

**Onkogene Transformationsprozesse der
t(4;11)-assoziierten Leukämie:
Expression von AF4•MLL
in vitro und *in vivo*
und Analyse kooperierender Ereignisse**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. phil. nat.)

vorgelegt beim Fachbereich 14

Biochemie, Chemie und Pharmazie

der Johann Wolfgang Goethe-Universität

in Frankfurt am Main

von

Carola Prella

aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main, 2014

(D30)

Vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie (FB14) der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Thomas Prisner

1. Gutachter: Prof. Dr. Rolf Marschalek

2. Gutachter: Prof. Dr. Robert Fürst

Datum der Disputation: 15.07.2014

Für Mario, Erika und Marco

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	4
1 Zusammenfassung	6
2 Einleitung	8
2.1 Leukämie	8
2.2 Genetische Grundlagen von Leukämieerkrankungen	9
2.3 Aberrationen des <i>MLL</i> -Gens	11
2.4 Die Translokation t(4;11)(q21;q23)	13
2.4.1 Klinische Eigenschaften	13
2.4.2 Struktur und Funktion des MLL- und des AF4-Proteins	14
2.4.3 Struktur und Funktion der Fusionsproteine MLL•AF4 und AF4•MLL	17
2.4.4 Mausmodelle der Translokation t(4;11)(q21;q23)	20
2.5 Sekundärmutationen in MLL-assoziierten Leukämien	25
2.5.1 FLT3	25
2.5.2 RAS	26
2.6 Koffein als Stimulans in MLL-assoziierten Leukämien	28
2.7 Zielsetzung der Arbeit	29
3 Ergebnisse	30
3.1 Untersuchung onkogener Transformationsprozesse nach Expression von AF4•MLL in humanen hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen	30
3.1.1 Etablierung lentiviraler Expressionssysteme	31
3.1.2 Isolation humaner hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen	35
3.1.3 Wachstumskurven	36
3.1.4 Colony Forming Unit (CFU)-Assay	39
3.1.5 Xenograft-Mausmodell	42
3.2 Analyse von Sekundärmutationen an genomischer DNA von Patienten mit einer t(4;11)-assoziierten Leukämie	49
3.2.1 Patientengruppen und sequenzierte Gene	49
3.2.2 Auswertung	51

3.3	Einfluss von Koffein auf AF4•MLL-exprimierende Zellen	53
3.3.1	Wachstumskurven von t(4;11)-Zelllinien	53
3.3.2	Wachstumskurven von stabil AF4•MLL- oder MLL•AF4-exprimierenden 32D-Zellen	56
3.3.3	Mausmodell	59
3.4	Expression von MLL-C im Mausmodell	64
3.4.1	Mausmodell	64
3.4.2	Sekundäre Retransplantationsexperimente	70
3.4.3	Auffällige Erkrankungen von Mäusen nach Expression des MLL-C-Proteins	72
4	Diskussion	77
4.1	Expressionssysteme für große Fusionsproteine in humanen Zellen und Auswahl geeigneter Zelltypen und Mausmodelle	77
4.2	Zellbiologische Effekte der t(4;11)-assoziierten Fusionsproteine <i>in vitro</i>	80
4.3	Die Relevanz von RAS-Mutationen in t(4;11)-assoziierten Leukämien	82
4.4	Der FLT3-Signalweg in t(4;11)-assoziierten Leukämien	85
4.5	Koffein-abhängige Wachstumsinhibition von t(4;11)-Zellen	87
4.6	MLL-C-induzierte hämatopoetische Differenzierung	88
4.7	Modell onkogener Transformationsprozesse der t(4;11)-assoziierten Leukämie	91
5	Material und Methoden	97
5.1	Material	97
5.1.1	Chemikalien, Geräte und ihre Bezugsquellen	97
5.1.2	Pufferlösungen und Medien	101
5.1.3	Verwendete Organismen	102
5.1.4	Antikörper	104
5.1.5	Synthetische Oligonukleotide	105
5.1.6	Vektoren und Plasmide	108
5.2	Molekularbiologische Methoden	109
5.2.1	Standardmethoden	109
5.2.2	PCR-Techniken	110
5.2.3	Sequenzanalysen	112

5.3	Zellbiologische Methoden	113
5.3.1	Polyethylenimin-Transfektion der Verpackungszelllinie Platinum-E zur Herstellung von Retroviren	113
5.3.2	Calciumphosphat-Transfektion der Zelllinie HEK-293T und Konzentration des viralen Überstandes zur Herstellung von Lentiviren	113
5.3.3	Transduktion und Selektion der murinen Suspensionszelllinie 32D	114
5.3.4	Wachstumskurven über Trypanblau-Färbungen und den CCK8-Assay	115
5.3.5	Zellzyklus-/Apoptose-Assay	115
5.3.6	Colony Forming Unit (CFU)-Assay	116
5.4	Mausexperimente	116
5.4.1	Aufreinigung von CD34 ⁺ humanen hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen aus Apheresaten	116
5.4.2	Transduktion und Transplantation von CD34 ⁺ humanen hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen in primäre Empfängermäuse	117
5.4.3	Blutabnahme an Mäusen zur Beobachtung des Krankheitsverlaufs	117
5.4.4	Isolierung und Aufreinigung von Lin ⁻ /Sca1 ⁺ murinen Knochenmarkzellen	118
5.4.5	Transduktion und Transplantation von Lin ⁻ /Sca1 ⁺ murinen Knochenmarkzellen in primäre Empfängermäuse	119
5.4.6	Aufarbeitung erkrankter Mäuse	120
5.4.7	Retransplantationsexperimente in sekundäre Empfängermäuse	121
6	Literaturverzeichnis	122
7	Anhang	139
7.1	Abkürzungsverzeichnis	139
7.2	Publikationen, Vorträge und Poster-Präsentationen	141
7.3	Danksagung	142
7.4	Lebenslauf	143

Abbildungsverzeichnis

2.1	Genetische Veränderungen als Grundlage der Leukämie-Entstehung_____	10
2.2	Häufigkeiten von Leukämien und Genotypen pädiatrischer akuter Leukämien _____	12
2.3	Struktur und Funktion von MLL, AF4, MLL•AF4 und AF4•MLL_____	24
2.4	Der FLT3- und RAS-Signalweg_____	27
3.1.1	Lentivirales Expressionssystem_____	32
3.1.2	Identifizierung der gesamten integrierten AF4•MLL-2AdT cDNA-Kassette in lentiviral transduzierten Zellen _____	34
3.1.3	Bestimmung von CD34 ⁺ und CD45 ⁺ Zellen aus Apheresaten _____	35
3.1.4	Wachstumskurven von transduzierten humanen hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen _____	37
3.1.5	Zellzyklus-/Apoptose-Assay von transduzierten humanen hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen _____	38
3.1.6	Colony Forming Unit-Assay von transduzierten humanen hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen _____	40
3.1.7	Expression lentiviraler Konstrukte in Kolonien des CFU-Assays _____	41
3.1.8	Krankheitsanalyse im Xenograft-Mausmodell _____	44
3.1.9	Blutbilder aller analysierten Mäuse im Xenograft-Modell _____	45
3.1.10	Engraftment humaner Zellen im Blut von Mäusen des Xenograft-Modells _____	47
3.1.11	Engraftment humaner Zellen im Knochenmark von Mäusen des Xenograft-Modells _____	48
3.2.1	Sequenzierte Gene und Patientengruppen der Sekundärmutationsanalyse _____	50
3.2.2	Auswertung der Sekundärmutationsanalyse _____	52
3.3.1	Wachstumskurven von Leukämie-Zelllinien unter Koffein-Behandlung _____	54
3.3.2	Zellzyklus-/Apoptose-Assay von SEM und RS(4;11) nach Koffein-Behandlung _____	55
3.3.3	Stabil AF4•MLL- oder MLL•AF4-exprimierende 32D-Zelllinien _____	57
3.3.4	Wachstumskurven von stabil AF4•MLL- oder MLL•AF4-exprimierenden 32D-Zellen in koffeinhaltigem Medium unter Gabe oder Entzug von Interleukin 3 _____	58
3.3.5	Verwendete Retroviren im Mausmodell zur Untersuchung von Koffeineffekten _____	59
3.3.6	Krankheitsdokumentation der Mäuse im Koffein-Modell _____	61

3.3.7	Analyse von Knochenmarkzellen der Mäuse am Ende des Experiments	63
3.4.1	Verwendete Retroviren im MLL-C-Mausmodell	65
3.4.2	Krankheitsdokumentation der Mäuse im MLL-C-Mausmodell	67
3.4.3	Analyse des Krankheitsphänotyps der Maus mit zsG2A-MLL-C-transduzierten murinen hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen	68
3.4.4	Engraftment CD45.2 ⁺ Zellen im Knochenmark von Mäusen im MLL-C-Mausmodell	69
3.4.5	Analyse sekundärer Retransplantationsexperimente der zsG2A-MLL-C-Maus	71
3.4.6	Analyse auftretender Ereignisse im MLL-C-Mausmodell	72
3.4.7	Krankheitsanalyse einer MLL-C-exprimierenden Maus nach 251 Tagen	74
3.4.8	Krankheitsanalyse einer MLL-C-exprimierenden Maus nach 255 Tagen	75
3.4.9	Krankheitsanalyse einer MLL-C-exprimierenden Maus nach 353 Tagen	76
4.1	RAS-Mutationen bei Säuglingen mit einer t(4;11)-assoziierten Leukämie	82
4.2	Modell onkogener Transformationsprozesse der t(4;11)-assoziierten Leukämie	96

Tabellenverzeichnis

3.1.1	Anzahl transplantiertes und analysierter Mäuse im Xenograft-Mausmodell	42
3.3.1	Anzahl transplantiertes und analysierter Mäuse im Koffein-Mausmodell	60
3.3.2	Vergleich des Engraftments transplantiertes Zellen im Mausmodell ± Koffein	62
3.4.1	Anzahl transplantiertes und analysierter Mäuse im MLL-C-Mausmodell	66

1 Zusammenfassung

In Deutschland erkranken pro Jahr ~1800 Kinder neu an Krebs, wobei Leukämien mit 33,8 % die häufigste diagnostizierte Krebsform darstellen. Besonders Leukämien mit dem Phänotyp einer akuten lymphatischen Leukämie (ALL) sind mit der Erkrankung im Kindesalter assoziiert. Die häufigsten genetischen Ursachen kindlicher ALLs sind ein hyperdiploider Karyotyp oder chromosomale Translokationen. Unter Säuglingen im Alter von nur wenigen Monaten mit einer ALL treten hier oft reziproke chromosomale Translokationen mit Beteiligung des *MLL*-Gens auf. Die t(4;11)-assoziierte Leukämie, mit dem *AF4*-Gen als Translokationspartner, stellt den häufigsten Krankheits-Phänotyp dieser Patientengruppe dar. Die Erkrankung zeichnet sich durch eine stark erhöhte Leukozytenzahl im peripheren Blut bei Diagnose aus. Aufgrund immunphänotyperischer und morphologischer Analysen werden die Leukozyten und auch die Erkrankung durch einen pro B-Zell Phänotyp charakterisiert. Ein weiteres klinisches Merkmal ist das schnell auftretende Rezidiv, welches schlecht auf eine folgende Therapie anspricht und zu sehr geringen Überlebensraten führt, wodurch die t(4;11)-assoziierte Leukämie als Hochrisiko-Leukämie klassifiziert wird. Als genetische Grundlage des Mechanismus der t(4;11)-Leukämogenese wird die Expression der resultierenden Fusionsproteine *MLL•AF4* und *AF4•MLL* angenommen. Durch die Expression beider Fusionsproteine wird die Funktion des Wildtyp *MLL*-Proteins gehemmt, welches als epigenetischer Regulator für die Hämatopoese und die Ausbildung des Körperbauplans während der Embryogenese essenziell ist. Weiterhin wird auch die Funktion des Wildtyp *AF4*-Proteins gehemmt, welches einen bedeutenden Bestandteil der zellulären Transkriptionsinitiations- und Elongationsmaschinerie darstellt. Außerdem beeinflussen beide Fusionsproteine zelluläre Mechanismen wie die Proliferation, das Überleben und die Differenzierung, weshalb die Erforschung des Pathomechanismus der Fusionsproteine essenziell für die Rekapitulation und damit für die Therapie und Heilung der Erkrankung ist. Aktuell rekapitulieren Studien der beiden Fusionsproteine die humane Erkrankung jedoch nur unzureichend. Das *MLL•AF4*-Protein zeigte bisher eine Blockierung der Apoptose nach unterschiedlichsten Induktionen in zellbasierten Systemen. Allerdings konnte dem Fusionsprotein kein onkogenes Potenzial *in vitro* nachgewiesen werden und auch *in vivo* führte die Expression von *MLL•AF4* zur Bildung von hauptsächlich myeloischen Neoplasien nach langen Latenzzeiten. Die Expression des reziproken *AF4•MLL*-Proteins führte in zellbasierten Systemen zu einem verstärkten Metabolismus durch die Steigerung der zellulären Transkription und beeinflusste so die Proliferation. Parallel trat eine hohe Apoptoserate auf, sodass die Proliferation nahezu unverändert schien. Da *in vitro* jedoch die Kontaktinhibition und Wachstumstransformation von Zellen gezeigt werden konnte und im Mausmodell der humane Phänotyp einer pro B-ALL ausgelöst wurde, scheint das *AF4•MLL*-Protein das

treibende Onkogen der t(4;11)-assoziierten Leukämie zu sein. Allerdings wird die Erkrankung auch in diesem Modell erst nach einer langen Latenzzeit beobachtet und auch die zellulären Mechanismen, in welchen das onkogene Potenzial des reziproken Fusionsproteins entscheidend ist, bleiben weiter zu untersuchen. Deshalb sollten im Rahmen dieser Arbeit hauptsächlich die Auswirkungen der Expression des onkogenen AF4•MLL-Proteins unter verschiedenen Aspekten untersucht, und kooperierende Ereignisse analysiert werden. Grundlegend sollte die Auswirkung des reziproken Fusionsproteins in humanen Zellen studiert, und auch Effekte des MLL•AF4-Proteins mit früheren Studien verglichen werden, um zellbiologisch relevante Mechanismen aufzudecken. Weiterhin sollte der Einfluss möglicher sekundärer Mutationen und die Wirkung von Koffein als Stimulans untersucht werden, um mögliche Ursachen der langen Latenzzeiten in t(4;11)-assoziierten Mausmodellen zu identifizieren. Da jedoch etwa 20 % aller t(4;11)-Patienten kein AF4•MLL-Protein bilden und als Reziprok oft der solitäre MLL C-Terminus exprimiert wird, sollte zudem der Effekt des MLL•C-Proteins im Mausmodell studiert werden. Insgesamt konnten alle erhobenen Daten mit Resultaten früherer Studien kombiniert werden, wodurch ein spezifisches Modell der t(4;11)-assoziierten Leukämogenese entstand. Das Modell diskutiert die onkogene Funktion des AF4•MLL-Proteins besonders während der hämatopoetischen Differenzierung. Durch die Ergebnisse dieser Arbeit zum klonogenen Wachstum der humanen Zellen nach Expression von AF4•MLL und der Ergebnisse im MLL•C-Mausmodell konnte ein Einfluss des Reziproks auf die Differenzierung von Leukozyten gezeigt werden. Weiterhin konnte nach AF4•MLL-Expression in humanen Zellen die Steigerung des Metabolismus aber auch die einhergehende vermehrte Apoptose bestätigt werden, welche die lange Latenzzeit im AF4•MLL-Mausmodell begründen könnte. Durch Kooperation mit dem MLL•AF4-Protein, welches anti-apoptotische Effekte zeigt, könnte es jedoch zum frühen Ausbruch der Erkrankung im Säuglingsalter kommen. Allerdings konnte in dieser Arbeit auch eine Steigerung der Proliferation von MLL•AF4-exprimierenden Zellen beobachtet werden, wenn anti-apoptotische Mechanismen des Fusionsproteins inaktiv sind, welche aus der Aktivierung des RAS/RAF/MEK/ERK-Signalwegs resultiert. Werden neben der Translokation zusätzliche RAS-Mutationen aquiriert, die bei 26 % der Kinder mit einer t(4;11)-Leukämie auftreten, wird der Signalweg und somit die Proliferation der leukämischen Blasten zusätzlich stabilisiert. Dadurch kommt es zu höheren Leukozytenzahlen und einem noch früheren Ausbruch der Erkrankung. Weiterhin deckte die Analyse von sekundären Mutationen auch die Beteiligung des FLT3-Signalwegs an der Therapieresistenz durch Quieszenz auf. Ein besonderer Einfluss von Koffein als Stimulans in t(4;11)-Zellen konnte hingegen ausgeschlossen werden. So wurde der Pathomechanismus der t(4;11)-assoziierten Leukämie in dieser Arbeit weiterführend aufgeklärt, wodurch Strategien zur Therapie und Heilung der Erkrankung in Zukunft intensiviert werden können.

2 Einleitung

2.1 Leukämie

Im Jahr 2010 erkrankten in Deutschland 252.400 Männer und 224.900 Frauen neu an Krebs. Die Prognose für das Jahr 2014 liegt bei insgesamt über 500.000 erstmalig diagnostizierten Krebserkrankungen. Innerhalb dieser Neuerkrankungen kommen Leukämien mit einem Anteil von über 12.000 Fällen pro Jahr vor, wobei pädiatrische von adulten Formen der Leukämie unterschieden werden. Unter jährlich etwa 1.800 neu diagnostizierten pädiatrischen Krebsfällen sind Leukämien mit 33,8 % die häufigste Krebsform bei Kindern in einem Alter von 0-15 Jahren (Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2013). Als Leukämie (griechisch leukós = weiß / haima = Blut) wird eine Krebserkrankung des blutbildenden Systems verstanden. Erstmals wurde der Begriff 1845 von dem Pathologen Rudolf Virchow und zeitgleich von John Hughes Bennett eingeführt (Bennett, 1845). Häufig ausgelöst durch die Mutation einer einzigen Zelle entstehen Populationen monoklonaler Leukozyten, die sich durch eine abnorme Proliferation auszeichnen. Da die entarteten Zellen während der frühen Differenzierung arretieren, werden sie als leukämische Blasten (griechisch blastos = Keim, Spross) bezeichnet. Nach primärer Anreicherung der leukämischen Blasten im Blut und im Knochenmark kommt es zu einer Störung der Hämatopoese und sekundär zur Infiltration der Organe (Hoffbrand *et al.*, 2006). Seit 1889 können Leukämien durch die ursprünglichen Unterteilungen von Wilhelm Ebstein nach dem Krankheitsverlauf in chronische und akute Formen unterschieden werden. Chronische Leukämien zeichnen sich durch ein langsames Fortschreiten der Erkrankung aus, während akute Leukämien mit der starken Vermehrung von leukämischen Blasten und rasch auftretenden Krankheitssymptomen assoziiert sind. Weiterhin werden akute Leukämien nach der "French-American-British (FAB) classification" bezüglich des Ursprungs der entarteten Zellen unterschieden. Das System trennt acht Untergruppen akuter myeloischer Leukämien (AML M₀-M₇) von drei Untergruppen akuter lymphatischer Leukämien (ALL L₁-L₃) (Bennett *et al.*, 1976). Außerdem werden Leukämien nach den Richtlinien der Weltgesundheitsorganisation (WHO) (Swerdlow *et al.*, 2008) oder der "European Group for the Immunological Characterization of Leukemias" (EGIL) (Bene *et al.*, 1995) klassifiziert. Im Allgemeinen werden mehr als ein Drittel der Leukämien als chronische lymphatische Leukämien (CLL) und mehr als ein Viertel als akute myeloische Leukämien (AML) diagnostiziert. Chronische myeloische Leukämien (CML) und akute lymphatische Leukämien (ALL) treten bei jeweils unter 10 % der Patienten auf. Bei Kindern kommt der Krankheitsphänotyp einer ALL jedoch am häufigsten vor (Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2013).

2.2 Genetische Grundlagen von Leukämieerkrankungen

Die Grundlage aller Leukämieerkrankungen sind genetische Veränderungen die in zwei Klassen unterteilt werden können (Abbildung 2.1). Klasse-I-Mutationen führen zu gesteigerter Proliferation sowie zu erhöhten Überlebensraten und stehen Klasse-II-Mutationen in Genen gegenüber, die für die hämatopoetische Differenzierung entscheidend sind (Shih *et al.*, 2012). Während Klasse-I-Mutationen oft durch die Veränderung einzelner Nukleinbasen gekennzeichnet sind, entstehen Klasse-II-Mutationen meist durch chromosomale Translokationen. Infolge zytotoxischer Agenzien, ionisierender Strahlung oder spontaner Ereignisse kommt es hierbei zu auftretenden DNA-Doppelstrangbrüchen in Genen zweier beteiligter Chromosomen. Besonders häufig treten solche Brüche in bestimmten "breakpoint cluster"-Regionen auf (Gu *et al.*, 1992; Reichel *et al.*, 1999), die überwiegend in Intronbereichen der Gene liegen, wodurch ein intakter Leserahmen bestehen bleibt (Marschalek *et al.*, 1997). Durch eine fehlerhafte Reparatur der nicht homologen Chromosomen, kommt es zur Verknüpfung der beiden Gene auf den beteiligten Chromosomen und damit zur Entstehung chimärer Genprodukte (Look, 1997; Tenen *et al.*, 1997). Der Mechanismus von Reparaturen nicht homologer Chromosomen wird "non-homologous end joining" genannt (Reichel *et al.*, 1998; Gillert *et al.*, 1999), und tritt natürlicherweise nur während der frühen Entwicklung von B- und T-Zellen auf (Fugmann *et al.*, 2000; Rooney *et al.*, 2004). Wird ein Chromosomenabschnitt mit dem eines anderen Chromosoms verbunden, sodass dabei Deletionen oder Duplikationen der DNA entstehen, wird die Translokation als unbalanciert bezeichnet (Johansson *et al.*, 1996). Bleibt die Gesamtmenge des Erbgutes jedoch unverändert, spricht man von einer balancierten chromosomalen Translokation (Pedersen-Bjergaard und Rowley, 1994). Innerhalb chromosomaler Translokationen werden zwei Typen unterschieden. Der Typ-I bezeichnet Translokationen, durch die ein Proto-Onkogen unter die Kontrolle eines immunzell-spezifischen "Enhancer-Elements" gebracht wird. Ein Beispiel hierfür ist die Translokation der Chromosomen vier und achtzehn t(4;18), durch die das Gen *c-Myc* mit dem "Enhancer" des *IgH*-Gens in B-Zellen fusioniert wird (Dalla-Favera *et al.*, 1982; Sanchez-Garcia, 1997). Da Typ-I-Translokationen jedoch auf Fehler in der Funktion von immunzell-spezifischen Rekombinationsenzymen zurückzuführen sind, bleiben diese auf lymphatische Zellen beschränkt und kommen nicht allzu häufig vor (Sanchez-Garcia und Rabbitts, 1993). Häufigere Translokationen des Typ-II sind durch die Bildung von Fusionsgenen charakterisiert, die aus dem 5'-Teil des einen und dem 3'-Teil des anderen beteiligten Gens bestehen, welche oftmals für die Entwicklung und Differenzierung hämatopoetischer Zellen entscheidend sind (Rabbitts, 1999). Das prominenteste Beispiel für eine Typ-II-Translokation ist die t(9;22), welche zur Bildung des Philadelphia-Chromosoms führt.

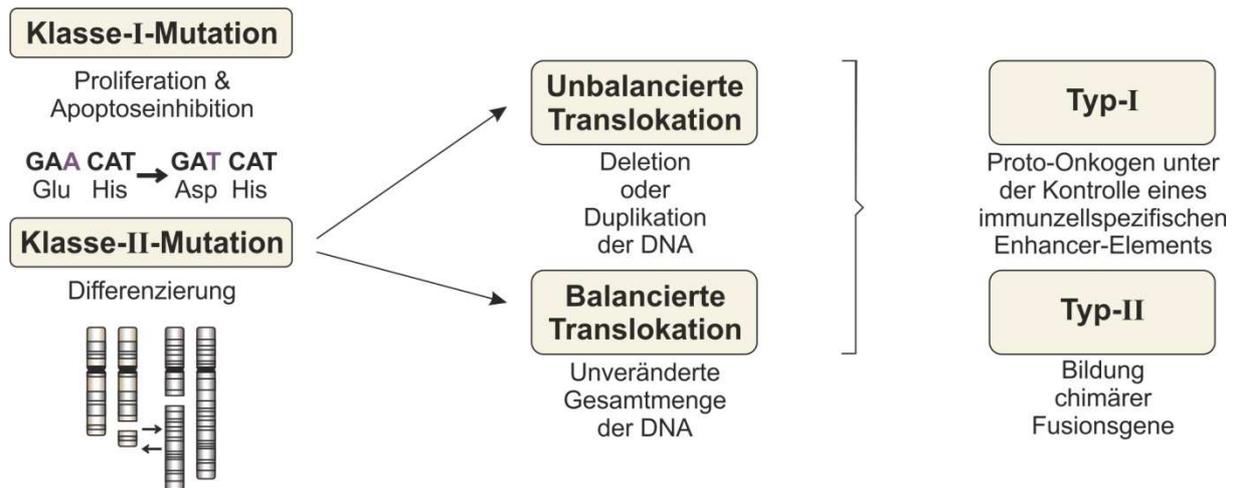


Abbildung 2.1: Genetische Veränderungen als Grundlage der Leukämie-Entstehung

Gliederung von Mutationsereignissen, welche zur Entstehung einer Leukämie führen.

Durch die reziproke Translokation $t(9;22)$ mit Beteiligung der Gene *BCR* und *ABL* entstehen die Fusionsgene *BCR-ABL* und *ABL-BCR*, deren Expression zur Entartung der Zelle führt (Rowley, 1973; Bartram *et al.*, 1985; Teyssier *et al.*, 1985; Nowell, 2007). Besonders bei Patienten mit einer CML ist das Philadelphia-Chromosom in über 90 % Ursache der Erkrankung (Kurzrock *et al.*, 2003). Für Patienten mit einer CLL hingegen ist eine Deletion des Chromosoms 13 ($del(13q14)$) mit 55 % am häufigsten für den Ausbruch der Krankheit verantwortlich (Hallek, 2013). Somit korrelieren verschiedene Arten von Mutationen oft bevorzugt mit bestimmten Leukämiearten (Abbildung 2.2). Solche verschiedenen Mutationen sind auch bei akuten Leukämien zu beobachten, wobei wiederum adulte und pädiatrische Leukämien unterschieden werden. Während ALLs bei Erwachsenen dominant durch die Translokation $t(9;22)$ und eher variable genetische Aberrationen klassifiziert sind, zeichnen sich adulte Patienten mit einer AML zu 50 % durch das Auftreten von Klasse-I-Mutationen der Gene *NPM*, *FLT3*, *CEBPA*, *WT1*, *RAS* oder *PTPN11* aus (Döhner und Döhner, 2008). Bei Kindern mit einer AML hingegen kommen jedoch häufiger chromosomale Translokationen wie die $t(8;21)$, die $t(15;17)$ oder Translokationen des *MLL*-Gens vor (Pui *et al.*, 2011). Die pädiatrische ALL, welche die häufigste Leukämieerkrankung im Kindesalter darstellt, zeichnet sich besonders durch das Auftreten eines hyperdiploiden Karyotyps mit mehr als 50 Chromosomen und die chromosomale Translokation $t(12;21)$ aus (Pui *et al.*, 2012). Weiterhin kommen Chromosomentranslokationen des *MLL*-Gens bei 8,3 % der Patienten vor. Abhängig vom Translokationspartner des *MLL*-Gens zeichnet diese Gruppe eine intermediäre bis sehr schlechte Prognose aus, da die Krankheit schlecht auf konventionelle Therapien anspricht. Nach Behandlung mit dem Standard-ALL-Protokoll einer zweijährigen Chemotherapie, eventuell ergänzt durch Bestrahlungen oder Stammzelltransplantationen (Mörcke *et al.*, 2010), sind *MLL*-Translokationen oft mit einer hohen Rezidivrate und einer geringen Überlebenswahrscheinlichkeit assoziiert (Tallen *et al.*, 2010).

2.3 Aberrationen des *MLL*-Gens

Die Diagnose akuter Leukämien erfolgt über zytomorphologische, -chemische und -immunphänotypische Untersuchungen von Knochenmarkzellen des Patienten. Weiterhin werden Techniken zur Quantifizierung der Leukämiezelllast (Monitoring der minimalen Resterkrankung, MRD) eingesetzt, welche einen wichtigen Prognosefaktor darstellt und über das Therapieprotokoll entscheidet (Burmeister *et al.*, 2006; Borowitz *et al.*, 2008; Van der Velden *et al.*, 2009). Da die Prognose bei *MLL*-assoziierten Leukämien von der Art der Aberrationen abhängig ist, kommt der MRD-Bestimmung besondere Bedeutung zu. Neben partiellen Tandemduplikationen, Deletionen, Inversionen und genetischen Veränderungen durch mehrere DNA-Doppelstrangbrüche kommen reziproke Translokationen am häufigsten vor. Über "Long-Distance-Inverse"-PCR (Meyer *et al.*, 2005 und 2006; Kowarz *et al.*, 2007) konnten bisher 79 Translokationspartnergene auf molekularer Ebene identifiziert werden, wobei etwa 90 % der Translokationen auf die Gene *AF4*, *AF9*, *ENL*, *AF10*, *ELL* und *AF6* entfallen (Meyer *et al.*, 2013). Überwiegend kommen *MLL*-Aberrationen mit Beteiligung dieser Gene bei Patienten mit einer AML, ALL und seltener mit myelodysplastischem Syndrom vor (Ziemin van der Poel *et al.*, 1991; Thirman *et al.*, 1993; Eguchi *et al.*, 2005). Besonders häufig sind dabei therapieinduzierte Leukämien (t-ALL oder t-AML) oder *de novo* akute Leukämien bei Kindern zu beobachten. Vor allem Säuglinge, also Kinder in einem Alter unter einem Jahr, und Kleinkinder im Alter bis zu sechs Jahren gehören oft zur Gruppe der Patienten mit einer Aberration des *MLL*-Gens. In der Gruppe der kindlichen Leukämien werden etwa 3 % als AML diagnostiziert. Bei kindlichen AML-Patienten kommen *MLL*-Translokationen zu 18 % vor, wobei die Translokation t(9;11) mit Beteiligung des *AF9*-Gens mit 36 % am häufigsten nachgewiesen werden kann. Die Gruppe der AMLs bei Säuglingen zeigt eine variablere Verteilung, da Translokationen mit Beteiligung der Gene *AF9*, *AF10* und *ELL* mit jeweils etwa 20 % den größten Anteil ausmachen. Die häufigste Einzeldiagnose kindlicher Leukämien ist jedoch die ALL bei nahezu 80 % der Fälle. Bei pädiatrischen *MLL*-assoziierten ALL-Erkrankungen, welche 8,3 % kindlicher ALLs ausmachen, dominiert die Translokation t(4;11) mit Beteiligung des *AF4*-Gens mit etwa 47 %. In der Gruppe der ALLs bei Säuglingen ist die t(4;11)-assoziierte Leukämie ebenfalls die häufigste Ursache von Leukämien durch genetische Veränderung des *MLL*-Gens (Abbildung 2.2) (Meyer *et al.*, 2013). Neben reziproken chromosomalen Translokationen des *MLL*-Gens kommen bei ~11 % der Patienten, sowie bei 20% der Patienten mit einer t(4;11)-Leukämie, komplexe Translokationen mit drei oder vier Translokationspartnergenen vor. Dabei entstehen mehrere Fusionsgene, wobei der 3'-Teil des *MLL*-Gens in über 86 % der Fälle ohne Fusionspartner über einen Gen-internen Promotor transkribiert wird. So entsteht ein verkürztes aber funktionelles *MLL*-C-Protein (Meyer *et al.*, 2013; Kowarz *et al.*, 2007; Scharf *et al.*, 2007).

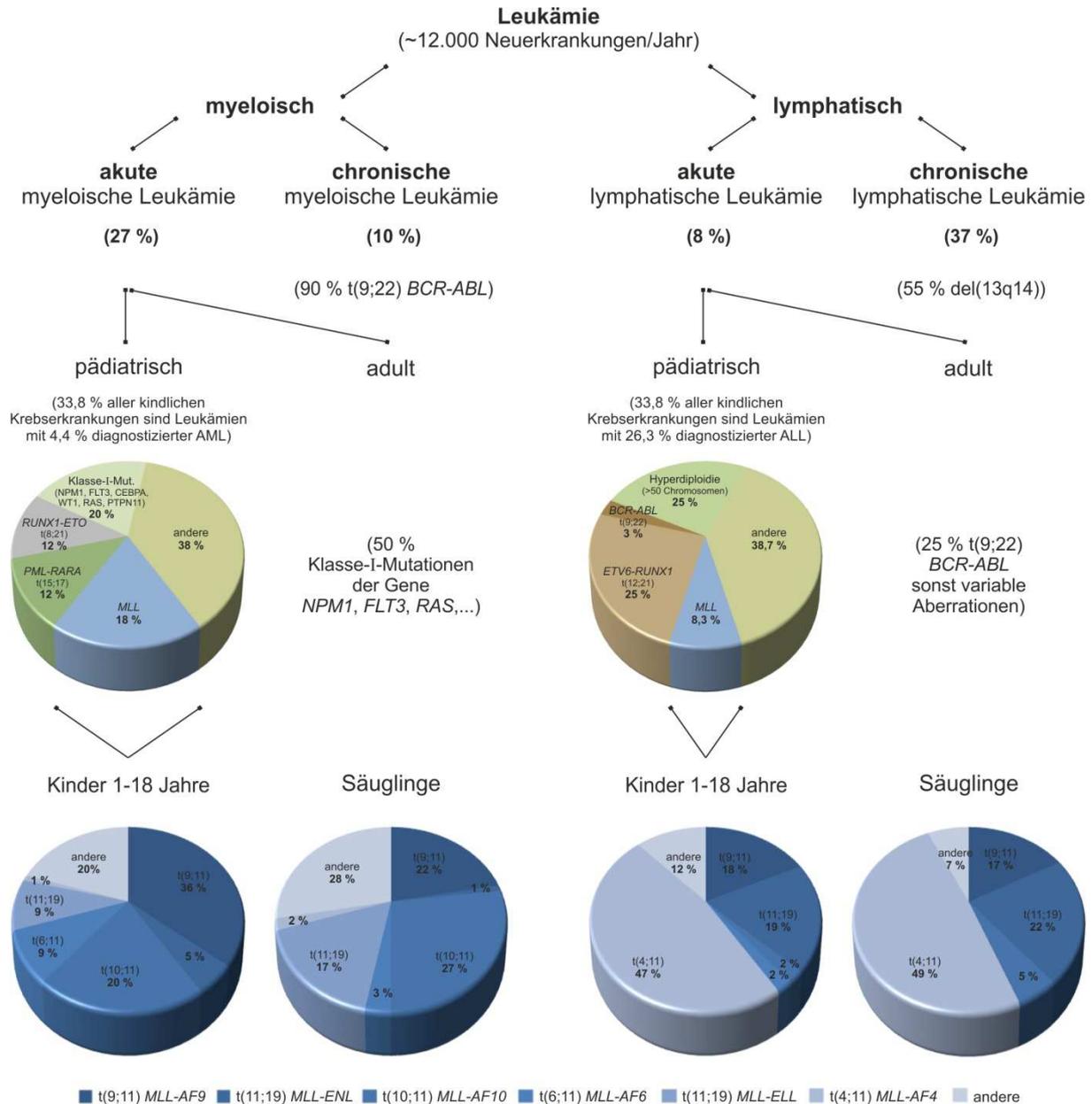


Abbildung 2.2: Häufigkeiten von Leukämien und Genotypen pädiatrischer akuter Leukämien

Aufteilung der Leukämieerkrankungen pro Jahr auf die vier Formen AML, CML, ALL und CLL wobei 18 % nicht genau bezeichnet werden konnten und deshalb nicht aufgeführt sind. Weiterhin wurden die häufigsten genetischen Veränderungen innerhalb dieser Formen dargestellt und bei akuten Leukämien pädiatrische und adulte Fälle separat aufgezeigt. Außerdem wurden Häufigkeiten verschiedener MLL-assoziierter Translokationen bei kindlichen akuten Leukämien aufgeführt, wobei jeweils zwischen Kindern im Alter von 1-18 Jahren und Säuglingen unterschieden wurde (Abbildung modifiziert nach Pui *et al.*, 2011 und Meyer *et al.*, 2013 mit den Daten des Robert Koch-Institut und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2013).

2.4 Die Translokation t(4;11)(q21;q23)

Die reziproke Translokation der Bande q23 des Chromosoms 11 und der Bande q21 des Chromosoms 4 wurde bereits 1979 bei der Leukämie eines Kindes beschrieben (Van den Berghe *et al.*, 1979). Sie kommt am häufigsten in *de novo* pädiatrischen Leukämien mit einem akuten lymphatischen Phänotyp vor (Daser und Rabbitts, 2005). Besonders bei Säuglingen und Kleinkindern mit einer ALL tritt die t(4;11) zu ~50 % auf, während sie unter ALLs älterer Kinder zu ~2-3 % und unter ALLs bei Erwachsenen zu ~10 % auftritt (Moorman, 2012). Aufgrund ihrer schlechten Prognose und Therapierbarkeit wird sie als Hochrisiko-Leukämie klassifiziert (Chen *et al.*, 1993; Rubnitz *et al.*, 1996; Pieters *et al.*, 2007).

2.4.1 Klinische Eigenschaften

Prognostische Faktoren wie das Alter und die Leukozytenzahl im Blut bei Diagnose, ein möglicher Befall des Zentralnervensystems (ZNS), das Ansprechen der Krankheit auf die Therapie oder die MRD im Knochenmark sind entscheidend für die Klassifizierung von Leukämien und bedeutend für die Behandlung. Die Hochrisiko-Leukämie t(4;11) vereint zahlreiche ungünstige klinische Charakteristika. Besonders häufig tritt sie bei Säuglingen im geringen Alter von wenigen Monaten auf. Die Patienten zeigen eine starke Vermehrung an Leukozyten im peripheren Blut ($>100 \times 10^9/l$) bei Diagnose, während Hämoglobin- und Thrombozytenwerte sowie LDH-Werte verringert sind. Gleichzeitig kann häufig eine Hepatosplenomegalie und Lymphadenomegalie sowie eine starke ZNS-Infiltration mit leukämischen Blasten beobachtet werden. Nach initialer Induktionstherapie, meist über die Gabe von Glucocorticoid, Vincristin und L-Asparaginase oder Prednison und Methotrexat, wird bei über 90 % der Patienten eine Remission erzielt. Anschließend tritt jedoch schnell ein Rezidiv auf, welches schlecht auf eine folgende Therapie anspricht und zu sehr geringen Überlebensraten führt. Auch allogene Stammzelltransplantationen in der ersten Remission verbessern nur geringfügig die Überlebensraten der Patienten. Leukämische Blasten werden morphologisch nach FAB als L1/L2 klassifiziert. Immunphänotypisch zeigen sie eine hohe Expression der Stammzellantigene CD133, CD135 und CD34, wobei CD34 auf Zellen erwachsener Patienten etwas geringer exprimiert wird. Weiterhin ist ein differenzierter Phänotyp mit Expression myeloischer Antigene (CD15⁺, CD65⁺) und dem lymphatischen Antigen CD19 zu beobachten. Besonders charakteristisch ist eine fehlende Expression des lymphatischen Vorläuferzell-Antigens CD10. Aufgrund dieses Expressionsmusters und der Morphologie leukämischer Blasten wird die t(4;11) als pro B-Zell Leukämie klassifiziert (Pui *et al.*, 1991; Johansson *et al.*, 1998; Heerema *et al.*, 1999; Tamai und Inokuchi, 2010; Marchesi *et al.*, 2011; Marks, 2013; Yu *et al.*, 2013).

2.4.2 Struktur und Funktion des MLL- und des AF4-Proteins

MLL

Das *MLL*-Gen (*mixed lineage leukemia*), auch *KMT2A*, *ALL-1*, *HRX* oder *Htrx* genannt (Cimino *et al.*, 1991; Djabali *et al.*, 1992; Gu *et al.*, 1992; Tkachuk *et al.*, 1992), überspannt einen Bereich von ~92 kb mit insgesamt 37 Exons auf Bande 23 des langen Arms von Chromosom 11. Das häufigste mRNA Transkript, welches durch ein fehlendes Exon 2 charakterisiert ist, umfasst 13,5 kb und kodiert für ein Protein von 3972 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 435 kDa. DNA-Doppelstrangbrüche treten in der "breakpoint cluster"-Region zwischen den Exons 8 und 14 auf, wobei nach der folgenden DNA-Reparatur der offene Leserahmen erhalten bleibt (Nilson *et al.*, 1996; Marschalek *et al.*, 1997; Reichel *et al.*, 1999). Verschiedene Studien an gesunden hämatopoetischen Zellen belegen eine enorme genetische Instabilität des *MLL*-Gens. Nach Exposition unterschiedlichster Substanzen kommt es häufig zu DNA-Doppelstrangbrüchen und zu chromosomalen Aberrationen (Felix, 2001; Doorn-Khosrovani *et al.*, 2007; Brassesco *et al.*, 2009). Besonders Konsensussequenzen der Topoisomerase II, DNase I hypersensitive Stellen und SARs sowie das vermehrte Auftreten repetitiver *Alu*-Elemente hängen mit häufigen DNA-Doppelstrangbrüchen zusammen (Schichman *et al.*, 1994; Broeker *et al.*, 1996; Strissel *et al.*, 1998; Strout *et al.*, 1998).

Die Transkription des *MLL*-Gens findet in nahezu allen Geweben statt, da es entscheidend an der epigenetischen Regulation beteiligt ist. Aufgrund auffälliger Sequenzhomologien zu den Proteinen Trithorax in *Drosophila melanogaster* und dem murinen Mll wird es in die stark konservierte Familie der Trithorax-Proteine eingeordnet (Tkachuk *et al.*, 1992; Ma *et al.*, 1993). Diese beeinflussen die Chromatinstruktur über Histonmodifikationen, sodass ein aktiver Transkriptionsstatus von Genen erzielt wird (Ringrose und Paro, 2004). Essenziell ist dabei jedoch ein Wechselspiel von transkriptioneller Aktivierung über Trithorax-Proteine und transkriptioneller Repression über antagonistische Gegenspieler der Polycomb-Proteine (Schuettengruber *et al.*, 2011). Die prominenteste Funktion der Trithorax-Proteine ist die Regulation des Expressionsmusters von *homeobox*-Genen (*HOX*-Gene) zur Ausbildung eines korrekten Körperbauplans und zur Gewebespezifizierung während der Embryonalentwicklung. Auch das MLL-Protein ist für die *HOX*-Genexpression entscheidend. Im lethalen homozygoten Mll^{-/-}-knockout konnte keine *HOX*-Genexpression beobachtet werden (Yu *et al.*, 1995). Entscheidend für den korrekten Ablauf der Embryogenese ist hierbei allerdings nicht die initiale Aktivierung, sondern die Aufrechterhaltung des Transkriptionsmusters der *HOX*-Gene während der Entwicklung (Yu *et al.*, 1998). Dieses Muster beeinflusst neben der Ausbildung des korrekten Körperbauplans auch die Blutbildung (Wan *et al.*, 2011; Artinger *et al.*, 2013). So zeichnen sich Mll-defiziente Embryonen durch

eine fehlerhafte fötale Hämatopoese (Hess *et al.*, 1997) und durch eine Reduzierung hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen aus (Yagi *et al.*, 1998; Ernst *et al.*, 2004). Generell maßgebend für die Funktion als positiver *HOX*-Gen Regulator ist die Bindung des MLL-Proteins an beispielsweise *Hoxa9*- und *Hoxc8*-Promotoren und die Histon-Methylierung über die stark konservierte C-terminal gelegene SET-Domäne des MLL-Proteins (Milne *et al.*, 2002; Nakamura *et al.*, 2002; Terranova *et al.*, 2006). Spezifische Histon-3-Trimethyl-Lysin-4-Signaturen (H3K4_{me3}) auf dem Chromatin werden durch das MLL-Protein über seine Funktion als Histonmethyltransferase aufgebracht (Yokoyama *et al.*, 2004; Cosgrove und Patel, 2010). Durch Bindung der SET-Domäne an die Proteine RBBP5, WDR5 und ASH2L entsteht der HMT-Subkomplex, welcher essenziell für die Methyltransferaseaktivität des MLL-Proteins ist (Nagy *et al.*, 2002; Dou *et al.*, 2006). Neben Histon-Methylierungen sind weitere Modifikationen des Chromatins an der Regulation des *HOX*-Gen Expressionsmusters beteiligt. So werden Acetylierungen durch die Bindung des MLL-Proteins an die Histon-Acetyltransferase MOF auf dem Chromatin aufgebracht (Dou *et al.*, 2005). Neben der Regulation des Expressionsmusters von *HOX*-Genen spielt das MLL-Protein außerdem eine Rolle in der Regulation des Zellzyklus (Liu *et al.*, 2007). Über Bindung an den "host-cell-factor-1" (HCF-1) wird die zellzyklusspezifische transkriptionelle Aktivierung induziert (Tyagi *et al.*, 2007), während eine Bindung an den Tumorsuppressor MENIN1 Cyclin und Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitoren aktiviert (Milne *et al.*, 2005; Takeda *et al.*, 2006). Weiterhin können dem MLL-Protein auch reprimierende Funktionen zugesprochen werden, da über die MT-Domäne des MLL-Proteins Histondeacetylasen, Proteine der Polycomb-Gruppe oder Corepressoren gebunden werden können (Xia *et al.*, 2003). Ein anderes Beispiel für die Rolle des MLL-Proteins als Aktivator oder Repressor kann im zentralen Teil des MLL-Proteins beobachtet werden. Hier befinden sich drei "plant-homeo-domain-Finger" (PHD-Finger), welche Protein-Protein-Interaktionspotenzial besitzen, sowie eine die PHD-Finger regulierende Bromodomäne. Der am besten charakterisierte PHD3 bindet entweder H3K4_{me3}-Signaturen, was für die MLL-assoziierte Aktivierung der Transkription essenziell ist, oder bindet das Cyclophilin Cyp33 wodurch die Expression von Zielgenen reprimiert wird (Chang *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2010; Rössler und Marschalek, 2013; Ali *et al.*, 2014). Eine weitere Domäne des MLL-Proteins ist die Transaktivatordomäne (TAD), welche durch Interaktion mit dem "CREB-binding-protein" zur Transkriptionsaktivierung beiträgt (Ernst *et al.*, 2001). Außerdem binden die drei AT-Haken im N-Terminus des MLL-Proteins sequenzspezifisch in der kleinen Furche der DNA (Zeleznik-Le *et al.*, 1994) und üben über Bindung an GADD34 Einfluss auf die Chromatinstruktur aus (Adler *et al.*, 1997 und 1999). Die zwei nukleären Lokalisationssequenzen (NLS) bewirken zudem den Transport des MLL-Proteins in den Zellkern (Yano *et al.*, 1997).

Über die Bindung der verschiedenen Domänen des MLL-Proteins an die beschriebenen Proteine bildet sich ein großer MLL-Proteinkomplex, der generell als epigenetischer Regulator angesehen werden kann (Nakamura *et al.*, 2002; Yokoyama *et al.*, 2004; Dou *et al.*, 2005). Vor der Assemblierung dieses Komplexes wird das MLL-Protein an zwei konservierten Protease-Erkennungssequenzen durch die Threonin-Aspartase Taspase 1 in zwei Fragmente MLL^N (p300) und MLL^C (p180) gespalten (Yokoyama *et al.*, 2002; Hsieh *et al.*, 2003). Im Anschluss interagieren die beiden Fragmente über die zwei intramolekularen Interaktionsdomänen FYRN und FYRC, was zur Stabilisierung des Komplexes führt (Hsieh *et al.*, 2003; Pless *et al.*, 2011). Ohne diese Stabilisierung werden sowohl MLL^N als auch MLL^C direkt nach der proteolytischen Spaltung abgebaut (Yokoyama *et al.*, 2011). So scheint die intramolekulare Interaktion nach proteolytischer Spaltung essenziell für das MLL-Protein zu sein, wobei eine Inhibition der Spaltung weniger Auswirkungen auf die Funktion des MLL-Proteins zeigt (Yokoyama *et al.*, 2013).

AF4

Das humane AF4-Protein (ALL-1 fused gene on chromosome 4), auch FEL genannt (Morrissey *et al.*, 1993), wird durch das Gen *AFF1* (*AF4/FMR2 family, member 1*) auf Bande 21 des langen Arms von Chromosom 4 kodiert. Das Gen überspannt einen Bereich von ~300 kb mit 20 Exons wobei die ersten Exons (Exon 1a, 1b) alternativ sind. Das mRNA Transkript umfasst 10,5 kb und kodiert für ein Protein von 1210 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 131 kDa, apparent 171 kDa. Über ein alternatives Polyadenylierungssignal im Exon 3 kann es zur Translation eines kürzeren Transkripts aus 2,8 kb kommen, wodurch das kleinere FelC-Protein entsteht. DNA-Doppelstrangbrüche treten in der "breakpoint cluster"-Region zwischen den Exons 3 und 6 auf (Nilson *et al.*, 1997).

Das ubiquitär exprimierte AF4-Protein (Chen *et al.*, 1993; Frestedt *et al.*, 1996) wird aufgrund der Domänenstruktur der ALF-Proteinfamilie (AF4, LAF4 und FMR2) zugeordnet (Nilson *et al.*, 1997). Charakteristisch sind sechs konservierte Domänen wie die familienpezifische ALF-Domäne, zwei Homologiedomänen (NHD und CHD), eine serinreiche Domäne (pSer) und zwei nukleäre Lokalisationssequenzen (NLS) über die das AF4-Protein in subnukleären Kompartimenten lokalisiert ist (Li *et al.*, 1998). Innerhalb der ALF-Domäne befindet sich außerdem ein Erkennungsmotiv für die beiden E3-Ubiquitin-Ligasen SIAH1 und SIAH2. Die Bindung der E3-Ubiquitin-Ligasen ist essenziell für eine streng regulierte Expression und eine Regulation des proteasomalen Abbaus des AF4-Proteins. So führt eine Überexpression des AF4-Proteins *in vitro* zum Verlust der Kontaktinhibition und zu Wachstumstransformation der Zelle (Bursen *et al.*, 2004). Im Mausmodell konnte außerdem über eine Punktmutation im SIAH-Erkennungsmotiv gezeigt werden, dass die Überexpression des AF4-Proteins zum Verlust von Purkinje-Zellen im Kleinhirn führt, wodurch es zu einer Einschränkung von

motorischen Fähigkeiten der Mäuse kommt ("robotic mouse") (Isaacs *et al.*, 2003; Oliver *et al.*, 2004; Bitoun *et al.*, 2009). Auf der anderen Seite führt die Inhibition der Expression des AF4-Proteins *in vitro* zu einer Wachstumsretardierung (unveröffentlichte Daten AK Marschalek) sowie zu Defekten in der B- und T-Zell Entwicklung im Mausmodell (Isnard *et al.*, 2000). Diese Effekte scheinen auf molekularer Ebene durch die Funktion des AF4-Proteins als Transkriptionsfaktor begründet, da AF4 sowohl an die DNA bindet als auch die Transkription aktiviert (Prasad *et al.*, 1995; Ma und Staudt, 1996). Außerdem konnte in zahlreichen Studien eine Interaktion zu den Proteinen AF9, ENL, AF10, DOT1L und pTEFb sowie eine Assoziation mit weiteren transkriptionellen Faktoren gezeigt werden, was in der Folge zu H3K79_{me3}-Signaturen auf dem Chromatin und damit zur Aktivierung der RNA-abhängigen transkriptionellen Elongation führt (Rubnitz *et al.*, 1994; Erfurth *et al.*, 2004; Zeisig *et al.*, 2005; Bitoun *et al.*, 2007; Yokoyama *et al.*, 2010; Benedikt *et al.*, 2011; Esposito *et al.*, 2011).

2.4.3 Struktur und Funktion der Fusionsproteine MLL•AF4 und AF4•MLL

MLL•AF4

Das MLL•AF4-Protein, aus dem N-Terminus des MLL-Proteins und dem C-Terminus des AF4-Proteins, besteht je nach Position der DNA-Doppelstrangbrüche der beteiligten Gene aus ~2100-2400 Aminosäuren und hat ein entsprechendes Molekulargewicht von 230-260 kDa.

Funktionell beeinflusst das Fusionsprotein stammzellähnliche Eigenschaften der leukämischen Blasten. Studien zur Identifizierung von Zielgenen des MLL•AF4-Proteins zeigen die Aktivierung eines Transkriptionsmusters, welches hämatopoetischen Stammzellen ähnelt (Guenther *et al.*, 2008). Hierunter können beispielweise Gene des HOXA-Clusters, wie HOXA7 und HOXA10 identifiziert werden (Gaussmann *et al.*, 2007; Bernt *et al.*, 2011). Allerdings wird eine Veränderung der HOX-Genexpression nicht immer in t(4;11)-Zelllinien und Patienten mit einer t(4;11)-assoziierten Leukämie beobachtet (Bertrand *et al.*, 2003; Thomas *et al.*, 2005; Trentin *et al.*, 2009). Weiterhin wurden charakteristische Gene wie FLT3, MYC, MEIS1 oder RUNX1 als MLL•AF4-Targets ermittelt (Wilkinson *et al.*, 2013). Auch hier treten diverse Veränderungen der Expression in Abhängigkeit des Fusionsproteins auf, was beispielsweise sowohl für das RUNX1-Protein (Wilkinson *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2014) als auch für FLT3 beobachtet werden kann (Chillon *et al.*, 2012). Weiterhin beeinflusst das Fusionsprotein MLL•AF4 die Selbsterneuerungskapazität von Zellen in Abhängigkeit der Telomerase (Gessner *et al.*, 2010). Da jedoch in CD34⁺ humanen hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen ein Einfluss von MLL•AF4 auf die normale Entwicklung der Zellen ausgeschlossen werden konnte (Montes *et al.*, 2011), scheinen die

Stammzeleigenschaften über die Expression des Fusionsproteins in t(4;11)-Zellen variabel. Eine andere Eigenschaft des Fusionsproteins MLL•AF4 ist die Blockierung der Apoptose. So tritt unter MLL•AF4-exprimierenden Zellen weniger programmierter Zelltod nach längeren Wachstumsphasen (Montes *et al.*, 2011), nach Serumentzug (Caslini *et al.*, 2004; Gaussmann *et al.*, 2007), nach Induktion der Apoptose mit TNF α (Tamai *et al.*, 2011) und nach Behandlung mit bestimmten Arzneimitteln auf (Kersey *et al.*, 1998). Wird die Expression des Fusionsproteins dagegen inhibiert, werden erhöhte Apoptoseraten beobachtet (Thomas *et al.*, 2005). Eine mögliche Ursache der Effekte könnte die erhöhte MLL•AF4-abhängige Expression von Mitgliedern der Calcium-bindenden S100-Proteine sein. Diese Proteine sind bei der Entstehung zahlreicher Erkrankungen involviert (Marenholz *et al.*, 2004) und sind auch in t(4;11)-Leukämien beispielsweise nach Behandlung mit Prednisolon sowie in Zelllinien nach Expression der Fusionsproteine hochreguliert (Gaussmann *et al.*, 2009; Tamai *et al.*, 2011; Spijkers-Hagelstein *et al.*, 2012). Außerdem führt die Inhibition von S100A6 zu erhöhter Apoptose in t(4;11)-Zellen (Tamai *et al.*, 2012; Dou *et al.*, 2013). Ein Mechanismus der die Blockierung der Apoptose durch Expression des Fusionsproteins begünstigt, ist die MLL•AF4-abhängige Blockierung des Zellzyklus. So konnte im induzierbaren Zellsystem ein G1-Phase Arrest nach Serumentzug beobachtet werden (Caslini *et al.*, 2004; Gaussmann *et al.*, 2007). Dieser Zellzyklus-blockierende Effekt kann vermutlich auf die Wechselwirkungen des MLL N-Terminus mit MENIN1 zurück geführt werden (Kapitel 2.4.2; Milne *et al.*, 2005; Xia *et al.*, 2005). Da die Inhibition der Apoptose und die damit assoziierte Blockierung des Zellzyklus über das Fusionsprotein MLL•AF4 durch unterschiedliche Ereignisse, wie Behandlung mit zytotoxischen Agenzien aber auch durch anhaltendes Wachstum initiiert werden kann, wurde im murinen, induzierbaren System stabil exprimierender MLL•AF4-Zellen eine Inhibition der Proliferation beobachtet (Gaussmann *et al.*, 2007). Die lentivirale Transduktion von humanen hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen mit der MLL•AF4-Fusion führte jedoch zur Steigerung der Proliferation (Montes *et al.*, 2011). Ursache für die Zunahme des Wachstums könnte eine aktivierte MAP-Kinase Signaltransduktion sein. So konnte gezeigt werden, dass das MLL•AF4-Protein den RAS-abhängigen Transkriptionsaktivator Elk1 aktiviert (Ng *et al.*, 2010) und die Expression der Rezeptor-Tyrosinkinase EphA7 verstärkt, wodurch der Phosphorylierungsstatus der ERK-Kinase erhöht wird (Nakanishi *et al.*, 2007). Wie genau die Proliferation von MLL•AF4-exprimierenden Zellen beeinflusst wird, bleibt jedoch weiterhin zu klären. Außerdem müssen weiterführende Studien des Fusionsproteins MLL•AF4 die Rolle der erhöhten Expression und der Prozessierung von mikroRNAs durch die Rekrutierung des Drosha-Proteins über das Fusionsprotein aufklären (Nakamura *et al.*, 2007). Trotz aller beschriebener Eigenschaften kann jedoch ein transformierendes Potenzial des MLL•AF4-Proteins ausgeschlossen werden (Bursen *et al.*, 2004).

AF4•MLL

Das AF4•MLL-Protein, aus dem N-Terminus des AF4-Proteins und dem C-Terminus des MLL-Proteins, besteht je nach Position der DNA-Doppelstrangbrüche der entsprechenden Gene aus ~2800-3200 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 300-350 kDa. Es vereint besondere Domänen der beiden Wildtyp-Proteine, die einen Einfluss auf die Expression und die Struktur des AF4•MLL-Proteins haben. Über den C-Terminus des MLL-Proteins besitzt das Fusionsprotein die beiden Schnittstellen für die proteolytische Spaltung über Taspase 1 in ein N-terminales (p178) und ein C-terminales Fragment (p134). Nach Heterodimerisierung über die intramolekularen Interaktionsdomänen FYRN und FYRC kommt es zur Stabilisierung des Proteins (Yokoyama *et al.*, 2002; Hsieh *et al.*, 2003; Pless *et al.*, 2011). Außerdem enthält das AF4•MLL-Protein über den N-Terminus des AF4-Proteins die Erkennungssequenz für die E3-Ubiquitin-Ligasen SIAH1 und SIAH2, in der familien-spezifischen ALF-Domäne. Aufgrund sterischer Gegebenheiten durch die Heterodimerisierung findet jedoch keine Bindung der E3-Ubiquitin-Ligasen und somit kein proteasomaler Abbau des Fusionsproteins statt, was ebenfalls zur Stabilisierung und somit zur Akkumulation des Proteins beiträgt (Bursen *et al.*, 2004).

In vitro-Studien zeigen, dass Wachstumskurven von murinen AF4•MLL-exprimierenden Zellen flacher verlaufen als die Kurven vergleichender Kontrollen (Gaussmann *et al.*, 2007). Außerdem zeigen knockdown-Experimente des Fusionsproteins einen verringerten Einfluss von AF4•MLL auf die Proliferation und das Überleben von t(4;11)-Zelllinien (Kumar *et al.*, 2011), sodass die Signifikanz der reziproken Fusion oft diskutiert wird (Sanders *et al.*, 2011), zumal sie nur bei etwa 80 % der t(4;11)-Patienten nachgewiesen werden kann (Kowarz *et al.*, 2007). Dennoch können dem AF4•MLL-Protein essenzielle Funktionen zugeschrieben werden. So kann unter genauerer Analyse des Wachstums von AF4•MLL-exprimierenden Zellen eine erhöhte Apoptoserate, aber auch ein verstärkter Metabolismus beobachtet werden (Gaussmann *et al.*, 2007). Durch diese Effekte scheint das AF4•MLL-Protein kaum Einfluss auf die Proliferation der Zellen zu haben, da bei den rasch wachsenden Zellen mit einem hohen Metabolismus zügig der programmierte Zelltod eintritt. Durch die Aufklärung des AF4•MLL-Multiproteinkomplexes kann der verstärkte Metabolismus der Zellen erklärt werden. Der Komplex vereint Proteine der SET-Domäne des MLL-Proteins, welcher H3K4_{me3}-Signaturen auf dem Chromatin aufbringt, mit der Bindung an pTEFb über den AF4 N-Terminus (Benedikt *et al.*, 2011). Über diese Bindung ist AF4•MLL entscheidend an der Aktivierung zellulärer Transkription beteiligt, wodurch die erhöhten Metabolismusraten in AF4•MLL-exprimierenden Zellen resultieren. Weiterhin interagiert der Komplex mit dem Wildtyp AF4-Protein, wodurch auch C-terminal AF4-assoziierte Proteine wie DOT1L über AF4•MLL beeinflusst werden (Benedikt *et al.*, 2011). Für andere MLL-Fusionen konnte bereits gezeigt werden, dass die Histonmethyltransferase DOT1L essenziell für die

Transformation ist (Deshpande *et al.*, 2013; Shen *et al.*, 2013), weshalb momentan Analysen von DOT1L-Inhibitoren verstärkt Gegenstand aktueller Forschungen sind (Anglin und Song, 2013; Basavapathruni *et al.*, 2014). Auch das reziproke AF4•MLL-Fusionsprotein führt nach Überexpression zum Verlust der Kontaktinhibition und zu Wachstumstransformation *in vitro*, was auf ein onkogenes Potenzial des Fusionsproteins deutet (Bursen *et al.*, 2004). Ob die Transformation jedoch abhängig von der Interaktion des AF4•MLL-Komplexes mit dem Wildtyp AF4-Protein und DOT1L ist, bleibt zu klären. Eine weitere Funktion des AF4•MLL-Proteins ist die Regulation von Genen hämatopoetischer Zellen. Der C-Terminus des MLL-Proteins verfügt über Interaktionspotenzial mit dem Transkriptionsfaktor RUNX1. Diese Interaktion ist auch für einen aktiven Transkriptionsstatus über H3K4_{me3}-Signaturen des *PU.1*-Gens entscheidend, welches hämatopoetische Stammzeleigenschaften aufrecht erhält und beispielsweise für eine aktive Expression von FLT3 sorgt (Huang *et al.*, 2011; Koh *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2013). Über den C-terminalen MLL-Teil scheint auch das AF4•MLL-Protein an RUNX1 zu binden (Wilkinson *et al.*, 2013). Weiterhin konnten nach Coexpression beider Fusionen eine erhöhte Expression der Gene *NANOG* und *OCT4* beobachtet werden, die mit dem *SOX2*-Gen für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz und für die Selbsterneuerung von embryonalen Stammzellen verantwortlich sind (Gaussmann *et al.*, 2007; Eberle *et al.*, 2010).

2.4.4 Mausmodelle der Translokation t(4;11)(q21;q23)

Die Erforschung des Pathomechanismus ist essenziell für die Therapie und Heilung von Erkrankungen. Da *in vitro*-Methoden oft nur unzureichende Aussagen über die Pathogenese von Leukämien zulassen, sind Tiermodelle unerlässlich, welche Phänotypen analog zur humanen Erkrankung imitieren. Hierzu werden meist transgene Mausmodelle verwendet (Carver und Pandolfi, 2006). Die genetische Veränderung von *in vitro* vermehrten embryonalen Stammzellen durch das Transgen, erfolgt dabei durch Elektroporation und anschließender homologer Rekombination. Die Zellen werden im Anschluss in Blastozysten injiziert und in Muttertiere verpflanzt. Dabei entstehende männliche chimäre Mäuse werden mit weiblichen Mäusen des Wildtyps rückgekreuzt, wobei heterozygote Tiere entstehen die wiederum durch Kreuzung zu Homozygotie führen.

Da Translokationen des *MLL*-Gens immer durch die Bildung eines direkten Fusionsproteins MLL-X (auch Derivat 11 genannt) charakterisiert sind und sich durch variable reziproke Fusionsproteine auszeichnen, wurde dem Derivat 11 allgemein die entscheidende Rolle in der Pathogenese der Leukämie zugesprochen. Allen Derivaten 11 gemein ist der N-Terminus des MLL-Proteins, welcher im Zuge dieser Hypothese auch ohne Fusionspartner auf onkogene Eigenschaften untersucht wurde. In einem transgenen Mausmodell wurde die

Expression des MLL N-Terminus (Exon 1-8) in chimären Mäusen untersucht, wobei kein Einfluss auf die hämatopoetische Differenzierung oder auf den generellen Gesundheitszustand der Tiere beobachtet wurde (Corral *et al.*, 1996). Onkogene Eigenschaften des MLL N-Terminus können nur nach Di- oder Oligomerisierung gezeigt werden. So entwickeln transgene Mäuse nach Expression eines MLL-lacZ-Konstrukts nach langer Latenzzeit lymphatische und myeloische Leukämien (Dobson *et al.*, 2000). Zusätzlich führt die Expression des Konstrukts zur Immortalisierung von Knochenmarkzellen, da das β -Galaktosidase Protein in aktiver Form tetramere Strukturen ausbildet (Martin *et al.*, 2003). Weiterhin kann den Oligomerisierungsdomänen von zytoplasmatischen MLL-Fusionspartnern eine Notwendigkeit für die Transformation zugewiesen werden (So *et al.*, 2003). Somit scheint die Fusion zum Translokationspartner essenziell für die transformierenden Eigenschaften des MLL N-Terminus und somit für Derivat 11-Proteine.

Transgene Mausmodelle für MLL•AF4

Die ersten Tiermodelle für die t(4;11)-assoziierte Leukämie wurden im Jahr 2006 entwickelt. In einem transgenen Mausmodell wurde der C-Terminus des humanen *AF4* mit den Exons 1-7 des murinen *Mll* rekombiniert. Heterozygote Tiere wiesen ein stumpferes Gesicht, größere Ohren und einen höher gesetzten Schwanz auf, sowie eine statistisch erhöhte Anzahl an Lymphozyten und gering vermehrte Anzahlen von Monozyten und Neutrophilen im Blut. Zellen des Knochenmarks wiesen pro B-Zellmarker und myeloische Marker auf, zeigten jedoch kein Transformationspotenzial *in vitro*. Im Mausmodell konnten variable lymphatische und myeloische Erkrankungen nach \approx 520 Tagen beobachtet werden, wobei im Blut selten krankhafte Veränderungen auftraten und so am häufigsten B-Zell Lymphome diagnostiziert wurden (Chen *et al.*, 2006). Da in anderen Studien ein knockin des *AF4* C-Terminus embryonal lethal war, wurde sich des konditionalen Cre/loxP-Rekombinationssystems bedient. Hierbei ist das Transgen in chimären Mäusen durch loxP-Elemente flankiert. Durch Kreuzung mit einer Cre-Maus wird die Rekombinase unter zelltypspezifischen Promotoren exprimiert und je nach Orientierung der loxP-Elemente das Transgen eliminiert oder invertiert (Metzger und Chambon, 2001). Die Inversionsmethode, welche humanes *AF4* (Basen 1504-4304) mit dem N-Terminus des murinen *Mll* (Exon 1-10) unter lymphozytenspezifischen Promotoren fusioniert, zeichnete sich nach durchschnittlich vierzehn Monaten durch extreme Splenomegalien aus. Allerdings trat keine Erkrankungen des Blutes auf, weshalb ein disseminiertes B-Zell Lymphom diagnostiziert wurde (Metzler *et al.*, 2006). Die Eliminationsmethode, durch welche ein Stop-Codon vor der *AF4*-cDNA-Kassette entfernt wurde, fusionierte *Mll* Exon 1-8 mit *AF4* (Aminosäure 347-1210) unter Kontrolle des endogenen *Mll*-Promotors. Neben Kreuzungen mit Cre-Mäusen wurde die Rekombination durch Transduktion von Knochenmarkzellen der chimären Mäuse mit hohen Zahlen an

Cre-Retroviren ausgelöst. Das Modell zeichnete sich durch eine große Spanne der Latenzzeit von 25-242 Tagen aus. Da die Krankheitsphänotypen jedoch schneller unter Virus-Transduktion entstanden, lässt sich ein entsprechender Einfluss des Virus nicht ausschließen. Im Modell wurden sowohl Phänotypen der AML als auch Phänotypen der ALL beobachtet, die als prä B-Zell Leukämien oder Leukämien mit gemischtem Hintergrund (MLL = mixed lineage leukemia) klassifiziert wurden (Krivtsov *et al.*, 2008). In einem weiteren transgenen Mausmodell wurde ein humanes MLL•AF4-Konstrukt auf einem retroviralen Vektor direkt in die Zellen der Blastozyste injiziert. Die Mäuse entwickelten nach 14 Monaten B-Zell Lymphome mit Infiltration vieler Organe wie Leber, Lunge, Milz und Nieren (Tamai und Inokuchi, 2013). Zusätzlich konnte in diesem Modell gezeigt werden, dass die Kreuzung mit einer Maus, welche eine konstitutiv aktive Mutation des *KRAS*-Gens (G12D) trägt, zu einer verkürzten Latenzzeit führte (5,5 vs. 14 Monate) wobei der Phänotyp erhalten blieb und *KRAS*(G12D)⁺/MLL•AF4⁻-Mäuse nicht erkrankten (Tamai *et al.*, 2011).

Xenograft-Mausmodell für MLL•AF4

Im Unterschied zu transgenen Mäusen, die das künstlich eingeführte Gen sowohl in somatischen Zellen als auch in Keimbahnzellen tragen, können mit viralen Methoden bestimmte Zellen verändert und anschließend transplantiert werden, wodurch auch Rückschlüsse auf den zellulären Ursprung der Erkrankung möglich sind. Hierfür werden retrovirale Systeme verwendet, die das Transgen über infizierende Retroviren in die Zielzelle einbringen. Neuere Studien bedienen sich dabei an lentiviralen Expressionssystemen, da Lentiviren im Unterschied zu anderen Retroviren über einen Präintegrationskomplex die Kernmembran passieren und auch ruhende Zellen infizieren können (Naldini, 1998). Dennoch ist die Effizienz eines viralen Systems immer vom Zelltyp und dem Konstrukt abhängig. Im Mausmodell zur Untersuchung von MLL•AF4 in humanen Zellen wurde ein trunkiertes *MLL* im Exon 10 mit dem Exon 8 des *AF4* fusioniert und lentiviral in CD34⁺ hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen eingebracht. Da der Ursprung leukämischer Zellen *in utero* vermutet wird, kann so die Funktion des Fusionsproteins in Zellen eines frühen Entwicklungsstadiums analysiert werden. Die anschließende Xenotransplantation in immunsupprimierte Mäuse zeigte eine Entwicklung von 60 % B-Zellen, 5-20 % myeloischen Zellen und 5-20 % unreifen Zellen. Im Gegensatz zu CD10-negativen pro B t(4;11)-Patientenzellen exprimierten 80 % der Zellen im Mausmodell das CD10-Antigen und zeigten einen prä B-Zell Phänotyp. Diese Zellen zeigten somit keine Blockierung in der Differenzierung. *In vitro*-Analysen der Zellen zeigten weiterhin ein gesteigertes klonogenes Wachstum und eine erhöhte Proliferation sowie höhere Überlebensraten. Dennoch konnte kein Krankheitsphänotyp über den Zeitraum von sechzehn Wochen in transplantierten Mäusen beobachtet werden (Montes *et al.*, 2011).

Retrovirales Transduktions-/Transplantationsmodell für AF4•MLL

Da reziproken Fusionsproteinen von Leukämien generell weniger Aufmerksamkeit zukommt (siehe oben) wurde bisher nur ein Mausmodell für AF4•MLL etabliert. Hierbei wurde ein retrovirales Expressionssystem verwendet, da Retroviren für andere MLL-Fusionen bereits erfolgreiche Modelle lieferten (Slany *et al.*, 1997; DiMartino *et al.*, 2000; Lavau *et al.*, 2000; So *et al.*, 2003; Ono *et al.*, 2005; Barbaré *et al.*, 2007). Als Konstrukte wurden die cDNAs von AF4•MLL (AF4 Exon 4 fusioniert mit MLL Exon 10) und MLL•AF4 (MLL Exon 8 fusioniert mit AF4 Exon 5) aus der t(4;11)-Zelllinie SEM verwendet (Marschalek *et al.*, 1995). Die entsprechenden Retroviren wurden für die Infektion von murinen hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen eingesetzt und die Zellen anschließend in die Blutbahn von Empfängermausen transplantiert. Mit einer Penetranz von 35 % zeigten Mäuse mit transplantierten AF4•MLL-exprimierenden Zellen einen Krankheitsphänotyp nach durchschnittlich 233 Tagen. Die Coexpression beider Fusionen führte ebenfalls zur Erkrankung der Mäuse (Penetranz 38 %, Latenzzeit \approx 266 Tage) während Mäuse mit transplantierten Zellen des MLL•AF4-Proteins keine Anzeichen einer Erkrankung über den Zeitraum von 381 Tagen zeigten. Alle erkrankten Mäuse wiesen eine Splenomegalie sowie vergrößerte Thymusgewebe auf. Außerdem wurden neben erhöhten Leukozytenwerten auch massive Infiltrationen vieler Organe wie Milz, Thymus, Leber, Lymphknoten und Nieren beobachtet. Immunphänotypische Untersuchungen klassifizierten die AF4•MLL-assoziierten Erkrankungen in Mäusen des retroviralen Transduktions-/Transplantationsmodells als pro B-Zell ALL (CD43⁺, B220⁺, CD3⁻, CD19⁻), B/T biphänotypische akute Leukämie (CD43⁺, B220⁺, CD3⁺) oder als Leukämie mit gemischtem Hintergrund (CD43⁺, B220⁺, Mac1⁺) (Bursen und Schwabe *et al.*, 2010).

Zusammengefasst rekapitulieren aktuelle Mausmodelle die humane Erkrankung der t(4;11)-assoziierten Leukämie nur unzureichend. Über die Expression des MLL•AF4-Fusionsproteins werden hauptsächlich andere Krankheitsphänotypen anstatt der pro B-ALL hervorgerufen. Außerdem sind die Erkrankungen im Tiermodell mit einer langen Latenzzeit gekoppelt, im Gegensatz zu dem extrem frühen Ausbruch beim Menschen im Säuglingsalter. Weiterhin zeigt auch das Mausmodell des reziproken AF4•MLL-Fusionsproteins eine lange Latenzzeit. Deshalb werden verschiedene Szenarien für die Etablierung eines Mausmodells häufig diskutiert, welche bei der Imitation der humanen Erkrankung essenziell sein könnten. Hierbei steht vor Allem die Kooperation beider Fusionsproteine im Mittelpunkt. Allerdings kann auch der Verwendung von Zellen des richtigen zellulären Ursprung im Tiermodell eine entscheidende Rolle zugeschrieben werden. Weiterhin könnten Stimulanzen oder kooperative genetische Veränderungen für die Leukämogenese notwendig sein (Stam, 2013).

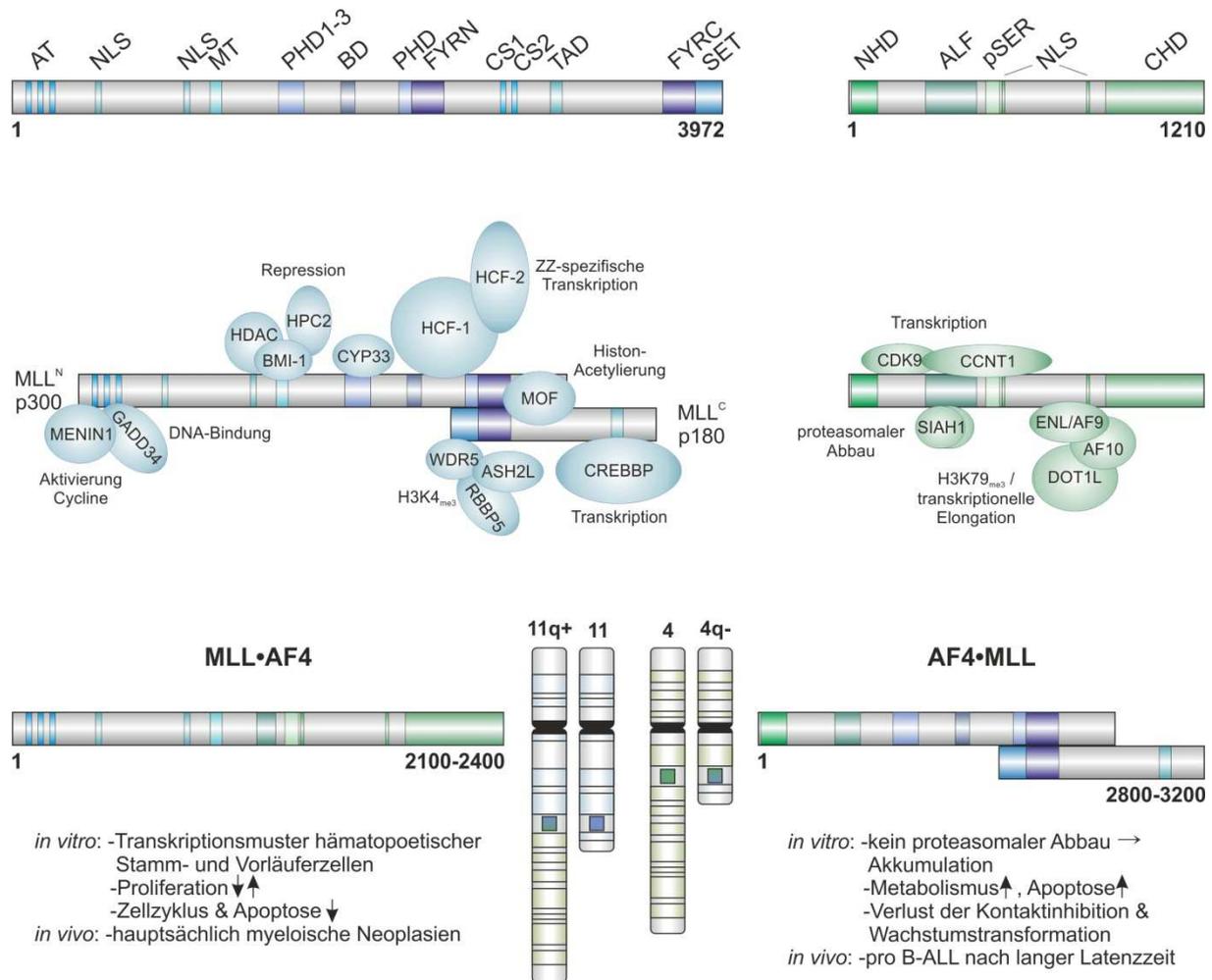


Abbildung 2.3: Struktur und Funktion von MLL, AF4, MLL•AF4 und AF4•MLL

Oben = Schematische Darstellung der Domänenstruktur des MLL- und des AF4-Proteins mit jeweiligen Größenangaben (AT = AT-Haken, NLS= nukleäres Lokalisationssignal, MT = MT-Domäne, PHD = plant-homeo-domain-Finger, BD = Bromodomäne, FYRN und FYRC = N- beziehungsweise C-terminale Dimerisationsdomäne, CS1 und CS2 = Schnittstellen der Taspase1, SET = SET-Domäne, NHD und CHD = N- beziehungsweise C-terminale Homologiedomäne, ALF = familienspezifische ALF-Domäne, pSER = Serin-reiche Domäne). Mitte = Multiproteinkomplexe des MLL- und des AF4-Proteins mit Interaktionspartner-assoziierten Funktionen (gezeigt sind die im Text erwähnten Interaktionspartner. Für genauere Studien der Komplexe siehe Prasad *et al.*, 1995; Nilson *et al.*, 1997; Nakamura *et al.*, 2002; Yokoyama *et al.*, 2004; Dou *et al.*, 2005; Zeisig *et al.*, 2005; Bitoun *et al.*, 2007 und Benedikt *et al.*, 2011). Unten = Schematische Darstellung der Domänenstruktur der Fusionsproteine MLL•AF4 und AF4•MLL mit jeweiligen Größenangaben und Funktionen *in vitro* und *in vivo*. Die Darstellung der Chromosomen 11 und 4 zeigt die resultierenden Fusionschromosomen nach reziproker Translokation, wobei die Gene *MLL* und *AF4* sowie *MLL•AF4* und *AF4•MLL* durch farbige Quadrate symbolisiert werden.

2.5 Sekundärmutationen in MLL-assoziierten Leukämien

Für Leukämien werden häufig "two hit"-Modelle postuliert, in denen proliferations- und überlebensbeeinflussende Mutationen mit den exprimierten Fusionsproteinen während der Leukämogenese kooperieren (Gilliland, 2001; Kosmider und Moreau-Gachelin, 2006). Für kindliche ALLs können beispielsweise oft zusätzliche genetische Veränderungen in Genen beobachtet werden, die essenziell für die Proliferation von differenzierenden B-Lymphozyten sind (Kuiper *et al.*, 2007). Da bei Säuglingen mit einer t(4;11)-assoziierten Leukämie kaum genetische Aberrationen der Kopienzahlen im Genom auftreten (Bardini *et al.*, 2010), könnten einzelne Punktmutationen in Genen eine Rolle spielen, auch wenn diese bisher nur selten identifiziert wurden (Dobbins *et al.*, 2013). Am häufigsten werden dabei Mutationen in den Genen *FLT3* und *RAS* diskutiert, weil diese allein häufig bei Patienten mit einer AML diagnostiziert werden und die Ursache der Erkrankung darstellen (Abbildung 2.2).

2.5.1 FLT3

Das humane *FLT3*-Gen (*FMS-like tyrosine kinase 3*) kodiert für eine membrangebundene Rezeptor-Tyrosinkinase die hauptsächlich in myeloischen und lymphatischen Vorläuferzellen exprimiert wird. Aufgrund der strukturellen Homologie wird sie den Klasse-III-Rezeptor-Tyrosinkinasen zugeordnet. Diese sind durch fünf Immunglobulin-ähnliche Domänen, eine Transmembrandomäne, eine juxtamembrane Domäne und durch zwei intrazelluläre Kinasedomänen charakterisiert. Weitere Mitglieder dieser Proteinfamilie sind der "colony-stimulating factor receptor" (FMS), der "steel factor receptor" (KIT) und die beiden "platelet-derived growth factor receptor A and B" (PDGFRA, PDGFRB). Die *FLT3*-Tyrosinkinase wird durch Bindung des *FLT3*-Liganden aktiviert, welcher in den meisten Geweben exprimiert wird. Nach der Bindung des Liganden wird die Konformation des inaktiven monomeren Rezeptors verändert, wodurch ein aktives Dimer entsteht. Dieses führt zur Aktivierung des PI3K- und RAS-Signalwegs, wodurch die Proliferation und Inhibition der Apoptose erhöht wird. Mutationen des *FLT3*-Gens kommen als Duplikation von 3 - >400 Basenpaaren in der juxtamembranen Domäne (*ITD*-Mutation = "internal tandem duplication", Exons 14 und 15) oder als Punktmutation in der Tyrosinkinase-Domäne vor (*TKD*-Mutation = "tyrosine kinase domain", Exon 20). Veränderungen der Konformation durch *ITD*-Mutationen führen zu Liganden-unabhängiger Dimerisierung, Autophosphorylierung und einer konstitutiven Aktivierung des Rezeptors. *TKD*-Mutationen resultieren ebenfalls in einem Liganden-unabhängigen konstitutiv aktiven Rezeptor, jedoch über eine erhöhte intrinsische Tyrosinkinase-Aktivität (Stirewalt und Radich, 2003).

Bei Patienten mit einer AML treten *FLT3*-Mutationen häufig auf. Während *ITD*-Mutationen bei 15-35 % der Patienten detektierbar sind, kommen *TKD*-Mutationen bei 5-10 % der AML-Patienten vor (Stirewalt und Radich, 2003). Generell sind *FLT3*-Mutationen bei AML-Patienten meist mit einer schlechten Prognose assoziiert, unabhängig von der sehr variablen Sequenz, Länge oder Lokalisation (Schnittger *et al.*, 2012). Bei ALL-Patienten treten *FLT3*-Mutationen generell selten auf. Am häufigsten kommen sie bei kindlichen ALLs mit hyperdiploidem Karyotyp mit etwa 21-25 % vor und auch bei Säuglingen und Kleinkindern mit genetischer Veränderung des *MLL*-Gens werden vor allem *TKD*-Mutationen bei 18 % der Patienten identifiziert (Armstrong *et al.*, 2004; Taketani *et al.*, 2004). Auftretende *FLT3*-Mutationen scheinen jedoch keinen Einfluss auf die Überlebenswahrscheinlichkeit von kindlichen ALL-Patienten zu haben (Barbosa *et al.*, 2014).

2.5.2 RAS

Die nahezu ubiquitär exprimierten humanen *RAS*-Gene *N*-, *K*- und *HRAS* kodieren für GTPasen, die als molekulare Schalter in zahlreichen zellulären Signalwegen der Proliferation, Differenzierung und des Überlebens von Zellen beteiligt sind. Sie bestehen aus einer hypervariablen Region und einer katalytischen G-Domäne. Durch post-transkriptionale Modifikationen der hypervariablen Region kommt es zur Lokalisation an der Plasmamembran. Werden aufgrund externer Stimuli beispielsweise Rezeptor-Tyrosinkinase aktiviert, kommt es zur Autophosphorylierung an Tyrosinresten der intrazellulären Kinasedomänen. Die phosphorylierten Tyrosinreste ermöglichen die Bindung der Adaptormoleküle SHC und GRB2, wodurch es zur Rekrutierung von Guaninnukleotid Austauschfaktoren (GEFs) wie dem SOS-Protein kommt. Die Dissoziation von gebundenem GDP in der katalytischen G-Domäne des RAS-Proteins wird durch GEFs stimuliert, wodurch ein Austausch zu gebundenem GTP erfolgt. Diese Bindung führt zu einer Konformationsänderung, welche die Affinität von RAS zu Effektoren wie Proteinen der RAF-Familie oder der PI3-Kinase steigert, wodurch diese aktiviert werden. Anschließend wird RAS durch die Hydrolyse des GTP zu GDP unter Beschleunigung durch GTPase aktivierende Proteine (GAPs) inaktiviert. Die häufigsten Mutationen der *RAS*-Gene sind Punktmutationen in der katalytischen G-Domäne, welche einen Glycin-Aminosäureaustausch bewirken (G12, G13, G61). Der Austausch führt zu einer Resistenz gegen die GAP-abhängige GTP-Hydrolyse, wodurch eine Stimulus-unabhängige konstitutiv aktive GTPase entsteht (Takashima und Faller, 2013).

RAS-Mutationen treten bei vielen Krebsarten auf. Am häufigsten kommen *KRAS*-Mutationen im Codon 12 vor, gefolgt von *NRAS*-Mutationen im Codon 61 (Takashima und Faller, 2013). Bei Patienten mit einer AML treten *RAS*-Mutationen zu etwa 11 % auf (Kadia *et al.*, 2012).

Während das Auftreten von *RAS*-Mutationen bei kindlichen AML-Patienten mit genetischen Veränderungen des *MLL*-Gens schwankt (0-20 %), kommen sie bei kindlichen ALL-Patienten mit genetischen Veränderungen des *MLL*-Gens mit einer Häufigkeit von 50 % vor (Mahgoub *et al.*, 1998; Liang *et al.*, 2006). Besonders scheinen sie mit der t(4;11)-ALL bei Säuglingen und Kleinkindern assoziiert und führen hier zu hohen Leukozytenzahlen bei Diagnose, starken Resistenzen bei Glucocorticoid-Behandlung und generell schlechten Überlebensraten (Driessen *et al.*, 2013; Barbosa *et al.*, 2014).

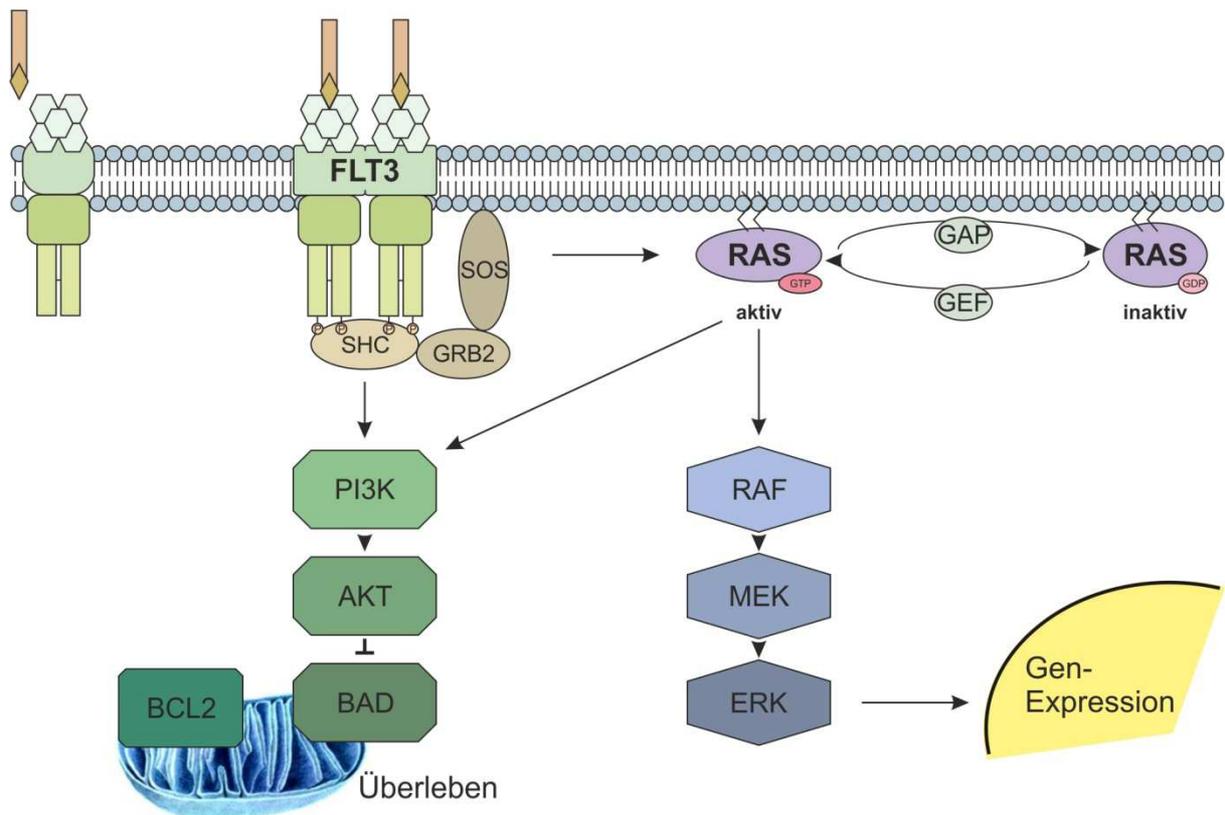


Abbildung 2.4: Der FLT3- und RAS-Signalweg

Die Rezeptor-Tyrosinkinase FLT3 (bestehend aus fünf Immunglobulin-ähnlichen Domänen, einer Transmembrandomäne, einer juxtamembranen Domäne und zwei intrazellulären Kinasedomänen [von oben nach unten]) führt nach Stimulation über den Liganden zur Aktivierung des PI3K- und RAS-Signalwegs. Der RAS-Signalweg wird über die RAS-abhängige Hydrolyse von GTP zu GDP unter Beschleunigung durch GTPase aktivierende Proteine (GAPs) aktiviert. Die Signalwege führen zu Genexpression sowie assoziiert zu Proliferation und zum Überleben der Zelle. (Abbildung modifiziert nach Stirewalt und Radich, 2003).

2.6 Koffein als Stimulans in MLL-assoziierten Leukämien

Koffein (IUPAC = 1,3,7-Trimethyl-2,6-purindion) ist ein in Pflanzen vorkommendes Xanthin-beziehungsweise Purinalkaloid-Derivat. Es wird vor allem in anregenden Getränken in üblichen Dosen von 50-200 mg eingenommen und wirkt hauptsächlich stimulierend auf das Zentralnervensystem aber auch positiv-chronotrop und -inotrop sowie bronchodilatierend und diuretisch (Mutschler *et al.*, 2001). Molekular bindet Koffein als Antagonist an Adenosin-Rezeptoren, vor allem am A_{2A} -Rezeptor welcher in Basalganglien, Blutgefäßen und Immunzellen von Milz und Thymus sowie in Leukozyten und Thrombozyten exprimiert wird. Durch die Bindung von Koffein an den Rezeptor werden cAMP-vermittelte Signaltransduktionen in Proteinkinase A-, MAP-Kinase- und PI3-Kinase-Signalwegen inhibiert (Chen *et al.*, 2013). Weiterhin hemmt Koffein die Aktivität der ATM- und ATR-Kinase, da sie zur Familie der Serin-/Threoninkinasen mit einer PI3K-ähnlichen katalytischen Domäne gehören (Blasina *et al.*, 1999; Sarkaria *et al.*, 1999). Beide Kinasen spielen eine entscheidende Rolle in der Aktivierung der zellulären Antwort nach DNA-Doppelstrangbrüchen. Hierbei kommt es zu DNA-Reparaturmechanismen, zur strikten Kontrolle des Zellzyklus, zur Modulation von Signalwegen und zu Apoptose oder Seneszenz (Shiloh und Ziv, 2013). Für Krebserkrankungen wird oftmals ein Einfluss aktiver DNA-Reparaturmechanismen diskutiert. Durch die Aktivierung des Mechanismus kommt es zu Seneszenz und somit zur Ausbildung von Resistenzen der Krebszellen gegenüber Bestrahlung und chemotherapeutischen Agenzien. Deshalb könnten Inhibitoren des DNA-Reparatur-signalwegs die Therapierbarkeit von Krebserkrankungen durch die Aufhebung der Seneszenz verbessern (Bartkova *et al.*, 2006; Mallette *et al.*, 2007; Hazawa *et al.*, 2012). Auch für Leukämien werden solche Inhibitoren diskutiert (D'Andrea, 2010), da vor allem bei Hochrisiko-Leukämien senescente und somit resistente Klone zu einem schnellen Rezidiv führen können. Außerdem konnten bereits anti-seneszente Effekte von Koffein, welches ein häufig verwendeter Inhibitor der ATM- und ATR-Kinasen des DNA-Reparaturmechanismus ist, auf Zellen mit genetischer Veränderung des *MLL*-Gens gezeigt werden. In einem *MLL*•*ENL*-basierten Mausmodell wurden nach sieben Monaten hyperproliferierende myeloische Zellen im Knochenmark und der Milz von Mäusen detektiert. Das gesteigerte Wachstum ließ jedoch ein bis zwei Monate später nach und die Zellen verfielen in Seneszenz, wodurch ein Ausbruch der Krankheit verhindert wurde. Diese Seneszenz konnte auf eine Aktivierung der ATM- und ATR-Kinase im DNA-Reparaturmechanismus zurückgeführt werden. Weiterhin führte die Inhibition beider Kinasen durch Behandlung der sieben Monate alten Mäuse mit Koffein als Stimulans zur Verkürzung der Latenzzeit und zum Ausbruch der Leukämieerkrankung nach durchschnittlich 62 Tagen (Takacova *et al.*, 2012).

2.7 Zielsetzung der Arbeit

Die t(4;11)-assoziierte Leukämie mit dem Phänotyp einer pro B-ALL ist eine häufig diagnostizierte Krebserkrankung bei Säuglingen in geringem Alter. Sie zeichnet sich durch eine schlechte Prognose aus, da die Krankheit kaum auf die Therapie anspricht und häufig mit einem Rezidiv einhergeht (Kapitel 2.4.1). Frühere Studien zur Aufklärung der Leukämogenese durch Expression der resultierenden Fusionsproteine MLL•AF4 und AF4•MLL konnten die humane Erkrankung jedoch nur unzureichend rekapitulieren (Kapitel 2.4.3 und 2.4.4). Zwar wurde im Mausmodell des reziproken Fusionsproteins AF4•MLL der humane Phänotyp imitiert, jedoch widerspricht die lange Latenzzeit dieses Modells, ebenso wie die Latenzzeiten in MLL•AF4-Mausmodellen, dem extrem frühen Ausbruch der Erkrankung im Säuglingsalter. Da die Expression von AF4•MLL in murinen zellbasierten Systemen weiterhin zum Verlust der Kontaktinhibition und zu Wachstumstransformation führt, scheint das reziproke Fusionsprotein das treibende Onkogen der t(4;11)-assoziierten Leukämie zu sein. Um die Leukämogenese der Erkrankung nun weiterführend auf zellulärer Ebene sowie im Tiermodell aufzuklären, wurde hauptsächlich die Auswirkung von AF4•MLL im Rahmen dieser Arbeit unter verschiedenen Aspekten untersucht. Die Funktion des reziproken Fusionsproteins sollte zunächst in humanen Zellen eines frühen Entwicklungsstadiums studiert werden. Zur Analyse von Transformationsprozessen sollten Zellen verwendet werden, welche dem Ursprung der humanen Erkrankung analog sind, da frühere Studien hauptsächlich in murinen Systemen durchgeführt wurden. Die Untersuchungen sollten *in vitro* Effekte auf die Proliferation und das klonogene Wachstum, sowie im Xenograft-Mausmodell die Entwicklung von Leukämie-Phänotypen zeigen. Da für das MLL•AF4-Protein bereits Studien in humanen Zellen vorliegen (Montes *et al.*, 2011), sollten alle Experimente entsprechend durchgeführt werden. Weiterhin sollte das Auftreten kooperierender Sekundärmutationen bei t(4;11)-Patienten studiert werden, welche möglicherweise den frühen Ausbruch der humanen Erkrankung fördern. Hierfür sollten die für die t(4;11)-ALL meist diskutierten Gene *FLT3* und *RAS* auf typische aktivierende Mutationen untersucht werden (Kapitel 2.5). Da außerdem ein aktiver DNA-Reparaturmechanismus zu Seneszenz der Leukämiezellen und assoziiert zu langen Latenzzeiten führen könnte, sollte zudem der Einfluss von Koffein als Stimulans auf t(4;11)-Zellen *in vitro* und *in vivo* untersucht werden. Aufgrund des Fokus dieser Arbeit auf Effekte des AF4•MLL-Proteins, sollte weiterhin das Potenzial des solitären MLL C-Terminus ermittelt werden eine Krankheit im Mausmodell hervorzurufen, da etwa 20 % aller Patienten kein AF4•MLL sondern häufig ein verkürztes MLL-C-Protein als Reziprok ausbilden (Kowarz *et al.*, 2007; Scharf *et al.*, 2007). Hierfür sollte das MLL-C-Protein mit Methyltransferaseaktivität über die konservierte SET-Domäne mit einem artifiziellen Protein ohne diese Domäne verglichen werden.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung onkogener Transformationsprozesse nach Expression von AF4•MLL in humanen hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen

Die Expression von AF4•MLL in murinen Systemen zeigt onkogene Eigenschaften des Fusionsproteins, wie den Verlust der Kontaktinhibition und die Wachstumstransformation von Zellen (Bursen *et al.*, 2004). Dennoch konnte die Entwicklung einer ALL im Tiermodell ausschließlich nach langen Latenzzeiten beobachtet werden (Bursen und Schwabe *et al.*, 2010), was eine klare Diskrepanz zur humanen Erkrankung darstellt, die vor allem bei Säuglingen vorkommt. Dies führt zur Annahme, t(4;11)-assoziierte Fusionsproteine entwickeln ihr vollständiges Transformationspotenzial möglicherweise nur in humanen Zellen eines frühen Entwicklungsstadiums.

Da für das Fusionsprotein MLL•AF4 bereits Studien in humanen Zellen eines solch frühen Entwicklungsstadiums vorliegen, wurden alle Experimente zur Untersuchung des onkogenen Potenzials von AF4•MLL möglichst analog durchgeführt, um alle Daten optimal vergleichen zu können. Durch die Expression von MLL•AF4 in CD34⁺ humanen hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen konnte im Xenograft-Mausmodell jedoch kein Phänotyp einer Leukämie oder einer anderen Erkrankung induziert werden (Montes *et al.*, 2011). Allerdings werden in MLL•AF4-Mausmodellen mit murinen Zellen jedoch meist myeloische Neoplasien nach langen Latenzzeiten beobachtet (Chen *et al.*, 2006; Metzler *et al.*, 2006; Krivtsov *et al.*, 2008; Tamai und Inokuchi, 2013) und Xenograft-Mausmodelle mit immunsuppremierten Mausstämmen in der Regel nach 12-16 Wochen abgebrochen, was zu diesen Ergebnissen führen könnte. Dennoch zeichnete sich das Modell durch eine effiziente Expression des Fusionsproteins in primären humanen Zellen aus. Außerdem konnte eine hohe Anzahl angewachsener Zellen beobachtet werden, die mit der Bildung neuer hämatopoetischer Zellen im Tier beginnen (Engraftment), was für eine gute Etablierung des Modells spricht. In zellbasierten Systemen führte die Expression von MLL•AF4 in CD34⁺ humanen hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen zu erhöhtem klonogenen Potenzial sowie zu erhöhter Proliferation, gekoppelt an eine geringere Apoptoserate *in vitro* (Montes *et al.*, 2011). Diese geringere Apoptoserate konnte zwar auch in murinen Systemen beobachtet werden, jedoch führte die Expression von MLL•AF4 hier zur Hemmung der Proliferation (Gaussmann *et al.*, 2007). Somit bedarf die Funktion von MLL•AF4 während der Proliferation von Zellen ebenfalls zusätzlicher Untersuchungen, sodass alle Studien in frühen humanen Zellen dieser Arbeit sowohl mit dem potenziell onkogenen AF4•MLL-Protein als auch mit dem MLL•AF4-Protein durchgeführt wurden.

3.1.1 Etablierung lentiviraler Expressionssysteme

Lentivirale Expressionssysteme werden häufig etabliert, um einen effizienten und anhaltenden Gentransfer in nicht stimulierte humane hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen ohne Verlust des typischen Oberflächenphänotyps zu ermöglichen (Evans *et al.*, 1999). Zur Transduktion von humanen Zellen dieser Arbeit wurde ein lentivirales System der zweiten Generation verwendet (Dull *et al.*, 1998). Der Transfervektor enthält eine trunkierte 5'LTR, die keine Funktion als RNA-Polymerase II Promotor besitzt. Die Expression wird stattdessen durch den konstitutiven EF1 α -Promotor gewährleistet. Neben basalen Einheiten wie das HIV-Verpackungssignal und das "rev-responsive-element" (RRE) enthält der Vektor weitere Modifikationen. Das "Woodchuck Hepatitis Virus Post-transcriptional Regulatory Element" (WPRE) dient zur Verbesserung der Transkription (Zufferey *et al.*, 1999) und damit zur Steigerung des Virustiters, ebenso wie der "central polypurine tract" (cPPT) (Follenzi *et al.*, 2000 ; Zennou *et al.*, 2000). Weiterhin ist der Vektor mit einer "selfinactivating-LTR" (SIN-LTR) versehen um Replikationsdefizienz zu gewährleisten (Zufferey *et al.*, 1998). Für möglichst kleine Transkripte, wurde auf einen zusätzlichen Promotor oder eine IRES-Sequenz ("internal ribosomal entry site") zur Expression eines Fluoreszenzmarkers verzichtet. Hierfür wurden im pRRL.sin-EF1 α -PGK-GFP-Ursprungsvektor der PGK-Promotor und der Fluoreszenzmarker GFP deletiert und die zu untersuchenden Fusionsgene *AF4•MLL* und *MLL•AF4* über eine T2A-Proteasesequenz direkt mit dem Fluoreszenzmarker dTomato fusioniert. Das nur 63 bp große autokatalytische 2A-Fragment ist außerdem im lentiviralen System effizienter als die IRES-vermittelte Expression (Chinnasamy *et al.*, 2006). In der Abbildung 3.1.1 A ist die provirale DNA der drei verwendeten Konstrukte schematisch dargestellt. Zur Produktion viraler Partikel wurde ein Transfervektor mit den beiden Verpackungsplasmiden co-transfiziert. Das Plasmid psPAX2 kodiert für die Gene *gag/pol*, *rev* und *tat* wobei das Plasmid pVSV-g zur Expression des VSV-G Hüllproteins führt. Der durch Ultrazentrifugation ~150-fach konzentrierte Virus wurde zur Transduktion hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen verwendet. Da durch alle Konstrukte der Fluoreszenzmarker dTomato exprimiert wird, wurde die Transduktionseffizienz am Fluoreszenzmikroskop beurteilt. Die Abbildung 3.1.1 B zeigt transduzierte humane hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen. Während mit dem 2AdT-Konstrukt eine Effizienz von mehr als 60 % erreicht werden konnte, ist diese mit den Fusionen *AF4•MLL* und *MLL•AF4* deutlich geringer und kann nur in einigen Zellpopulationen beobachtet werden. Um dennoch die Integration aller viralen Konstrukte in den transduzierten humanen hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen eindeutig zu bestimmen, wurden die Transkripte an cDNA nachgewiesen. Die Abbildung 3.1.1 C zeigt den Nachweis aller Konstrukte sowie des Haushaltsgens *GAPDH* als Ladekontrolle. Während für

MLL•AF4 nur eine geringe Abweichung zur Expression des Fluoreszenzmarkers zu beobachten war, zeigte AF4•MLL wie schon in Abbildung 3.1.1 B die geringste Transduktionseffizienz und analog die geringste Expression des Konstrukts.

A

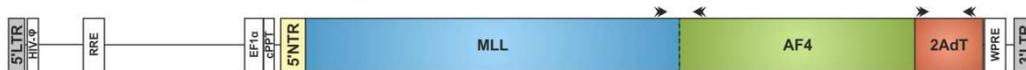
2AdT (4720bp)



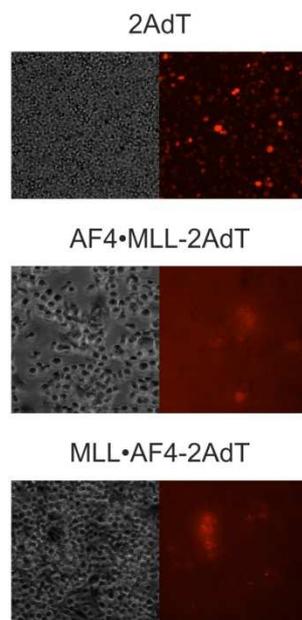
AF4•MLL-2AdT (13731bp)



MLL•AF4-2AdT (11676bp)



B



C

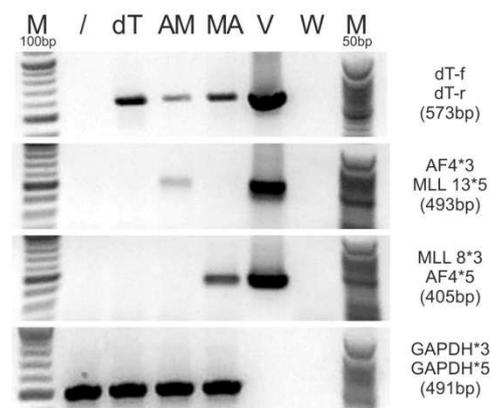


Abbildung 3.1.1: Lentivirales Expressionssystem

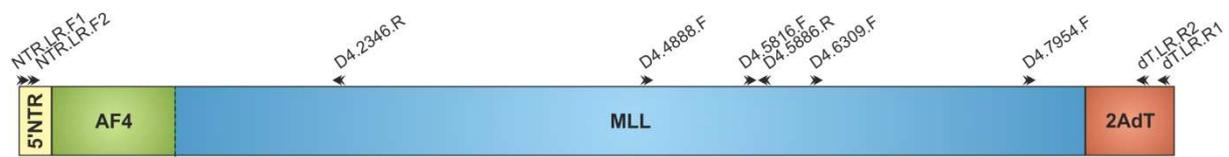
A) Schematische Darstellung der proviralen DNA verwendeter Lentiviren mit Größenangaben. Die Pfeile symbolisieren die Lage der Oligonukleotide zum Nachweis der Konstrukte (siehe C).

B) dTomato-Fluoreszenzmikroskopie transduzierter humaner hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen. Vergrößerung = 100x, Belichtung = 0,5 sek

C) Nachweis der integrierten lentiviralen Konstrukte auf transkriptioneller Ebene an cDNA transduzierter humaner hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen. Als Ladekontrolle dient der Nachweis von GAPDH. (M = Marker, / = untransduzierte Zellen, dT = 2AdT-transduzierte Zellen, AM = AF4•MLL-2AdT-transduzierte Zellen, MA = MLL•AF4-2AdT-transduzierte Zellen, V = Vektorkontrolle, W = Wasserkontrolle).

Wie in Abbildung 3.1.1 dargestellt, ist die provirale DNA beider Fusionsproteine deutlich größer als das Genom des HIV-1 Lentivirus mit 9,18 kb. Die Größe der Fusionsproteine kann daher die effiziente Verpackung des Virus und somit die Transduktion enorm beeinflussen. Auch wenn messbare Titer noch erreicht werden können, wenn die provirale DNA eine Größe von 18 kb übersteigt (Kumar *et al.*, 2001), sinkt die Anzahl der Viren drastisch ab der Auslastung des Kapsids. Um sicher zu stellen, dass die provirale DNA des AF4•MLL-2AdT-Konstrukts sowohl verpackt als auch nach Infektion vollständig in die DNA der Zielzelle integriert wird, wurden cDNA-Fragmente sowie das gesamte transkribierte Fusionsgen *AF4•MLL* aus lentiviral transduzierten Zellen nachgewiesen. Die Abbildung 3.1.2 A zeigt die hierfür verwendeten Oligonukleotide mit jeweiliger Lage und Orientierung an der proviralen DNA. Zum Nachweis aller Fragmente wurde eine "Longrange-PCR" mit vorangestellter "Touchdown-PCR" durchgeführt. Über die "Touchdown-PCR" sollten unspezifische Amplifikate vermieden werden. Da die gesamte AF4•MLL-cDNA-Kassette nicht über die erste "Longrange/Touchdown-PCR" amplifiziert werden konnte, wurde eine "Nested-PCR" angeschlossen (Abbildung 3.1.2 B links). Die Bande mit der entsprechenden Größe wurde aus dem Agarosegel extrahiert und nach Klonierung in den Vektor pGEM-T sequenziert. Hierbei konnte das Konstrukt vollständig bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Zur Identifizierung kleinerer Fragmente wurden Oligonukleotid-Kombinationen ab der 5'NTR oder dem dT-Fluoreszenzmarker gewählt. Wie die Abbildung 3.1.2 B rechts zeigt, konnten Fragmente unterschiedlicher Größe detektiert werden, welche insgesamt die komplette Länge des Konstrukts abdecken. Auffällig ist jedoch, dass das kleinste Fragment, beginnend ab dem Fluoreszenzmarker, am stärksten amplifiziert werden konnte und die Bandenstärke in Richtung der 5'NTR-gelegenen Fragmente abnimmt. Da diese Beobachtung auf das Auftreten möglicher Splicevarianten des Konstrukts AF4•MLL-2AdT durch den Virus deutet, wurden weiterhin zwei unspezifische Banden analysiert (Blockpfeile Abbildung 3.1.2 B). Hierfür wurden die Banden aus dem Agarosegel extrahiert und nach Klonierung in den Vektor pGEM-T sequenziert. Während der linke Pfeil auf ein PCR-Artefakt durch fehlerhaftes Binden der Primer deutet, konnte durch Sequenzierung der rechten Bande ein Spliceprodukt identifiziert werden. Die Reaktion unter Verwendung der Primer NTR.LR.F1 und D4.2346.R resultiert an der nicht gespliceten Matrize in einem Amplifikat vom Beginn der 5'NTR über den AF4-Teil bis zum Beginn des MLL-Teils. Die Sequenz des Amplifikats an der gespliceten Matrize beginnt ebenfalls am Beginn der 5'NTR, bricht jedoch nach 53 bp ab und beginnt erneut direkt in der Fusion bis zur Bindestelle des Primers D4.2346.R im MLL-Teil des Konstrukts (Daten nicht gezeigt). So entsteht ein Fragment von insgesamt 1158 bp. Folglich finden Splicevorgänge des Virus aufgrund der hohen Größe der verwendeten Konstrukte bevorzugt in der 5'NTR oder generell im 5'-Teil des Konstrukts statt, wodurch die bessere Amplifikation ab dem Fluoreszenzmarker resultiert.

A



B

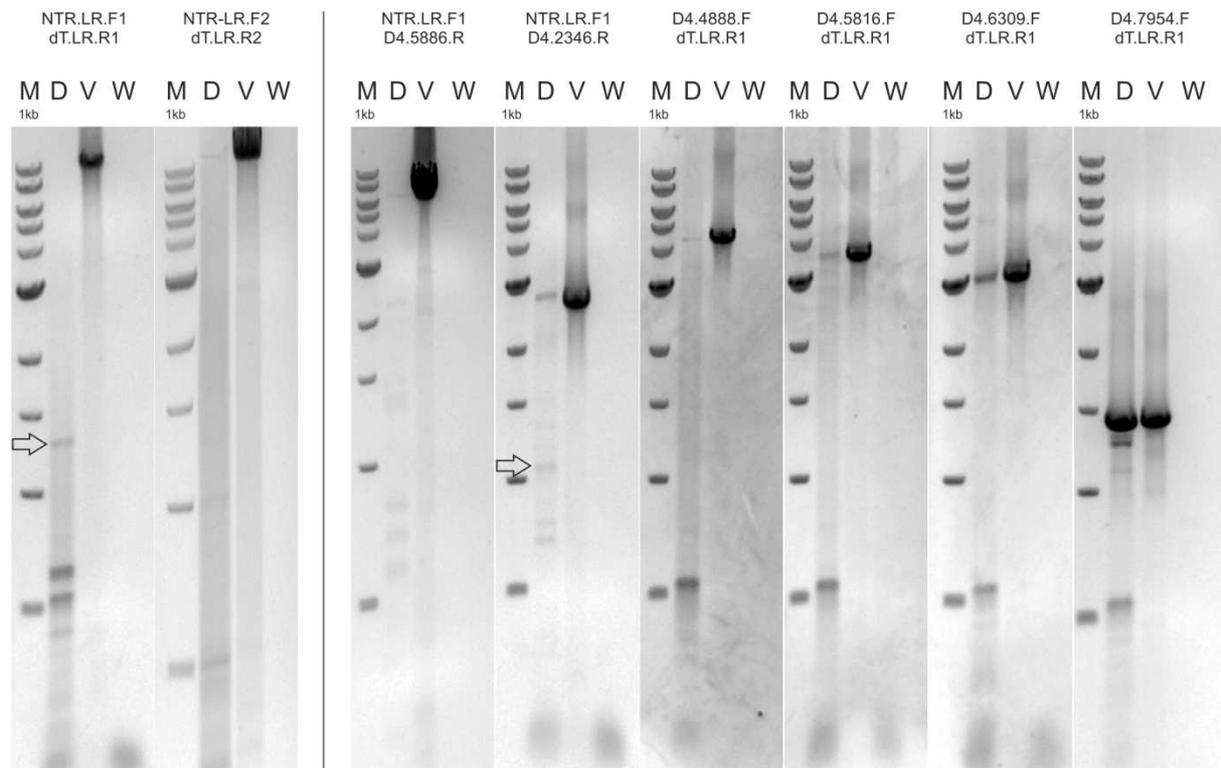


Abbildung 3.1.2: Identifizierung der gesamten integrierten AF4•MLL-2AdT cDNA-Kassette in lentiviral transduzierten Zellen

A) Schematische Darstellung der proviralen DNA des größten verwendeten lentiviralen Konstrukts AF4•MLL-2AdT. Die Pfeile symbolisieren die Lage der Oligonukleotide zum Nachweis des gesamten Konstrukts sowie einzelner Fragmente (siehe B).

B) Links = Nachweis des kompletten integrierten Konstrukts nach einer Nested-PCR im Anschluss an eine Longrange/Touchdown-PCR an spezifischer cDNA transduzierter Zellen. Rechts = Nachweis einzelner Fragmente des Konstrukts AF4•MLL-2AdT. Die Blockpfeile deuten auf zusätzlich analysierte Banden um alternative Splicevarianten zu charakterisieren. (M = Marker, D = Derivat-spezifische (AF4•MLL) cDNA, V = Vektorkontrolle, W = Wasserkontrolle)

3.1.2 Isolation humaner hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen

Hämatopoetische Stammzellen bilden die Spitze einer Hierarchie an Vorläuferzellen welche nach Differenzierung für die Produktion reifer Blutzellen wie Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten maßgebend sind. Für Transplantationen oder *in vitro*-Kulturen werden humane hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen (hHSPCs = "human hematopoietic stem and progenitor cells") üblicherweise aus Nabelschnurblut, dem peripheren Blut über Apherese oder dem Knochenmark gewonnen (Orkin und Zon, 2008). Da die multipotenten Stamm- und Vorläuferzellen das Zelloberflächen-Glycoprotein CD34 exprimieren, ist eine Verwendung von CD34 als Marker zur Isolation von hHSPCs möglich (Nielsen und McNagny, 2008). Für das Xenograft-Mausmodell wurden humane hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut gewonnen (hHSPCs-CB = "hHSPCs-cord blood"), während für alle *in vitro*-Experimente aufgrund der besseren Verfügbarkeit humane hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen aus dem peripheren Blut über Apheresate verwendet wurden (hHSPCs-PB = "hHSPCs-peripheral blood"). In beiden Fällen wurden die Zellen mittels humanem CD34 MicroBeadKit von Miltenyi isoliert. Die Abbildung 3.1.3 zeigt die durchflusszytometrische Analyse von Apheresezellen vor und nach der CD34-spezifischen Aufreinigung. Unbehandelte Apheresate enthielten etwa 1,5 % CD34⁺ Zellen. Weiterhin exprimierten etwa die Hälfte der Apheresezellen das im Allgemeinen auf hämatopoetischen Zellen zu findende Oberflächenantigen CD45. Nach der Aufreinigung konnte eine Population von 96 % CD34⁺ Zellen verzeichnet werden, die ebenfalls das Oberflächenantigen CD45 exprimieren, welche die Population von hHSPCs-PB darstellen.

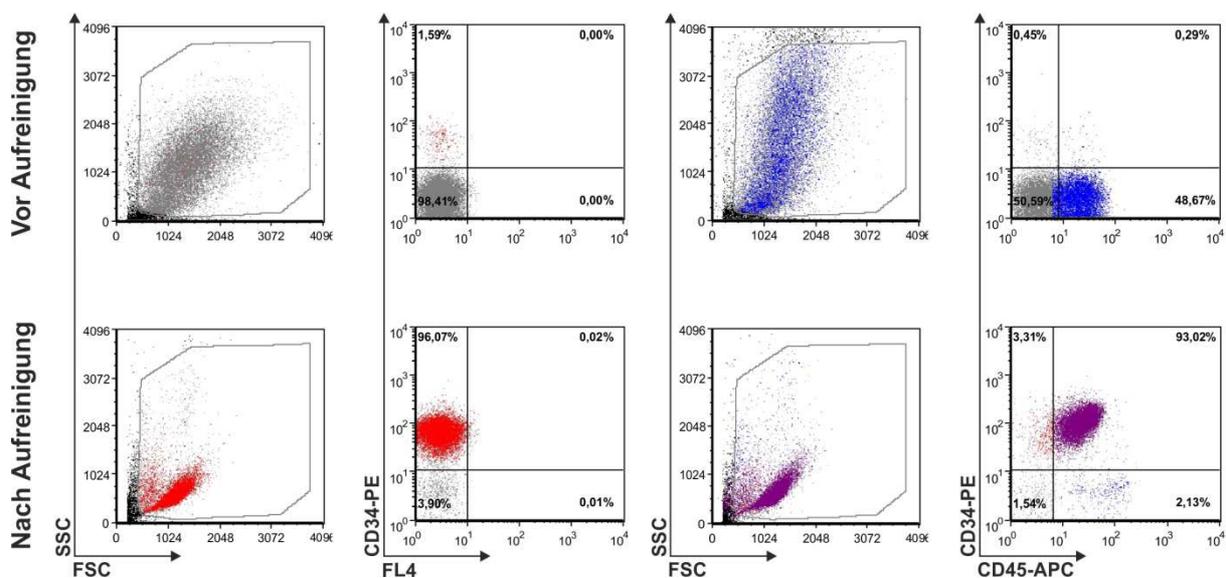


Abbildung 3.1.3: Bestimmung von CD34⁺ und CD45⁺ Zellen aus Apheresaten

Durchflusszytometrische Analyse von Apheresezellen vor und nach CD34-spezifischer Isolation.

3.1.3 Wachstumskurven

Nachdem die Population an CD34⁺ hHSPCs-PB mittels lentiviraler Transduktion (Kapitel 3.1.1) die Fusionen AF4•MLL-2AdT beziehungsweise MLL•AF4-2AdT oder den Fluoreszenzmarker 2AdT allein exprimierten, sollte zunächst die Proliferation der Zellen untersucht werden. Zur Messung der Zellproliferation wurde eine Kombination aus Trypanblau-Färbungen und Verwendung des CCK8-Assays durchgeführt. Während über die Trypanblau-Färbungen absolute Lebendzellzahlen bestimmt wurden, gibt der CCK8-Assay Aufschluss über die metabolische Aktivität der Zellen, wodurch Rückschlüsse auf die Proliferation gezogen werden können. Die Abbildung 3.1.4 A zeigt die Auswertung der Trypanblau-Zellzählung und die Abbildung 3.1.4 B die Auswertung des CCK8-Assays über einen Zeitraum von siebenzig Tagen. Die Expression von MLL•AF4 führte zu einer Zunahme der Proliferation von hHSPCs-PB im Vergleich zu untransduzierten oder 2AdT-transduzierten Zellen. Dieses gesteigerte Wachstum konnte bereits in älteren Studien an humanen Zellen belegt werden (Montes *et al.*, 2011). Nach etwa fünfzig Tagen jedoch stagnierte das Wachstum der Zellen plötzlich, was am nun eher geraden Verlauf der Wachstumskurve über die Trypanblau-Färbungen erkennbar ist. Der Effekt einer so gehemmten Proliferation nach Expression des MLL•AF4-Proteins konnte ebenfalls bereits in älteren Studien im induzierbaren, murinen Zellsystem beobachtet werden (Gaussmann *et al.*, 2007). Im CCK8-Assay korreliert das initial erhöhte Wachstum von MLL•AF4-transduzierten hHSPCs-PB allerdings nicht mit dem Metabolismus der Zellen. Dieser ähnelt stark den Werten untransduzierter Zellen und scheint somit durch die Expression des Fusionsproteins von Beginn an gedrosselt. Das reziproke Fusionsprotein AF4•MLL hingegen führte von Beginn an zu eher flacher verlaufenden Wachstumskurven der transduzierten hHSPCs-PB, sodass am Ende des Experiments keine lebenden Zellen in der Kultur verblieben. Da jedoch aus Studien im induzierbaren, murinen Zellsystem bekannt ist, dass dieser Effekt aufgrund der hohen Apoptoserate in Kombination mit einem starken Metabolismus der Zellen resultiert, wurden entsprechende Studien angeschlossen. Der metabolische CCK8-Assay zeigte jedoch einen ähnlichen Kurvenverlauf von Zellen nach AF4•MLL-Expression, wie die Auswertungen der Trypanblau-Färbungen, weshalb weitere Analysen angeschlossen wurden (Abbildung 3.1.5). Um die beobachteten Veränderungen in den Wachstumskurven auf die lentiviral transduzierten Konstrukte beziehen zu können, wurde die Expression aller Konstrukte zu verschiedenen Zeitpunkten während des Experiments bestimmt. Die Abbildung 3.1.4 C zeigt den Nachweis der Konstrukte an cDNA der Zellen zu Beginn sowie nach 24 und 60 Tagen in Kultur. Anfangs konnten alle Konstrukte eindeutig detektiert werden, wobei das Signal mit der Dauer der Proliferationsbestimmung abnahm. Insgesamt wurde wiederum die geringste Transduktionseffizienz in AF4•MLL-2AdT-transduzierten hHSPCs-PB beobachtet.

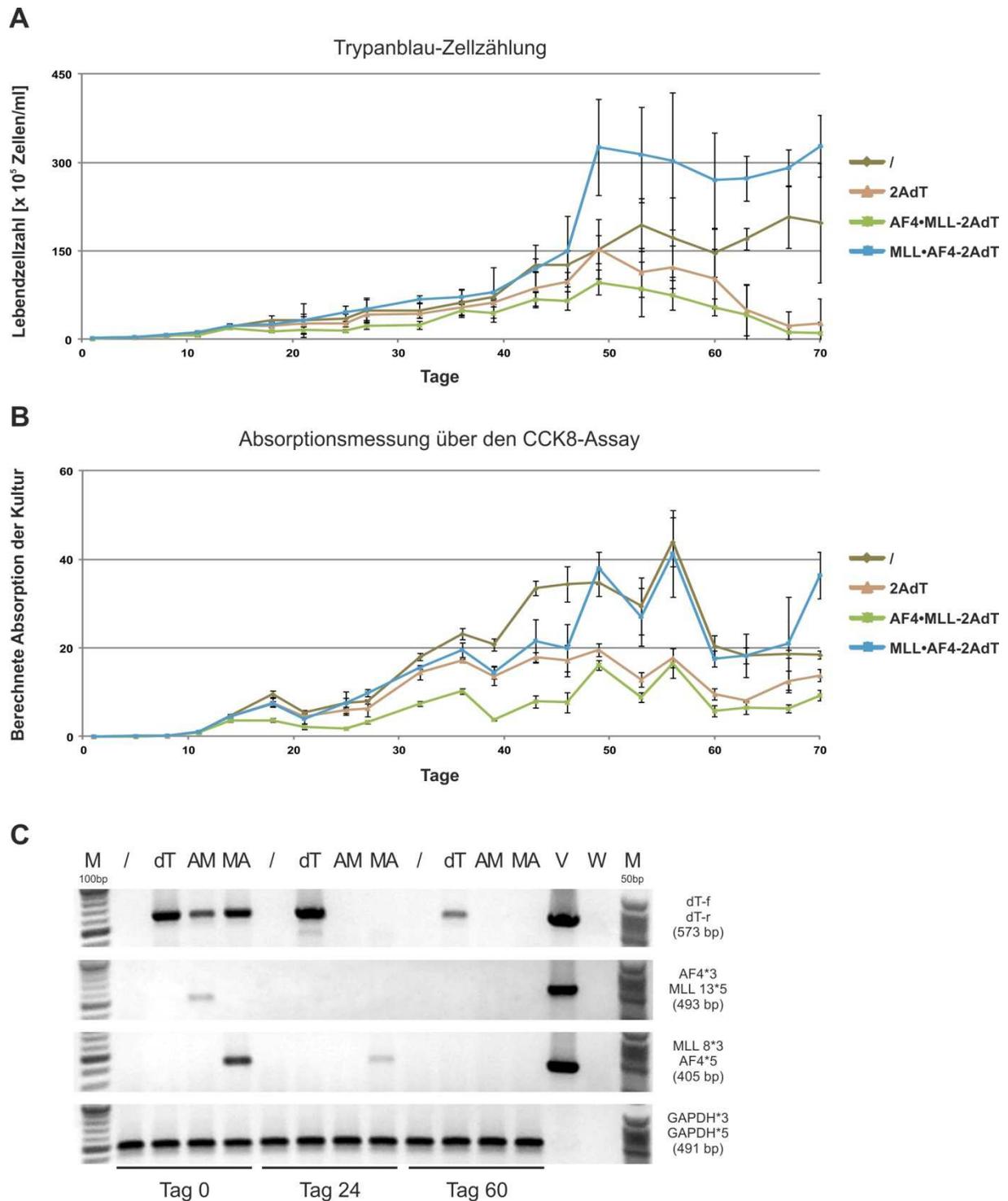


Abbildung 3.1.4: Wachstumskurven von transduzierten humanen hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen

A) Zellzählungen lebender Zellen über Trypanblau-Färbungen über einen Zeitraum von 70 Tagen.
 B) Absorptionsmessungen nach Verwendung des CCK8-Assays über einen Zeitraum von 70 Tagen.
 C) Nachweis der integrierten lentiviralen Konstrukte auf transkriptioneller Ebene an cDNA zu Beginn sowie nach 24 und 60 Tagen. Als Ladekontrolle diente der Nachweis von GAPDH. (M = Marker, / = untransduzierte Zellen, dT = 2AdT-transduzierte Zellen, AM = AF4•MLL-2AdT-transduzierte Zellen, MA = MLL•AF4-2AdT-transduzierte Zellen, V = Vektorkontrolle, W = Wasserkontrolle).

Um die Effekte der Proliferation transduzierter hHSPCs-PB genauer zu charakterisieren, wurde ein Zellzyklus-/Apoptose-Assay durchgeführt. Hierfür wurden transduzierte Zellen für sechs Stunden mit BrdU inkubiert. Dieses ist ein chemisches Analogon des Nukleosids Thymidin und wird an dessen Stelle während der S-Phase des Zellzyklus in die DNA eingebaut. Die Analyse der Verteilung von Zellen in die verschiedenen Phasen des Zellzyklus erfolgte über eine Doppelfärbung mit einem FITC-gekoppeltem Antikörper gegen BrdU und dem Nukleinsäureinterkalator Propidiumjodid, welcher zur DNA-Gehaltsbestimmung verwendet werden kann. Die Abbildung 3.1.5 zeigt die durchflusszytometrische Analyse der transduzierten hHSPCs-PB im Assay nach fünfzig Tagen. Die Expression von AF4•MLL führte zu erhöhten Apoptoseraten wie bereits von Gaussmann *et al.* gezeigt. Weiterhin wurden etwas mehr Zellen in der S-Phase beobachtet, was durch höhere Metabolismusraten der Zellen begründet sein kann. Für die Expression von MLL•AF4 hingegen konnten, in der Phase des stagnierten Wachstums, weniger Zellen in der G2/M-Phase beobachtet werden. Nach fünfzig Tagen in Kultur wiesen diese Zellen somit einen Zellzyklusarrest auf, welcher ebenfalls in früheren Studien beobachtet werden konnte (Gaussmann *et al.*, 2007).

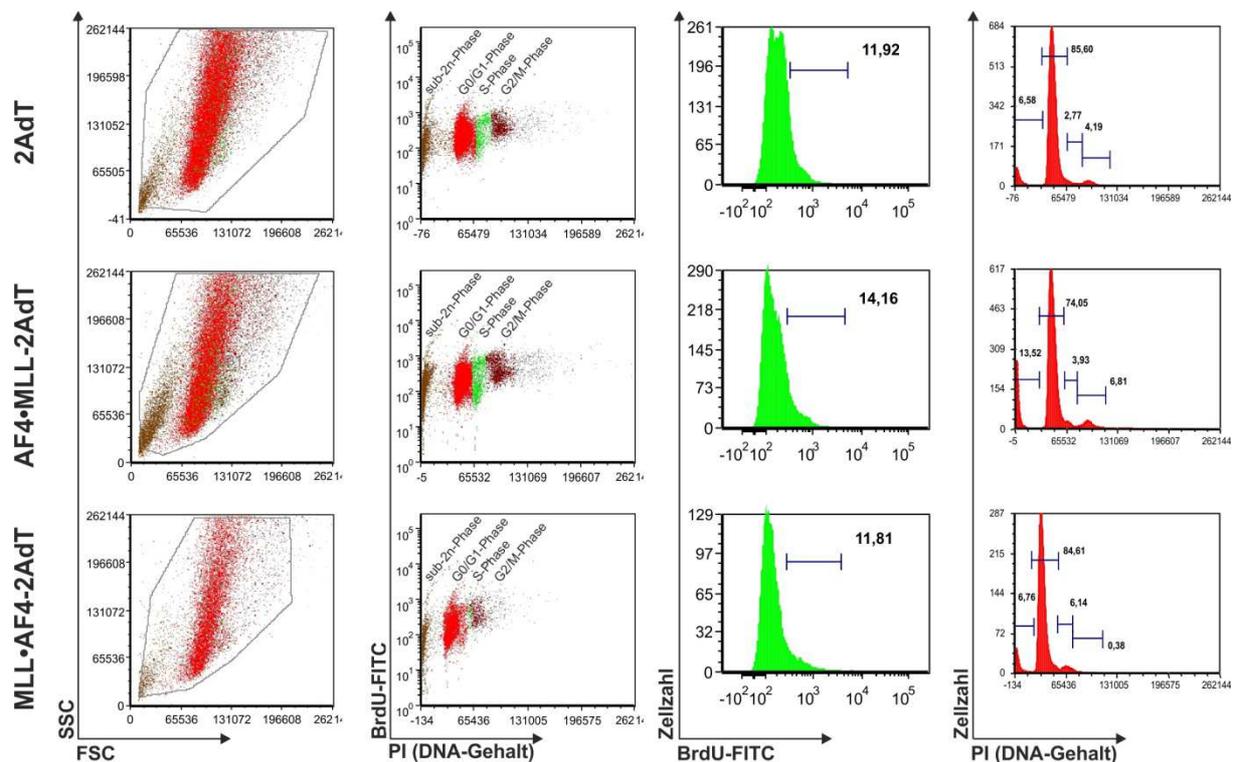


Abbildung 3.1.5: Zellzyklus-/Apoptose-Assay von transduzierten humanen hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen

Durchflusszytometrische Analyse von BrdU über einen spezifischen FITC-gekoppelten Antikörper und Propidiumjodid in transduzierten hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen nach fünfzig Tagen in Kultur.

3.1.4 Colony Forming Unit (CFU)-Assay

Klonogenes Wachstum beschreibt die Teilungsfähigkeit von Zellen und die Differenzierung in reife Zellstadien. Da HSPCs in semi-solidem Medium nach Induktion durch Zytokine proliferieren, kann ein CFU-Assay Aufschluss über die Klonogenität von Zellen geben. Hierfür wird die Bildung von Kolonien unterschiedlicher Morphologie beurteilt (Pereira *et al.*, 2007). Um das klonogene Wachstum lentiviral transduzierter hHSPCs-PB zu untersuchen, wurde Methylcellulose-Medium supplementiert mit den Zytokinen hSCF, hGM-CSF, hIL3 und hEpo verwendet. Durch Induktion der Zytokine können Kolonien mit reifen erythroiden Vorläuferzellen und geringer Proliferationskapazität (CFU-E = "colony forming unit-erythroid") oder Kolonien mit weniger entwickelten erythroiden Vorläuferzellen und hoher Proliferationskapazität (BFU-E = "burst forming unit-erythroid") entstehen. Weiterhin können Kolonien aus Granulozyten-Vorläuferzellen (CFU-G = "colony forming unit-granulocyte") und Vorläuferzellen von Makrophagen (CFU-M = "colony forming unit-macrophage") gebildet werden. Außerdem ist die Bildung von Kolonien mit gemischten Vorläuferzellen von Granulozyten und Makrophagen (CFU-GM) oder Granulozyten, Erythrozyten, Makrophagen und Megakaryozyten (CFU-GEMM) möglich. Die Abbildung 3.1.6 A zeigt die Auswertung des CFU-Assays für 2AdT-, AF4•MLL-2AdT- und MLL•AF4-2AdT-transduzierte hHSPCs-PB im Vergleich zu untransduzierten Zellen. Hierfür wurden Kolonien aus mindestens fünfzig Zellen nach jedem der drei Platings gezählt und anhand ihrer Morphologie bestimmt (Abbildung 3.1.6 A oben rechts). Die Analyse der Gesamtkolonienzahl ergab ein höheres klonogenes Potenzial aller transduzierten Zellen im Vergleich zu untransduzierten hHSPCs-PB nach den ersten beiden Platings. Erst die Bestimmung der verschiedenen Koloniearten zeigte Unterschiede aufgrund der Expression der Fusionsproteine. Nach dem ersten Plating differenzierten zunächst alle transduzierten Zellen hauptsächlich in Kolonien aus Granulozyten- und reifen erythroiden Vorläuferzellen. Nach dem zweiten Plating differenzierten Zellen nach Expression von MLL•AF4 oder des Fluoreszenzmarkers hauptsächlich in Kolonien aus Makrophagen-Vorläuferzellen. Zellen, welche das reziproke Fusionsprotein AF4•MLL exprimierten, zeigten jedoch eine stärkere Differenzierung in Granulozyten-Vorläuferzellen die als CFU-G oder auch als gemischte Kolonie mit Makrophagen-Vorläuferzellen (CFU-GM) vorlagen. Die vermehrte Bildung von Leukozyten nach Expression von AF4•MLL konnte ebenfalls in den Zytospins belegt werden. Die Abbildung 3.1.6 B spiegelt charakteristische Ausschnitte aller Zellen nach jedem Plating wider. Besonders nach dem zweiten Plating können, im Vergleich zu den Kontrollen und MLL•AF4-exprimierenden Zellen, deutlich mehr und vergrößerte AF4•MLL-assoziierte Leukozyten beobachtet werden. Eine genauere Charakterisierung der Leukozyten in beispielsweise Granulozyten war jedoch am Mikroskop nicht möglich. Nach dem dritten Plating wurden insgesamt nur wenig Kolonien gebildet.

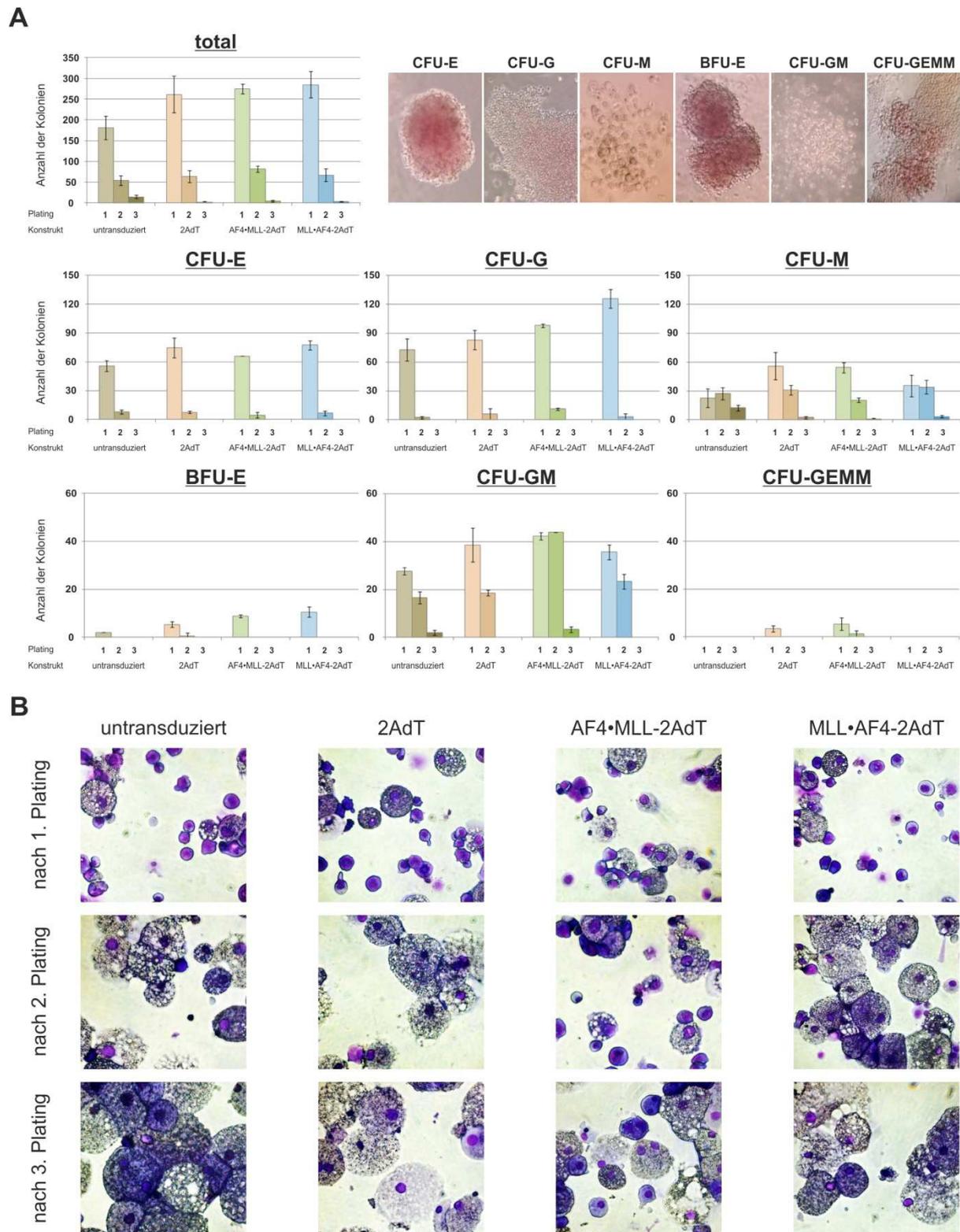


Abbildung 3.1.6: Colony Forming Unit-Assay von transduzierten humanen hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen

A) Auswertung des CFU-Assays nach insgesamt drei Platings. Gezeigt ist die Anzahl aller Kolonien pro Konstrukt sowie die verschiedenen Koloniearten. Oben rechts = Morphologie der verschiedenen Koloniearten.

B) Zytospins untransduzierter sowie aller transduzierter Zellen im CFU-Assay nach jedem Plating.

Um die Effekte im CFU-Assay auf die lentiviral transduzierten Konstrukte beziehen zu können, wurde die Expression aller Konstrukte bestimmt. Da durch alle Konstrukte der Fluoreszenzmarker dTomato exprimiert wurde, konnte die Transduktionseffizienz am Fluoreszenzmikroskop beurteilt werden. Die Abbildung 3.1.7 A zeigt den Nachweis der exprimierten Konstrukte über die Fluoreszenz der Kolonien transduzierter hHSPCs-PB nach dem ersten Plating, bei etwa 90 % der Kolonien mit dem 2AdT-Konstrukt und etwa 30 % der Kolonien mit den Fusionsproteinen. Weiterhin wurden die Konstrukte an cDNA der Zellen nach jedem Plating nachgewiesen (Abbildung 3.1.7 B). Hierbei konnten jedoch ausschließlich nach dem zweiten Plating alle Konstrukte gleichermaßen detektiert werden, was für eine Selektion transduzierter Klone in diesem Plating spricht. Nach dem ersten Plating konnte nur das MLL•AF4-Protein neben der Kontrolle, sowie nach dem dritten Plating nur die Kontrolle nachgewiesen werden.

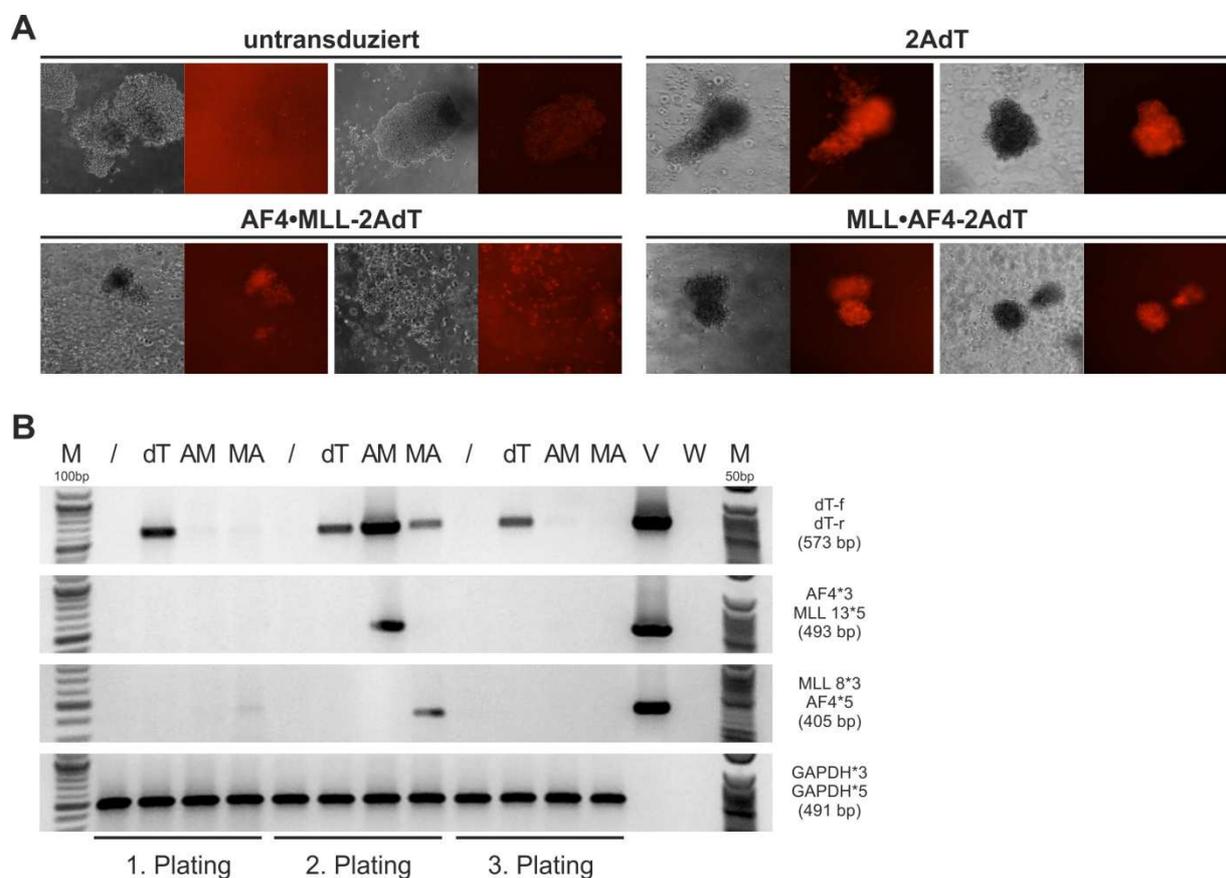


Abbildung 3.1.7: Expression lentiviraler Konstrukte in Kolonien des CFU-Assays

A) dTomato-Fluoreszenzmikroskopie von Kolonien des CFU-Assays nach dem ersten Plating. Vergrößerung = 100x, Belichtung = 0,5 sek

B) Nachweis der integrierten lentiviralen Konstrukte auf transkriptioneller Ebene an cDNA. Als Ladekontrolle dient der Nachweis von GAPDH. (M = Marker, / = untransduzierte Zellen, dT = 2AdT-transduzierte Zellen, AM = AF4•MLL-2AdT-transduzierte Zellen, MA = MLL•AF4-2AdT-transduzierte Zellen, V = Vektorkontrolle, W = Wasserkontrolle).

3.1.5 Xenograft-Mausmodell

Neben *in vitro*-Experimenten sollten die Auswirkungen lentiviral transduzierter hHSPCs im Tiermodell untersucht werden. Ein Xenograft-Modell (griechisch *xénos* = Gast; Fremder) bezeichnet die Transplantation von Zellen oder Geweben zwischen verschiedenen Spezies. Da es hierbei oft zu Abstoßungsreaktionen des Immunsystems und damit zu keinem Engraftment transplantierte Zellen kommt, muss ein entsprechender Stamm als Empfängerorganismus im Mausmodell gewählt werden. Der hochgradig immundefiziente Mausstamm NOD/LtSz-scid IL2 γ ⁻ zeichnet sich durch ein generell schwaches Immunsystem aus. Durch die sogenannte scid-Mutation der *PRKDC*-Gene werden DNA-Doppelstrangbrüche nach der V(D)J Rekombination in B- und T-Zellen nicht repariert und es werden keine reifen Lymphozyten gebildet. Außerdem wird durch die homozygote Mutation der "*IL2-gamma-chain*"-Gene die Differenzierung von NK-Zellen blockiert. Dennoch wird nach sublethaler Bestrahlung keine Entwicklung von Lymphomen begünstigt, xenotransplantierte Zellen werden gut angenommen und der Mausstamm zeigt eine hohe Überlebensrate die 16 Monate übersteigt (Shultz *et al.*, 2005). Um Leukämie-induzierende Effekte t(4;11)-assoziierter Fusionsproteine in humanen Zellen im Xenograft-Modell zu untersuchen, wurden AF4•MLL-2AdT-, MLL•AF4-2AdT- sowie 2AdT-transduzierte hHSPCs-CB verwendet. Nach sublethaler Bestrahlung von Mäusen des Stamms NOD/LtSz-scid IL2 γ ⁻ wurden die Zellen direkt in das Knochenmark des Femurs der Tiere transplantiert (IBMT = "intra-bone marrow transplantation") (Kim *et al.*, 2013). Diese Transplantationsmethode sollte zu einem besseren Engraftment der in das Tier eingebrachten Zellen führen, im Gegensatz zu Transplantationen in die Blutbahn der Tiere. Außerdem sollten durch die IBMT subkutane Gewebeveränderungen vermieden werden, die bei Transplantationen in die Blutbahn von immunsupprimierten Mäusen häufig entstehen. Die Tabelle 3.1.1 zeigt die Anzahl der transplantierten Mäuse pro Konstrukt und die Anzahl der analysierten Mäuse. Die Daten aller analysierten Mäuse flossen in Gewebegewichtsbestimmungen, Blutbilder, Analysen zum Engraftment humaner Zellen sowie im Nachweis der transduzierten Konstrukte ein.

Tabelle 3.1.1: Anzahl transplantierte und analysierter Mäuse im Xenograft-Mausmodell

Konstrukt	Transplantierte Mäuse	Analysierte Mäuse
pRRL_2AdT	5	4
pRRL_AF4•MLL-2AdT	10	5
pRRL_MLL•AF4-2Ad	5	3

Insgesamt wurden alle Mäuse über einen Zeitraum von 200 Tagen beobachtet. Die Abbildung 3.1.8 A zeigt den Leukämie-Graph für diese Zeit. Während des Beobachtungszeitraums konnte bei keiner Maus eine Leukämie-Entwicklung oder sonstige morphologisch feststellbare Erkrankungen diagnostiziert werden. Um genauere Aussagen über den Gesundheitszustand analysierter Mäuse treffen zu können, wurden Organe des Brustkorbs und des Bauchraums genauer untersucht. Hierfür wurden die Tiere ventral geöffnet um Lage, Größe und Beschaffenheit von Herz, Lunge, Thymus, Leber, Milz und Gastrointestinaltrakt zunächst rein optisch charakterisieren. Die Abbildung 3.1.8 C zeigt Aufnahmen dieser Organe im geöffneten Thorax und Bauch je einer Maus pro Konstrukt. Generell konnten keine Veränderungen der Organe beobachtet werden die auf eine Erkrankung der Mäuse schließen ließen. Da die t(4;11)-assoziierte Leukämie hauptsächlich den Krankheitsphänotyp einer ALL aufzeigt, wurden zur quantitativen Analyse möglicher Veränderungen charakteristische Zellen oder Gewebe der Erkrankung untersucht. Nach gängigen "Bethesda proposals for classification of lymphoid neoplasms in mice" werden lymphatische Erkrankungen an Veränderungen hämatopoetischer Organe wie Blut, Knochenmark, Milz, Leber oder Thymus und Lymphknoten klassifiziert (Morse *et al.*, 2002). Zur Analyse dieser Organe wurde zunächst das Gewicht von Milz, Thymus und Leber bestimmt. Die Abbildung 3.1.8 B zeigt die Auswertung der Gewichte aller analysierten Mäuse sowie die durchschnittlichen Gewichte pro verwendetem Konstrukt. Alle Mäuse zeigten Milzgewichte deren Mittelwert um etwa 50 mg schwankt. Für den hochgradig immundefizienten Mausstamm NOD/LtSz-scid IL2 γ sind Milzgewichte dieser Größenordnung unauffällig, während Milzen bei Mäusen ohne Beeinträchtigung des Immunsystems ein durchschnittliches Gewicht von 100 mg haben. Da das Knochenmark von Mäusen während der frühen Hämatopoese vollständig von Blutzellen ausgefüllt wird, werden hämatopoetische Veränderungen hauptsächlich durch Gewichts- und Größenunterschiede der Milzen ersichtlich. Durch die Expression von AF4•MLL in transplantierten hHSPCs-CB wurden jedoch im Durchschnitt kleinere und leichtere Milzen der Mäuse beobachtet (AM = $37,7 \pm 13,8$ mg vs. dT = $64,7 \pm 17,6$ mg / MA = $57,4 \pm 12,3$ mg). Weiterhin wurden keine Auffälligkeiten im Vergleich der Thymusgewichte von Mäusen nach AF4•MLL- oder MLL•AF4-Expression beobachtet. Die Analyse der Lebergewichte zeigte hingegen weitere Unterschiede zwischen den Konstrukten. Während Mäuse mit AF4•MLL-transduzierten hHSPCs-CB oder nach Expression der Kontrolle normale Lebergewichte von durchschnittlich 1000 mg zeigten, waren die Lebern von Mäusen mit transduzierten hHSPCs-CB nach Expression von MLL•AF4 deutlich größer und schwerer (MA = $1633,4 \pm 386,7$ mg vs. dT = $1090,8 \pm 80,8$ mg / AM = $972,9 \pm 114,6$ mg).

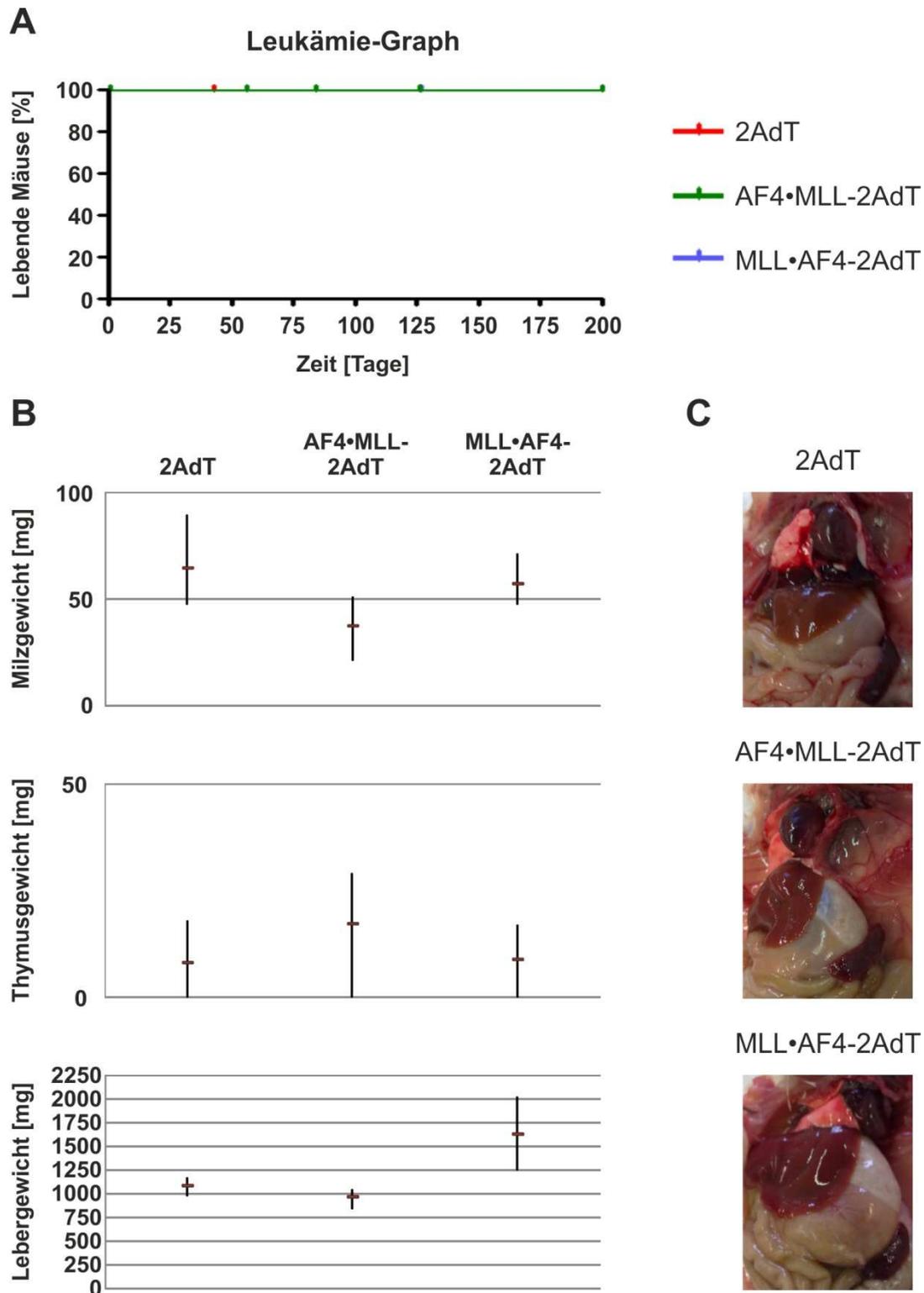


Abbildung 3.1.8: Krankheitsanalyse im Xenograft-Mausmodell

A) Kaplan-Meier-Überlebenskurve transplantierter Mäuse im Beobachtungszeitraum von 200 Tagen. Der Leukämie-Graph dokumentiert das Auftreten von Leukämie-Phänotypen.

B) Milz-, Thymus- und Lebergewichte aller analysierten Mäuse sowie die gemittelten Gewichte pro verwendetem Konstrukt.

C) Abbildung aller Organe im geöffneten Brust- und Bauchraum je einer Maus pro Konstrukt.

Zur Beurteilung des Blutes wurden Blutbilder aller analysierten Mäuse ausgewertet. Diese bestimmen die Anzahl von Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten pro Mikroliter Blut. Da sich Leukämien durch die stark vermehrte Bildung von Leukozyten auszeichnen, wurde die Anzahl an Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten genauer bestimmt. Die Abbildung 3.1.9 zeigt die Auswertung der Blutbilder aller Mäuse mit transplantierten hHSPCs-CB nach Expression von AF4•MLL, MLL•AF4 oder der Kontrolle. Generell lagen die Blutbilder aller Mäuse im Normbereich (Leukozyten = 3-15 x 1000/ μ l; Thrombozyten = 1400-6000 x 1000/ μ l; Erythrozyten = 5000-12000 x 1000/ μ l; Granulozyten = 1,2-6,8 x 1000/ μ l; Lymphozyten = 1,2-3,2 x 1000/ μ l; Monozyten = 0,3-0,8 x 1000/ μ l; Angaben aus Animal Blood Counter ABX Vet Pack). Allerdings fielen Mäuse mit transduzierten hHSPCs-CB nach Expression von AF4•MLL durch insgesamt weniger Blutzellen auf, als Mäuse der Kontrollgruppe oder Mäuse der Gruppe mit transduzierten hHSPCs-CB nach Expression von MLL•AF4.

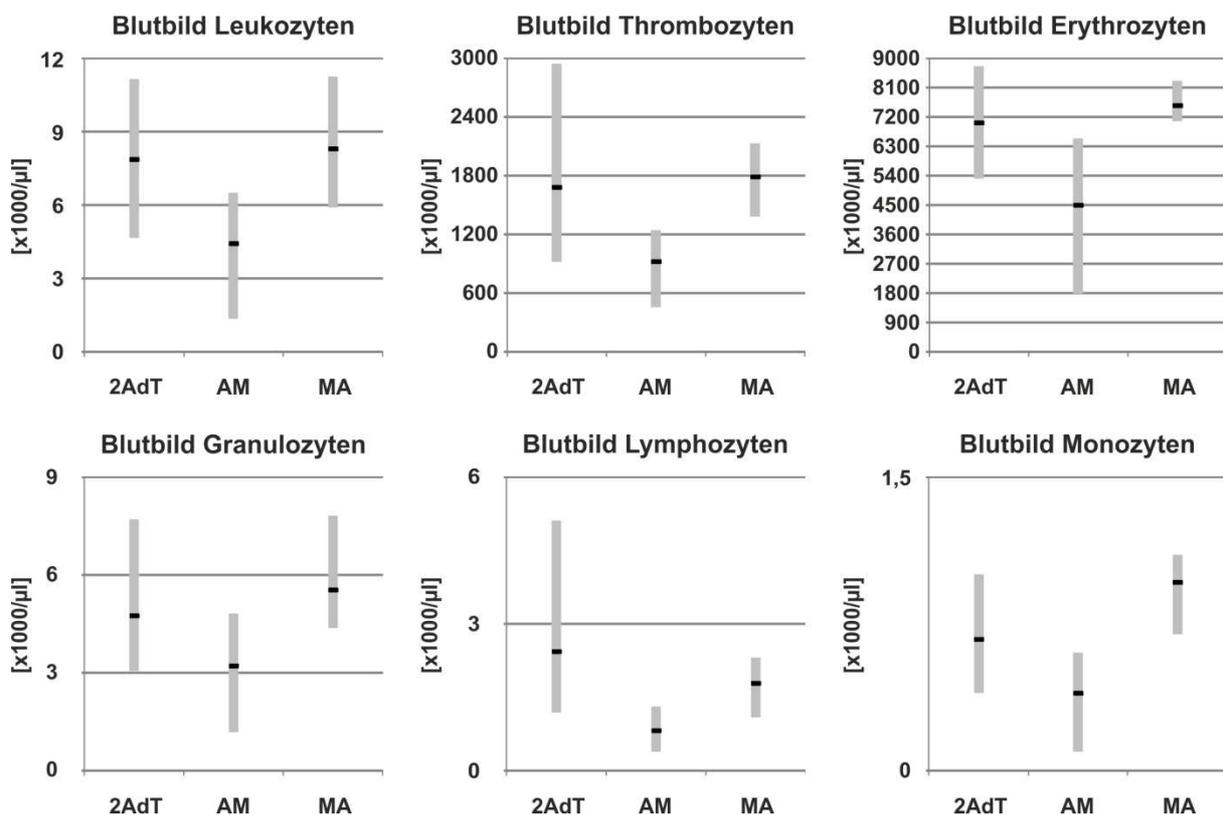


Abbildung 3.1.9: Blutbilder aller analysierten Mäuse im Xenograft-Modell

Die Blutbilder dokumentieren die Anzahl von Leukozyten, Thrombozyten und Erythrozyten pro μ l Blut. Die Angaben der Leukozyten wurden weiter unterteilt in die Anzahlen von Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten.

Um die beobachteten Effekte auf die transplantierten hHSPCs-CB beziehen zu können, wurde das Engraftment humaner Zellen im Blut und im Knochenmark der Mäuse untersucht. Zur Analyse des Blutes wurde im Rhythmus von vier Wochen bis zum Ende des Experiments Blut aus der Schwanzspitze entnommen und durchflusszytometrisch humane Blutzellen über einen APC-gekoppelten hCD45-Antikörper detektiert. Das humane Zelloberflächen-Glycoprotein CD45 wird auf allen Leukozyten exprimiert und kann zum generellen Nachweis humaner Zellen des Blutes verwendet werden. Die Abbildung 3.1.10 zeigt die Analyse des Blutes auf humane hämatopoetische Zellen am Ende des Experiments. Wie der Tabelle oben rechts zu entnehmen ist, konnten in zwei von vier Mäusen mit transduzierten hHSPCs-CB der Kontrolle, in drei von fünf Mäusen mit transduzierten hHSPCs-CB nach Expression von AF4•MLL, jedoch in keiner von drei Mäusen mit transduzierten hHSPCs-CB nach Expression von MLL•AF4 humane Zellen nachgewiesen werden. Der prozentuale Anteil an detektierten humanen Zellen im Blut für die Kontrollgruppe zeigte mit der Literatur vergleichbare Werte von etwa 6 % (Shultz *et al.*, 2005), während die Werte in den Gruppen der Fusionsproteine deutlich geringer waren. So konnte im Blut von Mäusen mit transduzierten hHSPCs-CB nach Expression von AF4•MLL nur knapp 1% humane Zellen nachgewiesen werden und die Mäuse mit transduzierten hHSPCs-CB nach Expression von MLL•AF4 zeigten keine humanen Zellen im Blut. Da das Engraftment von Zellen nach Transplantation im Knochenmark meist höher ist, im Vergleich zum Engraftment von Zellen im peripheren Blut, wurde weiterhin die Anzahl humaner hämatopoetischer Zellen im Knochenmark am Ende des Experiments bestimmt. Die Abbildung 3.1.11 A zeigt beispielhaft die durchflusszytometrische Analyse an je einer Maus pro Konstrukt. Durch Detektion über den APC-gekoppelten hCD45-Antikörper konnten in Mäusen mit transduzierten hHSPCs-CB der Kontrolle maximal 48 % (vergleiche im Blut maximal 16,3 % in Abbildung 3.1.10) humane Zellen nachgewiesen werden. Für Mäuse mit transduzierten hHSPCs-CB nach Expression von AF4•MLL wurden maximal 4 % und für Mäuse mit transduzierten hHSPCs-CB nach Expression von MLL•AF4 maximal 3 % humane Zellen im Knochenmark detektiert. Somit konnte ein Engraftment der Zellen generell bestätigt werden. Außerdem wurde die Expression der lentiviral transduzierten Konstrukte in Zellen des Knochenmarks aller analysierten Mäuse überprüft. Wie in Abbildung 3.1.11 B zu sehen ist, konnte im Knochenmark von drei von vier Mäusen die Expression des 2AdT-Konstrukts nachgewiesen werden, was mit den Daten des Engraftments humaner Zellen korreliert. Im Knochenmark von Mäusen der Fusionsgen-Konstrukte war die Detektion für MLL•AF4 nur in einem Fall sehr schwach und für AF4•MLL nicht möglich.

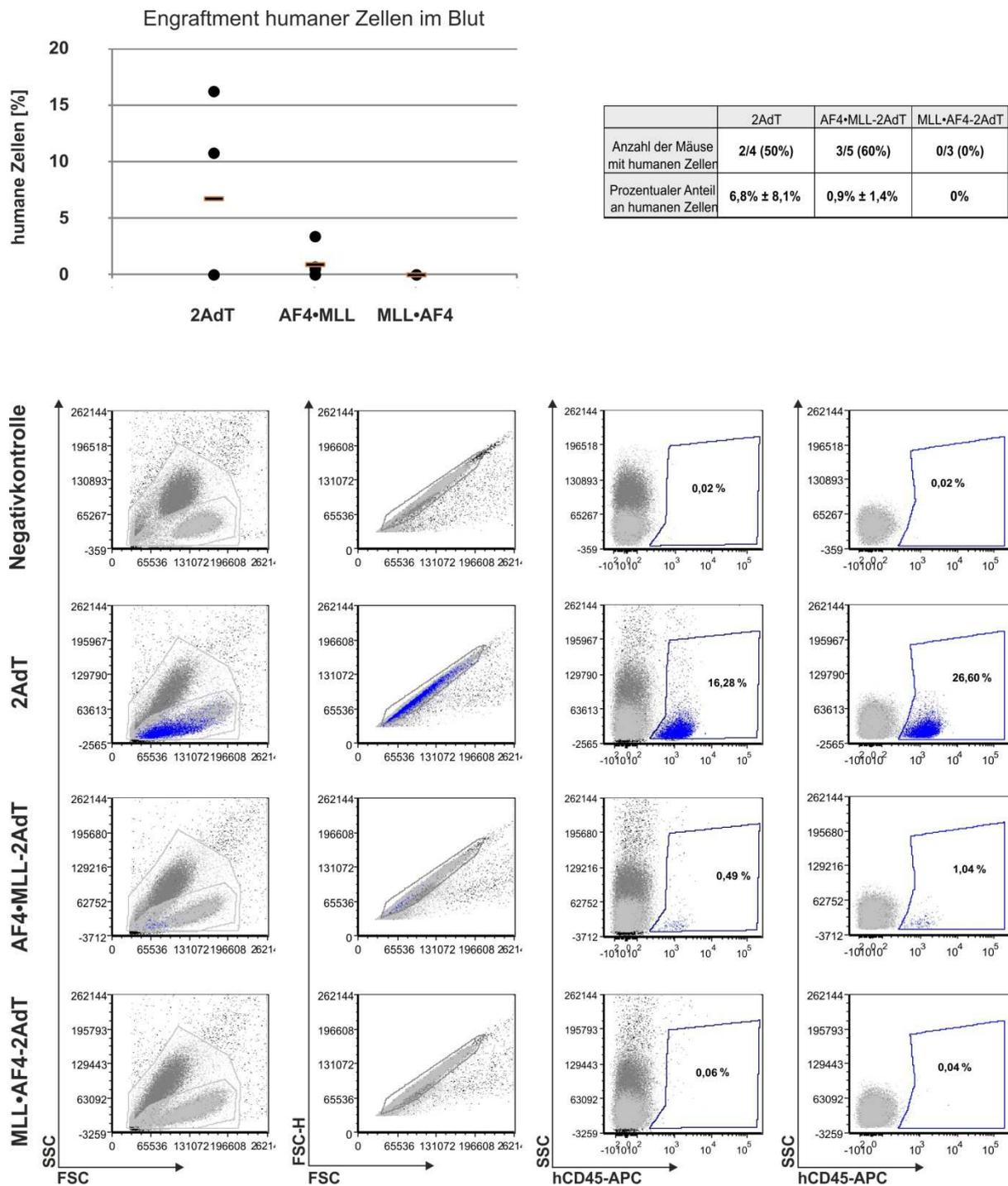


Abbildung 3.1.10: Engraftment humaner Zellen im Blut von Mäusen des Xenograft-Modells

Durchflusszytometrische Analyse humaner Zellen im Blut von Mäusen des Xenograft-Modells über einen APC-gekoppelten hCD45-Antikörper. Oben links = Auswertung aller Daten zu prozentualen Anteilen humaner Zellen im Blut sowie Bestimmung des Mittelwerts. Oben rechts = Tabelle zur Anzahl der Mäuse, in welchen ein Engraftment von humanen Zellen nachgewiesen werden konnte sowie zum prozentualen Anteil an humanen Zellen im Blut von Mäusen pro Konstrukt, als Mittelwerte mit Standardabweichungen.

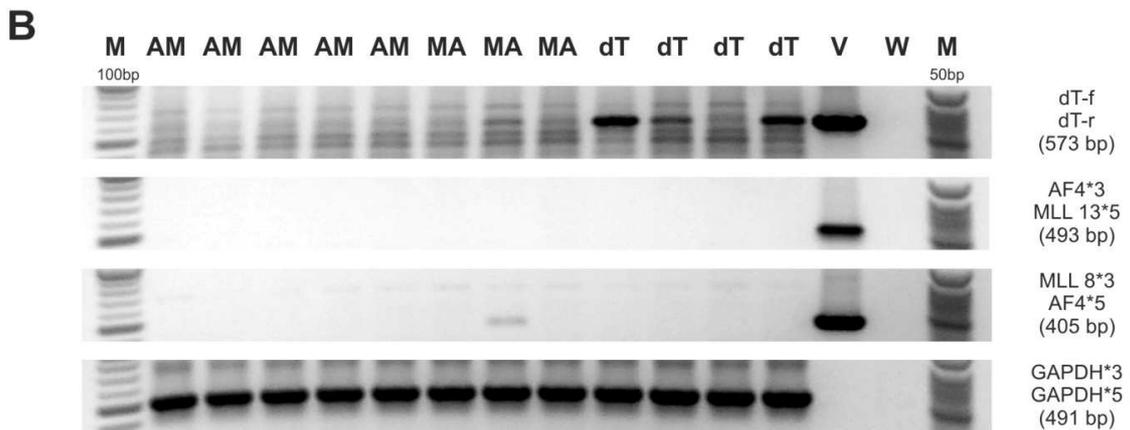
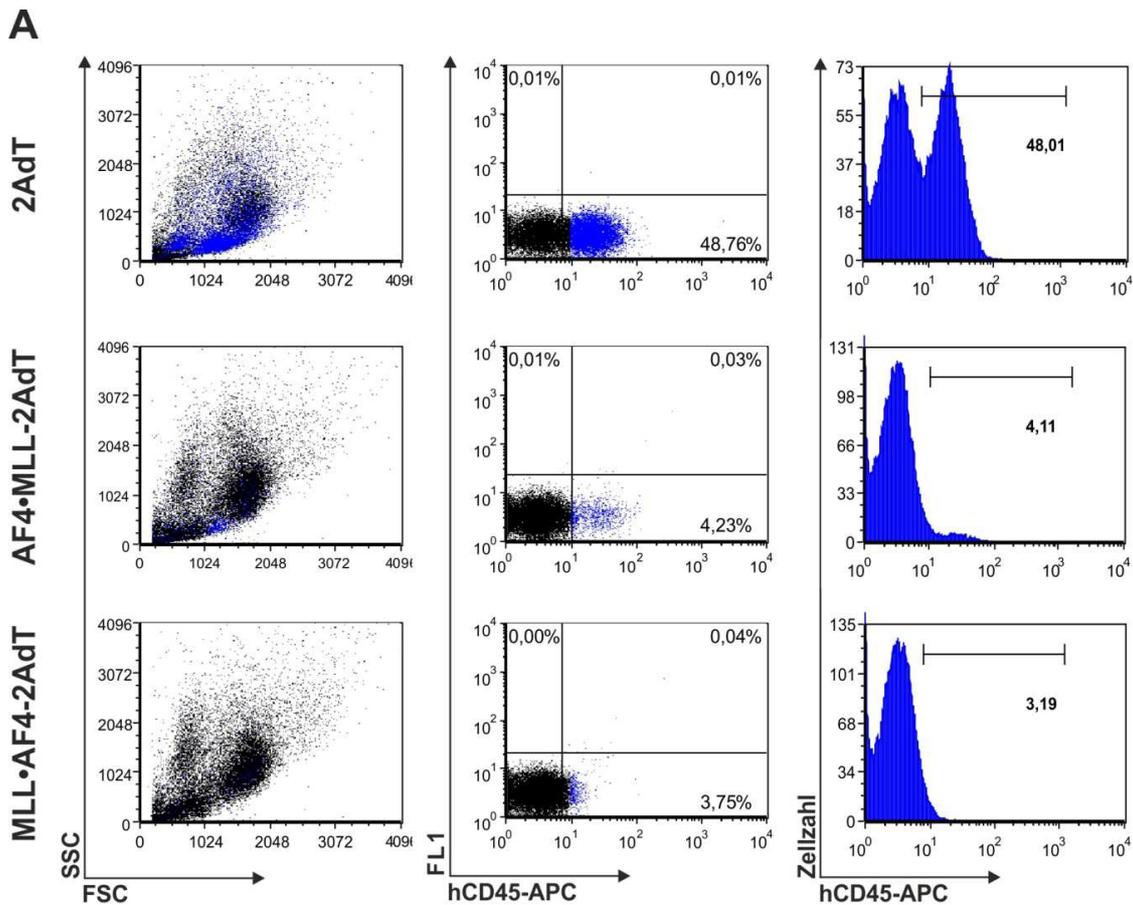


Abbildung 3.1.11: Engraftment humaner Zellen im Knochenmark von Mäusen des Xenograft-Modells

A) Durchflusszytometrische Analyse humaner Zellen im Knochenmark von Mäusen des Xenograft-Modells über einen APC-gekoppelten hCD45-Antikörper.

B) Nachweis der integrierten lentiviralen Konstrukte auf genomischer Ebene an gDNA aus Zellen des Knochenmarks. Als Ladekontrolle dient der Nachweis von GAPDH. (M = Marker, AM = AF4•MLL-2AdT-transduzierte Zellen, MA = MLL•AF4-2AdT-transduzierte Zellen, V = Vektorkontrolle, W = Wasserkontrolle).

3.2 Analyse von Sekundärmutationen an genomischer DNA von Patienten mit einer t(4;11)-assoziierten Leukämie

Die Etablierung von Mausmodellen für die t(4;11)-assoziierte Leukämie kann zurzeit nicht als abgeschlossen betrachtet werden und bedarf weiterer Entwicklungen. Über Expression des Fusionsproteins AF4•MLL kann zwar der humane Krankheitsphänotyp ausgelöst werden, jedoch benötigt dieses Modell eine lange Latenzzeit (Bursen und Schwabe *et al.*, 2010). Da für einen Ausbruch anderer hämatopoetischer Krankheiten oft ein "two hit"-Modell postuliert wird, in dem proliferations- und überlebensbeeinflussende Mutationen mit den exprimierten Fusionen kooperieren (Gilliland, 2001), sollte diese Hypothese für die t(4;11)-Leukämie untersucht werden. Nachdem besonders aktivierende Mutationen der Gene *FLT3* und *K*- beziehungsweise *NRAS* diskutiert wurden (Taketani *et al.*, 2004; Mahgoub *et al.*, 1998; Liang *et al.*, 2006), sollte die Analyse von Sekundärmutationen auf diese Gene fokussiert werden.

3.2.1 Patientengruppen und sequenzierte Gene

Zur Analyse kooperierender Mutationen in den Genen *FLT3* und *K*- beziehungsweise *NRAS* wurde genomische DNA einer Gruppe von 144 Patienten mit genetischer Veränderung des *MLL*-Gens untersucht. Die Kohorte wurde in drei Untergruppen aufgeteilt. Während 21 Patienten eine komplexe t(4;11)-Leukämie mit Beteiligung der Gene *MLL*, *AF4* und einem dritten Translokationspartner aufweisen, zeigen 79 Patienten eine reziproke t(4;11)-Leukämie. Durch die reziproke Translokation werden die beiden resultierenden Fusionsproteine MLL•AF4 und AF4•MLL exprimiert. Die Kontrollgruppe besteht aus 44 Patienten mit einer anderen Veränderung des *MLL*-Gens, wie die Expression der Fusionsproteine MLL•AF9, MLL•ENL, MLL•AF10, MLL•ELL und MLL•AF6 oder der Ausbildung einer partiellen Tandemduplikation des *MLL*-Gens (Abbildung 3.2.1 B). Um potenzielle Sekundärmutationen zu analysieren, wurde genomische DNA aus Zellen des Blutes oder des Knochenmarks aller Patienten bei Diagnose untersucht. Hierfür wurden Regionen der Gene *K*- beziehungsweise *NRAS* und *FLT3* amplifiziert, in welchen typischerweise aktivierende Punktmutationen auftreten. Die Abbildung 3.2.1 A zeigt die untersuchten Regionen der drei Gene. Für *K*- und *NRAS* wurden die Exons 2 und 3 amplifiziert. Für die *ITD*-Mutation des *FLT3*-Gens wurden die Exons 13-15 und für die *TKD*-Mutation das Exon 20 amplifiziert. Die untersuchten Fragmente wurden über Agarosegel-Elektrophorese aufgereinigt (Abbildung 3.2.1 C) und auftretende Mutationen durch direkte Sequenzierungen identifiziert (Prelle *et al.*, 2013).

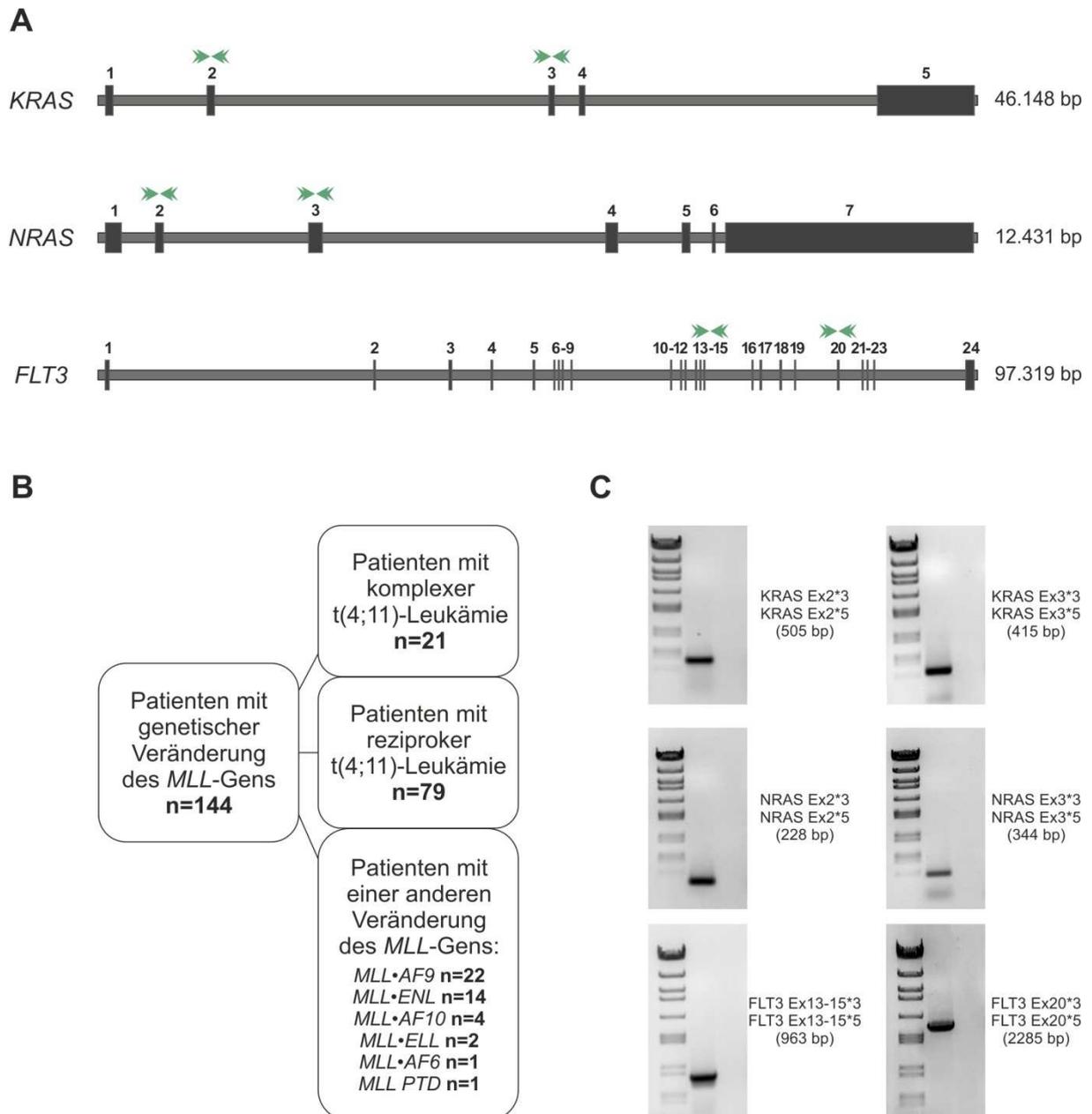


Abbildung 3.2.1: Sequenzierte Gene und Patientengruppen der Sekundärmutationsanalyse

A) Schematische Abbildung der Exon-Intron-Struktur analysierter Gene. Die Pfeile symbolisieren die Lage der Oligonukleotide zum Nachweis der untersuchten Fragmente.

B) Übersicht der untersuchten Patientengruppen. Alle Patienten mit genetischer Veränderung des *MLL*-Gens wurden in drei Untergruppen unterteilt. Patienten mit komplexer *t(4;11)*-Leukämie sind durch drei Translokationspartner charakterisiert, während bei Patienten mit reziproker *t(4;11)*-Leukämie das *AF4*-Gen den *MLL*-Translokationspartner darstellt. Die Kontrollgruppe besteht aus Patienten mit einer anderen Veränderung des *MLL*-Gens.

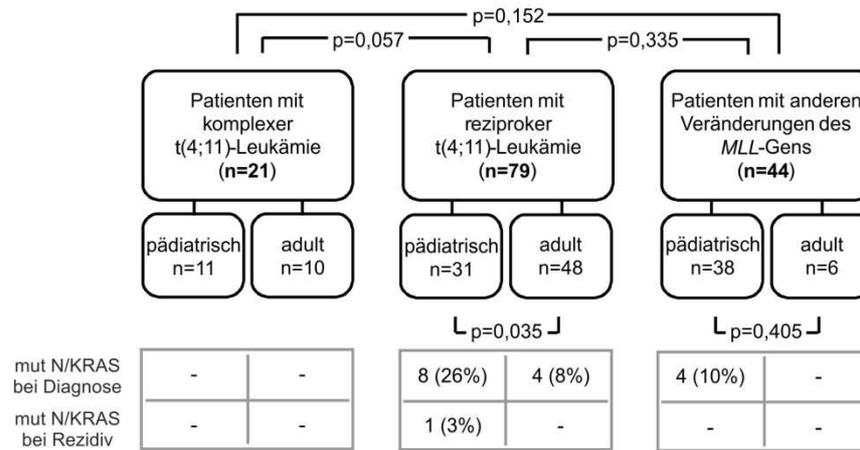
C) Untersuchte Fragmente eines Patienten der Gene *K*- beziehungsweise *NRAS* und *FLT3*.

3.2.2 Auswertung

Zur Auswertung von kooperierenden Mutationen wurden die Chromatogramme der direkten Sequenzierungen auf gleichzeitig auftretende Fluoreszenzsignale untersucht, welche auf eine heterozygote Mutation der DNA oder auf das Vorkommen von genetisch verschiedenen Zellklonen deuten. Während in den drei untersuchten Patientengruppen sowohl keine *ITD*-Mutationen als auch keine *TKD*-Mutationen des *FLT3*-Gens identifiziert wurden (Daten nicht gezeigt), zeigte die Analyse der *RAS*-Gene insgesamt 16 Nukleinsäureveränderungen. Der Hauptteil aller identifizierter Mutationen trat in der Untergruppe der Patienten mit reziproker *t(4;11)*-Leukämie auf. Hier konnten signifikant die meisten Mutationen ($n = 8$) an gDNA pädiatrischer Patienten erfasst werden. Die Untersuchung adulter Patienten mit reziproker *t(4;11)*-Leukämie sowie pädiatrischer Patienten mit einer anderen Veränderung des *MLL*-Gens deckte hingegen jeweils vier Punktmutationen auf. Die statistische Auswertung der Mutationen innerhalb der drei Untergruppen reziproker und komplexer *t(4;11)*-Leukämien und Patienten mit anderen Veränderungen des *MLL*-Gens zeigte jedoch keine Signifikanz (Abbildung 3.2.2 A). Zur genaueren Charakterisierung der identifizierten Punktmutationen wurde der resultierende Aminosäureaustausch bestimmt. Alle *NRAS* Mutationen, bis auf einen G12C-Austausch, resultierten in der typischen aktivierenden G12D Mutation. Außerdem trat eine *NRAS* G12D/G13D-Doppelmutation auf. Das Spektrum der *KRAS* Mutationen reichte von der typischen aktivierenden G12D Mutation über G10A, G12A, G12V bis zu G13D Aminosäureveränderungen. Für das Exon 3 der Gene *K*- beziehungsweise *NRAS*, in welchem der typische aktivierende G61-Aminosäureaustausch vorkommen kann, konnten keine Mutationen erfasst werden. Die Abbildung 3.2.2 B zeigt die identifizierten Mutationen gelb hinterlegt in den entsprechenden Chromatogrammen.

Um die Tendenz des vermehrten Vorkommens mutierter *RAS*-Gene in pädiatrischen Patienten mit reziproker *t(4;11)*-Leukämie genauer zu analysieren, wurden weiterhin Proben der Patienten bei Rezidiv untersucht. Da sich fünf Patienten zur Zeit der Analyse in Remission befanden und für acht Patienten keine Informationen über einen Rückfall zur Verfügung standen, konnten nur drei Proben analysiert werden. In zwei untersuchten Fällen konnte bei Rezidiv keine Mutation des *RAS*-Gens identifiziert werden. Lediglich in der Gruppe pädiatrischer Patienten mit reziproker *t(4;11)*-Leukämie zeigte ein Patient auch nach einem Rückfall die gleiche Mutation des vorher identifizierten *RAS*-Allels. Die identifizierte Mutation ist ein G12V-Aminosäureaustausch im *KRAS*-Gen. Somit sind *RAS*-Mutationen bei Rezidiv eines Patienten in den meisten Fällen nicht mehr nachweisbar, was auf das Vorkommen von genetisch verschiedenen Zellklonen deutet.

A



B

PNr	Translokation	Alter bei Diagnose	Mutation	Sequenz bei Diagnose	Sequenz bei Rezidiv
P08_1316	t(4;11)	2.5 Monate	NRAS - G12D/G13D		Keine Information
P09_1409	t(4;11)	2.9 Monate	KRAS - G12V		Keine Information
P05_394	t(4;11)	5 Monate	KRAS - G12D		Keine Information
P05_399	t(4;11)	5 Monate	KRAS - G12V		
P08_1180	t(4;11)	154 Monate	KRAS - G13D		MRD negativ
P09_1414	t(4;11)	3 Monate	KRAS - G13D		
P09_1421	t(4;11)	1 Monat	KRAS - G12A		Keine Information
P10_1628	t(4;11)	10 Monate	KRAS - G13D		Keine Information
P10-1783	t(11;19)	4.6 Monate	KRAS - G12D		Keine Information
P10-1758	t(9;11)	4 Jahre	NRAS - G12D		MRD negativ
P10-1755	t(10;11)	0.6 Monate	KRAS - G12D		Keine Information
P10-1754	t(11;19)	14 Monate	NRAS - G12C		Keine Information
P03_196	t(4;11)	adult	KRAS - G10A		MRD negativ
P06_821	t(4;11)	adult	NRAS - G12D		
P03_208	t(4;11)	adult	KRAS - G13D		MRD negativ
P03_209	t(4;11)	adult	NRAS - G12D		MRD negativ

Abbildung 3.2.2: Auswertung der Sekundärmutationsanalyse

A) Aufteilung aller analysierten Patienten in drei Untergruppen nach Translokation und Alter. Die Zahlen in den Kästen beschreiben die Anzahl diagnostizierter Mutationen bei Diagnose und Rezidiv während Signifikanzen über und unter den jeweiligen Patientengruppen angegeben sind.

B) Tabelle identifizierter Punktmutationen mit Patientenummer, Translokation der Leukämie, Alter des Patienten bei Diagnose, identifizierte Mutation, resultierendes Chromatogramm und Chromatogramm analysierter Rezidivfälle.

3.3 Einfluss von Koffein auf AF4•MLL-exprimierende Zellen

Da für eine andere chromosomale Translokation mit Beteiligung des *MLL*-Gens gezeigt werden konnte, dass Koffein als Stimulans zu anti-seneszenten Zuständen leukämischer Zellen sowie zu verkürzten Latenzzeiten in Mausmodellen führte (Takacova *et al.*, 2012), sollte dessen Einfluss auf t(4;11)-assoziierte Zellen untersucht werden.

3.3.1 Wachstumskurven von t(4;11)-Zelllinien

Um den Einfluss von Koffein zu untersuchen wurden t(4;11)-Zelllinien mit verschiedenen Konzentrationen des Xanthins behandelt. Die drei verwendeten Zelllinien mit dieser Translokation sind die beiden Vorläufer-B-Zelllinien SEM und RS(4;11) sowie die Akute Monocytische Leukämie-Zelllinie MV(4;11). Zur Kontrolle wurden Zellen der Linie KOPN-8 behandelt, da diese das Fusionsprotein MLL•ENL wie die Zellen der Studien von Takacova *et al.* exprimieren. Außerdem wurde die Vorläufer-B-Zelllinie NALM-6 nach Gabe von Koffein analysiert, um Leukämiezellen ohne genetische Veränderung des *MLL*-Gens vergleichen zu können. Alle Zelllinien wurden während Phasen des exponentiellen Wachstums ohne oder mit Koffein in Konzentrationen von 0,125 mM, 0,25 mM oder 0,5 mM inkubiert. Die gewählten Konzentrationen entsprechen durchschnittlichen Angaben aus Datenbank-recherchen anderer *in vitro*-Experimente mit Koffein (Ehrhardt *et al.*, 2013; Hashimoto *et al.*, 2004). Im täglichen Rhythmus nach Behandlung der Zellen mit Koffein, wurde das Wachstum über drei Tage bestimmt. Die Abbildung 3.3.1 zeigt Wachstumskurven der untersuchten Leukämie-Zelllinien unter Gabe von Koffein. Um Änderungen der Proliferation möglichst genau zu bestimmen, wurden sowohl Lebendzellzahlen über Trypanblau-Färbungen ermittelt (Abbildung 3.3.1 A) als auch Absorptionsmessungen nach Verwendung des CCK8-Assays durchgeführt, welche eher Rückschlüsse auf die metabolische Aktivität der Zellen zulassen (Abbildung 3.3.1 B). Die Trypanblau-Zellzählungen zeigten, dass alle Zelllinien mit einer *MLL*-Translokation nach drei Tagen ein reduziertes Wachstum nach Behandlung mit Koffein aufwiesen. Diese Abnahme der Proliferation korrelierte stark mit der Erhöhung der Koffein-Konzentrationen, wobei die höchste Konzentration das geringste Wachstum hervor rief. Zu bemerken ist jedoch, dass die Zelllinien SEM und RS(4;11) mit 0,25 mM beziehungsweise 0,125 mM Koffein zu Beginn des Wachstumsexperiments stärker proliferierten. Zellen der Linie NALM-6 zeigten verstärktes Wachstum unter Gabe von Koffein in einer Konzentration von 0,125 mM über den gesamten Zeitraum des Experiments. In höheren Konzentrationen bewirkte die Gabe von Koffein jedoch eine Hemmung des Wachstums. Im CCK8-Assay hingegen zeigten alle verwendeten Zelllinien ein verringertes Wachstum, beziehungsweise einen verringerten Metabolismus nach Behandlung mit Koffein.

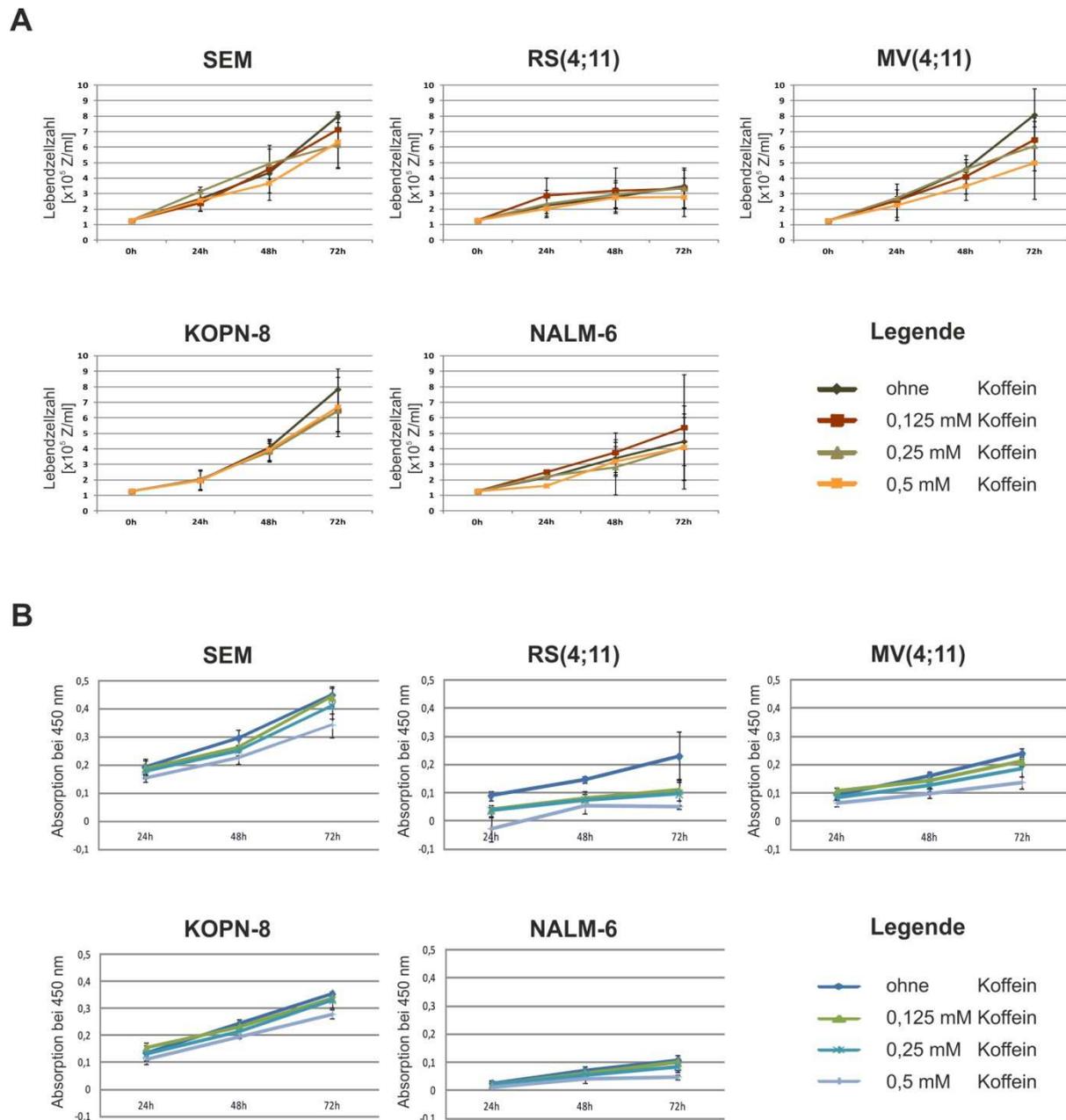


Abbildung 3.3.1: Wachstumskurven von Leukämie-Zelllinien unter Koffein-Behandlung

A) Zellzählungen lebender Zellen über Trypanblau-Färbungen der Zelllinien SEM, RS(4;11), MV(4;11), KOPN-8 und NALM-6 24, 48 und 72 Stunden nach Koffein-Behandlung mit den Konzentrationen 0 mM; 0,125 mM; 0,25 mM und 0,5 mM.

B) Absorptionsmessungen nach Verwendung des CCK8-Assays der Zelllinien SEM, RS(4;11), MV(4;11), KOPN-8 und NALM-6 24, 48 und 72 Stunden nach Koffein-Behandlung mit den Konzentrationen 0 mM; 0,125 mM; 0,25 mM und 0,5 mM.

Da die Wachstumskurven der Leukämie-Zelllinien meist eine Hemmung der Proliferation von Zellen bei steigender Koffein-Konzentration zeigten, wurde dieser Effekt weiterhin über einen Zellzyklus-/Apoptose-Assay charakterisiert. Bromodesoxyuridin wird von Zellen während des Zellzyklus anstelle des Nukleotids dTTP in die DNA eingebaut und kann durch spezifische Antikörper nachgewiesen werden. Durch zusätzliche Färbung mit dem DNA-Interkalator Propidiumjodid können über durchflusszytometrische Analysen sowohl Veränderungen im Zellzyklus als auch Apoptose der Zellen nachgewiesen werden.

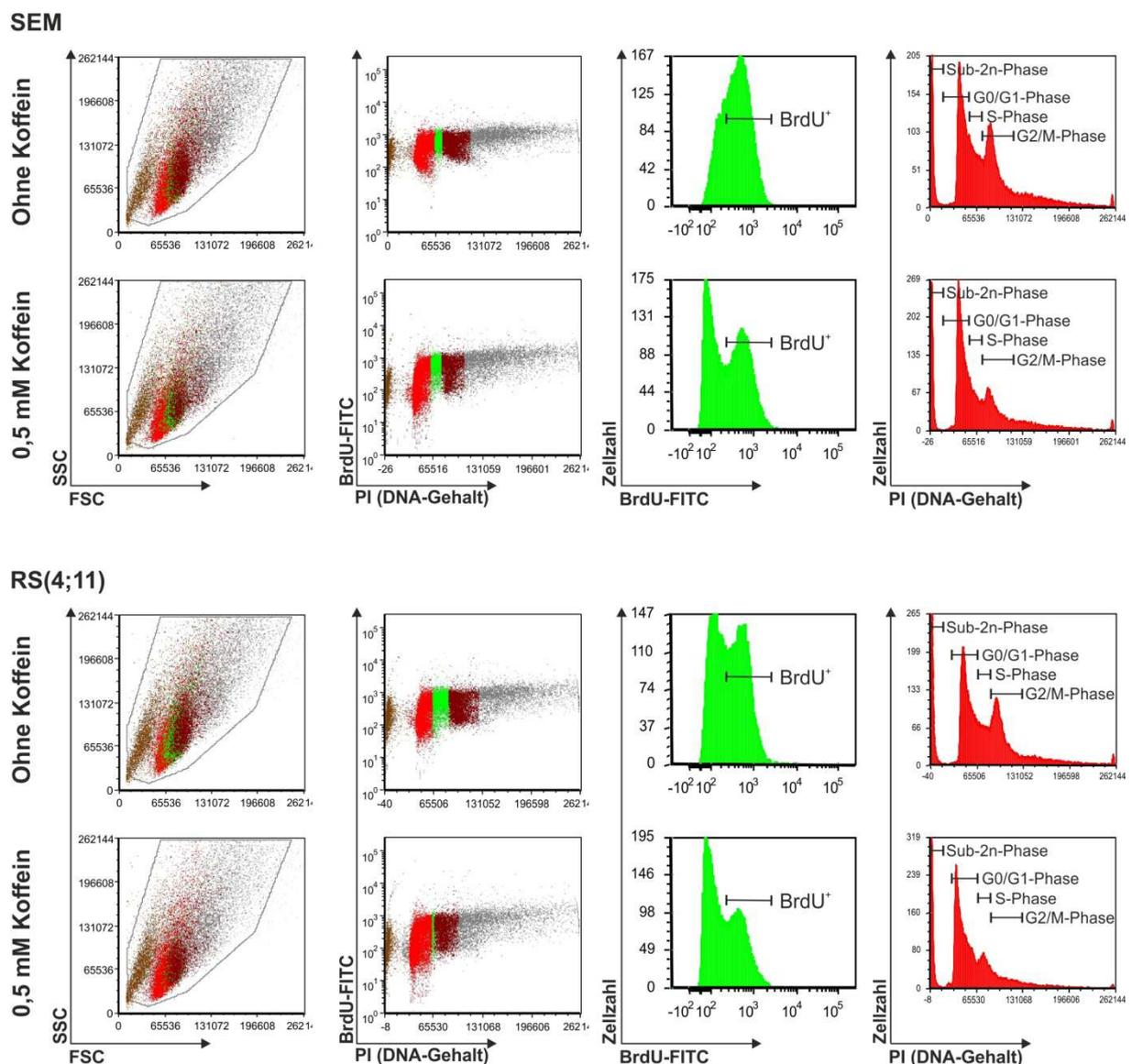


Abbildung 3.3.2: Zellzyklus-/Apoptose-Assay von SEM und RS(4;11) nach Koffein-Behandlung

Durchflusszytometrische Analysen von BrdU über einen spezifischen FITC-gekoppelten Antikörper und Propidiumjodid in den Leukämie-Zelllinien SEM und RS(4;11) 72 Stunden nach Koffein-Behandlung mit einer Konzentration von 0,5 mM.

In der Abbildung 3.3.2 sind die durchflusszytometrischen Analysen nach Verwendung des Zellzyklus-/Apoptose-Assays für die beiden t(4;11)-assoziierten Leukämie-Zelllinien SEM und RS(4;11) dargestellt. Die Linien wurden mit 0,5 mM Koffein behandelt und nach 72 Stunden analysiert. Die Anzahl von bis zu diesem Zeitpunkt mitotischer Zellen (BrdU⁺) wurde wie die Verteilung der Zellen in den Phasen des Zellzyklus G0/G1-, S- und G2/M-Phase sowie die Population an apoptotischen Zellen der sub-2n-Phase über den Nukleinsäureinterkalator Propidiumjodid ermittelt. Beide Zelllinien zeigten keine Veränderungen in der Population der sub-2n-Phase, wodurch ein Einfluss der Koffeinbehandlung auf die Apoptose der Zellen ausgeschlossen werden kann. Über die Verteilung der Zellen in die Phasen des Zellzyklus kann jedoch ein Effekt nach Koffeingabe beobachtet werden. Beide Linien wiesen weniger Zellen in der S-Phase sowie der G2/M-Phase auf und mehr Zellen in der G0/G1-Phase. Weiterhin wurden weniger BrdU⁺ Zellen, die während des Assays die Mitose durchlaufen hatten, detektiert. Somit wurde ein Arrest von SEM und RS(4;11) nach Behandlung mit 0,5 mM Koffein in der G1-Phase des Zellzyklus beobachtet.

3.3.2 Wachstumskurven von stabil AF4•MLL- oder MLL•AF4-exprimierenden 32D-Zellen

Der Effekt von Koffein auf die Proliferation t(4;11)-assoziiierter Zellen wurde an Zellen erweitert untersucht, die jeweils nur ein Fusionsprotein exprimieren und den im Mausmodell verwendeten Zellen analog sind. Für diesen Zweck wurde die murine pro B-Zelllinie aus longterm Knochenmarkkulturen 32D stabil über ecotrope Retroviren transduziert, sodass die Expression der Fusionsproteine AF4•MLL oder MLL•AF4 resultierte. Die Suspensionszelllinie 32D wächst in Abhängigkeit von Interleukin 3 (IL3) und arretiert ohne IL3 in der G0/G1-Phase des Zellzyklus, wobei durch anhaltenden Entzug der Zelltod über Apoptose eintritt. Die Abbildung 3.3.3 beschreibt die etablierten stabilen Zelllinien, welche anschließend für *in vitro*-Experimente verwendet wurden. Gezeigt ist die provirale DNA der verwendeten Retroviren über Konstrukte des Vektors pM-neo-Sfil in schematischer Darstellung mit den jeweiligen Größenangaben (A). Weiterhin wurden die Fusionstranskripte AF4•MLL und MLL•AF4 an cDNA aller kultivierten Klone nachgewiesen, damit nur Klone mit stabiler Expression für *in vitro*-Experimente verwendet wurden (B). Um zusätzlich die stabile Integration der Konstrukte der verwendeten Klone 32D_dT2A-AF4•MLL #66 und 32D_dT2A-MLL•AF4 #66 zu überprüfen, wurden die Fusionstranskripte erneut nach acht Passagen nachgewiesen (C).

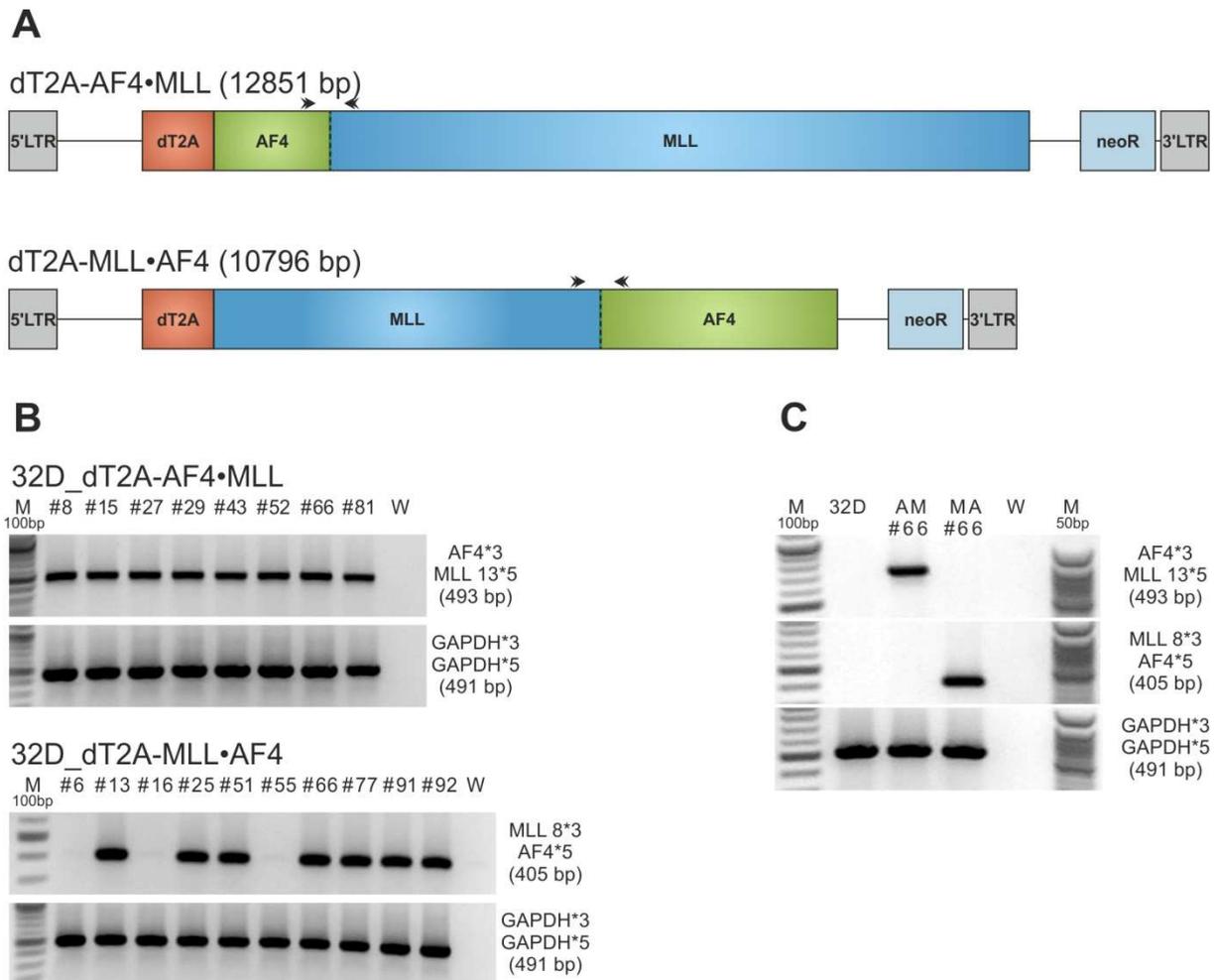


Abbildung 3.3.3: Stabil AF4•MLL- oder MLL•AF4-exprimierende 32D-Zelllinien

A) Schematische Darstellung der proviralen DNA verwendeter Retroviren mit Größenangaben. Die Pfeile symbolisieren die Lage der Oligonukleotide zum Nachweis der Konstrukte (siehe B).

B) Nachweis der integrierten retroviralen Konstrukte auf transkriptioneller Ebene an cDNA aller kultivierten Klone. Als Ladekontrolle diente der Nachweis von GAPDH.

C) Erneuter Nachweis der integrierten retroviralen Konstrukte auf transkriptioneller Ebene an cDNA verwendeter Klone nach acht Passagen. Als Ladekontrolle diente der Nachweis von GAPDH.

Um den Einfluss von Koffein zu untersuchen wurden zufällig ausgewählte Klone der etablierten stabilen Zelllinien, 32D_dT2A-AF4•MLL #66 und 32D_dT2A-MLL•AF4 #66, in Medium ohne oder mit 0,5 mM Koffein kultiviert. Über Absorptionsmessungen durch Verwendung des CCK8-Assays wurde die Proliferation der Zellen anhand der metabolischen Aktivität über einen Zeitraum von drei Tagen beobachtet. Da Koffein bereits seneszente Programme in MLL•ENL-assoziierten Leukämiezellen inhibieren konnte, wurde der Effekt des Xanthins weiterhin unter Gabe und Entzug von IL3 untersucht, da 32D-Zellen ohne IL3 im Zellzyklus arretieren. Wie bereits bei den Koffein-Experimenten der Suspensionszelllinien

zu beobachten war (Abbildung 3.3.1), führte die Behandlung mit dem Xanthin zur Hemmung der Proliferation aller verwendeten Zellen unabhängig von der Expression des jeweiligen Fusionsproteins (Abbildung 3.3.4). Diese Wachstumsinhibition bei Koffeinbehandlung wurde auch unter Entzug von IL3 beobachtet. Somit konnten keine anti-seneszenten Effekte von Koffein auf t(4;11)-Zellen beobachtet werden. Allerdings konnte nach Expression von MLL•AF4 gezeigt werden, dass die Proliferation dieser Zellen weniger im Verlauf des Experiments gehemmt wurde. Da bei 32D-Zellen durch anhaltenden IL3-Entzug der programmierte Zelltod eintritt, werden hier anti-apoptotische Effekte durch die Expression von MLL•AF4 bestätigt, welche bereits in älteren Studien beschrieben wurden (Caslini *et al.*, 2004; Gaussmann *et al.*, 2007).

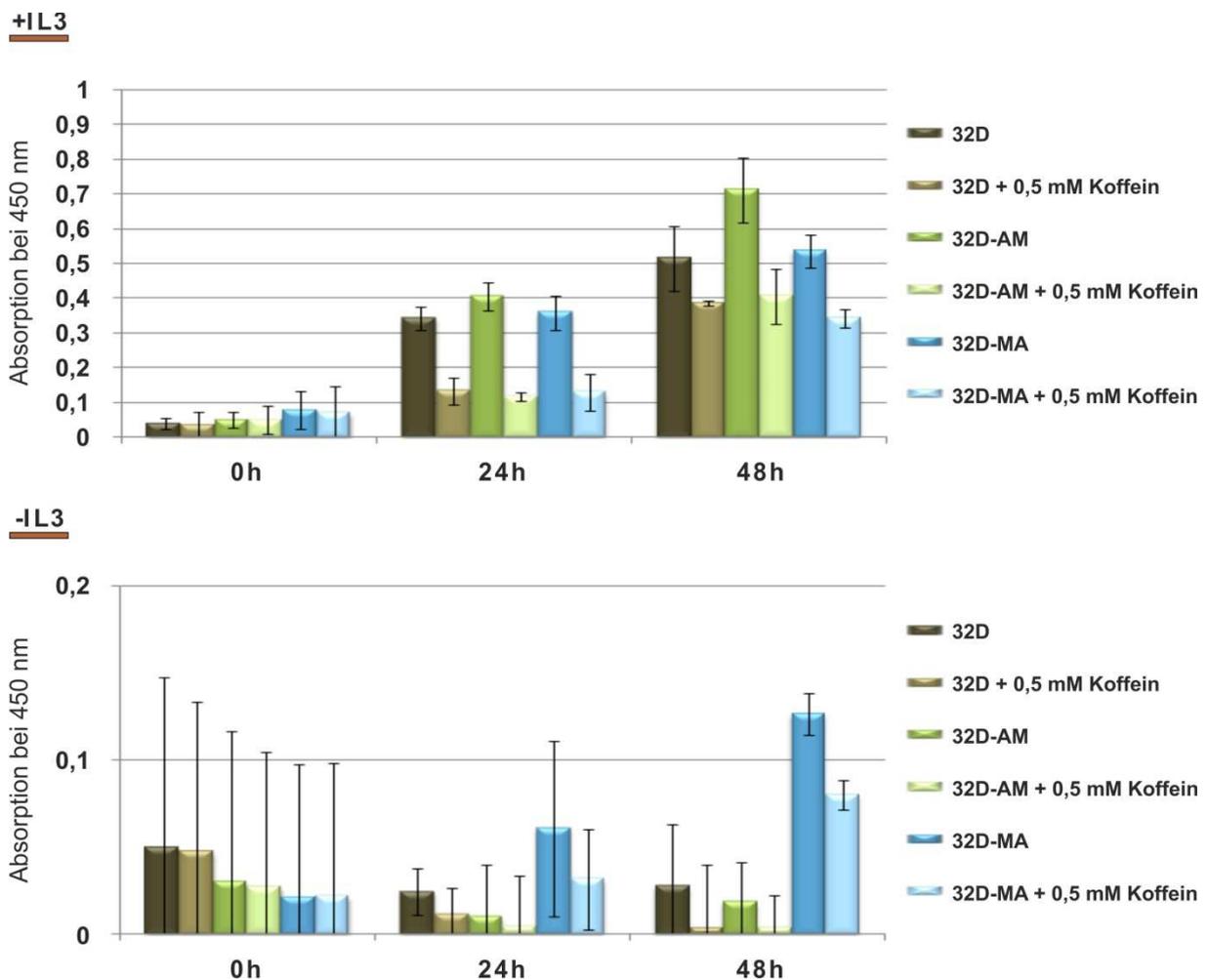


Abbildung 3.3.4: Wachstumskurven von stabil AF4•MLL- oder MLL•AF4-exprimierenden 32D-Zellen in koffeinhaltigem Medium unter Gabe oder Entzug von Interleukin 3

Absorptionsmessungen nach Verwendung des CCK8-Assays der stabil AF4•MLL- oder MLL•AF4-exprimierenden Klone der Suspensionszelllinie 32D nach 0, 24 und 48 Stunden. Die Zellen wurden mit und ohne 0,5 mM Koffein sowie unter Gabe (oben) oder Entzug (unten) von Interleukin 3 untersucht.

3.3.3 Mausmodell

Neben *in vitro*-Experimenten zur Auswirkung von Koffein auf t(4;11)-assoziierte Zellen wurde ein murines Transduktions-/Transplantationsmodell etabliert, um die Koffeineffekte auch *in vivo* charakterisieren zu können. Hierfür wurden murine hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen aus dem Knochenmark von Spendermäusen verwendet die Lineage negativ, also CD5-, B220-, CD11b-, Gr1-, 7-4- sowie Ter-119-defizient sind, jedoch das Oberflächenantigen Sca1 exprimieren (mHSPCs = "murine hematopoietic stem and progenitor cells"). Diese Population entspricht CD34⁺/CD38⁻ humanen hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen (Purton und Scadden, 2007). Die Transduktion der für zweiundsiebzig Stunden prä-stimulierten Zellen erfolgte über ecotrope Retroviren, die über Konstrukte des pIDEΔCMV-SEL mittels der Verpackungszelllinie Platinum-E hergestellt wurden. Die Abbildung 3.3.5 zeigt die provirale DNA der verwendeten Retroviren mit den jeweiligen Größenangaben. Außerdem ist der Nachweis der integrierten Konstrukte in test-transduzierten 32D-Zellen dargestellt, um die Infektiosität der Viren vor Transduktion von mHSPCs einschätzen zu können.

A

dT2A (3326 bp)



dT2A-AF4•MLL (12054 bp)



dT2A-MLL•AF4 (9999 bp)



B



Abbildung 3.3.5: Verwendete Retroviren im Mausmodell zur Untersuchung von Koffeineffekten

A) Schematische Darstellung der proviralen DNA verwendeter Retroviren mit Größenangaben.

B) Nachweis integrierter Konstrukte an cDNA test-transduzierter 32D-Zellen. Als Ladekontrolle diente der Nachweis von GAPDH.

Insgesamt sollte das verwendete Mausmodell dem Modell von Bursen & Schwabe *et al.*, 2010 gleichen, um die gewonnenen Daten gut vergleichen zu können. Neben der Verwendung desselben Zelltyps und derselben Virusart wurde der experimentelle Ablauf des Mausmodells eingehalten. Es wurden Empfängermause des Stamms C57BL/6-Ly5.1 gewählt, die einen Tag sowie eine Stunde vor der Transplantation einer sublethalen Ganzkörperbestrahlung mit jeweils fünf Gray unterzogen wurden. Dieser Stamm exprimiert die Isoform 1 des hämatopoetischen Zellmarkers Ly5 (=CD45), sodass im Modell transduzierte Zellen, welche die Isoform Ly5.2 exprimieren, identifiziert werden konnten (Shen *et al.*, 1985). Der einzige Unterschied beider Modelle lag in der Art der Transplantation. Um generell ein besseres Engraftment der transduzierten Zellen zu erreichen, wurden diese direkt in das Knochenmark des Femurs transplantiert. Die Tabelle 3.3.1 fasst die Anzahl der transplantierten Mäuse sowie die Anzahl der analysierten Mäuse pro Konstrukt zusammen. Die Daten aller analysierten Mäuse flossen in Gewebegewichtsbestimmungen, Analysen zum Engraftment transplantiertter Zellen sowie im Nachweis der transduzierten Konstrukte mit ein.

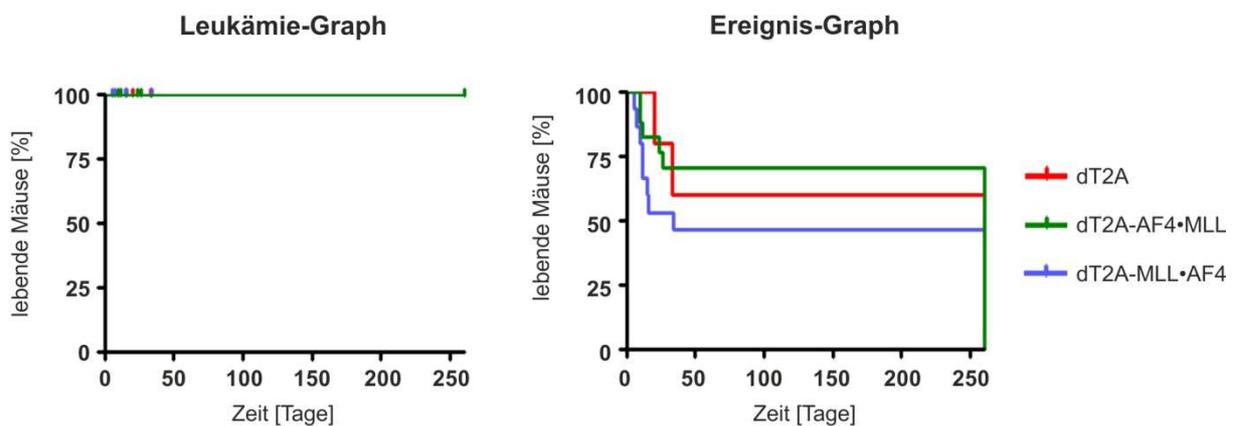
Tabelle 3.3.1: Anzahl transplantiertter und analysierter Mäuse im Koffein-Mausmodell

Konstrukt	Transplantierte Mäuse	Analysierte Mäuse
pIDEΔCMV-SEL_dT2A	5	4
pIDEΔCMV-SEL_dT2A-AF4•MLL	17	13
pIDEΔCMV-SEL_dT2A-MLL•AF4	15	7

Im Mausmodell zur Untersuchung der Auswirkungen von Koffein wurde allen Mäusen eine Woche nach Transplantation Koffein in einer Konzentration von 0,4 mg/ml über das Trinkwasser zugeführt. Diese Konzentration entspricht der verwendeten Dosis im von Takacova *et al.* etablierten Modell. Alle Tiere wurden über einen Zeitraum von 260 Tagen täglich einer phänotypischen Untersuchung unterzogen, um ein Auftreten von Krankheitssymptomen frühzeitig zu erkennen. Da im Tiermodell von Bursen & Schwabe *et al.* Leukämien nach 233 ± 21 Tagen auftraten, wurde das Experiment nach 260 Tagen abgebrochen und die Tiere analysiert. Zur Bestimmung einer Überlebenskurve nach Kaplan-Meier wurde für alle Mäuse die Zeitspanne zwischen Transplantation und Ende des Experiments dokumentiert. Wie die Abbildung 3.3.6 A zeigt, wies keine der transplantierten Mäuse den Krankheitsphänotyp einer Leukämie im Beobachtungszeitraum auf. Der Ereignis-Graph zeigt den plötzlichen Übernachts Tod von insgesamt einer Maus mit dem Konstrukt

pIDE Δ CMV-SEL-dT2A, von vier Mäusen mit dem Konstrukt pIDE Δ CMV-SEL-dT2A-AF4•MLL und von acht Mäusen mit dem Konstrukt pIDE Δ CMV-SEL-dT2A-MLL•AF4 in der frühen Zeit nach Transplantation. Diese Mäuse hatten extrem zurückgebildete Milzen und die Anzahl von Zellen im Knochenmark war deutlich reduziert, was auf die Bestrahlung zurückgeführt wurde. Am Ende des Beobachtungszeitraums von 260 Tagen wurde der Thorax und der Bauchraum aller Mäuse geöffnet um Größe, Lage und Beschaffenheit der Organe zu untersuchen. Alle Mäuse waren bei dieser Untersuchung vollkommen unauffällig. Da im Falle einer Leukämie häufig die Vergrößerung der Milz auftritt, wurden alle Milzen präpariert und gewogen. Die Abbildung 3.3.6 B zeigt die Auswertung aller Milzgewichte der Mäuse sowie deren Mittelwert nach Konstrukten. Hierbei konnten keine Veränderungen beobachtet werden. Alle Mäuse zeigten normale Milzgewichte des Mausstamms C57BL/6-Ly5.1 von etwa 100 mg.

A



B

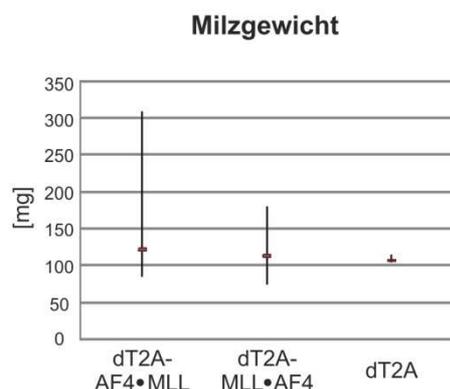


Abbildung 3.3.6: Krankheitsdokumentation der Mäuse im Koffein-Modell

A) Kaplan-Meier Überlebenskurven transplantierte Mäuse im Beobachtungszeitraum von 260 Tagen. Links = Der Leukämie-Graph dokumentiert das Auftreten von Leukämie-Phänotypen. Rechts = Der Ereignis-Graph dokumentiert das Auftreten von anderen Ereignissen, die zum Tod der Tiere führten. B) Milzgewichte aller analysierten Mäuse sowie die gemittelten Gewichte pro verwendetem Konstrukt.

Um das Engraftment der transplantierten Zellen im Knochenmark nachzuweisen wurden die Knochen beider Beine gespült und die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Da die transduzierten Zellen die Isoform 2 des hämatopoetischen Zelloberflächenmarkers Ly5 (= CD45) exprimieren, konnten diese gut von Zellen der Empfängermause C57BL/6-Ly5.1 unterschieden werden. Die Anzahl CD45.2⁺ Zellen gibt somit Aufschluss über den Erfolg des Engraftments transplantierte Zellen im Knochenmark. Die Abbildung 3.3.7 A zeigt die durchflusszytometrische Analyse von CD45.2⁺ Zellen im Knochenmark analysierter Mäuse. Wie der Tabelle oben rechts zu entnehmen ist, konnten in zwei von drei Mäusen mit dT2A-transduzierten mHSPCs, jedoch nur in vier von dreizehn Mäusen mit dT2A-AF4•MLL-transduzierten mHSPCs und in zwei von sieben Mäusen mit 2AdT-MLL•AF4-transduzierten mHSPCs CD45.2⁺ Zellen nachgewiesen werden. Der prozentuale Anteil an detektierten Spenderzellen im Knochenmark lag für die Kontrollgruppe bei mehr als 20 %, für beide Fusionen allerdings nur bei ~8 % beziehungsweise ~2 %. Da diese Werte auf ein schlechtes Engraftment der transplantierten Zellen im Koffein-Modell deuten, wurden die Werte zusätzlich mit Werten eines analogen Modells ohne Koffeingabe verglichen (Kapitel 3.4). Die Tabelle 3.3.2 zeigt, dass das Engraftment transplantierte Zellen unter Koffeinbehandlung der Mäuse um mehr als die Hälfte reduziert war im Vergleich zu Mäusen ohne Koffeinzusatz im Trinkwasser. Außerdem war der prozentuale Anteil an CD45.2⁺ Zellen im Koffein-Mausmodell wesentlich geringer (Koffein-Modell = 7,8 ± 18,6 % vs. Modell ohne Koffein = 21 ± 30,7 %). Somit hemmte Koffein die Proliferation von Zellen *in vitro* und auch das Engraftment von transplantierten Zellen im Mausmodell.

Tabelle 3.3.2: Vergleich des Engraftments transplantierte Zellen im Mausmodell ± Koffein

	Koffein-Modell	Modell ohne Koffein
Anzahl der Mäuse mit CD45.2 ⁺ Zellen	8/23 (34,8 %)	12/17 (70,6 %)
Prozentualer Anteil an CD45.2 ⁺ Zellen	7,8 % ± 18,6 %	21 % ± 30,7 %

Weiterhin wurde die erfolgreiche Integration der viralen Konstrukte in transduzierten und anschließend transplantierten Zellen auf genomischer Ebene nachgewiesen. Wie in Abbildung 3.3.7 B zu sehen ist, konnte in zwei von dreizehn analysierten Mäusen das virale Konstrukt dT2A-AF4•MLL in Knochenmarkszellen nachgewiesen werden. Alle Kontrollmäuse und alle Mäuse des Konstrukts dT2A-MLL•AF4 zeigten keine Expression beziehungsweise Integration der Konstrukte, was jedoch auf das geringe Engraftment der Zellen zurück geführt werden kann.

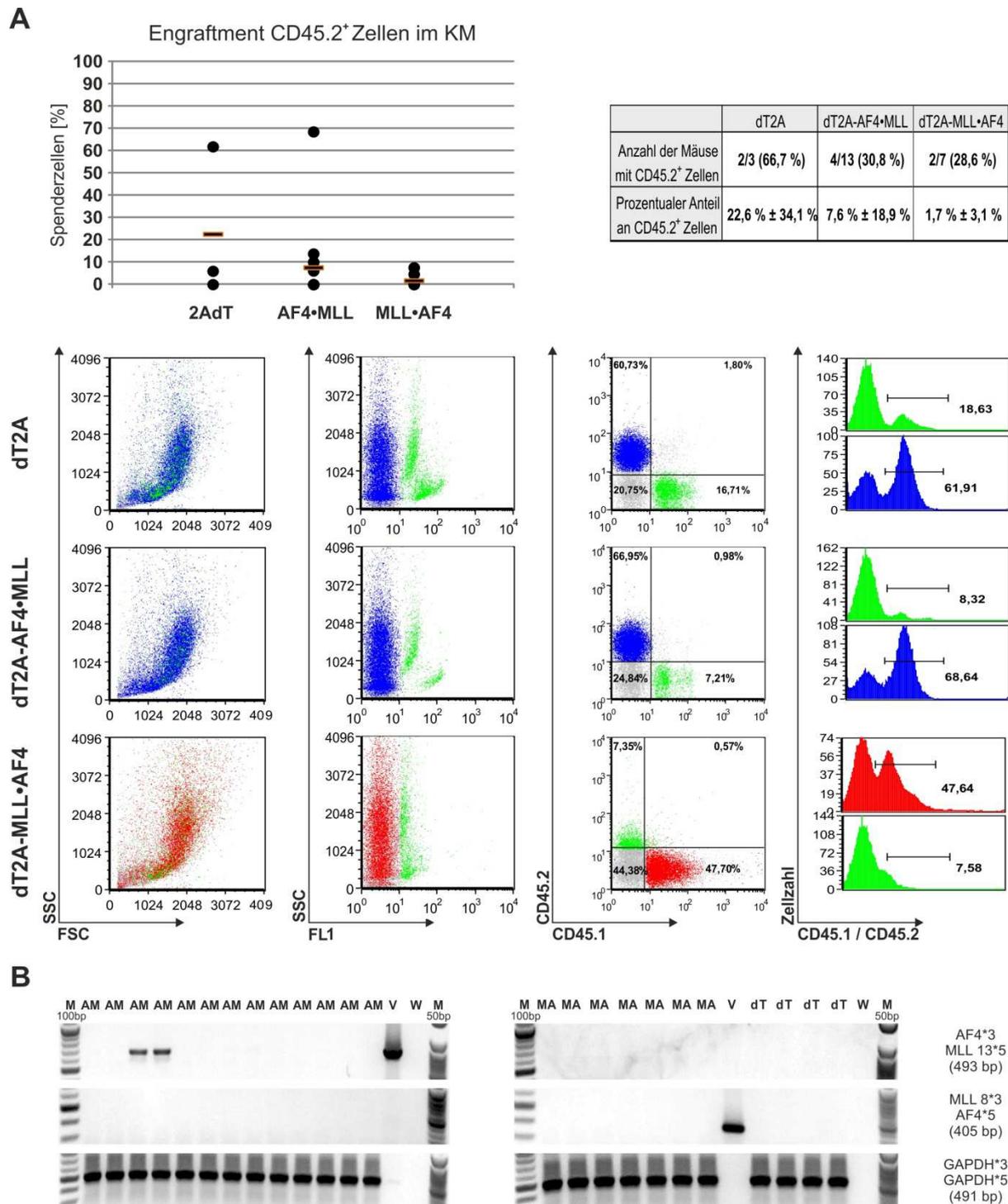


Abbildung 3.3.7: Analyse von Knochenmarkszellen der Mäuse am Ende des Experiments

A) Durchflusszytometrische Analyse zum Engraftment CD45.2⁺ Zellen im Knochenmark von Mäusen des Koffein-Modells über einen APC- bzw. FITC-gekoppelten CD45.2-Antikörper. Oben links = Auswertung aller Daten zu prozentualen Anteilen humaner Zellen im Blut sowie Bestimmung des Mittelwerts. Oben rechts = Tabelle zur Anzahl der Mäuse, in welchen ein Engraftment von humanen Zellen nachgewiesen werden konnte sowie zum prozentualen Anteil an humanen Zellen im Blut von Mäusen pro Konstrukt, als Mittelwerte mit Standardabweichungen.

B) Nachweis der verwendeten Konstrukte an gDNA aus Knochenmarkszellen analysierter Mäuse.

3.4 Expression von MLL·C im Mausmodell

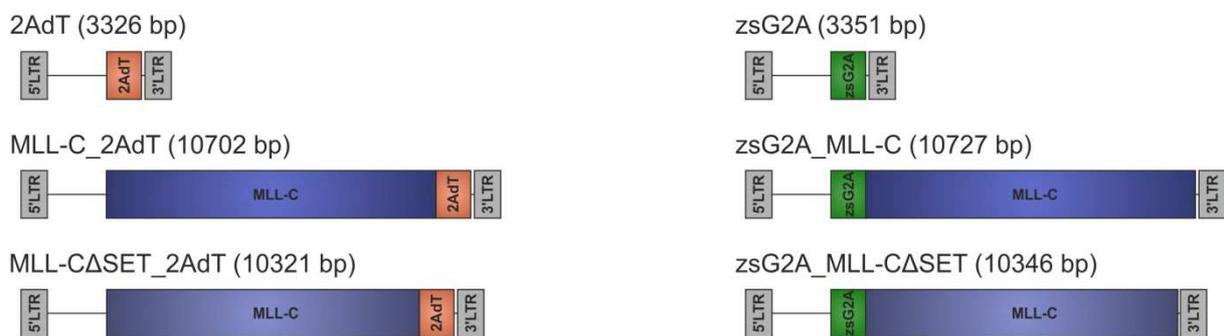
Für die t(4;11)-assoziierte Leukämie scheint das reziproke Fusionsprotein AF4•MLL das treibende Onkogen zu sein, da es *in vitro* zum Verlust der Kontaktinhibition sowie zu Wachstumstransformation von Zellen (Bursen *et al.*, 2004) und im Mausmodell zur Entwicklung lymphatischer Leukämieformen führt (Bursen und Schwabe *et al.*, 2010). MLL-assoziierte Leukämien zeichnen sich jedoch oft durch komplexe Chromosomenaberrationen wie Translokationen mit drei oder vier beteiligten Genen, Insertionen, Deletionen und Inversionen aus. Als Resultat dieser komplexen Aberrationen entsteht meist ein isolierter MLL C-Terminus, der nicht oder in umgekehrter Orientierung mit dem Translokationspartner fusioniert ist (Meyer *et al.*, 2013). Durch einen Gen-internen Promotor strangaufwärts des *MLL* Exon 12 kann der MLL C-Terminus jedoch auch ohne Fusionspartner transkribiert werden. Das so entstandene MLL·C-Protein beginnt ab der Bromodomäne und endet mit der konservierten SET-Domäne des MLL-Proteins. Über die enthaltenden Schnittstellen der Taspase 1 wird das MLL·C-Protein in ein ~97 kDa großes N-terminales Fragment und das auch im Wildtyp Protein vorkommende C-terminale Fragment gespalten. Über die zwei intramolekularen Interaktionsdomänen FYRN und FYRC heterodimerisieren die Fragmente, sodass dem stabilisierten MLL·C-Protein eine Funktion als Histonmethyltransferase über die SET-Domäne zukommt (Scharf *et al.*, 2007). Da auch etwa 20 % aller Patienten mit einer t(4;11)-assoziierten Leukämie kein reziprokes Fusionsprotein AF4•MLL ausbilden und es zur Bildung des MLL·C Proteins kommt (Kowarz *et al.*, 2007), sollte das Potenzial des MLL C-Terminus ermittelt werden, eine Krankheit im Mausmodell hervorzurufen.

3.4.1 Mausmodell

Um die Effekte der Expression des MLL C-Terminus *in vivo* charakterisieren zu können, wurde ein murines Transduktions-/Transplantationsmodell etabliert. Hierfür wurden mHSPCs verwendet, welche der Population von CD34⁺/CD38⁻ hHSPCs entsprechen (Purton und Scadden, 2007). Die Transduktion der für zweiundsiebzig Stunden prä-stimulierten Zellen erfolgte über ecotrope Retroviren, die über Konstrukte des pIDEΔCMV-SEL mittels der Verpackungszelllinie Platinum-E hergestellt wurden. Die Abbildung 3.4.1 A zeigt die provirale DNA der verwendeten Retroviren mit den entsprechenden Größenangaben. Neben Viren für die Expression des MLL C-Terminus wurden Konstrukte ohne die C-terminal gelegenen 381 bp verwendet, welche für die SET-Domäne des MLL-Proteins kodieren (Kapitel 2.4.2). Da MLL·C über die SET-Domäne wie das Wildtyp-Protein über Histonmethyltransferaseaktivität verfügt (Scharf *et al.*, 2007; Meyer *et al.*, 2013), stellt das Konstrukt MLL·CΔSET

eine inaktive Form des MLL C-Terminus dar. Weiterhin wurden beide Konstrukte über eine T2A Sequenz mit verschiedenen Fluoreszenzmarkern fusioniert, um eventuelle Effekte dieser Marker ausschließen zu können. Vor der Transduktion von mHSPCs wurde die Kopienzahl der Viren pro Konstrukt je Milliliter Virusüberstand ermittelt, um möglichst gleiche Virusmengen zu verwenden und ähnliche Transduktionseffizienzen zu erhalten. Die Abbildung 3.4.1 B zeigt die Viruskopienbestimmung der MLL-C-, ΔSET- und Fluoreszenzmarkerkonstrukte über quantitative PCR an cDNA aus viraler RNA im Überstand der Verpackungszelllinie Platinum-E. In der Tabelle sind die Viruskopien für jedes Konstrukt angegeben, die über eine Standardkurve ermittelt wurden.

A



B

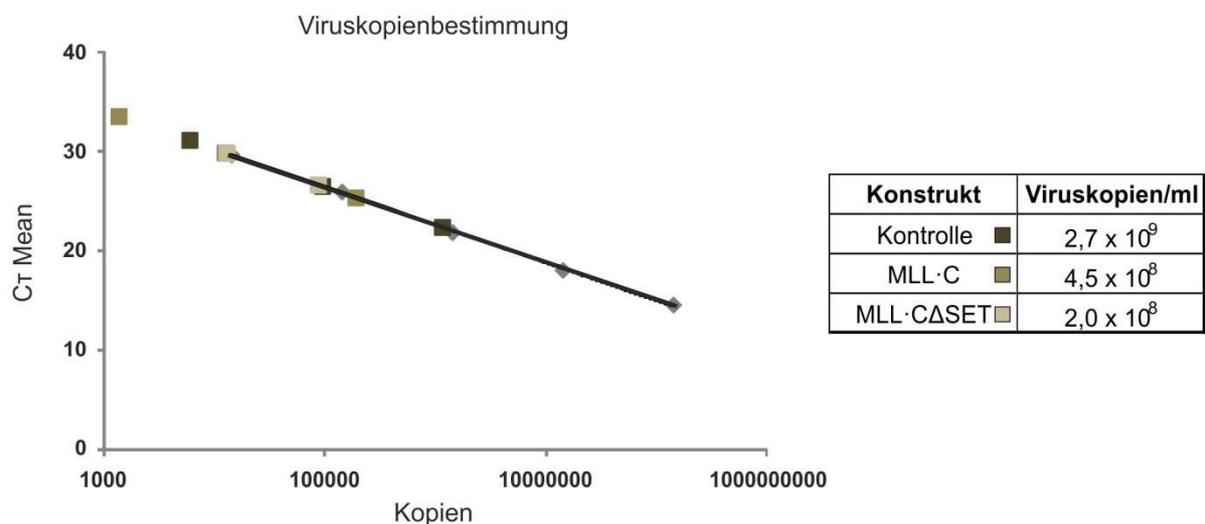


Abbildung 3.4.1: Verwendete Retroviren im MLL-C-Mausmodell

A) Schematische Darstellung der proviralen DNA verwendeter Retroviren mit Größenangaben.
 B) Viruskopienbestimmung der Konstrukte MLL·C, ΔSET und der Fluoreszenzmarker (Kontrolle) über quantitative PCR an cDNA aus revers transkribierter viraler RNA im Überstand der Verpackungszelllinie Platinum-E. Die absolute Quantifizierung der cDNA-Kopien im Virusüberstand erfolgte nach Herstellerangaben anhand einer Standardkurve.

Um transduzierte mHSPCs im Mausmodell jederzeit identifizieren zu können, wurden Empfängermause des Stamms C57BL/6-Ly5.1 gewählt. Da dieser Stamm die Isoform 1 des hämatopoetischen Zellmarkers Ly5 (= CD45) exprimiert, können transduzierte Zellen unterschieden werden, welche die Isoform Ly5.2 exprimieren (Shen *et al.*, 1985). Nach einer sublethalen Ganzkörperbestrahlung mit jeweils fünf Gray, sowohl einen Tag als auch eine Stunde vor der Transplantation, wurden die Zellen direkt in das Knochenmark des Femurs transplantiert. Die Tabelle 3.4.1 zeigt die Anzahl der transplantierten Mäuse pro Konstrukt und die Anzahl der analysierten Mäuse, deren Daten in Gewebegewichtsbestimmungen und Analysen zum Engraftment transplantiertter Zellen sowie im Nachweis der transduzierten Konstrukte einfließen.

Tabelle 3.4.1: Anzahl transplantiertter und analysierter Mäuse im MLL-C-Mausmodell

Konstrukt	Transplantierte Mäuse	Analysierte Mäuse
pIDEΔCMV-SEL_Kontrolle	11	4
pIDEΔCMV-SEL_MLL-C	14	9
pIDEΔCMV-SEL_MLL-ΔSET	10	4

Da für die Expression von MLL-C im Mausmodell bisher keine Publikationen vorliegen, wurden die Tiere über einen für Mausmodelle langen Zeitraum von 410 Tagen beobachtet. Aufgrund der Assoziation des MLL-C-Proteins mit der Entstehung bei reziproken und komplexen Translokationen die zum Phänotyp einer Leukämie führen, wurde im Mausmodell besonders auf die Entwicklung dieser Krankheit geachtet. Die Abbildung 3.4.2 A zeigt den Leukämie-Graph des Modells über den Beobachtungszeitraum von 410 Tagen. Eine Maus mit zsG2A-MLL-C-transduzierten mHSPCs entwickelte Merkmale einer Leukämie aufgrund der transplantierten Zellen nach 190 Tagen. Bei allen anderen Mäusen wurde keine Leukämie diagnostiziert oder es konnten keine transplantierten Zellen bei Analyse nachgewiesen werden. Am Ende des Beobachtungszeitraums oder bei Analyse wurden Thorax und Bauchraum aller Mäuse geöffnet um Größe, Lage und Beschaffenheit der Organe zu untersuchen. Da im Falle einer Leukämie häufig die Vergrößerung der Milz auftritt, wurden alle Milzen präpariert und gewogen. Die Abbildung 3.4.2 B zeigt die Auswertung aller Milzgewichte der Mäuse sowie deren Mittelwert nach Konstrukten. Während Mäuse mit Fluoreszenzmarker- oder ΔSET-transduzierten mHSPCs normale Milzgewichte des Mausstammes C57BL/6-Ly5.1 von etwa 100 mg zeigten, waren die Milzen von Mäusen mit MLL-C-transduzierten mHSPCs im Vergleich oft größer und schwerer (MLL-C = $243,3 \pm 260,7$ mg vs. Kontrolle = $113,3 \pm 16,5$ mg und ΔSET = $142,0 \pm 40,4$ mg).

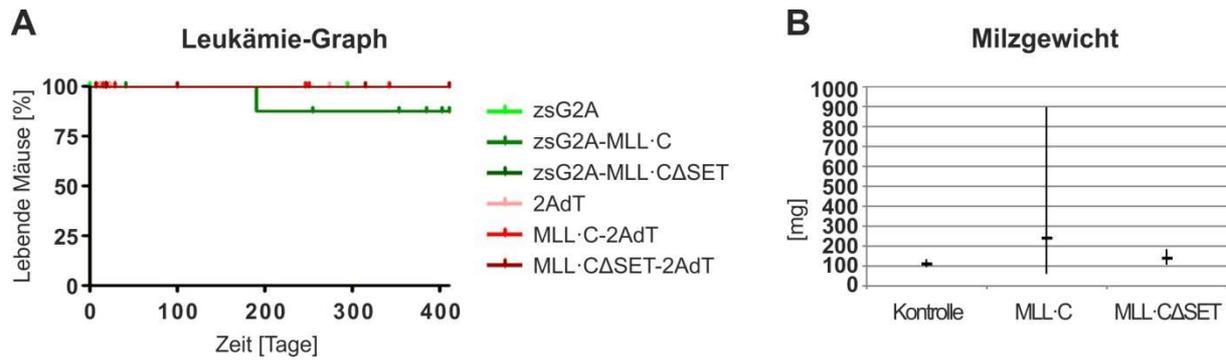


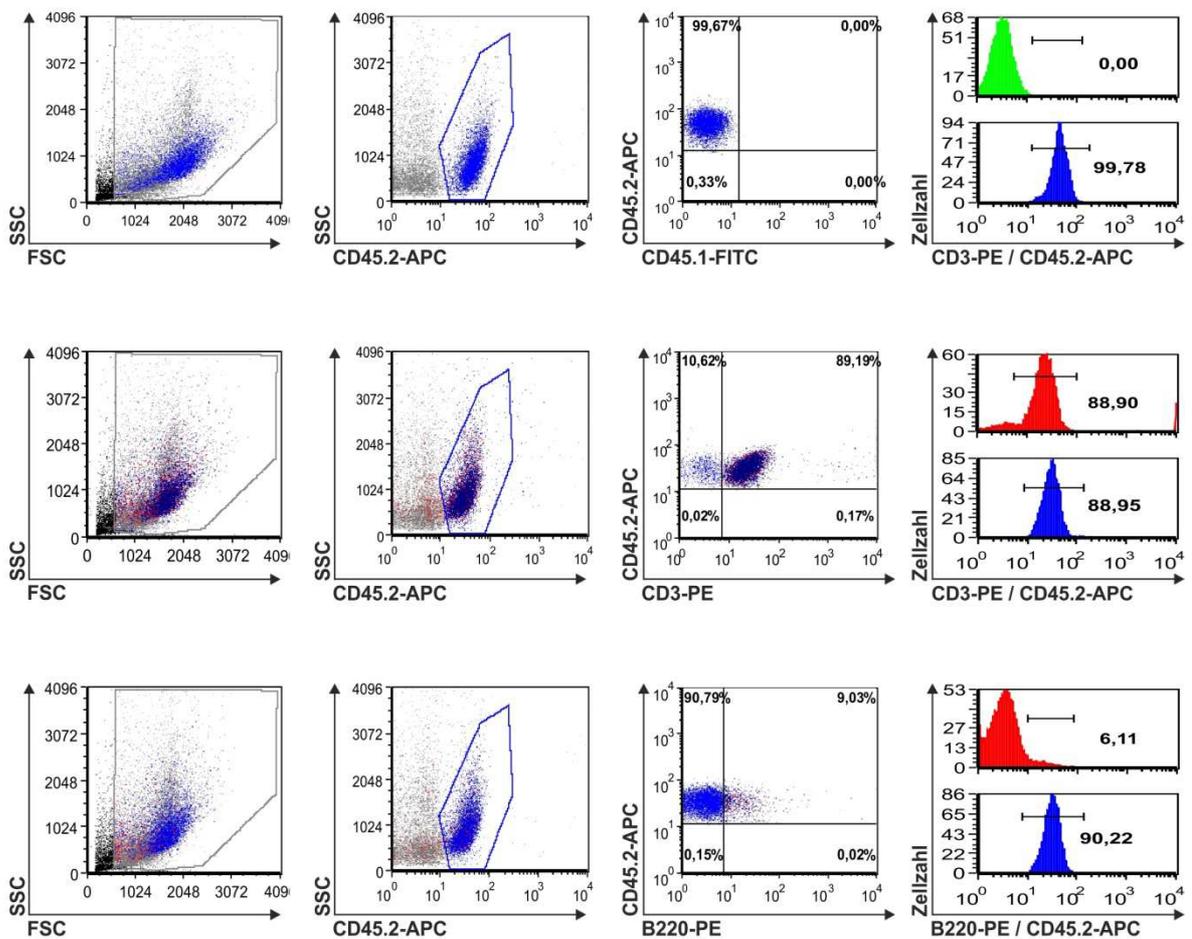
Abbildung 3.4.2: Krankheitsdokumentation der Mäuse im MLL-C-Mausmodell

A) Kaplan-Meier-Überlebenskurve transplanteder Mäuse im Beobachtungszeitraum von 410 Tagen.
 B) Milzgewichte aller analysierten Mäuse sowie die gemittelten Gewichte pro verwendetem Konstrukt.

Zur Charakterisierung der Leukämieerkmale der Maus mit zsG2A-MLL-C-transduzierten mHSPCs wurden Zellen des Knochenmarks und der Milz durchflusszytometrisch untersucht. Um den entstandenen Krankheitsphänotyp auf die transplantierten Zellen beziehen zu können, wurde zunächst der prozentuale Anteil an CD45.2⁺ Zellen bestimmt. Wie in Abbildung 3.4.3 A zu sehen ist, bestand das Knochenmark nahezu vollständig aus transplantierten Zellen. Weiterhin wurden lymphatische Oberflächenmarker auf CD45.2⁺ Zellen untersucht. Während CD45.2⁺ mHSPCs einen normalen Anteil an B-Lymphozyten bildeten (Nachweis über B220), betrug der Anteil an reifen T-Lymphozyten (CD3⁺ Zellen) fast 90 %. Nach gängigen "Bethesda proposals for classification of lymphoid neoplasms in mice" konnte daher ein T-Zell Neoplasma klassifiziert werden. Zur genaueren Charakterisierung des Krankheitsphänotyps wurden Blutausstriche und Zytospins von Zellen des Knochenmarks und der Milz analysiert. Wie in Abbildung 3.4.3 B erkennbar, ist die Anzahl von Leukozyten im Blut nicht erhöht. Die Zytospins von Knochenmark und Milz zeigen kleine bis mittelgroße Leukozyten. Da außerdem keine Vergrößerung des Thymus, jedoch ein Milzgewicht von 173 mg beobachtet wurde, scheint es sich um ein reifes T-Zell Neoplasma mit Charakteristiken eines Lymphoms zu handeln (Morse *et al.*, 2002). Die Analyse der Milzzellen zeigte analoge Resultate (Daten nicht gezeigt).

Um die beobachteten Effekte auf die transplantierten mHSPCs beziehen zu können, wurde das Engraftment CD45.2⁺ Zellen im Knochenmark aller analysierten Mäuse untersucht. Die Abbildung 3.4.4 zeigt die durchflusszytometrische Analyse des Knochenmarks über einen CD45.2-Antikörper. Wie der Tabelle oben rechts zu entnehmen ist, konnten in drei von vier Mäusen mit Fluoreszenzmarker-transduzierten mHSPCs, in sechs von neun Mäusen mit MLL-C-transduzierten mHSPCs und in ebenfalls drei von vier Mäusen mit ΔSET-transduzierten mHSPCs CD45.2⁺ Zellen nachgewiesen werden. Insgesamt wies das MLL-C-Mausmodell somit ein Engraftment transplanteder Zellen von mehr als 70 % auf.

A



B



Abbildung 3.4.3: Analyse des Krankheitsphänotyps der Maus mit zsG2A-MLL-C-transduzierten murinen hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen

A) Durchflusszytometrische Analyse von Zellen des Knochenmarks. Bestimmt wurde der Anteil an transplantierten Zellen (CD45.2⁺) im Vergleich zu Zellen der Empfängermaus (CD45.1⁺). Weiterhin wurde der prozentuale Anteil an reifen T-Lymphozyten (CD3⁺) und B-Lymphozyten während der Entwicklung (B220⁺) unter den transplantierten Zellen bestimmt.

B) Blutausstrich und Zytospins von Zellen des Knochenmarks und der Milz.

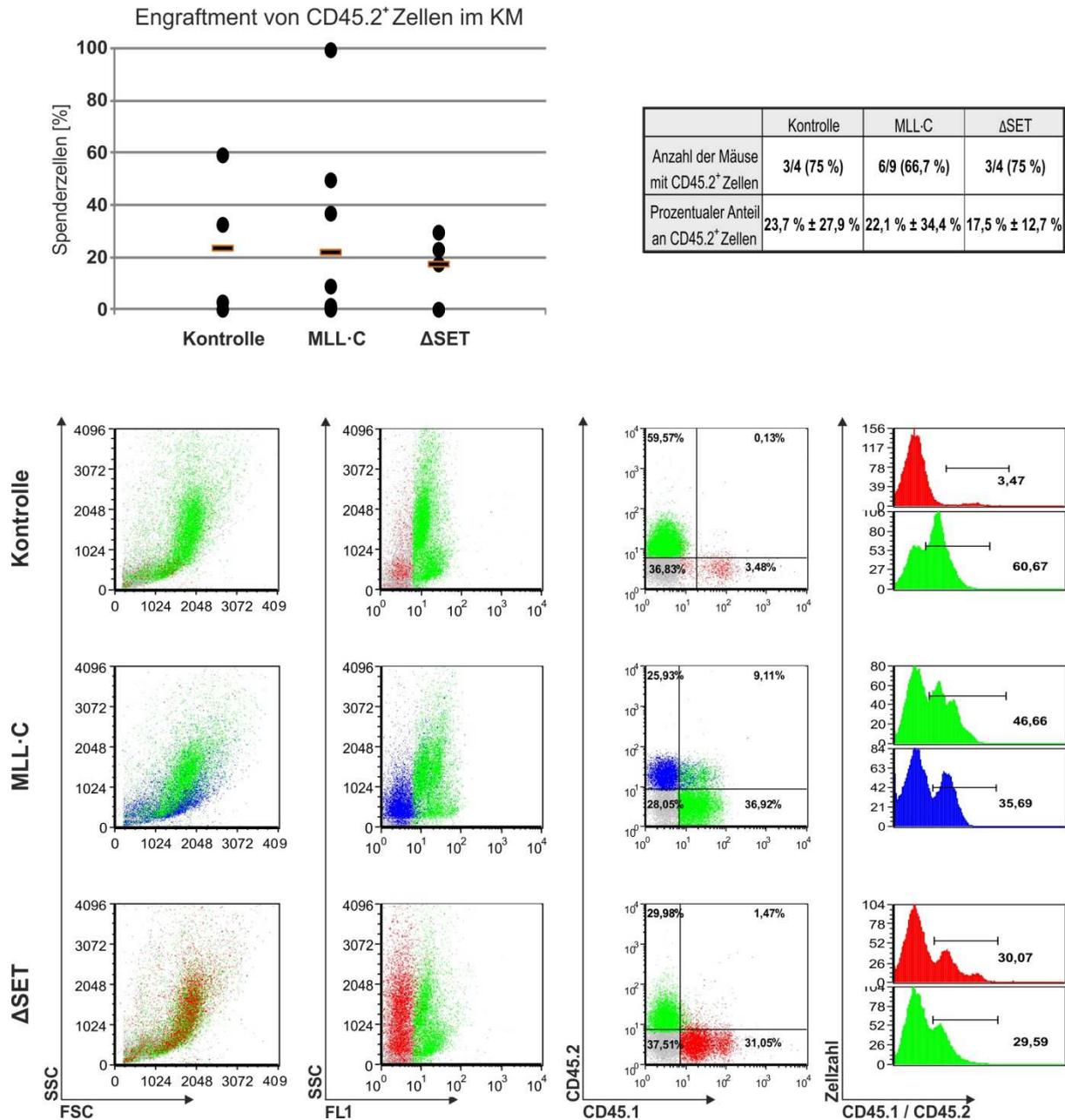


Abbildung 3.4.4: Engraftment CD45.2⁺ Zellen im Knochenmark von Mäusen im MLL-C-Mausmodell

Durchflusszytometrische Analyse CD45.2⁺ Zellen im Knochenmark über einen APC-/FITC-gekoppelten Antikörper im Vergleich zu körpereigenen Zellen der Empfängermäuse, welche die Isoform 1 des hämatopoetischen Zelloberflächenmarkers CD45 exprimieren. Oben links = Auswertung aller Daten zu prozentualen Anteilen CD45.2⁺ Zellen sowie Bestimmung des Mittelwerts. Oben rechts = Tabelle zur Anzahl der Mäuse, in welchen ein Engraftment von CD45.2⁺ Zellen nachgewiesen werden konnte sowie zum prozentualen Anteil an CD45.2⁺ Zellen im Knochenmark von Mäusen pro Konstrukt, als Mittelwerte mit Standardabweichungen.

3.4.2 Sekundäre Retransplantationsexperimente

Zur Bestätigung des Phänotyps eines reifen T-Zell Neoplasmas mit Charakteristiken eines Lymphoms der Maus mit zsG2A-MLL-C-transduzierten mHSPCs wurden sekundäre Retransplantationsexperimente durchgeführt. Hierfür wurden Zellen des Knochenmarks und der Milz dieser Maus in sublethal bestrahlte Empfängermäuse transplantiert. Um transplantierte Zellen im Mausmodell identifizieren zu können, wurden erneut Empfängermäuse des Stamms C57BL/6-Ly5.1 verwendet, welche die Isoform 1 des hämatopoetischen Zelloberflächenmarkers Ly5 (=CD45) exprimieren, während auf den ursprünglich transplantierten Zellen die Isoform CD45.2 zu finden ist. Die Abbildung 3.4.5 zeigt die Auswertung der sekundären Retransplantationsexperimente. Zur Bestimmung der Überlebenskurve nach Kaplan-Meier wurde für alle Mäuse die Zeitspanne zwischen Transplantation und Ausprägung eines Krankheitsphänotyps dokumentiert. Wie in Abbildung 3.4.5 A zu sehen ist, konnten nach 13 Tagen erste Anzeichen einer entstehenden Krankheit beobachtet werden, nach 29 Tagen waren alle Mäuse erkrankt. Um genauere Aussagen über den Gesundheitszustand erkrankter Mäuse treffen zu können, wurden die Organe des Bauchraums genauer untersucht. Hierfür wurde Lage, Größe und Beschaffenheit von Leber, Milz und Gastrointestinaltrakt zunächst rein optisch charakterisiert. Die Abbildung 3.4.5 B zeigt Aufnahmen dieser Organe je einer Maus pro transplantierte Zellart. Bei allen Mäusen waren die Lebern deutlich vergrößert. Außerdem wurde bei allen Mäusen eine Zunahme an Gewicht und Größe der Milzen beobachtet, welche zur genaueren Untersuchung präpariert und gewogen wurden. Die Analyse der Milzgewichte aller Mäuse zeigte ein durchschnittliches Gewicht von $499,3 \pm 126,1$ mg in Mäusen mit transplantierten Milzzellen der Primärmaus und von $464,8 \pm 204,6$ mg in Mäusen mit transplantierten Knochenmarkzellen der Primärmaus (Abbildung 3.4.5 C). Weiterhin wurde eine erhöhte Infiltration von Leukozyten besonders sowohl im Knochenmark als auch in der Milz beobachtet, was ein Vergleich der Zytospins in den Abbildungen 3.4.5 B und 3.3.4 B zeigte. Um die Zellen des Knochenmarks genauer zu charakterisieren wurde eine durchflusszytometrische Analyse durchgeführt. Die Abbildung 3.4.5 D zeigt eine erhöhte Anzahl reifer T-Lymphozyten, welche das Oberflächenantigen CD45.2 exprimieren und somit als ursprünglich transplantierte Zellen identifiziert werden können. Insgesamt konnte somit der Krankheitsphänotyp der primär mit zsG2A-MLL-C-transduzierten mHSPCs transplantierten Maus bestätigt werden. So zeigten sowohl Mäuse, welche mit Knochenmarkzellen der Primärmaus transplantiert wurden als auch Mäuse, welche mit Milzzellen der Primärmaus transplantiert wurden ein reifes T-Zell Neoplasma mit Charakteristiken eines Lymphoms. Nach Transplantation mit Milzzellen der Primärmaus konnte die Ausprägung des Phänotyp allerdings etwas schneller beobachtet werden.

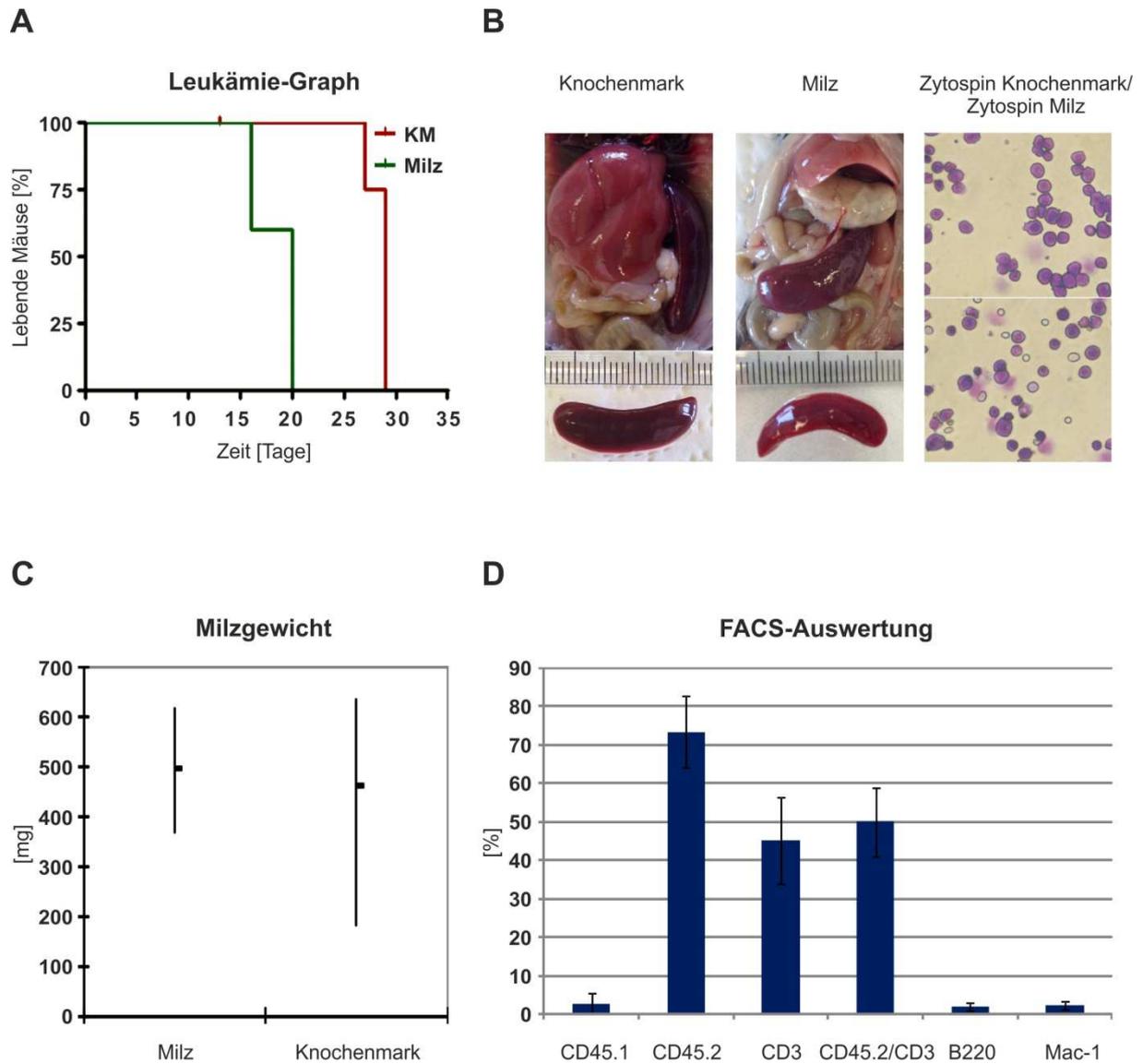


Abbildung 3.4.5: Analyse sekundärer Retransplantationsexperimente der zsG2A-MLL-C-Maus

A) Kaplan-Meier-Überlebenskurve aller mit Zellen des Knochenmarks oder der Milz transplantierten Mäuse im Beobachtungszeitraum.

B) Abbildungen aller Organe je einer Maus pro Gruppe transplantierten Knochenmark- oder Milzzellen. Weiterhin ist beispielhaft ein Zytospin von Knochenmarkzellen und Milzzellen einer sekundär transplantierten Maus gezeigt.

C) Milzgewichte aller analysierten Mäuse sowie die gemittelten Gewichte pro Gruppe.

D) Zusammengefasste Auswertung der durchflusszytometrischen Analyse von Knochenmarkzellen aller sekundär transplantierten Mäuse.

3.4.3 Auffällige Erkrankungen von Mäusen nach Expression des MLL-C-Proteins

Auch wenn über den Beobachtungszeitraum von 410 Tagen nur eine Maus einen Krankheitsphänotyp mit Merkmalen einer Leukämie beziehungsweise eines Lymphoms durch die transplantierten mHSPCs entwickelte, konnte im Mausmodell das Auftreten weiterer Krankheiten dokumentiert werden. Wie die Abbildung 3.4.6 im Ereignis-Graph zeigt, traten vor allem in der Gruppe von Mäusen nach Expression des MLL-C-Proteins gehäuft Krankheiten auf. Die Tabelle beschreibt alle Ereignisse (Analyse der Mäuse nach Feststellung präfinaler Merkmale, nach Feststellung anderer Krankheiten die ein Leiden der Tiere hervorgerufen hätte oder plötzlicher Tod) des Mausmodells nach 100 Tagen, da zu diesem Zeitpunkt der Einfluss von Bestrahlung, Narkose oder Transplantation ausgeschlossen werden kann. Für diesen Zeitraum wurden bei 27,3 % der Mäuse mit Fluoreszenzmarker-transduzierten mHSPCs, 20 % der Mäuse mit Δ SET-transduzierten mHSPCs und 57,1 % der Mäuse mit MLL-C-transduzierten mHSPCs Ereignisse beobachtet. Während die Gruppe des Δ SET-Konstrukts und der Kontrolle ausschließlich mildere Erkrankungen wie Diarrhoe und Ohrinfektionen aufwiesen oder aufgrund unauffälliger phänotypischer Untersuchungen keine eindeutigen Diagnosen gestellt werden konnten, wies die Gruppe der Mäuse nach Expression des MLL-C-Proteins in fünf von acht Fällen enorme Gewebeveränderungen in hämatopoetischen Organen auf.

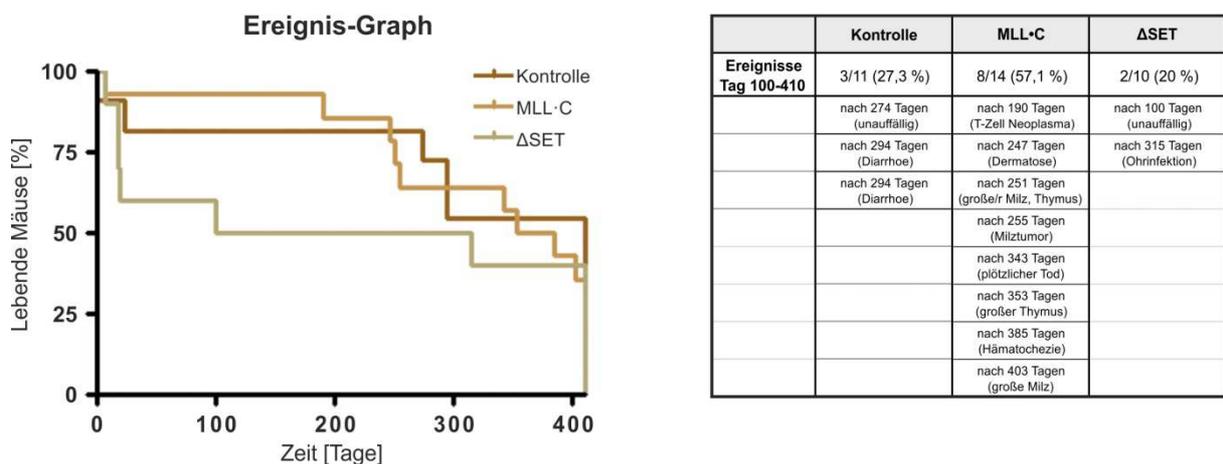


Abbildung 3.4.6: Analyse auftretender Ereignisse im MLL-C-Mausmodell

Links = Der Ereignis-Graph dokumentiert das Auftreten von Ereignissen (präfinale Merkmale oder Krankheiten die ein Leiden der Tiere hervorrufen) die zum Tod der Tiere führten. Rechts = Tabelle auftretender Ereignisse nach Gruppen der transplantierten Konstrukte. Gezeigt werden der Tag der Diagnose sowie deren Ergebnis.

Da besonders die Ereignisse mit Veränderungen hämatopoetischer Organe bei Mäusen mit MLL-C-transduzierten mHSPCs auffielen, wurden diese genauer charakterisiert. Die Abbildungen 3.4.7, 3.4.8 und 3.4.9 zeigen die Analyse von drei dieser Fälle. Um auftretende Krankheitsphänotypen auf die transplantierten mHSPCs beziehen zu können, wurde zunächst der Anteil an CD45.2⁺ Zellen im Knochenmark und den veränderten Geweben durchflusszytometrisch bestimmt. Da jedoch in den drei analysierten Fällen keine CD45.2⁺ Zellen identifiziert werden konnten und nur Zellen detektiert werden konnten, welche den hämatopoetischen Zelloberflächenmarker CD45.1 exprimierten, können die beobachteten Krankheitsbilder nicht eindeutig mit der Transplantation von MLL-C-transduzierten mHSPCs verbunden werden. Dennoch traten die Gewebeveränderungen exklusiv in der Gruppe dieser Mäuse auf. Die Abbildung 3.4.7 zeigt eine Vergrößerung von Leber, Milz und Thymus 251 Tage nach Transplantation. Die durchflusszytometrische Analyse zeigt vermehrt reife T-Lymphozyten (CD3⁺) sowie leicht vermehrte B-Lymphozyten im Knochenmark und in der Milz der Maus. Weiterhin konnten im Thymus der Maus ebenfalls vermehrt reife T-Lymphozyten (CD3⁺) beobachtet werden. Außerdem wurde eine Infiltration von Lymphozyten im Blutausschlag und dem Zytoplasten der Knochenmarkzellen beobachtet. Nach gängigen "Bethesda proposals for classification of lymphoid neoplasms in mice" konnte daher erneut ein T-Zell Neoplasma klassifiziert werden, welches aufgrund der vermehrten Lymphozyten im Blut Charakteristiken einer Leukämie aufweist. Auch die Maus mit präfinalen Merkmalen nach 255 Tagen (Abbildung 3.4.8) zeigte Veränderungen hämatopoetischer Gewebe. Hier konnte eine extreme Gewichtszunahme der Milz verzeichnet werden, welche durch die Bildung eines Tumors begünstigt wurde. Um die Zellen des Tumors separat zu untersuchen, wurde die durchflusszytometrische Analyse neben Zellen des Knochenmarks und der Milz (roter Teil Milz) auf Zellen des Milztumors (weißer Teil Milz) erweitert. Wie die Abbildung 3.4.8 zeigt, konnten vor allem im Knochenmark und in Zellen des Tumors ein erhöhter Anteil von 50-60 % myeloischer Zellen (Mac1⁺) identifiziert werden. Auch die Abbildungen der Zytoplasten von Knochenmark- und Milzzellen zeigten eine Infiltration von myeloischen Zellen. Ein erhöhtes Vorkommen an myeloischen Zellen (Mac1⁺) konnte ebenso in Knochenmarkzellen der Maus mit Krankheitssymptomen 353 Tage nach Transplantation beobachtet werden. Die Abbildung 3.4.9 B zeigt die durchflusszytometrische Analyse der Knochenmark- und Milzzellen. In Zellen der Milz wurde jedoch ein normaler Anteil an myeloischen Zellen beobachtet, während vermehrt B-Lymphozyten detektiert wurden. Nach gängigen "Bethesda proposals for classification of lymphoid neoplasms in mice" weisen diese Resultate auf ein Neoplasma mit eher biphenotypischem Ursprung hin. Generell zeigte die Milz keine auffälligen phänotypischen Veränderungen. Allerdings war der Thymus dieser Maus stark vergrößert.

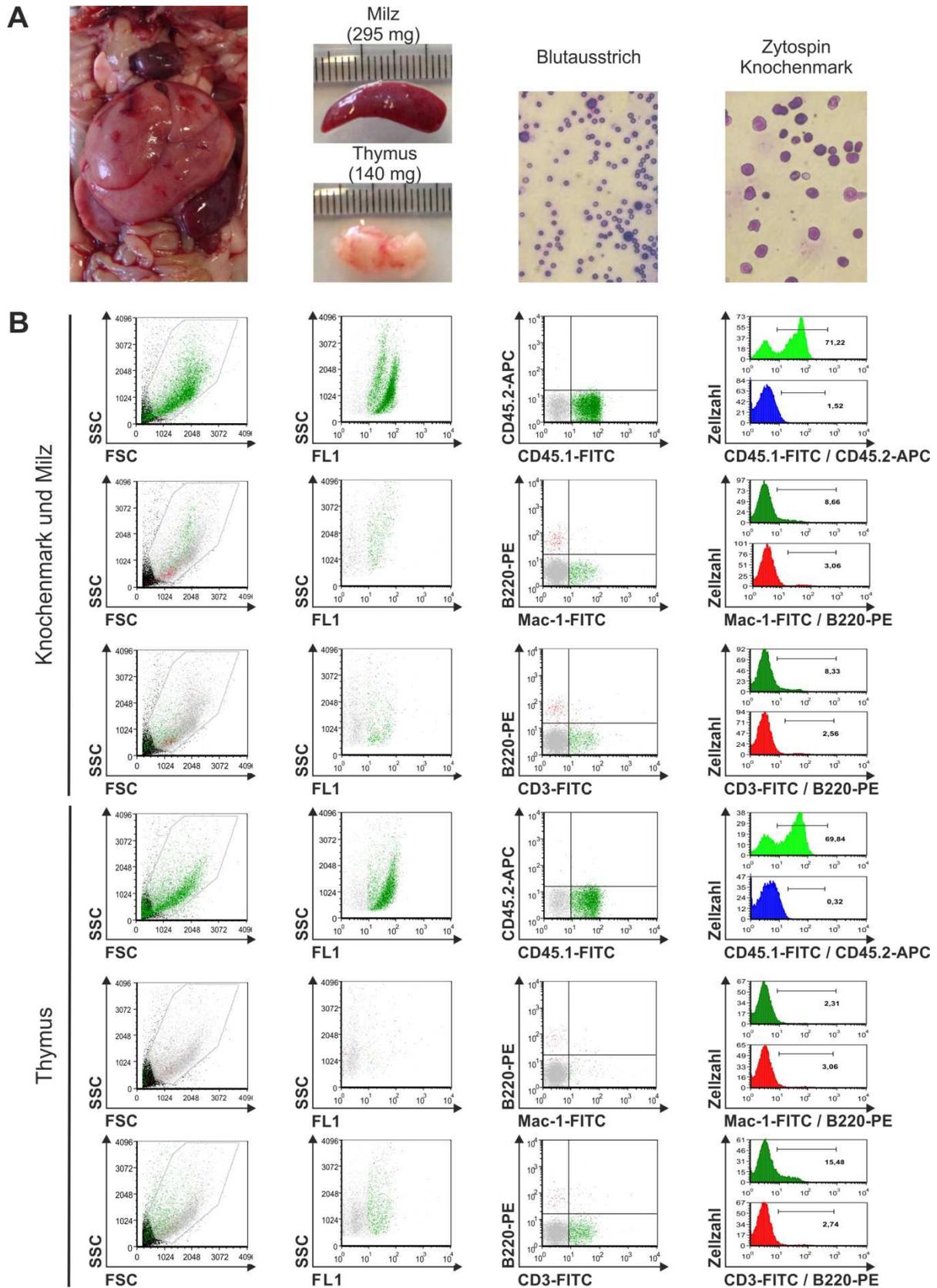


Abbildung 3.4.7: Krankheitsanalyse einer MLL-C-exprimierenden Maus nach 251 Tagen

A) Abbildungen aller Organe sowie des Blutausstrichs und des Zytospins von Knochenmarkzellen.

B) Durchflusszytometrische Analyse von Zellen des Knochenmarks, der Milz und des Thymus.

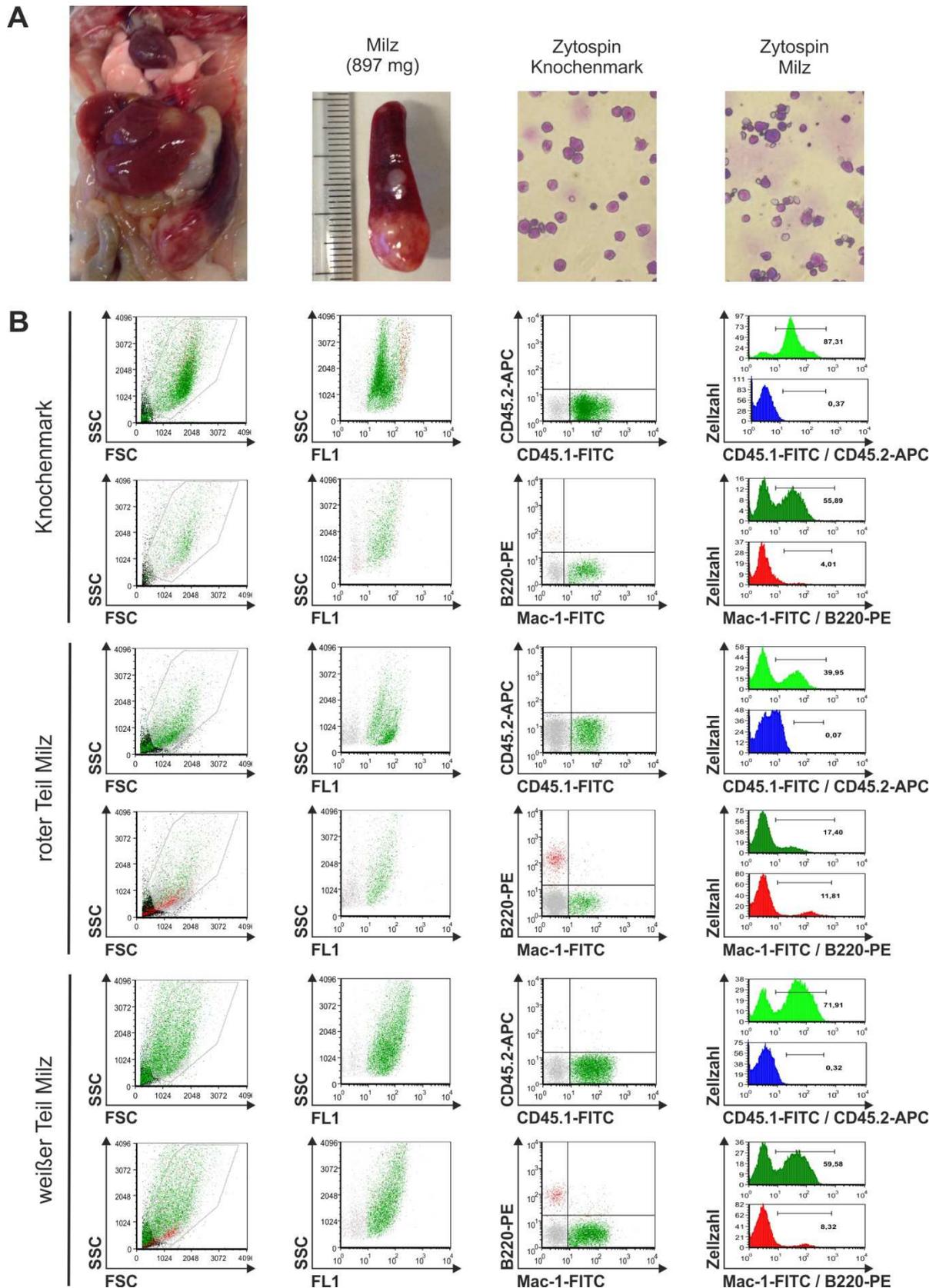


Abbildung 3.4.8: Krankheitsanalyse einer MLL-C-exprimierenden Maus nach 255 Tagen

A) Abbildungen aller Organe sowie der Zytospins von Knochenmark- und Milzzellen.

B) Durchflusszytometrische Analyse von Zellen des Knochenmarks und der Milz (weißer / roter Teil).

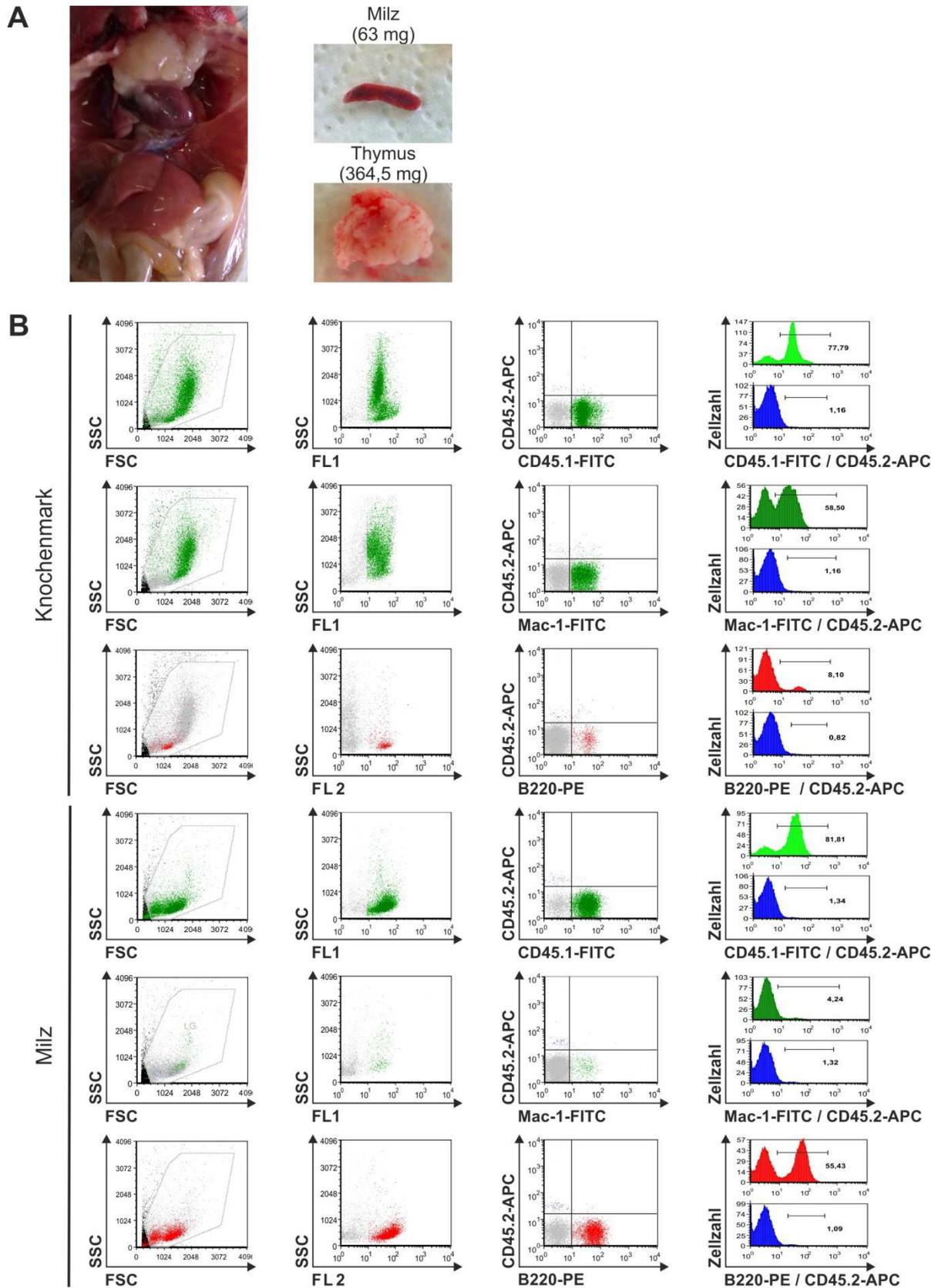


Abbildung 3.4.9: Krankheitsanalyse einer MLL-C-exprimierenden Maus nach 353 Tagen

A) Abbildungen aller Organe.

B) Durchflusszytometrische Analyse von Zellen des Knochenmarks und der Milz.

4 Diskussion

4.1 Expressionssysteme für große Fusionsproteine in humanen Zellen und Auswahl geeigneter Zelltypen und Mausmodelle

Die Erforschung des Pathomechanismus von Leukämien durch Tiermodelle ist ein essenzieller Bestandteil für die Behandlung und Heilung der Krankheit. Die Modelle klären Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Zellen im Organismus und decken intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden auf, welche für die Initiation und das Andauern der Erkrankung entscheidend sind. Außerdem finden etablierte Modelle Anwendung in Therapie-assoziierten Studien. Da Leukämien durch krankhafte Veränderungen hämatopoetischer Zellen hervorgerufen werden, sollten Tiermodelle bevorzugt werden, welche auf diese Zelltypen fokussiert sind. Während transgene Mäuse das künstlich eingeführte Gen sowohl in somatischen Zellen als auch in Keimbahnzellen tragen, können mit Transfektionsmethoden hämatopoetische Zellen unterschiedlichen Differenzierungsgrades verändert und anschließend transplantiert werden, wodurch auch Rückschlüsse auf den zellulären Ursprung der Erkrankung gezogen werden können.

Für die t(4;11)-assoziierte Leukämie ist die Etablierung von Transfektions-/Transplantations-Modellen jedoch problematisch. Die Fusionsproteine MLL•AF4 und AF4•MLL haben je nach Lage der Bruchpunkte der entsprechenden Gene eine Größe von 2100-2400 beziehungsweise 2800-3200 Aminosäuren. Diese enorme Größe beeinflusst die Wahl des effektivsten Expressionssystems dramatisch. Generell werden drei Gruppen von Transfektionsmethoden unterschieden. Klassische chemische Methoden verwenden kationische Polymere, Calciumphosphat oder kationische Lipide die über Komplexbildung und Endozytose zur Aufnahme der DNA führen. Physikalische Methoden bringen die DNA über Mikroinjektion, Elektroporation, Sonoporation, Laser-Bestrahlung, magnetische Nanopartikel oder durch Genkanonen in die Zielzellen ein (Kim und Eberwine, 2010). Bezüglich der Größe der einzubringenden DNA sind diese Methoden nicht limitiert, jedoch führen sie hauptsächlich zu einer transienten Expression. Da Tiermodelle je nach Latenzzeit die stabile Expression des eingeführten Gens über unbestimmte Zeit voraussetzen, sind diese Methoden meist unzureichend. Außerdem werden für Leukämie-Modelle hauptsächlich Stamm- und Vorläuferzellen genetisch verändert. Chemische Methoden zeigen hier Transfektionseffizienzen von <1 % sowie eine minimale Integration der eingeführten Gene. Deshalb finden höchstens physikalische Methoden wie Elektroporationen Anwendung, da sie ohne besondere Voraussetzungen durchzuführen sind (Peister *et al.*, 2004; Moore *et al.*, 2010), auch wenn hier oft hohe Viabilitätsverluste der Zellen verzeichnet werden und ein Einfluss auf die Induktion der Differenzierung nicht ausgeschlossen werden kann. Am

effektivsten sind jedoch biologische Methoden unter Verwendung viraler Systeme. Besonders simple Retroviren zeichnen sich, ebenso wie komplexe Retroviren, durch hohe Transduktionseffizienzen und hohe Integrationsraten aus, wodurch stabile Expressionssysteme resultieren. Allerdings können stabil integrierte Gene Insertionsmutagenesen hervorrufen und die Retroviren sind durch die Größe ihres Genoms auf maximal 7-12 kb der proviralen DNA limitiert (Zhang und Godbey, 2006). Wie die Abbildungen 3.1.1 und 3.3.5 zeigen, sind für die Fusionsgene *MLL•AF4* und *AF4•MLL* nur Größen proviraler DNA an der oberen Grenze dieses Limits oder darüber hinaus möglich, was zu erheblichen Verlusten der Verpackungs- und Transduktionseffizienz führt. Weiterhin sind dadurch klassische MOI-Bestimmungen über die Fluoreszenz nicht möglich und auch semiquantitative Beurteilungen der Transduktionseffizienz, welche gDNA-Kopien der Fusionsgene über Titrations-PCR-Experimente mit Plasmidkopien vergleichen, liefern keine Aussage über den Erfolg des Expressionssystems. Außerdem konnte diese Arbeit zeigen, dass es aufgrund der maximalen Auslastung des viralen Kapsids zu Splicevarianten des eingeführten Gens kommen kann. Viren mit größeren Genomen wie Adenoviren, die einen Austausch von bis zu 30 kb des 36 kb Genoms zulassen, wären an dieser Stelle optional. Da Adenoviren allerdings nicht zu einer Integration und somit zur stabilen Expression der eingeführten DNA führen, sowie weiterhin beispielsweise Lymphozyten nur schlecht infizieren (Zhang und Godbey, 2006), stellen sie zurzeit keine echte Alternative zu Retroviren dar. Hier könnte eine Kombination mit Methoden hilfreich sein, welche über Transposonelemente zur Integration von eingeführten Genen und stabilen Expressionen führen. Das "sleeping beauty"-System bedient sich dabei an einem Transposaseenzym, das von inversen Basenwiederholungselementen flankierte Gene zufällig in palindromische AT-Wiederholungen im Genom inseriert (Ivics *et al.*, 2004). Für Krebszellen sowie Stamm- und Vorläuferzellen konnten bereits erfolgreiche stabile Geninsertionen gezeigt werden (Sumiyoshi *et al.*, 2009; Hong *et al.*, 2014). Ob eine Kombination aus Einschleusung großer Fusionsgene über beispielsweise Adenoviren und anschließender Integration über Transposonsysteme effizient für hämatopoetische Zellen ist, bleibt jedoch weiter zu untersuchen. Aktuell scheinen hier retrovirale Systeme mit geringen Transduktionseffizienzen, gefolgt von Elektroporationen mit unerwünschten Wirkungen auf die Zelle und geringer Integration, die dennoch effektivsten Expressionssysteme hämatopoetischer Zellen.

Weiterhin ist die Frage nach der Auswahl eines geeigneten Zelltyps im Leukämie-Modell essenziell, da die Expression der Fusionsproteine vermutlich nur in Zellen entsprechenden Ursprungs den humanen Phänotyp der Erkrankung korrekt imitiert. Für die t(4;11)-assoziierte Leukämie liegt der Ursprung der Erkrankung *in utero*. Da die Leukämie eine maligne Erkrankung des blutbildenden Systems ist, scheinen frühe hämatopoetische Zellen als Ursprung naheliegend. Allerdings konnte das Fusionsprotein *MLL•AF4* auch in der DNA

mesenchymaler Stammzellen des Knochenmarks bei Patienten identifiziert werden, während andere Leukämie-assoziierte Fusionsproteine nicht gefunden wurden. Dies lässt auf einen zellulären Ursprung in prä-hämatopoetischen Vorläuferzellen schließen (Menendez *et al.*, 2009). Das Modell humaner embryonaler Blutzellbildung geht von einer Population multipotenter Stammzellen, den Hämangioblasten aus, welche im Mesoderm des Embryos zu hämatopoetischen und endothelialen Stammzellen differenzieren. Hämatopoetische Stammzellen besiedeln anschließend die fötale Leber, die Milz und schließlich das Knochenmark (Wang *et al.*, 2004; Cumano und Godin, 2007). Da t(4;11)-Zellen weiterhin von der AF4-induzierten Transkription des humanen Glycoproteins CD133 abhängig sind, welches auf hämatopoetischen und endothelialen Stammzellen exprimiert wird (Mak *et al.*, 2012), scheinen Hämangioblasten als zellulärer Ursprung wahrscheinlich. Für Tiermodelle verfügbare humane Zellen mit ähnlichem Ursprung sind pränatale embryonale Stammzellen (hESCs), die *in vitro* aus Embryonen bis zum Blastozystenstadium vermehrt wurden (Cortes *et al.*, 2009) sowie postnatale CD34⁺ hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen aus der fötalen Leber, aus Nabelschnurblut oder dem peripheren Blut über Apherese (Vodyanik *et al.*, 2005; Drake *et al.*, 2011). Für hESCs konnte bereits eine gering erhöhte Instabilität des *MLL*-Gens nach Exposition mit Etoposid im Vergleich zu CD34⁺ hHSPCs gezeigt werden (Bueno *et al.*, 2011). Weiterhin verstärkte die Expression von MLL•AF4 die endotheliale Spezifikation von hESCs (Bueno *et al.*, 2012). Für CD34⁺ hHSPCs konnte eine initiale Zunahme der Proliferation und des klonogenen Wachstums, gefolgt von einem Zellzyklusarrest nach Expression von MLL•AF4, in dieser Arbeit und von Montes *et al.* gezeigt werden. Die Expression von AF4•MLL in CD34⁺ hHSPCs zeigte dagegen im Vergleich flacher verlaufende Wachstumskurven aufgrund der vermehrten Apoptose, aber auch eine verstärkte Bildung von Leukozyten (Abbildungen 3.1.4, 3.1.5 und 3.1.6). Allerdings konnten für frühe humane hämatopoetische Zellen bisher keine Mausmodelle etabliert werden, wodurch die Frage des zellulären Ursprungs weiterhin auf hESCs und CD34⁺ hHSPCs, stellvertretend für Hämangioblasten, fixiert bleibt.

Die Problematik der bisher nicht erfolgreichen Etablierung eines humanen Mausmodells für die t(4;11)-assoziierte Leukämie könnte neben der Frage nach dem korrekten zellulären Ursprung auch in der Wahl eines geeigneten Mausmodells begründet sein. Bisher wurde aufgrund möglicher Abstoßungsreaktionen und schlechtem Engraftment xenotransplantierte Zellen der hochgradig immundefiziente Mausstamm NOD/LtSz-scid IL2 γ ⁻ als Empfängerorganismus gewählt. Dieser bildet keine reifen Lymphozyten und NK-Zellen und zeichnet sich durch ein generell schwaches Immunsystem aus, wodurch gute Transplantationsergebnisse erzielt werden können (Shultz *et al.*, 2005). Allerdings könnte ein schwaches Immunsystem kontraproduktiv für die Imitation von Erkrankungen sein, welche sich wie Leukämien durch starke Interaktionen mit dem Immunsystem auszeichnen. Zur

Rekonstitution eines humanen Immunsystems in immundefizienten Mäusen können Transplantationen von humanen fötalen Thymus- und Leberzellen in Kombination mit humanen CD34⁺ hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen dienen (BLT-Mäuse = bone marrow/liver/thymus) (Lan *et al.*, 2006; Denton *et al.*, 2012). Andere Möglichkeiten ein dem Immunsystem ähnliches Milieu für transplantierte humane Zellen zu erzielen, kann durch die Expression humaner Zytokine sowie durch Idealisierung von Zell-Zell- oder Rezeptor-Liganden-Interaktionen im immundefizienten Mausstamm gelingen (Drake *et al.*, 2012). So führt die Expression der humanen Zytokine SCF, GM-CSF und IL3 zu erhöhter hämatopoetischer Rekonstitution nach Transplantation (NSG-SGM3-Mäuse) (Billerbeck *et al.*, 2011) und auch der knockin humaner Zytokin-Gene in murine analoge Gene zeichnete sich durch eine verbesserte Differenzierung transplantierte Zellen aus. Weiterhin zeigt die Expression humaner *MHC*-Gene verbesserte T-Zell Funktionen transplantierte Zellen und auch die Humanisierung von Genen, welche für murine Makrophagen Funktionen nötig sind, erhöhen die Effizienz erfolgreicher Xenograft-Mausmodelle (Drake *et al.*, 2012). Die Wahl eines solchen humanisierten Mausstamms könnte somit zur Etablierung eines Modells der t(4;11)-assoziierten Leukämie beitragen.

4.2 Zellbiologische Effekte der t(4;11)-assoziierten Fusionsproteine *in vitro*

Die Grundlagenforschung der humanen t(4;11)-assoziierten Leukämie bezieht sich in erster Linie auf Analysen der beiden resultierenden Fusionsproteine MLL•AF4 und AF4•MLL. Um Auswirkungen der Fusionen im Tiermodell verstehen zu können, ist die Analyse von zellbiologischen Effekten *in vitro* entscheidend. Da murine Systeme oft besser etabliert sind, werden sie häufig für erste Untersuchungen verwendet. Frühere *in vitro*-Studien an stabil MLL•AF4-exprimierenden, induzierbaren, murinen embryonalen Fibroblasten zeigten eine blockierte Proliferation der Zellen. Außerdem konnten anti-apoptotische Effekte über einen Arrest in der G0/G1-Phase des Zellzyklus nach Serumentzug beobachtet werden (Gaussmann *et al.*, 2007). In dieser Arbeit konnten diese anti-apoptotischen Effekte des MLL•AF4-Proteins in murinen 32D-Zellen nach IL3-Entzug bestätigt werden (Abbildung 3.3.4). Ein Einfluss der Fusionsproteine auf die Proliferation unter normalen Bedingungen konnte jedoch kaum beobachtet werden, da ein Zeitraum von drei Tagen für eine korrekte Aussage über das Proliferationsverhalten eher ungenügend ist. Im Gegensatz zu den Beobachtungen von Gaussmann *et al.* im murinen Zellsystem, führte die Expression von MLL•AF4 in CD34⁺ hHSPCs-CB initial zur Zunahme der Proliferation und des klonogenen Wachstums sowie ebenfalls zu höheren Überlebensraten (Montes *et al.*, 2011). Die

Untersuchungen an MLL•AF4-exprimierenden CD34⁺ hHSPCs-PB in dieser Arbeit konnten die initiale Zunahme der Proliferation bestätigen (Abbildungen 3.1.4). Allerdings wurde nach etwa fünfzig Tagen eine Stagnation dieses initialen Wachstums der Zellen beobachtet, was am nun eher geraden Verlauf der Wachstumskurve über die Trypanblau-Färbungen erkennbar war. In dieser Phase wurde im Zellzyklus-/Apoptose-Assay ein Arrest der Zellen während des Zellzyklus nachgewiesen (Abbildung 3.1.5). Somit scheint das MLL•AF4-Protein zwar zu einer Steigerung der Proliferation führen zu können, jedoch überwiegen anti-apoptotische Mechanismen wie die Blockierung des Zellzyklus durch das Fusionsprotein, wodurch die Proliferation blockiert wird. Aus diesem Grund können in zellbasierten Studien zur Proliferation von MLL•AF4-exprimierenden Zellen sowohl Wachstumssteigernde als auch -hemmende Effekte beobachtet werden. Zudem wurde in dieser Arbeit wie auch von Montes *et al.* keine Veränderung während der Differenzierung humaner hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen nach Expression von MLL•AF4 beobachtet (Abbildung 3.1.6). Die Arbeiten von Bueno *et al.* zeigten außerdem eine endotheliale Spezifikation humaner embryonaler Stammzellen nach Expression des Fusionsproteins. Somit scheint MLL•AF4 keinen Einfluss auf die hämatopoetische Differenzierung zu haben.

Das AF4•MLL-Protein hingegen führte zur vermehrten Bildung von Leukozyten, und genauer Granulozyten, im CFU-Assay (Abbildung 3.1.6). Somit scheint das reziproke Fusionsprotein einen Einfluss auf die Differenzierung von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen zu haben. Insgesamt wurde jedoch keine Zunahme des klonogenen Wachstums im Vergleich zu Zellen beobachtet, welche das MLL•AF4-Protein oder den Fluoreszenzmarker als Kontrolle exprimierten. Auch die Proliferation von AF4•MLL-exprimierenden Zellen scheint oftmals nur wenig verändert. So konnten in früheren *in vitro*-Studien an stabil AF4•MLL-exprimierenden, induzierbaren, murinen embryonalen Fibroblasten flacher verlaufende Wachstumskurven im Vergleich zu den Kurven der Kontrollen beobachtet werden. Die genauere Analyse des Wachstums von AF4•MLL-exprimierenden Zellen zeigte jedoch eine erhöhte Apoptoserate, aber auch einen verstärkten Metabolismus der Zellen (Gaussmann *et al.*, 2007). In Analysen dieser Arbeit konnte die Steigerung der Apoptose und auch der vermehrte Metabolismus der CD34⁺ hHSPCs-PB nach Expression des reziproken Fusionsproteins bestätigt werden (Abbildungen 3.1.4, 3.1.5). Durch diese Effekte scheint das AF4•MLL-Protein kaum Einfluss auf die Proliferation der Zellen zu haben, da bei den rasch wachsenden Zellen mit einem hohen Metabolismus zügig der programmierte Zelltod eintritt. Da jedoch weiterhin in murinen zellbasierten Systemen der Verlust der Kontaktinhibition und die Wachstumstransformation von Zellen nach Expression von AF4•MLL beobachtet werden konnte, scheint das reziproke Fusionsprotein über onkogenes Potenzial zu verfügen (Bursen *et al.*, 2004).

4.3 Die Relevanz von RAS-Mutationen in t(4;11)-assoziierten Leukämien

Onkogene Mutationen des GTPase-Gens *RAS* können bei ~25 % aller Krebserkrankungen identifiziert werden und kommen häufig bei hämatopoetischen Krankheiten vor. Besonders *K-* und *NRAS*-Mutationen der Codons 12, 13 und 61 sind mit der Stimulus-unabhängigen Aktivierung des RAS/RAF/MEK/ERK-Signalwegs und einhergehender maligner Proliferation sowie erhöhten Überlebensraten assoziiert. So können transgene Mausmodelle einer *K-* beziehungsweise *NRAS* G12D Mutation zu erhöhter Myeloproliferation führen. Bei allen Leukämienarten werden mehr *NRAS*-Mutationen im Vergleich zu *KRAS*-Mutationen beobachtet (Ward *et al.*, 2012), da *NRAS*-Mutationen hauptsächlich bei hämatopoetischen Erkrankungen und *KRAS*-Mutationen hauptsächlich bei epithelialen Erkrankungen auftreten (Schubbert *et al.*, 2007). Kindliche ALLs mit genetischer Veränderung des *MLL*-Gens stellen jedoch eine Ausnahme dar, da hier ~40 % *KRAS*-Mutationen und ~10 % *NRAS*-Mutationen auftreten (Liang *et al.*, 2006). Auch die häufigste *MLL*-Translokation bei Säuglingen t(4;11) zeichnet sich durch das Auftreten von *RAS*-Mutationen bei durchschnittlich 26 % der Patienten aus (Driessen *et al.*, 2013; Prelle *et al.*, 2013 / diese Arbeit; Barbosa *et al.*, 2014). Eine genauere Auswertung der Daten zeigt, dass mehr als zwei Drittel der Patienten eine *KRAS*-Mutation der Codons 12 und 13 trägt und dass besonders G12-Aminosäureveränderungen mit einem geringen Alter und hohen Leukozytenzahlen bei Diagnose assoziiert sind (Abbildung 4.1).

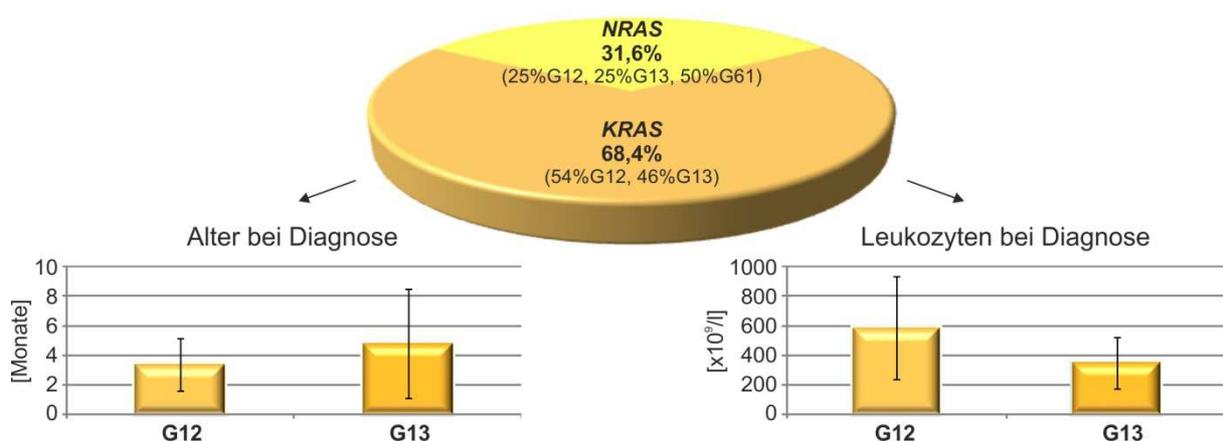


Abbildung 4.1: RAS-Mutationen bei Säuglingen mit einer t(4;11)-assoziierten Leukämie

Häufigkeiten von *K-* und *NRAS*-Mutationen bei Säuglingen mit einer t(4;11)-Leukämie und Auswertung des Alters und der Leukozytenzahl bei Diagnose in Abhängigkeit von der Art der *KRAS*-Mutation (Abbildung mit Daten von Driessen *et al.*, 2013; Prelle *et al.*, 2013 / diese Arbeit; Barbosa *et al.*, 2014).

Die vermehrte Diagnose von *KRAS*-Mutationen bei kindlichen t(4;11)-ALLs könnte mit dem zellulären Ursprung der Erkrankung verbunden sein (Kapitel 4.1). Da die Leukämie *in utero* vermutlich in Hämangioblasten entsteht, könnten zusätzliche eher endothelial geprägte *KRAS*-Mutationen ein weiteres Indiz dieser Hypothese sein. Die sich während der Embryogenese oft teilenden Hämangioblasten könnten, ausgelöst durch den Translokations-initiiierenden Stimulus, weitere Mutationen aquirieren. Allerdings kann innerhalb der Gruppe identifizierter *KRAS*-Mutationen keine besondere Frequenz einer bestimmten Mutation beobachtet werden. So kommen G12- und G13-Aminosäureveränderungen zu etwa gleichen Anteilen vor und auch die resultierende Aminosäure ist variabel (Abbildungen 3.2.2 und 4.1). Auch wenn G12-Mutationen mit einem geringeren Alter und höheren Leukozytenzahlen assoziiert und für die Leukämogenese fördernd sind, da die intrinsische GTPase Aktivität von G13-Mutanten eher der Wildtyp-Form ähnelt (Chen *et al.*, 2013), stellt diese Mutation kein besonderes Merkmal der t(4;11)-Leukämie dar. Daher scheinen zwar Mutationen im *KRAS*-Gen typisch für die t(4;11)-assoziierte Leukämie, jedoch ist die Ausprägung der Mutation eher willkürlich.

Weiterhin kann das mutierte *RAS*-Allel bei einem Rezidiv meist nicht mehr diagnostiziert werden (Abbildung 3.2.2; Barbosa *et al.*, 2014). Die Begründung könnte in der Funktion des MLL•AF4-Fusionsproteins zu finden sein. Dessen Expression führte *in vitro* zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors Elk-1, welcher über den RAS/RAF/MEK/ERK-Signalweg beeinflusst wird. Nach Inhibition der Kinase MEK konnte die Elk-1-Aktivierung aufgehoben werden und auch eine Inhibition der MLL•AF4-Expression in t(4;11)-Zelllinien führte zu einem reduzierten Phosphorylierungsstatus von MEK (Ng *et al.*, 2010). Weiterhin erhöhte die Expression von MLL•AF4 die Transkription des Kinase-Gens *EphA7*. Die Expression der Kinase führte zu einem gesteigerten Phosphorylierungsstatus von ERK, dessen Blockierung in t(4;11)-Zelllinien außerdem zu Apoptose führte (Nakanishi *et al.*, 2007). Somit scheint die Expression von MLL•AF4 den RAS/RAF/MEK/ERK-Signalweg zu aktivieren, wodurch die initiale Proliferation von humanen Zellen nach Expression des Fusionsproteins begründet werden kann (Montes *et al.*, 2011; Abbildung 3.1.4). Allerdings konnte in dieser Arbeit auch eine Stagnation der Proliferation nach längerer Wachstumsphase durch einen Zellzyklusarrest gezeigt werden, und auch in murinen Systemen wurde bereits ein gehemmtes Wachstum nach Expression von MLL•AF4 beobachtet (Gaussmann *et al.*, 2007). Dieser Effekt scheint mit anti-apoptischen Auswirkungen der Expression von MLL•AF4 zu korrelieren. So wird unter Expression des Fusionsproteins der Zellzyklus auch nach Entzug von Seren oder anderen essenziellen Wachstumsstimulanzien, nach Induktion der Apoptose mit TNF α und nach Behandlung mit bestimmten Arzneimitteln oder auch Koffein blockiert. Durch das Auftreten von *RAS*-Mutationen kann der MLL•AF4-assoziierte aktive RAS/RAF/MEK/ERK-Signalweg stabilisiert

werden, wodurch die anti-apoptischen Effekte, wie die Blockierung des Zellzyklus, gehemmt werden. So kann es zwar zu einem schnelleren Ausbruch der Erkrankung, jedoch auch zu einer besseren Therapierbarkeit kommen, wodurch nur wenige *RAS*-Mutationen bei einem Rezidiv diagnostiziert werden.

Über die genannten Beobachtungen lassen sich weiterhin etablierte Mausmodelle für das Fusionsprotein MLL•AF4 deuten. Durch Aktivierung des RAS/RAF/MEK/ERK-Signalwegs kommt es zu erhöhter Proliferation der genetisch veränderten hämatopoetischen Zelle und zur Entstehung von hauptsächlich Lymphomen. Da über die Expression von MLL•AF4 die Differenzierung nicht beeinflusst wird (Kapitel 4.2), werden variable myeloproliferative Krankheiten diagnostiziert (Chen *et al.*, 2006; Metzler *et al.*, 2006; Krivtsov *et al.*, 2008; Tamai und Inokuchi, 2013), welche den Phänotypen von RAS-Modellen ähneln. Die Entstehung der Erkrankungen ist weiterhin mit langen Latenzzeiten verknüpft, was vermutlich durch die Stagnation der Proliferation begründet werden kann. Über die Kooperation von *RAS*-Mutationen kann das stagnierte Wachstum jedoch aufgehoben werden. So führte eine aktivierende *KRAS*-Mutation im MLL•AF10-assoziierten Xenograft-Mausmodell zum Ausbruch einer Leukämie nach acht Wochen, während beide Mutationen allein keinen Krankheitsphänotyp induzieren konnten (Moriya *et al.*, 2012). Eine aktivierende *KRAS*-Mutation im transgenen MLL•AF4-Mausmodell verkürzte die Latenzzeit der Lymphomentwicklung weiterhin von zwölf auf fünf Monate, während die *KRAS*-Mutation allein nicht zu einer Erkrankung führte (Tamai *et al.*, 2011).

Zusammengefasst scheinen *RAS*-Mutationen besonders während der Translokation *in utero* im Hämangioblasten aufzutreten, weshalb hauptsächlich *KRAS*-Mutationen bei kindlichen t(4;11)-Patienten vorkommen. Da die Mutation nicht essenziell für die Leukämogenese der Erkrankung ist, werden variable Formen der *KRAS*-Mutationen von G12- und G13-Aminosäureveränderungen sowie einige *NRAS*-Mutationen detektiert. Dennoch führt die Kooperation von *RAS*-Mutationen mit der Expression der Fusionsproteine zu einem rascheren Ausbruch der Erkrankung und zu extrem hohen Leukozytenzahlen im Blut bei Diagnose. Dies könnte durch die Stabilisierung des MLL•AF4-assoziierten aktiven RAS/RAF/MEK/ERK-Signalweg begründet sein. Allerdings wird so auch der anti-apoptische Effekt des MLL•AF4-Proteins gehemmt, wodurch die Erkrankung besser auf die Therapie anspricht und so weniger *RAS*-Mutationen bei Rezidiv diagnostiziert werden. Wurden die Klone mit einer *RAS*-Mutation durch die Therapie eliminiert, besteht das Rezidiv aus angereicherten Klonen, welche MLL•AF4-assoziierte anti-apoptische Effekte und dadurch Therapieresistenz zeigen. Für die Aufrechterhaltung der Erkrankung scheinen *RAS*-Mutationen daher entbehrlich. So könnte der Krankheitsphänotyp der t(4;11)-Hochrisiko-Leukämie entstehen. Diese Annahme ist jedoch zurzeit rein spekulativ und bedarf weiterer Untersuchungen.

4.4 Der FLT3-Signalweg in t(4;11)-assoziierten Leukämien

Onkogene Mutationen der Rezeptor-Tyrosinkinase *FLT3* kommen bei Kindern mit einer ALL hauptsächlich bei ~21-28 % der Patienten mit hyperdiploidem Karyotyp und bei ~16-18 % der Patienten mit genetischer Veränderung des *MLL*-Gens vor (Armstrong *et al.*, 2004; Taketani *et al.*, 2004; Brown *et al.*, 2005; Barbosa *et al.*, 2014). Für Säuglinge und Kleinkinder mit einer t(4;11)-ALL konnten jedoch keine (diese Arbeit) oder insgesamt sechs *FLT3*-Mutationen in drei Studien mit jeweils mehr als 130 Patienten dieser Altersgruppe identifiziert werden (Taketani *et al.*, 2004; Emerenciano *et al.*, 2008; Barbosa *et al.*, 2014). Die diagnostizierten Mutationen der Säuglinge mit einer t(4;11)-ALL sind in der Tyrosinkinasedomäne der Codons 835 und 836 lokalisiert und gehen mit geringem Alter von durchschnittlich drei Monaten und erhöhten Leukozytenzahlen bei Diagnose von durchschnittlich $550 \times 10^9/l$ einher. Allerdings kann kein eindeutiger Hinweis auf einen Einfluss auf die Prognose der Patienten in Abhängigkeit der zusätzlichen Mutation identifiziert werden (Taketani *et al.*, 2004; Emerenciano *et al.*, 2008; Barbosa *et al.*, 2014). Dennoch scheint der FLT3-abhängige Signalweg entscheidend mit der t(4;11)-Leukämie assoziiert, da in leukämischen Blasten von Patienten häufig eine hohe Expression der Wildtyp Tyrosinkinase sowie ein erhöhter FLT3-Phosphorylierungsstatus beobachtet wird. Besonders Patienten mit sehr hoher FLT3-Expression entwickeln früh ein Rezidiv und zeigen sehr schlechte Überlebensraten im Vergleich zu Patienten ohne genetische Veränderung des *MLL*-Gens (Stam *et al.*, 2007; Chillon *et al.*, 2012). Da vor allem t(4;11)-Zellen mit sehr hoher FLT3-Expression selektiv auf FLT3-Inhibitoren wie Midostaurin (PKC412) und Lestaurtinib (CEP-701) ansprechen, werden aktuelle Behandlungsprotokolle bereits um Lestaurtinib erweitert. Über die Inhibitoren wird der Phosphorylierungsstatus der Tyrosinkinase inhibiert und die Zellen gehen in Apoptose (Brown *et al.*, 2005; Stam *et al.*, 2007; Brown, 2013).

Auf molekularbiologischer Ebene konnte die Relevanz des aktiven FLT3-Signalwegs noch nicht vollständig aufgeklärt werden, da die Aktivierung der Tyrosinkinase besonders in Zellen mit einer t(4;11)-Translokation zu einer konträren Auswirkung zu führen scheint. In genetisch nicht veränderten hämatopoetischen Vorläuferzellen führt die Bindung des Liganden am FLT3-Rezeptor zu erhöhter Proliferation und dadurch zur Initiation der Differenzierung von Blutzellen. Ebenso ist der Signalweg durch die konstitutiven FLT3-Mutanten TKD und ITD aktiv, was hier zu einer enormen Proliferation und Differenzierung, sowie zur Entartung der Zellen führt (Kapitel 2.5.1). Bei t(4;11)-Zellen führt die Stimulation durch den Liganden jedoch zur Inhibition der Proliferation über einen Arrest in der G0/G1-Phase des Zellzyklus und zur Unterdrückung der Apoptose nach Bestrahlung oder Behandlung mit Chemotherapeutika. Im Gegensatz weisen Leukämiezellen ohne genetische Veränderung des *MLL*-Gens diese

Effekte nicht auf und zeigen die auch in genetisch nicht mutierten Zellen auftretende Zunahme der Proliferation (Furuichi *et al.*, 2007). Außerdem führt eine zusätzliche *TKD*-Mutation in *MLL*•*AF4*-exprimierenden murinen 32D, hESCs und *CD34*⁺ hHSPCs zur gesteigerten Unterdrückung der Apoptose sowie zu verringertem klonogenen Wachstum und zur Hemmung der Differenzierung in Blutzellen. Im Mausmodell führte die *FLT3*-Aktivierung in *MLL*•*AF4*-exprimierenden Zellen dementsprechend nicht Transformation und somit zu keiner Erkrankung der Tiere (Yamaguchi *et al.*, 2009; Bueno *et al.*, 2013; Montes *et al.*, 2013).

Ein aktiver *FLT3*-Signalweg scheint somit zu Quieszenz von *t(4;11)*-Zellen zu führen, da nach Bindung des Liganden die Proliferation abnimmt und die Apoptose über einen Arrest in der *G0/G1*-Phase des Zellzyklus inhibiert wird. So können die ruhenden Zellen schon vor Beginn der Therapie resistente Kolonien bilden, welche zu einem raschen Rezidiv der Hochrisiko-Leukämie führen. Da die Aktivierung des *FLT3*-Signalwegs über eine erhöhte Expression der Wildtyp Tyrosinkinase und Stimulation des Liganden gewährleistet werden kann, scheinen *TKD*-Mutationen überflüssig, was durch die extrem geringe Diagnoserate bei Patienten unterstützt wird. Weiterhin scheinen *ITD*-Mutationen sogar nachteilig während der *t(4;11)*-Leukämogenese, da sie die Aktivierung von Liganden-abhängigen Signalwegen an der Zelloberfläche blockieren. Diese Stimulation über Liganden ist jedoch sowohl für den Wildtyp *FLT3*-Signalweg als auch für weitere Zell-Zell-Interaktionen entscheidend (Choudhary *et al.*, 2009). Die Expression der Tyrosinkinase wird von den beiden *t(4;11)*-assoziierten Fusionsproteinen gewährleistet. So konnte das *FLT3*-Gen ebenso wie das *RUNX1*-Gen als *MLL*•*AF4*-Target ermittelt werden (Wilkinson *et al.*, 2013). Weiterhin scheint das *AF4*•*MLL*-Protein an *RUNX1* zu binden, wodurch ein aktiver Transkriptionsstatus über *H3K4*_{me3}-Signaturen des *PU.1*-Gens für eine aktive Expression von *FLT3* sorgt (Huang *et al.*, 2011; Koh *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2013). Die hoch exprimierte Tyrosinkinase kann so über Interaktionen mit Stromazellen des Knochenmarks und Bindung des Liganden aktiviert werden, wodurch es zu den beschriebenen quieszenten Effekten kommt (Furuichi *et al.*, 2007). So könnten weiterhin Beobachtungen gedeutet werden, die Chemoresistenz nach Interaktion von Zellen mit genetischer Veränderung des *MLL*-Gens und Zellen des Knochenmarks zeigen (Sison *et al.*, 2013). Da diese Interaktion essenziell für *t(4;11)*-Zellen scheint, werden aktuell Inhibitoren der Verbindung mit Stromazellen in Behandlungsprotokollen für die kindliche ALL diskutiert (Brown, 2013). Eine Inhibition des *FLT3*-Signalwegs könnte weiterhin die Quieszenz von *t(4;11)*-Zellen blockieren, was zu einer besseren Therapierbarkeit führen könnte. Da jedoch eine *FLT3*-Aktivierung in *t(4;11)*-Zellen lediglich die Quieszenz beeinflusst, muss auch die Suche nach einer Onkogen-gerichteten Therapie weiter verfolgt werden.

4.5 Koffein-abhängige Wachstumsinhibition von t(4;11)-Zellen

Der ATM/ATR-abhängige DNA-Reparaturmechanismus führt innerhalb seiner Funktion nach genotoxischem Stress zur Blockierung des Zellzyklus und zu Seneszenz. Da für verschiedene Krebserkrankungen und auch für Leukämiezellen mit genetischer Veränderung des *MLL*-Gens bereits eine Hemmung dieser Seneszenz durch Behandlung mit dem ATM/ATR-Inhibitor Koffein gezeigt werden konnte (Bartkova *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2008; Hazawa *et al.*, 2012; Takacova *et al.*, 2012), sollte der Effekt des Xanthins auf t(4;11)-Zellen in dieser Arbeit untersucht werden. Sowohl durch das Auftreten des therapieresistenten Rezidivs der Erkrankung als auch die ruhenden Eigenschaften der Zellen in verschiedenen Modellen lassen eine Relevanz dieser Mechanismen vermuten (Kapitel 2). Sowohl in t(4;11)-Zelllinien als auch in MLL•AF4- oder AF4•MLL-exprimierenden 32D-Zellen unter Gabe oder Entzug von IL3 konnte jedoch eine konzentrationsabhängige Wachstumsinhibition der Zellen nach Behandlung mit Koffein gezeigt werden (Abbildungen 3.3.1 und 3.3.4), welche auf einen Zellzyklusarrest zurückzuführen war. Weiterhin wurde die Inhibition der Proliferation nach Koffein-Gabe jedoch auch in untransduzierten 32D-Zellen beobachtet. Im Mausmodell konnte zudem ein stark gehemmtes Engraftment transplanteder Zellen beobachtet werden. Außerdem wurde ein G0/G1-Arrest auch in murinen Epidermiszellen und ALL-Zellen beobachtet (Hashimoto *et al.*, 2004; Erhardt *et al.*, 2013), weshalb der Koffein-abhängige Effekt nicht t(4;11)-spezifisch scheint. Weiterhin konnte in MLL•AF4-exprimierenden hESCs eine globale Hemmung des DNA-Reparaturmechanismus gezeigt werden (Bueno *et al.*, 2013), sodass ein Einfluss dieses Signalwegs eher unwahrscheinlich ist. Diese Hemmung scheint durch die Expression der t(4;11)-assoziierten Fusionsproteine begründet. Während in Zellen ohne genetische Veränderung des *MLL*-Gens nach Aktivierung des ATM/ATR-Reparaturmechanismus eine Serin516-Phosphorylierung von MLL zum S-Phase Arrest führt, kann in t(4;11)-Zellen keine Hemmung der Replikation beobachtet werden. Hier ist die Phosphorylierung von MLL•AF4 dominant gegenüber der des Wildtyps, wodurch eine weitere Aktivierung des Signalwegs und der S-Phase Arrest blockiert wird (Liu *et al.*, 2010). Da die ATM/ATR-abhängige Phosphorylierung von MLL•AF4 jedoch keinen Effekt auf die Proliferation zeigt, scheint die Inhibition der Kinasen durch Koffein ebenfalls irrelevant. Die Koffein-abhängige Wachstumsinhibition könnte eher auf die allgemeine Blockierung von cAMP-vermittelten Signaltransduktionen in Proteinkinase A-, MAP-Kinase- und PI3-Kinase-Signalwegen und / oder auf MLL•AF4-abhängige anti-apoptotische Effekte zurückzuführen sein. Somit scheint der DNA-Reparaturmechanismus bei der t(4;11)-Leukämie nicht aktiv zu sein und führt auch nicht zu den ruhenden Eigenschaften der Zellen, weshalb eine Behandlung mit Koffein keine entscheidenden Auswirkungen zeigt.

4.6 MLL-C-induzierte hämatopoetische Differenzierung

Das MLL-Protein wird in die stark konservierte Familie der Trithorax-Proteine eingeordnet, deren prominenteste Funktion die Regulation des Expressionsmusters von *HOX*-Genen über H3K4_{me3}-Signaturen der C-terminal gelegenen SET-Domäne ist. Neben der Realisierung eines korrekten Körperbauplans während der Embryonalentwicklung ist eine kontrollierte *HOX*-Genexpression entscheidend für die Hämatopoese (Kapitel 2.4.2). Während die Embryogenese bis zur Bildung des frühen Mesoderms nicht MLL-abhängig ist, kann ab dem Hämangioblastenstadium keine Differenzierung von Blutzellen bei MLL-Defizienz beobachtet werden (Ernst *et al.*, 2004). Dieser Effekt lässt sich auf eine reduzierte *HOX*-Genexpression zurückführen, wobei auch andere hämatopoetische Gene entscheidend beteiligt sind (Ono *et al.*, 2005; Artinger *et al.*, 2013). Bei Leukämien mit genetischer Veränderung des *MLL*-Gens kommt es durch die Expression der Fusionsproteine zu einer Konkurrenzsituation, wodurch das Wildtyp MLL-Protein in seiner Funktion eingeschränkt wird. Dadurch kommt es zu Störungen der *HOX*-Genexpression und der Blutbildung, welche mit der Leukämie assoziiert sind. Verschiedene MLL-Fusionen wie beispielsweise MLL•AF9 oder MLL•ENL erzeugen jedoch ein aberrantes *HOX*-Gen Expressionsmuster, dass zu einer raschen Proliferation der differentiell arretierten hämatopoetischen Zellen und zur Transformation führt (Ayton und Cleary, 2001; Faber *et al.*, 2009). Da Derivat 11-Proteine allerdings keine SET-Domäne aufweisen, unterliegt diese Aktivierung einem anderen Mechanismus, welcher vermutlich über die Interaktion des MLL N-Terminus mit MENIN1 erfolgt (Yokoyama *et al.*, 2004). Für die t(4;11)-assoziierte Leukämie scheint jedoch das Derivat 11 MLL•AF4 und eine verknüpfte *HOX*-Genexpression nicht zur Transformation zu führen (Kapitel 2.4.3, 2.4.4, 4.2). Das reziproke AF4•MLL hingegen zeigt onkogene Eigenschaften, da es in murinen Zellen zum Verlust der Kontaktinhibition und zu Wachstumstransformation führt (Bursen *et al.*, 2004). Allerdings konnte auch ein verstärkter Metabolismus, gekoppelt an erhöhte Apoptoseraten nach Expression von AF4•MLL in murinen und humanen Zellen gezeigt werden, was zu insgesamt flach verlaufenden Wachstumskurven führte (Gaussmann *et al.*, 2007; Abbildungen 3.1.4 und 3.1.5). Diese Beobachtung, dass bei den rasch wachsenden Zellen mit einem hohen Metabolismus zügig der programmierte Zelltod eintritt, könnte eventuell die geringere Anzahl an Blutzellen im Xenograft-Mausmodell sowie die geringeren Milzgewichte nach Expression von AF4•MLL dieser Arbeit begründen. Weiterhin konnte ein Einfluss auf die Differenzierung hämatopoetischer Zellen beobachtet werden, da nach Expression des Reziproks vermehrt Leukozyten gebildet wurden (Abbildung 3.1.6). Somit scheinen die proliferationsbeeinflussenden Eigenschaften des AF4•MLL-Proteins, also der verstärkte Metabolismus aber auch die erhöhte Apoptoserate, besonders während der hämatopoetischen Differenzierung entscheidend. Da AF4•MLL, durch die Bindung des AF4

N-Terminus an pTEFb, entscheidend an der Aktivierung zellulärer Transkription beteiligt ist, und durch den MLL C-Terminus Histonmethyltransferaseaktivität besitzt, werden in der Funktion des Fusionsproteins die Transkriptionsaktivierung, also auch ein verstärkter Metabolismus, mit der Kontrolle der Hämatopoese verknüpft. Daher könnte der korrekte humane t(4;11)-Phänotyp einer pro B-Zell ALL im Mausmodell von Bursen und Schwabe *et al.* durch die differenzierungsbeeinflussenden Eigenschaften des AF4•MLL resultieren. Aufgrund der schlechten Proliferation der Zellen könnte weiterhin die lange Latenzzeit erklärt werden. Dennoch wurden bisher keine genaueren Rückschlüsse auf eine Bedeutung der SET-Domäne im MLL C-Terminus und eine mögliche *HOX*-Genexpression oder Wirkung auf andere hämatopoetische Gene und damit verbundene Blutbildung gezogen.

Dass sogar die Expression des solitären MLL-C-Proteins einen Einfluss auf die Differenzierung hämatopoetischer Zellen hat, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden. Im Mausmodell führte die Expression des C-Terminus zu etwa doppelt so schweren Milzen im Vergleich zu den Kontrollen (Abbildung 3.4.2), was auf eine gesteigerte Hämatopoese schließen lässt. Außerdem konnte die Entwicklung verschiedener Neoplasien nach Expression von MLL-C beobachtet werden. Darunter ein T-Zell Neoplasma mit auftretender Hepatosplenomegalie (Abbildung 3.4.3), ein leukämisches Neoplasma mit Vergrößerungen von Leber, Milz und Thymus (Abbildung 3.4.7), ein Milztumor durch vermehrt myeloische Zellen (Abbildung 3.4.8) und eine Bildung stark vergrößerten Thymusgewebes mit eher biphänotypischem Ursprung (Abbildung 3.4.9). Weiterhin traten solch extreme Erkrankungen nicht bei Mäusen mit Fluoreszenzmarker-transduzierten mHSPCs und nicht bei Mäusen mit Δ SET-transduzierten mHSPCs auf. Da über das Δ SET-Konstrukt keine SET-Domäne exprimiert wird und das Protein keine Funktion als Histonmethyltransferase aufweist, müssen die beobachteten Effekte auf die Anwesenheit einer funktionellen SET-Domäne zurückzuführen sein. Essenziell für die Funktion als Histonmethyltransferase während der Hämatopoese ist jedoch die für das MLL-Protein charakteristische proteolytische Spaltung und Heterodimerisierung (Kapitel 2.4.2). Ohne Dimerisierung über die Interaktionsdomänen FYRN und FYRC kommt es zur Degradation der Fragmente und zum Phänotyp eines MLL-knockout. Die Störung der Interaktion kommt vor allem bei Veränderungen in der Struktur der PHD-Finger des *MLL* vor, wie bei der selten vorkommenden Deletion des Exon 11, wodurch ein Teil des PHD1 zerstört wird. Die Deletion führt zur Hemmung der *HOX*-Genexpression und der Hämatopoese sowie bei Patienten zu einer schlechten Prognose (Yokoyama *et al.*, 2011). Weiterhin konnte bei t(4;11)-Patienten ein hohes Rezidivrisiko mit einem Bruchpunkt im Intron 11 assoziiert werden, während Patienten mit Bruchpunkten im Intron 9 in Gruppen mit geringerem Risiko eingestuft wurden (Emerenciano *et al.*, 2013). Diese Beobachtung hängt ebenfalls mit Veränderungen der PHD-Finger und beeinflusster *HOX*-Genexpression über Methylierungen der SET-Domäne zusammen. So werden Säuglinge und Kleinkinder mit

einer t(4;11)-Leukämie in eine Gruppe mit erhöhter *HOX*-Genexpression und geringem Rezidivrisiko sowie in eine Gruppe ohne *HOX*-Genexpression und hohem Rezidivrisiko eingeordnet (Stam *et al.*, 2010). Weiterhin kommen niedrige *HOX*-Genexpressionen vermehrt bei Säuglingen mit einem Bruchpunkt im Intron 11 vor, während hohe *HOX*-Genexpressionen hauptsächlich bei älteren Kindern mit einem Bruchpunkt im Intron 9 vorkommen (Trentin *et al.*, 2009). Im Mausmodell dieser Arbeit wurden MLL-C-Konstrukte ab dem Exon 13 verwendet. Hier scheint kein Einfluss der PHD-Finger auf die Funktion des MLL-C als Histonmethyltransferase erkennbar, sodass vermutlich eine Interaktion der Fragmente über FYRN und FYRC möglich war, die zu den hämatopoetischen Phänotypen im Modell führten. Unter realen Bedingungen wird der MLL C-Terminus jedoch während der Transkription inhibiert, da die 3'UTR des *MLL*-Gens stark mit der RNA-Polymerase II interagiert, wodurch die Transkription verzögert wird (Gomez-Benito *et al.*, 2011). Da AF4 und genauer der N-Terminus, welcher auch im Fusionsprotein AF4•MLL exprimiert wird, zu Initiation und Elongation der Transkription durch Bindung an pTEFb führt, könnte diese 3'UTR-abhängige Inhibition jedoch bei der reziproken t(4;11)-Leukämie irrelevant sein. Weiterhin bleibt zu klären, in wieweit sich die Fusion des AF4 N-Terminus und besonders der Bruchpunkt auf eine mögliche *HOX*-Genexpression über den MLL C-Terminus auswirkt, da in einem System induzierbarer AF4•MLL-exprimierender muriner embryonaler Fibroblasten bisher keine Aktivierung von *HOX*-Genen gezeigt werden konnte (Gaussmann *et al.*, 2007). Dennoch könnte ein spezifisches *HOX*-Gen Expressionsmuster besonders in frühen hämatopoetischen Zellen die Differenzierung von Leukozyten beeinflussen.

Ein zusätzlicher Mechanismus zur Regulierung der Differenzierung hämatopoetischer Zellen über den MLL C-Terminus erfolgt über die Bindung an den Transkriptionsfaktor RUNX1. Dieser ist für die Hämatopoese essenziell und führt bei embryonal lethaler Defizienz zur Blockierung der Blutbildung in der fötalen Leber (Okuda *et al.*, 1996). Während der Hämatopoese reguliert RUNX1 Gene wie *GM-CSF*-, *CSF-1 Rezeptor*-, *Myeloperoxidase*-, *neutrophile Elastase*- und *T-Zell Antigen Rezeptor*-Gene (Okuda *et al.*, 2001). Bei AML-Patienten kommen häufig Punktmutationen oder Translokationen des *RUNX1*-Gens vor, wobei bei ALL-Patienten eine Überexpression des Wildtyp Proteins mit dem transformierenden Potenzial assoziiert ist (Blyth *et al.*, 2005 und 2009). Da der C-Terminus des MLL-Proteins über Interaktionspotenzial mit RUNX1 verfügt und auch das AF4•MLL-Protein über den C-terminalen MLL-Teil an RUNX1 zu binden scheint (Wilkinson *et al.*, 2013), könnte diese Interaktion ebenfalls zu den differenzierungsbeeinflussenden Eigenschaften des Reziproks beitragen. Die Hypothesen einer Relevanz des MLL C-Terminus für die hämatopoetische Differenzierung sind zurzeit jedoch rein spekulativ und bedürfen weiterer Forschung. Vor allem, da im MLL-C-Mausmodell dieser Arbeit kein Rückschluss der beobachteten Phänotypen auf die Expression des MLL-C in transplantierten Zellen gezogen

werden konnte. In den meisten Fällen wurden trotz der Erkrankungen keine genetisch veränderten Zellen identifiziert, was die gedankliche Reflexion über alternative Mechanismen verlangt.

Auch in Betracht der erhöhten Apoptoseraten von Zellen nach Expression von AF4•MLL sowie der verstärkten Transkription über den AF4 N-Terminus sollte eine Kommunikation zwischen Zellen über intraluminale Vesikel nicht ausgeschlossen werden. Dabei können Exosomen mit einer Größe von 40-100 nm und Mikro-Vesikel mit einer Größe von 100-1000 nm den Austausch von Proteinen aber auch Nukleinsäuren wie mRNAs und miRNAs über Exozytose gewährleisten (Valadi *et al.*, 2007; Simons und Raposo, 2009). Besonders mesenchymale Stammzellen nutzen Exosomen zur Programmierung umliegender Zellen, wodurch beispielsweise Heilungsprozesse initiiert werden (Lavoie und Rosu-Myles, 2013). Außerdem nutzen Krebszellen Exosomen, um von umliegenden Zellen des Immunsystems nicht als entartet erkannt und im Gegenteil eher gefördert zu werden (Gabriel *et al.*, 2013). Für Leukämien werden Exosomen aktuell stark diskutiert. Bisher konnten jedoch schon Exosomen für Zelloberflächenantigene wie CD33, CD34 und CD117 sowie Wachstumsfaktoren wie TGFβ1 in Seren von AML-Patienten identifiziert werden, welche die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen des Immunsystems verringern. Dadurch können immun-supprimierende Eigenschaften an umliegende Zellen gelangen und die entartete Zelle kann sich im Knochenmark einnisten (Whiteside, 2013). Der Austausch Leukämie-assoziiertes mRNAs über Exosomen kann in Kulturen von Leukämiezellen und Knochenmarkzellen eindrucksvoll beobachtet werden. Allerdings dienen Exosomen nicht nur der Umgestaltung des Milieus der Krebszelle, sondern auch der Verbreitung onkogener Transkripte was für *FLT3*-Mutationen gezeigt werden konnte (Huan *et al.*, 2013). Ob Exosomen auch mit der t(4;11)-Leukämie assoziiert sind und im MLL-C-Mausmodell dieser Arbeit zu den beobachteten Phänotypen führten, muss weiter untersucht werden. Allerdings ist diese Theorie ein weiteres Indiz für die essenzielle Notwendigkeit einer entsprechenden Umgebung des Immunsystems für die Funktion der Fusionsproteine MLL•AF4 und AF4•MLL.

4.7 Modell onkogener Transformationsprozesse der t(4;11)-assoziierten Leukämie

Leukämien treten in Deutschland bei ~12.000 Patienten pro Jahr auf und repräsentieren etwa 2,4 % aller diagnostizierten Krebsneuerkrankungen. Bei Kindern sind Leukämien mit 33,8 % jedoch die häufigste Krebsform, die vor allem mit dem Phänotyp einer ALL assoziiert ist (Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2013). Besonders im Säuglingsalter treten wiederholt Translokationen des

genetisch instabilen *MLL*-Gens auf, wobei die Translokation t(4;11) dominant vorkommt. Allerdings treten t(4;11)-assoziierte Leukämien auch sekundär nach Therapie mit beispielsweise Topoisomerase II-Inhibitoren bei älteren Patienten auf. Aufgrund dieser zweiten Patientengruppe wird die Ursache der Erkrankung auch bei der maternalen Aufnahme von angereicherten Flavonoiden während der Schwangerschaft, neben der allgemeinen Exposition genotoxischer Strahlung und Agenzien, vermutet (Strick *et al.*, 2000; Alexander *et al.*, 2001; Spector *et al.*, 2005). Als zellulärer Ursprung der t(4;11)-assoziierten Leukämie werden Hämangioblasten während der frühen Embryonalentwicklung angenommen. Diese bilden im Blastozystenstadium hämatopoetische und endotheliale Stammzellen (Kapitel 4.1). Leukämische Blasten der t(4;11)-Translokation sind durch ein Transkriptionsmuster charakterisiert, welches frühen hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen ähnelt (Kapitel 2.4.3). Da durch die Expression der Fusionsproteine MLL•AF4 und AF4•MLL eine Konkurrenzsituation zu den Proteinen MLL und AF4 entsteht, werden die Funktionen der Wildtyp Proteine gedrosselt. Veränderungen in der Funktion der Wildtyp Proteine der t(4;11)-Translokation und anderer genetischer Veränderungen des *MLL*-Gens werden gern diskutiert, um gemeinsame Mechanismen von *MLL*-Translokationen aufzudecken. Der Einfluss auf die *HOX*-Genexpression stellt dabei die *MLL*-assoziierte Modulation dar. Während die Funktion des Wildtyp *MLL*-Proteins durch die Translokation beeinflusst wurde, konnte für einige Derivat 11 Fusionen durch die Interaktion des *MLL* N-Terminus mit *MENIN1* die transkriptionelle Aktivierung von *MLL*-Targetgenen wie *HOX*-Genen gezeigt werden, die für die Transformation essenziell ist. Für die t(4;11)-assoziierte Leukämie scheint jedoch das Derivat 11 MLL•AF4 und eine verknüpfte *HOX*-Genexpression nicht zur Transformation zu führen (Kapitel 2.4.3, 2.4.4, 4.2), während der Einfluss von *HOX*-Gen Veränderungen in t(4;11)-Zellen generell diskutiert wird. Die Fusionspartnergen-assoziierte Modulation resultiert aus der gemeinsamen Verbindung der häufigsten Translokationspartner mit dem pTEFb/DOT1L-Transkriptionskomplex. So sorgen *MLL*-assoziierte Fusionsproteine dominant gegenüber der Funktion der Wildtyp Translokationspartnerproteine für veränderte H3K79_{me2/3}-Chromatinmuster und erhöhte Transkriptionslevel, was zur Transformation von betroffenen Zellen führt. Auch für die t(4;11)-Leukämie scheint die Assoziation von AF4 mit pTEFb und auch DOT1L einen wichtigen Mechanismus während der Leukämogenese darzustellen (Marschalek, 2010 und 2011; Somarville und Cleary, 2010; Slany, 2010; Smith *et al.*, 2011; Ballabio und Milne, 2012; Muntean und Hess, 2012; de Boer *et al.*, 2013).

Da jedoch jede Translokation mit genetischer Veränderung des *MLL*-Gens Unterschiede im Phänotyp der leukämischen Zellen, in der Umgestaltung von Signalwegen und in Therapie-assoziierten Charakteristika aufweist, sollten neben gemeinsamen besonders spezifische Mechanismen betrachtet werden. Deshalb ist die Analyse der Expression beider t(4;11)-assoziiierter Fusionsproteine MLL•AF4 und AF4•MLL *in vitro* und *in vivo* essenziell für die

Aufklärung der Leukämogenese. Durch die Ergebnisse verschiedener Studien in Kombination mit Resultaten dieser Arbeit lässt sich so für die t(4;11)-assoziierte Leukämie ein spezifisches Modell der Leukämogenese postulieren. Der augenfälligste Unterschied der t(4;11)-Leukämie zu anderen MLL-assoziierten Translokationen ist das *AF4*-Gen als Translokationspartner. Das Wildtyp *AF4*-Protein ist in seiner Funktion entscheidend an der Aktivierung der RNA-abhängigen transkriptionellen Initiation und Elongation beteiligt (Kapitel 2.4.2). In früheren *in vitro*-Studien konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Expression des *AF4* N-Terminus, welcher ebenfalls im reziproken Fusionsprotein *AF4•MLL* exprimiert wird, zu Wachstumstransformation von Zellen führt. Da die Expression und die Regulation des proteasomalen Abbaus des *AF4*-Proteins jedoch strikt über die beiden E3-Ubiquitin-Ligasen *SIAH1* und *SIAH2* reguliert wird, kann das *AF4*-Protein als Proto-Onkogen angesehen werden. Im Fall des *AF4•MLL*-Proteins konnte jedoch gezeigt werden, dass das reziproke Fusionsprotein aufgrund sterischer Gegebenheiten nicht proteasomal abgebaut wird und in der Zelle akkumuliert. Weiterhin konnte auch hier der Verlust der Kontaktinhibition und die Wachstumstransformation von Zellen beobachtet werden, wodurch dem *AF4•MLL*-Protein ein onkogenes Potenzial zugesprochen wird (Bursen *et al.*, 2004). Durch Analysen dieser Arbeit konnte die Ausprägung des onkogenen Potenzials von *AF4•MLL* besonders während der hämatopoetischen Differenzierung charakterisiert werden. Über die Expression des MLL C-Terminus und der konservierten SET-Domäne kommt es zur Aktivierung der hämatopoetischen Differenzierung, wodurch im Mausmodell verschiedene maligne Neoplasien resultieren. Die Zunahme der Hämatopoese könnte durch die Regulation von *HOX*-Genen über die SET-Domäne entstehen. Weiterhin interagiert der MLL C-Terminus mit dem Transkriptionsfaktor *RUNX1*, wodurch die Differenzierung zusätzlich beeinflusst wird (Kapitel 4.6). Da der C-terminale MLL-Teil auch durch das *AF4•MLL*-Protein exprimiert wird, könnten diese Mechanismen die Rolle des reziproken Fusionsproteins während der Hämatopoese definieren. So arretiert der frühe Hämangioblast nach der Translokation in der Entwicklung, weil besonders die Funktion des für die Hämatopoese entscheidenden Wildtyp MLL-Proteins durch die Expression der Fusionsproteine in seiner Funktion gedrosselt wird. Durch die Expression von *AF4•MLL* wird jedoch sowohl generell die Transkription gesteigert als auch bestimmte hämatopoetische Gene aktiviert. Dies führt verstärkt zur Bildung von Leukozyten *in vitro* (Kapitel 3.1.4), als auch zur Imitation des korrekten humanen Phänotyps einer pro B-ALL im Mausmodell (Bursen und Schwabe *et al.*, 2010). Die lange Latenzzeit dieses Modells kann weiterhin durch *in vitro*-Analysen erklärt werden. So zeigen *AF4•MLL*-exprimierende Zellen flacher verlaufende Wachstumskurven im Vergleich zu den Kurven der Kontrollen. Zwar wird durch das reziproke Fusionsprotein die Transkription, der Metabolismus und somit die Proliferation erhöht, jedoch tritt ebenso rasch der programmierte Zelltod auf (Kapitel 4.2), weshalb die Manifestation der Erkrankung im *AF4•MLL*-Modell einige Zeit benötigt.

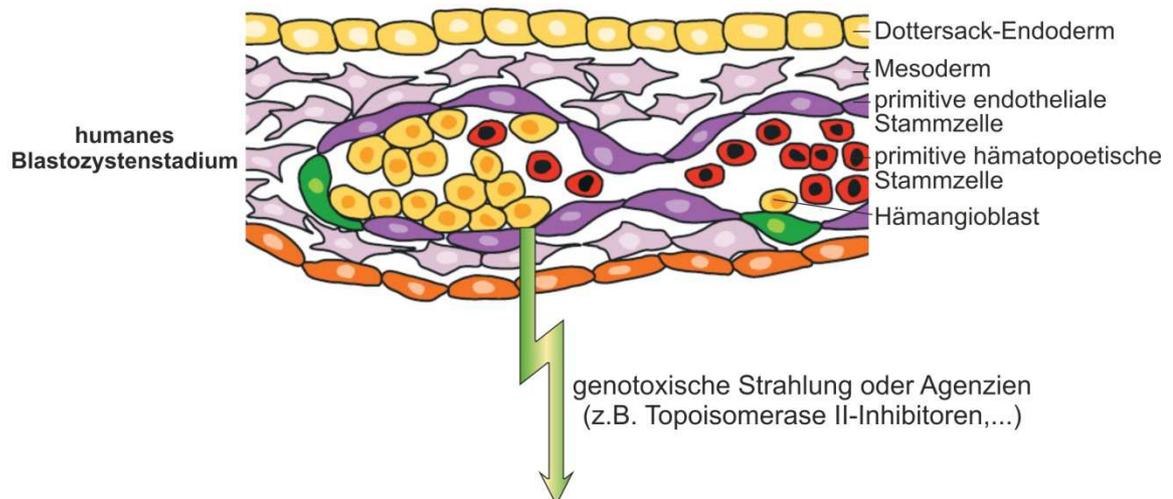
Das MLL•AF4-Protein hingegen zeigt *in vitro* eine deutliche Inhibition der Apoptose. Diese hängt vermutlich mit der Interaktion des MLL N-Terminus mit MENIN1 zusammen, wodurch Cycline und Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitoren aktiviert werden und es zum Arrest des Zellzyklus kommt (Milne *et al.*, 2005; Takeda *et al.*, 2006). Verschiedene Studien belegen niedrigere Apoptoseraten von MLL•AF4-exprimierenden Zellen nach längeren Wachstumsphasen, nach Entzug von Seren oder anderen essenziellen Wachstumsstimulanzen, nach Induktion der Apoptose mit TNF α und nach Behandlung mit bestimmten Arzneimitteln oder auch Koffein (Kapitel 2.4.3, 3.1.3, 3.3.2). Eine genaue Charakterisierung dieser Effekte ist aktuell noch offen, jedoch wird eine Beteiligung Calcium bindender Proteine der S100-Familie diskutiert. Diese Proteine sind bei der Entstehung zahlreicher Erkrankungen involviert (Marenholz *et al.*, 2004) und sind auch in t(4;11)-Leukämien beispielsweise nach Behandlung mit Prednisolon hochreguliert (Tamai *et al.*, 2011; Spijkers-Hagelstein *et al.*, 2012). Außerdem führt die Inhibition von S100A6 durch IL24 und durch die miRNA-205 zu erhöhter Apoptose, wodurch gleichzeitig die Relevanz der Regulierung von miRNAs bei der t(4;11)-Leukämie deutlich wird (Tamai *et al.*, 2012; Dou *et al.*, 2013). Wenn die anti-apoptotischen Effekte des MLL•AF4-Proteins in der t(4;11)-Leukämiezelle mit den aktivierenden Effekten des AF4•MLL-Proteins im Zuge der hämatopoetischen Differenzierung kooperieren, kann es so zum extrem frühen Ausbruch der Erkrankung im Säuglingsalter kommen. Zusätzlich kann eine weitere Funktion des MLL•AF4-Proteins den Ausbruch der Erkrankung beschleunigen. *In vitro*-Experimente zeigen, dass Zellen nach Expression von MLL•AF4 eine gesteigerte Proliferation zeigen können, wenn anti-apoptotische Mechanismen des Fusionsproteins inaktiv sind (Kapitel 4.3). Diese Zunahme der Proliferation resultiert vermutlich aus einer Aktivierung des RAS/RAF/MEK/ERK-Signalwegs. Werden durch den translokationsauslösenden Stimulus zusätzliche RAS-Mutationen im betroffenen Hämangioblasten aquiriert, wird der aktive Signalweg und damit die Proliferation stabilisiert. So kommt es zum heftigen Ausbruch der Erkrankung mit hohen Leukozytenzahlen während der ersten Lebensmonate. Hierbei ist der Grad der Aktivierung des Signalwegs für die Leukämogenese zwar unerheblich, jedoch verschlechtern sich die Überlebensraten der Patienten mit zunehmender Aktivität der RAS-Mutation wie beispielsweise einer G12-Aminosäureveränderung. Ohne zusätzliche RAS-Mutation hingegen, wird der RAS/RAF/MEK/ERK-Signalweg durch die anti-apoptotischen Effekte des MLL•AF4-Proteins inaktiviert oder überlagert, was eventuell auch die Quieszenz der t(4;11)-Zelle fördert.

Da die t(4;11)-assoziierte Leukämie als Hochrisiko-Leukämie klassifiziert wird, weil ein schnell auftretendes Rezidiv schlecht auf die Therapie anspricht, sind Mechanismen einer Quieszenz der entarteten Zellen wahrscheinlich. Für die Rezeptor-Tyrosinkinase FLT3 ist eine Beteiligung an diesen Mechanismen anzunehmen (Kapitel 4.4). In zellbasierten

Systemen konnte bereits gezeigt werden, dass die FLT3-Stimulation in t(4;11)-Zellen zur Hemmung der Proliferation führt. So wird aufgrund verschiedener Studien postuliert, dass der in Leukämiezellen überexprimierte Rezeptor durch den Liganden von Zellen des Knochenmarks stimuliert wird. Durch diese wichtige Interaktion zu umliegenden Zellen entwickeln die Leukämiezellen eine Resistenz gegenüber Therapien mit zytotoxischer Bestrahlung oder zytotoxischer Agenzien. Die Expression der Tyrosinkinase wird von den beiden t(4;11)-assoziierten Fusionsproteinen gewährleistet. So konnte das *FLT3*-Gen ebenso wie das *RUNX1*-Gen als MLL•AF4-Target ermittelt werden (Wilkinson *et al.*, 2013). Weiterhin scheint das AF4•MLL-Protein an RUNX1 zu binden, wodurch ein aktiver Transkriptionsstatus über H3K4_{me3}-Signaturen des *PU.1*-Gens für eine aktive Expression von FLT3 sorgt (Huang *et al.*, 2011; Koh *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2013).

Ein weiteres Indiz für die Bedeutung von Interaktionen der Leukämiezellen zu umliegenden Zellen könnte die Vermutung von t(4;11)-assoziierten Exosomen sein. Da Krebszellen häufig Exosomen nutzen, um von umliegenden Zellen des Immunsystems nicht als entartet erkannt und im Gegenteil eher gefördert zu werden (Gabriel *et al.*, 2013) oder auch um onkogene Transkripte zu verbreiten (Huan *et al.*, 2013), könnten Zell-Zell-Wechselwirkungen nützlich für die Manifestation der Erkrankung sein.

Somit können durch die Aufklärung der Leukämogenese in der Therapie der t(4;11)-assoziierten Leukämie zahlreiche Punkte angegriffen werden, wodurch Strategien zur Therapie und Heilung der Erkrankung intensiviert werden können. Da Translokationen mit genetischer Veränderung des *MLL*-Gens scheinbar über gemeinsame Mechanismen bei der Entstehung der Erkrankung verfügen, können Methyltransferase-Inhibitoren MLL-assoziierte Funktionen blockieren und spezifische DOT1L-Inhibitoren auch die Fusionspartner-assoziierte Chromatin-Modulation hemmen. Eine exaktere Möglichkeit der Inhibition der Fusionsproteine bietet jedoch die Regulation der Expression. So könnte beispielsweise die Akkumulation des Onkogens AF4•MLL in der Zelle verhindert werden. Da das reziproke Fusionsprotein sowohl die Schnittstellen der Taspase 1, als auch die Erkennungsmotive der E3-Ubiquitin-Ligasen SIAH1 und SIAH2 enthält, könnte sowohl die Hemmung der proteolytischen Spaltung als auch der Heterodimerisierung zum proteasomalen Abbau von AF4•MLL führen. Für das MLL•AF4-Protein scheint die Regulation der Expression allerdings nicht offensichtlich. Dennoch könnte die Inhibition der anti-apoptotischen Effekte des Fusionsproteins, beispielsweise durch die Hemmung der S100-Proteine, zu erhöhter Apoptose der Leukämiezellen führen. Ebenso könnte die Regulation des MLL•AF4-assoziierten RAS/RAF/MEK/ERK-Signalwegs die Therapierbarkeit verbessern und auch andere Signalwege wären als Angriffspunkte der Therapie möglich. So könnte die Hemmung der FLT3-Aktivierung über Blockierung von Zell-Zell-Interaktionen eine Therapieoption darstellen.



Modell der t(4;11)-assoziierten Leukämogenese

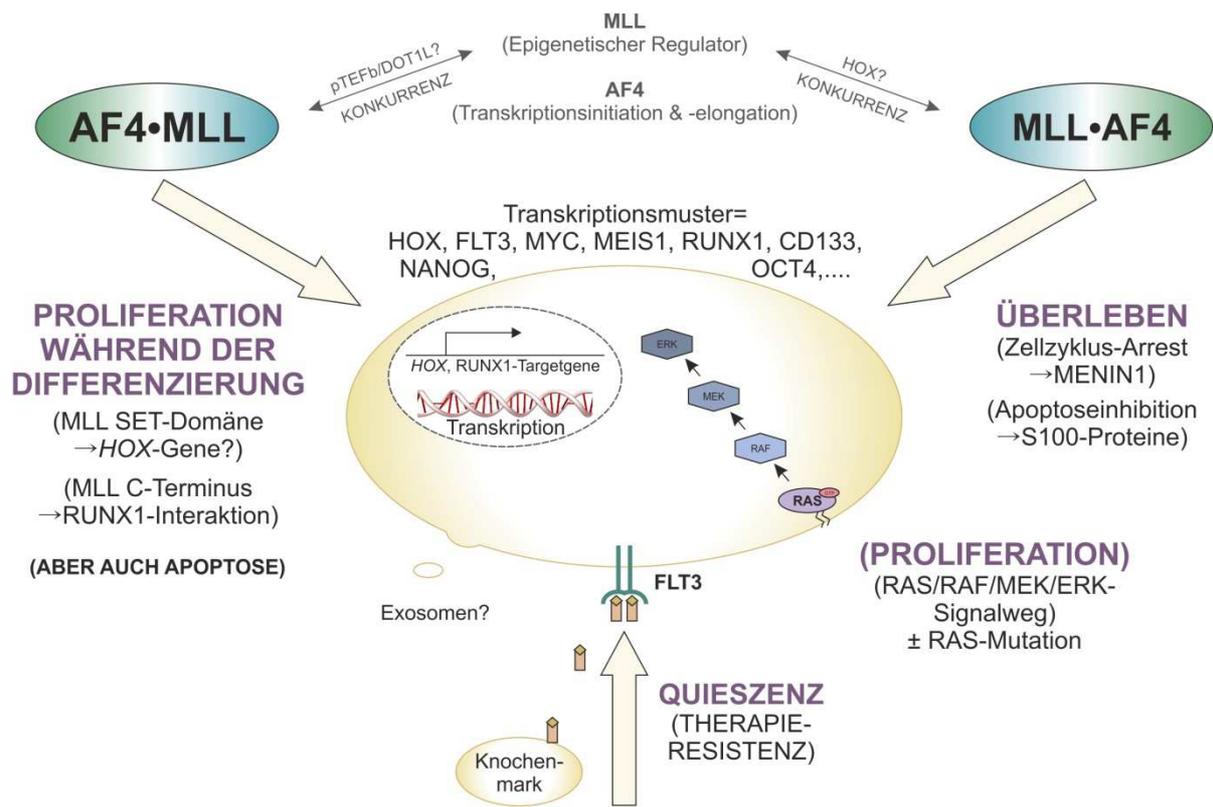


Abbildung 4.2: Modell onkogener Transformationsprozesse der t(4;11)-assoziierten Leukämie

Im Modell der t(4;11)-assoziierten Leukämogenese kooperiert die Funktion des reziproken AF4•MLL-Proteins bei der Proliferation während der Differenzierung mit den überlebensbeeinflussenden Eigenschaften des MLL•AF4-Proteins bei der Entstehung der t(4;11)-assoziierten Hochrisiko-Leukämie. Die Therapieresistenz der leukämischen Blasten entsteht durch die Liganden-abhängige Stimulation des FLT3-Rezeptors und dadurch ausgelöste Quieszenz. (Abbildung des Blastozystenstadiums modifiziert nach Cumano und Godin, 2007).

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Chemikalien, Geräte und ihre Bezugsquellen

Substanzen	Bezugsquelle
Agar	Sigma
Agarose	Invitrogen
Ampicillin	Roth
β -Mercaptoethanol	Roth
Bacto-Trypton	Difco
Betaisodona®-Lösung	MundiPharma
Bepanthen Augen- und Nasensalbe	Bayer Vital GmbH
BrdU (5-Bromo-2'-deoxyuridin)	Sigma
Bromphenolblau	Roth
BSA	Roth
Calciumchlorid	Merck
DMSO	Sigma
dNTPs	Peqlab
EDTA	Roth
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Sigma
Forene® Isofluran	Abbott
Glucose	Merck
Hefeextrakt	Difco
HEPES	Roth
Isopropanol	Roth
Kaliumacetat	Roth
Kaliumhydroxid	Roth
Kanamycin	Roth
Ketamin (Ketavet®) 10 % Injektionslösung	CEVA SANTE ANIMALE
Koffein	Sigma
λ -DNA (für DNA-Marker)	MBI Fermentas
Magnesiumchlorid	Merck
Magnesiumsulfat	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natriumhydrogenphosphat	Roth
Natriumhydroxid	Roth
Paraformaldehyd	Sigma
PEI (Polyethylenimin)	Sigma
PI (Propidiumjodid)	Sigma
Polybrene®	Sigma
Saccharose	Roth
Salzsäure (rauchend)	Roth
Tris	Roth

Triton-X 100
Tween-20
Xylen-Cyanol-FF
Xylazin (Rompun®) 2 % Injektionslösung

Sigma
Roth
Merck
Bayer HealthCare

Nährmedien und Zusatzstoffe

Blasticidin
DMEM (high und low Glucose)
FLT3-Ligand (human), rekombinant
Foetal Bovine Serum Gold (FBS)
G418
human Methylcellulose Base Media
Hyclone FBS
IL3 (human), rekombinant
IL3 (murin), rekombinant
IL6 (murin), rekombinant
Iscove's MDM
L-Glutamin 200mM
PBS (1x)
Penicillin/Streptomycin (10x)
Puromycin
RetroNectin®
RPMI 1640
SCF (human), rekombinant
SCF (murin), rekombinant
StemSpan™ H3000
Trypan Blue Stain
Trypsin/EDTA solution (10x)

Bezugsquelle

PAA
PAA
Peprotech
PAA
PAA
R & D Systems
Hyclone
Peprotech
Peprotech
Peprotech
PAA
PAA
PAA
PAA
PAA
Takara
PAA
Peprotech
Peprotech
StemCell
Sigma
PAA

Kits und Größenmarker

BD FACS™ Lysing Solution
Big Dye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit
Cell Counting Kit-8
DNeasy Blood & Tissue Kit
Gel Extraction Kit
HiDi™ Formamide
NucleoSpin RNA Virus-Kit
PCR Purification Kit
Pure Yield™ Plasmid Midiprep System
QIAquick® Gel Extraction Kit
Quant-X™ One-Step qRT-PCR SYBR® Kit
Retro-X™ qRT-PCR Titration Components Kit
RNeasy Mini Kit
100 bp DNA ladder

Bezugsquelle

BD
Applied Biosystems
Dojindo
Qiagen
Qiagen
Applied Biosystems
Macherey Nagel
Qiagen
Promega
Qiagen
Clontech
Clontech
Qiagen
NEB

1 kb DNA ladder
50 bp DNA ladder

NEB
NEB

Enzyme

Alkalische Phosphatase
DNase
Klenow Large Fragment
Lysozym
PCR Extender System
Taq Polymerase (und Puffer)
Restriktionsendonukleasen (und Puffer)
RNase
RNasin
Superskript™ Reverse Transkriptase
T4-DNA-Ligase (und Puffer)
T4-DNA-Quick Ligase (und Puffer)
T4-Polynukleotid-Kinase (und Puffer)

Bezugsquelle

NEB
Qiagen
NEB
Sigma
5 PRIME
Promega
NEB
Sigma
Promega
Invitrogen
NEB
NEB
NEB

Geräte

-20 °C-Gefrierschrank
-80 °C-Gefrierschrank
ABI Prism 310 Genetic Analyzer
ABI StepOnePlus™ Real-Time PCR System
Agarosegel-Elektrophoresekammer
Akku Jet
Animal Blood Counter ABX Vet Pack
Brutschränke HeraCell
Durchflusszytometer (CyFlow®ML, FACS Canto II, FACSVerse)
Eismaschine
Elisa-Reader MR5000
Elektroporator Gene Pulser™ (Bakterien)
Feinwaage TE124S-OCE
Fluoreszenz-Mikroskop Observer Z1
Gammabestrahlungsanlage-Biobeam 2000
Heizblock
Kühlschränke
MACS-Seperatoren Octomacs und Quadromacs
Mikroskop
Nanophotometer P330
Netzgerät/PS500XT DC Power Supply
Neubauer-Zählkammer
PCR-Geräte (GeneAmp PCR System 9700)
pH-Meter
Pipetten P10, P20, P100, P1000

Bezugsquelle

Liebherr
Heraerus
Applied Biosystems
Applied Biosystems
Owl Separation System
Braun
Scilvet
Thermo Scientific
Partec, BD
Ziegra
Dynatech
Bio-Rad
Sartorius
Zeiss
Gamma Service Medical
Liebisch
Liebherr
Miltenyi
Nikon
Implen
Hofer Scientific Instr.
Brand
Applied Biosystems
Inolab
Eppendorf

S2 Brutschrank HeraCell 150i	Thermo Scientific
S2 Sterilbank Maxisafe 2020	Thermo Scientific
S2 Zentrifuge Megafuge 16R	Thermo Scientific
Schüttelinkubator (Bakterien) CH4103	HT Infors
SterilGard Hood (LaminAir HB2472)	Heraeus
Thermoschüttler	Eppendorf
Tischzentrifugen (5415D, 5424, 5702, 5702R)	Eppendorf
Ultrazentrifuge L-70 (Rotor SW41Ti)	Beckmann
UV-Schirm (TFX-20M)	Life Technologies
Vortex-2 Genie	Scientific Industries
Wasserbäder	Julabo
Zellzähler TC10	BioRad
Zentrifuge J2-HS (Rotor JA 20)	Beckmann
Zentrifuge J6-HC Rotor JLA 10,5)	Beckmann
Zytospin-Zentrifuge (Cellspin I)	Tharmac

Verbrauchsmaterialien

ARGENTRIX® Einmal-Höllenstein-Ätzstift
 Cell-Strainer 100 µm Nylon
 Cryo-Röhrchen
 Doppel-Cellfunnel (Einweg)
 EDTA-Röhrchen
 FACS-Röhrchen
 Falcons (15 ml und 50 ml)
 Gewebekulturschalen ø15 cm
 ø10 cm
 6-well
 12-well
 24-well
 24-well (Mit humanem
 Fibronektin beschichtet)
 96-well
 Kanülen Sterican 0,55 x 25 mm 24G
 MACS® Cell Separation Columns MS und LS
 Nitril-Einweghandschuhe
 Objektträger
 PCR-Gefäße
 Petrischalen
 Pipetten (Steril; 2, 5, 10 und 25 ml)
 Pipettenspitzen (20, 200 und 1000 µl)
 Polypropylenröhrchen 5 ml
 Reaktionsgefäße 1,5 ml
 Sequenziergefäße
 Sterilfilter 0,45 und 0,2 µm
 Tuberkulin-Spritzen Omnifix-F 25G
 Ultrazentrifugen-Röhrchen Thinwall,
 Ultra-Clear™, 13.2 ml, 14 x 89 mm
 Zählkammern TC10
 Zellkulturflaschen 50 ml

Bezugsquelle

Höllenstein
 BD
 Greiner bio-one
 Tharmac
 Sarstedt
 Sarstedt
 Greiner bio-one
 Greiner bio-one
 Sarstedt
 Greiner bio-one
 Thermo Scientific
 Greiner bio-one
 BD
 Greiner bio-one
 Braun
 Miltenyi
 VWR
 VWR
 Greiner bio-one
 Greiner bio-one
 Corning
 Greiner bio-one
 Greiner bio-one
 Eppendorf
 Applied Biosystems
 Sarstedt
 Braun
 Beckmann
 BioRad
 Greiner bio-one

5.1.2 Pufferlösungen und Medien

Pufferlösung

Calciumchlorid-Transformationspuffer

Zusammensetzung

10 mM Tris
10 mM CaCl₂
10 mM MgCl₂

DNA-Ladepuffer

50 % (w/v) Saccharose
100 mM EDTA
0,1 % (w/v) Bromphenolblau
0,1 % (w/v) Xylen-Cyanol-FF

HBS (2x), pH = 7,01

277 mM NaCl
10 mM KCl
1,8 mM Na₂HPO₄
43 mM HEPES
2 % (w/v) Glucose

Ketamin/Xylazin-Lösung

17,5 % Ketamin 10 %-Lösung
4,5 % Xylazin 2 %-Lösung
78 % PBS

Low TE

10 mM Tris/HCl, pH = 8
0,1 mM EDTA

PBS+

PBS (1x)
10 % (v/v) FCS

PBS++

PBS (1x)
1 % (w/v) BSA
2 mM EDTA

PI-stain

40 µg/ml Propidiumjodid
10 mM Tris pH = 7
5 mM MgCl₂
40 µg/ml RNaseA

ST-Puffer (DNA-Minipräparation) pH = 8

80 % (w/v) Saccharose
5 % (v/v) Triton-X 100
50 mM EDTA
50 mM Tris

TBE-Puffer

100 mM Tris
500 mM H₃BO₃
2,5 mM EDTA

E.coli-Medien

Salzlösung (Elektroporation)

Zusammensetzung

1 M NaCl
100 mM MgCl₂
100 mM MgSO₄

SOB-Medium	2 % (w/v) 0,5 % (w/v) 0,25 % (v/v)	Bacto-Trypton Hefeextrakt 40 %-ige Glucoselösung
YT-Medium	1 % 0,5 % 0,5 %	Bacto-Trypton NaCl Hefeextrakt
YT-Medium mit Agar	+ 1,2 %	Agar
YT-Medium (AMP)	+ 100 µg/ml	Ampicillin
YT-Medium (KAN)	+ 25 µg/ml	Kanamycin

5.1.3 Verwendete Organismen

Bakterienstamm	Genotyp
SCS110	<i>rpsL thr leu endA thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44 Δ(lac-proAB)</i>
Stbl2	<i>mcrA(mcrBC-hsdRMS-mrr) endA1 recA1 thi gyrA96 recA1 supE44(lac-proAB) λ⁻</i>
Top10	<i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80ΔlacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 AraD139 Δ(ara,leu)7697 galU galK rpsL(SmR) endA1 nupG</i>

Zelllinie	Zelltyp/Medium	DSMZ/Referenz
32D	IL3-abhängige murine pro B-Zelllinie aus longterm Knochenmarkkulturen RPMI 1640 + 10 % (v/v) FCS + 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin + 20 % (v/v) WEHI-3B Überstand	ACC 411
HEK-293T	Humane Nierenkarzinomzellen; Derivat der Linie 293 (ACC 305), das ein Plasmid mit der temperatursensitiven Mutante des SV-40 T-Antigen trägt DMEM (Low Glucose) + 10 % (v/v) FCS + 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin	ACC 635
KOPN-8	Vorläufer-B-Zelllinie, isoliert aus dem dem peripheren Blut eines Patienten mit Vorläufer B-Zell ALL; t(11;19) MLL•ENL RPMI 1640 + 10 % (v/v) FCS + 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin	ACC 552

MV(4;11)	<p>Akute Monocytische Leukämie-Zelllinie von einem Patienten mit AML; t(4;11) MLL•AF4 und <i>FLT3-ITD</i> Mutation</p> <p>RPMI 1640 + 10 % (v/v) FCS + 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin</p>	ACC102
NALM-6	<p>Vorläufer-B-Zelllinie, isoliert aus dem dem peripheren Blut eines Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie</p> <p>RPMI 1640 + 10 % (v/v) FCS + 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin</p>	ACC 128
Platinum-E	<p>Modifizierte HEK-293T Zelllinie zur Produktion von ecotrophen Retroviren (Morita <i>et al.</i>, 2000; Takahashi und Yamanaka, 2006)</p> <p>DMEM (Low Glucose) + 10 % (v/v) FCS + 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin + 1 µg/ml (w/v) Puromycin + 10 µg/ml (w/v) Blasticidin</p>	Cell Biolabs, Inc.
RS(4;11)	<p>Vorläufer-B-Zelllinie, isoliert aus dem dem Knochenmark eines Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie; t(4;11) MLL•AF4</p> <p>RPMI 1640 + 10 % (v/v) FCS + 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin</p>	ACC 508
SEM	<p>Vorläufer-B-Zelllinie, isoliert aus dem dem peripheren Blut eines Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie; t(4;11) MLL•AF4</p> <p>RPMI 1640 + 10 % (v/v) FCS + 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin</p>	ACC 546
WEHI-3B	<p>Interleukin 3-produzierende murine Makrophagenartige Zelllinie</p> <p>90-95 % Iscove's MDM + 10 % (v/v) FBS + 2 mM L-Glutamin + 2.5 x 10⁻⁵ M Mercaptoethanol</p>	ACC 26

Die Kultivierung der humanen und murinen Zelllinien erfolgte bei 5 % CO₂, 95 % relativer Luftfeuchtigkeit und bei 37 °C.

Zelle

hHSPC

Zelltyp/Medium

Humane hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut oder dem peripheren Blut über Apheresate, die das Zelloberflächen-Glycoprotein CD34 exprimieren.

Aufreinigung

CD34 MicroBead Kit human (Miltenyi)

	StemSpan H3000 + 100 ng/ml hFLT3-L + 100 ng/ml hSCF + 10 ng/ml hIL3 ODER IMDM + 20 % (v/v) FCS + 5 % (v/v) L-Glutamin + 2 % (v/v) Penicillin/Streptomycin + 100 ng/ml hFLT3-L + 100 ng/ml hSCF + 10 ng/ml hIL3	
mHSPC	Murine hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen aus dem Knochenmark, die CD5-, B220-, CD11b-, Gr1-, 7-4- sowie Ter-119-defizient sind und das Zelloberflächen-Antigen Sca1 exprimieren.	<ul style="list-style-type: none"> · Lineage Cell Depletion Kit mouse (Miltenyi) · α-Sca1 MicroBead Kit (FITC) mouse
	DMEM (Low Glucose) + 2 mM L-Glutamin + 10 % (v/v) HyClone + 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin + 20 ng/ml mIL3 + 20 ng/ml mIL6 + 100 ng/ml mSCF ("LSK-Medium")	

Die Kultivierung der humanen und murinen Zellen erfolgte bei 5 % CO₂, 95 % relativer Luftfeuchtigkeit und bei 37 °C.

Mausstamm

C57BL/6-Ly5.1
C57BL/6-Ly5.2
NOD/LtSz-scid IL2ry⁻

Referenz

Charles River
Charles River
Jackson Laboratory
(Aus der Zucht AG Grez,
Georg-Speyer-Haus FfM)

5.1.4 Antikörper

Antikörper

α -BrdU-FITC
 α -hCD34-PE
 α -hCD45-APC
 α -mCD3e-PE
 α -mCD45.1-FITC
 α -mCD45.1-PE
 α -mCD45.2-APC
 α -mCD45.2-FITC
 α -mCD45R (B220)-PE
 α -mMac1-FITC
 α -Sca1 MicroBead Kit (FITC) mouse
CD34 MicroBead Kit human
FcR Blocking Reagent human
FcR Blocking Reagent mouse
Lineage Cell Depletion Kit mouse

Bezugsquelle

BD
BD
BD
Miltenyi
Miltenyi

5.1.5 Synthetische Oligonukleotide

Für Klonierungen, PCR-Analysen und Sequenzierungen verwendete Oligonukleotide, die als Auftragssynthese von der Firma Eurofins (Luxemburg) bezogen wurden.

Oligonukleotide zur Klonierung von pRRL-Plasmiden

Sfil-Linker zum Einfügen des dTomato-Markers:

dT+RE*FW: 5'-AGCTTTGTTTAAACGGCCTCACTGGCCATCGATGGATCCCATATG
TCTAGAATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGTCATC-3'

dT+RE*RW: 5'-TTCCGCGGCCGCTATGGCCGACGTCGACTTACTTGTACAGCTCG
TCCATGCCGTACAGGAACAG-3'

Linker zum Einfügen einer MCS / Deletion von PGK-Promotor und GFP:

pRRL-dT-MCS_PX*3: 5'-AAACGGCCTCACTGGCCGATATCCCCGGGATGCATG
AATTCATCGATACTAGTGGATCCCATATGT-3'

pRRL-dT-MCS_PX*5: 5'-CTAGACATATGGGATCCACTAGTATCGATGAATTCATGCATC
CCGGGATATCGGCCAGTGAGGCCGTTT-3'

PCR des C-terminalen Fragments von AF4•MLL:

der4_NsiI*3: 5'-GATGCCACCATGCATGGAAATGCTGCAC-3'

der4_BamHI*5: 5'-CGCGGATCCGTTTAGGAACTTCCGGCATTCTTG-3'

PCR des C-terminalen Fragments von MLL•AF4:

der11_EcoRI*3: 5'-GAATAAAGAATTCTTTGCTCGGCTCAGC-3'

der11_BamHI*5: 5'-CGCGGATCCAGGTGTTTTGGTTAATTCTTGTAGC-3'

Linker zum Einfügen des 2A-Fragments:

2A*FW: 5'-GATCCGGCAGTGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTGCTAACATG
CGGTGACGTCGAGGAGAATCCTGGCCCAT-3'

2A*RW: 5'-CTAGATGGGCCAGGATTCTCCTCGACGTCACCGCATGTTAGCA
GACTTCTCTGCCCTCTCCACTGCCG-3'

Oligonukleotide zur Klonierung von pIDEΔCMV-SEL-Plasmiden

PCR für MLL•C-2AdT-Konstrukt:

MLL-KasI*3: 5'-CAACTGTGGCGCCAAGAAATGCCGGAAGTTCC-3'

dT(Sal)/XhoI*5: 5'-CCGCTCGAGTTACTTGTACAGCTCGTCCAT-3'

PCR zur Entfernung der Gateway[®]-att-sites im pIDE-RFB:

LTR_EcoRI*3: 5'-CCGGAATTCAGATTTTATTTAGTCTCCAGAAAAAGG-3'

LTR_SapI*5: 5'-TCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCAATACGC-3'

Linker zum Einfügen der SfiI-Klonierungskassette:

SEL(B/E)*fw: 5'-GATCCGGCCTCTGAGGCCTCTAGAAGAGTTAACAGTCCA
TGGCCTGTCAGGCCG-3'

SEL(B/E)*rev: 5'- AATTCGGCCTGACAGGCCATGGACTGTAACTCTTCTAGA
GGCCTCAGAGGCCG-3'

Oligonukleotide für PCR-Analysen

AF4*3 5'- GTTGCAATGCAGCAGAAGCC-3'

AF4*5 5'- ACTGTCACTGTCCTCACTGTCA-3'

dT-f 5'-GCGAGGAGGTCATCAAAGAG-3'

dT-r 5'-CGTAGTAGTAGCCGGGCAGT-3'

GAPDH*3 5'- CTTACCACCATGGAGAAGG-3'

GAPDH*5 5'- CCTGCTTCACCACCTTCTTG-3'

MLL 8*3 5'- CCCAAAACCACTCCTAGTGAG-3'

MLL 13*5 5'- CAGGGTGATAGCTGTTTCGG-3'

Oligonukleotide zur Analyse/Sequenzierung von Patientenmaterial

KRAS Exon2*3: 5'-GATACACGTCTGCAGTCAAC-3'

KRAS Exon 2*5: 5'-TCATGGACCCTGACATACTC-3'

KRAS Exon 3*3: 5'-GCCATTTGTCCGTCATCTTTGGAG-3'

KRAS Exon 3*5: 5'-TGCATGGCATTAGCAAAGACTCA-3'

NRAS Exon 2*3: 5'-TGTAGATGTGGCTCGCCAAT-3'

NRAS Exon 2*5: 5'-TGATCCGACAAGTGAGAGAC-3'

NRAS Exon 3*3: 5'-GGCAATAGCATTGCATTCCC-3'

NRAS Exon 3*5: 5'-TCCCTAGTGTGGTAACCTCA-3'

ITD 13-14-15*3: 5'-TGTTGCCTGGGCTGGTGTCTAATTCTTG-3'

ITD 13-14-15*5: 5'-AAGAGAAGAAGGCATGGGTGGGAAACTG-3'

ITD seq: 5'-GGTTGTCTCCTCTTC-3'

TKD 20*3: 5'-AGAGGCTTTCTGAGGGAGTGCGTGCTTC-3'

TKD 20*5: 5'-GGCATGAGCCACTGCACCCAGCCAATTCAC-3'

TKD seq: 5'-ACCGGTACCTCCTACTGAAG-3'

Oligonukleotide zur Sequenzierung (allgemein)

FT(Farbtaq)*seq	5'-GGCATGGACGAGCTGTACA-3'
pIDEΔCMV-SEL seq	5'-CCACCGCCCTCAAAGTAG-3'
pM*rev	5'- CTGGAGACTAAATAAAATC-3'
pRRL-seq1*3	5'-CCTCAGACAGTGGTTCAAAG-3'
SP6	5'- ATTTAGGTGACACTATAGAATAC-3'
T7	5'- TAATACGACTCACTATAGG-3'

Oligonukleotide für den Nachweis spezifischer AF4•MLL-Fragmente

spezifische AF4•MLL cDNA-Synthese:

D4.9922	5'-CAACTCCTCATAAAGAGACA-3'
D4.9788	5'-GAATACCAGTCAATCTTTCA-3'
D4.9664	5'-GATGGTGTAGTCCTCGTT-3'
D4.8194	5'-TTTATCTGTCAATGACTTCC-3'
D4.7124	5'-ATGGATACAACATTCAAGAC-3'
D4.6065	5'-CTTCAGGAGTTGGATCTAC-3'
D4.5029	5'-ACCATAGGATCTTACTCCAT-3'
D4.4094	5'-TAGGAATTCCAGGGTAAG-3'
D4.3014	5'-TATCATCCAGAAAGACACAG-3'
D4.1599	5'-CACTTATTACACTCCAGCAG-3'
D4.0565	5'-AGGAATTAAGGATATTTTCG-3'

Nachweis von AF4•MLL-Fragmenten:

dT.LR.R1	5'-TGGTGTCCACGTAGTAGTAGCCGGGCAGTT-3'
dT.LR.R2	5'-GAGGCCTCCCAGCCCATTGTCTTCTTCTGC-3'
D4.2346.R	5'-AGTTGGTGAGTCTGGTTCTCCAGGACCTTT-3'
D4.5886.R	5'-ATTGTTGCCATGACCTTGCTCTACTGAACC-3'
NTR.LR.F1	5'-ATACCCACGTGGTTTAAACGGCCTCACTGG-3'
NTR.LR.F2	5'-GGGGCTCGAGAGCAGGTAGTCCCGTAACAT-3'
D4.7954.F	5'-CTCTCATTTCAGGTGTTAACGGTTTGAGG-3'
D4.6309.F	5'-GCACTTACATTCCCTCCCTGCAGCTACTCA-3'
D4.5816.F	5'-AAGGACACATGGATGCAGACCACATCTCTA-3'
D4.4888.F	5'-ACAGTGATTTCTTCAGGTGGAGAGGAACGA-3'

5.1.6 Vektoren und Plasmide

Name	Beschreibung
pRRL_(AM/MA)-2AdT	Derivat des lentiviralen Vektors pRRL.sin-EF1 α -PGK-GFP (Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Pablo Menendez, Granada) mit deletiertem PGK-Promotor und GFP-Fluoreszenzmarker. Die Expression der Fusionsproteine, welche über eine T2A-Protease Sequenz direkt mit dem Fluoreszenzmarker dTomato fusioniert sind, wird über den konstitutiven EF1 α -Promotor gewährleistet. Das Plasmid wurde von der Firma Plasmid Factory, Bielefeld in Auftragssynthese in einer Konzentration von 1 mg/ml bezogen. 7490 bp.
pIDE Δ CMV-SEL	Derivat des retroviralen Gateway [®] -fähigen Destinationvektors PINCO (Grignani <i>et al.</i> , 1998) mit deletierten att-sites sowie CMV-Promotor und GFP-Fluoreszenzmarker. Zum erleichterten Austausch der Zielgene (dT2A; dT2A-AF4•MLL; dT2A-MLL•AF4; MLL•C-2AdT; MLL•C Δ SET-2AdT; zsG2A; zsG2A-MLL•C; zsG2A-MLL•C Δ SET) wurde eine SfiI-Klonierungskassette eingefügt. 11449 bp.
pM-neo-SfiI	Derivat des retroviralen Expressionsvektors pMSCneo mit eingefügter SfiI-Klonierungskassette. 6658 bp.
psPAX2	Lentiviraler Verpackungsvektor für die Gene <i>gag/pol</i> und <i>rev</i> . Das Plasmid wurde von der Firma PlasmidFactory, Bielefeld in Auftragssynthese Endotoxin-, RNA- und Proteinfrei in einer Konzentration von 1 mg/ml in low TE bezogen. 10703 bp.
pVSV-g	Expressionsplasmid für das VSV-G Hüllprotein. Das Plasmid wurde von der Firma PlasmidFactory, Bielefeld in Auftragssynthese Endotoxin-, RNA- und Proteinfrei in einer Konzentration von 1 mg/ml in low TE bezogen. 6507 bp.
pGEM-T	Bakterieller Klonierungsvektor für Taq-Polymerase amplifizierte DNA-Fragmente. 3000 bp.

5.2 Molekularbiologische Methoden

5.2.1 Standardmethoden

Die Durchführung der im folgenden Abschnitt aufgeführten Methoden erfolgte, soweit nicht anders angegeben, nach Herstellerangaben oder gängigen Standardprotokollen (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Vol.3/4* von Sambrook *et al.*, 2000/2012).

- Agarose-Gelelektrophorese
- Auffüllreaktionen an überhängenden Enden der DNA (NEB)
- Dephosphorylierung von 5'-Enden der DNA (NEB)
- Extraktion von DNA aus Agarosegelen (QIAGEN)
- Extraktion von Gesamt-gDNA aus Säugerzellen (QIAGEN)
- Extraktion von Gesamt-RNA aus Säugerzellen (QIAGEN)
- Extraktion von viraler Gesamt-RNA aus Verpackungszell-Überstand (Macherey Nagel)
- Fällungen von Nukleinsäuren (Alkoholisch/Phenol-Chloroform)
- Herstellung CaCl_2 - und elektroporationskompetenter *E.coli* Bakterien
- Hybridisierung von synthetischen Oligonukleotiden
- Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli* (Promega)
- Ligation von DNA mittels T4 DNA-Ligase (NEB)
- Minilysat Präparation von Plasmid-DNA aus *E.coli* mittels "boiled-lysis"-Methode (Holmes und Quigley, 1981)
- Phosphorylierung von 5'-Enden der DNA (NEB)
- Photometrische Bestimmung der Konzentration von DNA/RNA
- Reverse Transkription (Invitrogen)
- Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen (NEB)
- Transformation CaCl_2 -kompetenter *E.coli* Bakterien
- Transformation elektrokompeter *E.coli* Bakterien

5.2.2 PCR-Techniken

Amplifikation von RAS- und FLT3-Fragmenten aus Patienten-gDNA (Standard-PCR)

DNA-Fragmente zur Untersuchung bestimmter Sequenzen der humanen Gene *K-* und *NRAS* sowie *FLT3* wurden mittels PCR Extender System (5 PRIME) selektiv amplifiziert, da der Enzym-Mix dieses Systems über Korrekturlesefähigkeit verfügt. Als Matrize wurde genomische DNA aus den Zellen des Blutes oder des Knochenmarks der Patienten aus Studiengruppen der International BFM Study-Group (I-BFM) und der German Multicenter Study Group on ALL (GMALL) verwendet.

Reaktionsansatz (50 µl):	PCR-Programm:
5 µl gDNA (10 ng/µl)	93 °C 2 min
10 µl Primer 3'-Richtung (\cong 0,4 µM)*	93 °C 20 sek
10 µl Primer 5'-Richtung (\cong 0,4 µM)*	62 °C 30 sek
5 µl HiFi-Puffer (10x)	68 °C 3 min
4 µl dNTPs (\cong je 0,2 mM)	68 °C 5 min
0,2 µl PCR Extender Enzyme Mix (\cong 1 U)	
15,8 µl MQ-Wasser	

* *NRAS*: *NRAS* Exon 1*3 & *NRAS* Exon 1*5 sowie *NRAS* Exon 2*3 & *NRAS* Exon 2*5

KRAS: *KRAS* Exon 1*3 & *KRAS* Exon 1*5 sowie *KRAS* Exon 2*3 & *KRAS* Exon 2*5

FLT3: ITD 13-14-15 *3 & ITD 13-14-15 *5 sowie TKD 20*3 & TKD 20*5

Folgend wurden die Proben über Agarosegel-Elektrophorese und anschließender Gel-Extraktion (Qiagen) gereinigt und 300-400 ng des Amplifikats zur Sequenzierung in einer Standard-Sequenzierreaktion verwendet.

Amplifikation von cDNA-Kassetten an cDNA oder gDNA aus Knochenmarkszellen transplantierter Mäuse (Standard-PCR)

Zum Nachweis integrierter cDNA-Kassetten in die DNA transduzierter und in Mäuse transplantierte hämatopoetischer Zellen wurden spezifische DNA-Fragmente mittels Standard-PCR amplifiziert. Als Matrize diente genomische DNA aus Knochenmarkszellen.

Zum Nachweis transkribierter cDNA-Kassetten der DNA transduzierter und in Mäuse transplantierte hämatopoetischer Zellen wurde Gesamt-RNA aus Knochenmarkszellen isoliert. Die mittels SuperskriptTM Reverser Transkriptase (Invitrogen) in cDNA umgeschriebene RNA diente als Matrize in der Reaktion.

Reaktionsansatz (50 µl):	PCR-Programm:
5 µl g/cDNA (\cong 100 ng)	94 °C 2 min
5 µl Primer 3'-Richtung (\cong 0,2 µM)*	94 °C 30 sek
5 µl Primer 5'-Richtung (\cong 0,2 µM)*	58 °C 30 sek
10 µl GoTaq-Puffer (5x)	72 °C 1 min
5 µl MgCl ₂ (\cong 1,5 mM)	72 °C 3 min
4µl dNTPs (\cong je 0,2mM)	
0,2 µl GoTaq-Polymerase (\cong 1 U)	
15,8 µl MQ-Wasser	
* <i>dT2A</i> : dT-f & dT-r	
<i>AF4•MLL</i> : AF4*3 & MLL 13*5	
<i>MLL•AF4</i> : MLL 8*3 & AF4*5	
<i>GAPDH</i> : GAPDH*3 & GAPDH*5	

} 35
Zyklen

Virentiterbestimmung an viraler RNA (qRT-PCR)

Die Quantifizierung viraler Partikel im Überstand von transfizierten Platinum-E Zellen erfolgte unter Verwendung des ABI StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems sowie des Quant-X™ One-Step qRT-PCR SYBR® Kits von Clontech. Über die Interkalation von SYBR Green in die DNA bildet sich ein Fluoreszenzfarbstoff-DNA-Komplex, der nach entsprechender Anregung Licht proportional zur DNA-Menge emittiert. Erreicht die Fluoreszenz einen Schwellenwert, werden C_T-Werte (cycle threshold) jeder Probe ermittelt. Die absolute Quantifizierung der cDNA-Kopien im Virusüberstand erfolgte nach Herstellerangaben anhand einer Standardkurve mittels Primern und Kontrollplasmid (10¹ bis 10⁸) des Retro-X™ qRT-PCR Titration Components Kit von Clontech. Als Matrize wurde zunächst virale RNA aus dem Überstand isoliert (Macherey Nagel) und anschließend mittels Superskript™ Reverser Transkriptase (Invitrogen) in cDNA umgeschrieben.

Reaktionsansatz (25 µl):	PCR-Programm:
2 µl Probe	95 °C 10 min
0,5 µl Retro-X Reverse Titer-Primer	95 °C 15 sek
0,5 µl Retro-X Forward Titer-Primer	60 °C 1 min
12,5 µl Quant-X Puffer (2x)	95 °C 15 sek
0,5 µl ROX™ Reference Dye LMP	
0,5 µl Quant-X™ Enzyme	
8,5 µl MQ-Wasser	

} 40
Zyklen
T_M

Sequencing Kit (Applied Biosystems) gemäß der Herstelleranleitung, erfolgte die Detektion im Abi Prism® 310 Genetic Analyzer.

Standard-Sequenzierungsreaktion:	PCR-Programm:
4 µl DNA (~100 ng/µl)	94 °C 10 sek
3 µl Terminator Ready Reaction Mix (Big Dye)	56 °C 10 sek
3 µl Primer (2 pmol/µl)	60 °C 4 min
	} 35 Zyklen

5.3 Zellbiologische Methoden

5.3.1 Polyethylenimin-Transfektion der Verpackungszelllinie Platinum-E zur Herstellung von Retroviren

Am Tag vor der Transfektion wurde die Verpackungszelllinie Platinum-E auf ø10 cm-Gewebekulturschalen in Vollmedium ausgebracht. Bei Erreichen einer Konfluenz von ~80 % inkubierten die Zellen am folgenden Tag, nach einmaligem Waschen mit PBS, in 7 ml DMEM (Low Glucose) ohne Zusätze eine Stunde bei 37 °C. Anschließend wurde der Transfektionsmix tropfenweise in das Medium der Zellen gegeben. Nach 18 Stunden Inkubation bei 37 °C wurde der Medium/Transfektionsmix abgenommen und durch 6ml des Mediums der Empfängerzellen (Ohne Zytokine) ersetzt. Dieser virale Überstand wurde nach weiteren 24 Stunden im Brutschrank vorsichtig abgenommen, direkt durch ein 0,45 µm Sterilfilter gegeben und aliquotiert in flüssigem Stickstoff eingefroren und später bei -80 °C gelagert. Die Zellen wurden mit frischen 6 ml Medium der Empfängerzellen erneut 24 Stunden bei 37 °C inkubiert und der Virusüberstand danach analog verarbeitet.

Transfektionsmix pro ø10cm Gewebekulturschale:

500 µl PBS	tropfenweise unter vortexen	500 µl PBS	} Inkubation
20 µg pIDEΔCMV-SEL oder pM-neo Sfil		110 µl PEI (10mM)	

5.3.2 Calciumphosphat-Transfektion der Zelllinie HEK-293T und Konzentration des viralen Überstandes zur Herstellung von Lentiviren

Um ein Volumen von 400 µl konzentrierten Virusüberstand herzustellen wurden je 5 x 10⁶ Zellen der Linie HEK-293T am Tag vor der Transfektion auf sechzehn ø10 cm-

Gewebekulturschalen in Vollmedium ausgebracht. Bei Erreichen einer Konfluenz von ~80 % wurde das Medium der Zellen am folgenden Tag durch 5 ml DMEM (High Glucose) ohne Zusätze ersetzt. Anschließend wurde der Transfektionsmix kurz gevortext und tropfenweise in das Medium der Zellen gegeben. Nach neun Stunden Inkubation bei 37 °C wurde die Ablagerung der CaPO₄/DNA-Präzipitate am Mikroskop bestätigt, der Medium/Transfektionsmix abgenommen und durch 4,5 ml Vollmedium ersetzt. Nach vierzig Stunden Inkubation bei 37 °C wurde der virale Überstand durch einen 0,45 µm Sterilfilter gegeben und zu je 11,7 ml auf sechs Ultrazentrifugen-Röhrchen verteilt. Die Aufkonzentration der Lentiviren erfolgte bei 26.000 rpm und 4 °C in zwei Stunden. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig dekantiert und das Pellet bei Raumtemperatur für fünf Minuten angetrocknet. Nach Zugabe von je 75 µl StemSpan H3000 pro Röhrchen wurde der Virus für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und im Rhythmus von zehn Minuten kurz gevortext. Die Lagerung des so ~150-fach konzentrierten Virusüberstandes erfolgte in vereinten 400 µl bei -80 °C.

Transfektionsmix pro ø10 cm-Gewebekulturschale im Polypropylenröhrchen:

20 µl pRRL 15 µl psPAX2 6 µl pVSV-g	}	+ 412 µl MQ-Wasser (vortexen)	+	47 µl CaCl ₂ (2,5 M) (vortexen, 5 min RT)	+	500 µl 2x HBS (tropfenweise, unter vortexen)	}	Inkubation 20 min, RT
---	---	----------------------------------	---	---	---	--	---	--------------------------

5.3.3 Transduktion und Selektion der murinen Suspensionszelllinie 32D

Am Tag vor der Transduktion wurden je 1 x 10⁵ Zellen der Linie 32D in zwölf Wells einer 24-well-Platte in Vollmedium ausgebracht. Am folgenden Tag wurden die Zellen bei 2000 rpm und 30 °C für fünf Minuten sedimentiert und das Medium vorsichtig abgenommen. Anschließend wurden je 2 ml des jeweiligen Virusüberstandes pro Well, versetzt mit 10 % WEHI-3B Überstand und 8 µg/ml Polybrene[®], auf die Zellen gegeben sowie erneut bei 2000 rpm und 30 °C für zwei Stunden zentrifugiert. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C erfolgte die Transduktion analog erneut. Anschließend wurden alle Zellen, nach weiteren 24 Stunden Inkubation bei 37 °C, mit PBS gewaschen und in 5 ml Vollmedium + 1000 µg/ml G418 zur Selektion ausgebracht. Die maximale Konzentration des G418 wurde zuvor über eine Tötungskurve bestimmt. Um monoklonale Zelllinien der beiden Transduktionen zu erhalten wurden die Zellen nach drei Tagen Selektion mittels Trypanblau-Färbung gezählt und in einer Konzentration von einer lebenden Zelle pro 500 µl Medium (1/3 konditioniertes Medium + 2/3 Vollmedium + 1000 µg/ml G418) verdünnt. Diese Medium/Zellsuspension wurde in einem Volumen von je 250 µl/Well auf eine 96-well-Platte verteilt und zwei Wochen bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Expansion von pro Transduktion willkürlich gewählten zwölf Klonen.

5.3.4 Wachstumskurven über Trypanblau-Färbungen und den CCK8-Assay

Zur Messung der Zellproliferation verschiedener Zelllinien wurde eine Kombination aus Trypanblau-Färbungen und Verwendung des CCK8-Assays durchgeführt. Der CCK8-Assay ist ein Derivat des MTT-Assays, der durch die Umwandlung des Tetrazoliumsalses WST-8 über Dehydrogenasen in der Zelle zum orange-farbenen WST-8-Formazan, Aussagen über die metabolische Aktivität und somit die Anzahl lebender Zellen zulässt (Ishiyama *et al.*, 1997). Trypanblau ist ein anionischer Diazofarbstoff, der von lebenden Zellen nicht aufgenommen wird und stattdessen abgestorbene Zellen mit perforierten Zellmembranen dunkelblau anfärbt. Für die Wachstumskurven wurden die Zellen in einer bestimmten Dichte ausgesät und täglich bzw. zweimal pro Woche die Proliferation bestimmt. Für die Trypanblau-Färbungen wurden 15 µl der Kultur abgenommen und mit 15 µl Trypanblau-Lösung versetzt im Zellzähler TC10 gemessen. Für den CCK8-Assay wurden je 100 µl der Kultur in einem Well einer 96-well-Platte mit 10 µl CCK8-Lösung luftblasenfrei versetzt und bei 37 °C zwei Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 450 nm im Elisa-Reader MR5000 bestimmt und der Wert einer Blindprobe (Medium) subtrahiert. Alle Messungen wurden in Triplikaten durchgeführt.

Zelldichte zu Beginn der Wachstumskurven bzw. nach wöchentlicher Passage:

hHSPCs-PB:	1 x 10 ⁵ Zellen/ml	KOPN-8:	1,25 x 10 ⁵ Zellen/ml
32D:	4 x 10 ⁴ Zellen/ml	MV(4;11):	1,25 x 10 ⁵ Zellen/ml
32D-AM:	4 x 10 ⁴ Zellen/ml	NALM-6:	1,25 x 10 ⁵ Zellen/ml
32D-MA:	4 x 10 ⁴ Zellen/ml	RS(4;11):	1,25 x 10 ⁵ Zellen/ml
		SEM:	1,25 x 10 ⁵ Zellen/ml

5.3.5 Zellzyklus-/Apoptose-Assay

Die Bestimmung des Zellzyklus und der Apoptoseraten verschiedener Zelllinien erfolgte über eine Doppelfärbung mit PI und einem FITC-gekoppeltem Antikörper gegen BrdU nach bearbeitetem Protokoll von Hoy *et al.*, 1989. Hierfür wurden die zu messenden Zellkulturen mit bzw. ohne BrdU in einer Endkonzentration von 1 mM versetzt und jeweils vier Stunden (SEM, RS(4;11), NALM-6) oder sechs Stunden (transduzierte hHSPCs-PB) bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 1600 rpm für zehn Minuten sedimentiert. Nach Fixierung der Zellen in 1000 µl 1-4 % Paraformaldehyd erfolgte die Lagerung bei 4 °C bis zur Analyse am nächsten Tag. Am Tag der Analyse wurden die Zellen bei 1600 rpm für zehn Minuten sedimentiert und in 300 µl PBS + 0,5 % Triton-X 100 resuspendiert für fünfzehn Minuten permeabilisiert. Anschließend wurde die DNA durch Inkubation in 3 ml 2 N HCl +

0,5 % Triton-X 100 für dreißig Minuten bei Raumtemperatur unter schütteln denaturiert. Nach zweimaligem waschen mit PBS erfolgte Inkubation der Zellen, resuspendiert in 100 µl PBS++ und mit 2 µl BrdU-Antikörper versetzt, für zwanzig Minuten im Dunklen bei Raumtemperatur. Nicht gebundene Antikörper wurde durch einen Waschschrift mit PBS entfernt und zuletzt die Zellen in 500 µl PI-stain dreißig Minuten bei 37 °C im Dunklen gefärbt. Die Analyse erfolgte am Durchflusszytometer FACSVerse.

5.3.6 Colony Forming Unit (CFU)-Assay

Um die Fähigkeit transduzierter hHSPCs-PB zu untersuchen, in verschiedene Zelltypen differenzieren und Kolonien bilden zu können, wurde ein Colony Forming Unit- oder Methylcellulose-Assay durchgeführt. Hierfür wurden in Triplikaten jeweils 500, 2000 und 8000 hHSPCs-PB eine Woche nach Transduktion in Methylcellulose-Medium ausgesät, welches die Zytokine hSCF (50 ng/ml), hGM-CSF (10 ng/ml), hIL3 (10 ng/ml) und hEpo (3 U/ml) enthält. Anschließend wurde dreimal im Rhythmus von zwölf Tagen die Anzahl der unterschiedlichen Kolonien bestimmt und die Zellen erneut ausgebracht. Gezählt wurden ausschließlich Kolonien bestehend aus mindestens fünfzig Zellen.

5.4 Mausexperimente

Alle Mausexperimente entsprechen den Tierschutzbestimmungen und sind durch das Regierungspräsidium in Darmstadt genehmigt.

5.4.1 Aufreinigung von CD34⁺ humanen hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen aus Apheresaten

Für *in vitro*-Experimente wurden CD34⁺ hHSPCs-PB aus Apheresaten (Freundlicherweise zur Verfügung gestellt vom Blutspendedienst Frankfurt) isoliert. Hierfür wurden alle Proben in einem 50 ml-Falcon vereint, mit PBS++ gewaschen und CD34-exprimierende Zellen nach Herstellerangaben mit dem CD34 MicroBead Kit für humane Zellen (Miltenyi) aufgereinigt. Die anschließende Kultivierung der isolierten hHSPCs-PB erfolgte in 5 ml StemSpan H3000 + 10 ng/ml IL3 + 100 ng/ml SCF + 100 ng/ml FLT3-L. Die Transduktion der Zellen erfolgte analog zur Transduktion von hHSPCs-CB (Kapitel 5.4.2).

5.4.2 Transduktion und Transplantation von CD34⁺ humanen hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen in primäre Empfängermäuse

Am Tag nach der Aufreinigung wurden CD34⁺ hHSPCs-CB (Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Pablo Menendez, Granada) transduziert. Hierfür wurde pro Empfängermaus ein Well einer mit humanem Fibronectin beschichteten 24-well-Platte mit 200 µl aufkonzentriertem lentiviralem Überstand versehen und die Platte bei 4000 rpm und 30 °C für dreißig Minuten zentrifugiert. Anschließend erfolgte das Ausbringen von 1-3 x 10⁵ pelletierten Zellen in 200 µl aufkonzentriertem lentiviralem Überstand + 20 ng/ml IL3 + 200 ng/ml SCF + 200 ng/ml FLT3-L + 16 µg/ml Polybrene[®] resuspendiert in den vorbereiteten Wells. Die Zellen wurden auf der Platte bei 1200 rpm und 30 °C für dreißig Minuten sedimentiert und zwei Tage bei 37 °C inkubiert. Für die Transplantation wurden alle Zellen, die mit demselben Virus transduziert wurden, vereint und mit PBS gewaschen. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen in 30 µl PBS pro Maus aufgenommen und bis zur Transplantation auf Eis gelagert. Als Empfänger für die transduzierten humanen Blutstammzellen dienten zwölf Wochen alte Mäuse des immundefizienten Stamms NOD/LtSz-scid IL2ry⁻, die zwanzig Stunden vor Transplantation einer sublethalen Ganzkörperbestrahlung mit 2,75 Gray unterzogen wurden. Die transduzierten hHSPCs-CB wurden anschließend direkt in das Knochenmark des Femurs transplantiert. Zur Durchführung der IBMT wurden die Mäuse durch intraperitoneale Injektion einer Ketamin/Xylazin-Lösung (10 µl/g Körpergewicht) anästhesiert und die Wunde mittels Betaisodona[®]-Lösung antiseptisch behandelt. Nach der Transplantation wurden die Mäuse täglich einer phänotypischen Untersuchung unterzogen.

Anzahl transplantierte Zellen in 30 µl PBS pro Maus: hHSPCs-CB: ~2,5 x 10⁵ Zellen

5.4.3 Blutabnahme an Mäusen zur Beobachtung des Krankheitsverlaufs

Um den Krankheitsverlauf transplantierte Mäuse des immunsupprimierten Stamms NOD/LtSz-scid IL2ry⁻ zu beobachten, wurde in einem Rhythmus von vier Wochen das Blut der Tiere analysiert. Hierfür wurde die Schwanzspitze jeder Maus mit einer chirurgischen Schere gekappt, das austretende Blut in EDTA-Röhrchen aufgefangen um Gerinnung zu vermeiden, und die Wunde mittels ARGENTRIX[®] Einmal-Höllenstein-Ätztift behandelt. Etwa zwei Tropfen der Blutprobe dienten der Analyse mit dem Animal Blood Counter ABX Vet Pack um ein Blutbild zu erstellen. Im übrigen abgenommenen Blut wurde die Anzahl der humanen hämatopoetischen Zellen bestimmt. Hierfür wurde das Blut mit 200 µl PBS++ aus

dem EDTA-Röhrchen gewaschen und in ein FACS-Röhrchen überführt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit humanem und murinem FcR Blocking Reagent sowie mit dem α -hCD45-APC nach Herstellerangaben für dreißig Minuten bei 4 °C. Um Erythrozyten in den Blutproben zu lysieren, wurden nach der Inkubation 2 ml BD FACS™ Lysing Solution für zehn Minuten bei Raumtemperatur mit den Blutproben gemischt. Zuletzt wurden die Zellen bei 1400 rpm für fünf Minuten sedimentiert, einmal mit PBS gewaschen und die Anzahl hCD45⁺ Zellen mittels Analyse am Durchflusszytometer FACS Canto II bestimmt.

5.4.4 Isolierung und Aufreinigung von Lin⁻/Sca1⁺ murinen Knochenmarkzellen

Für die Isolierung Lin⁻/Sca1⁺ muriner Stamm- und Vorläuferzellen aus dem Knochenmark (mHSPCs) wurden zwölf Wochen alte Spendermäuse des Stamms C57BL/6-Ly5.2 im Verhältnis 2:1 pro Empfängermaus verwendet. Zur Entnahme des Knochenmarks erfolgte eine Anästhesie der Tiere mittels Isofluran und die anschließende Tötung durch zervikale Dislokation. Anschließend wurden die Tiere äußerlich mit 70 %-igem Ethanol desinfiziert und das Fell sowie das Muskelfleisch entfernt. Zur Entnahme der Beinknochen wurden die unteren Extremitäten an der Hüfte vom Rumpf getrennt und die Pfoten entfernt. Anschließend wurden Femur und Tibia vom restlichen Muskelfleisch und den Sehnen befreit. Durch Anbohren der Epiphysen mit einer Kanüle konnten die Knochen mehrfach mit kaltem PBS⁺ gespült und die Zellen anschließend durch ein 100 μ m Zellsieb von Knochenrückständen befreit werden. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden Knochenmarkzellen die CD5⁻, B220⁻, CD11b⁻, Gr1⁻, 7-4⁻ sowie Ter-119-defizient sind, mittels Lineage Cell Depletion Kit für murine Zellen (Miltenyi) aufgereinigt. Hierfür wurden die Zellen bei 1600 rpm für fünf Minuten pelletiert und in 40 μ l PBS⁺⁺ pro 10⁷ Zellen resuspendiert. Anschließend erfolgte die Inkubation von jeweils 10⁷ Zellen mit 10 μ l des Biotin-Antikörper Cocktails für zehn Minuten bei 4 °C. Nach der folgenden Zugabe von 30 μ l PBS⁺⁺ pro 10⁷ Zellen wurden 20 μ l der α -Biotin Microbeads verwendet, um gebundene Zellen während einer 15-minütigen Inkubation bei 4 °C zu koppeln. Anschließend wurden die Zellen mit PBS⁺⁺ gewaschen und 10⁸ Zellen in 500 μ l PBS⁺⁺ auf eine kalibrierte LS-Säule im Magneten Quadro-MACS gegeben. Alle durchlaufenden Zellen während diesem Schritt und den drei folgenden Waschschritten mit je 1 ml PBS⁺⁺ pro Säule, wurden in einem 15 ml Falcon aufgefangen. Im Anschluss fand erneut die Bestimmung der Zellzahl statt. Darauf folgte die Selektion Sca-1⁺ Zellen mittels α -Sca1MicroBead Kit (FITC) für murine Zellen. Hierfür wurden die Zellen bei 1600 rpm für fünf Minuten pelletiert und in 90 μ l PBS⁺⁺ pro 10⁷ Zellen resuspendiert. Anschließend erfolgte die Inkubation von jeweils 10⁷ Zellen mit 10 μ l

des α -Sca1-FITC für zehn Minuten bei 4 °C. Nach einmaligem Waschen der Zellen mit PBS++ wurden die Zellen in 80 μ l PBS++ pro 10^7 Zellen resuspendiert und mit 20 μ l α -FITC Microbeads pro 10^7 Zellen für fünfzehn Minuten bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut gewaschen und 10^8 Zellen in 500 μ l PBS++ auf eine kalibrierte LS-Säule im Magneten Quadro-MACS gegeben. Nach dreimaligem Waschen der Säule mit je 1ml PBS++ wurde die Säule vom Magneten genommen und die Zellen in 5 ml PBS++ mit Hilfe des Plungers von der Säule gespült. Die Kultivierung der mHSPCs erfolgte in 5 ml LSK-Medium für 72 Stunden.

5.4.5 Transduktion und Transplantation von Lin⁻/Sca1⁺ murinen Knochenmarkzellen in primäre Empfängermäuse

Die Transduktion von mHSPCs erfolgte in RetroNectin[®]-beschichteten 24-well-Platten. Hierfür wurden entsprechend viele Wells am Tag vor der Transduktion mit 10 μ g/cm² RetroNectin[®] in PBS versehen und bei 4 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurde das überschüssige RetroNectin[®] abgesaugt und jeweils 500 μ l PBS + 2 % BSA pro Well für dreißig Minuten bei Raumtemperatur hinzu gegeben. Anschließend wurde jedes Well mit 500 μ l PBS gewaschen und danach 500 μ l des Virusüberstandes pro Well bei 4000 rpm und 15 °C für dreißig Minuten zentrifugiert. Nach Abnehmen des Überstandes nach der Zentrifugation wurde dieser Schritt fünfmal wiederholt. Die so vorbereitete Platte diente der Inkubation von $1-3 \times 10^5$ mHSPCs pro Well in 1000 μ l Virusüberstand + 20 ng/ml mIL3 + 20 ng/ml + mIL6 + 100 ng/ml mSCF über Nacht bei 37 °C. Etwa vierundzwanzig Stunden nach der ersten Transduktion wurden die Zellen auf der Platte bei 1200 rpm und 30 °C für fünf Minuten sedimentiert um überstehenden Virusüberstand vorsichtig abpipettieren zu können. Anschließend wurden pro Well 1000 μ l frischer Virusüberstand auf die Zellen gegeben und bei 1200 rpm und 30 °C für dreißig Minuten zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt und die Zellen abschließend erneut pro Well in 1000 μ l Virusüberstand + 20 ng/ml mIL3 + 20 ng/ml mIL6 + 100 ng/ml mSCF bei 37 °C über Nacht inkubiert. Für die Transplantation erfolgte die Vereinigung aller Zellen der Transduktion mit dem gleichen Konstrukt sowie ein folgender Waschschrift mit PBS. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen in 30 μ l PBS pro Maus aufgenommen und bis zur Transplantation auf Eis gelagert. Als Empfänger der transduzierten mHSPCs wurden zwölf Wochen alte Empfängermäuse des Stamms C57BL/6-Ly5.1 gewählt, da dieser Stamm eine andere Form des hämatopoetischen Zellmarkers CD45 bzw. Ly5 exprimiert als der Donorstamm C57BL/6-Ly5.2. Die sublethale Ganzkörperbestrahlung mit jeweils 5 Gray aller Empfängermäuse erfolgte sowohl vierundzwanzig Stunden als auch eine Stunde vor der Transplantation. Die

transduzierten Zellen wurden anschließend direkt in das Knochenmark des Femurs transplantiert. Zur Durchführung der IBMT wurden die Mäuse durch intraperitoneale Injektion einer Ketamin/Xylazin-Lösung (10 µl/g Körpergewicht) anästhesiert und die Wunde mittels Betaisodona®-Lösung antiseptisch behandelt. Nach der Transplantation wurden die Mäuse täglich einer phänotypischen Untersuchung unterzogen. Im Koffein-Mausmodell wurde den Mäusen eine Woche nach Transplantation Koffein in einer Konzentration von 0,4 mg/ml über das Trinkwasser zugeführt.

Anzahl transplantierte mHSPCs in 30 µl PBS pro Maus:

Koffein-Mausmodell:

dTomato2A: ~1,0 x 10⁶ Zellen
dT2A-AF4•MLL: ~2,5 x 10⁵ Zellen
dT2A-MLL•AF4: ~3,5 x 10⁵ Zellen

MLL-C-Mausmodell:

dTomato2A: ~1 x 10⁶ Zellen
MLL-C-dT2A: ~1 x 10⁶ Zellen
MLL-CΔSET-dT2A: ~1 x 10⁶ Zellen
zsGreen2A: ~1 x 10⁶ Zellen
zsG2A-MLL-C: ~1 x 10⁶ Zellen
zsG2A-MLL-CΔSET: ~1 x 10⁶ Zellen

5.4.6 Aufarbeitung erkrankter Mäuse

Bei Feststellung präfinaler Merkmale bei der täglichen phänotypischen Untersuchung wie Gewichtsverlust, struppiges Fell, blasse Häute und Schleimhäute sowie buckeliger und langsamer Gang wurden die Tiere mittels Isofluran anästhesiert und durch zervikale Dislokation getötet.

Blutausstrich: Für Blutausstriche wurde Blut mit einer Kanüle direkt aus dem Herzen genommen und mit 0,1 mM EDTA gemischt um Gerinnung zu vermeiden. Der Ausstrich erfolgte mit einem Tropfen Blut auf einen Objektträger, der mit einem zweiten Objektträger gleichmäßig verteilt wurde.

Präparation von Knochenmark, Milz, Leber und ektope Thymusgewebe: Zur Entnahme von Geweben wurden die Tiere äußerlich mit 70 %-igem Ethanol desinfiziert und das Fell sowie das Peritoneum entlang des kompletten Thorax und Bauchraums geöffnet. Nach Dokumentation von Größe und Lage der einzelnen Organe erfolgte die Präparation von Milz, Leber und eventuell vorhandener ektope Thymusgewebe sowie beider Femora und Tibien und die Lagerung in eiskaltem PBS. Die Größen der präparierten Organe wurden mit einem Lineal vermessen sowie die Gewichte bestimmt. Anschließend wurden die Organe durch ein 100 µm Zellsieb zerrieben, mit PBS gespült und die Anzahl der Zellen bestimmt. Zur Isolierung des Knochenmarks wurden Femora und Tibien vom restlichen Muskelfleisch und den Sehnen befreit. Durch Anbohren der Epiphysen mit einer Kanüle konnten die Knochen

mehrfach mit kaltem PBS+ gespült und die Zellen anschließend durch ein 100 µm Zellsieb von Knochenrückständen befreit sowie die Anzahl der Zellen bestimmt werden.

Zytospins: Zur Fixierung der Zellen verschiedener Organe sowie von Knochenmarkzellen auf einem Objektträger diente die Anfertigung von Zytospins. Hierfür wurde ein Objektträger mit einem Doppel-Cellfunnel in die Vorrichtung der Zytospin-Zentrifuge (Cellspin I) eingespannt. Anschließend wurden 5×10^4 Zellen der verschiedenen Zellsuspensionen in einem Volumen von 200 µl PBS in die beiden Trichterammern pipettiert und zehn Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Alle Wright-Giemsa-Färbungen wurden in der Abteilung für Hämatologie der Goethe-Universität Frankfurt am Main durchgeführt.

Durchflusszytometrische Analyse: Zur Charakterisierung der verschiedenen hämatopoetischen Zellen wurden Antikörperfärbungen der unterschiedlichen Oberflächenmarker durchgeführt. Hierfür wurden $1-3 \times 10^5$ Zellen der verschiedenen Zellsuspensionen in einem Volumen von 200 µl PBS++ in einem FACS-Röhrchen mit den entsprechenden Fluoreszenzkonjugierten Antikörpern für dreißig Minuten bei 4 °C im Dunklen inkubiert. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Analyse mit dem Gerät CyFlow[®]ML und die Auswertung mit dem Programm FCS Express V3 von De Novo Software.

Kryokonservierung der Zellen: Um Zellen der verschiedenen Gewebe für einen späteren Zeitpunkt zu konservieren wurden $5 \times 10^6 - 2 \times 10^7$ Zellen in einem Milliliter LSK-Medium (Ohne Zytokine) + 10 % DMSO resuspendiert und in Kryo-Röhrchen in flüssigem Stickstoff eingefroren.

5.4.7 Retransplantationsexperimente in sekundäre Empfängermäuse

Um die Fähigkeit einen bestimmten Krankheitsphänotyp in Mäusen hervorzurufen, wurden kryokonservierte Zellen des Knochenmarks und der Milz primär erkrankter Mäuse aufgetaut und zweimal in PBS gewaschen. Nach Bestimmung der Lebenszellzahl über Trypanblau-Färbungen wurden die Zellen in 100 µl PBS pro sekundäre Empfängermaus aufgenommen und bis zur Transplantation auf Eis gelagert. Als Empfänger der Retransplantationsexperimente dienten zwölf Wochen alte Mäuse des Stamms C57BL/6-Ly5.1, welche vor der Transplantation einer sublethalen Ganzkörperbestrahlung mit 4,5 Gray unterzogen wurden. Zur retrobulbären Transplantation erfolgte die Anästhesie der Mäuse kurz mittels Isofluran. Nach der Transplantation wurden die Mäuse täglich einer phänotypischen Untersuchung unterzogen.

Anzahl transplanteder Zellen in 100 µl PBS pro Maus: $\sim 4 \times 10^6$ Zellen

6 Literaturverzeichnis

- Adler, H.T., Nallaseth, F.S., Walter, G., and Tkachuk, D.C. (1997). HRX leukemic fusion proteins form a heterocomplex with the leukemia-associated protein SET and protein phosphatase 2A. *J. Biol. Chem.* *272*, 28407–28414.
- Adler, H.T., Chinery, R., Wu, D.Y., Kussick, S.J., Payne, J.M., Fornace, A.J., Jr, and Tkachuk, D.C. (1999). Leukemic HRX fusion proteins inhibit GADD34-induced apoptosis and associate with the GADD34 and hSNF5/IN1 proteins. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 7050–7060.
- Alexander, F.E., Patheal, S.L., Biondi, A., Brandalise, S., Cabrera, M.E., Chan, L.C., Chen, Z., Cimino, G., Cordoba, J.C., Gu, L.J., et al. (2001). Transplacental chemical exposure and risk of infant leukemia with MLL gene fusion. *Cancer Res.* *61*, 2542–2546.
- Ali, M., Hom, R.A., Blakeslee, W., Ikenouye, L., and Kutateladze, T.G. (2014). Diverse functions of PHD fingers of the MLL/KMT2 subfamily. *Biochim. Biophys. Acta* *1843*, 366–371.
- Anglin, J.L., and Song, Y. (2013). A medicinal chemistry perspective for targeting histone H3 lysine-79 methyltransferase DOT1L. *J. Med. Chem.* *56*, 8972–8983.
- Artinger, E.L., Mishra, B.P., Zaffuto, K.M., Li, B.E., Chung, E.K.Y., Moore, A.W., Chen, Y., Cheng, C., and Ernst, P. (2013). An MLL-dependent network sustains hematopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *110*, 12000–12005.
- Ayton, P.M., and Cleary, M.L. (2001). Molecular mechanisms of leukemogenesis mediated by MLL fusion proteins. *Oncogene* *20*, 5695–5707.
- Ballabio, E., and Milne, T.A. (2012). Molecular and Epigenetic Mechanisms of MLL in Human Leukemogenesis. *Cancers (Basel)* *4*, 904–944.
- Barabé, F., Kennedy, J.A., Hope, K.J., and Dick, J.E. (2007). Modeling the initiation and progression of human acute leukemia in mice. *Science* *316*, 600–604.
- Barbosa, T.C., Andrade, F.G., Lopes, B.A., de Andrade, C.F.G., Mansur, M.B., Emerenciano, M., and Pombo-de-Oliveira, M.S. (2014). Impact of mutations in FLT3, PTPN11 and RAS genes on the overall survival of pediatric B cell precursor acute lymphoblastic leukemia in Brazil. *Leuk. Lymphoma*.
- Bardini, M., Spinelli, R., Bungaro, S., Mangano, E., Corral, L., Cifola, I., Fazio, G., Giordan, M., Basso, G., De Rossi, G., et al. (2010). DNA copy-number abnormalities do not occur in infant ALL with t(4;11)/MLL-AF4. *Leukemia* *24*, 169–176.
- Bartkova, J., Rezaei, N., Lontos, M., Karakaidos, P., Kletsas, D., Issaeva, N., Vassiliou, L.-V.F., Kolettas, E., Niforou, K., Zoumpourlis, V.C., et al. (2006). Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* *444*, 633–637.
- Bartram, C.R., Anger, B., Carbonell, F., and Kleihauer, E. (1985). Involvement of chromosome 9 in variant Ph1 translocation. *Leuk. Res.* *9*, 1133–1137.
- Basavapathruni, A., Olhava, E.J., Daigle, S.R., Therkelsen, C.A., Jin, L., Boriack-Sjodin, P.A., Allain, C.J., Klaus, C.R., Raimondi, A., Scott, M.P., et al. (2014). Nonclinical pharmacokinetics and metabolism of EPZ-5676, a novel DOT1L histone methyltransferase inhibitor. *Biopharm Drug Dispos.*
- Bene, M.C., Castoldi, G., Knapp, W., Ludwig, W.D., Matutes, E., Orfao, A., and van't Veer, M.B. (1995). Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* *9*, 1783–1786.
- Bennett, J.H. (1845). Case of hypertrophy of the spleen and liver in which death took place from suppuration of the blood. *Edinburgh Medical and Surgical Journal* *64*, 413–423.
- Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.A., Gralnick, H.R., and Sultan, C. (1976). Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br. J. Haematol.* *33*, 451–458.

- Van den Berghe, H., David, G., Broeckaert-Van Orshoven, A., Louwagie, A., Verwilghen, R., Casteels-Van Daele, M., Eggermont, E., and Eeckels, R. (1979). A new chromosome anomaly in acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Hum. Genet.* *46*, 173–180.
- Bernt, K.M., Zhu, N., Sinha, A.U., Vempati, S., Faber, J., Krivtsov, A.V., Feng, Z., Punt, N., Daigle, A., Bullinger, L., et al. (2011). MLL-rearranged leukemia is dependent on aberrant H3K79 methylation by DOT1L. *Cancer Cell* *20*, 66–78.
- Bertrand, F.E., Spengeman, J.D., Shah, N., and LeBien, T.W. (2003). B-cell development in the presence of the MLL/AF4 oncoprotein proceeds in the absence of HOX A7 and HOX A9 expression. *Leukemia* *17*, 2454–2459.
- Billerbeck, E., Barry, W.T., Mu, K., Dorner, M., Rice, C.M., and Ploss, A. (2011). Development of human CD4+FoxP3+ regulatory T cells in human stem cell factor-, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-, and interleukin-3-expressing NOD-SCID IL2R γ (null) humanized mice. *Blood* *117*, 3076–3086.
- Bitoun, E., Oliver, P.L., and Davies, K.E. (2007). The mixed-lineage leukemia fusion partner AF4 stimulates RNA polymerase II transcriptional elongation and mediates coordinated chromatin remodeling. *Hum. Mol. Genet.* *16*, 92–106.
- Bitoun, E., Finelli, M.J., Oliver, P.L., Lee, S., and Davies, K.E. (2009). AF4 is a critical regulator of the IGF-1 signaling pathway during Purkinje cell development. *J. Neurosci.* *29*, 15366–15374.
- Blasina, A., Price, B.D., Turenne, G.A., and McGowan, C.H. (1999). Caffeine inhibits the checkpoint kinase ATM. *Curr. Biol.* *9*, 1135–1138.
- Blyth, K., Cameron, E.R., and Neil, J.C. (2005). The RUNX genes: gain or loss of function in cancer. *Nat. Rev. Cancer* *5*, 376–387.
- Blyth, K., Slater, N., Hanlon, L., Bell, M., Mackay, N., Stewart, M., Neil, J.C., and Cameron, E.R. (2009). Runx1 promotes B-cell survival and lymphoma development. *Blood Cells Mol. Dis.* *43*, 12–19.
- De Boer, J., Walf-Vorderwülbecke, V., and Williams, O. (2013). In focus: MLL-rearranged leukemia. *Leukemia* *27*, 1224–1228.
- Borowitz, M.J., Devidas, M., Hunger, S.P., Bowman, W.P., Carroll, A.J., Carroll, W.L., Linda, S., Martin, P.L., Pullen, D.J., Viswanatha, D., et al. (2008). Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study. *Blood* *111*, 5477–5485.
- Brassesco, M.S., Montaldi, A.P., and Sakamoto-Hojo, E.T. (2009). Preferential induction of MLL (Mixed Lineage Leukemia) rearrangements in human lymphocyte cultures treated with etoposide. *Genetics and Molecular Biology* *32*, 144–150.
- Broeker, P.L., Super, H.G., Thirman, M.J., Pomykala, H., Yonebayashi, Y., Tanabe, S., Zeleznik-Le, N., and Rowley, J.D. (1996). Distribution of 11q23 breakpoints within the MLL breakpoint cluster region in de novo acute leukemia and in treatment-related acute myeloid leukemia: correlation with scaffold attachment regions and topoisomerase II consensus binding sites. *Blood* *87*, 1912–1922.
- Brown, P. (2013). Treatment of infant leukemias: challenge and promise. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* *2013*, 596–600.
- Brown, P., Levis, M., Shurtleff, S., Campana, D., Downing, J., and Small, D. (2005). FLT3 inhibition selectively kills childhood acute lymphoblastic leukemia cells with high levels of FLT3 expression. *Blood* *105*, 812–820.
- Bueno, C., Montes, R., Catalina, P., Rodríguez, R., and Menendez, P. (2011). Insights into the cellular origin and etiology of the infant pro-B acute lymphoblastic leukemia with MLL-AF4 rearrangement. *Leukemia* *25*, 400–410.

- Bueno, C., Montes, R., Melen, G.J., Ramos-Mejia, V., Real, P.J., Ayllón, V., Sanchez, L., Ligeró, G., Gutierrez-Aranda, I., Fernández, A.F., et al. (2012). A human ESC model for MLL-AF4 leukemic fusion gene reveals an impaired early hematopoietic-endothelial specification. *Cell Res.* 22, 986–1002.
- Bueno, C., Ayllón, V., Montes, R., Navarro-Montero, O., Ramos-Mejia, V., Real, P.J., Romero-Moya, D., Araúzo-Bravo, M.J., and Menendez, P. (2013). FLT3 activation cooperates with MLL-AF4 fusion protein to abrogate the hematopoietic specification of human ESCs. *Blood* 121, 3867–3878, S1–3.
- Burmeister, T., Marschalek, R., Schneider, B., Meyer, C., Gökbüget, N., Schwartz, S., Hoelzer, D., and Thiel, E. (2006). Monitoring minimal residual disease by quantification of genomic chromosomal breakpoint sequences in acute leukemias with MLL aberrations. *Leukemia* 20, 451–457.
- Bursen, A., Moritz, S., Gaussmann, A., Moritz, S., Dingermann, T., and Marschalek, R. (2004). Interaction of AF4 wild-type and AF4.MLL fusion protein with SIAH proteins: indication for t(4;11) pathobiology? *Oncogene* 23, 6237–6249.
- Bursen, A., Schwabe, K., Ruster, B., Henschler, R., Ruthardt, M., Dingermann, T., and Marschalek, R. (2010). The AF4.MLL fusion protein is capable of inducing ALL in mice without requirement of MLL.AF4. *Blood* 115, 3570–3579.
- Carver, B.S., and Pandolfi, P.P. (2006). Mouse modeling in oncologic preclinical and translational research. *Clin. Cancer Res.* 12, 5305–5311.
- Caslini, C., Serna, A., Rossi, V., Introna, M., and Biondi, A. (2004). Modulation of cell cycle by graded expression of MLL-AF4 fusion oncoprotein. *Leukemia* 18, 1064–1071.
- Chang, P.-Y., Hom, R.A., Musselman, C.A., Zhu, L., Kuo, A., Gozani, O., Kutateladze, T.G., and Cleary, M.L. (2010). Binding of the MLL PHD3 finger to histone H3K4me3 is required for MLL-dependent gene transcription. *J. Mol. Biol.* 400, 137–144.
- Chen, C.-C., Er, T.-K., Liu, Y.-Y., Hwang, J.-K., Barrio, M.J., Rodrigo, M., Garcia-Toro, E., and Herreros-Villanueva, M. (2013a). Computational analysis of KRAS mutations: implications for different effects on the KRAS p.G12D and p.G13D mutations. *PLoS ONE* 8, e55793.
- Chen, C.S., Hilden, J.M., Frestedt, J., Domer, P.H., Moore, R., Korsmeyer, S.J., and Kersey, J.H. (1993a). The chromosome 4q21 gene (AF-4/FEL) is widely expressed in normal tissues and shows breakpoint diversity in t(4;11)(q21;q23) acute leukemia. *Blood* 82, 1080–1085.
- Chen, C.S., Sorensen, P.H., Domer, P.H., Reaman, G.H., Korsmeyer, S.J., Heerema, N.A., Hammond, G.D., and Kersey, J.H. (1993b). Molecular rearrangements on chromosome 11q23 predominate in infant acute lymphoblastic leukemia and are associated with specific biologic variables and poor outcome. *Blood* 81, 2386–2393.
- Chen, J.-F., Eltzschig, H.K., and Fredholm, B.B. (2013b). Adenosine receptors as drug targets--what are the challenges? *Nat Rev Drug Discov* 12, 265–286.
- Chen, W., Li, Q., Hudson, W.A., Kumar, A., Kirchhof, N., and Kersey, J.H. (2006). A murine MLL-AF4 knock-in model results in lymphoid and myeloid deregulation and hematologic malignancy. *Blood* 108, 669–677.
- Chillón, M.C., Gómez-Casares, M.T., López-Jorge, C.E., Rodríguez-Medina, C., Molines, A., Sarasquete, M.E., Alcoceba, M., Miguel, J.D.G.-S., Bueno, C., Montes, R., et al. (2012). Prognostic significance of FLT3 mutational status and expression levels in MLL-AF4+ and MLL-germline acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 26, 2360–2366.
- Chinnasamy, D., Milsom, M.D., Shaffer, J., Neuenfeldt, J., Shaaban, A.F., Margison, G.P., Fairbairn, L.J., and Chinnasamy, N. (2006). Multicistronic lentiviral vectors containing the FMDV 2A cleavage factor demonstrate robust expression of encoded genes at limiting MOI. *Virology* 3, 14.
- Choudhary, C., Olsen, J.V., Brandts, C., Cox, J., Reddy, P.N.G., Böhmer, F.D., Gerke, V., Schmidt-Arras, D.-E., Berdel, W.E., Müller-Tidow, C., et al. (2009). Mislocalized activation of oncogenic RTKs switches downstream signaling outcomes. *Mol. Cell* 36, 326–339.

- Cimino, G., Moir, D.T., Canaani, O., Williams, K., Crist, W.M., Katzav, S., Cannizzaro, L., Lange, B., Nowell, P.C., Croce, C.M., et al. (1991). Cloning of ALL-1, the Locus Involved in Leukemias with the t(4;11)(q21;q23), t(9;11)(p22;q23), and t(11;19)(q23;p13) Chromosome Translocations. *Cancer Res* 51, 6712–6714.
- Corral, J., Lavenir, I., Impey, H., Warren, A.J., Forster, A., Larson, T.A., Bell, S., McKenzie, A.N., King, G., and Rabbitts, T.H. (1996). An Mll-AF9 fusion gene made by homologous recombination causes acute leukemia in chimeric mice: a method to create fusion oncogenes. *Cell* 85, 853–861.
- Cortes, J.L., Sanchez, L., Ligeró, G., Gutierrez-Aranda, I., Catalina, P., Elosua, C., Leone, P.E., Montes, R., Bueno, C., Ramos-Mejía, V., et al. (2009). Mesenchymal stem cells facilitate the derivation of human embryonic stem cells from cryopreserved poor-quality embryos. *Hum. Reprod.* 24, 1844–1851.
- Cosgrove, M.S., and Patel, A. (2010). Mixed lineage leukemia: a structure-function perspective of the MLL1 protein. *FEBS J.* 277, 1832–1842.
- Cumano, A., and Godin, I. (2007). Ontogeny of the hematopoietic system. *Annu. Rev. Immunol.* 25, 745–785.
- D'Andrea, A.D. (2010). Targeting DNA repair pathways in AML. *Best Pract Res Clin Haematol* 23, 469–473.
- Dalla-Favera, R., Bregni, M., Erikson, J., Patterson, D., Gallo, R.C., and Croce, C.M. (1982). Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 7824–7827.
- Dasler, A., and Rabbitts, T.H. (2005). The versatile mixed lineage leukaemia gene MLL and its many associations in leukaemogenesis. *Semin. Cancer Biol.* 15, 175–188.
- Denton, P.W., Nochi, T., Lim, A., Krisko, J.F., Martinez-Torres, F., Choudhary, S.K., Wahl, A., Olesen, R., Zou, W., Di Santo, J.P., et al. (2012). IL-2 receptor γ -chain molecule is critical for intestinal T-cell reconstitution in humanized mice. *Mucosal Immunol* 5, 555–566.
- Deshpande, A.J., Chen, L., Fazio, M., Sinha, A.U., Bernt, K.M., Banka, D., Dias, S., Chang, J., Olhava, E.J., Daigle, S.R., et al. (2013). Leukemic transformation by the MLL-AF6 fusion oncogene requires the H3K79 methyltransferase Dot1l. *Blood* 121, 2533–2541.
- Dhalluin, C., Carlson, J.E., Zeng, L., He, C., Aggarwal, A.K., and Zhou, M.M. (1999). Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature* 399, 491–496.
- DiMartino, J.F., Miller, T., Ayton, P.M., Landewe, T., Hess, J.L., Cleary, M.L., and Shilatifard, A. (2000). A carboxy-terminal domain of ELL is required and sufficient for immortalization of myeloid progenitors by MLL-ELL. *Blood* 96, 3887–3893.
- Djabali, M., Selleri, L., Parry, P., Bower, M., Young, B.D., and Evans, G.A. (1992). A trithorax-like gene is interrupted by chromosome 11q23 translocations in acute leukaemias. *Nat Genet* 2, 113–118.
- Dobbins, S.E., Sherborne, A.L., Ma, Y.P., Bardini, M., Biondi, A., Cazzaniga, G., Lloyd, A., Chubb, D., Greaves, M.F., and Houlston, R.S. (2013). The silent mutational landscape of infant MLL-AF4 pro-B acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 52, 954–960.
- Dobson, C.L., Warren, A.J., Pannell, R., Forster, A., and Rabbitts, T.H. (2000). Tumorigenesis in mice with a fusion of the leukaemia oncogene Mll and the bacterial lacZ gene. *EMBO J.* 19, 843–851.
- Döhner, K., and Döhner, H. (2008). Molecular characterization of acute myeloid leukemia. *Haematologica* 93, 976–982.
- Doorn-Khosrovani, S.B. van W. van, Janssen, J., Maas, L.M., Godschalk, R.W.L., Nijhuis, J.G., and Schooten, F.J. van (2007). Dietary flavonoids induce MLL translocations in primary human CD34+ cells. *Carcinogenesis* 28, 1703–1709.

- Dou, L., Li, J., Zheng, D., Li, Y., Gao, X., Xu, C., Gao, L., Wang, L., and Yu, L. (2013). MicroRNA-205 downregulates mixed-lineage-AF4 oncogene expression in acute lymphoblastic leukemia. *Onco Targets Ther* 6, 1153–1160.
- Dou, Y., Milne, T.A., Tackett, A.J., Smith, E.R., Fukuda, A., Wysocka, J., Allis, C.D., Chait, B.T., Hess, J.L., and Roeder, R.G. (2005). Physical association and coordinate function of the H3 K4 methyltransferase MLL1 and the H4 K16 acetyltransferase MOF. *Cell* 121, 873–885.
- Dou, Y., Milne, T.A., Ruthenburg, A.J., Lee, S., Lee, J.W., Verdine, G.L., Allis, C.D., and Roeder, R.G. (2006). Regulation of MLL1 H3K4 methyltransferase activity by its core components. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 713–719.
- Drake, A.C., Khoury, M., Leskov, I., Iliopoulou, B.P., Fragoso, M., Lodish, H., and Chen, J. (2011). Human CD34+ CD133+ hematopoietic stem cells cultured with growth factors including Angptl5 efficiently engraft adult NOD-SCID Il2 γ ^{-/-} (NSG) mice. *PLoS ONE* 6, e18382.
- Drake, A.C., Chen, Q., and Chen, J. (2012). Engineering humanized mice for improved hematopoietic reconstitution. *Cell. Mol. Immunol.* 9, 215–224.
- Driessen, E.M.C., van Roon, E.H.J., Spijkers-Hagelstein, J.A.P., Schneider, P., de Lorenzo, P., Valsecchi, M.G., Pieters, R., and Stam, R.W. (2013). Frequencies and prognostic impact of RAS mutations in MLL-rearranged acute lymphoblastic leukemia in infants. *Haematologica* 98, 937–944.
- Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R.J., Nguyen, M., Trono, D., and Naldini, L. (1998). A Third-Generation Lentivirus Vector with a Conditional Packaging System. *J. Virol.* 72, 8463–8471.
- Eberle, I., Pless, B., Braun, M., Dingermann, T., and Marschalek, R. (2010). Transcriptional properties of human NANOG1 and NANOG2 in acute leukemic cells. *Nucleic Acids Res.* 38, 5384–5395.
- Eguchi, M., Eguchi-Ishimae, M., and Greaves, M. (2005). Molecular pathogenesis of MLL-associated leukemias. *Int. J. Hematol.* 82, 9–20.
- Ehrhardt, H., Wachter, F., Grunert, M., and Jeremias, I. (2013). Cell cycle-arrested tumor cells exhibit increased sensitivity towards TRAIL-induced apoptosis. *Cell Death Dis* 4, e661.
- Emerenciano, M., Menezes, J., Vasquez, M.L., Zalcborg, I., Thuler, L.C.S., Pombo-de-Oliveira, M.S., and Brazilian Collaborative Study Group of Infant Acute Leukemia (2008). Clinical relevance of FLT3 gene abnormalities in Brazilian patients with infant leukemia. *Leuk. Lymphoma* 49, 2291–2297.
- Emerenciano, M., Meyer, C., Mansur, M.B., Marschalek, R., Pombo-de-Oliveira, M.S., and Brazilian Collaborative Study Group of Infant Acute Leukaemia (2013). The distribution of MLL breakpoints correlates with outcome in infant acute leukaemia. *Br. J. Haematol.* 161, 224–236.
- Erfurth, F., Hemenway, C.S., de Erkenez, A.C., and Domer, P.H. (2004). MLL fusion partners AF4 and AF9 interact at subnuclear foci. *Leukemia* 18, 92–102.
- Ernst, P., Wang, J., Huang, M., Goodman, R.H., and Korsmeyer, S.J. (2001). MLL and CREB bind cooperatively to the nuclear coactivator CREB-binding protein. *Mol. Cell. Biol.* 21, 2249–2258.
- Ernst, P., Mabon, M., Davidson, A.J., Zon, L.I., and Korsmeyer, S.J. (2004). An Mll-dependent Hox program drives hematopoietic progenitor expansion. *Curr. Biol.* 14, 2063–2069.
- Esposito, G., Cevenini, A., Cuomo, A., de Falco, F., Sabbatino, D., Pane, F., Ruoppolo, M., and Salvatore, F. (2011). Protein network study of human AF4 reveals its central role in RNA Pol II-mediated transcription and in phosphorylation-dependent regulatory mechanisms. *Biochem. J.* 438, 121–131.
- Evans, J.T., Kelly, P.F., O'Neill, E., and Garcia, J.V. (1999). Human cord blood CD34+CD38- cell transduction via lentivirus-based gene transfer vectors. *Hum. Gene Ther.* 10, 1479–1489.
- Faber, J., Krivtsov, A.V., Stubbs, M.C., Wright, R., Davis, T.N., van den Heuvel-Eibrink, M., Zwaan, C.M., Kung, A.L., and Armstrong, S.A. (2009). HOXA9 is required for survival in human MLL-rearranged acute leukemias. *Blood* 113, 2375–2385.

- Felix, C.A. (2001). Leukemias related to treatment with DNA topoisomerase II inhibitors*. *Medical and Pediatric Oncology* 36, 525–535.
- Follenzi, A., Ailles, L.E., Bakovic, S., Geuna, M., and Naldini, L. (2000). Gene transfer by lentiviral vectors is limited by nuclear translocation and rescued by HIV-1 pol sequences. *Nat. Genet.* 25, 217–222.
- Frestedt, J.L., Hilden, J.M., Moore, R.O., and Kersey, J.H. (1996). Differential expression of AF4/FEL mRNA in human tissues. *Genet. Anal.* 12, 147–149.
- Fugmann, S.D., Lee, A.I., Shockett, P.E., Villey, I.J., and Schatz, D.G. (2000). The RAG proteins and V(D)J recombination: complexes, ends, and transposition. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 495–527.
- Furuichi, Y., Goi, K., Inukai, T., Sato, H., Nemoto, A., Takahashi, K., Akahane, K., Hirose, K., Honna, H., Kuroda, I., et al. (2007). Fms-like tyrosine kinase 3 ligand stimulation induces MLL-rearranged leukemia cells into quiescence resistant to antileukemic agents. *Cancer Res.* 67, 9852–9861.
- Gabriel, K., Ingram, A., Austin, R., Kapoor, A., Tang, D., Majeed, F., Qureshi, T., and Al-Nedawi, K. (2013). Regulation of the tumor suppressor PTEN through exosomes: a diagnostic potential for prostate cancer. *PLoS ONE* 8, e70047.
- Gaussmann, A., Wenger, T., Eberle, I., Bursen, A., Bracharz, S., Herr, I., Dingermann, T., and Marschalek, R. (2007). Combined effects of the two reciprocal t(4;11) fusion proteins MLL.AF4 and AF4.MLL confer resistance to apoptosis, cell cycling capacity and growth transformation. *Oncogene* 26, 3352–3363.
- Gessner, A., Thomas, M., Castro, P.G., Büchler, L., Scholz, A., Brümmendorf, T.H., Soria, N.M., Vormoor, J., Greil, J., and Heidenreich, O. (2010). Leukemic fusion genes MLL/AF4 and AML1/MTG8 support leukemic self-renewal by controlling expression of the telomerase subunit TERT. *Leukemia* 24, 1751–1759.
- Gillert, E., Leis, T., Repp, R., Reichel, M., Hösch, A., Breitenlohner, I., Angermüller, S., Borkhardt, A., Harbott, J., Lampert, F., et al. (1999). A DNA damage repair mechanism is involved in the origin of chromosomal translocations t(4;11) in primary leukemic cells. *Oncogene* 18, 4663–4671.
- Gilliland, D.G. (2001). Hematologic malignancies. *Curr. Opin. Hematol.* 8, 189–191.
- Gomez-Benito, M., Loayza-Puch, F., Oude Vrielink, J.A.F., Oude Vrielink, J., Otero, M.D., and Agami, R. (2011). 3'UTR-mediated gene silencing of the Mixed Lineage Leukemia (MLL) gene. *PLoS ONE* 6, e25449.
- Grignani, F., Kinsella, T., Mencarelli, A., Valtieri, M., Riganelli, D., Grignani, F., Lanfrancone, L., Peschle, C., Nolan, G.P., and Pelicci, P.G. (1998). High-efficiency gene transfer and selection of human hematopoietic progenitor cells with a hybrid EBV/retroviral vector expressing the green fluorescence protein. *Cancer Res.* 58, 14–19.
- Gu, Y., Cimino, G., Alder, H., Nakamura, T., Prasad, R., Canaani, O., Moir, D.T., Jones, C., Nowell, P.C., and Croce, C.M. (1992). The (4;11)(q21;q23) chromosome translocations in acute leukemias involve the VDJ recombinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 10464–10468.
- Guenther, M.G., Lawton, L.N., Rozovskaia, T., Frampton, G.M., Levine, S.S., Volkert, T.L., Croce, C.M., Nakamura, T., Canaani, E., and Young, R.A. (2008). Aberrant chromatin at genes encoding stem cell regulators in human mixed-lineage leukemia. *Genes Dev.* 22, 3403–3408.
- Hallek, M. (2013). Chronic lymphocytic leukemia: 2013 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *Am. J. Hematol.* 88, 803–816.
- Hashimoto, T., He, Z., Ma, W.-Y., Schmid, P.C., Bode, A.M., Yang, C.S., and Dong, Z. (2004). Caffeine inhibits cell proliferation by G0/G1 phase arrest in JB6 cells. *Cancer Res.* 64, 3344–3349.
- Hazawa, M., Hosokawa, Y., Monzen, S., Yoshino, H., and Kashiwakura, I. (2012). Regulation of DNA damage response and cell cycle in radiation-resistant HL60 myeloid leukemia cells. *Oncol. Rep.* 28, 55–61.

- Heerema, N.A., Sather, H.N., Ge, J., Arthur, D.C., Hilden, J.M., Trigg, M.E., and Reaman, G.H. (1999). Cytogenetic studies of infant acute lymphoblastic leukemia: poor prognosis of infants with t(4;11) - a report of the Children's Cancer Group. *Leukemia* 13, 679–686.
- Hess, J.L., Yu, B.D., Li, B., Hanson, R., and Korsmeyer, S.J. (1997). Defects in yolk sac hematopoiesis in Mll-null embryos. *Blood* 90, 1799–1806.
- Hoffbrand, V., Moss, P., and Pettit, J. (2006). *Essential haematology*, 5th ed. edn. (Wiley-Blackwell).
- Holmes, D.S., and Quigley, M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* 114, 193–197.
- Hong, I.-S., Lee, H.-Y., and Kim, H.-P. (2014). Novel therapeutic approaches for various cancer types using a modified sleeping beauty-based gene delivery system. *PLoS ONE* 9, e86324.
- Hoy, C.A., Seamer, L.C., and Schimke, R.T. (1989). Thermal denaturation of DNA for immunochemical staining of incorporated bromodeoxyuridine (BrdUrd): critical factors that affect the amount of fluorescence and the shape of BrdUrd/DNA histogram. *Cytometry* 10, 718–725.
- Hsieh, J.J.-D., Ernst, P., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Korsmeyer, S.J. (2003). Proteolytic cleavage of MLL generates a complex of N- and C-terminal fragments that confers protein stability and subnuclear localization. *Mol. Cell. Biol.* 23, 186–194.
- Huan, J., Hornick, N.I., Shurtleff, M.J., Skinner, A.M., Goloviznina, N.A., Roberts, C.T., Jr, and Kurre, P. (2013). RNA trafficking by acute myelogenous leukemia exosomes. *Cancer Res.* 73, 918–929.
- Huang, G., Zhao, X., Wang, L., Elf, S., Xu, H., Zhao, X., Sashida, G., Zhang, Y., Liu, Y., Lee, J., et al. (2011). The ability of MLL to bind RUNX1 and methylate H3K4 at PU.1 regulatory regions is impaired by MDS/AML-associated RUNX1/AML1 mutations. *Blood* 118, 6544–6552.
- Isaacs, A.M., Oliver, P.L., Jones, E.L., Jeans, A., Potter, A., Hovik, B.H., Nolan, P.M., Vizer, L., Glenister, P., Simon, A.K., et al. (2003). A mutation in *Af4* is predicted to cause cerebellar ataxia and cataracts in the robotic mouse. *J. Neurosci.* 23, 1631–1637.
- Ishiyama, M., Miyazono, Y., Sasamoto, K., Ohkura, Y., and Ueno, K. (1997). A highly water-soluble disulfonated tetrazolium salt as a chromogenic indicator for NADH as well as cell viability. *Talanta* 44, 1299–1305.
- Isnard, P., Coré, N., Naquet, P., and Djabali, M. (2000). Altered lymphoid development in mice deficient for the *mAF4* proto-oncogene. *Blood* 96, 705–710.
- Ivics, Z., Kaufman, C.D., Zayed, H., Miskey, C., Walisko, O., and Izsvák, Z. (2004). The Sleeping Beauty transposable element: evolution, regulation and genetic applications. *Curr Issues Mol Biol* 6, 43–55.
- Johansson, B., Mertens, F., and Mitelman, F. (1996). Primary vs. secondary neoplasia-associated chromosomal abnormalities--balanced rearrangements vs. genomic imbalances? *Genes Chromosomes Cancer* 16, 155–163.
- Johansson, B., Moorman, A.V., Haas, O.A., Watmore, A.E., Cheung, K.L., Swanton, S., and Secker-Walker, L.M. (1998). Hematologic malignancies with t(4;11)(q21;q23)--a cytogenetic, morphologic, immunophenotypic and clinical study of 183 cases. European 11q23 Workshop participants. *Leukemia* 12, 779–787.
- Kadia, T.M., Kantarjian, H., Kornblau, S., Borthakur, G., Faderl, S., Freireich, E.J., Luthra, R., Garcia-Manero, G., Pierce, S., Cortes, J., et al. (2012). Clinical and proteomic characterization of acute myeloid leukemia with mutated RAS. *Cancer* 118, 5550–5559.
- Kersey, J.H., Wang, D., and Oberto, M. (1998). Resistance of t(4;11) (MLL-AF4 fusion gene) leukemias to stress-induced cell death: possible mechanism for extensive extramedullary accumulation of cells and poor prognosis. *Leukemia* 12, 1561–1564.

- Kim, T.K., and Eberwine, J.H. (2010). Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal Bioanal Chem* 397, 3173–3178.
- Kim, D.S., Lee, M.W., Noh, Y.H., Jang, M.C., Lee, S.H., Son, M.H., Jung, H.L., Yoo, K.H., Sung, K.W., and Koo, H.H. (2013). Engraftment Efficacy of Human Hematopoietic Stem Cells Transplanted into NOD/SCID Mice Using Two Methods: Intra-Bone Marrow Transplantation of Hematopoietic Stem Cells and Intravenous Co-Transplantation with Mesenchymal Stem Cells. *Acta Haematol.* 131, 179–182.
- Koh, C.P., Wang, C.Q., Ng, C.E.L., Ito, Y., Araki, M., Tergaonkar, V., Huang, G., and Osato, M. (2013). RUNX1 meets MLL: epigenetic regulation of hematopoiesis by two leukemia genes. *Leukemia* 27, 1793–1802.
- Kosmider, O., and Moreau-Gachelin, F. (2006). From mice to human: the “two-hit model” of leukemogenesis. *Cell Cycle* 5, 569–570.
- Kowarz, E., Burmeister, T., Lo Nigro, L., Jansen, M.W.J.C., Delabesse, E., Klingebiel, T., Dingermann, T., Meyer, C., and Marschalek, R. (2007). Complex MLL rearrangements in t(4;11) leukemia patients with absent AF4.MLL fusion allele. *Leukemia* 21, 1232–1238.
- Krivtsov, A.V., Feng, Z., Lemieux, M.E., Faber, J., Vempati, S., Sinha, A.U., Xia, X., Jesneck, J., Bracken, A.P., Silverman, L.B., et al. (2008). H3K79 methylation profiles define murine and human MLL-AF4 leukemias. *Cancer Cell* 14, 355–368.
- Kuiper, R.P., Schoenmakers, E.F.P.M., van Reijmersdal, S.V., Hehir-Kwa, J.Y., van Kessel, A.G., van Leeuwen, F.N., and Hoogerbrugge, P.M. (2007). High-resolution genomic profiling of childhood ALL reveals novel recurrent genetic lesions affecting pathways involved in lymphocyte differentiation and cell cycle progression. *Leukemia* 21, 1258–1266.
- Kumar, A.R., Yao, Q., Li, Q., Sam, T.A., and Kersey, J.H. (2011). t(4;11) leukemias display addiction to MLL-AF4 but not to AF4-MLL. *Leuk. Res.* 35, 305–309.
- Kumar, M., Keller, B., Makalou, N., and Sutton, R.E. (2001). Systematic determination of the packaging limit of lentiviral vectors. *Hum. Gene Ther.* 12, 1893–1905.
- Kurzrock, R., Kantarjian, H.M., Druker, B.J., and Talpaz, M. (2003). Philadelphia chromosome-positive leukemias: from basic mechanisms to molecular therapeutics. *Ann. Intern. Med.* 138, 819–830.
- Lan, P., Tonomura, N., Shimizu, A., Wang, S., and Yang, Y.-G. (2006). Reconstitution of a functional human immune system in immunodeficient mice through combined human fetal thymus/liver and CD34+ cell transplantation. *Blood* 108, 487–492.
- Lavau, C., Luo, R.T., Du, C., and Thirman, M.J. (2000). Retrovirus-mediated gene transfer of MLL-ELL transforms primary myeloid progenitors and causes acute myeloid leukemias in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 10984–10989.
- Lavoie, J.R., and Rosu-Myles, M. (2013). Uncovering the secrets of mesenchymal stem cells. *Biochimie* 95, 2212–2221.
- Li, Q., Frestedt, J.L., and Kersey, J.H. (1998). AF4 encodes a ubiquitous protein that in both native and MLL-AF4 fusion types localizes to subnuclear compartments. *Blood* 92, 3841–3847.
- Liang, D.-C., Shih, L.-Y., Fu, J.-F., Li, H.-Y., Wang, H.-I., Hung, I.-J., Yang, C.-P., Jaing, T.-H., Chen, S.-H., and Liu, H.-C. (2006). K-Ras mutations and N-Ras mutations in childhood acute leukemias with or without mixed-lineage leukemia gene rearrangements. *Cancer* 106, 950–956.
- Liu, H., Cheng, E.H.-Y., and Hsieh, J.J.-D. (2007). Bimodal degradation of MLL by SCFSkp2 and APC/Cdc20 assures cell cycle execution: a critical regulatory circuit lost in leukemogenic MLL fusions. *Genes Dev.* 21, 2385–2398.
- Liu, H., Takeda, S., Kumar, R., Westergard, T.D., Brown, E.J., Pandita, T.K., Cheng, E.H.-Y., and Hsieh, J.J.-D. (2010). Phosphorylation of MLL by ATR is required for execution of mammalian S-phase checkpoint. *Nature* 467, 343–346.

- Look, A.T. (1997). Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science* 278, 1059–1064.
- Ma, C., and Staudt, L.M. (1996). LAF-4 encodes a lymphoid nuclear protein with transactivation potential that is homologous to AF-4, the gene fused to MLL in t(4;11) leukemias. *Blood* 87, 734–745.
- Ma, Q., Alder, H., Nelson, K.K., Chatterjee, D., Gu, Y., Nakamura, T., Canaani, E., Croce, C.M., Siracusa, L.D., and Buchberg, A.M. (1993). Analysis of the murine All-1 gene reveals conserved domains with human ALL-1 and identifies a motif shared with DNA methyltransferases. *PNAS* 90, 6350–6354.
- Mahgoub, N., Parker, R.I., Hosler, M.R., Close, P., Winick, N.J., Masterson, M., Shannon, K.M., and Felix, C.A. (1998). RAS mutations in pediatric leukemias with MLL gene rearrangements. *Genes Chromosomes Cancer* 21, 270–275.
- Mak, A.B., Nixon, A.M.L., and Moffat, J. (2012). The mixed lineage leukemia (MLL) fusion-associated gene AF4 promotes CD133 transcription. *Cancer Res.* 72, 1929–1934.
- Malette, F.A., Gaumont-Leclerc, M.-F., and Ferbeyre, G. (2007). The DNA damage signaling pathway is a critical mediator of oncogene-induced senescence. *Genes Dev.* 21, 43–48.
- Marchesi, F., Girardi, K., and Avvisati, G. (2011). Pathogenetic, Clinical, and Prognostic Features of Adult t(4;11)(q21;q23)/MLL-AF4 Positive B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Adv Hematol* 2011, 621627.
- Marenholz, I., Heizmann, C.W., and Fritz, G. (2004). S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322, 1111–1122.
- Marks, D.I., Moorman, A.V., Chilton, L., Paietta, E., Enshaie, A., DeWald, G., Harrison, C.J., Fielding, A.K., Foroni, L., Goldstone, A.H., et al. (2013). The clinical characteristics, therapy and outcome of 85 adults with acute lymphoblastic leukemia and t(4;11)(q21;q23)/MLL-AFF1 prospectively treated in the UKALLXII/ECOG2993 trial. *Haematologica* 98, 945–952.
- Marschalek, R. (2010). Mixed lineage leukemia: roles in human malignancies and potential therapy. *FEBS J.* 277, 1822–1831.
- Marschalek, R. (2011). Mechanisms of leukemogenesis by MLL fusion proteins. *Br. J. Haematol.* 152, 141–154.
- Marschalek, R., Greil, J., Löchner, K., Nilson, I., Siegler, G., Zweckbronner, I., Beck, J.D., and Fey, G.H. (1995). Molecular analysis of the chromosomal breakpoint and fusion transcripts in the acute lymphoblastic SEM cell line with chromosomal translocation t(4;11). *Br. J. Haematol.* 90, 308–320.
- Marschalek, R., Nilson, I., Löchner, K., Greim, R., Siegler, G., Greil, J., Beck, J.D., and Fey, G.H. (1997). The structure of the human ALL-1/MLL/HRX gene. *Leuk. Lymphoma* 27, 417–428.
- Martin, M.E., Milne, T.A., Bloyer, S., Galoian, K., Shen, W., Gibbs, D., Brock, H.W., Slany, R., and Hess, J.L. (2003). Dimerization of MLL fusion proteins immortalizes hematopoietic cells. *Cancer Cell* 4, 197–207.
- Menendez, P., Catalina, P., Rodríguez, R., Melen, G.J., Bueno, C., Arriero, M., García-Sánchez, F., Lassaletta, A., García-Sanz, R., and García-Castro, J. (2009). Bone marrow mesenchymal stem cells from infants with MLL-AF4+ acute leukemia harbor and express the MLL-AF4 fusion gene. *J. Exp. Med.* 206, 3131–3141.
- Metzger, D., and Chambon, P. (2001). Site- and time-specific gene targeting in the mouse. *Methods* 24, 71–80.
- Metzler, M., Forster, A., Pannell, R., Arends, M.J., Daser, A., Lobato, M.N., and Rabbitts, T.H. (2006). A conditional model of MLL-AF4 B-cell tumorigenesis using invertebrate technology. *Oncogene* 25, 3093–3103.

- Meyer, C., Schneider, B., Reichel, M., Angermueller, S., Strehl, S., Schnittger, S., Schoch, C., Jansen, M.W.J.C., van Dongen, J.J., Pieters, R., et al. (2005). Diagnostic tool for the identification of MLL rearrangements including unknown partner genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *102*, 449–454.
- Meyer, C., Kowarz, E., Schneider, B., Oehm, C., Klingebiel, T., Dinger, T., and Marschalek, R. (2006). Genomic DNA of leukemic patients: target for clinical diagnosis of MLL rearrangements. *Biotechnol J* *1*, 656–663.
- Meyer, C., Hofmann, J., Burmeister, T., Gröger, D., Park, T.S., Emerenciano, M., Pombo de Oliveira, M., Renneville, A., Villarese, P., Macintyre, E., et al. (2013). The MLL recombinome of acute leukemias in 2013. *Leukemia* *27*, 2165–2176.
- Milne, T.A., Briggs, S.D., Brock, H.W., Martin, M.E., Gibbs, D., Allis, C.D., and Hess, J.L. (2002). MLL targets SET domain methyltransferase activity to Hox gene promoters. *Mol. Cell* *10*, 1107–1117.
- Milne, T.A., Hughes, C.M., Lloyd, R., Yang, Z., Rozenblatt-Rosen, O., Dou, Y., Schnepf, R.W., Krankel, C., Livolsi, V.A., Gibbs, D., et al. (2005). Menin and MLL cooperatively regulate expression of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *102*, 749–754.
- Montes, R., Ayllón, V., Gutierrez-Aranda, I., Prat, I., Hernández-Lamas, M.C., Ponce, L., Bresolin, S., Te Kronnie, G., Greaves, M., Bueno, C., et al. (2011). Enforced expression of MLL-AF4 fusion in cord blood CD34+ cells enhances the hematopoietic repopulating cell function and clonogenic potential but is not sufficient to initiate leukemia. *Blood* *117*, 4746–4758.
- Montes, R., Ayllón, V., Prieto, C., Bursen, A., Prella, C., Romero-Moya, D., Real, P.J., Navarro-Montero, O., Chillón, C., Marschalek, R., et al. (2013). Ligand-independent FLT3 activation does not cooperate with MLL-AF4 to immortalize/transform cord blood CD34+ cells. *Leukemia*.
- Moore, J.C., Atze, K., Yeung, P.L., Toro-Ramos, A.J., Camarillo, C., Thompson, K., Ricupero, C.L., Breneman, M.A., Cohen, R.I., and Hart, R.P. (2010). Efficient, high-throughput transfection of human embryonic stem cells. *Stem Cell Res Ther* *1*, 23.
- Moorman, A.V. (2012). The clinical relevance of chromosomal and genomic abnormalities in B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Blood Rev.* *26*, 123–135.
- Mörücke, A., Zimmermann, M., Reiter, A., Henze, G., Schrauder, A., Gadner, H., Ludwig, W.D., Ritter, J., Harbott, J., Mann, G., et al. (2010). Long-term results of five consecutive trials in childhood acute lymphoblastic leukemia performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 2000. *Leukemia* *24*, 265–284.
- Morita, S., Kojima, T., and Kitamura, T. (2000). Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. *Gene Ther.* *7*, 1063–1066.
- Moriya, K., Suzuki, M., Watanabe, Y., Takahashi, T., Aoki, Y., Uchiyama, T., Kumaki, S., Sasahara, Y., Minegishi, M., Kure, S., et al. (2012). Development of a multi-step leukemogenesis model of MLL-rearranged leukemia using humanized mice. *PLoS ONE* *7*, e37892.
- Morrissey, J., Tkachuk, D.C., Milatovich, A., Francke, U., Link, M., and Cleary, M.L. (1993). A serine/proline-rich protein is fused to HRX in t(4;11) acute leukemias. *Blood* *81*, 1124–1131.
- Morse, H.C., 3rd, Anver, M.R., Fredrickson, T.N., Haines, D.C., Harris, A.W., Harris, N.L., Jaffe, E.S., Kogan, S.C., MacLennan, I.C.M., Pattengale, P.K., et al. (2002). Bethesda proposals for classification of lymphoid neoplasms in mice. *Blood* *100*, 246–258.
- Muntean, A.G., and Hess, J.L. (2012). The pathogenesis of mixed-lineage leukemia. *Annu Rev Pathol* *7*, 283–301.
- Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H.K., and Schäfer-Korting, M. (2001). *Arzneimittelwirkungen-Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*, 8. Auflage (Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart).

- Nagy, P.L., Griesenbeck, J., Kornberg, R.D., and Cleary, M.L. (2002). A trithorax-group complex purified from *Saccharomyces cerevisiae* is required for methylation of histone H3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *99*, 90–94.
- Nakamura, T., Mori, T., Tada, S., Krajewski, W., Rozovskaia, T., Wassell, R., Dubois, G., Mazo, A., Croce, C.M., and Canaani, E. (2002). ALL-1 is a histone methyltransferase that assembles a supercomplex of proteins involved in transcriptional regulation. *Mol. Cell* *10*, 1119–1128.
- Nakamura, T., Canaani, E., and Croce, C.M. (2007). Oncogenic All1 fusion proteins target Drosha-mediated microRNA processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *104*, 10980–10985.
- Nakanishi, H., Nakamura, T., Canaani, E., and Croce, C.M. (2007). ALL1 fusion proteins induce deregulation of EphA7 and ERK phosphorylation in human acute leukemias. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *104*, 14442–14447.
- Naldini, L. (1998). Lentiviruses as gene transfer agents for delivery to non-dividing cells. *Curr. Opin. Biotechnol.* *9*, 457–463.
- Ng, M.-H.J., Ng, R.K., Kong, C.-T., Jin, D.-Y., and Chan, L.-C. (2010). Activation of Ras-dependent Elk-1 activity by MLL-AF4 family fusion oncoproteins. *Exp. Hematol.* *38*, 481–488.
- Nielsen, J.S., and McNagny, K.M. (2008). Novel functions of the CD34 family. *J. Cell. Sci.* *121*, 3683–3692.
- Nilson, I., LöCHNER, K., Siegler, G., Greil, J., Beck, J.D., Fey, G.H., and Marschalek, R. (1996). Exon/intron structure of the human ALL-1 (MLL) gene involved in translocations to chromosomal region 11q23 and acute leukaemias. *British Journal of Haematology* *93*, 966–972.
- Nilson, I., Reichel, M., Ennas, M.G., Greim, R., Knörr, C., Siegler, G., Greil, J., Fey, G.H., and Marschalek, R. (1997). Exon/intron structure of the human AF-4 gene, a member of the AF-4/LAF-4/FMR-2 gene family coding for a nuclear protein with structural alterations in acute leukaemia. *Br. J. Haematol.* *98*, 157–169.
- Nowell, P.C. (2007). Discovery of the Philadelphia chromosome: a personal perspective. *J. Clin. Invest.* *117*, 2033–2035.
- Okuda, T., van Deursen, J., Hiebert, S.W., Grosveld, G., and Downing, J.R. (1996). AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell* *84*, 321–330.
- Okuda, T., Nishimura, M., Nakao, M., and Fujita, Y. (2001). RUNX1/AML1: a central player in hematopoiesis. *Int. J. Hematol.* *74*, 252–257.
- Oliver, P.L., Bitoun, E., Clark, J., Jones, E.L., and Davies, K.E. (2004). Mediation of Af4 protein function in the cerebellum by Siah proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *101*, 14901–14906.
- Ono, R., Ihara, M., Nakajima, H., Ozaki, K., Kataoka-Fujiwara, Y., Taki, T., Nagata, K.-I., Inagaki, M., Yoshida, N., Kitamura, T., et al. (2005a). Disruption of Sept6, a fusion partner gene of MLL, does not affect ontogeny, leukemogenesis induced by MLL-SEPT6, or phenotype induced by the loss of Sept4. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 10965–10978.
- Ono, R., Nosaka, T., and Hayashi, Y. (2005b). Roles of a trithorax group gene, MLL, in hematopoiesis. *Int. J. Hematol.* *81*, 288–293.
- Orkin, S.H., and Zon, L.I. (2008). Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* *132*, 631–644.
- Park, S., Osmer, U., Raman, G., Schwantes, R.H., Diaz, M.O., and Bushweller, J.H. (2010). The PHD3 domain of MLL acts as a CYP33-regulated switch between MLL-mediated activation and repression. *Biochemistry* *49*, 6576–6586.

- Pedersen-Bjergaard, J., and Rowley, J.D. (1994). The balanced and the unbalanced chromosome aberrations of acute myeloid leukemia may develop in different ways and may contribute differently to malignant transformation. *Blood* 83, 2780–2786.
- Peister, A., Mellad, J.A., Wang, M., Tucker, H.A., and Prockop, D.J. (2004). Stable transfection of MSCs by electroporation. *Gene Ther.* 11, 224–228.
- Pereira, C., Clarke, E., and Damen, J. (2007). Hematopoietic Colony-Forming Cell Assays. In *Stem Cell Assays*, M.C. Vemuri, ed. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 177–208.
- Pieters, R., Schrappe, M., De Lorenzo, P., Hann, I., De Rossi, G., Felice, M., Hovi, L., LeBlanc, T., Szczepanski, T., Ferster, A., et al. (2007). A treatment protocol for infants younger than 1 year with acute lymphoblastic leukaemia (Interfant-99): an observational study and a multicentre randomised trial. *Lancet* 370, 240–250.
- Pless, B., Oehm, C., Knauer, S., Stauber, R.H., Dingermann, T., and Marschalek, R. (2011). The heterodimerization domains of MLL-FYRN and FYRC--are potential target structures in t(4;11) leukemia. *Leukemia* 25, 663–670.
- Prasad, R., Yano, T., Sorio, C., Nakamura, T., Rallapalli, R., Gu, Y., Leshkowitz, D., Croce, C.M., and Canaani, E. (1995). Domains with transcriptional regulatory activity within the ALL1 and AF4 proteins involved in acute leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 12160–12164.
- Prelle, C., Bursen, A., Dingermann, T., and Marschalek, R. (2013). Secondary mutations in t(4;11) leukemia patients. *Leukemia* 27, 1425–1427.
- Pui, C.H., Frankel, L.S., Carroll, A.J., Raimondi, S.C., Shuster, J.J., Head, D.R., Crist, W.M., Land, V.J., Pullen, D.J., and Steuber, C.P. (1991). Clinical characteristics and treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia with the t(4;11)(q21;q23): a collaborative study of 40 cases. *Blood* 77, 440–447.
- Pui, C.-H., Carroll, W.L., Meshinchi, S., and Arceci, R.J. (2011). Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. *J. Clin. Oncol.* 29, 551–565.
- Pui, C.-H., Mullighan, C.G., Evans, W.E., and Relling, M.V. (2012). Pediatric acute lymphoblastic leukemia: where are we going and how do we get there? *Blood* 120, 1165–1174.
- Purton, L.E., and Scadden, D.T. (2007). Limiting factors in murine hematopoietic stem cell assays. *Cell Stem Cell* 1, 263–270.
- Rabbitts, T.H. (1999). Perspective: chromosomal translocations can affect genes controlling gene expression and differentiation--why are these functions targeted? *J. Pathol.* 187, 39–42.
- Reichel, M., Gillert, E., Nilson, I., Siegler, G., Greil, J., Fey, G.H., and Marschalek, R. (1998). Fine structure of translocation breakpoints in leukemic blasts with chromosomal translocation t(4;11): the DNA damage-repair model of translocation. *Oncogene* 17, 3035–3044.
- Reichel, M., Gillert, E., Breitenlohner, I., Repp, R., Greil, J., Beck, J.D., Fey, G.H., and Marschalek, R. (1999). Rapid isolation of chromosomal breakpoints from patients with t(4;11) acute lymphoblastic leukemia: implications for basic and clinical research. *Cancer Res.* 59, 3357–3362.
- Ringrose, L., and Paro, R. (2004). Epigenetic Regulation of Cellular Memory by the Polycomb and Trithorax Group Proteins. *Annual Review of Genetics* 38, 413–443.
- Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (2013). *Krebs in Deutschland 2009/2010* 9. Ausgabe.
- Rooney, S., Chaudhuri, J., and Alt, F.W. (2004). The role of the non-homologous end-joining pathway in lymphocyte development. *Immunol. Rev.* 200, 115–131.
- Rössler, T., and Marschalek, R. (2013). An alternative splice process renders the MLL protein either into a transcriptional activator or repressor. *Pharmazie* 68, 601–607.

- Rowley, J.D. (1973). Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 243, 290–293.
- Rubnitz, J.E., Morrissey, J., Savage, P.A., and Cleary, M.L. (1994). ENL, the gene fused with HRX in t(11;19) leukemias, encodes a nuclear protein with transcriptional activation potential in lymphoid and myeloid cells. *Blood* 84, 1747–1752.
- Rubnitz, J.E., Behm, F.G., and Downing, J.R. (1996). 11q23 rearrangements in acute leukemia. *Leukemia* 10, 74–82.
- Sánchez-García, I. (1997). Consequences of chromosomal abnormalities in tumor development. *Annu. Rev. Genet.* 31, 429–453.
- Sánchez-García, I., and Rabbitts, T.H. (1993). LIM domain proteins in leukaemia and development. *Semin. Cancer Biol.* 4, 349–358.
- Sanders, D.S., Muntean, A.G., and Hess, J.L. (2011). Significance of AF4-MLL reciprocal fusion in t(4;11) leukemias? *Leuk. Res.* 35, 299–300.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 5463–5467.
- Sarkaria, J.N., Busby, E.C., Tibbetts, R.S., Roos, P., Taya, Y., Karnitz, L.M., and Abraham, R.T. (1999). Inhibition of ATM and ATR kinase activities by the radiosensitizing agent, caffeine. *Cancer Res.* 59, 4375–4382.
- Scharf, S., Zech, J., Bursen, A., Schraets, D., Oliver, P.L., Kliem, S., Pfitzner, E., Gillert, E., Dingermann, T., and Marschalek, R. (2007). Transcription linked to recombination: a gene-internal promoter coincides with the recombination hot spot II of the human MLL gene. *Oncogene* 26, 1361–1371.
- Schichman, S.A., Caligiuri, M.A., Gu, Y., Strout, M.P., Canaani, E., Bloomfield, C.D., and Croce, C.M. (1994). ALL-1 partial duplication in acute leukemia. *PNAS* 91, 6236–6239.
- Schnittger, S., Bacher, U., Haferlach, C., Alpermann, T., Kern, W., and Haferlach, T. (2012). Diversity of the juxtamembrane and TKD1 mutations (exons 13-15) in the FLT3 gene with regards to mutant load, sequence, length, localization, and correlation with biological data. *Genes Chromosomes Cancer* 51, 910–924.
- Schubbert, S., Shannon, K., and Bollag, G. (2007). Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 7, 295–308.
- Schuettengruber, B., Martinez, A.-M., Iovino, N., and Cavalli, G. (2011). Trithorax group proteins: switching genes on and keeping them active. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 799–814.
- Shen, C., Jo, S.Y., Liao, C., Hess, J.L., and Nikolovska-Coleska, Z. (2013). Targeting recruitment of disruptor of telomeric silencing 1-like (DOT1L): characterizing the interactions between DOT1L and mixed lineage leukemia (MLL) fusion proteins. *J. Biol. Chem.* 288, 30585–30596.
- Shen, F.W., Saga, Y., Litman, G., Freeman, G., Tung, J.S., Cantor, H., and Boyse, E.A. (1985). Cloning of Ly-5 cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 7360–7363.
- Shih, A.H., Abdel-Wahab, O., Patel, J.P., and Levine, R.L. (2012). The role of mutations in epigenetic regulators in myeloid malignancies. *Nat. Rev. Cancer* 12, 599–612.
- Shultz, L.D., Lyons, B.L., Burzenski, L.M., Gott, B., Chen, X., Chaleff, S., Kotb, M., Gillies, S.D., King, M., Mangada, J., et al. (2005). Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. *J. Immunol.* 174, 6477–6489.
- Simons, M., and Raposo, G. (2009). Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21, 575–581.

- Sison, E.A.R., Rau, R.E., McIntyre, E., Li, L., Small, D., and Brown, P. (2013). MLL-rearranged acute lymphoblastic leukaemia stem cell interactions with bone marrow stroma promote survival and therapeutic resistance that can be overcome with CXCR4 antagonism. *Br. J. Haematol.* *160*, 785–797.
- Slany, R.K. (2010). When speed matters: leukemogenic transformation by MLL fusion proteins. *Cell Cycle* *9*, 2475–2476.
- Slany, R.K., Lavau, C., and Cleary, M.L. (1998). The oncogenic capacity of HRX-ENL requires the transcriptional transactivation activity of ENL and the DNA binding motifs of HRX. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 122–129.
- Smith, E., Lin, C., and Shilatifard, A. (2011). The super elongation complex (SEC) and MLL in development and disease. *Genes Dev.* *25*, 661–672.
- So, C.W., Lin, M., Ayton, P.M., Chen, E.H., and Cleary, M.L. (2003). Dimerization contributes to oncogenic activation of MLL chimeras in acute leukemias. *Cancer Cell* *4*, 99–110.
- Somerville, T.C.P., and Cleary, M.L. (2010). Grist for the MLL: how do MLL oncogenic fusion proteins generate leukemia stem cells? *Int. J. Hematol.* *91*, 735–741.
- Spector, L.G., Xie, Y., Robison, L.L., Heerema, N.A., Hilden, J.M., Lange, B., Felix, C.A., Davies, S.M., Slavin, J., Potter, J.D., et al. (2005). Maternal diet and infant leukemia: the DNA topoisomerase II inhibitor hypothesis: a report from the children's oncology group. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* *14*, 651–655.
- Spijkers-Hagelstein, J.A.P., Schneider, P., Hulleman, E., de Boer, J., Williams, O., Pieters, R., and Stam, R.W. (2012). Elevated S100A8/S100A9 expression causes glucocorticoid resistance in MLL-rearranged infant acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* *26*, 1255–1265.
- Stam, R.W. (2013). The ongoing conundrum of MLL-AF4 driven leukemogenesis. *Blood* *121*, 3780–3781.
- Stam, R.W., Schneider, P., de Lorenzo, P., Valsecchi, M.G., den Boer, M.L., and Pieters, R. (2007). Prognostic significance of high-level FLT3 expression in MLL-rearranged infant acute lymphoblastic leukemia. *Blood* *110*, 2774–2775.
- Stam, R.W., Schneider, P., Hagelstein, J.A.P., van der Linden, M.H., Stumpel, D.J.P.M., de Menezes, R.X., de Lorenzo, P., Valsecchi, M.G., and Pieters, R. (2010). Gene expression profiling-based dissection of MLL translocated and MLL germline acute lymphoblastic leukemia in infants. *Blood* *115*, 2835–2844.
- Stirewalt, D.L., and Radich, J.P. (2003). The role of FLT3 in haematopoietic malignancies. *Nat. Rev. Cancer* *3*, 650–665.
- Strick, R., Strissel, P.L., Borgers, S., Smith, S.L., and Rowley, J.D. (2000). Dietary bioflavonoids induce cleavage in the MLL gene and may contribute to infant leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *97*, 4790–4795.
- Strissel, P.L., Strick, R., Rowley, J.D., and Zeleznik-Le, N.J. (1998). An In Vivo Topoisomerase II Cleavage Site and a DNase I Hypersensitive Site Colocalize Near Exon 9 in the MLL Breakpoint Cluster Region. *Blood* *92*, 3793–3803.
- Strout, M.P., Marcucci, G., Bloomfield, C.D., and Caligiuri, M.A. (1998). The partial tandem duplication of ALL1 (MLL) is consistently generated by Alu-mediated homologous recombination in acute myeloid leukemia. *PNAS* *95*, 2390–2395.
- Sumiyoshi, T., Holt, N.G., Hollis, R.P., Ge, S., Cannon, P.M., Crooks, G.M., and Kohn, D.B. (2009). Stable transgene expression in primitive human CD34+ hematopoietic stem/progenitor cells, using the Sleeping Beauty transposon system. *Hum. Gene Ther.* *20*, 1607–1626.
- Swerdlow, S.H., Campo, E., Harris, N.L., Jaffe, E.S., Pileri, S.A., Stein, H., Thiele, J., and Vardiman, J.W. (2008). WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Fourth Edition, Volume 2 (WHO).

- Takacova, S., Slany, R., Bartkova, J., Stranecky, V., Dolezel, P., Luzna, P., Bartek, J., and Divoky, V. (2012). DNA damage response and inflammatory signaling limit the MLL-ENL-induced leukemogenesis in vivo. *Cancer Cell* 21, 517–531.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663–676.
- Takashima, A., and Faller, D.V. (2013). Targeting the RAS oncogene. *Expert Opin. Ther. Targets* 17, 507–531.
- Takeda, S., Chen, D.Y., Westergard, T.D., Fisher, J.K., Rubens, J.A., Sasagawa, S., Kan, J.T., Korsmeyer, S.J., Cheng, E.H.-Y., and Hsieh, J.J.-D. (2006). Proteolysis of MLL family proteins is essential for *taspase1*-orchestrated cell cycle progression. *Genes Dev.* 20, 2397–2409.
- Taketani, T., Taki, T., Sugita, K., Furuichi, Y., Ishii, E., Hanada, R., Tsuchida, M., Sugita, K., Ida, K., and Hayashi, Y. (2004). FLT3 mutations in the activation loop of tyrosine kinase domain are frequently found in infant ALL with MLL rearrangements and pediatric ALL with hyperdiploidy. *Blood* 103, 1085–1088.
- Tallen, G., Ratei, R., Mann, G., Kaspers, G., Niggli, F., Karachunsky, A., Ebell, W., Escherich, G., Schrappe, M., Klingebiel, T., et al. (2010). Long-term outcome in children with relapsed acute lymphoblastic leukemia after time-point and site-of-relapse stratification and intensified short-course multidrug chemotherapy: results of trial ALL-REZ BFM 90. *J. Clin. Oncol.* 28, 2339–2347.
- Tamai, H., and Inokuchi, K. (2010). 11q23/MLL acute leukemia : update of clinical aspects. *J Clin Exp Hematop* 50, 91–98.
- Tamai, H., and Inokuchi, K. (2013). Establishment of MLL/AF4 transgenic mice with the phenotype of lymphoblastic leukemia or lymphoma. *J Nippon Med Sch* 80, 326–327.
- Tamai, H., Miyake, K., Takatori, M., Miyake, N., Yamaguchi, H., Dan, K., Shimada, T., and Inokuchi, K. (2011a). Activated K-Ras protein accelerates human MLL/AF4-induced leukemo-lymphomogenicity in a transgenic mouse model. *Leukemia* 25, 888–891.
- Tamai, H., Miyake, K., Yamaguchi, H., Takatori, M., Dan, K., Inokuchi, K., and Shimada, T. (2011b). Resistance of MLL-AFF1-positive acute lymphoblastic leukemia to tumor necrosis factor-alpha is mediated by S100A6 upregulation. *Blood Cancer J* 1, e38.
- Tamai, H., Miyake, K., Yamaguchi, H., Takatori, M., Dan, K., Inokuchi, K., and Shimada, T. (2012). AAV8 vector expressing IL24 efficiently suppresses tumor growth mediated by specific mechanisms in MLL/AF4-positive ALL model mice. *Blood* 119, 64–71.
- Tenen, D.G., Hromas, R., Licht, J.D., and Zhang, D.E. (1997). Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia. *Blood* 90, 489–519.
- Terranova, R., Agherbi, H., Boned, A., Meresse, S., and Djabali, M. (2006). Histone and DNA methylation defects at Hox genes in mice expressing a SET domain-truncated form of Mll. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 6629–6634.
- Teyssier, J.R., Bartram, C.R., Deville, J., Potron, G., and Pigeon, F. (1985). c-abl Oncogene and chromosome 22 “bcr” juxtaposition in chronic myelogenous leukemia. *N. Engl. J. Med.* 312, 1393–1394.
- Thirman, M.J., Gill, H.J., Burnett, R.C., Mbangkollo, D., McCabe, N.R., Kobayashi, H., Ziemer-van der Poel, S., Kaneko, Y., Morgan, R., and Sandberg, A.A. (1993). Rearrangement of the MLL gene in acute lymphoblastic and acute myeloid leukemias with 11q23 chromosomal translocations. *N. Engl. J. Med.* 329, 909–914.
- Thomas, M., Gessner, A., Vornlocher, H.-P., Hadwiger, P., Greil, J., and Heidenreich, O. (2005). Targeting MLL-AF4 with short interfering RNAs inhibits clonogenicity and engraftment of t(4;11)-positive human leukemic cells. *Blood* 106, 3559–3566.

- Tkachuk, D.C., Kohler, S., and Cleary, M.L. (1992). Involvement of a homolog of *Drosophila trithorax* by 11q23 chromosomal translocations in acute leukemias. *Cell* 71, 691–700.
- Trentin, L., Giordan, M., Dingermann, T., Basso, G., Te Kronnie, G., and Marschalek, R. (2009). Two independent gene signatures in pediatric t(4;11) acute lymphoblastic leukemia patients. *Eur. J. Haematol.* 83, 406–419.
- Tyagi, S., Chabes, A.L., Wysocka, J., and Herr, W. (2007). E2F activation of S phase promoters via association with HCF-1 and the MLL family of histone H3K4 methyltransferases. *Mol. Cell* 27, 107–119.
- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J.J., and Lötvall, J.O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* 9, 654–659.
- Van der Velden, V.H.J., Corral, L., Valsecchi, M.G., Jansen, M.W.J.C., De Lorenzo, P., Cazzaniga, G., Panzer-Grümayer, E.R., Schrappe, M., Schrauder, A., Meyer, C., et al. (2009). Prognostic significance of minimal residual disease in infants with acute lymphoblastic leukemia treated within the Interfant-99 protocol. *Leukemia* 23, 1073–1079.
- Vodyanik, M.A., Bork, J.A., Thomson, J.A., and Slukvin, I.I. (2005). Human embryonic stem cell-derived CD34+ cells: efficient production in the coculture with OP9 stromal cells and analysis of lymphohematopoietic potential. *Blood* 105, 617–626.
- Wan, X., Hu, B., Liu, J., Feng, X., and Xiao, W. (2011). Zebrafish *mll* gene is essential for hematopoiesis. *J. Biol. Chem.* 286, 33345–33357.
- Wang, L., Li, L., Shojaei, F., Levac, K., Cerdan, C., Menendez, P., Martin, T., Rouleau, A., and Bhatia, M. (2004). Endothelial and hematopoietic cell fate of human embryonic stem cells originates from primitive endothelium with hemangioblastic properties. *Immunity* 21, 31–41.
- Ward, A.F., Braun, B.S., and Shannon, K.M. (2012). Targeting oncogenic Ras signaling in hematologic malignancies. *Blood* 120, 3397–3406.
- Whiteside, T.L. (2013). Immune modulation of T-cell and NK (natural killer) cell activities by TEXs (tumour-derived exosomes). *Biochem. Soc. Trans.* 41, 245–251.
- Wilkinson, A.C., Ballabio, E., Geng, H., North, P., Tapia, M., Kerry, J., Biswas, D., Roeder, R.G., Allis, C.D., Melnick, A., et al. (2013). RUNX1 is a key target in t(4;11) leukemias that contributes to gene activation through an AF4-MLL complex interaction. *Cell Rep* 3, 116–127.
- Xia, Z.-B., Anderson, M., Diaz, M.O., and Zeleznik-Le, N.J. (2003). MLL repression domain interacts with histone deacetylases, the polycomb group proteins HPC2 and BMI-1, and the corepressor C-terminal-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 8342–8347.
- Xia, Z.-B., Popovic, R., Chen, J., Theisler, C., Stuart, T., Santillan, D.A., Erfurth, F., Diaz, M.O., and Zeleznik-Le, N.J. (2005). The MLL fusion gene, MLL-AF4, regulates cyclin-dependent kinase inhibitor CDKN1B (p27kip1) expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 14028–14033.
- Yagi, H., Deguchi, K., Aono, A., Tani, Y., Kishimoto, T., and Komori, T. (1998). Growth disturbance in fetal liver hematopoiesis of Mll-mutant mice. *Blood* 92, 108–117.
- Yamaguchi, H., Hanawa, H., Uchida, N., Inamai, M., Sawaguchi, K., Mitamura, Y., Shimada, T., Dan, K., and Inokuchi, K. (2009). Multistep pathogenesis of leukemia via the MLL-AF4 chimeric gene/Flt3 gene tyrosine kinase domain (TKD) mutation-related enhancement of S100A6 expression. *Exp. Hematol.* 37, 701–714.
- Yano, T., Nakamura, T., Blechman, J., Sorio, C., Dang, C.V., Geiger, B., and Canaani, E. (1997). Nuclear punctate distribution of ALL-1 is conferred by distinct elements at the N terminus of the protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 7286–7291.

- Yokoyama, A., Kitabayashi, I., Ayton, P.M., Cleary, M.L., and Ohki, M. (2002). Leukemia proto-oncoprotein MLL is proteolytically processed into 2 fragments with opposite transcriptional properties. *Blood* 100, 3710–3718.
- Yokoyama, A., Wang, Z., Wysocka, J., Sanyal, M., Aufiero, D.J., Kitabayashi, I., Herr, W., and Cleary, M.L. (2004). Leukemia proto-oncoprotein MLL forms a SET1-like histone methyltransferase complex with menin to regulate Hox gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 24, 5639–5649.
- Yokoyama, A., Lin, M., Naresh, A., Kitabayashi, I., and Cleary, M.L. (2010). A higher-order complex containing AF4 and ENL family proteins with P-TEFb facilitates oncogenic and physiologic MLL-dependent transcription. *Cancer Cell* 17, 198–212.
- Yokoyama, A., Ficara, F., Murphy, M.J., Meisel, C., Naresh, A., Kitabayashi, I., and Cleary, M.L. (2011). Proteolytically cleaved MLL subunits are susceptible to distinct degradation pathways. *J. Cell. Sci.* 124, 2208–2219.
- Yokoyama, A., Ficara, F., Murphy, M.J., Meisel, C., Hatanaka, C., Kitabayashi, I., and Cleary, M.L. (2013). MLL becomes functional through intra-molecular interaction not by proteolytic processing. *PLoS ONE* 8, e73649.
- Yu, B.D., Hess, J.L., Horning, S.E., Brown, G.A., and Korsmeyer, S.J. (1995). Altered Hox expression and segmental identity in Mll-mutant mice. *Nature* 378, 505–508.
- Yu, B.D., Hanson, R.D., Hess, J.L., Horning, S.E., and Korsmeyer, S.J. (1998). MLL, a mammalian trithorax-group gene, functions as a transcriptional maintenance factor in morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 10632–10636.
- Yu, W., Qi-Fa, L., Ya-Zhen, Q., Dai-Hong, L., Lan-Ping, X., Bin, J., Qian, J., Min, D., Si-Jian, Y., Xin-Miao, J., et al. (2013). Improved outcome with hematopoietic stem cell transplantation in a poor prognostic subgroup of patients with mixed-lineage-leukemia (MLL)-rearranged acute leukemia: Results from a prospective, multi-center study. *Am. J. Hematol.*
- Zeisig, D.T., Bittner, C.B., Zeisig, B.B., García-Cuéllar, M.-P., Hess, J.L., and Slany, R.K. (2005). The eleven-nineteen-leukemia protein ENL connects nuclear MLL fusion partners with chromatin. *Oncogene* 24, 5525–5532.
- Zeleznik-Le, N.J., Harden, A.M., and Rowley, J.D. (1994). 11q23 translocations split the “AT-hook” cruciform DNA-binding region and the transcriptional repression domain from the activation domain of the mixed-lineage leukemia (MLL) gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 10610–10614.
- Zennou, V., Petit, C., Guetard, D., Nerhbass, U., Montagnier, L., and Charneau, P. (2000). HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell* 101, 173–185.
- Zhang, X., and Godbey, W.T. (2006). Viral vectors for gene delivery in tissue engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58, 515–534.
- Zhao, X., Chen, A., Yan, X., Zhang, Y., He, F., Hayashi, Y., Dong, Y., Rao, Y., Li, B., Conway, R., et al. (2014). Down-regulation of RUNX1/CBF β by MLL fusion proteins enhances HSC self-renewal. *Blood*.
- Zhou, J., Wu, J., Li, B., Liu, D., Yu, J., Yan, X., Zheng, S., Wang, J., Zhang, L., Zhang, L., et al. (2013). PU.1 is essential for MLL leukemia partially via crosstalk with the MEIS/HOX pathway. *Leukemia*.
- Ziemin-van der Poel, S., McCabe, N.R., Gill, H.J., Espinosa, R., 3rd, Patel, Y., Harden, A., Rubinelli, P., Smith, S.D., LeBeau, M.M., and Rowley, J.D. (1991). Identification of a gene, MLL, that spans the breakpoint in 11q23 translocations associated with human leukemias. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 10735–10739.
- Zufferey, R., Dull, T., Mandel, R.J., Bukovsky, A., Quiroz, D., Naldini, L., and Trono, D. (1998). Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J. Virol.* 72, 9873–9880.
- Zufferey, R., Donello, J.E., Trono, D., and Hope, T.J. (1999). Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J. Virol.* 73, 2886–2892.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

Ø	Durchschnitt
°C	Grad Celsius
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Massenprozent
AF4	ALL-1 fused gene on chromosome 1
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
APC	Allophycocyanin
bp	Basenpaare
BrdU	5-Bromo-2'-deoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin
CCK-8	Cell Counting Kit-8
CFU	Colony forming unit
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CML	Chronische myeloische Leukämie
cPPT	Central polypurine tract
der4/der11	Derivatchromosom 4 beziehungsweise 11
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure, DNS)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dT	dTomato-Fluoreszenzmarker
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCS	Kälberserumalbumin
FITC	Fluorescein-isothiocyanate
FLT3	Fms-related tyrosine kinase 3
FLT3-L	FLT3-Ligand
fw / *3	Forward (Primer bindet am sense-strand)
g/kg/µg/ng	Gramm/Kilogramm/Mikrogramm/Nanogramm
G418	Geneticin (Antibiotikum)
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
HCl	Salzsäure
HSPC	Hämatopoietic stem and precursor cell
IBMT	Intra-bone marrow transplantation
IL-3 bzw. -6	Interleukin 3 bzw. 6
IRES	Internal ribosomal entry site
l/ml/µl	Liter/Milliliter/Mikroliter
M/mM/µM	Mol/Millimol/Mikromol
MCS	Multiple Cloning Site
min	Minute
MLL	Mixed lineage leukemia / KMT2A, ALL-1, HRX or Htrx
MQ-Wasser	Reinstwasser über das Millipore-Reinstwassersystem

MRD	Minimal residual disease (Minimale Resterkrankung)
N	Äquivalentkonzentration; Normalität
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PEI	Polyethylenimin
PI	Propidiumjodid
RAS	Rat sarcoma, kleines G-Protein
rev / *5	Reverse (Primer bindet am antisense-strand)
RNA	Ribonucleicacid (Ribonukleinsäure, RNS)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Zellkulturmedium)
RRE	Rev responsive element
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
rpm	Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
S2	Sicherheitsstufe 2 eines gentechnischen Labors
SCF	Stem cell factor
sek	Sekunde
SIN LTR	Selfinactivating long terminal region
U	Unit (Einheit)
WPRES	Woodchuck Hepatitis Virus Post-transcriptional Regulatory Element
ZNS	Zentralnervensystem
zsG	zsGreen-Fluoreszenzmarker

7.2 Publikationen, Vorträge und Poster-Präsentationen

Publikationen

"Secondary mutations in t(4;11) leukemia patients",

Prelle C, Bursen A, Dingermann T und Marschalek R, *Leukemia*, 2013 Jun; 27(6): 1425-7

"Ligand-independent FLT3 activation does not cooperate with MLL-AF4 to immortalize/transform cord blood CD34+ cells",

Montes R, Ayllón V, Prieto C, Bursen A, **Prelle C**, Romero-Moya D, Real PJ, Navarro-Montero O, Chillón C, Marschalek R, Bueno C, Menendez P, *Leukemia*, 2013 Nov 18; epub ahead of print

Vorträge

"Secondary mutations in t(4;11)-associated leukemia",

24. Jahrestagung der Kind-Philipp-Stiftung für Leukämieforschung, Wilsede/Niedersachsen, 16.06.2011

Poster-Präsentationen

"Secondary mutations in t(4;11) leukemia patients",

3rd UCT Science Day, Klinikum Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt/Main, 09.09.2011

7.3 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Prof. Dr. Rolf Marschalek für die Überlassung des sehr interessanten Themas, die gute Betreuung, den Austausch von vielen hilfreichen und immer neuen Anregungen zu Ergebnissen, sowie für die rasche Durchsicht der Arbeit danken.

Bei Prof. Dr. Robert Fürst bedanke ich mich für die freundliche Übernahme der Zweitbegutachtung und die produktiven Diskussionen während der Arbeitsseminare.

Prof. Dr. Theodor Dingermann danke ich für konstruktive Beiträge während der Arbeitsseminare und eine rege Zusammenarbeit im Bio-I-Praktikum.

Für die große Hilfsbereitschaft bei der Realisierung des Xenograft-Mausmodells gilt mein Dank Dr. Pablo Menendez für die freundliche Überlassung von Plasmiden und Zellen, sowie Dr. Stefan Stein und Hana Kunkel für sämtliche Unterstützung mit den Mäusen.

Allen derzeitigen und ehemaligen Laborkollegen des Instituts für Pharmazeutische Biologie danke ich für eine erstklassige Arbeitsatmosphäre und für viele konstruktive aber auch amüsante Stunden im Laboralltag. Besonderer Dank gilt Dr. Eric Kowarz für die vielen kritischen Anmerkungen und die Hilfe in DNA-Angelegenheiten. Für zahlreiche lustige Momente und eine tolle Zusammenarbeit im Bio-I-Praktikum danke ich Dr. Ilse Zündorf und Fabian Mück. Tanja Rößler möchte ich für viele nette Gespräche und die Durchsicht der Arbeit danken. Katharina Karl, Dr. Bastian Scholz und Dr. Jenny Hsieh danke ich für die beste Labornachbarschaft die man sich wünschen kann. Weiterhin danke ich ganz herzlich Dr. Claus Meyer, Silvia Bracharz, Freia Pfeil, Christian Engelbrecht, Alessa Gramlich, Denise Löscher, Sarah Gaul, Sigrid Schickling-Herzog und allen Mitgliedern des AK Fürst für den wissenschaftlichen Austausch und viele unterhaltsame Kaffeepausen.

Ein ganz besonderes Dankeschön an:

Dr. Adelheid Bursen für all die Jahre super Zusammenarbeit, zahlreiche unvergessliche Maus-Abenteuer sowie für die kritische Betrachtung und vielen Anregungen zu der Arbeit. Außerdem möchte ich mich für alle freundschaftlichen Gespräche und Erlebnisse bedanken, die uns über die Zeit so verbunden haben.

Jenny Merkens für all die großen und kleinen Gefallen, die mir meinen Laboralltag so wahnsinnig erleichtert haben und für die vielen vertrauten Worte, durch die Freundschaften entstanden sind.

Meinen Eltern für die liebevolle Unterstützung während meiner gesamten Ausbildung, ohne die ich vermutlich so einige Steine mehr aus dem Weg hätte räumen müssen.

Marco für die unendliche Geduld, die stete Motivation und für viele unbeschwerte Momente, durch die er mir immer wieder neue Kraft geschenkt hat.

Meiner Familie und Freunden für die unermüdliche Unterstützung und den Rückhalt über all die Jahre, in denen sie mir auch so oft Verständnis und Nachsicht entgegengebracht haben.

7.4 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Carola Prella
 Geburtsdatum: 03.01.1984
 Geburtsort: Frankfurt am Main
 Staatsangehörigkeit: Deutsch
 Familienstand: Ledig

Schulbildung

Aug. 1990 – Jun. 1994 Albert-Schweitzer-Schule / Grundschule Frankfurt am Main
 Aug. 1994 – Jun. 2000 Erich-Kästner-Schule / Integrierte Gesamtschule Maintal
 Aug. 2000 – Jun. 2003 Lichtenberg-Oberstufengymnasium / Gymnasium Bruchköbel
 (Abschluss: Abitur)

Akademische Ausbildung

Okt. 2003 – Jul. 2004 Studium der Pharmazie an der Goethe Universität
 Frankfurt am Main
 Okt. 2004 – Jul. 2009 Studium der Biologie an der Goethe Universität Frankfurt
 am Main mit den Schwerpunkten Pharmakologie, Ökotoxi-
 kologie und allgemeine Zell- und Entwicklungsbiologie
 Jun. 2008 Diplomprüfungen
 Aug. 2008 – Jul. 2009 Diplomarbeit am Institut für Biochemie II an der Goethe
 Universität Frankfurt am Main in der Gruppe "Cardiovascular
 Signalling" von Dr. Stefanie Oess, betreut durch Dr. Meike
 Hoffmeister
 Titel der Diplomarbeit: „Identifizierung von Interaktionspartnern
 der neuen E3-Ligase NOSIP“
 Jul. 2009 Erlangen des akademischen Grades Diplom-Biologin
 Okt. 2009 – Dez. 2009 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Pharmazeutische
 Biologie der Goethe Universität Frankfurt am Main
 Seit Jan. 2010 Promotion am Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie
 der Goethe-Universität Frankfurt am Main am Institut für
 Pharmazeutische Biologie unter Leitung von Prof. Dr. Rolf
 Marschalek, betreut durch Dr. Adelheid Bursen
 Titel der Promotion: „Onkogene Transformationsprozesse
 der t(4;11)-assoziierten Leukämie: Expression von
 AF4•MLL *in vitro* und *in vivo* und Analyse
 kooperierender Ereignisse“

Akademische Lehrer

Prof. Dr. Werner Müller-Esterl, Prof. Dr. Anna Starzinski-Powitz, Prof. Dr. Walter Volkandt,
 Prof. Dr. Jörg Öhlmann, PD Dr. Ellen Niederberger, Prof. Dr. Rolf Marschalek, Prof. Dr.
 Robert Fürst und Prof. Dr. Theodor Dingermann

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich mich bisher keiner Doktorprüfung im Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Bereich unterzogen habe.

Frankfurt am Main, den..... (Unterschrift)

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Dissertation über

„Onkogene Transformationsprozesse der t(4;11)-assoziierten Leukämie:
Expression von AF4•MLL *in vitro* und *in vivo* und Analyse kooperierender Ereignisse“

selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass alle Entlehnungen aus anderen Schriften mit Angabe der betreffenden Schrift gekennzeichnet sind.

Ich versichere, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Frankfurt am Main, den..... (Unterschrift)