Universitätsklinikum Ulm
Klinik für Kinder- und Jugendmedizin
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Klaus-Michael Debatin

Sektion Pädiatrische Endokrinologie und Diabetologie
Leiter: Prof. Dr. med. Martin Wabitsch
Prof. Dr. rer. nat. Pamela Fischer-Posovszky

Etablierung eines Ko-Kultur-Modellsystems zur Untersuchung der Interaktion von Adipozyten unterschiedlicher Herkunft und B-Vorläufer-ALL-Zellen

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin an der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Elena Dorothea Brenner
geboren in Aalen
2021

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Pamela Fischer-Posovszky

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Konstanze Döhner

Tag der Promotion: 24.06.2022

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis III
1 Einleitung 1
1.1 Akute lymphatische Leukämie im Kindesalter 1
1.2 Fett ist nicht gleich Fett - Die unterschiedlichen Typen des Fettgewebes 3
1.2.1 Weißes, braunes und beiges Fettgewebe 3
1.2.2 Die Adipozyten des Knochenmarks 5
1.3 Die Knochenmarknische 7
1.4 Die Interaktion von Leukämiezellen und Adipozyten 10
1.4.1 Modellsysteme 10
1.4.2 Einfluss des WAT auf unterschiedliche Leukämiezellen 11
1.4.3 Einfluss des MAT auf unterschiedliche Leukämiezellen 11
1.5 Ziel der Arbeit 12
2 Material und Methoden 14
2.1 Material 14
2.1.1 Biologisches Material 14
2.1.2 Substanzen, Reagenzien und Kits 16
2.1.3 Puffer, Lösungen, Enzyme und Kits 18
2.1.4 Primer und Antikörper 18
2.1.5 Geräte, Materialien und Software 19
2.1.6 Zellkulturbedingungen und -medien 20
2.2 Methoden 21
2.2.1 Allgemeine Zellkultur 21
2.2.2 Ko-Kultur 23
2.2.3 Zellkultur-Experimente mit konditionierten Medien 25
2.2.4 Transwell-Assay 26
2.2.5 Zellbiologische Methoden 27
2.2.6 Molekularbiologische Methoden 29
2.2.7 Statistische Analysen 33
3 Ergebnisse 34
3.1 Etablierung und Testung eines Ko-Kultur-Modellsystems mit Adipozyten und Leukämiezellen 34
3.1.1 Charakterisierung der zur Etablierung verwendeten SGBS-Zellen 34

3.1.2 Selektion eines geeigneten Zellkulturmediums zur Untersuchung der Interaktion von Adipozyten und Leukämiezellen 36
3.2 Das serumfreie und standardisierte Adipozyten-Leukämiezell-Ko-Kultur-Modellsystem 40
3.2.1 Adipozyten des MAT im Ko-Kultur-Modellsystem 42
3.3 Charakterisierung der Interaktion von Adipozyten unterschiedlicher Herkunft mit Leukämiezellen 45
3.3.1 Der Einfluss von Adipozyten des WAT auf B-Vorläufer-ALL-Zellen .. 45
3.3.2 Der Einfluss von Adipozyten des MAT auf B-Vorläufer-ALL-Zellen .. 49
3.3.3 (Prä-)Adipozyten des WAT und MAT verbessern das Überleben bestimmter Xenograft-Proben 55
4 Diskussion 61
4.1 Methodik 62
4.1.1 Herausforderungen der Etablierung einer Ko-Kultur 62
4.2 Leukämiezellen werden durch (Prä-)Adipozyten unterschiedlicher Herkunft unterschiedlich beeinflusst 66
4.3 Wie findet die Einflussnahme von (Prä-)Adipozyten auf BCP-ALL-Zellen statt? 69
4.4 Die Interaktion von Leukämiezellen und Adipozyten induziert einen proinflammatorischen, Leukämie-supportiven Zellstatus in Adipozyten 71
4.5 Übergewicht und dessen Auswirkung auf die Leukämie 74
5 Zusammenfassung 78
6 Literaturverzeichnis 80
7 Anhang 92
8 Danksagung 95
9 Lebenslauf 97

Abkürzungsverzeichnis

ADIPOQ ..... Adiponektin
ALL ..... Akute lymphatische Leukämie
AML ..... Akute myeloische Leukämie
ANOVA ..... Analysis of Variance
ATCC ..... American Type Culture Collection
ATGL ..... Adipozyten-Triglycerid-Lipase
ATP ..... Adenosintriphosphat
BAT ..... Brown adipose tissue
BCA ..... Bicinchoninsäure
BCP-ALL ..... B-cell precursor acute lympoblastic leukemia
BCR-ABL ..... Breakpoint Cluster Region-Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog 1
BMI ..... Body-Mass-Index
BSA ..... Bovines Serumalbumin
cDNA ..... Complementary deoxyribonucleic acid
CLL ..... Chronisch lymphatische Leukämie
cMAT ..... Constitutive marrow adipose tissue
CML ..... Chronische myeloische Leukämie
CT ..... CellTrace
CTGF ..... Connective Tissue Growth Factor
CT-Wert ..... Threshold cycle-Wert
CXCL12 ..... CXC-Motiv-Chemokin 12
DEPC ..... Diethylpyrocarbonat
DMEM/F12 ..... Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nährmischung F12
DMSO ..... Dimethylsulfoxid
dNTP ..... Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPBS ..... Dulbecco's phosphate-buffered saline
DSMZ ..... Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT ..... Dithiothreitol
ECL ..... Enhanced chemiluminescence
EDTA ..... Ethylendiaminotetraacetat
ERK ..... Extracellular-signal Regulated Kinase
FABP4 ..... Fatty Acid Binding Protein 4
FACS ..... Fluorescence-Activated Cell Scanning
FCS ..... Fetal calf serum
FSC ..... Forward Scatter
GLUT4 ..... Glukose-Transporter-4
GSEA ..... Gene Set Enrichment Analysis
HCl ..... Hydrochlorid
Hprt ..... Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
HRP ..... Horseradish peroxidase
HSC ..... Hematopoietic stem cell
IBMX 3-Isobutyl-1-Methylxanthin
IgG ..... Immunglobulin G
IL ..... Interleukin
IL6R Interleukin-6-Rezeptor-Gen
IL-6R Interleukin-6-Rezeptor
JAK/STAT ..... Januskinase/Signal Transducers and Activators of Transcription
LDS ..... Lithiumdodecylsulfat
LEP ..... Leptin
LEPR ..... Leptinrezeptor
LIC ..... Leukemia initiating cell
L-KM ..... Leukämiezell-konditioniertes Medium
LPC ..... Lymphoid progenitor cell
LSC ..... Leukemic stem cell
MAT ..... Marrow adipose tissue
Mcp-1 ..... Monocyte chemoattractant protein-1
MEM ..... Minimum Essential Medium
MFI ..... Mittlere Fluoreszenzintensität
MLL ..... Myeloid/Lymphoid or mixed-lineage Leukemia 1

MM ..... Mastermix
MPC ..... Myeloid progenitor cell
mRNA ..... Messenger ribonucleic acid
MSC ..... Mesenchymal stem cell
MTX ..... Methotrexat
NaCl ..... Natriumchlorid
NK-Zellen ..... Natürliche Killerzellen
NOD/SCID ..... Non-Obese Diabetic / Severe Combines Immunodeficiency
op/op ..... Colony-stimulating factor 1 less osteopetrotic Mausstamm
PFA ..... Paraformaldehyd
PI ..... Propidiumiodid
PPARG ..... Proliferator-aktivierter-Rezeptor-Gamma
QD ..... Quick-Diff-Medium
qPCR ..... Quantitative Polymerase Kettenreaktion
rMAT ..... Regulated marrow adipose tissue
RNA ..... Ribonucleic acid
rpm ..... Revolutions per minute
RPMI ..... Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium
RT ..... Reverse Transkription
SCF ..... Stem cell factor
SD ..... Standarddeviation
SDS-PAGE ..... Sodium Dodecyl Sulfat Polyacrylamid Gel Elektrophorese
SEM ..... Standard Error of the Mean
SGBS ..... Simpson-Golabi-Behmel Syndrom
SSC ..... Sideward Scatter
T3 ..... Triiodothyronin
TAG ..... Triacylglycerol
TBS ..... Tris-buffered saline
TBST ..... Tris-buffered saline with Tween20
TF2B ..... Transkriptionsfaktor 2B
TNFα ..... Tumor Nekrose Faktor alpha
Tris ..... Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UCP1 ..... Uncoupling Protein 1
WAT ..... White adipose tissue
X ..... Xenograft
YAT ..... Yellow adipose tissue
ZNS ..... Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

In der Krebs- und Fettzellforschung ist bereits länger bekannt, dass Adipozyten das Wachstum solider Tumore durch Bereitstellung von Energie fördern [74]. Unklar ist jedoch, ob Fettgewebszellen des Knochenmarks auf die akute lymphatische Leukämie des Kindesalters in ihrer Entwicklung und Erhaltung unterstützend wirken. Die Hypothese dieser Arbeit lautete, dass eine enge Interaktion zwischen Fettgewebszellen und Leukämiezellen des Knochenmarks stattfindet. Dabei programmieren Leukämiezellen Adipozyten des Knochenmarks dahingehend um, dass ein das Wachstum und Überleben begünstigendes proinflammatorisches Milieu für die Leukämiezellen geschaffen wird.

Im Folgenden werden spezifische Charakteristika der akuten lymphatischen Leukämie sowie des Fettgewebes erläutert, um schließlich auf die mögliche Interaktion zwischen diesen beiden Zellarten einzugehen.

1.1 Akute lymphatische Leukämie im Kindesalter

Die akute lymphatische Leukämie (ALL) macht mit etwa 46 % den größten Anteil unter den Krebserkrankungen im Kindes- und Jugendalter von 0 bis 14 Jahren aus und trägt unter allen pädiatrischen Krebserkrankungen am stärksten zur krebsbedingten Mortalität der unter 20-Jährigen bei [118, 121]. Der Erkrankungsgipfel liegt dabei zwischen dem zweiten und fünften Lebensjahr [99].

Mögliche Risikofaktoren für die Entstehung der ALL stellen sowohl genetische Syndrome wie das Down-Syndrom oder die Ataxia teleangiectatica, eine genetische Prädisposition sowie Umwelteinflüsse (ionisierende Strahlung, Zytostatika) dar [54, 99]. In den wenigsten Fällen der ALL kann jedoch auf eine eindeutige Erkrankungsursache geschlossen werden. Klinisch kann sich die ALL durch Blutungs-/Infektionszeichen, Anämie und Abgeschlagenheit äußern, was durch Verdrängung anderer Blut- und Immunabwehrzellen durch Lymphoblasten im Knochenmark und der damit einhergehenden Knochenmarkinsuffizienz zu erklären ist [36]. Zudem fällt bei der körperlichen Untersuchung der Kinder häufig eine Lymphknotenschwellung und eine Hepato-/Splenomegalie auf [36]. Letztgenanntes kann sich klinisch auch durch Bauchschmerzen und Appetitlosigkeit äußern. Auch Knochen- und Gelenkschmerzen, die unter Umständen zu eingeschränkter Bewegungsfähigkeit der Kinder führen können, treten auf. Weitere Symptome

umfassen Kopfschmerzen, Erbrechen, Sehstörungen und nervale Ausfälle bei einer Manifestation im zentralen Nervensystem (ZNS) sowie Hodenschwellungen und (Schleim-) Hautinfiltrationen [36].

Die ALL wird auf Grundlage von Morphologie, Immunphänotyp, Zytochemie sowie zyto- und molekulargenetischer Methoden in unterschiedliche Subtypen unterteilt [36]. Mit Hilfe der Immunphänotypisierung und der damit einhergehenden Analyse der Oberflächenantigene können Leukämiezellen bestimmten Leukämie-Subgruppen zugeteilt werden. Dabei findet eine Unterscheidung von B-Linien-ALL, B-Vorläufer-ALL (B-cell precursor acute lympoblastic leukemia; BCP-ALL) und T-Linien-ALL statt [36]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die BCP-ALL untersucht, zumal diese die häufigste Form der ALL im Kindes- und Jugendalter darstellt [99]. Diese wird wiederum in die Pro-B-ALL, Common ALL und Prä-B-ALL unterteilt [36]. Durch zyto- und molekulargenetische Untersuchungen können Chromosomen-Aberrationen und Genmutationen erkannt und als Prognosefaktoren herangezogen werden [36, 54].

Die Verbesserung der Heilungsraten von anfänglich 10 % in den 1960er Jahren auf aktuell 90 %, welche durch neue risikoadaptierte Strategien und Kombinationen etablierter Chemotherapeutika erreicht wurden, zeugen von dem großen Erfolg der Therapie der ALL [54]. Diese gliedert sich in verschiedene Therapieblöcke, die an das Risikoprofil des Patienten angepasst werden. Dabei folgt einer Vortherapie mit Prednisolon die Induktionstherapie mit Dexamethason, Vincristin, Daunorubicin, L-Asparaginase und weiteren Zytostatika [36]. Ziel der Induktionstherapie ist dabei die Leukämiezelllast um mehr als 99 % zu reduzieren und eine geregelte Hämatopoese wiederherzustellen [99]. Bei Patienten mit ZNS-Beteiligung wird eine Extrakompartmenttherapie mit Methotrexat (MTX) durchgeführt, woran sich eine Reinduktionstherapie anschließt [36]. Die nachfolgende Erhaltungstherapie mit MTX und Mercaptopurin für mindestens 2 Jahre nach der Diagnose vervollständigt das Therapieschema der ALL [36, 99]. Die allogene Stammzelltransplantation kommt nur bei Patienten mit hohem Risikoprofil, wie es z.B. beim Vorhandensein des *BCR-ABL*-Fusionsgens (Breakpoint Cluster Region-Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog 1) und des *MLL*-Rearrangements (Myeloid/Lymphoid or mixed-Lineage leukemia 1) der Fall ist, zum Einsatz, da diese mit einer erhöhten Mortalität und Morbidität einhergeht [36, 99].

Nicht alle Patienten können durch dieses Therapieschema geheilt werden. Die Resistenz gegenüber etablierten Therapeutika der Induktionstherapie und die damit einhergehende Proliferation eines Leukämiezell-Klons können zu einer deutlichen Verschlechterung der Prognose im Rahmen eines früh auftretenden Rezidivs führen [8, 54]. 20,5 % der Patienten mit einer ALL erleben ein Rezidiv ihrer Erkrankung, das in über der Hälfte der Fälle das Knochenmark befällt [92]. Ein frühes Rezidiv im Knochenmark steigert das Risiko an der ALL zu versterben drastisch, da nur 24,1 % dieser Patienten fünf Jahre nach Rezidiv noch am Leben sind, wohingegen dies auf über 50 % der Patienten mit einem andernorts lokalisierten Rezidiv zutrifft [92]. Für diese betroffenen Kinder und Jugendliche werden neue Therapiemöglichkeiten benötigt, um ihre Heilungschancen zu verbessern.

1.2 Fett ist nicht gleich Fett - Die unterschiedlichen Typen des Fettgewebes

Das Fettgewebe ist ein im Körper ubiquitär vorkommendes Bindegewebe, das auf die Speicherung und Freigabe von Energie in Form von Lipiden spezialisiert ist. Dabei beträgt der prozentuale Fettgewebsanteil, der unter anderem abhängig von Alter, Body-Mass-Index (BMI) und Geschlecht ist, 8 - 35 % der Gesamtkörpermasse [43]. Je nach Lokalisation, Morphologie und Funktion kann das Fettgewebe in weißes (white adipose tissue; WAT), braunes (brown adipose tissue; BAT) oder beiges Fettgewebe unterteilt werden [47, 105]. Das Fettgewebe des Knochenmarks (marrow adipose tissue; MAT) wird auch als gelbes Fettgewebe (yellow adipose tissue; YAT) bezeichnet [75].

1.2.1 Weißes, braunes und beiges Fettgewebe

Das WAT kann lageabhängig in unterschiedliche Fettgewebsarten unterteilt werden. Das subkutane Fettgewebe macht dabei 80 - 90 %, das viszerale Fettgewebe hingegen 6 - 20 % der Gesamtfettmasse aus, wobei diese Werte abhängig vom Geschlecht sind [62]. Erstgenanntes findet sich vor allem in unteren Körperregionen unter der Haut von Bauch, Hüfte, Oberschenkel und Gesäß und tritt bei Frauen gehäuft auf [62]. Im Gegensatz dazu umgibt das bei Männern vermehrt vorkommende viszerale Fettgewebe innere Organe und wird mit metabolischen Erkrankungen sowie gesteigerter Insulinresistenz in Verbindung gebracht [56].

Der Anteil des BAT im Körper des Erwachsenen ist im Vergleich zu dem des WAT gering. Während Babys signifikante Mengen an BAT besitzen, nimmt dieser Anteil mit steigendem Alter ab, jedoch sind supraklavikulär, axillär, nuchal, spinal, zervikal, paravertebral, mediastinal und (supra-)renal kleine BAT-Restanteile im Erwachsenen nachweisbar [89].

Morphologisch bilden Adipozyten des WAT große univakuoläre, aus Triacylglycerolen (TAG) bestehende Lipidtropfen, die die Zellorganelle an den Zellrand drängen [109]. Adipozyten des BAT speichern ihre TAG hingegen in vielen kleinen Lipidvakuolen [109]. Während Adipozyten des BAT viele und große Mitochondrien enthalten, die dem BAT seine braune Farbe verleihen, verfügen Adipozyten des WAT über deutlich weniger Mitochondrien [109].

Die Adipozyten des WAT tragen durch Speicherung und Freisetzung von Lipiden zur Energiehomöostase bei, wobei freie Fettsäuren aus der Zirkulation aufgenommen oder durch *de novo* Lipogenese hergestellt und in Form von TAG in den Adipozyten gespeichert werden, die bei der Lipolyse erneut abgebaut und zur β-Oxidation verwendet werden [15].

Im Gegensatz zum WAT, das als Energiespeicher dient, verbrauchen die Adipozyten des BAT Energie in Form von Wärme, indem sie die Fettsäureoxidation durch das Transmembranprotein Uncoupling Protein 1 (UCP1) von der ATP-Synthese entkoppeln [102]. Dieser Mechanismus der Thermogenese wird vor allem durch Kälteexposition, Aktivierung des sympathischen Nervensystems und durch Schilddrüsenhormone vermittelt [79]. Diese Stimuli führen jedoch nicht nur zu einer gesteigerten Aktivität bereits vorhandener Adipozyten des BAT, sondern induzieren auch die Bildung sogenannter beiger Adipozyten innerhalb weißer Fettdepots [112]. Zudem findet eine gesteigerten Interkonversion von WAT in beiges Fettgewebe bei krebsassoziierter Kachexie statt [68, 97]. Das von den Tumorzellen sezernierte Parathormon-related Protein sowie die mit Krebserkrankungen häufig einhergehende Steigerung inflammatorischer Faktoren wie Interleukin-6 (IL-6) fördern dabei die Bildung von beigem Fettgewebe [68, 97].

Beige Adipozyten exprimieren UCP1, weisen jedoch auch morphologische Ähnlichkeiten zu Adipozyten des WAT auf [52, 67, 90, 105]. Sie stellen eine heterogene Gruppe dar und kommen u.a. im inguinalen, axillären und subkutanen

WAT des Nagers und im zervikalen, axillären, paravertebralen Fettgewebe und weiteren Körperregionen des Menschen vor [66, 108].

Des Weiteren ist das Fettgewebe ein endokrines Organ, das durch Freisetzung sogenannter Adipokine vielfältige Funktionen besitzt. So führt Leptin im Hypothalamus zu einer Minderung des Appetits sowie einem erhöhten Energieverbrauch [22, 41]. Außerhalb des zentralen Nervensystems trägt Leptin u.a. durch Aktivierung von Neutrophilen, indirekte Steigerung der Zytokin-Produktion, eine Proliferation von naiven T-Zellen und eine erhöhte T-Helfer-Zell Reaktion zu einem proinflammatorischen Milieu bei [22].

Ein weiteres wichtiges Adipokin stellt Adiponektin dar, dessen Sekretion hochspezifisch für Adipozyten ist. Adiponektin unterstützt unter anderem die Insulinsensitivität in der Leber, fördert die Glukoseaufnahme, Fettspeicherung und Adipogenese in Adipozyten und wirkt kardioprotektiv [22, 131]. Gleichzeitig senkt Adiponektin die inflammatorischen Abläufe in verschiedenen Organismen [131]. Während in epidemiologischen Studien ein Mangel an Adiponektin mit einer gesteigerten Tumorgenese einherging, führten hohe Adiponektinlevel zu einer Steigerung der Angiogenese und somit zu einem Wachstum von Tumoren [22].

1.2.2 Die Adipozyten des Knochenmarks

Zu Beginn des Lebens ist die Knochenmarkhöhle des Menschen nahezu frei von Adipozyten, jedoch voll besetzt mit Zellen der Hämatopoese, weshalb das Knochenmark des Neugeborenen und Kleinkindes als rotes Knochenmark bezeichnet wird [6]. Die Adipogenese im Knochenmark setzt kurz vor der Geburt ein und wird postnatal enorm gesteigert [75]. Dabei wird das rote Knochenmark stetig durch Adipozyten infiltriert und ersetzt, wodurch das gelbe Knochenmark entsteht [75]. Die Umwandlung vollzieht sich zunächst in den Endgliedern der Hände und Füße, woran sich die Vermehrung der Adipozyten in der Diaphyse langer Röhrenknochen und die Ausbreitung nach distal und proximal anschließt [75]. Das Knochenmark von Wirbelsäule und Becken wird erst einige Jahre später, im frühen Erwachsenenalter, umgewandelt [75]. Dies hat zur Folge, dass bis zum 25. Lebensjahr mehr als die Hälfte der Knochenmarkhöhle mit Adipozyten gefüllt ist und sich die Hämatopoese weitestgehend auf das axiale Skelett und die proximalen Anteile der Extremitäten beschränkt [14].

Definiert wurden zwei unterschiedliche Formen des Knochenmarkfettgewebes, die sich in Entwicklung, Morphologie, Genexpression, Lipidinhalt, Lokalisation und Regulation voneinander unterscheiden [13, 113, 126]. Während das konstitutive Knochenmarkfettgewebe (constitutive marrow adipose tissue; cMAT) nur wenigen Veränderungen unterworfen ist, ist das regulierte Knochenmarkfettgewebe (regulated marrow adipose tissue; rMAT) hoch modulierbar.

Die oben beschriebene fettige Umwandlung in gelbes Knochenmark in den frühen Lebensjahren erfolgt durch die enorme Expansion des cMAT [113]. Zeitlich entwickelt sich dieses somit vor dem rMAT. Die Adipozyten des cMAT sind signifikant größer als die des rMAT und enthalten einen erhöhten Anteil an ungesättigten Lipiden [113]. In ihrer Morphologie sind die Adipozyten des cMAT nicht von denen des WAT zu unterscheiden [113].

Die sich daran anschließende langsame, aber lebenslange Akkumulation von Knochenmarkfettgewebe an Stellen des roten Knochenmarks wird von der stetigen Zunahme des rMAT getragen [75]. Die Adipozyten des rMAT sind dabei als einzelne Zellen zwischen den hämatopoetischen Bestandteilen der Knochenmarkhöhle verstreut [75]. Sie enthalten einen gesteigerten Anteil an gesättigten Lipiden, wodurch ein zum WAT ähnliches Lipidprofil entsteht [113].

Das MAT hat parakrine und endokrine Eigenschaften, wodurch es sowohl eine lokale Wirkung auf benachbarte Zellen als auch einen systemischen Einfluss haben kann [73]. Im Knochenmark erhöht Adiponektin aus Adipozyten des MAT die Proliferation von hämatopoetischen Stammzellen (hematopoietic stem cell; HSC) und unterstützt so den Erhalt der Unreife der HSC [31]. Des Weiteren fördert Adiponektin hier den Erhalt und die Proliferation von Osteoblasten und inhibiert die Bildung von Osteoklasten, was zur Knochenstabilität beiträgt [73].

Das Proteohormon Leptin wird ebenfalls von Adipozyten des MAT gebildet [73]. In der Knochenmarkhöhle bindet dieses an Leptinrezeptor-positive ($LEPR^+$) mesenchymale Stammzellen (mesenchymal stem cell; MSC), was zu einer vermehrten Bildung von Adipozyten und einer verminderten Bildung von Osteoblasten führt [104].

Vergleicht man Adipozyten des MAT mit denen des subkutanen WAT, so werden 13,7 % aller Gene unterschiedlich exprimiert [76]. Dabei konnte gezeigt werden,

dass adipozytenspezifische Gene wie Proliferator-aktivierter-Rezeptor-Gamma (*PPARG)*, Fatty Acid Binding Protein 4 (*FABP4*) und Adipsin, sowie eine Vielzahl von Genen, die am Lipidmetabolismus beteiligt sind, im WAT relativ zum MAT höher exprimiert werden [76, 81]. Inflammations-assoziierte Gene wie *IL-6,* Tumor Nekrose Faktor alpha (*TNFα*), CXC-Motiv-Chemokin 12 (*CXCL12*) und *IL-1β* werden dabei in den Adipozyten des MAT im Vergleich zum WAT vermehrt exprimiert [76, 81].

1.3 Die Knochenmarknische

Das Knochenmark beherbergt neben Hämatozyten, Adipozyten, Osteoblasten und deren Vorläuferzellen zudem mesenchymale und hämatopoetische Stammzellen [81, 82]. Es ist der Ort der Hämatopoese und der Entstehung von Leukämien (Abbildung 1). Die Knochenmarknische kann in unterschiedliche Zonen unterteilt werden. Ortsabhängig (endostal versus perivaskulär) können HSCs durch CXCL12 entweder immobilisiert und in Quieszenz versetzt oder aktiviert werden (Abbildung 1) [32, 50].

Aktive HSCs entwickeln sich im Knochenmark in der Myelopoese über die myeloiden Progenitorzellen (myeloid progenitor cell; MPC) in Neutrophile, Basophile, Eosinophile, Monozyten, Erythrozyten und Thrombozyten. Bei der Lymphopoese entwickeln sich aus der lymphoiden Progenitorzelle (lymphoid progenitor cell; LPC) B- und T-Zellen sowie natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Störungen der Differenzierung können zur Entstehung der Leukämie-initiierenden Zelle (leukemia initiating cell; LIC) und im weiteren Verlauf zur Ausbildung leukämischer Blasten führen, was als Leukämogenese bezeichnet wird (Abbildung 1). Aus den multipotenten MSCs entstehen durch unterschiedliche Differenzierungsprozesse u.a. Adipozyten, Osteo-/Fibroblasten sowie Chondro- und Myozyten [26, 129].

Der Einfluss der Knochenmarkadipozyten auf die HSCs und die damit verbundene Hämatopoesekapazität sowie Leukämogenese wird kontrovers diskutiert, scheint jedoch von der Lokalisation der Adipozyten im Körper sowie äußeren Einflussfaktoren abzuhängen [139]. Im fettreichen Schwanzbereich von Mäusen haben Knochenmarkadipozyten einen negativen Einfluss auf die Hämatopoese [1, 5, 88]. Im Gegensatz dazu verbessert die Akkumulation von

Knochenmarkadipozyten in langen Röhrenknochen nach einer Bestrahlung indirekt die hämatopoetische Regeneration [139]. Steigendes Alter, Diabetes mellitus, Bestrahlung, Chemotherapie, Adipositas aber auch Anorexie und tumorbedingte Kachexie führen zu einer Akkumulation von Adipozyten sowie zur Änderung der Genexpression von Knochenmarkfettgewebe, sodass dieses dem weißen Fettgewebe ähnelt (Abbildung 1) [2, 17, 18, 24, 61, 87, 113, 132]. Durch die vermehrte Ausschüttung von Adipokinen sowie durch eine Inflammationsreaktion wird die Hämatopoese gestört [2]. Zudem sind HSCs vom sogenannten Stammzellfaktor (stem cell factor; SCF) abhängig, der von Endothelzellen, aber

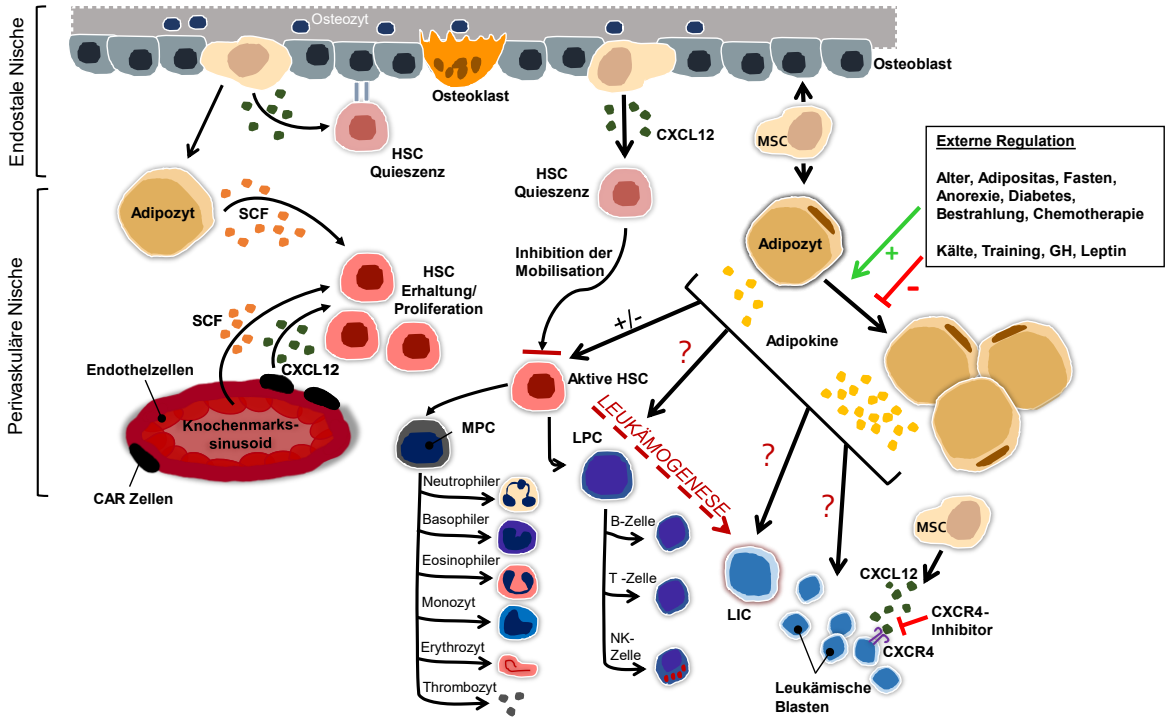


Abbildung 1: Die Knochenmarknische. Exemplarische Darstellung der Knochenmarknische mit den wichtigsten Zellen der Hämatopoese und Leukämogenese sowie Adipozyten, Osteoblasten/-klasten und deren Vorläuferzellen. Durch die Sekretion von CXC-Motiv-Chemokin 12 (CXCL12) aus mesenchymalen Stammzellen (MSC) und Osteoblasten werden die hämatopoetischen Stammzellen (HSC) durch Inhibition der Mobilisation in der hypoxischen endostalen Nische des Knochenmarks zurückgehalten und in Quieszenz versetzt. In der perivaskulären Nische werden durch die Sekretion von CXCL12 und Stammzellfaktor (SCF) aus Endothel- und CAR- Zellen (CXCL12 abundant reticular cells) die HSCs aktiviert und in ihrer Proliferation gefördert. Aktive HSCs entwickeln sich im Knochenmark zudem in der Myelopoese über die myeloiden Progenitorzellen (MPC) in Neutrophile, Basophile, Eosinophile, Monozyten, Erythrozyten und Thrombozyten. Bei der Lymphopoese entwickelt sich aus der lymphoiden Progenitorzelle (LPC) B- und T-Zellen sowie natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Störungen in diesen Differenzierungsprozessen können zur Entstehung der Leukämie-initiierenden Zelle (LIC) und im weiteren Verlauf zur Ausbildung leukämischer Blasten führen (Leukämogenese). Neben hämatopoetischen Zellen tragen Leukämiezellen den CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4 (CXCR4) auf ihrer Oberfläche. Durch die Hemmung der CXCL12/CXCR4-Interaktion kann das Überleben der Leukämiezellen indirekt reduziert werden. MSCs bilden die Vorläuferzellen von Osteoblasten und Adipozyten. Durch externe Einflüsse wie hohes Alter, Diabetes mellitus, Bestrahlung, Chemotherapie, Adipositas, aber auch Anorexie findet eine Akkumulation der Adipozyten statt, was mit einer gesteigerten Ausschüttung von Adipokinen und einem inflammatorischen Status einhergeht. Externe Einflüsse wie Kälte, körperliches Training, Wachstumshormon (Growth Hormon; GH) und Leptingabe wirken diesem Effekt entgegen. Die Hämatopoese wird körperregions-abhängig durch Adipozyten negativ bzw. positiv reguliert. Der Einfluss der Adipozyten auf die Lymphopoese und Leukämogenese ist weitestgehend unverstanden.

auch von Adipozyten sezerniert wird. Dabei ist SCF aus Adipozyten für die Hämatopoese v.a. unter Stressbedingungen bedeutend [138, 139].

Primäre Leukämiezellen gehen bei einer *ex vivo* Kultivierung schnell in spontane Apoptose. Daher scheint ihr Überleben von unterstützenden Faktoren aus ihrer *in vivo* Umgebung abzuhängen [11, 35, 114]. Dies legt nahe, dass das Überleben und die Proliferation der Leukämiezellen maßgeblich von der Interaktion mit den Zellen der Knochenmarknische beeinflusst wird [111]. Das Knochenmarkfettgewebe bildet einen Hauptteil der Knochenmarknische, jedoch wurde die Wissenschaft erst kürzlich auf dessen Einfluss auf die Hämatopoese und Leukämieentstehung aufmerksam. Dabei zeigen aktuelle Studien, dass das MAT sowohl negative als auch positive Einflüsse auf die Leukämiezellentstehung und -proliferation sowie Chemoresistenz hat (siehe Kapitel 1.4.3.) [20, 78, 98, 114, 116].

Die Hypothese dieser Arbeit lautet, dass durch die Inhibition der Interaktion von Leukämiezellen und Knochenmarkadipozyten das Überleben der Leukämiezellen im Knochenmark reduziert werden kann. Durch die Entwicklung von Inhibitoren, die diese Interaktion stören, könnten somit neue Therapiemodelle zur Reduktion der Morbidität und Mortalität bei Leukämieerkrankungen entstehen. Ein geeignetes Beispiel hierfür ist die Hemmung der CXCL12/CXCR4-Interaktion (Abbildung 1). Der Botenstoff CXCL12 wird von Knochenmark-Stromazellen sezerniert und lockt Zellen mit CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4 (CXCR4) in das Knochenmark, in dem reichlich Wachstumsfaktoren vorhanden sind (Abbildung 1) [70, 137]. Neben hämatopoetischen Zellen tragen Leukämiezellen ebenfalls diesen Rezeptor auf ihrer Oberfläche. Durch die Blockade von CXCR4 wandern Leukämiezellen aus dem Knochenmark in die Peripherie ab. Zudem findet eine Induktion der Differenzierung der Leukämiezellen statt. Durch die Inhibition der CXCL12/CXCR4-Signalkaskade werden überlebensfördernde Stimuli vermindert [19, 136]. Zusammengenommen bewirken diese Prozesse ein schlechteres Überleben der Leukämiezellen. Verschiedene CXCR4-Inhibitoren werden bereits in klinischen Studien angewendet und zeigen erste positive Ergebnisse [19, 27, 137].

1.4 Die Interaktion von Leukämiezellen und Adipozyten

Der exakte Einfluss der Adipozyten des Knochenmarks auf die ALL ist aktuell unzureichend verstanden. Dabei konnten sowohl negative als auch positive Einflüsse der Adipozyten auf Leukämiezellen festgestellt werden, die nachfolgend erläutert werden.

1.4.1 Modellsysteme

Für die Analyse der Interaktion von Adipozyten und Leukämiezellen wurden in der Literatur bisher unterschiedliche Modellsysteme verwendet, die auf Grund ihrer Herkunft in WAT- und MAT-Modellsysteme unterteilt werden können.

Zur Untersuchung der Einflussnahme des WAT auf verschiedene Leukämiezellen kamen als (Prä-)Adipozyten-Modellsysteme des subkutanen Fettgewebes die murine Zelllinie 3T3-L1, sowie die humane Zelllinie Chub-S7 in verschiedenen Studien zum Einsatz [11, 35, 98, 116, 117, 130]. Diese exprimieren typische WAT-spezifische Gene [85]. Außerdem kamen murine gonadale und viszerale Fettgewebedepots zur Anwendung [11, 98, 130].

In dieser Arbeit wurde der humane Simpson-Golabi-Behmel Syndrom (SGBS) Zellstamm verwendet, der ursprünglich aus dem subkutanen Fettgewebe eines Säuglings mit SGBS entstammt [128]. Obwohl dieser Zellstamm weder transformiert noch immortalisiert wurde, bleibt die Proliferationskapazität sowie die Fähigkeit zur Differenzierung bis zur 50. Passage *ex vivo* erhalten [128]. SGBS-Adipozyten weisen dabei ein zu Adipozyten des subkutanen Fettgewebes vergleichbares Genexpressionsmuster auf [39]. Je nach Differenzierungsgrad können SGBS-Zellen Adipokine wie Adiponektin und Leptin oder Interleukine sezernieren [39].

Zur Untersuchung der Interaktion von Leukämiezellen mit Adipozyten des Knochenmarks kamen in der entsprechenden Literatur primäre humane und murine MSCs aus dem Knochenmark zur Anwendung. Zudem wurden die murine Stromazelllinie MS-5 und die murine mesenchymale Stammzelllinie OP9, die jeweils in Adipozyten differenziert werden können, in der Literatur und in dieser Arbeit verwendet [11, 16, 35, 98, 114].

1.4.2 Einfluss des WAT auf unterschiedliche Leukämiezellen

Bei der Untersuchung des Einflusses von Adipozyten des WAT auf Leukämiezellen konnte gezeigt werden, dass Leukämiezellen vermehrt in gonadale und viszerale Fettgewebedepots der Maus einwandern sowie CXCL12-abhängig zu Fettgewebs-Explantaten oder zu konditioniertem Medium von Adipozyten migrieren [11, 98, 130]. Dabei boten die Adipozyten den murinen und humanen Leukämiezellen Schutz vor dem Chemotherapeutikum Vincristin, was durch gesteigerte Expression überlebensfördernder, sowie Suppression pro-apoptotischer Gene vermittelt wurde [11]. Ein anderer protektiver Mechanismus stellt die Verstoffwechselung von Daunorubicin in weniger aktive Metabolite durch Adipozyten in einer Ko-Kultur mit ALL-Zellen dar [116, 117].

Zudem wurde die gegenseitige Einflussnahme von (Prä-)Adipozyten und CML- sowie AML-Zellen untersucht. Dabei verursachten Leukämiestammzellen (leukemic stem cell; LSC) im gonadalen Fettgewebe von Mäusen eine Steigerung der Lipolyse mit vermehrter Freisetzung von freien Fettsäuren, um diese als Energiequelle zu nutzen [130]. Die LSCs zeigten außerdem ein proinflammatorisches Profil, das wiederum die Lipolyse beeinflusste, sowie eine gesteigerte Chemotherapieresistenz [130].

1.4.3 Einfluss des MAT auf unterschiedliche Leukämiezellen

Es konnte gezeigt werden, dass murine OP9- und MS-5-Präadipozyten das Überleben und die Proliferation von BCP-/T-ALL-Zellen in der Ko-Kultur verbesserten, was auf reife Adipozyten jedoch nicht zutraf [20, 59]. Korrespondierend zu den Adipozyten des WAT schützten jedoch nur MS-5-Adipozyten, nicht aber MS-5-Präadipozyten die ALL-Zellen vor Vincristin [20]. Ebenfalls konnte eine Resistenz von unterschiedlichen ALL-Zelllinien gegenüber L-Asparaginase in der Ko-Kultur oder im Transwell-Assay mit OP9- bzw. MS-5-Adipozyten festgestellt werden [35].

Wie zuvor für das WAT beschrieben, konnte eine CXCL12-induzierte Migration von Prä-B-ALL Zellen hin zu OP9-Adipozyten, -Präadipozyten oder zu konditioniertem Medium von Adipozyten festgestellt werden [98]. Förderte man die Differenzierung von Adipozyten aus MSCs durch den Knockdown des Connective Tissue Growth

Factors (CTGF), unterstützten diese das Engraftment der Leukämiezellen nach deren Migration [9].

Betrachtet man den Einfluss des MAT auf die AML, so verbessern Knochenmarkadipozyten das Überleben und Wachstum von AML-Blasten in der Ko-Kultur [114]. Unter Einfluss der AML-Zellen sezernierten Adipozyten vermehrt Fettsäuren, die von AML-Zellen zur Proliferation genutzt wurden [114]. Jedoch konnte nicht nur ein unterstützender Effekt der Adipozyten auf AML-Zellen nachgewiesen werden: eine Zunahme der Adipogenese im roten Knochenmark durch PPARγ-Agonisten führte zur gesteigerten Differenzierung von hämatopoetischen Progenitorzellen und gleichzeitig zur Verminderung des Wachstums der Leukämiezellen [16].

Zusammenfassend konnten unterschiedliche Studien zeigen, dass eine Migration von ALL-Zellen hin zu humanen und murinen Adipozyten des MAT und WAT unter dem Einfluss von CXCL12 stattfand [11, 98, 130]. Zudem konnten Adipozyten in der Ko-Kultur mit ALL-Zellen diese vor Chemotherapeutika wie Vincristin, Daunorubicin und L-Asparaginase schützen [11, 20, 35, 116, 117]. Des Weiteren greifen Leukämiezellen in den Metabolismus von Adipozyten ein, indem deren Lipolyse induziert wird [114]. Die dabei freigesetzten Fettsäuren wurden von den Leukämiezellen zur Proliferation genutzt [114].

1.5 Ziel der Arbeit

Die Zunahme der Prävalenz von Übergewicht und Adipositas bei Kindern und Erwachsenen führt zur Steigerung multipler Komorbiditäten sowie Krebs [4, 21, 48, 101, 110]. Zudem bringt die durch Adipositas verursachte Erhöhung der Adipozytenanzahl im Knochenmark Veränderungen in der Knochenmarknische mit sich, die zu einer gesteigerten Inflammation, Beeinträchtigung der Hämatopoese sowie Leukämiezellentwicklung beitragen können [2, 5, 35, 88, 114]. Ein frühes ALL-Rezidiv im Knochenmark ist oft durch Resistenzen gegenüber etablierten Chemotherapeutika gekennzeichnet und steigert das Risiko an der ALL zu versterben drastisch, weshalb für die betroffenen Kinder und Jugendlichen neue Therapiemöglichkeiten benötigt werden [92]. Ein Forschungsschwerpunkt liegt dabei verstärkt auf der Knochenmarknische, dem Ort der Entstehung der ALL. Ein Ansatz zur Etablierung neuartiger Therapiekonzepte ist die Einflussnahme auf die

Interaktionen zwischen Leukämiezellen mit Zellen in ihrer Mikroumgebung im Knochenmark [134].

Die zuvor beschriebenen unterschiedlichen Ergebnisse des Effekts von Adipozyten auf Leukämiezellen könnten von der Tatsache rühren, dass Erkenntnisse zur Interaktion von Adipozyten und Leukämiezellen durch verschiedenste Modellsysteme gewonnen werden. Diese unterscheiden sich in der Verwendung von humanen oder murinen Knochenmarkadipozyten sowie subkutanen oder gonadalen Adipozyten und Leukämiezellen verschiedenster Art und wurden *in vivo*, *ex vivo* oder *in vitro* durchgeführt, wodurch eine Vergleichbarkeit der Daten nur eingeschränkt möglich ist.

Das Ziel dieser Arbeit ist daher die Beantwortung folgender Fragen:

1. Ist es möglich, ein standardisiertes Ko-Kultur-Modellsystem zu entwickeln, in dem sich die Interaktion von Adipozyten und Leukämiezellen untersuchen lässt?

2. Führt die Interaktion von BCP-ALL-Zellen und Adipozyten *in vitro* zu einem verbesserten Überleben und einer Proliferation von BCP-ALL-Zellen?

3. Wie findet die Interaktion von BCP-ALL-Zellen und Adipozyten statt?

4. Bewirkt diese Interaktion eine Veränderung der Eigenschaften von Adipozyten und BCP-ALL-Zellen?

5. Unterscheiden sich die Adipozyten des weißen Fettgewebes von denen des Knochenmarks bezüglich der Interaktion und Einflussnahme auf das Überleben und die Proliferation der BCP-ALL-Zellen?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Biologisches Material

Tabelle 1: Adipozytenspezifische Zelllinien. ATCC: American Type Culture Collection; DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen; op/op: colony-stimulating factor 1 less osteopetrotic Mausstamm; SGBS: Simpson-Golabi-Behmel Syndrom.

Zellart	Herkunft	Primäre Referenz	Anbieter
MS-5	Etabliert durch die Bestrahlung kultivierter adhärenter Knochenmarkzellen aus langen murinen Röhrenknochen	[57]	DSMZ Nr.: ACC 441
OP9	Etablierung aus der Schädelkalotte einer op/op Maus	[86]	ATCC: CRL-2749
SGBS	Zellen entstammen aus dem Fettgewebe eines an SGBS erkrankten Kindes	[128]	Prof. Dr. M. Wabitsch Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Ulm

Tabelle 2: B-Vorläufer-ALL-Zelllinien. Übersicht über die Charakteristika aller verwendeten B-Vorläufer-ALL-Zelllinien modifiziert nach [34]. Die Unterpunkte der Spalte Herkunft stehen für: (1) Alter und Geschlecht; (2) Art der Leukämie; (3) Behandlungsstatus; (4) Ort der Probenentnahme.

B-Vorläufer-ALL-Zelllinien	Herkunft	Primäre Referenz	Anbieter
EU3 (auch: 697)	(1) 12-jähriger Junge (2) Non-T-Non-B-ALL (3) Rezidiv (4) Knochenmark	[38]	DSMZ Nr.: ACC 42
Kasumi-2	(1) 15-jähriger Junge (2) BCP-ALL (3) Erstdiagnose (4) Knochenmark	Nicht publiziert	DSMZ Nr.: ACC 526
KOPN-8	(1) 3-monatiges Mädchen (2) BCP-ALL (3) Keine Angaben (4) Peripheres Blut	[80]	DSMZ Nr.: ACC 552
NALM-6	(1) 19-jähriger Junge (2) Non-T-Non-B-ALL (3) Rezidiv (4) Peripheres Blut	[55]	DSMZ Nr.: ACC 128

RCH-ACV	(1) 8-jähriges Mädchen (2) cALL (3) Rezidiv (4) Knochenmark	[58]	DSMZ Nr.: ACC 548
REH	(1) 15-jähriges Mädchen (2) ALL (3) 1. Rezidiv (4) Peripheres Blut	[106]	DSMZ Nr.: ACC 22
RS4;11	(1) 32-jährige Frau (2) ALL (3) 1. Rezidiv (4) Knochenmark	[122]	DSMZ Nr.: ACC 508
SMS-SB	(1) 16-jähriges Mädchen (2) BCP-ALL (3) - (4) Peripheres Blut	[119]	Forschungslabor Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Ulm
UoC-B6	(1) 7-jähriges Mädchen (2) BCP-ALL (3) 4. Rezidiv (4) Knochenmark	[135]	Forschungslabor Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Ulm

Tabelle 3: **Xenograft-Proben.** Die verschiedenen Xenograft-Proben wurden von Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin und Prof. Dr. Lüder-Hinrich Meyer (Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Ulm) zur Verfügung gestellt. Die Unterpunkte der Spalte „Herkunft“ stehen für: (1) Geschlecht und Altersgruppe; (2) Art der Leukämie; (3) Behandlungsstatus.

Xenograft-Proben	Herkunft
X002	(1) Junge >9 Jahre (2) cALL (3) Rezidiv
X006	(1) Junge 1-9 Jahre (2) Prä B-ALL (3) Rezidiv
X015	(1) Mädchen 1-9 Jahre (2) cALL (3) Remission
X018	(1) Junge >9 Jahre (2) Prä B-ALL (3) Verstorben
X024	(1) Mädchen >9 Jahre (2) cALL (3) Remission
X036	(1) Mädchen 1-9 Jahre (2) cALL (3) Remission
X120	(1) Mädchen 1-9 Jahre (2) Prä B-ALL (3) Remission
X121	(1) Junge 1-9 Jahre (2) cALL (3) Rezidiv
X132	(1) Mädchen 1-9 Jahre (2) Prä B-ALL (3) Rezidiv
X133	(1) Mädchen <1 Jahr (2) Pro B-ALL (3) Remission
X135	(1) Mädchen 1-9 Jahre (2) Prä B-ALL (3) Remission
X139	(1) Junge >9 Jahre (2) cALL (3) Remission

X055	(1) Junge 1-9 Jahre (2) cALL (3) Rezidiv	X142	(1) Junge < 1 Jahr (2) Pro B-ALL (3) Remission
X068	(1) Junge 1-9 Jahre (2) cALL (3) Remission	X170	(1) Mädchen 1-9 Jahre (2) cALL (3) Remission
X076	(1) Mädchen > 9 Jahre (2) cALL (3) Remission	X187	(1) Junge 1-9 Jahre (2) cALL (3) Remission
X089	(1) Junge > 9 Jahre (2) cALL (3) Rezidiv	X229	(1) Junge <1 Jahr (2) Pro B-ALL (3) Remission
X112	(1) Mädchen 1-9 Jahre (2) cALL (3) Remission	X245	(1) Mädchen 1-9 Jahre (2) cALL (3) Remission
X116	(1) Mädchen >9 Jahre (2) Prä B-ALL (3) Remission		

2.1.2 Substanzen, Reagenzien und Kits

Tabelle 4: Substanzen, Reagenzien und Kits

Name	Anbieter
AIMV	Thermo Fisher Scientific
Ampuwa Spüllösung	Fresenius Kabi
Biotin	Sigma-Aldrich
Bolt 4-12 % Bis-Tris Plus Gel, 15 Well	Thermo Fisher Scientific
Bolt LDS Probenpuffer, 4x	Thermo Fisher Scientific
Bolt MES SDS Elektrophoresepuffer, 20x	Thermo Fisher Scientific
Bolt Sample Reduktionsmittel, 10x	Thermo Fisher Scientific
Bradford Protein Assay Konzentrat, 5x	Bio-Rad
BSA	Sigma-Aldrich
CellTrace Violet Zell-Proliferations-Kit	Invitrogen
cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	Roche
Cortisol	Sigma-Aldrich
DEPC-H_2O (Nuklease-freies Wasser)	Qiagen
Dexamethason	Sigma-Aldrich
Direct-zol RNA Miniprep Kit	Zymo Research
Direct-zol RNA PreWash/Wash	Zymo Research
DMEM/F12 (1:1)	Thermo Fisher Scientific
DMEM	Thermo Fisher Scientific

DMSO	Honeywell
DNase/RNase freies Wasser	Zymo Research
dNTP Mix 20 mM	Amersham
DPBS	Thermo Fisher Scientific
DTT Lösung, 100 mM	Thermo Fisher Scientific
ECL Western Blotting Substrat	Thermo Fisher Scientific
EDTA	Carl Roth
Ethanol	Honeywell
FCS	Thermo Fisher Scientific
Formalinlösung	AppliChem
Glycerol	Carl Roth
Human Genome U133 Array	Thermo Fisher Scientific
iBlot2 Transfer Stapel, Nitrocellulose, Mini	Thermo Fisher Scientific
Insulin	Thermo Fisher Scientific
3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX)	Sigma-Aldrich
Isopropanol	VWR
L-Glutamin 200 mM (100X)	Thermo Fisher Scientific
MEM α, nucleosides (1X)	Thermo Fisher Scientific
Milchpulver (Skim Milk Powder)	Sigma-Aldrich
NuPAGE LDS Probenpuffer, 4x	Thermo Fisher Scientific
NuPAGE MES SDS Elekrophoresepuffer, 20x	Thermo Fisher Scientific
NuPAGE Novex 4-12 % Bis-Tris Gel, 15 Well	Thermo Fisher Scientific
NuPAGE Proben-Reduktionsmittel, 10x	Thermo Fisher Scientific
Oil Red O	Sigma-Aldrich
Pantothenat	Sigma-Aldrich
Penicillin-Streptomycin Lösung 100x	Thermo Fisher Scientific
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich
Random Primer	Invitrogen
RNA Waschpuffer	Zymo Research
Rosiglitazon	Cayman
RPMI 1640 Medium (1X)	Thermo Fisher Scientific
Sso Advanced Universalproben Supermix	BioRad
SuperScript II RT	Invitrogen
SYBR Green	BioRad
Transferrin	Sigma-Aldrich
Triiodothyronin (T3)	Sigma-Aldrich
Tris HCl	Sigma-Aldrich
TRI Reagent	Zymo Research
Triton X-100	Serva

Trypsin/EDTA	Biochrome
Tween 20	AppliChem
1st Strand Puffer (5x)	Zymo Research
3’ IVT Express Kit	Thermo Fisher Scientific

2.1.3 Puffer, Lösungen, Enzyme und Kits

Tabelle 5: Puffer, Lösungen, Enzyme und Kits

Name	Zusammensetzung	Endkonzentration
CellTrace Violet Zell-Proliferations-Kit	CellTrace™ Violet	1 µM
	DMSO (500 µL)	
Oil Red O Vorratslösung	Oil Red O Lösung in Isopropanol	0,35 %
Propidiumiodid-Färbelösung	DPBS	
	Propidiumiodid	1 µg/ml
Lysepuffer-Stammlösung	EDTA	2 mM
	Glycerol	10 % vol
	NaCl	150 mM
	Tris HCl	10 mM
	Triton X-100	1 % vol
Protein-Lysepuffer	Zu Lysepuffer Stammlösung hinzugeben:	
	DTT	1 mM
	cOmplete Protease Inhibitor Lösung (25x)	1x
Blockierungs-Puffer	Milchpulver	5 % in Waschpuffer
Waschpuffer (TBST)	TBS	1x
	Tween 20	0,1 % vol

2.1.4 Primer und Antikörper

Tabelle 6: Primer

Die Primer wurden von der biomers.net GmbH Ulm hergestellt.

Zielgen Mensch	Sequenz	
	Vorwärtsprimer (5‘ - 3‘)	Rückwärtsprimer (5‘ - 3‘)
Adiponektin	GGCCGTGATGGCAGAGAT	CCTTCAGCCCCGGGTACT
ATGL	GACGAGCTCATCCAGGCCAATGTCTG	GATGGTGTTCTTAAGCTCATAGAGTGGCAGG
FABP4	GCTTTTGTAGGTACCTGGAAACTT	ACACTGATGATCATGTTAGGTTTGG
GLUT4	TTCCAACAGATAGGCTCCGAAG	AAGCACCGCAGAGAACACAG
Interleukin-6	TACCCCCAGGAGAAGATTCC	TTTTCTGCCAGTGCCTCTTT
Interleukin-7	CAACACAGACTCGGCAACTC	GGCAACAGAACAAGGATCAGG
Interleukin-8	TGCCAAGGAGTGCTAAAGAACTTAGATGTCAG	AGCTTTACAATAATTTCTGTGTTGGCGCAGTG
Leptin	GTTGCAAGGCCCAAGAAGCCCA	CAGTGTCTGGTCCATCTTGGATAAGGTCAGG

MCP1	TCCCAAAGAAGCTGTGATCTTCAAGACC	AGTGAGTGTTCAAGTCTTCGGAGTTTGG
PPARG	GATCCAGTGGTTGCAGATTACAA	GAGGGAGTTGGAAGGCTCTTC
TF2B	TGGGATCTGAATGGCGAACTTTCAGCAATGAC	TCCTGTGCCCTTGCCAATCATGGTAGAC
Zielgen Maus		
Adiponektin	GTTCCTCTTAATCCTGCCCAGTCATGCC	GGACCAAGAAGACCTGCATCTCCTTTCTC
Glut4	TGAGCTGAAGGATGAGAAACGGAAGTTGGA	CTAAGAGCACCGAGACCAACGTGAAGACC
Hprt	GCTGGTGAAAAGGACCTC	CACAGGACTAGAACACCT
Interleukin-6	GATGGATGCTACCAAACTGGA	TCTGAAGGACTCTGGCTTTG
Mcp-1	AGGTCCCTGTCATGCTTCTG	GGGATCATCTTGCTGGTGAA
Pparg	GACCACTCGCATTCCTTTGACATCAAGCC	TGATCGCACTTTGGTATTCTTGGAGCTTCAG

Tabelle 7: Antikörper

Antigen	Zielspezies	Herkunft	Typ	Verdünnung	Anbieter
Adiponektin	Mensch, Maus	Hase	P, PK	1:1000	GeneTex
ß-Aktin	Mensch	Maus	P, MK	1:5000	Sigma-Aldrich
IgG	Hase	Ziege	S, PK	1:5000	Southern Biotech
IgG	Maus	Ziege	S, PK	1:5000	Santa Cruz Biotechnology
ERK	Mensch, Maus	Hase	P, PK	1:10000	Sigma-Aldrich
PPARγ	Mensch, Maus	Hase	P, MK	1:1000	Cell Signaling Technology

2.1.5 Geräte, Materialien und Software

Tabelle 8: Geräte und Materialien

Name	Anbieter
Attune NxT Flow Zytometer	Thermo Fisher Scientific
Bolt Mini Gel Tank Elektrophoresekammer	Thermo Fisher Scientific
BZ-9000 Fluoreszenzmikroskop	Keyence
CFX Connect™ Real-Time PCR Detektionssystem	Bio-Rad
DMi1 Lichtmikroskop	Leica
ELx800 Plattenleser	BioTek Instruments
FACS Röhrchen	Sarstedt
GE Healthcare Amersham Hyperfilm ECL	Thermo Fisher Scientific
Hard-Shell® 96-Well PCR Platten	Bio-Rad
iBlot2 dry Blottingsystem	Thermo Fisher Scientific
Multipipette	Eppendorf
NanoDrop 2000 Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific
Optimax Filmentwickler	Protec
PCR Deckfolie	Bio-Rad
Pipetten	Eppendorf
Pipettenspitzen (20 µl, 200 µl, 1250 µl)	Sarstedt
Reaktionsgefäße (0,5–2 ml)	Eppendorf

Röhre (5 ml, 50 ml)	Sarstedt
Serologische Pipetten (1, 2, 5, 10, 25 ml)	Sarstedt
Thermozykler, peqSTAR	Peqlab
Transwell-Einsatz 0,4 µm Porengröße	Corning
Deepwell Platte	Sarstedt
Vortex Schüttler Genie 2	Bender Hobein, Zürich
Zellkulturplatten (12-, 96-Well)	Corning
Zellkulturplatten (12-, 96-Well)	Sarstedt
Zellkulturflaschen (175 cm²)	Corning
Zellkulturflaschen (175 cm²)	Sarstedt
Zellkulturflaschen (75 cm²)	Sarstedt
Zellschaber	Sarstedt
Zymo-Spin IIC Säulen und Auffangbehälter	Zymo Research
2100 Bioanalyzer	Agilent

Tabelle 9: Software

Name	Version	Anbieter
Attune NxT Software	2.6	Thermo Fisher Scientific
Excel	16.0.10827.20118	Microsoft
FlowJo	10.0.7r2	FlowJo
GSEA Desktop	v3.0	Broad Institute, Massachusetts Institute of Technology and Regents, University of California
NanoDrop 2000/2000c	1.4.2	ThermoFisher Scientific
Prism	6.01	GraphPad
Word	16.0.10827.20118	Microsoft

2.1.6 Zellkulturbedingungen und -medien

Tabelle 10: Zellkulturmedien

Zell-/Kulturtyp	Name	Medium	Zusätze
SGBS	0F-Medium (Basalmedium)	DMEM/F12	17 µM Pantothenat 33 µM Biotin 100 U/ml Penicillin/Streptomyzin
	0F + FCS (Proliferationsmedium)	0F-Medium	10 % FCS
MS-5	Basalmedium	MEM-alpha	100 U/ml Penicillin/Streptomyzin
	Proliferationsmedium	Basalmedium	10 % FCS
OP9	Basalmedium	MEM-alpha	100 U/ml Penicillin/Streptomyzin
	Proliferationsmedium	Basalmedium	20 % FCS

SGBS, MS-5, OP9	Quick-Diff-Medium	0F-/Basalmedium	100 nM Cortisol 25 nM Dexamethason 20 nM humanes rekombinantes Insulin 250 µM Isobutylmethylxanthin 2 µM Rosiglitazon 10 µg/ml Transferrin 200 µM T3
	3FC-Medium	0F-/Basalmedium	100 nM Cortisol 20 nM humanes rekombinantes Insulin 10 µg/ml Transferrin 200 µM T3
Leukämiezelllinien	Standard-Kulturmedium	RPMI	20 % FCS 2 % L-Glutamin 100 U/ml Penicillin/Streptomyzin
Ko-Kultur/ Transwell-Assay	DMEM/F12-Grundmedium	DMEM/F12	100 U/ml Penicillin/Streptomyzin

2.2 Methoden

2.2.1 Allgemeine Zellkultur

Die Leukämiezellen wurden bei 1500 rpm für 5 Minuten, alle MS-5- und OP9-Zellen bei 1500 rpm sowie alle SGBS-Zellen bei 1100 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Alle Zellen wurden bei 37 °C, 100 % Wasserdampf-gesättigter Luft und einer CO_2-Sättigung von 5 % inkubiert. Die Kulturmedien wurden vor Nutzung auf eine Temperatur von 37 °C erwärmt. Die Zell-Waschschritte erfolgten mit Dulbecco's Phosphate-buffered Saline (DPBS).

2.2.1.1 Adipogene Differenzierung von MS-5-, OP9- und SGBS-Zellen

Für die durchgeführten Experimente wurden folgende Kulturgefäße und Zelldichten verwendet:

Tabelle 11: Kulturgefäße und Aussaatdichte

Zellart	Kulturgefäß	Zelldichte pro Well	Volumen pro Well in ml
MS-5	T175 Kulturflasche	5×10^5	24
	12-Well Platte	3×10^4	1
	96-Well Platte	3.5×10^3	0,1
OP9	T175 Kulturflasche	3×10^5	24
	12-Well Platte	$1,5 \times 10^5$	1
	96-Well Platte	$1,5 \times 10^4$	0,1

SGBS	T175 Kulturflasche	1,5 x 10^5	24
	12-Well Platte	2,5 x 10^4	1
	96-Well Platte	3,5 x 10^3	0,1

MS-5, OP9- und SGBS-Zellen wurden jeweils im zellartspezifischen Proliferationsmedium in T175 Zellkulturflaschen kultiviert. Bei konfluentem Zellwachstum wurden diese zunächst mit 24 ml DPBS gewaschen, für 5 Minuten in 1,5 ml Trypsin/EDTA bei 37 °C inkubiert und die Trypsinierung anschließend mit zellartspezifischem Proliferationsmedium abgestoppt. Nach Überführung der Zellen in ein 50 ml Gefäß fand eine zehn-minütige Zentrifugation statt. Die dabei entstandenen Überstände wurden abgesaugt und das Zellpellet in frischem Proliferationsmedium resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer wurden die Zellen mit dem Proliferationsmedium auf die gewünschte Zelldichte verdünnt und entsprechend Tabelle 11 in den jeweiligen Zellkulturplatten ausgesät, wobei dieser Zeitpunkt als Tag -3 definiert wurde.

Um die adipogene Differenzierung der MS-5- und SGBS-Zellen zu starten, wurden diese drei Tage nach Aussaat (Tag 0) nach einmaligem Waschen mit DPBS für vier Tage mit dem Quick-Diff-Medium (QD) versetzt, welches an Tag 4 durch das 3FC-Medium ersetzt wurde. An Tag 14 wurden die reifen MS-5- / SGBS-Adipozyten für weitere Experimente verwendet (siehe Abbildung 2).

Auch die adipogene Differenzierung der OP9-Zellen begann an Tag 0 mit einem Waschschritt und der darauffolgenden Kultivierung im QD-Medium. Dieses wurde jedoch schon an Tag 2 der Differenzierung durch das 3FC-Medium ersetzt, welches anschließend alle zwei Tage zur Hälfte (1:2 Verdünnung) mit frischem 3FC-Medium erneuert wurde. Die OP9-Zellen wurden ebenfalls an Tag 14 der Differenzierung für Experimente verwendet (siehe Abbildung 2).

2.2.1.2 Leukämiezellkultur

Die BCP-ALL-Zelllinien wurden in T75 Zellkulturflaschen in Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium (RPMI) + 20 % FCS + 2 % L-Glutamin kultiviert und zwei Mal wöchentlich mit frischem Medium 1:5 - 1:10 verdünnt. Vor der Verwendung in Experimenten wurden die Zellen in 50 ml Gefäße überführt und zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet als Waschschritt mit 20 ml DPBS resuspendiert. Es folgte die erneute Zentrifugation und das Absaugen des

Überstandes, woran sich dann die Resuspension der Zellen in 1 ml DPBS anschloss. Auf die sich anschließende Zellzahlbestimmung folgte die Aufnahme und Resuspension der Leukämiezellen entsprechend der vorgesehenen Zellzahl im gewünschten Kulturmedium.

2.2.1.3 Xenograft-Proben

Die Xenograft-Proben wurden von Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin und Prof. Dr. Lüder-Hinrich Meyer (Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Ulm) zur Verfügung gestellt. Das Patientenmaterial wurde nach schriftlicher Einwilligung der Patienten gewonnen (Ethikvoten 8/16 und 135/13 Universität Ulm). Leukämiezellen aus Patientenblut oder Knochenmark wurden durch einen Ficoll-Gradienten aufgereinigt und zur Amplifikation in 6 Wochen alte weibliche NOD/SCID Mäuse transplantiert [83]. Die Tiere wurden engmaschig auf typische Anzeichen der Leukämieentwicklung überprüft und bei Erkrankung tierschutzgerecht euthanasiert und die Organe (Milz, Knochenmark und ZNS) zur Leukämiezell-Gewinnung entnommen. Für die hier durchgeführten *ex vivo* Experimente mit primären Leukämiezellen wurden ausschließlich Leukämiezellen aus der Milz verwendet. In Tabelle 3 sind alle verwendeten Xenograft-Proben aufgelistet. Alle Tierexperimente zur Amplifikation der in dieser Arbeit verwendeten Patientenproben wurden durch das Regierungspräsidium Tübingen genehmigt.

2.2.2 Ko-Kultur

Für die Ko-Kultur wurden MS-5-, OP9- oder SGBS-Zellen gemäß Tabelle 11 ausgesät und nach dem jeweiligen Differenzierungsprotokoll in Kapitel 2.2.1.1 in reife Adipozyten differenziert. Zudem wurden drei Tage vor Beginn der Ko-Kultur (Tag -3) MS-5-, OP9-, oder SGBS-Zellen mit dem in Kapitel 2.2.1.1 beschriebenen Verfahren im jeweiligen Proliferationsmedium ausgesät und an Tag 0 als Tag 0 Präadipozyten in der Ko-Kultur verwendet (Abbildung 2). Die Ko-Kultur wurde in 12- und 96-Well-Zellkulturplatten durchgeführt.

An Tag 14 der adipogenen Differenzierung und an Tag 0 der Präadipozytenkultur wurde das verbrauchte Medium vorsichtig mit einer 10 ml Glaspipette (12-Well-Platten) oder einer Multikanal-Pipette (96-Well-Platten) abgenommen. Anschließend wurde den Zellen 2 ml (12-Well Platten) bzw. 200 µl (96-Well-Platten) DPBS pro Well zugegeben und unverzüglich wieder abgenommen. Dieser Waschschritt wurde wiederholt, sodass die Zellen möglichst frei von alten Medienrückständen waren. Danach wurden vorsichtig 1,5 ml (12-Well-Platten) oder

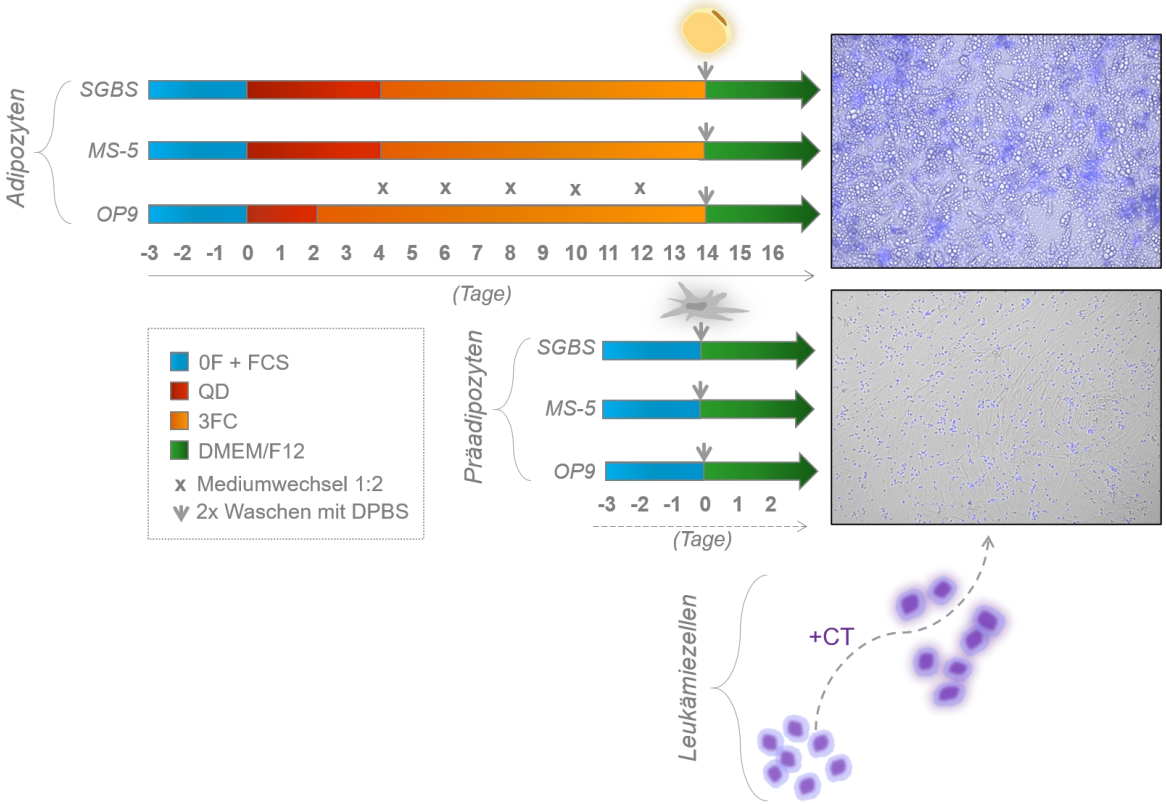


Abbildung 2: Differenzierungsprotokoll der SGBS-, MS-5-, oder OP9-Adipozyten und Ablauf der Ko-Kultivierung von SGBS-, MS-5-, OP9-Präadipozyten und Adipozyten mit Leukämiezellen. Der Ablauf der Differenzierung von SGBS-, MS-5- oder OP9-Präadipozyten zu Adipozyten kommt links oben zur Darstellung. An Tag -3 wurden SGBS-, MS-5- oder OP9-Präadipozyten im zellartspezifischen Proliferationsmedium (hellblau) ausgesät, woraufhin an Tag 0 ein Medienwechsel auf das Quick-Diff-Medium (QD; rot) stattfand. An Tag 2 (OP9) bzw. an Tag 4 (SGBS und MS-5) der adipogenen Differenzierung folgte ein Medienwechsel auf 3FC (orange). Die Kreuze (x) über der OP9-Zeitachse stellen den zweitägigen 1:2 3FC-Medienwechsel dar, welcher ausschließlich bei den OP9-Zellen durchgeführt wurde. Für Versuche, in denen Tag 0 Präadipozyten verwendet wurden, fand drei Tage vor Ko-Kultivierungsbeginn an Tag 14 der adipogenen Differenzierung eine Aussaat der SGBS-, MS-5- oder OP9-Präadipozyten im zellartspezifischen Proliferationsmedium statt (kürzere Pfeile unten im Bild). Tag 14 Adipozyten und Tag 0 Präadipozyten wurden nach zweimaligem Waschen mit DPBS (kurze senkrechte Pfeile) in DMEM/F12 (grüner Pfeil) kultiviert. Für die Ko-Kultur wurden BCP-ALL-Leukämiezellen oder Xenograft-Proben mit Cell Trace (CT) Violet gefärbt und auf die SGBS-, MS-5- oder OP9-Präadipozyten/-Adipozyten ausgesät. Die Fluoreszenzmikrofotografie in der Abbildung rechts oben zeigt exemplarisch die Ko-Kultivierung von lipidtropfenbeladenen SGBS-Adipozyten (weiße Kreise) mit Leukämiezellen an Tag 7, die in der der Abbildung rechts unten die Ko-Kultivierung von SGBS-Präadipozyten mit Leukämiezellen zu Beginn der Ko-Kultur (20-fache Vergrößerung).

100 µl (96-Well-Platten) Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nährmischung F12 (DMEM/F12) pro Well auf die Zellen pipettiert.

Für Ko-Kultur-Experimente, bei denen BCP-ALL Zelllinien verwendet wurden, wurden diese aus den T75 Kulturflaschen entnommen, gemäß Kapitel 2.2.1.2 gewaschen und anschließend mit dem Farbstoff CellTrace (CT) Violet angefärbt (siehe Kapitel 2.2.5.2). Die erfolgreiche CT Violet-Färbung der Leukämiezellen wurde direkt anschließend durch die Analyse am Durchflusszytometer bestätigt. Die CT-positiven BCP-ALL Zelllinien wurden mit einer Dichte von 2 x 10^4 Zellen (96-Well-Platten) bzw. 1 x 10^5 Zellen pro Well (12-well-Platten) mit Adipozyten bzw. Tag 14 Präadipozyten ko-kultiviert oder parallel dazu als Mono-Kultur in DMEM/F12 ausgesät.

Für Ko-Kultur-Experimente, in denen BCP-ALL Xenograft-Proben verwendet wurden, mussten die jeweiligen Proben zunächst aufgetaut, mit DPBS gewaschen und gezählt werden, um die Zellen anschließend ebenfalls mit CT Violet zu färben. Nach Bestätigung der CT Violet-Positivität der Leukämiezellen mittels Durchfluss-zytometrie wurden diese mit einer Dichte von 5 x 10^5 – 1 x 10^6 Zellen pro ml in 96-well-Platten zusammen mit Adipozyten bzw. Tag 14 Präadipozyten ko-kultiviert oder als Monokultur in DMEM/F12 ausgesät (Kontrolle). Zum Zeitpunkt der Analyse wurde der Inhalt des jeweiligen Wells der 96-well-Platten in eine Deepwell-Platte überführt, das Well mit 200 µl DPBS gewaschen und für fünf Minuten mit 50 µl Trypsin inkubiert, um Zellen, welche sich an den Gefäßwänden angeheftet hatten, abzulösen. Durch Zugabe von 50 µl FCS wurde das Trypsin inaktiviert. Anschließend wurden alle übrigen Zellen in die Deepwell-Platte überführt. Nach Anfärbung der Zellen mit Propidiumiodid (PI) wurden die Proben mit Hilfe des Autosamplers des Attune NxT Durchflusszytometers automatisiert gemessen.

2.2.3 Zellkultur-Experimente mit konditionierten Medien

Zur Analyse des Einflusses von sezernierten Faktoren von Leukämiezelllinien auf SGBS-(Prä-)Adipozyten, wurden NALM-6 und REH BCP-ALL-Zelllinien zunächst bis zur Semikonfluenz in T75 Kulturflaschen in RPMI + 20 % FCS kultiviert. Nach der Zentrifugation, einem Waschschritt und der Zellzahlbestimmung fand eine Kultivierung der Zellen mit einer Dichte von 1 x 10^6 Zellen pro ml in 0F + 0,5 % BSA für 48 Stunden in einer T75 Kulturflasche statt. Danach wurde die Zellsuspension

vollständig in ein Gefäß überführt, bei 2500 rpm für 5 Minuten zentrifugiert und das generierte konditionierte Medium der Leukämiezellen (L-KM) in mehrere Gefäße unter Verwerfung des Pellets aufgeteilt. Das L-KM wurde bis zur Verwendung bei -20 °C eingefroren.

Zudem fand eine Differenzierung der SGBS-Zellen gemäß des in Kapitel 2.2.1.1 beschriebenen Differenzierungsprotokolls im 12-Well-Format statt. An Tag 14 der adipogenen Differenzierung wurde das Kulturmedium über den Adipozyten vorsichtig vollständig mit einer 10 ml Glaspipette abgenommen, um unverzüglich je 1 ml des L-KM von NALM-6, REH oder des unkonditionierten Kontrollmediums 0F + 0,5 % BSA hinzuzugeben. Um eine 1:2 Verdünnung der konditionierten Medien und der unkonditionierten Kontrolle zu erreichen, wurden 0,5 ml des alten Kulturmediums auf den Adipozyten abgenommen und je 0,5 ml der gewünschten Kondition vorsichtig zugegeben. Nach einer Inkubation von 24 Stunden im Zellkulturschrank und daran anschließender Ribonukleinsäure (Ribonucleic acid, RNA) -Ernte, -Isolation, reverser Transkription und quantitativer Polymerase Kettenreaktion (qPCR) konnten die möglichen Änderungen der Expression verschiedener Gene von SGBS-Adipozyten durch Inkubation in L-KM analysiert werden. SGBS-Adipozyten, die für 24 Stunden in unkonditioniertem 0F + 0,5 % BSA kultiviert wurden, wurden dabei als Kontrolle herangezogen.

2.2.4 Transwell-Assay

Durch die Verwendung von Transwell-Einsätzen mit einer Porengröße von 0,4 µm wurden (Prä-)Adipozyten und Leukämiezellen räumlich voneinander getrennt, ein Austausch sezernierter Faktoren war allerdings weiterhin möglich. Verwendet wurden SGBS-Adipozyten und MS-5-(Prä-)Adipozyten, sowie die Leukämiezelllinien NALM-6, REH, EU3, Kasumi-2 und KOPN-8. Nach Abnahme des alten Mediums wurden SGBS-Adipozyten und MS-5-(Prä-)Adipozyten vorsichtig zweimalig mit DPBS gewaschen und anschließend in 1,5 ml DMEM/F12 kultiviert. Die Versuche fanden in 12-Well-Platten statt.

Die Leukämiezellen wurden nach der Anfärbung mit CT Violet (Kapitel 2.2.5.2) in DMEM/F12 resuspendiert und die Zellzahl auf 1 x 10^5 pro Well eingestellt. Dafür wurden nach dem Medienwechsel von SGBS-/MS-5-(Prä-)Adipozyten auf DMEM/F12 jeweils 0,5 ml Leukämiezellsuspension entweder in Monokultur, in

Ko-Kultur oder im Transwell kultiviert. Zum Analysezeitpunkt wurde der Inhalt jedes Transwells bzw. Wells der Ko-Kultur und Kontrolle in ein FACS (Fluorescence-activated Cell Sorting)-Röhrchen überführt und die Wells mit 0,5 ml DPBS gewaschen, was wiederum in die Röhrchen überführt wurde. Zum Ablösen restlicher Zellbestandteile wurde jedes Well für 5 Minuten mit 100 µl Trypsin benetzt, dessen Wirkung anschließend durch 300 µl FCS pro Well abgestoppt wurde. Anschließend wurde die komplette Flüssigkeit im Well ebenfalls in die FACS-Röhrchen überführt, welche dann bei 1800 rpm für 5 Minuten zentrifugiert wurden. Nach vorsichtigem Absaugen des Überstandes unter Schonung des sich am Boden gebildeten Zellpellets fand eine Anfärbung der Zellen mit 300 µl einer 1:1000 mit DPBS verdünnten PI-Lösung statt (Stockkonzentration 1mg/ml, Arbeitslösung 1µg/ml), woran sich die Messung am Attune NxT Durchflusszytometer anschloss.

Um herauszufinden, ob Leukämiezelllinien einen Einfluss auf MS-5-Zellen hatten, wurde eine Analyse der relativen Genexpression von Adipozyten und Präadipozyten nach der Kultivierung im Transwell-Assay durchgeführt. Hierfür wurde mittels qPCR die Genexpression von *Il-6* und dem Chemokin Monocyte chemoattractant protein-1 (*Mcp-1*) gemessen.

2.2.5 Zellbiologische Methoden

2.2.5.1 Mikroskopie und Bestimmung der Zellzahl und Differenzierungsrate

Zur Bestimmung von Zellzahlen, Differenzierungsraten und zur Beurteilung der (Prä-)Adipozytenmorphologie wurde das DMi1 Lichtmikroskop verwendet. Die Zellzahl wurde unter Zuhilfenahme einer Neubauer Zählkammer ermittelt. Zur Analyse der adipogenen Differenzierungsrate wurden mit Hilfe eines Netzmikrometers die Anzahl an Präadipozyten und Adipozyten auf 1 mm^2 bestimmt, wobei letztgenannte mindestens fünf deutlich sichtbare Lipidtopfen beinhalten mussten, um als solche zu gelten. Um die Differenzierungsrate zu berechnen, wurde der Quotient aus Adipozytenanzahl und der Summe aller gezählten Zellen (Adipozyten und Präadipozyten) pro Sichtfeld bestimmt. Nach Ermittlung der Differenzierungsrate von drei unterschiedlichen Betrachtungspunkten einer 12-Well-Platte wurde der Mittelwert gebildet. Um die morphologische Entwicklung der Adipozyten während der Differenzierung sowie das Aussehen der Zellen in der

Ko-Kultur festzuhalten, wurden mit dem BZ-9000 Fluoreszenzmikroskop Mikrofotografien in 4-, 10- und 20-facher Vergrößerung angefertigt.

2.2.5.2 Färbungen

Oil Red O Färbung

Zur lichtmikroskopischen Verdeutlichung der zunehmenden Lipideinlagerung in den Adipozyten während der adipogenen Differenzierung wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Differenzierung Oil Red O Färbungen angefertigt. Hierzu wurden die Zellen vorsichtig mit 2 ml DPBS gewaschen und mit einer 4 %igen Paraformaldehyd (PFA) Lösung bei Raumtemperatur inkubiert, die nach 10 Minuten durch eine frische PFA Lösung ersetzt wurde. Anschließend wurden die fixierten Zellen bei 4 °C gelagert. Zur weiteren Verarbeitung der Proben wurde das PFA vollständig abgenommen, die Zellen mit 60 %igem Isopropanol gewaschen und für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit der Oil Red O Arbeitslösung (Zusammensetzung siehe Tabelle 5) inkubiert. Nach Abnahme der Lösung wurden die Zellen vier Mal mit destilliertem Wasser gewaschen, um überschüssige Farbreste zu entfernen. Die anschließenden Bildaufnahmen wurden mit Hilfe des BZ-9000 Fluoreszenzmikroskops angefertigt.

CellTrace Violet Färbung

Um bei der Durchflusszytometrie Leukämiezellen in der Ko-Kultur von (Prä)-Adipozyten unterscheiden zu können, sowie die Proliferation der Leukämiezellen zu ermitteln, wurden diese mit Hilfe des CT Violet Cell Proliferationkit angefärbt. Dabei wurden die Zellen zunächst mit 20 ml DBPS gewaschen, zentrifugiert, gezählt und mit einer Konzentration von 2 x 10^6 Zellen pro ml eingestellt. Im Anschluss fand eine schonende Resuspension der Zellen mit gleichem Volumen an DPBS mit 2 µM CT statt, um eine Endkonzentration von 1 µM CT auf 1 x 10^6 Zellen pro ml zu erhalten. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten bei 37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von gleichem Volumen FCS abgestoppt. Nach weiterer fünfminütiger Inkubation bei 37 °C wurden die nun angefärbten Leukämiezellen zentrifugiert, mit DPBS gewaschen, gezählt und in der gewünschten Zelldichte auf (Prä-)Adipozyten oder in eine alleinige Medienkontrolle ausgesät.

Propidiumiodid Färbung

Zur Bestimmung der Zellviabilität am Durchflusszytometer wurde der Farbstoff Propidiumiodid (PI) verwendet. Vor der Messung am Durchflusszytometer wurden die Leukämiezellen unter vorsichtiger, mehrmaliger Resuspension mit PI, welches zuvor mit DPBS verdünnt wurde, angefärbt (Endkonzentration 1 µg/ml).

2.2.5.3 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe des Attune NxT Zytometers (Durchflusszytometer, auch: Fluorescence-activated Cell Sorting (FACS)) wurden Zellen, die in 96-Well-Platten ausgesät oder überführt wurden, am Autosampler vollautomatisch analysiert, wohingegen Proben in FACS-Röhrchen händisch gemessen wurden. Dabei fand eine Analyse von Größe (gemessen als Vorwärtsstreulicht, auch: Forward Scatter (FSC)), Granularität (gemessen als Seitwärtsstreulicht, auch: Sideward Scatter (SSC)) sowie Fluoreszenz von CT- und PI-gefärbten Zellen statt. Zur Detektion PI-gefärbter Zellen wurde der Kanal VL1-A, zur Detektion CT-gefärbter Zellen der Kanal BL1-A des Attune NxT Zytometers verwendet.

2.2.6 Molekularbiologische Methoden

2.2.6.1 RNA Ernte, Isolation und Konzentrationsbestimmung

Die RNA Ernte und Isolation erfolgte mit Hilfe des Direct-zol RNA Miniprep Kit. Zu Beginn wurde der Überstand auf den (Prä-)Adipozyten durch vorsichtiges Absaugen entfernt, die Zellen mit 3 ml DPBS pro Well gewaschen und die RNA in TRIzol Reagenz gelöst, wofür 500 µl Trizol auf drei Wells einer 12-well Platte verteilt wurden. Nach dem Resuspendieren wurden die Proben aus drei Wells in ein Eppendorf-Gefäß überführt und bei -80 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

Um die RNA zu isolieren, wurde zunächst in jede mit 500 µl Trizol lysierte Probe das gleiche Volumen Ethanol (95 - 100 %) hinzugegeben und die Probe resuspendiert. Anschließend wurden die Proben jeweils in einen Säulenbehälter pipettiert und für 1 Minute bei 12.000 g zentrifugiert. Die RNA wurde durch zweimalige Zugabe von 400 µl Pre-Wash Puffer und 700 µl RNA-Waschpuffer gereinigt, wobei zwischen jedem Waschschritt eine erneute Zentrifugation mit

12.000 g für 1 Minute, bzw. 2 Minuten beim letzten Waschschritt, erfolgte. Nach dem Transfer der Säulenbehälter auf neue 1,5 ml Eppendorf-Gefäße wurden die RNA-Proben durch Zugabe von 50 µl DNAase/RNAase-freiem Wasser je Probe von den Säulen eluiert und zur kurzfristigen Weiterverarbeitung auf Eis zwischengelagert. Mit Hilfe des NanoDrop 2000 wurde anschließend die Reinheit und Konzentration der einzelnen RNA Proben bestimmt. Schloss sich die Reverse Transkription (RT) direkt an, wurden die Proben weiterhin auf Eis gelagert. Zur längerfristigen Aufbewahrung wurden diese bei -80 °C eingefroren.

2.2.6.2 Reverse Transkription und Quantitative Polymerase Kettenreaktion

Zur Beurteilung der Messenger Ribonukleinsäure (mRNA) Expressionslevel wurden RNA-Proben in komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) durch die reverse Transkription transkribiert. Zur Denaturierung der RNA wurden 1 µl Random-Primer mit 1 µg RNA und RNAse-freiem Wasser in einem Endvolumen von 12 µl vermischt und bei 85 °C für 3 Minuten in den Thermocycler gestellt. Bei der anschließenden Lagerung der Proben auf Eis band der Random Primer an die RNA. Währenddessen wurde der Mastermix (MM) bestehend aus

- 5 µl 5x 1st Strand Puffer
- 2,5 µl Dithiothreitol (DTT)
- 1,5 µl RNAse-freies Wasser
- 1 µl Superscript-RT

pro Probe hergestellt und gut vermischt. Nachdem in jede Probe 11 µl MM hinzu pipettiert wurden, wurden diese nach kurzer Zentrifugation erneut in den Thermocycler gestellt und bei

- 25 °C für 15 Minuten
- 42 °C für 50 Minuten
- 70 °C für 15 Minuten
- 4 °C (bis zur Weiterverarbeitung)

der RT unterzogen. Anschließend wurden die Proben mit RNAse freiem Wasser auf jeweils 200 µl aufgefüllt und entweder direkt für die qRT-PCR weiterverwendet oder bei -20 °C gelagert.

Zur Bestimmung der relativen Expression verschiedenster Gene wurde die qRT-PCR durchgeführt. Zunächst wurde ein Mastermix bestehend aus

- 5 µl Sso advances SYBR Super Mix
- 3 µl RNAse-freies Wasser
- 1 µl Primer passend zum gewünschten Zielgen

pro Probe angefertigt, von welchem 9 µl pro Well in eine 96-Well-Platte pipettiert wurden. Anschließend wurde 1 µl der gewünschten cDNA Probe dem entsprechenden Well hinzugefügt, wobei für jedes Zielgen die einzelnen Proben in Duplikaten angefertigt wurden. Als Kontrolle unspezifischer Bindungen wurde dem 9 µl Mastermix eines jeweiligen Gens einmalig 1 µl RNAse-freies Wasser hinzu-pipettiert. Danach wurde die 96-Well-Platte mit einer Deckfolie verschlossen, kurz zentrifugiert und zur Analyse in das CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System platziert, in dem die qRT-PCR für 40 Zyklen ablief, wobei zwischen der Denaturierung bei 90 °C für 15 Sekunden und der Polymerisation bei 60 °C für 1 Minute stetig gewechselt wurde. Da die cDNA durch einen fluoreszierenden Farbstoff (SYBR Super Mix) angefärbt und der Fluoreszenzgehalt nach jedem Zyklus proportional zur Menge der PCR-Produkte anstieg und gemessen wurde, konnte man einen Schwellenzyklus (threshold cycle; CT) definieren, bei dem die Fluoreszenz erstmals die Hintergrundfluoreszenz überstieg. Um ungleiche Ausgangsmengen der verwendeten RNA auszugleichen, wurde der CT-Wert von Referenzgenen (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (Hprt) oder Trans-kriptionsfaktor 2B (TF2B)) bestimmt und von dem CT-Wert des untersuchten Gens subtrahiert, wodurch der ΔCT-Wert gebildet wurde. Nach Bestimmung des $2^{-\Delta CT}$-Werts fand die Berechnung des $2^{-\Delta\Delta CT}$-Werts statt, um den Effekt durch die Behandlung einer Probe auf die Genexpression im Vergleich zur Kontrolle zu ermitteln [77].

2.2.6.3 Genexpressionsprofil

Die Daten der basalen Genexpression der Xenograft-Proben wurden von Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin und Prof. Dr. Lüder-Hinrich Meyer (Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Ulm) zur Verfügung gestellt. Die basale Genexpression von 13 Xenograft Survivors/Non-Survivors wurde mit Hilfe der Human Genome U133 Plus 2.0 Array Platform ermittelt. Die Qualitätsanalyse der RNA wurde mittels

des Agilent 2100 Bioanalyzers durchgeführt. Zur Aufbereitung der RNA wurde das Affymetrix 3‘-IVT Express Kit gemäß Herstellerangaben verwendet, woran sich die Genexpressionsanalyse mit Hilfe des Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Arrays anschloss. Zur Interpretation der Genexpressionsdaten wurde die Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) Software des Broad Institute verwendet [84, 124].

2.2.6.4 Proteinextraktion und Konzentrationsbestimmung

Die Proteinextraktion fand unter ständiger Kühlung auf Eis statt, wobei zunächst die Medienüberstände aus den 12-well-Platten abgesaugt und der Zellrasen jedes Wells einmalig mit 3 ml kaltem DPBS gewaschen wurde. Anschließend wurden 100 µl Lysepuffer (Zusammensetzung siehe Tabelle 5) auf drei Wells verteilt, die Zellen mittels Zellschaber von der Unterfläche abgeschabt und in ein Gefäß überführt. Nach einer 20-minütigen Inkubationszeit auf Eis wurden die Lysate für 30 Minuten bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand über den Präadipozyten bzw. die Interphase zwischen Zellpellet und oben schwimmender Lipidablagerung der Adipozyten in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert. Zur Protein-konzentrationsbestimmung wurde der Bicinchoninsäure (BCA) Assay verwendet. Dabei wurde zunächst 1 µl einer jeweiligen Probe in Triplikaten in einer 96-well-Platte vorgelegt und 100 µl des Assay Reagenz je Well hinzugegeben. Nach Farbumschlag unter kontinuierlichem Schütteln bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 550 nm mit einem Mikroplattenleser bestimmt und die Proteinkonzentration entsprechend angeglichen.

2.2.6.5 SDS-PAGE und Western Blot

Um die Proteinproben mit Hilfe der Sodium Dodecyl Sulfat Polyacrylamid Gel Elektrophorese (SDS-PAGE) zu separieren, wurden die Proben mit dem Bolt Lithiumdodecylsulfat (LDS)-Puffer (4x) und dem NuPAGE Proben-Reduktionsmittel (10x) versetzt und bei 90 °C für 10 Minuten denaturiert. Dann wurden die jeweiligen Proben sowie eine Ladekontrolle in die Taschen des vorgefertigten NuPAGE Novex 4 - 12 % Bis-Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) Gels pipettiert, das in einer mit MES SDS Elektrophorese-Puffer (1x) befüllten Elektrophoresekammer platziert war. Die Größenauftrennung erfolgte bei 180 Volt über 35 bis 50 Minuten. Mit Hilfe

des iBlot2 Western Plot Systems wurden die Proteine bei 20 Volt über 7 Minuten auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und danach im Blockierungs-Puffer (Tabelle 5) zur Blockung unspezifischer Bindungsstellen für eine Stunde inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran insgesamt drei Mal für jeweils 10 Minuten mit 1x Tris-buffered saline with Tween20 (TBST) (Tabelle 5) gewaschen und anschließend bei 4 °C über Nacht oder für eine Stunde bei Raumtemperatur mit einem Primärantikörper inkubiert. Es folgte das dreimalige Waschen der Membran für jeweils 10 Minuten mit 1x TBST, woraufhin die Zugabe des verdünnten Horseradish Peroxidase (HRP) Sekundärantikörpers für eine Stunde bei Raumtemperatur stattfand. Dann wurde die Membran erneut für drei Mal 10 Minuten mit 1x TBST gewaschen. Durch Zugabe von Enhanced Chemiluminescence (ECL)-Substrat wurde die Enzymaktivität der HRP auf einem Amersham Hyperfilm im Optimax Filmentwickler detektiert.

2.2.7 Statistische Analysen

Die statistischen Analysen wurden mit Hilfe der GraphPad Prism Software durchgeführt. Als statistische Tests wurden One-way ANOVA (Analysis of Variance, Varianzanalyse), Two-way ANOVA, Mixed Effects Model, Kruskal-Wallis-Test, Friedman Test und der doppelte t-Test verwendet. Das allgemein Signifikanzniveau wurde auf 0,05 festgelegt. Dabei entsprach * p-Wert ≤ 0,05; ** p-Wert ≤ 0,01; *** p-Wert ≤ 0,001 und **** p-Wert ≤ 0,0001. Zudem wurde der Mittelwert berechnet und zusammen mit Standardabweichung (Standarddeviation, SD) oder Standardfehler (Standard Error of the Mean, SEM) angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung und Testung eines Ko-Kultur-Modellsystems mit Adipozyten und Leukämiezellen

Um die Interaktion von Leukämiezellen und Adipozyten *in vitro* untersuchen zu können, sollte in dieser Arbeit ein geeignetes Ko-Kultur-System entwickelt werden.

Hierfür mussten als erstes Zellkulturbedingungen definiert werden, die das Wachstum und die Viabilität beider Zelltypen erlauben, aber gleichzeitig deren Funktion nicht einschränken.

3.1.1 Charakterisierung der zur Etablierung verwendeten SGBS-Zellen

Als Modellsystem wurden humane SGBS-Zellen verwendet. Der schematische Ablauf der adipogenen Differenzierung ist in Abbildung 3A zu sehen. Im Präadipozytenzustand vor Induktion der adipogenen Differenzierung hatten die Zellen eine fibroblastoide Gestalt (Abbildung 3A). Während drei Tage nach Zugabe von adipogenem Medium nur vereinzelt und sehr kleine Lipideinschlüsse zu erkennen waren, sind nach sieben und noch deutlicher nach vierzehn Tagen klare Lipidvakuolen zu erkennen. Dies spiegelt sich in einer Zunahme der Differenzierungsrate wider (Abbildung 3B). Parallel zu den morphologischen Veränderungen konnte man eine deutliche Steigerung der Expression adipogener Markergene wie Adiponektin (*ADIPOQ*), Glukose-Transporter-4 (*GLUT4*) und *PPARG* beobachten (Abbildung 3C). *IL-6* hingegen verhielt sich gegenläufig zu *GLUT4*, *ADIPOQ* und *PPARG* (Abbildung 3C).

Zudem wurde die Proteinexpression von PPARγ während der adipogenen Differenzierung von SGBS-Zellen analysiert. Interessanterweise zeigte sich ab Tag 3 zunächst vermehrt die Expression der Isoform PPARγ1, wohingegen ab Tag 7 die Expression von PPARγ2 stärker ausgeprägt war (Abbildung 3D). Dieser Zustand wurde bis zu Tag 14 in leicht verminderter Intensität aufrechterhalten.

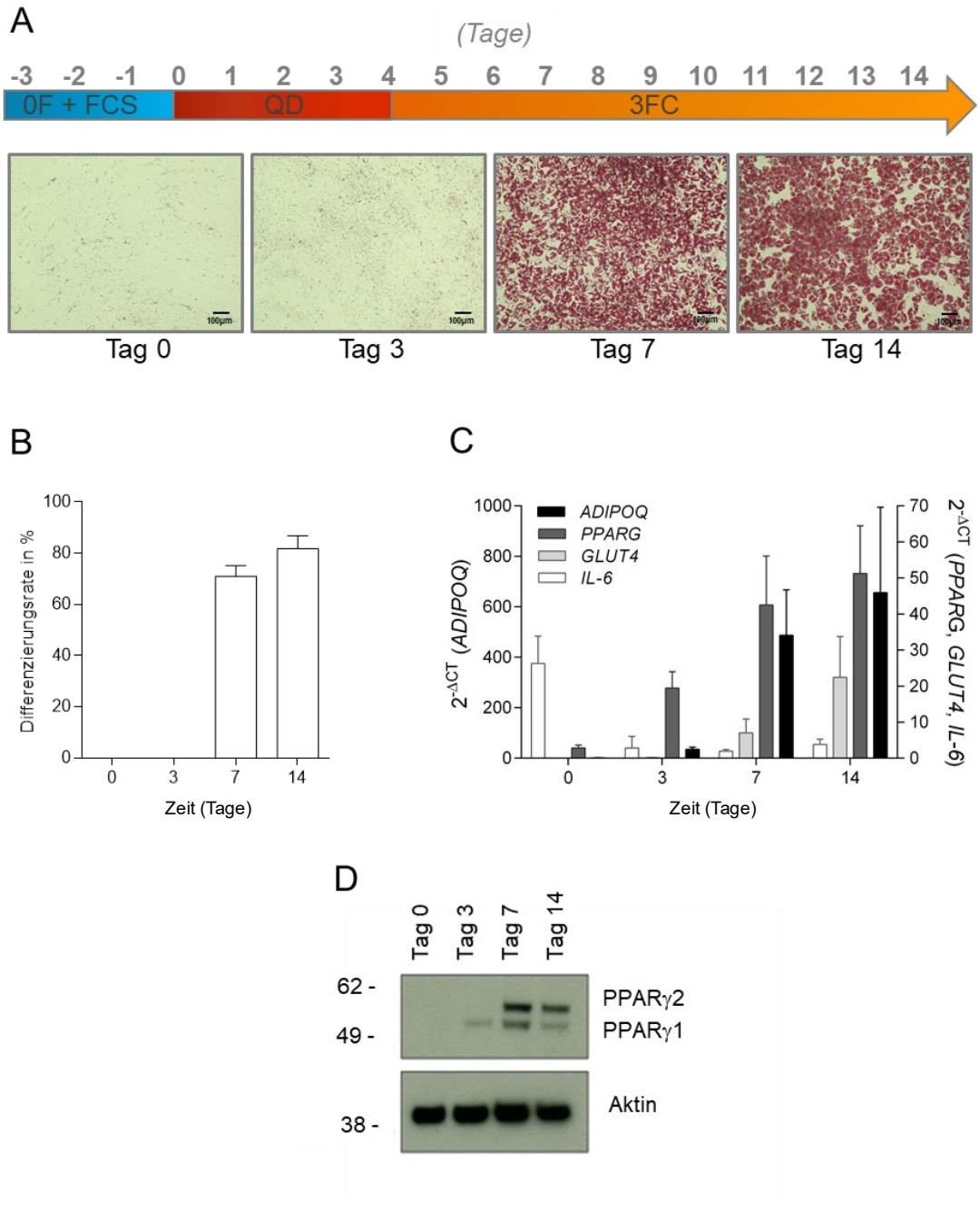


Abbildung 3: Protokoll der adipogenen Differenzierung von Simpson-Golabi-Behmel Syndrom-Zellen (SGBS-Zellen). (A) Zeitachse des Differenzierungsablaufs von SGBS-Zellen. Die unter der Zeitachse dargestellten Mikrofotografien zeigen SGBS-Zellen an Tag 0, 3, 7 und 14 des Differenzierungsprozesses nach einer Oil red O Färbung (Maßstab 100 µm). (B) Die Differenzierungsrate der SGBS-Zellen wurde während der adipogenen Differenzierung zu den Zeitpunkten Tag 0, 3, 7 und 14 ermittelt. (C) Mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) wurde die mRNA Expression von vier ausgewählten Genen relativ zum Referenzgen Transkriptionsfaktor 2B (*TF2B*) an Tag 0,3, 7 und 14 bestimmt und der $2^{-\Delta CT}$-Wert von Peroxisom-Proliferator-aktivierter-Rezeptor-Gamma (*PPARG*), Glukose-Transporter-4 (*GLUT4*), Interleukin-6 (*IL-6*) (rechte y-Achse) sowie Adiponektin (*ADIPOQ*) (linke y-Achse) berechnet. Im exemplarisch ausgewählten Western Blot (D) ist die Proteinexpression von Peroxisom-Proliferator-aktivierter-Rezeptor-Gamma 1 und 2 (PPARγ1 und PPARγ2) sowie Aktin als Ladekontrolle an Tag 0, 3, 7 und 14 dargestellt. In (B) und (C) zeigen die Balken den Mittelwert + SD, N=3-4.

3.1.2 Selektion eines geeigneten Zellkulturmediums zur Untersuchung der Interaktion von Adipozyten und Leukämiezellen

Um zunächst ein für beide Zelltypen gleichermaßen geeignetes Zellkulturmedium zu identifizieren, wurden SGBS-Adipozyten für 48 Stunden in den SGBS-typischen Kulturmedien 0F und 3FC, oder in den leukämiezelltypischen Kulturmedien AIMV und RPMI + 20 % FCS inkubiert (Abbildung 4A und B). Zur Ermittlung des Effekts der unterschiedlichen Kulturmedien auf die Genexpression von Adipozyten wurde die Expression der Adipozytenmarker *PPARG*, *GLUT4*, *ADIPOQ* und *LEP* bestimmt (Abbildung 4A). Durch die Kultivierung der SGBS-Zellen in RPMI + FCS fiel die relative Expression der vier adipogenen Gene im Mittel im Vergleich zur Kultivierung in 3FC signifikant ab (Abbildung 4A). AIMV zeigte einen geringeren Einfluss auf die relative Genexpression als RPMI + FCS, die relative Expression von *ADIPOQ*, *GLUT4* und *LEP* sank im Vergleich zu 3FC jedoch ebenfalls deutlich. Eine Ausnahme bildete dabei die relative Genexpression von *PPARG*, die unter Einfluss von AIMV nahezu stabil blieb. Im Gegensatz dazu zeigte sich kein signifikanter Abfall der relativen Genexpression zuvor genannter Gene durch die Kultivierung der SGBS-Adipozyten in 0F (Abbildung 4A).

Die relative Expression der inflammatorischen Gene *IL-6* und *IL-8* nahm im Mittel nach Kultivierung von SGBS-Adipozyten in RPMI + FCS im Vergleich zur Kultivierung in 3FC signifikant zu (Abbildung 4B). Auch die Kultivierung in AIMV führte zu einer erhöhten relativen Expression von *IL-6* in SGBS-Adipozyten (Abbildung 4B). Durch die Kultivierung in 0F wurde die relative Genexpression von *IL-6 und IL-8* in den SGBS-Adipozyten, verglichen mit 3FC, nicht signifikant verändert.

Zur Ermittlung eines geeigneten Kulturmediums für eine Ko-Kultur aus Adipozyten und Leukämiezellen wurde im nächsten Schritt der Einfluss der vier oben genannten Kulturmedien auf die Proliferation und das Überleben der Leukämiezelllinie NALM-6 getestet (Abbildung 4C und D). Diese wurden in ihrem Kulturmedium RPMI + FCS als Kontrolle, sowie in AIMV, 3FC oder 0F kultiviert und die Zellviabilität sowie Zellzahl nach ein bis vier Tagen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die Zellviabilität nach vier Tagen in allen vier Kulturmedien über 70 % lag und diese in 3FC und 0F nicht signifikant von der Kontrolle abwich (Abbildung 4C). Die Anzahl der Zellen in 0F und 3FC (Abbildung 4D) war gegenüber der Kontrolle

signifikant erniedrigt, jedoch hatten sich die Zellzahlen in 0F und 3FC im Vergleich zur Aussaat verdoppelt.

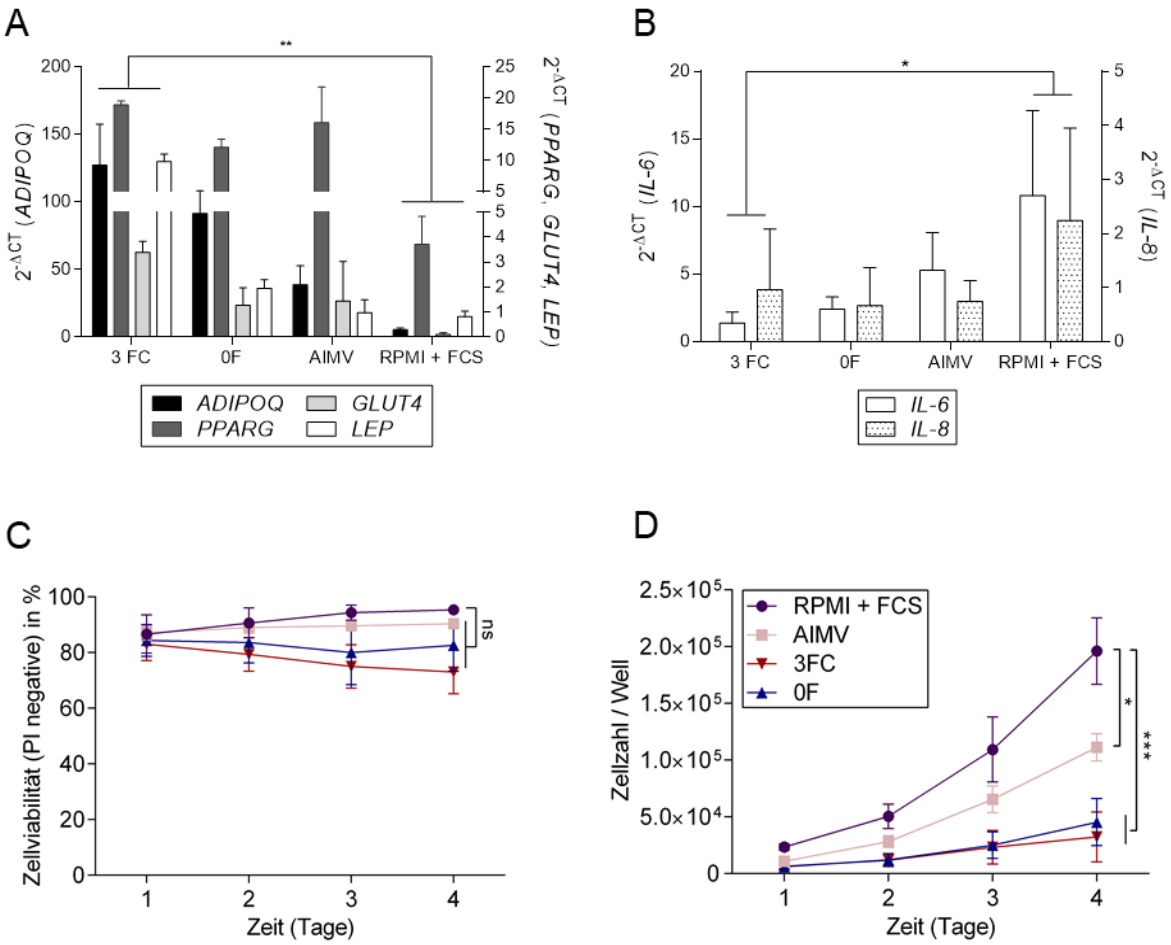


Abbildung 4: Einfluss von adipozyten- und leukämiezelltypischen Kulturmedien auf SGBS-Adipozyten und NALM-6 Leukämiezellen. (A) und (B): An Tag 14 der adipogenen Differenzierung wurde ein vollständiger Wechsel des Kulturmediums der SGBS-Adipozyten auf RPMI + 20 % FCS, AIMV, 3FC oder 0F durchgeführt. Nach einer Inkubation von 48 Stunden wurde mittels quantitativer Polymerase Kettenreaktion (qPCR) die Genexpression relativ zum Referenzgen Transkriptionsfaktor 2B (*TF2B)* bestimmt und in Form des $2^{-\Delta CT}$-Wertes angegeben. Dabei zeigt (A) die relative mRNA Expression von Peroxisom-Proliferator-aktivierter-Rezeptor-Gamma (*PPARG*), Glukose-Transporter-4 (*GLUT4)* und Leptin (*LEP*) auf der rechten y-Achse sowie Adiponektin (*ADIPOQ)* auf der linken y-Achse. Die relative mRNA Expression von Interleukin-6 (*IL-6)* zeigt sich auf der linken y-Achse sowie von Interleukin-8 (*IL-8)* auf der rechten y-Achse in (B). (C) und (D): NALM-6-Zellen wurden in RPMI + 20 % FCS, AIMV, 3FC oder 0F für 1, 2, 3 und 4 Tage kultiviert. Zu den jeweils angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen mit Propidiumiodid (PI) gefärbt und sowohl die Zellviabilität, angegeben in % PI-negativer Zellen (C), als auch die Proliferation (Zellzahl pro Well) (D) mittels Durchflusszytometrie bestimmt. In (A) und (B) zeigen die Fehlerbalken den Mittelwert + SD; N=2-3. Statistik: Friedman-Test. In (C) und (D) zeigen die Datenpunkte den Mittelwert ± SEM; N=3-4. Statistik: Two-way ANOVA - Dunnett's multiple comparisons test, ns = nicht signifikant; * p-Wert ≤ 0,05; ** p-Wert ≤ 0,01; *** p-Wert ≤ 0,001.

Da die Kulturmedien AIMV und RPMI + FCS sowohl einen supprimierenden Einfluss auf die Genexpression von *ADIPOQ*, *LEP* und *GLUT4* zeigten als auch zu einer Steigerung inflammatorischer Gene in SGBS-Adipozyten führten, erwiesen sich die Leukämiezellmedien als weniger geeignet für die Ko-Kultivierung. Jedoch zeigte sich, dass die Leukämiezelllinie NALM-6 sowohl in 0F als auch in 3FC überlebte, weshalb der Einfluss adipogener Kulturmedien in einem nächsten Schritt eingehender analysiert wurde.

Hierfür wurde der Effekt der adipogenen Differenzierungsfaktoren Transferrin, Insulin, Cortisol, T3, IBMX, Dexamethason und Rosiglitazon, die teilweise oder komplett in 0F, 3FC und im QD enthalten sind, auf NALM-6, REH, RS4;11 und UoCB6 untersucht (Abbildung 5). Zudem wurde der Einfluss genannter Kulturmedien auf die Leukämiezelllinien nicht nur nach vier (Abbildung 4), sondern auch nach sieben Tagen untersucht (Abbildung 5), um ein System zu entwickeln, das auch zu späteren Messzeitpunkten kontrolliert einsetzbar ist.

Nach der Kultivierung in Dexamethason und im QD war die relative Zellviabilität und Zellzahl von NALM-6 im Vergleich zur Kultivierung der Zellen im Basalmedium DMEM/F12 deutlich geringer (Abbildung 5). Noch drastischer war der Einfluss nahezu aller Konditionen auf REH-Zellen. Eine Ausnahme bildete dabei die Kultivierung mit Cortisol, bei der die Zellviabilität und -zahl von NALM-6, REH und UoCB6 im Vergleich zu DMEM/F12 aufrechterhalten werden konnte. Bei der Analyse von RS4;11 stellte sich heraus, dass die Zellviabilität und -zahl vor allem nach Kultivierung im QD bzw. in Cortisol und in Dexamethason stark reduziert waren. Im Gegensatz dazu war die Viabilität der mit Insulin kultivierten Zellen bis zu Tag 7 um das 2-, die Zellzahl um das 3,6-fache höher im Vergleich zum Basalmedium DMEM/F12. Keine andere getestete Leukämiezelllinie zeigte eine derart gesteigerte Verdopplungsrate.

Die Zelllinie UoCB6 wurde nur wenig durch die adipogenen Differenzierungsfaktoren beeinflusst. Die Kultivierung in Cortisol, Dexamethason und Rosiglitazon führte jedoch zu einer leichten Erhöhung der Zellviabilität.

Diese Ergebnisse zeigen eine eindeutige Einflussnahme von adipogenen Differenzierungsfaktoren auf die Zellviabilität und Zellzahl der Leukämiezelllinien NALM-6, REH, RS4;11 und UoCB6. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass

ausschließlich die Kulturmedien 0F und DMEM/F12 zur Ko-Kultivierung von Leukämiezellen und SGBS-Adipozyten geeignet sind.

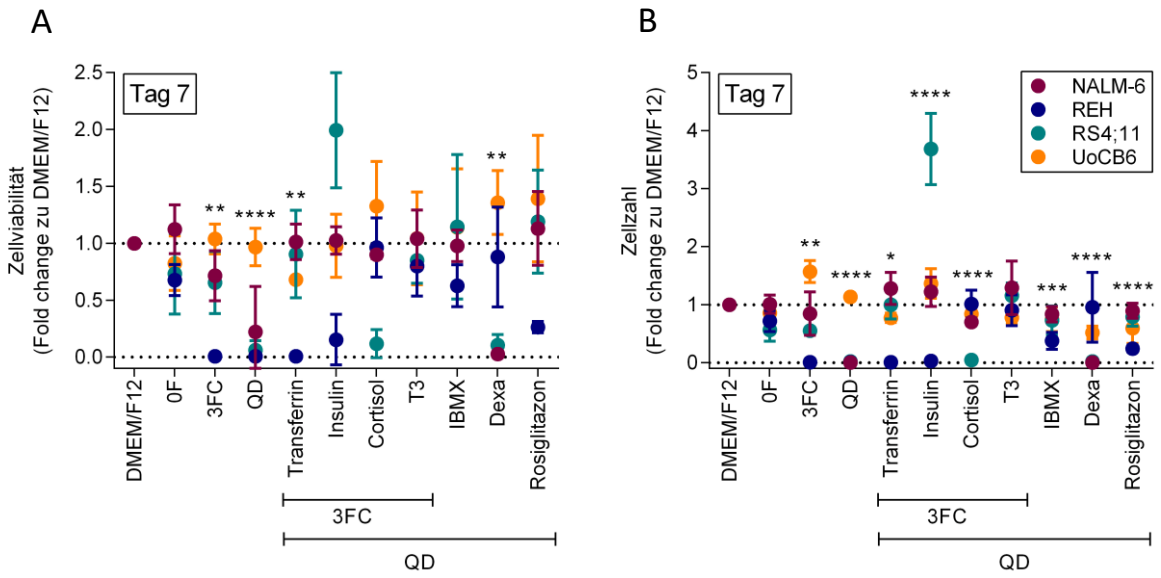


Abbildung 5: Adipogene Differenzierungsfaktoren beeinflussen die Zellviabilität und Zellzahl der Leukämiezelllinien NALM-6, REH, RS4;11 und UoCB6. Die vier Leukämiezelllinien wurden für sieben Tage in DMEM/F12 oder unter Zusatz einzelner Differenzierungsfaktoren (Transferrin, Insulin, Cortisol, T3, 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX), Dexamethason (Dexa), Rosiglitazon) kultiviert. Zudem fand eine Kultivierung in 0F, 3FC oder Quick-Diff-Medium (QD) statt. Anschließend wurde die Zellviabilität sowie Zellzahl der Leukämiezelllinien nach Anfärbung mit Propidiumiodid (PI) am Durchflusszytometer bestimmt und die Vervielfältigungsrate der einzelnen Leukämiezelllinien im Vergleich zu DMEM/F12 berechnet. Die Datenpunkte und Balken zeigen den Mittelwert ± SD; N=3-4. Statistik: Two-way ANOVA - Dunnett's multiple comparisons test, * p-Wert ≤ 0,05; ** p-Wert ≤ 0,01; *** p-Wert ≤ 0,001; **** p-Wert ≤ 0,0001.

3.2 Das serumfreie und standardisierte Adipozyten-Leukämiezell-Ko-Kultur-Modellsystem

Vor der Ko-Kultivierung wurden SGBS-Zellen zunächst gemäß des standardisierten Differenzierungsprotokolls in reife Tag 14 Adipozyten differenziert (Abbildung 3 sowie Abbildung 6). Um bei dem sich anschließenden Medienwechsel mögliche 3FC-Residuen auf ein Minimum zu reduzieren, wurde nach Abnahme und vor Zugabe von DMEM/F12 an Tag 14 ein zweimaliger Waschschritt mit DPBS eingeführt. Da der Einfluss von reifen Adipozyten auf Leukämiezelllinien im Folgenden bis zu einer Dauer von zehn Tagen beobachtet werden sollte, wurde eine zehntägige Kultivierung der SGBS-Adipozyten in DMEM/F12 untersucht, wobei zunächst besonders auf die Morphologie geachtet wurde. Hierfür wurden am Tag des Differenzierungsbeginns (Tag 0), am Tag des Medienwechsels auf DMEM/F12 (Tag 14) sowie ein, drei, fünf, sieben und zehn Tage (Tag 14 + 1 bis Tag 14 + 10) danach Mikrofotografien der zuvor mit Oil Red O angefärbten SGBS-Zellen angefertigt (Abbildung 6). Die morphologischen Veränderungen der SGBS-Zellen bis Tag 14 fanden gemäß Abbildung 3 statt. Nach dem Medienwechsel auf DMEM/F12 verringerte sich die Anzahl der reifen Adipozyten sowie deren Lipidtropfen, was gleichzeitig mit einer Größenzunahme einzelner Lipidtropfen einherging. Zur Ermittlung möglicher Veränderungen der Gen- und Proteinexpression durch die Kultivierung der SGBS-Adipozyten in DMEM/F12 wurden, zu den in Abbildung 6 korrespondierenden Zeitpunkten, die Genexpression von *PPARG*, *ADIPOQ* und *IL-6* sowie die Proteinexpression von Adiponektin und PPARγ bestimmt (Daten nicht gezeigt). Hier zeigte sich, dass nach dem Medienwechsel auf DMEM/F12 ein kurzzeitiger Gen- sowie Proteinexpressionsabfall stattfand, der jedoch bis zu Tag 14 + 10 teilweise ausgeglichen werden konnte.

Zusammenfassend erwies sich DMEM/F12 auf Grund des geringen Einflusses auf Leukämiezellen und SGBS-Adipozyten als geeignetes Kulturmedium für die Untersuchung der Interaktion oben genannter Zellen.

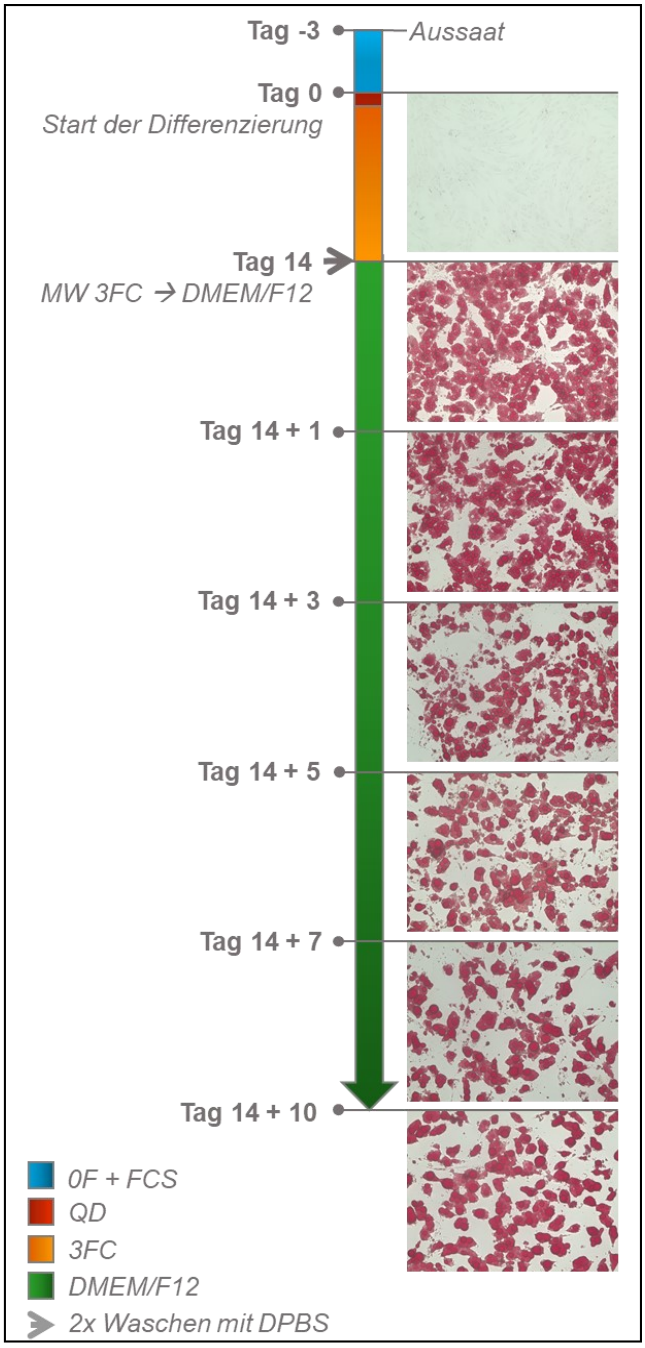


Abbildung 6: Übersicht über den Ablauf der Differenzierung sowie Morphologie der Simpson-Golabi-Behmel Syndrom (SGBS)-Adipozyten unter Einfluss von DMEM/F12 zu definierten Messzeitpunkten. Die nach unten gerichtete Zeitachse zeigt die adipogene Differenzierung von der Aussaat in 0F + FCS (blauer Balken) und dem Start der Differenzierung durch den Medienwechsel auf das Quick-Diff-Medium (QD, rot) an Tag 0, bis zum Medienwechsel auf 3FC (orange). An Tag 14 der adipogenen Differenzierung fand nach zweimaligem Waschen mit DPBS (grauer Pfeil) ein Medienwechsel auf DMEM/F12 (grüner Pfeil) statt. Zu den jeweils angegebenen Messzeitpunkten wurden die Adipozyten mit Oil Red O angefärbt und anschließend Mikrofotografien von den Adipozyten angefertigt (20-fache Vergrößerung).

3.2.1 Adipozyten des MAT im Ko-Kultur-Modellsystem

Eine Fragestellung dieser Arbeit lautet, ob sich Adipozyten des weißen Fettgewebes von denen des Knochenmarks bezüglich der Einflussnahme auf das Überleben und die Proliferation der BCP-ALL-Zellen unterscheiden. Nachdem zunächst Adipozyten des WAT (SGBS-Zellen) im Ko-Kultur-Modellsystem getestet wurden, sollten nun Adipozyten des MAT untersucht werden.

Hierfür wurden die murinen MS-5- und OP9-Knochenmarkzelllinien verwendet, welche adipogene Differenzierungskapazität besitzen. Zur besseren Vergleichbarkeit der Knochenmarkzelllinien und SGBS-Zellen wurden deren Differenzierungsprotokolle angeglichen, was für die Knochenmarkzelllinien zunächst etabliert werden musste (Abbildung 2 und Abbildung 7).

Vor Induktion der adipogenen Differenzierung hatten die MS-5-Zellen eine sternförmige Gestalt (Abbildung 7A). Während drei Tage nach Zugabe von adipogenem Medium nur vereinzelte und sehr kleine Lipideinschlüsse sichtbar waren, nahmen Anzahl und Größe der Lipidtropfen von Tag 7 bis Tag 14 deutlich zu.

Im Gegensatz zu den undifferenzierten SGBS- und MS-5-Zellen zeigten die OP9-Zellen vor Beginn der Differenzierung an Tag 0 eine rundliche Morphologie und kleinste Lipidablagerungen, die ab Tag 3 als deutliche intrazelluläre Lipidtropfen erkennbar waren und in Anzahl und Größe bis Tag 14 weiter zunahmen (Anhang 1).

Parallel zu den morphologischen Veränderungen konnte eine deutliche Zunahme der Expression adipogener Markergene wie *Adipoq, Pparg* und *Glut4* in MS-5-Zellen bis zu Tag 14 beobachtet werden (Abbildung 7B). Vergleichbares galt für die Expression von *Pparg* und *Glut4* in den OP9-Zellen (Anhang 1).

Zudem wurde die Proteinexpression von PPARγ und Adiponektin zur Validierung der mRNA-Expression während der adipogenen Differenzierung von MS-5-Zellen analysiert. Dabei konnten ab Tag 3 deutliche Banden auf Höhe 55 und 60 kDa, entsprechend der Isoformen PPARγ1 und PPARγ2, detektiert werden (Abbildung 7C). Die Adiponektin-Proteinexpression war ab Tag 3 der adipogenen Differenzierung nachweisbar und nahm im zeitlichen Verlauf bis Tag 14 weiter zu.

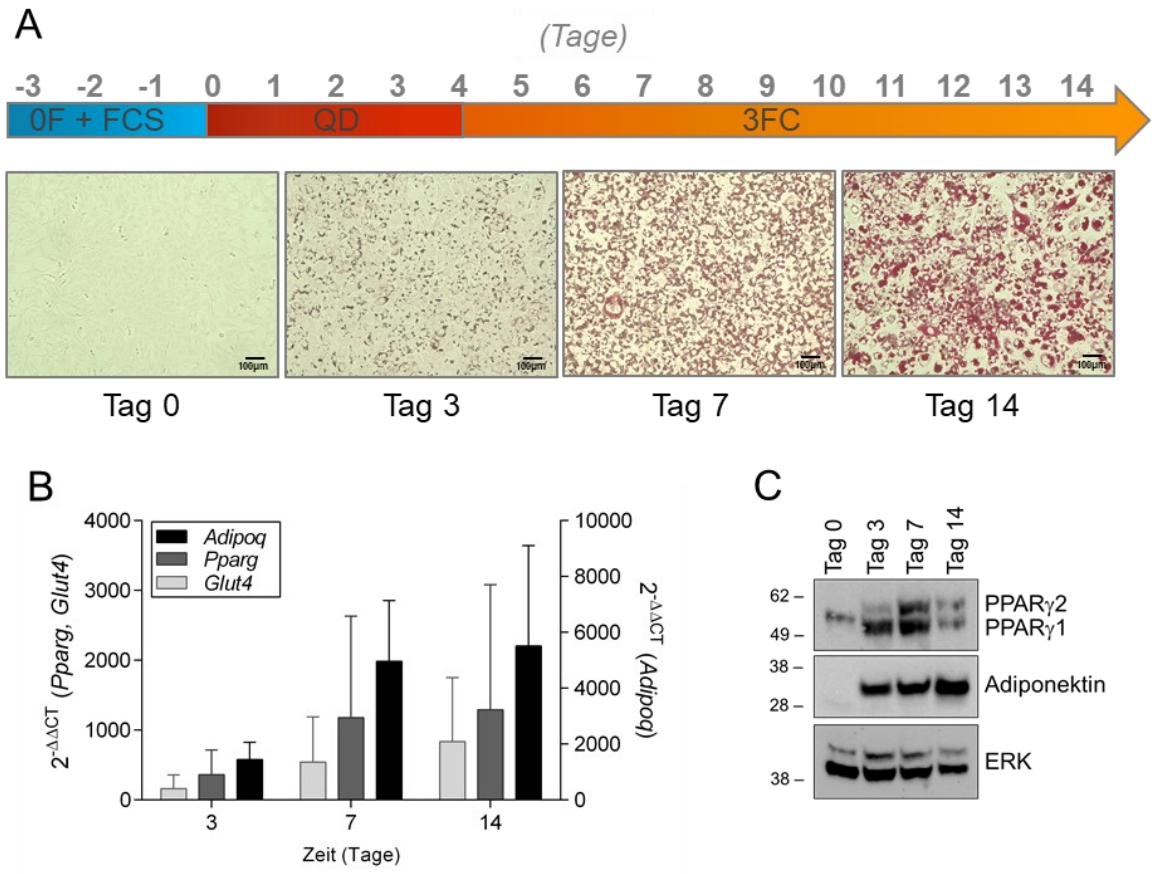


Abbildung 7: Protokoll der adipogenen Differenzierung der murinen Knochenmarkstroma-Zelllinie MS-5. (A) Zeitachse des Differenzierungsablaufs von MS-5-Knochenmarkstromazellen. Die Aussaat der MS-5-Fibroblasten fand drei Tage (Tag -3) vor Differenzierungsbeginn in 0F + FCS (blauer Balken) statt. Um den Beginn der Differenzierung zu starten, wurde an Tag 0 ein Medienwechsel auf Quick-Diff-Medium (QD; roter Balken) durchgeführt, welches an Tag 3 des Differenzierungsprozesses durch 3FC-Medium (oranger Pfeil) ersetzt wurde und bis zur vollständigen Differenzierung der MS-5-Zellen an Tag 14 auf den Zellen verblieb. Die unter der Zeitachse dargestellten Mikrofotografien zeigen MS-5-Zellen an Tag 0, 3, 7 und 14 des Differenzierungsprozesses nach einer Oil Red O Färbung (Maßstab 100 µm). (B) Mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) wurde die Expression von typischen adipogenen Differenzierungsgenen relativ zum Referenzgen Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (*Hprt)* an Tag 0, 3, 7 und 14 bestimmt und der $2^{-\Delta\Delta CT}$-Wert berechnet. Dabei ist der $2^{-\Delta\Delta CT}$-Wert von Peroxisom-Proliferator-aktivierter-Rezeptor-Gamma (*Pparg)* und Glukose-Transporter-4 (*Glut4)* auf der linken y-Achse, sowie der $2^{-\Delta\Delta CT}$-Wert von Adiponektin (*Adipoq)* auf der rechten y-Achse zu sehen. Im exemplarisch ausgewählten Western Blot (C) wurde die Proteinexpression von PPARγ1 und PPARγ2, Adiponektin sowie ERK als Ladekontrolle an Tag 0, 3, 7 und 14 ermittelt. In (B) zeigen die Balken den Mittelwert + SD; N=2-3.

Auch die OP9-Zellen zeigten auf Proteinebene bei fortschreitender Differenzierung eine deutliche Expression klassischer adipozytärer Marker (Anhang 1).

Fasst man diese Erkenntnisse zusammen, so konnte durch das neu etablierte Differenzierungsprotokoll eine nahezu vollständige Differenzierung von MS-5- und OP-9-Zellen in reife Adipozyten erzielt werden.

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss von DMEM/F12 auf die MS-5- und OP9-Knochenmarkzellen getestet, was korrespondierend zu den SGBS-Zellen in Abbildung 6 durchgeführt wurde (Anhang 2). Mit dem Medienwechsel auf DMEM/F12 verringerte sich die Größe und Anzahl der Lipidtropfen im Verlauf bis Tag 14 + 10 leicht, insgesamt waren jedoch viele gut differenzierte und mit Lipidtropfen gefüllte Adipozyten erkennbar. Die Gen- und Proteinexpression adipogener Marker fiel nach dem Medienwechsel auf DMEM/F12 ebenfalls ab, stabilisierte sich jedoch (Daten nicht gezeigt).

Da sich die MS-5- und OP9-Knochenmarkzellen unter Einfluss von DMEM/F12 wenig in ihrer Morphologie veränderten, sowie die Gen- und Proteinexpression adipozytenspezifischer Marker weiterhin vorhanden war, konnten diese für nachfolgende Experimente zur Analyse der Interaktion von Knochenmarkadipozyten mit Leukämiezellen verwendet werden.

3.3 Charakterisierung der Interaktion von Adipozyten unterschiedlicher Herkunft mit Leukämiezellen

3.3.1 Der Einfluss von Adipozyten des WAT auf B-Vorläufer-ALL-Zellen

Nach der Etablierung des Zellkultur-Modellsystems zur Untersuchung der Interaktion von Adipozyten und Leukämiezellen kam dieses in Experimenten zur Anwendung. Dabei wurde die Einflussnahme von Adipozyten des WAT (SGBS-Adipozyten) auf die Leukämiezelllinien NALM-6, REH, RS4;11, UoCB6, EU3, KOPN-8, Kasumi-2, RCH-ACV und SMS-SB in der Ko-Kultur analysiert (Abbildung 8). Hier zeigte sich, dass einzig die Zelllinien NALM-6 und RS4;11 in der Ko-Kultur mit SGBS-Adipozyten eine Tendenz zur Steigerung der Zellviabilität bzw. eine signifikante Steigerung der Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle aufwiesen (Abbildung 8B).

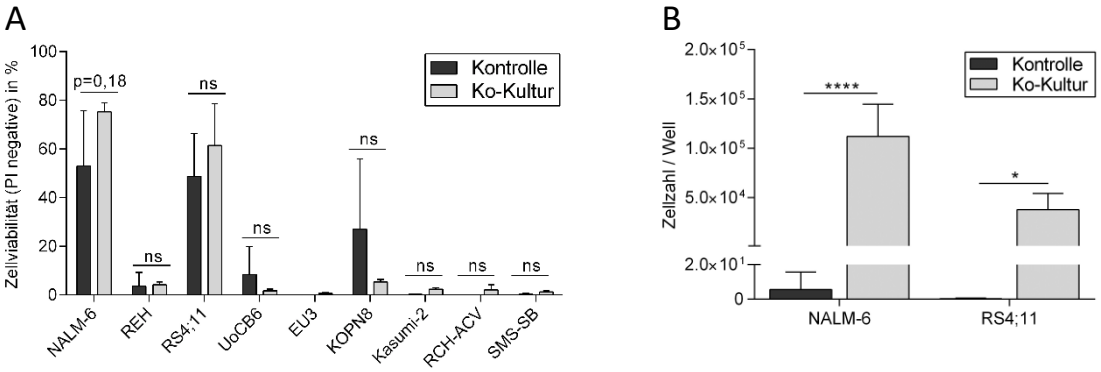


Abbildung 8: SGBS-Adipozyten unterstützen nur bestimmte Leukämiezelllinien in ihrem Überleben und ihrer Proliferation in der Ko-Kultur. NALM-6, REH, RS4; 11, UoCB6, EU3, KOPN-8, Kasumi-2, RCH-ACV und SMS-SB wurden nach Anfärbung mit CellTrace Violet in einer Ko-Kultur mit SGBS-Adipozyten oder in einer Mono-Kultur (Kontrolle) kultiviert. Nach sieben Tagen wurde die Zellviabilität (A) aller genannten Leukämiezelllinien sowie die Zellzahl pro Well nach Anfärbung mit Propidiumiodid (PI) am Durchflusszytometer bestimmt. (B) zeigt dabei die Zellzahl pro Well von NALM-6 und RS4;11. Alle Versuche wurden in DMEM/F12 Kulturmedium durchgeführt. Die Balken zeigen den Mittelwert + SD, N=4. Statistik: Two-way ANOVA - Sidak's multiple comparisons test, ns = nicht signifikant; * p-Wert ≤ 0,05; **** p-Wert ≤ 0,0001.

Um aufzuklären, ob diese Steigerung der Zellviabilität und -zahl der NALM-6-Zellen durch SGBS-Zellen zellkontaktabhängig war, oder auch indirekt über sezernierte Faktoren stattfinden konnte, wurde eine Kultivierung von NALM-6 im Transwell-Assay zusammen mit SGBS-Adipozyten durchgeführt (Abbildung 9). Dabei hatten die SGBS-Adipozyten auf die Zellviabilität und Zellzahl von NALM-6 im Transwell-Assay einen zur Ko-Kultur vergleichbaren Einfluss (Abbildung 9). An Tag 6 war eine

Tendenz zur Steigerung der Zellviabilität und -zahl der NALM-6-Zellen im Transwell-Assay und in der Ko-Kultur im Vergleich zur Kontrolle erkennbar, die sich jedoch noch nicht als signifikant im Vergleich zur Kontrolle erwies.

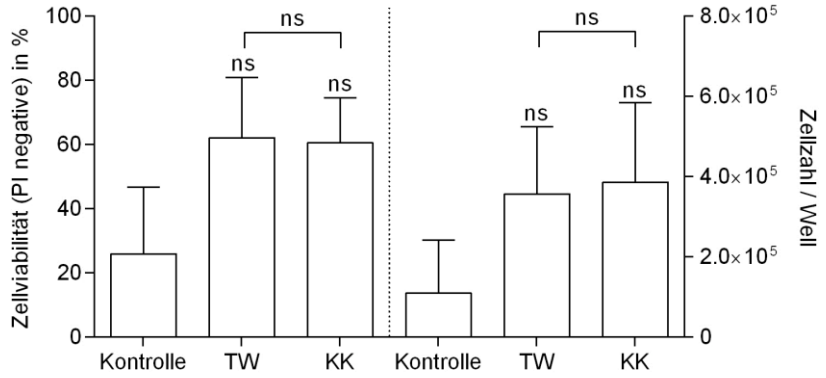


Abbildung 9: Das Überleben und die Proliferation der Leukämiezelllinie NALM-6 wird sowohl im Transwell-Assay als auch in der Ko-Kultur mit SGBS-Adipozyten unterstützt. NALM-6-Zellen wurden mit CellTrace Violet angefärbt und in der Ko-Kultur (KK) bzw. im Transwell-Assay (TW) mit SGBS-Adipozyten oder in einer Mono-Kultur (Kontrolle) kultiviert. Nach sechs Tagen wurden die NALM-6-Zellen mit Propidiumiodid (PI) angefärbt und die Zellviabilität in Prozent PI-negativer Zellen (linke y-Achse) sowie die Zellzahl pro Well (rechte y-Achse) am Durchflusszytometer ermittelt. Alle Versuche wurden in DMEM/F12 Kulturmedium durchgeführt. Die Balken zeigen den Mittelwert + SD; N=3. Statistik: One-way ANOVA - Kruskal-Wallis-Test, ns = nicht signifikant.

3.3.1.1 Leukämiezell-konditionierte Medien induzieren eine Steigerung der Genexpression von *Interleukin-6*, *-7* und *-8* in SGBS-Adipozyten

Um nicht nur den Einfluss von SGBS-Adipozyten auf Leukämiezelllinien, sondern auch umgekehrt den Einfluss von Leukämiezellen auf SGBS-Adipozyten zu untersuchen, wurde die Wirkung von Leukämiezell-konditionierten Medien (L-KM) auf die Expression der inflammatorischen Gene *IL-6*, *IL-7* und *IL-8* von SGBS-Adipozyten getestet (Abbildung 10).

Das unverdünnte konditionierte Medium von NALM-6 führte zu einer leichten Erhöhung der relativen Genexpression von *IL-7* (1,6-fach) und *IL-8* (7,6-fach). Interessanterweise induzierte das konditionierte Medium der REH-Zellen (REH-KM) die höchste Steigerung der relativen Genexpression von *IL-6* (12-fach), *IL-7* (7,6-fach) und *IL-8* (387-fach) im Vergleich zur Kontrolle und zu anderen getesteten konditionierten Medien in SGBS-Adipozyten (Abbildung 10). Der Einfluss auf die

relative Genexpression von *IL-6*, *-7* und *-8* im Vergleich zur Kontrolle war dabei in allen konditionierten Medien dosisabhängig, wobei das unverdünnte L-KM stets zu einer größeren Steigerung der relativen Genexpression führte. Bei dem L-KM der REH-Zellen stellte sich diese Steigerung als signifikant dar (Abbildung 10).

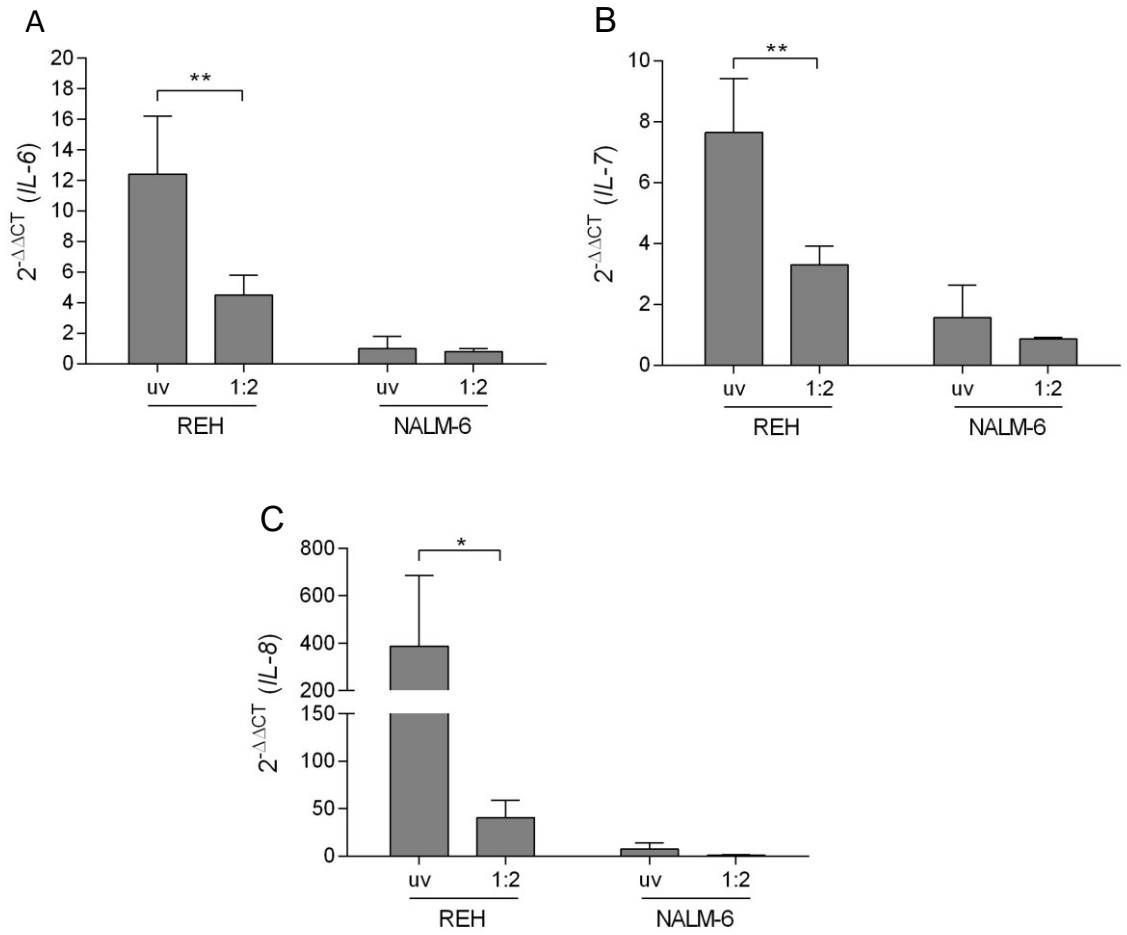


Abbildung 10: Leukämiezell-konditionierte Medien induzieren in SGBS-Adipozyten ein proinflammatorisches Genexpressionsprofil. Nach Herstellung konditionierter Medien der Zelllinien NALM-6 und REH wurden SGBS-Adipozyten für 24 Stunden in unverdünntem (uv) oder 1:2 verdünntem Leukämiezell-konditioniertem Medium sowie einem unkonditionierten Kontrollmedium kultiviert. Anschließend wurde mittels quantitativer Polymerase Kettenreaktion (qPCR) die mRNA Expression von Interleukin-6, -7 und -8 (*IL-6*,*-7* und *-8*) relativ zum Referenzgen Transkriptionsfaktor 2B (*TF2B*) der Adipozyten bestimmt und der $2^{-\Delta\Delta CT}$-Wert berechnet, wobei die Genexpression von *IL-6*, *IL-7* und *IL-8* relativ zu *TF2B* von SGBS-Zellen, welche in unkonditioniertem Medium kultiviert wurden, als Kontrolle herangezogen wurde. Die Balken zeigen den Mittelwert + SD, N=3-4. Statistik: Two-way ANOVA - Sidak's multiple comparisons test, * p-Wert ≤ 0,05; ** p-Wert ≤ 0,01.

3.3.1.2 Der Einfluss von SGBS-Präadipozyten auf B-Vorläufer-ALL-Zellen

Als nächstes sollte die Hypothese, dass Präadipozyten und Adipozyten einen unterschiedlichen Einfluss auf Leukämiezellen haben, im Zellkultur-Modellsystem getestet werden. Hierfür wurden die neun Leukämiezelllinien jeweils mit Präadipozyten bzw. Adipozyten ko-kultiviert, woran sich die Bestimmung der Zellviabilität anschloss (Abbildung 11). Dabei war die Zellviabilität aller getesteten Leukämiezelllinien in der Adipozyten-Ko-Kultur an Tag 7 und 10 nicht signifikant höher als die der Zellen des Kontrollmediums (Abbildung 11A und B). Dies bestätigte die Erkenntnis aus vorausgegangenen Experimenten, dass SGBS-Adipozyten nur ausgewählte Leukämiezelllinien in ihrem Überleben und ihrer Proliferation beeinflussen konnten (Abbildung 8). Im Gegensatz dazu führte die Ko-Kultivierung mit SGBS-Präadipozyten schon ab Tag 7 zu einer Steigerung der Zellviabilität der Leukämiezelllinien, die an Tag 10 einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle aufwies (Abbildung 11). Jedoch unterschied sich die Viabilität der Leukämiezellen in der Präadipozyten-Ko-Kultur nicht signifikant von der Adipozyten-Ko-Kultur zu beiden Messzeitpunkten.

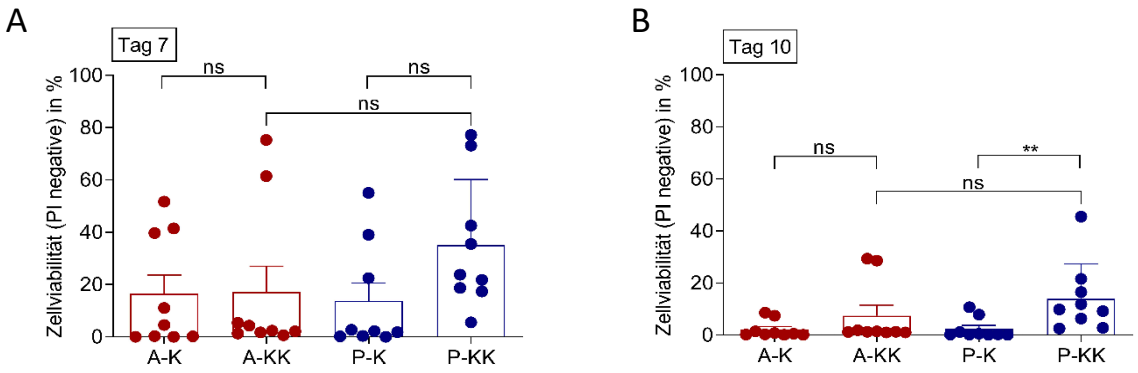


Abbildung 11: Zellviabilität neun unterschiedlicher Leukämiezelllinien nach Ko-Kultivierung mit SGBS-Adipozyten und -Präadipozyten. NALM-6, REH, RS4;11, UoCB6, EU3, KOPN-8, Kasumi-2, RCH-ACV und SMS-SB wurden nach der Anfärbung mit CellTrace Violet mit SGBS-Adipozyten (Abkürzung A, rot) bzw. -Präadipozyten (P, blau) ko-kultiviert (KK) oder in einem Kontrollmedium (K) ausgesät. An Tag 7 (A) und Tag 10 (B) wurde die Zellviabilität der Leukämiezelllinien nach der Färbung mit Propidiumiodid (PI) am Durchflusszytometer bestimmt. Jeder Punkt entspricht dabei dem Mittelwert der Zellviabilität einer Zelllinie aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Alle Versuche wurden in DMEM/F12 Kulturmedium durchgeführt. Die Balken zeigen den Mittelwert aller neun getesteten Zelllinien + SD, N=3. Statistik: One-way ANOVA – Kruskal-Wallis test, ns = nicht signifikant; ** p-Wert ≤ 0,01.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass nur das Überleben und die Proliferation der Leukämiezelllinien NALM-6 und RS4;11 durch SGBS-Adipozyten sowie -Präadipozyten unterstützt wurde. Bei allen anderen Zelllinien konnte ein allenfalls sehr kurzfristig anhaltender positiver Effekt auf das Überleben und die Proliferation beobachtet werden. Umgekehrt induzierten Leukämiezell-konditionierte Medien in SGBS-Adipozyten jedoch ein proinflammatorisches Genexpressionsprofil. Da die aus weißem Fettgewebe stammenden SGBS-Zellen nur auf wenige Leukämiezelllinien einen viabilitäts- und proliferationssteigernden Effekt hatten, wurde im nächsten Schritt der Einfluss von Zelllinien aus dem Knochenmark untersucht. Hierfür kamen die beiden Knochenmark-Stroma-Zelllinien MS-5 und OP9 zur Anwendung.

3.3.2 Der Einfluss von Adipozyten des MAT auf B-Vorläufer-ALL-Zellen

Zur Analyse der Interaktion von Adipozyten des Knochenmarks und Leukämiezelllinien wurden MS-5- oder OP9-Adipozyten jeweils mit NALM-6, REH, RS4;11, UoCB6, EU3, Kasumi-2, KOPN-8, RCH-ACV und SMS-SB ko-kultiviert.

Betrachtet man die Zellviabilität der mit MS-5-Adipozyten ko-kultivierten Leukämiezelllinien, so zeigte sich an Tag 7 bei sieben der neun getesteten eine signifikante Verbesserung im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 12A). Diese gesteigerte Zellviabilität konnte in sechs der neun Zelllinien bis zu Tag 10, zwar auf reduzierten Niveau, jedoch mit signifikanten Unterschied zur Kontrollbedingung, aufrechterhalten werden (Daten nicht gezeigt). Durch die Ko-Kultivierung der Leukämiezelllinien mit OP9-Adipozyten wurde die Zellviabilität bei zwei von neun Zelllinien signifikant gesteigert, wobei in weiteren eine Tendenz zur Steigerung im Vergleich zur Kontrolle deutlich erkennbar war (Abbildung 12A).

Bezüglich der Zellzahlen an Tag 7 verzeichnete NALM-6 und KOPN-8 den höchsten, signifikanten Anstieg in der MS-5-Ko-Kultur, jedoch zeigten ebenfalls REH, RS4;11 und EU3 eine signifikante Erhöhung (Abbildung 12B). In der Ko-Kultur mit OP9 zeigte lediglich NALM-6 eine signifikante Zellzahlsteigerung.

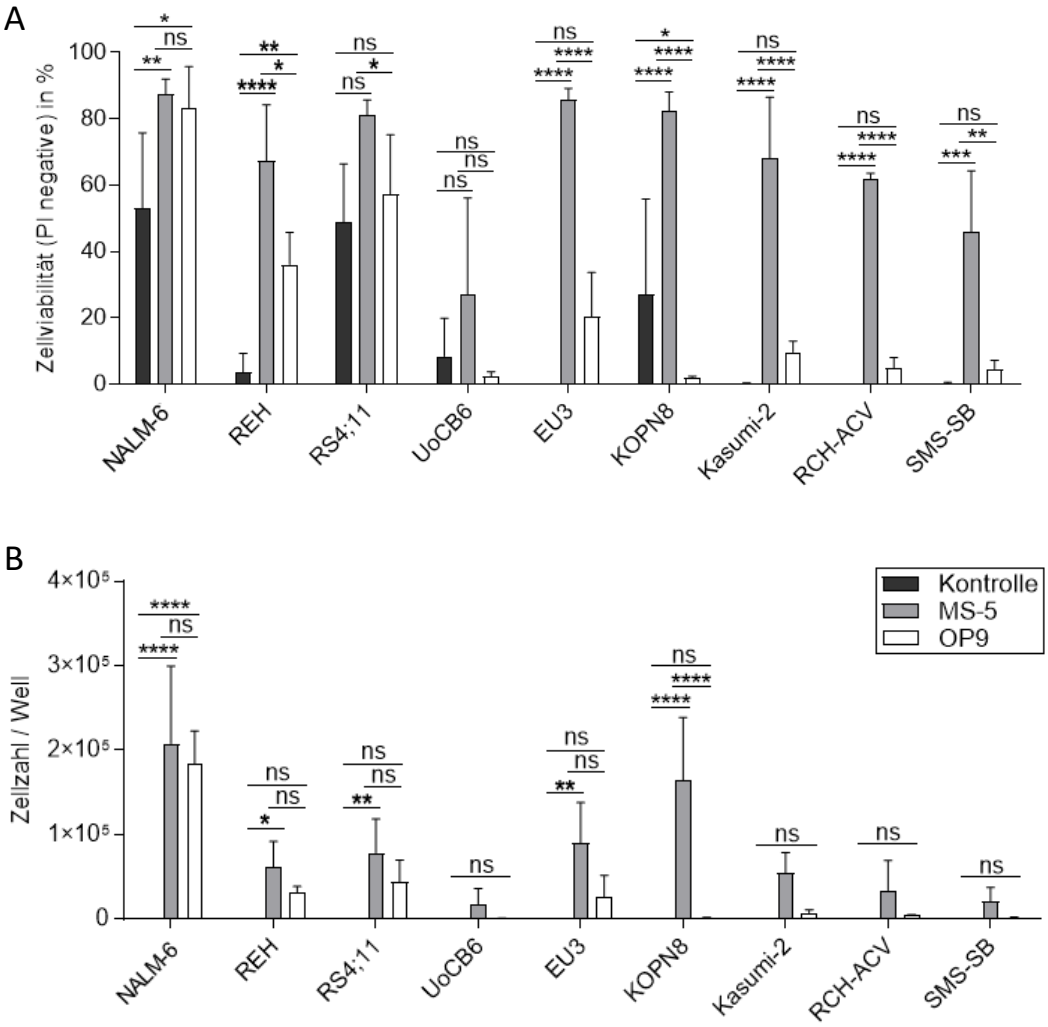


Abbildung 12: MS-5- und OP9-Adipozyten unterstützen das Überleben und die Proliferation der Leukämiezelllinien in der Ko-Kultur in unterschiedlichem Ausmaß. NALM-6, REH, RS4;11, UoCB6, EU3, KOPN-8, Kasumi-2, RCH-ACV und SMS-SB wurden nach der Anfärbung mit CellTrace Violet mit MS-5- oder OP9-Adipozyten oder in einem Kontrollmedium (Kontrolle) kultiviert. Nach sieben Tagen wurde die Zellviabilität (A) und die Zellzahl pro Well (B) der Leukämiezelllinien nach der Färbung mit Propidiumiodid (PI) am Durchflusszytometer bestimmt. Alle Versuche wurden in DMEM/F12 Kulturmedium durchgeführt. Die Balken zeigen den Mittelwert der einzelnen getesteten Zelllinien + SD, N = 3-4. Statistik: Two-way ANOVA - Turkey's multiple comparisons test, ns = nicht signifikant; * p-Wert ≤ 0,05; ** p-Wert ≤ 0,01; *** p-Wert ≤ 0,001; **** p-Wert ≤ 0,0001.

Zusammenfassend hatten MS-5-Adipozyten den größten Einfluss auf die getesteten Leukämiezelllinien. OP9-Adipozyten hatten einen signifikanten Einfluss auf NALM-6, REH und RS4;11, wobei dieser zumeist signifikant geringer im Vergleich zur MS-5-Adipozyten-Ko-Kultur ausfiel.

Des Weiteren wurde der Einfluss von MS-5- und OP9-Präadipozyten auf die Leukämiezelllinien untersucht (Abbildung 13). Dabei führte auch die Ko-Kultivierung der Leukämiezellen mit MS-5-Präadipozyten zu einer signifikanten Steigerung der Zellviabilität und -zahl im Vergleich zur Kontrolle. MS-5-Präadipozyten unterschieden sich in ihrem Einfluss auf die Leukämiezelllinien nicht signifikant von MS-5-Adipozyten. Im Gegensatz dazu wurde weder durch Ko-Kultivierung mit OP9-Adipozyten noch mit OP9-Präadipozyten die Zellviabilität sowie -zahl der Leukämiezelllinien signifikant verbessert (Abbildung 13). Einzig die Leukämiezelllinie NALM-6 (oberster Messpunkt OP9-Adipozyten-Ko-Kultur) zeigte, wie zuvor in Abbildung 12 beschrieben, in der Ko-Kultur mit OP9-Adipozyten eine Steigerung der Zellviabilität und -zahl bis zu Tag 10 (Abbildung 13).

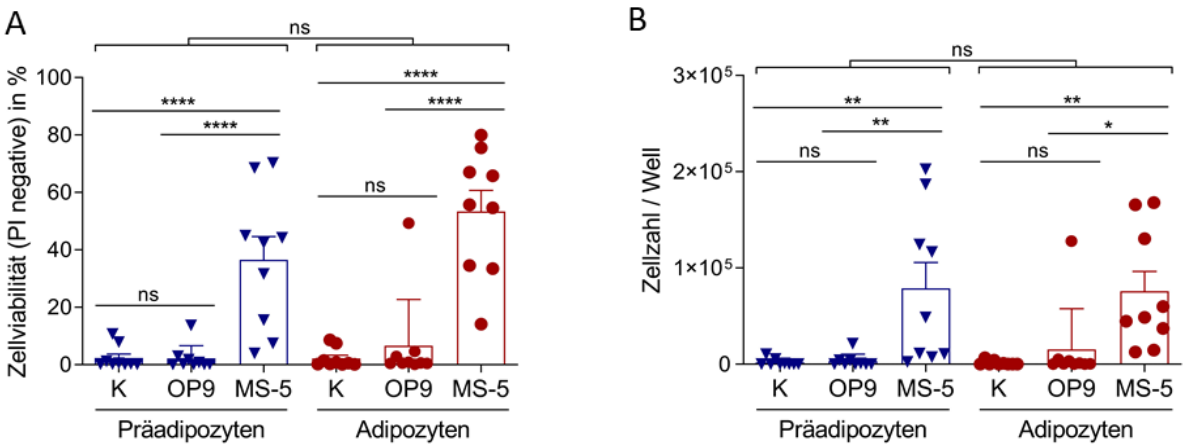


Abbildung 13: MS-5-Präadipozyten und -Adipozyten, nicht jedoch OP9-Zellen, haben eine vergleichbare supportive Einflussnahme auf das Überleben und die Proliferation der Leukämiezelllinien in der Ko-Kultur. NALM-6, REH, RS4;11, UoCB6, EU3, KOPN-8, Kasumi-2, RCH-ACV und SMS-SB wurden nach der Anfärbung mit CellTrace Violet mit MS5- oder OP9-Präadipozyten / -Adipozyten oder in einer Mono-Kultur (Kontrolle; K) kultiviert. Nach zehn Tagen wurde die Zellviabilität (A) und die Zellzahl pro Well (B) der Leukämiezelllinien in der Ko-Kultur mit MS-5- / OP9-Präadipozyten (blau) oder -Adipozyten (rot) nach der Färbung mit Propidiumiodid (PI) am Durchflusszytometer bestimmt. Dabei stellt jeder Punkt im Graphen den Mittelwert der Zellviabilität oder Zellzahl pro Well einer Zelllinie aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten dar. Die blauen / roten Fehlerbalken zeigen den Mittelwert + SEM der Zellviabilität/-zahl aller neun getesteten Leukämiezelllinien. Alle Versuche wurden in DMEM/F12 Kulturmedium durchgeführt. N=3. Statistik: Two-way ANOVA - Tukey's multiple comparisons test, ns = nicht signifikant; * p-Wert ≤ 0,05; ** p-Wert≤ 0,01; *** p-Wert ≤ 0,001; **** p-Wert ≤ 0,0001.

3.3.2.1 MS-5-(Prä-)Adipozyten unterstützen zellkontaktunabhängig eine Subgruppe von B-Vorläufer-ALL-Zelllinien

Anhand dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass MS-5-(Prä-)Adipozyten das Überleben der meisten getesteten Leukämiezelllinien bis Tag 10 verbesserten. Im nächsten Schritt sollte der zugrundeliegende Mechanismus dieses Effekts analysiert werden, wofür zellkontaktunabhängige Experimente im Transwell-Assay durchgeführt wurden. Da OP9-(Prä-)Adipozyten kaum Einfluss auf das Überleben und die Proliferation der getesteten Leukämiezelllinien hatten (Abbildung 13), wurden die Transwell-Assays nur mit MS-5-(Prä-)Adipozyten durchgeführt.

Die Zellviabilität und Zellzahl der Leukämiezelllinien EU3, Kasumi-2 und KOPN-8 wurde durch die Ko-Kultivierung mit MS-5-Präadipozyten im Vergleich zum Transwell-Assay mit Präadipozyten und zur Kontrolle signifikant erhöht (Abbildung 14). Ebenfalls fand eine meist signifikante Steigerung der Zellviabilität und -zahl von EU3 und Kasumi-2 in der Ko-Kultur mit MS-5-Adipozyten im Vergleich zum Transwell-Assay mit Adipozyten und zur Kontrolle statt (Abbildung 14).

Im Gegensatz dazu zeigte die Kultivierung von EU3 mit MS-5-Adipozyten im Transwell-Assay keine Steigerung der Zellviabilität und -zahl im Vergleich zu allen anderen Konditionen und zur Kontrolle (Abbildung 14). Interessanterweise wies KOPN-8 in der Ko-Kultur mit Adipozyten eine niedrigere Zellviabilität und -zahl im Vergleich zum Transwell-Assay mit Adipozyten auf. KOPN-8 war somit die einzige Zelllinie, die im Transwell-Assay mit Adipozyten eine tendenziell höhere Zellviabilität und -zahl besaß als in der Ko-Kultur mit Adipozyten (Abbildung 14).

Insgesamt wiesen alle drei getesteten Leukämiezelllinien ein signifikant verbessertes Überleben in der Ko-Kultur mit MS-5-(Prä-)Adipozyten auf, was die Ergebnisse vorheriger Experimente bestätigte (Abbildung 12A und B). Zudem zeigte sich zumeist ein signifikanter Unterschied zwischen der Zellviabilität der Leukämiezellen im Transwell-Assay im Vergleich zur Ko-Kultur.

Ob die Zellviabilität und -zahl durch eine direkte (Ko-Kultur) oder indirekte (Transwell) Interaktion mit MS-5-(Prä-)Adipozyten verbessert wurde, hing von der jeweils getesteten Leukämiezelllinie ab. Eine verallgemeinernde Aussage bezüglich des Interaktionsmechanismus ist daher zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich.

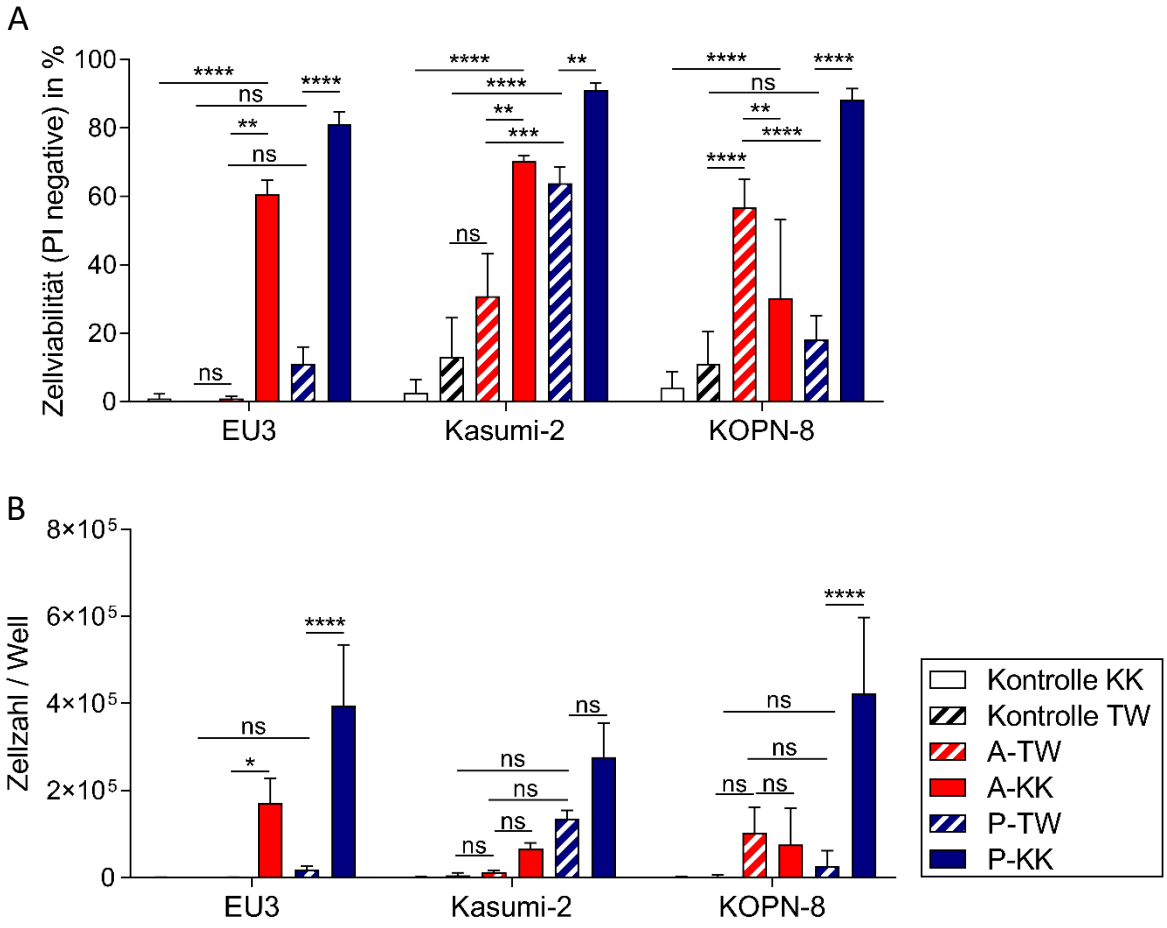


Abbildung 14: **Das Überleben und die Proliferation der Leukämiezelllinien EU3, Kasumi-2 und KOPN-8 wird durch MS-5-(Prä-)Adipozyten in der Ko-Kultur und im Transwell-Assay unterschiedlich beeinflusst.** EU3, Kasumi-2 und KOPN-8 wurden nach der Anfärbung mit CellTrace Violet mit MS5-Präadipozyten (Abk. P; blau) oder -Adipozyten (Abk. A; rot) in einer Ko-Kultur (KK), im Transwell-Assay (TW), oder in DMEM/F12 als entsprechende Kontrolle kultiviert. Nach sieben Tagen wurden die Zellviabilität (A) und Zellzahl pro Well (B) der Leukämiezelllinien in der Ko-Kultur oder im Transwell-Assay mit MS5-Präadipozyten oder -Adipozyten nach der Färbung mit Propidiumiodid (PI) am Durchflusszytometer bestimmt. Alle Versuche wurden in DMEM/F12 Kulturmedium durchgeführt. Die Balken zeigen den Mittelwert + SD, N = 3. Statistik: Two-way ANOVA - Tukey's multiple comparisons test, ns = nicht signifikant; * p-Wert ≤ 0,05; ** p-Wert ≤ 0,01; *** p-Wert ≤ 0,001; **** p-Wert ≤ 0,0001.

3.3.2.2 B-Vorläufer-ALL-Zellen induzieren einen proinflammatorischen Status in MS-5-(Prä-)Adipozyten

Um herauszufinden, ob Leukämiezelllinien einen Einfluss auf MS-5-Zellen hatten, wurde eine Analyse der relativen Genexpression von (Prä-)Adipozyten nach der Kultivierung im Transwell-Assay durchgeführt (Abbildung 15). Der Einfluss von Kasumi-2 und KOPN-8 auf die relative Genexpression von *Il-6* und dem Chemokin *Mcp-1* in MS-5-Präadipozyten erwies sich gegenüber der Kontrolle als gering. Durch

die Ko-Kultivierung mit EU3 wurde *Mcp-1* in Präadipozyten jedoch auf das 2,5-fache gesteigert.

Ebenfalls stieg die Expression von *Il-6* in den MS-5-Adipozyten auf das 2,2- bis 2,5-fache im Transwell-Assay mit EU3, Kasumi-2 bzw. KOPN-8 an. Interessanterweise stieg *Mcp-1* in Adipozyten im Transwell-Assay mit EU3 auf das 16,6-fache an.

Somit konnte gezeigt werden, dass die Leukämiezelllinien EU3, Kasumi-2 und KOPN-8 einen proinflammatorischen Genexpressionsstatus in MS-5-Adipozyten induzieren.

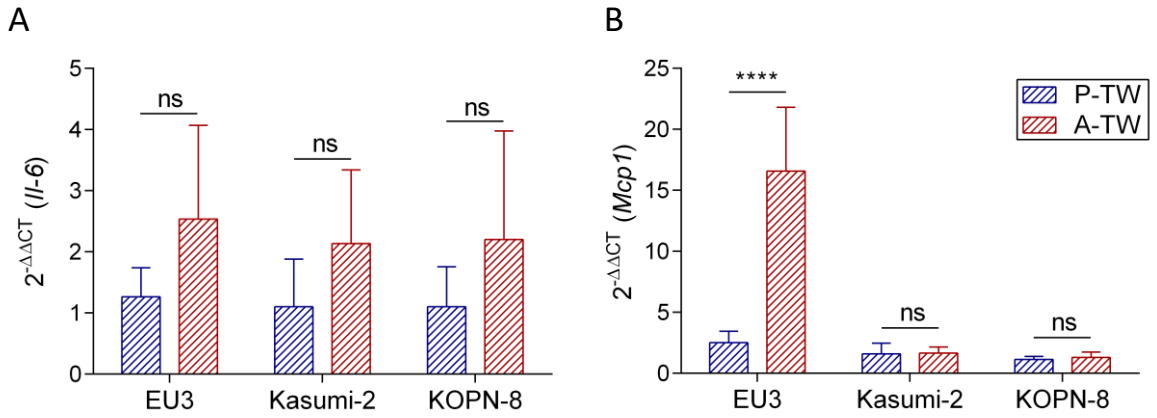


Abbildung 15: Die Leukämiezelllinien EU3, Kasumi-2 und KOPN-8 induzieren in MS-5-Adipozyten einen proinflammatorischen Genexpressionsstatus. EU3, Kasumi-2 und KOPN-8 wurden nach der Anfärbung mit CellTrace Violet in Transwell-Assays mit MS-5-Adipozyten und -Präadipozyten kultiviert. Nachdem die Leukämiezelllinien zur Analyse am Durchflusszytometer nach sieben Tagen aus den Transwell-Einsätzen entfernt wurden, wurde mittels quantitativer real-time Polymerase Kettenreaktion (qPCR) die mRNA Expression von Interleukin-6 (*Il-6*) und Monocyte chemoattractant protein-1 (*Mcp-1*) relativ zum Referenzgen Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (*Hprt*) von Präadipozyten (blau) und Adipozyten (rot) bestimmt. Anschließend wurde der $2^{-\Delta\Delta CT}$-Wert von *Il-6* (A) und *Mcp-1* (B) berechnet, wofür als Kontrolle die entsprechende relative Genexpression der MS-5-(Prä-)Adipozyten im Kontrollmedium ohne Leukämiezellen herangezogen wurde. Die Balken zeigen den Mittelwert + SD, N=3. Statistik: Two-way ANOVA - Tukey's multiple comparisons test, ns = nicht signifikant; **** p-Wert ≤ 0,0001.

Fasst man die Ergebnisse des Kapitels 3.2.1 und 3.3.2 zusammen, so wurde zunächst ein serumfreies, adipogenes Differenzierungsprotokoll für die murinen Knochenmark-Zelllinien MS-5 und OP9 etabliert und die adipogenen Eigenschaften dieser Zellen nach deren Differenzierung untersucht (Abbildung 7 und Anhang 1). Nachdem gezeigt wurde, dass das Zellkultur-Modellsystem mit DMEM/F12 für die murinen Knochenmarkzelllinien geeignet war (Anhang 2), konnte in Ko-Kultur Experimenten mit MS-5-Adipozyten bzw. -Präadipozyten und neun BCP-ALL-

Zelllinien das signifikant verbesserte Überleben der Leukämiezellen in der Ko-Kultur im Vergleich zur Kontrolle ermittelt werden (Abbildung 12 und Abbildung 13). Im Gegensatz dazu wurde das Überleben und die Proliferation durch den Einfluss von OP9-Präadipozyten und -Adipozyten nur bei einzelnen Leukämiezelllinien gesteigert (Abbildung 12 und Abbildung 13).

In Transwell-Assays konnte gezeigt werden, dass das verbesserte Überleben der Leukämiezelllinien vor allem vom Zellkontakt mit MS-5-(Prä-)Adipozyten abhängig war, jedoch auch über sezernierte Faktoren erreicht wurde (Abbildung 14). Dabei hatten nicht nur die MS-5-Zellen einen Einfluss auf die Leukämiezelllinien. Umgekehrt fand eine Erhöhung der relativen Expression der inflammatorischen Gene *Il-6* und *Mcp-1* in MS-5-Adipozyten nach der Ko-Kultivierung mit Leukämiezelllinien statt (Abbildung 15).

3.3.3 (Prä-)Adipozyten des WAT und MAT verbessern das Überleben bestimmter Xenograft-Proben

In den vorherigen Kapiteln konnte der positive Einfluss von humanen SGBS- und murinen MS-5-Präadipozyten und -Adipozyten auf das Überleben und die Proliferation bestimmter Leukämiezelllinien gezeigt werden. Zur Verifizierung dieser Ergebnisse wurde nun der Einfluss von humanen SGBS- und murinen MS-5-(Prä-)Adipozyten auf primäre Leukämiezellen getestet. Die gentechnisch nicht veränderten und aus Patientenblutproben stammenden, primären Leukämiezellen wurden zunächst zur Vervielfältigung in Mäuse transplantiert und später isoliert, wobei diese dann als Xenograft-Proben bezeichnet werden. Die Xenograft-Proben wurden von Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin und Prof. Dr. Lüder-Hinrich Meyer (Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Ulm) zur Verfügung gestellt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Xenograft-Proben mit MS-5- bzw. SGBS-Adipozyten oder -Präadipozyten ko- oder in DMEM/F12 mono-kultiviert (Kontrolle). Zu definierten Zeitpunkten fand die Bestimmung der Zellviabilität, Zellzahl und mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) statt. Die Zellviabilität der Xenograft-Proben (X) 002, 089, 132, 133, 036 und 187 ist in Abbildung 16 zu sehen. Hier zeigt sich, dass bestimmte Xenograft-Proben (z.B. X002, X089) eine sehr geringe Zellviabilität in allen genannten Konditionen aufwiesen und nur ein geringer Unterschied zwischen den Leukämiezellen in der Ko-Kultur und der Mono-Kultur über den

gesamten Zeitverlauf vorhanden war (Abbildung 16A und B). Ganz anders gestaltete sich die Zellviabilität der Proben X132 und X133 (Abbildung 16C und D), die in allen Ko-Kulturen einen deutlichen Unterschied gegenüber der Kontrolle aufwiesen. Dabei zeigten diese beiden Xenograft-Proben in der Ko-Kultur mit MS-5-Präadipozyten im gesamten Zeitverlauf die höchste Zellviabilität im Vergleich zu

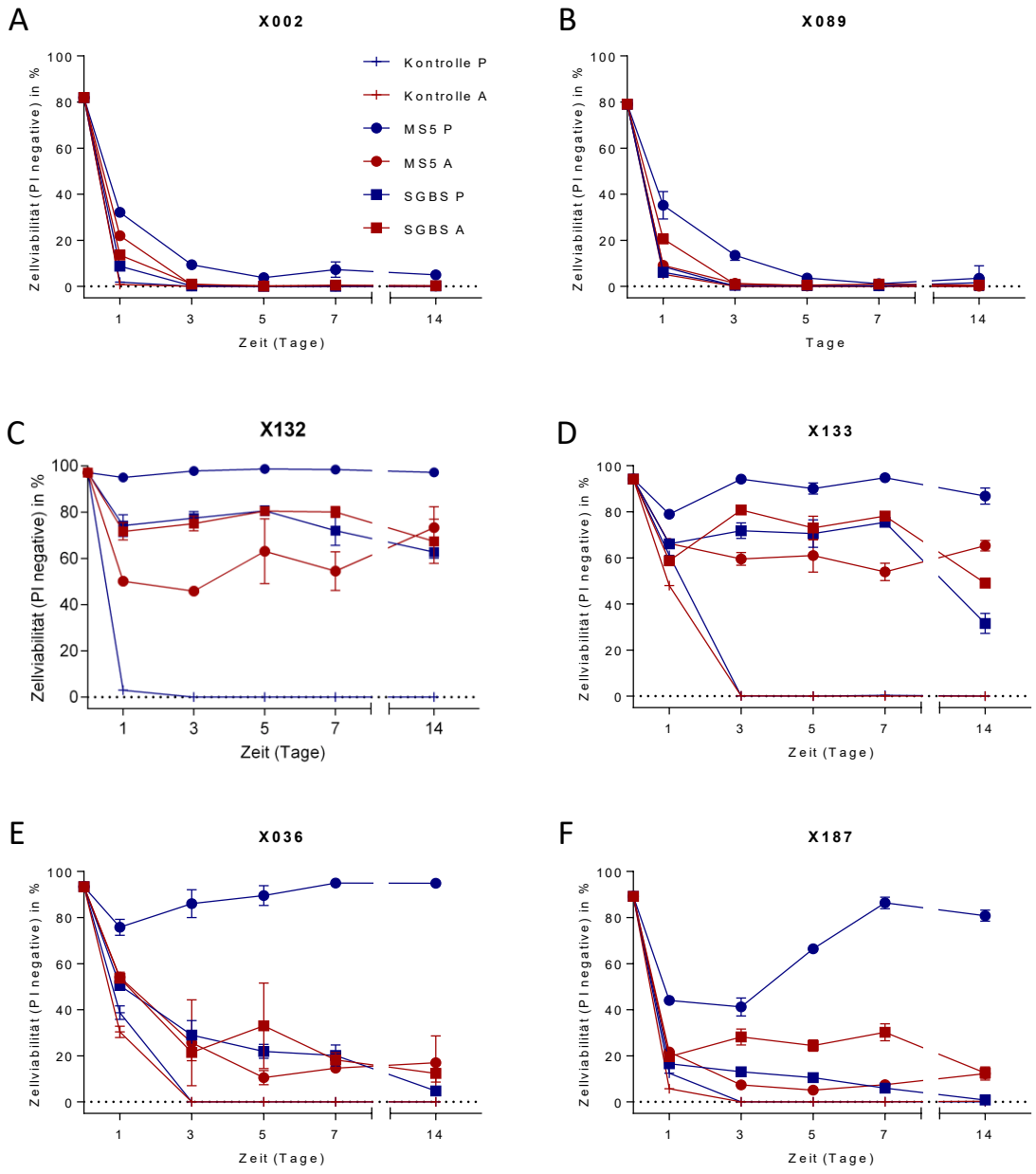


Abbildung 16: Xenograft-Proben werden in Ko-Kulturen mit MS-5- und SGBS-(Prä-)Adipozyten unterschiedlich in ihrem Überleben unterstützt. Die Xenograft-Proben (X) 002, 089, 132, 133, 036 und 187 wurden nach Anfärbung mit CellTrace Violet mit SGBS- oder MS-5-Präadipozyten (blau)/-Adipozyten (rot) ko- oder in einem Kontrollmedium (Kreuz) mono-kultiviert. Nach 1, 3, 5, 7 und 14 Tagen wurde die Zellviabilität von X002 (A), X089 (B), X132 (C), X133 (D), X036 (E) und X187 (F) nach der Färbung mit Propidiumiodid (PI) am Durchflusszytometer bestimmt. Jeder Punkt entspricht dabei dem Mittelwert aus Triplikaten einer Messung der jeweiligen Xenograft-Probe zum angegebenen Messzeitpunkt ± SD. Alle Versuche wurden in DMEM/F12 Kulturmedium durchgeführt.

allen anderen Ko-Kulturen und zur Kontrolle. Die Xenograft-Probe 187 wies die Besonderheit auf, dass die Zellviabilität in der MS-5-Präadipozyten-Ko-Kultur zunächst bis Tag 3 absank, sich in den darauffolgenden Tagen jedoch wieder erholte und auf hohe Werte anstieg (Abbildung 16F). In den anderen Ko-Kulturen sowie in der Kontrolle fand diese Erholung nicht statt (Abbildung 16F). Die Übersicht der Viabilität aller 23 getesteten Xenograft-Proben ist in Anhang 3 dargestellt.

Zusätzlich zur Zellviabilität wurde, nach Anfärbung der Xenograft-Proben mit CT Violet, die MFI der lebenden Zellen ermittelt. In der Ko-Kultur mit MS-5-Präadipozyten fand eine signifikante Reduktion der MFI der Xenograft-Proben nach sieben Tagen gegenüber der Kontrolle statt (Abbildung 17A). Durch die geringere Proliferation der Xenograft-Proben in der MS-5-Adipozyten Ko-Kultur lag die MFI dieser Xenograft-Proben im Vergleich zur Ko-Kultur mit MS-5-Präadipozyten signifikant höher. Die Xenograft-Proben im Kontrollmedium zeigten passend dazu im Mittel eine signifikant höhere MFI als die der beiden anderen Gruppen (Abbildung 17A).

Betrachtet man die Zellzahl aller getesteten Xenograft-Proben, so zeigten sich im Mittel die höchsten Zellzahlen in der Ko-Kultur mit MS-5-Präadipozyten, die zudem

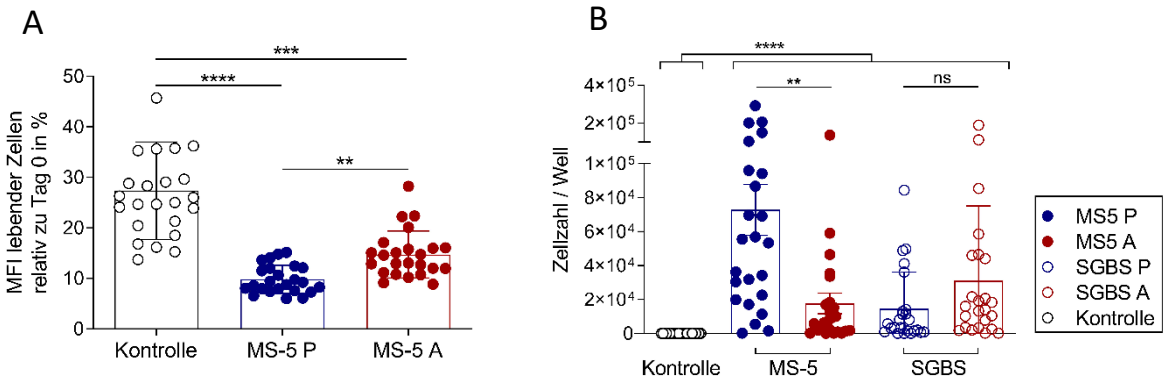


Abbildung 17: Die Proliferation der Xenograft-Proben wird durch Ko-Kultivierung signifikant gesteigert. Die 23 verschiedenen Xenograft-Proben (X) 120, 116, 132, 133, 055, 076, 229, 006, 121, 135, 112, 170, 139, 018, 187, 245, 036, 068, 142, 024, 015, 002 und 089 wurden auf SGBS-Präadipozyten (blauer Kreisumriss), SGBS-Adipozyten (roter Kreisumriss), MS-5-Präadipozyten (blau gefüllter Kreis), MS-5-Adipozyten (rot gefüllter Kreis) oder in einem Kontrollmedium (schwarzer Kreisumriss) kultiviert. Nach siebentägiger Kultivierung wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) relativ zu Tag 0 in Prozent (A), sowie die Zellzahl pro Well (B) der Xenograft-Proben nach der Färbung mit Propidiumiodid am Durchflusszytometer bestimmt. Dabei stellt jeder Punkt im Graphen den Mittelwert aus Triplikaten der MFI relativ zu Tag 0 oder den Mittelwert aus Triplikaten der Zellzahl pro Well einer Xenograft-Probe nach Kultivierung in der entsprechenden Kondition an Tag 7 dar. Die blauen und roten Fehlerbalken zeigen den Mittelwert ± SEM der MFI / Zellzahl pro Well aller 24 getesteten Xenograft-Proben. N=3. Statistik: Kruskal-Wallis Test, ns = nicht signifikant; ** p-Wert ≤ 0,01; *** p-Wert ≤ 0,001; **** p-Wert ≤ 0,0001.

signifikant höher als in der Ko-Kultur mit MS-5-Adipozyten waren (Abbildung 17B). Die Zellzahlen der Xenograft-Proben in der Ko-Kultur mit SGBS-Adipozyten und -Präadipozyten waren nicht signifikant verschieden. Insgesamt war der Mittelwert der Zellzahlen der Xenograft-Proben in allen Ko-Kulturen gegenüber der Kontrolle jeweils signifikant höher.

Um näher zu charakterisieren, was Leukämiezellen zum Überleben in einer Adipozyten-Ko-Kultur befähigt, wurden die Proben anhand ihrer Überlebensfähigkeit in unterschiedliche Gruppen eingeteilt (Abbildung 18). Dabei wurden die Xenograft-Proben, die sowohl in der Ko-Kultur mit SGBS-Adipozyten als auch mit MS-5-Adipozyten eine Zellviabilität von über 40 % aufwiesen, der Gruppe

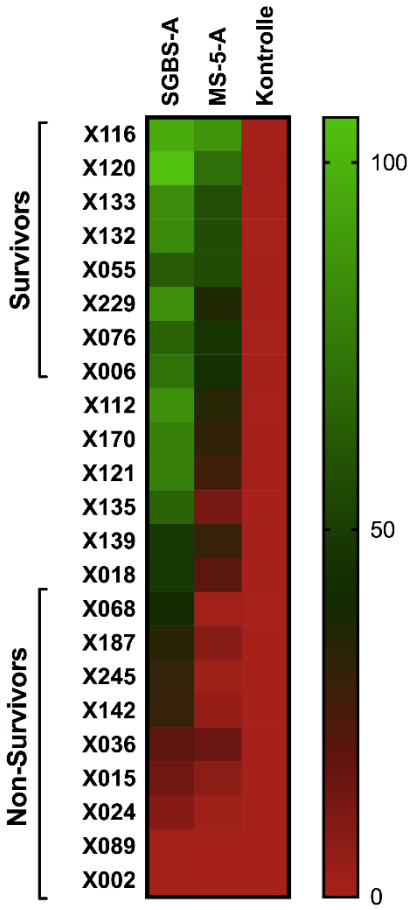


Abbildung 18: Xenograft-Proben können auf Grundlage ihres Überlebens in der Ko-Kultur mit SGBS- und MS-5-Adipozyten in Survivors und Non-Survivors unterteilt werden. Die 23 verschiedenen Xenograft-Proben (X) 120, 116, 132, 133, 055, 076, 229, 006, 121, 135, 112, 170, 139, 018, 187, 245, 036, 068, 142, 024, 015, 002 und 089 wurden nach der Anfärbung mit CellTrace Violet auf SGBS-Adipozyten (SGBS-A) und MS-5-Adipozyten (MS-5-A) oder in Mono-Kultur (Kontrolle) kultiviert. Nach sieben Tagen wurde die Zellviabilität der angegebenen Xenograft-Proben nach der Färbung mit Propidiumiodid (PI) am Durchflusszytometer bestimmt und auf den Hintergrundzelltod normalisiert. Niedrige Zellviabilitätswerte werden durch die Farbe Rot, hohe Zellviabilitätswerte durch die Farbe Grün dargestellt. Alle Versuche wurden in DMEM/F12 Kulturmedium durchgeführt.

der Überlebenden/Survivors, die Xenograft-Proben mit einer Zellviabilität von unter 40 % in beiden zuvor genannten Ko-Kulturen der Gruppe der Nicht-Überlebenden (Non-Survivors) zugeteilt (Abbildung 18).

Alle anderen Xenograft-Proben, deren Zellviabilität nicht in beiden Ko-Kulturen über oder unter 40 % lag, konnten keiner der beiden Gruppen zugeteilt werden und blieben unklassifiziert (Abbildung 18). Ein Beispiel hierfür war X112, dessen Zellviabilität in der SGBS-Adipozyten-Ko-Kultur über 80 %, jedoch in der MS-5-Adipozyten-Ko-Kultur unter 35 % lag.

3.3.3.1 Das verbesserte Überleben der Xenograft-Survivors durch Adipozyten korreliert mit einer hohen Expression proinflammatorischer Gene in BCP-ALL-Xenograft-Proben

Um die Ursache der überlegenen Zellviabilität mancher Xenograft-Proben in der Ko-Kultur im Vergleich zu anderen getesteten Xenograft-Proben zu ergründen, wurde die basale Genexpression von Xenograft-Proben mit guter Überlebenskapazität (Survivors) mit der Genexpression von Xenograft-Proben mit schlechter Überlebenskapazität (Non-Survivors) mittels GSEA verglichen (Genexpressionsprofile der Xenograft-Proben stammen von Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin und Prof. Dr. Lüder-Hinrich Meyer, Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Ulm). Das Ziel war dabei, mögliche Signalwege zu identifizieren, die das Überleben der Leukämiezellen auf Adipozyten ermöglichen. Bei dieser Analyse zeigte sich, dass unter den Genen, die in der Gruppe der Survivors am höchsten exprimiert waren, u.a. das Interleukin-6-Rezeptor-Gen (*IL6R*) zu finden war (Abbildung 19). Im Gegensatz dazu war die Expression des *IL6R* in den Xenograft Non-Survivors deutlich erniedrigt.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass sowohl MS-5-Adipozyten und -Präadipozyten als auch SGBS-Adipozyten und -Präadipozyten das Überleben und die Proliferation einer Gruppe von BCP-ALL-Xenograft-Proben bis zu vierzehn Tage aufrechterhalten können. Anhand ihrer Überlebenskapazität in Adipozyten-Ko-Kulturen konnten Xenograft-Proben der Gruppe der Survivors oder Non-Survivors zugeteilt werden. Interessanterweise zeigte die Gruppe der Xenograft-Survivors in der GSE-Analyse eine erhöhte basale Expression des Interleukin-6-Rezeptors im Vergleich zu den Xenograft-Non-Survivors.

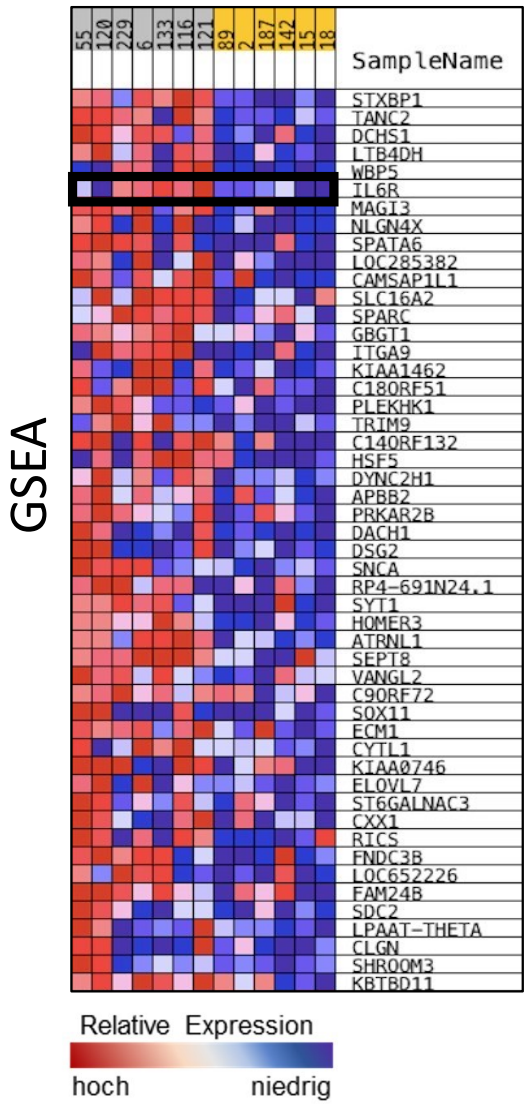


Abbildung 19: Das Interleukin-6-Rezeptor-Gen wird in der Kohorte der Xenograft-Survivors im Vergleich zu den Non-Survivors der Adipozyten-Xenograft-Ko-Kultur vermehrt exprimiert. Die basale Genexpression aus vorliegenden Genexpressionsprofilen der Xenograft-Survivor und Non-Survivor wurde mittels Gene Set Enrichment Analysen (GSEA) verglichen. Entsprechend der Farbskala im unteren Teil der Abbildung wird eine hohe Expression der Gene durch die Farbe Rot, eine niedrige durch die Farbe Blau dargestellt. Die basale Genexpression des Interleukin-6-Rezeptors (*IL6R*) der Xenograft Survivors (linke Spalte) und Non-Survivors (rechte Spalte) wurde mit Hilfe einer Markierung hervorgehoben.

4 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob Adipozyten das Überleben und die Proliferation von BCP-ALL-Zellen verbessern können, und ob Leukämiezellen sowohl mit Adipozyten des weißen Fettgewebes als auch mit Adipozyten des Knochenmarks interagieren. Zudem sollte die Frage beantwortet werden, ob diese Interaktion zu einer Veränderung der Eigenschaften von Adipozyten und BCP-ALL-Zellen führt und ob sich die Adipozyten des weißen Fettgewebes von denen des Knochenmarks bezüglich der Interaktion und Einflussnahme auf das Überleben und die Proliferation der BCP-ALL-Zellen unterscheiden.

Um diese Fragen beantworten zu können, wurden in dieser Arbeit folgende Arbeitsaufträge erfüllt:

1. Etablierung eines standardisierten, kontrollierten Adipozyten-Leukämiezell-Ko-Kultur Systems, das die Erforschung der Interaktion beider Zellarten ermöglicht, ohne diese maßgeblich zu beeinflussen.

2. Durchführung zellkontaktabhängiger, sowie -unabhängiger Experimente zur Untersuchung des Mechanismus der Interaktion von Adipozyten und B-Vorläufer-ALL-Zellen.

3. Vergleich des Einflusses von weißem Fettgewebe (WAT) und Knochenmarkfettgewebe (MAT) auf B-Vorläufer-ALL-Zelllinien und B-Vorläufer-ALL-Xenograft-Proben.

4.1 Methodik

4.1.1 Herausforderungen der Etablierung einer Ko-Kultur

Im Rahmen der Etablierungsarbeit wurde ein standardisiertes, kontrolliertes Adipozyten-Leukämiezell-Ko-Kultur-Modellsystem entwickelt, das die Erforschung der Interaktion beider Zellarten ermöglichen sollte. Hierfür musste zunächst ein für beide Zellarten passendes Kulturmedium gefunden werden, welches die Zellen bestmöglich unterstützt, ohne diese jedoch in ihrer Interaktion zu beeinflussen. Dabei wurden sowohl leukämiezelltypische Medien wie AIMV und RPMI als auch die Kulturmedien 0F und 3FC von (Prä-)Adipozyten verwendet (Abbildung 4). Da durch die leukämiezelltypischen Kulturmedien eine Suppression adipozytenspezifischer Gene sowie eine Steigerung der Expression inflammatorischer Gene in Adipozyten stattfand, waren diese nicht für Experimente geeignet (Abbildung 4). Die Leukämiezelllinie NALM-6 zeigte in den adipozyten-typischen Kulturmedien eine stabile Zellviabilität, jedoch eine verminderte Proliferation im Vergleich zur Kultivierung in Leukämiezellkulturmedien (Abbildung 4). Die mangelnde Proliferation stellte bei der Durchführung der Experimente jedoch keinen Nachteil dar, da, unter Gewährleistung einer guten Zellviabilität, der Mangel an Proliferation genutzt wurde, um den positiven Einfluss der SGBS-Adipozyten auf Leukämiezellen im Sinne einer Proliferationssteigung nach einer Interaktion der beiden Zellarten zu detektieren. In einem nächsten Schritt sollte der Einfluss der Kulturmedien 0F und 3FC sowie der in 3FC enthaltenen Differenzierungsfaktoren auf unterschiedliche Leukämiezelllinien getestet werden.

Hierfür wurden die vier Leukämiezelllinien NALM-6, REH, RS4;11 und UoCB6 in den Medien kultiviert, die bei der SGBS-Zellkultur und der Differenzierung von SGBS-Zellen in Adipozyten zur Anwendung kommen (DMEM/F12, 0F, 3FC, QD). Dabei zeigte sich eine eindeutige Einflussnahme auf die Zellviabilität und -zahl aller Leukämiezelllinien durch die Differenzierungsfaktoren Insulin, Cortisol, Dexamethason, IBMX und Transferrin, die in den Differenzierungsmedien QD und 3FC enthalten sind (Abbildung 5).

Insgesamt bedeutete dies, dass Experimente in einem Kulturmedium mit einer möglichst geringen Anzahl an Zusätzen durchgeführt werden sollten. Zudem sollten

eventuell vorhandene Residuen adipogener Differenzierungsfaktoren auf ein Minimum reduziert werden.

Für Ko-Kultur-Experimente wurden die SGBS-Zellen zunächst gemäß des standardisierten Differenzierungsprotokolls in reife Adipozyten differenziert (Abbildung 3 und Abbildung 6). Um bei dem sich anschließenden Medienwechsel mögliche 3FC-Residuen zu entfernen, wurde nach dessen Abnahme und vor Zugabe von DMEM/F12 an Tag 14 ein zweimaliger Waschschritt mit DPBS eingeführt. DMEM/F12 wurde als Grundmedium für die Ko-Kultur und Transwell-Assays verwendet, da dieses im Vergleich zu 3FC und 0F frei von Zusätzen war. Da die Ko-Kultur über einen Zeitraum von zehn Tagen durchgeführt wurde, fand eine Analyse des Einflusses einer zehntägigen Kultivierung der SGBS-Adipozyten in DMEM/F12 auf deren Morphologie, Gen- sowie Proteinexpression statt (Abbildung 6). Auf Grund einer nur geringgradigen Reduktion der Anzahl reifer Adipozyten, sowie die sich, nach kurzzeitigem Abfall stabilisierende Expression adipozytenspezifischer Gene, erwies sich DMEM/F12 als geeignetes Kulturmedium für SGBS-Zellen. Dies konnte ebenfalls für die murinen Knochenmarkzelllinien OP9 und MS-5 gezeigt werden (Anhang 1, Anhang 2). Daraus lässt sich schließen, dass SGBS-/MS-5- und OP9-Adipozyten auch nach zehntägiger Kultivierung in DMEM/F12 durch die Expression adipozytenspezifischer Gene noch ihre typischen Charakteristiken aufweisen und somit Adipozyten auf Leukämiezellen in der Ko-Kultur wirken.

Da DMEM/F12 sowohl für Leukämiezellen (Abbildung 5) als auch für SGBS-, MS-5- und OP9-Zellen (Abbildung 6, Anhang 1 und Anhang 2) geeignet war, wurde dieses als Kulturmedium für Ko-Kultur und Transwell-Assays festgelegt.

In der für diese Arbeit relevanten Literatur sind wenig Verweise auf adipogene Differenzierungsfaktoren und deren mögliche Beeinflussung der Leukämiezell-Viabilität zu finden. Dabei konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass adipogene Differenzierungsfaktoren diverse Einflüsse auf Leukämiezelllinien haben und diese sich zwischen den verschiedenen Zelllinien unterscheiden (Abbildung 5). Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass die zum Teil sehr kontroversen Ergebnisse in bereits publizierten Studien bezüglich der Einflussnahme von Adipozyten auf Leukämiezellen auch durch die unterschiedlichen Kulturbedingungen bedingt sind (siehe Kapitel 1.4).

Vergleicht man die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse mit der entsprechenden Literatur, fällt auf, dass in einigen Studien für die Herstellung von L-KM das Grundmedium DMEM und das Leukämiezellmedium RPMI mit Zugabe von FCS oder BSA verwendet wurde [33, 65, 96, 117]. In publizierten Studien wurde bei der Durchführung von Transwell-Assays RPMI mit FCS-Zusatz genutzt, für das in Abbildung 4 eine Beeinträchtigung der Genexpression reifer Adipozyten nachgewiesen wurde [98, 117]. Gleiches ist für die Ko-Kultur von Leukämiezellen und Adipozyten im T-ALL-Kulturmedium, das FCS und Humanserum enthält, anzunehmen [7, 20]. Zudem wurden Ko-Kultur-Experimente in Proliferations- oder Differenzierungsmedien untersucht, die unterschiedliche Konzentrationen an FCS oder BSA, aber auch andere Differenzierungsfaktoren, wie z.B. Insulin oder Cortisol enthielten [11, 16, 20, 33, 88, 114]. Aus der Literatur geht nicht hervor, dass vor Ko-Kultivierung von reifen Adipozyten mit Leukämiezellen Reste des Differenzierungsmediums durch Waschschritte entfernt wurden, um so einen möglichen Einfluss von Differenzierungsfaktoren auf die Leukämiezellen zu verhindern [11, 88, 114]. Hierbei ist erwähnenswert, dass Faktoren wie Cortisol oder Insulin multiple Einflüsse auf verschiedenste Krebsarten haben können und die Glucokortikoidsensibilität der Lymphoblasten bei der ALL eine wichtige Rolle für die Risikostratifizierung der Erkrankung spielt [64, 103]. In einigen Studien lassen sich kaum Angaben zu den Kulturbedingungen der Ko-Kultur-Experimente finden. Es scheint so, dass Leukämiezellen und (Prä-)Adipozyten jeweils in ihren eigenen Medien gemeinsam kultiviert wurden, was wiederum zu zuvor genannter Problematik führen kann [116, 117].

Zudem ist die Auswahl einer geeigneten Kontrolle von wichtiger Bedeutung. In der relevanten Literatur sind hierfür nahezu keine Angaben zu finden. Medienzusätze wie Differenzierungsfaktoren, BSA, aber auch FCS werden jedoch von Zellen gebunden und verbraucht [40, 100]. Befinden sich nun zwei Zellarten in einem System, so binden und verbrauchen diese mehr Faktoren als in einer Mono-Kultur, die als Kontrolle verwendet wird. Dadurch stehen den Zellen in der Mono-Kultur unter anderem mehr Wachstumsfaktoren zur Verfügung als den entsprechenden Zellen in der Ko-Kultur. Dies bedeutet, dass Effekte in der Ko-Kultur unter Umständen dadurch maskiert werden, dass die Zellen der Kontrolle durch eine höhere verfügbare Menge an Faktoren ebenfalls in ihrem Wachstum unterstützt wurden. Daher führt die Verwendung von FCS-versetzten Kulturmedien in der Ko-

Kultur und im Transwell-Assay zu Schwierigkeiten bei der Auswahl der geeigneten Kontrolle [33, 116, 117]. Welche Kontrolle dabei jedoch ausgewählt wurde, kann den entsprechenden Methoden meist nicht entnommen werden. In dieser Arbeit wurde auf die Zugabe von FCS verzichtet, um oben genannte Problematik zu umgehen.

Zu erwähnen ist zudem, dass in dieser Arbeit unterschiedliche Messzeitpunkte betrachtet wurden. Während der Etablierung wurden zunächst frühe Zeitpunkte (Tag 2 und Tag 4) zur Analyse des Einflusses von Zellkulturmedien auf das Überleben der Leukämiezellen bzw. auf die Genexpression von (Prä-)Adipozyten gewählt. In weiteren Etablierungsschritten konnte gezeigt werden, dass SGBS-/MS-5- und OP9-Adipozyten die Expression typischer adipogener Marker auch zehn Tage nach Medienwechsel auf DMEM/F12 aufrechterhalten (Abbildung 6 und Anhang 2). Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass die SGBS-/MS-5- und OP9-Zellen typische Charakteristika von Adipozyten aufweisen und somit der Einfluss von Adipozyten, und nicht etwa Präadipozyten oder Stromazellen, auf Leukämiezellen untersucht wurde. In Abbildung 16 wurde einmalig Tag 14 als Messzeitpunkt untersucht, um für zukünftige Experimente zu explorieren, wie lange Xenografts in der Ko-Kultur mit SGBS- und MS-5-Zellen überleben. Hierbei ist anzumerken, dass eine Charakterisierung der SGBS- und MS-5-Zellen nur bis zu Tag 10, nicht jedoch bis zu Tag 14 durchgeführt wurde, weshalb dieser Messzeitpunkt in künftigen Experimenten erneut untersucht werden sollte.

Insgesamt konnte mit dieser Etablierungsarbeit ein serumfreies, kontrollierbares und standardisiertes Adipozyten-Leukämiezell-Ko-Kultur-System entwickelt werden, das die Erforschung der Interaktion beider Zellarten weitestgehend ohne Störfaktoren ermöglicht.

4.2 Leukämiezellen werden durch (Prä-)Adipozyten unterschiedlicher Herkunft unterschiedlich beeinflusst

Um die Ergebnisse der Forschungsarbeiten zur Interaktion von (Prä-)Adipozyten und Leukämiezellen einordnen zu können, muss man sich zunächst die Unterschiede der zum Einsatz gekommenen Zellarten verdeutlichen. Die hier verwendeten humanen SGBS-Zellen repräsentieren auf Grund ihrer Herkunft und Genexpression subkutanes Fettgewebe [39, 128]. In der Literatur wurden für die Charakterisierung der Interaktion mit Leukämiezellen bisher die humane, subkutane Fettgewebszelllinie Chub-S7 oder auch primäre Fettgewebszellen genutzt [98, 116, 117]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmals SGBS-Zellen zur Erforschung der Interaktion von (Prä-)Adipozyten und Leukämiezellen verwendet. Im Gegensatz zu den subkutanen SGBS-Zellen entstammen die sowohl hier als auch in der Literatur häufig eingesetzten MS-5- und OP9-Stromazelllinien dem murinen Knochenmark. Zudem wurden in der Literatur murine primäre MSCs aus dem Knochenmark verwendet [9, 16]. Um Experimente mit humanen Knochenmarkfettzellen durchzuführen, wurde in der Literatur zusätzlich auf humane MSCs aus dem Knochenmark zurückgegriffen [9, 16, 114, 116].

Eine ebenso große Rolle bei der Interaktion dieser beiden Zellarten spielt die Auswahl der Leukämiezellen, da sich der Einfluss von (Prä-)Adipozyten auf einzelne Leukämiezelllinien als auch auf primäre Leukämiezellen und Xenograft-Proben unterscheidet.

Nennenswert sind diese Unterschiede auf Grund einer heterogenen Datenlage auf diesem Themengebiet. Durch die Verwendung von Adipozyten aus WAT, MAT, aus der Maus und dem Menschen sowie ihren verschiedenen Differenzierungsstufen (Prä- und Adipozyt), Zelllinien und Primärzellen können kontroverse Erkenntnisse zumindest teilweise erklärt werden.

Diese Arbeit zeigt, dass das Überleben und die Proliferation von Leukämiezellen durch Ko-Kultivierung mit SGBS-, MS-5-, oder OP9-Zellen unterschiedlich beeinflusst wird. Dabei hatten MS-5-Präadipozyten sowohl in der Ko-Kultur als auch im Transwell-Assay die größte Einflussnahme auf die Leukämiezelllinien und Xenograft-Proben im Sinne einer signifikanten Steigerung des Überlebens und der Zellzahl (Abbildung 12 und Abbildung 13). Dieses Ergebnis stimmt mit dem zweier

Arbeitsgruppen überein, die ebenfalls einen positiven Effekt muriner MS-5-Präadipozyten auf das Überleben und die Proliferation von BCP-ALL-Zellen in der Ko-Kultur festgestellt hatten, der durch reife Adipozyten jedoch nicht erzielt wurde [20, 59]. Letztgenanntes Ergebnis konnte dabei nur teilweise durch die Erkenntnisse aus dieser Arbeit bestätigt werden. In der Ko-Kultur hatten MS-5-Adipozyten nämlich einen vergleichbar signifikanten Effekt wie MS-5-Präadipozyten auf das Überleben und die Proliferation der in dieser Arbeit verwendeten BCP-ALL-Zelllinien (Abbildung 13). Wurden MS-5-Adipozyten oder -Präadipozyten mit Xenograft-Proben ko-kultiviert, so führten beide Ko-Kulturen zu einer signifikanten Steigerung der Proliferation und des Überlebens der Xenograft-Proben, wobei die Steigerung durch MS-5-Präadipozyten signifikant höher im Vergleich zu MS-5-Adipozyten ausfiel (Abbildung 17).

Nennenswert sind ebenfalls die Unterschiede zwischen den beiden murinen Knochenmark-Stromazelllinien MS-5 und OP9. Während sowohl MS-5-Präadipozyten als auch -Adipozyten das Überleben und die Proliferation der Leukämiezelllinien signifikant unterstützen, traf dies nicht auf OP9-Zellen zu (Abbildung 12 und Abbildung 13). Interessanterweise führte die Ko-Kultivierung von OP9-Präadipozyten und -Adipozyten mit Xenograft-Proben jedoch zu einer signifikanten Steigerung des Überlebens der Leukämiezellen (Daten nicht gezeigt). Dabei zeigte die Ko-Kultivierung mit OP9-Adipozyten keinen signifikanten Unterschied zu der mit MS-5-Adipozyten, die Ko-Kultur von MS-5-Präadipozyten hatte jedoch einen signifikant höheren Effekt auf die Zellviabilität der Xenograft-Proben im Vergleich zur Ko-Kultur mit OP9-Präadipozyten (Daten nicht gezeigt).

Im Gegensatz dazu war für murine 3T3-L1-(Prä-)Adipozyten kein unterstützender Effekt auf Prä-B-ALL-Zelllinien in der Ko-Kultur oder im Transwell-Assay in der Literatur nachweisbar [11]. Dies könnte neben methodischen Unterschieden auch an den verwendeten Zelllinien liegen, da 3T3-L1 subkutanen Ursprungs sind. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte ein deutlicher Unterschied auf die Zellviabilität und -zahl der Leukämiezellen in der SGBS-Ko-Kultur mit Fettzellen aus dem subkutanen Fettgewebe im Vergleich zur MS-5-Ko-Kultur mit Fettzellen aus dem Knochenmark festgestellt werden. Während MS-5-Adipozyten das Überleben bis zu Tag 10 in sieben von neun Leukämiezelllinien signifikant verbesserten, konnte das Überleben derselben neun Leukämiezelllinien in der Ko-Kultur mit SGBS-Adipozyten nicht

signifikant gesteigert werden (Abbildung 11 und Abbildung 13). Fand jedoch eine Ko-Kultivierung primärer Leukämiezellen mit Adipozyten statt, so zeigte sich eine signifikante Steigerung der Zellviabilität der Xenograft-Proben sowohl in der Ko-Kultur mit MS-5- als auch mit SGBS-Adipozyten (Abbildung 17).

Daher ist es möglich, dass die Herkunft der Adipozyten (subkutan versus Knochenmark) das Überleben und die Proliferation von Leukämiezellen differentiell beeinflusst. Des Weiteren könnte die unterschiedliche Einflussnahme der MS-5-(Prä-)Adipozyten im Vergleich zu SGBS-(Prä-)Adipozyten auf Leukämiezellen auch von ihrer unterschiedlichen Herkunft aus Maus und Mensch rühren. Schließlich lässt sich zum momentanen Zeitpunkt keine Aussage darüber treffen, ob der Grund des unterschiedlichen Effekts dieser beiden Zellarten durch ihre Herkunft aus WAT und MAT oder durch ihre Spezieszugehörigkeit bedingt ist. In der Literatur wurden Adipozyten murinen und humanen Ursprungs zur Interaktionsanalyse mit Leukämiezellen verwendet, jedoch wurden diese Erkenntnisse bisher nicht vergleichend gegenübergestellt. Sheng *et al.* konnten jedoch zeigen, dass sowohl humane Chub-S7- als auch murine 3T3-L1-Adipozyten, die beide subkutanes Fettgewebe repräsentieren, Leukämiezellen vor Chemotherapeutika schützen [117]. Zudem konnte gezeigt werden, dass primäre humane Adipozyten des Knochenmarks, Adipozyten der murinen Knochenmarkzelllinie OP9 sowie der murinen subkutanen Zelllinie 3T3-L1 das Überleben von diversen Leukämiezellen unterstützen [11, 35, 114].

Des Weiteren muss stets zwischen reifen Adipozyten und deren Vorläuferzellen, den Präadipozyten, unterschieden werden. Nur SGBS-Präadipozyten konnten in einer Ko-Kultur mit Leukämiezelllinien eine signifikante Steigerung der Zellviabilität dieser Zellen im Vergleich zur Kontrolle erzielen, nicht jedoch SGBS-Adipozyten (Abbildung 11). MS-5-Zellen zeigten diesen Unterschied in der Ko-Kultur mit Leukämiezelllinien nicht, da MS-5-Präadipozyten und -Adipozyten einen vergleichbaren positiven Einfluss auf das Überleben und die Proliferation der Leukämiezelllinien hatten (Abbildung 13). In der Ko-Kultur mit Xenograft-Proben hatten MS-5-Präadipozyten den größten signifikant positiven Einfluss auf das Überleben erstgenannter Zellen, gefolgt von SGBS-Adipozyten (Anhang 3). MS-5-Adipozyten und SGBS-Präadipozyten bewirkten ebenfalls eine signifikante Steigerung der Zellviabilität von unterschiedlichen Xenograft-Proben, die im

Vergleich zum Einfluss der MS-5-Präadipozyten und SGBS-Adipozyten jedoch geringer war (Daten nicht gezeigt).

Der Grund für die verschiedene Einflussnahme von (Prä-)Adipozyten auf Xenograft-Proben und Leukämiezelllinien könnte an ihrer unterschiedlichen Herkunft, Entwicklung und den damit verbundenen unterschiedlichen Genexpressionsprofilen liegen (Tabelle 2 und 3). Die hier getesteten Leukämiezelllinien wurden sowohl aus dem peripheren Blut als auch aus dem Knochenmark zum Zeitpunkt der Diagnose oder eines Rezidivs aus männlichen und weiblichen Patienten im Alter von drei Monaten bis 32 Jahren isoliert, wobei sieben von neun Zelllinien aus Kindern stammen (Tabelle 2). Auch die hier verwendeten Xenograft-Proben stammen ursprünglich aus unterschiedlichen Patienten (Tabelle 3). Auf die Genexpression verschiedener Xenograft-Proben wird in Kapitel 4.4 näher eingegangen.

4.3 Wie findet die Einflussnahme von (Prä-)Adipozyten auf BCP-ALL-Zellen statt?

Ein Ziel dieser Arbeit war, den Mechanismus der Interaktion von Adipozyten und BCP-ALL-Zellen zu untersuchen. Hierfür wurden Transwell-Assays und Ko-Kultur Experimente durchgeführt. Während die Leukämiezellen in der Ko-Kultur einen direkten Zell-Zell-Kontakt mit den SGBS-Zellen eingehen konnten, wurden die Zellen im Transwell-Assay durch ein feinporiges, für Zellen undurchlässiges Gitternetz in Form eines Transwell-Einsatzes voneinander getrennt. Die hier verwendete Porengröße der Gitternetze ermöglichte jedoch einen Austausch sezernierter Faktoren beider Zellarten. Das Transwell-Assay brachte im Gegensatz zur Herstellung und Verwendung konditionierter Medien den Vorteil mit sich, dass sezernierte Faktoren direkt und ohne vorheriges Verarbeiten, Transportieren und Lagern, einen Einfluss auf die jeweils andere Zellart ausüben konnten.

Interessanterweise zeigte sich im Transwell-Assay von MS-5-Adipozyten/-Präadipozyten und verschiedenen Leukämiezelllinien, dass die Präadipozyten-Ko-Kultur dem Transwell-Assay mit Präadipozyten, in Bezug auf die Steigerung der Viabilität der Leukämiezelllinien, stets überlegen war (Abbildung 14). Dies galt jedoch nicht für den Vergleich von Adipozyten-Ko-Kultur und Transwell-Assay mit Adipozyten (Abbildung 14). Eine Leukämiezelllinie zeigte sogar ein signifikant verbessertes Überleben nach Kultivierung im Transwell-Assay mit

Adipozyten im Vergleich zur Ko-Kultur mit Adipozyten. Somit konnte man keine allgemeingültige Aussage über den Mechanismus der Interaktion von (Prä-)Adipozyten und Leukämiezellen treffen, da diese je nach Leukämiezelllinie und (Prä-)Adipozytenart zellkontaktabhängig und -unabhängig stattfand. Von welchen Faktoren diese Interaktion abhängt, bleibt Bestandteil weiterer Forschungsarbeit.

Das variable Ansprechen der unterschiedlichen Leukämiezellen auf (Prä-)Adipozyten im Transwell-Assay und in der Ko-Kultur könnte auch die gegenläufigen Ergebnisse einer Arbeitsgruppe erklären, die für die murinen 8093-B-ALL-Zellen keinerlei Verbesserung der Proliferation weder im Transwell-Assay noch in der Ko-Kultur mit 3T3-L1-(Prä-)Adipozyten feststellten [11]. 3T3-L1-Adipozyten verbesserten jedoch nach Zugabe des Chemotherapeutikums Vincristin das Überleben der B-ALL-Zellen und anderer Leukämiezelllinien sowohl im Transwell-Assay als auch in der Ko-Kultur. Dieser Effekt galt auch für OP9-Adipozyten, jedoch in abgeschwächtem Ausmaß [11]. Ebenfalls wurden die Leukämiezellen vor L-Asparaginase und Daunorubicin im Transwell-Assay und in der Ko-Kultur durch 3T3-L1- oder OP9-Adipozyten geschützt, was durch Präadipozyten nicht erreicht wurde [35, 117]. Dieser schützende Effekt war somit zellkontaktunabhängig [35, 117]. Interessanterweise konnte konditioniertes Medium von Adipozyten die ALL-Zellen nicht vor Daunorubicin schützen, hingegen konditioniertes Medium von ko-kultivierten Adipozyten und Leukämiezellen schon [117].

Die unterschiedlichsten Zellarten, Kulturbedingungen und Versuchsaufbauten machen einen Vergleich der Daten kaum möglich. Durch die Verwendung von DMEM/F12 sowie Minimierung adipogener Differenzierungsfaktoren im Transwell-Assay bzw. in der Ko-Kultur können Störfaktoren minimiert werden und eine genauere Interaktionsprüfung zwischen Fettgewebszellen und Leukämiezellen erfolgen. Dies wird darin bestätigt, dass deutliche Unterschiede im Überleben und der Proliferation der getesteten Leukämiezelllinien bei der Kultivierung im Transwell-Assay und in der Ko-Kultur mit Adipozyten und Präadipozyten im neu etablierten System erkennbar sind.

4.4 Die Interaktion von Leukämiezellen und Adipozyten induziert einen proinflammatorischen, Leukämie-supportiven Zellstatus in Adipozyten

Durch die Interaktion von Adipozyten und Leukämiezellen wurden beide Zellarten auf unterschiedlichen Ebenen beeinflusst. Während Adipozyten das Überleben und die Proliferation einiger Leukämiezelllinien sowie Xenograft-Proben signifikant verbesserten, führte die Inkubation der Adipozyten mit konditionierten Medien von Leukämiezellen zu einer ausgeprägten Steigerung der Genexpression der inflammatorischen Gene *IL-6*, *IL-7* und *IL*-8 (Abbildung 10). Diese Gene werden in reifen SGBS-Adipozyten normalerweise kaum exprimiert, hingegen jedoch in SGBS-Präadipozyten (Abbildung 3). Je nach Differenzierungsrate können bestimmte Interleukine zudem von SGBS-Zellen sezerniert werden, was wiederum ein proinflammatorisches Milieu für die Leukämiezellen schafft [39]. Ebenso induzierten die Leukämiezelllinien EU3, Kasumi-2 und KOPN-8 einen proinflammatorischen Genexpressionsstatus in MS-5-Adipozyten, u.a. durch die Steigerung der Expression von *IL-6* (Abbildung 15).

In der Literatur wird beschrieben, dass IL-6 bei Krebserkrankungen häufig gesteigert exprimiert wird und an wichtigen Mechanismen der Krebsentwicklung und -erhaltung wie Apoptose, Proliferation und Invasion beteiligt ist [60, 71]. Durch die übermäßige Aktivierung des IL-6/JAK/STAT (Januskinase/Signal Transducers and Activators of Transcription) Signalwegs sowohl in den Tumorzellen als auch in den Zellen der Mikroumgebung des Tumors findet eine Immunsuppression und Begünstigung des Tumorwachstums statt [60]. Die Inhibition von IL-6 und dessen Rezeptor sowie deren nachgeschaltete Signalkaskade findet schon heute Anwendung in der Therapie bestimmter Krebserkrankungen [60]. Die Inhibition des IL-6/JAK/STAT Signalwegs in Leukämiezellen könnte somit einen interessanten neuen Therapieansatz für Kinder mit ALL darstellen.

Die Rolle von IL-6 in der Interaktion von Adipozyten und Krebszellen wurde unter anderem für den Brustkrebs ausführlich untersucht [33, 42, 71]. Es konnte gezeigt werden, dass Adipozyten in einem Transwell-Assay mit Brustkrebszellen ihre Lipidtropfen sowie typische spätadipogene Marker (z.B. *Adiponektin*, *Hormon-sensitive Lipase*, *FABP4*) verlieren, die Genexpression von *IL-6*, *IL-1β* und *TNFα* jedoch erhöht wird, was zu einem proinflammatorischen Milieu führt [33, 42]. Wie in

dieser Arbeit gezeigt, wurde dieses proinflammatorische Milieu durch Leukämiezellen über die vermehrte Expression inflammatorischer Gene in Adipozyten ebenfalls hervorgerufen (Abbildung 10 und Abbildung 15). Zudem stieg in der oben genannten Studie die Sekretion von IL-6 durch Adipozyten an, was die Invasivität der Krebszellen erhöhte [33]. In klinischen Studien korrelierte ein erhöhter IL-6 Spiegel von Frauen mit Brustkrebs mit einer schlechteren Prognose [69]. Ob dies gleichermaßen für Leukämien gilt, bleibt Bestandteil aktueller Forschungsarbeiten.

Auch beim Ovarialkarzinom bildeten omentale Adipozyten vermehrt IL-6 und IL-8, was eine gesteigerte Migration der Ovarialkarzinom-Zellen hin zu Adipozyten bewirkte [93]. Dabei verursachten diese in den Adipozyten eine gesteigerte Lipolyse und Freisetzung freier Fettsäuren, die von Krebszellen aufgenommen wurden und zu erhöhtem Tumorwachstum führten [93].

Dieser Mechanismus wurde ebenfalls für AML-Zellen in einer Ko-Kultur mit Adipozyten beschrieben. Dabei induzierten AML-Zellen die vermehrte Freisetzung von Fettsäuren aus Adipozyten, welche wiederum durch FABP4 zu den AML-Zellen transportiert und von diesen zur Proliferation genutzt wurden [114]. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von L-KM auf SGBS-Adipozyten untersucht, wobei die Expression von *FABP4* und anderen am Lipidmetabolismus beteiligten Genen wie *ATGL* und *GLUT-4* in SGBS-Adipozyten durch die Inkubation in L-KM nicht beeinflusst wurde (Daten nicht gezeigt). Dies könnte daran liegen, dass oben beschriebener Eingriff in den Lipidmetabolismus der Adipozyten durch Leukämiezellen zellkontaktabhängig, sprich nur in der Ko-Kultur und somit nicht durch sezernierte Faktoren wie z.B. L-KM stattfindet. Zudem könnte ein weiterer Grund die unterschiedliche Herkunft der Zellen sein, da bis zum jetzigen Zeitpunkt die Steigerung von *FABP4* nur in myeloischen Zellen, nicht jedoch in Zellen der lymphatischen Reihe nachgewiesen wurde. Eine Steigerung der Lipolyse in Adipozyten und somit Einfluss auf den Lipidstoffwechsel wurde bisher nur durch AML- und CML-Zellen ausgelöst [114, 130].

Interessanterweise fiel in der vorliegenden Arbeit auf, dass die Genexpression des *IL6R* in der Gruppe der Xenograft-Proben, die in einer Ko-Kultur mit Adipozyten überlebten (Survivors), höher war als in der Gruppe der Non-Survivors (Abbildung 19). Zudem konnte eine bis zu 387-fache Steigerung inflammatorischer Gene in

SGBS-Adipozyten nach der Inkubation mit L-KM festgestellt werden (Abbildung 10). Somit bleibt zu erforschen, ob durch die Interaktion von Adipozyten und Leukämiezellen erstgenannte vermehrt IL-6 exprimieren, sezernieren und dieses Leukämiezellen zur Verfügung stellen, die auf Grund der gesteigerten Expression des *IL6R* sowie der konsekutiven Bildung des IL-6-Rezeptors (IL-6R) IL-6 vermehrt binden können. Dieser Effekt könnte durch die Sekretion proinflammatorischer Faktoren wie IL-6 durch Leukämiezellen selbst verstärkt werden. Durch die Aktivierung des IL-6/JAK/STAT-Signalwegs könnte dann das verbesserte Überleben sowie die erhöhte Proliferation der Xenograft-Survivors vermittelt werden. Im Rückschluss könnte der rasche Zelltod der Xenograft-Non-Survivors in der Ko-Kultur mit Adipozyten auf die fehlende Expression des *IL6R* und des IL-6R zurückzuführen sein, sodass diese keinen Nutzen aus der gesteigerten IL-6-Sekretion ziehen können.

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist, dass möglicherweise nicht alle Leukämiezellen gleichermaßen Adipozyten beeinflussen können. Auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich der Effekt von Leukämiezell-konditionierten Medien auf die Expression von *IL-6*, *-7* und *-8* in Adipozyten je nach Leukämiezelllinie unterschiedlich darstellt (Abbildung 10). Somit ist es wahrscheinlich, dass nicht alle Leukämiezellen gleichermaßen ein inflammatorisches Profil in Adipozyten hervorrufen.

Die Bedeutung des IL-6/JAK/STAT3-Signalwegs bei der Interaktion von Adipozyten und Leukämiezellen und der damit einhergehenden Einflussnahme auf Leukämiezellen erfordert weitere experimentelle Aufklärung. Im Rahmen dessen sollte gezeigt werden, ob die hohe Genexpression von *IL6R* mit einem verbesserten Überleben der BCP-ALL-Zellen durch Interaktion mit Adipozyten einhergeht, und ob dabei die Aktivierung des IL-6-Rezeptors mit nachfolgendem Signalweg stattfindet. Im Gegenzug sollte erforscht werden, ob BCP-ALL-Zellen tatsächlich die *IL-6*-Expression in Adipozyten steigern, um ihr eigenes Überleben sicherzustellen. Sodann kann die Wirkungsweise von IL-6-/IL-6-Rezeptor-Inhibitoren auf die Interaktion von Adipozyten und BCP-ALL-Zellen untersucht werden, mit der Erwartung, ein neues Therapeutikum gegen die ALL zu entwickeln.

Interessant ist auch die Frage, ob IL-6 aus Adipozyten ebenfalls als Lockstoff für ALL-Zellen fungiert, so wie dies für Ovarialkarzinom-Zellen beschrieben wurde [93].

Dabei könnten die ALL-Zellen ins Fettgewebe einwandern, mit Adipozyten interagieren und freie Fettsäuren, die aus Adipozyten durch die gegenseitige Interaktion freigesetzt wurden, für ihre Proliferation nutzen. Letztgenannter Mechanismus konnte bereits für AML-Zellen nachgewiesen werden (siehe oben) [114].

4.5 Übergewicht und dessen Auswirkung auf die Leukämie

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl Adipozyten des WAT (SGBS-Zellen) als auch des MAT (MS-5-Zellen) das Überleben von bestimmten Leukämiezellen steigern können. Betrachtet man nun die Erkenntnis, dass adipöse Menschen mehr WAT, jedoch auch mehr MAT besitzen, gelangt man schnell zu der Frage, ob adipöse Menschen verstärkt unter Malignomen leiden. In der Tat zeigte sich in mehreren Studien ein statistischer Zusammenhang zwischen Übergewicht bzw. Adipositas und erhöhter Prävalenz und Mortalität durch solide Tumoren wie dem Brust-/Ovarialkarzinom bei Frauen und dem Prostata-/Magenkarzinom bei Männern [21, 110]. Zudem konnte auch ein erhöhtes Risiko an verschiedenen Leukämien wie der ALL, AML und CML zu erkranken, festgestellt werden [12, 63, 72, 107, 110, 120]. Dieser Zusammenhang wurde ebenfalls bei der pädiatrischen ALL beobachtet [37, 94, 95].

Um die Kausalität dieser statistischen Erkenntnisse zu erklären, muss noch viel Grundlagenforschung vollzogen werden. Leukämie-Studien in Mäusen zeigen jedoch, dass eine gesteigerte Akkumulation von Fettmasse zu einer verminderten Wirkung der Chemotherapie und zu einem erhöhten Risiko für Leukämie-Rezidive führt [10, 11]. Zudem wandern Leukämiezellen verstärkt ins WAT und MAT ein, wo sie durch Adipozyten vor Chemotherapeutika und dem damit einhergehenden Zelltod geschützt werden [10, 11, 35, 98, 116, 117, 130]. Für die T-ALL konnte gezeigt werden, dass im Adipozyten-reichen Knochenmark des Mausschwanzes ALL-Zellen weniger proliferierten und in eine Art Quieszenz versetzt sind. Dies bewirkte eine verstärkte Resistenz gegenüber zellzyklusabhängigen Chemotherapeutika wie Vincristin oder Cytarabin [20]. Somit führte eine gesteigerte Anzahl an Knochenmarkadipozyten zu einer gesteigerten Resistenz gegenüber Chemotherapeutika. Ein weiterer schützender Effekt vor Vincristin wird der

gesteigerten Expression überlebensfördernder Proto-Onkogene sowie der Suppression pro-apoptotischer Gene in den Leukämiezellen zugeschrieben [11].

Denkbar wäre somit, dass bei einem erhöhten Auftreten von MAT und WAT, wie bei der Adipositas, Leukämiezellen auch beim Menschen verstärkt in das Fettgewebe einwandern und dort vor Chemotherapeutika geschützt werden. Dabei könnte der Effekt, dass AML- und CML-Zellen die Lipolyse in Adipozyten induzieren und die dabei freigesetzten Fettsäuren zur Proliferation nutzen, im Rahmen der Adipositas verstärkt auftreten [114, 130].

Hinzu kommt, dass Adipozyten die Fähigkeit zur potenten Sekretion von inflammatorischen Faktoren wie IL-6 und TNF besitzen [53, 65, 91]. Sowohl im WAT als auch im MAT werden *IL-6*, *TNFα* und *CXCL12* exprimiert, wobei eine höhere Expression im MAT stattfindet [76, 81]. Im Fettgewebe übergewichtiger Menschen läuft ebenfalls eine unterschwellige, jedoch chronische Entzündungsreaktion ab [45, 49]. Ein chronisch inflammatorischer Status trägt letzten Endes über die Aktivierung von Onkogenen und Suppression von Tumorsuppressorgenen zur Krebsentstehung bei [28, 46]. Hierfür wäre das MAT und die dort stattfindende Leukämogenese ein geeignetes Beispiel. Ein proinflammatorisches Milieu konnte auch im Rahmen dieser Arbeit nach der Interaktion von Adipozyten und Leukämiezellen festgestellt werden, da unter anderem die Genexpression von IL-6 in Adipozyten nach Ko-Kultivierung mit Leukämiezellen gesteigert wurde. So ließe sich schlussfolgern, dass Adipositas und Übergewicht über die damit einhergehende chronische Inflammation zu einer gesteigerten Vulnerabilität gegenüber Krebs führen. Das Krebswachstum könnte dabei durch die Inflammation verstärkt werden, was das schlechtere Outcome bei adipösen Patienten mitbedingt.

Bedenkt man nun, dass die globale Prävalenz von Übergewicht und Adipositas in den letzten vier Jahrzenten einen stetigen Anstieg zeigte und im Jahr 2014 10,8 % aller Männer und 14,9 % aller Frauen weltweit adipös waren, so erschließt sich die hohe Relevanz zur Erforschung der Interaktion von Fettgewebe und Krebs [30]. Dabei sind nicht nur Erwachsene von der steigenden Prävalenz betroffen. In Europa liegt die durchschnittliche Prävalenz von übergewichtigen und adipösen Mädchen und Jungen mit 21,1 % sowie 18,6 % deutlich über dem globalen Durchschnitt [3]. Durch die Inhibition der Interaktion von Adipozyten und Krebszellen könnte die Mortalität durch Krebs reduziert werden, insbesondere vor dem Hintergrund, dass

ein frühes Rezidiv im Knochenmark das Risiko an der ALL zu versterben drastisch steigert, da nur ein Viertel dieser Patienten fünf Jahre nach dem Rezidiv noch am Leben sind [92].

Ein anderer Ansatz ist die Reduktion der MAT- und WAT-Masse. Sowohl das hohe Lebensalter, die Akkumulation viszeralen Fetts, Adipositas, Diabetes mellitus, Immobilisation, Osteoporose als auch der Einfluss von Östrogen führen zu einer erhöhten Akkumulation von Adipozyten im Knochenmark [5, 18, 29, 125, 127]. Erwähnenswert ist dabei, dass auch eine dauerhafte Kalorienrestriktion, wie z.B. bei der Anorexia nervosa, zu einer Steigerung des rMAT führt [25]. Die im Rahmen einer Krebstherapie durchgeführte Bestrahlung oder Chemotherapie steigern ebenfalls den Adipozytenanteil im Knochenmark [23, 115]. Eine Reduktion der Adipozytenzahl im Knochenmark wird unter anderem durch Bewegung und Kälteexposition, aber auch durch die Gabe des Antidiabetikums Metformin und im Tiermodell durch die subkutane Verabreichung von Leptin an Leptin-defiziente Mäuse verursacht (Abbildung 1) [16, 51, 113, 123, 133]. Dabei konnte in klinischen Studien gezeigt werden, dass sich körperliches Training während und nach der antileukämischen Therapie positiv auf physische und psychische Aspekte auswirkt [44]. Unklar ist noch, warum Fasten, was zu einer Zunahme von MAT führt, die Entwicklung einer B- und T-ALL verhindern kann [24, 78]. Gemäß oben beschriebener Beispiele sollte die Zunahme von MAT nämlich zu einer Verbesserung des Leukämiezellüberlebens führen. Lu *et al.* erklären die Ergebnisse dadurch, dass das Fasten und der damit einhergehende reduzierte Leptin-Spiegel zu einer Steigerung der Leptinrezeptor-Expression führt, was eine Differenzierung der Leukämiezellen und somit eine Inhibition der ALL verursacht [78]. Umgekehrt konnte gezeigt werden, dass eine gesteigerte Leptin-Sekretion durch Adipozyten eine Einwanderung und erleichterte Ansiedelung von Leukämiezellen im Fettgewebe bewirkt [9]. Dazu passt die klinische Beobachtung, dass im Knochenmark von AML- und ALL-Patienten eine gesteigerte Leptin-Expression vorliegt [9]. Zudem trägt Leptin u.a. durch Aktivierung von Neutrophilen, indirekte Steigerung der Zytokinproduktion, eine Proliferation von naiven T-Zellen und eine erhöhte T-Helfer-Zell-Reaktion zu einem proinflammatorischen Milieu bei, was, wie oben beschrieben, zur Krebsentstehung beitragen kann [22]. Somit wirken in der Mikroumgebung des Knochenmarks multiple Mechanismen auf die Leukämiezellen ein, die diese unterschiedlich modulieren können. Dabei könnte der von Lu *et al.*

entdeckte Mechanismus den Effekt der gesteigerten MAT-Masse überflügeln und die widersprüchlichen Erkenntnisse teilweise erklären. Selbstverständlich ist hierbei jedoch noch viel Forschungsarbeit von Nöten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Entwicklung von Therapien und Strategien, die Übergewicht und Fettleibigkeit vermindern sowie die MAT- und WAT-Bildung und die Interaktion von Adipozyten, Fettgewebe und Leukämiezellen inhibieren, einen zukünftigen Ansatz zur ALL-Therapie darstellen können. Das Ziel ist dabei, die etablierten Therapieschemata zu ergänzen und die Mortalität der kindlichen ALL, v.a. nach Knochenmarkrezidiven, zu senken.

5 Zusammenfassung

Das Knochenmark ist der Entstehungsort der akuten lymphatischen Leukämie (ALL). Ein dortiges frühes Rezidiv ist oft durch Resistenzen gegenüber etablierten Chemotherapeutika gekennzeichnet und steigert das Risiko, an der ALL zu versterben drastisch. Ein Ansatz zur Etablierung neuartiger Therapiekonzepte ist die Einflussnahme auf die Interaktionen zwischen Leukämiezellen und Adipozyten. Zur Untersuchung der Interaktion von ALL-Zellen und Adipozyten ist die Entwicklung eines standardisierten Ko-Kultur-Modellsystems Voraussetzung.

In dieser Arbeit wurde ein Ko-Kultur-Modellsystem entwickelt, das außer dem Grundmedium Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nährmischung F12 (DMEM/F12) weder adipogene Differenzierungsfaktoren, bovines Serumalbumin noch fetales Kälberserum enthält, da diese Faktoren die Interaktion von Leukämiezellen und Adipozyten beeinflussen können. Das Modellsystem gewährleistet, dass sich die Morphologie der Adipozyten sowie die Gen- und Proteinexpression adipozytenspezifischer Marker kaum verändert.

In diesem Ko-Kultur-Modellsystem wurde der Einfluss sowohl von Adipozyten des Knochenmarks (MS-5- und OP9-Zellen) als auch des weißen Fettgewebes (Simpson-Golabi-Behmel Syndrom- (SGBS) Zellen) auf B-Vorläufer-ALL-Zelllinien und primäre B-Vorläufer-ALL-Zellen (Xenograft-Proben) untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass murine MS-5-Adipozyten in der Ko-Kultur das Überleben der B-Vorläufer-ALL-Zelllinien NALM-6, REH, EU3, KOPN-8, Kasumi-2, RCH-ACV und SMS-SB, sowie bestimmter Xenograft-Proben (Xenograft-Survivors) bis zu vierzehn Tage signifikant im Vergleich zur Mono-Kultur verbessern. Der Einfluss muriner OP9-Adipozyten auf B-Vorläufer-ALL-Zelllinien erwies sich als gering, da nur NALM-6 eine Steigerung der Zellviabilität und -zahl aufwies. Während humane SGBS-Adipozyten das Überleben und die Proliferation der 23 getesteten Xenograft-Proben im Mittel signifikant im Vergleich zur Mono-Kultur steigerten, traf dies nur auf die B-Vorläufer-ALL-Zelllinien NALM-6 und RS4;11 zu.

Zudem wurde der Einfluss von Präadipozyten auf Leukämiezellen untersucht. Dabei bewirkte die Ko-Kultivierung mit MS-5-Präadipozyten eine signifikante Steigerung der Zellviabilität und -zahl der getesteten B-Vorläufer-ALL-Zelllinien. MS-5-Präadipozyten unterstützten das Überleben und die Proliferation der B-Vorläufer-ALL-Xenograft-Proben in der gemeinsamen Ko-Kultur am stärksten von allen in

dieser Arbeit verwendeten Zelltypen. Im Gegensatz dazu wurde durch Ko-Kultivierung mit OP9-Präadipozyten die Zellviabilität sowie -zahl der getesteten B-Vorläufer-ALL-Zelllinien nicht signifikant verbessert. SGBS-Präadipozyten verbesserten das Überleben und die Proliferation von NALM-6 und RS4;11 sowie einer Gruppe von Xenograft-Proben signifikant.

Ob die Interaktion von B-Vorläufer-ALL-Zelllinien und Adipozyten des weißen Fettgewebes oder Knochenmarks zellkontaktabhängig oder -unabhängig war, wurde in Ko-Kulturen und in Transwell-Assays untersucht. Dabei benötigten MS-5-Adipozyten zumeist den direkten Zellkontakt, um das Überleben der B-Vorläufer-ALL-Zelllinien zu fördern, da letztgenannte im Transwell-Assay ein schlechteres Überleben als in der Ko-Kultur zeigten. Eine Ausnahme bildete dabei KOPN-8, die keinen Zellkontakt mit MS-5-Adipozyten zur Steigerung der Proliferation benötigte. Zudem unterstützten SGBS-Adipozyten das Überleben und die Proliferation von NALM-6 zellkontaktunabhängig. Somit scheint der Mechanismus der Interaktion abhängig von der getesteten B-Vorläufer-ALL-Zelllinie zu sein und könnte ebenfalls von der Herkunft der Adipozyten (aus weißem Fettgewebe bzw. Knochenmark) beeinflusst werden.

Leukämiezellen induzierten im Fettgewebe ein proinflammatorisches Genexpressionsprofil durch die gesteigerte Expression von Interleukin-6, -7 und -8 (*IL-6*, *-7*, *-8)* in SGBS-Adipozyten sowie von *Il-6* und Monocyte chemoattractant protein-1 (*Mcp-1)* in MS-5-Adipozyten. Interessanterweise zeigten die Xenograft-Survivors eine höhere basale Expression des Interleukin-6-Rezeptors als Xenograft-Non-Survivors. Durch die Aktivierung des Interleukin-6-Rezeptors auf Leukämiezellen durch von Adipozyten sezerniertes IL-6 könnte somit das verbesserte Überleben sowie die erhöhte Proliferation der Xenograft-Survivors vermittelt werden.

Die Erforschung dieses Mechanismus sowie dessen pharmakologische Inhibition bleibt Bestandteil zukünftiger Forschungsarbeit. Durch die Etablierung eines standardisierten Ko-Kultur-Systems zur Interaktionsprüfung von Adipozyten und Leukämiezellen sowie die Identifikation eines an der Interaktion potentiell beteiligten Signalwegs wurde mit dieser Arbeit die Grundlage zur weiteren Erforschung der Interaktion zwischen Adipozyten und B-Vorläufer-ALL-Zellen gelegt, mit dem Ziel, diese Interaktion in der Zukunft gezielt durch neue Therapieansätze zu unterbinden.

6 Literaturverzeichnis

1. Adler B J, Green D E, Pagnotti G M, Chan M E, Rubin C T: High Fat Diet Rapidly Suppresses B Lymphopoiesis by Disrupting the Supportive Capacity of the Bone Marrow Niche. PloS one, 9: e90639(2014)

2. Adler B J, Kaushansky K, Rubin C T: Obesity-driven disruption of haematopoiesis and the bone marrow niche. Nature reviews. Endocrinology, 10: 737-748(2014)

3. Ahrens W, Pigeot I, Pohlabeln H, De Henauw S, Lissner L, Molnár D, Moreno L A, Tornaritis M, Veidebaum T, Siani A: Prevalence of overweight and obesity in European children below the age of 10. International journal of obesity, 38 Supplement 2: 99-107(2014)

4. Alberti, K. G. M. M, Eckel R H, Grundy S M, Zimmet P Z, Cleeman J I, Donato K A, Fruchart J, James W P T, Loria C M, Smith S C, Jr: Harmonizing the Metabolic Syndrome: A Joint Interim Statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. Circulation, 120: 1640-1645(2009)

5. Ambrosi T H, Scialdone A, Graja A, Gohlke S, Jank A, Bocian C, Woelk L, Fan H, Logan D W, Schürmann A, Saraiva L R, Schulz T J: Adipocyte Accumulation in the Bone Marrow during Obesity and Aging Impairs Stem Cell-Based Hematopoietic and Bone Regeneration. Cell stem cell, 20: 771-784(2017)

6. Ambrosi T, Schulz T: The emerging role of bone marrow adipose tissue in bone health and dysfunction. Journal of molecular medicine, 95: 1291-1301(2017)

7. Armstrong F, Brunet de la Grange, P., Gerby B, Rouyez M C, Calvo J, Fontenay M, Boissel N, Dombret H, Baruchel A, Landman-Parker J, Roméo P H, Ballerini P, Pflumio F: NOTCH is a key regulator of human T-cell acute leukemia initiating cell activity. Blood, 113: 1730-1740(2009)

8. Bailey L C, Lange B J, Rheingold S R, Bunin N J: Bone-marrow relapse in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. The lancet oncology, 9: 873-883(2008)

9. Battula V L, Chen Y, Cabreira M d G, Ruvolo V, Wang Z, Ma W, Konoplev S, Shpall E, Lyons K, Strunk D, Bueso-Ramos C, Davis R E, Konopleva M, Andreeff M: Connective tissue growth factor regulates adipocyte differentiation of mesenchymal stromal cells and facilitates leukemia bone marrow engraftment. Blood, 122: 357-366(2013)

10. Behan J W, Avramis V I, Yun J P, Louie S G, Mittelman S D: Diet-induced obesity alters vincristine pharmacokinetics in blood and tissues of mice. Pharmacological research, 61: 385-390(2010)

11. Behan J W, Yun J P, Proektor M P, Ehsanipour E A, Arutyunyan A, Moses A S, Avramis V I, Louie S G, Butturini A, Heisterkamp N, Mittelman S D: Adipocytes Impair Leukemia Treatment in Mice. Cancer research, 69: 7867-7874(2009)

12. Benavente Y, Casabonne D, Costas L, Robles C, Alonso E, de la Banda E, Gonzalez-Barca E, Marcos-Gragera R, Llorca J, Tardón A, Monleon J J, Aymerich M, Campo E, Gimeno-Vázquez E, Castaño-Vinyals G, Aragonés N, Pollán M, Kogevinas M, de Sanjosé S: Established and suggested exposures on CLL/SLL etiology: Results from the CLL-MCC-Spain study. Cancer epidemiology, 52: 106-111(2018)

13. Bigelow C L, Tavassoli M: Fatty Involution of Bone Marrow in Rabbits. Cells Tissues Organs, 118: 60-64(1984)

14. Blebea J S, Houseni M, Torigian D A, Fan C, Mavi A, Zhuge Y, Iwanaga T, Mishra S, Udupa J, Zhuang J, Gopal R, Alavi A: Structural and Functional Imaging of Normal Bone Marrow and Evaluation of Its Age-Related Changes. Seminars in nuclear medicine, 37: 185-194(2007)

15. Bódis K, Roden M: Energy metabolism of white adipose tissue and insulin resistance in humans. European Journal of Clinical Investigation, 48: 13017-13030(2018)

16. Boyd A L, Reid J C, Salci K R, Aslostovar L, Benoit Y D, Shapovalova Z, Nakanishi M, Porras D P, Almakadi M, Campbell C J V, Jackson M F, Ross C A, Foley R, Leber B, Allan D S, Sabloff M, Xenocostas A, Collins T J, Bhatia M: Acute myeloid leukaemia disrupts endogenous myelo-erythropoiesis by compromising the adipocyte bone marrow niche. Nature cell biology, 19: 1336-1347(2017)

17. Bredella M A, Fazeli P K, Miller K K, Misra M, Torriani M, Thomas B J, Ghomi R H, Rosen C J, Klibanski A: Increased bone marrow fat in anorexia nervosa. The Journal of clinical endocrinology and metabolism, 94: 2129-2136(2009)

18. Bredella M A, Torriani M, Ghomi R H, Thomas B J, Brick D J, Gerweck A V, Rosen C J, Klibanski A, Miller K K: Vertebral Bone Marrow Fat Is Positively Associated With Visceral Fat and Inversely Associated With IGF-1 in Obese Women. Obesity, 19: 49-53(2010)

19. Burger J A, Peled A: CXCR4 antagonists: targeting the microenvironment in leukemia and other cancers. Leukemia, 23: 43-52(2009)

20. Cahu X, Calvo J, Poglio S, Prade N, Colsch B, Arcangeli M, Leblanc T, Petit A, Baleydier F, Baruchel A, Landman-Parker J, Junot C, Larghero J, Ballerini P, Delabesse E, Uzan B, Pflumio F: Bone marrow sites differently imprint dormancy and chemoresistance to T-cell acute lymphoblastic leukemia. Blood advances, 1: 1760-1772(2017)

21. Calle E E, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun M J: Overweight, Obesity, and Mortality from Cancer in a Prospectively Studied Cohort of U.S. Adults. The New England Journal of Medicine, 348: 1625-1638(2003)

22. Carbone F, La Rocca C, Matarese G: Immunological functions of leptin and adiponectin. Biochimie, 94: 2082-2088(2012)

23. Casamassima F, Ruggiero C, Caramella D, Tinacci E, Villari N, Ruggiero M: Hematopoietic bone marrow recovery after radiation therapy: MRI evaluation. Blood, 73: 1677-1681(1989)

24. Cawthorn W P, Scheller E L, Parlee S D, Pham H A, Learman B S, Redshaw C M, Sulston R J, Burr A A, Das A K, Simon B R, Mori H, Bree A J, Schell B, Krishnan V, MacDougald O A: Expansion of Bone Marrow Adipose Tissue During Caloric Restriction Is Associated With Increased Circulating Glucocorticoids and Not With Hypoleptinemia. Endocrinology, 157: 508-521(2016)

25. Cawthorn W, Scheller E, Learman B, Parlee S, Simon B, Mori H, Ning X, Bree A, Schell B, Broome D, Soliman S, DelProposto J, Lumeng C, Mitra A, Pandit S, Gallagher K, Miller J, Krishnan V, Hui S, Bredella M, Fazeli P, Klibanski A, Horowitz M, Rosen C, MacDougald O: Bone Marrow Adipose Tissue Is an Endocrine Organ that Contributes to Increased Circulating Adiponectin during Caloric Restriction. Cell metabolism, 20: 368-375(2014)

26. Chen Q, Shou P, Zheng C, Jiang M, Cao G, Yang Q, Cao J, Xie N, Velletri T, Zhang X, Xu C, Zhang L, Yang H, Hou J, Wang Y, Shi Y: Fate decision of mesenchymal stem cells: adipocytes or osteoblasts? Cell death and differentiation, 23: 1128-1139(2016)

27. Cho B S, Kim H J, Konopleva M: Targeting the CXCL12/CXCR4 axis in acute myeloid leukemia: from bench to bedside. The Korean journal of internal medicine, 32: 248-257(2017)

28. Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A: Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. Carcinogenesis, 30: 1073-1081(2009)

29. Devlin M J, Rosen C J: The bone–fat interface: basic and clinical implications of marrow adiposity. The Lancet Diabetes & Endocrinology, 3: 141-147(2015)

30. Di Cesare M, Bentham J, Stevens G A, Zhou B, Danaei G, Lu Y, Bixby H, Cowan M J, Riley L M, Björkelund C: Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. The Lancet, 387: 1377(2016)

31. DiMascio L, Voermans C, Uqoezwa M, Duncan A, Lu D, Wu J, Sankar U, Reya T: Identification of Adiponectin as a Novel Hemopoietic Stem Cell Growth Factor. The Journal of Immunology, 178: 3511-3520(2007)

32. Ding L, Morrison S J: Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. Nature, 495: 231-235(2013)

33. Dirat B, Bochet L, Dabek M, Daviaud D, Dauvillier S, Majed B, Wang Y Y, Meulle A, Salles B, Le Gonidec S, Garrido I, Escourrou G, Valet P, Muller C: Cancer-

Associated Adipocytes Exhibit an Activated Phenotype and Contribute to Breast Cancer Invasion. Cancer research, 71: 2455-2465(2011)

34. Drexler H G: The Leukaemia-Lymphoma Cell Line Factsbook. 1. Auflage, Academic Press, London, San Diego, (2001)

35. Ehsanipour E A, Sheng X, Behan J W, Wang X, Butturini A, Avramis V I, Mittelman S D: Adipocytes Cause Leukemia Cell Resistance to L-Asparaginase via Release of Glutamine. Cancer research, 73: 2998-3006(2013)

36. Escherich G, Schrappe M, Creutzig U: S1-Leitlinie 025/014: Akute lymphoblastische- (ALL) Leukämie im Kindesalter. [Homepage of AWMF online], [Online] April, 2016-last update. Available: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/025-014l_S1_Akute_lymphoblastische_Leukaemie_ALL_2016-04.pdf [18.09.2019]

37. Ethier M, Alexander S, Abla O, Green G, Lam R, Sung L: Association between obesity at diagnosis and weight change during induction and survival in pediatric acute lymphoblastic leukemia. Leukemia & Lymphoma, 53: 1677-1681(2012)

38. Findley H W, Cooper M D, Kim T H, Alvarado C, Ragab A H: Two new acute lymphoblastic leukemia cell lines with early B-cell phenotypes. Blood, 60: 1305-1309(1982)

39. Fischer-Posovszky P, Newell F S, Wabitsch M, Tornqvist H E: Human SGBS Cells – a Unique Tool for Studies of Human Fat Cell Biology. Obesity facts, 1: 184-189(2008)

40. Francis G L: Albumin and mammalian cell culture: implications for biotechnology applications. Cytotechnology, 62: 1-16(2010)

41. Friedman J M: The Function of Leptin in Nutrition, Weight, and Physiology. Nutrition Reviews, 60: 1-14(2002)

42. Fujisaki K, Fujimoto H, Sangai T, Nagashima T, Sakakibara M, Shiina N, Kuroda M, Aoyagi Y, Miyazaki M: Cancer-mediated adipose reversion promotes cancer cell migration via IL-6 and MCP-1. Breast cancer research and treatment, 150: 255-263(2015)

43. Gallagher D, Heymsfield S B, Heo M, Jebb S A, Murgatroyd P R, Sakamoto Y: Healthy percentage body fat ranges: an approach for developing guidelines based on body mass index. The American journal of clinical nutrition, 72: 694-701(2000)

44. Galvão D A, Newton R U: Review of exercise intervention studies in cancer patients. Journal of clinical oncology, 23: 899-909(2005)

45. Ghigliotti G, Barisione C, Garibaldi S, Fabbi P, Brunelli C, Spallarossa P, Altieri P, Rosa G, Spinella G, Palombo D, Arsenescu R, Arsenescu V: Adipose tissue immune response: novel triggers and consequences for chronic inflammatory conditions. Inflammation, 37: 1337-1353(2014)

46. Giles F J, Krawczyk J, O'Dwyer M, Swords R, Freeman C: The role of inflammation in leukaemia. Advances in Experimental Medicine and Biology, 816: 335-360(2014)

47. Giordano A, Smorlesi A, Frontini A, Barbatelli G, Cinti S: White, brown and pink adipocytes: the extraordinary plasticity of the adipose organ. European journal of endocrinology, 170: 159-171(2014)

48. Global Burden of Metabolic Risk Factors for Chronic Diseases Collaboration (BMI Mediated Effects), Lu Y, Hajifathalian K, Ezzati M, Woodward M, Rimm E B, Danaei G: Metabolic mediators of the effects of body-mass index, overweight, and obesity on coronary heart disease and stroke: a pooled analysis of 97 prospective cohorts with 1·8 million participants. The Lancet, 383: 970-983(2014)

49. Grant R W, Dixit V D: Adipose tissue as an immunological organ. Obesity, 23: 512-518(2015)

50. Greenbaum A, Hsu Y S, Day R B, Schuettpelz L G, Christopher M J, Borgerding J N, Nagasawa T, Link D C: CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. Nature, 495: 227-230(2013)

51. Hamrick M W, Della-Fera M A, Choi Y, Pennington C, Hartzell D, Baile C A: Leptin Treatment Induces Loss of Bone Marrow Adipocytes and Increases Bone Formation in Leptin-Deficient ob/ob Mice. Journal of Bone and Mineral Research, 20: 994-1001(2005)

52. Himms-Hagen J, Melnyk A, Zingaretti M C, Ceresi E, Barbatelli G, Cinti S: Multilocular fat cells in WAT of CL-316243-treated rats derive directly from white adipocytes. The American Journal of Physiology, 279: 670-681(2000)

53. Hotamisligil G S, Shargill N S, Spiegelman B M: Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. Science, 259: 87-91(1993)

54. Hunger S P, Mullighan C G: Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. The New England journal of medicine, 373: 1541-1552(2015)

55. Hurwitz R, Hozier J, LeBien T, Minowada J, Gajl-Peczalska K, Kubonishi I, Kersey J: Characterization of a leukemic cell line of the pre-B phenotype. International Journal of Cancer, 23: 174-180(1979)

56. Item F, Konrad D: Visceral fat and metabolic inflammation: the portal theory revisited. Obesity reviews, 13: 30-39(2012)

57. Itoh K, Tezuka H, Sakoda H, Konno M, Nagata K, Uchiyama T, Uchino H, Mori K J: Reproducible establishment of hemopoietic supportive stromal cell lines from murine bone marrow. Experimental Hematology, 17: 145-153(1989)

58. Jack I, Seshadri R, Garson M, Michael P, Callen D, Zola H, Morley A: RCH-ACV: a lymphoblastic leukemia cell line with chromosome translocation 1;19 and trisomy 8. Cancer Genetics and Cytogenetics, 19: 261-269(1986)

59. Jiang Z, Wu D, Ye W, Weng J, Lai P, Shi P, Guo X, Huang G, Deng Q, Tang Y, Zhao H, Cui S, Lin S, Wang S, Li B, Wu Q, Li Y, Liu P, Pei D, Du X, Yao Y, Li P: Defined, serum/feeder-free conditions for expansion and drug screening of primary B-acute lymphoblastic leukemia. Oncotarget, 8: 106382-106392(2017)

60. Johnson D E, O'Keefe R A, Grandis J R: Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer. Nature reviews Clinical oncology, 15: 234-248(2018)

61. Justesen J, Stenderup K, Ebbesen E N, Mosekilde L, Steiniche T, Kassem M: Adipocyte tissue volume in bone marrow is increased with aging and in patients with osteoporosis. Biogerontology, 2: 165-171(2001)

62. Karastergiou K, Smith S R, Greenberg A S, Fried S K: Sex differences in human adipose tissues – the biology of pear shape. Biology of sex differences, 3: 13(2012)

63. Kasim K, Levallois P, Abdous B, Auger P, Johnson K C: Lifestyle Factors and the Risk of Adult Leukemia in Canada. Cancer Causes Control, 16: 489-500(2005)

64. Kern D H, Chien F W, Morton D L: Selective effects of insulin and hydrocortisone on colony formation and chemosensitivity of human tumors in soft agar. International journal of cancer, 33: 807-812(1984)

65. Keuper M, Blüher M, Schön M R, Möller P, Dzyakanchuk A, Amrein K, Debatin K, Wabitsch M, Fischer-Posovszky P: An inflammatory micro-environment promotes human adipocyte apoptosis. Molecular and Cellular Endocrinology, 339: 105-113(2011)

66. Kiefer F W: Browning and thermogenic programing of adipose tissue. Best Practice & Research: Clinical Endocrinology & Metabolism, 30: 479-485(2016)

67. Kiefer F W, Vernochet C, O'Brien P, Spoerl S, Brown J D, Nallamshetty S, Zeyda M, Stulnig T M, Cohen D E, Kahn C R, Plutzky J: Retinaldehyde dehydrogenase 1 regulates a thermogenic program in white adipose tissue. Nature medicine, 18: 918-925(2012)

68. Kir S, White J P, Kleiner S, Kazak L, Cohen P, Baracos V E, Spiegelman B M: Tumour-derived PTH-related protein triggers adipose tissue browning and cancer cachexia. Nature, 513: 100-104(2014)

69. Knüpfer H, Preiß R: Significance of interleukin-6 (IL-6) in breast cancer. Breast cancer research and treatment, 102: 129-135(2006)

70. Kumar S, Geiger H: HSC Niche Biology and HSC Expansion Ex Vivo. Trends in Molecular Medicine, 23: 799-819(2017)

71. Kumari N, Dwarakanath B, Das A, Bhatt A: Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance. Tumor Biology, 37: 11553-11572(2016)

72. Larsson S C, Wolk A: Overweight and obesity and incidence of leukemia: A meta-analysis of cohort studies. International journal of cancer, 122: 1418-1421(2008)

73. Lecka-Czernik B: Marrow fat metabolism is linked to the systemic energy metabolism. Bone, 50: 534-539(2012)

74. Lengyel E, Makowski L, DiGiovanni J, Kolonin M G: Cancer as a Matter of Fat: The Crosstalk between Adipose Tissue and Tumors. Trends in cancer, 4: 374-384(2018)

75. Li Z, Hardij J, Bagchi D P, Scheller E L, MacDougald O A: Development, regulation, metabolism and function of bone marrow adipose tissues. Bone, 110: 134-140(2018)

76. Liu L, Shen W, Ueno M, Patel S, Kraemer F B: Characterization of age-related gene expression profiling in bone marrow and epididymal adipocytes. BMC genomics, 12: 212-229(2011)

77. Livak K J, Schmittgen T D: Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2−ΔΔCT Method. Methods, 25: 402-408(2001)

78. Lu Z, Xie J, Wu G, Shen J, Collins R, Chen W, Kang X, Luo M, Zou Y, Huang L J, Amatruda J F, Slone T, Winick N, Scherer P E, Zhang C C: Fasting selectively blocks development of acute lymphoblastic leukemia via leptin-receptor upregulation. Nature medicine, 23: 79-90(2017)

79. Marlatt K L, Ravussin E: Brown Adipose Tissue: an Update on Recent Findings. Current obesity reports, 6: 389-396(2017)

80. Matsuo Y, Drexler H G: Establishment and characterization of human B cell precursor-leukemia cell lines. Leukemia Research, 22: 567-579(1998)

81. Mattiucci D, Maurizi G, Izzi V, Cenci L, Ciarlantini M, Mancini S, Mensà E, Pascarella R, Vivarelli M, Olivieri A, Leoni P, Poloni A: Bone marrow adipocytes support hematopoietic stem cell survival. Journal of cellular physiology, 233: 1500-1511(2018)

82. Méndez-Ferrer S, Michurina T V, Ferraro F, Mazloom A R, MacArthur B D, Lira S A, Scadden D T, Ma'ayan A, Enikolopov G N, Frenette P S: Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. Nature, 466: 829-834(2010)

83. Meyer L H, Eckhoff S M, Queudeville M, Kraus J M, Giordan M, Stursberg J, Zangrando A, Vendramini E, Möricke A, Zimmermann M, Schrauder A, Lahr G, Holzmann K, Schrappe M, Basso G, Stahnke K, Kestler H A, te Kronnie G, Debatin K: Early Relapse in ALL Is Identified by Time to Leukemia in NOD/SCID Mice and Is Characterized by a Gene Signature Involving Survival Pathways. Cancer cell, 19: 206-217(2011)

84. Mootha V K, Lindgren C M, Eriksson K, Subramanian A, Sihag S, Lehar J, Puigserver P, Carlsson E, Ridderstråle M, Laurila E, Houstis N, Daly M J, Patterson N, Mesirov J P, Golub T R, Tamayo P, Spiegelman B, Lander E S, Hirschhorn J N, Altshuler D, Groop L C: PGC-1α-responsive genes involved in oxidative

phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. Nature genetics, 34: 267-273(2003)

85. Morrison S, McGee S L: 3T3-L1 adipocytes display phenotypic characteristics of multiple adipocyte lineages. Adipocyte, 4: 295-302(2015)

86. Nakano T, Kodama H, Honjo T: Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. Science, 265: 1098-1101(1994)

87. Napoli N, Chandran M, Pierroz D D, Abrahamsen B, Schwartz A V, Ferrari S L, IOF Bone and Diabetes Working Group: Mechanisms of diabetes mellitus-induced bone fragility. Nature reviews Endocrinology, 13: 208-219(2017)

88. Naveiras O, Nardi V, Wenzel P L, Hauschka P V, Fahey F, Daley G Q: Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. Nature, 460: 259-263(2009)

89. Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B: Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. American journal of physiology: endocrinology and metabolism, 293: 444-452(2007)

90. Nedergaard J, Cannon B: The Browning of White Adipose Tissue: Some Burning Issues. Cell metabolism, 20: 396-407(2014)

91. Neels J G, Olefsky J M: Inflamed fat: what starts the fire? The Journal of clinical investigation, 116: 33-35(2006)

92. Nguyen K, Devidas M, Cheng S, La M, Raetz E A, Carroll W L, Winick N J, Hunger S P, Gaynon P S, Loh M L: Factors influencing survival after relapse from acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. Leukemia, 22: 2142-2150(2008)

93. Nieman K M, Kenny H A, Penicka C V, Ladanyi A, Buell-Gutbrod R, Zillhardt M R, Romero I L, Carey M S, Mills G B, Hotamisligil G S, Yamada S D, Peter M E, Gwin K, Lengyel E: Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. Nature medicine, 17: 1498-1503(2011)

94. Orgel E, Sposto R, Malvar J, Seibel N L, Ladas E, Gaynon P S, Freyer D R: Impact on Survival and Toxicity by Duration of Weight Extremes During Treatment for Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia: A Report From the Children's Oncology Group. Journal of clinical oncology, 32: 1331-1337(2014)

95. Orgel E, Tucci J, Alhushki W, Malvar J, Sposto R, Fu C H, Freyer D R, Abdel-Azim H, Mittelman S D: Obesity is associated with residual leukemia following induction therapy for childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia. Blood, 124: 3932-3938(2014)

96. Permana P A, Menge C, Reaven P D: Macrophage-secreted factors induce adipocyte inflammation and insulin resistance. Biochemical and Biophysical Research Communications, 341: 507-514(2006)

97. Petruzzelli M, Schweiger M, Schreiber R, Campos-Olivas R, Tsoli M, Allen J, Swarbrick M, Rose-John S, Rincon M, Robertson G, Zechner R, Wagner E: A Switch from White to Brown Fat Increases Energy Expenditure in Cancer-Associated Cachexia. Cell metabolism, 20: 433-447(2014)

98. Pramanik R, Sheng X, Ichihara B, Heisterkamp N, Mittelman S D: Adipose tissue attracts and protects acute lymphoblastic leukemia cells from chemotherapy. Leukemia research, 37: 503-509(2013)

99. Pui C, Robison L L, Look A T: Acute lymphoblastic leukaemia. The Lancet, 371: 1030-1043(2008)

100. Quinlan G J, Martin G S, Evans T W: Albumin: biochemical properties and therapeutic potential. Hepatology, 41: 1211-1219(2005)

101. Renehan A G, Tyson M, Egger M, Heller R F, Zwahlen M: Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. The Lancet, 371: 569-578(2008)

102. Ricquier D: UCP1, the mitochondrial uncoupling protein of brown adipocyte: A personal contribution and a historical perspective. Biochimie, 134: 3-8(2017)

103. Riehm H, Reiter A, Schrappe M, Berthold F, Dopfer R, Gerein V, Ludwig R, Ritter J, Stollmann B, Henze G: Die Corticosteroid-abhängige Dezimierung der Leukämiezellzahl im Blut als Prognosefaktor bei der akuten lymphoblastischen Leukämie im Kindesalter (Therapiestudie ALL-BFM 83). Klinische Pädiatrie, 199: 151-160(1987)

104. Rodeheffer M, Horowitz M: Fat Decisions: Leptin Regulates Bone versus Fat in the Marrow. Cell stem cell, 18: 684-686(2016)

105. Rosen E D, Spiegelman B: What We Talk About When We Talk About Fat. Cell, 156: 20-44(2014)

106. Rosenfeld C, Goutner A, Choquet C, Venuat A M, Kayibanda B, Pico J L, Greaves M F: Phenotypic characterisation of a unique non-T, non-B acute lymphoblastic leukaemia cell line. Nature, 267: 841-843(1977)

107. Ross J A, Parker E, Blair C K, Cerhan J R, Folsom A R: Body Mass Index and Risk of Leukemia in Older Women. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention, 13: 1810-1813(2004)

108. Rui L: Brown and Beige Adipose Tissues in Health and Disease. Comprehensive Physiology, 7: 1281-1306(2017)

109. Saely C H, Geiger K, Drexel H: Brown versus White Adipose Tissue: A Mini-Review. Gerontology, 58: 15-23(2011)

110. Samanic C, Gridley G, Chow W, Lubin J, Hoover R N, Fraumeni J F: Obesity and Cancer Risk among White and Black United States Veterans. Cancer Causes Control, 15: 35-43(2004)

111. Sánchez-Aguilera A, Méndez-Ferrer S: The hematopoietic stem-cell niche in health and leukemia. Cellular and molecular life sciences, 74: 579-590(2016)

112. Sanchez-Gurmaches J, Hung C, Guertin D A: Emerging Complexities in Adipocyte Origins and Identity. Trends in cell biology, 26: 313-326(2016)

113. Scheller E L, Doucette C R, Learman B S, Cawthorn W P, Khandaker S, Schell B, Wu B, Ding S, Bredella M A, Fazeli P K, Khoury B, Jepsen K J, Pilch P F, Klibanski A, Rosen C J, MacDougald O A: Region-specific variation in the properties of skeletal adipocytes reveals regulated and constitutive marrow adipose tissues. Nature communications, 6: 7808-7820(2015)

114. Shafat M S, Oellerich T, Mohr S, Robinson S D, Edwards D R, Marlein C R, Piddock R E, Fenech M, Zaitseva L, Abdul-Aziz A, Turner J, Watkins J A, Lawes M, Bowles K M, Rushworth S A: Leukemic blasts program bone marrow adipocytes to generate a protumoral microenvironment. Blood, 129: 1320-1332(2017)

115. Sheng X, Mittelman S D: The Role of Adipose Tissue and Obesity in Causing Treatment Resistance of Acute Lymphoblastic Leukemia. Frontiers in pediatrics, 2: 53(2014)

116. Sheng X, Parmentier J, Tucci J, Pei H, Cortez-Toledo O, Dieli-Conwright C M, Oberley M J, Neely M, Orgel E, Louie S G, Mittelman S D: Adipocytes Sequester and Metabolize the Chemotherapeutic Daunorubicin. Molecular cancer research, 15: 1704-1713(2017)

117. Sheng X, Tucci J, Parmentier J, Ji L, Behan J W, Heisterkamp N, Mittelman S D: Adipocytes cause leukemia cell resistance to daunorubicin via oxidative stress response. Oncotarget, 7: 73147-73159(2016)

118. Smith M A, Seibel N L, Altekruse S F, Ries L A G, Melbert D L, O'Leary M, Smith F O, Reaman G H: Outcomes for Children and Adolescents With Cancer: Challenges for the Twenty-First Century. Journal of clinical oncology, 28: 2625-2634(2010)

119. Smith R G, Dev V G, Shannon W A: Characterization of a novel human pre-B leukemia cell line. Journal of Immunology, 126: 596-602(1981)

120. Söderberg K C, Kaprio J, Verkasalo P K, Pukkala E, Koskenvuo M, Lundqvist E, Feychting M: Overweight, obesity and risk of haematological malignancies: A cohort study of Swedish and Finnish twins. European journal of cancer, 45: 1232-1238(2008)

121. Steliarova-Foucher E, Colombet M, Ries L A G, Moreno F, Dolya A, Bray F, Hesseling P, Shin H Y, Stiller C A, Bouzbid S, Hamdi-Cherif M, Hablas A, Chirpaz E, Buziba N, Chesumbai G C, Manraj S S, Reynders D, Wabinga H R, Chokunonga E, Moreno F, Lima C A, Asturian Laporte C, de Oliveira J C, de Aquino J P, Gallagher S V, Uribe C J, Bravo L E, Yepez Chamorro M C, Torres Alvarado G, Galán Alvarez Y H, Martinez Reyes F C, Castillo Calvas J C, Mendoza Alava M, Cueva Ayala P, Hanchard B, Fajardo-Gutiérrez A, Zavala Zegarra D E, Barrios E, Nikiforuk C, Woods R, Turner D, MacIntyre M, Corriveau A, Navaneelan T, Bertrand

C, Stuart-Panko H, Wilson R J, Kosary C, Shen X, Brockhouse J, Yee G A, Mitchell T C, Snipes K, West D, Rao C, Bolick S, Rycroft R K, Mueller L, Zheng Y, Dosch K, Brown H, Vargas A, Levin G M, Bayakly R, Johnson C, Shen T, Ruppert L, Lynch C F, Lai S M, Tucker T C, Wu X C, Schwenn M, Stern K, Gershman S, Copeland G, Bushhouse S, Rogers D B, Jackson Thompson J, Lemons D, Frederick S, Harris J A, Riddle B, Stroup A, Wiggins C, Schymura M J, Giljahn L K, Sheikh A, Schubert S, Aldinger W, Fulton J P, Whiteside M, Nogueira L, Sweeney C, Johnson A, Martin J, Farley S, Harrelson D, Malicki R, Espinoza J R: International incidence of childhood cancer, 2001–10: a population-based registry study. The lancet oncology, 18: 719-731(2017)

122. Stong R C, Korsmeyer S J, Parkin J L, Arthur D C, Kersey J H: Human acute leukemia cell line with the t(4;11) chromosomal rearrangement exhibits B lineage and monocytic characteristics. Blood, 65: 21-31(1985)

123. Styner M, Pagnotti G M, McGrath C, Wu X, Sen B, Uzer G, Xie Z, Zong X, Styner M A, Rubin C T, Rubin J: Exercise Decreases Marrow Adipose Tissue Through B-Oxidation in Obese Running Mice. Journal of Bone and Mineral Research, 32: 1692(2017)

124. Subramanian A, Tamayo P, Mootha V K, Mukherjee S, Ebert B L, Gillette M A, Paulovich A, Pomeroy S L, Golub T R, Lander E S, Mesirov J P: Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. Proceedings of the National Academy of Sciences, 102: 15545-15550(2005)

125. Syed F, Oursler M, Hefferanm T, Peterson J, Riggs B, Khosla S: Effects of estrogen therapy on bone marrow adipocytes in postmenopausal osteoporotic women. Osteoporosis International, 19: 1323-1330(2008)

126. Tavassoli M: Marrow adipose cells. Ultrastructural and histochemical characterization. Archives of pathology (1960), 98: 189-192(1974)

127. Trudel G, Payne M, Mädler B, Ramachandran N, Lecompte M, Wade C, Biolo G, Blanc S, Hughson R, Bear L, Uhthoff H K: Bone marrow fat accumulation after 60 days of bed rest persisted 1 year after activities were resumed along with hemopoietic stimulation: the Women International Space Simulation for Exploration study. Journal of Applied Physiology, 107: 540-548(2009)

128. Wabitsch M, Brenner R, Melzner I, Braun M, Möller P, Heinze E, Debatin K, Hauner H: Characterization of a human preadipocyte cell strain with high capacity for adipose differentiation. International Journal of Obesity, 25: 8-15(2001)

129. Xu R, Taskin M B, Rubert M, Seliktar D, Besenbacher F, Chen M: hiPS-MSCs differentiation towards fibroblasts on a 3D ECM mimicking scaffold. Scientific reports, 5: 8480-8486(2015)

130. Ye H, Adane B, Khan N, Sullivan T, Minhajuddin M, Gasparetto M, Stevens B, Pei S, Balys M, Ashton J, Klemm D, Woolthuis C, Stranahan A, Park C, Jordan C: Leukemic Stem Cells Evade Chemotherapy by Metabolic Adaptation to an Adipose Tissue Niche. Cell Stem Cell, 19: 23-37(2016)

131. Ye R, Scherer P E: Adiponectin, driver or passenger on the road to insulin sensitivity? Molecular Metabolism, 2: 133-141(2013)

132. Yeung D K, Griffith J F, Antonio G E, Lee F K, Woo J, Leung P C: Osteoporosis is associated with increased marrow fat content and decreased marrow fat unsaturation: a proton MR spectroscopy study. Journal of magnetic resonance imaging, 22: 279-285(2005)

133. Yu H, Zhong X, Gao P, Shi J, Wu Z, Guo Z, Wang Z, Song Y: The Potential Effect of Metformin on Cancer: An Umbrella Review. Frontiers in endocrinology, 10: 617(2019)

134. Zeng Z, Xi Shi Y, Samudio I J, Wang R, Ling X, Frolova O, Levis M, Rubin J B, Negrin R R, Estey E H, Konoplev S, Andreeff M, Konopleva M: Targeting the leukemia microenvironment by CXCR4 inhibition overcomes resistance to kinase inhibitors and chemotherapy in AML. Blood, 113: 6215-6224(2009)

135. Zhang L Q, Downie P A, Goodell W R, McCabe N R, LeBeau M M, Morgan R, Sklar J, Raimondi S C, Miley D, Goldberg A: Establishment of cell lines from B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. Leukemia, 7: 1865-1874(1993)

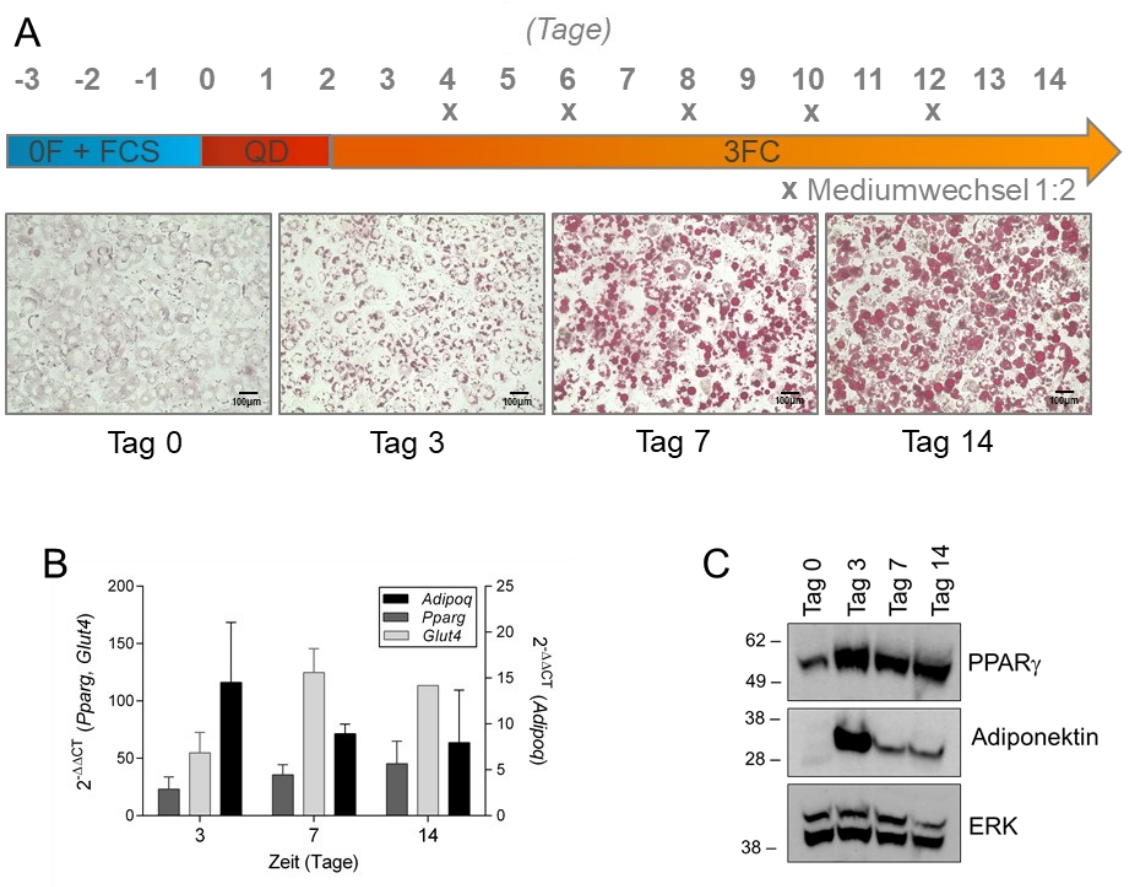
136. Zhang Y, Patel S, Abdelouahab H, Wittner M, Willekens C, Shen S, Betems A, Joulin V, Opolon P, Bawa O, Pasquier F, Ito M, Fujii N, Gonin P, Solary E, Vainchenker W, Coppo P, De Botton S, Louache F: CXCR4 inhibitors selectively eliminate CXCR4-expressing human acute myeloid leukemia cells in NOG mouse model. Cell death & disease, 3: e396(2012)

137. Zhang Y, Saavedra E, Tang R, Gu Y, Lappin P, Trajkovic D, Liu S, Smeal T, Fantin V, De Botton S, Legrand O, Delhommeau F, Pernasetti F, Louache F: Targeting primary acute myeloid leukemia with a new CXCR4 antagonist IgG1 antibody (PF-06747143). Scientific reports, 7: 7305-7313(2017)

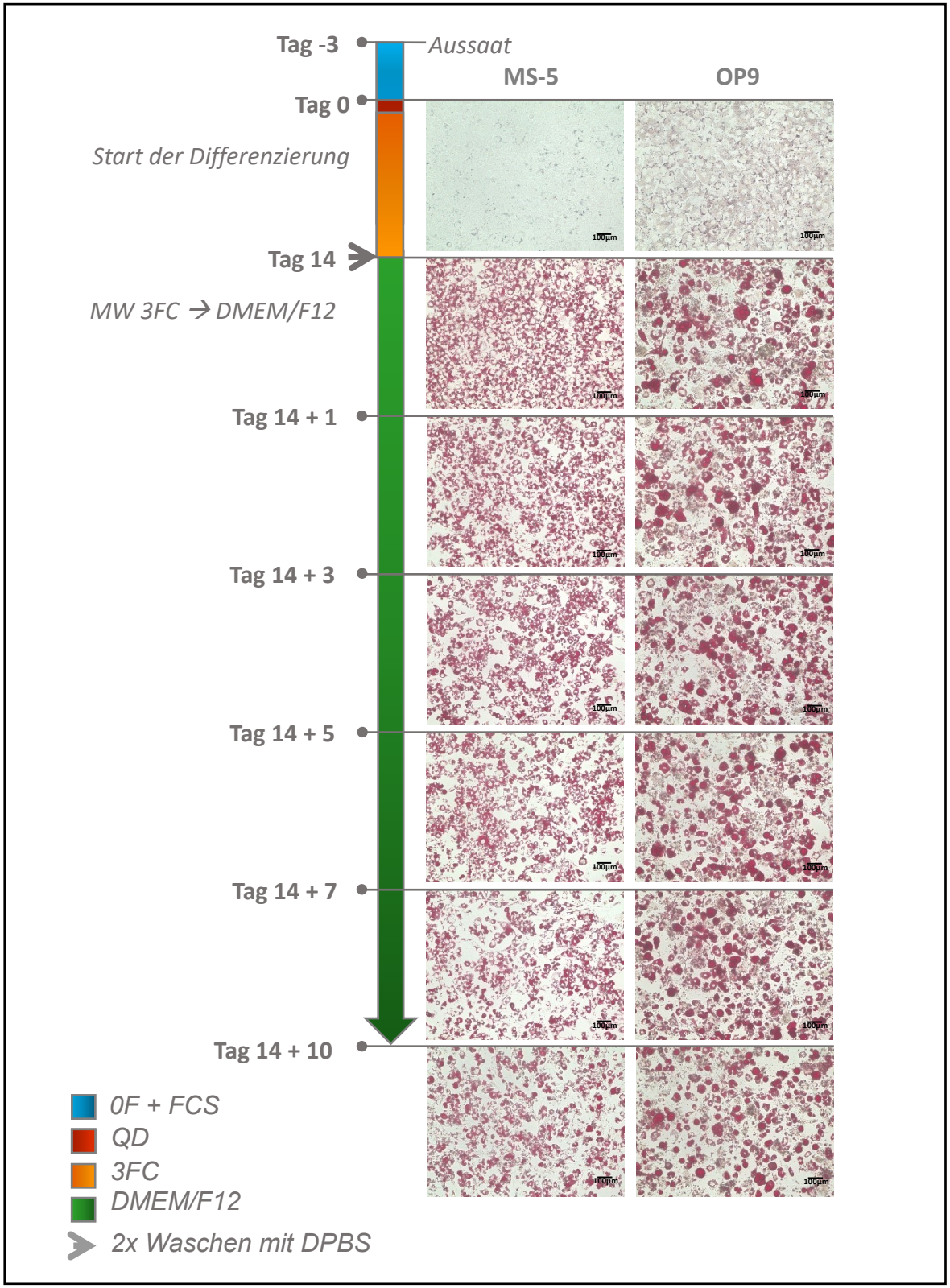
138. Zhang Z, Huang Z, Ong B, Sahu C, Zeng H, Ruan H B: Bone marrow adipose tissue-derived stem cell factor mediates metabolic regulation of hematopoiesis. Haematologica, 104: 1731-1743(2019)

139. Zhou B O, Yu H, Yue R, Zhao Z, Rios J J, Naveiras O, Morrison S J: Bone marrow adipocytes promote the regeneration of stem cells and haematopoiesis by secreting SCF. Nature cell biology, 19: 891-903(2017)

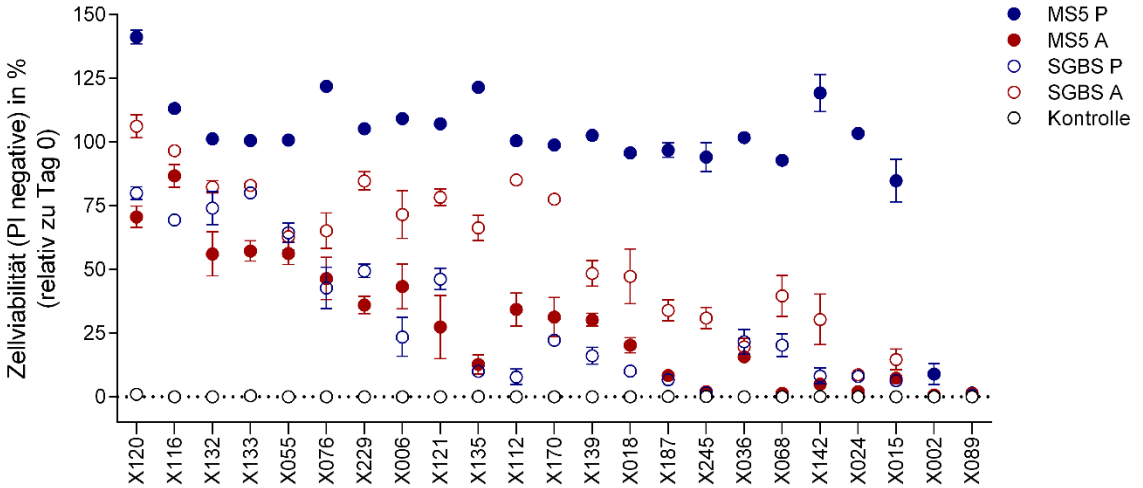
7 Anhang



Anhang 1: Protokoll der adipogenen Differenzierung der murinen Stroma-Zelllinie OP9. (A) Zeitachse des Differenzierungsablaufs von OP9-Stromazellen. Die Aussaat der OP9-Zellen fand drei Tage (Tag -3) vor Differenzierungsbeginn in 0F + FCS (blauer Balken) statt. Um den Beginn der Differenzierung zu starten, wurde an Tag 0 ein Medienwechsel auf das Quick-Diff-Medium (QD; roter Balken) durchgeführt, welches an Tag 2 des Differenzierungsprozesses durch das 3FC-Medium (oranger Pfeil) ersetzt wurde. Dieses wurde jeden zweiten Tag 1:2 mit frischem 3FC-Medium erneuert (x). Die unter der Zeitachse dargestellten Mikrofotografien zeigen OP9-Zellen an Tag 0, 3, 7, und 14 des Differenzierungsprozesses nach einer Oil red O Färbung (Maßstab 100µm). (B) Mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) wurde die mRNA Expression von typischen adipogenen Differenzierungsgenen relativ zum Referenzgen Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (*Hprt)* an Tag 0, 3, 7 und 14 bestimmt und der $2^{-\Delta\Delta CT}$-Wert berechnet. Dabei ist der $2^{-\Delta\Delta CT}$-Wert von Peroxisom-Proliferator-aktivierter-Rezeptor-Gamma (*Pparg)* und Glukose-Transporter-4 (*Glut4)* auf der linken y-Achse, sowie der $2^{-\Delta\Delta CT}$-Wert von Adiponektin (*Adipoq)* auf der rechte y-Achse zu sehen. Im exemplarisch ausgewählten Western Blot (C) wurde die Proteinexpression von PPARγ, Adiponektin sowie ERK als Ladekontrolle an Tag 0, 3, 7, und 14 ermittelt. In (B) zeigen die Balken den Mittelwert + SD; N=2-3.



Anhang 2: Übersicht über den Ablauf der Differenzierung sowie Morphologie von MS-5- und OP9-Zellen unter Einfluss von DMEM/F12. Die nach unten gerichtete Zeitachse zeigt die adipogene Differenzierung (blauer, roter und oranger Balken), sowie den an Tag 14 stattfindenden Medienwechsel auf DMEM/F12 (grüner Pfeil) nach zweimaligem Waschen mit DPBS (grauer Pfeilkopf). In der rechten Bildhälfte kommen die morphologischen Veränderungen der, mit Oil Red O gefärbten MS-5- und OP9-Zellen unter DMEM/F12-Einfluss 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach dem Medienwechsel auf DMEM/F12 (Tag 14 + 1 bis Tag 14 + 10) in Mikrofotografien zur Darstellung (Maßstab 100 µm).



Anhang 3: Übersicht über die Zellviabilität getesteter Xenograft-Proben nach siebentägiger Ko-Kultivierung mit humanen SGBS- oder murinen MS-5-(Prä-)Adipozyten. Die 23 verschiedenen Xenograft-Proben (X) 120, 116, 132, 133, 055, 076, 229, 006, 121, 135, 112, 170, 139, 018, 187, 245, 036, 068, 142, 024, 015, 002 und 089 wurden nach der Anfärbung mit CellTrace Violet auf SGBS-Präadipozyten (blauer Kreisumriss), SGBS-Adipozyten (roter Kreisumriss), MS5-Präadipozyten (blau gefüllter Kreis), MS5-Adipozyten (rot gefüllter Kreis) oder in einem Kontrollmedium (schwarzer Kreisumriss) kultiviert. Nach siebentägiger Kultivierung wurde die Zellviabilität der auf der x-Achse angegebenen Xenograft-Proben nach der Färbung mit Propidiumiodid (PI) am Durchflusszytometer bestimmt und auf den Hintergrundzelltod normalisiert. Jeder Punkt entspricht dabei dem Mittelwert aus Triplikaten einer Messung der jeweiligen Xenograft-Probe zum angegebenen Messzeitpunkt ± SD. Alle Versuche wurden im DMEM/F12 Kulturmedium durchgeführt.

8 Danksagung

Die Danksagung wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

9 Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.