

Aus der
Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen
Abteilung Innere Medizin II
(Schwerpunkt: Hämatologie, Onkologie, Klinische
Immunologie, Rheumatologie)

**Bedeutung verschiedener Ursprungszellen und
Fusionspartner für die Entstehung von MLL-
translozierten Leukämien**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinische Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Hammer, Lukas, geb. Bruns**

2024

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. C. Schneidawind
2. Berichterstatter: Professorin Dr. med. J. Skokowa
3. Berichterstatter: Professor Dr. R. Marschalek

Tag der Disputation: 13.05.2024

Für meine Frau

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
1.1	Akute Leukämien	9
1.1.1	Einordnung in die Systematik maligner hämatologischer Erkrankungen	9
1.1.2	Epidemiologie, Diagnostik, Klassifikation und Prognose	10
1.1.3	Therapie akuter Leukämien	13
1.2	MLL-rearrangierte Leukämien	15
1.2.1	Demographie, Ursprungszelle und Fusionspartner.....	15
1.2.2	Physiologische Funktion der MLL-, AF4- und AF9-Gene.....	17
1.2.3	Molekulare Mechanismen und Folgen der Translokation	21
1.3	Modellsystem zur Untersuchung altersabhängiger Unterschiede bei MLLr Leukämien	24
1.3.1	Bisherige MLLr Modellsysteme.....	24
1.3.2	CRISPR/Cas9-basierte MLLr Modelle	25
1.4	Zielsetzung der Arbeit	27
2	Materialien und Methoden	30
2.1	Materialien.....	30
2.1.1	Geräte.....	30
2.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	32
2.1.3	Chemikalien und Reagenzien.....	33
2.1.4	Medien, Puffer und Lösungen.....	36
2.1.5	Zellen und Plasmide	38
2.1.6	Primer	38
2.1.7	Antikörper	39
2.1.8	Software	40
2.2	Methoden	42
2.2.1	Gewinnung der HSPCs aus huBM.....	42
2.2.2	Produktion der sgRNAs für das CRISPR/Cas9-System und funktionelle Testung in K562-Zellen.....	43
2.2.2.1	Herstellung der sgRNAs.....	44
2.2.2.2	<i>In vitro cleavage assay</i> zur funktionellen Testung.....	45

2.2.2.3	<i>In vivo</i> Testung der sgRNAs.....	45
2.2.3	Genomeditierung der HSPCs aus huBM	47
2.2.3.1	Elektroporation der HSPCs aus huBM	47
2.2.3.2	Zellkultur der translozierten Zellen und Kryokonservierung....	48
2.2.3.3	PCR zur Identifikation der Translokation	49
2.2.3.4	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	50
2.2.3.5	Karyotypisierung	51
2.2.3.6	Reverse-Transkriptase-Polymerase- Kettenreaktion (RT-PCR)	52
2.2.4	Charakterisierung der translozierten Zellen	52
2.2.4.1	Durchflusszytometrie.....	52
2.2.4.2	May-Grünwald-Giemsa-Färbung.....	53
2.2.4.3	Colony Forming Assay (CFA).....	54
2.2.4.4	Quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase- Kettenreaktion (RT-qPCR)	54
2.2.4.5	RNA-Sequenzierung	55
2.2.4.6	FFAR2-Antagonisierung.....	57
2.2.5	Statistik	57
3	Ergebnisse.....	59
3.1	Etablierung des humanen MLL-AF4 und MLL-AF9 translozierten Modells mittels CRISPR/Cas9 in adulten Zellen	59
3.1.1	Herstellung von sgRNAs für MLL, AF4 und AF9	59
3.1.2	Induktion der Translokation in HSPCs aus huBM	60
3.2	Charakterisierung der MLL-translozierten Zellen und Validierung als patientenähnliches in vitro Modell	65
3.2.1	Proliferationsverhalten	65
3.2.2	Fähigkeit zur Selbsterneuerung	65
3.2.3	Funktionelle MLL- und Zielgenexpressionen	66
3.2.4	Bestimmung des Immunphänotyps.....	67
3.2.5	Blastenartige Morphologie	70
3.3	Vergleich der generierten MLL-AF4 und MLL-AF9 aus adultem huBM mit neonatalen Zellen.....	71

3.3.1	Nur HSPBs aus huCB lassen sich durch MLL-AF4-Translokationen transformieren	71
3.3.2	Identifikation von differentiell exprimierten Genen der translozierten Zellen unterschiedlichen Ursprungs	72
3.3.3	FFAR2 als möglicher intrinsischer Faktor für die fehlende Zelltransformation von MLL-AF4 huBM	74
4	Diskussion	79
4.1	Etablierung des CRISPR/Cas9-basierten MLLr-Modells in HSPCs aus huBM	79
4.2	Charakterisierung der MLL-translozierten Zellen und Validierung als naturgetreues MLLr- <i>in-vitro</i> -Leukämie-Modell	82
4.3	Vergleich der induzierten adulten und embryonalen MLLr Zellen	86
5	Zusammenfassung	93
6	Literaturverzeichnis.....	96
7	Erklärung zum Eigenanteil	111
8	Veröffentlichungen.....	114
9	Finanzierung und Unterstützung.....	115
10	Anhang	116
11	Danksagung.....	126

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema der Zielsetzung.....	29
Abbildung 2: <i>In vitro</i> Testung der sgRNAs.	59
Abbildung 3: Elektroporationseffizienz in K562-Testzellen.....	60
Abbildung 4: Schneideeffizienz der sgRNAs in K562-Testzellen.....	60
Abbildung 5: Effizienz der magnetischen Zellseparation und Elektroporation in CD34 ⁺ huBM-Zellen.....	61
Abbildung 6: Schneideeffizienz in HSPCs aus huBM.....	62
Abbildung 7: Vergleich der Schneideeffizienz in HSPCs aus huCB/CB, peripheren Blut (PBSZ) und huBM/BM.....	62
Abbildung 8: Nachweis der erfolgreichen Induktion der MLL-Translokationen in HSPCs aus huBM.	63
Abbildung 9: Nachweis 100 % reiner Zellkulturen.	64
Abbildung 10: Proliferationsverhalten der translozierten Zellen.....	65
Abbildung 11: Selbsterneuerungskapazität der MLLr Zellen.	66
Abbildung 12: Patientenähnliches Expressionsprofil.	67
Abbildung 13: Immunphänotyp der MLLr Zellen aus huBM.....	69
Abbildung 14: Unreife, blastenartige Zellmorphologie der MLLr Zellen.	70
Abbildung 15: Proliferationsvergleich von MLLr Zellen aus huCB und huBM und CD9-Expression von MLLr Zellen aus huBM im Verlauf.	72
Abbildung 16: Differentiell exprimierte Gene und MLL-Gen Signatur der MLLr Zellen aus huCB im Vergleich zu huBM.....	73
Abbildung 17: Typische MLLr-spezifische Zielgene in der RNA-Sequenzierung.	74
Abbildung 18: FFAR2 ist das am meisten herunterregulierte DEG in MLL-AF4-Zellen aus huBM.	75
Abbildung 19: FFAR2-Expression von CRISPR/Cas9-generierten MLLr Zellen und Patientenzellen.	76
Abbildung 20: FFAR2-Expression in anderen Krebsentitäten und Leukämien.....	77
Abbildung 21: Antagonisierung von FFAR2 in MLL-AF4-Zellen aus huCB und huBM.	78

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht maligner Erkrankungen des blutbildenden Systems.....	9
Tabelle 2: Altersspezifische Risikostratifizierung der AML mit MLLr adaptiert nach der Klassifikation des European Leukemia Net (ELN) und der Risikogruppen der pädiatrischen AML.....	12
Tabelle 3: Geräte.....	30
Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien.....	32
Tabelle 5: Chemikalien und Reagenzien.....	33
Tabelle 6: Medien, Puffer und Lösungen.....	36
Tabelle 7: Zellen und Plasmide	38
Tabelle 8: Primer	38
Tabelle 9: Antikörper	39
Tabelle 10: Software	40

Abkürzungsverzeichnis

-	Fehlend
+	zusätzlich/positiv
7-AAD	7-Aminoactinomycin
<i>abln</i>	Abnormalität
AF	AlexaFluor
AF1P	<i>Epidermal Growth Factor Receptor Pathway Substrate 15/ EPS15</i>
AF4	<i>ALF Transcription Elongation Factor 1/AFF1</i>
AF6	<i>AFDN/Afadin, Adherens Junction Formation Factor</i>
AF9	<i>MLLT3 super elongation complex subunit</i>
AF10	<i>MLLT10 Histone Lysine Methyltransferase DOT1L Cofactor</i>
AF17	<i>MLLT6 PHD Finger Containing</i>
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
APC	Allophycocyanin
ASH2L	<i>Set1/Ash2 histone methyltransferase complex subunit</i> ASH2
ATP	Adenosintriphosphat
BB	<i>BrilliantBlue</i>
BCL-6	<i>BCL6 Transcription Repressor</i>
BH	Benjamini-Hochberg
BM	humanes Knochenmark/huBM
BMI1	<i>polycomb complex protein</i> BMI1
bp	Basenpaare
BRD4	<i>Bromodomain Containing 4</i>
BV	<i>BrilliantViolet</i>
Cas	CRISPR-assoziiertes Protein
Cas9	CRISPR-assoziierte Endonuklease 9
CB	humanes Nabelschnurblut/huCB

CBP	<i>CREB Binding Protein, CREBP</i>
CBX8	<i>Chromobox Homolog 8/Polycomb 3</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDK9	<i>cyclin-dependent kinase 9</i>
CFA	<i>colony forming assay</i>
Cq	<i>quantification cycle</i>
CR	<i>complete remission</i>
CRISPR	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
crRNA	<i>CRISPR-RNA</i>
CtBP	<i>C-terminal-binding protein complex</i>
CTD	<i>C-terminale repeat Domäne</i>
ctrl	<i>control</i>
CXCR4	<i>C-X-C motif chemokine receptor 4</i>
CYP33	<i>Cyclophilin-33</i>
DEG	<i>differentiell exprimiertes Gen</i>
DMSO	<i>Dimethylsulfoxid</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	<i>Desoxyribonukleosidtriphosphat</i>
DOT1L	<i>disruptor of telomeric silencing 1-like, Histon-Lysin-Methyltransferase</i>
DPY30	<i>protein dpy-30 homolog</i>
ds	<i>double stranded</i>
DSIF	<i>DRB sensitivity inducing factor</i>
EDTA	<i>Ethylendiamintetraessigsäure</i>
ELAC2	<i>zinc phosphodiesterase, ELAC protein 2</i>
ELL	<i>Elongation Factor For RNA Polymerase II</i>
ELN	<i>European Leukemia Net</i>
ENL	<i>MLLT1 Super Elongation Complex Subunit, MLLT1</i>
FAB	<i>French-American-British</i>

FBS	<i>fetal bovine serum</i>
FcR	FC Rezeptor
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
FITC	Fluorescein
FLT3	<i>fms-related tyrosine kinase 3</i>
FLT3-L	<i>fms-related tyrosine kinase 3 ligand</i>
fwd	<i>forward</i>
G-CSF	<i>granulocyte-colony stimulating factor</i>
GEO	<i>NCBI's Gene Expression Omnibus</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GMALL	<i>German Multicenter Study Group for Adult Acute Lymphoblastic Leukemia</i>
gRNA	<i>guide RNA</i>
GSEA	<i>gene-set-enrichment-Analyse</i>
H	Histon
HDR	<i>homology-directed repair</i>
HDAC1-2	Histon-Deacetylase 1-2
hMBM	<i>high-affinity menin binding motif</i>
HOX	<i>clustered homeobox</i>
HSC	<i>hematopoietic stem cell</i>
HSPC	<i>hematopoietic stem and progenitor cell</i>
HSZT	allogene hämatogene Stammzelltransplantation
hu	human
huBM	humanes Knochenmark/BM
huCB	humanes Nabelschnurblut/CB
ICD	<i>International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems</i>
IL	Interleukin
inv	Inversion

ITD	<i>internal tandem duplication</i>
K	Lysin
KDM1A	Lysin spezifische Demethylase 1a
KMT2A	Histon-Lysin-N-Methyltransferase 2A, MLL
LEDGF	<i>lens epithelium-derived growth factor</i>
MACS	<i>magnetic activated cell sorting</i>
MEIS1	<i>homebox protein meis1</i>
MEN1	Multiple endokrine Neoplasie Typ 1
MLL	Histon-Lysin N-Methyltransferase 2A, KMT2A; <i>mixed lineage leukemia</i> , MLL1
MLL-C	C-terminales MLL
MLL-N	N-terminales MLL
MLLr	MLL-rearrangiert
MM6	Mono-Mac-6
MOF	Lysine Acetyltransferase 8/KAT8
MOZ	Lysine Acetyltransferase 6A/KAT6A
MPAL	<i>Mixed phenotype acute leukemia</i>
MRD	<i>minimal residual disease</i>
NELF	<i>negative elongation factor</i>
NGS	<i>next generation sequencing</i>
NHEJ	<i>non-homologous end joining</i>
<i>non-MLLr</i>	nicht-MLL-rearrangiert
nRPKM	<i>normalized reads per kilobase million</i>
p	kurzer Chromosomarm
P300	<i>E1A Binding Protein P300</i> , EP300
P/S	Penicillin-Streptomycin
PAFc	<i>polymerase associated factor complex</i>
PAM	<i>protospacer adjacent motif</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>

PBSZ	Periphere mononukleäre Stammzellen
PcG	<i>polycomb group</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
PHD	pflanzliche Homöodomänen
PPIE	Prolylisomerase
PRC1/2	chromobox Protein 8, Teil des <i>polycomb repressive complex 1/2</i>
P-TEFb	positiver Transkriptions-Elongation-Faktor
q	langer Chromosomarm
q.s.	<i>quantum satis</i>
RbBP5	<i>retinoblastoma-binding protein 5</i>
RD	Repressionsdomäne
rev	<i>reverse</i> , rückwärts
RING1B	<i>Ring Finger Protein 1</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNF	<i>Ring Finger Protein 20</i>
RNP	<i>ribonucleoprotein</i>
RT	Raumtemperatur oder reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RT-qPCR	quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SAM	S-Adenosylmethionin
SCF	<i>stem cell factor</i> , Stammzellfaktor
SD	<i>standard deviation</i> , Standardabweichung
SEC	Superelongationskomplex
SET	Su(var)3-9, enhancer of zeste, trithorax
SEPT6	<i>Septin 6</i>
sgRNA	<i>single guide RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SIRT	<i>Sirtuin 1</i>

ss	<i>single stranded, einzelsträngig</i>
SSC	<i>side scatter, Seitwärtsstreulicht</i>
t	<i>translocated</i>
t(4;11)	<i>MLL-AF4 translocated</i>
t(9;11)	<i>MLL-AF9 translocated</i>
TALEN	<i>transcription activator-like effector nuclease</i>
TBS	<i>TRIS-buffered saline, TRIS-Puffer</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TPO	Thrombopoietin
tracrRNA	transaktivierende CRISPR-RNA
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TrxG	<i>thritorax group</i>
v	Variable
WDR5	<i>WD repeat-containing protein 5</i>
WHO	<i>World Health Organisation, Weltgesundheitsorganisation</i>
ZF	Zinkfinger
ZFN	Zink-Finger-Nukleasen
ZNF827	<i>zinc finger protein 827</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Akute Leukämien

1.1.1 Einordnung in die Systematik maligner hämatologischer Erkrankungen

In der Fachliteratur zur Inneren Medizin bilden maligne Erkrankungen des blutbildenden Systems eine heterogene Gruppe, deren Einteilung historisch gewachsen ist und sich sowohl an klinischen als auch pathologischen Aspekten orientiert.^[1-3] Die verschiedenen Erkrankungen werden vier großen Gruppen zugeordnet, die als Leukämien, Lymphome, myeloproliferative Erkrankungen und myelodysplastische Syndrome bezeichnet werden. Eine Übersicht zeigt die nachfolgende Tabelle.^[3]

Tabelle 1: Übersicht maligner Erkrankungen des blutbildenden Systems^[1, 3]

Gruppe	Erkrankung	Typische Klinik
Leukämien	Akute myeloische Leukämie Akute lymphatische Leukämie	Blutungszeichen, Hautblässe, Infektzeichen
Lymphome	Hodgkin Lymphome	B-Symptomatik, Lymphadenopathie, Hepatosplenomegalie
	Non-Hodgkin Lymphome: - Chronisch lymphatische Leukämie	Splenomegalie, Lymphadenopathie
	- Multiples Myelom	Knochenschmerzen, erhöhte Infektanfälligkeit
	- Non Hodgkin Lymphome der B-Zell Reihe - Non Hodgkin Lymphome der T-Zell Reihe	Lymphadenopathie, oft extranodale Manifestation, Hautbeteiligung
Myeloproliferative Erkrankungen	Chronisch myeloische Leukämie Polycythaemia vera	Massive Splenomegalie, Fieber, Gewichtsverlust Gesichtsplethora, periphere Zyanose, Zeichen der Hyperviskosität
	Essenzielle Thrombozythämie	Thrombozytose, Thrombosen, hämorrhagische Diathese

	Primäre Myelofibrose	Splenomegalie, Anämie
Myelodysplastische Syndrome	Heterogene Erkrankungsgruppe, häufig mit peripherer Zytopenie	Anämie, Infekte, Blutungsneigung, Splenomegalie

Das in dieser Arbeit analysierte Krankheitsbild der Leukämien mit Translokationen des *mixed lineage leukemia* (Histon-Lysin N-Methyltransferase 2A, KMT2A oder MLL)-Gens gehört zur Gruppe der akuten Leukämien. Akute Leukämien sind definiert als maligne klonale Neoplasien hämatopoetischer Vorläuferzellen, die das Knochenmark, Blut und andere Gewebe infiltrieren.^[1, 2] Anstelle der physiologischen Hämatopoese kommt es zur autonomen Proliferation unreifer, schlecht differenzierter Blasten. Die Folge ist häufig eine Panzytopenie im peripheren Blut, die sich klinisch als eine Anämie mit Leistungsabfall, Müdigkeit und Blässe zeigt. Eine Thrombozytopenie kann zu Petechien und Blutungen führen, während eine Granulo- und Lymphozytopenie eine erhöhte Infektionsgefahr und Fieber zur Folge hat. Zudem kommt es zu einem Ausschwemmen der leukämischen Blasten in das periphere Blut verbunden mit der Zunahme der Viskosität und Thrombosegefahr. Der Befall weiterer Organe kann durch Hautinfiltrate, Meningeosis leukaemica, Gingivahyperplasie oder Hepatosplenomegalie imponieren und dadurch bedingte Beschwerden verursachen.^[1, 3, 4] Unbehandelt führen akute Leukämien rasch zum Tod.^[2] Die Ätiologie der Erkrankung ist häufig unklar und keiner eindeutigen Ursache zuzuordnen. Eine genetische Disposition, ionisierende Strahlungen und myelotoxische Chemikalien sind jedoch mit der Krankheitsentstehung assoziiert. Auch Arzneimittel, insbesondere Behandlungen mit Chemotherapeutika wie Alkylanzien, können zur Ausbildung einer akuten Leukämie führen.^[2]

1.1.2 Epidemiologie, Diagnostik, Klassifikation und Prognose

Abhängig von der betroffenen Ursprungszelle werden akute Leukämien in myeloische oder lymphatische Leukämien eingeteilt. Akute myeloische Leukämien (AML) entstehen aus den Vorläuferzellen der Granulozyten, akute lymphatische Leukämien (ALL) aus den Vorläuferzellen der B- und T-

Lymphozyten.^[1, 3] Zur Abschätzung des Krankheitsverlaufes und zur Planung der Therapie werden sowohl AML als auch ALL in weitere Subtypen differenziert. Diese Differenzierung erfolgt auf Basis der zyto- und molekulargenetischen Veränderungen, der Klinik und den morphologischen sowie immunphänotypischen Eigenschaften. Diagnostisch werden daher im Rahmen einer Knochenmarksuntersuchung die lichtmikroskopische Diagnostik durchgeführt, zytochemische Analysen eingesetzt und die Durchflusszytometrie zur Bestimmung des Immunphänotyps angewendet. Die erforderlichen genetischen Untersuchungen erfolgen mittels Karyogramm, Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH), Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR), *next generation sequencing* (NGS) sowie durch Genexpressionsprofilanalysen und Einzelnukleotidpolymorphismus-Array-Analysen.^[2, 3, 5] Im Folgenden werden zunächst die Einteilung und Prognose der AML dargestellt, anschließend wird auf die ALL eingegangen.

Die Einteilung für die AML wird durch die *World Health Organisation* (WHO) herausgegeben und laufend aktualisiert.^[2, 4, 6] Die aktuelle Einteilung aus dem Jahr 2022 wurde von *Khoury et al.* publiziert.^[2, 4, 6, 7] Die in dieser Arbeit unter anderem untersuchten MLL-rearrangierten (MLLr) Leukämien mit dem Translokationspartner MLLT3 *super elongation complex subunit* (AF9) werden der Untergruppe mit rekurrenten genetischen Veränderungen zugeordnet, MLLr werden als akute Leukämie mit gemischtem Phänotyp in der Untergruppe der akuten Leukämien unklarer Abstammung geführt.^[6] Mithilfe dieser Einteilung sind etwa 50 % des Patientenkollektivs zyto- und molekulargenetisch klassifizierbar.^[4] Dies stellt einen großen Fortschritt gegenüber älteren Klassifikationen dar, die überwiegend auf morphologische Kriterien basieren, wie z.B. das *French-American-British* (FAB)-Klassifikationssystem.^[7] Durch die Einteilung und das Verständnis der Molekulargenetik der Erkrankung ist eine zielgerichtete, differenzierte und fortschrittliche Behandlung möglich.^[2] Zudem ermöglicht die neuere Klassifikation ein höheres Maß an Objektivität und Reproduzierbarkeit.^[4] Zur Prognoseabschätzung der AML bei Erwachsenen werden ebenfalls die molekular- und zytogenetischen Veränderungen herangezogen und nach der *European Leukemia Net* (ELN)-Klassifikation in günstig, intermediär und

ungünstig eingeteilt.^[8] Zusätzlich ist das Alter ein wichtiger prognostischer Faktor.^[9] Während insgesamt das Risiko bei Erwachsenen mit steigendem Alter zunimmt, zeigt die Risikostratifizierung der pädiatrischen Leukämien hinsichtlich der hier untersuchten MLLr Leukämien unabhängig vom Translokationspartner eine ungünstige Prognose (siehe Tabelle 2).^[4, 9]

Tabelle 2: Altersspezifische Risikostratifizierung der AML mit MLLr adaptiert nach der Klassifikation des European Leukemia Net (ELN) und der Risikogruppen der pädiatrischen AML^[4, 8]

Translokation (t), variable (v), kurzer Chromosomarm (p), langer Chromosomarm (q)

Prognose	Adult	Pädiatrisch
Günstig/ Standard Risiko	/	/
Intermediär/ Intermediäres Risiko	t(9;11)(p22;q23); MLL-AF9	/
Ungünstig/ Hohes Risiko	t(v;11)(v;q23); MLLr	11q23/MLLr: <ul style="list-style-type: none"> - t(4;11)(q21;q23) MLL-AF4 - t(6;11)(q27;q23) MLL-AF6 - t(10;11)(p12;q23) MLL-A10 - t(9;11)(p21;q23) MLL-AF9 - mit anderen zyto- genetischen Aberrationen

Für die ALL existiert ebenfalls eine von der WHO herausgegebene Klassifikation, die zunächst immunphänotypisch nach T- und B-Zelllinie differenziert und dann zur weiteren Einteilung zyto- und molekulargenetische Kriterien verwendet.^[10]

MLLr Leukämien werden zu der Gruppe der B-lymphoblastischen Leukämien/Lymphomen mit rekurrenten genetischen Veränderungen gezählt.^[10]

^{11]} Klinisch bedeutsamer für die Therapieentscheidung und Prognose ist die Orientierung an der Klassifikation nach immunologischen Subtypen, die den Studien der deutschen multizentrischen Studiengruppe für die ALL des Erwachsenen (GMALL) zugrunde liegt.^[10] Der häufigste Subtyp ist dabei die *Common ALL*, die aus B-Zellen hervorgeht und den immunologischen Marker CD10 aufweist. Die in dieser Arbeit untersuchte zytogenetische Veränderung

einer Translokation des MLL-Gens wird dieser Klassifikation entsprechend als Pro-B-ALL identifiziert.^[10] Zur Prognoseabschätzung werden bei der ALL ungünstige Faktoren entsprechend der GMALL-Studien definiert.^[10] Als Risikofaktoren gelten eine hohe Leukozytenzahl, definierte Untergruppen nach der GMALL Studie, eine späte komplette Remission (*complete remission*, CR), bestimmte zytogenetische/molekulare Aberrationen sowie der Verlauf der minimalen Resterkrankung (*minimal residual disease*, MRD) nach Frühkonsolidation oder ein früher Anstieg der MRD nach vorheriger molekularer CR.^[10] Bei Vorliegen einer der Risikofaktoren wird ein Patient nicht mehr der Standardrisikogruppe, sondern der Hochrisikogruppe zugeordnet und entsprechend behandelt.^[10] Sowohl das Vorliegen einer MLL Translokation mit dem Translokationspartner *ALF Transcription Elongation Factor 1/AFF1 (AF4)* als auch die Subgruppe der Pro-B-ALL wird als Risikofaktor eingestuft. MLLr Leukämien werden demnach sowohl für die AML (nach der ELN-Klassifikation) als auch für die ALL (nach den GMALL-Studien) als Hochrisikofaktor mit intermediärer bis ungünstiger Prognose eingestuft.^[4, 9, 10]

Epidemiologisch ist die ALL die häufigste Krebserkrankung im Kindesalter und tritt in dieser Alterskohorte mit einer Inzidenz von ca. 5/100.000 Einwohner auf.^[1] Die AML ist eine mit dem Alter zunehmend auftretende Erkrankung. Die Zahl der Neuerkrankungen liegt bei der AML im Mittel aller Altersgruppierungen bei 3,7/100.000 Einwohner, in der Kohorte der über 70-Jährigen tritt sie jedoch mit einer altersspezifischen Inzidenz von 100/100.000 Einwohner auf.^[1, 4, 10]

1.1.3 Therapie akuter Leukämien

Die Therapie akuter Leukämien erfolgt in Abhängigkeit von der Klassifikation, dem Alter und der darauf beruhenden prognostischen Einschätzung. Die Säulen der Therapie bilden die zytostatische und die symptomatische und supportive Behandlung. Ziel der zytostatischen Therapie ist es, in einem kurativen Ansatz die Zerstörung der neoplastischen Zellen sowie die Herbeiführung und den Erhalt einer kompletten Remission zu erreichen.^[3] Die Therapie erfolgt in der Regel an spezialisierten klinischen Zentren und wird nach definierten Studienprotokollen durchgeführt.^[1]

Die komplette (hämatologische) Remission ist dabei definiert als der lichtmikroskopisch ausbleibende Nachweis von Leukämiezellen und einem Blastenanteil von unter fünf Prozent im Knochenmark. Die Remission wird mit der Erholung und Normalisierung der peripheren Blutzellen und damit der Symptomlosigkeit des Patienten verbunden.^[3, 5] Anspruch der Therapie ist es, dies bereits im ersten Schritt, der sogenannten Induktionstherapie, zu erreichen, um so effektiv Rezidive zu verhindern und ein Langzeitüberleben zu ermöglichen.^[5] Häufig eingesetzte Substanzen bei der AML sind Cytarabin in Kombination mit Anthrazyklinen.^[2] Bei der ALL werden letztere eher zusammen mit Vincristin und Dexamethason verabreicht.^[5, 10] Als Teil der Postremissionstherapie wird eine Konsolidierungstherapie angeschlossen zur Eradikation möglicher verbliebener, aber nicht nachweisbarer Leukämiezellen. Die Konsolidierungstherapie erfolgt als Chemotherapie und insbesondere bei Hochrisikoleukämien als allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSZT). Die Rezidivprävention der HSZT ist sehr effektiv und wirkt vor allem immunologisch als *Graft-versus-Leukämie* Effekt.^[2] Allerdings birgt die HSZT auch hohe Komplikationsrisiken durch toxische Nebenwirkungen der myeloablativen Vorbehandlung, Infektionen infolge der immunsuppressiven Therapie und durch *Graft-versus-Host* Effekte.^[1] Wenn keine HSZT durchgeführt wurde, wird als Postremissionstherapie häufig eine Erhaltungstherapie mittels niedrig dosierter Chemotherapeutika durchgeführt.^[4, 10] Um zentralnervösen Manifestationen vorzubeugen, die insbesondere bei Rezidiven häufig therapierefraktär sind, ist ein weiterer Bestandteil der Therapie der ALL eine Prophylaxe des zentrale Nervensystems (ZNS). Diese erfolgt mittels intrathekaler Therapie, systemischer Hochdosis-Therapie oder kranialer Radiotherapie.^[5] Neben den Chemotherapeutika stehen in Abhängigkeit von der Klassifikation und dem genetischen Profil der Erkrankung neue zielgerichtete Therapien zur Verfügung, die vielversprechende Erfolge in der Tumorthherapie erzielen.^[2] Eine Übersicht zeigt die Veröffentlichung von *Döhner et al.* für die AML, die Arbeiten von *Phelan et al.*, *Bassan et al.*, *Samra et al.* und *Terwilliger et al.* einen Überblick zur ALL.. ^[8, 12-15]

Einen wesentlichen Beitrag für den Erfolg der Behandlung bildet die zweite Säule der Therapie akuter Leukämien. Diese umfasst supportive Ansätze, die Komplikationen und Nebenwirkungen verringern. Hierzu zählen vor allem die antiinfektiöse, antiemetische und gastrointestinale Prophylaxe.^[16-18] Mithilfe zielgerichteter therapeutischer Medikamente wie dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib bei Translokationen des Philadelphia-Chromosoms t(9;22) konnten auch bei prognostisch ungünstig eingestuften akuten Leukämien große Erfolge erzielt werden.^[19] Bei MLLr akuten Leukämien bleibt dieser Erfolg bislang aus. Diese sind schwer zu behandeln, haben hohe Rückfallraten und weiterhin eine schlechte Prognose trotz spezifischer Therapieversuche wie mit dem Inhibitor der *disruptor of telomeric silencing 1-like* (DOT1L) oder einer Histon-Lysin-Methyltransferase.^[20, 21]

1.2 MLL-rearrangierte Leukämien

1.2.1 Demographie, Ursprungszelle und Fusionspartner

Aggressive und therapieresistente Leukämien basieren häufig auf einer chromosomalen Translokation des MLL-Gens, welches für die Histon-Lysin-N-Methyltransferase 2A (KMT2A) kodiert und nach dieser benannt ist. Das MLL-Gen wird auch als *Mixed lineage leukemia*-Gen bezeichnet. Entgegen der Suggestion dieser Bezeichnung entwickeln Patienten jedoch nur in wenigen Fällen eine akute Leukämie mit gemischtem Phänotyp (*Mixed phenotype acute leukemia*, MPAL).^[22] In den meisten Fällen tritt die MLLr Leukämie als eine AML oder eine ALL auf.^[23] MLL-Translokationen sind in 5-10 % aller akuten Leukämiefälle ursächlich für diese Erkrankung.^[24, 25] Hinsichtlich der demographischen Verteilung zeigt sich, dass insbesondere Neugeborene betroffen sind. Wie in Kapitel 1.1.2 beschrieben, weisen ALL einen Häufigkeitsgipfel in dieser Altersgruppe auf.^[1] Interessanterweise lässt sich in bis zu 80 % aller ALL in dieser Alterskohorte eine MLL-Translokation nachweisen.^[23, 26, 27] Neonatale MLLr Leukämien sind trotz Anwendung moderner Therapiekonzepte weiterhin mit einer besonders schlechten Prognose assoziiert, wie die kürzlich veröffentlichte „Interfant“-Studie zeigt.^[28] MLLr Leukämien bei Erwachsenen treten insbesondere als sekundäre Leukämie nach Vorbehandlung mit Topoisomerase-2 Inhibitoren auf.^[29, 30]

Nicht nur Häufigkeit und Prognose verändern sich altersspezifisch, es zeigen sich auch Auffälligkeiten hinsichtlich des Fusionspartners und der weiteren genetischen Aberrationen. Das MLL-Gen ist an über 100 rekurrenten chromosomalen Translokationen beteiligt mit über 80 bekannten Fusionspartnern. Trotz dieser Vielzahl unterschiedlicher Fusionspartner sind in 90 % der MLL-Translokationen die Translokationspartner AF4, AF9, *MLLT1 Super Elongation Complex Subunit* (ENL), *MLLT10 Histone Lysine Methyltransferase DOT1L Cofactor* (AF10), *AFDN/Afadin Adherens Junction Formation Factor* (AF6), *Elongation Factor For RNA Polymerase 2* (ELL), *Epidermal Growth Factor Receptor Pathway Substrate 15* (AF1P), *MLLT6 PHD Finger Containing* (AF17) und *Septin 6* (SEPT6) betroffen.^[23, 24] Die detaillierte Aufschlüsselung der Fusionspartner in Abhängigkeit von Alter und klinischem Subtyp zeigt, dass die häufig bei Säuglingen auftretenden ALL hauptsächlich AF4 als Fusionspartner aufweist.^[1, 23] AML, die eher bei fortgeschrittenem Alter auftritt, zeigt dagegen eine Dominanz des Fusionspartners AF9.^[1, 23] *Meyer et al.* konnten in ihrer Arbeit zudem zeigen, dass sich der Bruchpunkt der Translokation abhängig von Altersgruppen und vom Translokationspartner verändert. Bei Neugeborenen mit AF4- und ENL-Fusionen und bei Kindern und Erwachsenen mit ELL-Fusionen zeigte sich der Bruchpunkt der Translokation im Intron 11. Bei Erwachsenen mit AF9- sowie bei Kindern mit AF10-Fusionen zeigte sich dies dagegen seltener. In allen Altersgruppen zeigte sich bei AF6 eine Präferenz für einen Bruch im Intron 9.^[23] Wie in Kapitel 1.2.3 dargestellt wird, hat dies einen Einfluss auf den Verlauf der Erkrankung und ist ein möglicher Faktor hinsichtlich der altersabhängigen Prognose.^[31-33]

Die Ursache dieser Prädominanz und Aggressivität der Erkrankung im Kindesalter ist nur teilweise verstanden und Gegenstand aktueller Forschung. *Horton et al.* führten Untersuchungen in einem humanisierten MLLr Mausmodell durch und konnten beobachten, dass infantile Zellen eher zur Transformation neigen. Eine Immortalisierung adulter Zellen mittels transviraler Transduktion gelang hingegen nicht.^[34] Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Untersuchungen von MLL-ENL-translozierten Zellen, wie *Okeyo-Owuor et al.* nachweisen konnten.^[35] Zudem zeigten sich dezidierte Expressionsmuster, die

mögliche intrinsische Eigenschaften adulter und neonataler MLL-AF9-Zellen widerspiegeln.^[34] Weiterhin weisen MLLr Leukämien im Säuglingsalter kaum sekundäre Mutationen auf. Diese unterscheiden sich zudem gegenüber Sekundärmutationen bei Erwachsenen.^[36-39] Darüber hinaus hat das umgebende Milieu einen starken Einfluss auf die Abstammungslinie von MLLr Leukämien, wie die Ergebnisse der Studien von *Wei et al.* und *Barabe et al.* zeigten.^[40, 41] Auch der jeweilige Fusionspartner beeinflusst den resultierenden Phänotyp. Auf diesen ursächlichen Effekt wird in Kapitel 1.2.3 näher eingegangen.

Die Translokation erfolgt am ehesten in hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen (*hematopoietic stem and progenitor cell*, HSPCs), da diese zur Selbsterneuerung sowie zur lymphatischen wie auch myeloischen Differenzierung befähigt sind.^[42] Dies wird durch die Beobachtung gestützt, dass MLLr leukämische Zellen oftmals sowohl myeloische als auch lymphatische Differenzierungsmarker tragen.^[23, 43, 44] Bemerkenswerterweise scheinen MLLr Leukämien von Neugeborenen zudem häufig bereits im Mutterleib zu entstehen.^[45-47] Der Ort der Hämatopoese verändert sich jedoch im Laufe der embryonalen Entwicklung und damit der Ursprung der HSPCs. Die embryonal vorliegenden Mikroumgebungen unterscheiden sich von adultem Knochenmark.^[48] Es ist vorstellbar, dass dieses umgebende Milieu einen Einfluss auf die Leukämogenese hat.^[40] Zudem gibt es Hinweise, dass spezifische embryonale Leberzellen den Ursprung neonataler MLLr Leukämien bilden.^[49]

Es ist bisher nicht hinreichend geklärt, wie die altersabhängigen Unterschiede im Hinblick auf Häufigkeit, Phänotyp und Fusionspartner entstehen. Eine Zusammenführung der vorliegenden Forschungsergebnisse zeigt aber, dass es entscheidende Unterschiede in der Leukämogenese gibt und sich diese in Abhängigkeit von der Ursprungszelle, dem Fusionspartner und dem umgebenden Milieu entwickeln.^[50]

1.2.2 Physiologische Funktion der MLL-, AF4- und AF9-Gene

Das Wildtyp MLL-Gen liegt auf Chromosom 11 (11q23) und ist für die Kodierung eines circa 500 kDa großes, 4000 Aminosäuren langes Protein, die Histon-Lysin N-Methyltransferase 2A (KMT2A/MLL), verantwortlich.^[51, 52] Diese wird ubiquitär

in fast allen adulten Geweben exprimiert.^[53] Die Transferase zeigt eine hohe Homologie zu *thritorax group* (TrxG)-Proteinen, die erstmals in *Drosophila melanogaster* identifiziert wurden. TrxG-Proteine sind mit transkriptioneller Aktivierung assoziiert und spielen eine wichtige Rolle in der Segmentierung des Körperplans.^[51, 54] Diese Proteine sind evolutionär hochkonserviert und MLL ist ein Vertreter dieser Gruppe in Säugetieren.^[52, 55] MLL methyliert Lysin 4 an Histon 3 und signalisiert epigenetisch ebenfalls transkriptionelle Aktivierung und ermöglicht die Expression einer Vielzahl von Zielgenen.^[55, 56] Insbesondere die Aufrechterhaltung der Expression sogenannter *clustered Homeobox* (HOX)-Gene erfolgt durch diese epigenetische Regulation. HOX-Gene spielen in der frühen embryonalen Segmentierung eine große Rolle und bei der korrekten Gewebeentwicklung.^[57] Auch die Proliferation, Aufrechterhaltung und korrekte Differenzierung der Hämatopoese sind stark abhängig von einer korrekten HOX-Gen Expression.^[58-62] Die Interaktion an den Zielgenen erfolgt dabei durch multiple Komplexbildung mit einer Vielzahl von Partnerproteinen über verschiedene Domänen des MLL-Proteins.^[63] Dabei ist es funktionell sowohl mit der bereits beschriebenen transkriptionellen Aktivierung assoziiert, enthält jedoch auch geninaktivierende Bereiche.^[22]

Nach der Transkription wird das Protein zunächst durch die Taspase-1 proteolytisch gespalten in ein N-terminales und C-terminales Proteinfragment, die über ihre Phenylalanin und Tyrosin reichen N- und C-terminalen Domänen verbunden bleiben und als Heterodimer die Plattform für multiple Interaktionen bilden.^[64-66] Der 368 kDa große N-terminale Teil (MLL-N) enthält wichtige Elemente, die eine Bindung des KMT2A-Proteins an seine Zielgene ermöglicht und dazu beitragen, Chromatinsignaturen zu erkennen.^[67] Eines dieser Elemente ist die Menin-bindende Domäne *high-affinity menin binding motif* (hMBM). Menin ist bekannt als Tumorsuppressor, dessen funktioneller Verlust das Syndrom Multiple endokrine Neoplasie Typ 1 (MEN1) verursacht.^[68, 69] *Yokoyama et al.* konnten jedoch im Kontext von MLLr Leukämien zeigen, dass Menin als molekularer Adapter fungiert und eine Interaktion zwischen dem KMT2A-Protein und dem *lens epithelium-derived growth factor* (LEDGF) ermöglicht.^[70] Durch Chromatinanbindung und direkte Interaktion mit der *deoxyribonucleic acid* (DNA)

bilden Menin und LEDGF im Zusammenspiel mit KMT2A wichtige Kofaktoren zur Regulation MLL-abhängiger Transkriptionswege.^[70-72] Ein weiteres wichtiges Motiv in diesem Kontext bildet die CxxC-Domäne. Diese bindet an unmethylierte CpG-DNA von regulatorischen Abschnitten der jeweiligen Zielgenen und verhindert durch diese Bindung eine weitere Methylierung.^[73-75] Dadurch wird eine fortlaufende Transkription ermöglicht.^[76] Zudem bindet CxxC zusätzlich an den *polymerase associated factor complex* (PAFc). Resultat dieser Interaktion ist eine erhöhte transkriptionelle Aktivität durch direkte Wechselwirkungen mit der RNA Polymerase 2 sowie Kollokalisierung an der DNA zur korrekten Orientierung an Promotoren der Zielgene.^[77]

Die CxxC-Region ist Teil der Repressionsdomäne (RD)1, an die sich eine zweite anschließt. Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen aktivierenden Transkriptionsfaktoren binden an diese Regionen Proteine der *polycomb* Gruppe (PcG), die mit transkriptioneller Inaktivierung assoziiert sind und einen Gegenpol zu TrxG-Proteinen darstellen.^[78, 79] Involvierte Proteine sind das *polycomb complex protein* (BMI1), die *zinc phosphodiesterase ELAC protein 2* (ELAC2), die Histon-Deacetylase 1-2 (HDAC1-2) und der Cofaktor *C-terminal-binding protein complex* (CtBP).^[79] Die Prolylisomerase *Cyclophilin 33* (Cyp33) bewirkt eine Konformationsänderung des MLL-Proteins. Diese bindet an die weiter Carboxy-terminal gelegenen pflanzlichen Homöodomänen (PHD) und katalysiert so eine Potenzierung der Interaktion des MLL-Proteins mit den inaktivierenden PcGs.^[79-81] Die Anwesenheit von Cyp33 kann daher in diesem Zusammenhang als Umschaltpunkt angesehen werden, der zwischen transkriptioneller Aktivierung oder Repression durch das MLL-Protein entscheidet.^[67]

Der C-terminale Teil (MLL-C) ist enzymatisch aktiv und führt Histonmethylierungen und -acetylierungen aus.^[67] Dieser enthält eine *transcriptional activation* Domäne und eine Su(var)3-9, *enhancer of zeste, trithorax* (SET)-Domäne.^[22, 51] Die SET-Domäne überträgt die Methylgruppe von S-Adenosylmethionin (SAM) auf Lysin 4 an Histon 3 (H3K4).^[82] Der MLL-C interagiert innerhalb eines Proteinkomplexes bestehend aus *WD repeat-containing protein 5* (WDR5), *retinoblastoma-binding protein 5* (RbBP5), *protein*

dpy-30 homolog (DPY30) und *Set1/Ash2 histone methyltransferase complex subunit* ASH2 (ASH2L). Das Zusammenwirken in diesem Proteinkomplex bewirkt eine Steigerung der dem C-terminalen Teil des MLL-Proteins typischen Histonmethylierungen und -acetylierungen an H3K4 um den Faktor 600.^[83, 84] Die *transcriptional activation* Domäne interagiert zudem mit den Histonacetylierungstransferasen *CREB Binding Protein* (CBP)/*1A Binding Protein P300* (p300), der *Lysine Acetyltransferase 6A/KAT6A* (MOZ) und der *Lysine Acetyltransferase 8/KAT8* (MOF), die an H3K27, H3K9 und H4K16 acetylieren. Deren Transferase-Tätigkeiten sind ebenfalls mit einer HOX-Gen-Aktivierung assoziiert.^[84, 85]

Zusammenfassend üben MLL-N und MLL-C im Zusammenspiel mit multiplen Komplexpartnern wie WDR5, RbBP5, DPY30, ASH2L, CBP/p300, MOF, MOZ und MEN1 als Heterodimer eine Funktion als transkriptioneller und epigenetischer Aktivator und Repressor aus. So werden Zellentwicklung, Proliferation und die Etablierung eines transkriptionellen Gedächtnisses zur Zelllinienidentität im Gleichgewicht gehalten. Das MLL-Protein ist daher für eine normale Zellphysiologie von großer Bedeutung.^[67]

Die physiologische Funktion der beiden häufigsten Fusionspartner AF4 und AF9 ist bis heute unklar.^[22] *Isnard et al.* konnten für AF4 einen Einfluss in der Lymphogenese nachweisen, da AF4-knockout Mäuse ein deutliches Defizit in der T- und B-Zellentwicklung zeigten.^[86] Darüber hinaus ist es in der Lage, mit DOT1L und dem positiven Transkriptions-Elongation-Faktor (P-TEFb) sowie indirekt mit der RNA-Polymerase 2 zu interagieren.^[87] Die Polymerase II wird so von ihrer arretierten Form in eine Elongationsform überführt.^[21] Diese Interaktion wird auch als Superelongationskomplex (SEC) bezeichnet. AF9 kann mit seinem C-Terminus mit AF4 interagieren und ist so ebenfalls an der Interaktion mit DOTL-1, PTEFb und der RNA-Polymerase 2 beteiligt.^[88] Der C-terminale Teil ist typischerweise auch in MLLr erhalten.^[89] Physiologisch gibt es Hinweise, dass AF9 vor allem regulatorische Funktionen in der Bildung von Erythrozyten und Megakaryozyten ausübt.^[90] Für AF9 wurde zudem gezeigt, dass es mit *Polycomb 3* und dem *BCL6 Transcription Repressor* (BCL6) interagiert und mit seiner

N-terminalen YEATS-Domäne eine Lesefunktion für Acetylierungen auf Histon 1 und 3 ausübt.^[91, 92] Letzteres spielt vor allem in der Rekrutierung von DOTL an das Chromatin eine Rolle, die YEATS-Domäne geht im Zuge der Translokation mit MLL jedoch verloren. Die Funktion wird möglicherweise durch das MLL-Protein übernommen.^[22, 88]

1.2.3 Molekulare Mechanismen und Folgen der Translokation

Die Translokation des MLL-Gens hat weitreichende Auswirkungen auf transkriptioneller und epigenetischer Ebene.^[84] Eine zentrale Rolle der aberranten Genexpression infolge der Translokation fällt einer veränderten Komplexbildung zur Kontrolle der Elongation durch die RNA-Polymerase 2 zu.^[85] Die häufigsten Fusionspartner, die etwa 80 % aller MLL-translozierten Leukämien ausmachen sind direkt oder indirekt in die Kontrolle dieser Komplexe integriert.^[85, 93] Die Transkription von Genen für Differenzierung, Proliferation und im Rahmen von Anpassungsvorgängen, die eine schnelle Reaktion erfordern, werden häufiger über die Regulation der Elongation als über den klassischen Weg der Initiation gesteuert.^[85, 94]

Dies trifft zu einem gewissen Grad auch auf viele andere Gene zu, da die RNA-Polymerase 2 nach ihrer Initiierung häufig stoppt, bis entsprechende Signale für weitere Transkription gegeben sind.^[85, 94] Einer dieser Komplexpartner ist DOT1L, eine Methyltransferase, die als einzig bekannte Transferase Lysin 79 an Histon 3 (H3K79) Mono-, Di- oder Trimethylieren kann.^[95] H3K79-Methylierung ist assoziiert mit erhöhter transkriptioneller Aktivität.^[96] Durch die Fusion von AF9, ENL, AF10 und AF17 an das N-terminale Ende des MLL-Protein, die direkt an DOT1L binden, verändert sich das epigenetische Methylierungsmuster MLL-spezifischer Targetgene wie HOXA9 und *homeobox protein Meis1* (MEIS1) von H3K4 zu H3K79.^[97] Dadurch wird die bisher moderate, regulierte Expression der Zielgene hochreguliert und bildet durch Differenzierungsblock und erhöhte Proliferation die Grundlage für onkogenes Potential und leukämische Transformation.^[98, 99] Zudem ist bekannt, dass H3K79 Methylierung von DOT1L durch die Ubiquitinierung von Histon 2B ermöglicht wird. Die Ubiquitinierung wird

dabei durch die RNF20 (*Ring Finger Protein 20*) Untereinheit des PAF-Komplexes des MLL-N katalysiert.^[100]

PTEFb ist ein weiterer wichtiger Komplexpartner, auf den verschiedene Fusionspartner direkt Einfluss nehmen und der MLL-x bedingte aberrante Transkription ermöglicht.^[101] PTEF-b ist ein Dimer aus der *cyclin-dependent kinase 9* (CDK9) und Cyklin T1/T2 oder Cyklin K und phosphoryliert die C-terminale *repeat* Domäne (CTD) der RNA-Polymerase 2. Phosphorylierung und Muster der CTD ermöglichen die Bindung akzessorischer Proteine, die so Initiierung, Elongation und Termination der RNA-Polymerase 2 regulieren.^[85] Insbesondere Serin-2 wird durch PTEF-b erkannt und ist phosphoryliert notwendig für effiziente Elongation.^[85] PTEF-b wird direkt durch AF4, AF5 und LAF-4 gebunden, AF9 und ENL nehmen Einfluss auf PTEF-b über die Bindung mit AF4.^[93] Durch die Fusion an MLL-N wird die Aktivität von PTEF-b erhöht und hält die RNA-Polymerase 2 in einem Status ständiger Elongationsaktivität und verhindert zudem Akkumulation von inhibitorischer Histonmethylierung an den adressierten Loci.^[93]

Durch das MLL-Fusionsprotein bleiben HOX-Loci daher selbst unter erzwungener Differenzierung offen und produktiv.^[93] Auch physiologisch interagiert das MLL-Wildtypprotein mit PTEF-b über die *Bromodomain Containing 4* (BRD4), das an CDK9 bindet und PTEF-b stimuliert.^[102] BRD4 wird über die H4K16 Acetylierung durch p300/CBP, MOZ und MOF gebunden, welche wiederum durch Interaktion mit der *transcriptional activation* Domäne des MLL-C rekrutiert werden.^[103] DOTL-1 inhibiert *Sirtuin 1* (SIRT1), eine Deacetylase, die gegenteilig zu diesem physiologischen Mechanismus wirkt. Diese Inhibition ist in Leukämien dadurch möglicherweise verstärkt.^[104] Ein weiterer Interaktionspartner für AF9 und ENL ist das *chromobox* Protein 8, Teil des *polycomb repressive complex 1* (PRC1). Dieser behindert Transkription durch Verdichtung des Chromatins und Ubiquitinierung von Histon H2A durch die Untereinheit *Ring Finger Protein 1* (RING1B).^[85, 105] AF9 und ENL interagieren mit dem Chromobox Homolog 8/Polycomb 3 (CBX8) und inhibieren PRC1. Infolgedessen wird das transkriptionelle Gleichgewicht gestört und es erfolgt eine

ungeminderte Expression von Zielgenen des PRC1 Komplexes, insbesondere von HOX-Genen. Dieser Mechanismus folgt damit dem bereits benannten aberranten Transkriptom in MLLr Leukämien.^[85, 106] Bisher ungeklärt ist, ob MLL-Fusionen alle 3 zuvor beschriebenen Mechanismen zur Aktivierung ihrer Zielgene rekrutieren.^[85]

Strukturanalysen von ENL und dem homologen AF9 haben ergeben, dass diese sowohl mit DOT1L-1, AF4 oder CBX8 interagieren können. Aufgrund einer spezifischen Strukturänderung abhängig vom Bindungspartner sind jedoch weitere Bindungen nach der Komplexbildung mit einem dieser Partner nicht mehr möglich.^[107] Möglicherweise wird das Adressieren mehrerer Mechanismen durch Dimerisation, Multimerisation oder mehrere MLL-Fusionskomplexe mit unterschiedlichen Partnern möglich.^[85, 106] Es ist zudem nicht klar, ob und welche weiteren Expressionsveränderungen neben den HOX-Genen, MEIS1 und PBX absolut notwendig für die Leukämogenese und Aufrechterhaltung der Erkrankung sind.^[85] Für einige epigenetischen und transkriptionellen Veränderungen in MLL-Fusionen konnte jedoch ein Einfluss in der Pathogenese nachgewiesen werden. Der Lysin spezifische Demethylase 1a (KDM1A) wurde für die MLL-AF9 Translokation eine Rolle im Differenzierungsblock zugewiesen.^[108, 109] Die Demethylierung von Dimethyl-H3K4 und der dadurch bedingte hohe Level an Trimethyl-H3K4 Modifikationen führt an Loci von deregulierten Genen in MLLr Leukämien zu Aktivierung und Genexpression. Weitere Deregulation konnte für den PRC2 Komplex und der resultierenden verminderten Trimethylierung von H3K27 am Locus von CDKN2A festgestellt werden.^[110] Weitere beteiligte Komplexpartner zeigen die Arbeiten von *Osaki et al.*, *Wilkinson et al.*, und *Slany et al.* auf. ^[85, 109, 111, 112]

Neben den pathophysiologischen Prozessen durch das Fusionsprotein und die damit einhergehende Komplexbildung mit aberranter Epigenetik und Transkription, gibt es auch eine strukturelle Folge des Bruches innerhalb des MLL-Gens. Ein großer Teil der Translokationen entsteht in der *Breakpoint cluster region* zwischen Exon 9 und 11.^[23] An dieser Stelle befindet sich die bereits im Abschnitt „Physiologische Funktion der MLL-, AF4- und AF9-Gene“ beschriebene

PHD-Domäne und die Bromodomäne, die zusammen mit CYP33 eine inhibitorische Funktion ausüben. Die chromosomale Translokation an dieser Stelle trennt diese beiden Domänen voneinander und zerstört den beschriebenen inhibitorischen Kontrollmechanismus.^[67] Die Chromatinlesefunktion über MEN1/LEDGF und den PAF-Komplex wird von der Chromatinschreibefunktion mit der SET-Domäne abgekoppelt und resultiert in einer ständigen Aktivität beider Teile.^[67] Der Einfluss dieser Abkopplung konnte durch die künstliche Fusion der PHD-Domäne an MLL-X gezeigt werden. Diese führte zu einem Verlust der Onkogenität durch Wiedergewinn der inhibitorischen Funktion.^[31, 32, 67] Bei einem Bruch im Intron 11 ist die Bindung von CYP33 an die PHD Domäne direkt negativ beeinflusst und ist mit einer schlechteren Prognose assoziiert.^[33]

1.3 Modellsystem zur Untersuchung altersabhängiger Unterschiede bei MLLr Leukämien

1.3.1 Bisherige MLLr Modellsysteme

Es wurden bisher verschiedene Modellsysteme etabliert, um die Biologie der MLLr Leukämieerkrankung besser zu verstehen und um therapeutische Ansätze zu entwickeln und anzuwenden.^[41, 113, 114] Die Verwendung von Patientenzellen ist zur Testung von Hypothesen, abgeleitet aus bisherigen Studien, limitiert, da diese in *in vitro* Kulturen schnell ausdifferenzieren und apoptotisch werden.^[115, 116] Zudem werden Patientenzellen in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium gewonnen und akquirieren weitere Mutationen, so dass eine Fokussierung auf ein onkogenes Event und die resultierenden Folgen eingeschränkt ist.^[36] Dies trifft auch auf kommerzielle Zelllinien zu.^[117, 118]

Aufgrund dieser Einschränkungen kommen häufiger murine Modellsysteme zum Einsatz. Eine Übersicht zu den diesen Modellsystemen, ihren Ergebnissen und Meilensteinen vermittelt das 2017 veröffentlichte Review von Thomas A. Milne.^[114] Es gibt rein murine Modelle, bei denen retrovirale modifizierte Mauszellen transplantiert werden, oder transgene Mäuse. Diese haben in der Vergangenheit wertvolle Informationen geliefert, jedoch sind die Ergebnisse muriner Systeme aufgrund der unterschiedlichen Physiologie von Maus und Mensch nicht direkt auf den Menschen übertragbar, wie verschiedene

Übersichtsarbeiten bereits zeigten.^[119, 120] Eine Alternative bieten Xenograft-basierte Modelle, bei denen retroviral modifizierte humane Zellen oder Patientenzellen beziehungsweise kommerzielle Zelllinien in Mäuse transplantiert werden.^[114] Letztere weisen ebenfalls die Problematik multipler vorbestehender Mutationen auf.^[118] Retroviral induzierte Veränderungen hingegen führen zu einer unphysiologischen Überexpression der Onkogene und spiegeln damit nicht die zugrunde liegende Patientenerkrankung wider.^[40, 41, 114, 121, 122]

Mithilfe neuer Geneditierungsmethoden wie *transcription activator-like effector nuclease* (TALEN), ist es gelungen, Doppelstrangbrüche in HSPCs einzuführen, die entweder in eine natürliche MLL-Translokation mündeten oder aber ein *Knock-in-Konstrukt* in das MLL-Gen ermöglichten. Dabei wird das MLL-Fusionsprodukt von einem endogenen Promoter exprimiert. Diese veränderten Zellen konnten nach einer langen Latenzzeit auch Leukämien in immunkompromittierten Mäusen induzieren.^[113, 123-125] Letztere rekapitulierten zwar viele Merkmale von MLLr Patientenleukämien, wie Proliferation, Morphologie und das Transkriptom, jedoch wiesen diese Arbeiten unter dem Einsatz von TALENs technische Limitationen auf, bedingt durch aufwändige Etablierung, niedriger methodischer Effizienz und eine damit verbundene umfangreiche *in vitro* Kultur zum Erreichen einer ausreichenden Anzahl MLLr Zellen.^[113, 121]

1.3.2 CRISPR/Cas9-basierte MLLr Modelle

Um die technischen Limitationen von TALENs zu umgehen und gleichzeitig Xenograft-Modelle mit humanen Zellen und endogenen physiologischen Promotoren zu erstellen, eignet sich die *clustered regular interspaced short palindromic repeats* (CRISPR)/Cas9-Technologie, wie unter anderem die kürzlich veröffentlichte Arbeit unserer Arbeitsgruppe durch *Secker et al.* zeigen konnten.^[117, 121, 125]

Ursprünglich wurde CRISPR zusammen mit der zweifach RNA-gesteuerten Endonuklease Cas9 (CRISPR-assoziierte Endonuklease 9) als ein adaptives bakterielles System zur Verteidigung gegen Phagen und Plasmidtransfer

bekannt.^[126] Der CRISPR-Locus besteht aus kurzen, sich wiederholenden palindromischen Sequenzen, sogenannten *repeats*. Im Laufe des Immunisierungsprozess werden fortlaufend kurze Fragmente eingedrungener Fremd-DNA von Phagen oder Plasmiden durch assoziierte Proteine des CRISPR-Systems als sogenannte *Protospacer* zwischen die *repeats* eingebaut.^[127-129] Durch Transkription und Prozessierung des CRISPR-Locus entsteht die CRISPR-RNA (crRNA), die am 5` Ende die fremde DNA in Form des *spacers* (etwa 20 Basenpaare lang) enthält und am 3` Ende einen Teil des *repeats*.^[130] Im Falle eines erneuten Einbaus des gleichen fremden DNA-Materials hybridisiert die crRNA mit diesem und triggert die Zerstörung des fremden komplementären Genmaterials.^[126, 131-133] Diese Zerstörung wird mit Hilfe von DNA-schneidenden CRISPR assoziierten Genen (Cas) erreicht. Es gibt 6 bekannte CRISPR-Systeme mit jeweils eigenen Cas-Proteinen, die mit der crRNA interferieren.^[126, 134, 135] Das CRISPR/Cas9-System gehört zum Typ 2 und verwendet Cas9, eine Endonuklease, zum Erkennen und Schneiden der DNA-Stränge.^[131, 136, 137] Im Zuge des Ausschaltungsprozesses der fremden DNA lagert sich an die crRNA zusätzlich eine transaktivierende RNA, die sogenannte tracrRNA, an und diese bilden gemeinsam die spezifische *guideRNA* (gRNA). Diese gRNA formt mit dem Cas9-Protein zusammen einen Ribonukleoproteinkomplex und leitet das Cas9-Protein an die entsprechende Stelle der DNA.^[138] Zusätzlich benötigt jeder Protospacer eine spezienspezifische 3-5 Basenpaar lange *protospacer adjacent motif* (PAM)-Sequenz in unmittelbarer Nähe, um ein Erkennen und Ausschalten der fremden DNA mithilfe des RNP-Komplexes zu ermöglichen.^[139, 140] Der formierte RNP-Komplex aus gRNA mit crRNA und tracrRNA und Cas9 Protein ist schließlich in der Lage, jede komplementäre DNA zum *spacer* in der crRNA mit entsprechend assoziierter PAM-Sequenz zu erkennen und Doppelstrangbrüche zu induzieren.^[126, 136, 137]

Das Ersetzen der tracrRNA und crRNA mit einer synthetischen *single guide RNA* (sgRNA), die die Eigenschaften dieser beiden durch direkte kovalente Bindung vereint, ermöglicht es, dieses prokaryontische Abwehrsystem effizient und vielfältig in Eukaryoten einzusetzen.^[137] Durch einfaches Anpassen der 15-20

Basenpaar langen RNA-Sequenz des *spacers* in der crRNA beziehungsweise der äquivalenten Struktur in der sgRNA kann dieses System so programmiert werden, dass theoretisch jede DNA-Sequenz im Genom anvisiert werden kann, um damit präzise Doppelstrangbrüche zu induzieren.^[126, 137] Diese Doppelstrangbrüche werden in Eukaryoten dann mittels *non-homologous end joining* (NHEJ) oder *high-fidelity homolgy directed repair* (HDR) repariert, um einen Zelluntergang zu verhindern.^[141, 142] Beim *NHEJ* entstehen so zufällig kleine Insertationen oder Deletionen einzelner Basenpaare an der Bruchstelle, die zu *frame-shifts* oder den Einbau eines Stoppcodons führen können.^[143, 144]

Durch den gezielten Einsatz von designten CRISPR/Cas-Systemen können somit *Gen-Knockouts* erzielt werden.^[126] Beim Einbringen von mehreren Doppelstrangbrüchen sind auch Genumlagerungen und in der Folge Translokationen möglich.^[121, 145] Beim HDR wird die Reparatur anhand einer DNA-Vorlage durchgeführt. Dies ermöglicht ein *Knockin* von Genen sowie spezifische Basenaustausche.^[144, 146, 147] Um Genomeditierungen mittels des CRISPR/Cas-Systems durchführen zu können, muss dieses in die Zielzellen eingebracht werden. *Gundry et al.* entwickelten in ihrer Arbeit eine effiziente Methode, um den bereits präformierten RNP-Komplex ohne den Gebrauch von viralen Vektoren oder den Einsatz von Plasmiden per Elektroporation einzubringen.^[148] Diese Methode wurde durch *Secker et al.* modifiziert und die sgRNA zur Adressierung der MLLr Loci eingesetzt.^[121] Hierdurch gelang die Etablierung eines CRISPR/Cas9-basierten MLLr Modells, das die Erkrankung präzise abbildet und seine phänotypischen, morphologischen wie auch molekulare Eigenschaften wiedergibt.^[117, 121]

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Chromosomale Translokationen, die das MLL-Gen betreffen, führen zu Leukämien, die meist mit einer besonders schlechten Prognose vergesellschaftet sind. Interessanterweise tritt bei Säuglingen die MLL-AF4-Translokation meist als ALL zum Vorschein und macht dabei 80 % aller akuten Leukämien aus. Im Gegensatz dazu führt die MLL-AF9-Translokation beim Erwachsenen in der Regel zur AML und trägt zu 10 % aller Leukämien bei.

Die Ursachen für diese altersabhängigen Unterschiede sind bisher nur unzureichend verstanden. Als Grundlage wurde in unserer Arbeitsgruppe ein authentisches CRISPR/Cas9-basiertes MLLr Leukämiemodell mit den Translokationspartnern AF4 und AF9 in humanen hämatopoetischen Zellen aus humanen Nabelschnurblut (huCB/CB) etabliert, das präzise die Biologie der Erkrankung abbildet.

Die Zielsetzungen dieser Promotion sind in Abbildung 1 schematisch zusammengeführt und stellen sich wie folgt dar:

- Etablierung eines adulten CRISPR/Cas9-MLL-AF4- und -AF9-Modell unter Verwendung von humanen HSPCs aus adultem humanem Knochenmark (huBM/BM)
- Charakterisierung des adulten CRISPR/Cas9-MLLr Modells: Proliferation, Viabilität, Morphologie, Immunphänotyp, Kolonienformationspotential (*colony forming assay*, CFA), Transkriptom (RNA-Sequenzierung, RT-qPCR der Zielgene) und Vergleich mit dem infantilen MLLr-Modell
- Einordnung der therapeutischen Anwendbarkeit von spezifischen Subleukämie-typischen möglichen Zielstrukturen.

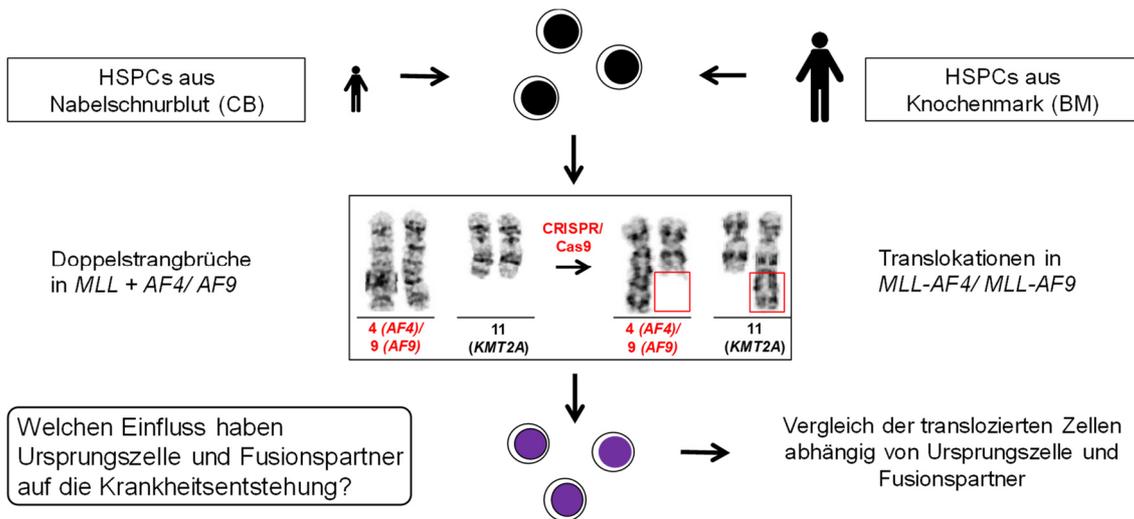


Abbildung 1: Schema der Zielsetzung. Dargestellt wird die Induktion MLL-AF4- und -AF9-Translokationen in HSPCs aus Nabelschnurblut und aus adultem Knochenmark (schwarze Zellen) durch Einbringen von Doppelstrangbrüchen (dargestellt wird das Karyogramm vor und nach Translokation). Anschließend erfolgen Analyse und Vergleich der translozierten Zellen (Darstellung durch violette Zellen) hinsichtlich der Fragestellung nach dem Einfluss der Ursprungszelle und des Fusionspartners. Veröffentlicht in Bruns L., Jahrestagung der DGHO. Berlin, 2019.^[149]

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Tabelle 3: Geräte

Geräte	Bezeichnung	Hersteller
Abzüge	<i>Niedrigraum-Tischabzug Scala</i>	WALDNER Laboreinrichtungen GmbH & Co. KG, Wangen, Deutschland
Autoklav		Wesa AG, Eupen, Belgien
Durchflusszytometer	<i>FACSCanto II</i> <i>LSRFortessa</i>	BD Biosciences, Franklin Lakes, Vereinigte Staaten von Amerika BD Biosciences, Franklin Lakes, Vereinigte Staaten von Amerika
Eismaschine	<i>Scotsman AF100</i>	Hubbard Systems Inc., Great Blakenham, Vereinigtes Königreich
Elektrophorese	<i>Bioanalyzer 2100</i> <i>PerfectBlue Horizontal Mini Gel System</i> <i>Mini-PROTEAN Tetra Cell</i>	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, Vereinigte Staaten von Amerika Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, Vereinigte Staaten von Amerika
Elektrophorese-Netzgerät	<i>Consort EV2310</i>	Consort bvba, Turnhout, Belgien
Elektroporations-Systeme	<i>Lonza 4D-Nucleofector</i>	Lonza Group AG, Basel, Schweiz
Gefrierbehälter	<i>Mr. Frosty</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
Geldokumentation	<i>EBOX VXY2</i>	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Heizblock	<i>AccuBlock Digital Dry Bath</i>	Labnet International Inc., Edison, Vereinigte Staaten von Amerika
Inkubatoren	<i>HERAcell 150</i> <i>Binder C170</i>	Heraeus Instruments, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland BINDER GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Kameras	<i>Nikon Digital Sight Axiocam 105 color</i>	Nikon Corporation, Tokyo, Japan Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Kühlgeräte	<i>BIOSAFE 420</i>	Cryotherm GmbH & Co. KG, Kirchen, Deutschland

	<i>BIOSAFE Control β</i>	Cryotherm GmbH & Co. KG, Kirchen, Deutschland
	<i>HERAfreeze HFU B Serie-86 °C</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
	<i>Ultratiefkühlschrank Liebherr premium</i>	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß, Deutschland
Magnete	<i>MidiMACS Separator</i>	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Mikroskope	<i>Axio Imager M2</i>	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
	<i>Nikon Eclipse TS100</i>	Nikon Corporation, Tokyo, Japan
	<i>Zeiss Primovert</i>	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
	<i>Zeiss Axiphot</i>	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
	<i>Zeiss Axiovert 25</i>	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Mikrowelle	<i>LG MG-3822G</i>	LG Electronics Inc., Seoul, Südkorea
Photometer	<i>NanoDrop 2000c</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
Pipetten	<i>Pipetboy</i>	INTEGRA Biosciences AG, Zizers, Schweiz
	<i>Multipette E3</i>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
	<i>Eppendorf Research plus</i>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Rühr-Heiz-Platten IKA	<i>Magnetrührer RCT basic</i>	IKA-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland
Sterilbänke	<i>HS 18/2</i>	Heraeus Instruments, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
	<i>LaminAir HBB 2448</i>	Heraeus Instruments, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Thermocycler	<i>T100Thermal Cycler</i> <i>LightCycler® 480 Instrument II</i>	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Vereinigte Staaten von Amerika Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
Thermoschüttler	<i>TS basic</i>	CellMedia GmbH & Co. KG, Elsteraue, Deutschland
UV-Tisch	<i>Transilluminator UST-20M-BE</i>	biostep GmbH, Burkhardtsdorf, Deutschland

Vakuumpumpe	VACUSAFE	INTEGRA Biosciences AG, Zizers, Schweiz
Waagen	<i>M-prove d = 0,01 g</i> <i>AT261Delta RangeFact d = 0,01 mg</i>	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
Wasserbäder	GFL 1083	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Zählkammer	Neubauer-Zählkammer	Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim vor der Rhön, Deutschland
Zentrifugen	<i>Shandon Cytospin 3</i> <i>Megafuge 1.0R</i> <i>Micro Star 17R</i> <i>Multifuge X3R</i> <i>Fresco 17</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika Heraeus Instruments, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland Heraeus Instruments, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland Heraeus Instruments, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien

Material	Bezeichnung/Größe	Hersteller
Deckgläser	20 x 24 x 0,4 mm 24 x 60 x 0,13-0,16 mm	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland
Dispenser-Spitzen	<i>Combitips advanced 5 mL</i>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Einfrierröhrchen	<i>Cryo.s 2 ml</i>	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Einmalhandschuhe	S, M, L, XL	PAUL HARTMANN AG, Heidenheim, Deutschland
Filterkarten	<i>Shandon FilterCards</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
Filterpapier	<i>Whatman 50 x 60 cm</i>	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland

Glaspipetten	<i>Pasteur Capillary Pipettes 230 mm</i>	Wilhelm Ulbrich GdbR, Bamberg, Deutschland
Kanülen	<i>Microlance 3 1,2 x 40 mm</i>	Becton Dickinson, Franklin Lakes, Vereinigte Staaten von Amerika
Mikroreaktions- gefäße	0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Objektträger	<i>SuperFrost</i> <i>SuperFrost Plus</i>	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland
Pipettenspitzen	<i>TipOne 10 µl, 100 µl, 200 µl</i> <i>Biosphere 1250 µl</i>	STARLAB INTERNATIONAL GmbH, Hamburg, Deutschland SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Rundbodenröhrchen	5 ml	Corning Inc., New York, Vereinigte Staaten von Amerika
MACS-Säulen	<i>LS column</i>	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Spritzen	1 ml, 2 ml, 5 ml, 20 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Stabpipetten	5 ml, 10 ml, 25 ml	Corning Incorporated, New York, Vereinigte Staaten von Amerika
Zellkulturflaschen	75 cm ²	Corning Inc., New York, Vereinigte Staaten von Amerika
Zellkulturplatten	Rundboden 96-Well Flachboden 96-Well Flachboden 48-Well Flachboden 24-Well	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland Corning Incorporated, New York, Vereinigte Staaten von Amerika
Zellkulturschalen	35 x 10 mm, 145 x 20 mm	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zentrifugenröhrchen	15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 5: Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
<i>AccuPrime Pfx DNA Polymerase</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
Ammoniumpersulphat (APS)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
SeaKem LE Agarose	Lonza Group AG, Basel, Schweiz
<i>Biocoll Separating Solution</i> 1,077 g/ml	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland

β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Vereinigte Staaten von Amerika
Bromphenolblau Natriumsalz	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Cas9 mit NLS	PNABio Inc., Thousand Oaks, Vereinigte Staaten von Amerika
<i>CD34 MicroBead Kit UltraPure, human</i>	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
CryoStor CS10	STEMCELL Technologies Inc., Vancouver, Kanada
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)</i>	gibco, Life Technologies Limited AG, Paisley, Vereinigtes Königreich
dNTP Mix	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ethanol (C ₂ H ₅ OH)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<i>Euparal</i>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
FcR Blocking Reagent	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
<i>fetal bovine serum (FBS)</i>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Fixogum (Rubber Cement)	Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland
Formaldehydlösung 4 %, gepuffert, pH 6,9	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<i>GelRed</i>	Biotium, Inc., Fremont, Vereinigte Staaten von Amerika
<i>GeneRuler Low Range DNA Ladder</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
Giemsas Azur-Eosin-Methylenblaulösung	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
HEPES	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Vereinigte Staaten von Amerika
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<i>KAPA HiFi PCR Kit</i>	Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
<i>KaryoMax Colcemid</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
<i>Maxima SYBR Green and Probe qPCR Master Mix</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
May-Grünwalds Eosin-Methylenblaulösung modifiziert	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Methanol (CH ₃ OH)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<i>MethoCult H4230</i>	STEMCELL Technologies Inc., Vancouver, Kanada

MLL- <i>Breakapart</i> Sonde	Cytocell Limited, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Natriumchlorid (NaCl) (tri-)Natriumcitrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Vereinigte Staaten von Amerika
<i>NEB Hi-Scribe T7 Kit</i>	New England Biolabs Inc., Ipswich, Vereinigte Staaten von Amerika
<i>NEB-Puffer 2</i>	New England Biolabs Inc., Ipswich, Vereinigte Staaten von Amerika
<i>NextSeq 500 High Output Kit v2.5 75 Cycles</i>	Illumina Inc., San Diego, Vereinigte Staaten von Amerika
<i>NucleoBond Xtra Maxi Plus EF</i>	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
<i>NucleoSpin DNA RapidLyse Kit</i>	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
<i>NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit</i>	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
<i>NucleoSpin RNA Kit</i>	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
<i>P3 Primary Cell 4D-Nucleofector X Kit S</i>	Lonza Group AG, Basel, Schweiz
<i>Penicillin-Streptomycin 10 000 U/ml (P/S)</i>	Lonza Group AG, Basel, Schweiz
<i>QuantSeq 3' mRNA-Seq Library Prep Kit FWD Random Hexamers</i>	Lexogen GmbH, Wien, Österreich Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
<i>RevertAid H Minus Reverse Transkriptase</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
<i>RevitaCell Supplement</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
<i>RiboLock RNase Inhibitor</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
<i>RNaseZAP</i>	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Vereinigte Staaten von Amerika
<i>Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium</i>	gibco, Life Technologies Limited AG, Paisley, Vereinigtes Königreich
<i>StemMACS HSC Expansion Media XF, human</i>	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Sucrose	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Vereinigte Staaten von Amerika
T7-Endonuclease-I	New England Biolabs Inc., Ipswich, Vereinigte Staaten von Amerika
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

<i>TruSeq RNA Library Prep Kit v2</i>	Illumina Inc., San Diego, Vereinigte Staaten von Amerika
<i>TruSeq Stranded Total RNA</i>	Illumina Inc., San Diego, Vereinigte Staaten von Amerika
Trypanblau 0.4 %	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Vereinigte Staaten von Amerika
Trypsin-EDTA (0.25 %), phenol red	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
Wasser nukleasefrei	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
<i>Xylencyanol FF</i>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Zellzusätze (<i>SR-1, UM-729</i>)	STEMCELL Technologies Inc., Vancouver, Kanada
Zytokine (FLT3-L, SCF, TPO, G-CSF, IL-3, IL-6)	PeproTech, Inc., Rocky Hill, Vereinigte Staaten von Amerika
<i>ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit</i>	ZytoVision GmbH, Bremerhaven, Deutschland
<i>z-Vad-FMK</i>	AdooQ BioScience LLC, Irvine, Vereinigte Staaten von Amerika
<i>Zymo RNA Clean & Concentrator Kit</i>	Zymo Research, Irvine, Vereinigte Staaten von Amerika

2.1.4 Medien, Puffer und Lösungen

Tabelle 6: Medien, Puffer und Lösungen

Medium	Inhaltsstoffe
2 % Agarose-Gel	TAE-Puffer 2 % Agarose 1:10 000 <i>GelRed</i>
2 x Natriumcitrat-Puffer	0,3 M NaCl 30 mM tri-Natriumcitrat pH 7.0 mit HCl
10 x Agarose-Ladepuffer	0,08 % Bromphenolblau 0,08 % Xylencyanol FF 1,6 mM EDTA 0,16 % SDS 66,7 % Sucrose
10 % Polyacrylamid-Gel	4,7 ml H ₂ O 3,3 ml Acrylamid 30 % 2,0 ml 5x TAE-Puffer 100 µl APS 10 % 10 µl TEMED
10x Polyacrylamid-Ladepuffer	0,025 g Bromphenolblau 500 µl 10 % SDS 200 µl 0,5 M EDTA 3,9 ml Glycerol

Cas9-Reaktionspuffer	ad 10 ml H ₂ O 20 mM HEPES 100 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ 0,1 mM EDTA
FACS-Buffer	PBS 2 % FBS
Fixativ	300 ml Methanol 100 ml Essigsäure 100 %
CFA Medium	<i>MethoCult H4230</i> 50 ng/ml FLT3-L, SCF, TPO, G-CSF, IL-3, IL-6, 0,375 µM <i>SR-1</i> , <i>UM729</i>
K562-Medium	RPM1 1640 10 % FBS 1 % P/S
MACS-Puffer	PBS 0,5 % BSA 2 mM EDTA
Mono-Mac-6-Medium	RPMI1640 10 FBS 1 % P/S 1 mM Glutamin 1 mM NEAA 1 mM Na-Pyruvat 10 µg/ml hu Insulin
SEM-Medium	IMDM 10 % FBS 1 % P/S
Sörensen-Puffer	25 ml 20x KH ₂ PO ₄ 100 ml 5x Na ₂ HPO ₄ ad 500 ml H ₂ O
Stammzellmedium	<i>StemMACS HSC Expansion Medium</i> 1 % P/S 50 ng/ml FLT3-L, SCF, TPO, G-CSF, IL-3, IL-6 0,75 µM <i>SR-1</i> , <i>UM729</i> 10 % FBS
TAE-Puffer	H ₂ O 0,04 M TRIS-acetat 0,001 M EDTA
Trypanblau 0,04 %	1 ml Trypanblau 0.4 % 9 ml PBS
Verdünnte May-Grünwald-Färbelösung (1:2)	25 ml Sörensen-Puffer 25 ml May-Grünwalds Eosin-Methylenblaulösung modifiziert
Verdünnte Giemsa-Färbelösung (1:10)	45 ml Sörensen-Puffer 5 ml Giemsas Azur-Eosin-Methylenblaulösung
Verdünnte Giemsa-Färbelösung (1:20)	47,5 ml Sörensen-Puffer

2,5 ml Giemsa's Azur-Eosin-Methylenblaulösung

2.1.5 Zellen und Plasmide

Tabelle 7: Zellen und Plasmide

Bezeichnung	Herkunft, Hauptsitz
Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut (HSPCs)	Universitätsklinikum Tübingen (Ethikvotum 751/2015BO2 der Ethikkommission der Universität Tübingen)
Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen aus adultem Knochenmark (HSPCs)	Universitätsklinikum Tübingen (Ethikvotum 309/2018BO2 der Ethikkommission der Universität Tübingen)
Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen aus adultem peripherem Blut (HSPCs)	Universitätsklinikum Tübingen (Ethikvotum 309/2018BO2 der Ethikkommission der Universität Tübingen)
K562	American Type Culture Collection, Manassas, Vereinigte Staaten von Amerika
SEM	American Type Culture Collection, Manassas, Vereinigte Staaten von Amerika
Mono-Mac-6	American Type Culture Collection, Manassas, Vereinigte Staaten von Amerika
PX458	Addgene, Warertown, MA, Vereinigte Staaten von Amerika

2.1.6 Primer

Tabelle 8: Primer^[121]

Funktion	Bezeichnung	Sequenz in 5'3'
sgRNA Produktion	MLL sgRNA1 fwd	taatacgactcactataGGAGTGGGCATGTA GAGGTAgtttagagctagaaATAGC
	MLL sgRNA2 fwd	taatacgactcactataGGAAGTATTTTAGAG ATTTTgtttagagctagaaATAGC
	MLL sgRNA3 fwd	taatacgactcactataGGAGCTCCTTATAGA TGAAGgtttagagctagaaATAGC
	AF4 sgRNA1 fwd	taatacgactcactataGGCCATGGCTTTTGG GTAGGgtttagagctagaaATAGC
	AF4 sgRNA2 fwd	taatacgactcactataGGTGCCTTCTCAGTC AGTTGgtttagagctagaaATAGC
	AF4 sgRNA3 fwd	taatacgactcactataGGCTGCTGTGCGATAG TCCTCgtttagagctagaaATAGC

	AF4 sgRNA4 fwd AF9 sgRNA1 fwd AF9 sgRNA2 fwd universal rev	taatacgactcactataGGCTGATCTTGACCA TCCATgtttagagctagaaATAGC taatacgactcactataGGTTTGATGCTAGCA GAGGTgtttagagctagaaATAGC aatacgactcactataGGATATGGAGAAAGT TGTAGgtttagagctagaaATAGC AGCACCGACTCGGTGCCACT
Analyseprimer zur Identifikation der Schneideeffizienz	MLL fwd MLL rev AF4 fwd AF4 rev AF9 fwd AF9 rev	AAGTGACCTTTCTCTCTCCACAGG ACAGAAAGTCCCCATTTATTCAGGAT GACCTAGCAGTGAAAGTCCATGATAA CTGGTAACCGAAATCTTCTCTCTCTT GCCTTGACTTCTCTCTAGCTATGAAA AAACTGCTGGGATTACAAGTGTGAG ATTCCCTGTTTAAACCAGCTAAAGAA GACATTTTCATCTCAAATCCGTCTTC GCAGTGAAAGTCCATGATAAAGAGAC ACAGAAAGTCCCCATTTATTCAGGAT TTCCCTGTTTAAACCAGCTAAAGAAA TCTTGACCAAATATTTAGCCAAGTT CAACCTCTGCTAGCATCAAACCTT CACCAACAGAAAGTCCCCATTTAT AGTGGACTTTAAGGAGGATTGTGAA
Analyseprimer zur Identifikation der Translokation	MLL-AF4 fwd MLL-AF4 rev AF4-MLL fwd AF4-MLL rev MLL-AF9 fwd MLL-AF9 rev AF9-MLL fwd AF9-MLL rev	TCAGTTTGGTGAGCTTGGCTT AGTGGACTTTAAGGAGGATTGTGAA TGGCAGGACTGGGTTGTTC
Analyseprimer der RT-PCR	MLL-X fwd cDNA MLL-AF4 rev cDNA MLL-X fwd cDNA MLL-AF9 rev cDNA	AGTGGACTTTAAGGAGGATTGTGAA TGGCAGGACTGGGTTGTTC
Analyseprimer der RT-qPCR	18S rRNA fwd 18S rRNA rev hu MEIS1 fwd hu MEIS1 rev hu HOXA9 fwd hu HOXA9 rev hu FFAR2 hu FFAR2 rev	CGGCTACCACATCCAAGGAA GCTGGAATTACCGCGGCT TGGCCACACGTCACACAGT TTTGTCTTATCAGGGTTCATCATC ATGAGAGCGGCGGAGACA CGCGCATGAAGCCAGTT CCCTCACGAGTTTTGGCTTC GGAGCCACGTGCTGCAGTA

2.1.7 Antikörper

Tabelle 9: Antikörper

Fluorescein isothiocyanate (FITC), *Cluster of differentiation* (CD), Phycoerythrin (PE), Allophycocyanin (APC), Cyanin (Cy), *Alexa Fluor* (AF), *Brilliant Violet* (BV), Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP),

Antigen	Fluorochrom	Klon	Hersteller, Hauptsitz
---------	-------------	------	-----------------------

CD9	PE	eBioSN4/S N4 C3-3A2	eBioscience Inc., Frankfurt am Main, Deutschland
CD10	APC/Cy7	HI10a	Biologend Inc., San Diego, Vereinigte Staaten von Amerika
CD14	AF700	HCD14	Biologend Inc., San Diego, Vereinigte Staaten von Amerika
CD15	BV605	W6D3	Biologend Inc., San Diego, Vereinigte Staaten von Amerika
CD19	APC	HIB19	Biologend Inc., San Diego, Vereinigte Staaten von Amerika
CD20	BV421	2H7	Biologend Inc., San Diego, Vereinigte Staaten von Amerika
CD24	BV650	ML5	BD Biosciences, Franklin Lakes, Vereinigte Staaten von Amerika
CD32	PE	FUN-2	Biologend Inc., San Diego, Vereinigte Staaten von Amerika
CD33	BV421	WM53	Biologend Inc., San Diego, Vereinigte Staaten von Amerika
CD34	APC	4H11	eBioscience Inc., Frankfurt am Main, Deutschland
CD38	PE/Cy7	HIT2	eBioscience, Inc., Frankfurt am Main, Deutschland
CD64	APC/Cy7	10.1	Biologend Inc., San Diego, Vereinigte Staaten von Amerika
CD117	BV711	104D2	Biologend Inc., San Diego, Vereinigte Staaten von Amerika
CD135	PerCP/Cy5.5	BV10A44H2	Biologend Inc., San Diego, Vereinigte Staaten von Amerika
Viability Dye eFluor 506	≈ AmCyan	-	eBioscience Inc., Frankfurt am Main, Deutschland

2.1.8 Software

Tabelle 10: Software

Software	Hersteller, Hauptsitz
<i>BBMap Tools Suite v38.67</i>	DOE Joint Genome Institute, Berkeley, Vereinigte Staaten von Amerika
<i>DESeq2 v1.26</i>	Bioconductor, Buffalo, Vereinigte Staaten von Amerika
<i>Ensembl genome browser</i>	Europäisches Institut für Bioinformatik, Hinxton, Vereinigtes Königreich
<i>FACS DIVA</i>	BD Biosciences, Franklin Lakes, Vereinigte Staaten von Amerika

FastQC v0.11.4	Babraham Bioinformatics, Cambridge, Vereinigtes Königreich
<i>FlowJo V10</i>	TreeStar, FlowJo LLC, Ashland, Vereinigte Staaten von Amerika
<i>GenomicAlignments V1.14.2</i>	Bioconductor, Buffalo, Vereinigte Staaten von Amerika
<i>GraphPad PRISM 8</i>	GraphPad Software Inc., San Diego Vereinigte Staaten von Amerika
<i>GSEA V3.0</i>	Broad Institute Inc., Cambridge, Vereinigte Staaten von Amerika
<i>Ikaros Karyotypisierungssystem</i>	MetaSystems Hard & Software GmbH, Altlußheim, Deutschland
<i>ImageJ 1.48v</i>	National Institutes of Health, Bethesda, Vereinigte Staaten von Amerika
<i>NCBI's Gene Expression Omnibus</i>	National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Vereinigte Staaten von Amerika
<i>NIS elements</i>	Nikon Corporation, Tokyo, Japan
<i>Primer3web Version 4.1.0</i>	Whitehead Institute for Biomedical Research Cambridge, England
Rsubread v2.0.0	Olivia Newton-John Cancer Research Institute, Melbourne, Australia
Star V2.7.0a	GitHub Inc., San Francisco, Vereinigte Staaten von Amerika
<i>Surrogate variable analysis V3.26.0</i>	Bioconductor, Buffalo, Vereinigte Staaten von Amerika
<i>ZEN 3.0 blue edition</i>	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland

2.2 Methoden

Die hier verwendeten Methoden und die im Folgenden dargestellten Vorgehensweisen zur Generierung von MLL-AF4- und MLL-AF9-translozierten Zellen in HSPCs aus huBM mittels CRISPR/Cas9 beruhen auf dem von *Secker et al.* entwickeltem CRISPR/Cas9-basierten MLLr Modell von HSPCs aus huCB.^[117, 121]

2.2.1 Gewinnung der HSPCs aus huBM

Die Entnahme des huBM zur Knochenmarktransplantation erfolgte nach ärztlicher Aufklärung durch die Abteilung der Inneren Medizin II, Hämatologie und Onkologie, des Universitätsklinikums Tübingen. Nach Weiterverarbeitung des entnommenen huBM für die medizinische Behandlung der Patienten/-innen wurden die zuvor benutzten und nicht mehr benötigten Knochenmarkentnahmebeutel, Filter sowie Zählproben anonymisiert und mit schriftlichem Einverständnis der Patienten/-innen direkt nach der Entnahme zur weiteren Verarbeitung in das Labor übergeben. Ein entsprechendes Ethikvotum 309/2018BO2 des Universitätsklinikums Tübingen lag vor.

Zur Gewinnung der huBM erfolgte zunächst eine Separation mononukleärer Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation. Hierfür wurden die gebrauchten Entnahmebeutel und Filtersysteme mit 345 ml Phosphatpuffer (*phosphate buffered saline*, PBS) ausgewaschen, in eine Zellkulturflasche überführt und die Zählproben hinzugegeben. Anschließend wurden je 15 ml einer Biocoll-Lösung mit je 35 ml der ausgewaschenen Zelllösung in 10 x 50 ml Zentrifugationsröhrchen vorsichtig überschichtet. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei Raumtemperatur und 400 x g mit langsamer Beschleunigung und Bremse für 30 Minuten. Durch die Dichtegradientenzentrifugation bildeten sich 4 Phasen: Zuerst eine Phase aus Erythrozyten und Granulozyten, darüber eine Phase bestehend aus dem Biocoll-Polymer, eine intermediäre Phase, die die mononukleären Zellen enthält und eine oberstehende Plasmaphase. Die intermediäre Phase wurde entnommen und in 5 x 50 ml Zentrifugationsröhrchen überführt. Anschließend wurden diese mit PBS auf 50 ml aufgefüllt. Zur weiteren Aufreinigung wurden die Proben mit 300 g für 5 Minuten

erneut zentrifugiert und der Überstand über den so gewonnenen Zellpellets verworfen. Die Zellpellets wurden nun zusammengeführt, in 40 ml PBS gelöst und zur Abtrennung von Thrombozyten in einem erneuten Waschschrift bei 200 g zentrifugiert. Für die magnetische Zellseparation (*magnetic activated cell sorting*, MACS) zur Isolation von HSPCs aus den gewonnenen mononukleären Zellen wurde das *human CD34 MicroBead Kit UltraPure* von Miltenyi verwendet und nach Herstellerangaben eingesetzt. Mittels Neubauer-Zellkammer wurde die Zellzahl ermittelt und diese pro 1×10^8 Zellen in 300 μ l MACS-Puffer resuspendiert. Daraufhin wurden 100 μ l *FcR Blocking Reagent* sowie 100 μ l *CD34 MicroBeads* je 10^8 Zellen hinzugefügt und für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden diese zum Entfernen der überschüssigen *beads* mit 10 ml MACS-Puffer gewaschen. Hierzu erfolgte eine Zentrifugation bei 300 g für 10 Minuten und anschließender Resuspension in 500 μ l MACS-Puffer. Die Zellen wurden dann auf die im Magneten (*MidiMACS Separator*) eingespannte sowie befeuchtete *LS column* Magnetsäule gegeben und 3 x mit 3 ml MACS-Puffer gewaschen. Durch die Bindung der *MicroBeads* an CD34 verbleiben die HSPCs mit diesem Oberflächenmarker in der Magnetsäule. Durch die Waschschriffe werden Zellen ohne Markierung entfernt. Anschließend wurde die Säule aus dem Magnet entfernt, die markierten Zellen mit 5 ml MACS-Puffer sowie Druck mittels eines Konus schnell aus der Säule gelöst und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen gegeben. Die so isolierten Zellen wurden anschließend erneut bei 300 g für 10 Minuten gewaschen und schließlich in 0,5 ml Stammzellmedium ohne Zugabe von FBS gegeben. Die Kultivierung erfolgte für 48 Stunden in einer 48-Well-Zellkulturplatte bei 37 °C und 5 % CO₂. Pro Well wurden je 1×10^6 Zellen verwendet. Der Erfolg der Separation wurde 24 Stunden später durchflusszytometrisch kontrolliert. Diese Untersuchungsmethode wird im Kapitel 2.2.4.1 dargestellt.

2.2.2 Produktion der sgRNAs für das CRISPR/Cas9-System und funktionelle Testung in K562-Zellen

2.2.2.1 Herstellung der sgRNAs

Zur Adressierung der Schnittstellen im MLL-, AF4- und AF9-Gen und zur Induktion der Doppelstrangbrüche mittels des CRISPR/Cas9-Systems ist die Herstellung spezifischer sgRNAs notwendig. *Secker et al.* ist es gelungen, effiziente sgRNAs zu designen.^[121] Entsprechend wurden für diese Arbeit sgRNAs nach dem Protokoll von *Secker et al.* hergestellt.^[117]

Dieses Protokoll verwendet methodisch eine Polymerasekettenreaktion (PCR) sowie nachfolgender *in vitro* Transkription und orientiert sich an der Arbeit von *Gundry et al.*^[148] Das Design der sgRNAs berücksichtigt die bereits im Kapitel 1.2.3 beschriebenen patientenüblichen Schnittstellen. Die Schnittstelle für das MLL-Gen liegt daher in Intron 11, für AF4 in Exon 3 und für AF9 in Intron 4. Die Bezeichnung der Exons und Introns erfolgt nach *Nilson et al.* für MLL sowie auf *Nilson et al.* und *Strissel et al.* für AF4 und AF9.^[121, 150-152]

Eine sgRNA besteht, wie im Kapitel 1.3.2 dargestellt, aus einem universellen Grundgerüst und der spezifischen *target complementary region*, die die Bindung an die spezifischen Schnittstellen in den *target*-Genen ermöglicht. Das universelle Grundgerüst wurde mittels des Plasmids 458 (Addgene) bereitgestellt. Die genspezifische *target complementary region* wurde als Oligonukleotid durch die Firma Sigma Aldrich hergestellt und als Primer verwendet. Für die nachfolgende Transkription beinhaltet die spezifische Sequenz zusätzlich einen T7 Promotor, eine Modifikation von ATAGC am 3'-Ende sowie zur Verbindung mit dem Grundgerüst eine überlappende Sequenz mit diesem. Mittels PCR lassen sich die Bestandteile der sgRNA verbinden und amplifizieren. Ein universeller Rückwärtsprimer wurde für das Grundgerüst eingesetzt. Die Primer sind in Kapitel 2.1.6 hinterlegt.

Für die PCR wurde das *KAPA Hifi PCR Kit* nach Herstellerangaben verwendet entsprechend dem in Anhang 1A dargestellten Programm und Pipettierschema.^[121] Die Auftrennung der PCR-Produkte wurde mittels eines 2 %-igen Agarose-Gels bei 100 V für 45 Minuten ermöglicht. Zur Bestimmung der Produktgröße wurde der *GeneRuler Low Range DNA Ladder* mit aufgetragen und zur Visualisierung unter dem UV-Licht *GelRed* hinzugefügt. Die Isolierung

aus dem Agarose-Gel erfolgte nach Herstellerangaben mittels *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kits*. Die resultierende DNA wurde in 15 µl H₂O eluiert. Anschließend erfolgte die *in vitro* Transkription nach Herstellerangaben mittels *NEB Hi-Scribe T7 Kit* mit dem in Anhang 1B dargestelltem Pipettierschema und einer Inkubation für 5h bei 37 °C. Zur Prävention des Abbaus der RNA wurde der Arbeitsplatz mit *RNaseZAP* vorbehandelt.^[117, 121] Das Produkt wurde schließlich mit H₂O auf 50 µl ergänzt. Anschließend erfolgte eine Aufreinigung mit Hilfe des *Zymo RNA Clean & Concentrator Kit* nach Herstellerangaben. Die so hergestellten sgRNAs wurden mit einer Konzentration von 1 µg/µL bei -80 °C in 0,5 ml Mikroreaktionsgefäßen gelagert.

2.2.2.2 *In vitro* cleavage assay zur funktionellen Testung

Zur Überprüfung der Funktionalität wurde die Schneideeffizienz *in vitro* mittels des *in vitro cleavage assays* ermittelt. Hierfür wurde zunächst mit dem *NucleoSpin DNA RapidLyse Kit* nach Herstellerangaben genomische DNA von K562 als Testzellen gewonnen. Die DNA wurde dann mit einer PCR an dem Abschnitt der erwarteten Schnittstelle des CRISPR/Cas9-System amplifiziert. Die verwendeten Primer und Modifikationen des *AccuPrime Pfx DNA Polymerase* Programms wurden durch *Secker et al.* entworfen und in dieser Arbeit identisch verwendet.^[117] Im Anhang 1C sind die detaillierten PCR-Bedingungen dargestellt. Die Auftrennung und Isolierung der PCR-Produkte erfolgten analog zu dem im Kapitel 2.2.2.1 beschriebenen Vorgehen. Das gewonnene PCR-Produkt wurde anschließend mit der sgRNA und dem Cas9-Protein bei 37 °C für 10 Minuten zusammen inkubiert, basierend auf dem im Anhang 1D dargestellten Pipettierschema. Als Kontrolle wurde die DNA nur mit dem Cas9 Protein zusammengegeben. Daraufhin wurde das Produkt auf einem 10 %-igen mit *GelRed* versetzten Polyacrylamid-Gel gegeben und bei 100 V für 70 Minuten aufgetrennt. Die bildgebende Analyse unter UV-Licht am Geldokumentationssystem *EBOX VXY2* ermöglichte dann die Darstellung und Ermittlung der Schneideeffizienz.

2.2.2.3 *In vivo* Testung der sgRNAs

Die *in vivo* Testung der sgRNAs wurde mittels Genomeditierung von K562-Zellen per Nukleofektion ebenfalls nach dem Vorbild von *Secker et al.* durchgeführt.^[117] Für die Nukleofektion wurden 1×10^6 Zellen/ml in K562-Medium bei 5 % CO₂ kultiviert, um so eine möglichst optimale Proliferation zu erreichen. Die Elektroporation der Zellen erfolgte mit dem *P3 Primary Cell 4D-Nucleofector X Kit S*. Dafür wurden 1 µl Cas9-Protein und 1 µl sgRNA mit einer Konzentration von 1 µg/µl in den beiliegenden 20 µl *strip* gegeben. Die Inkubation wurde für 30 Minuten gewährleistet. Die K562-Zellen wurden bei 300 x g und Raumtemperatur gewaschen und jeweils 3×10^5 Zellen in 20 µl *P3 Solution* aufgenommen. Die Zellen wurden dann zügig zum formierten RNP-Komplex aus sgRNA und Cas9-Protein gegeben und vorsichtig gemischt. Als Kontrolle wurden Zellen in ein Well pipettiert, in dem zuvor nur das Cas9-Protein ohne die sgRNA pipettiert wurde. Um zudem durchflusszytometrisch eine Effizienzkontrolle der Elektroporation zu ermöglichen, wurde optional 0,5 µl eines GFP-Plasmids hinzugefügt. Dieses wurde zusammen mit dem sgRNA/Cas9-Komplex durch die Nukleofektion in die Zellen eingebracht und fluoreszierte bei erfolgreicher Integration in die Zelle. Die Nukleofektion erfolgte mit dem *Lonza 4D Nucleofector* und dem Programm FF-120. Nach der Elektroporation schloss sich eine 10-minütige Inkubation und schließlich das Abstoppen der Reaktion mit 100 µl K562-Medium an.

Die behandelten Zellen wurden anschließend in ein 96-Rundbodenwell überführt und auf 200 µl K562-Medium aufgefüllt. Nach 48 Stunden Kultivierung bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde die Kontrolle der Elektroporationseffizienz mittels durchflusszytometrischer Bestimmung des GFP-Signals und der Kontrolle der Vitalität am *FACSCanto II* durchgeführt. Für die Auswertung wurde die *FACS DIVA* Software verwendet. Die Evaluierung der Schneideeffizienz der sgRNAs erfolgte mit dem T7-Endonuklease-I-Assay. Hierfür wurde nach der beschriebenen 48-stündigen Kultivierung mit Hilfe des *NucleoSpin DNA RapidLyse Kit* die DNA nach Herstellerangaben isoliert. Nachfolgend wurde, wie in Kapitel 2.2.2.2 beschrieben, der Abschnitt der erwarteten Schnittstelle per PCR amplifiziert. Verwendet wurde die *AccuPrime Pfx DNA Polymerase*, die Primer sind in Kapitel 2.1.6 abgebildet.^[117] Im Anhang 1C sind die detaillierten PCR-

Bedingungen dargestellt. Die Auftrennung und Isolierung der PCR-Produkte erfolgten analog zu dem im Kapitel 2.2.2.1 beschriebenen Vorgehen.

Die verwendeten sgRNAs mit dem CRISPR/Cas9-System erzeugen Doppelstrangbrüche in der DNA, die anschließend durch zelleigene Reparaturmechanismen wieder zusammengeführt werden. Dieser Prozess ist fehleranfällig und resultiert in veränderten Basenabfolgen. Das isolierte PCR-Produkt enthält daher sowohl veränderte als auch nicht veränderte Abschnitte. Durch Denaturierung der Doppelstrang DNA und langsame Hybridisierung können korrekt reparierte und fehlerhaft reparierte DNA-Stränge zusammengeführt werden. Die T7-Endonuklease erkennt Basenfehlpaarungen und verdaut die entstandenen *Loops* an diesen hergestellten Doppelsträngen. Durch anschließende Elektrophorese lässt sich dies darstellen. Die Veränderungen durch das CRISPR/Cas9-System werden so bewiesen und die Funktionalität und die Effizienz der jeweiligen sgRNAs bestätigt. Die Hybridisierung erfolgte nach dem in Anhang 1E dargestellten Ansatz. Der anschließende Verdau erfolgte bei 37 °C für 15 Minuten mit dem in Anhang 1F dargestellten Schema. Die anschließende Elektrophorese erfolgte durch Auftragen der DNA auf ein 10 %-iges Polyacrylamid-Gel und einer Laufzeit von 70 Minuten bei 100 V. Zur Abschätzung der Größe der Fragmente wurde eine *GeneRuler Low Range DNA Ladder* mit aufgetragen. Die anschließende Färbung des Gels gelang mittels 3 x *GelRed* für 30 Minuten. Die Bildgebung konnte mittels des Geldokumentationssystem *EBOX VXY2* und für die Analyse mit der Software *ImageJ 1.48v* erzielt werden.

2.2.3 Genomeditierung der HSPCs aus huBM

2.2.3.1 Elektroporation der HSPCs aus huBM

Die HSPCs wurden, wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben, isoliert und für 48 Stunden mit einer Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml ins Stammzellmedium bei 37 °C und 5 % CO₂ in einer 48-Well-Platte kultiviert. Zur Induktion der Doppelstrangbrüche, die zur Translokation des MLL-Gens mit dem jeweiligen Fusionspartner führen sollen, musste der RNP-Komplex per Elektroporation in die Zellen eingebracht werden. Die Nukleofektion erfolgte mit dem *P3 Primary*

Cell 4D-Nucleofector X Kit S. Jeweils 1 μL Cas9-Protein (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) und 1 μL sgRNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) wurden dafür in ein 20 μl *Strip* pipettiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 30 Minuten. Zur Erzeugung der Translokation sind zwei Doppelstrangbrüche gleichzeitig mit Hilfe des CRISPR/Cas9-Systems notwendig. Daher wurden in einem Ansatz die sgRNA für das MLL-Gen und die sgRNA für AF4 oder AF9 mit Cas9 in einem 20 μl Well vorinkubiert. Die HSPCs wurden bei 300 x g und Raumtemperatur zentrifugiert und je 3×10^5 Zellen in 20 μl *P3 Solution* gelöst. Diese wurden dann zu dem formierten RNP-Komplex zugegeben, gemixt und zügig mit dem Programm EO-100 elektroporiert. Als Kontrolle wurden Zellen verwendet, bei denen nur das Cas9 Protein ohne sgRNAs eingesetzt wurde. Zur Effizienzkontrolle der Einbringung des RNP-Komplexes konnte optional 0,5 μl GFP-Plasmid vor Elektroporation hinzugegeben und im Anschluss durchflusszytometrisch mit dem *FACSCanto II* und der Software *FACS DIVA* analysiert werden. Nach der Elektroporation erfolgte eine 3-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. 100 μl 37 °C warmes, hinzugefügtes Stammzellmedium ermöglichten den Abbruch der Reaktion. Jeder Ansatz wurde anschließend in zwei 96-Rundbodenwells mit je 200 μl Stammzellmedium gegeben. Die Kultivierung erfolgte weiter bei 37 °C und 5 % CO_2 . Zur Apoptoseinhibition nach der Elektroporation wurden dem Stammzellmedium 20 μM des Caspase-Inhibitors *z-Vad-MNK* hinzugegeben. Nach 48 Stunden erfolgte, wie in Kapitel 2.2.2.3 beschrieben, die Funktionalitätstestung der sgRNA auch in HSPCs mit dem T7-Endonuklease-I-Assay.

2.2.3.2 Zellkultur der translozierten Zellen und Kryokonservierung

Die verwendeten Kulturbedingungen und Kryokonservierung wurden nach Secker modifiziert.^[117] 48 Stunden nach Elektroporation wurde dem Stammzellmedium 10 % FBS zugegeben. Die translozierten Zellen wie auch die Kontrollzellen wurden im Folgenden in 48-Well-Platten mit 500 μl Stammzellmedium und einer Konzentration von mindestens 2×10^6 Zellen/ml und maximalen 3×10^6 Zellen/ml bei 37 °C und 5 % CO_2 kultiviert. Die Proliferation der Kultur wurde durch Zellzahlbestimmung alle 2 Tage mittels einer Neubauer-Zählkammer überwacht und in Proliferationskurven dokumentiert. Zur

Differenzierung zwischen lebenden und toten Zellen wurden diese vor Zählung mit Trypanblau-Lösung gefärbt. Für weitere Untersuchungen wurden regelmäßig Zellpellets erstellt. Hierfür wurden mindestens 2×10^6 Zellen mit $16.100 \times g$ bei 4°C für 1 Minute zentrifugiert und anschließend mit $500 \mu\text{l}$ 4°C kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen unter gleichen Bedingungen erneut zentrifugiert. Die Lagerung erfolgte bei -80°C .

Um eine Kryokonservierung der Zellen zu ermöglichen, wurde dem Medium für 2 Stunden *RevitaCell Supplement* zugegeben. Das Gefrieren der Zellen bei -80°C in *CryoStor CS 10* war dann mit einer Konzentration von 1×10^7 Zellen/ml möglich. Nach mindestens 24 Stunden bei -80°C konnten die Zellen in eine Langzeitaufbewahrung bei -160°C überführt werden. Das Auftauen der Zellen erfolgte bei 37°C im Wasserbad. Danach wurden diese pro 1 ml mit 50 ml PBS versetzt und bei $300 \times g$ und Raumtemperatur abzentrifugiert. Diese wurden dann in Stammzellmedium plus den Zellzusatz *RevitaCell Supplement* resuspendiert und wie zuvor kultiviert.

2.2.3.3 PCR zur Identifikation der Translokation

Zur Identifikation der Translokation wurde aus den regelmäßig gewonnenen Zellpellets die genomische DNA mit dem *NucleoSpin DNA RapidLyse Kit* nach Herstellerangaben isoliert. Nachfolgend wurde der durch CRISPR/Cas9 erzeugte translozierte Abschnitt der DNA per PCR auf Vorhandensein untersucht. Hierfür wurden Primer *upstream* im MLL-Gen und *downstream* im AF4- oder AF9-Gen nahe der CRISPR/Cas9-Schnittstelle verwendet. Sowohl das Design der Primer mittels *Primer3web Version 4.1.0* als auch die Titrierung der optimalen Anlagerungstemperatur und die Testung der Primer erfolgte nach *Secker et al.*^[117, 121] Die Primersequenzen sind in Kapitel 2.1.6 hinterlegt. Für die PCR wurde die *AccuPrime Pfx DNA Polymerase* nach Herstellerangaben verwendet.^[117] Die PCR Bedingungen sind im Anhang 1C dargestellt. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte wie in Kapitel 2.2.2.1 beschrieben mit verlängerter Laufzeit von 1 Stunde. Bei erfolgreich translozierten Zellen war unter UV-Licht eine deutliche Bande entsprechend der erwarteten Länge der PCR-Produkte für MLL-AF4 und MLL-AF9 nachzuweisen. Die Dokumentation erfolgte

mittels des Geldokumentationssystems *EBOX VXY2*. Zur anschließenden Sanger-Sequenzierung wurden die positiven Banden unter UV-Licht ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit* herausgelöst. Je 18 ng des PCR-Produktes pro 100 Basenpaare wurden in 12 µl H₂O mit je 3 µl des 10 µM Vorwärts- und Rückwärtsprimers zur Sanger-Sequenzierung gegeben. Diese wurde durch das *Microsynth SeqLab* durchgeführt. Um den wachsenden Anteil translozierter Zellen im Verlauf darzustellen, wurde eine semiquantitative PCR mit jeweils 100 ng DNA-Proben eingesetzt und schließlich gleichzeitig in chronologischer Reihenfolge auf dem 2 %-igen Agarose-Gel aufgetragen. Die Stärke der Bande gab Hinweise auf die Zunahme der translozierten Zellen.

2.2.3.4 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Bei positivem Ergebnis der im vorherigen Kapitel dargestellten Translokations-PCR wurde eine FISH durchgeführt. Diese dient zum einen als sicherer Nachweis der entstandenen Translokation und zum anderen konnte so der prozentuelle Anteil translozierter Zellen in der Zellkultur bestimmt werden. Bei 100 %-reinen translozierten Zellkulturen konnten sich dann weitere Untersuchungen zur Charakterisierung bezüglich der Morphologie, des Immunphänotyps und des Transkriptoms anschließen. Zur Vorbereitung der FISH-Analyse wurden 3×10^6 Zellen bei 300 x g und Raumtemperatur für 5 Minuten zentrifugiert und mit 1 ml PBS versetzt. Anschließend wurden diese direkt in 4 %-iger Formaldehydlösung aufgenommen und eine halbe Stunde auf Eis fixiert. Die Durchführung der FISH-Analyse fand in Kooperation mit dem Institut für Pathologie und Neuropathologie des Uniklinikums Tübingen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Falko Fend und in Zusammenarbeit mit Frau Barbara Mankel statt. Für die Analyse wurden jeweils 10 µl der Zellsuspension zunächst auf silanisierte *SuperFrost Plus* Objektträger aufgetropft und anschließend getrocknet. Danach wurde für 40 Minuten 2 x Natriumcitrat (*saline-sodium citrate*, SSC) -Puffer bei 95 °C zugesetzt. Daran anschließend wurde bei Raumtemperatur die Demineralisierung und Dehydrierung mit einer aufsteigenden Alkoholreihe von 70-100 % Ethanol erreicht. Die *MLL-breakapart* Sonde wurde auf 37 °C für 5 Minuten vorgewärmt und 4 µl auf die ebenfalls vorgewärmten und getrockneten

Objektträger gegeben. Diese wurden dann mit einem Deckglas und Fixogum abgedeckt, abgedichtet und im *Hybrite Hybridization System* für 5 Minuten bei 72 °C denaturiert. In etwa 12 Stunden erfolgte dann die Hybridisierung bei 37 °C und konstanter Luftfeuchtigkeit. Die weitere Präparation erfolgte am nächsten Tag mit dem *ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit*. Zunächst wurden die Proben für 2 Minuten bei 72 °C mit dem *Cytology Stringency Wash Buffer* SSC, dann für 1 Minute bei Raumtemperatur mit dem *Cytology Wash Buffer* SSC gewaschen und abschließend mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 85 %, 100 %) getrocknet. Als letzter Schritt vor der Auswertung erfolgte die Eindeckung der Präparate mit einer *DAPI/DuraTect-Solution*. Am *Axio Imager M2* wurden final je 100 Zellen analysiert.

2.2.3.5 Karyotypisierung

Die Karyotypisierung wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik des Universitätsklinikums Tübingen und der Leitung von Dr. med. Ulrike Mau-Holzmann erstellt. Hierfür wurden vorbereitend mindestens 5×10^6 der translozierten Zellen entnommen. Um eine Arretierung der Mitose zu erreichen, musste zunächst 50 µl *KaryoMax Colcemid* hinzugefügt und anschließend bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert werden. Die Zellen wurden dann bei 200 x g und Raumtemperatur für 6 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Zellen in 0,075 M Kaliumchlorid-Lösung gegeben und dann erneut bei 37 °C für 20 Minuten inkubiert. Die Zellsuspension wurde im Folgenden bei 300 x g und Raumtemperatur für 6 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen. Zur Fixation der gewonnenen Zellsuspension wurden in drei Schritten jeweils 5 ml Fixativ verwendet. Der erste Milliliter Fixativ wurde dabei tröpfchenweise hinzugegeben. Nach jeder Hinzugabe erfolgte eine anschließende Zentrifugation bei 300 x g und Raumtemperatur für 6 Minuten und das Verwerfen des Überstandes. Nach der zweiten Zugabe von Fixativ erfolgte zudem eine Inkubation von 30 Minuten bei 4 °C und nach der dritten Zugabe eine gleichlange Inkubation bei -20 °C. Die Lagerung des Sediments war dann bei -20 °C in Fixativ möglich. Zur weiteren Herstellung der Karyogramme wurden die Sedimente aufgewirbelt und auf vorbereitete Objektträger aufgetropft. Die Vorbereitung der Objektträger erfolgte

mindestens 24 Stunden mit Fixativ bei 4 °C, mit anschließendem Abspülen und Lagerung in 4 °C kühlem Wasser. Dann wurden die Präparate bei einer Luftfeuchtigkeit von 35 % und einer Temperatur von 24 °C getrocknet und schließlich bei 60 °C für 2 Stunden fertiggestellt. Zur Darstellung der G-Bänderung wurden die Präparate bei 90 °C für 1 Stunde denaturiert. Dann wurde diese für 60 Sekunden in 37 °C warmes *Trypsin-EDTA (0.25 %) phenol red* und anschließend zum Abstoppen in eiskaltes PBS getaucht. Es erfolgte dann die Färbung in Giemsa-Lösung (1:20) für 20 Minuten und schließlich die Spülung mit H₂O. Die Proben wurden dann über Nacht getrocknet und dann mit *Euparal* gedeckt. Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch mit dem *Zeiss Axiphot* Mikroskop. Die Dokumentation und Analyse erfolgte mit dem *Ikaros Karyotypisierungs-System*.

2.2.3.6 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Zum Nachweis der Translokation und der Auswirkungen auf mRNA Ebene wurde eine RT-PCR durchgeführt. Dafür wurden zunächst Zellpellets zur Extraktion der RNA gewonnen nach dem in Kapitel 6.3.2 dargestellten Schema. Zur RNA-Gewinnung wurde das *NucleoSpin RNA Kit* nach Herstellerangaben verwendet. Eine Qualitätskontrolle erfolgte dann mit dem *NanoDrop 2000c*. Anschließend wurde die komplementäre DNA (cDNA) mit der *RevertAid H Minus Reverse Transcriptase*, des *RiboLock RNase Inhibitors*, des *dNTP Mix* und der *Random Hexamers* nach Herstellerangaben und dem in Anhang 1G dargestelltem Schema generiert. Die RT-PCR erfolgte mit der hergestellten cDNA mittels des *Maxima SYBR Green and Probe qPCR Master Mix* nach Herstellerangaben und dem in Anhang 1H dargestelltem Schema. Die verwendeten Primer sind in Kapitel 2.1.6 abgebildet.^[117] Die aus der PCR gewonnenen Produkte wurden auf ein 2 %-iges Agarose-Gel bei 100 V für 45 Minuten mit *GeRED* gegeben zur Auftrennung der DNA-Fragmente. Die anschließende Darstellung und Dokumentation unter UV-Licht erfolgte am Geldokumentationssystem *EBOX VXY2*.

2.2.4 Charakterisierung der translozierten Zellen

2.2.4.1 Durchflusszytometrie

Zur Darstellung des Immunphänotyps wurden die MLL-translozierten Zellen auf verschiedene Oberflächenproteine per Durchflusszytometrie untersucht (Anhang 1J). Für die Zellfärbung wurden 2×10^5 Zellen verwendet und zunächst in einem Rundbodenröhrchen mit 1 ml FACS-Puffer versetzt und bei $300 \times g$ und Raumtemperatur für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde zur Blockierung unspezifischer Bindungen der Antikörper an den FC Rezeptor 1 μl *FcR Blocking Reagent* pro 50 μl FACS-Puffer verwendet, resuspendiert und bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ für 5 Minuten inkubiert. Zur Färbung wurden dann die spezifischen Antikörper hinzugegeben (siehe Anhang 1J) und auf ein Volumen von 100 μl mit FACS-Puffer aufgefüllt. Die Antikörper wurden bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ für 20 Minuten inkubiert. Schließlich erfolgte eine erneute Waschung der Zellen mit 1 ml FACS-Puffer bei $300 \times g$ und Raumtemperatur für 5 Minuten sowie das Wiederaufnehmen der gefärbten Zellen in 100 μl FACS-Puffer. Die Messung fand in Kooperation mit der *FACS Core Facility* Tübingen am *LSRFortessa* mittels der *FACS DIVA* Software statt. Die Titrierung der Antikörperkonzentration und die Einstellung des *LSRFortessa* wurden nach Secker^[117] modifiziert. Dies ist detailliert in Anhang 1L und Anhang 1J dargestellt.^[117] Es wurden mindestens 100.000 Ereignisse aufgenommen. Die Analyse der Messung erfolgte mit der Software *FlowJO V10*. Das Gating erfolgte zunächst mittels *Forward scatters* anhand der Abhängigkeit der Zellhöhe von der Zellfläche zum Ausschluss von eingemessenen Dupletten und anschließender Analyse von Einzelzellen. Weiterhin wurden die Zellen mittels des *Forward scatters* und des *Side scatters* hinsichtlich ihrer Granularität unterschieden und mit dem Viabilitätsfarbstoff *Viability Dye eFluor 506* in lebende und tote Zellen differenziert. Die Darstellung des Immunphänotyps und die weitere Differenzierung der Zellen erfolgte dann anhand der Färbung durch die Antikörper aus Anhang 1J.

2.2.4.2 May-Grünwald-Giemsa-Färbung

Die Morphologie der translozierten Zellen wurde im Vergleich zu gleich lang kultivierten Kontrollzellen mittels May-Grünwald-Giemsa-Färbung und anschließender lichtmikroskopischer Betrachtung beurteilt. Dafür wurden je 1×10^5 Zellen in 1 ml PBS überführt und durch eingespannte Zytologietrichter auf Objektträger mit Filterkarten in eine Zytozentrifuge gegeben. Die Zentrifugation

erfolgte dann bei 40 x g für 4 Minuten. Im Anschluss wurden die Objektträger entnommen, vorsichtig die Filter entfernt und die Zellen über Nacht getrocknet. Die Färbung erfolgte nach dem in Anhang 1K gezeigten Schema. Die Beurteilung und Dokumentation der Präparate erfolgte entweder unter Verwendung des *Nikon Eclipse TS100* Mikroskops mit der Kamera *Nikon Digital Sight* oder des *Zeiss Primovert* Mikroskops mit der *Axiocam 105 color* mit einem x 40 Objektiv. Zur Analyse wurde die Software *NIS elements* für das *Nikon Eclipse TS100* Mikroskop verwendet und die Software *ZEN 3.0 blue edition* beim *Zeiss Primovert*.

2.2.4.3 Colony Forming Assay (CFA)

Um die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Koloniebildung zu testen, wurden MLLr Zellen und ihre Kontrollen in ein halbfestes Medium aus Methylzellulose gegeben. Dabei wurden jeweils 1×10^4 Zellen in maximal 100 μ l Flüssigkeit verwendet, diese vorsichtig ohne Blasenbildung in *Methocult H4230* Medium eingespritzt und in eine 35 x 10 mm Zellkulturschale überführt. Das Medium enthielt zusätzlich die Zytokine FLT3-L, SCF, G-CSF, IL3, IL6 und TPO mit einer finalen Konzentration von 50 ng/ml sowie die Zellzusätze *SR-1* und *UM-729* mit einer finalen Konzentration von 0,75 μ M. Die Kultivierung der Zellen erfolgte dann bei 37 °C und 5 % CO₂. Je 3 Replikate in 35 x 10 mm Zellkulturschalen wurden in einer 145 x 20 mm Zellkulturschale zusammengeführt. Diese enthielt zusätzlich eine 35 x 10 mm Zellkulturschale mit PBS. Nach 12-14 Tagen wurden die gebildeten Kolonien lichtmikroskopisch mit dem *Zeiss Axiovert 25* Mikroskop gezählt. Das Medium wurde anschließend mit 50 ml warmen PBS vorsichtig aufgelöst, bei 300 x g und Raumtemperatur für 5 Minuten abzentrifugiert und dann wie zuvor mit 1×10^4 Zellen in Methylzellulose gesetzt und weiter kultiviert. Nach 12-14 Tagen wurden die Kolonien erneut gezählt, noch einmal angesetzt und dann ausgewertet.

2.2.4.4 Quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR)

Zur Identifikation und Darstellung bekannter hochregulierter Zielgene von MLL-translozierten Leukämien wurde eine RT-qPCR durchgeführt, wie im Kapitel

2.2.3.6 dargestellt. Hierbei wurden die generierten genomeditierten Zellen mit Kontrollzellen verglichen, die nur mit dem Cas9-Protein nukleofiziert wurden. Zudem wurden Proben von MLL-translozierten Patientenzellen mitgemessen. Dieses Verfahren wurde außerdem zur Validierung der Ergebnisse der RNA-Sequenzierung verwendet. Hier war zunächst die Isolierung der RNA sowie die Herstellung der cDNA notwendig. Diese erfolgte nach Herstellerangaben mit der *RevertAid H Minus Reverse Transcriptase*, des *RiboLock RNase Inhibitors*, des *dNTP Mixes* sowie der *Random Hexamers* nach dem in Anhang 1G dargestellten Schema.^[117] Die RT-qPCR wurde dann aus der gewonnenen cDNA nach Herstellerangaben mittels des *Maxima SYBR Green and Probe qPCR Master Mix* und dem in Anhang 1L dargestellten Schema durchgeführt. Die RT-qPCRs erfolgten in Zusammenarbeit mit der biologisch-technischen Assistentin (BTA) unserer Arbeitsgruppe Hildegard Keppeler.^[117] Jede Probe wurde in Duplikaten gemessen. Die RNA des 18SrRNA-Gens wurde als Referenz benutzt und mit Hilfe der 18SrRNA-Sonde detektiert. Dies wurde nach untenstehendem Schema und mit dem *Maxima Probe qPCR Master Mix* nach Herstellerangaben durchgeführt (siehe Anhang 1M).^[117] Die Auswertung und Dokumentation wurde unter Zuhilfenahme der $\Delta\Delta Cq$ -Methode am *LightCycler® 480 Instrument II* erreicht. Die Ergebnisse wurden auf die 18SrRNA-Werte normalisiert und die Kontrollzellen als Kalibrator verwendet. Die Bestimmung der *quantification cycle* (Cq) Werte erfolgte anhand der sigmoidalen Kurvenverläufe.

2.2.4.5 RNA-Sequenzierung

Zur Analyse des Transkriptoms der generierten translozierten Zellen wurde eine RNA-Sequenzierung durchgeführt. Diese wurde mit den fetalen Gensignaturen von MLLr Zellen von *Secker et al.*, verglichen.^[121] Als Kontrollzellen dienten nur mit dem Cas9-Protein behandelte Zellen aus huCB und huBM. Die Erstellung erfolgte in Zusammenarbeit mit dem *Next-Generation-Sequencing* (NGS) *Competence Center* Tübingen (NCCT) als *CoreFacility* des Universitätsklinikums und der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen unter der Leitung von Prof. Dr. Olaf Rieß und in Kooperation mit Dr. Nicolas Casadei. Die anschließende Datenanalyse wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Epigenetik des Instituts für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik des

Universitätsklinikums Tübingen unter der Leitung von Professorin Dr. rer. nat. Julia Schulze-Hentrich und insbesondere durch die Mitarbeit von Ph.D., Dr. rer. nat. Thomas Hentrich durchgeführt.

Für die Sequenzierung wurde, wie in Kapitel 2.2.3.6 beschrieben, zunächst RNA aus entsprechenden Zellpellets mit dem *NucleoSpin RNA Kit* isoliert. Die Qualitätskontrolle wurde mittels *NanoDrop 2000c* und per *Bioanalyzer 2100* erreicht. Die Sequenzierung erfolgte am *NextSeq 500* Gerät mit einer Auflösung von 6-11 Millionen Fragmenten pro Probe und 101 Basenpaare Länge. Die gelesenen Fragmente (*reads*) wurden hinsichtlich Adapterkontaminationen, durchschnittlich niedriger Qualität und wiederkehrender Sequenzen untersucht. Zum Ausschluss dieser Störfaktoren wurde das *BBDuk* des *BBMap Tools Suite v38.67* mit den folgenden Parametern: [*k=13 ktrim=r useshortkmers=t mink=5 qtrim=r trimq=10 minlength=20*] unter Verwendung der *polyA* und *truseq_rna kmer resources* angewendet. Die Qualität wurde anschließend unter zu Hilfenahme der *FastQC v0.11.4* Software überprüft. Dann erfolgte der Abgleich der gelesenen Fragmente mittels des *Star V2.7.0a* mit dem *Ensemble Homo Sapiens Genom v95* mit den folgenden Parametern: [*--outFilterType BySJout--outFilterMultimapNmax 20--alignSJoverhangMin 8--alignSJDDBverhangMin 1--outFilterMismatchNmax 999 --outFilterMismatchNoverLmax 0.6--alignIntronMin 20--outSAMattributes NH HI NM M*]. Die Werte der gelesenen Fragmente aller Gene wurden mittels der *featurecounts* Funktion der Software *Rsubread v2.0.0* (mit folgenden Parametern: [*GTF.featureType="exon" GTF.attrType="gene_id" useMetaFeatures=TRUE strandSpecific=1*]) und aus *DESeq2 v1.26* ermittelt. Transkripte mit weniger als einem gelesenen Fragment wurden aus der nachfolgenden Analyse ausgeschlossen.

Insgesamt wurden durch die Sequenzierung 21.978 Gene zur Bestimmung unterschiedlicher Expression identifiziert. Für die differenzielle Expression wurde der Grenzwert von $|\log_2 \text{fold-change}| \geq 1$ gesetzt sowie der angepasste p-Wert nach Benjamini-Hochberg von *BH-adjusted p-value* $\leq 0,01$. Zum Ausschluss eines falsch-positiven Befundes wurde die *surrogate variable analysis V3.26.0* eingesetzt. Um die *normalized reads per kilobase million* (nRPKM) der

Gesamtheit der Fragmente zu kalkulieren, wurden die Rohdaten der *DESeq2 V1.25* verwendet. Diese wurden anschließend als Orientierung der relativen Genexpression genutzt. Die Validierung identifizierter Gene, die eine unterschiedliche Expression zwischen den Translokationspartnern, Ursprungszellen und gegenüber den Kontrollzellen aufwiesen, erfolgte mittels RT-qPCR, wie im Kapitel 2.2.4.4 dargestellt. Die Rohdaten der RNA-Sequenzierung sind in der Datenbank *NCBI's Gene Expression Omnibus (GEO)* unter der GEO Zugangsnummer GSE148714 verfügbar.

2.2.4.6 FFAR2-Antagonisierung

Um den Einfluss von FFAR2 funktionell zu testen, wurden die MLL-AF4-Zellen aus huBM und huCB mit dem FFAR2-Antagonist GLP0974 (Tocris, Bristol) in Zusammenarbeit mit Dr. Kathy-Ann Secker behandelt.^[153] Der Antagonist wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO) mit einer Stockkonzentration gelöst und dann mit 1 μM und 5 μM verwendet. Die MLLr Zellen mit einer AF4-Translokation aus huCB wurden mit $7,5 \times 10^5$ Zellen/ml und die Zellen aus huBM mit 10×10^5 Zellen/ml in Flüssigkultur angesetzt. Als Medium wurde wiederum das *StemMACS HSC Expansion Media XF, human* verwendet und mit 1 % *Penicillin-Streptomycin*, 10 % FBS, Zytokinen (G-CSF, TPO, SCF, FLT3L, IL-3 und IL-6) mit einer Konzentration von 50 ng/ml für huCB und 100 ng/ml für huBM MLLr Zellen sowie den Zellzusätzen (*SR-1* und *UM-729*) mit einer Konzentration von 0,75 μM versetzt. Als Kontrolle wurden die Zellen nur mit DMSO behandelt. Alle 2 Tage erfolgte die erneute Behandlung mit dem Antagonisten in entsprechender Konzentration und die Zellen wurden auf ihre ursprüngliche Dichte zurückgesetzt. Die Zellzählung erfolgte nach Färbung mit Trypanblau mit der Neubauer-Zählkammer. Die gesamte Behandlungszeit betrug 14 Tage.

2.2.5 Statistik

Die hier gezeigten Experimente wurden mindestens zweimal biologisch unabhängig voneinander ausgeführt und Messungen mindestens in Duplikaten durchgeführt. Bei der Auswertung von zusammengefassten Daten aus mehreren unabhängigen Experimenten wurde zur Beschreibung der Streuung die Berechnung des arithmetischen Mittelwertes und der Standardabweichung

durchgeführt. Für die statistische Auswertung wurde ein ungepaarter *Student's t-Test* durchgeführt und $p < 0.05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet. Zur Berechnung dieser Analysen wurde die Software *GraphPad Prism 8* verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung des humanen MLL-AF4 und MLL-AF9 translozierten Modells mittels CRISPR/Cas9 in adulten Zellen

MLL-translozierte Leukämien zeigen altersabhängig deutliche Unterschiede hinsichtlich der Häufigkeit der Erkrankung, des hauptsächlichsten Translokationspartners und der Prognose. *Secker et al.* konnte unter der Verwendung von CRISPR/Cas9 die chromosomalen Translokationen MLL-AF4 und MLL-AF9 in HSPCs aus huCB induzieren und eine erfolgreiche Modelletablierung für die kindliche MLLr Leukämie demonstrieren.^[117, 121] Um die klinisch beobachteten Unterschiede zwischen embryonalen und adulten MLL-translozierten Leukämien zu untersuchen, wurde dieses Modell in dieser Arbeit in ein adultes System übertragen. Hierzu wurden anstelle der HSPCs aus huCB HSPCs aus huBM verwendet.

3.1.1 Herstellung von sgRNAs für MLL, AF4 und AF9

Für die Generierung der Doppelstrangbrüche wurden zunächst sgRNAs *in vitro* hergestellt, die dann gemeinsam mit dem Cas9-Protein das CRISPR/Cas9-System bilden. Das Design und die adressierten Schnittstellen im MLL-, AF4- und AF9-Gen wurden aus *Secker et al.* übernommen.^[121] Die sgRNAs wurden zunächst auf ihre Funktionalität mit dem *in vitro cleavage assay* getestet, der eine sehr gute Schneideeffizienz der sgRNAs zeigte. In Abbildung 2 wird exemplarisch die Schneideeffizienz der sgRNAs von AF4 und AF9 *in vitro* dargestellt.

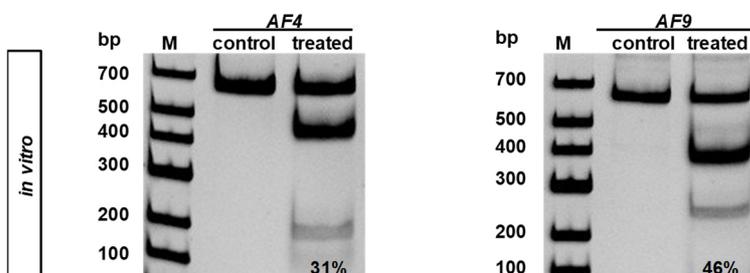


Abbildung 2: *In vitro* Testung der sgRNAs. Die Polyacrylamid-Gel-Bilder zeigen repräsentative Ergebnisse des T7 *in vitro cleavage assays* zur Testung der sgRNAs in K562. Die Schneideeffizienz wurde mittels *ImageJ 1.48v* ermittelt.

Als *Proof of Principle* wurden die sgRNAs mit guter Schneideeffizienz dann in K562-Testzellen eingesetzt. Hierfür wurden die Zellen mit den sgRNAs, dem Cas9-Protein und einem GFP-Plasmid nukleofiziert. Die K562-Testzellen zeigten ein gutes Überleben und eine sehr gute Elektroporationseffizienz von über 70 % (siehe Abbildung 3).

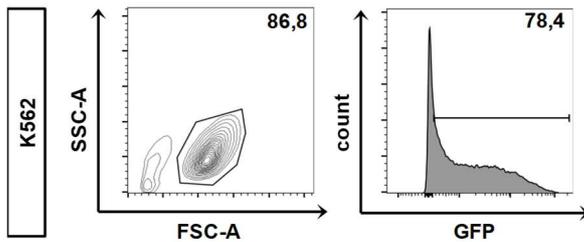


Abbildung 3: Elektroporationseffizienz in K562-Testzellen. Gezeigt ist die exemplarische durchflusszytometrische Untersuchung hinsichtlich der Viabilität der K562-Testzellen nach Elektroporation. Durch Einbringen eines GFP-Plasmids wurde zusätzlich die Effizienz der Methode anhand der GFP-Positivität bestimmt werden.

Anschließend wurde mittels T7-Endonuklease-I-Assay die daraus resultierende Schneideeffizienz in K562-Testzellen ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4 dargestellt. Diese Daten wurden veröffentlicht in Secker, Bruns et al., 2020.^[50]

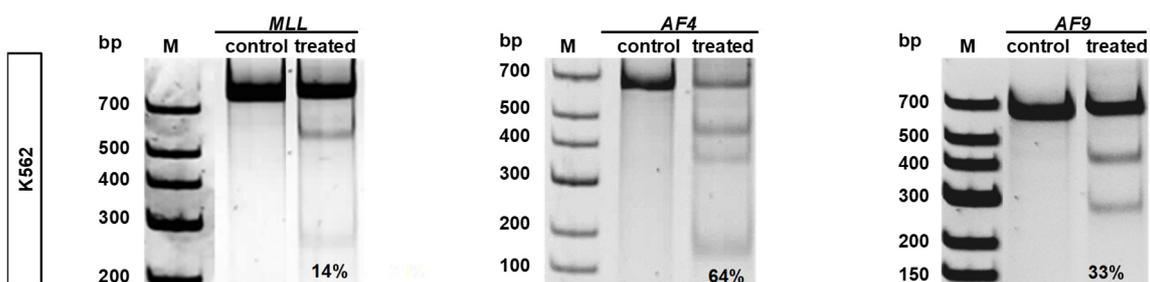


Abbildung 4: Schneideeffizienz der sgRNAs in K562-Testzellen. T7-Endonuklease-I-Assay zeigt die jeweilige prozentuale sgRNA-Schneideeffizienzen in K562-Zellen. Daten publiziert in Secker, Bruns et al., 2020.^[50]

3.1.2 Induktion der Translokation in HSPCs aus huBM

Nach Sicherstellung funktionierender sgRNAs mit adäquater Schneideeffizienz wurden diese in HSPCs aus huBM eingesetzt. Dafür wurden diese zunächst mittels Dichtegradientenzentrifugation und magnetischer Zellseparation aufgereinigt. Anschließend erfolgte nach 48 Stunden die Nukleofektion gleichzeitig mit der sgRNA für MLL und AF4 oder AF9, dem Cas9-Protein und GFP-Plasmid. Nach 24 Stunden zeigte die GFP-Bestimmung mittels Durchflusszytometrie ein gutes Ergebnis mit 50 % Effizienz. Abbildung 5 zeigt repräsentativ die durchflusszytometrische Analyse nach magnetischer Zellseparation (A) und Elektroporation (B).

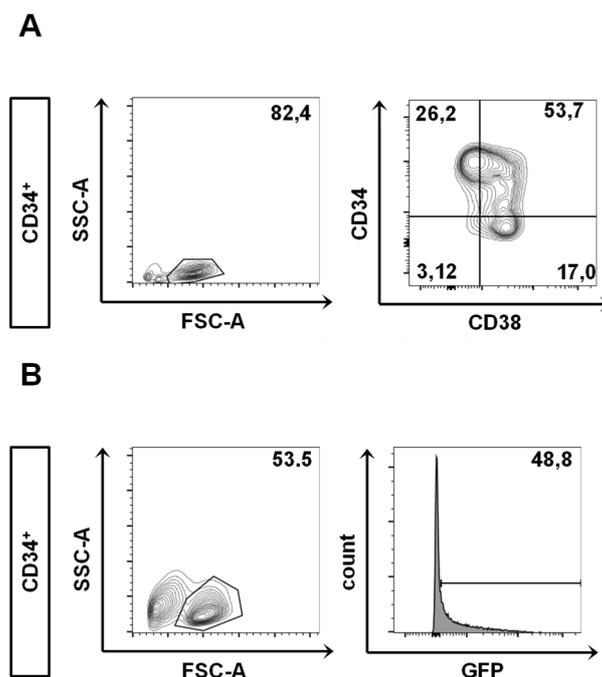


Abbildung 5: Effizienz der magnetischen Zellseparation und Elektroporation in CD34⁺ huBM-Zellen. Die Bestimmung der Effizienz hinsichtlich der magnetischen Zellseparation (A) und der Elektroporation (B) erfolgte mittels Durchflusszytometrie.

Nach 48 Stunden zeigte der T7-Endonuklease-I-Assay erfolgreiches Schneiden aller sgRNAs in HSCPs jedoch wie erwartet mit deutlich niedrigerer Effizienz im Vergleich zur Testung in den K562-Zellen, insbesondere für MLL und AF9. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6 abgebildet. Diese Daten wurden veröffentlicht in *Secker, Bruns et al., 2020.*^[50]

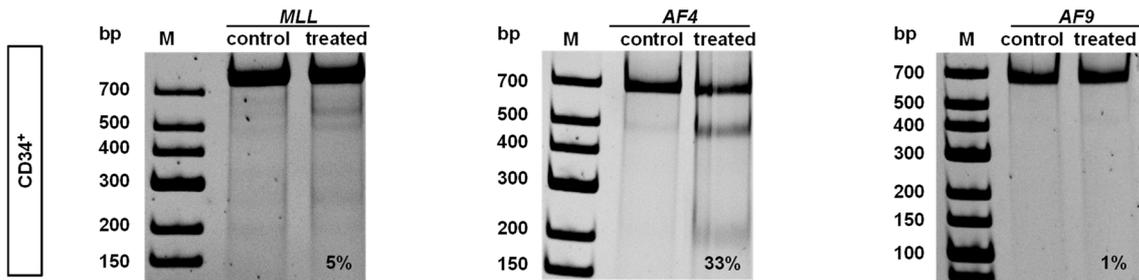


Abbildung 6: Schneideeffizienz in HSPCs aus huBM. Die Bestimmung der sgRNA Schneideeffizienzen erfolgte mittels T7-Endonuklease-I-Assay und anschließender Auswertung mittels *ImageJ 1.48v*. Daten publiziert in *Secker, Bruns et al., 2020*.^[50]

Zum Vergleich der Schneideeffizienz in anderen HSPCs wurden die sgRNAs auch in HSPCs aus huCB sowie in peripheren hämatopoetischen Stammzellen (PBSZ) nach GSCF-Stimulation eingebracht. Die Ergebnisse zeigten eine ähnliche Schneideeffizienz und sind in Abbildung 7 repräsentativ für AF4 dargestellt.

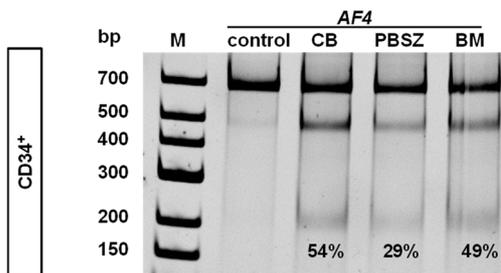


Abbildung 7: Vergleich der Schneideeffizienz in HSPCs aus huCB/CB, peripheren Blut (PBSZ) und huBM/BM. Die Bestimmung der sgRNA Schneideeffizienzen erfolgte mittels T7-Endonuklease-I-Assay und anschließender Auswertung mittels *ImageJ 1.48v*. Die Polyacrylamid-Gel-Bilder zeigen repräsentative Ergebnisse von CD34⁺ Zellen aus huCB, PBSZ und huBM.

Die Zellen wurden in Flüssigkultur weiter kultiviert und die Proliferation mittels manueller Zählung mit Trypanblau verfolgt. Trotz der niedrigen Schneideeffizienz im MLL- und AF9-Gen ließen sich nach durchschnittlich 30 Tagen mittels PCR die Fusionsprodukte in 3 von 10 Versuchen für MLL-AF4 und in 4 von 8 Versuchen für MLL-AF9 nachweisen. Die Validierung durch Sanger-Sequenzierung zeigte die erwarteten spezifische Translokationssequenz

Spenderunabhängig. Der PCR-Nachweis gelang frühestens nach 30 Tagen Kultivierungszeit und damit deutlich später als vergleichbare Daten von huCB.^[121] Die Ergebnisse zeigt Abbildung 8. Diese Daten wurden veröffentlicht in *Secker, Bruns et al., 2020.*^[50]

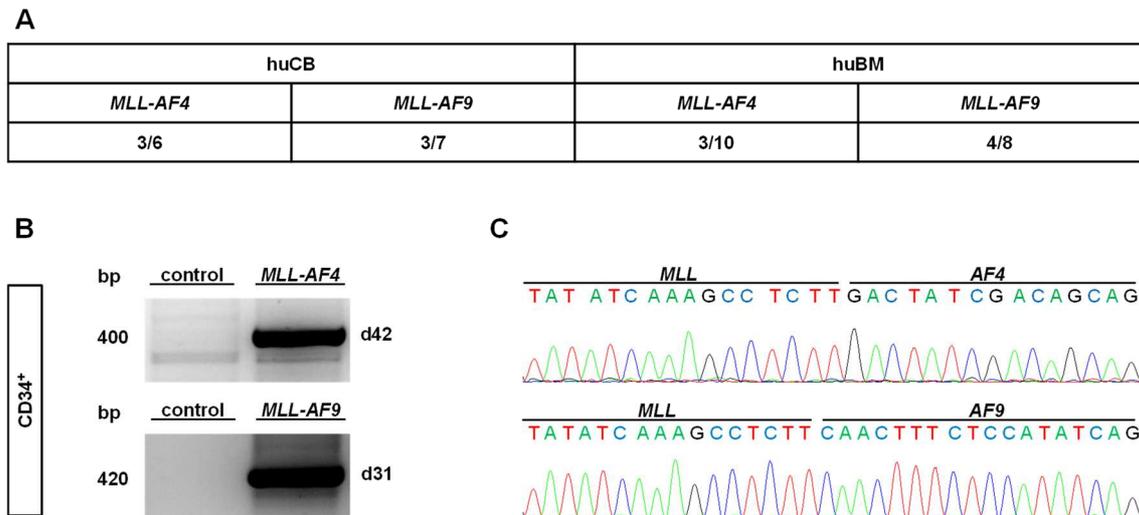


Abbildung 8: Nachweis der erfolgreichen Induktion der MLL-Translokationen in HSPCs aus huBM. (A) Dargestellt sind Häufigkeit und Nachweis der Translokation in MLL-AF4 und -AF9 in CD34⁺ HSPCs aus huBM und huCB gemessen an der Gesamtzahl der Experimente. Translokationsdaten aus huCB erhoben durch *Secker.*^[117] (B) Repräsentative Darstellung der Agarose-Bilder positiver Translokationen von huBM als PCR-Produkte an Tag 42 für MLL-AF4 und Tag 31 für MLL-AF9. (C) Repräsentative Darstellung der Sanger-Sequenzierung der PCR-Produkte aus huBM. Daten publiziert in *Secker, Bruns et al., 2020.*^[50]

Zum definitiven Nachweis der Translokationen und zur Sicherstellung 100 % reiner, translozierter Zellkulturen für weitere valide Untersuchungen hinsichtlich der molekularen Mechanismen MLL-translozierter Leukämien wurde eine FISH-Analyse und ein Karyogramm angefertigt. Dafür wurden die Zellen zunächst weiter kultiviert und in regelmäßigen Abständen eine PCR-Analyse zum Nachweis des fusionierten Gens unter Einsatz von 100 µg DNA durchgeführt und dadurch semiquantitativ der relative Anteil translozierter Zellen in der Kultur dargestellt. Nachdem kein weiterer Zuwachs in der Stärke der Bande ersichtlich war, wurde die FISH-Analyse durchgeführt und brachte den Nachweis 100 % reiner Zellen bei einer manuellen Zählung von 100 Zellen. In Abbildung 9 sind

repräsentative Resultate an Tag 45 für MLL-AF4- und an Tag 54 für MLL-AF9-Zellen gezeigt.

Die *MLL-breakapart* Sonde detektiert hierbei sowohl ein intaktes und ein transloziertes MLL-Gen. Ersteres zeigt sich durch zusammenliegende Sondenfarben (rot und grün), letzteres durch getrennte. Die Chromosomenanalyse zeigte ebenfalls ein positives Ergebnis mit entsprechenden Bandenmustern wie in Abbildung 9 repräsentativ jeweils für MLL-AF4- und MLL-AF9-Zellen dargestellt. Wie bereits durch den späteren positiven PCR-Nachweis der Translokationen angedeutet, zeigte sich auch das Auswachsen zu reinen Zellkulturen verzögert im Vergleich zu translozierten Zellen aus huCb.^[121] Diese Daten wurden veröffentlicht in *Secker, Bruns et al., 2020.*^[50]

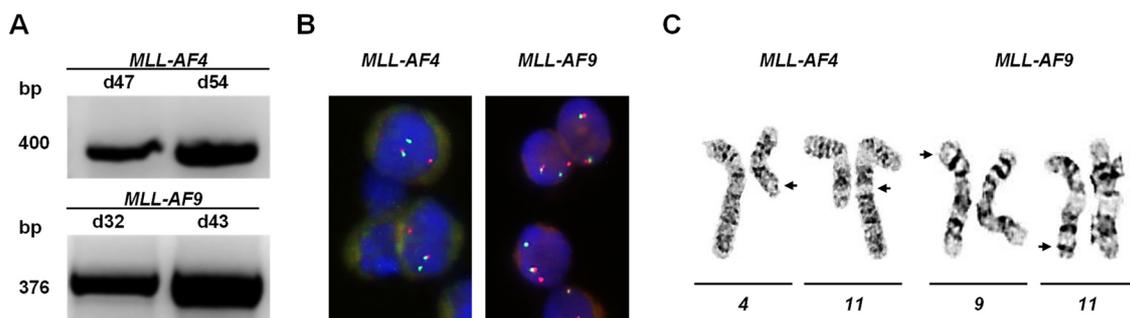


Abbildung 9: Nachweis 100 % reiner Zellkulturen. Dargestellt ist der Nachweis 100 % reiner Zellkulturen nach 40-50-tägiger Kultur. **(A)** Die Agarose-Gel-Bilder zeigen repräsentative Ergebnisse einer semi-quantitativen PCR der Translokationsprodukte MLL-AF4 und MLL-AF9. **(B)** Die Fluoreszenzaufnahmen zeigen exemplarisch die FISH-Analyse der translozierten Zellen mit Darstellung der intakten und translozierten MLL-Gene. **(C)** Dargestellt sind Aufnahmen der Chromosomenanalyse der translozierten Zellen. Daten publiziert in *Secker, Bruns et al., 2020.*^[50]

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse die einfache Durchführbarkeit und hohe Effizienz der Genomeditionierung mittels des CRISPR/Cas9-Systems und der Erzeugung von MLL-Translokationen in adulten HSPCs.

3.2 Charakterisierung der MLL-translozierten Zellen und Validierung als patientenähnliches in vitro Modell

Zur Validierung des MLLr Modells aus huBM und um die Vergleichbarkeit zu Patientenzellen mit MLL-Translokationen herzustellen, werden die genomeditierten Zellen anhand ihres Proliferationsverhaltens, der Genexpression, der Morphologie und ihres Immunphänotyps charakterisiert.

3.2.1 Proliferationsverhalten

MLL-translozierte Leukämien zeichnen sich durch starke autonome Proliferation aus. Die translozierten Zellen wiesen ebenfalls eine starke Proliferation auf und ließen sich im Fall von MLL-AF9 translozierten Zellen unbegrenzt über 365 Tage und weiter kultivieren. Parallel angesetzte und nur mit Cas9-Protein nukleofizierte Kontrollzellen stellten dagegen ab Tag 30 langsam das Wachstum ein und wurden zunehmend apoptotisch (Abbildung 10). Dieses Wachstumsverhalten ermöglichte das Auswachsen 100 % reiner translozierter Kulturen, wie in der FISH-Analyse gezeigt (vgl. hierzu Kapitel 3.1.2).

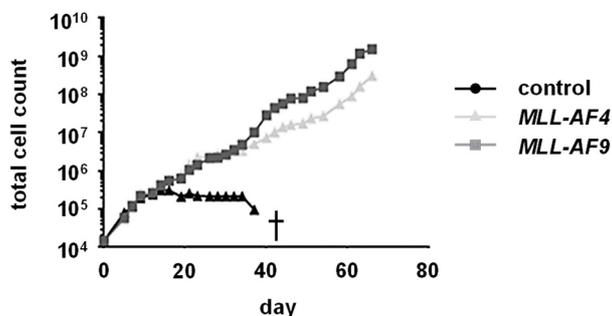


Abbildung 10: Proliferationsverhalten der translozierten Zellen. Dargestellt ist das Proliferationsverhalten exemplarisch für MLL-AF4 und MLL-AF9 translozierte Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen desselben Spenders, die ausschließlich mit dem Cas9-Protein nukleofiziert wurden. Die Erfassung erfolgte mittels manueller Zählung und Hochrechnung nach Färbung mit Trypanblau.

3.2.2 Fähigkeit zur Selbsterneuerung

Zur Prüfung der Fähigkeit zur Selbsterneuerung wurde ein CFA-Assay durchgeführt. Hier zeigte sich, dass in Methylzellulose nur mit Cas9-Protein

behandelte Kontrollzellen und MLL-AF4-Zellen kaum befähigt waren, Kolonien zu bilden. Auch in einer zweiten Passage zeigten diese kein Zellwachstum mehr. Im Gegensatz dazu konnten die MLL-AF9-Zellen sowohl in der ersten Runde Kolonien ausbilden, zeigten aber auch noch in der zweiten Passage ein Kolonienformierungspotential als Ausdruck für ihre anhaltende Selbsterneuerungsfähigkeit. Die Ergebnisse des CFAs werden in Abbildung 11 dargestellt.

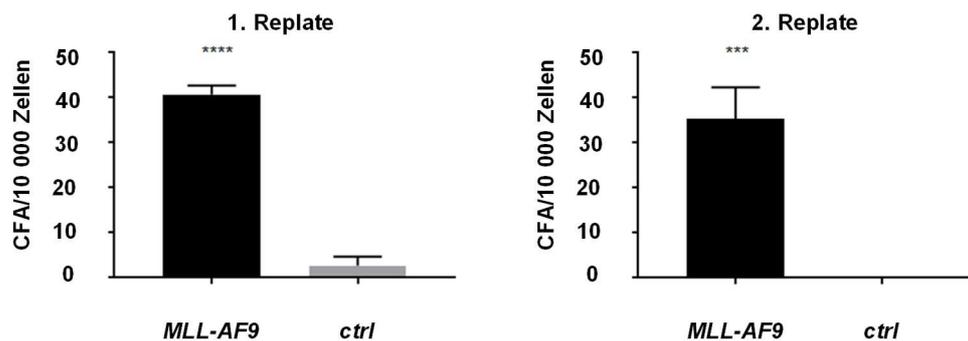


Abbildung 11: Selbsterneuerungskapazität der MLLr Zellen. Dargestellt ist die Kolonienformation im CFA-Assay von MLL-AF9-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen. Das Experiment wurde in biologischen Duplikaten durchgeführt (n=2). Es wurde der Student's t-Test verwendet: * zeigt $p < 0.05$ an. Die Fehlerbalken zeigen die SD an.

3.2.3 Funktionelle MLL- und Zielgenexpressionen

Der Nachweis der Expression des Fusionsgens auf mRNA Ebene erfolgte mittels RT-PCR. In Abbildung 12 ist exemplarisch der erfolgreiche Nachweis dargestellt. Zudem wurden mittels RT-qPCR bekannte typische MLL-Zielgene wie MEIS1 und HOXA9 untersucht. Diese zeigten sich, wie in Abbildung 12 repräsentativ dargestellt, deutlich erhöht zu den nur mit Cas9 nukleofizierten Kontrollzellen, sodass die Auswirkungen der Translokation auch auf transkriptioneller Ebene sichtbar wurden. Zum Vergleich wurden MLL-translozierte Zellen von Patienten untersucht. Hier zeigte sich ein vergleichbar hohes Expressionslevel. Dies unterstreicht die naturgetreue Abbildung des hier vorgestellten Modells von MLLr Leukämien im direkten Vergleich mit Patientendaten. Diese Daten wurden veröffentlicht in *Secker, Bruns et al., 2020*.^[50]

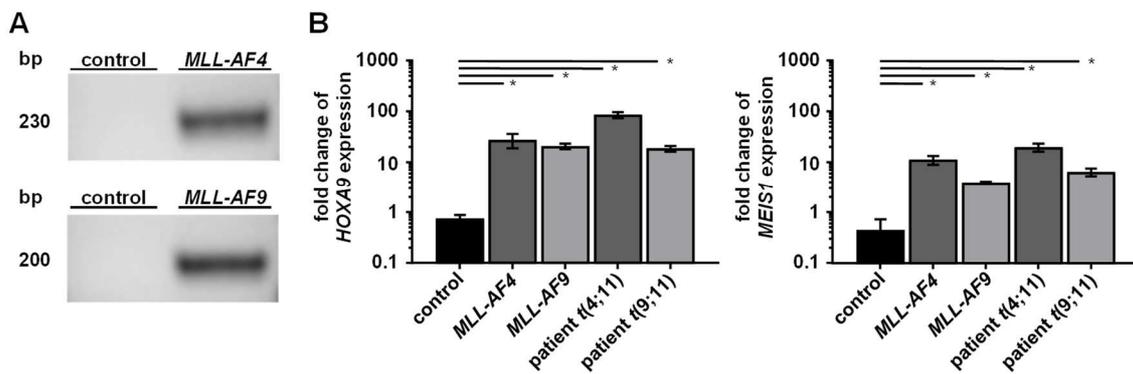


Abbildung 12: Patientenähnliches Expressionsprofil. Dargestellt wird der Nachweis des funktionellen Fusionsproteins auf RNA-Ebene (**A**) sowie vergleichend das Expressionsprofil MLLr typischer Zielgene in den MLL-AF4- und -AF9-Zellen im Vergleich zu entsprechenden Patientenproben, normalisiert zu Kontrollzellen (huBM, nukleofiziert mit Cas9 alleine) (**B**). Das Experiment wurde in biologischen Duplikaten durchgeführt (n=2) und die horizontalen Balken stellen den Mittelwert dar. Es wurde der Student's t-Test verwendet: * zeigt $p < 0.05$. Die Fehlerbalken zeigen die SD an. Daten publiziert in Secker, Bruns et al., 2020.^[50]

3.2.4 Bestimmung des Immunphänotyps

Leukämische Zellen von Patienten mit MLL-translozierten Leukämien zeigen häufig einen myelomonozytären Immunphänotyp mit charakteristischer CD15, CD64 und CD33 Oberflächenexpression. Typischerweise zeigen sie keine Expression von CD34, im Gegensatz zu den meisten Leukämiepatienten ohne MLL-Translokation.^[154] CD34 und CD38 werden als Oberflächenmarker verwendet, um die Differenzierung im Verlauf der Hämatopoese nachzuvollziehen. Während Stammzellen häufig CD34 positiv und CD38 negativ sind, exprimieren weiter differenzierte Zellen zunehmend CD38 und weniger CD34.^[155] Bei der Untersuchung der genomeditierten MLL-translozierten Zellen mittels Durchflusszytometrie zeigte sich ebenfalls dieser myelomonozytärer Immunphänotyp, mit kaum Expression von CD34, dafür aber hochexprimiert CD117 als Zeichen der Unreife. Die Kontrollzellen hingegen zeigten eine verstärkte Expression von CD38 und CD14 als Zeichen ihrer Differenzierung und wiederum kaum CD117 (Abbildung 13).^[123] Bei den MLL-translozierten Zellen zeigte sich zudem der MLL-translokationsspezifische Marker CD9 im Vergleich zu den Kontrollzellen als signifikant erhöht.^[123, 154] Die Expression dieses Markers

stieg zudem über die Zeit parallel zum relativen Anteil der translozierten Zellen in der Zellkultur, vergleichbar mit der in Kapitel 3.1.2 beschriebenen semiquantitativen PCR-Analyse des fusionierten Gens. Die Darstellung der durchflusszytometrischen Untersuchungen im Verlauf sind in Abbildung 13B dargestellt.

Zusammenfassend präsentieren sich die genomeditierten MLLr huBM Zellen mit einem undifferenzierten myelomonozytären Blastenbild, welches für MLL-Leukämien typisch ist. Diese Daten wurden veröffentlicht in *Secker, Bruns et al., 2020*.^[50]

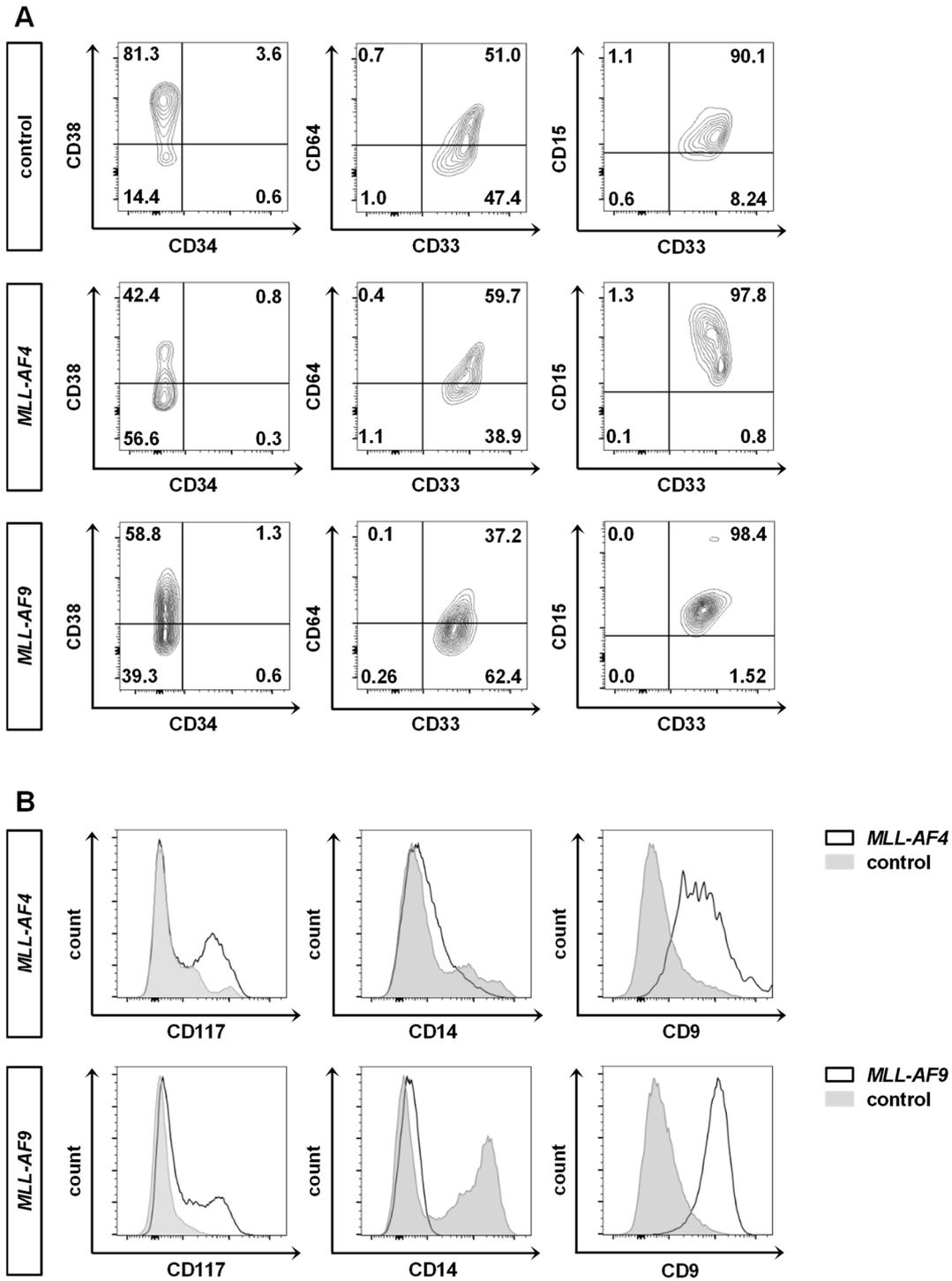


Abbildung 13: Immunphänotyp der MLLr Zellen aus huBM. (A) zeigt Konturdiagramme der durchflusszytometrischen Analyse hinsichtlich eines myelomonozytären Phänotyps mit Darstellung von CD33, CD64 und CD15. (B) zeigt die Expression der (un)reife Marker und CD9 als typischen Marker für MLL-translozierte Leukämien im Vergleich zu Kontrollzellen. Daten publiziert in *Secker, Bruns et al., 2020.*^[50]

3.2.5 Blastenartige Morphologie

Zur weiteren Beurteilung der genomeditierten Zellen wurde mittels *Cytospin* und anschließender May-Grünwald-Giemsa-Färbung die Morphologie der Zellen untersucht. Die Kontrollzellen stellten sich Makrophagen ähnlich dar mit vielen Karyopyknosen, die fortschreitendes apoptotisches Verhalten anzeigen. Die translozierten Zellen zeigten sich dagegen mit einer blastenartigen Morphologie mit verschobener Kern-Zytoplasma-Relation sowie mehreren Mitosen. In Abbildung 14 sind die lichtmikroskopischen Aufnahmen nach May-Grünwald-Giemsa-Färbung dargestellt. Diese Daten wurden veröffentlicht in *Secker, Bruns et al., 2020*.^[50]

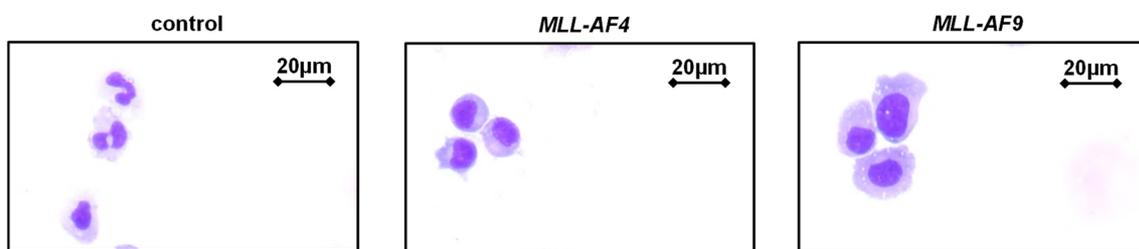


Abbildung 14: Unreife, blastenartige Zellmorphologie der MLLr Zellen. Dargestellt sind repräsentativ die lichtmikroskopischen Aufnahmen nach May-Gründwald-Giemsa-Färbung der translozierten Zellen verglichen mit Kontrollzellen, die nur mit dem Cas9-Protein behandelt wurden. Die MLLr Zellen zeigen verminderte Apoptosezeichen und blastenartige Morphologie mit verschobener Kern-Plasma-Relation. Skalenbalken definieren 20 µm. Daten publiziert in *Secker, Bruns et al., 2020*.^[50]

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Kontrollzellen im Laufe der Kultivierung sowohl immunphänotypisch als auch morphologisch fortschreitende Differenzierung zeigten, während die translozierten Zellen eine unreife, blastenartige Entwicklung beibehielten mit erhöhter Expression MLL-spezifischer Zielgene. Mit CRISPR/Cas9 erzeugte MLL-Translokationen in HSPCs aus huBM imitieren folglich authentisch MLL-translozierte Leukämien und können als patientenähnliches *in vitro* Modell für weitere Experimente und Untersuchungen verwendet werden.

3.3 Vergleich der generierten MLL-AF4 und MLL-AF9 aus adultem huBM mit neonatalen Zellen

3.3.1 Nur HSPBs aus huCB lassen sich durch MLL-AF4-Translokationen transformieren

Wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben, zeigten sowohl die MLL-AF4 als auch die MLL-AF9 translozierten Zellen aus HSPCs aus huBM gegenüber ihren nur mit Cas9 behandelten Kontrollzellen einen deutlichen Proliferationsvorteil. MLL-AF9 translozierte Zellen waren in ihrem Wachstum unbegrenzt und ließen sich 365 Tage und weiter in Kultur halten. Dies traf interessanterweise nicht für MLL-AF4 translozierte Zellen zu. In allen durchgeführten Experimenten stoppten diese nach durchschnittlich 80 Tagen die Proliferation und unterliefen apoptotischen Prozessen trotz stabiler Expression des MLL-AF4-Fusionsgens. Zuvor ließ sich bereits ein Rückgang der CD9 Expression nachweisen (Abbildung 15).

Secker et al. konnten in ihren Arbeiten zeigen, dass sowohl MLL-AF4- als auch MLL-AF9 translozierte Zellen von HSPCs aus huCB unter gleichen Kultur- und Wachstumsbedingungen immortalisieren und ein unbegrenzt Wachstumspotential über 1 Jahr und mehr aufweisen.^[121] Abbildung 15 zeigt hierzu vergleichend den Wachstumsverlauf der Zellen aus huBM (A) mit huCB (B).^[50, 121] Diese Daten weisen darauf hin, dass sowohl der Fusionspartner, AF4 oder AF9, und die Ursprungszelle, huCB oder huBM, eine wichtige Rolle in der Leukämieinduktion spielen. Hierzu passend zeigt sich die Korrelation mit der Klinik. Wie in unseren in vitro Experimenten, in denen sich keine ausreichende Transformation der huBM ausgehend von dem Fusionspartner AF4 zeigte, werden kaum MLL-AF4-Leukämien bei Erwachsenen gefunden.^[23, 50] Diese Daten wurden veröffentlicht in *Secker, Bruns et al., 2020.*^[50]

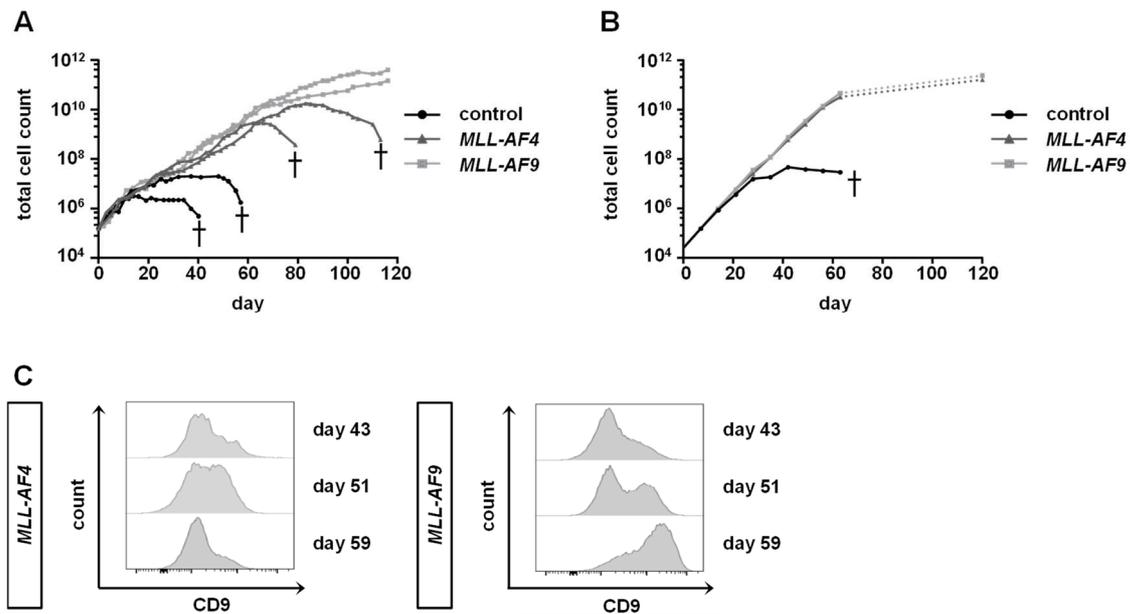


Abbildung 15: Proliferationsvergleich von MLLr Zellen aus huCB und huBM und CD9-Expression von MLLr Zellen aus huBM im Verlauf. (A, B) Dargestellt ist repräsentativ der Wachstumsverlauf der translozierten Zellen aus huBM und huCB sowie der jeweiligen Kontrollzellen anhand einer Trypanblaufärbung. (C) Dargestellt ist die durchflusszytometrische Analyse der CD9-Expression für MLL-AF4 und -AF9 translozierten Zellen aus huBM im Verlauf der Kultivierung. Daten publiziert in *Secker, Bruns et al., 2020*.^[50]

3.3.2 Identifikation von differentiell exprimierten Genen der translozierten Zellen unterschiedlichen Ursprungs

Zur näheren Untersuchung des Phänomens, dass sich MLL-AF4 translozierte Zellen aus huBM nicht immortalisieren ließen, und um einen Einblick in das Transformationspotential der Translokation in unterschiedlichen Ursprungszellen zu gewinnen, wurde eine RNA-Sequenzierung durchgeführt.^[50] Im Vergleich zu Kontrollzellen konnten im Rahmen der Sequenzierung für MLL-AF9-Zellen aus huBM 335 differentiell exprimierte Gene (DEG) identifiziert werden, für MLL-AF4-Zellen waren es 502. In den MLLr Zellen aus huCB konnten für MLL-AF9 939 und für MLL-AF4 654 differentiell exprimierte Gene nachgewiesen werden.^[50] 73 dieser Gene waren in allen Gruppen aufzufinden und sind damit möglicherweise einer allgemeinen MLL-Gen Signatur zuzuordnen, die unabhängig vom Ursprungsgewebe ist. In Abbildung 16 sind die DEG und 73 gemeinsam

exprimierten Gene dargestellt. Diese Daten wurden veröffentlicht *in Secker, Bruns et al., 2020.*^[50]



Abbildung 16: Differenziell exprimierte Gene und MLL-Gen Signatur der MLLr Zellen aus huCB im Vergleich zu huBM. (A) zeigt die Gesamtanzahl der DEG in den jeweiligen Gruppen gegenüber Kontrollzellen. In (B) sind die 73 gemeinsamen DEGs in allen MLLr Zellen dargestellt. Daten publiziert *in Secker, Bruns et al., 2020.*^[50]

Diese 73 Gene beinhalteten typische MLLr-Zielgene wie HOXA9, HOXA10-AS und MEIS1 (Abbildung 17). Diese waren in allen Gruppen gleichermaßen hochreguliert.^[50] Die Ergebnisse für HOXA9 und MEIS1 wurden zudem für MLLr Zellen aus huBM mittels RT-qPCR verifiziert, siehe Abbildung 12 in Kapitel 3.2.3. Funktionelle MLL- und Diese Ergebnisse zeigen, dass die mit CRISPR/Cas9 erzeugten MLLr-Modelle aus huCB und huBM physiologisch die Erkrankung abbilden. Die mangelnde Transformation durch MLL-AF4 in adulten Zellen kann mit diesem Ergebnis jedoch nicht durch fehlende Expression dieser typischen MLLr-Zielgene erklärt werden.^[50]

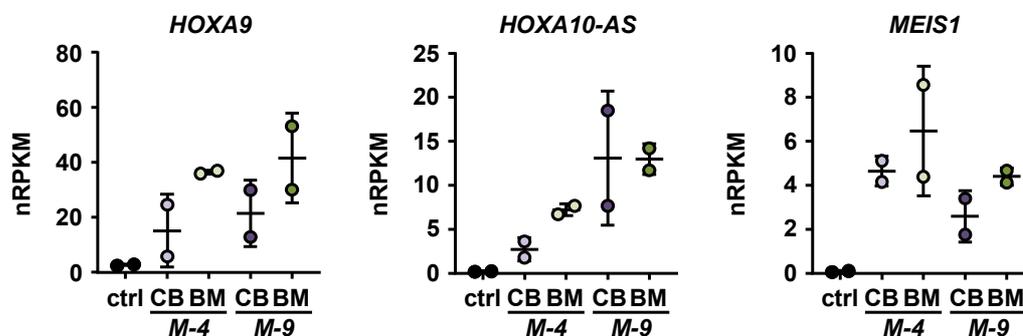


Abbildung 17: Typische MLLr-spezifische Zielgene in der RNA-Sequenzierung. Darstellung der differentiell exprimierten MLLr-spezifischen Zielgene HOXA9, HOXA10-AS und MEIS1 detektiert mittels RNA-Sequenzierung. Normalisierte Reads pro Kilobase-Million (nRPKM) sind als einzelne Datenpunkte mit dem Mittelwert aufgetragen. Die Fehlerbalken zeigen die SD an. Daten publiziert in *Secker, Bruns et al., 2020*.^[50]

3.3.3 FFAR2 als möglicher intrinsischer Faktor für die fehlende Zelltransformation von MLL-AF4 huBM

Um möglich Gene zu identifizieren, die verantwortlich sind für das Unvermögen von MLL-AF4, adulte Zellen zu immortalisieren, wurden die DEGs von MLL-AF4 aus huBM mit den DEGs von MLL-AF9 aus huBM und huCB sowie von MLL-AF4 aus huCB verglichen. Hierbei konnten 45 Gene identifiziert werden, die eine signifikante unterschiedliche Expression aufwiesen. FFAR2 konnte dabei als das am stärksten herunterregulierte Gen identifiziert werden, das jedoch noch eine gewisse bleibende Expressionsstärke bei den MLL-AF4-Zellen aus huBM zeigte. Somit könnte FFAR2 eine wichtige Rolle in der Transformation von MLLr-

Leukämien spielen (Abbildung 18). Diese Daten wurden veröffentlicht *in Secker, Bruns et al., 2020.*^[50]

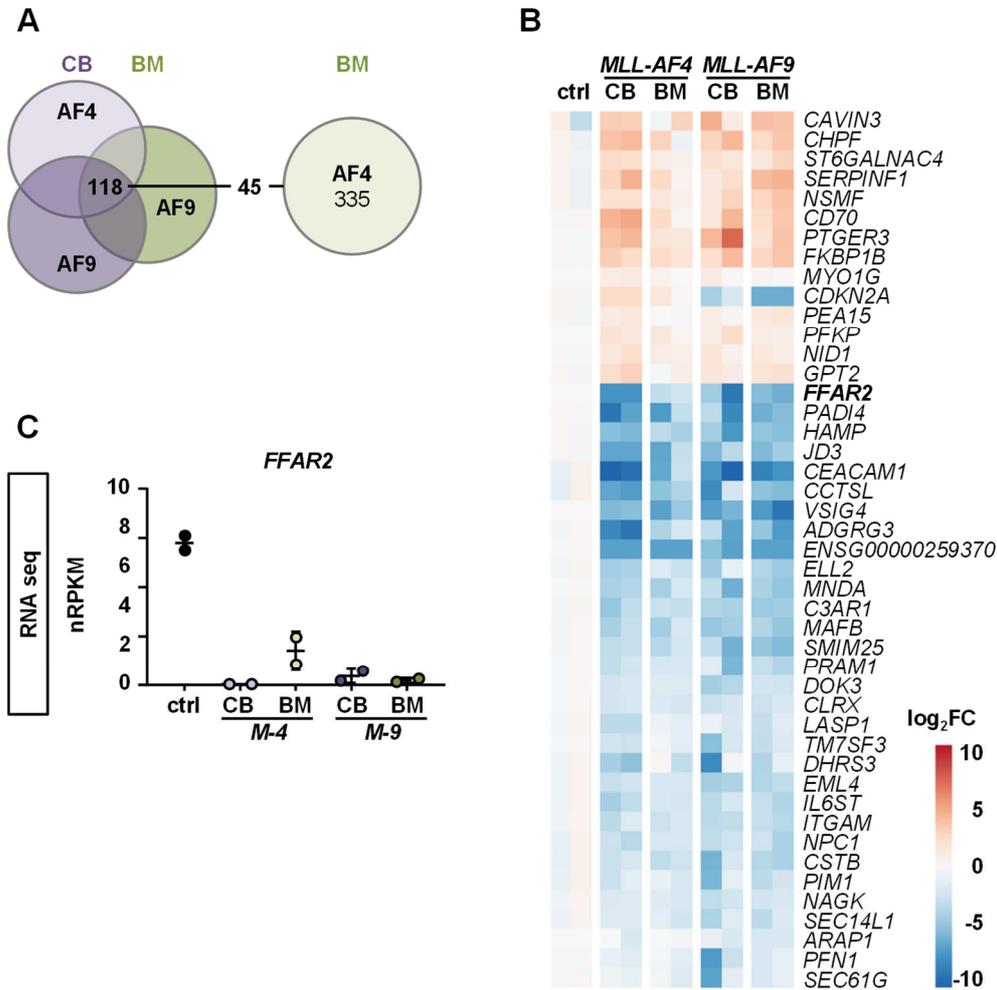


Abbildung 18: FFAR2 ist das am meisten herunterregulierte DEG in MLL-AF4-Zellen aus huBM. (A) zeigt die Gesamtzahl der DEG der MLL-AF4 Zellen aus huBM gegenüber den anderen MLLr Zellen. (B) Heatmap der 45 DEG aus A mit FFAR2 als das am meisten herunterregulierte Gen. (C) Im Vergleich zu allen anderen MLL-translozierten Zellen zeigten sich MLL-AF4-Zellen aus huBM FFAR2 weniger stark herunterreguliert. Normalisierte Reads pro Kilobase Million (nRPKM) sind als einzelne Datenpunkte mit dem Mittelwert aufgetragen. Fehlerbalken zeigen die SD an. Daten publiziert in *Secker, Bruns et al., 2020.*^[50]

Zur Validierung der Ergebnisse der RNA-Sequenzierung wurden RT-qPCR mit weiteren Modellzellen von anderen Spendern und mit Patientenzellen durchgeführt. Es zeigte sich erneut eine deutliche Herunterregulation von FFAR2 in allen translozierten Zellen verglichen mit den gesunden Kontrollzellen, jedoch

bei den MLL-AF4-Zellen aus huBM signifikant weniger stark zu den anderen MLLr Zellen (Abbildung 19). Diese Daten wurden veröffentlicht in *Secker, Bruns et al., 2020*.^[50]

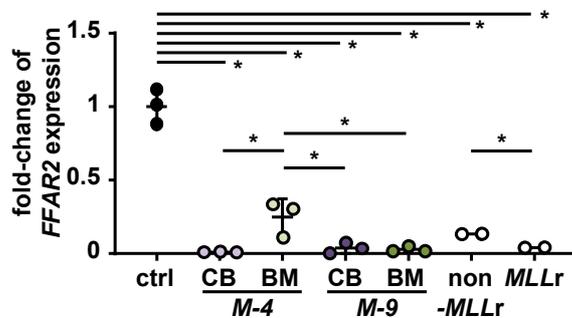


Abbildung 19: FFAR2-Expression von CRISPR/Cas9-generierten MLLr Zellen und Patientenzellen. Gezeigt wird die RT-qPCR-Analyse von CRISPR/Cas9-MLLr Zellen aus huCB und huBM, sowie Proben von Patienten ohne MLLr (UPN1) und Patienten mit MLLr (UPN2) im Vergleich zur Kontrolle. Jeder Punkt steht für eine Probe. Die horizontalen Linien stellen den Mittelwert dar. Es wurde der Student's t-Test verwendet: *zeigt $p < 0.05$. Die Fehlerbalken geben die SD an. Daten publiziert in *Secker, Bruns et al., 2020*.^[50]

Um die Bedeutung der Expression in Neoplasien zu beurteilen, wurde das Expressionsniveau von FFAR2 in unterschiedlichen neoplastischen Erkrankungen aus öffentlichen Datenbanken (oncomine.org) miteinander verglichen. Insbesondere Brustkrebs, Prostatakrebs und hämatologische Krebserkrankungen zeigen niedrige Expressionslevel von FFAR2. In der Analyse von Patientendaten, die an verschiedenen Leukämieentitäten erkrankt waren, zeigte sich ebenfalls eine erniedrigte FFAR2-Expression verglichen mit gesunden Kontrollen (öffentliche Daten von oncomine.org). Abbildung 20 zeigt die Ergebnisse dieser Analyse öffentlich verfügbarer Daten. Diese Daten wurden veröffentlicht in *Secker, Bruns et al., 2020*.^[50]

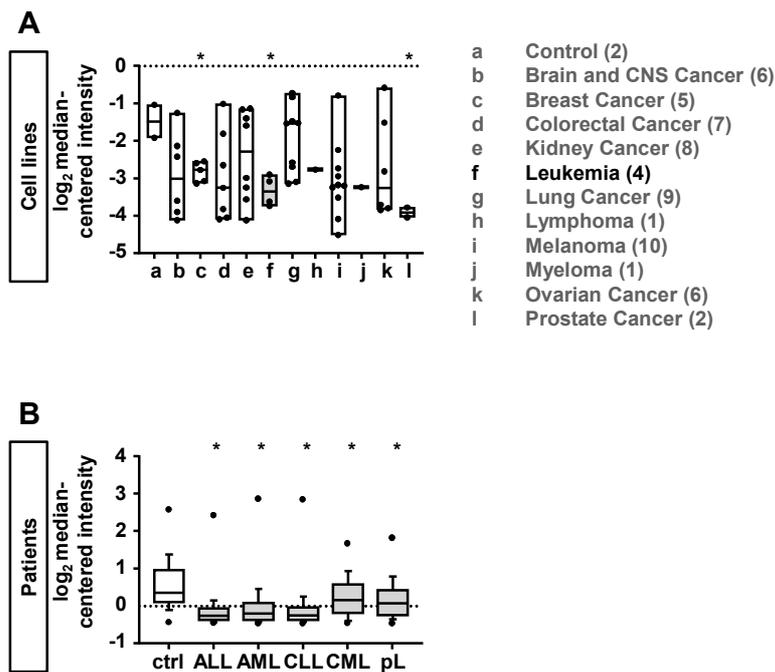


Abbildung 20: FFAR2-Expression in anderen Krebsentitäten und Leukämien. (A) FFAR2-Expression im Vergleich verschiedener Krebsarten. Die Kästchen zeigen den Bereich von der 25. bis zur 75. Perzentile; die horizontalen Linien stellen den Median dar; die Fehlerbalken zeigen den Bereich von der 10. bis zur 90. Perzentile; die Punkte zeigen die Maximal- und Minimalwerte an. (Daten aus oncomine.org) **(B)** FFAR2-Expression in verschiedenen Leukämieentitäten. Die Kästchen zeigen den Bereich von der 25. Bis zur 75. Perzentile; die horizontalen Linien stellen den Median dar; die Fehlerbalken zeigen den Bereich von der 10. bis zur 90. Perzentile; die Punkte zeigen die Höchst- und Mindestwerte (Daten aus oncomine.org). Es wurde der Student's t-Test verwendet: * zeigt $p < 0.05$. Daten publiziert in Secker, Bruns et al., 2020.^[50]

Um die funktionelle Relevanz von FFAR2 *in vitro* zu bestätigen, wurden MLL-AF4-Zellen aus huBM und huCB, die bereits 62 Tage in Kultur waren, mit dem FFAR2-Antagonisten GLPG0974 behandelt. Bemerkenswerterweise konnte hierdurch die Proliferationshemmung der MLL-AF4-Zellen aus huBM partiell wiederhergestellt werden, wohingegen sich bei MLL-AF4-Zellen aus huCB kein Effekt zeigte (Abbildung 21). Diese Daten wurden veröffentlicht in Secker, Bruns et al., 2020.^[50]

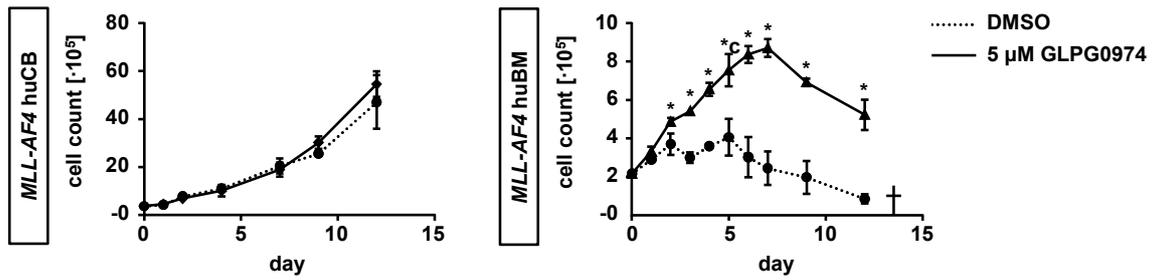


Abbildung 21: Antagonisierung von FFAR2 in MLL-AF4-Zellen aus huCB und huBM. Dargestellt ist die Wachstumskurve nach 62-tägiger Kultur von MLL-AF4-Zellen aus huCB und huBM unter Einsatz von 5 μ M des FFAR2-Antagonisten GLPG0974 verglichen mit der Kontrolle (DMSO). Die Zellzahl wurde mittels Neubauer-Zählkammer nach Trypanblaufärbung bestimmt. Es wurde der Student's t-Test verwendet: * zeigt $p < 0.05$. Diese Daten wurden veröffentlicht in *Secker, Bruns et al., 2020.*^[50]

Diese Ergebnisse bestätigen, dass FFAR2 eine wichtige Rolle in der Immortalisierung von MLLr Leukämien spielt.

4 Diskussion

4.1 Etablierung des CRISPR/Cas9-basierten MLLr-Modells in HSPCs aus huBM

MLLr Leukämien sind mit 5-10 % aller akuten Leukämien eine häufige Erkrankung und sind mit einer schlechten Prognose assoziiert.^[24, 26] Insbesondere Neugeborene sind sehr stark von dieser Erkrankung betroffen mit besonders aggressiven und therapieresistenten Verläufen.^[23, 36] Interessanterweise weisen kindliche MLLr Leukämien häufig eine Translokation im AF4-Gen auf und erkranken an einer ALL. Erwachsene dagegen sind meist von einer AML betroffen und AF9 wird als häufigster Translokationspartner nachgewiesen.^[23] Die Ursache für diese Unterschiede zwischen Erwachsenen und Neugeborenen sind kaum verstanden und Forschungsgegenstand dieser Arbeit.^[50]

Patientenzellen eignen sich zur Untersuchung dieses Phänomens nur begrenzt, da sie in *in vitro* Kulturen schnell ausdifferenzieren und weitere genetische Veränderungen im Verlauf der Erkrankungen aufweisen können.^[36, 39, 156, 157] Um diese Problematik zu umgehen, ist der Einsatz von patientenähnlichen MLLr Modellen sinnvoll. Bisherige Modelle spiegeln jedoch nur eingeschränkt die krankheitsrelevante Biologie wider, da es sich hauptsächlich um reine Mausmodelle mit Unterschieden zum humanen (Epi-) Genom oder durch virale Vektoren veränderte humane Zellmodelle handelt, die eine unphysiologische Überexpression entscheidender Onkogene aufweisen.^[34, 114, 120, 158] *Secker et al.* ist es gelungen, ein authentisches, CRISPR/Cas9-basiertes MLLr Modell mit den Translokationspartnern AF4 und AF9 in HSPCs aus huCB zu etablieren, das diese Limitationen bisheriger Modelle umgeht.^[121] Durch die Induktion von Doppelstrangbrüchen mittels des CRISPR/Cas9-Systems an aus Patientendaten abgeleiteten Schnittstellen entwickelten sich MLL-translozierte Zellen in einem humanen System mit endogenen Promotoren. Diese waren nicht nur auf genetischer Ebene vergleichbar mit MLLr Leukämien von Patienten, sondern auch auf morphologischer, phänotypischer und transkriptioneller Ebene.^[117, 121, 159] Ziel dieser Arbeit war die Umsetzung dieses authentischen Modells in HSPCs

aus adultem huBM, um die unterschiedliche Ausprägung der Erkrankung zwischen Erwachsenen und Kindern durch den Vergleich der neonatalen und adulten Ursprungszelle näher zu untersuchen.

Die Etablierung in einem adulten System konnte sowohl für MLL-AF4 als auch für MLL-AF9 mit hoher Effektivität erreicht werden. In 3 von 10 Versuchen für MLL-AF4 und 4 von 8 Versuchen für MLL-AF9 gelang die Translokation. Die Effizienz, mit der die Translokation ohne virale Vektoren eingebracht werden konnte, ist insbesondere unter folgenden Aspekten hervorzuheben. Zum einen war die gemessene Schneideeffizienz der sgRNAs, mit denen die Doppelstrangbrüche eingebracht wurden, in HSPCs aus huBM sehr gering. Zum anderen können die induzierten Doppelstrangbrüche durch zelleigene Reparaturmechanismen wieder korrekt repariert werden oder dieser schwere DNA-Schaden induzierte in den meisten Fälle eine Apoptose.^[160, 161] Insgesamt ist die Entstehung einer Translokation daher unwahrscheinlich und unterstreicht das Potential von den MLL-Fusionproteinen als onkogener Treiber. Durch den starken proliferativen Vorteil wuchsen aus den initial eingesetzten 3×10^5 Zellen dennoch nach kurzer Zeit reine Zellkulturen heran mit 100 % translozierten Zellen, während sich die Kontrollzellen nach etwa einem Monat Kultivierung apoptotisch zeigten.

Sowohl die Induktion beider Translokationen als auch das nachfolgende Auswachsen in adulten hämatopoetischen Stammzellen konnten mit dieser Arbeit erstmalig gezeigt werden.^[50] Durch das Durchführen einer RT-PCR konnte auf funktioneller RNA-Ebene das Translokationsprodukt nachgewiesen werden. Die translozierten Zellen wiesen präzise die aus Patientendaten abgeleiteten und durch die sgRNA adressierten Schnittstellen im Intron 11 auf. Wahrscheinlich handelte es sich um polyklonale Zellkulturen, bei denen initial Translokationen mit derselben Sequenz in mehreren Zellen entstanden sind. Dies könnte ebenfalls zur kurzen Latenzzeit bis zum Auswachsen der reinen Zellkulturen beitragen. Diese Translokationssequenz in Intron 11 ist, wie im Kapitel 1.2.3 gezeigt, an einer Stelle lokalisiert, die durch die gestörte Bindung der PHD3-Domäne an CYP33 mit einer besonderen schlechten Prognose assoziiert ist und

insbesondere bei MLLr Leukämien von Neugeborenen häufig identifiziert werden konnte.^[23, 33, 162] *Meyer et al.* führten in ihrer Studie eine genaue Analyse hinsichtlich der Bruchpunkte abhängig von Translokationspartner, Alter und klinischer Manifestation als ALL oder AML in einem großen Kollektiv von MLLr Leukämiepatienten durch. Dabei zeigte sich, dass ALL insbesondere Bruchpunkte im Intron 11 aufweisen, während bei den AML-Patienten signifikant häufig ein Bruchpunkt im Intron 9 auftrat.

Entsprechend der altersabhängigen Verteilung der ALL- und AML-Fälle und der Translokationspartner zeigte sich auch, dass jüngere Patienten entsprechend häufiger im Intron 11 den Doppelstrangbruch erlitten mit AF4 als Translokationspartner. Bei Erwachsenen MLLr Leukämien dominiert ein Bruch im Intron 9 mit einer Fusion mit AF9.^[23] *Meyer et al.* postulierten, dass zwei unterschiedlich Mechanismen als Ursprung für die Doppelstrangbrüche infrage kommen. Intron 11 ist ein transkriptionsgekoppelter Hotspot, der insbesondere auf externe zytotoxische Noxen reagiert, während Intron 9 möglicherweise durch transkriptionell bedingte ALU-Wiederholungen Torsionsstress durch die Polymerase III und II erfährt.^[23] Dieser Aspekt wurde zur Beantwortung der Fragestellung hinsichtlich altersabhängigen Unterschiede MLL-translozierter Leukämien in dieser Arbeit nicht näher untersucht. Eine Adaptierung des hier verwendeten Modells und Adressierung von Intron 9 mit Hilfe des CRISPR/Cas9-Systems, um einen altersabhängigen Einfluss der Bruchstelle und die daraus resultierenden Signalwege molekulargenetisch zu analysieren, ist in zukünftigen Versuchen möglich und Gegenstand aktueller Untersuchungen bei der Arbeitsgruppe Schneidawind.^[33]

Die Verwendung von hämatopoetischen Stammzellen, sowohl im neonatalen als auch im adulten System, leitet sich aus ihrer Eigenschaft zur Selbsterneuerung und ihrer sowohl lymphatischen als auch myeloischen Differenzierungsfähigkeit ab. Da MLLr Leukämien klinisch sowohl als AML als auch ALL sowie als MPAL imponieren, kommen nur Zellen als Ursprung in Frage, die diese Eigenschaften aufweisen.^[23, 43] Ein weitere Beleg für diese Diversität hinsichtlich der Zellreihe sind MLLr Leukämiefälle, die nach spezifischer Therapie einer ALL im Rezidiv als

AML imponieren.^[163] Hierarchisch direkt anschließend an HSCs sind die multipotenten hämatopoetischen Progenitorzellen (HPC), die ebenfalls zu weiterer Differenzierung, jedoch nur eingeschränkt zur Selbsterneuerung befähigt sind.^[164] Hinsichtlich MLLr Leukämien konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass auch Progenitorzellen Ursprung einer MLLr Leukämie sein können. Diese Leukämien zeigten sich jedoch im Vergleich zu Leukämien mit einer HSC in ihrer Aggressivität vermindert.^[165] Inwieweit dieser Aspekt eine Rolle hinsichtlich der altersabhängigen Unterschiede von MLLr Leukämien spielen, ist nicht bekannt. Das in dieser Arbeit weiterentwickelte Modell könnte durch Einsatz von vorangegangener Isolation der Progenitorzellen, anstatt der Verwendung der gesamten HSPC-Population, Hilfe bei dieser Fragestellung geben. Neben diesen weiteren Einsatzmöglichkeiten ist es durch das in dieser Arbeit generierte adulte MLLr Modell mit AF4 als auch AF9 als Translokationspartner möglich, zu Grunde liegende Signalwege zu identifizieren und näher zu untersuchen. Durch einen Vergleich mit dem identisch generierten neonatalen MLLr Modell durch *Secker et al.* bietet sich eine Plattform, um sich der Kernfrage dieser Arbeit hinsichtlich der altersabhängigen Unterschiede bei MLLr Leukämien weiter anzunähern.^[121]

4.2 Charakterisierung der MLL-translozierten Zellen und Validierung als naturgetreues MLLr-*in-vitro*-Leukämie-Modell

Die genomeditierten Zellen teilen nicht nur die genetische Übereinstimmung mit Patientenzellen, sondern auch ihre morphologischen, immunphänotypischen und transkriptionellen Eigenschaften. Entsprechend der eingesetzten Zytokine mit FLT3-L, SCF, TPO, G-CSF, IL-3, IL-6 zur Optimierung der Wachstumsbedingungen zeigte sich ein myelomonozytärer Immunphänotyp mit erhöhter Expression von CD33, CD64 und CD15 und fehlendem CD34.^[123] Dieser myelomonozytäre Phänotyp ist typischerweise auch bei Blasten von MLLr Leukämiepatienten nachweisbar.^[154, 166]

Die in diesem Modell eingesetzten Kulturbedingungen mit myeloischen Zytokinen und die resultierenden Ergebnisse müssen jedoch auch unter dem Aspekt betrachtet werden, dass die Mikroumgebung einen Einfluss auf Wachstum, Immunphänotyp und Signalwege haben könnte. In Zusammenhang mit der MLLr

Leukämogenese konnten *Wei et al.* und *Barabe et al.* in ihren Arbeiten Mikroumgebungen identifizieren, die durch ihre Zytokinzusammensetzungen Einfluss auf die entstehende Abstammungslinie von MLLr Leukämien hatten.^[40, 41] Umgekehrt ergaben andere Studien einen Einfluss der leukämischen Zellen auf das umgebende Stroma.^[167] *Menendez et al.* konnten bei MLL-AF4 translozierten Leukämien die Translokation auch in mesenchymalen Stromazellen des Knochenmarks nachweisen.^[168] Insbesondere MLLr Leukämien mit AF4 als Translokationspartner imponieren wie in Kapitel 1.2.1 beschrieben häufig als ALL.^[23] Eine lymphatische Mikroumgebung wurde in dieser Arbeit nicht eingesetzt, könnte jedoch vergleichend Gegenstand weiterer Experimente sein.

Eine differenzierte Betrachtung der Mikroumgebung ist auch hinsichtlich des Entwicklungsstandes der Hämatopoese zum Zeitpunkt der Leukämieentstehung interessant. Insbesondere in der embryonalen Entwicklung verändert sich die Umgebung der Hämatopoese und damit der Ursprung der HSC und HPC stark. HSCs und HPCs sind ab dem 3. Trimenon im Knochenmark und zu einem kleinen Teil in der Blutzirkulation ansässig. In der embryonalen Entwicklung sind jedoch der Dottersack, die aorto-gonadale-mesonephrische Region, die Leber sowie die Plazenta anatomische Orte der Blutbildung.^[169, 170] Dabei ändert sich nicht nur die anatomische Region, sondern im Verlauf der Entwicklung, auch die Mikroumgebung. Microarray-Analysen von *Martin et al.* zeigten unter anderem, dass das Stroma in der fetalen Leber eine höhere Expression von Regulatoren des Wnt-Signalwegs aufwies, während im Stroma des Knochenmarks eine erhöhte Expression des Notch-Signalwegs vorlag.^[171] Weitere Arbeiten zeigten erhöhte Level von insulin-like growth factor 2 und angiopoetin-like protein.^[48, 172] Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Nische der HSCs zur adäquaten Expansion und Instandhaltung während der Entwicklung beiträgt.^[171] Diese Veränderungen in der embryonalen Hämatopoese und der Mikroumgebung sind in Bezug auf infantile MLLr Leukämien relevant, da verschiedene Studien eine Genese bereits *in utero* nahelegen.^[46] So zeigten Zwillingsstudien von *Greaves et al.* eine Konkordanzrate von annähernd 100 % bei monozygoten Zwillingen mit infantiler Leukämie.^[47] Es gelang *Rowe et al.* Hinweise auf einen spezifischen

Einfluss des Entwicklungsstandes der hämatopoetischen Nische auf den resultierenden Phänotyp zu identifizieren.^[173] Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die neonatale Knochenmarknische einen gemischt myeloiden und B-lymphoiden Phänotyp unterstützt.^[173]

Nicht nur die Mikroumgebung hat einen Einfluss auf die resultierende Abstammungslinie, die sich im Immunphänotyp widerspiegelt. Auch der jeweilige Fusionspartner beeinflusst den resultierenden Phänotyp. *Lin et al.* konnten eine starke lymphatische Tendenz von AF4 als Fusionspartner nachweisen.^[174] Es konnte außerdem in Xenograft-Modellen gezeigt werden, dass der Transfusionspartner ENL exklusiv zu einer ALL führt. Der Translokationspartner AF9 dagegen wies dagegen eine ALL, AML oder einen gemischten Phänotyp auf.^[41, 113] Hinweise für die Wechselwirkungen zwischen eingesetztem Zytokinmilieu und Fusionspartner konnten in dieser Arbeit wie auch in der Arbeit von *Secker et al.* durch den Einsatz der AF4- und AF9-translozierten Zellen in halbfestem Kulturmedium beobachtet werden. Im Gegensatz zur Flüssigkultur mit myeloischen Zytokinen zeigten sich die adulten MLL-AF4-translozierten Zellen in halbfestem Medium in ihrer Selbsterneuerungsfähigkeit im Vergleich zu MLL-AF9-Zellen vermindert.^[117] Zur weiteren Untersuchung dieser Wechselwirkungen könnte das hier vorgestellte Modell adaptiert werden und im lymphatischen Milieu kultiviert werden.

Unabhängig von Phänotyp und Mikroumgebung konnte auch in diesem adulten MLLr Modell zuverlässig eine Translokation erzeugt werden mit typischen MLLr-Zielgenen wie MEIS1 und HOXA9.^[98, 99] Das Expressionslevel dieser Zielgene war vergleichbar mit den Messungen in MLLr Zellen von betroffenen Patienten. Die translozierten Zellen wiesen einen deutlichen proliferativen Vorteil gegenüber den eingesetzten Kontrollzellen auf. Passend dazu zeigten diese in der May-Grünwald-Giemsa-Färbung eine leukämietypische blastenartige Morphologie mit verschobener Kern-Plasma-Relation auf, während nur mit Cas9-Protein nukleofizierte Zellen apoptotische Merkmale aufwiesen. Diese morphologische Beobachtung spiegelt sich auch in den immunphänotypischen Untersuchungen wider. Während Kontrollzellen zunehmend CD14 als Marker für Differenzierung

exprimierten, ließ sich CD14 auf der Oberfläche der manipulierten Zellen trotz prolongierter Kultivierung kaum nachweisen. Im Gegensatz dazu konnte CD117 als Marker für Unreife auf den translozierten Zellen identifiziert werden.^[50] *Aoki et al.* konnten in ihrer Arbeit CD9 als Marker für Leukämie-induzierende Zellen in MLLr Leukämien nachweisen.^[154] *Schneidawind et al.* bestätigten dieses Ergebnis und konnten zudem zeigen, dass CD9 ein nützlicher Marker für das Anreichern von genomeditierten MLLr Zellen *in vitro* darstellt.^[123] Als weiterer Beleg für die Authentizität des hier etablierten adulten MLLr Modells konnte diese CD9-Anreicherung ebenfalls nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu zeigten untergehende translozierte Zellen einen Verlust der CD9-Expression. Möglicherweise kann der Verlust von CD9 als potentiell früher Marker für aufkommenden Zelltod in der Therapie klinisch eingesetzt werden.^[50] Weitere Untersuchungen bei Patienten mit MLLr Leukämien unter Therapie sind notwendig, um dieses Phänomen zu bestätigen.^[50]

In Zusammenschau validieren diese Ergebnisse, dass ein naturgetreues MLLr-*in-vitro*-Leukämie-Modell in adulten hämatopoetischen Stammzellen durch den Einsatz der CRISPR/Cas-Technologie gelungen ist. Dieses kann als experimentelle Plattform für weiterführende Untersuchungen hinsichtlich der Pathophysiologie bei MLLr Leukämien dienen. Durch Modifikationen des Modells könnten die in dieser Arbeit nicht berücksichtigte Aspekte beleuchtet werden. So ist die Rolle der reziproken AF4-MLL-Fusion in der MLLrLeukämogenese unklar und wird weithin diskutiert, wie die zusammenfassende Arbeit von *Marschalek et al.* aufzeigt.^[175] In dem hier generierten MLLr Modell handelt es sich um Translokationen, in der sowohl die MLL-AF4 bzw. MLL-AF9 als auch die AF4-MLL und AF9-MLL Fusionen vorhanden sind. Um den Einfluss auf den Pathomechanismus der reziproken Fusion näher zu untersuchen, kann im Rahmen dieses Modells ein gezieltes Ausschalten eines der beiden Fusionskonstrukte zielführend sein. Inwieweit die Anwesenheit des Wildtyp-MLL-Gens notwendig ist, ist weiterhin Gegenstand der Forschung.^[176] Die Ergebnisse der FISH-Untersuchung in dieser Arbeit wiesen neben dem translozierten MLL-Gen immer auch das Wildtyp-Gen nach. Auch hier könnten durch einen Knockout wertvolle Informationen hinsichtlich dieser Fragestellung gewonnen werden.

Auch der Einsatz in weiteren Ursprungszellen stellt eine mögliche Erweiterung des hier vorgestellten Modells dar. So konnten *Barret et al.* in ihren Experimenten Hinweise auf einen Ursprung der Erkrankungen in spezifischen fetalen Leberzellen finden.^[49]

Auch die Rolle weiterer Mutationen, die für die Leukämieinduktion notwendig sind, bleibt unklar. Eine Mutationsanalyse der in dieser Arbeit kreierte translozierten Zellen könnte diesbezüglich weitere Erkenntnisse liefern. Insbesondere bei Neugeborenen MLLr Leukämien lassen sich kaum zusätzliche Mutationen nachweisen.^[36]

4.3 Vergleich der induzierten adulten und embryonalen MLLr Zellen

Durch den Vergleich zwischen embryonalen und adulten MLLr Zellen, die methodisch identisch hergestellt wurden, lassen sich Unterschiede herausarbeiten.^[117] Es ist naheliegend, dass intrinsische Eigenschaften der Ursprungszelle ursächlich für die Prädominanz und Aggressivität der Erkrankung im Kindesalter sein könnten. Da sowohl die Initiierung der Translokation und die nachfolgende Kultivierung zwischen adulten und neonatalen Zellen analog erfolgten, ist es möglich, intrinsische Eigenschaften der Ursprungszellen zu untersuchen, und Faktoren zu identifizieren, die Einfluss auf die Krankheitsentwicklung haben.

Im direkten Vergleich der neonatalen und adulten Zellen zeigten sich hinsichtlich des Immunphänotyps, der Expression typischer MLLr-Targetgene wie auch morphologisch und im initialen Proliferationsverhalten keine Unterschiede.^[50] In Hinblick auf das weitere Proliferationsverhalten in prolongierten Zellkulturen im Hinblick auf eine Immortalisierung konnten jedoch signifikante Abweichungen der adulten Zellen beobachtet werden. In der Arbeit von *Secker et al.* wiesen sowohl AF4- als auch AF9-translozierte Zellen unbegrenztes Wachstumspotential auf.^[121] In adulten Zellen traf dies für AF9 translozierte Zellen ebenfalls zu. In adulten AF4 translozierten Zellen wurde hingegen initial eine starke Proliferation beobachtet, die aber nach etwa 80 Tagen zum Erliegen kam. Eine mögliche Erklärung dieses Phänomens ist, dass MLL-AF4 in den adulten Zellen unter

myeloischen Zellkulturbedingungen zwar initial eine präleukämische Transformation erlaubte, diese jedoch nicht vollständig beendet werden konnte.^[50]

Diese Beobachtung deckt sich auch mit dem klinischen Bild bei Patienten. Während neonatale MLLr Leukämien vor allem als ALL mit AF4 auftreten, sind AML mit AF4 als Translokationspartner äußerst selten.^[23] MLL-AF9 Leukämien treten bei adulten Patienten zudem überwiegend als myeloische Leukämie auf, während bei neonatalen Zellen sowohl lymphatische als auch myeloische Leukämien beobachtet werden.^[23] Auch *Horton et al.* kamen in ihrem humanisierten MLLr Mausmodell mit AF9-translozierten Zellen zu dem Ergebnis, dass eine Transformation in adulten Zellen wesentlich schwieriger zu etablieren und nur unter myeloischen Bedingungen möglich war.^[34] *Horton et al.* leitete dies zu der Annahme, dass unter anderem das höhere Proliferationspotential und das Selbsterneuerungspotential der neonatalen Zellen für das unterschiedliche Transformationspotential verantwortlich sind.^[34] Das Proliferationspotential ist definiert als die Fähigkeit zur Teilung und Bildung von Tochterzellen unabhängig von Zelllinie und Mutationsstatus. Das Selbsterneuerungs- oder Expansionspotential dagegen beschreibt die Kapazität zur Teilung und Selbsterneuerung in primitiven Zellen mit dem gleichen biologischen Potential wie die Ursprungszelle.^[164] *Lansdorp et al.* konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass nur etwa 25 % der CD34 positiven Zellen von Erwachsenen in Flüssigkultur Zellteilung zeigten (Proliferationspotential) und die Anzahl der CD34 positiven Zellen annähernd konstant blieb (Expansionspotential). Zellen aus huCB dagegen zeigten nahezu 100 % proliferatives Verhalten und die Anzahl der CD34 positiven Zellen erhöhte sich signifikant bis zum 250-fachen.^[177] Die Annahme von *Horton et al.* wird durch dieses Ergebnis unterstützt.^[34]

Ein wichtiger Mechanismus der Zellteilung ist der Zellzyklus, der für die exakte Duplikation der DNA und als Kontrollmechanismus der Zellteilung verantwortlich ist. Dieser wird in zwei wesentliche Abschnitte eingeteilt: Die M-Phase, der eigentlichen Teilung, und die S-Phase, in der die DNA-Synthese stattfindet. Zwischen diesen Phasen liegen sogenannte Gap-Phasen (G₁- und G₂-Phase),

die zur Vorbereitung, der Verdopplung der Proteinmasse und Zellorganellen sowie dem Zellwachstum dienen. Die Zellen können außerdem in einen Zellarrest versetzt werden, der sogenannten G₀-Phase und aus Zellteilung und -zyklus austreten. Einige Zellen verbleiben in diesem Arrest bis zum Zelltod, andere können unter bestimmten Bedingungen wieder in die G₁-Phase und die Zellteilung eintreten.^[178] Ein Großteil der adulten HSCs befindet sich als ruhende Zellen in dieser G₀-Phase.^[164, 179] Lediglich 10 % der HSCs im adulten huBM befindet sich im Zellzyklus.^[180-183] In fetalen Geweben, wie in der Leber von fetalen Mäusen, hingegen konnte ein deutlich höherer Anteil von HSCs im Zellzyklus festgestellt werden, der nahezu bei 100 % lag. Es ist vorstellbar, dass Zellen in der G₁-Phase empfänglicher gegenüber einer malignen Transformation sind. Im Gegensatz dazu könnte der höhere Anteil seneszenten Zellen bei Erwachsenen ursächlich für die erschwerte Etablierung MLL-translozierter Zellen in adulten Modellen sein.^[34] Demgegenüber stehen die in dieser Arbeit erworbenen Kenntnisse über die transformierten MLL-AF9-Zellen aus huBM, deren Proliferationspotential den neonatalen Zellen gleich.

Einen weiteren Einflussfaktor stellen die Mikroumgebung und die hier enthaltenen Zytokine dar. Wie bereits im vorherigen Kapitel 4.2 beschrieben, konnten verschiedene Arbeiten einen Einfluss des umgebenden Milieus auf die entstehende Abstammungslinie MLLr Leukämie nachweisen.^[40, 41] Zusätzlich haben Zytokine auch hinsichtlich des Wachstums einen unterschiedlichen Effekt auf adulte und embryonale Zellen. Adulte Zellen benötigen für das gleiche Ansprechen hinsichtlich ihres Wachstums höhere Konzentrationen an Zytokinen und reagieren weniger sensibel.^[184, 185] Bezogen auf die Abstammungslinie ist insbesondere für infantile MLL-AF4-Leukämien beschrieben, dass sie myeloische Marker koexprimieren und eine höhere Plastizität aufweisen.^[26, 186] Adulte Zellen scheinen dagegen eher eine myeloische Tendenz zu haben.^[34] Diese Beobachtungen bieten eine mögliche Erklärung, warum unter myeloischen Bedingungen eine vollständige Transformation MLL-AF4 translozierter Zellen in neonatalen Zellen möglich war, eine Immortalisierung MLL-AF4 translozierter adulter Zellen in dieser Arbeit aber nicht gelang. Der Einsatz des hier vorgestellten Modells in lymphatischer Kultur ist daher in zukünftigen Arbeiten

von großem Interesse. Dabei stellt es eine große Herausforderung dar, eine experimentelle Umsetzung der komplexen Zusammenhänge zwischen hämatopoetischen Stammzellen und der umgebenden Nische sowie intrinsische Einflüsse auf die Leukämieentstehung zu etablieren. Eine Übersicht bisher eingesetzter Modelle, der Erkenntnisse hinsichtlich dieser Zusammenhänge und daraus resultierenden Therapieansätze bietet unter anderem die zusammenführende Arbeit von *Duguid et al.*^[187]

Um die intrinsischen Eigenschaften der Ursprungszellen näher zu untersuchen, ist es notwendig, Signalwege auf genetischer und transkriptioneller Ebene zu betrachten. Gene, deren essenzielle Rolle für die Initiierung und Erhaltung der MLLr Leukämien hinreichend beschrieben wurden, wie HOXA9, HOXA10 und MEIS1, zeigten sich unabhängig vom Translokationspartner sowohl in embryonalen als auch in adulten Zellen vergleichbar hochreguliert, wie verschiedene Arbeiten zeigen konnten.^[34, 82, 188] Trotz erhöhtem Level dieser für MLLr Leukämien typischen Zielgene zeigten die adulten MLL-AF4-Zellen in unseren Experimenten den bereits beschriebenen Zelluntergang und verfehlten eine Immortalisierung. Weitere Faktoren müssen daher eine Rolle in der Leukämogenese spielen. In der Vergangenheit konnten genetische Programme und Signalwege identifiziert werden, die ursächlich für die beschriebenen unterschiedlichen Eigenschaften zwischen embryonalen und adulten hämatopoetischen Stammzellen sein könnten.^[183, 189-191] *Wong et al.* beschrieben systematisch Genmodulkarten, die die transkriptionelle Programme von embryonalen Stammzellen, adulten Gewebestammzellen und humanen Krebszellen verglichen.^[192] Als wichtige Gene im embryonal ähnlichen Stammzellprogramm konnten unter anderem *Sox2*, *c-Myc*, *Dnmt1*, *Cbx3*, *Hdac1* und *Yy1* erkannt werden. Das adulte Stammzellprogramm ist dagegen dominiert von transkriptionellen Regulatoren der Differenzierung.^[192] Dieses embryonal ähnliche transkriptionelle Programm konnte in verschiedenen malignen Tumoren nachgewiesen werden und zeigte sich mit einer äußerst schlechten Prognose.^[192, 193] Auch durch *Somerville et al.* identifizierte leukämische Stammzellen von MLLr Leukämien teilten dieses transkriptionelle Programm.^[194, 195] In *gene set enrichment* Analysen konnten *Horton et al.* feststellen, dass dieses embryonale

Stammzellprogramm in neonatalen MLL-AF9-Zellen exprimiert wird, in adulten Zellen zeigte sich jedoch keine Anreicherung. *Horton et al.* leitete dies zu der Annahme, dass die langfristige Selbsterneuerung und Transformation die Aufrechterhaltung oder Reaktivierung von neonatalen HSC-spezifischen Programmen beinhaltet.^[34]

Die in dieser Arbeit durchgeführte RNA-Sequenzierung der mit CRISPR/Cas9-induzierten MLLr Zellen aus huCB und adultem huBM zeigte eine gemeinsam gültige MLLr-Signatur mit für MLLr-typisch hochregulierten Zielgenen wie HOXA9 und MEIS1.^[50] In der Analyse differentiell exprimierter Gene konnten die Ergebnisse von *Horton et al.* nicht identifiziert werden, wobei die eingesetzte Probenanzahl sehr gering war.^[34] Unter den 45 unterschiedlich exprimierten Genen zeigte sich FFAR2 als das am meisten herunterregulierte Gen in allen translozierten Zellen, jedoch weniger stark in MLL-AF4-Zellen aus huBM.^[50] FFAR2, auch bekannt als GPR43, gehört zur G-Protein-gekoppelten Rezeptorfamilie und wird physiologisch durch kurzkettige Fettsäuren wie Butyrate oder Propionate, die unter anderem bei der Fermentation von Ballaststoffen durch Darmbakterien entstehen, aktiviert.^[196, 197] Die Aktivierung resultiert über den G α i-Signalweg in einer cAMP-Signalinhibierung.^[196, 197] Das durch FFAR2 inhibierte cAMP resultiert in einer supprimierten Funktion der Proteinkinase K und ihrem Substrat, des CBP.^[197] Dies führt insgesamt zu einer herabgesetzten Expression von Histondeacetylasen (HDACs), die Acetylgruppen der Aminosäure Lysin an Kernhistonen entfernen.^[198] Die Acetylierung von Histonen ist ein wichtiger epigenetischer Regulator der Gentranskription durch die Veränderung des Chromatins, das zu verminderten Transkriptionsfaktoren führt. Hyperacetylierungen von Histonen sind daher assoziiert mit erhöhter transkriptioneller Aktivität, Hypoacetylierungen dagegen mit der Suppression der Gentranskription.^[199]

Die Bedeutung von FFAR2 in Neoplasien verbleibt als ein Gegenstand der Forschung, jedoch konnte für verschiedene Entitäten ein Verlust von FFAR2 nachgewiesen werden. Dieser Effekt ist möglicherweise ein entscheidender Faktor in der Transformation von MLLr Leukämien.^[197, 200] *Pan et al.* konnten in

ihrer Arbeit zu Kolonkarzinomen zeigen, dass der Verlust von FFAR2 insbesondere zu hohen Leveln von H3K4me3 führt und einem herabgesetzten Level von H3K79me2.^[197] Diese epigenetischen Veränderungen sind ebenfalls für MLLr Leukämien beschrieben worden und haben eine entscheidende Rolle in der Pathogenese. So zeigen insbesondere leukämische Stammzellen dieses epigenetische Profil mit hohen H3K4me3 und niedrigen Leveln von H3K79me2.^[201] Die Arbeit von *Wong et al.* ergab, dass dieses Profil eine entscheidende Rolle hinsichtlich des onkogenen Potentials der leukämischen Stammzellen spielt.^[201] Um die Rolle von FFAR2 in Leukämien besser zu beurteilen, wurden öffentlich verfügbare Patientendaten erneut analysiert.^[202, 203] Hier zeigte sich passend zu unserem Modell eine signifikante Herabregulation von FFARs in leukämischen Zellen im Vergleich zu gesunden Zellen, aber auch zu anderen Tumorentitäten, was wiederum erneut die Wichtigkeit dieses pathogenen Signalwegs bei hämatologischen Neoplasien betont.^[50] Zudem konnten *Bindels et al.* einen regulatorischen Einfluss von FFAR2 in einem Mausmodell mit leukämischen Zellen mit dem BCR-ABL-Fusionsprotein nachweisen.^[200] Auch wir konnten die Wichtigkeit von FFAR2 in unserem MLL-AF4-Modell aus huBM herausarbeiten, indem die MLL-AF4-Zellen nach Hinzugabe des FFAR2-Antagonisten GLPG0974 ihr Wachstum wieder begannen, während es keinen Einfluss auf die MLL-AF4-Zellen aus huCB hatte.^[50, 153] Kürzlich wurde ein pharmakologisch gut verträglicher FFAR2-Agonist entwickelt, der nach den hier erhobenen Daten ein mögliches Therapeutikum für MLLr Leukämien darstellt.^[50, 153]

Zusammenfassend ist es in dieser Arbeit gelungen, ein authentisches und innovatives CRISPR/Cas9-basiertes MLLr in huCB- und huBM-Zellen zu generieren. Unter Verwendung physiologischer Promotoren zeigten die genomeditierten MLL-AF4- und -AF9-Zellen morphologische, phänotypische und transkriptionelle Eigenschaften, die MLLr-Patientenleukämien ähnelten. Im Vergleich zwischen den generierten huCB- und huBM-Zellen zeigte sich, dass sich nur Zellen aus huCB durch das Onkogen MLL-AF4 unter myeloischen Bedingungen transformieren ließen. Dies verdeutlicht den Einfluss von Ursprungszelle und Fusionspartner in der Leukämogenese und auf die

resultierende Erkrankung. Verschiedene Arbeiten konnten in der Vergangenheit Hinweise auf die multiplen und komplexen Signalwege identifizieren, die ursächlich für die Rolle von Ursprungszelle und Fusionspartner sind.^[34, 192, 194] In dieser Arbeit zeigt sich, dass die mangelnde Herunterregulation von FFAR2, ein epigenetischer Regulator, entscheidend für die mangelnde Transformation adulter MLL-AF4-Zellen ist. Aktuelle Forschungsergebnisse unterstützen diese These. Insbesondere für Leukämien ergaben sich Hinweise auf die unerlässliche Rolle der Herunterregulation von FFAR2 für die Leukämogenese. Folglich könnte FFAR2 als therapeutisches Ziel in der zukünftigen Behandlung von MLLr Leukämien dienen.^[50]

5 Zusammenfassung

Translokationen des MLL-Gens sind eine häufige Ursache akuter Leukämien. Insbesondere Neugeborene sind sehr stark von dieser Erkrankung betroffen, die in einer überwiegenden Anzahl der Fälle mit einem besonders aggressiven und therapieresistenten Verlauf verbunden ist. Bis zu 80 % aller Leukämien in dieser Alterskohorte sind MLL-transloziert und hauptsächlich mit dem Translokationspartner AF4 assoziiert. Bei Erwachsenen dagegen sind nur 10 % der AML MLL-transloziert mit AF9 als dem bedeutsamsten Fusionspartner und einer intermediären Prognose. Die Ursache für diese altersabhängigen Unterschiede sind bisher nur unzureichend verstanden und Gegenstand aktueller Forschung. Der molekulare Pathomechanismus der Erkrankung umfasst dabei multiple Komplexpartner und führt zu weitreichenden epigenetischen wie auch transkriptionellen Veränderungen.

Trotz vielversprechender zielgerichteter Therapien bleibt ein durchschlagender Therapieerfolg bei MLL-translozierten Leukämieerkrankungen bislang aus. In unserer Arbeitsgruppe (Medizinischen Klinik Abteilung Innere Medizin II des Universitätsklinikum Tübingen, Betreuung: PD Dr. med. Corina Schneidawind, Ph.D.) ist es gelungen, ein effizientes, auf der CRISPR/Cas9-Technologie basierendes MLL-translozierte Modell in hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen (HSPCs) aus Nabelschnurblut zu etablieren, das die Biologie der Erkrankung naturgetreu abbildet. Durch die vergleichende Anwendung dieses Modells in adulten hämatopoetischen Stammzellen ist es möglich, der Fragestellung dieser Arbeit nach dem Einfluss der Translokationspartner und der Ursprungszelle auf den altersabhängigen Unterschied hinsichtlich der Häufigkeit und Prognose von MLL-translozierten Leukämien nachzugehen. Hierfür wurden HSPCs aus adultem Knochenmark isoliert und mit Hilfe der CRISPR/Cas9-Technologie Doppelstrangbrüche an patientenspezifischen Schnittstellen im MLL-Gen sowie im AF4- und AF9-Gen eingebracht. Die hieraus entstandenen Translokationen wurden mittels PCR und Sanger-Sequenzierung sowie Karyotypisierung identifiziert. Die translozierten Zellen wurden mittels myeloischer Flüssigzellkultur angereichert und das Proliferationsverhalten mit

Trypan-Blau-Färbung dokumentiert. Das Erreichen einer 100 % reinen MLL-translozierten Zellkultur wurde mittels FISH-Untersuchung bestätigt. Anschließend erfolgte die Charakterisierung des Modells anhand des Immunphänotyps basierend auf durchflusszytometrischen Analysen, der morphologischen Beurteilung mittels May-Grünwald-Giemsa-Färbung sowie der transkriptionellen Analyse durch RT-PCR, RT-qPCR und RNA-Sequenzierung. Die Rolle von FFAR2, ein epigenetischer Tumormarker, und dessen Einfluss auf die Proliferation und Immortalisierung der Zellen wurde durch Verwendung des FFAR2-Antagonisten GLPG0974 ebenfalls untersucht.

Die entstandenen MLL-AF4- und MLL-AF9-Zellen aus HSPCs vom Knochenmark generiert, zeigten ein starkes Proliferationsverhalten und monoklonales Auswachsen zu reinen Zellkulturen. Die Charakterisierung ergab eine unreife Zellmorphologie, einen patienten-typischen myelomonozytären Immunphänotyp und erhöhte MLL typische Zielgene. Die Validität dieser Ergebnisse zeigt sich sowohl im Vergleich mit Patientenzellen, aber auch mit den Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe zu genomeditierten neonatalen Zellen. Interessanterweise zeigten alle genomeditierten MLL-translozierte Zellen aus Nabelschnurblut und Knochenmark ein ungebremstes Zellwachstum bis auf MLL-AF4-Zellen mit den Ursprungszellen aus Knochenmark. Diese stoppten die Proliferation nach etwa 80 Tagen und wurden trotz stabiler Expression des MLL-AF4-Fusionsgens apoptotisch. Die RNA-Sequenzierung zeigte 45 unterschiedlich exprimierte Gene, von denen FFAR2, als das am meisten herunterregulierte Gen identifiziert werden konnte. In MLL-AF4-Zellen zeigte sich die Herabregulation jedoch nur in vermindertem Ausmaß. Wir vermuteten daher, dass die fehlende vollständige Herabregulation von FFAR2 für die fehlende Immortalisierung der genomeditierten MLL-AF4-Zellen aus Knochenmark in myeloischem Milieu verantwortlich sein könnte. Der Einsatz des FFAR2-Antagonisten GLPG0974 unterstrich diese Hypothese funktionell, da adulte MLL-AF4-Zellen unter Einfluss des Antagonisten erneut eine erhöhte Proliferation und Überleben aufwiesen, während neonatale MLL-AF4-Zellen hiervon unbeeinflusst blieben.

Unsere Beobachtung, dass MLL-AF4-Zellen aus Knochenmark nicht in der Lage sind, eine Immortalisierung unter myeloischen Bedingungen zu erreichen, ist vereinbar mit der Klinik, bei der MLL-AF4-Leukämien bei Erwachsenen im Gegensatz zu MLL-AF4-Leukämien bei Neugeborenen nur einen geringen Anteil ausmachen. Dies unterstreicht zudem die Rolle des Fusionspartners sowie den intrinsischen Eigenschaften der Ursprungszelle für die maligne Transformation. Die Analyse sowie der Vergleich mit neonatalen Zellen weist darauf hin, dass die Herunterregulation von FFAR2 ein möglicher Mechanismus ist, der zu den altersabhängigen Unterschieden zwischen adulten und neugeborenen MLL-translozierten Leukämien beiträgt.

Durch die in dieser Arbeit erstmalig gelungene Etablierung eines naturgetreuen MLL-translozierten Modells mit den Translokationspartnern AF4 und AF9 in HSPCs aus adultem Knochenmark wird eine experimentelle Plattform geboten, die weiterführende Untersuchungen zum Verständnis der MLL-Leukämogenese und zur Testung weiterer Therapieoptionen ermöglicht

6 Literaturverzeichnis

1. Herold G., Hallek M., Balke-Want H., Becker H., Breuninger M., Galkin V., et al. Leukämien. In: Herold Gerd, (Hrsg). Innere Medizin. 37. Aufl. Köln: Herold, G. ; 2019. S. 96-102.
2. Westermann J., Bullinger L. Akute myeloische Leukämie. In: Suttorp N. Möckel M., Siegmund B., Dietel M., (Hrsg). Harrisons Innere Medizin. 20. Aufl. Berlin: ABW Wissenschaftsverlag; 2020. S. 917-27.
3. Renz-Polster H., Krautzig S. Maligne hämatologische Erkrankungen. In: Renz-Polster H., Krautzig, S., (Hrsg). Basislehrbuch Innere Medizin. 5. Aufl. München: Urban & Fischer; 2013. S. 282-7.
4. Röllig C., Beelen D. W., Braess J., Greil R., Niederwieser D., Passweg J., et al. Empfehlungen der Fachgesellschaft zur Diagnostik und Therapie hämatologischer und onkologischer Erkrankungen – Leitlinie Akute Myeloische Leukämie (AML): DGHO - Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie; 2021. Verfügbar auf: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/akute-myeloische-leukaemie>. [Zugriff: 12.09.2023]
5. Westermann J., Schwartz S. Akute lymphatische Leukämien. In: Suttorp N. Möckel M., Siegmund B., Dietel M., (Hrsg). Harrisons Innere Medizin. 20. Aufl. Berlin: ABW Wissenschaftsverlag; 2020. S. 939-45.
6. Khoury J. D., Solary E., Abla O., Akkari Y., Alaggio R., Apperley J. F., et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia*. 2022;36(7):1703-19.
7. Arber D. A., Orazi A., Hasserjian R., Thiele J., Borowitz M. J., Le Beau M. M., et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391-405.
8. Döhner H., Wei A. H., Appelbaum F. R., Craddock C., DiNardo C. D., Dombret H., et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood*. 2022;140(12):1345-77.
9. Juliusson G., Lazarevic V., Horstedt A. S., Hagberg O., Hoglund M. Acute myeloid leukemia in the real world: why population-based registries are needed. *Blood*. 2012;119(17):3890-9.
10. Gökbuget N., Baldus C., Brüggemann M., Hauswirth A. W., Schanz U., Stelljes M., et al. Empfehlungen der Fachgesellschaft zur Diagnostik und Therapie hämatologischer und onkologischer Erkrankungen – Leitlinie Akute Lymphatische Leukämie (ALL): DGHO - Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie; 2021. Verfügbar auf: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/akute-lymphatische-leukaemie-all>. [Zugriff: 21.07.2021]
11. Swerdlow SH C. E., Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Revised Fourth Edition: WHO Classification of Tumours. 2017.
12. Bassan R., Hoelzer D. Modern therapy of acute lymphoblastic leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(5):532-43.

13. Phelan K. W., Advani A. S. Novel Therapies in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Current hematologic malignancy reports*. 2018;13(4):289-99.
14. Samra B., Jabbour E., Ravandi F., Kantarjian H., Short N. J. Evolving therapy of adult acute lymphoblastic leukemia: state-of-the-art treatment and future directions. *Journal of hematology & oncology*. 2020;13(1):70.
15. Terwilliger T., Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood cancer journal*. 2017;7(6):e577.
16. Christopheit M., Schmidt-Hieber M., Sprute R., Buchheidt D., Hentrich M., Karthaus M., et al. Infektiöse Komplikationen nach Hochdosistherapie und autologer Stammzelltransplantation: DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V.; 2021. Verfügbar auf: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/infektioese-komplikationen-nach-hochdosistherapie-und-autologer-stammzelltransplantation/>. [Zugriff: 23.07.2021]
17. Jordan K., Jahn F., Feyer P., Karthaus M., Leithold C., Oechsle K., et al. Antiemese bei medikamentöser Tumortherapie: DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V.; 2019. Verfügbar auf: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/antiemese-bei-medikamentoeser-tumortherapie>. [Zugriff: 23.07.2021]
18. Schmidt-Hieber M., Bierwirth J., Buchheidt D., Oliver A. Cornely, Hentrich M., Maschmeyer G., et al. Gastrointestinale Komplikationen (Schwerpunkt: Diarrhoe und Colitis) bei Patienten mit hämatologischen und onkologischen Erkrankungen: DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V.; 2018. Verfügbar auf: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/gastrointestinale-komplikationen-schwerpunkt-diarrhoe-und-colitis-bei-patienten-mit-haematologischen-und-onkologischen-erkrankungen>. [Zugriff: 23.07.2021]
19. Abou Dalle I., Jabbour E., Short N. J., Ravandi F. Treatment of Philadelphia Chromosome-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia. *Current treatment options in oncology*. 2019;20(1):4.
20. Stein E. M., Garcia-Manero G., Rizzieri D. A., Tibes R., Berdeja J. G., Savona M. R., et al. The DOT1L inhibitor pinometostat reduces H3K79 methylation and has modest clinical activity in adult acute leukemia. *Blood*. 2018;131(24):2661-9.
21. Steinhilber D., Marschalek R. How to effectively treat acute leukemia patients bearing MLL-rearrangements ? *Biochem Pharmacol*. 2018;147:183-90.
22. Winters A. C., Bernt K. M. MLL-Rearranged Leukemias-An Update on Science and Clinical Approaches. *Front Pediatr*. 2017;5:4.
23. Meyer C., Burmeister T., Groger D., Tsaur G., Fechina L., Renneville A., et al. The MLL recombinome of acute leukemias in 2017. *Leukemia*. 2018;32(2):273-84.
24. Muntean A. G., Hess J. L. The pathogenesis of mixed-lineage leukemia. *Annu Rev Pathol*. 2012;7:283-301.

25. Marchesi F., Girardi K., Avvisati G. Pathogenetic, Clinical, and Prognostic Features of Adult t(4;11)(q21;q23)/MLL-AF4 Positive B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Advances in hematology*. 2011;2011:621627.
26. Pui C. H., Gaynon P. S., Boyett J. M., Chessells J. M., Baruchel A., Kamps W., et al. Outcome of treatment in childhood acute lymphoblastic leukaemia with rearrangements of the 11q23 chromosomal region. *Lancet (London, England)*. 2002;359(9321):1909-15.
27. Pieters R., Schrappe M., De Lorenzo P., Hann I., De Rossi G., Felice M., et al. A treatment protocol for infants younger than 1 year with acute lymphoblastic leukaemia (Interfant-99): an observational study and a multicentre randomised trial. *Lancet (London, England)*. 2007;370(9583):240-50.
28. Pieters R., De Lorenzo P., Ancliffe P., Aversa L. A., Brethon B., Biondi A., et al. Outcome of Infants Younger Than 1 Year With Acute Lymphoblastic Leukemia Treated With the Interfant-06 Protocol: Results From an International Phase III Randomized Study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2019;37(25):2246-56.
29. Super H. J., McCabe N. R., Thirman M. J., Larson R. A., Le Beau M. M., Pedersen-Bjergaard J., et al. Rearrangements of the MLL gene in therapy-related acute myeloid leukemia in patients previously treated with agents targeting DNA-topoisomerase II. *Blood*. 1993;82(12):3705-11.
30. Krivtsov A. V., Armstrong S. A. MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(11):823-33.
31. Chen J., Santillan D. A., Koonce M., Wei W., Luo R., Thirman M. J., et al. Loss of MLL PHD finger 3 is necessary for MLL-ENL-induced hematopoietic stem cell immortalization. *Cancer Res*. 2008;68(15):6199-207.
32. Muntean A. G., Giannola D., Udager A. M., Hess J. L. The PHD fingers of MLL block MLL fusion protein-mediated transformation. *Blood*. 2008;112(12):4690-3.
33. Emerenciano M., Meyer C., Mansur M. B., Marschalek R., Pombo-de-Oliveira M. S. The distribution of MLL breakpoints correlates with outcome in infant acute leukaemia. *Br J Haematol*. 2013;161(2):224-36.
34. Horton S. J., Jaques J., Woolthuis C., van Dijk J., Mesuraca M., Huls G., et al. MLL-AF9-mediated immortalization of human hematopoietic cells along different lineages changes during ontogeny. *Leukemia*. 2013;27(5):1116-26.
35. Okeyo-Owuor T., Li Y., Patel R. M., Yang W., Casey E. B., Cluster A. S., et al. The efficiency of murine MLL-ENL-driven leukemia initiation changes with age and peaks during neonatal development. *Blood advances*. 2019;3(15):2388-99.
36. Andersson A. K., Ma J., Wang J., Chen X., Gedman A. L., Dang J., et al. The landscape of somatic mutations in infant MLL-rearranged acute lymphoblastic leukemias. *Nat Genet*. 2015;47(4):330-7.

37. Bardini M., Spinelli R., Bungaro S., Mangano E., Corral L., Cifola I., et al. DNA copy-number abnormalities do not occur in infant ALL with t(4;11)/MLL-AF4. *Leukemia*. 2010;24(1):169-76.
38. Prelle C., Bursen A., Dingermann T., Marschalek R. Secondary mutations in t(4;11) leukemia patients. *Leukemia*. 2013;27(6):1425-7.
39. Bolouri H., Farrar J. E., Triche T., Jr., Ries R. E., Lim E. L., Alonzo T. A., et al. The molecular landscape of pediatric acute myeloid leukemia reveals recurrent structural alterations and age-specific mutational interactions. *Nature medicine*. 2018;24(1):103-12.
40. Wei J., Wunderlich M., Fox C., Mulloy J. C. Microenvironment determines lineage fate in a human model of MLL-AF9 leukemia. *Cancer Cell*. 2008.
41. Barabé F., Kennedy J. A., Hope K. J., Dick J. E. Modeling the initiation and progression of human acute leukemia in mice. *Science (New York, NY)*. 2007;316(5824):600-4.
42. Bonnet D. Haematopoietic stem cells. *J Pathol*. 2002;197(4):430-40.
43. Pui C. H., Frankel L. S., Carroll A. J., Raimondi S. C., Shuster J. J., Head D. R., et al. Clinical characteristics and treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia with the t(4;11)(q21;q23): a collaborative study of 40 cases. *Blood*. 1991;77(3):440-7.
44. Wölfl M., Rasche M., Eyrich M., Schmid R., Reinhardt D., Schlegel P. G. Spontaneous reversion of a lineage switch following an initial blinatumomab-induced ALL-to-AML switch in MLL-rearranged infant ALL. *Blood advances*. 2018;2(12):1382-5.
45. Ford A. M., Ridge S. A., Cabrera M. E., Mahmoud H., Steel C. M., Chan L. C., et al. In utero rearrangements in the trithorax-related oncogene in infant leukaemias. *Nature*. 1993;363(6427):358-60.
46. Gale K. B., Ford A. M., Repp R., Borkhardt A., Keller C., Eden O. B., et al. Backtracking leukemia to birth: identification of clonotypic gene fusion sequences in neonatal blood spots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(25):13950-4.
47. Greaves M. F., Maia A. T., Wiemels J. L., Ford A. M. Leukemia in twins: lessons in natural history. *Blood*. 2003;102(7):2321-33.
48. Zhang C. C., Kaba M., Ge G., Xie K., Tong W., Hug C., et al. Angiopoietin-like proteins stimulate ex vivo expansion of hematopoietic stem cells. *Nature medicine*. 2006;12(2):240-5.
49. Barrett N. A., Malouf C., Kapeni C., Bacon W. A., Giotoopoulos G., Jacobsen S. E. W., et al. MLL-AF4 Confers Enhanced Self-Renewal and Lymphoid Potential during a Restricted Window in Development. *Cell Rep*. 2016;16(4):1039-54.
50. Secker K. A., **Bruns L.**, Keppeler H., Jeong J., Hentrich T., Schulze-Hentrich J. M., et al. Only Hematopoietic Stem and Progenitor Cells from Cord Blood Are Susceptible to Malignant Transformation by MLL-AF4 Translocations. *Cancers*. 2020;12(6).
51. Tkachuk D. C., Kohler S., Cleary M. L. Involvement of a homolog of *Drosophila trithorax* by 11q23 chromosomal translocations in acute leukemias. *Cell*. 1992;71(4):691-700.

52. Gu Y., Nakamura T., Alder H., Prasad R., Canaani O., Cimino G., et al. The t(4;11) chromosome translocation of human acute leukemias fuses the ALL-1 gene, related to *Drosophila trithorax*, to the AF-4 gene. *Cell*. 1992;71(4):701-8.
53. Butler L. H., Slany R., Cui X., Cleary M. L., Mason D. Y. The HRX proto-oncogene product is widely expressed in human tissues and localizes to nuclear structures. *Blood*. 1997;89(9):3361-70.
54. Ingham P. W. Genetic control of the spatial pattern of selector gene expression in *Drosophila*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1985;50:201-8.
55. Schuettengruber B., Chourrout D., Vervoort M., Leblanc B., Cavalli G. Genome regulation by polycomb and trithorax proteins. *Cell*. 2007;128(4):735-45.
56. Saksouk N., Simboeck E., Déjardin J. Constitutive heterochromatin formation and transcription in mammals. *Epigenetics Chromatin*. 2015;8:3.
57. Yu B. D., Hanson R. D., Hess J. L., Horning S. E., Korsmeyer S. J. MLL, a mammalian trithorax-group gene, functions as a transcriptional maintenance factor in morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(18):10632-6.
58. Hess J. L., Yu B. D., Li B., Hanson R., Korsmeyer S. J. Defects in yolk sac hematopoiesis in Mll-null embryos. *Blood*. 1997;90(5):1799-806.
59. Fidanza V., Melotti P., Yano T., Nakamura T., Bradley A., Canaani E., et al. Double knockout of the ALL-1 gene blocks hematopoietic differentiation in vitro. *Cancer Res*. 1996;56(6):1179-83.
60. Jude C. D., Climer L., Xu D., Artinger E., Fisher J. K., Ernst P. Unique and independent roles for MLL in adult hematopoietic stem cells and progenitors. *Cell Stem Cell*. 2007;1(3):324-37.
61. McMahon K. A., Hiew S. Y., Hadjur S., Veiga-Fernandes H., Menzel U., Price A. J., et al. Mll has a critical role in fetal and adult hematopoietic stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell*. 2007;1(3):338-45.
62. Ernst P., Fisher J. K., Avery W., Wade S., Foy D., Korsmeyer S. J. Definitive hematopoiesis requires the mixed-lineage leukemia gene. *Developmental cell*. 2004;6(3):437-43.
63. Nakamura T., Mori T., Tada S., Krajewski W., Rozovskaia T., Wassell R., et al. ALL-1 is a histone methyltransferase that assembles a supercomplex of proteins involved in transcriptional regulation. *Molecular cell*. 2002;10(5):1119-28.
64. Hsieh J. J., Ernst P., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Korsmeyer S. J. Proteolytic cleavage of MLL generates a complex of N- and C-terminal fragments that confers protein stability and subnuclear localization. *Molecular and cellular biology*. 2003;23(1):186-94.
65. García-Alai M. M., Allen M. D., Joerger A. C., Bycroft M. The structure of the FYR domain of transforming growth factor beta regulator 1. *Protein Sci*. 2010;19(7):1432-8.
66. Yokoyama A., Kitabayashi I., Ayton P. M., Cleary M. L., Ohki M. Leukemia proto-oncoprotein MLL is proteolytically processed into 2 fragments with opposite transcriptional properties. *Blood*. 2002;100(10):3710-8.

67. Marschalek R. Systematic Classification of Mixed-Lineage Leukemia Fusion Partners Predicts Additional Cancer Pathways. *Ann Lab Med.* 2016;36(2):85-100.
68. Lemmens I., Van de Ven W. J., Kas K., Zhang C. X., Giraud S., Wautot V., et al. Identification of the multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) gene. The European Consortium on MEN1. *Human molecular genetics.* 1997;6(7):1177-83.
69. Chandrasekharappa S. C., Guru S. C., Manickam P., Olufemi S. E., Collins F. S., Emmert-Buck M. R., et al. Positional cloning of the gene for multiple endocrine neoplasia-type 1. *Science (New York, NY).* 1997;276(5311):404-7.
70. Yokoyama A., Cleary M. L. Menin critically links MLL proteins with LEDGF on cancer-associated target genes. *Cancer Cell.* 2008;14(1):36-46.
71. Milne T. A., Hughes C. M., Lloyd R., Yang Z., Rozenblatt-Rosen O., Dou Y., et al. Menin and MLL cooperatively regulate expression of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2005;102(3):749-54.
72. Chen Y. X., Yan J., Keeshan K., Tubbs A. T., Wang H., Silva A., et al. The tumor suppressor menin regulates hematopoiesis and myeloid transformation by influencing Hox gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2006;103(4):1018-23.
73. Ayton P. M., Chen E. H., Cleary M. L. Binding to nonmethylated CpG DNA is essential for target recognition, transactivation, and myeloid transformation by an MLL oncoprotein. *Molecular and cellular biology.* 2004;24(23):10470-8.
74. Birke M., Schreiner S., García-Cuellar M. P., Mahr K., Titgemeyer F., Slany R. K. The MT domain of the proto-oncoprotein MLL binds to CpG-containing DNA and discriminates against methylation. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(4):958-65.
75. Bach C., Mueller D., Buhl S., Garcia-Cuellar M. P., Slany R. K. Alterations of the CxxC domain preclude oncogenic activation of mixed-lineage leukemia 2. *Oncogene.* 2009;28(6):815-23.
76. Erfurth F. E., Popovic R., Grembecka J., Cierpicki T., Theisler C., Xia Z. B., et al. MLL protects CpG clusters from methylation within the Hoxa9 gene, maintaining transcript expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2008;105(21):7517-22.
77. Muntean A. G., Tan J., Sitwala K., Huang Y., Bronstein J., Connelly J. A., et al. The PAF complex synergizes with MLL fusion proteins at HOX loci to promote leukemogenesis. *Cancer Cell.* 2010;17(6):609-21.
78. Schuettengruber B., Martinez A. M., Iovino N., Cavalli G. Trithorax group proteins: switching genes on and keeping them active. *Nature reviews Molecular cell biology.* 2011;12(12):799-814.
79. Xia Z. B., Anderson M., Diaz M. O., Zeleznik-Le N. J. MLL repression domain interacts with histone deacetylases, the polycomb group proteins HPC2 and BMI-1, and the corepressor C-terminal-binding protein.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2003;100(14):8342-7.
80. Wang Z., Song J., Milne T. A., Wang G. G., Li H., Allis C. D., et al. Pro isomerization in MLL1 PHD3-bromo cassette connects H3K4me readout to CyP33 and HDAC-mediated repression. *Cell*. 2010;141(7):1183-94.
 81. Chang P. Y., Hom R. A., Musselman C. A., Zhu L., Kuo A., Gozani O., et al. Binding of the MLL PHD3 finger to histone H3K4me3 is required for MLL-dependent gene transcription. *Journal of molecular biology*. 2010;400(2):137-44.
 82. Milne T. A., Briggs S. D., Brock H. W., Martin M. E., Gibbs D., Allis C. D., et al. MLL targets SET domain methyltransferase activity to Hox gene promoters. *Molecular cell*. 2002;10(5):1107-17.
 83. Dou Y., Milne T. A., Ruthenburg A. J., Lee S., Lee J. W., Verdine G. L., et al. Regulation of MLL1 H3K4 methyltransferase activity by its core components. *Nature structural & molecular biology*. 2006;13(8):713-9.
 84. Chan A. K. N., Chen C. W. Rewiring the Epigenetic Networks in MLL-Rearranged Leukemias: Epigenetic Dysregulation and Pharmacological Interventions. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2019;7:81.
 85. Slany R. K. The molecular mechanics of mixed lineage leukemia. *Oncogene*. 2016;35(40):5215-23.
 86. Isnard P., Core N., Naquet P., Djabali M. Altered lymphoid development in mice deficient for the mAF4 proto-oncogene. *Blood*. 2000;96(2):705-10.
 87. Peterlin B. M., Price D. H. Controlling the elongation phase of transcription with P-TEFb. *Molecular cell*. 2006;23(3):297-305.
 88. Li Y., Wen H., Xi Y., Tanaka K., Wang H., Peng D., et al. AF9 YEATS domain links histone acetylation to DOT1L-mediated H3K79 methylation. *Cell*. 2014;159(3):558-71.
 89. Erfurth F., Hemenway C. S., de Erkenez A. C., Domer P. H. MLL fusion partners AF4 and AF9 interact at subnuclear foci. *Leukemia*. 2004;18(1):92-102.
 90. Pina C., May G., Soneji S., Hong D., Enver T. MLLT3 regulates early human erythroid and megakaryocytic cell fate. *Cell Stem Cell*. 2008;2(3):264-73.
 91. Hemenway C. S., de Erkenez A. C., Gould G. C. The polycomb protein MPC3 interacts with AF9, an MLL fusion partner in t(9;11)(p22;q23) acute leukemias. *Oncogene*. 2001;20(29):3798-805.
 92. Srinivasan R. S., de Erkenez A. C., Hemenway C. S. The mixed lineage leukemia fusion partner AF9 binds specific isoforms of the BCL-6 corepressor. *Oncogene*. 2003;22(22):3395-406.
 93. Mueller D., Garcia-Cuellar M. P., Bach C., Buhl S., Maethner E., Slany R. K. Misguided transcriptional elongation causes mixed lineage leukemia. *PLoS biology*. 2009;7(11):e1000249.
 94. Jonkers I., Lis J. T. Getting up to speed with transcription elongation by RNA polymerase II. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2015;16(3):167-77.
 95. McLean C. M., Karemaker I. D., van Leeuwen F. The emerging roles of DOT1L in leukemia and normal development. *Leukemia*. 2014;28(11):2131-8.

96. Schubeler D., MacAlpine D. M., Scalzo D., Wirbelauer C., Kooperberg C., van Leeuwen F., et al. The histone modification pattern of active genes revealed through genome-wide chromatin analysis of a higher eukaryote. *Genes & development*. 2004;18(11):1263-71.
97. Okada Y., Feng Q., Lin Y., Jiang Q., Li Y., Coffield V. M., et al. hDOT1L links histone methylation to leukemogenesis. *Cell*. 2005;121(2):167-78.
98. Wong P., Iwasaki M., Somervaille T. C., So C. W., Cleary M. L. Meis1 is an essential and rate-limiting regulator of MLL leukemia stem cell potential. *Genes & development*. 2007;21(21):2762-74.
99. Faber J., Krivtsov A. V., Stubbs M. C., Wright R., Davis T. N., van den Heuvel-Eibrink M., et al. HOXA9 is required for survival in human MLL-rearranged acute leukemias. *Blood*. 2009;113(11):2375-85.
100. Wang E., Kawaoka S., Yu M., Shi J., Ni T., Yang W., et al. Histone H2B ubiquitin ligase RNF20 is required for MLL-rearranged leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(10):3901-6.
101. Smith E., Lin C., Shilatifard A. The super elongation complex (SEC) and MLL in development and disease. *Genes & development*. 2011;25(7):661-72.
102. Itzen F., Greifenberg A. K., Bosken C. A., Geyer M. Brd4 activates P-TEFb for RNA polymerase II CTD phosphorylation. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(12):7577-90.
103. Dou Y M. T., Tackett AJ, Smith ER, Fukuda A, Wysocka J et al. Physical association and coordinate function of the H3 K4 methyltransferase MLL1 and the H4 K16 acetyltransferase MOF. *CELL*. 2005;121:873–85.
104. Gilan O., Lam E. Y., Becher I., Lugo D., Cannizzaro E., Joberty G., et al. Functional interdependence of BRD4 and DOT1L in MLL leukemia. *Nature structural & molecular biology*. 2016;23(7):673-81.
105. Di Croce L., Helin K. Transcriptional regulation by Polycomb group proteins. *Nature structural & molecular biology*. 2013;20(10):1147-55.
106. Maethner E., Garcia-Cuellar M. P., Breitingner C., Takacova S., Divoky V., Hess J. L., et al. MLL-ENL inhibits polycomb repressive complex 1 to achieve efficient transformation of hematopoietic cells. *Cell Rep*. 2013;3(5):1553-66.
107. Leach B. I., Kuntimaddi A., Schmidt C. R., Cierpicki T., Johnson S. A., Bushweller J. H. Leukemia fusion target AF9 is an intrinsically disordered transcriptional regulator that recruits multiple partners via coupled folding and binding. *Structure*. 2013;21(1):176-83.
108. Harris W. J., Huang X., Lynch J. T., Spencer G. J., Hitchin J. R., Li Y., et al. The histone demethylase KDM1A sustains the oncogenic potential of MLL-AF9 leukemia stem cells. *Cancer Cell*. 2012;21(4):473-87.
109. de Boer J., Walf-Vorderwulbecke V., Williams O. In focus: MLL-rearranged leukemia. *Leukemia*. 2013;27(6):1224-8.
110. Neff T., Sinha A. U., Kluk M. J., Zhu N., Khattab M. H., Stein L., et al. Polycomb repressive complex 2 is required for MLL-AF9 leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(13):5028-33.

111. Osaki H., Walf-Vorderwulbecke V., Mangolini M., Zhao L., Horton S. J., Morrone G., et al. The AAA+ ATPase RUVBL2 is a critical mediator of MLL-AF9 oncogenesis. *Leukemia*. 2013;27(7):1461-8.
112. Wilkinson A. C., Ballabio E., Geng H., North P., Tapia M., Kerry J., et al. RUNX1 is a key target in t(4;11) leukemias that contributes to gene activation through an AF4-MLL complex interaction. *Cell Rep*. 2013;3(1):116-27.
113. Buechele C., Breese E. H., Schneidawind D., Lin C. H., Jeong J., Duque-Afonso J., et al. MLL leukemia induction by genome editing of human CD34+ hematopoietic cells. *Blood*. 2015;126(14):1683-94.
114. Milne T. A. Mouse models of MLL leukemia: recapitulating the human disease. *Blood*. 2017;129(16):2217-23.
115. Bruserud O., Gjertsen B. T., Foss B., Huang T. S. New strategies in the treatment of acute myelogenous leukemia (AML): in vitro culture of aml cells--the present use in experimental studies and the possible importance for future therapeutic approaches. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2001;19(1):1-11.
116. Manabe A., Coustan-Smith E., Behm F. G., Raimondi S. C., Campana D. Bone marrow-derived stromal cells prevent apoptotic cell death in B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1992;79(9):2370-7.
117. Secker K.-A. Ein innovatives humanes in vitro CRISPR/Cas9-Modell zur Untersuchung KMT2A-rearrangierter Leukämien. Tübingen: Eberhard Karls Universität; 2020.
118. Drexler H. G., Quentmeier H., MacLeod R. A. Malignant hematopoietic cell lines: in vitro models for the study of MLL gene alterations. *Leukemia*. 2004;18(2):227-32.
119. Mestas J., Hughes C. C. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2004;172(5):2731-8.
120. Rangarajan A., Weinberg R. A. Opinion: Comparative biology of mouse versus human cells: modelling human cancer in mice. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(12):952-9.
121. Secker K. A., Keppeler H., Duerr-Stoerzer S., Schmid H., Schneidawind D., Hentrich T., et al. Inhibition of DOT1L and PRMT5 promote synergistic anti-tumor activity in a human MLL leukemia model induced by CRISPR/Cas9. *Oncogene*. 2019.
122. Chen W., O'Sullivan M. G., Hudson W., Kersey J. Modeling human infant MLL leukemia in mice: leukemia from fetal liver differs from that originating in postnatal marrow. *Blood*. 2011;117(12):3474-5.
123. Schneidawind C., Jeong J., Schneidawind D., Kim I. S., Duque-Afonso J., Wong S. H. K., et al. MLL leukemia induction by t(9;11) chromosomal translocation in human hematopoietic stem cells using genome editing. *Blood advances*. 2018;2(8):832-45.
124. Choi P. S., Meyerson M. Targeted genomic rearrangements using CRISPR/Cas technology. *Nat Commun*. 2014;5:3728.
125. Reimer J., Knöß S., Labuhn M., Charpentier E. M., Göhring G., Schlegelberger B., et al. CRISPR-Cas9-induced t(11;19)/MLL-ENL

- translocations initiate leukemia in human hematopoietic progenitor cells in vivo. *Haematologica*. 2017;102(9):1558-66.
126. Jiang F., Doudna J. A. CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. Annual review of biophysics. 2017;46:505-29.
 127. Sternberg S. H., Redding S., Jinek M., Greene E. C., Doudna J. A. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*. 2014;507(7490):62-7.
 128. Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S., et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science (New York, NY)*. 2007;315(5819):1709-12.
 129. Amitai G., Sorek R. CRISPR-Cas adaptation: insights into the mechanism of action. *Nature reviews Microbiology*. 2016;14(2):67-76.
 130. Brouns S. J., Jore M. M., Lundgren M., Westra E. R., Slijkhuis R. J., Snijders A. P., et al. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science (New York, NY)*. 2008;321(5891):960-4.
 131. Garneau J. E., Dupuis M., Villion M., Romero D. A., Barrangou R., Boyaval P., et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*. 2010;468(7320):67-71.
 132. Hale C. R., Zhao P., Olson S., Duff M. O., Graveley B. R., Wells L., et al. RNA-guided RNA cleavage by a CRISPR RNA-Cas protein complex. *Cell*. 2009;139(5):945-56.
 133. Wiedenheft B., Sternberg S. H., Doudna J. A. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature*. 2012;482(7385):331-8.
 134. Wright A. V., Nuñez J. K., Doudna J. A. Biology and Applications of CRISPR Systems: Harnessing Nature's Toolbox for Genome Engineering. *Cell*. 2016;164(1-2):29-44.
 135. Makarova K. S., Wolf Y. I., Alkhnbashi O. S., Costa F., Shah S. A., Saunders S. J., et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nature reviews Microbiology*. 2015;13(11):722-36.
 136. Gasiunas G., Barrangou R., Horvath P., Siksnys V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(39):E2579-86.
 137. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J. A., Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science (New York, NY)*. 2012;337(6096):816-21.
 138. Deltcheva E., Chylinski K., Sharma C. M., Gonzales K., Chao Y., Piszczak Z. A., et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*. 2011;471(7340):602-7.
 139. Bolotin A., Quinquis B., Sorokin A., Ehrlich S. D. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology (Reading, England)*. 2005;151(Pt 8):2551-61.
 140. Anders C., Niewoehner O., Duerst A., Jinek M. Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature*. 2014;513(7519):569-73.

141. Lieber M. R. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annual review of biochemistry*. 2010;79:181-211.
142. San Filippo J., Sung P., Klein H. Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annual review of biochemistry*. 2008;77:229-57.
143. Wang H., Yang H., Shivalila C. S., Dawlaty M. M., Cheng A. W., Zhang F., et al. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*. 2013;153(4):910-8.
144. Lin Y., Cradick T. J., Brown M. T., Deshmukh H., Ranjan P., Sarode N., et al. CRISPR/Cas9 systems have off-target activity with insertions or deletions between target DNA and guide RNA sequences. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(11):7473-85.
145. Kim D., Bae S., Park J., Kim E., Kim S., Yu H. R., et al. Digenome-seq: genome-wide profiling of CRISPR-Cas9 off-target effects in human cells. *Nat Methods*. 2015;12(3):237-43, 1 p following 43.
146. Ran F. A., Hsu P. D., Lin C. Y., Gootenberg J. S., Konermann S., Trevino A. E., et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*. 2013;154(6):1380-9.
147. Liu M., Rehman S., Tang X., Gu K., Fan Q., Chen D., et al. Methodologies for Improving HDR Efficiency. *Frontiers in genetics*. 2018;9:691.
148. Gundry M. C., Brunetti L., Lin A., Mayle A. E., Kitano A., Wagner D., et al. Highly Efficient Genome Editing of Murine and Human Hematopoietic Progenitor Cells by CRISPR/Cas9. *Cell Rep*. 2016;17(5):1453-61.
149. Bruns L S. K., Keppeler H, Mankel B, Schneidawind D, Schneidawind C. . Only hematopoietic stem and progenitor cells from cord blood are susceptible to malignant transformation by MLL-AF4 translocations. *Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hä-matologie und Medizinische Onkologie (DGHO) Berlin, 2019*. 2019.
150. Nilson I., Lochner K., Siegler G., Greil J., Beck J. D., Fey G. H., et al. Exon/intron structure of the human ALL-1 (MLL) gene involved in translocations to chromosomal region 11q23 and acute leukaemias. *Br J Haematol*. 1996;93(4):966-72.
151. Nilson I., Reichel M., Ennas M. G., Greim R., Knorr C., Siegler G., et al. 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*. 1997;98(1):157-69.
152. Strissel P. L., Strick R., Tomek R. J., Roe B. A., Rowley J. D., Zeleznik-Le N. J. DNA structural properties of AF9 are similar to MLL and could act as recombination hot spots resulting in MLL/AF9 translocations and leukemogenesis. *Human molecular genetics*. 2000;9(11):1671-9.
153. Hansen A. H., Sergeev E., Bolognini D., Sprenger R. R., Ekberg J. H., Ejsing C. S., et al. Discovery of a Potent Thiazolidine Free Fatty Acid Receptor 2 Agonist with Favorable Pharmacokinetic Properties. *J Med Chem*. 2018;61(21):9534-50.
154. Aoki Y., Watanabe T., Saito Y., Kuroki Y., Hijikata A., Takagi M., et al. Identification of CD34+ and CD34- leukemia-initiating cells in MLL-

- rearranged human acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2015;125(6):967-80.
155. Notta F., Zandi S., Takayama N., Dobson S., Gan O. I., Wilson G., et al. Distinct routes of lineage development reshape the human blood hierarchy across ontogeny. *Science (New York, NY)*. 2016;351(6269):aab2116.
 156. Dorantes-Acosta E., Chávez-González A., Santos J. I., Medina-Sanson A., Mayani H. Defective in vitro growth of primitive hematopoietic cells from pediatric patients with acute myeloid leukemia. *Pediatric blood & cancer*. 2008;51(6):741-6.
 157. Mayani H., Flores-Figueroa E., Chávez-González A. In vitro biology of human myeloid leukemia. *Leukemia research*. 2009;33(5):624-37.
 158. Cheon D. J., Orsulic S. Mouse models of cancer. *Annu Rev Pathol*. 2011;6:95-119.
 159. Secker K. A., Bloechl B., Keppeler H., Duerr-Stoerzer S., Schmid H., Schneidawind D., et al. MAT2A as Key Regulator and Therapeutic Target in MLLr Leukemogenesis. *Cancers*. 2020;12(5).
 160. Lips J., Kaina B. DNA double-strand breaks trigger apoptosis in p53-deficient fibroblasts. *Carcinogenesis*. 2001;22(4):579-85.
 161. Kaina B. DNA damage-triggered apoptosis: critical role of DNA repair, double-strand breaks, cell proliferation and signaling. *Biochem Pharmacol*. 2003;66(8):1547-54.
 162. Rössler T., Marschalek R. An alternative splice process renders the MLL protein either into a transcriptional activator or repressor. *Die Pharmazie*. 2013;68(7):601-7.
 163. Gardner R., Wu D., Cherian S., Fang M., Hanafi L. A., Finney O., et al. Acquisition of a CD19-negative myeloid phenotype allows immune escape of MLL-rearranged B-ALL from CD19 CAR-T-cell therapy. *Blood*. 2016;127(20):2406-10.
 164. Mayani H. Biological differences between neonatal and adult human hematopoietic stem/progenitor cells. *Stem cells and development*. 2010;19(3):285-98.
 165. George J., Uyar A., Young K., Kuffler L., Waldron-Francis K., Marquez E., et al. Leukaemia cell of origin identified by chromatin landscape of bulk tumour cells. *Nat Commun*. 2016;7:12166.
 166. Baer M. R., Stewart C. C., Lawrence D., Arthur D. C., Mrózek K., Strout M. P., et al. Acute myeloid leukemia with 11q23 translocations: myelomonocytic immunophenotype by multiparameter flow cytometry. *Leukemia*. 1998;12(3):317-25.
 167. Passaro D., Di Tullio A., Abarategi A., Rouault-Pierre K., Foster K., Ariza-McNaughton L., et al. Increased Vascular Permeability in the Bone Marrow Microenvironment Contributes to Disease Progression and Drug Response in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Cell*. 2017;32(3):324-41.e6.
 168. Menendez P., Catalina P., Rodríguez R., Melen G. J., Bueno C., Arriero M., et al. Bone marrow mesenchymal stem cells from infants with MLL-AF4+ acute leukemia harbor and express the MLL-AF4 fusion gene. *J Exp Med*. 2009;206(13):3131-41.
 169. Tavassoli M. Embryonic and fetal hemopoiesis: an overview. *Blood cells*. 1991;17(2):269-81; discussion 82-6.

170. Mikkola H. K., Gekas C., Orkin S. H., Dieterlen-Lievre F. Placenta as a site for hematopoietic stem cell development. *Exp Hematol.* 2005;33(9):1048-54.
171. Martin M. A., Bhatia M. Analysis of the human fetal liver hematopoietic microenvironment. *Stem cells and development.* 2005;14(5):493-504.
172. Zhang C. C., Lodish H. F. Insulin-like growth factor 2 expressed in a novel fetal liver cell population is a growth factor for hematopoietic stem cells. *Blood.* 2004;103(7):2513-21.
173. Rowe R. G., Lummertz da Rocha E., Sousa P., Missios P., Morse M., Marion W., et al. The developmental stage of the hematopoietic niche regulates lineage in MLL-rearranged leukemia. *J Exp Med.* 2019;216(3):527-38.
174. Lin S., Luo R. T., Ptasinska A., Kerry J., Assi S. A., Wunderlich M., et al. Instructive Role of MLL-Fusion Proteins Revealed by a Model of t(4;11) Pro-B Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cell.* 2016;30(5):737-49.
175. Marschalek R. The reciprocal world of MLL fusions: A personal view. *Biochimica et biophysica acta Gene regulatory mechanisms.* 2020;1863(7):194547.
176. Thiel A. T., Blessington P., Zou T., Feather D., Wu X., Yan J., et al. MLL-AF9-induced leukemogenesis requires coexpression of the wild-type Mll allele. *Cancer Cell.* 2010;17(2):148-59.
177. Lansdorp P. M., Dragowska W., Mayani H. Ontogeny-related changes in proliferative potential of human hematopoietic cells. *J Exp Med.* 1993;178(3):787-91.
178. Alberts B J. A., Lewis J, et al. *Molecular Biology of the Cell.* 4th edition. New York: Garland Science; 2002.
179. Szilvassy S. J. The biology of hematopoietic stem cells. *Archives of medical research.* 2003;34(6):446-60.
180. Fleming W. H., Alpern E. J., Uchida N., Ikuta K., Spangrude G. J., Weissman I. L. Functional heterogeneity is associated with the cell cycle status of murine hematopoietic stem cells. *The Journal of cell biology.* 1993;122(4):897-902.
181. Morrison S. J., Hemmati H. D., Wandycz A. M., Weissman I. L. The purification and characterization of fetal liver hematopoietic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1995;92(22):10302-6.
182. Bowie M. B., McKnight K. D., Kent D. G., McCaffrey L., Hoodless P. A., Eaves C. J. Hematopoietic stem cells proliferate until after birth and show a reversible phase-specific engraftment defect. *The Journal of clinical investigation.* 2006;116(10):2808-16.
183. Copley M. R., Eaves C. J. Developmental changes in hematopoietic stem cell properties. *Experimental & molecular medicine.* 2013;45(11):e55.
184. Weekx S. F., Van Bockstaele D. R., Plum J., Moulijn A., Rodrigus I., Lardon F., et al. CD34⁺⁺ CD38⁻ and CD34⁺ CD38⁺ human hematopoietic progenitors from fetal liver, cord blood, and adult bone marrow respond differently to hematopoietic cytokines depending on the ontogenic source. *Exp Hematol.* 1998;26(11):1034-42.

185. Traycoff C. M., Abboud M. R., Laver J., Clapp D. W., Srour E. F. Rapid exit from G0/G1 phases of cell cycle in response to stem cell factor confers on umbilical cord blood CD34+ cells an enhanced ex vivo expansion potential. *Exp Hematol.* 1994;22(13):1264-72.
186. Khalidi H. S., Chang K. L., Medeiros L. J., Brynes R. K., Slovak M. L., Murata-Collins J. L., et al. Acute lymphoblastic leukemia. Survey of immunophenotype, French-American-British classification, frequency of myeloid antigen expression, and karyotypic abnormalities in 210 pediatric and adult cases. *American journal of clinical pathology.* 1999;111(4):467-76.
187. Duguid A., Mattiucci D., Ottersbach K. Infant leukaemia - faithful models, cell of origin and the niche. *Disease models & mechanisms.* 2021;14(10).
188. Ayton P. M., Cleary M. L. Molecular mechanisms of leukemogenesis mediated by MLL fusion proteins. *Oncogene.* 2001;20(40):5695-707.
189. Kim I., Saunders T. L., Morrison S. J. Sox17 dependence distinguishes the transcriptional regulation of fetal from adult hematopoietic stem cells. *Cell.* 2007;130(3):470-83.
190. Lee Y. T., de Vasconcellos J. F., Yuan J., Byrnes C., Noh S. J., Meier E. R., et al. LIN28B-mediated expression of fetal hemoglobin and production of fetal-like erythrocytes from adult human erythroblasts ex vivo. *Blood.* 2013;122(6):1034-41.
191. Yuan J., Nguyen C. K., Liu X., Kanellopoulou C., Muljo S. A. Lin28b reprograms adult bone marrow hematopoietic progenitors to mediate fetal-like lymphopoiesis. *Science (New York, NY).* 2012;335(6073):1195-200.
192. Wong D. J., Liu H., Ridky T. W., Cassarino D., Segal E., Chang H. Y. Module map of stem cell genes guides creation of epithelial cancer stem cells. *Cell Stem Cell.* 2008;2(4):333-44.
193. Ben-Porath I., Thomson M. W., Carey V. J., Ge R., Bell G. W., Regev A., et al. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat Genet.* 2008;40(5):499-507.
194. Somervaille T. C., Matheny C. J., Spencer G. J., Iwasaki M., Rinn J. L., Witten D. M., et al. Hierarchical maintenance of MLL myeloid leukemia stem cells employs a transcriptional program shared with embryonic rather than adult stem cells. *Cell Stem Cell.* 2009;4(2):129-40.
195. Somervaille T. C., Cleary M. L. Identification and characterization of leukemia stem cells in murine MLL-AF9 acute myeloid leukemia. *Cancer Cell.* 2006;10(4):257-68.
196. Lee T., Schwandner R., Swaminath G., Weiszmann J., Cardozo M., Greenberg J., et al. Identification and functional characterization of allosteric agonists for the G protein-coupled receptor FFA2. *Molecular pharmacology.* 2008;74(6):1599-609.
197. Pan P., Oshima K., Huang Y. W., Agle K. A., Drobyski W. R., Chen X., et al. Loss of FFAR2 promotes colon cancer by epigenetic dysregulation of inflammation suppressors. *Int J Cancer.* 2018;143(4):886-96.
198. Shao R. H., Tian X., Gorgun G., Urbano A. G., Foss F. M. Arginine butyrate increases the cytotoxicity of DAB(389)IL-2 in leukemia and lymphoma cells by upregulation of IL-2Rbeta gene. *Leukemia research.* 2002;26(12):1077-83.

199. Jones P. L., Wolffe A. P. Relationships between chromatin organization and DNA methylation in determining gene expression. *Seminars in cancer biology*. 1999;9(5):339-47.
200. Bindels L. B., Porporato P. E., Ducastel S., Sboarina M., Neyrinck A. M., Dewulf E. M., et al. Ffar2 expression regulates leukaemic cell growth in vivo. *Br J Cancer*. 2017;117(9):1336-40.
201. Wong S. H., Goode D. L., Iwasaki M., Wei M. C., Kuo H. P., Zhu L., et al. The H3K4-Methyl Epigenome Regulates Leukemia Stem Cell Oncogenic Potential. *Cancer Cell*. 2015;28(2):198-209.
202. Shankavaram U. T., Reinhold W. C., Nishizuka S., Major S., Morita D., Chary K. K., et al. Transcript and protein expression profiles of the NCI-60 cancer cell panel: an integromic microarray study. *Mol Cancer Ther*. 2007;6(3):820-32.
203. Haferlach T., Kohlmann A., Wiczorek L., Basso G., Kronnie G. T., Bene M. C., et al. Clinical utility of microarray-based gene expression profiling in the diagnosis and subclassification of leukemia: report from the International Microarray Innovations in Leukemia Study Group. *J Clin Oncol*. 2010;28(15):2529-37.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Medizinischen Klinik Abteilung Innere Medizin II des Universitätsklinikums Tübingen in der Arbeitsgruppe PD Dr. med. Corina Schneidawind, Ph.D. unter Betreuung von PD Dr. med. Corina Schneidawind, Ph.D. und Professor Dr. med. Dominik Schneidawind, Ph.D. durchgeführt. Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit PD Dr. med. Corina Schneidawind, Ph.D. und Dr. rer. nat. Kathy-Ann Secker.

Die Versuche zur Etablierung des humanen MLL-AF4 und MLL-AF9 translozierten Modells mittels CRISPR/Cas9 in adulten hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen wurden nach Einarbeitung durch Dr. rer. nat. Kathy-Ann Secker durch mich eigenständig durchgeführt. Die Auswertung der Versuche erfolgte nach der Methodik des etablierten Modells in Nabelschnurblut aus der Veröffentlichung „*Inhibition of DOT1L and PRMT5 promote synergistic anti-tumor activity in a human MLL leukemia model induced by CRISPR/Cas9*“ von Secker et al. 2019 in *Oncogene* sowie der Promotionsarbeit „*Ein innovatives humanes in vitro CRISPR/Cas9-Modell zur Untersuchung KMT2A-rearrangierter Leukämien*“ von Dr. rer. nat. Kathy-Ann Secker an der Eberhard Karls Universität Tübingen im Jahr 2020.

Der Nachweis der Translokation per FISH-Analyse erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie und Neuropathologie und der Abteilung für Allgemeine und Molekulare Pathologie und Pathologische Anatomie des Universitätsklinikums Tübingen unter der Leitung von Prof Dr. Falko Fend. Frau Barbara Mankel führte die Versuche zur Färbung und lichtmikroskopischen Auswertung durch. Die Erstellung der Karyogramme erfolgte in Kooperation mit dem Institut für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik des Universitätsklinikums Tübingen in Zusammenarbeit mit Dr. med. Ulrike Mau-Holzmann. Die Versuche zum Proliferationsverhalten und zur Fähigkeit zur Selbsterneuerung (*Colony-Forming Assay*) wurden nach Einarbeitung durch Dr. rer. nat. Kathy-Ann Secker durch mich eigenständig durchgeführt und

ausgewertet. Die RT-qPCR und RT-PCR Versuche zur Auswertung der MLL-Targetgene sowie der Nachweis des Fusionsproduktes wurden durch Hildegard Keppeler, BTA, durchgeführt und mit mir gemeinsam ausgewertet. Die durchflusszytometrische Untersuchung zur Bestimmung des Immunphänotyps und der CD9 Expression wie auch die Herstellung und Analyse der *Cytospins* zur morphologischen Beurteilung der Zellen wurden nach Einarbeitung durch Dr. rer. nat. Kathy-Ann Secker durch mich eigenständig durchgeführt und ausgewertet. Der Vergleich der translozierten adulten Zellen mit neonatalen Zellen erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. rer. nat. Kathy-Ann Secker. Sämtliche Versuche und Daten mit Zellen aus Nabelschnurblut wurden durch Dr. rer. nat. Kathy-Ann Secker durchgeführt und ausgewertet. Die RNA-Sequenzierung wurde im Institut für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik des Universitätsklinikums Tübingen durchgeführt. Die Auswertung der Daten und die Analyse erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. rer. nat. Kathy-Ann Secker, Johan Jeong, Ph.D., Dr. rer. nat. Thomas Hentrich und Professor Dr. rer. nat. Julia Schulze-Hentrich unter der Leitung von PD Dr. med. Corina Schneidawind, Ph.D.. Die RT-qPCR Analyse der FFAR2-Expression erfolgte in Zusammenarbeit mit Hildegard Keppeler und Dr. rer. nat. Kathy-Ann Secker. Die Analyse der FFAR2-Expression in anderen Krebsentitäten aus öffentlichen Datenbanken (*oncomine.org*) erfolgte durch Dr. rer. nat. Kathy-Ann Secker. Die Versuche unter Einsatz des FFAR2-Agonisten GLPG0974 erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. rer. nat. Kathy-Ann Secker.

Dieser Dissertation zu Grunde liegt die Veröffentlichung „*Only Hematopoietic Stem and Progenitor Cells from Cord Blood Are Susceptible to Malignant Transformation by MLL-AF4 Translocations*“, die ich gemeinsam als Erstautor mit Dr. rer. nat. Kathy-Ann Secker in Zusammenarbeit mit PD Dr. med. Corina Schneidawind, Ph.D. verfasst habe. Die Experimente wurden durch mich eigenständig durchgeführt und ausgewertet oder in Zusammenarbeit mit der Erstautorin Dr. rer. nat. Kathy-Ann Secker und den aufgeführten Koautoren.

Die Verwendung für die vorliegende Arbeit erfolgt im Einverständnis sämtlicher Koautoren.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Nagold, den 15.10.2023

[Lukas Hammer, geb. Bruns]

8 Veröffentlichungen

Publikation:

Secker K. A.*, **Bruns L.***, Keppeler H., Jeong J., Hentrich T., Schulze-Hentrich J. M., et al. Only Hematopoietic Stem and Progenitor Cells from Cord Blood Are Susceptible to Malignant Transformation by MLL-AF4 Translocations. *Cancers*. 2020;12(6): 1487.

*geteilte Erstautorenschaft

Kongressbeiträge:

Bruns L, Secker KA, Keppeler H, Mankel B, Schneidawind D, Schneidawind C. Only hematopoietic stem and progenitor cells from cord blood are susceptible to malignant transformation by *MLL-AF4* translocations. *Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Medizinische Onkologie (DGHO)*. Berlin, 2019.

Bruns L, Secker KA, Keppeler H, Mankel B, Schneidawind D, Schneidawind C. Only hematopoietic stem cells derived from cord blood are amenable to malignant progression by *MLL-AF4* translocations. *Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Medizinische Onkologie (DGHO)*. Virtuell, 2020.

9 Finanzierung und Unterstützung

Lukas Hammer, geb. Bruns, wurde im Rahmen dieser Promotion durch ein Stipendium des IZKF-Promotionskollegs der medizinischen Fakultät (2018-1) der Eberhard Karls Universität Tübingen unterstützt.

10 Anhang

Anhang 1A: PCR-Bedingungen für die sgRNA-Produktion nach Secker et al.^[117, 121]

Reagenzien	Menge	PCR-Programm	Temperatur	Dauer
Vorwärtsprimer (10 µM)	2 µl	Initiale Denaturierung	95 °C	3 min
Universaler Rückwärtsprimer (10 µM)	2 µl	Denaturierung	98 °C	5 sec
PX458 (2-4 ng/µL)	1 µl	Primeranlagerung	60 °C	5 sec
KAPA HiFi Mix (2 x)	10 µl	Elongation	72 °C	10 sec
H ₂ O nukleasefrei	6 µl	→ Wiederholung		22x
Gesamt	20 µl	Finale Elongation	72 °C	1 min
		Kühlung	4 °C	∞

Anhang 1B: Inkubationsbedingungen für die *in vitro* Transkription nach Secker et al.^[117, 121]

Reagenzien	Menge
DNA (400-1000 ng)	4 µl
dNTPs (Desoxyribonukleosid-triphosphate)	8 µl
Reaction Buffer (10 x)	2 µl
T7 RNA Polymerase Enzyme Mix	2 µl
H ₂ O nukleasefrei	4 µl
Gesamt	20 µl

Anhang 1C: PCR-Bedingungen für die Amplifikation der Schnittstelle nach Secker et al.^[117, 121]

Reagenzien	Menge	PCR-Programm	Temperatur	Dauer
Vorwärtsprimer (10 µM)	1,5 µl	Initiale Denaturierung	95 °C	2 min
Rückwärtsprimer (10 µM)	1,5 µl	Denaturierung	95 °C	15 sec
genomische DNA	200 ng	Primeranlagerung	q.s.	30 sec
Reaction Mix (10 x)	5 µl	Elongation	68 °C	30 sec
AccuPrime Pfx DNA Polymerase	0,5 µl	→ Wiederholung		40 x
H ₂ O nukleasefrei	q.s.	Finale Elongation	68 °C	10 min
Gesamt	50 µl	Kühlung	4 °C	∞

Anhang 1D: Cleavage-Assay nach Secker et al.^[117, 121]

Reagenzien	Menge
Cas9-Protein (1 µg/µL)	400 ng
sgRNA (1 µg/µL)	400 ng
dsDNA	200 ng
Cas9-Reaktionspuffer	q.s.
Gesamt	20 µl

Anhang 1E: Hybridisierungsansatz für T7-Endonuklease-I-Assay nach Secker et al.^[117, 121]

Reagenzien	Menge	PCR-Programm	Temperatur	Dauer
NEB Puffer 2	2 µl	Initiale Denaturierung	95 °C	5 min
dsDNA	200 ng	Gradient	95 °C -85 °C	-2 K/s
H ₂ O nukleasefrei	q.s.	Gradient	85 °C -25 °C	-0,1 K/s
Gesamt	19 µl	Kühlung	4 °C	∞

Anhang 1F: Verdau des T7-Endonuklease-I-Assay nach Secker et al.^[117, 121]

Pipettierschema	Menge
Hybridisierungsansatz	19 µl
<i>T7 Endonuklease I</i>	1 µl
Gesamt	20 µl

Anhang 1G: cDNA Synthese nach Secker et al.^[117, 121]

Reagenzien	Menge	Programm	Temperatur	Dauer
isolierte RNA	1,0 µg	Inkubation	65 °C	5 min
<i>Random Hexamer</i> Primer	0,2 µg	Kühlung	4 °C	1 min
H ₂ O nukleasefrei	q.s.			
Gesamt	12,5 µl			
<i>5x Reaction Buffer</i>	4,0 µl	Primeranlagerung	25 °C	5 min
<i>RiboLock RNase</i> <i>Inhibitor</i>	0,5 µl	Reverse Transkription	42 °C	60 min
<i>dNTP Mix</i>	2,0 µl	Inaktivierung RT	70 °C	5 min
<i>RevertAid H Minus</i> RT	1,0 µl	Kühlung	4 °C	∞
Gesamt	20,0 µl			

Anhang 1H: RT-PCR nach *Secker et al.*^[117, 121]

Pipettierschema	Menge	Programm	Temperatur	Dauer
<i>Maxima SYBR</i>	10 µl	Initiale	95 °C	10 min
<i>Green Master Mix</i>		Denaturierung		
Vorwärtsprimer (2 µM)	3 µl	Denaturierung	95 °C	15 sec
Rückwärtsprimer (2 µM)	3 µl	Primeranlagerung	60 °C	1 min
cDNA	50 ng	→ Wiederholung		40 x
H ₂ O nukleasefrei	q.s.	Kühlung	12 °C	∞
Gesamt	20 µl			

Anhang 1l: Einstellung des LSRFortessa Gerätes modifiziert nach Secker et al.^[117, 121]

Laser	PMT	Splitter	BP Filter	Fluorochrome
violett 402 nm	A	Q735 LPXXR	ET 785/60	BV785
	B	Q685 LPXR	HC 711/25	BV711
	C	Q635 LPXR	HC 661/11	BV650
	D	Q555 LPXR	HC 605/15	BV605
	E	Q495 LPXR	ET 525/50	BV510, V500, Pacific Orange, Zombie Aqua, Amcyan
	F	-	ET 450/50	Pacific Blue, eFluor450, VioBlue, V450, BV421, DAPI
	G	-	ET 450/50	-
	H	-	-	-
blau 488 nm	A	Q635 LPXR	690/50	PerCP, PerCP/Cy5.5, BB667, PerCP/Vio700, PerCP/eFluor710
	B	Q495 LPXR	530/30	FITC, BB515, AF488, CFSE, GFP
	C	-	ZET 488/10S	SSC
gelb/grün 561 nm	A	750 DCXXR	ET 785/60	PE/Cy7, PE/Vio770, PE/AF750
	B	Q675LPXR	ET 700/40	PE/Cy5.5
	C	Q635LPXR	HC 661/11	PE/AF647, 7-AAD, PE/Cy5
	D	Q600 LPXR	HC 615/20	PE/Dazzle594, PE/eFluor610, PE/AF594, PE/TexasRed, PI, mCherry
	E	-	HC 586/15	PE
	G	-	-	-
	H	-	-	-
	A	750 DCXXR	HC 785/60	APC/Cy7, APC/AF750, APC/AF780, APC/eF780, ZombieNIR, APC/H7
rot 640 nm	B	Q695 LPXR	HC 725/40	AF700
	C	-	ET 670/30	APC, AF647, CF647, Cy5

Anhang 1J: Antikörper und Färbung modifiziert nach Secker et al.^[117, 121]

Antigen	Fluorochrom	Verdünnung
CD34	APC	1:50
CD38	PE/Cy7	1:50
CD15	BV605	1:50
CD64	APC/Cy7	1:50
CD14	AF700	1:50
CD9	PE	1:50
CD33	BV421	1:50
CD117	BV711	1:50
CD32	PE	1:50
CD24	BV650	1:50
CD20	BV421	1:50
CD19	APC	1:50
CD135	PerCP/Cy5.5	1:50
CD10	APC/Cy7	1:50
Viability Dye eFluor 506	äquivalent zu AmCyan	1:1000

Anhang 1K: May-Grünwald-Giemsa-Färbung modifiziert nach Secker et al.^[117, 121]

Arbeitsschritt	Reagenzien	Verdünnung	Inkubation
Fixierung	Methanol	-	10 min
Trocknung			10 min
Färbung	May-Grünwald	1:2	10 min
Färbung	Giemsa	1:10	20 min
Spülung	H ₂ O		
Entfärbung	Sörensen Puffer	-	3-4 min
Trocknung			über Nacht
Abdeckung	Euparal		über Nacht

Anhang 1L: RT-qPCR-Bedingungen für Zielgene nach Secker et al.^[117, 121]

Pipettierschema	Menge	Programm	Temperatur	Dauer
Maxima SYBR Green Master Mix	10 µl	Initiale Denaturierung	95 °C	10 min
Vorwärtsprimer (2 µM)	3 µl	Denaturierung	95 °C	14 sec
Rückwärtsprimer (2 µM)	3 µl	Primeranlagerung	60 °C	1 min
cDNA	50 ng	→ Wiederholung		45 x
H ₂ O nukleasefrei	q.s.	Kühlung	RT	∞
Gesamt	20 µl	Schmelzkurven- erstellung von 65 °C-95 °C	0,06 °C	/ 1 sec

Anhang 1M: RT-qPCR für die 18sRNA nach Secker et al.^[117, 121]

Pipettierschema	Menge	Programm	Temperatur	Dauer
<i>Maxima Probe qPCR Master Mix</i>	10 µl	Initiale Denaturierung	95 °C	10 min
Vorwärtsprimer (0,5 µM)	2 µl	Denaturierung	95 °C	14sec
Rückwärtsprimer (0,5 µM)	2 µl	Primeranlagerung	60 °C	1min
cDNA	50 ng	→ Wiederholung		45x
H ₂ O nukleasefrei	q.s.	Kühlung	RT	∞
18S rRNA Sonde (4 µM)	1 µl			
Gesamt	20 µl			

GCAGTATCAGAGGAAGTAATTCCTTCACATGGAAGTATCAAACCATGATGATTCCTTGAGTCAGCAA
 AACTGTAAGAGAAATTCAATCCCAGTGTATTTTCGCAATATATTCAATATGAATTGAACAACCTAGGTGA
 GCCTTTTAATAGTCCGTGTCTGAGATTAATACTTTTTAAAGCAGCAGTTATTTTTGGACTCATTGAAATG
 AAATACTCTGACATTGTGATGTCACACTAATTTTATGCTTTTCATCCTTATTTTCCATCCAAAGTTGTGT
 AATTGTAATACTTTCTT **AAGTGACCTTTCTCTCCACA**GGAGGATTGTGAAGCAGAAAATGTGTGGG
AGATGGGAGGCTTAGGAATCTTGACTTCTGTTCTATAACACCCAGGGTGGTTTGCTTTCTCTGTGCC
AGT**AGTGGGCATGTAGAG**GTAAGGCATCCTGCTTCTTTGTACCCAGGAAGTACATAAAATTATTTTC
 TGTGGATGAAATTACTATAGTCTGTTTTGTTGGTATTTAGCAGGTAATTCCTGTTTAAACCAGCTAA
 AGAAATGTTTTG **AAGTATTTTAGAGATTTT**AGGAAGGAATCTGCTATTAGAGTAGCAAAGTTATTGAGA
 GTGAAAAGATCAATAATCCCATCTCTCTAAATTCAGTCTTTATTAGAGTTCTGATCTTTCTGTTAGATG
 TCTAAATAAGAGAAAAAATTATACAGTGGTCTATTAAGGGGATGCTATTGATGGTTATTTTATATTGTA
 TATCAAAGCCT **CTTCATCTATAAGGAGCT**CTTACCAATTAATAAGAAAAAGGAATGACATCCAGAAAA
 AAAATAGGCAAAAGACAGAAATAGATAATTCACAAAATTAGAAAATAAATACATGTTGGGTGGCAGGGG
 GAGGTGAAGGGAGGGTGTCTGTTTTTTAGCCCTCTAGTGACCAAAAACCTGGAAATTAAGCATGATAA
 AAAAAGA **ATCCTGAATAAATGGGGACTTTCTGT**TGGTGGAAGAAATATAGATTAGTTACAATCTTTCT
 TTCTGAGGGAAT

Anhang 2A: Position der sgRNA Zielsequenzen im MLL-Gen. Dargestellt sind die Position der Primer (gelb hinterlegt) und der Zielsequenzen der sgRNA (rot). Das Exon wird hellblau hinterlegt dargestellt, das Intron schwarz.

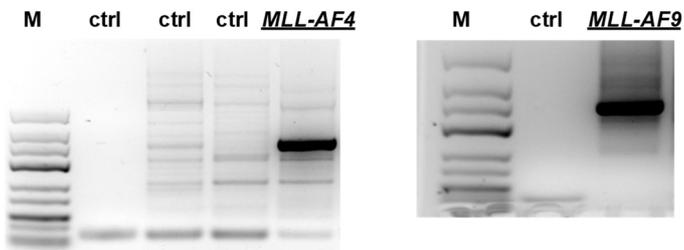
TCCAACCAGCAAACCTTTCCCGGACGCAAGGAAGCAGCAAGGTTTCATGGCAGCAGCAATAACAGTA
 AAGGCTATTGCCAGCCAAATCTCCCAAG **GACCTAGCAGTGAAAGTCCATGATAAA**GAGACCCCTCA
 AGACAGTTTGGTGGCCCTGCCAGCCGCTTCTCAGACATTTCCACCTCCCTCCCTCCCCTCAAAA
 AGTGTGCAATGCAGCAGAAGCCCACGGCTTATGTCCGGCCC **ATGGATGGTCAAGATCAG**GCCCT
 AGTGAATCCCCTGAACTGAAACCACTGCCG **GAGGACTATCGACAGCAG**ACCTTTGAAAAACAGACT
 TGAAAGTGCCTGCCAAAGCCAAGCTCACCAAACTGAAGA **TGCCTTCTCAGTCAGTTG**AGGTGTGTGG
 AATTTCTTATCTTGGGGAATTCGAATTCGAAGACGGATTTGAGATGAAAATGTCCGGAGGATGTGGGG
 CAAGGTGGGGAGGTTAGT **CCATGGCTTTTGGGTAGG**GGGAATCTTTTTGGCTTTAGGATCTTGTTAA
 TAACCCGCGAAAAACTCAGATCTGAGATGGACGACTGATTATAGATATTGAAATGCAGTTTGCAGAAA
 GGTTTAGAGAACCTTTTTATGGAGCCAAAATTTATATACAGTAAAACATAGAGATCATAAGAGTACAGT
 TTGTGTTTCAAAAAATAGATACACCTATAGGATCCAAAACCCAATC **AAGAGAGAGAAGATTT****CGGTTAC**
CAGAAAGTTTCAGGAAGGTTTTTCAGGTGTCTTATTTATTGTTTTGGGAGACACTGGGGTAACAATGTG
 AACACGAAAAAATTTTTTTGATTAATACCTCCTCAG

Anhang 2B: Position der sgRNA Zielsequenzen im AF4-Gen. Dargestellt sind die Position der Primer (gelb hinterlegt) und der Zielsequenzen der sgRNA (rot). Das Exon wird hellblau hinterlegt dargestellt, das Intron schwarz.

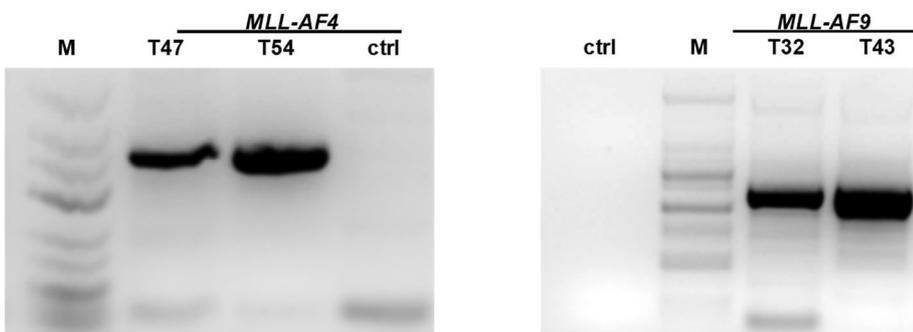
CACCAGTTGCATTAGCCTCTAAAAAGAGTGTCAGCCTATCCTTTGAACTTTGAAGCCAGGCCTTGAC
 TTCTCTCTAGCTATGAAAGCTCTAGATGGCATCTTGTTCCAGTAGAAGGCTGTTTCGTCTACATAGAAA
 ATTTGTGTAGTGTAGCCACCTTCATCAATGTTGTTAGCTAGATCTTCTGGATAACTTCCTGCAGCTTCT
 GTATCAGCTCTTGCTGCTTCAACTTGCACCTTTTATGTTACAGAGATGGCTTATTTCCCTAAACCTTATG
 AACCAACCTCTGCTAGCATCAAACCTTTTGTCTGCAGCTTCTCATCTCTCAGATTTTATAAAATTTAAA
 GAGAATTAGGGCTTTGCTCTTGATTAGGCTTTGGTTAAGGAAGTGTGTTGGCTGGTGTGATCTTATAT
 CCAGACCACTACAACCTTTCTCCATATCAGCAATAAGGCTGTTTTGCTTCCTTATCATTTCATGAGTTCAC
 TGGAGTAGCACTTTTAATTCCATTCAAGAACCTTTTCTTTGCATTCACTAACTTGGCTAAATATTTGGTGC
 AAGAGGCCTAGCATTGGCCTGTCACCTCTTGACATGCCTTTCTCACTAAGCCTAATCATTATAGCTT
 TGATTTAAAGTGAGAGATGTGTCTTGTTGGTGCAGTGGCTCACACTTGTAATCCCAGCAGTTGGGAGGCC
 AAGGCA

Anhang 2C: Position der sgRNA Zielsequenzen im AF9-Gen. Dargestellt sind die Position der Primer (gelb hinterlegt) und der Zielsequenzen der sgRNA (rot). Das Exon wird hellblau hinterlegt dargestellt, das Intron schwarz.

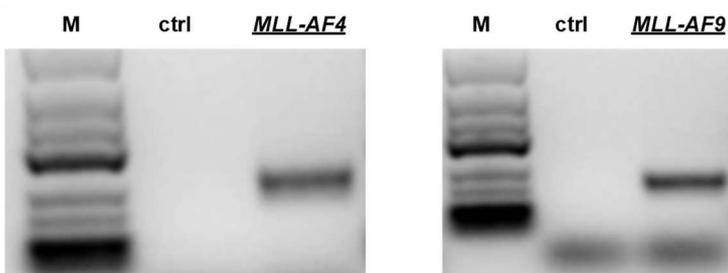
A



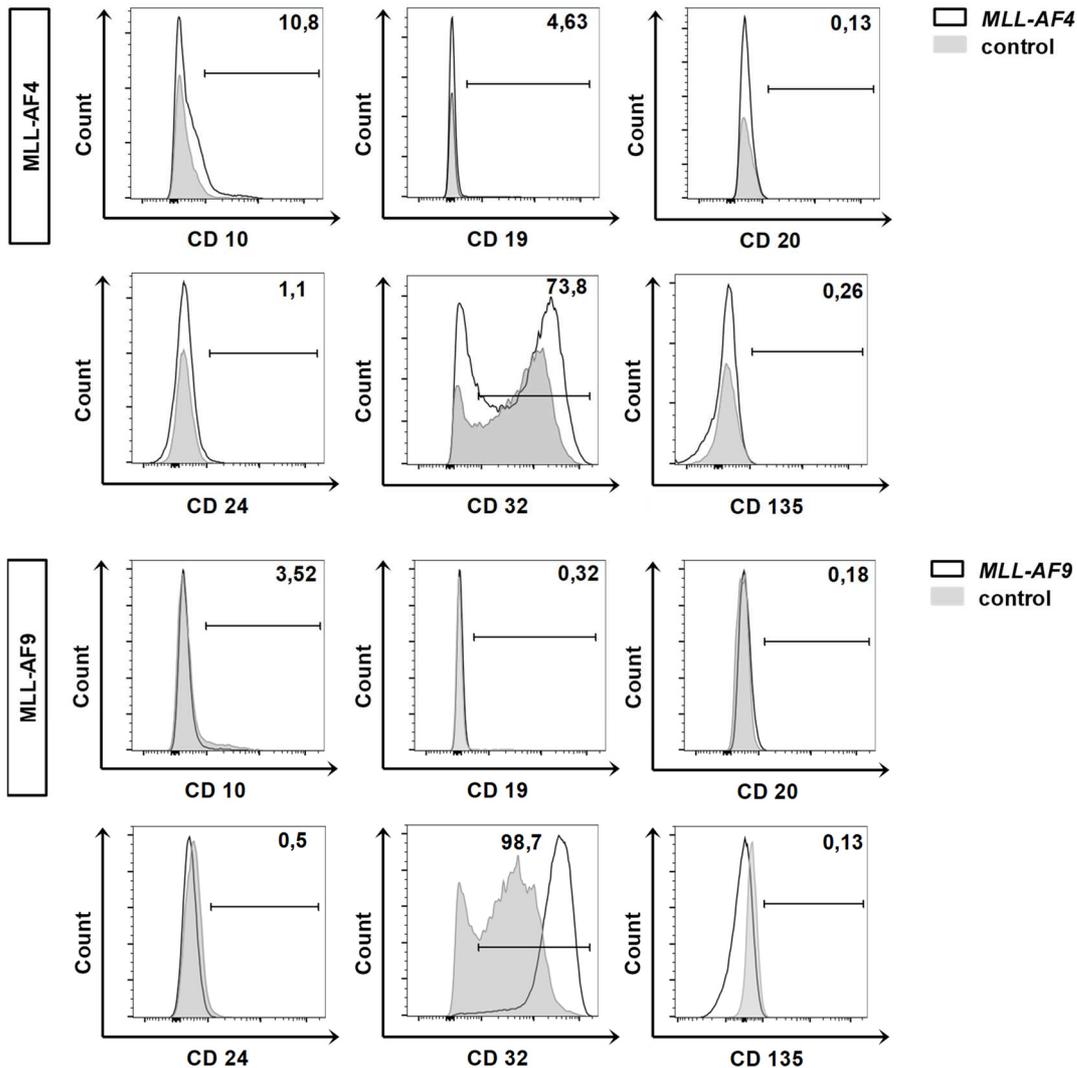
B



C



Anhang 3: Agarosebilder inklusive Kontrollen und Marker. Dargestellt sind die vollständigen Agarosebilder inklusive Kontrollen (ctrl) und Molekulargewichtsmarkern (M). **(A)** aus Abbildung 8, **(B)** aus Abbildung 9 und **(C)** aus Abbildung 12.



Anhang 4: Lymphatischer Phänotyp in der durchflusszytometrischen Untersuchung. Dargestellt sind exemplarisch die durchflusszytometrische Untersuchung zur Bestimmung des Immunphänotyps. Konturdiagramme der durchflusszytometrischen Analyse hinsichtlich eines lymphatischen Phänotyps mit Darstellung von CD10, CD19, CD20, CD23, CD24 und CD135. Translozierte Zellen (schwarze Linie) dargestellt verglichen mit Kontrollzellen, die nur mit dem Cas9-Protein behandelt wurden (grau schraffierte Fläche). Ein lymphatischer Immunphänotyp unter myeloischen Kulturbedingungen zeigte sich nicht.

11 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei PD Dr. Corina Schneidawind und Prof. Dr. Dominik Schneidawind bedanken für die erstklassige Betreuung über den gesamten Zeitraum meiner Promotion. Bei jeder Problemstellung, bei jedem Erfolg und Misserfolg konnte ich mich an sie wenden und mich auf Ihre Beratung, Hilfestellung und motivierenden Worte verlassen. Danke für die intensive Förderung, die diese Arbeit wie auch die Kongressbeiträge und die Veröffentlichung unseres gemeinsamen Papers möglich gemacht haben.

Ein großes Dankeschön gilt auch der AG Schneidawind für den kollegialen Austausch, die Unterstützung und den Spaß am gemeinsamen wissenschaftlichen Arbeiten. Insbesondere Kathy und Hilde möchte ich danken für Ihren Support bei jeder Fragestellung, die hervorragende Einarbeitung und herausragende Zusammenarbeit.

Ein weiterer Dank gilt alle Kooperationspartnern für die tolle Zusammenarbeit und den wissenschaftlichen Austausch. Für die Bioinformatischen Analysen möchte ich mich bei Johan Jeong, Ph.D., Dr. rer. nat. Thomas Hentrich und Professor Dr. rer. nat. Julia Schulze-Hentrich bedanken. Für die RNA-Sequenzierung möchte ich mich bei Prof. Dr. Olaf Rieß, Dr. Nicolas Casadei und dem NCCT bedanken. Mein Dank für die Erstellung der FISH-Analysen geht an Barbara Mankel, Prof. Dr. Falko Fend und dem Institut für Pathologie und Neuropathologie des Universitätsklinikums Tübingen. Für die Erstellung der Karyogramme und der RNA-Sequenzierung danke ich dem Institut für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik des Universitätsklinikums Tübingen. Für die Unterstützung bei den durchflusszystemetrischen Untersuchungen gilt mein Dank der FACS Core Facility. Weiterhin möchte ich mich für die Bereitstellung des Knochenmarks bei der Abteilung der Inneren Medizin II, Hämatologie und Onkologie des Universitätsklinikums Tübingen bedanken.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie und insbesondere meinen Eltern, die mir zu jeder Zeit den Rücken gestärkt haben und mit Rat und Tat zur Seite standen.

Und meiner Frau Lena. Danke für deine Geduld, deine uneingeschränkte Unterstützung und alles, was du für mich tust. Danke, dass du bei mir bist.