.
- 88 Mohnike W, Hör G, Hertel A, et al. *PET/CT-Atlas: Interdisziplinäre PET/CT- und PET/MR-Diagnostik und Therapie*, 3rd edn. Berlin [Germany]: Springer 2016.
- 89 Dresel S. *PET in oncology*. Berlin, New York: Springer 2007.
- 90 Hassanein M, Weidow B, Koehler E, et al. Development of high-throughput quantitative assays for glucose uptake in cancer cell lines. *Molecular*

- imaging and biology MIB the official publication of the Academy of Molecular Imaging 2011;13(5):840–852. doi:10.1007/s11307-010-0399-5.
- 91 Millon SR, Ostrander JH, Brown JQ, et al. Uptake of 2-NBDG as a method to monitor therapy response in breast cancer cell lines. *Breast cancer research and treatment* 2011;126(1):55–62. doi:10.1007/s10549-010-0884-1.
- 92 Yamada K, Saito M, Matsuoka H, et al. A real-time method of imaging glucose uptake in single, living mammalian cells. *Nature protocols* 2007;2(3):753–762. doi:10.1038/nprot.2007.76.
- 93 O'Neil RG, Wu L, Mullani N. Uptake of a fluorescent deoxyglucose analog (2-NBDG) in tumor cells. *Molecular imaging and biology MIB the official publication of the Academy of Molecular Imaging* 2005;7(6):388–392. doi:10.1007/s11307-005-0011-6.
- 94 Nitin N, Carlson AL, Muldoon T, et al. Molecular imaging of glucose uptake in oral neoplasia following topical application of fluorescently labeled deoxyglucose. *International journal of cancer* 2009;124(11):2634–2642. doi:10.1002/ijc.24222.
- 95 Frees AE, Rajaram N, McCachren SS, et al. Delivery-corrected imaging of fluorescently-labeled glucose reveals distinct metabolic phenotypes in murine breast cancer. *PloS one* 2014;9(12):e115529. doi:10.1371/journal.pone.0115529.
- 96 Majmundar AJ, Wong WJ, Simon MC. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Molecular cell* 2010;40(2):294–309. doi:10.1016/j.molcel.2010.09.022.
- 97 Zecchini V, Madhu B, Russell R, et al. Nuclear ARRB1 induces pseudohypoxia and cellular metabolism reprogramming in prostate cancer. *The EMBO Journal* 2014;33(12):1365–1382. doi:10.15252/embj.201386874.
- 98 Adams RA, Flowers A, Davis BJ. Direct implantation and serial transplantation of human acute lymphoblastic leukemia in hamsters, SB-2. *Cancer research* 1968;28(6):1121–1125.
- 99 Wang N, Huang L, Di Wang, et al. Successful engraftment of human acute lymphoblastic leukemia cells in NOD/SCID mice via intrasplenic inoculation.

- Cancer biology & therapy 2012;13(12):1158–1164.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/3469473>.
- 100 Murakami T, Nishiyama T, Shirotani T, et al. Identification of two enhancer elements in the gene encoding the type 1 glucose transporter from the mouse which are responsive to serum, growth factor, and oncogenes. *The Journal of biological chemistry* 1992;267(13):9300–9306.
- 101 Wahdan-Alaswad R, Fan Z, Edgerton SM, et al. Glucose promotes breast cancer aggression and reduces metformin efficacy. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 2013;12(24):3759–3769. doi:10.4161/cc.26641.
- 102 Macheda ML, Rogers S, Best JD. Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. *Journal of cellular physiology* 2005;202(3):654–662. doi:10.1002/jcp.20166.
- 103 Kaira K, Serizawa M, Koh Y, et al. Biological significance of 18F-FDG uptake on PET in patients with non-small-cell lung cancer. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 2014;83(2):197–204. doi:10.1016/j.lungcan.2013.11.025.
- 104 Morani F, Phadngam S, Follo C, et al. PTEN regulates plasma membrane expression of glucose transporter 1 and glucose uptake in thyroid cancer cells. *Journal of molecular endocrinology* 2014;53(2):247–258. doi:10.1530/JME-14-0118.
- 105 Rivenzon-Segal D, Rushkin E, Polak-Charcon S, et al. Glucose transporters and transport kinetics in retinoic acid-differentiated T47D human breast cancer cells. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 2000;279(3):E508-19. doi:10.1152/ajpendo.2000.279.3.E508.
- 106 Egawa-Takata T, Endo H, Fujita M, et al. Early reduction of glucose uptake after cisplatin treatment is a marker of cisplatin sensitivity in ovarian cancer. *Cancer science* 2010;101(10):2171–2178. doi:10.1111/j.1349-7006.2010.01670.x.
- 107 Wang Y-D, Li S-J, Liao J-X. Inhibition of glucose transporter 1 (GLUT1) chemosensitized head and neck cancer cells to cisplatin. *Technology in cancer research & treatment* 2013;12(6):525–535. doi:10.7785/tcrt.2012.500343.

- 108 Suttie SA, Park KGM, Smith TAD. 18F2-fluoro-2-deoxy-D-glucose incorporation by AGS gastric adenocarcinoma cells in vitro during response to epirubicin, cisplatin and 5-fluorouracil. *British journal of cancer* 2007;97(7):902–909. doi:10.1038/sj.bjc.6603971.
- 109 Board M, Humm S, Newsholme EA. Maximum activities of key enzymes of glycolysis, glutaminolysis, pentose phosphate pathway and tricarboxylic acid cycle in normal, neoplastic and suppressed cells. *The Biochemical journal* 1990;265(2):503–509.
- 110 Mazurek S. Pyruvate kinase type M2: A key regulator of the metabolic budget system in tumor cells. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2011;43(7):969–980. doi:10.1016/j.biocel.2010.02.005.
- 111 Schwartz MK. Enzymes as prognostic markers and therapeutic indicators in patients with cancer. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 1992;206(1-2):77–82.
- 112 Brand K. Glutamine and glucose metabolism during thymocyte proliferation. Pathways of glutamine and glutamate metabolism. *Biochemical Journal* 1985;228(2):353–361.
- 113 Munyon WH, Merchant DJ. The relation between glucose utilization, lactic acid production and utilization and the growth cycle of L strain fibroblasts. *Experimental cell research* 1959;17(3):490–498. doi:10.1016/0014-4827(59)90069-2.
- 114 Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S, Marín-Hernández A, et al. Energy metabolism in tumor cells. *The FEBS journal* 2007;274(6):1393–1418. doi:10.1111/j.1742-4658.2007.05686.x.
- 115 Shah VO, Civin CI, Loken MR. Flow cytometric analysis of human bone marrow. IV. Differential quantitative expression of T-200 common leukocyte antigen during normal hemopoiesis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)* 1988;140(6):1861–1867.
- 116 Chiche J, Brahim-Horn MC, Pouysségur J. Tumour hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis: A common feature in cancer. *Journal of cellular and molecular medicine* 2010;14(4):771–794. doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00994.x.

- 117 Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nature reviews. Cancer* 2004;4(11):891–899. doi:10.1038/nrc1478.
- 118 Guillaumond F, Leca J, Olivares O, et al. Strengthened glycolysis under hypoxia supports tumor symbiosis and hexosamine biosynthesis in pancreatic adenocarcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2013;110(10):3919–3924. doi:10.1073/pnas.1219555110.
- 119 Sundfør K, Lyng H, Rofstad EK. Tumour hypoxia and vascular density as predictors of metastasis in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *British journal of cancer* 1998;78(6):822–827.
- 120 Hockel M, Schlenger K, Aral B, et al. Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer research* 1996;56(19):4509–4515.
- 121 Burt BM, Humm JL, Kooby DA, et al. Using positron emission tomography with (18)FFDG to predict tumor behavior in experimental colorectal cancer. *Neoplasia (New York, N.Y.)* 2001;3(3):189–195. doi:10.1038/sj/neo/7900147.
- 122 Zhou W, Capello M, Fredolini C, et al. Proteomic analysis reveals Warburg effect and anomalous metabolism of glutamine in pancreatic cancer cells. *Journal of proteome research* 2012;11(2):554–563. doi:10.1021/pr2009274.
- 123 Marín-Hernández A, Rodríguez-Enríquez S, Vital-González PA, et al. Determining and understanding the control of glycolysis in fast-growth tumor cells. Flux control by an over-expressed but strongly product-inhibited hexokinase. *The FEBS journal* 2006;273(9):1975–1988. doi:10.1111/j.1742-4658.2006.05214.x.
- 124 Schroeder T, Yuan H, Viglianti BL, et al. Spatial heterogeneity and oxygen dependence of glucose consumption in R3230Ac and fibrosarcomas of the Fischer 344 rat. *Cancer research* 2005;65(12):5163–5171. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-3900.
- 125 Walenta S, Wetterling M, Lehrke M, et al. High Lactate Levels Predict Likelihood of Metastases, Tumor Recurrence, and Restricted Patient

- Survival in Human Cervical Cancers. *Cancer Res* 2000;60(4):916–921.
<http://cancerres.aacrjournals.org/content/60/4/916.full.pdf>.
- 126 Lum JJ, Bui T, Gruber M, et al. The transcription factor HIF-1alpha plays a critical role in the growth factor-dependent regulation of both aerobic and anaerobic glycolysis. *Genes & Development* 2007;21(9):1037–1049.
doi:10.1101/gad.1529107.
- 127 Brizel DM, Sibley GS, Prosnitz LR, et al. Tumor hypoxia adversely affects the prognosis of carcinoma of the head and neck. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 1997;38(2):285–289.
- 128 Höckel M, Knoop C, Schlenger K, et al. Intratumoral pO₂ predicts survival in advanced cancer of the uterine cervix. *Radiotherapy and oncology journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 1993;26(1):45–50.
- 129 Gatenby RA, Kessler HB, Rosenblum JS, et al. Oxygen distribution in squamous cell carcinoma metastases and its relationship to outcome of radiation therapy. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 1988;14(5):831–838.
- 130 Brizel DM, Scully SP, Harrelson JM, et al. Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma. *Cancer research* 1996;56(5):941–943.
- 131 Gottschalk S, Anderson N, Hainz C, et al. Imatinib (STI571)-mediated changes in glucose metabolism in human leukemia BCR-ABL-positive cells. *Clinical cancer research an official journal of the American Association for Cancer Research* 2004;10(19):6661–6668. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-0039.
- 132 Semenza GL, Roth PH, Fang HM, et al. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *The Journal of biological chemistry* 1994;269(38):23757–23763.
- 133 Robert Koch-Institut. *Krebs in Deutschland für 2013/2014: RKI-Bib1* (Robert Koch-Institut) 2017.

- 134 Ebert BL, Firth JD, Ratcliffe PJ. Hypoxia and mitochondrial inhibitors regulate expression of glucose transporter-1 via distinct Cis-acting sequences. *The Journal of biological chemistry* 1995;270(49):29083–29089.
- 135 Bos JL. ras oncogenes in human cancer: A review. *Cancer research* 1989;49(17):4682–4689.
- 136 Chen C, Pore N, Behrooz A, et al. Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia. *The Journal of biological chemistry* 2001;276(12):9519–9525. doi:10.1074/jbc.M010144200.
- 137 Ying H, Kimmelman AC, Lyssiotis CA, et al. Oncogenic Kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism. *Cell* 2012;149(3):656–670. doi:10.1016/j.cell.2012.01.058.
- 138 Zhang D, Wang Y, Dong L, et al. Therapeutic role of EF24 targeting glucose transporter 1-mediated metabolism and metastasis in ovarian cancer cells. *Cancer science* 2013;104(12):1690–1696. doi:10.1111/cas.12293.
- 139 Oburoglu L, Tardito S, Fritz V, et al. Glucose and glutamine metabolism regulate human hematopoietic stem cell lineage specification. *Cell Stem Cell* 2014;15(2):169–184. doi:10.1016/j.stem.2014.06.002.
- 140 Wang D-N, Lemieux MJ, Boulter JM. Purification and characterization of transporter proteins from human erythrocyte membrane. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 2003;228:239–255.
- 141 El-Menshawey N, Abd-Aziz SM, Elkhamisy EM, et al. Leukemia propagating cells in Philadelphia chromosome-positive ALL: A resistant phenotype with an adverse prognosis. *Blood research* 2018;53(2):138–144. doi:10.5045/br.2018.53.2.138.
- 142 Long J, Liu S, Li K, et al. High proportion of CD34+/CD38-cells is positively correlated with poor prognosis in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia & lymphoma* 2014;55(3):611–617. doi:10.3109/10428194.2013.807924.