

# **Ein innovatives humanes *in vitro* CRISPR/Cas9- Modell zur Untersuchung *KMT2A*-rearrangierter Leukämien**

## **Dissertation**

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität Tübingen  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von  
Apothekerin, M.Sc. Kathy-Ann Secker  
aus Nürtingen

Tübingen  
2019



Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:

29.04.2020

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Peter Ruth

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Julia Skokowa



*Für meine Familie*



## Abstract

*KMT2A* rearrangements play a crucial role in leukemogenesis. They are associated with a poor prognosis and new treatment strategies are urgently needed. In the work for this thesis, the CRISPR/Cas9 system was used to generate an innovative leukemia model based on 100% pure *KMT2A*-rearranged (*KMT2Ar*) cells derived from umbilical cord blood with indefinite growth in cell culture systems. This model shared phenotypical, morphological and molecular features of patient leukemic cells faithfully mimicking the nature of the disease. Thus, it serves as ideal fundamental basis for pharmacological studies. The catalytic activity of disruptor of telomeric silencing 1-like histone methyltransferase (DOT1L) is critical for the transforming potential of *KMT2A* oncogenes and inhibition of DOT1L represents one specific therapeutic approach for *KMT2Ar* leukemias currently tested in clinical trials. However, the previous success was limited by restricted response. Recently, it has been shown that the inhibition of protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5) exhibits anti-tumoral activity against human cell lines *in vitro* and in *KMT2A* mouse models. Here, DOT1L and PRMT5 inhibitors were used alone or in combination in the human CRISPR/Cas9-*KMT2Ar* leukemia model demonstrating a dose-dependent reduced proliferation, impairment of cell cycle, increasing differentiation, apoptosis, downregulation of known *KMT2Ar* target genes and sensitization to chemotherapy. Strikingly, the combination of both compounds led to synergistic anti-tumor effects.

As described above, methyltransferases and epigenetic dysregulation play a pivotal role in *KMT2A* pathogenesis and the mechanistic understanding paves the avenue for the development of new targeted therapies. S-adenosylmethionine (SAM) is the universal methyl donor in human cells and is synthesized by methionine adenosyltransferase 2A (MAT2A). Here, the human CRISPR/Cas9-*KMT2Ar* leukemia model was used to evaluate the role of MAT2A in *KMT2A* leukemogenesis and as therapeutic target. *MAT2A* was found to be significantly overexpressed compared to healthy controls amenable to investigate the impact of MAT2A on leukemogenesis upon inhibition with the recently developed inhibitor PF-9366. By using non-*KMT2Ar* and *KMT2Ar* cell lines and the CRISPR/Cas9-*KMT2Ar* leukemia model, a dose-dependent reduced proliferation and viability, increased differentiation and apoptosis, impairment of cell cycle and downregulation of *KMT2Ar* target genes were detected. Interestingly, *KMT2Ar* cell lines showed an increased response compared to non-*KMT2Ar* cells confirming its specificity towards *KMT2Ar* leukemias. Regarding clinical translation, the combinational treatment of PF-9366 with chemotherapy or targeted therapies like DOT1L and PRMT5 inhibitors revealed even more pronounced effects.

In summary, the human CRISPR/Cas9-*KMT2Ar* leukemia model provides an experimental platform to test new therapies and this work provides a strong rationale for novel targeted combination therapies to improve the outcome of *KMT2Ar* leukemias.

*KMT2A*-Translokationen spielen eine wichtige Rolle bei der Leukämogenese. Sie sind mit einer schlechten Prognose verbunden und erfordern dringend neue Behandlungsstrategien. In der Arbeit für diese Dissertation wurde das CRISPR/Cas9-System verwendet, um ein innovatives Leukämiemodell zu generieren, das auf 100% reinen *KMT2A*-rearrangierten (*KMT2Ar*) Zellen aus Nabelschnurblut basiert, die ein unbestimmtes Wachstum in Zellkultursystemen zeigen. Dieses Modell teilte die phänotypischen, morphologischen und molekularen Merkmale von Patientenleukämiezellen, sodass die Krankheit realitätsgetreu nachgeahmt werden konnte. Somit dient es als ideale Plattform für pharmakologische Studien.

Die katalytische Aktivität der *disruptor of telomeric silencing 1-like histone methyltransferase* (DOT1L) ist entscheidend für das onkologische Potenzial und die Hemmung von DOT1L dient als ein spezifischer therapeutischer Ansatz für *KMT2Ar* Leukämien, der derzeit in klinischen Studien getestet wird. Der bisherige Erfolg war jedoch durch ein eingeschränktes Ansprechen begrenzt. Kürzlich wurde gezeigt, dass die Hemmung der *protein arginine methyltransferase 5* (PRMT5) eine antitumorale Aktivität gegenüber humanen Zelllinien *in vitro* und in *KMT2Ar* Mausmodellen zeigt. In dieser Arbeit wurden DOT1L- und PRMT5-Inhibitoren allein oder in Kombination im humanen *KMT2A*-CRISPR/Cas9-Translokationsmodell verwendet, wobei sich eine dosisabhängige verringerte Proliferation, eine Beeinträchtigung des Zellzyklus, zunehmende Differenzierung und Apoptose, eine Herunterregulation bekannter *KMT2Ar* Zielgene und eine Sensibilisierung gegenüber einer Chemotherapie zeigten. Bemerkenswerterweise führte die Kombination beider Inhibitoren zu synergistischen Effekten.

Wie oben bereits beschrieben, spielen Methyltransferasen und epigenetische Dysregulationen eine zentrale Rolle bei der *KMT2Ar* Pathogenese. Ein besseres Verständnis mechanistischer Abläufe ermöglicht die Entwicklung neuer zielgerichteter Therapien. S-Adenosylmethionin (SAM) ist der universelle Methyl donor in menschlichen Zellen und wird durch die Methioninadenosyltransferase 2A (MAT2A) synthetisiert. Hier wurde das humane *KMT2A*-CRISPR/Cas9-Translokationsmodell verwendet, um die Rolle von MAT2A bei der *KMT2A*-Leukämogenese und deren Eignung als therapeutische Zielstruktur zu bewerten. Es wurde festgestellt, dass MAT2A im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant überexprimiert ist, sodass der Einfluss von MAT2A auf die Leukämogenese durch den Einsatz eines erst kürzlich entwickelten Inhibitors PF-9366 untersucht werden konnte. Unter Verwendung von nicht-*KMT2Ar* und *KMT2Ar* Zelllinien sowie des *KMT2A*-CRISPR/Cas9-Translokationsmodells wurden eine dosisabhängige verringerte Proliferation, erhöhte Differenzierung und Apoptose, eine Beeinträchtigung des Zellzyklus und eine Herunterregulation bekannter *KMT2Ar*-Zielgene nachgewiesen. Interessanterweise zeigten *KMT2Ar* Zelllinien ein erhöhtes Ansprechen im Vergleich zu nicht-*KMT2Ar* Zellen, sodass die Spezifität gegenüber *KMT2Ar* Leukämien bestätigt wurde. In Bezug auf die klinische Translation zeigte die kombinierte Behandlung mit PF-9366 und Chemotherapie oder gezielten Therapien wie DOT1L- und PRMT5-Inhibitoren gesteigerte Effekte.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das humane *KMT2A*-CRISPR/Cas9-Translokationsmodell eine experimentelle Plattform für die Testung innovativer Therapien bietet. Diese Arbeit liefert überzeugende Erkenntnisse für neuartige gezielte Kombinationstherapien, um die Prognose von *KMT2A*r Leukämien zu verbessern.

## Inhaltsverzeichnis

Abstract.....	I
Inhaltsverzeichnis .....	IV
Abbildungsverzeichnis .....	VIII
Tabellenverzeichnis .....	X
Abkürzungsverzeichnis.....	XI
1 Einleitung .....	1
1.1 Akute Leukämieformen.....	1
1.1.1 Epidemiologie und klinisches Krankheitsbild.....	1
1.1.2 Klassifizierung der akuten Leukämie laut Welt-Gesundheits-Organisation (WHO) .....	2
1.1.3 Therapieformen und Prognose nach Leitlinie.....	4
1.2 Mutationen des <i>KMT2A</i> -Gens .....	7
1.2.1 Physiologische Bedeutung der Lysin-Methyltransferase 2A .....	7
1.2.2 Pathophysiologische Folgen des <i>KMT2A</i> -Onkogens auf Proteinebene .....	9
1.2.3 Pathophysiologische Folgen des <i>KMT2A</i> -Onkogens auf Komplexbildung und nachfolgende Signalwege .....	10
1.2.4 Beschreibung der häufigsten Translokationspartner <i>KMT2A</i> -rearrangierter Leukämien.....	13
1.3 Modelle zur Identifizierung und Inhibition neuer Zielstrukturen in <i>KMT2A</i> -rearrangierten Leukämien .....	16
1.3.1 <i>in vitro</i> Modelle.....	16
1.3.2 <i>in vivo</i> Modelle .....	17
1.3.3 Zukunftsorientierte Optimierungen der bisher verwendeten Modellsysteme .....	18
1.4 CRISPR/Cas9-System.....	20
1.4.1 Ursprung des CRISPR/Cas9-Systems .....	20
1.4.2 Anpassungen für die Verwendung des CRISPR/Cas9-Systems zur Genom-editierung <i>in vitro</i> .....	22
1.4.3 Möglichkeiten der genetischen Veränderung von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen.....	24
1.5 Ziele der Arbeit .....	25
2 Material .....	27
2.1 Bakterienstämme, Zelllinien und Primärzellen .....	27
2.2 Software.....	27
2.3 Geräte .....	28
2.4 Verbrauchsmaterial.....	29
2.5 Chemikalien, verbrauchsfertige Reagenzien und Kitsysteme .....	30
2.6 Rezepturen für Puffer und Medien .....	33
2.7 Plasmide .....	35
2.8 Primer .....	35

2.9 Antikörper und Viabilitätsfarbstoffe .....	36
3 Methoden.....	37
3.1 Gewinnung von Primärzellen .....	37
3.1.1 Isolation von Blut aus der Nabelschnur.....	37
3.1.2 Isolation mononukleärer Zellen aus Nabelschnurblut .....	37
3.1.3 Isolation hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut .....	38
3.2 Entwicklung des CRISPR/Cas9-Systems .....	39
3.2.1 Identifizierung von patientenüblichen Schnittstellen .....	39
3.2.2 Design von sgRNAs .....	39
3.2.3 Produktion der sgRNAs <i>in vitro</i> .....	39
3.2.4 Funktionelle Testung der sgRNAs <i>in vitro</i> .....	41
3.2.5 Elektroporation von Zelllinien .....	42
3.2.6 Funktionelle Testung der sgRNAs in Zelllinien mittels T7-Endonuklease-I-Assay .....	42
3.3 Generierung <i>KMT2A</i> -rearrangierter Zellen mittels des CRISPR/Cas9-Systems.....	44
3.3.1 Elektroporation von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut	44
3.3.2 Funktionelle Testung der sgRNAs in hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut mittels T7-Endonuklease-I-Assay .....	44
3.3.3 Translokationsinduktion in CD34 <sup>+</sup> Stamm- und Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut .....	45
3.3.4 Zellkultur <i>KMT2A</i> -rearrangierter Zellen.....	45
3.4 Identifikation der <i>KMT2A</i> -Translokation mittels DNA-Analytik.....	46
3.4.1 Polymerase-Ketten-Reaktion und Sanger-Sequenzierung .....	46
3.4.2 Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung.....	47
3.4.3 Chromosomenanalyse und Karyotypisierung .....	48
3.5 Charakterisierung <i>KMT2A</i> -rearrangierter Zellen mittels hämatologischer Diagnostik .....	49
3.5.1 May-Grünwald-Giemsa-Färbung.....	49
3.5.2 Colony-Forming-Unit-Assay .....	49
3.5.3 Durchflusszytometrie.....	50
3.6 Charakterisierung <i>KMT2A</i> -rearrangierter Zellen mittels RNA-Analytik.....	52
3.6.1 RNA-Isolation .....	52
3.6.2 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion .....	52
3.6.3 RNA-Sequenzierung .....	53
3.6.4 <i>Gene-set-enrichment</i> -Analyse.....	54
3.6.5 Quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion.....	54
3.7 Identifikation und Validierung von Zielstrukturen .....	56
3.7.1 RNA-Sequenzierung und RT-qPCR.....	56
3.7.2 Proteinextraktion .....	56
3.7.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot.....	56

## Inhaltsverzeichnis

---

3.8 <i>in vitro</i> Inhibitortestung.....	57
3.8.1 Versuchsaufbau.....	57
3.8.2 Viabilitätsanalyse.....	58
3.8.3 Proliferationsuntersuchung.....	58
3.8.4 Apoptoseanalyse.....	59
3.8.5 Zellzyklusanalyse.....	60
3.8.6 Differenzierungsanalyse.....	61
3.9 Statistik.....	62
3.9.1 Darstellung zusammengefasster Daten.....	62
3.9.2 Statistische Testverfahren.....	62
3.9.3 Synergieberechnung.....	62
4 Ergebnisse.....	64
4.1 Etablierung des humanen <i>KMT2A</i> -CRISPR/Cas9-Systems.....	64
4.1.1 Etablierung von sgRNAs für <i>KMT2A</i> , <i>AFF1</i> und <i>MLLT3</i> in hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut.....	64
4.1.2 Translokationsinduktion in hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut.....	65
4.1.3 Nachweis der reinen, polyklonalen Populationen <i>KMT2A</i> -rearrangierter Zellen.....	66
4.2 Charakterisierung <i>KMT2A</i> -rearrangierter Zellen.....	68
4.2.1 Proliferationsverhalten und Fähigkeit zur Selbsterneuerung <i>KMT2A</i> -rearrangierter Zellen.....	68
4.2.2 Blastenartige Morphologie <i>KMT2A</i> -rearrangierter Zellen.....	69
4.2.3 Phänotypische Charakterisierung <i>KMT2A</i> -rearrangierter Zellen mittels Durchflusszytometrie.....	70
4.2.4 Authentizität <i>KMT2A</i> -rearrangierter Zellen als patientenähnliches <i>in vitro</i> Modell.....	72
4.3 <i>KMT2A</i> -rearrangierte Zellen zur Validierung von PRMT5 als Zielstruktur.....	75
4.3.1 Erhöhte PRMT5-Expression in <i>KMT2A</i> -rearrangierten Zellen.....	75
4.3.2 Titration spezifischer Inhibitoren für DOT1L und PRMT5 in <i>KMT2A</i> -rearrangierten Zellen.....	76
4.4 <i>KMT2A</i> -rearrangierte Zellen als <i>in vitro</i> Modell zur kombinierten DOT1L- und PRMT5-Inhibition als mögliche zielgerichtete Therapie.....	79
4.4.1 Nachweis eines synergistischen Effekts der Inhibition beider Zielstrukturen mittels Dosis-Wirksamkeits-Kurven.....	79
4.4.2 Reduzierte Proliferation <i>KMT2A</i> -rearrangierter Zellen durch Einzelbehandlungen und gesteigerter Effekt durch eine Kombinationsbehandlung mit DOT1L- und PRMT5-Inhibitoren....	80
4.4.3 Beeinträchtigung des Zellzyklus der <i>KMT2A</i> -rearrangierten Zellen in der DNA-Synthese-Phase durch DOT1L- und PRMT5-Inhibitoren.....	82
4.4.4 Induzierte Differenzierung <i>KMT2A</i> -rearrangierter Zellen durch eine Einzelbehandlung mit DOT1L-Inhibitor und nach Kombinationsbehandlung.....	83
4.4.5 Induzierte Apoptose <i>KMT2A</i> -rearrangierter Zellen durch Einzelbehandlung und gesteigerter Effekt durch Kombinationsbehandlung.....	86
4.4.6 Kombination mit Chemotherapie als Möglichkeit für die klinische Anwendung.....	87

4.5 <i>KMT2A</i> -rearrangierte Zellen zur Identifikation von MAT2A als Zielstruktur .....	90
4.5.1 Erhöhte <i>MAT2A</i> -Expression in <i>KMT2A</i> -rearrangierten Zellen .....	90
4.5.2 Erhöhte Expression von <i>MAT2A</i> in publizierten <i>KMT2A</i> -rearrangierten Patientendaten ....	91
4.6 <i>KMT2A</i> -rearrangierte Zellen als <i>in vitro</i> Modell zur MAT2A-Inhibition als mögliche zielgerichtete Therapie .....	93
4.6.1 Titration eines innovativen, spezifischen Inhibitors für MAT2A in <i>KMT2A</i> -rearrangierten Zellen.....	93
4.6.2 Reduzierte Proliferation und Viabilität durch MAT2A-Inhibition in <i>KMT2A</i> -rearrangierten Zellen.....	94
4.6.3 Beeinträchtigung des Zellzyklus der <i>KMT2A</i> -rearrangierten Zellen in der DNA-Synthese-Phase .....	96
4.6.4 Induzierte Apoptose durch MAT2A-Inhibition in <i>KMT2A</i> -rearrangierten Zellen.....	97
4.6.5 Induzierte Differenzierung durch MAT2A-Inhibition in <i>KMT2A</i> -rearrangierten Zellen.....	98
4.6.6 Einfluss der MAT2A-Inhibition auf nachfolgende Signalwege .....	101
4.7 Validierung von MAT2A als mögliche Zielstruktur in <i>KMT2A</i> -rearrangierten Zelllinien .....	104
4.7.1 Unterschiede in Proliferation und Viabilität nach MAT2A-Inhibition in nicht- <i>KMT2A</i> - und <i>KMT2A</i> -rearrangierten Zelllinien .....	104
4.7.2 Beeinträchtigung des Zellzyklus der <i>KMT2A</i> -rearrangierten Zelllinien in der DNA-Synthese-Phase .....	106
4.7.3 Induzierte Apoptose durch MAT2A-Inhibition in <i>KMT2A</i> -rearrangierten Zelllinien .....	108
4.8 Mögliche Kombinationsstrategien zielgerichteter Therapien für die klinische Anwendung .....	110
4.8.1 MAT2A-Inhibition in Kombination mit Chemotherapie .....	110
4.8.2 MAT2A-Inhibition zur Steigerung der zielgerichteten Therapie mittels DOT1L-Inhibitor ...	112
4.8.3 Kombinationsstrategie innovativer zielgerichteter Therapien mit PRMT5- und MAT2A-Inhibitoren.....	114
5 Diskussion .....	117
5.1 Etablierung des humanen <i>KMT2A</i> -CRISPR/Cas9-Systems.....	117
5.2 Charakterisierung <i>KMT2A</i> -rearrangierter Zellen .....	119
5.3 <i>KMT2A</i> -rearrangierte Zellen zur Validierung von PRMT5 als Zielstruktur .....	121
5.4 <i>KMT2A</i> -rearrangierte Zellen zur Identifikation von MAT2A als Zielstruktur .....	123
6 Zusammenfassung und Ausblick .....	127
7 Anhang .....	130
8 Literaturverzeichnis .....	144
9 Publikationen und Kongressbeiträge .....	166
9.1 Publikationen.....	166
9.2 Kongressbeiträge .....	167
10 Lebenslauf.....	168
11 Danksagung .....	169

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vereinfachtes Modell der humanen Hämatopoese. ....	1
Abbildung 2: Aufbau, Komplexbildung und Funktion der Lysin-Methyltransferase 2A. ....	7
Abbildung 3: Schematischer Aufbau der PHD, ihre Sub- und angrenzende Domänen. ....	8
Abbildung 4: Schematischer Aufbau der PHD mit <i>breakpoint cluster region</i> (BCR). ....	9
Abbildung 5: MLL-X- und X-MLL-Fusionsproteine mit verbleibenden Interaktionspartnern. ....	10
Abbildung 6: Veränderung der MLL-X- und X-MLL-Fusionsproteine in Bezug auf Komplexbildung und nachfolgende Signalwege. ....	11
Abbildung 7: S-Adenosylmethionin-Zyklus. ....	13
Abbildung 8: Verteilung der häufigsten Translokationspartner <i>KMT2A</i> -rearrangierter Leukämien. ....	14
Abbildung 9: Zusammenfassung bisher verwendeter Modellsysteme. ....	19
Abbildung 10: Das CRISPR/Cas9-System als prokaryotisches Immunsystem. ....	20
Abbildung 11: Schematische Abbildung des Cas9-Proteins. ....	21
Abbildung 12: Das prokaryotische CRISPR/Cas9-Immunsystem gegenüber der Anpassungen für <i>in vitro</i> Anwendungen. ....	22
Abbildung 13: Schematische Abbildung der sgRNA. ....	23
Abbildung 14: <i>Genome editing</i> durch Reparatur von DSB. ....	24
Abbildung 15: Schematischer Überblick der Zielsetzung. ....	26
Abbildung 16: Schematische Abbildung der Dichtegradientenzentrifugation. ....	37
Abbildung 17: Kontrolle der Reinheit CD34 <sup>+</sup> Zellen nach magnetischer Zellseparation. ....	38
Abbildung 18: Vereinfachte Übersicht der sgRNA-Produktion <i>in vitro</i> . ....	40
Abbildung 19: Beispiel einer FISH anhand von kulturexpandierten CD34 <sup>+</sup> Zellen mit intaktem <i>KMT2A</i> -Gen. ....	47
Abbildung 20: <i>Counting beads</i> im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht. ....	59
Abbildung 21: Analysestrategie zur Differenzierung apoptotischer Zellen. ....	59
Abbildung 22: Analysestrategie zur Bestimmung des Zellzyklus. ....	61
Abbildung 23: Berechnung des Kombinationsindex. ....	63
Abbildung 24: Etablierung von sgRNAs für <i>KMT2A</i> , <i>AFF1</i> und <i>MLLT3</i> . ....	65
Abbildung 25: Translokationsinduktion in hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut. ....	65
Abbildung 26: Nachweis der reinen, polyklonalen Populationen <i>KMT2A</i> -rearrangierter Zellen. ....	67
Abbildung 27: Proliferationsverhalten und Fähigkeit zur Selbsterneuerung <i>KMT2A</i> -rearrangierter Zellen. ....	68
Abbildung 28: Blastenartige Morphologie <i>KMT2A</i> -rearrangierter Zellen. ....	69
Abbildung 29: Phänotypische Charakterisierung <i>KMT2A</i> -rearrangierter Zellen mittels Durchflusszytometrie. ....	71
Abbildung 30: <i>KMT2A</i> -rearrangierte Zellen als patientenähnliches <i>in vitro</i> Modell. ....	73
Abbildung 31: Erhöhte <i>PRMT5</i> -Expression in <i>KMT2A</i> -rearrangierten Zellen. ....	76
Abbildung 32: Titration spezifischer Inhibitoren für DOT1L und PRMT5 in <i>KMT2A</i> -rearrangierten Zellen. ....	78
Abbildung 33: Synergistischer Effekt der Inhibition von DOT1L und PRMT5. ....	79

Abbildung 34: Reduzierte Proliferation <i>KMT2A</i> -rearrangierter Zellen durch Einzelbehandlung mit DOT1L- und PRMT5-Inhibitoren und gesteigerter Effekt durch Kombinationsbehandlung. ....	81
Abbildung 35: Beeinträchtigung des Zellzyklus der <i>KMT2A</i> -rearrangierten Zellen in der DNA-Synthese-Phase durch DOT1L- und PRMT5-Inhibitoren.....	82
Abbildung 36: Induzierte Differenzierung <i>KMT2A</i> -rearrangierter Zellen durch Einzelbehandlung mit DOT1L-Inhibitor und nach Kombinationsbehandlung. ....	85
Abbildung 37: Induzierte Apoptose <i>KMT2A</i> -rearrangierter Zellen durch Einzelbehandlung und gesteigerter Effekt durch Kombinationsbehandlung. ....	86
Abbildung 38: Die Behandlung mit DOT1L- und PRMT5-Inhibitoren sensibilisiert <i>KMT2A</i> -rearrangierte Zellen für Chemotherapie. ....	89
Abbildung 39: Erhöhte <i>MAT2A</i> -Expression in <i>KMT2A</i> -rearrangierten Zellen.....	91
Abbildung 40: Erhöhte Expression von <i>MAT2A</i> in publizierten <i>KMT2A</i> -rearrangierten Patientendaten. ....	92
Abbildung 41: Titration eines innovativen, spezifischen Inhibitors für <i>MAT2A</i> in <i>KMT2A</i> -rearrangierten Zellen.....	93
Abbildung 42: Reduzierte Proliferation und Viabilität durch <i>MAT2A</i> -Inhibition in <i>KMT2A</i> -rearrangierten Zellen.....	95
Abbildung 43: Beeinträchtigung des Zellzyklus der <i>KMT2A</i> -rearrangierten Zellen in der DNA-Synthese-Phase durch <i>MAT2A</i> -Inhibition. ....	96
Abbildung 44: Induzierte Apoptose durch <i>MAT2A</i> -Inhibition in <i>KMT2A</i> -rearrangierten Zellen.....	98
Abbildung 45: Induzierte Differenzierung durch <i>MAT2A</i> -Inhibition in <i>KMT2A</i> -rearrangierten Zellen. ..	99
Abbildung 46: Differentielle Expression nach <i>MAT2A</i> -Inhibition in <i>t(4;11)</i> -rearrangierten Zellen.....	103
Abbildung 47: Unterschiede in Proliferation und Viabilität nach <i>MAT2A</i> -Inhibition in nicht- <i>KMT2A</i> - und <i>KMT2A</i> -rearrangierten Zelllinien. ....	105
Abbildung 48: Beeinträchtigung des Zellzyklus der <i>KMT2A</i> -rearrangierten Zelllinien in der DNA-Synthese-Phase. ....	107
Abbildung 49: Induzierte Apoptose durch <i>MAT2A</i> -Inhibition in <i>KMT2A</i> -rearrangierten Zelllinien. ....	108
Abbildung 50: <i>MAT2A</i> -Inhibition in Kombination mit Chemotherapie. ....	111
Abbildung 51: <i>MAT2A</i> -Inhibition zur Steigerung der zielgerichteten Therapie mittels DOT1L-Inhibitor.....	113
Abbildung 52: Kombinationsstrategie innovativer zielgerichteter Therapien mit PRMT5- und <i>MAT2A</i> -Inhibitoren. ....	115
Abbildung 53: Denkbare <i>feedforward</i> -Regulation in <i>KMT2A</i> -rearrangierten Zellen im Hinblick auf <i>MAT2A</i> .....	125
Abbildung 54: Schematische Zusammenfassung. ....	128
Abbildung 55: Schematische Darstellung einer möglichen Erweiterung des CRISPR/Cas-9-basierten Leukämiemodells.....	129

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: WHO-Klassifikation der AML .....	3
Tabelle 2: WHO-Klassifikation der ALL .....	3
Tabelle 3: FAB-Klassifikation.....	4
Tabelle 4: Prognose der adulten AML nach ELN .....	4
Tabelle 5: Prognose der adulten ALL nach GMALL.....	5
Tabelle 6: Prognose der pädiatrischen AML nach GPOH.....	5
Tabelle 7: Prognose der pädiatrischen ALL nach GPOH.....	6
Tabelle 8: Bakterienstämme, Zelllinien und Primärzellen .....	27
Tabelle 9: Software.....	27
Tabelle 10: Geräte .....	28
Tabelle 11: Verbrauchsmaterial.....	29
Tabelle 12: Chemikalien, verbrauchsfertige Reagenzien und Kitsysteme .....	30
Tabelle 13: Rezepturen für Puffer und Medien .....	33
Tabelle 14: Plasmide .....	35
Tabelle 15: Primersequenzen für die sgRNA-Produktion.....	35
Tabelle 16: Analyseprimer für <i>KMT2A (MLL)</i> , <i>AFF1 (AF4)</i> und <i>MLLT3 (AF9)</i> .....	35
Tabelle 17: Primer für die Identifikation der reziproken Translokationen .....	35
Tabelle 18: Primer für die Identifikation der Translokationen auf cDNA-Ebene per RT-PCR.....	35
Tabelle 19: Primer für die RT-qPCR der entsprechenden Zielgene .....	36
Tabelle 20: Antikörper und Viabilitätsfarbstoffe .....	36
Tabelle 21: PCR-Bedingungen für die sgRNA-Produktion.....	40
Tabelle 22: Inkubationsbedingungen für die <i>in vitro</i> Transkription.....	40
Tabelle 23: PCR-Bedingungen für <i>AccuPrime Pfx DNA Polymerase</i> .....	41
Tabelle 24: <i>In vitro cleavage assay</i> .....	41
Tabelle 25: PCR-Bedingungen für <i>AccuPrime Pfx DNA Polymerase</i> .....	43
Tabelle 26: Hybridisierungsansatz für T7-Endonuklease-I-Assay .....	43
Tabelle 27: T7-Endonuklease-I-Assay .....	43
Tabelle 28: PCR-Bedingungen für <i>AccuPrime Pfx DNA Polymerase</i> .....	46
Tabelle 29: Pipettierschema der Färbeschritte für die Durchflusszytometrie für eine Probe .....	50
Tabelle 30: Konfiguration <i>LSRFortessa</i> .....	51
Tabelle 31: Färbung für die phänotypische Charakterisierung <i>KMT2A</i> -rearrangierter Zellen I .....	51
Tabelle 32: Färbung für die phänotypische Charakterisierung <i>KMT2A</i> -rearrangierter Zellen II .....	51
Tabelle 33: Erststrang-cDNA-Synthese.....	52
Tabelle 34: RT-PCR-Bedingungen.....	52
Tabelle 35: Erststrang-cDNA-Synthese.....	54
Tabelle 36: RT-qPCR-Bedingungen.....	55
Tabelle 37: RT-qPCR-Bedingungen für das Referenzgen .....	55
Tabelle 38: Übersicht der Inhibitoren in <i>KMT2A</i> -rearrangierten und Kontrollzellen .....	57
Tabelle 39: Zelllinien für die Inhibitorrestung.....	58
Tabelle 40: Pipettierschema der Färbung zur Apoptoseanalyse für eine Probe .....	60

## Abkürzungsverzeichnis

-	fehlend
+	zusätzlich oder positiv
5-MTHF	5-Methyltetrahydrofolat
7-AAD	7-Aminoactinomycin
A	<i>area</i> , Fläche
a	alternativ
AAV	<i>adeno-associated virus</i> , Adeno-assoziiertes Virus
ABCA1	<i>ATP binding cassette subfamily A member 1</i>
ABCG1	<i>ATP binding cassette subfamily G member 1</i>
<i>abln</i>	Abnormalität
<i>add</i>	Addition
AF	<i>AlexaFluor</i>
AFF1	<i>AF4/FMR2 family member 1</i> , AF4
ALL	akute lymphatische Leukämie
allo-SZT	allogenen Stammzelltransplantation
AML	akute myeloische Leukämie
APC	Allophycocyanin
APL	akute Promyelozyten-Leukämie
APOL2	Apolipoprotein L2
APS	Ammoniumpersulphat
Ara-C	Cytarabin
ASH2L	<i>Set1/Ash2 histone methyltransferase complex subunit ASH2</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BB	<i>BrilliantBlue</i>
BCR	<i>breakpoint cluster region</i>
BD	Bromodomäne
BH	Benjamini-Hochberg
bp	Basenpaare
BP	Bandpass
BrdU	Bromodesoxyuridin
BSA	bovines Serumalbumin
BV	<i>BrilliantViolet</i>
c	<i>complementary</i> , komplementär
Cas	CRISPR-assoziiertes Protein
Cas9	CRISPR-assoziierte Endonuklease 9
CBMC	<i>cord blood mononuclear cell</i>
CBX5	Chromobox 5
CBX8	Polycomb 3
CD	<i>cluster of differentiation</i>

## Abkürzungsverzeichnis

---

CDK1	<i>cyclin-dependent kinase 1</i>
CDKN1A	<i>cyclin dependent kinase inhibitor 1</i> , cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor 1, p21
CF	Cyanine-basierter Fluoreszenzfarbstoff
CFSE	Carboxyfluoresceindiacetatsuccinimidylester
CFU	<i>colony forming unit</i> , Kolonie-bildende Einheit
CI	<i>combination index</i> , Kombinationsindex
CLP	<i>common lymphoid progenitor</i> , gemeinsamer lymphoider Vorläufer
CMP	<i>common myeloid progenitor</i> , gemeinsamer myeloider Vorläufer
Cq	<i>quantification cycle</i>
CR	<i>complete remission</i> , komplette Remission
CREBBP	<i>CREB-binding protein</i>
CREBP	<i>cAMP response element-binding protein</i>
CRISPR	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
CtBP	<i>C-terminal-binding protein complex</i>
ctrl	<i>control</i> , Kontrolle
CXCR4	<i>C-X-C motif chemokine receptor 4</i>
Cy	Cyanin
CYP33	Cyclophilin-33
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DC	<i>dendritic cell</i> , dendritische Zelle
DEG	differentiell exprimiertes Gen
<i>del</i>	Deletion
<i>der</i>	Derivat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DOC	Natriumdesoxycholat
DOT1L	<i>disruptor of telomeric silencing 1-like</i> , Histon-Lysin-Methyltransferase
DOT1Li	DOT1L-Inhibitor
ds	<i>double stranded</i> , doppelsträngig
DSB	Doppelstrangbruch
E2F1	Transkriptionsfaktor E2F1
ECSASB2	<i>Elongin B/C-Cullin–SOCS box protein</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i> , epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
EGIL	<i>European Group for the Immunological Characterization of Leukemias</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELAC2/HPC2	<i>zinc phosphodiesterase ELAC protein 2</i>
ELN	<i>European LeukemiaNet</i>
EP	Erythrozyten-Progenitor
ESB	Einzelstrangbrüche
FAB	<i>French-American-British</i>

---

FBS	<i>fetal bovine serum</i> , fetales Kälberserum
FcR	Fc Rezeptor
FDR	<i>false discovery rate</i>
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> , vorwärts
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
G-CSF	<i>granulocyte-colony stimulating factor</i> , Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GEO	<i>NCBI's Gene Expression Omnibus</i>
GFOD1	<i>glucose-fructose oxidoreductase domain containing 1</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i> , grün fluoreszierendes Protein
GMALL	<i>German Multicenter Study Group for Adult Acute Lymphoblastic Leukemia</i>
GMP	Granulozyten-Makrophagen-Progenitor
GP	Granulozyten-Progenitor
GPOH	Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie
gRNA	<i>guide RNA</i>
GSEA	<i>gene-set-enrichment</i> -Analyse
H	Histon, Hilite oder <i>hight</i> , Höhe
HDAC1-2	Histon-Deacetylase 1-2
HDR	<i>homology-directed repair</i> , Homologie-gerichtete Reparatur
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HLA	humanes Leukozyten-Antigen
HMGB3	<i>high mobility group box 3</i>
HOX	<i>homeobox</i> , Homöobox
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> , Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HSC	<i>hematopoietic stem cell</i> , hämatopoetische Stammzelle
HSPC	<i>hematopoietic stem and progenitor cell</i> , hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzelle
hu	human
huCB	<i>human cord blood</i> , humanes Nabelschnurblut
<i>i</i>	Isochromosom
IC <sub>50</sub>	<i>inhibitory concentration</i> , inhibitorische Konzentration bei 50 % des maximalen Effekts
ICD	<i>international classification of diseases</i> , Internationale Klassifikation der Krankheiten, Version 10
IL	Interleukin
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
<i>indel</i>	<i>insertion and deletion</i> , Einbau und Deletion
<i>inv</i>	Inversion
ITD	<i>internal tandem duplication</i> , interne Tandemduplikation
K	Lysin
KAT5, MOF	Lysin-Acetyltransferase 5

## Abkürzungsverzeichnis

---

KMT2A	Lysin-Methyltransferase 2A
<i>KMT2A-r</i>	<i>KMT2A-rearrangiert</i>
komb.	Kombinationsbehandlung
kRas	<i>kirsten rat sarcoma virus</i>
LAMP5	<i>lysosomal associated membrane protein family member 5</i>
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LEDGF	<i>PC4 and SFRS1-interacting protein</i>
M	Methylierung oder Molekulargewichtsmarker
MACS	<i>magnetic activated cell sorting</i> , magnetische Zellseparation
MALAT1	<i>metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1</i>
<i>mar</i>	Markerchromosom
MAT	Methioninadenosyltransferase
MAT2A	Methioninadenosyltransferase 2A
MAT2Ai	MAT2A-Inhibitor
MBD	Methyl-DNA-bindende Domäne
MD	<i>matched donor</i> , gut passender verwandter oder unverwandter Spender
MDM2	MDM2 Protoonkogen
MEIS1	<i>homeobox protein Meis1</i>
MEP	Megakaryozyten-Erythrozyten-Progenitor
MK	Megakaryozyt
MLL, MLL1	Myeloisches / Lymphoides oder Mixed-Lineage Leukämie-Protein 1
MLL <sup>C</sup>	C-Terminales MLL
MLL <sup>N</sup>	N-terminales MLL
<i>MLLr</i>	<i>KMT2A-rearrangiert</i>
MLLT1	<i>MLLT1 super elongation complex subunit</i> , ENL
MLLT3	<i>MLLT3 super elongation complex subunit</i> , AF9
MM6	Mono-Mac-6
MP	Monozyten-Progenitor
MPP	multipotenter Progenitor
MS	Methioninsynthase
MSD	<i>matched sibling donor</i> , HLA-identer Geschwisterspender
MYB	<i>MYB proto-oncogene, transcription factor</i>
NCCT	NGS Competence Center Tübingen
NEAA	<i>non-essential amino acids</i> , nicht-essentielle Aminosäuren
NEAT1	<i>nuclear paraspeckle assembly transcript 1</i>
NES	<i>normalized enrichment score</i>
NF1	Neurofibromin 1
NFκB1	<i>nuclear factor kappa B subunit 1</i>
NGS	<i>next generation sequencing</i>
NHEJ	<i>non-homologous end joining</i> , nichthomologe Endverknüpfung
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
non- <i>MLLr</i>	nicht- <i>KMT2A-rearrangiert</i>

NOS	<i>not otherwise specified</i> , nicht anderweitig klassifiziert
nRPKM	<i>normalized reads per kilobase million</i>
NSD1	<i>nuclear receptor binding SET domain protein 1</i>
NSG	NOD-Scid-Gamma
NTC	<i>no template control</i> , Nicht-Template-Kontrolle
ODN	Oligodesoxynukleotid
P/S	Penicillin-Streptomycin
p53	Tumorprotein p53
PAFc	<i>polymerase associated factor complex</i>
PAM	<i>protospacer adjacent motif</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphatpuffer
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PE	Phycocerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
PHD	<i>plant homeodomain</i> , PH-Domäne
PI	Propidiumiodid
PLAC8	<i>placenta associated 8 protein</i>
PMT	Photomultiplier
PPIE	Prolylisomerase
pre-crRNA	pre-CRISPR-RNA
PRMT5	<i>protein arginine methyltransferase 5</i>
PRMT5i	PRMT5-Inhibitor
Pro B	B-Zell-Progenitor
Pro DC	DC-Progenitor
Pro NK	NK-Zell-Progenitor
Pro T	T-Zell-Progenitor
Ptd-L-Ser	Phosphatidylserin
P-TEFb	positiver Transkriptions-Elongation-Faktor
q.s.	<i>quantum satis</i> , so viel wie nötig
R	Arginin
RB1	<i>RB transcriptional corepressor 1</i>
RbBP5	<i>retinoblastoma-binding protein 5</i>
rev	<i>reverse</i> , rückwärts
RIPA	<i>radioimmunoprecipitation assay</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RNAPII	RNA-Polymerase II
RNaseIII	Ribonuklease-3
RNP	Ribonukleoprotein
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur oder reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

## Abkürzungsverzeichnis

---

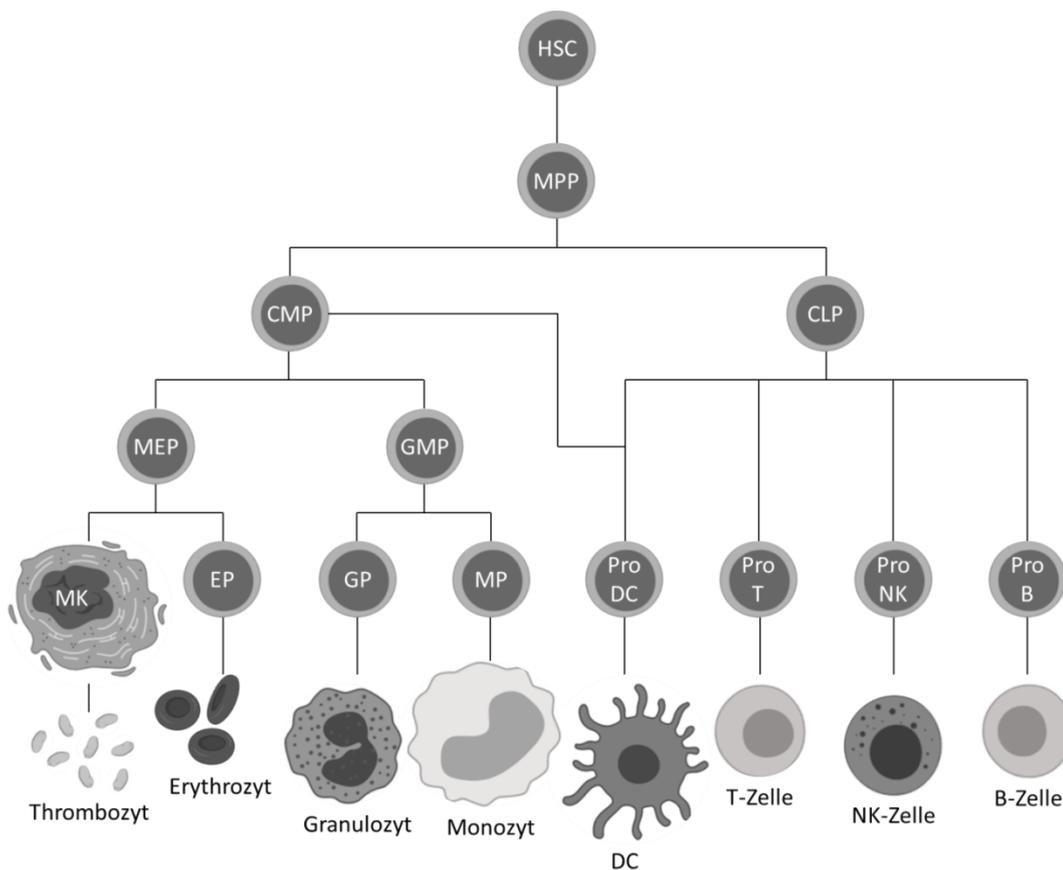
RT-qPCR	quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SAH	S-Adenosylhomocystein
SAHH	S-Adenosylhomocysteinhydrolase
SAM	S-Adenosylmethionin
SAM-M	SAM-abhängige Methylase
SCF	<i>stem cell factor</i> , Stammzellfaktor
SD	<i>standard deviation</i> , Standardabweichung
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natrium-Dodecylsulfat
sgRNA	<i>single guide RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SOX4	<i>SRY-box transcription factor 4</i>
SPTBN1	<i>spectrin beta, non-erythrocytic 1</i>
SR-1	StemRegenin 1
ss	<i>single stranded</i> , einzelsträngig
SSC	<i>saline-sodium citrate</i> , Natriumcitrat oder <i>side scatter</i> , Seitwärtsstreulicht
sva	<i>surrogate variable analysis</i>
<i>t</i>	Translokation
<i>t(4;11)</i>	<i>MLL-AF4, M-4</i>
<i>t(9;11)</i>	<i>MLL-AF9, M-9</i>
TAE	TRIS-acetat-EDTA
TALEN	<i>transcription activator-like effector nuclease</i>
TBS	<i>TRIS-buffered saline</i> , TRIS-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
THF	Tetrahydrofolat
TMEM97	<i>sigma intracellular receptor 2, transmembrane protein 97</i>
TPO	Thrombopoietin
tracrRNA	transaktivierende CRISPR-RNA
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UPN	<i>unique patient number</i>
v	Variable
WDR5	<i>WD repeat-containing protein 5</i>
WHO	<i>world health organisation</i> , Weltgesundheitsorganisation
X	DNA-Substrat
ZF	Zinkfinger
ZFN	Zink-Finger-Nukleasen
ZNF827	<i>zinc finger protein 827</i>

# 1 Einleitung

## 1.1 Akute Leukämieformen

### 1.1.1 Epidemiologie und klinisches Krankheitsbild

Das Krankheitsbild der akuten Leukämie umfasst eine heterogene Gruppe hämatopoetischer Tumore. Abgegrenzt werden die akuten von den chronischen Formen anhand des Krankheitsverlaufes. Während akute Leukämien in frühen Vorläuferzellen entstehen und in einer schnellen Krankheitsprogression resultieren, entstehen chronische Leukämien in reiferen Zellen, die noch einige Aufgaben übernehmen können, sodass die Krankheit langsamer voranschreitet. Ausgehend vom Knochenmark ist generell die reguläre Hämatopoese (**Abbildung 1**) beeinträchtigt, da die entarteten, stark proliferierenden Zellen das gesunde Knochenmark überwachsen. Klinisch manifestieren sich dadurch Zytopenien, die zu Blutungen (Thrombozytopenie), Infektionen (Granulozytopenie) und Leistungsminderung (Anämie) führen. Außerdem können lymphatische Organe, wie Milz und Lymphknoten, sowie nicht-lymphatische Organe, wie beispielsweise die Leber, infiltriert werden.<sup>[1][2]</sup>



**Abbildung 1: Vereinfachtes Modell der humanen Hämatopoese.** Hämatopoetische Stammzelle (*hematopoietic stem cell*, HSC), multipotenter Progenitor (MPP), gemeinsamer myeloider Vorläufer (*common myeloid progenitor*, CMP), gemeinsamer lymphoider Vorläufer (*common lymphoid progenitor*, CLP), Megakaryozyten-Erythrozyten-Progenitor (MEP), Granulozyten-Makrophagen-Progenitor (GMP), Megakaryozyt (MK), Erythrozyten-Progenitor (EP), Granulozyten-Progenitor (GP), Monozyten-Progenitor (MP), dendritische Zelle (*dendritic cell*, DC), DC-Progenitor (Pro DC), T-Zell-Progenitor (Pro T), natürliche Killerzelle (NK-Zelle), NK-Zell-Progenitor (Pro NK), B-Zell-Progenitor (Pro B). Gezeigt ist die vereinfachte hierarchische Entstehung hämatopoetischer Zellen. Modifiziert nach Seita et al., 2010.<sup>[3][4]</sup> Erstellt mit Hilfe von *BioRender*.<sup>[5]</sup>

Die Zahl der Neuerkrankungen liegt in westlichen Ländern altersstandardisiert bei ca. 5/100.000 pro Jahr.<sup>[6][7]</sup> In Deutschland machen akute Leukämien 13 % aller malignen hämatologischen Tumore aus.<sup>[6]</sup> Betrachtet man die Epidemiologie akuter Leukämien genauer, muss zwischen der myeloischen und lymphatischen Form unterschieden werden. 80 % aller akuten Leukämien gehen von myeloischen Vorläuferzellen aus, wobei eher ältere Menschen betroffen sind.<sup>[6]</sup> Das mediane Erkrankungsalter liegt bei ca. 70 Jahren.<sup>[8][9]</sup> Akute Leukämien lymphatischer Vorläuferzellen treten im Gegensatz dazu eher im Kindesalter auf. Leukämien stellen hier mit 33,8 % die häufigste Krebsart dar, wobei die akute Leukämie lymphatischer Vorläuferzellen wiederum als häufigste Form auftritt (77,7 %).<sup>[6][10]</sup> Das mediane Erkrankungsalter liegt bei 4 Jahren, ein zweiter Häufigkeitsgipfel tritt im Alter über 80 Jahren auf.<sup>[2][10]</sup> Insgesamt sind Männer etwas häufiger betroffen.<sup>[6][9]</sup>

### 1.1.2 Klassifizierung der akuten Leukämie laut Welt-Gesundheits-Organisation (WHO)

Zur Abgrenzung der heterogenen Gruppe akuter Leukämien für prognostische und therapeutische Zwecke dient zunächst deren Einteilung nach der Ursprungszelle in die akute myeloische Leukämie (AML) und die akute lymphatische Leukämie (ALL). Dennoch sind in diesen Untergruppen verschiedene Krankheitsformen zusammengefasst, die sich in ihrer Prognose, dem Krankheitsverlauf und der nötigen Therapie maßgeblich unterscheiden.<sup>[1][2]</sup> Durch Fortschritte und weitere Erkenntnisse der Forschung werden die Einteilungen ständig verbessert und angepasst. Anwendung finden sie dann letztendlich in Empfehlungen der Weltgesundheitsorganisation (*world health organisation*, WHO)<sup>[11]</sup> (**Tabelle 1**, **Tabelle 2**), deren ICD (*international classification of diseases*) -Systematik<sup>[12]-[14]</sup> und den deutschen Leitlinien.<sup>[1][2]</sup> Früher war die Einteilung anhand der Morphologie und des Immunphänotyps maßgeblich, welche in der Diagnosestellung und Prognose heutzutage teilweise noch eine Rolle spielen. Beispiele hierfür sind die Kriterien der *French-American-British* (FAB) -Klassifikation<sup>[15]-[18]</sup> (**Tabelle 3**) und die der *European Group for the Immunological Characterization of Leukemias* (EGIL).<sup>[19]</sup> Trotzdem verschiebt sich die Wichtigkeit der Klassifikation und Einteilung akuter Leukämien in Richtung der Zytogenetik, welche auch standardmäßig immer breitere Anwendung findet.<sup>[1][2][13][14][20]</sup>

Hämatologische Diagnostik beinhaltet nunmehr eine Zytomorphologie des peripheren Blutes mittels eines Differenzialblutbildes sowie des Knochenmarks mittels eines Myelogramms, eine Immunphänotypisierung mittels Durchflusszytometrie sowie genetische Analysen auf zytogenetischer und molekulargenetischer Ebene.<sup>[21]</sup> Nach der Einteilung können genauere Aussagen zu Prognose und sinnvollen Therapieregimes getroffen werden.

**Tabelle 1: WHO-Klassifikation der AML<sup>[1][11]</sup>**

Translokation (*t*), Inversion (*inv*), nicht anderweitig klassifiziert (*not otherwise specified*, NOS), akute Promyelozyten-Leukämie (APL), Variable (*v*)

Subgruppe	Spezifikation
AML mit wiederkehrenden genetischen Veränderungen	AML mit <i>t</i> (8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> AML mit <i>inv</i> (16)(p13.1q22) oder <i>t</i> (16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> APL mit <i>t</i> (15;17)(q22;q12); <i>PML-RARA</i> <b>AML mit <i>t</i>(9;11)(p22;q23); <i>MLL3-KMT2A</i></b> AML mit <i>t</i> (6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i> AML mit <i>inv</i> (3)(q21q26.2) oder <i>t</i> (3;3)(q21;q26.2); <i>GATA2, MECOM</i> AML (megakaryoblastisch) mit <i>t</i> (1;22)(p13;q13); <i>RBM15-MKL1</i> Provisorische Entität: AML mit <i>BCR-ABL1</i> AML mit <i>NPM1</i> -Mutation AML mit biallelischen <i>CEBPA</i> -Mutationen Provisorische Entität: AML mit <i>RUNX1</i> -Mutation
AML mit Myelodysplasie-assoziierten Veränderungen Therapie-assoziierte myeloische Neoplasien	
AML, NOS	AML mit minimaler Differenzierung AML ohne Ausreifung AML mit Ausreifung Akute myelomonozytäre Leukämie Akute monoblastische/monozytäre Leukämie Reine Erythrozytenleukämie Erythrozytenleukämie, erythroid/myeloisch Akute Megakaryoblastenleukämie Akute Basophilenleukämie Akute Panmyelose mit Myelofibrose
Myeloisches Sarkom	
Myeloische Proliferationen bei Down-Syndrom	Downsyndrom-assoziierte myeloische Leukämie Transientes myeloproliferatives Syndrom
Akute Leukämie unklarer Linienzugehörigkeit	Akute undifferenzierte Leukämie Akute Leukämie mit gemischtem Phänotyp mit <i>t</i> (9;22)(q34;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> <b>Akute Leukämie mit gemischtem Phänotyp mit <i>t</i>(v;11q23); <i>KMT2A</i>-Translokation</b> Akute Leukämie mit gemischtem Phänotyp, B/myeloisch, NOS Akute Leukämie mit gemischtem Phänotyp, T/myeloisch, NOS

**Tabelle 2: WHO-Klassifikation der ALL<sup>[2][11]</sup>**

Translokation (*t*), nicht anderweitig klassifiziert (*not otherwise specified*, NOS)

Subgruppe	Spezifikation
B-lymphatische Leukämie / B-lymphatisches Lymphom, NOS	
B-lymphatische Leukämie / B-lymphatisches Lymphom mit wiederkehrenden genetischen Veränderungen	B-ALL mit <i>t</i> (9;22)(q34;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> <b>B-ALL mit <i>t</i>(v;11q23); <i>KMT2A</i>-Translokation</b> B-ALL mit <i>t</i> (12;21)(p13;q22); <i>ETV6-RUNX1</i> B-ALL mit Hyperdiploidie B-ALL mit Hypodiploidie (hypodiploide ALL) B-ALL mit <i>t</i> (5;14)(q31;q32); <i>IL3-IGH</i> B-ALL mit <i>t</i> (1;19)(q23;p13.3); <i>TCF3-PBX</i> B-ALL, <i>BCR-ABL1</i> -ähnlich B-ALL mit <i>iAMP21</i> -Mutation
T-lymphatische Leukämie / T-lymphatisches Lymphom	Frühe T-Zell-Vorläufer-ALL Provisorische Entität: NK-Zell-ALL
Reifzellige B-Zell-Neoplasien	Burkitt-Lymphom

**Tabelle 3: FAB-Klassifikation**<sup>[15]-[18]</sup>

FAB-Subtyp	Beschreibung
M 0	AML mit minimaler Differenzierung, Myeloblasten ohne Granula
M 1	AML ohne Ausreifung, Myeloblasten mit oder ohne Granula
M 2	AML mit Ausreifung, Myeloblasten mit Granula, einzelne Myelozyten
M 3	Akute Promyelozyten-Leukämie (APL), Promyelozyten, deutlich granuliert
M 4	Akute myelomonozytäre Leukämie, Myeloblasten und Promyelozyten > 20 %
M 5a	Akute Monozyten-Leukämie ohne Ausreifung, große Monoblasten
M 5b	Akute Monozyten-Leukämie mit Ausreifung, Monoblasten, Promonozyten und Monozyten, Monozytose im peripheren Blut
M 6	Akute Erythroleukämie, Megaloblastäre Erythropoese > 50 %, Myeloblasten > 30 %
M 7	Akute Megakaryoblasten-Leukämie, Megakaryoblasten
L 1	Kleine, homogene Zellen, leichte bis mäßige Basophilie
L 2	Große, heterogene Zellen, mäßige bis starke Basophilie
L 3	Reifzellige B-ALL oder Burkitt-Leukämie/Lymphom, große Zellen mit wenig Heterogenität, sehr starke Basophilie

### 1.1.3 Therapieformen und Prognose nach Leitlinie

Die Therapie akuter Leukämien richtet sich maßgeblich nach deren prognostischer Einteilung. Für die AML ist diese nach *European LeukemiaNet* (ELN)<sup>[22]</sup> und für die ALL nach *German Multicenter Study Group for Adult Acute Lymphoblastic Leukemia* (GMALL)<sup>[2]</sup> festgelegt (**Tabelle 4, Tabelle 5**).

**Tabelle 4: Prognose der adulten AML nach ELN**<sup>[22]</sup>

Translokation (*t*), Inversion (*inv*), interne Tandemduplikation (*internal tandem duplication*, ITD), Variable (*v*), fehlend (-), Abnormalität (*abln*)

ELN Risikogruppe	Aberrationen
günstig	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>t</i>(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i></li> <li>- <i>inv</i>(16)(p13.1q22) oder <i>t</i>(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i></li> <li>- Mutiertes <i>NPM1</i> ohne <i>FLT3</i>-ITD oder mit <i>FLT3</i>-ITD niedrig</li> <li>- Biallelisch mutiertes <i>CEBPA</i></li> </ul>
intermediär	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mutiertes <i>NPM1</i> mit <i>FLT3</i>-ITD hoch (normaler Karyotyp)</li> <li>- Wildtyp-<i>NPM1</i> ohne <i>FLT3</i>-ITD (normaler Karyotyp) oder mit <i>FLT3</i>-ITD niedrig (mit oder ohne ungünstige genetische Aberrationen)</li> <li>- <b><i>t</i>(9;11)(p22;q23); <i>MLL3-KMT2A</i></b></li> <li>- Zytogenetische Aberrationen, die nicht als günstig oder ungünstig eingestuft wurden</li> </ul>
ungünstig	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>t</i>(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i></li> <li>- <b><i>t</i>(v;11)(v;q23); <i>KMT2A</i>-Genumlagerung</b></li> <li>- <i>t</i>(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i></li> <li>- <i>inv</i>(3)(q21q26.2) oder <i>t</i>(3;3)(q21;q26.2); <i>GATA2, MECOM (EVI1)</i></li> <li>- -5 oder <i>del</i>(5q); -7; -17/<i>abn</i>(17p)</li> <li>- Komplexer Karyotyp (≥3 Aberrationen)</li> <li>- Monosomaler Karyotyp (Monosomie + Monosomie/chromosomale Aberration)</li> <li>- Wildtyp-<i>NPM1</i> mit <i>FLT3</i>-ITD hoch</li> <li>- Mutiertes <i>RUNX1</i></li> <li>- Mutiertes <i>ASXL1</i></li> <li>- Mutiertes <i>TP53</i></li> </ul>

**Tabelle 5: Prognose der adulten ALL nach GMALL<sup>[2]</sup>**Translokation (*t*), komplette Remission (*complete remission*, CR)

GMALL Risikogruppe	Prognosefaktor
Standardrisikogruppe	ohne ungünstige Prognosefaktoren
Hochrisikogruppe	mindestens ein ungünstiger Prognosefaktor aus:
	- Leukozytenzahl > 30.000 Leukozyten/ $\mu$ L Blut bei B-Vorläufer-ALL
	- Komplette Remission > 3 Wochen nach Induktion
	- Aberrationen <i>t</i> (9;22); <i>BCR-ABL</i> <i>t</i> (4;11); <i>KMT2A-AFF1</i>
	- Komplex aberranter Karyotyp
	- Minimale Resterkrankung > 1 Leukämiezelle/ $10^4$ Lymphozyten nach Frühkonsolidation > 1 Leukämiezelle/ $10^4$ Lymphozyten nach vorheriger molekularer CR

Die jeweiligen pädiatrischen Erkrankungen werden nach der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH) prognostisch folgendermaßen eingeteilt (**Tabelle 6, Tabelle 7**):

**Tabelle 6: Prognose der pädiatrischen AML nach GPOH<sup>[23]</sup>**Translokation (*t*), Inversion (*inv*), fehlend (-), Deletion (*del*), mutiert (*mut*), interne Tandemduplikation (*internal tandem duplication*, ITD)

GPHO Risikogruppe	Aberrationen
günstig	<i>t</i> (8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> <i>inv</i> (16)(p13.1;q22) oder <i>t</i> (16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> <i>t</i> (15;17)(q22;q21); <i>PML-RARA1</i> Molekular (bei kongenitaler Neutropenie-AML) <i>NPM1</i> -mutierte AML <i>CEBPA</i> Doppelmutation <b><i>t</i>(1;11)(q21;q23); <i>KMT2A-MLLT11(AF1Q)</i></b> <i>GATA1s</i> assoziierte Leukämie bei Trisomie 21 Mosaik
intermediär	Zytogenetische Aberrationen, die nicht als günstig oder ungünstig eingestuft wurden
ungünstig	-7 <sup>s</sup> , -5 oder <i>del</i> (5q) <i>inv</i> (3)(q21;q26.2) oder <i>t</i> (3;3)(q21;q26.2); <i>RPN1-MECOM(EVI1-MDS1-EAP)</i> <i>t</i> (6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i> <i>t</i> (7;12)(q36;p13); <i>ETV6(TEL)-HLXB9(MNX1)</i> <i>t</i> (4;11)(q21;q23); <i>KMT2A-AFF1(AF4)</i> <i>t</i> (6;11)(q27;q23); <i>KMT2A-MLLT4(AF6)</i> <i>t</i> (5;11)(q35;p15.5); <i>NUP98-NSD1</i> <i>t</i> (10;11)(p12;q23); <i>KMT2A-MLLT10(AF10)</i> 12p / <i>t</i> (2;12) Komplexer Karyotyp <i>WT1mut/FLT3-ITD</i> <i>t</i> (9;22)(q34;q11.2)

**Tabelle 7: Prognose der pädiatrischen ALL nach GPOH<sup>[24]</sup>**  
 Translokation (t)

GPHO Risikogruppe	Prognosefaktor	
günstig	- Leukozytenzahl	< 20.000 Leukozyten/μL Blut bei B-Vorläufer-ALL
	- Alter	1-5 Jahre
	- Ansprechen	nach 7 Tagen Prednison Vortherapie
	- Ansprechen	< 1.000 Blasten/μL Blut auf initiale Induktionstherapie
	- Minimale Resterkrankung	< 5 % Blasten im Knochenmark negativ nach 12 Wochen
	- Chromosomenzahl	> 50
	- Aberrationen	t(12;21); TEL-AML1
ungünstig	- Leukozytenzahl	> 100.000 Leukozyten/μL Blut bei B-Vorläufer-ALL
	- Alter	< 1 Jahr > 10 Jahre
	- Ansprechen	nach 7 Tagen Prednison Vortherapie
	- Ansprechen	> 1.000 Blasten/μL Blut auf initiale Induktionstherapie
	- Minimale Resterkrankung	> 5 % Blasten im Knochenmark > 1 Leukämiezelle/10 <sup>3</sup> Lymphozyten nach 12 Wochen
	- Chromosomenzahl	< 45
	- Aberrationen	t(9;22) - BCR-ABL t(4;11) - KMT2A-AFF1

Auffällig ist, dass die Prognose mittlerweile durch die Bewertung zytogenetischer Parameter stattfindet und *KMT2A*-Mutationen in beiden Leukämiephänotypen unter den jeweiligen Kriterien als prognostisch intermediär bis schlecht eingeordnet werden.

Eine Therapie umfasst für prognostisch schlecht eingeordnete akute Leukämien generell eine intensive Induktionstherapie mit anschließender Konsolidierung und Intensivierung.<sup>[1][2][23][24]</sup> Die Indikation zur allogenen Stammzelltransplantation (allo-SZT) in erster Remission oder während der Konsolidierung ist bei dieser schlechten Prognose durch die ungünstige Zytogenetik und das damit einhergehende erhöhte Rezidivrisiko gegeben.<sup>[1][2][23][24]</sup> Dabei soll die allo-SZT bevorzugt mit vorhandenen humanen-Leukozyten-Antigen (HLA) - identen Geschwisterspendern (*matched sibling donor*, MSD) bzw. gut passenden verwandten oder unverwandten Spendern (*matched donor*, MD) durchgeführt werden.<sup>[1][2][23][24]</sup>

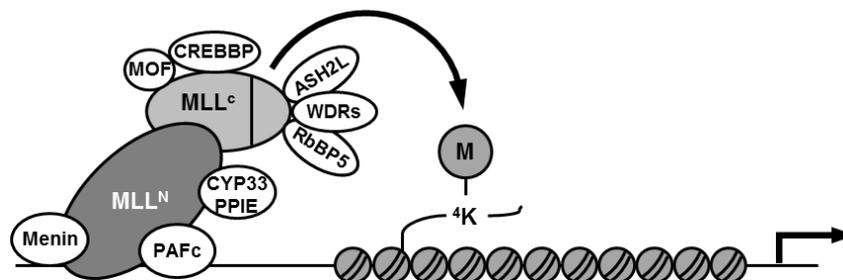
Trotz der Anwendung von aggressiven Therapieregimen sind *KMT2A*-rearrangierte Leukämien noch immer mit einer schlechten Prognose assoziiert.<sup>[2][22]</sup> Die Entwicklung innovativer therapeutischer Strategien ist daher dringend erforderlich.

## 1.2 Mutationen des *KMT2A*-Gens

### 1.2.1 Physiologische Bedeutung der Lysin-Methyltransferase 2A

Das *KMT2A*-Gen befindet sich auf Chromosom 11 (11q23) und kodiert für die Lysin-Methyltransferase 2A (*KMT2A*), die auch als Myeloisches / Lymphoides oder *Mixed-Lineage* Leukämie-Protein 1 (*MLL*, *MLL1*) bekannt ist. Die häufige Beteiligung der Methyltransferase in onkologische Prozesse der akuten Leukämie spiegelt sich so bereits in der Bezeichnung wider. Um die pathophysiologischen Prozesse verstehen zu können, muss die essenzielle physiologische Bedeutung der Lysin-Methyltransferase 2A bekannt sein.

Durch ihre Funktion der spezifischen Methylierung des Histons H3 an Lysin 4 (*H3K4*) (**Abbildung 2**) und die dadurch erfolgende Expressionsregulation der *clustered homeobox* (*HOX*)-Gene ist die *KMT2A* maßgeblich an der frühen Hämatopoese, wie der Proliferation und Rekrutierung hämatopoetischer Vorläufer sowie der Stammzell-Selbsterneuerung, beteiligt.<sup>[25]-[27]</sup>

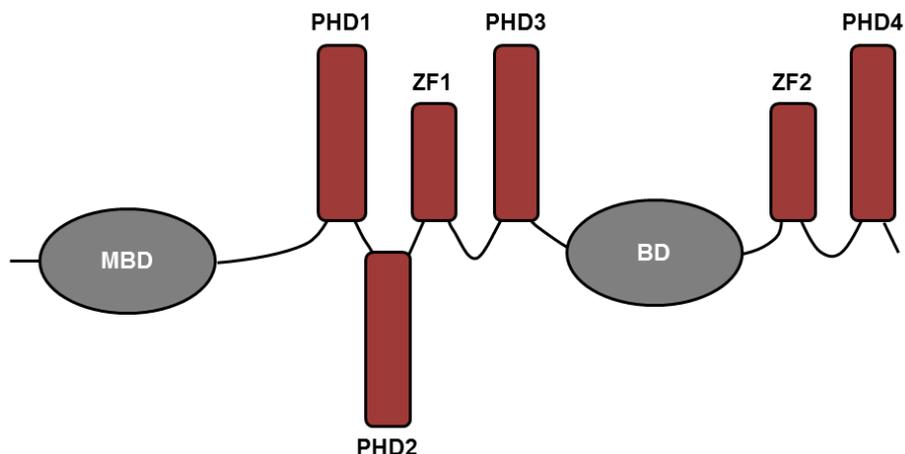


**Abbildung 2: Aufbau, Komplexbildung und Funktion der Lysin-Methyltransferase 2A.** N-terminaler Teil (*MLL<sup>N</sup>*), C-terminaler Teil (*MLL<sup>C</sup>*), Lysin-Acetyltransferase 5 (*KAT5*, *MOF*), *cAMP response element-binding protein* (*CREBP*), *CREB-binding protein* (*CREBBP*), Prolylisomerase (*PPIE*, *CYP33*), *WD repeat-containing protein 5* (*WDR5*), *retinoblastoma-binding protein 5* (*RbBP5*), *Set1/Ash2 histone methyltransferase complex subunit ASH2* (*ASH2L*), *polymerase associated factor complex* (*PAFc*). Gezeigt ist die Methylierung (M) des Histons H3 an Lysin 4 (*H3K4*).<sup>[28]-[30]</sup>

Das Protein wird durch die Taspase 1 prozessiert, wobei die resultierenden Fragmente (*MLL<sup>N</sup>*, *MLL<sup>C</sup>*) als Heterodimer mit einer Vielzahl anderer Proteine einen großen nukleären Komplex bilden.<sup>[29][30]</sup> Innerhalb dieses Heterodimers werden vielseitige Funktionen vereint, welche die Balance der Zelle zwischen Differenzierung und Proliferation halten. Je nach Komplexpartner wird eher die eine oder die andere Funktion verstärkt ausgeführt.

Der C-terminale Teil des Proteins übt die enzymatische Histon-Acetylierung und -Methylierung typischerweise an *H3K4* aus.<sup>[30]</sup> Durch die Methylierungsmuster können die epigenetischen Modifikationen zu einem transkriptionellen Gedächtnis und zur Zellentwicklung beitragen.<sup>[30]</sup> Wichtige Komplexpartner, die mit der sogenannten C-terminalen SET-Domäne interagieren, sind hier das *WD repeat-containing protein 5* (*WDR5*), *retinoblastoma-binding protein 5* (*RbBP5*) und *Set1/Ash2 histone methyltransferase complex subunit ASH2* (*ASH2L*).<sup>[31][32]</sup>

Der N-terminale Teil beinhaltet weitere wichtige Domänen und mögliche Interaktionsstellen. Zum einen interagiert das MLL-Protein mit Menin, *PC4* and *SFRS1-interacting protein* (LEDGF) und *polymerase associated factor complex* (PAFc) und co-lokalisiert an der DNA, um die Transkription zu regulieren.<sup>[33]</sup> Des Weiteren findet sich dort die sogenannte PH-Domäne (*plant homeodomain*, PHD), welche sich aus den Subdomänen PHD1-3, einer Bromodomäne (BD) und einer weiteren Subdomäne PHD4 zusammensetzt (**Abbildung 3**). Anders als im Normalfall hat die BD hier keine Lesefunktion der Histon-Acetylierungen, sondern stabilisiert lediglich die PHD3-Subdomäne.<sup>[30]</sup> Diese ist dafür verantwortlich, die nukleosomalen Methylierungsmuster an H3K4 zu lesen, wobei diese Stelle wiederum mittels der Interaktionspartner *cAMP response element-binding protein* (CREBP), *CREB-binding protein* (CREBBP) und der Lysin-Acetyltransferase 5 (KAT5, MOF) acetyliert werden kann.<sup>[34]</sup> Das MLL-Protein „schreibt“ demnach nicht nur Methylierungsmuster, sondern „liest“ diese auch aus.<sup>[34][35]</sup> In diesem Zustand agiert das MLL-Protein im Komplex als transkriptioneller Aktivator.

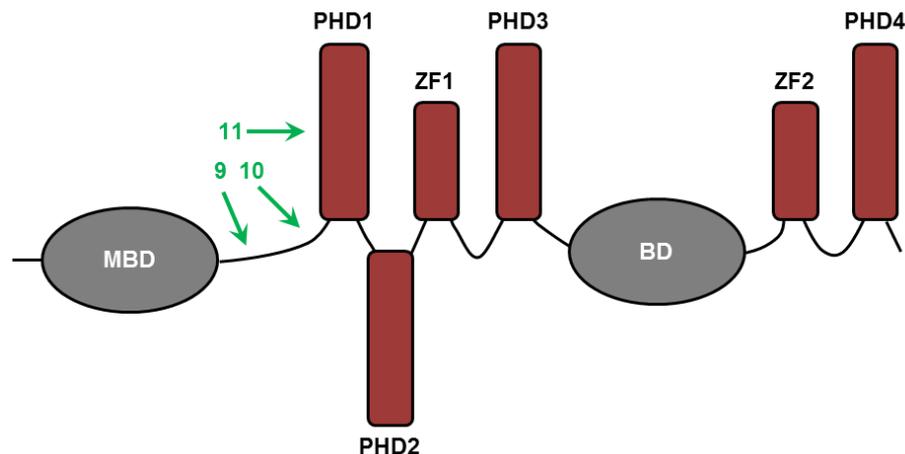


**Abbildung 3: Schematischer Aufbau der PHD, ihre Sub- und angrenzende Domänen.** *Plant homeodomain* (PHD), Bromodomäne (BD), Zinkfinger (ZF), Methyl-DNA-bindende Domäne (MBD). Gezeigt ist der Aufbau eines Abschnitts des N-terminalen Fragments des MLL-Proteins. Modifiziert nach Marschalek et al., 2016.<sup>[30]</sup>

In Anwesenheit der Prolylisomerase (PPIE), auch als Cyclophilin-33 (CYP33) bekannt, wird eine Konformationsänderung des MLL-Proteins katalysiert. PPIE verhindert, dass die PHD3-Subdomäne mit der BD interagieren kann.<sup>[36][37]</sup> Eine solche Isomerisierung mit PPIE führt dazu, dass die PHD3-Subdomäne die BD verlässt, um stattdessen mit dem Polycomb-Repressor-Komplex bestehend aus *polycomb complex protein BMI1*, *zinc phosphodiesterase ELAC protein 2* (ELAC2/HPC2), Histon-Deacetylase 1-2 (HDAC1-2), *C-terminal-binding protein complex* (CtBP) und der Methyl-DNA-bindenden Domäne (MBD) zu interagieren. So entsteht ein repressiver transkriptioneller Komplex.<sup>[30]</sup> In seiner physiologischen Form ist das MLL-Protein also in der Lage, sowohl als transkriptioneller Aktivator als auch als Repressor zu agieren, wobei die PPIE als „Schalter“ fungiert.<sup>[30]</sup>

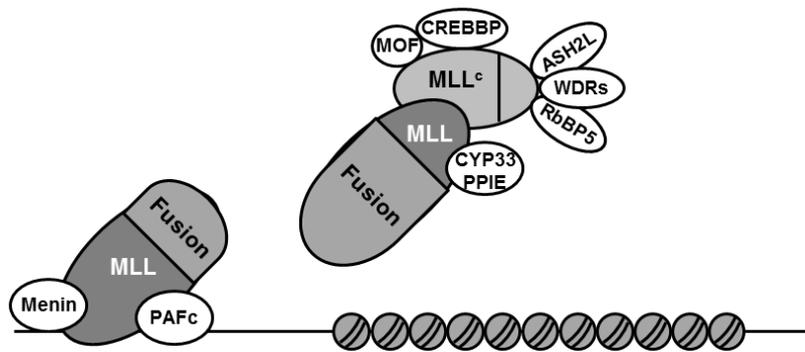
## 1.2.2 Pathophysiologische Folgen des *KMT2A*-Onkogens auf Proteinebene

Betrachtet man die pathophysiologische Situation in *KMT2A*-rearrangierten Leukämien auf Proteinebene genauer, so sind zunächst die Folgen der chromosomalen Translokation  $t(v;11)$  auf das MLL-Protein an sich in Betracht zu ziehen. In den meisten Fällen werden Translokationen der sogenannten *breakpoint cluster region* (BCR) beschrieben. Diese befindet sich zwischen Exon 9 und Intron 11.<sup>[38]</sup> Die Nomenklatur der Exon- und Intronstruktur basiert hier auf Nilson et al., 1996.<sup>[39]</sup>



**Abbildung 4: Schematischer Aufbau der PHD mit *breakpoint cluster region* (BCR).** *Plant homeo-domain* (PHD), Bromodomäne (BD), Zinkfinger (ZF), Methyl-DNA-bindende Domäne (MBD). Gezeigt ist der Aufbau eines Abschnitts des N-terminalen Fragments des MLL-Proteins. Prätranskriptionelle Positionen von Intron 9-11 sind als grüne Pfeile markiert. Modifiziert nach Marschalek et al., 2016 und Meyer et al., 2018.<sup>[30][38]</sup>

Die BCR ist in **Abbildung 4** (grüne Pfeile) dargestellt. Durch eine Translokation an dieser Stelle wird die MBD von der PHD getrennt.<sup>[30]</sup> Dadurch wird die durch die PPIE vermittelte repressive Funktion des MLL-Proteins zerstört, da trotz deren Anwesenheit keine Interaktion der PHD mit der MBD und somit des Polycomb-Repressor-Komplexes stattfinden kann.<sup>[41][42]</sup> Der intrinsische Kontrollmechanismus ist somit nicht mehr vorhanden, die „Methylierungs-Lesefunktion“ wird von der „Methylierungs-Schreibefunktion“ getrennt und beide Fragmente des MLL-Proteins sind ständig aktiv.<sup>[30]</sup> Das MLL-X-Fusionsprotein ist noch immer in der Lage, über Menin, LEDGF und PAFc an Promotoren zu binden, kann jedoch seine inhibitorische Funktion nicht mehr ausüben.<sup>[30]</sup> Das Gegenstück, das X-MLL-Fusionsprotein, behält die PHD3, die CREBBP/MOF-bindende Domäne und die SET-Domäne mit ihrem Komplex (**Abbildung 5**).



**Abbildung 5: MLL-X- und X-MLL-Fusionsproteine mit verbleibenden Interaktionspartnern.** Ly-sin-Acetyltransferase 5 (KAT5, MOF), *cAMP response element-binding protein* (CREBP), *CREB-binding protein* (CREBBP), Prolylisomerase (PPIE, CYP33), *WD repeat-containing protein 5* (WDR5), *retinoblastoma-binding protein 5* (RbBP5), *Set1/Ash2 histone methyltransferase complex subunit ASH2* (ASH2L), *polymerase associated factor complex* (PAFc). Gezeigt sind das MLL-X- und das X-MLL-Fusionsprotein posttranslational nach chromosomaler Translokation.<sup>[30][40]</sup>

Die schwerwiegenden Veränderungen allein auf Proteinebene ohne genaue Betrachtung der nachfolgenden Signalwege liefern bereits genügend Erklärungsansätze für die Eingruppierung *KMT2A*-rearrangierter Leukämien mit BCR als akute Leukämien mit schlechter Prognose. Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass Patienten mit einer Translokation in Intron 11 prognostisch vergleichsweise noch schlechter einzuordnen sind.<sup>[43]</sup> Während eine Translokation mit der Separation von MBD und PHD und des damit einhergehenden Verlustes der inhibitorischen Funktion ein onkologischer Event darstellt, so führen Translokationen speziell in Intron 11 zusätzlich zu einem Strukturverlust der PHD.<sup>[30]</sup> Der cystein- und histidinreiche Komplex kann nicht mehr korrekt gefaltet werden und der ubiquitin-vermittelte Abbau durch das Degradationsprotein *Elongin B/C-Cullin-SOCS box protein* (ECSASB2) ist nicht mehr möglich.<sup>[44]</sup> Eine Translokation in Intron 11 kann daher als zweiter onkologischer Event gesehen werden.<sup>[30]</sup>

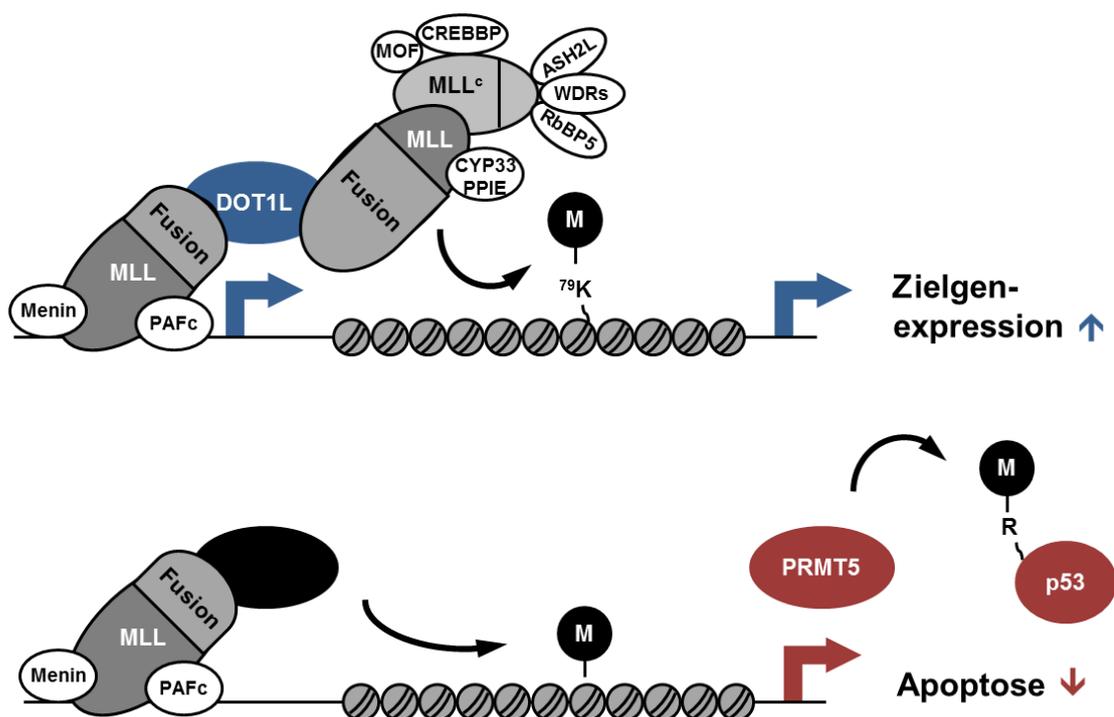
### 1.2.3 Pathophysiologische Folgen des *KMT2A*-Onkogens auf Komplexbildung und nachfolgende Signalwege

Bei *KMT2A*-rearrangierten Leukämien spielen in der Pathophysiologie nicht nur die Veränderungen auf Proteinebene, sondern auch weitreichendere Veränderungen der Komplexbildung und nachfolgenden Signalwege eine Rolle. Werden N- und C-terminal Proteinsequenzen der Translokationspartner angehängt, so ist das Potential für ein erheblich verändertes Interaktom gegeben.<sup>[30]</sup>

Als Beispiele hierfür sind der positive Transkriptions-Elongation-Faktor (P-TEFb), der *nuclear factor kappa B subunit 1* (NFkB1), die *disruptor of telomeric silencing 1-like* (DOT1L) -Histon-Lysin-Methyltransferase und das *nuclear receptor binding SET domain protein 1* (NSD1) zu nennen.<sup>[45]</sup> Diese neuen Komplexpartner haben gemeinsam, dass sie die RNA-Polymerase II (RNAPII) direkt binden können und mit ihr transkriptionell aktiv sind.<sup>[30]</sup> Das MLL-X-

Fusionsprotein gewinnt so an transkriptioneller Aktivität. Zudem führt das Zusammenspiel der Histon-Methyltransferasen (DOT1L, NSD1) mit der Funktion der SET-Domäne des X-MLL-Fusionsproteins zu einem veränderten Methylierungsmuster (v.a. H3K4me2/3, H3K36me2/3, and H3K79me2/3). Es werden so inaktive Chromatinregionen aktiviert, Differenzierung wird gestoppt, Stammzellgene werden exprimiert und ein onkologisches Potential entsteht.<sup>[30]</sup>

Im Speziellen sind in letzter Zeit mögliche Zielstrukturen identifiziert worden, die auf diese Weise mit dem MLL-X- und X-MLL-Fusionsproteinen interagieren oder in nachfolgenden Signalwegen rekrutiert werden (**Abbildung 6**).



**Abbildung 6: Veränderung der MLL-X- und X-MLL-Fusionsproteine in Bezug auf Komplexbildung und nachfolgende Signalwege.** Lysin-Acetyltransferase 5 (KAT5, MOF), *cAMP response element-binding protein* (CREBP), *CREB-binding protein* (CREBBP), Prolyl-isomerase (PPIE, CYP33), *WD repeat-containing protein 5* (WDR5), *retinoblastoma-binding protein 5* (RbBP5), *Set1/Ash2 histone methyltransferase complex subunit ASH2* (ASH2L), *polymerase associated factor complex (PAFc) disruptor of telomeric silencing 1-like* (DOT1L) -Histon-Lysin-Methyltransferase, *protein arginine methyltransferase 5* (PRMT5). Gezeigt ist eine schematische Darstellung neuer Komplexparker (schwarz) und rekrutierter Proteine (DOT1L), das veränderte Methylierungsmuster (M) sowie die veränderte Expression *KMT2A*-translokationsspezifischer Zielgene (blauer Pfeil) und die Überexpression von *PRMT5*, die zu einer reduzierten Apoptose führt.<sup>[28][30][45]</sup>

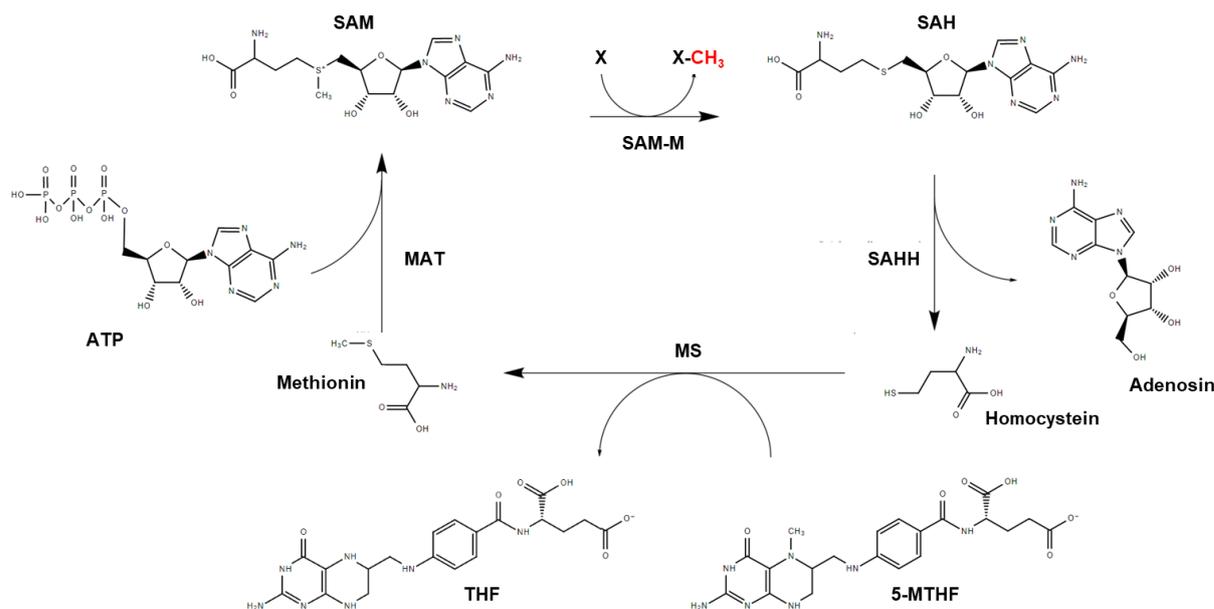
Der bisher am besten charakterisierte neue Komplexparker ist DOT1L, eine H3K79-spezifische Histon-Methyltransferase (**Abbildung 6**, obere Zeile).<sup>[28]</sup> Aufgrund der Rekrutierung von DOT1L zum N-terminalen MLL-X-Fusionsprotein, kann dies seine Methylierung an H3K4 nicht mehr ausführen und methyliert stattdessen H3K79. Folglich verändert sich das Methylierungsmuster von H3K4 zu H3K79 und die bisher moderate Expression zentraler *KMT2A*-translokationsspezifischer Zielgene wird hochreguliert.<sup>[28]</sup> Bekannt sind hier vor allem

die *homeobox*-Gene *MEIS1* und *HOXA9*.<sup>[46]</sup> Somit wird die myeloische Differenzierung blockiert und die Proliferation gesteigert, wodurch ein onkologisches Potential entsteht, das in einer leukämischen Transformation resultiert.<sup>[29]</sup> Eine therapeutische Rationale für eine DOT1L-Inhibition ist durch die bisherige *in vitro* und *in vivo* Studienlage gegeben.<sup>[47][48]</sup> Vielversprechende *small molecules*, welche die Histon-Methyltransferase-Aktivität hemmen, zeigen in ersten klinischen Studien (NCT01684150) jedoch nur eingeschränkte Aktivität.<sup>[49]</sup>

Weitere nachfolgende Signalwege, die wichtig sind, um die Pathophysiologie weiter zu verstehen, beinhalten die gesteigerte transkriptionelle Aktivität des MLL-X-Fusionsproteins. Das MLL-X-Fusionsprotein ist noch immer in der Lage, über Menin, LEDGF und PAFc an Promotoren zu binden, kann jedoch seine inhibitorische Funktion nicht mehr ausüben.<sup>[30]</sup> Die transkriptionelle Aktivität über den PAFc ist also gesteigert. Kürzlich veröffentlichte Studien weisen auf eine direkte Bindung an den Promotor der *protein arginine methyltransferase 5* (PRMT5) hin (**Abbildung 6**, untere Zeile) hin.<sup>[50]</sup> PRMT5 ist durch Arginin-Methylierung in der Lage, die Gentranskription zu deaktivieren. In erhöhter Menge vorhanden, trägt es zu einer pathophysiologischen Deaktivierung von Tumorsuppressorgenen durch H3R8 und H4R3 bei.<sup>[51]</sup> Außerdem sind mehrere lösliche Proteine durch Arginin-Methylierungen der PRMT5 betroffen. Hierzu zählen Komponenten des Spliceosoms, der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (*epidermal growth factor receptor*, EGFR)<sup>[52]</sup>, der Transkriptionsfaktor E2F1<sup>[53]</sup> und das prominente Tumorprotein p53<sup>[54]</sup>. Durch die Methylierung von p53 wird zum einen der Zellzyklus nicht durch den cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitor 1 (*cyclin dependent kinase inhibitor 1*, p21, CDKN1a) reguliert<sup>[55][56]</sup> und des Weiteren wird Apoptose verhindert.<sup>[57]</sup> Ob PRMT5 zur reduzierten Differenzierung leukämischer Zellen beiträgt, wird kontrovers diskutiert.<sup>[50][55]</sup> Allgemein ist bekannt, dass die Proliferation forciert wird, sodass PAFc und PRMT5 als potenzielle therapeutische Angriffspunkte gesehen werden.<sup>[50][58][59]</sup> Eine Anwendung von PRMT5-Inhibitoren in Patienten mit soliden Tumoren oder non-Hodgkin's Lymphom, in denen PRMT5 aus anderen Gründen hochreguliert ist, wird bereits untersucht (NCT02783300).

Letztendlich spielen in allen bisher beschriebenen *KMT2A*-translokationsspezifischen Signalwegen Methylierungen eine zentrale Rolle. DNA- und Histon-Methylierungen werden von Methyltransferasen ausgeführt, welche die Methylgruppe hauptsächlich mithilfe von S-Adenosylmethionin (SAM) übertragen.<sup>[60][61]</sup> SAM ist der wichtigste Methylgeber und ist daher maßgeblich an der epigenetischen Regulation der Genexpressionen und damit der Beeinflussung von Zellwachstum, Apoptose und Differenzierung beteiligt.<sup>[62][63]</sup> Die Biosynthese von SAM aus Adenosintriphosphat (ATP) und L-Methionin (**Abbildung 7**) wird durch die Methioninadenosyltransferase (MAT) in der Leber durch MAT1 und extrahepatisch durch MAT2A und MAT2B bewerkstelligt.<sup>[64]-[68]</sup> Onkologisch ist bekannt, dass *MAT2A* in aktivierten T-Zellen, T-Zell-Leukämiezellen sowie in anderen Krebsarten, wie dem hepatozellulären oder kolorektalen Karzinom, überexprimiert wird.<sup>[69][70]</sup> Eine starke Abhängigkeit des onkologi-

schen Potentials *KMT2A*-rearrangierter Leukämien von Methylierungen stellt SAM und sein produzierendes Enzym MAT2A in den Mittelpunkt des Forschungsinteresses. Die essenzielle Bedeutung von MAT2A und SAM kann durch *knock-down*-Experimente und Substratinhibition durch das Methionin-Analogon Cycloleucin in Krebszellen durch resultierenden Zelltod nachgewiesen werden.<sup>[69][71]-[74]</sup> Erst seit Kurzem existiert ein geeigneter direkter Inhibitor von MAT2A, sodass es nun gilt, dieses Enzym als zentrale Schaltstelle von epigenetischen Regulationen und somit als wichtiges therapeutisches Ziel in *KMT2A*-rearrangierten Leukämien zu evaluieren.<sup>[75]</sup>

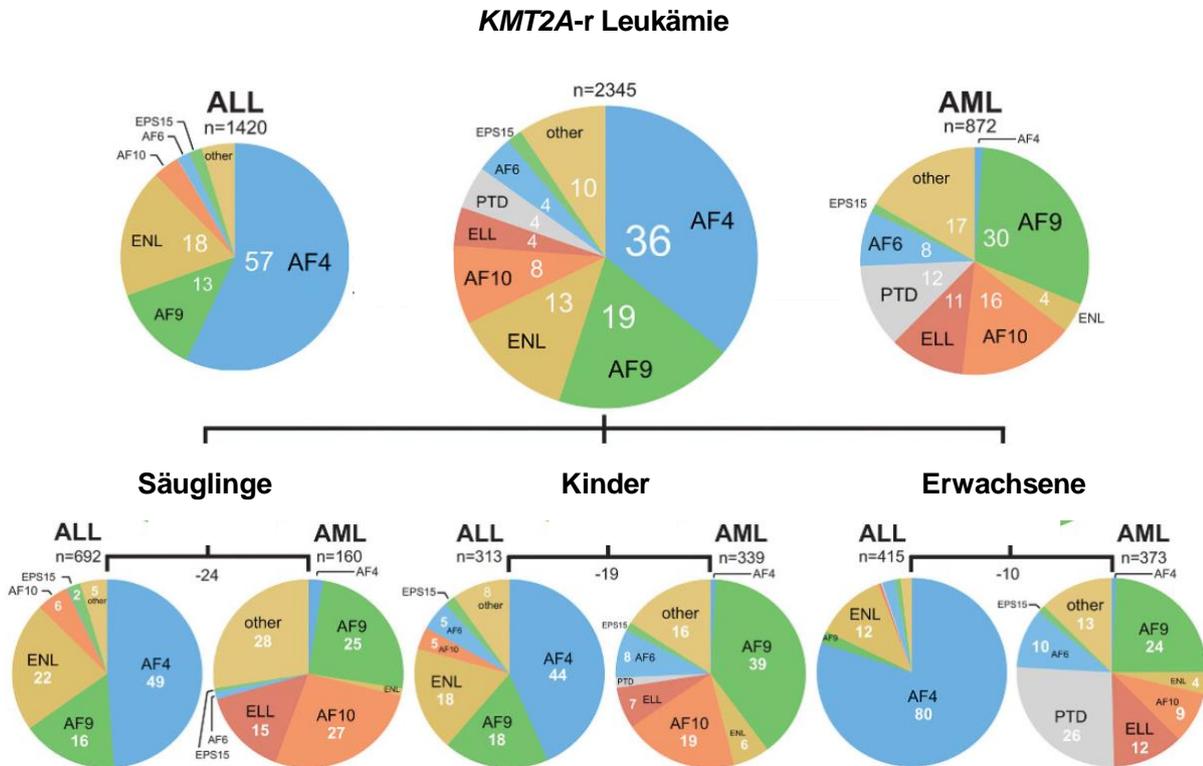


**Abbildung 7: S-Adenosylmethionin-Zyklus.** Adenosintrophosphat (ATP), Methioninadenosyltransferase (MAT), S-Adenosylmethionin (SAM), SAM-abhängige Methylase (SAM-M), DNA-Substrat (X), S-Adenosylhomocystein (SAH), S-Adenosylhomocysteinhydrolase (SAHH), 5-Methyltetrahydrofolat (5-MTHF), Methioninsynthase (MS), Tetrahydrofolat (THF). Gezeigt sind die Synthese von SAM, die Methylierung eines Substrats und die anschließende enzymatische Aufarbeitung der Edukte. Gezeichnet mit *ChemSpider*.<sup>[76]</sup>

### 1.2.4 Beschreibung der häufigsten Translokationspartner *KMT2A*-rearrangierter Leukämien

Aus Patientendaten und derer Genomsequenzierungen können die Häufigkeiten der genetischen Aberrationen genauer charakterisiert werden. Meyer et al., 2018 stratifizierten eine große Patientenpopulation über Jahre hinweg hinsichtlich der Translokationspartner, des Phänotyps und des Auftretens der Leukämie in pädiatrischen oder adulten Fällen.<sup>[38]</sup> Insgesamt ist nun bekannt, dass in *KMT2A*-rearrangierten Leukämien vermehrt *AFF1* (*AF4/FMR2 family member 1, AF4*), *MLLT3* (*MLLT3 super elongation complex subunit, AF9*) und *MLLT1* (*MLLT1 super elongation complex subunit, ENL*) als Translokationspartner auftreten.<sup>[38]</sup>

Unterscheidet man zwischen AML und ALL, so tritt die ALL vorrangig im frühen Kindesalter auf, wobei die Inzidenz in höherem Alter wieder steigt.<sup>[2][10]</sup> Interessanterweise tritt hier überwiegend *AFF1* als Translokationspartner auf.<sup>[38]</sup> Die AML hingegen tritt vorwiegend in älteren Patienten auf, wobei hier *MLLT3* als prominenter Translokationspartner beschrieben wird.<sup>[8][9][38]</sup> Zusammengefasst ist die aktuelle Datenlage in **Abbildung 8**.



**Abbildung 8: Verteilung der häufigsten Translokationspartner *KMT2A*-rearrangierter Leukämien.** *KMT2A*-rearrangiert (*KMT2A*-r), akute lymphatische Leukämie (ALL), akute myeloische Leukämie (AML), Säuglinge (0,03 bis 12 Monate,  $n=876$ ), Kinder (älter als 12 Monate bis 18 Jahre,  $n=671$ ), Erwachsene (älter als 18 Jahre,  $n=798$ ). Gezeigt ist die Verteilung der Translokationspartner hinsichtlich des Alters der Patienten und des Phänotyps der Erkrankung. Modifiziert nach Meyer et al., 2018.<sup>[38]</sup>

Physiologisch sind die Proteinfunktionen der Translokationspartner noch nicht hinreichend beschrieben. Es ist lediglich bekannt, dass das *AFF1*-kodierte Protein AF4 essenziell für die Lymphopoese zu sein scheint.<sup>[64]</sup> Es kann natürlicherweise P-TEFb und DOT1 und darüber die RNAPII direkt binden.<sup>[78]</sup> Die Auswirkungen dieser Interaktion infolge einer Translokation sind in „Kapitel 1.2.3 Pathophysiologische Folgen des *KMT2A*-Onkogens auf Komplexbildung und nachfolgende Signalwege“ beschrieben. Der Einfluss hinsichtlich der regulären Physiologie ist nicht charakterisiert.<sup>[79]</sup>

Für das *MLLT3*-kodierte Protein AF9 ist bekannt, dass es mit AF4 über den C-Terminus interagieren kann.<sup>[80]</sup> Physiologisch trägt AF9 mit seiner Chromatinlesefunktion der Acetylierung der Histonproteine 1 und 3 (H1 und H3) maßgeblich zur Funktion des Komplexes aus AF4, P-TEFb, DOT1L und der RNAPII bei, der auch als Super-Elongations-Komplex

bekannt ist.<sup>[80]</sup> Die Konsequenzen einer Translokation gehen folglich mit denen einer *t(4;11)*-Translokation einher und sind in „Kapitel 1.2.3 Pathophysiologische Folgen des *KMT2A*-Onkogens auf Komplexbildung und nachfolgende Signalwege“ beschrieben. Physiologisch ist das AF9-Protein zudem in der Lage, mit Polycomb 3, auch bekannt als CBX8 und ein Bestandteil des Polycom-Repressor-Komplexes, zu interagieren.<sup>[81]</sup> Diese Funktion verliert sich jedoch infolge einer Translokation.<sup>[81]</sup>

Insgesamt kann gesagt werden, dass die physiologischen Funktionen der häufigsten Translokationspartner nicht hinreichend bekannt sind. Lediglich ihre Fähigkeit, Komplexe zu bilden, ist in der Literatur beschrieben. Aufgrund der chromosomalen Aberration wird diese Fähigkeit mit der Funktion des MLL-Proteins verknüpft, was zu veränderten Wirkungen aufgrund veränderter Lesemuster führt. Vorausgesetzt ist eine *in-frame*-Fusion.

Wie bereits in „Kapitel 1.2.2 Pathophysiologische Folgen des *KMT2A*-Onkogens auf Proteinebene“ beschrieben, ist dabei die Region zwischen Exon 9 und Intron 11 des *KMT2A*-Gens als Bruchstelle beteiligt.<sup>[38]</sup> Die Nomenklatur der Exon- und Intronstruktur basiert hier auf Nilson et al., 1996.<sup>[39]</sup> Solche BCRs gibt es auch in den beschriebenen Translokationspartnern. Das *AFF1*-Gen bricht häufig zwischen Exon 3 und Exon 6.<sup>[82]</sup> Die Nomenklatur der Exon- und Intronstruktur basiert hier auf Nilson et al., 1997.<sup>[82]</sup> Für das *MLLT3*-Gen sind zwei BCRs bekannt. Während sich eine häufige Bruchstelle in Intron 4 befindet, liegt eine zweite BCR zwischen Intron 7 und Intron 8.<sup>[83]</sup> Die Nomenklatur der Exon- und Intronstruktur basiert hier auf Strissel et al., 2000.<sup>[83]</sup>

Abhängig von der genauen Bruchstelle und der Basenabfolge resultieren 13 % aller *KMT2A*-Aberrationen in *in-frame*-Translokationen und somit in funktionalen Proteinen.<sup>[38]</sup> Das bedeutet, dass auch die Translokationspartnerproteine ihre Funktionen zumindest teilweise behalten. In den restlichen Fällen entstehen *out-of-frame*-Fusionen, wobei die Expressionfähigkeit der Translokationspartner zerstört und lediglich ein kürzeres MLL\*-Protein produziert wird.<sup>[38]</sup>

## 1.3 Modelle zur Identifizierung und Inhibition neuer Zielstrukturen in *KMT2A*-rearrangierten Leukämien

### 1.3.1 *in vitro* Modelle

Die in „Kapitel 1.2 Mutationen des *KMT2A*-Gens“ beschriebenen Alterationen auf chromosomaler und auf Proteinebene zeigen, dass allein eine *KMT2A*-Translokation einen erheblichen Einfluss auf die Physiologie einer Zelle nehmen kann. Einher damit geht die Tatsache, dass Patienten mit *KMT2A*-Translokation signifikant weniger zusätzliche Mutationen akkumulieren als andere Patienten mit akuten Leukämien.<sup>[84][85]</sup> *KMT2A*-rearrangierte Zellen entarten also bereits mit weniger kooperierenden Mutationen und eine Leukämie tritt durch einen so starken onkologischen *driver* früher auf. Unterstützt wird dies durch die Tatsache, dass Leukämien mit *KMT2A*-Translokation häufig bei Säuglingen auftreten. Die Latenzzeit der Leukämieentstehung ist hier sehr kurz, sodass sie sich schnell ohne viele zusätzliche Mutationen entwickelt haben.<sup>[86]</sup> Eine Untersuchung der genauen Abläufe der Leukämieentstehung, um die Rolle der *KMT2A*-Translokation hierbei zu verstehen, ist daher interessant. Des Weiteren sind innovative Therapien für eine Erkrankung mit äußerst schlechter Prognose wünschenswert. Eine Möglichkeit zur Identifizierung und nachfolgenden Inhibition neuer Zielstrukturen in *KMT2A*-rearrangierten Leukämien wird benötigt. Die direkten Effekte der *KMT2A*-Translokation auf nachfolgende Signalwege sind hierbei wichtig, um eine direkte Kausalität des künftigen Wirkstoffs für alle Patienten mit dieser Mutation abzuleiten.

Ein erster Ansatz zur möglichen Charakterisierung ist die Verwendung von Patientenzellen. Für genomische Analysen und Momentaufnahmen der Genexpression sind solche Proben unerlässlich und wertvoll. Da hier bereits von einer fulminanten Leukämie ausgegangen werden muss, sind Aussagen über deren Entstehung begrenzt. Außerdem ist hinlänglich bekannt, dass sich Patientenzellen akuter Leukämien nicht oder nur sehr begrenzt in *in vitro* Kulturen halten lassen, bevor Apoptose induziert wird.<sup>[87]-[91]</sup> Von einer Testung möglicher innovativer Therapien an Patientenzellen ist demnach abzusehen.

Eine nächste naheliegende und schnell verfügbare Option sind klassische, kommerzielle Zelllinien. Die Aussagen über die Leukämieentstehung sind hier ebenfalls begrenzt und die genomische Charakterisierung und Analyse der Genexpression sind längst nicht so wertvoll wie die der Patientenzellen. Hier wird lediglich die Limitation eines verfügbaren *in vitro* Testsystems für innovative Wirkstoffe überwunden.<sup>[92]</sup> Eine Übertragbarkeit der Erkenntnisse ist jedoch nicht direkt möglich, da Zelllinien wie auch Patientenzellen stets multiple Mutationen aufweisen. Eine direkte Kausalität der Erkenntnisse zur *KMT2A*-Translokation ist daher nur bedingt möglich.

Forscher sind daher daran interessiert, *in vitro* Modelle zu entwickeln, welche die *KMT2A*-Translokation als Einzelmutation ins Zentrum der Analysen stellen. Eine Charakterisierung nachfolgender Signalwege für mögliche neue therapeutische Angriffspunkte wird so möglich.

Ein ideales Modell kann im Folgenden weiter als Testsystem für mögliche Wirkstoffe dienen. Wenn möglich, ist eine Erweiterung des Modells für kooperative Mutationen anzustreben, um die Abläufe der Leukämieentstehung zu rekapitulieren und die Krankheit möglichst zuverlässig nachzubilden.

### 1.3.2 *in vivo* Modelle

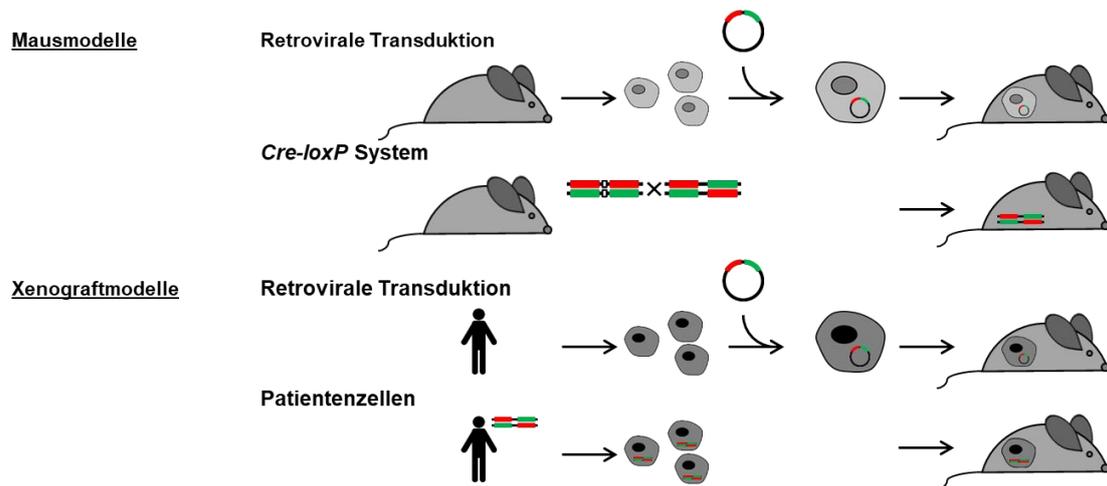
Die unzureichende Verwendbarkeit der *in vitro* Modellsysteme für *KMT2A*-rearrangierte Leukämien, wie Patientenzellen und Zelllinien, führt zur Erwägung von Mausmodellen. Über die Jahre haben sich hier viele verschiedene Variationen der möglichen *in vivo* Modelle herauskristallisiert.

Zum einen kann die Expression eines MLL-Fusionsproteins mittels viraler Transduktion in Mauszellen induziert werden.<sup>[93][94]</sup> Diese Zellen können anschließend in Empfängermäuse transplantiert werden. Solche *knock-in* Modelle geben Aufschluss über das onkologische Potential der Zellen.<sup>[95]</sup> Ist die Mutation ausreichend, um eine Leukämie in der Empfängermaus zu induzieren? Die so generierten Mäuse können im Folgenden auch als Testsystem für Therapeutika dienen.<sup>[95]</sup> Auch die Frage einer nachfolgend veränderten Genexpression kann zumindest eingegrenzt werden. Allerdings werden die Transgene hier in nicht-physiologischen Mengen exprimiert, sodass eine konkrete Aussage über die zelluläre Pathophysiologie eingeschränkt wird.<sup>[95]</sup> Um die Limitation der viralen Mausmodelle hinsichtlich der nicht-physiologischen Expression des MLL-Fusionsproteins zu umgehen, sind endogene Mausmodelle verfügbar. Diese *in vivo KMT2A*-Translokationsmodelle bedienen sich des *Cre-loxP*-Systems und der Induktion mittels Doxycyclin.<sup>[96]-[98]</sup> Solche induzierbaren Modelle können Aufschluss über das onkologische Potential der Zellen geben, indem untersucht wird, ob eine Leukämie in der Empfängermaus induziert wird.<sup>[95]</sup> Weiter können sie ebenso als Testsystem für innovative Therapeutika dienen.<sup>[95]</sup> Die Frage einer nachfolgend veränderten Genexpression kann aufgrund der endogenen Expression besser abgeschätzt werden. Allerdings ist die Cre-Expression abhängig von der spezifischen Zellabstammung und auf bestimmte Untergruppen beschränkt, sodass eine präzise Kontrolle schwer wird.<sup>[95]</sup> Auch die Tatsache, dass die murine Hämatopoese zwar ähnlich zur humanen verläuft, sich aber in zentralen Punkten unterscheidet, trägt dazu bei, dass diese Mausmodelle die humane Erkrankung nur bedingt widerspiegeln können.<sup>[95]</sup> Beispielsweise enthält das periphere Blut in Mäusen viele Lymphozyten, wohingegen das menschliche Blut eher neutrophilenreich ist.<sup>[99]</sup> Aufgrund dieser Limitationen rückt die Verwendung von humanen Zellen in den Vordergrund. Anwendungen hierfür sind Xenograftmodelle von editierten Zellen und Patientenzellen. Für die Entwicklung von Xenograftmodellen können gesunde humane Zellen beispielsweise aus Nabelschnurblut viral transduziert und anschließend in Empfängermäusen verwendet werden.<sup>[100]-[102]</sup> Solche Xenograftmodelle aus genveränderten Zellen können wiederum Auf-

schluss über das onkologische Potential und die Leukämieinduktion der Zellen geben.<sup>[95]</sup> Weiter können sie ebenso als Testsystem für innovative Therapeutika verwendet werden.<sup>[95]</sup> Die Frage einer nachfolgend veränderten Genexpression kann aufgrund der viralen Methode und der daraus folgenden nicht-physiologischen Überexpression schlecht eingeschätzt werden.<sup>[95]</sup> Der Vorteil dieser Methode liegt in der Verwendung humaner Ausgangszellen, deren Physiologie als wesentlich für die exakte Imitation der Leukämieinitiierung gesehen wird.<sup>[95]</sup> Um die Limitation der nicht-physiologischen Überexpression viraler Xenograftmodelle zu überwinden, können patientenabgeleitete Zelllinien oder primäre Patientenzellen in Xenograftmodellen eingesetzt werden.<sup>[95]</sup> Da es sich hier um Patienten mit verschiedenen genetischen Zusammensetzungen, Phänotypen sowie unterschiedlichem Erkrankungsalter handelt, sind randomisierte Studien mit genügend großen Fallzahlen für eine ausreichende statistische Trennschärfe (*power*) nötig.<sup>[103]</sup> Der Charakter eines universellen Modells ist jedoch nicht gegeben. Xenograftmodellen unter der Benutzung humaner Ausgangszellen fehlt im Allgemeinen eine geeignete Mikroumgebung oder Nische für humane Zellen in den Empfängermäusen.<sup>[95]</sup> Daher müssen weitere Anstrengungen, humane Mikroumgebungen in Mäusen zu entwickeln, unternommen werden, um und den bisherigen Goldstandard der NOD-Scid-Gamma (NSG) -Maus für humane Xenograftmodelle zu verbessern.<sup>[104]</sup> Ein Modellsystem, das möglichst alle guten Eigenschaften der bisher etablierten Systeme vereint und die genannten Limitationen überwindet, ist daher erforderlich.

### 1.3.3 Zukunftsorientierte Optimierungen der bisher verwendeten Modellsysteme

Die bisher beschriebenen Modellsysteme (**Abbildung 9**) haben ihre entsprechenden Stärken, beinhalten jedoch auch jeweils Schwächen.<sup>[95]</sup> *In vitro* Modelle haben entweder keine Aussicht auf eine geeignete *in vitro* Testkultur, wie Patientenzellen<sup>[87]-[91]</sup>, oder beinhalten zusätzliche Mutationen, welche die Ergebnisse ebenso beeinflussen können, wie kommerzielle Zelllinien<sup>[92]</sup>. *In vivo* Modelle in Mäusen bedienen sich entweder der murinen Physiologie unter Verwendung muriner Ausgangszellen für virale Genveränderungen oder durch induzierbare Systeme. Da die murine Hämatopoese zwar ähnlich jedoch nicht gänzlich vergleichbar zum humanen Pendant verläuft, können diese Mausmodelle die humane Erkrankung nur bedingt widerspiegeln.<sup>[95]</sup> Virale Methoden führen zudem zu einer nicht-physiologischen Überexpression des Onkogens, sodass die Analyse nachfolgender Signalwege nicht verlässlich ist.<sup>[95]</sup> Xenograftmodelle versuchen den humanen Aspekt in murinen Modellen zu bedienen, wobei die viralen Methoden bislang noch unumgänglich sind. Eine gewünschte Lösung ist demnach ein Modell, dessen Anwendung sich sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eignet. Eine Verwendung von humanem Ausgangsmaterial ist wünschenswert.



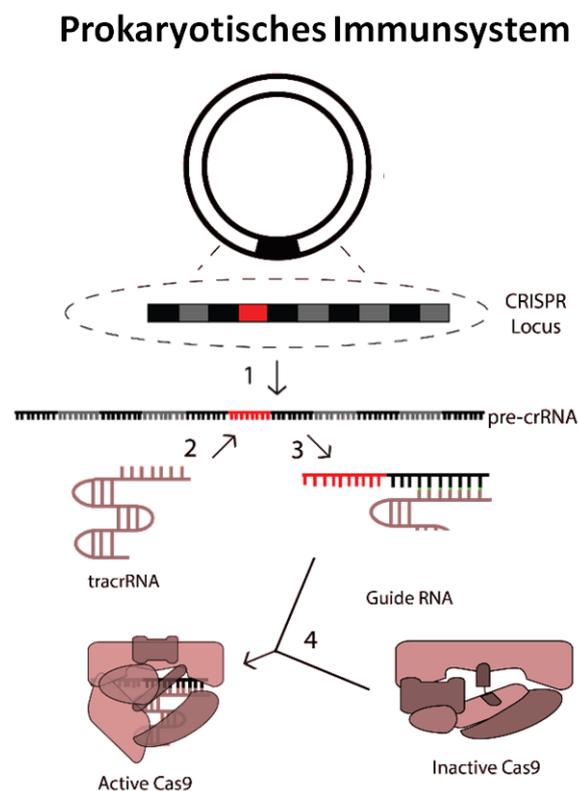
**Abbildung 9: Zusammenfassung bisher verwendeter Modellsysteme.** Gezeigt sind die bisher verwendeten Maus- und Xenograftmodelle. In Mausmodellen werden entweder murine Zellen (hellgrau) viral transduziert, um das Fusionsprotein mittels eines Plasmids (schwarzer Kreis) zu exprimieren, oder die Translokation des *KMT2A*- (rot) und des Translokationspartners (grün) wird mittels *Cre-loxP*-Systems direkt in Mäusen induziert. Durch die Isolation gesunder humaner Zellen (schwarzes Personen-Piktogramm, dunkelgraue Zellen) und die virale Expression des Fusionsproteins (schwarzer Kreis) können Xenograftmodelle etabliert werden. Patientenzellen (schwarzes Personen-Piktogramm und dunkelgraue Zellen mit Translokation) können nicht allein *in vitro* kultiviert werden, sodass auch hier ein Xenograftmodell nötig ist. Gezeichnet nach Informationen aus Milne et al., 2017.<sup>[95]</sup>

Zudem soll keine virale Methodik zur Induktion genetischer Veränderungen verwendet werden. Es besteht die Idee, patientenübliche BCRs mit Nukleasen zu adressieren, um dort Schnittstellen im Genom zu induzieren.<sup>[105]-[107]</sup> Die Translokation soll so, ähnlich der Patientenleukämogenese, induziert werden, aber schließlich von selbst geschehen. Die Vorteile der Verwendung humaner Ausgangszellen, der Induktion der Translokation unter endogenen Promotoren sowie die Möglichkeit, die resultierenden Zellen *in vitro*, in humaner Zytokinumgebung oder gar mit *feeder*-Zellen oder letztendlich in Xenograftmodellen kultivieren zu können, stellen einen großen Fortschritt dar. Schneidawind (früher Büchele) et al. liefern hierzu erste Ergebnisse.<sup>[105]-[107]</sup> Die Verwendung von *transcription activator-like effector nucleases* (TALENs) kann zu einer erfolgreichen Induktion der *t(9;11)*-Translokation führen.<sup>[107]</sup> Die resultierenden Zellen zeigen ein verändertes Wachstumspotential, erhöhtes onkologisches Potential und sind in der Lage, akute Leukämien in Mäusen zu induzieren.<sup>[107]</sup> Die *KMT2A*-rearrangierten Zellen zeigen einen undifferenzierten myelomonozytären Phänotyp und eine *KMT2A*-translokationsspezifische transkriptionelle Signatur.<sup>[107]</sup> Bisher sind die Konzepte jedoch noch von limitierter Effizienz geprägt und technologisch zu verbessern.<sup>[105][106]</sup> Die Verfügbarkeit innovativer Nukleasen kann zur Optimierung dieser vielversprechenden Idee beitragen. Die Methodik wird in „Kapitel 1.4 CRISPR/Cas9-System“ genauer erklärt.

## 1.4 CRISPR/Cas9-System

### 1.4.1 Ursprung des CRISPR/Cas9-Systems

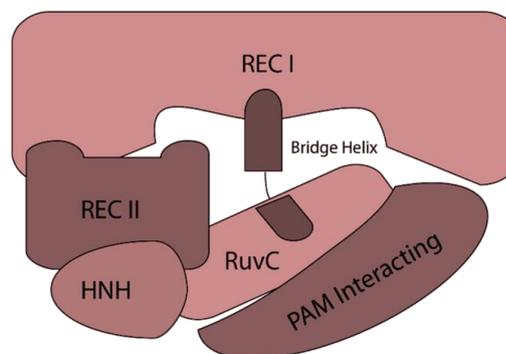
Das *clustered regularly interspaced short palindromic repeat* (CRISPR)/Cas9-System wurde ursprünglich in Prokaryoten gefunden.<sup>[108]</sup> Die Bezeichnung lässt dabei keine Rückschlüsse in Bezug auf dessen Funktion, sondern lediglich auf die Anordnung der DNA-Sequenzen zu (**Abbildung 10**). Lange war die Funktion dieser Sequenzen unbekannt, sodass allein die Struktur den Ausschlag für die Namensgebung gab.<sup>[108]</sup> Nun ist bekannt, dass es sich hierbei um ein adaptives Immunsystem der Prokaryoten gegen Phagen und konjugative Plasmid-Infektionen handelt.<sup>[109]</sup>



**Abbildung 10: Das CRISPR/Cas9-System als prokaryotisches Immunsystem.** Palindromische *repeats* (schwarz), *spacer* (grau, rot), pre-CRISPR-RNA (pre-crRNA), transaktivierende CRISPR-RNA (tracrRNA), CRISPR-assoziiertes Protein (Cas9). Gezeigt sind die Transkription, Prozessierung und Formation der CRISPR/Cas9-Strukturen. Modifiziert nach Cavanagh P. und Garrity A., 2014.<sup>[110]</sup>

Das CRISPR/Cas9-System kann auch als Typ II klassifiziert werden und besteht aus sich wiederholenden palindromischen Sequenzen (*repeats*) von 21 bis 40 Basenpaaren, die durch *spacer*-Sequenzen mit einer Länge von 20 bis 58 Basenpaaren, sogenannte *protospacer*, getrennt sind (**Abbildung 10**).<sup>[110]-[112]</sup> Die Anzahl der Sequenzen variiert von Spezies zu Spezies, aber auf jede *repeat*-Sequenz folgt ein einzigartiger *protospacer*.<sup>[113]</sup> Diese Sequenzen werden entweder durch Vererbung an die Tochtergeneration weitergegeben oder aber häufiger adaptiert.<sup>[113]</sup> Dringt Fremd-DNA in Folge einer Infektion in den Organismus ein, so wird diese prozessiert und die DNA-Fragmente werden mittels CRISPR-assoziierten

Proteinen (Cas1, Cas2, Csn2 und Cas9) zwischen die *spacer*-Sequenzen eingebaut.<sup>[114]</sup> Bei einer erneuten Infektion kann das adaptive Immunsystem wie folgt reagieren: *Protospacer* und *repeats* werden zur *guide* RNA (gRNA) transkribiert und formiert.<sup>[115]</sup> Zunächst enthält die transkribierte pre-CRISPR-RNA (pre-crRNA) die spezifischen *repeats* und *protospacer*. Als nächster Schritt lagert sich eine transaktivierende CRISPR-RNA (tracrRNA) an die pre-crRNA an.<sup>[115]</sup> Eine Spaltung durch Ribonuklease-3 (RNaseIII) mit Hilfe anderer CRISPR-assoziiierter Proteinen bewirkt die Bildung der spezifischen gRNA (**Abbildung 10**).<sup>[115]</sup> Jeder *protospacer* ist immer mit einem *protospacer adjacent motif* (PAM) assoziiert, welches zwischen den Spezies variieren kann.<sup>[116]</sup> Eine weitere wichtige Sequenz für das Immunsystem dieser Prokaryoten ist das CRISPR-assoziierte (Csn1, Cas) Gen, das für das gleichnamige Cas9-Protein (CRISPR-assoziierte Endonuklease 9) kodiert.<sup>[117]</sup> Dieses besteht aus sechs Domänen: REC I, REC II, *bridge helix*, PAM interacting, HNH und RuvC (**Abbildung 11**).<sup>[110]</sup>

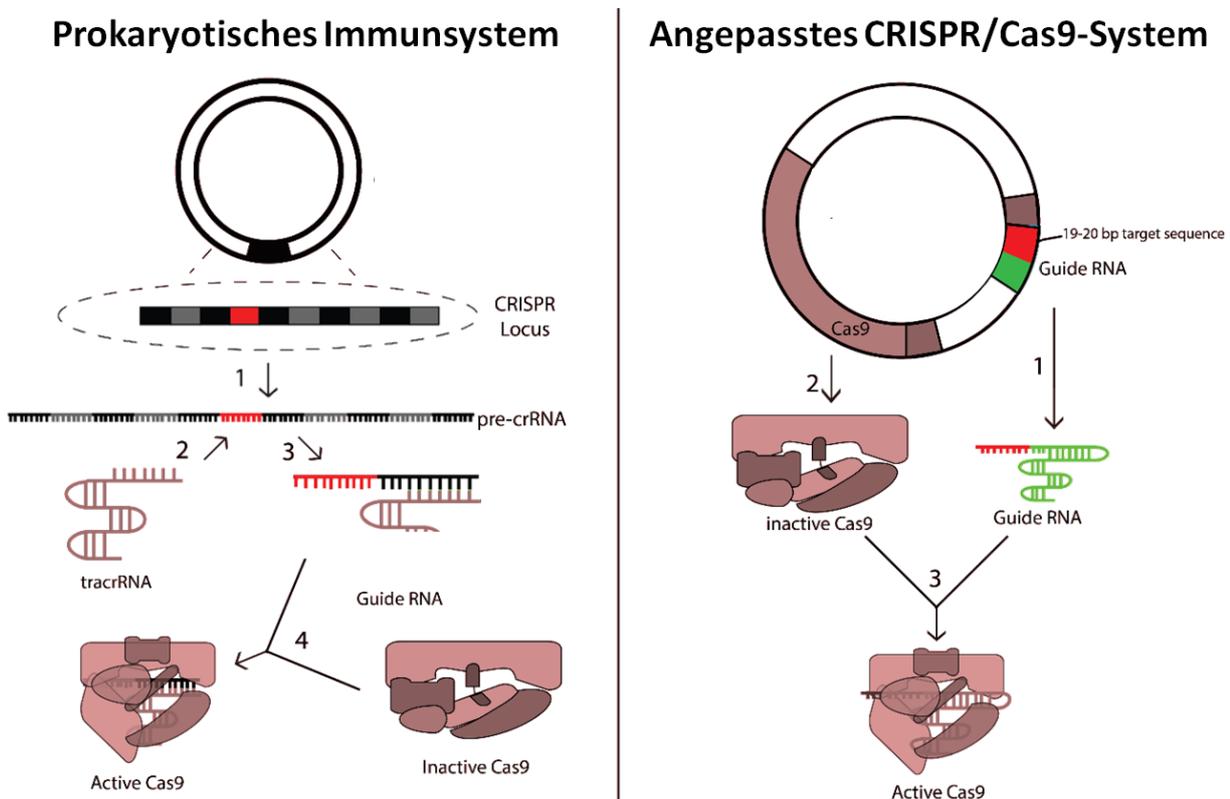


**Abbildung 11: Schematische Abbildung des Cas9-Proteins.** Gezeigt sind alle sechs Protein-Domänen REC I, REC II, *bridge helix*, PAM interacting, HNH und RuvC in inaktiver Konformation. Modifiziert nach Cavanagh P. und Garrity A., 2014.<sup>[110]</sup>

Zur Aktivierung des Immunsystems müssen sich beide Strukturen, gRNA und Cas9-Protein, zu einem Ribonukleoprotein (RNP)-Komplex zusammenlagern.<sup>[118][119]</sup> Sind Sequenzen als „fremd“ hinterlegt, kann eine spezielle gRNA den RNP-Komplex mit der Genschere Cas9 zu dieser Fremd-DNA führen. Durch Bindung der gRNA an das Cas9-Protein kommt eine Konformationsänderung zustande, die eine Aktivierung der Nukleasedomänen nach sich zieht.<sup>[120]</sup> Der genaue Mechanismus der Konformationsänderung ist noch nicht bekannt. Jedoch gibt es Hypothesen von Jinek et al., 2014, dass entweder sterische Gründe oder schwache Wechselwirkungen zwischen Protein und RNA zur Konformationsänderung beitragen.<sup>[120]</sup> Bei Zusammenlagerung des CRISPR/Cas9-Komplexes mit der Fremd-DNA kann somit ein Doppelstrangbruch (DSB) mit anschließendem Abbau der Fremd-DNA bewirkt werden.<sup>[110][121]</sup>

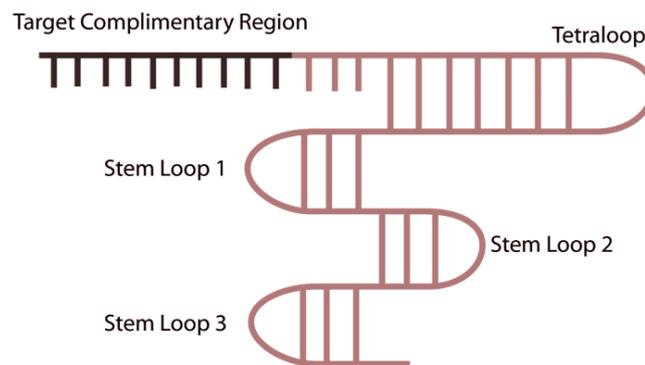
### 1.4.2 Anpassungen für die Verwendung des CRISPR/Cas9-Systems zur Genomeditierung *in vitro*

Das in Prokaryoten gefundene System kann durch geeignete Anpassung für vielfältige Zwecke in der Forschung eingesetzt werden. Im Bereich der Genomeditierung können Gene mittels dafür entworfener gRNA adressiert und schließlich modifiziert werden. Das System kann hierbei sehr variabel in vielerlei Zielzellen eingesetzt werden. Den größten Unterschied der technischen Verwirklichung zum natürlichen Weg stellt die chimäre *single guide* RNA (sgRNA) dar.<sup>[122]</sup> Dabei wird die crRNA mit der tracrRNA kovalent fusioniert und ist so nicht nur durch komplementäre Basen mittels Wechselwirkungen verbunden (**Abbildung 12**).<sup>[122]</sup>



**Abbildung 12: Das prokaryotische CRISPR/Cas9-Immunsystem gegenüber der Anpassungen für *in vitro* Anwendungen.** Palindromische *repeats* (schwarz), *spacer* (grau, rot), pre-CRISPR-RNA (pre-crRNA), transaktivierende CRISPR-RNA (tracrRNA), CRISPR-assoziiertes Protein (Cas9), kovalent verknüpfte *single guide* RNA (rot, grün). Gezeigt sind die Transkription, Prozessierung und Formation der CRISPR/Cas9-Strukturen gegenüber der plasmid-basierten Expression der CRISPR/Cas9-Strukturen für *in vitro* Anwendungen. Modifiziert nach Cavanagh P. und Garrity A., 2014.<sup>[110]</sup>

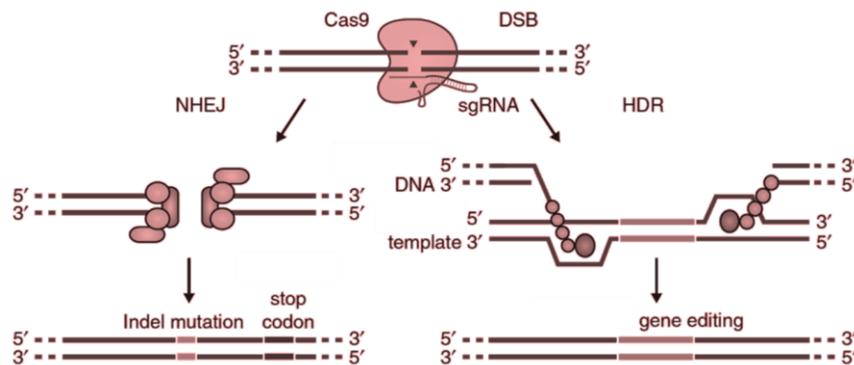
Die T-Form besteht dabei aus drei *stem loops* und einem *tetraloop*, welche aus der ursprünglichen tracrRNA abgeleitet sind, sowie der 19-20 Basenpaar langen spezifischen Region, die, vergleichbar zur crRNA, komplementär zur Ziel-Sequenz ist (*target complementary region*) (**Abbildung 13**).<sup>[116]</sup> Die so entwickelte sgRNA interagiert mit dem Cas9-Protein in der Zielzelle. Daraufhin wird die Ziel-DNA im Genom auf zufällige Art und Weise gesucht.<sup>[123]</sup> Diese muss eine bestimmte Sequenz, eine zwei bis drei Basenpaare lange PAM-Sequenz besitzen, um erkannt zu werden.<sup>[122][124]</sup>



**Abbildung 13: Schematische Abbildung der sgRNA.** Gezeigt sind *stem loop 1-3* und *tetraloop* abgeleitet aus *tracrRNA* (hell) sowie *target complementary region* abgeleitet aus *crRNA* (dunkel). Modifiziert nach Cavanagh P. und Garrity A., 2014.<sup>[110][116]</sup>

Diese Sequenz befindet sich ein Nukleotid *downstream* der zur sgRNA komplementären Region (Cas9 aus *Streptococcus pyogenes*: 5'-NGG).<sup>[125]</sup> Beim Design des CRISPR/Cas9-Systems muss beachtet werden, dass die Sequenz der sgRNA und des PAM komplementär zur Ziel-DNA gewählt wird. Dann ist das Cas9-Protein, genauer die *PAM-interacting*-Domäne, in der Lage, die Basenpaare der DNA *upstream* des PAM zu trennen und die *target-complementary region* der sgRNA kann sich mit der Ziel-DNA verbinden.<sup>[123]</sup> Anschließend können die Nukleasedomänen, RuvC und HNH, einen DSB in der Ziel-DNA nach der dritten Base *upstream* des PAM induzieren.<sup>[116]</sup> Wie auch in anderen Proteinen sind die HNH- und RuvC-Domänen des Cas9-Proteins in der Lage, einzelsträngige DNA zu schneiden und weisen eine hohe Homologie zu anderen HNH- und RuvC-Domänen auf.<sup>[119][126]-[129]</sup> Dabei schneidet die HNH-Domäne den zur gRNA komplementären DNA-Strang, wobei die RuvC-Domäne den nicht-komplementären Strang schneidet.<sup>[119]</sup> So kann die genaue zu adressierende Stelle im Genom ermittelt werden.

Eine Editierung des Genoms kann nun über mehrere Möglichkeiten der DNA-Reparatur erfolgen (**Abbildung 14**). Wird ein DSB induziert, muss dieser für das Überleben der Zelle wieder geschlossen werden, wobei Modifikationen eingebracht werden können. Über nicht-homologe Endverknüpfung (*non-homologous end joining*, NHEJ) repariert die Zelle den DSB alleine und zufällig.<sup>[130]</sup> Mutationen entstehen durch Einbau und Deletion (*insertion/deletion*, *indel*) zufälliger Basenpaare. Dies kann zu *Gen-knock-outs* führen, indem ein *frame shift* eingeleitet oder ein frühzeitiger *stop codon* eingebaut wird.<sup>[124]</sup> Eine weitere Möglichkeit, Mutationen in ein bestimmtes Gen einzubringen, ist die Homologie-gerichtete Reparatur (*homology-directed repair*, HDR).<sup>[131]</sup> Hierbei soll die DNA anhand von präziser, dafür konzipierter DNA-Korrekturvorgängen repariert werden. Dieser Vorgang wird also dazu benutzt, einen Basenaustausch oder einen *Gen-knock-in* durchzuführen. Es können neben doppelsträngigen (*double stranded*, ds) DNA-Vorlagen auch einzelsträngige (*single stranded*, ss) Oligodesoxynukleotide (ODN) oder virale Plasmide (*adeno-associated virus*, AAV) verwendet werden.<sup>[124][132][133]</sup>



**Abbildung 14: Genome editing durch Reparatur von DSB.** Doppelstrangbruch (DSB), *single guide* RNA (sgRNA), nichthomologe Endverknüpfung (*non-homologous end joining*, NHEJ), Homologiegerichtete Reparatur (*homology-directed repair*, HDR), Korrekturvorlage (*template*), Einbau und Deletion (*insertion/deletion*, *indel*), Genomeditierung (*gene editing*). Gezeigt ist die Reparatur der DSB über NHEJ und zufällige *indel*-Mutationen mit resultierendem *frame shift* oder *stop codon* und *Gen-knock-out* sowie über HDR durch präzise Reparatur anhand einer DNA-Korrekturvorlage mit resultierendem Basenaustausch oder *Gen-knock-in*. Modifiziert nach Ran et al., 2013.<sup>[124]</sup>

Weitere Möglichkeiten bietet das CRISPR/Cas9-System für die Genomeditierung durch Modifikationen des Cas9-Proteins. Bei entsprechender Mutation (Deletion einer Domäne des Cas9) können auch nur Einzelstrangbrüche (ESB) durchgeführt werden. So entsteht aus dem Cas9-Protein eine DNA-Nickase, die in der Lage ist ESB statt DSB mit gleichbleibender Spezifität durchzuführen.<sup>[134]</sup> Des Weiteren kann die Nuklease-Aktivität des Cas9-Proteins gänzlich deaktiviert werden, wobei zusätzlich eine Fusion zu einer Cytidin-Deaminase eingeführt wird. So kann die Spezifität des Cas9-Proteins für einen Ein-Basen-Austausch mittels Deaminaseaktivität verwendet werden.<sup>[135][136]</sup>

### 1.4.3 Möglichkeiten der genetischen Veränderung von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen

Damit der Einsatz beider Bestandteile des CRISPR/Cas9-Systems in Zielzellen gewährleistet ist, muss die Effizienz für jeden Organismus bzw. für jede Zielzelle spezifisch angepasst werden. Es besteht die Möglichkeit, sgRNA und Cas9-Protein auf je einem Plasmid oder auf einem gemeinsamen Plasmid in den Zielzellen zu exprimieren. Hierfür ist ein Kodon-optimiertes Cas9-Protein essenziell.<sup>[131]</sup> Der Vorteil hierbei ist das technisch einfache Einbringen von Plasmiden in Zielzellen. Jedoch muss die Zelle in der Lage sein, das CRISPR/Cas9-System selbst zu exprimieren. Um die Effizienz in humanen CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen (*hematopoietic stem and progenitor cells*, HSPCs) zu erhöhen, etablierten Gundry et al., 2016 ein Protokoll zur Nukleofektion des formierten und aktivierten RNP-Komplexes. Die Effizienz der DSB konnte so erheblich gesteigert werden.<sup>[137]</sup>

## 1.5 Ziele der Arbeit

Das *KMT2A*-Protoonkogen ist ein häufiges Ziel für chromosomale Translokationen. Eine *KMT2A*-Translokation kommt in 10 % aller Leukämien<sup>[138]</sup> und in 80 % aller Leukämien im Kleinkindesalter<sup>[38]</sup> vor. Trotz der Anwendung von aggressiven Therapieregimes sind *KMT2A*-rearrangierte Leukämien noch immer mit einer schlechten Prognose assoziiert.<sup>[2][22][138]</sup> Die Entwicklung innovativer therapeutischer Strategien ist daher dringend erforderlich.

Physiologisch kodiert das *KMT2A*-Gen für eine Histon-Methyltransferase, die sich mit weiteren Proteinen zu einem großen nukleären Proteinkomplex zusammensetzt und dabei die epigenetische Expression von verschiedenen Genen reguliert, welche für die Hämatopoese wesentlich sind.<sup>[25]-[27][30]-[35]</sup> Als Folge chromosomaler Translokationen erwirbt das *KMT2A*-Gen durch eine Fusion mit verschiedenen Translokationspartnergenen, wie *AFF1* und *MLLT3*, neue Funktionalitäten.<sup>[30][45]</sup>

Unterschiedliche Modellsysteme sind bereits entwickelt, um die Rolle der MLL-Fusionsproteine als transkriptionelle und epigenetische Schlüsselregulatoren der leukämischen Pathogenese zu charakterisieren.<sup>[93]-[98]</sup> Jedoch beruhen die bisherigen Modelle hauptsächlich auf Mausmodellen und sind daher von eingeschränkter Aussagekraft, da es signifikante Unterschiede zwischen den genetischen Profilen von Maus und Mensch gibt.<sup>[99]</sup> Auch die Verwendung von menschlichen Zellen spiegelt nicht die eigentliche Krankheitsbiologie wider. Hier werden hauptsächlich virale Onkogene mit supraphysiologischen Expressionen eingesetzt, die zu unvorhersehbaren biologischen Effekten in der Zelle führen.<sup>[95][100]-[102]</sup> Bei der Verwendung von primären Patientenzellen werden fast ausschließlich Xenograftmodelle genutzt, da Patientenzellen bekanntermaßen in *in vitro* Kulturen rasch ausdifferenzieren und die Apoptose induziert wird.<sup>[87]-[91][103]</sup> Schneidawind (früher Büchele) et al. liefern erste Erkenntnisse für ein humanes *KMT2A*-Translokationsmodell, in dem die Mutation induziert wird und so die Onkogenexpression unter endogenen Promotoren verläuft.<sup>[105]-[107]</sup> Limitationen hinsichtlich der Effizienz beschränken bisher die Verwendbarkeit des Modells.<sup>[106][107]</sup>

Das CRISPR/Cas9-System bietet eine innovative Form der Genomeditierung, indem Gene mittels dafür entworfener sgRNA adressiert und schließlich mittels der Nuklease Cas9 modifiziert werden können.<sup>[116][122]-[124][130][131]</sup> Das System kann sehr variabel in vielerlei Zielzellen eingesetzt werden und stellt eine Verbesserung gegenüber herkömmlicher Nukleasen wie Zink-Finger-Nukleasen (ZFN) und TALENs dar.

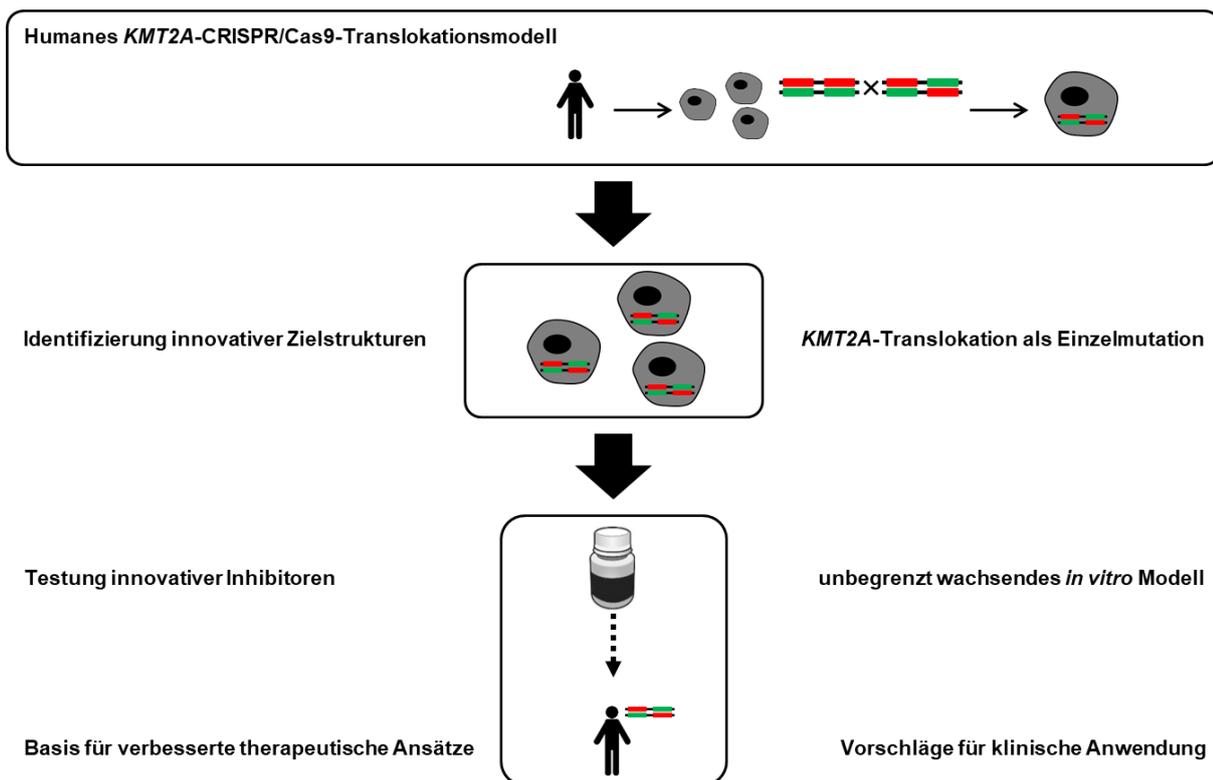
In dieser Arbeit soll folglich das CRISPR/Cas9-System zur Etablierung eines humanen *KMT2A*-CRISPR/Cas9-Translokationsmodells verwendet werden, das molekulargenetisch, phänotypisch und morphologisch *KMT2A*-rearrangierten Patientenzellen ähnelt. Die MLL-Fusion soll hierbei patientengetreu als Komplettranslokation in humanen CD34<sup>+</sup>-Nabelschnurblutstammzellen imitiert werden. Dabei steht die Expression des Onkogens unter der Kontrolle des endogenen Promoters. Die CRISPR/Cas9-generierten *KMT2A*-

## Einleitung

rearrangierten Zellen sollen anschließend charakterisiert und mit Patientenzellen verglichen werden. Hinsichtlich bekannter Parameter kann so die Verlässlichkeit des Modells gewährleistet werden.

Als besonderer Vorteil können so innovative Zielstrukturen für spätere therapeutische Ansätze aufgrund der *KMT2A*-Translokation als Einzelmutation identifiziert und validiert werden. Im Folgenden eignet sich das *KMT2A*-CRISPR/Cas9-Translokationsmodell idealerweise als explorative Plattform zur Testung dieser therapeutischen Zielstrukturen.

Die Inhibition der bekannten *KMT2A*-translokationsspezifischen Zielstruktur der Methyltransferase DOT1L zeigt keine ausreichende Effektivität in klinischen Studien.<sup>[49]</sup> Eine Verbesserung der therapeutischen Strategie unter Verwendung eines PRMT5-Inhibitors<sup>[50]</sup> in Kombination soll in CRISPR/Cas9-generierten *KMT2A*-rearrangierten Zellen getestet werden und könnte neue Erkenntnisse diesbezüglich liefern. Des Weiteren sollen weitere innovative Zielstrukturen zur Verbesserung der therapeutischen Möglichkeiten identifiziert und deren Inhibition getestet werden. Ein schematischer Überblick der Zielsetzung ist in **Abbildung 15** dargestellt.



**Abbildung 15: Schematischer Überblick der Zielsetzung.** Gezeigt ist die Etablierung des *KMT2A*-CRISPR/Cas9-Translokationsmodells aus gesunden humanen Stamm- und Vorläuferzellen (schwarzes Personen-Piktogramm, graue Zellen). Die DSB im *KMT2A*- (rot) und Translokationspartnergen (grün) führen zur Translokation und einer onkologischen Transformation. Nach der Generierung einer reinen Zellpopulation folgt die Charakterisierung. Die nachfolgenden Effekte der *KMT2A*-Translokation als Einzelmutation tragen zur Identifizierung innovativer Zielstrukturen bei. Das unbegrenzt wachsende *in vitro* Modell kann im Folgenden zur Testung innovativer Inhibitoren verwendet werden. Die Erkenntnisse stellen eine Basis für verbesserte therapeutische Ansätze dar und werden für eine klinische Anwendung vorgeschlagen.

## 2 Material

### 2.1 Bakterienstämme, Zelllinien und Primärzellen

**Tabelle 8: Bakterienstämme, Zelllinien und Primärzellen**

American Type Culture Collection (ATCC); Genetik: Gesamtchromosomenanzahl, Geschlechtschromosomen, betroffene Chromosomen und Art der Abnormalität, Bande; fehlend (-), zusätzlich (+), Markerchromosom (*mar*), Deletion (*del*), Derivat (*der*), Translokation (*t*), Addition (*add*), Isochromosom (*i*)

Bezeichnung	Herkunft, Hauptsitz
mononukleäre Zellen aus Nabelschnurblut ( <i>cord blood mononuclear cells</i> , CBMCs)	Ethikvotum 751/2015BO2 der Ethikkommission der Universität Tübingen, in Kooperation mit der Abteilung Kinderheilkunde IV – Neonatologie des Universitätsklinikums Tübingen
K562	ATCC, Manassas, Vereinigte Staaten von Amerika
Klassifikation	CML
Genetik	61-68<3n>XX, -X, -3, +7, -13, -18, +3 <i>mar</i> , <i>del</i> (9)(p11/13), <i>der</i> (14)t(14;?)(p11;?), <i>der</i> (17)t(17;?)(p11/13;?), <i>der</i> (?18)t(15;?18)(q21;?q12), <i>del</i> (X)(p22)
SKM-1	ATCC, Manassas, Vereinigte Staaten von Amerika
Klassifikation	AML M5
Genetik	43(38-43)<2n>XY, +1, -12, -14, -20, -21, t(1;19)(q21;q13), <i>del</i> (2)(p11), <i>del</i> (9)(q12), <i>add</i> (17)(p1?) - sideline mit idem, <i>der</i> (10)t(10;?21)(p11;q11), -21
SEM	ATCC, Manassas, Vereinigte Staaten von Amerika
Klassifikation	ALL
Genetik	45(40-46)<2n>XX, -13, t(4;11)(q21;q23), <i>del</i> (7)(p14)
THP-1	ATCC, Manassas, Vereinigte Staaten von Amerika
Klassifikation	AML M5
Genetik	94(88-96)<4n>XY/XXY, -Y, +1, +3, +6, +6, -8, -13, -19, -22, -22, +2 <i>mar</i> , <i>add</i> (1)(p11), <i>del</i> (1)(q42.2), <i>i</i> (2q), <i>del</i> (6)(p21)x2-4, <i>i</i> (7p), <i>der</i> (9)t(9;11)(p22;q23)i(9)(p10)x2, <i>der</i> (11)t(9;11)(p22;q23)x2, <i>add</i> (12)(q24)x1-2, <i>der</i> (13)t(8;13)(p11;p12), <i>add</i> (?18)(q21)
Mono-Mac-6	ATCC, Manassas, Vereinigte Staaten von Amerika
Klassifikation	AML M5
Genetik	84-90<4n>XX/XXX, -Y, +6, +7, -12, -13, -13, -16, -16, +2 <i>mar</i> , t(9;11)(p22;q23)x2, <i>add</i> (10)(p11)x2, <i>add</i> (12)(q21), <i>del</i> (13)(q13q14) <i>der</i> (13)t(13;14)(p11;q12)x2, <i>der</i> (17)t(13;17)(q21;p11)x2
<i>E.coli</i> DH5 $\alpha$ Competent Cells	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika

### 2.2 Software

**Tabelle 9: Software**

Bezeichnung	Hersteller, Hauptsitz
CRISPRscan <sup>[139]</sup>	Giraldez Lab, Yale, Vereinigte Staaten von Amerika
DESeq2 V1.18.1 <sup>[140]</sup>	Bioconductor, Buffalo, Vereinigte Staaten von Amerika
Ensembl genome browser 97 <sup>[141]</sup>	Europäisches Institut für Bioinformatik, Hinxton, Vereinigtes Königreich
FACS DIVA	BD Biosciences, Franklin Lakes, Vereinigte Staaten von Amerika
FastQC V0.11.4	Babraham Bioinformatics, Cambridge, Vereinigtes Königreich
FlowJo V10	TreeStar, FlowJo LLC, Ashland, Vereinigte Staaten von Amerika
GenomicAlignments V1.14.2 <sup>[140]</sup>	Bioconductor, Buffalo, Vereinigte Staaten von Amerika
Gen V2.0 Data Analysis Software	BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall, Deutschland
GraphPad PRISM 8	GraphPad Software Inc., San Diego Vereinigte Staaten von Amerika
GSEA V3.0 <sup>[142][143]</sup>	Broad Institute, Inc., Cambridge, Vereinigte Staaten von Amerika
Ikaros Karyotypisierungssystem	MetaSystems Hard & Software GmbH, Altlußheim, Deutschland
ImageJ 1.48v	National Institutes of Health, Bethesda, Vereinigte Staaten von Amerika
ImageStudio Lite V5.2	Li-Cor Biosciences Inc., Lincoln, Vereinigte Staaten von Amerika
MSigDB database V7.0 <sup>[143][144]</sup>	Broad Institute, Inc., Cambridge, Vereinigte Staaten von Amerika
NCBI's Gene Expression Omnibus <sup>[145][146]</sup>	National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Vereinigte Staaten von Amerika
NIS elements	Nikon Corporation, Tokyo, Japan
Primer3web Version 4.1.0 <sup>[147][148][149]</sup>	National Institutes of Health, Bethesda, Vereinigte Staaten von Amerika
Samtools V1.1	Genome Research Limited, Hinxton, Vereinigtes Königreich
STAR V2.5.4b	GitHub, Inc., San Francisco, Vereinigte Staaten von Amerika
Surrogate variable analysis V3.26.0 <sup>[140]</sup>	Bioconductor, Buffalo, Vereinigte Staaten von Amerika
ZEN 3.0 blue edition	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland

## 2.3 Geräte

**Tabelle 10: Geräte**

Bezeichnung	Hersteller, Hauptsitz
Abzüge <i>Niedrigraum-Tischabzug Scala</i>	WALDNER Laboreinrichtungen GmbH & Co. KG, Wangen, Deutschland
Autoklav	Wesa AG, Eupen, Belgien
Bunsenbrenner	Carl Friedrich Usbeck KG, Radevormwald, Deutschland
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
Elektroporationssysteme <i>Lonza 4D-Nucleofector</i>	Lonza Group AG, Basel, Schweiz
Fluoreszenz-Reader <i>Synergy HTX Multi-Mode Reader.</i>	BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall, Deutschland
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</i> <i>Axiocam 105 color</i>	Nikon Corporation, Tokyo, Japan Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Kühlgeräte <i>BIOSAFE 420</i> <i>+ BIOSAFE Control B</i> <i>HERAfreeze HFU B Serie</i> <i>-86 °C-Ultratiefkühlschrank</i> <i>Liebherr premium</i> <i>-20 °C und 4 °C</i>	Cryotherm GmbH & Co. KG, Kirchen, Deutschland Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß, Deutschland
Magnete <i>MidiMACS Separator</i>	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Mikroskope <i>Nikon Eclipse TS100</i> <i>Zeiss Primovert</i> <i>Zeiss Axiovert 25</i> <i>Zeiss Axio Imager M2</i> <i>Zeiss Axiophot</i>	Nikon Corporation, Tokyo, Japan Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Mikrowelle <i>LG MG-3822G</i>	LG Electronics Inc., Seoul, Südkorea
Mischer <i>IKA KS250 basic</i> <i>IKA MS2 Minishaker</i> <i>Sunlab Rollenmischer</i> <i>SU1400 D-8400</i>	IKA-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland IKA-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Objektträgerverarbeitungssystem <i>Vysis HYBrite Hybridization System</i>	Abbott Laboratories AG, Chicago, Vereinigte Staaten von Amerika
Photometer <i>NanoDrop 2000c</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
Pipettierhilfen <i>Pipetboy</i> <i>MultipetteE3</i> <i>Eppendorf Research plus</i>	INTEGRA Biosciences AG, Zizers, Schweiz Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Reinstwasseranlage <i>TKA GenPure</i>	TKA Wasseraufbereitungssysteme GmbH, Niederelbert, Deutschland
Rühr-Heiz-Platten <i>IKA Magnetrührer RCT basic</i>	IKA-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland
Sterilbänke <i>HS 18/2</i> <i>LaminAir HBB 2448</i>	Heraeus Instruments, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland Heraeus Instruments, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Thermocycler <i>T100 Thermal 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
Ultraschallbad <i>Sonorex Super RK 255 H</i> <i>Sonopuls Serie 2000</i>	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
UV-Tisch <i>Transilluminator UST-20M-BE</i>	biostep GmbH, Burkhardtsdorf, Deutschland
Vakuumpumpe <i>VACUSAFE</i>	INTEGRA Biosciences AG, Zizers, Schweiz
Waagen <i>M-prove</i> d = 0,01 g <i>AT261 DeltaRangeFact</i> d = 0,01 mg	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
Wasserbäder <i>GFL 1083</i>	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Western-Blot Mini Trans-Blot Cell Odyssey CLx	Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, Vereinigte Staaten von Amerika Li-Cor Biosciences Inc., Lincoln, Vereinigte Staaten von Amerika
Zählkammer <i>Neubauer-Zählkammer</i>	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

## 2.4 Verbrauchsmaterial

**Tabelle 11: Verbrauchsmaterial**

Bezeichnung	Hersteller, Hauptsitz
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
Einfriereröhrchen <i>Cryo.s 2 mL</i>	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Einmalhandschuhe S, M, L	PAUL HARTMANN AG, Heidenheim, Deutschland
Filterkarten <i>Shandon FilterCards</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
Filterpapier <i>Whatman 50x60cm</i> <i>Gel blot paper GB003</i>	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Glaspipetten <i>Pasteur Capillary Pipettes</i> 230 mm	Wilhelm Ulbrich GdB, Bamberg, Deutschland
Kanülen <i>Microlance 3 1,2 x 40 mm</i>	Becton Dickinson, Franklin Lakes, Vereinigte Staaten von Amerika
Membran <i>Immobilon-FL PVDF, 0,45 µm,</i> 26,5 cm x 3,75 m-Rolle	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Mikroreaktionsgefäße 0,5 mL, 1,5 mL, 2 mL	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

## Material

Objektträger <i>SuperFrost</i> <i>SuperFrost Plus</i>	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland
Pipettenspitzen <i>TipOne</i> 10 µL, 100 µL, 200 µL <i>Biosphere</i> 1250 µL	STARLAB INTERNATIONAL GmbH, Hamburg, Deutschland SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Rundbodenröhrchen 5 mL	Corning Incorporated, New York, Vereinigte Staaten von Amerika
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 <sup>2</sup>	Corning Incorporated, New York, Vereinigte Staaten von Amerika
Zellkulturplatten 96-Well, Flachboden 96-Well, Rundboden 48-Well, Flachboden 24-Well, Flachboden	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland Corning Incorporated, New York, Vereinigte Staaten von Amerika Corning Incorporated, New York, Vereinigte Staaten von Amerika
Zellkulturschalen 35 x 10 mm 145 x 20 mm	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zentrifugenröhrchen 15 mL, 50 mL	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

## 2.5 Chemikalien, verbrauchsfertige Reagenzien und Kitsysteme

**Tabelle 12: Chemikalien, verbrauchsfertige Reagenzien und Kitsysteme**

Bezeichnung	Hersteller, Hauptsitz
<i>AccuPrime Pfx DNA Polymerase</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
<i>Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)</i>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<i>Agar-Agar, BioScience</i>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<i>Albumin Fraktion V, proteasefrei Bovines Serumalbumin (BSA)</i>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<i>Ammoniumpersulphat (APS)</i>	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
<i>SeaKem LE Agarose</i>	Lonza Group AG, Basel, Schweiz
<i>alamarBlue</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
<i>Ampicillin</i>	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Vereinigte Staaten von Amerika
<i>ARA-cell</i>	STADA GmbH, Bad Vilbel, Deutschland
<i>Biocoll Separating Solution</i> 1,077 g/mL	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
<i>β-Mercaptoethanol</i>	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Vereinigte Staaten von Amerika
<i>Bromphenolblau Natriumsalz</i>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<i>Cas9 with NLS</i>	PNAbio Inc., Thousand Oaks, Vereinigte Staaten von Amerika
<i>CD34 MicroBead Kit UltraPure, human</i>	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
<i>Complete tablets Mini Easypack</i> 30 tablets	Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
<i>CryoStor CS10</i>	STEMCELL Technologies Inc., Vancouver, Kanada
<i>Dimethylsulfoxide (DMSO)</i>	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
<i>Dinatriumhydrogenphosphat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)</i>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)</i>	gibco, Life Technologies Limited AG, Paisley, Vereinigtes Königreich
<i>dNTP Mix</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
<i>Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)</i>	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

<i>Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)</i>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<i>EPZ004777</i>	Tocris Bioscience, Bristol, Vereinigtes Königreich
<i>EPZ015666</i>	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Vereinigte Staaten von Amerika
<i>EPZ015938</i>	Selleck Chemicals LLC, Houston, Vereinigte Staaten von Amerika
<i>EPZ5676</i>	Selleck Chemicals LLC, Houston, Vereinigte Staaten von Amerika
<i>Essigsäure 100 % (CH<sub>3</sub>COOH)</i>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<i>Ethanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH)</i>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<i>Euparal</i>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<i>FcR Blocking Reagent</i>	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
<i>Fetales Kälberserum (fetal bovine serum, FBS)</i>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<i>FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit</i>	BD Biosciences, Franklin Lakes, Vereinigte Staaten von Amerika
<i>Fixogum (Rubber Cement)</i>	Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland
<i>Formaldehydlösung 4 %, gepuffert, pH 6,9</i>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<i>FITC BrdU Flow Kit</i>	BD Biosciences, Franklin Lakes, Vereinigte Staaten von Amerika
<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
<i>Giemsa's Azur-Eosin-Methylenblaulösung</i>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<i>L-Glutamine (200 mM)</i>	Lonza Group AG, Basel, Schweiz
<i>Glycerol</i>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<i>Glycin</i>	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
<i>Heparin-Natrium-25000</i>	Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
<i>HEPES</i>	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Vereinigte Staaten von Amerika
<i>Insulin solution human</i>	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Vereinigte Staaten von Amerika
<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)</i>	Lonza Group AG, Basel, Schweiz
<i>Kaliumchlorid (KCl)</i>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<i>Kaliumdihydrogenphosphat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)</i>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, 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>Latex beads 3,0 µm</i>	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Vereinigte Staaten von Amerika
<i>LB-Medium (Lennox)</i>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<i>Magnesiumchlorid (MgCl<sub>2</sub>)</i>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<i>Maxima SYBR Green qPCR Master Mix</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
<i>May-Grünwalds Eosin-Methylenblaulösung modifiziert</i>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<i>Methanol (CH<sub>3</sub>OH)</i>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<i>MethoCult H4230</i>	STEMCELL Technologies Inc., Vancouver, Kanada
<i>MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100X) (NEAA)</i>	gibco, Life Technologies Limited AG, Paisley, Vereinigtes Königreich
<i>Milchpulver</i>	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
<i>MLL Breakapart probe</i>	Cytocell Limited, Cambridge, Vereinigtes Königreich
<i>Natriumazid (NaN<sub>3</sub>)</i>	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Vereinigte Staaten von Amerika
<i>Natriumchlorid (NaCl)</i>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<i>(tri-)Natriumcitrat</i>	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Vereinigte Staaten von Amerika
<i>Natriumdiphosphat (Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>)</i>	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Vereinigte Staaten von Amerika
<i>Natriumdesoxycholat (DOC)</i>	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Vereinigte Staaten von Amerika
<i>Natrium-Dodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate, SDS)</i>	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
<i>Natriumfluorid (NaF)</i>	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Vereinigte Staaten von Amerika

## Material

<i>Natriumpyruvate (100 mM)</i>	gibco, Life Technologies Limited AG, Paisley, Vereinigtes Königreich
<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>NP40</i>	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, 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>PageRuler Plus Prestained Protein Ladder</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
<i>Penicillin-Streptomycin 10.000 U/mL (P/S)</i>	Lonza Group AG, Basel, Schweiz
<i>PF-9366</i>	Carbosynth Ltd., Berkshire, Vereinigtes Königreich
<i>QuantSeq 3' mRNA-Seq Library Prep Kit FWD</i>	Lexogen GmbH, Wien, Österreich
<i>Random Hexamers</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
<i>RevertAid H Minus Reverse Transcriptase</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
<i>Salzsäure rauchend 37 % (HCl)</i>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<i>Sucrose</i>	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Vereinigte Staaten von Amerika
<i>T7 Endonuclease I</i>	New England Biolabs Inc., Ipswich, Vereinigte Staaten von Amerika
<i>Tetramethylethyldiamin (TEMED)</i>	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
<i>TRIS-acetat</i>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<i>TRIS-HCl</i>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, 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
<i>Trypan Blue solution 0.4 %</i>	Sigma Aldrich Corporation, St. Louis, Vereinigte Staaten von Amerika
<i>Trypsin-EDTA (0.25 %), phenol red</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
<i>Tween20</i>	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
<i>Wasser</i>	
für Chromatographie nukleasefrei	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
<i>Xylencyanol FF</i>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<i>Zellzusätze</i>	
<i>SR-1, UM-729</i>	STEMCELL Technologies Inc., Vancouver, Kanada
<i>Zytokine</i>	
<i>FLT3-L, SCF, TPO, G-CSF, IL-3, IL-6</i>	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 &amp; Concentrator Kit</i>	Zymo Research, Irvine, Vereinigte Staaten von Amerika

## 2.6 Rezepturen für Puffer und Medien

**Tabelle 13: Rezepturen für Puffer und Medien**

Bezeichnung	Zusammensetzung
2 % Agarose-Gel	TAE-Puffer 2 % Agarose 1:10.000 GelRed
2 x Natriumcitrat-Puffer	0,3 M NaCl 30 mM tri-Natriumcitrat pH 7.0 mit HCl
4x Lämmli-Puffer	H <sub>2</sub> O 25 mM TRIS-HCl pH 6,8 8,2 % SDS 25,8 % Glycerol 5 % β-Mercaptoethano 400 µg/mL Bromphenolblau
5 % Milchpulver-Suspension	TBS-T 5 % Milchpulver
5x Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	44,7 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ad 1 L H <sub>2</sub> O
6 % SDS-Polyacrylamid-Sammelgel	3,2 mL H <sub>2</sub> O 1,13 mL Acrylamid 30 % 1,75 mL TRIS pH 6,8 0,5 M 70 µL SDS 10 % 70 µL APS 10 % 7 µL TEMED
10x 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 <sub>2</sub> 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 ad 10 mL H <sub>2</sub> O
10 % SDS-Polyacrylamid-Trenngel	4,1 mL H <sub>2</sub> O 3,3 mL Acrylamid 30 % 2,5 mL TRIS pH 8,8 1,5 M 100 µL SDS 10 % 105 µL APS 10 % 15 µL TEMED
20x KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	90,7 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ad 1 L H <sub>2</sub> O
Cas9-Reaktionspuffer	20 mM HEPES 100 mM NaCl 5 mM MgCl <sub>2</sub> 0,1 mM EDTA
FACS-Buffer	PBS 2 % FBS
Fixativ	300 mL Methanol 100 mL Essigsäure 100 %
halbfestes Medium	MethoCult H4230 50 ng/mL FLT3-L, SCF, TPO, G-CSF, IL-3, IL-6, 0,375 µM SR-1, UM729
K562-Medium	RPM1 1640 10 % FBS 1 % P/S
Laufpuffer	15,1 g TRIS 72 g Glycin 5 g SDS ad 5 L H <sub>2</sub> O

## Material

Lysogeny broth (LB) -Agar	15 g Agar-Agar ad 1 L LB-Medium 100 µg/mL Ampicillin
Lysogeny broth (LB) -Medium	10 g LB-Medium (Lennox) ad 1 L H <sub>2</sub> O 100 µg/mL Ampicillin
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
RIPA-Puffer	H <sub>2</sub> O 1 % NP40 0,5 % DOC 0,1 % SDS 50 mM TRIS pH 8,0 80 mM NaCl 50 mM NaF 20 mM Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> 1 mM EDTA 1 mM EGTA 1 Tablette Complete tablets Mini Easypack für 10 mL
SEM-Medium	IMDM 10 % FBS 1 % P/S
Sörensen-Puffer	25 mL 20x KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 100 mL 5x Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ad 500 mL H <sub>2</sub> O
Stammzellmedium I	StemMACS HSC Expansion Medium 1 % P/S 50 ng/mL FLT3-L, SCF, TPO, G-CSF, IL-3, IL-6 0,75 µM SR-1, UM729
Stammzellmedium II	StemMACS HSC Expansion Medium 1 % P/S 50 ng/mL FLT3-L, SCF, TPO, G-CSF, IL-3, IL-6 0,75 µM SR-1, UM729 20 µM z-Vad-FMK
Stammzellmedium III	StemMACS HSC Expansion Medium 1 % P/S 50 ng/mL FLT3-L, SCF, TPO, G-CSF, IL-3, IL-6 0,75 µM SR-1, UM729 10 % FBS
TAE-Puffer	H <sub>2</sub> O 0,04 M TRIS-acetat 0,001 M EDTA
TBS-T	10 mM TRIS pH7,6 150 mM NaCl 0,05 % Tween20
THP-1-Medium	RPMI 1640 10 % FBS 1 % P/S
Transferpuffer	43,58 mM TRIS 39 mM Glycin 20 % Methanol
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 Giemsas Azur-Eosin-Methylenblaulösung

## 2.7 Plasmide

**Tabelle 14: Plasmide**

Bezeichnung	Hersteller, Hauptsitz
PX458	Addgene Inc., Watertown, Vereinigte Staaten von Amerika

## 2.8 Primer

**Tabelle 15: Primersequenzen für die sgRNA-Produktion**

*KMT2A (MLL)*, *AFF1 (AF4)* und *MLLT3 (AF9)*, vorwärts (*forward*, fwd), rückwärts (*reverse*, rev)

Name	Sequenz (5'3')
<i>MLL</i> sgRNA1 fwd	taatcgcactcactataGGAGTGGGCATGTAGAGGTAgtttagagctagaaATAGC
<i>MLL</i> sgRNA2 fwd	taatcgcactcactataGGAAGTATTTTAGAGATTTTgtttagagctagaaATAGC
<i>MLL</i> sgRNA3 fwd	taatcgcactcactataGGAGCTCCTTATAGATGAAGgtttagagctagaaATAGC
<i>AF4</i> sgRNA1 fwd	taatcgcactcactataGGCCATGGCTTTTGGGTAGGgtttagagctagaaATAGC
<i>AF4</i> sgRNA2 fwd	taatcgcactcactataGGTGCCTTCTCAGTCAGTTGgtttagagctagaaATAGC
<i>AF4</i> sgRNA3 fwd	taatcgcactcactataGGCTGCTGTGCGATAGTCCTCgtttagagctagaaATAGC
<i>AF4</i> sgRNA4 fwd	taatcgcactcactataGGCTGATCTTGACCATCCATgtttagagctagaaATAGC
<i>AF9</i> sgRNA1 fwd	taatcgcactcactataGGTTTGATGCTAGCAGAGGTgtttagagctagaaATAGC
<i>AF9</i> sgRNA2 fwd	taatcgcactcactataGGATATGGAGAAAGTTGTAGgtttagagctagaaATAGC
universal rev	AGCACCGACTCGGTGCCACT

**Tabelle 16: Analyseprimer für *KMT2A (MLL)*, *AFF1 (AF4)* und *MLLT3 (AF9)***

vorwärts (*forward*, fwd), rückwärts (*reverse*, rev)

Name	Sequenz (5'3')	Produktgröße, Temperatur
<i>MLL</i> fwd	AAGTGACCTTTCTCTCTCCACAGG	704 bp, 59 °C
<i>MLL</i> rev	ACAGAAAGTCCCCATTTATTCAGGAT	
<i>AF4</i> fwd	GACCTAGCAGTGAAAGTCCATGATAA	650 bp, 61 °C
<i>AF4</i> rev	CTGGTAACCGAAATCTTCTCTCTCTT	
<i>AF9</i> fwd	GCCTTGACTTCTCTCTAGCTATGAAA	621 bp, 60 °C
<i>AF9</i> rev	AAACTGCTGGGATTACAAGTGTGAG	

**Tabelle 17: Primer für die Identifikation der reziproken Translokationen**

*KMT2A (MLL)*, *AFF1 (AF4)* und *MLLT3 (AF9)*, vorwärts (*forward*, fwd), rückwärts (*reverse*, rev)

Name	Sequenz (5'3')	Produktgröße, Temperatur
<i>MLL-AF4</i> fwd	ATCCCTGTTTAAACCAGCTAAAGAA	400 bp, 60 °C
<i>MLL-AF4</i> rev	GACATTTTCATCTCAAATCCGCTTTC	
<i>AF4-MLL</i> fwd	GCAGTGAAAGTCCATGATAAAGAGAC	420 bp, 60 °C
<i>AF4-MLL</i> rev	ACAGAAAGTCCCCATTTATTCAGGAT	
<i>MLL-AF9</i> fwd	TTCCCTGTTTAAACCAGCTAAAGAAA	376 bp, 60 °C
<i>MLL-AF9</i> rev	TCTTGCACCAAATATTTAGCCAAGTT	
<i>AF9-MLL</i> fwd	CAACCTCTGCTAGCATCAAACCTT	375 bp, 60 °C
<i>AF9-MLL</i> rev	CACCAACAGAAAGTCCCCATTTAT	

**Tabelle 18: Primer für die Identifikation der Translokationen auf cDNA-Ebene per RT-PCR**

*KMT2A (MLL)*, *AFF1 (AF4)* und *MLLT3 (AF9)*, vorwärts (*forward*, fwd), rückwärts (*reverse*, rev)

Name	Sequenz (5'3')	Produktgröße
<i>MLL-X</i> fwd cDNA	AGTGGACTTTAAGGAGGATTGTGAA	230 bp
<i>MLL-AF4</i> rev cDNA	TCAGTTTGGTGAGCTTGGCTT	
<i>MLL-X</i> fwd cDNA	AGTGGACTTTAAGGAGGATTGTGAA	200 bp
<i>MLL-AF9</i> rev cDNA	TGGCAGGACTGGGTTGTTC	

**Tabelle 19: Primer für die RT-qPCR der entsprechenden Zielgene**

Human (hu), ribosomale RNA (rRNA), vorwärts (*forward*, fwd), rückwärts (*reverse*, rev)

Name	Sequenz (5'3')
18S rRNA fwd	CGGCTACCACATCCAAGGAA
18S rRNA rev	GCTGGAATTACCGCGGCT
hu <i>MEIS1</i> fwd	TGGCCACACGTCACACAGT
hu <i>MEIS1</i> rev	TTTGTCTTATCAGGGTCATCATC
hu <i>HOXA9</i> fwd	ATGAGAGCGGCGGAGACA
hu <i>HOXA9</i> rev	CGCGCATGAAGCCAGTT
hu <i>CBX5</i> fwd	GAATATCTACTGAAGTGAAAGGCTTTT
hu <i>CBX5</i> rev	AGGGCAATCCAAGTTTTTCTCA
hu <i>MYB</i> fwd	AAAAACTGAAGAAGCTGGTGGAA
hu <i>MYB</i> rev	GCTGGCACTGCACATCTGTT
hu <i>HMGB3</i> fwd	AAAGGCCACCGTCTGGATTC
hu <i>HMGB3</i> rev	TGCCACGTCTCCAATAGAGATG
hu <i>PRMT5</i> fwd	GTGACCCTGAGGCCAGTTT
hu <i>PRMT5</i> rev	GAAGTTGTGCAGCCGTACCA
hu <i>MAT2A</i> fwd	TCTTCCAAAGGTTTTGACTACAAGAC
hu <i>MAT2A</i> rev	AGCCAAACATTAAGCCCTGGT

## 2.9 Antikörper und Viabilitätsfarbstoffe

**Tabelle 20: Antikörper und Viabilitätsfarbstoffe**

7-Aminoactinomycin (7-AAD), Phosphatidylserin (Ptd-L-Ser), Fluorescein (FITC), Bromodesoxyuridin (BrdU), *Cluster of differentiation* (CD), Phycoerythrin (PE), Allophycocyanin (APC), Cyanin (Cy), *Alexa Fluor* (AF), *Brilliant Violet* (BV), Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP), Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), Methioninadenosyltransferase 2A (MAT2A), Propidiumiodid (PI)

Antigen	Fluorochrom	Klon	Hersteller, Hauptsitz
7-AAD	7-AAD	-	BD Biosciences, Franklin Lakes, Vereinigte Staaten von Amerika
Ptd-L-Ser	FITC AnnexinV	-	BD Biosciences, Franklin Lakes, Vereinigte Staaten von Amerika
BrdU	FITC	B44	BD Biosciences, Franklin Lakes, Vereinigte Staaten von Amerika
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
GAPDH	-	14C10	Cell Signaling Inc., Danvers, Vereinigte Staaten von Amerika
MAT2A	-	polyklonal	Novus Biologicals, LLC, Centennial, Vereinigte Staaten von Amerika
<i>Rabbit IgG</i>	IRDye 680RD	polyklonal	Li-Cor Biosciences Inc., Lincoln, Vereinigte Staaten von Amerika
PI	PI	-	BD Biosciences, Franklin Lakes, Vereinigte Staaten von Amerika
<i>Viability Dye</i> eFluor 506	≈ AmCyan	-	eBioscience, Inc., Frankfurt am Main, Deutschland

## 3 Methoden

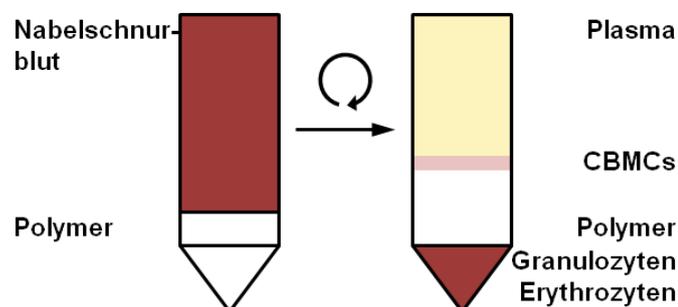
### 3.1 Gewinnung von Primärzellen

#### 3.1.1 Isolation von Blut aus der Nabelschnur

Humanes Nabelschnurblut (*human cord blood*, huCB) wurde nach schriftlicher ärztlicher Aufklärung von den Ärzten der Frauenklinik entnommen und im Anschluss im Labor anonymisiert ohne jegliche Identifizierungskennzeichnungen verarbeitet. Ein entsprechendes Ethikvotum 751/2015BO2 der Ethikkommission der Universität Tübingen lag vor. Das Nabelschnurblut wurde in Kooperation mit der Abteilung Kinderheilkunde IV - Neonatologie, neonatologische Intensivmedizin des Universitätsklinikums Tübingen gewonnen. Es wurden 3-5 mL *Heparin-Natrium-25000* in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen vorgelegt. Das Blut aus der noch mit der Plazenta verbundenen Nabelschnur wurde in die vorbereiteten Röhrchen ausgestrichen, bei Raumtemperatur (RT) gelagert und noch am selben Tag, nach Möglichkeit innerhalb der ersten Stunde nach Gewinnung, verarbeitet.

#### 3.1.2 Isolation mononukleärer Zellen aus Nabelschnurblut

Die Isolation mononukleärer Zellen aus huCB (*cord blood mononuclear cells*, CBMCs) wurde mittels Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Zur Trennung der CBMCs wurde das synthetische Polymer *Biocoll* mit einer molekularen Masse von ungefähr 400.000 Da und einer Dichte von 1,077 g/mL verwendet. 15 mL *Biocoll* wurden pro 50 mL Zentrifugenröhrchen verwendet. 50 mL huCB wurden mit Phosphatpuffer (*phosphate buffered saline*, PBS) auf 175 mL aufgefüllt, auf fünf Zentrifugenröhrchen verteilt (je 35 mL) und langsam überschichtet. Die Dichtegradientenzentrifugation wurde bei 400 x g und RT mit reduzierter Beschleunigung und Bremse für 30 min durchgeführt (**Abbildung 16**).



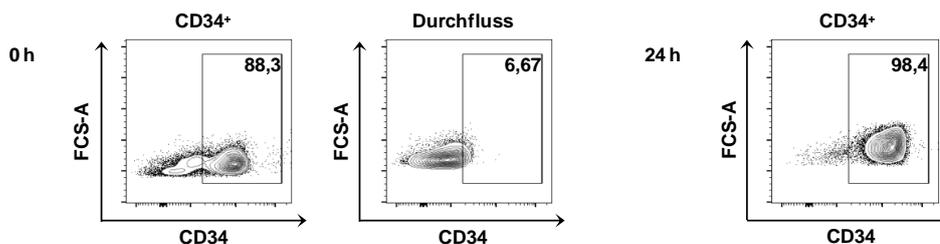
**Abbildung 16: Schematische Abbildung der Dichtegradientenzentrifugation.** Gezeigt ist die Phasenverteilung nach Überschichtung des verdünnten Nabelschnurblutes und des Polymers (Dichte 1,077 g/mL) sowie nach Zentrifugation (runder Pfeil). Resultierende Phasen sind die Plasmaphase, die Intermediärphase mit mononukleären Zellen (*cord blood mononuclear cells*, CBMCs), die Polymerphase und die Granulozyten- und Erythrozytenphase.

Anschließend wurde die Intermediärphase (**Abbildung 16**) abgenommen, in drei Zentrifugenröhrchen zusammengeführt und mit PBS auf je 50 mL aufgefüllt. Der nächste Wasch-

schritt erfolgte bei 300 x g und RT für 5 min. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellpellets zusammengeführt, auf 40 mL mit PBS aufgefüllt und resuspendiert. Vor dem Thrombozytenwaschschritt bei 200 x g und RT für 10 min wurden 10 µL Zellsuspension als Zählprobe entnommen.

### 3.1.3 Isolation hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut

Die Isolation von HSPCs aus huCB erfolgte mittels magnetischer Zellseparation (*magnetic activated cell sorting*, MACS) unter Verwendung des *human CD34 MicroBead Kit UltraPure* nach Herstellerangaben basierend auf der ermittelten Gesamtzellzahl. Der Isolationspuffer wurde selbst hergestellt (MACS-Puffer). Zunächst erfolgte die Bestimmung der Gesamtzellzahl mittels einer *Neubauer*-Zählkammer. Anschließend wurden die Zellen bei 300 x g und RT für 10 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 300 µL MACS-Puffer pro  $10^8$  Zellen resuspendiert. Es wurden 100 µL *FcR Blocking Reagent* und 100 µL *CD34 MicroBeads* pro  $10^8$  Zellen zugegeben und gemischt. Die Inkubation erfolgte bei 4 °C für 30 min. Die überschüssigen *beads* wurden mit 10 mL MACS-Puffer pro  $10^8$  Zellen und einem Zentrifugationsschritt bei 300 x g und RT für 10 min entfernt. Die magnetisch markierten Zellen wurden in 500 µL MACS-Puffer pro  $10^8$  Zellen resuspendiert. Für die magnetische Separation wurden ein *MidiMACS Separator* und eine *LS Column* verwendet. Die Säule wurde in den Magneten eingesetzt, mit 3 mL MACS-Puffer equilibriert und dann mit der Zellsuspension beladen. Darauf folgten drei Waschschritte mit je 3 mL MACS-Puffer, wobei das Säulenreservoir vor jedem Waschschritt leergelaufen sein musste. Der Durchfluss wurde aufgefangen. Zuletzt wurde die Säule aus dem Magneten gelöst, auf ein 15 mL Zentrifugenröhrchen gesetzt und die CD34<sup>+</sup> Zellen mit 5 mL MACS-Puffer mittels des beiliegenden Kolbens zügig aus der Säule gespült. Die gewonnenen Zellen wurden anschließend mit einer Konzentration von mindestens  $7,5 \times 10^5$  Zellen/mL in einer 24-Well-Zellkulturplatte in 1 mL Stammzellmedium I pro Well für 48 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Reinheit wurde direkt nach dem Vorgang und 24 h später an einem *LSRFortessa* und der *FACS DIVA* Software durchflusszytometrisch kontrolliert (**Abbildung 17**). Durchführung siehe „Kapitel 3.5.3 Durchflusszytometrie“.



**Abbildung 17: Kontrolle der Reinheit CD34<sup>+</sup> Zellen nach magnetischer Zellseparation.** Aufgereinigte CBMCs wurden direkt nach Isolation mittels magnetischer Zellseparation und nach 24 h in Flüssigkultur durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt sind repräsentative durchflusszytometrische Analysen.

## 3.2 Entwicklung des CRISPR/Cas9-Systems

### 3.2.1 Identifizierung von patientenüblichen Schnittstellen

Wie bereits in „Kapitel 1.2.2 Pathophysiologische Folgen des *KMT2A*-Onkogens auf Proteinebene“ beschrieben, ist das *KMT2A*-Gen rearrangierter Leukämien häufig in Intron 9, 10 und mit der schlechtesten Prognose in Intron 11 betroffen.<sup>[38]</sup> Aufgrund dessen wurde Intron 11 für die Genomeditorung durch das CRISPR/Cas9-System gewählt. Die Nomenklatur der Exon- und Intronstruktur basiert hier auf Nilson et al., 1996.<sup>[39]</sup> Die Schnittstellen des CRISPR/Cas9-Systems in den Translokationspartnergenen wurden ebenfalls in den BCRs des jeweiligen Gens gewählt. Wie in „Kapitel 1.2.4 Beschreibung der häufigsten Translokationspartner *KMT2A*-rearrangierter Leukämien“ beschrieben, wurde für *AFF1* Exon 3 und für *MLLT3* Intron 4 adressiert. Die Nomenklatur der Exon- und Intronstruktur basiert hier auf Nilson et al., 1997 und Strissel et al., 2000.<sup>[82][83]</sup> Relevante Sequenzabschnitte sind in **Anhang 1**, **Anhang 2** und **Anhang 3** aus *Ensembl genome browser 97* dargestellt.<sup>[141]</sup>

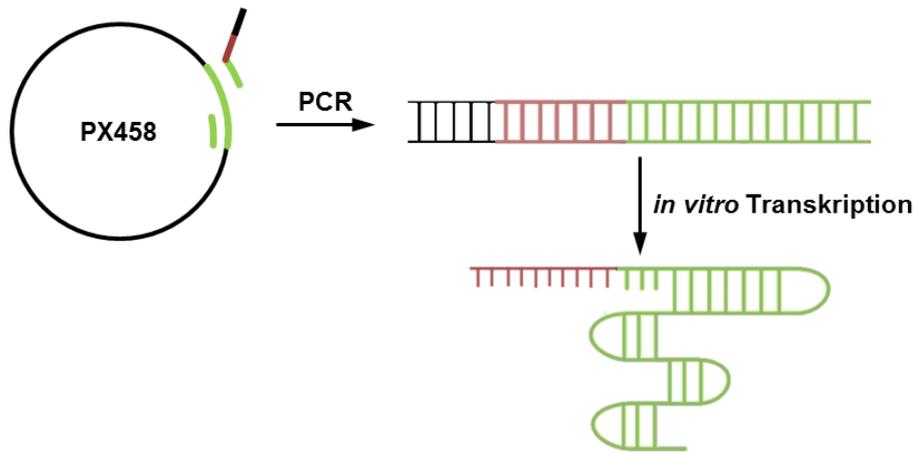
### 3.2.2 Design von sgRNAs

Die zu adressierenden Sequenzen wurden mit Hilfe von *CRISPRscan* analysiert.<sup>[139]</sup> Es wurden sgRNAs für das humane Genom, für Cas9 und mit einem PAM von 5'NGG ausgewählt. Ein möglichst hoher *CRISPRscore* sollte erreicht werden, um eine hohe Effizienz zu gewährleisten. Trotzdem mussten auch *off-target*-Effekte berücksichtigt werden. Es wurden sgRNAs gewählt, für die nach Hsu et al., 2013 (*all*) und Cong et al., 2013 (*seed*) keine *off-target*-Effekte resultieren sollten.<sup>[150][151]</sup>

### 3.2.3 Produktion der sgRNAs *in vitro*

Die Produktion der sgRNAs *in vitro* wurde durch eine Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) mit anschließender *in vitro* Transkription nach Gundry et al., 2016 durchgeführt.<sup>[137]</sup> Das universelle sgRNA-Rückgrat bestehend aus *stem loop* 1-3 und *tetra-loop* (**Abbildung 13**) wurde auf Plasmid PX458 bereitgestellt. Dieses wurde aus einer Stichkultur isoliert, indem diese auf *lysogeny broth* (LB)-Agar mit 100 µg/mL Ampicillin mittels Vereinzelungstechnik ausgestrichen und das Plasmid anschließend einzelklonal aus 5 mL Vorkultur und 500 mL Hauptkultur mittels des *NucleoBond Xtra Maxi Plus EF* Kits aufgereinigt wurde. Die spezifischen *target complementary regions* der entsprechenden sgRNAs aus *CRISPRscan*<sup>[139]</sup> wurden mit Hilfe eines Primers individuell bestellt, sodass die DNA-Produktion mittels Amplifikation möglich war (**Abbildung 18**). Die durch *CRISPRscan*<sup>[139]</sup> erstellten sgRNA-Oligonukleotide beinhalteten zusätzlich zur *target complementary region* einen T7-Promotor, eine Überlappung mit dem sgRNA-Rückgrat und wurden mit einer Modi-

fikation von „ATAGC“ am 3'-Ende versehen. Als Rückwärtsprimer wurde ein universeller Primer verwendet. Die Primer sind in „Kapitel 2.8 Primer“ in **Tabelle 15** hinterlegt.



**Abbildung 18: Vereinfachte Übersicht der sgRNA-Produktion *in vitro*.** Gezeigt sind das Plasmid PX458 mit sgRNA-Rückgrat (grün), der universelle Rückwärtsprimer (grün) und der modifizierte Vorwärtsprimer mit T7-Promotor (schwarz) und individueller *target complementary region* (rot). Die gewünschte dsDNA (oben) wird amplifiziert und in ssRNA (unten) umgeschrieben.

Für die PCR wurden die Primer in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  gelagert und zu einer Arbeitskonzentration von 10  $\mu\text{M}$  verdünnt. Die PCR wurde mit dem *KAPA HiFi PCR Kit* nach Herstellerangaben mit leichten Modifikationen durchgeführt (**Tabelle 21**).

**Tabelle 21: PCR-Bedingungen für die sgRNA-Produktion**

Pipettierschema		Programm		
Vorwärtsprimer (10 $\mu\text{M}$ )	2 $\mu\text{L}$	Initiale Denaturierung	95 °C	3 min
Universaler Rückwärtsprimer (10 $\mu\text{M}$ )	2 $\mu\text{L}$	Denaturierung	98 °C	5 sec
PX458 (2-4 ng/ $\mu\text{L}$ )	1 $\mu\text{L}$	Primeranlagerung	60 °C	5 sec
<i>KAPA HiFi Mix</i> (2x)	10 $\mu\text{L}$	Elongation	72 °C	10 sec
H <sub>2</sub> O nukleasefrei	6 $\mu\text{L}$	→ Wiederholung		22 x
<b>gesamt</b>	<b>20 <math>\mu\text{L}</math></b>	Finale Elongation	72 °C	1 min
		Kühlung	4 °C	$\infty$

Die PCR-Produkte wurden mittels eines 2 %-igen Agarose-Gels bei 100 V für 45 min unter Verwendung von *GelRed* und der *GeneRuler Low Range DNA Ladder* aufgetrennt, anschließend mithilfe des *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kits* isoliert und in 15  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O eluiert. Die *in vitro* Transkription erfolgte nach Arbeitsplatzvorbereitung mit *RNaseZAP* mittels *NEB Hi-Scribe T7 Kit* (**Tabelle 22**).

**Tabelle 22: Inkubationsbedingungen für die *in vitro* Transkription**

Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)

Pipettierschema		Programm		
DNA (400-1000 ng)	4 $\mu\text{L}$	Inkubation	37 °C	5 h
dNTPs	8 $\mu\text{L}$			
<i>Reaction Buffer</i> (10x)	2 $\mu\text{L}$			
<i>T7 RNA Polymerase Enzyme Mix</i>	2 $\mu\text{L}$			
H <sub>2</sub> O nukleasefrei	4 $\mu\text{L}$			
<b>gesamt</b>	<b>20 <math>\mu\text{L}</math></b>			

Die Reaktion wurde anschließend auf 50 µL aufgefüllt, mittels des *Zymo RNA Clean & Concentrator Kits* nach Herstellerangaben aufgereinigt und in 25 µL eluiert. Die resultierende sgRNA wurde mit einer Endkonzentration von 1 µg/µL aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

### 3.2.4 Funktionelle Testung der sgRNAs *in vitro*

Für die funktionelle Testung wurde der *in vitro cleavage assay* verwendet. Genomische DNA von K562 Testzellen wurde mittels des *NucleoSpin DNA RapidLyse Kits* isoliert. Der jeweilige Abschnitt des entsprechenden Gens, der durch das CRISPR/Cas9-System adressiert werden sollte, wurde per PCR amplifiziert. Dafür wurden Primer mit *Primer3web Version 4.1.0* designt.<sup>[147]-[149]</sup> Für die PCR wurden die Primer in einer Konzentration von 100 µM gelagert und zu einer Arbeitskonzentration von 10 µM verdünnt. Die optimale Anlagerungstemperatur wurde für jedes Primerpaar individuell titriert und ist in „Kapitel 2.7 Plasmide“ in **Tabelle 16** hinterlegt. Die PCR wurde mit der *AccuPrime Pfx DNA Polymerase* nach Herstellerangaben mit leichten Modifikationen durchgeführt (**Tabelle 23**).

**Tabelle 23: PCR-Bedingungen für *AccuPrime Pfx DNA Polymerase***  
Quantum satis (q.s., so viel wie nötig)

Pipettierschema		Programm	
Vorwärtsprimer (10µM)	1,5 µL	Initiale Denaturierung	95 °C 2 min
Rückwärtsprimer (10µM)	1,5 µL	Denaturierung	95 °C 15 sec
genomische DNA	200 ng	Primeranlagerung	q.s. 30 sec
<i>Reaction Mix</i> (10x)	5 µL	Elongation	68 °C 30 sec
<i>AccuPrime Pfx DNA Polymerase</i>	0,5 µL	→ Wiederholung	40 x
H <sub>2</sub> O nukleasefrei	q.s.	Finale Elongation	68 °C 10 min
<b>gesamt</b>	<b>50 µL</b>	Kühlung	4 °C ∞

Die PCR-Produkte wurden mittels eines 2 %-igen Agarose-Gels bei 100 V für 45 min unter Verwendung von *GelRed* und der *GeneRuler Low Range DNA Ladder* aufgetrennt, anschließend mithilfe des *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kits* isoliert und in 15 µL H<sub>2</sub>O eluiert. Die hergestellten sgRNAs konnten anhand des so produzierten PCR-Produkts (dsDNA) auf Funktionalität getestet werden (**Tabelle 24**):

**Tabelle 24: *In vitro cleavage assay***  
Quantum satis (q.s., so viel wie nötig)

Pipettierschema		Programm	
Cas9-Protein (1 µg/µL)	400 ng	Inkubation	37 °C 10 min
sgRNA (1 µg/µL)	400 ng		
dsDNA	200 ng		
Cas9-Reaktionspuffer	q.s.		
<b>gesamt</b>	<b>20 µL</b>	Inkubation	37 °C 10 min

Das Cas9-Protein und die entsprechende sgRNA wurden im Cas9-Reaktionspuffer für 10 min bei 37 °C vorinkubiert. Danach wurde die dsDNA zugesetzt und der Ansatz für weitere 10 min bei 37 °C inkubiert. Als Kontrolle wurde das Cas9-Protein allein mit dsDNA ver-

wendet. Die Analyse erfolgte auf einem 10 %-igen Polyacrylamid-Gel bei 100 V für 70 min mittels der *GeneRuler Low Range DNA Ladder* mit anschließender Färbung in 3x *GelRed*. Die Dokumentation erfolgte am Geldokumentationssystem *EBOX VXY2*.

### 3.2.5 Elektroporation von Zelllinien

Für die funktionelle Testung der sgRNAs in Zelllinien wurden K562 Zellen verwendet. Dazu wurden  $1 \times 10^6$  Zellen aufgetaut, in PBS gewaschen und zu  $1 \times 10^5$  Zellen/mL in K562-Medium bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in Kultur genommen. Passagiert wurden sie bei  $1 \times 10^6$  Zellen/mL, um eine gute Proliferation vor der Elektroporation zu gewährleisten. Für die Genomeditierung per Nukleofektion wurde das *P3 Primary Cell 4D-Nucleofector X Kit S* verwendet. Hierfür wurde 1 µL Cas9-Protein (1 µg/µL) mit 1 µL der zu testenden sgRNA (1 µg/µL) für 15-30 min bei RT in einem 20 µL-Well dem Kit beiliegenden *strip* inkubiert. Anschließend wurden pro Ansatz  $3 \times 10^5$  K562 Zellen bei 300 x g und RT für 5 min abzentrifugiert und in 20 µL *P3 Solution* resuspendiert. Die Zellen wurden in das entsprechende 20 µL-Well überführt und vorsichtig mit dem RNP vermischt. Als Kontrollen wurden Ansätze allein mit Cas9-Protein verwendet und zur Effizienzüberprüfung wurde der Zell-RNP-Suspension zusätzlich 0,5 µg GFP-Plasmid zugesetzt. Die Nukleofektion wurde mit Programm FF-120 des *Lonza 4D-Nucleofector-Systems* durchgeführt. Danach wurde die Zell-RNP-Suspension für 10 min bei RT inkubiert und schließlich mit 100 µL vorgewärmtem K562-Medium abgestoppt. Ein Ansatz wurde auf jeweils zwei 96-Rundbodenwells à 200 µL K562-Medium verteilt und für 48 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Danach erfolgten die Auswertung der Funktionalität der sgRNAs mittels T7-Endonuklease-I-Assay und eine Effizienzmessung des Elektroporationserfolges der GFP<sup>+</sup> Zellen mittels Durchflusszytometrie unter der Verwendung eines Viabilitätsfarbstoffs am *FACSCanto II* und der *FACS DIVA* Software.

### 3.2.6 Funktionelle Testung der sgRNAs in Zelllinien mittels T7-Endonuklease-I-Assay

Nach Elektroporation der K562 Testzellen wurde genomische DNA mittels des *NucleoSpin DNA RapidLyse Kits* isoliert. Der jeweilige Abschnitt des entsprechenden Gens, der durch das CRISPR/Cas9-System adressiert wurde, konnte per PCR amplifiziert werden. Dafür wurden die Primer, die zuvor mit *Primer3web Version 4.1.0* designt wurden, verwendet.<sup>[147][148][149]</sup> Für die PCR wurden die Primer in einer Konzentration von 100 µM gelagert und zu einer Arbeitskonzentration von 10 µM verdünnt. Die optimale Anlagerungstemperatur wurde für jedes Primerpaar individuell titriert und ist in „Kapitel 2.8 Primer“ in **Tabelle 16** hinterlegt. Die PCR wurde mit der *AccuPrime Pfx DNA Polymerase* nach Herstellerangaben mit leichten Modifikationen durchgeführt (**Tabelle 25**).

**Tabelle 25: PCR-Bedingungen für *AccuPrime Pfx DNA Polymerase***

Quantum satis (q.s., so viel wie nötig)

Pipettierschema		Programm		
Vorwärtsprimer (10µM)	1,5 µL	Initiale Denaturierung	95 °C	2 min
Rückwärtsprimer (10µM)	1,5 µL	Denaturierung	95 °C	15 sec
genomische DNA	200 ng	Primeranlagerung	q.s.	30 sec
<i>Reaction Mix</i> (10x)	5 µL	Elongation	68 °C	30 sec
<i>AccuPrime Pfx DNA Polymerase</i>	0,5 µL	→ Wiederholung		40 x
H <sub>2</sub> O nukleasefrei	q.s.	Finale Elongation	68 °C	10 min
<b>gesamt</b>	<b>50 µL</b>	Kühlung	4 °C	∞

Die PCR-Produkte wurden mittels eines 2 %-igen Agarose-Gels bei 100 V für 45 min unter Verwendung von *GelRed* und der *GeneRuler Low Range DNA Ladder* aufgetrennt, anschließend mithilfe des *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kits* isoliert und in 15 µL H<sub>2</sub>O eluiert. Die so gewonnenen PCR-Produkte (dsDNA) enthielten sowohl editierte als auch nicht-editierte DNA, da die Zellen die DNA infolge eines induzierten DSBs reparierten und durch NHEJ zum Teil veränderte Basenabfolgen resultierten. Mit dem T7-Endonuklease-I-Assay konnte auf Funktionalität getestet werden, indem die dsDNA zuerst denaturiert wurde, um dann kontrolliert und langsam wieder hybridisiert zu werden (**Tabelle 26**):

**Tabelle 26: Hybridisierungsansatz für T7-Endonuklease-I-Assay**

Quantum satis (q.s., so viel wie nötig)

Pipettierschema		Programm		
<i>NEB Puffer 2</i>	2 µL	Initiale Denaturierung	95 °C	5 min
dsDNA	200 ng	Gradient	95 °C - 85 °C	-2 K/s
H <sub>2</sub> O nukleasefrei	q.s.	Gradient	85 °C - 25 °C	-0,1 K/s
<b>gesamt</b>	<b>19 µL</b>	Kühlung	4 °C	∞

Bei der erneuten Hybridisierung waren drei verschiedene Strukturen möglich: dsDNA aus zwei nicht-editierten Strängen, dsDNA aus zwei editierten Strängen und dsDNA aus einem editierten und einem nicht-editierten Strang. Letztere beinhalteten folglich eine Diskrepanz der Basenabfolge. Diese konnte von der *T7 Endonuklease I* erkannt werden und der fehlerhafte Strang wurde verdaut (**Tabelle 27**).

**Tabelle 27: T7-Endonuklease-I-Assay**

Pipettierschema		Programm		
Hybridisierungsansatz	19 µL	Inkubation	37 °C	15 min
<i>T7 Endonuklease I</i>	1 µL			
<b>gesamt</b>	<b>20 µL</b>			

Die DNA wurde anschließend elektrophoretisch auf einem 10 %-igen Polyacrylamid-Gel separiert und die entstandenen Fragmente stellten folglich die jeweilige Schneideeffizienz dar. Die Analyse wurde bei 100 V für 70 min mittels der *GeneRuler Low Range DNA Ladder* mit anschließender Färbung in 3x *GelRed* durchgeführt und am Geldokumentationssystem *EBOX VXY2* dokumentiert. Die Quantifizierung erfolgte durch die Software *ImageJ 1.48v*.<sup>[152]</sup>

### **3.3 Generierung *KMT2A*-rearrangierter Zellen mittels des CRISPR/Cas9-Systems**

#### **3.3.1 Elektroporation von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut**

Als Zielzellen für die Genomeditierung sollten HSPCs aus huCB verwendet werden. Sowohl für eine erste Effizienztestung der einzelnen sgRNAs als auch für die letztendliche Translokationsinduktion mussten HSPCs aus huCB elektroporiert werden. Dazu wurde zunächst, wie in „Kapitel 3.1 Gewinnung von Primärzellen“ beschrieben, Blut aus der Nabelschnur gewonnen, CBMCs mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert und anschließend HSPCs mittels des *human CD34 MicroBead Kit UltraPure* aufgereinigt. Die Zellen wurden mit einer Konzentration von  $7,5 \times 10^5$  Zellen/mL in Stammzellmedium I für 48 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert, um eine gute Proliferation vor der Elektroporation zu gewährleisten.

Für die Etablierung der Genomeditierung in Zielzellen per Nukleofektion wurde das *P3 Primary Cell 4D-Nucleofector X Kit S* verwendet. Hierfür wurde 1 µL Cas9-Protein (1 µg/µL) mit je 1 µL sgRNA (1 µg/µL) für 15-30 min bei RT in einem 20 µL-Well dem Kit beiliegenden *strip* inkubiert. Anschließend wurden pro Ansatz  $3 \times 10^5$  HSPCs bei 300 x g und RT für 5 min abzentrifugiert und in 20 µL *P3 Solution* resuspendiert. Die Zellen wurden in das entsprechende 20µL-Well überführt und vorsichtig mit dem RNP vermischt. Als Kontrollen wurden Ansätze allein mit Cas9-Protein verwendet und zur Effizienzüberprüfung wurden der Zell-RNP-Suspension zusätzlich 0,5 µg GFP-Plasmid zugesetzt. Die Nukleofektion wurde mit Programm EO-100 des *Lonza 4D-Nucleofector*-Systems durchgeführt. Danach wurde die Zell-RNP-Suspension für 3 min bei RT inkubiert und die Reaktion schließlich mit 100 µL vorgewärmtem Stammzellmedium II abgestoppt. Ein Ansatz wurde auf jeweils zwei 96-Rundbodenwells mit je 200 µL Stammzellmedium II verteilt und für 48 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Anschließend erfolgten eine Untersuchung der Funktionalität nach „Kapitel 3.3.2 Funktionelle Testung der sgRNAs in hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut mittels T7-Endonuklease-I-Assay“ sowie eine Effizienzmessung des Elektroporationserfolges der GFP<sup>+</sup> Zellen mittels Durchflusszytometrie unter der Verwendung eines Viabilitätsfarbstoffs am *FACSCanto II* und der *FACS DIVA* Software.

#### **3.3.2 Funktionelle Testung der sgRNAs in hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut mittels T7-Endonuklease-I-Assay**

Für die funktionelle Testung wurden die sgRNAs separat in HSPCs aus huCB angewendet. Nach Elektroporation wurde die jeweilige genomische DNA mittels des *NucleoSpin DNA RapidLyse Kits* isoliert. Die Effizienzanalyse erfolgte wie in „Kapitel 3.2.6 Funktionelle Testung der sgRNAs in Zelllinien mittels T7-Endonuklease-I-Assay“ beschrieben.

### 3.3.3 Translokationsinduktion in CD34<sup>+</sup> Stamm- und Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut

Für die Translokationsinduktion mussten HSPCs aus huCB, wie in „Kapitel 3.3.1 Elektroporation von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut“ beschrieben, elektroporiert werden. Die *KMT2A*-Translokation wurde entweder mit *KMT2A* sgRNA 3 und *AFF1* sgRNA 3 oder *KMT2A* sgRNA 3 und *MLL3* sgRNA 2 durchgeführt, welche jeweils die beste Effizienz in CD34<sup>+</sup> HSPCs aus huCB zeigten. Dazu wurden je 1 µL Cas9-Protein (1 µg/µL) und je 1 µL (1 µg/µL) der jeweiligen sgRNA (insgesamt 2 µL) für 15-30 min bei RT in einem 20 µL-Well dem Kit beiliegenden *strip* des *P3 Primary Cell 4D-Nucleofector X Kit S* inkubiert. Anschließend wurden pro Ansatz 3 x 10<sup>5</sup> HSPCs bei 300 x g und RT für 5 min abzentrifugiert und in 20 µL *P3 Solution* resuspendiert. Die Zellen wurden in das entsprechende 20µL-Well überführt und vorsichtig mit dem RNP vermischt. Als Kontrollen wurden Ansätze allein mit Cas9-Protein verwendet. Die Nukleofektion wurde mit dem Programm EO-100 des *Lonza 4D-Nucleofector-Systems* durchgeführt. Danach wurde die Zell-RNP-Suspension für 3 min bei RT inkubiert und die Reaktion schließlich mit 100 µL vorgewärmtem Stammzellmedium II abgestoppt. Ein Ansatz wurde auf jeweils zwei 96-Rundbodenwells à 200 µL Stammzellmedium II verteilt und für 48 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Anschließend erfolgte eine langfristige Kultur unter Zugabe von 10 % fetalem Kälberserum (*fetal bovine serum*, FBS) in Stammzellmedium III bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>.

### 3.3.4 Zellkultur *KMT2A*-rearrangierter Zellen

Nach Isolation der HSPCs wurden diese Zellen für 48 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in Stammzellmedium I bis zur Elektroporation kultiviert. Danach wurden 20 µM des Caspase-Inhibitors *z-Vad-FMK* hinzugegeben (Stammzellmedium II), um die initiale Apoptose nach Nukleofektion zu blockieren. Weitere 48 h später wurde das Medium mit 10 % FBS supplementiert (Stammzellmedium III). In diesem Medium konnten die *KMT2A*-rearrangierten Zellen langfristig bei einer minimalen Zelldichte von 7,5 x 10<sup>5</sup> Zellen/mL, einer optimalen Zelldichte von 1 x 10<sup>6</sup> Zellen/mL und einer maximalen Zelldichte von 2 x 10<sup>6</sup> Zellen/mL bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert werden, wobei mit Kontrollzellen ebenso verfahren wurde.

Für die Kryokonservierung wurde dem Medium der Zellzusatz *RevitaCell Supplement* für 2 h zugesetzt. Anschließend konnten die *KMT2A*-rearrangierten Zellen in *CryoStor* zu 1 x 10<sup>7</sup> Zellen/mL mittels eines Gefrierbehälters bei -80°C eingefroren und anschließend zur Langzeitlagerung bei -160 °C aufbewahrt werden. Zum Auftauen wurden die *KMT2A*-rearrangierten Zellen kurz im Wasserbad bei 37 °C erwärmt und je 1 mL in 50 mL PBS bei 300 x g und RT für 5 min gewaschen. Dem Stammzellmedium III wurde bis zur ersten Passage erneut der Zellzusatz *RevitaCell Supplement* zugesetzt.

### 3.4 Identifikation der *KMT2A*-Translokation mittels DNA-Analytik

#### 3.4.1 Polymerase-Ketten-Reaktion und Sanger-Sequenzierung

Nach der Elektroporation der HSPCs aus huCB mit je zwei sgRNAs und Cas9-Protein wurde die genomische DNA mittels des *NucleoSpin DNA RapidLyse Kits* isoliert. Der jeweilige Abschnitt im *KMT2A*-Gen wurde artifizuell mit den entsprechenden Abschnitten des *AFF1*- oder *MLL3*-Gens fusioniert, um ein mögliches PCR-Produkt abschätzen zu können. Die Vorüberlegungen für die reziproken Translokationsprodukte sind in **Anhang 4** und **Anhang 5** dargestellt. Anhand dessen wurden Primer mit *Primer3web Version 4.1.0* designt.<sup>[147][148][149]</sup> Der resultierende chromosomale Fusionsabschnitt, der durch das CRISPR/Cas9-System induziert wurde, konnte so per PCR amplifiziert werden. Für die PCR wurden die Primer in einer Konzentration von 100 µM gelagert und zu einer Arbeitskonzentration von 10 µM verdünnt. Die optimale Anlagerungstemperatur wurde für jedes Primerpaar individuell titriert und ist in „Kapitel 2.8 Primer“ in **Tabelle 17** hinterlegt. Die PCR wurde mit der *AccuPrime Pfx DNA Polymerase* nach Herstellerangaben mit leichten Modifikationen durchgeführt (**Tabelle 28**).

**Tabelle 28: PCR-Bedingungen für *AccuPrime Pfx DNA Polymerase***

Quantum satis (q.s., so viel wie nötig)

Pipettierschema		Programm		
Vorwärtsprimer (10µM)	1,5 µL	Initiale Denaturierung	95 °C	2 min
Rückwärtsprimer (10µM)	1,5 µL	Denaturierung	95 °C	15 sec
genomische DNA	200 ng	Primeranlagerung	q.s.	30 sec
<i>Reaction Mix</i> (10x)	5 µL	Elongation	68 °C	30 sec
<i>AccuPrime Pfx DNA Polymerase</i>	0,5 µL	→ Wiederholung		40 x
H <sub>2</sub> O nukleasefrei	q.s.	Finale Elongation	68 °C	10 min
<b>gesamt</b>	<b>50 µL</b>	Kühlung	4 °C	∞

Das Vorhandensein von PCR-Produkten wurde mittels eines 2 %-igen Agarose-Gels bei 100 V für 45 min unter der Verwendung von *GelRed* und der *GeneRuler Low Range DNA Ladder* analysiert. Die Dokumentation erfolgte am Geldokumentationssystem *EBOX VXY2*. Die positiven Banden konnten anschließend ausgeschnitten, mithilfe des *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kits* isoliert und die Produkte in 15 µL H<sub>2</sub>O eluiert werden. Für eine anschließende Sequenzierung zur Identifikation der Translokationsprodukte wurden je 18 ng PCR-Produkt pro 100 Basenpaare (bp) in 12 µL H<sub>2</sub>O und jeweils 3 µL des 10 µM Vorwärts- oder Rückwärtsprimers in zwei Ansätzen zu *Microsynth SeqLab* geschickt.

Für die Überwachung der Zunahme des Anteils translokationspositiver Zellen über die Zeit wurde eine semi-quantitative PCR angewendet. Hierfür wurden Proben über die Zeit gesammelt, zu einem Zeitpunkt extrahiert und anschließend wurden standardisiert 100 ng genomische DNA in die PCR eingesetzt. Die Bandenstärke indizierte dabei den wachsenden Anteil der translokationspositiven Zellen. Die Analyse erfolgte mittels eines 2 %-igen Agarose-Gels bei 100 V für 45 min unter Verwendung von *GelRed* und der *GeneRuler Low Range DNA Ladder* und wurde am Geldokumentationssystem *EBOX VXY2* dokumentiert.

### 3.4.2 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung

Für die Bestimmung der Reinheit *KMT2A*-rearrangierter Zellen wurde eine Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) durchgeführt, sobald eine Sättigung der semi-quantitativen PCR aus „Kapitel 3.4.1 Polymerase-Ketten-Reaktion und Sanger-Sequenzierung“ erkennbar war.

Dafür wurden  $3 \times 10^6$  Zellen bei  $300 \times g$  und RT für 5 min abzentrifugiert, in 1 mL PBS gewaschen und sofort in 4 % Formaldehydlösung aufgenommen. Die Zellsuspension wurde auf Eis eine halbe Stunde fixiert. Die FISH wurde in Kooperation 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 Herrn Prof. Dr. Falko Fend und in Kooperation mit Frau Barbara Mankel angefertigt.

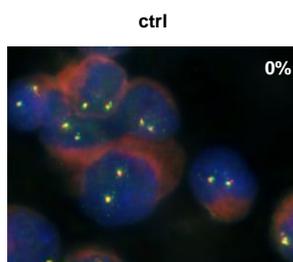
Es wurden je 10  $\mu\text{L}$  Zellsuspension auf silanisierte *SuperFrost Plus* Objektträger aufgetropft und getrocknet. Anschließend wurden die Objektträger in einem 2x Natriumcitrat (*saline-sodium citrate*, SSC) -Puffer bis zur Alterung der Präparate für 40 min bei  $95^\circ\text{C}$  inkubiert. Darauf folgten eine Demineralisierung in Wasser bei RT und eine Dehydrierung mittels aufsteigender Alkoholreihe von 70 % und 100 % Ethanol.

Nach dem Trocknen der Präparate mussten die Objektträger und die *MLL breakpoint* Sonde für 5 min auf  $37^\circ\text{C}$  vorgewärmt werden, sodass anschließend 4  $\mu\text{L}$  der Sonde aufgetragen werden konnten. Es wurde je ein Deckglas aufgelegt und mit *Fixogum* abgedichtet.

Die Denaturierung erfolgte im *HYBrite Hybridization System* bei  $72^\circ\text{C}$  für 5 min. Die Hybridisierung wurde im selben Gerät über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  und geregelter Luftfeuchtigkeit durchgeführt.

Am nächsten Tag wurden *Fixogum* und Deckgläser vorsichtig entfernt und die Präparate weiter mit dem *ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit* behandelt. Es erfolgte ein Waschschrift bei  $72^\circ\text{C}$  für 2 min in *Cytology Stringency Wash Buffer* SSC, um die Präparate anschließend bei RT für 1 min in *Cytology Wash Buffer* SSC waschen und in aufsteigender Alkoholreihe von 70 %, 85 % und 100 % Ethanol trocknen zu können. Die Proben wurden mit der *DAPI/DuraTect-Solution* eingedeckt.

Die Auswertung erfolgte am *Axio Imager M2* mit geeigneten Filtern. Insgesamt wurden zur Analyse 100 Zellen ausgezählt.



**Abbildung 19: Beispiel einer FISH anhand von kulturreexpandierten CD34<sup>+</sup> Zellen mit intaktem *KMT2A*-Gen.** Nach Isolierung und Kultur erfolgte die Analyse der Zellen durch manuelle Auszählung der FISH von 100 Zellen. Repräsentative Fluoreszenzaufnahmen sind gezeigt. Die Analyse wurde in Kooperation mit dem Institut für Pathologie und Neuropathologie und der Abteilung für Allgemeine und Molekulare Pathologie und Pathologische Anatomie des Universitätsklinikums Tübingen angefertigt.

### 3.4.3 Chromosomenanalyse und Karyotypisierung

Für die Karyotypisierung mittels Chromosomenanalyse wurden *KMT2A*-rearrangierte Zellen passagiert und nach 24 h und 48 h wurden mindestens 5 mL Flüssigkultur verwendet. Die Chromosomenanalyse wurde in Kooperation mit dem Institut für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik des Universitätsklinikums Tübingen unter der Leitung von Frau Dr. Ulrike Mau-Holzmann angefertigt.

Zur Mitose-Arretierung wurden 50 µL *KaryoMax Colcemid* pro 5 mL Flüssigkultur zugegeben und bei 37 °C für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 200 x g und RT für 6 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, die Zellen aufgemischt und in 5 mL hypotoner 0,075 M Kaliumchlorid-Lösung resuspendiert. Das Zentrifugenröhrchen wurde mit Parafilm verschlossen, bei 37 °C für 20 min auf dem Schüttler inkubiert und erneut bei 300 x g und RT für 6 min abzentrifugiert.

Nach Verwerfen des Überstandes und Aufmischen der Zellen wurde diese für eine erste Fixierung mit 5 mL Fixativ versetzt. 1 mL wurde tropfenweise, die restlichen 4 mL wurden schnell zugegeben. Die Zellen wurden bei 300 x g und RT für 6 min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes und Aufmischen der Zellen wurde diese erneut mit 5 mL Fixativ bei 4 °C für 30 min fixiert und anschließend zentrifugiert. Ein dritter Fixationsschritt wurde mit 5 mL Fixativ und bei -20 °C für 30 min durchgeführt. Abschließend wurden die fixierten Zellen bei 300 x g und RT für 6 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment konnte bei -20 °C in Fixativ gelagert werden.

Vor der Herstellung der Präparate wurden die Objektträger mit Fixativ bei 4 °C für mindestens 24 h vorbereitet, mit kaltem Wasser abgespült und in Wasser bei 4 °C gelagert. Anschließend konnte das Sediment aufgewirbelt und auf die vorbereiteten, gewässerten Objektträger aufgetropft werden. Bei einer relativen Luftfeuchte von 35 % und 24 °C wurden die Präparate getrocknet und im Anschluss bei 60 °C für 2 h auf dem Heizblock gealtert.

Für die G-Bänderung erfolgte zunächst eine Denaturierung der Präparate bei 90°C für 1 h. Nach Auskühlen der Präparate wurden diese in auf 37 °C vorgewärmtes *Trypsin-EDTA* (0.25 %), *phenol red* getaucht und für 60 s inkubiert. Die Reaktion wurde durch Eintauchen der Präparate in eiskaltes PBS gestoppt. Anschließend erfolgt eine Färbung in verdünnter Giemsa-Lösung (1:20) für 20 min. Die Präparate wurden 3x kurz mit H<sub>2</sub>O gespült. Eine Trocknung über Nacht war nötig, um die fertigen Präparate schließlich mit Euparal einzudecken.

Eine Auswertung der Chromosomenpräparate erfolgte mit dem *Axiophot* Mikroskop. Für die Dokumentation und Analyse wurde die *Ikaros* Software verwendet.

## 3.5 Charakterisierung *KMT2A*-rearrangierter Zellen mittels hämatologischer Diagnostik

### 3.5.1 May-Grünwald-Giemsa-Färbung

Zur Untersuchung der Morphologie wurden Dünnschichtpräparate von *KMT2A*-rearrangierten Zellen nach Erreichen von 100 % Reinheit und von Kontrollzellen, die nur mit Cas9-Protein behandelt und über den gleichen Zeitraum kultiviert wurden, angefertigt. Dazu wurden je  $1 \times 10^5$  Zellen in 1 mL PBS aufgenommen. Für jede Probe wurde ein Objektträger mit einer Filterkarte bestückt und mit einem Zytologietrichter in die Metallclips der Zytocentrifuge gespannt. Die Zellsuspension wurde anschließend in die Probenkammer gegeben. Durch die Zentrifugation bei  $55 \times g$  und RT für 4 min wurden die Zellen auf das Sedimentationsfeld des Objektträgers gebracht und die Flüssigkeit wurde durch die Filterkarte aus der Probenkammer absorbiert. Die Dünnschichtpräparate wurden über Nacht bei RT getrocknet. Nach der Trocknung erfolgte eine Fixierung mit Methanol für 10 min bei RT. Die Präparate wurden anschließend erneut bei RT getrocknet. Darauf folgte die May-Grünwald-Färbung mit verdünntem Färbereagens (1:2) für 10 min bei RT. Direkt im Anschluss wurde mit verdünnter Giemsa-Lösung (1:10) für 20 min bei RT gefärbt. Die Präparate wurden gründlich mit  $H_2O$  gespült und im Folgenden mit Sörensen-Puffer für 3-4 min (maximal 5 min) entfärbt. Nach einer erneuten Trocknung über Nacht wurden die fertigen histologischen Präparate schließlich mit Euparal eingedeckt.

Eine Auswertung der Dünnschichtpräparate erfolgte mit dem *Nikon Eclipse TS100* Mikroskop oder dem *Zeiss Primovert* jeweils mit einem  $\times 40$  Objektiv und den zugehörigen Kameras *Nikon Digital Sight* oder *Axiocam 105 color*. Für die Dokumentation und Analyse wurde jeweils die zugehörige Software verwendet: *NIS elements* oder *ZEN 3.0 blue edition*. Eine Auflösung von  $1280 \times 960$  oder  $2560 \times 1920$  Pixeln wurde entsprechend erreicht.

### 3.5.2 Colony-Forming-Unit-Assay

Für die Analyse der Fähigkeit zur Selbsterneuerung wurden Kulturen in halbfestem Medium durchgeführt (*colony forming units*, CFU).  $1 \times 10^4$  *KMT2A*-rearrangierte Zellen oder Kontrollzellen, die nur mit Cas9-Protein behandelt und über den gleichen Zeitraum kultiviert wurden, wurden in 1 mL des Methylcellulose-basierten MethoCult H4230 Mediums supplementiert mit jeweils 50 ng/mL Zytokinen (FLT3-L, SCF, G-CSF, IL-3, IL-6, TPO) und jeweils  $0,375 \mu M$  Zellzusätzen (SR-1, UM729) resuspendiert. Dabei war darauf zu achten, dass 1 mL halbfestes Medium maximal mit 100  $\mu L$  Flüssigkeit verdünnt wurde. Die Kulturen wurden in eine  $35 \times 10$  mm Zellkulturschale gesetzt, Luftblasen wurden entfernt und je drei Ansätze wurden mit einer  $35 \times 10$  mm Zellkulturschale mit PBS in einer großen  $145 \times 20$  mm Zellkulturschale bei  $37^\circ C$  und 5 %  $CO_2$  für 12-14 Tage kultiviert. Nach der primären Kultur wurden die gebil-

deten Kolonien am *Axiovert 25* Mikroskop gezählt und normiert. Für eine sekundäre Kultur konnte das halbfeste Medium mit 50 mL warmem PBS aufgelöst werden. Die Zellen wurden anschließend bei 300 x g und RT für 5 min abzentrifugiert und wieder zu  $1 \times 10^4$  Zellen/mL halbfestem Medium resuspendiert. Die Kultur erfolgte entsprechend der primären Kultur. Eine Auswertung erfolgte wiederum mikroskopisch nach 12-14 Tagen.

### 3.5.3 Durchflusszytometrie

Die Immunphäotypisierung *KMT2A*-rearrangierter Zellen oder Kontrollzellen, die nur mit Cas9-Protein behandelt und über den gleichen Zeitraum kultiviert wurden, erfolgte durchflusszytometrisch.  $2 \times 10^5$  Zellen wurden hierfür in Rundbodenröhrchen überführt und mit 1 mL FACS-Puffer bei 300 x g und RT für 5 min gewaschen.

Die Färbung der Zellen sollte insgesamt in 100  $\mu$ L erfolgen. Um unspezifische Antikörperbindung an F<sub>c</sub>-Rezeptoren zu verhindern, wurden pro Probe 50  $\mu$ L FACS-Puffer mit 1  $\mu$ L *FcR Blocking Reagent* versetzt und zu den Zellen gegeben. Nach Resuspendieren war eine Inkubation für 5 min bei 4 °C erforderlich. Der zweite Teil der Färbung beinhaltete die Antikörper und den Viabilitätsfarbstoff. Die fehlenden 50  $\mu$ L FACS-Puffer pro Probe wurden mit den entsprechenden Antikörpern in entsprechender Konzentration relativ zum Endvolumen von 100  $\mu$ L versetzt und zur Zellsuspension gegeben. Nach Resuspendieren folgte eine Inkubation für 20 min bei 4 °C. Ein Pipettierschema ist in **Tabelle 29** dargestellt.

**Tabelle 29: Pipettierschema der Färbeschritte für die Durchflusszytometrie für eine Probe**

Puffer	Zusätze	Inkubationsbedingungen
50 $\mu$ L FACS-Puffer	1 $\mu$ L <i>FcR Blocking Reagent</i>	4 °C, 5 min
50 $\mu$ L FACS-Puffer	x $\mu$ L Antikörper	4 °C, 20 min
<b>gesamt</b>	<b>100 <math>\mu</math>L</b>	

Anschließend wurden die Zellen mit 1 mL FACS-Puffer bei 300 x g und RT für 5 min gewaschen, der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden in 100  $\mu$ L FACS-Puffer zur Messung resuspendiert. Die Messung erfolgte an einem *LSRFortessa* unter der Verwendung der *FACS DIVA* Software. Die Konfiguration und die möglichen Kanäle sind in **Tabelle 30** dargestellt.

Es wurden die Daten von mindestens 100.000 Ereignissen aufgezeichnet. Die Auswertung erfolgte mittels *FlowJo V10*. Es wurden Einzelzellen mittels des Vorwärtsstreulichts und des Verhältnisses der Zellfläche zur Zellhöhe ausgewählt. Anschließend wurden die Zellen anhand ihrer Granularität mittels des Vorwärts- und Seitwärtsstreulichts charakterisiert. Darauf folgte die Trennung von lebenden und toten Zellen mittels des Vitalitätsfarbstoffs. Eine anschließende Charakterisierung der Zellen war mit den Markern aus **Tabelle 31** und **Tabelle 32** möglich.

**Tabelle 30: Konfiguration LSRFortessa**

Photomultiplier (PMT), Bandpass (BP) -Filter, *Brilliant Violet* (BV), 4',6-diamidino-2-phenylindol (DAPI), Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP), *Brilliant Blue* (BB), Fluorescein (FITC), *Alexa Fluor* (AF), Carboxyfluoresceindiacetatsuccinimidylester (CFSE), *green fluorescent protein* (GFP), Seitwärtsstreuung (side scatter, SSC), Phycoerythrin (PE), 7-Aminoactinomycin (7-AAD), Propidiumiodid (PI), Allophycocyanin (APC), Hilite (H), Cyanine-basierter Fluoreszenzfarbstoff (CF)

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	-	-	-
rot 640 nm	A	750 DCXXR	HC 785/60	APC/Cy7, APC/AF750, APC/AF780, APC/eF780, ZombieNIR, APC/H7
	B	Q695 LPXR	HC 725/40	AF700
	C	-	ET 670/30	APC, AF647, CF647, Cy5

**Tabelle 31: Färbung für die phänotypische Charakterisierung KMT2A-rearrangierter Zellen I**

*Cluster of differentiation* (CD), Allophycocyanin (APC), Phycoerythrin (PE), Cyanin (Cy), *Brilliant Violet* (BV), *Alexa Fluor* (AF)

Antigen	Fluorochrom	Klon	Verdünnung
CD34	APC	4H11	1:50
CD38	PE/Cy7	HIT2	1:50
CD15	BV605	W6D3	1:50
CD64	APC/Cy7	10.1	1:50
CD14	AF700	HCD14	1:50
CD9	PE	eBioSN4/SN4 C3-3A2	1:50
CD33	BV421	WM53	1:50
CD117	BV711	104D2	1:50
<i>Viability Dye</i> eFluor 506	äquivalent zu AmCyan	-	1:1000

**Tabelle 32: Färbung für die phänotypische Charakterisierung KMT2A-rearrangierter Zellen II**

*Cluster of differentiation* (CD), Phycoerythrin (PE), *Brilliant Violet* (BV), Allophycocyanin (APC), Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP), Cyanin (Cy)

Antigen	Fluorochrom	Klon	Verdünnung
CD32	PE	FUN-2	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
<i>Viability Dye</i> eFluor 506	äquivalent zu AmCyan	-	1:1000

### 3.6 Charakterisierung *KMT2A*-rearrangierter Zellen mittels RNA-Analytik

#### 3.6.1 RNA-Isolation

Zellkulturproben wurden zur RNA-Analytik bei 16 100 x g und 4 °C für 1 min abzentrifugiert, mit 500 µL vorgekühltem PBS (4 °C) gewaschen und erneut bei 16 100 x g und 4 °C für 1 min abzentrifugiert. Die Zellpellets wurden bei -80 °C gelagert. Die Isolation von RNA erfolgte mittels des *NucleoSpin RNA Kits* nach Herstellerangaben basierend auf einer maximalen Zellzahl von  $5 \times 10^6$  Zellen. Eine DNase Behandlung war inbegriffen.

#### 3.6.2 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

Für die RNA-Analytik war eine Synthese der komplementären (*complementary*, c) DNA *KMT2A*-rearrangierter Zellen und Kontrollzellen, die nur mit Cas9-Protein behandelt wurden, nötig. Die Erststrang-cDNA wurde mittels der *RevertAid H Minus Reverse Transcriptase*, des *RiboLock RNase Inhibitors*, des *dNTP Mixes* und der *Random Hexamers* nach Herstellerangaben synthetisiert (**Tabelle 33**).

**Tabelle 33: Erststrang-cDNA-Synthese**

Reverse Transkriptase (RT), Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs), quantum satis (q.s., so viel wie nötig)

Pipettierschema		Programm		
isolierte RNA	1,0 µg	Inkubation	65 °C	5 min
<i>Random Hexamer</i> Primer	0,2 µg	Kühlung	4 °C	1 min
H <sub>2</sub> O RNasefrei	q.s.	Primeranlagerung	25 °C	5 min
<b>gesamt</b>	<b>12,5 µL</b>	Reverse Transkription	42 °C	60 min
<i>5x Reaction Buffer</i>	4,0 µL	Inaktivierung RT	70 °C	5 min
<i>RiboLock RNase Inhibitor</i>	0,5 µL	Kühlung	4 °C	∞
<i>dNTP Mix</i>	2,0 µL			
<i>RevertAid H Minus RT</i>	1,0 µL			
<b>gesamt</b>	<b>20,0 µL</b>			

Die cDNA wurde bei -20°C gelagert. Anschließend wurde die Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) durchgeführt, um die Fusionen der mRNA infolge der t(4;11)- und t(9;11)-Translokationen detektieren zu können. Primer aus „Kapitel 2.8 Primer“ aus **Tabelle 18** und der *Maxima SYBR Green qPCR Master Mix*, der die *Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase* und *dNTPs* beinhaltet, wurden verwendet (**Tabelle 34**).

**Tabelle 34: RT-PCR-Bedingungen**

Quantum satis (q.s., so viel wie nötig)

Pipettierschema		Programm		
<i>Maxima SYBR Green Master Mix</i>	10 µL	Initiale Denaturierung	95 °C	10 min
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 <sub>2</sub> O nukleasefrei	q.s.	Kühlung	12 °C	∞
<b>gesamt</b>	<b>20 µL</b>			

Als Kontrolle wurden außerdem Ansätze ohne cDNA (*no template control*, NTC) verwendet. Das Vorhandensein von RT-PCR-Produkten wurden mittels eines 2 %-igen Agarose-Gels bei 100 V für 45 min unter Verwendung von *GelRed* und der *GeneRuler Low Range DNA Ladder* analysiert. Die Dokumentation erfolgte am Geldokumentationssystem *EBOX VXY2*. Die positiven Banden konnten anschließend ausgeschnitten, mithilfe des *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kits* isoliert und in 15  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  eluiert werden. Eine darauffolgende Sequenzierung sollte die Identifikation der Translokationsprodukte auf mRNA-Ebene bestätigen. Hierfür wurden je 18 ng PCR-Produkt pro 100 bp in 12  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  und jeweils 3  $\mu\text{L}$  des 10  $\mu\text{M}$  Vorwärts- oder Rückwärtsprimers in zwei Ansätzen zu *Microsynth SeqLab* geschickt.

### 3.6.3 RNA-Sequenzierung

Nach der RNA-Isolation konnte eine Analyse des Transkriptoms *KMT2A*-rearrangierter Zellen und Kontrollzellen, die nur mit Cas9-Protein behandelt wurden, mittels RNA-Sequenzierung durchgeführt werden. Die Qualität der RNA wurde am *NanoDrop* und am *Bioanalyzer* bestimmt. Die Erstellung der Bibliothek sowie die Sequenzierung an sich wurden mit den *TrueSeq Kits* der *Illumina*-Methode durchgeführt. Die RNA-Sequenzierung wurde in Kooperation 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 durchgeführt.

Die Qualität der RNA-Sequenzierungsdaten wurde durch die *FastQC V0.11.4* Software bestimmt, um die Sequenzierungszyklen mit niedriger durchschnittlicher Qualität, mögliche Adapterkontaminationen oder wiederkehrende Sequenzen aus der PCR-Amplifikation zu identifizieren. Anschließend wurden die gelesenen Fragmente (*reads*) mittels der *STAR V2.5.4b* Software gegen das humane Genom *Ensembl homo sapiens genome V91* abgeglichen.<sup>[141]</sup> Dies erlaubte einen lückenhaften Abgleich, um Splicevarianten auszumachen. Die Qualität des Abgleichs wurde mittels der *samtools V1.1* Software durchgeführt. Die normalisierten Werte gelesener Fragmente aller Gene wurden aus *GenomicAlignments V1.14.2*<sup>[140]</sup> und *DESeq2 V1.18.1*<sup>[140]</sup> erhalten. Transkripte mit weniger als 50 *reads* wurden von weiterführenden Analysen ausgeschlossen. Wichtige Grenzwerte wurden folgendermaßen gesetzt:

- differentielle Expression:  $|\log_2 \text{fold-change}| \geq 1$
- angepasster p-Wert nach Benjamini-Hochberg (BH): *BH-adjusted p-value*  $\leq 0,01$

## Methoden

Die *surrogate variable analysis* V3.26.0 (sva)<sup>[140]</sup> wurde verwendet, um einen falsch-positiven Unterschied zwischen den Proben zu minimieren. Die Rohdaten aus *DESeq2* V1.18.1<sup>[140]</sup> wurden benutzt, um *normalized reads per kilobase million* (nRPKMs) aller gelesener Fragmente zu berechnen, die anschließend als Maßstab für die relative Genexpression dienten. Die Datenanalyse der RNA-Sequenzierung wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Epigenetik des Instituts für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik des Universitätsklinikums Tübingen unter der Leitung von Dr. Julia Schulze-Hentrich und in Kooperation mit Dr. Thomas Hentrich durchgeführt. Die Datensätze der RNA-Sequenzierung sind in der Datenbank *NCBI's Gene Expression Omnibus* (GEO) hinterlegt und unter der GEO Zugangsnummer GSE128342 abrufbar.<sup>[145][146]</sup>

### 3.6.4 Gene-set-enrichment-Analyse

Die zugrundeliegenden Daten aus „Kapitel 3.6.3 RNA-Sequenzierung“ konnten mit verschiedenen Signaturen mittels der *gene-set-enrichment*-Analyse (GSEA) abgeglichen werden.<sup>[142][143]</sup> Zum einen erfolgte die Charakterisierung *KMT2A*-rearrangierter Zellen über einen Vergleich mit den Patientendatensätzen von Andersson et al., 2015 und Stam et al., 2010.<sup>[84][153]</sup> Des Weiteren konnten Methylierungssignaturen mittels der allgemein verfügbaren *GO-Methylation*-Signatur<sup>[154][155]</sup> der *MSigDB database* V7.0<sup>[143][144]</sup> identifiziert werden. Die Analyse erfolgte mittels der *GSEA* V3.0 Software.<sup>[142][143]</sup>

### 3.6.5 Quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

Für die quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR) war erneut eine Synthese der cDNA *KMT2A*-rearrangierter Zellen und Kontrollzellen, die nur mit Cas9-Protein behandelt wurden, nötig. Die Erststrang-cDNA wurde mittels der *RevertAid H Minus Reverse Transcriptase*, des *RiboLock RNase Inhibitors*, des *dNTP Mixes* und der *Random Hexamers* nach Herstellerangaben synthetisiert (**Tabelle 35**).

#### Tabelle 35: Erststrang-cDNA-Synthese

Reverse Transkriptase (RT), Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs), quantum satis (q.s., so viel wie nötig)

Pipettierschema		Programm	
isolierte RNA	1,0 µg	Inkubation	65 °C 5 min
<i>Random Hexamer</i> Primer	0,2 µg	Kühlung	4 °C 1 min
H <sub>2</sub> O RNasefrei	q.s.	Primeranlagerung	25 °C 5 min
<b>gesamt</b>	<b>12,5 µL</b>	Reverse Transkription	42 °C 60 min
<i>5x Reaction Buffer</i>	4,0 µL	Inaktivierung RT	70 °C 5 min
<i>RiboLock RNase Inhibitor</i>	0,5 µL	Kühlung	4 °C ∞
<i>dNTP Mix</i>	2,0 µL		
<i>RevertAid H Minus RT</i>	1,0 µL		
<b>gesamt</b>	<b>20,0 µL</b>		

Die cDNA wurde bei -20°C gelagert. Anschließend wurde die RT-qPCR durchgeführt, um die Expression der Zielgene nachfolgender Signalwege detektieren zu können. Primer aus „Kapitel 2.8 Primer“ aus **Tabelle 19** und der *Maxima SYBR Green qPCR Master Mix*, der die *Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase*, *dNTPs* und den *SYBR Green I dye* beinhaltet, wurden verwendet (**Tabelle 36**).

**Tabelle 36: RT-qPCR-Bedingungen**  
Quantum satis (q.s., so viel wie nötig)

Pipettierschema	
<i>Maxima SYBR Green Master Mix</i>	10 µL
Vorwärtsprimer (2 µM)	3 µL
Rückwärtsprimer (2 µM)	3 µL
cDNA	50 ng
H <sub>2</sub> O nukleasefrei	q.s.
<b>gesamt</b>	<b>20 µL</b>

Programm		
Initiale Denaturierung	95 °C	10 min
Denaturierung	95 °C	14 sec
Primeranlagerung	60 °C	1 min
→ Wiederholung		45 x
Kühlung	RT	∞
Schmelzkurvenerstellung	+ 0,06 °C	/ 1 sec
von 65 °C-95 °C		

Zur Quantifizierung wurde jede Probe in Duplikaten gemessen. Als Kontrolle wurden außerdem NTCs verwendet. Als Referenzgen wurde 18S rRNA mittels 18S rRNA Sonde [JOE]TGCTGGCACCAGACTTGCCCTC[TAM] und dem *Maxima Probe qPCR Master Mix* amplifiziert (**Tabelle 37**).

**Tabelle 37: RT-qPCR-Bedingungen für das Referenzgen**  
Quantum satis (q.s., so viel wie nötig)

Pipettierschema	
<i>Maxima Probe qPCR Master Mix</i>	10 µL
Vorwärtsprimer (0,5 µM)	2 µL
Rückwärtsprimer (0,5 µM)	2 µL
cDNA	50 ng
H <sub>2</sub> O nukleasefrei	q.s.
18S rRNA Sonde (4 µM)	1 µL
<b>gesamt</b>	<b>20 µL</b>

Programm		
Initiale Denaturierung	95 °C	10 min
Denaturierung	95 °C	14 sec
Primeranlagerung	60 °C	1 min
→ Wiederholung		45 x
Kühlung	RT	∞

Die Dokumentation erfolgte am *LightCycler 480 Instrument II* und mittels der  $\Delta\Delta Cq$ -Methode. Aus den sigmoidalen Kurvenverläufen wurden die *quantification cycle* (Cq) -Werte bestimmt, die Ergebnisse auf die 18S rRNA normalisiert und Kontrollzellen als Kalibrator verwendet.

## 3.7 Identifikation und Validierung von Zielstrukturen

### 3.7.1 RNA-Sequenzierung und RT-qPCR

Für die Identifikation von Zielstrukturen wurden die RNA-Sequenzierungsdaten aus „Kapitel 3.6.3 RNA-Sequenzierung“ verwendet. Die Auswertung erfolgte wie oben beschrieben. Grenzwerte wurden beibehalten und es wurden nRPKMs dargestellt. Die Validierung der RNA-Sequenzierung erfolgte mittels RT-qPCR wie in „Kapitel 3.6.5 Quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion“ beschrieben. Es wurden die Primer aus „Kapitel 2.8 Primer“ und **Tabelle 19** verwendet.

### 3.7.2 Proteinextraktion

Zur zusätzlichen Validierung der Überexpression innovativer Zielstrukturen wurde eine relative Quantifizierung der Proteinkonzentration durchgeführt. Hierzu wurden *KMT2A*-rearrangierte Zellen nach Erreichen von 100 % Reinheit und Kontrollzellen, die nur mit Cas9-Protein behandelt wurden, bei 300 x g und RT für 5 min zentrifugiert. Die Zellpellets konnten bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert werden. Zur Extraktion des zellulären Gesamtproteins wurden die Zellen mit RIPA-Puffer für 1 h auf Eis lysiert. Die Zellsuspension wurde alle 10 min durchmischt und zuletzt mit Ultraschall bearbeitet. Die Proben wurden bei 16 100 x g und 4 °C 20 min zentrifugiert, der Überstand anschließend mit einem gleichen Volumenteil an 4x Lämmli-Puffer versetzt und für 5 min auf 95 °C erhitzt.

### 3.7.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot

Gleiche Proteinmengen wurden auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel bestehend aus Sammel- und Trenngel geladen. Zur Größenbestimmung wurde der *PageRuler Plus Prestained Protein Ladder* verwendet. In Laufpuffer wurde die Gelelektrophorese für 1 h 15 min bei 140 V durchgeführt. Nach erfolgreicher SDS-PAGE wurden die aufgetrennten Proteine aus dem SDS-Polyacrylamid-Gel auf eine *Immobilon-FL PVDF* Membran durch das *wet blot*-Verfahren übertragen. Hierfür wurde der Transferpuffer verwendet und eine Spannung von 100 V für 1 h 15 min angelegt. Die Membran wurde anschließend für 20 min in 5 % Milchpulver blockiert, 3x mit TBS-T für je 5 min gewaschen und über Nacht bei 4 °C mit den entsprechenden Primärantikörpern inkubiert. Anschließend erfolgten erneut 5 Waschriffe mit TBS-T für je 5 min. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurde für 1 h bei RT durchgeführt. Nach weiteren 5 Waschriffen mit TBS-T für je 10 min wurde die Membran getrocknet und am *Li-Cor Odyssey CLx* mit der Image Studio Software dokumentiert. Die Quantifizierung des relativen Proteingehalts erfolgte ebenfalls mit Image Studio. Hierfür wurde Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Referenzprotein verwendet.

### 3.8 *in vitro* Inhibitortestung

#### 3.8.1 Versuchsaufbau

Um die CRISPR/Cas9-generierten *KMT2A*-rearrangierten Zellen als *in vitro* Testsystem für innovative Wirkstoffe zu verwenden, wurde eine Flüssigkultur etabliert. *KMT2A*-rearrangierte Zellen oder ursprünglich nur mit Cas9-Protein behandelte Kontrollzellen wurden in Stammzellmedium III zu  $7,5 \times 10^5$  Zellen/mL ausgesät.

Die verwendeten Inhibitoren wurden in Dimethylsulfoxid (DMSO) angelöst. Dabei wurden die Verdünnungen so gewählt, dass die eingesetzte DMSO-Konzentration 0,1 % betrug. Dies entsprach einer 1:1.000 Verdünnung der jeweiligen Behandlung von Arbeitslösung zu Zellkultur. Bei Titrationen wurden dementsprechend mehrere Arbeitslösungen sequentiell verdünnt. Zellen ohne Zusatz und DMSO allein wurden als Kontrollen verwendet, um die Letalität des DMSOs auszuschließen und einen korrekten Bezug zu haben.

Nach Ansetzen der Flüssigkulturen wurden die Zellen alle 2 Tage passagiert und wieder auf die ursprüngliche Zelldichte zurückgesetzt. Meist war hierfür eine 1:2 Verdünnung notwendig. Die maximale Kulturzeit betrug 6 Tage.

**Tabelle 38: Übersicht der Inhibitoren in *KMT2A*-rearrangierten und Kontrollzellen**

Zielstruktur	Inhibitor	alternativer Inhibitor	Dosierungsschema
DOT1L	EPZ004777	EPZ5676	vollständige Nachdosierung → an Tag 2 und Tag 4
PRMT5	EPZ015666	EPZ015938	vollständige Nachdosierung → an Tag 2 und Tag 4
MAT2A	PF-9366	-	Supplementierung des frischen Mediums → an Tag 2 und Tag 4

Die Inhibition von DOT1L und PRMT5 erforderte eine Nachdosierung der Inhibitoren alle 2 Tage. Das bedeutete, dass die entsprechende Behandlung an Tag 2 und Tag 4 nach der Zellpassagierung erneut 1:1.000 zugegeben wurde. Für die Inhibition von MAT2A wurde lediglich das frische Medium bei jeder Passage mit dem 1:1.000-fachen des Inhibitors versetzt und zu den Zellen gegeben, um Verdünnungseffekte auszuschließen. Eine Übersicht ist in **Tabelle 38** dargestellt.

Das Chemotherapeutikum Cytarabin (Ara-C) wurde in Natrium-(S)-lactat-Lösung (50 %) bereitgestellt und in PBS verdünnt. Die entsprechenden Konzentrationen wurden ebenfalls so eingestellt, dass eine 1:1.000 Verdünnung für die Anwendung in der Flüssigkultur nötig war.

Für sequenzielle Versuche wurden *KMT2A*-rearrangierte Zellen für insgesamt 6 Tage mit den jeweiligen Inhibitoren vorbehandelt. Anschließend wurden die Behandlungen ausgewaschen, die Zellen zu originaler Zelldichte wieder ausgesät und für weitere 2 Tage mit Ara-C oder PBS als Kontrolle behandelt.

Der MAT2A-Inhibitor PF-9366 wurde zudem in kommerziellen Zelllinien getestet. Diese wurden, wie in **Tabelle 39** gezeigt, in Flüssigkultur ausgesät. Die Behandlungen erfolgten ebenso mit einer 1:1.000 Verdünnung der entsprechenden Arbeitslösung zu einer finalen DMSO-

Konzentration von 0,1 %. Für eine Kulturdauer von 6 Tagen erfolgte die erste Passage der Zellen nach 4 Tagen, wobei die Zellen wieder auf die ursprüngliche Zelldichte zurückgesetzt wurden. Für die Inhibition von MAT2A wurde auch hier das frische Medium bei jeder Passage mit dem 1:1.000-fachen des Inhibitors versetzt und zu den Zellen gegeben, um Verdünnungseffekte auszuschließen.

**Tabelle 39: Zelllinien für die Inhibitortestung**

Zelllinie	Anfangszelldichte	Medium
SKM-1	0,5 x 10 <sup>6</sup> /mL	RPMI 1640 + 15 % FBS + 1 % P/S
SEM	0,5 x 10 <sup>6</sup> /mL	IMDM + 10 % FBS + 1 % P/S
THP-1	0,2 x 10 <sup>6</sup> /mL	RPMI 1640 + 10 % FBS + 1 % P/S

Als Methoden zur Auswertung der *in vitro* Inhibitortestung wurden die im Folgenden aufgeführten In-Prozess- und Endpunktanalysen verwendet.

### 3.8.2 Viabilitätsanalyse

Zur Bestimmung der Zellviabilität nach Inhibitorbehandlung im Vergleich zu DMSO-behandelten Zellen wurde der Viabilitätsfarbstoff *AlamarBlue* verwendet. Drang das blaue, zellpermeable, nicht-fluoreszente Resazurin in lebende Zellen ein, so wurde es zum roten, hoch-fluoreszenten Resorufin reduziert.

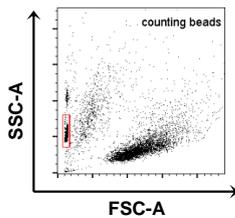
Zellen wurden nach 6 Tagen Behandlung resuspendiert und 100 µL Zellsuspension wurde in eine 96-Well-Zellkulturplatte übertragen. Dazu wurden je 10 µL *AlamarBlue* gegeben und für 2-4 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Auswertung erfolgte anschließend fluoreszenzbasiert mit einem *Synergy HTX Multi-Mode Reader* und der *Gen Version 2.0 Data Analysis Software*.

### 3.8.3 Proliferationsuntersuchung

Die Proliferation der Zellen über den 6-tägigen Behandlungszeitraum wurde durch die Zellzahlbestimmung mittels einer *Neubauer*-Zählkammer überwacht. Alle 2 Tage wurde die Gesamtzellzahl bestimmt und die Wachstumskurven erstellt. Um zwischen toten und lebenden Zellen zu differenzieren, wurden die Zellen mit Trypanblau-Lösung gefärbt. Damit konnte zudem die relative Zellzahl zu DMSO-behandelten Zellen als Kontrolle nach 6 Tagen Behandlung errechnet werden.

Als weitere Methode diente die durchflusszytometrische Bestimmung der relativen Zellzahl. Der in „Kapitel 3.8.4 Apoptoseanalyse“ beschriebenen Färbung wurden *Latex Beads* von 3,0 µm Durchmesser im Verhältnis 1:7.000, bezogen auf ein Endvolumen von 500 µL, zugesetzt. Die Messung erfolgte an einem *LSRFortessa* unter der Verwendung der *FACS DIVA*

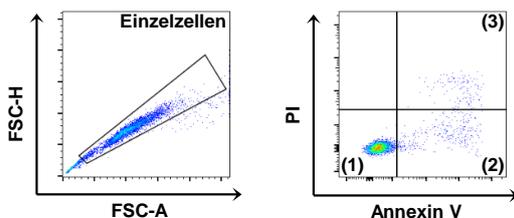
Software. Es wurden Einzelzellen mittels des Vorwärtsstreulichts und des Verhältnisses der Zellfläche zur Zellhöhe ausgewählt. Anschließend erfolgte die Trennung von lebenden und toten Zellen mittels des Vitalitätsfarbstoffs (PI). Die durchflusszytometrische Datenerfassung wurde anhand einer definierten Anzahl der *counting beads* im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht gestoppt, sodass die Anzahl der lebenden Zellen ermittelt und zur DMSO-Kontrolle relativiert werden konnte (**Abbildung 20**). Es wurden mindestens 6.000 lebende Zellen in der DMSO-Kontrolle erfasst. Die Auswertung erfolgte mittels *FlowJo V10*.



**Abbildung 20: Counting beads im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht.** Vorwärtsstreulicht (FSC-A), Seitwärtsstreulicht (SSC-A), *Latex beads* 3,0  $\mu\text{m}$  (*counting beads*, rotes Rechteck). Gezeigt sind eine repräsentative durchflusszytometrische Analyse *KMT2A*-rearrangierter Zellen und die Abgrenzung der *counting beads* im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht. Die Datenerfassung wurde anhand einer definierten Anzahl der *counting beads* gestoppt.

### 3.8.4 Apoptoseanalyse

Die Externalisierung von Phosphatidylserin zur Außenseite der Zellmembran während der Apoptose wurde mittels des *FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I* analysiert. Anhand der Färbung mit Propidiumiodid (PI) und einer Annexin V-Färbung konnte zwischen lebenden (1), früh apoptotischen (2) und spät apoptotischen (3) Zellen unterschieden werden (**Abbildung 21**).



**Abbildung 21: Analysestrategie zur Differenzierung apoptotischer Zellen.** Vorwärtsstreulicht (FSC), Zellfläche (*area*, A), Zellhöhe (*height*, H), Propidiumiodid (PI), lebende Zellen (1), früh apoptotische Zellen (2), spät apoptotische Zellen (3). Gezeigt ist eine repräsentative durchflusszytometrische Analyse *KMT2A*-rearrangierter Zellen.

Je  $1-3 \times 10^5$  Zellen wurden hierfür in Rundbodenröhrchen überführt und mit 1 mL PBS bei  $300 \times g$  und RT für 5 min gewaschen. Die Messung wurde in 500  $\mu\text{L}$  Flüssigkeit durchgeführt, sodass 500  $\mu\text{L}$  1x Annexin-Puffer je Probe aus dem 10x Annexin-Puffer angesetzt wurden. Davon wurden 100  $\mu\text{L}$  pro Probe entnommen und mit den entsprechenden Färbereagenzien versetzt. Den restlichen 400  $\mu\text{L}$  wurden *Latex Beads*, wie in „Kapitel 3.8.3 Proliferationsuntersuchung“ beschrieben, zugesetzt. Ein Pipettierschema ist in **Tabelle 40** dargestellt.

**Tabelle 40: Pipettierschema der Färbung zur Apoptoseanalyse für eine Probe**

Propidiumiodid (PI), Fluorescein (FITC), Alexa Fluor (AF), Raumtemperatur (RT)

Puffer	Zusätze	Inkubationskonditionen
100 µL 1x Annexin-Puffer	5,0 µL PI 2,5 µL FITC Annexin V 1,0 µL AF700 CD14-Antikörper	RT, 15 min
400 µL 1x Annexin-Puffer	0,07 µL <i>Latex Beads</i>	Abstopplösung
<b>gesamt</b>	<b>500 µL</b>	→ Messung innerhalb von 2 h

Anschließend wurden die Zellen jeder Probe in 100 µL der Färbelösung resuspendiert und bei RT im Dunkeln für 15 min inkubiert. Die Reaktion wurde schließlich mit den 400 µL des 1x Annexin-Puffers, der die *counting beads* enthielt, abgestoppt.

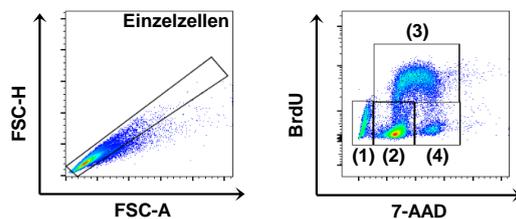
Die Messung erfolgte innerhalb der nachfolgenden 2 h an einem *LSRFortessa* unter der Verwendung der *FACS DIVA* Software. Die Auswertung erfolgte mittels *FlowJo V10*. Vor der Analyse wurden Einzelzellen mittels des Vorwärtsstreulichts und des Verhältnisses der Zellfläche zur Zellhöhe ausgewählt.

### 3.8.5 Zellzyklusanalyse

Die Zellzyklusanalyse erfolgte mit dem *FITC BrdU Flow Kits* nach Herstellerangaben. Hierfür wurden Zellen für 40 min mit 10 µM Bromodesoxyuridin (BrdU) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> gepulst. Anschließend wurden hiervon 5 x 10<sup>5</sup> Zellen pro Probe in ein Rundbodenröhrchen überführt und mit 1 mL FACS-Puffer bei 300 x g und RT für 5 min gewaschen. Es folgten die Fixierungs- und Permeabilisierungsschritte laut Herstellerangaben mit *Cytofix/Cytoperm Buffer* bei RT für 20 min und *Cytoperm Permeabilization Buffer Plus* für 10 min auf Eis sowie ein jeweiliger Waschschrift mit *1x Perm/Wash Buffer* bei 300 x g und RT für 5 min. Der DNase-Verdau mit 30 µg DNase/10<sup>6</sup> Zellen bei 37 °C für 60 min wurde anschließend im Wasserbad durchgeführt. Nach dem vorgeschriebenen Waschschrift mit *1x Perm/Wash Buffer* bei 300 x g und RT für 5 min erfolgte die Färbung des eingebauten BrdUs durch dem 1:50 vorverdünnten FITC Brdu-Antikörper. Nach einem weiteren Waschschrift mit *1x Perm/Wash Buffer* bei 300 x g und RT für 5 min konnte der DNA-Gehalt mit 20 µL 7-AAD gefärbt werden. Die Messung erfolgte an einem *LSRFortessa* unter der Verwendung der *FACS DIVA* Software. Die Auswertung erfolgte mittels *FlowJo V10*. Vor der Analyse wurden Einzelzellen mittels des Vorwärtsstreulichts und des Verhältnisses der Zellfläche zur Zellhöhe ausgewählt.

Durch die oben beschriebene Färbung konnte zwischen den einzelnen Phasen des Zellzyklus, G<sub>0</sub>-, G<sub>1</sub>-, G<sub>2</sub>-, M- und S-Phase, und apoptotischen Zellen (1) differenziert werden. Befanden sich Zellen im dormanten Stadium, also den Phasen G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (2), lag die DNA einfach in den Zellen vor. Die 7-AAD Färbung zeigte einen geringen DNA-Gehalt. Fand gerade eine DNA-Synthese statt, stieg der DNA-Gehalt in den Zellen an. Gleichzeitig wurden die Doppelstränge zur Synthese aufgetrennt, sodass ein Einbau des BrdU möglich war und die Zellen der S-Phase zugeordnet werden konnten (3). In der G<sub>2</sub>- und M-Phase lag die DNA doppelt

vor, sodass mittels 7-AAD ein zweifacher DNA-Gehalt quantifiziert wurde (4) (**Abbildung 22**).



**Abbildung 22: Analysestrategie zur Bestimmung des Zellzyklus.** Vorwärtsstreulicht (FSC), Zellfläche (*area*, A), Zellhöhe (*height*, H), Bromodesocyturidin (BrdU), apoptotische Zellen (1), G0/G1-Phase (2), S-Phase (3), G2/M-Phase (4). Gezeigt ist eine repräsentative durchflusszytometrische Analyse *KMT2A*-rearrangierter Zellen.

### 3.8.6 Differenzierungsanalyse

Für die Untersuchung der Differenzierungsunterschiede nach 6 Tagen Behandlung wurden verschiedene Endpunktanalysen durchgeführt. Zur Darstellung der Morphologie wurden Dünnschichtpräparate von behandelten und DMSO-behandelten Zellen angefertigt. Die Anfertigung der Dünnschichtpräparate und die Durchführung der histologischen Färbung erfolgten, wie in „Kapitel 3.5.1 May-Grünwald-Giemsa-Färbung“ beschrieben. Des Weiteren konnte die Regulation des Differenzierungsmarkers CD14 und somit dessen Expression auf der Oberfläche bestimmt werden. Diese Analyse wurde einhergehend mit der in „Kapitel 3.8.4 Apoptoseanalyse“ beschriebenen Methode durchgeführt. Ein Pipettierschema ist in **Tabelle 40** dargestellt. Die Differenzierung wurde nicht nur auf morphologischer oder phänotypischer Ebene sichtbar, sondern wurde zunächst auf epigenetischer Ebene induziert und resultierte in der veränderten Expression *KMT2A*-translokationsspezifischer Signaturgene. Eine Inhibitorbehandlung führte entsprechend zu einer Herunterregulation dieser Zielgene, deren Expression durch eine RT-qPCR bestimmt wurde. Die Durchführung erfolgte wie in „Kapitel 3.6.5 Quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion“ beschrieben.

Weiter wurden Zellen nach Inhibitorbehandlung mit PF-9366 mittels RNA-Sequenzierung analysiert. Die Probenvorbereitung und Qualitätsbestimmung erfolgte wie in „Kapitel 3.6.3 RNA-Sequenzierung“ beschrieben. Die Bibliothek wurde hier mit dem *QuantSeq 3' mRNA-Seq Library Prep Kit FWD* erstellt. Die Sequenzierung wurde mit dem *NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5 (75 Cycles)* der Illumina-Methode durchgeführt. Die Datenanalyse der RNA-Sequenzierung erfolgte wie in „Kapitel 3.6.3 RNA-Sequenzierung“ beschrieben. Wichtige Grenzwerte wurden folgendermaßen gesetzt:

- differentielle Expression:  $|\log_2 \text{fold-change}| \geq 0,5$
- angepasster p-Wert nach Benjamini-Hochberg (BH): *BH-adjusted p-value*  $\leq 0,1$

## 3.9 Statistik

### 3.9.1 Darstellung zusammengefasster Daten

Die hier gezeigten *in vitro* Daten wurden durch die deskriptiven statistischen Größen des arithmetischen Mittelwerts und der Standardabweichung (*standard deviation*, SD) dargestellt. Neu ausgewertete Daten aus bereits publizierten Datensätzen wurden mit ihren ursprünglichen statistischen Parametern dargestellt. Die jeweiligen Größen sind in den entsprechenden Abbildungsbeschriftungen beschrieben.

### 3.9.2 Statistische Testverfahren

Um eine Aussage über die statistische Signifikanz treffen zu können, wurde zunächst die Verteilung der jeweiligen Stichprobe bestimmt. Als Test auf Normalverteilung wurde der Shapiro-Wilk-Test verwendet. Anschließend wurde auf Varianzgleichheit getestet. Hierfür wurde der F-Test angewandt. Bei Ablehnung der Nullhypothese des F-Tests bei  $p \leq 0,05$  war schließlich ein ungepaarter *t*-Test möglich. Eine Signifikanz wurde ab einem  $p \leq 0,05$  angenommen.

Innerhalb einer Abbildung wurde auch dann ein *t*-Test durchgeführt, wenn ein Parameter der vorherigen Tests unzutreffend war. Trotzdem wurden adäquate Testverfahren für diese Einzelfälle verwendet, um sich der Aussage, die Nullhypothese anzunehmen oder abzulehnen, sicher zu sein. Als eine Anpassung bei nicht-normalverteilten Stichproben aber gleicher Verteilung konnte der Mann-Whitney-Test herangezogen werden. Bei normalverteilten Proben aber keiner Varianzgleichheit wurde das Ergebnis zusätzlich mit einem Welch-Test überprüft.

Die statistischen Testverfahren wurden mittels der *GraphPad PRISM 8* Software durchgeführt.

### 3.9.3 Synergieberechnung

Für die Synergieberechnungen wurde die Methode nach Chou-Talalay verwendet.<sup>[156]</sup> Zunächst mussten hierfür die Dosis-Wirkungs-Kurven durch die Verwendung steigender Konzentrationen der Einzelbehandlungen der zu analysierenden Substanzen erstellt werden. Aus den Daten wurden folglich Kurven nach einem vierparametrischen logarithmischen Modell mittels der *GraphPad PRISM 8* Software interpoliert.

Anschließend wurde die Wirksamkeit beider Substanzen mit Hilfe der mittleren inhibitorischen Konzentration bei 50 % des maximalen Effekts (*inhibitory concentration*,  $IC_{50}$ ) bewertet und eingestuft. Ausgehend von dem Verhältnis der  $IC_{50}$ -Werte beider Substanzen wurden die Titrationsschritte mit konstantem, äquipotenten Verhältnis ermittelt.

Aus den  $IC_{50}$ -Werten der Einzelbehandlungen sowie der kombinatorischen Dosis-Wirkungskurve konnten Isobologramme zu 50 % Effektniveau zur Bestimmung der Synergie erstellt werden.<sup>[156]</sup> Lagen die Datenpunkte der Kombinationstherapie auf oder über der Verbindungslinie der Einzelbehandlungen, musste von einem additiven oder antagonistischen Effekt ausgegangen werden. Lagen die Datenpunkte der Kombinationstherapie unterhalb der Verbindungslinie der Einzelbehandlungen, konnte von Synergie gesprochen werden.<sup>[156]</sup>

Darüberhinaus konnten nach Chou-Talalay anhand der  $IC_{50}$ -Werte entsprechende Kombinationsindices (*combination indices*, CI) berechnet werden.<sup>[156]</sup>

$$CI = \frac{IC_{50}(S1_{komb})}{IC_{50}(S1)} + \frac{IC_{50}(S2_{komb})}{IC_{50}(S2)}$$

**Abbildung 23: Berechnung des Kombinationsindex.** Inhibitorische Konzentration bei 50 % des maximalen Effekts (*inhibitory concentration*,  $IC_{50}$ ), Substanz 1 (S1), Substanz 2 (S2), Kombinationsbehandlung (komb). Gezeigt ist die Berechnung des Kombinationsindex nach Chou-Talalay.<sup>[156]</sup>

Zunächst mussten hierfür die  $IC_{50}$ -Werte beider Substanzen aus den Einzelbehandlungen bekannt sein, um die Werte in die jeweiligen Nenner entsprechend einzusetzen. Anschließend musste die Konzentrationszusammensetzung identifiziert werden, die zu 50 % Inhibition infolge einer Kombination führt. Die dazu beitragenden Konzentrationen beider Substanzen konnten dann in den entsprechenden Zähler der Formel eingesetzt werden.

Ein CI größer als 1 ( $CI \geq 1$ ) indizierte Antagonismus, ein CI gleich 1 ( $CI = 1$ ) indizierte einen additiven Effekt, ein CI kleiner als 1 ( $CI \leq 1$ ) indizierte Synergie.<sup>[156]</sup>

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Etablierung des humanen *KMT2A*-CRISPR/Cas9-Systems

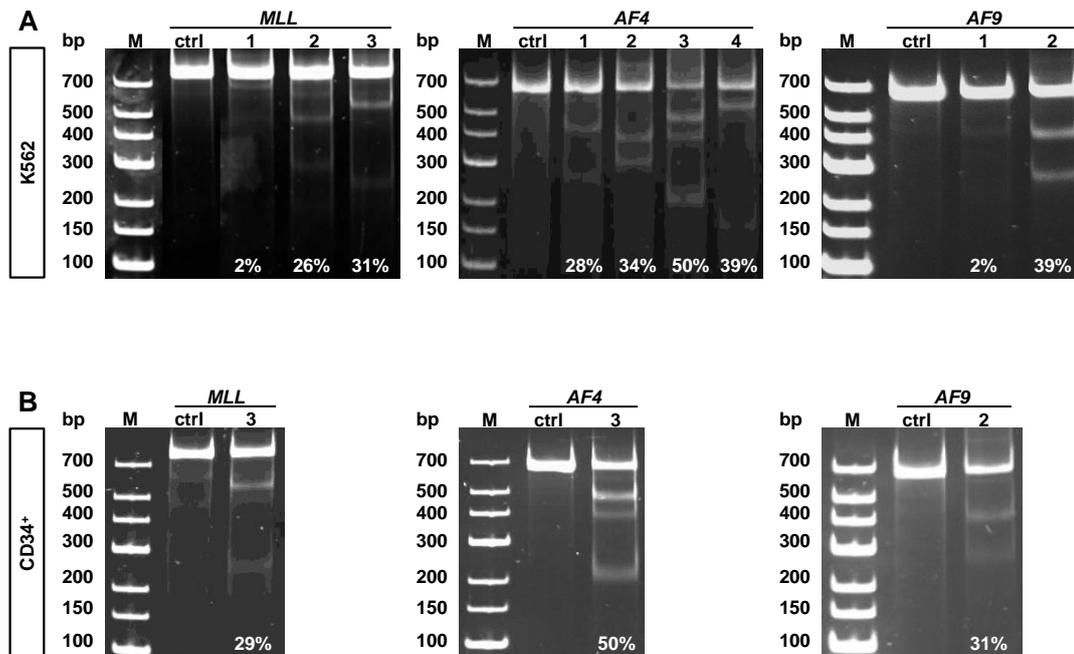
#### 4.1.1 Etablierung von sgRNAs für *KMT2A*, *AFF1* und *MLLT3* in hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut

Das CRISPR/Cas9-System bietet eine Plattform für hoch präzise Genomeditionen mit verbesserter Effizienz im Vergleich zu bisherigen Verfahrensweisen, wie TALENs und ZFNs. Um die Limitationen bisheriger Modellsysteme zu überwinden, sollte das humane TALEN-Translokationsmodell mittels der CRISPR/Cas9-Technologie optimiert werden.<sup>[105]-[107]</sup> Die Vorteile dieses humanen Systems, das endogene *KMT2A*-Onkogen darzustellen und so die Krankheit verlässlich zu imitieren, sollten hier erhalten bleiben. Vor allem aber sollten durch die Verwendung des innovativen Systems die lange Latenzzeit bis zur möglichen Identifikation positiver Translokationsprodukte für weitere Untersuchungen verkürzt werden und die gesteigerte Effizienz zur Etablierung eines verlässlichen, stabilen CRISPR/Cas9-Translokationsmodells führen.

Dazu wurden sgRNAs für die entsprechenden Gene konzipiert. Hierbei wurde darauf geachtet, patientenabgeleitete Schnittstellen im Genom zu wählen, welche die schlechte Prognose akuter *KMT2A*-rearrangierter Leukämien möglichst gut veranschaulichen. Es wurden daher Sequenzen in den jeweiligen BCRs der *KMT2A*-, *AFF1*- und *MLLT3*-Gene gewählt.<sup>[38][39][75][76]</sup> Für das *KMT2A*-Gen war es darüber hinaus wichtig, Intron 11 zu adressieren, um den Strukturverlust der PHD und die damit einhergehende schlechte Prognose zu imitieren.<sup>[38][39]</sup>

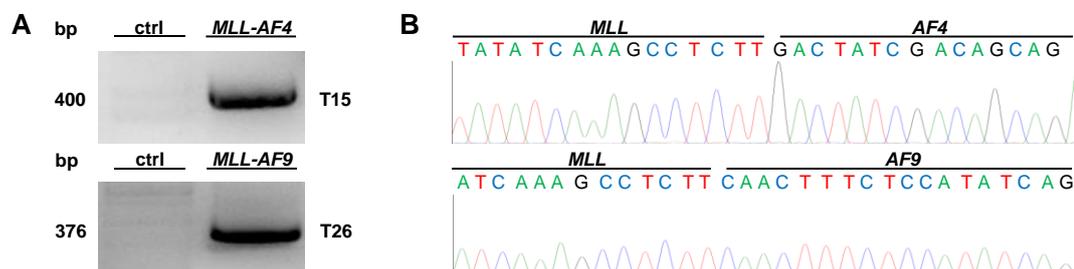
Für die praktische Durchführung war die Herangehensweise der RNP-basierten CRISPR/Cas9-Methode ausschlaggebend, um eine ausreichende Effizienz in CD34<sup>+</sup> huCB Zellen zu erreichen.<sup>[137]</sup> Außerdem ist zu erwähnen, dass die Physiologie der Zelle durch diese virusfreie Methode möglichst wenig zusätzlich beeinflusst wird.<sup>[137][158]</sup> Die selbstentworfenen sgRNAs mit *CRISPRscan* mussten folglich *in vitro* produziert und auf Funktionalität getestet werden. Hierfür wurde der *in vitro cleavage assay* verwendet (Daten nicht gezeigt). Als *proof-of-principle* erfolgte dann die Effizienztestung in K562-Zellen. Nach Nukleofektion der Zellen wurde die genomische DNA isoliert, die gewählte Stelle per PCR amplifiziert und hinsichtlich der entstandenen DSB und NHEJ mittels des T7-Endonuklease-Assays analysiert. Die Schneideeffizienzen sind in **Abbildung 24 A** dargestellt.

Anhand der Daten wurde die jeweils beste sgRNA pro Gen mit mindestens 30 % Schneideeffizienz ausgewählt und weiter in CD34<sup>+</sup> huCB Zielzellen hinsichtlich ihrer Effizienz getestet. Ähnlich hohe Schneideeffizienzen konnten ebenso in CD34<sup>+</sup> huCB Zielzellen erreicht werden. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 24 B** dargestellt. Diese Daten wurden publiziert in Secker et al., 2019.<sup>[157]</sup>



**Abbildung 24: Etablierung von sgRNAs für *KMT2A*, *AFF1* und *MLLT3*.** Die Bestimmung der sgRNA-Schneideeffizienzen erfolgte mittels T7-Endonuklease-I-Assay. **(A)** Die Polyacrylamid-Gel-Bilder zeigen repräsentative Ergebnisse des T7-Endonuklease-I-Assays von K562-Testzellen, die mit sgRNAs für *KMT2A* (*MLL*) (sgRNA1-3), *AFF1* (*AF4*) (sgRNA1-4) und *MLLT3* (*AF9*) (sgRNA1-2) und Cas9-Protein nukleofiziert wurden. **(B)** Die jeweilige sgRNA mit der besten Schneideeffizienz wurde in CD34<sup>+</sup> HSPCs aus huCB angewendet. Zellen, die nur mit Cas9-Protein behandelt wurden, dienten als jeweilige Kontrollen (ctrl). Die Menge an verdauten PCR-Produkten definierter Größe (Basenpaare, bp) repräsentiert die durch NHEJ entstandene fehlerhafte Reparatur der DSB und wurde mittels *ImageJ* quantifiziert. Schneideeffizienzen in %. Daten publiziert in Secker et al., 2019.<sup>[157]</sup>

#### 4.1.2 Translokationsinduktion in hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut



**Abbildung 25: Translokationsinduktion in hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut.** Die jeweiligen sgRNAs für *KMT2A* (*MLL*) und *AFF1* (*AF4*) oder *MLLT3* (*AF9*) wurden zur Translokationsinduktion entsprechend paarweise verwendet. **(A)** Repräsentative Agarose-Gel-Bilder positiver PCR-Produkte definierter Größe (bp) für *t(4;11)* (*MLL-AF4*) und *t(9;11)* (*MLL-AF9*) von CD34<sup>+</sup> HSPCs aus huCB an Tag 15 und Tag 26 sind gezeigt. Zellen, die nur mit Cas9-Protein behandelt wurden, dienten als Kontrolle (ctrl). Die zugehörigen Sanger-Sequenzierungsergebnisse sind in **(B)** gezeigt. Daten publiziert in Secker et al., 2019.<sup>[157]</sup>

Um die  $t(9;11)$ - und  $t(4;11)$ Translokationen mit gesteigerter Effizienz hinsichtlich einer verkürzten Latenzzeit und Stabilität zu verbessern, wurden wiederum CD34<sup>+</sup> huCB Zellen isoliert und mit sgRNAs für *KMT2A* und *MLLT3* oder *AFF1* jeweils paarweise mit Cas9-Protein als RNP-Komplexe in die Zellen eingebracht. Zellen, die lediglich mit Cas9-Protein behandelt wurden, dienten als Kontrollzellen. Nach Nukleofektion der Zellen wurde die genomische DNA isoliert. Die konzipierten Genfusionen sowohl der  $t(9;11)$ - als auch der  $t(4;11)$ -Translokation konnten bereits sehr früh in Kultur per PCR identifiziert (**Abbildung 25 A**) und per Sanger-Sequenzierung validiert werden (**Abbildung 25 B**). *KMT2A*-rearrangierte Zellen von unterschiedlichen Spendern wiesen dieselbe Sequenz der Genfusionen auf. Vollständige Agarose-Gel-Bilder mit Molekulargewichtsmarker sind in **Anhang 6** dargestellt. Diese Daten wurden publiziert in Secker et al., 2019.<sup>[157]</sup>

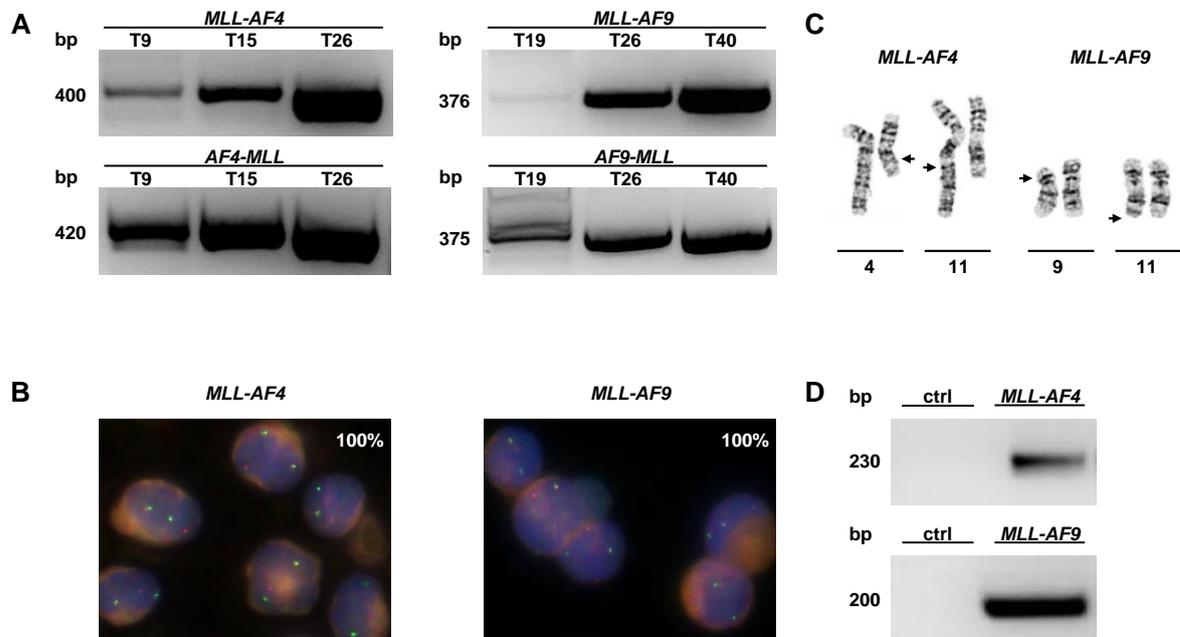
### 4.1.3 Nachweis der reinen, polyklonalen Populationen *KMT2A*-rearrangierter Zellen

Der Nachweis einer Translokation ist nicht hinreichend, um die *KMT2A*-rearrangierten Zellen als *in vitro* Modell weiter verwenden zu können. Eine möglichst reine Kultur ist notwendig, um später verlässliche Aussagen und Rückschlüsse auf die Pathophysiologie möglich zu machen. Daher wurden die nukleofizierten Zellen nach der Genomeditierung in Flüssigkultur unter optimalen Wachstumsbedingungen mit bewährten Zytokinen und Chemokinen gehalten und überwacht.<sup>[105]-[107]</sup> Eine regelmäßige Überprüfung mittels semi-quantitativer PCR der konzipierten Genfusionen durch den normierten Einsatz von 100 ng genomischer DNA sollte erste Informationen der relativen Anzahl translokationspositiver Zellen liefern. In **Abbildung 26 A** sind repräsentative Ergebnisse dieser Untersuchungen gezeigt. Für die reziproken  $t(4;11)$ - und  $t(9;11)$ -Translokationen sind stärker werdende Signale der PCR-Produkte über die Zeit zu erkennen. Vollständige Agarose-Gel-Bilder mit Molekulargewichtsmarker sind in **Anhang 6** dargestellt.

Zum Zeitpunkt eines starken, gesättigten Signals wurde zur verlässlichen Quantifizierung translokationspositiver Zellen eine FISH durchgeführt. Hier sind repräsentative Resultate an Tag 30 für  $t(4;11)$ - und an Tag 40 für  $t(9;11)$ -Zellen dargestellt (**Abbildung 26 B**). Die *KMT2A breakapart* Sonde detektiert hierbei jeweils ein intaktes *KMT2A*-Gen, indem die Sondenfarben Rot und Grün fast überlagert auftreten. Liegen die Sondenfarben getrennt voneinander in der Zelle vor, so befinden sich die hybridisierten Genabschnitte auf unterschiedlichen Chromosomen. Die Auszählung von 100 Zellen ergab eine Reinheit translokationspositiver Zellen von 100 % an den entsprechenden repräsentativen Tagen.

Gleichermaßen ergaben die Chromosomenanalysen  $t(4;11)$ - und  $t(9;11)$ -rearrangierter Zellen die jeweiligen spezifischen Bandenmuster (**Abbildung 26 C**). Anhand der Pfeile sind die reziproken Translokationen zu erkennen.

Die funktionale Expression der fusionierten Exone auf mRNA-Ebene wurde anschließend mittels RT-PCR nachgewiesen. Die repräsentativen Ergebnisse zeigen  $t(4;11)$ - und  $t(9;11)$ -Fusionstranskripte der cDNA (**Abbildung 26 D**). Vollständige Agarose-Gel-Bilder mit Molekulargewichtsmarker sind in **Anhang 6** dargestellt. Diese Daten wurden publiziert in Secker et al., 2019.<sup>[157]</sup>



**Abbildung 26: Nachweis der reinen, polyklonalen Populationen *KMT2A*-rearrangierter Zellen.** Der Erfolg der Translokationsinduktion wurde über einen Kulturzeitraum von mindestens 40 Tagen überwacht. **(A)** Die Agarose-Gel-Bilder zeigen repräsentative Ergebnisse der semi-quantitativen PCR definierter Größen (bp) von 100 ng genomischer DNA. Die reziproken Translokationsprodukte für  $t(4;11)$  (*MLL-AF4* und *AF4-MLL*) und  $t(9;11)$  (*MLL-AF9* und *AF9-MLL*) nehmen in ihrer Menge vom Tag der ersten Identifikation (Tag 9 und Tag 19) bis zu 100 % reinen, polyklonalen Kulturen (Tag 26 und Tag 40) zu. **(B)** Die Identifikation der 100 % reinen, polyklonalen Kulturen (*MLL-AF4* und *MLL-AF9*) erfolgte mittels manueller Auszählung der FISH-Analyse von 100 Zellen. Repräsentative Fluoreszenzaufnahmen sind gezeigt. Die Analyse wurde in Kooperation mit dem Institut für Pathologie und Neuropathologie und der Abteilung für Allgemeine und Molekulare Pathologie und Pathologische Anatomie des Universitätsklinikums Tübingen angefertigt. Die Chromosomenanalyse der *KMT2A*-rearrangierten Zellen ist in **(C)** dargestellt. Die Analyse wurde in Kooperation mit dem Institut für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik des Universitätsklinikums Tübingen angefertigt. **(D)** Der Nachweis der Translokation auf mRNA-Ebene ist repräsentativ per Agarose-Gel-Bild der entsprechenden RT-PCRs für *MLL-AF4* und *MLL-AF9* gezeigt. Daten publiziert in Secker et al., 2019.<sup>[157]</sup>

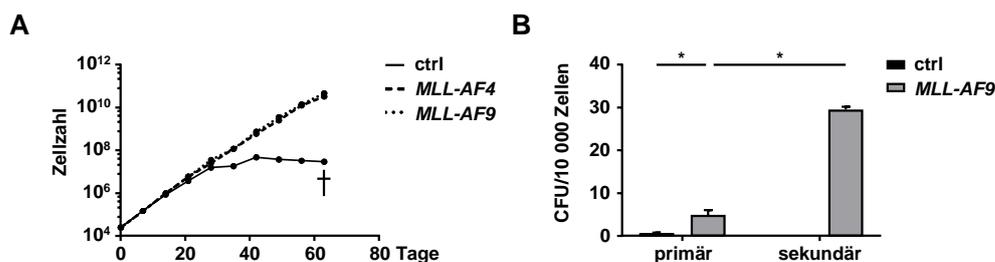
Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das CRISPR/Cas9-System eine verbesserte Methode zur effizienten Generierung humaner endogener *KMT2A*-Translokationen basierend auf Patientensequenzen darstellt. Hoch präzise Genomedierungen ermöglichten immer gleichbleibende genetische Alterationen in verschiedenen Spendern. Dies führte zur Etablierung eines verlässlichen *KMT2A*-rearrangierten endogenen *in vitro* Modells mit unbegrenztem Wachstumspotential. Der Identifikationszeitpunkt konnte zeitlich im Vergleich zum humanen TALEN-Translokationsmodell erheblich nach vorne verschoben werden. Zudem konnte schon sehr früh eine 100 % reine polyklonale *KMT2A*-rearrangierte Population erreicht werden, die dann zur weiteren Charakterisierung zu Verfügung stand.

## 4.2 Charakterisierung *KMT2A*-rearrangierter Zellen

### 4.2.1 Proliferationsverhalten und Fähigkeit zur Selbsterneuerung *KMT2A*-rearrangierter Zellen

Die Verwendung des CRISPR/Cas9-Systems unter Berücksichtigung patientenabgeleiteter Schnittstellen kann zu Induktion eines *in vitro* Modells führen. Ohne lentiviralen Einfluss können so Translokationen unter endogenen Promotoren in Zellen exprimiert werden. Diese Zellen sollten im Gegensatz zu Patientenzellen *in vitro* in Kultur gehalten werden können, ohne jedoch ihre Vergleichbarkeit zu ebendiesen zu verlieren. Eine Charakterisierung der in „Kapitel 4.1 Etablierung des humanen *KMT2A*-CRISPR/Cas9-Systems“ entwickelten *KMT2A*-rearrangierten Zellen, sollte Aufschluss über deren Proliferationsverhalten, Morphologie und Phänotyp sowie deren Vergleichbarkeit zu Patientenzellen geben, um Belege zu sammeln, die Krankheit verlässlich imitieren zu können.

In „Kapitel 4.1.3 Nachweis der reinen, polyklonalen Populationen *KMT2A*-rearrangierter Zellen“ wurde bereits beschrieben, dass die Intensität des Signals der semi-quantitativen PCR über die Kulturzeit zunahm. Dies und die Tatsache, dass letztendlich an Tag 30 und Tag 40 100 % reine translokationspositive Populationen identifiziert werden konnten, lassen Rückschlüsse auf deren verändertes Proliferationsverhalten zu. Nicht nur die Zellen in den jeweiligen Ansätzen, die nicht durch das CRISPR/Cas9-System verändert wurden, sondern auch Kontrollzellen in Parallelansätzen sind den *KMT2A*-rearrangierten Zellen in ihrem Proliferationsverhalten unterlegen. Deutlich wurde dies durch die Untersuchung der Wachstumskurven der jeweiligen Zellen.



**Abbildung 27: Proliferationsverhalten und Fähigkeit zur Selbsterneuerung *KMT2A*-rearrangierter Zellen.** (A) Die Proliferation *KMT2A*-rearrangierter Zellen (*MLL-AF4* und *MLL-AF9*) und Kontrollzellen (ctrl), die nur mit Cas9-Protein behandelt wurden, wurde nach Translokationsinduktion (Tag 0) überwacht. Gezeigt sind die errechneten Gesamtzellzahlen repräsentativer Kulturen bis zum Absterben der Kontrollzellen. (B) Die Fähigkeit zur Selbsterneuerung wurde mittels des CFU-Assays bestimmt. Gezeigt sind die zusammengefassten Daten aus drei biologischen Replikaten ( $n=3$ )  $t(9;11)$ -rearrangierter (*MLL-AF9*) und Kontrollzellen (ctrl), die nur mit Cas9-Protein behandelt wurden. Unveröffentlichte Daten.

Nach Nukleofektion (Tag 0) bestand zunächst kein Unterschied zwischen RNP-behandelten Zellen und solchen, die nur mit Cas9-Protein nukleofiziert wurden. Ungefähr an Tag 30 verlangsamte sich jedoch die Proliferation der Kontrollzellen, wohingegen sich die der *KMT2A*-rearrangierten Zellen auf gleichbleibend hohem Niveau hielt. Ein Absterben durch Differen-

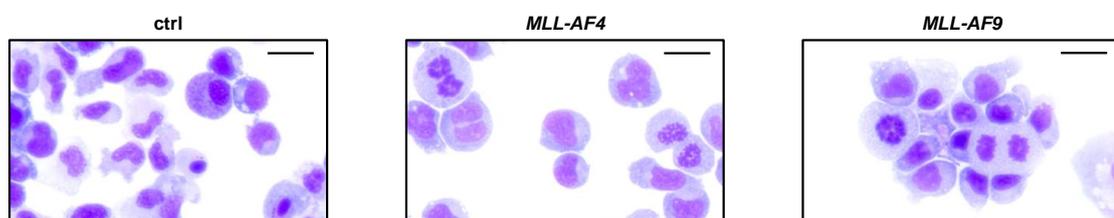
zierung der CD34<sup>+</sup> huCB nach ungefähr 60 Tagen in Flüssigkultur unter myeloischen Kulturbedingungen wurde beobachtet, während *KMT2A*-rearrangierte Zellen unbegrenzt weiterwuchsen. Repräsentative Ergebnisse sind in **Abbildung 27 A** dargestellt.

Zu einem späten Zeitpunkt in Kultur, ab welchem bereits reine *KMT2A*-rearrangierte Zellen vorlagen, konnten die Zellen hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Selbsterneuerung verglichen werden. Während CD34<sup>+</sup> huCB in myeloischer Flüssigkultur immer mehr differenzierten und kaum noch Kolonien in Methylcellulose bildeten, behielten über den gleichen Zeitraum kultivierte *t(9;11)*-rearrangierte Zellen ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung bei. Die Verwendung von Zellen aus primären Methylcellulosekulturen in sekundären Ansätzen zeigte, dass *t(9;11)*-rearrangierte Zellen durch die Steigerung der potenziell leukämieinitiierenden Zellen imstande waren, erneut Kolonien in gesteigertem Ausmaß zu bilden, während Kontrollzellen diese Eigenschaft nicht besaßen. Ergebnisse sind in **Abbildung 27 B** dargestellt. *t(4;11)*-rearrangierte Zellen bildeten zu keinem Zeitpunkt und von keinem Spender Kulturen aus.

#### 4.2.2 Blastenartige Morphologie *KMT2A*-rearrangierter Zellen

Zur weiteren Charakterisierung und Untersuchung der Eignung *KMT2A*-rearrangierter Zellen als *in vitro* Modell sind nicht nur Proliferationsverhalten und Fähigkeit zur Selbsterneuerung, sondern auch die Zellmorphologie wichtig, um das onkologische Potential zu bewerten. Untersuchungen histologischer May-Grünwald-Giemsa-Färbungen sollten einen Einblick dahingehend ermöglichen.

Während CD34<sup>+</sup> huCB in myeloischer Flüssigkultur mit zunehmender Dauer differenzierten, sodass sich ihre Morphologie dahingehend änderte, entwickelten über den gleichen Zeitraum kultivierte *KMT2A*-rearrangierte Zellen eine blastenartige Morphologie. Ergebnisse sind in **Abbildung 28** dargestellt. Kontrollzellen zeigten einen myelozytären Phänotyp mit bereits apoptotischen Zellen. *KMT2A*-rearrangierte Zellen hingegen wiesen viele Mitosen und eine blastenartige Zellmorphologie auf.



**Abbildung 28: Blastenartige Morphologie *KMT2A*-rearrangierter Zellen.** Die Untersuchung der Morphologie *KMT2A*-rearrangierter Zellen (*MLL-AF4* und *MLL-AF9*) und Kontrollzellen (ctrl), die nur mit Cas9-Protein behandelt wurden, erfolgte mittels histologischer Färbung nach May-Grünwald-Giemsa. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen der Zellmorphologie der Dünnschichtpräparate. Maßstabsbalken geben 20 µm an. Unveröffentlichte Daten.

Nicht nur das oben beschriebene veränderte Proliferationsverhalten, sondern auch Veränderungen der Zellmorphologie lassen somit auf ein erhöhtes onkologisches Potential *KMT2A*-rearrangierter Zellen schließen.

### 4.2.3 Phänotypische Charakterisierung *KMT2A*-rearrangierter Zellen mittels Durchflusszytometrie

Eine phänotypische Charakterisierung von Modellzellen ist unerlässlich, um diese von Kontrollzellen abzugrenzen, deren Verhalten und Eigenschaften zu erklären und um einen Ausgangspunkt für spätere Analysen festzulegen. Die Methode der Durchflusszytometrie spielt hierfür in der Hämatologie und Onkologie eine zentrale Rolle.

Bezüglich der Hämatopoese ist es wichtig zu erwähnen, dass bei Stammzellen zunächst von CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> Zellen ausgegangen werden kann. Je weiter die Vorläuferzellen differenzieren, desto mehr CD38 exprimieren sie auf ihrer Oberfläche.<sup>[159]</sup> Es ist bekannt, dass leukämische Zellen von Patienten mit *KMT2A*-rearrangierter Leukämie meist unabhängig ihres Phänotyps (AML oder ALL) CD34<sup>-</sup> Zellen enthalten.<sup>[160][161]</sup>

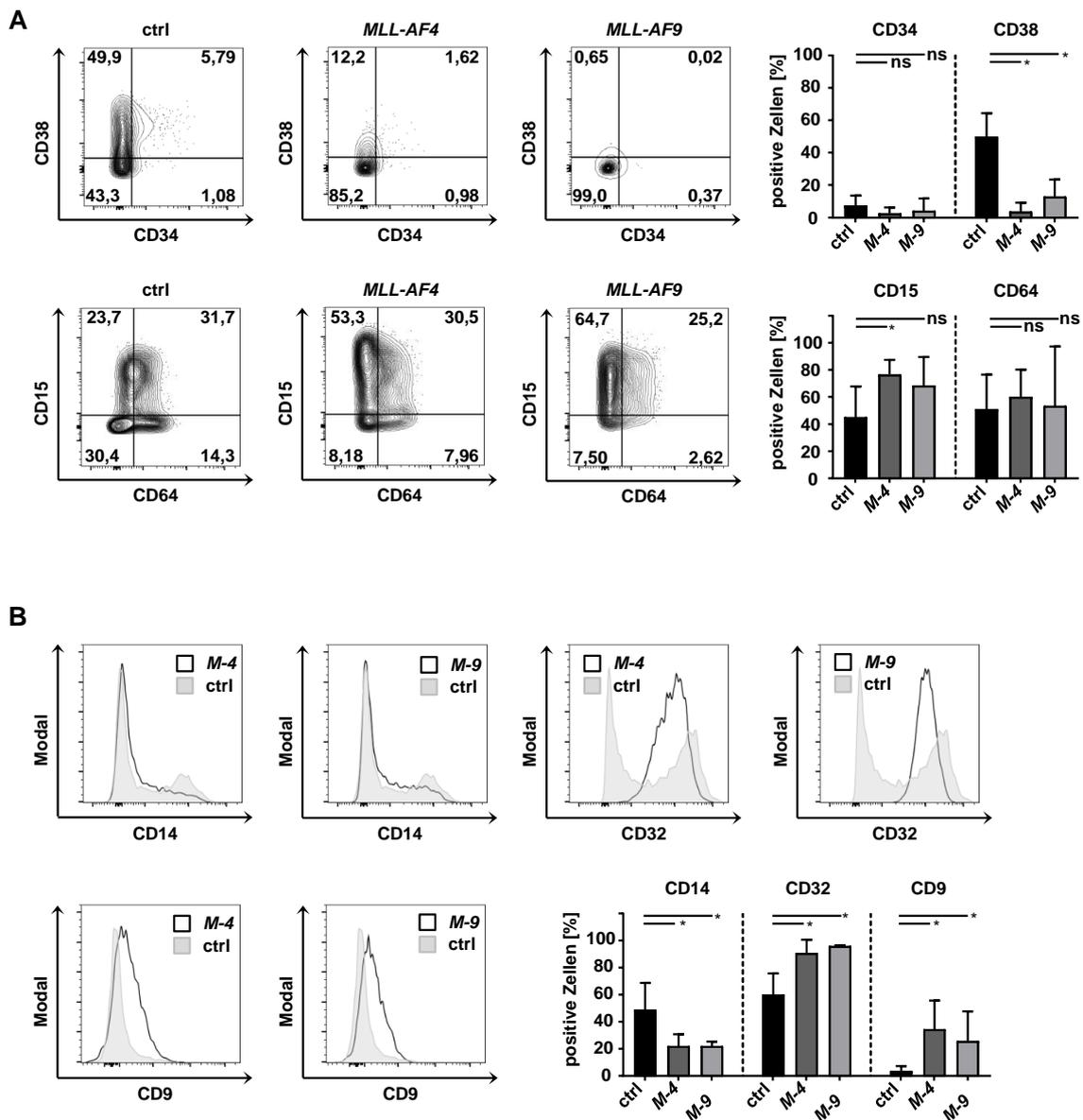
Wurden die hier generierten *KMT2A*-rearrangierten Zellen mit Kontrollzellen verglichen, welche gleich lange in Kultur gehalten wurden, so waren beide Populationen als CD34<sup>-</sup> zu charakterisieren, während die Kontrollzellen jedoch CD38 als gesteigerten Differenzierungsmarker auf ihrer Oberfläche exprimierten (**Abbildung 29 A**, obere Reihe).

Die Verwendung eines Kulturmediums mit eher myeloisch prägenden Zytokinen führte sowohl bei *KMT2A*-rearrangierten als auch bei Kontrollzellen zur Expression von myelomonozytären Markern wie CD15 und CD64 und somit zu einem myelomonozytären Phänotyp (**Abbildung 29 A**, untere Reihe). Mit den Ergebnissen der Markerexpression von CD34 und CD38 kann man somit zusammenfassend für *KMT2A*-rearrangierte Zellen von weniger differenzierten, myelomonozytären Vorläuferblasten ausgehen.

Unterstützt wird diese Hypothese durch die erweiterte Untersuchung des monozytären Oberflächenmarkers CD14. Als typischer Differenzierungsmarker der Monozyten<sup>[162]</sup> ist dieses Oberflächenprotein gut dafür geeignet, *KMT2A*-rearrangierte Zellen und Kontrollzellen in ihrem Stadium zu charakterisieren und zu vergleichen. In **Abbildung 29 B** ist gezeigt, dass die CD14-Expression sowohl auf t(4;11)- als auch auf t(9;11)-rearrangierten Zellen sehr gering und auf Kontrollzellen signifikant erhöht war.

Als weiterer Faktor zur Charakterisierung und Abgrenzung *KMT2A*-rearrangierter Zellen gegen Kontrollzellen sind bereits einige *KMT2A*-translokationsspezifische Oberflächenmarker bekannt. Aoki et al., 2015 sowie Schneidawind et al., 2018 benannten CD32 und CD9 als solch *KMT2A*-translokationsspezifische Marker.<sup>[107][160]</sup> Deren Überprüfung auf den hier generierten, *KMT2A*-rearrangierten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen ist in **Abbildung 29 B**

dargestellt. Sowohl die Expression von CD32 als auch von CD9 war auf *KMT2A*-rearrangierten signifikant erhöht. Diese Daten wurden publiziert in Secker et al., 2019.<sup>[157]</sup> Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *KMT2A*-rearrangierte Zellen als gering differenzierte, myelomonozytäre Vorläuferblasten mit *KMT2A*-translokationsspezifischer Markerexpression charakterisiert werden können.



**Abbildung 29: Phänotypische Charakterisierung *KMT2A*-rearrangierter Zellen mittels Durchflusszytometrie.** Der Phänotyp *KMT2A*-rearrangierter Zellen (*MLL-AF4*, *M-4* und *MLL-AF9*, *M-9*) und Kontrollzellen (ctrl), die nur mit Cas9-Protein behandelt wurden, wurde nach erreichter Reinheit bestimmt. **(A)** Durchflusszytometrische Analysen zeigen eine geringe CD34- und CD38-Expression *KMT2A*-rearrangierter Zellen und deren myelomonozytäre Expression von CD15 und CD64. Repräsentative und zusammengefasste Daten aus drei biologischen Replikaten ( $n=3$ ) sind gezeigt. **(B)** *KMT2A*-rearrangierte Zellen (schwarze Linie) zeigen geringere Expression des Differenzierungsmarkers CD14 und höhere Expression der *KMT2A*-leukämiespezifischen Oberflächenmarker CD32 und CD9 im Vergleich zu Kontrollzellen (ctrl, graue Schattierung). Repräsentative und zusammengefasste Daten aus drei biologischen Replikaten ( $n=3$ ) sind gezeigt. Balken zeigen das arithmetische Mittel, Fehlerbalken geben die SD an. Ein ungepaarter *t*-Test wurde verwendet. \* bedeutet  $p<0,05$ . Daten publiziert in Secker et al., 2019.<sup>[157]</sup>

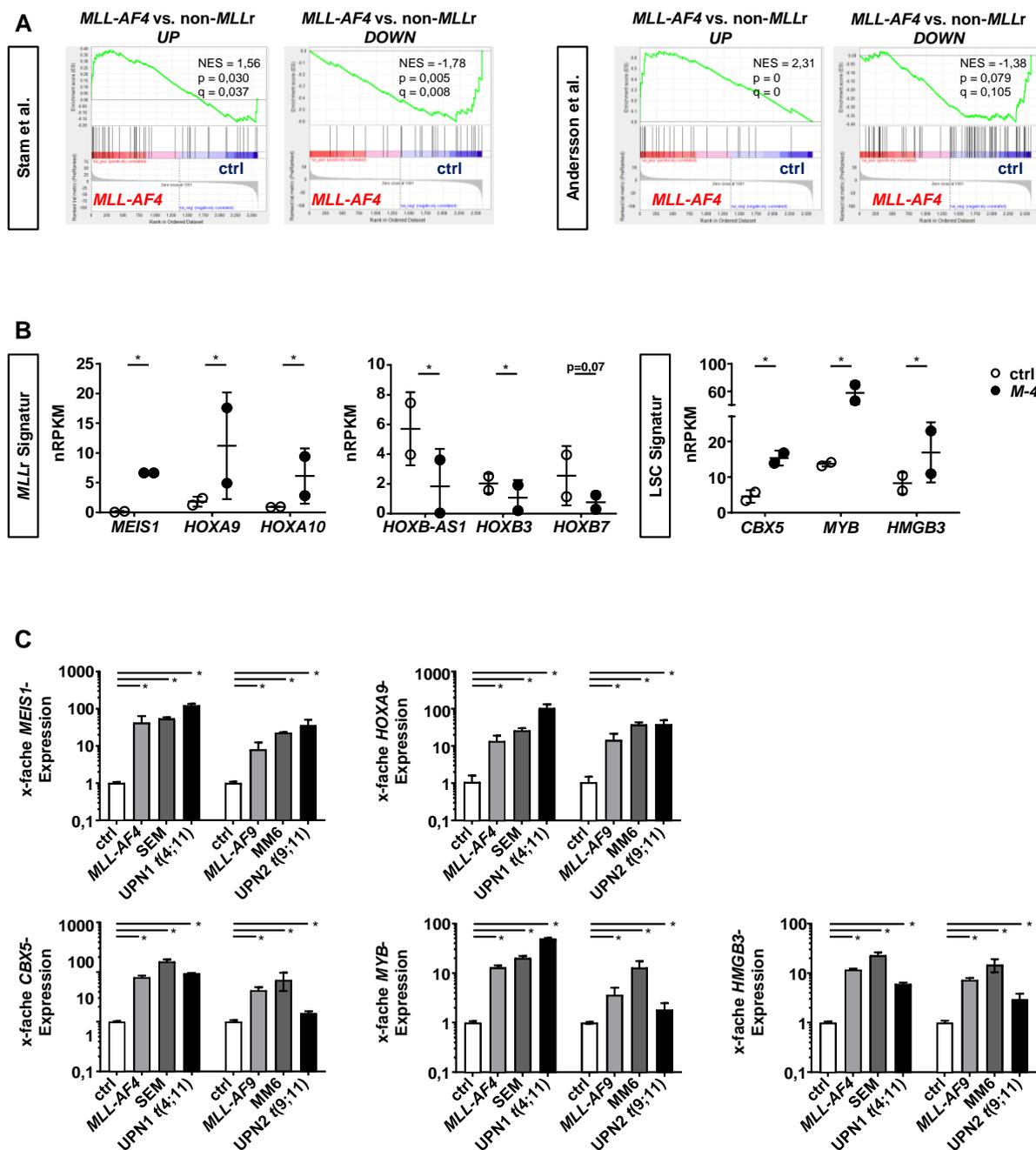
#### 4.2.4 Authentizität *KMT2A*-rearrangierter Zellen als patientenähnliches *in vitro* Modell

Die Intension, patientenabgeleitete Schnittstellen zur Etablierung des CRISPR/Cas9-Systems zu verwenden, stellt eine zentrale Rolle für die Authentizität des *in vitro* Modells dar. Um CRISPR/Cas9-generierte *KMT2A*-rearrangierte Zellen als verlässliches Modell nutzen zu können, müssen pathologische Signalwege als Konsequenz der *KMT2A*-Translokation mit Patientendaten vergleichbar sein.<sup>[105]-[107]</sup> Der Verzicht auf lentivirale Methoden trägt hier zur Minimierung unerwünschter Effekte bei. Trotzdem ist ein Nachweis der Verlässlichkeit des *in vitro* Modells unbedingt notwendig, um die Krankheit nachgewiesenermaßen imitieren zu können.

Zusätzlich zur bisherigen Charakterisierung der Proliferation, der Fähigkeit zur Selbsterneuerung, der Morphologie und des Phänotyps bietet die Methode der RNA-Sequenzierung die Möglichkeit, Zellen hinsichtlich ihrer Unterschiede und Gemeinsamkeiten auf transkriptioneller Ebene zu analysieren. Ein interner Vergleich mit Kontrollzellen stellt die Basis für dieses Vorgehen dar. Anschließend können ermittelte Expressionslevel mit Patientendaten und bisherigen Erkenntnissen über das *KMT2A*-translokationsspezifische Transkriptom abgeglichen werden.

Für *t*(4;11)-rearrangierte Zellen wurden zwei unabhängige Spender mittels RNA-Sequenzierung untersucht. Dazu wurden die *t*(4;11)-rearrangierten Zellen und ihre entsprechenden Kontrollzellen, die lediglich mit Cas9-Protein behandelt wurden, in gleichen Kulturbedingungen gehalten. Nach Erreichen einer 100 % reinen Population *KMT2A*-rearrangierter Zellen wurden die vier Proben analysiert. Die Expressionsprofile der *t*(4;11)-rearrangierten Zellen wurden mit denen der Kontrollen verglichen. Hierbei wurden 2.729 von 13.276 Genen (~ 21 %) als differentiell exprimiert ermittelt ( $p < 0,01$ ). Davon waren 1.417 Gene in *t*(4;11)-rearrangierten Zellen hochreguliert. Ergebnisse hierzu sind in **Anhang 7 A** dargestellt. Eine Korrelation der Proben ergab eine größere Ähnlichkeit zwischen den beiden Spendern mit *t*(4;11)-Translokation als zur jeweiligen Kontrolle des ursprünglichen Spenders (**Anhang 7 B**). Die 100 meist differentiell exprimierten Gene (50 hoch- und 50 herunterreguliert) sind in **Anhang 8** aufgelistet. Diese interne Analyse des Vergleichs *KMT2A*-rearrangierter Zellen mit entsprechenden Kontrollzellen ergab folglich, dass die *KMT2A*-Translokation erheblichen Einfluss auf nachfolgende Signalwege hatte. Diese Ergebnisse wurden nun mit Patientendaten aus Stam et al., 2010 in Relation gebracht. Es konnte gezeigt werden, dass innerhalb der 100 meist differentiell exprimierten Gene bereits *MEIS1* und *FLT3* detektiert wurden, was deren konservierte Rolle in *KMT2A*-rearrangierten Zellen unterstreicht (**Anhang 8**).<sup>[153]</sup>

Außerdem wurden innerhalb der 100 meist differentiell exprimierten Gene des Patientendatensatzes die fünf Gene *MEIS1*, *APOL2*, *GFOD1*, *SPTBN1* und *ZNF827* gefunden, deren Expressionshöhe nahezu identisch zu der der CRISPR/Cas9-generierten *t*(4;11)-rearrangierten Zellen gefunden werden konnte (**Anhang 7 C**). Diese Daten wurden publiziert in Secker et al., 2019.<sup>[157]</sup>



**Abbildung 30: KMT2A-rearrangierte Zellen als patientenähnliches *in vitro* Modell.**  $t(4;11)$ -rearrangierte Zellen (*MLL-AF4*,  $n=2$ ) und Kontrollzellen derselben Spender (*ctrl*,  $n=2$ ), die nur mit Cas9-Protein behandelt wurden, wurden nach identischer Zeit in Kultur mittels RNA-Sequenzierung analysiert. Die Rohdaten wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Epigenetik des Instituts für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik des Universitätsklinikums Tübingen ausgewertet. **(A)** GSEA der *MLL-AF4*-Signatur verglichen mit zwei Patientendatensätzen sind gezeigt.<sup>[84][153]</sup> Es wurden  $t(4;11)$ -rearrangierte Patientenzellen (*MLL-AF4*) mit nicht-rearrangierten (*non-MLLr*) verglichen. Hochregulierte *gene sets* in Patienten wurden ebenso in  $t(4;11)$ -rearrangierte Zellen (*MLL-AF4*, rot) gefunden, während herunterregulierte *gene sets* in Patienten in Kontrollzellen (*ctrl*, blau) gefunden wurden. Es sind die Werte der *normalized enrichment scores* (NES), der p-Werte (p) für statistische Signifikanz und q-Werte für die *false discovery rate* (FDR) gezeigt. **(B)** Die differentielle Genexpression aus der RNA-Sequenzierungs-Analyse lässt sich anhand der charakteristischen *KMT2A*-leukämiespezifischen Zielgene (*MLLr* Signatur) und der leukämischen Stammzellensignatur (LSC Signatur) verdeutlichen. Charakterisiert wurden  $t(4;11)$ -rearrangierte Zellen (*MLL-AF4*,  $n=2$ , schwarz) anhand der Hochregulation von *MEIS1*, *HOXA9* und *HOXA10* und der Herunterregulation von *HOXB-AS1*, *HOXB3* und *HOXB7* sowie der spezifischen Regulation von *CBX5*, *MYB* und *HMGB3* im Vergleich zu Kontrollzellen derselben Spender (*ctrl*,  $n=2$ , weiß), die nur mit Cas9-Protein behandelt wur-

den. Werte in *normalized reads per kilobase million* (nRPKM), jeder Datenpunkt repräsentiert eine Probe. Die Validierung der RNA-Sequenzierung mittels RT-qPCR ist in **(C)** gezeigt. Die Expression  $t(4;11)$ -rearrangierter (*MLL-AF4*) und  $t(9;11)$ -rearrangierter Zellen (*MLL-AF9*) wurde auf die der Kontrollzellen (ctrl) normalisiert und mit den Expressionen der  $t(4;11)$ -rearrangierten Zelllinie SEM oder der  $t(9;11)$ -rearrangierten Zelllinie Mono-Mac-6 (MM6) sowie Patientenzellen (*unique patient number*, UPN1 und UPN2) mit jeweils  $t(4;11)(q21;q23)$  und  $t(9;11)(p22;q23)$  verglichen. Zusammengefasste Daten aus zwei biologischen Replikaten ( $n=2$ ) durchgeführt in technischen Duplikaten sind gezeigt. Balken zeigen das arithmetische Mittel, Fehlerbalken geben die SD an. Ein ungepaarter *t*-Test wurde verwendet. \* bedeutet  $p < 0,05$ . Daten publiziert in Secker et al., 2019.<sup>[157]</sup>

Um diese ersten Hinweise der Vergleichbarkeit des *in vitro* Modells zu Patientenzellen zu validieren, wurden GSEA durchgeführt. Dazu wurden die Signaturen zweier Patientendatensätze mit den RNA-Sequenzierungsergebnissen des *in vitro* Modells verglichen. In **Abbildung 30 A** ist gezeigt, dass die patientenabgeleiteten *KMT2A*-translokationsspezifischen Signaturen in CRISPR/Cas9-generierten  $t(4;11)$ -rearrangierten Zellen bestätigt werden konnten.

Des Weiteren wurde die Expression CRISPR/Cas9-generierter  $t(4;11)$ -rearrangierter Zellen mit einzelnen, bereits publizierten *KMT2A*-translokationsspezifischen Signaturgenen abgeglichen.<sup>[46][163]-[165]</sup> Es wurde sowohl die Hochregulation des HOXA-Clusters als auch die Herunterregulation des HOXB-Clusters detektiert (**Abbildung 30 B**). Außerdem konnte die Signatur der sich selbst-erneuernden leukämischen Stammzellen (*leukemic stem cell*, LSC)<sup>[166]</sup> anhand der Überexpression von Chromobox 5 (*CBX5*), *MYB proto-oncogene* (*MYB*) und *high mobility group box 3* (*HMGB3*) in CRISPR/Cas9-generierten  $t(4;11)$ -rearrangierten Zellen nachgewiesen werden (**Abbildung 30 B**).

Als zusätzliche Bestätigung wurden die Ergebnisse, die auf RNA-Sequenzierungsanalysen basierten, mittels RT-qPCR validiert. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die *KMT2A*-translokationsspezifische Signatur, bestehend aus der Überexpression von *MEIS1* und *HOXA9*, als auch die LSC Signatur, bestehend aus der Überexpression von *CBX5*, *MYB* und *HMGB3*, ebenfalls mit Hilfe der alternativen Methode in  $t(4;11)$ - und  $t(9;11)$ -rearrangierten Zellen gefunden werden konnten. Außerdem konnten so auch die Expressionsniveaus mit denen von *KMT2A*-rearrangierten Zelllinien und Patienten verglichen werden. Hierfür wurden die  $t(4;11)$ -rearrangierte Zelllinie SEM und die  $t(9;11)$ -rearrangierte Zelllinie Mono-Mac-6 sowie Patientenzellen von zwei Spendern mit  $t(4;11)(q21;q23)$  und  $t(9;11)(p22;q23)$  verwendet. Alle Zellarten exprimierten hohe Level der relevanten Gene. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 30 C** dargestellt. Diese Daten wurden publiziert in Secker et al., 2019.<sup>[157]</sup>

Zusammengefasst ist zu sagen, dass das Expressionsprofil CRISPR/Cas9-generierter *KMT2A*-rearrangierter Zellen mit Zelllinien und Patientenzellen einhergeht. Die Bedeutung der differentiell exprimierten Gene des *in vitro* Modells spielt also generell eine Rolle, wodurch diesem der Charakter eines verlässlichen Modells zugeschrieben werden kann. Die Ergebnisse des Proliferationsverhaltens, der Morphologie und des Phänotyps unterstützen dies.

### 4.3 *KMT2A*-rearrangierte Zellen zur Validierung von *PRMT5* als Zielstruktur

#### 4.3.1 Erhöhte *PRMT5*-Expression in *KMT2A*-rearrangierten Zellen

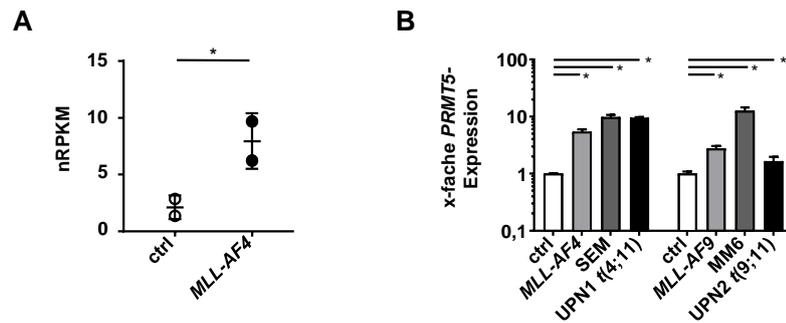
Die durch das CRISPR/Cas9-System generierten *KMT2A*-rearrangierten Zellen spiegeln die Pathologie der zugrundeliegenden Erkrankung wider, um zur Identifizierung neuer und Validierung bekannter Strukturen für eine zielgerichtete Therapie beitragen zu können. Die in „Kapitel 4.2 Charakterisierung *KMT2A*-rearrangierter Zellen“ gewonnenen Erkenntnisse definieren die Authentizität des *in vitro* Modells für diese Intension.

Das MLL-X-Fusionsprotein kann aufgrund seiner alternierten Struktur neue Funktionen durch die Rekrutierung alternativer Cofaktoren gewinnen. Als solcher Cofaktor ist DOT1L bekannt, der die Transformation *KMT2A*-rearrangierter Zellen in Bezug auf deren onkologisches Potential weiter vorantreibt. Hinsichtlich zielgerichteter Therapien ist DOT1L aus Modellen sowie Patientenzellen als Zielstruktur bekannt und eine Inhibition wird bereits in klinischen Studien angewandt.<sup>[28][49]</sup> Die Effizienz dieser Therapie blieb jedoch hinter den Erwartungen zurück. Eine Behandlung *KMT2A*-rearrangierter Leukämien mit einer Inhibition von DOT1L durch eine Einzelsubstanz muss also als gescheitert angesehen werden. Eine Kombinationstherapie könnte den Effekt verbessern. Hierzu werden Ergebnisse aus Tierstudien und Überexpressionsmodellen vorgeschlagen, die *PRMT5* als weitere abgeleitete Angriffsmöglichkeit sehen.<sup>[50][58][59]</sup>

Zunächst sollte getestet werden, ob *PRMT5* als Resultat dieses Signalwegs auch in humanen *KMT2A*-rearrangierten Zellen auf endogenem Expressionsniveau eine Rolle spielt. Weiterhin sollte eine mögliche Kombinationstherapie in Aussicht gestellt werden, indem sowohl *PRMT5* als auch DOT1L als Zielstrukturen adressiert wurden, um die Effektivität der zunächst vielversprechenden zielgerichteten Therapie *KMT2A*-rearrangierter Leukämien zu verbessern.

Als erster Schritt wurde die Expression von *PRMT5* in CRISPR/Cas9-System generierten *KMT2A*-rearrangierten Zellen analysiert. Aus RNA-Sequenzierungsanalysen konnte bestätigt werden, dass die *PRMT5*-Expression in *t*(4;11)-rearrangierten Zellen, ähnlich wie in einigen anderen Tumoren und im Tiermodell, hochreguliert war (**Abbildung 31 A**). Zur weiteren Validierung der Ergebnisse wurden RT-qPCR-Versuche durchgeführt, welche belegten, dass *PRMT5* in *t*(4;11)- und *t*(9;11)-rearrangierten Zellen, den Zelllinien SEM und MM6 sowie Patientenzellen von zwei Spendern mit *t*(4;11)(q21;q23) und *t*(9;11)(p22;q23) überexprimiert wurde (**Abbildung 31 B**). Diese Daten wurden publiziert in Secker et al., 2019.<sup>[157]</sup>

Diese Ergebnisse geben erste Hinweise darauf, dass *PRMT5* eine mögliche Zielstruktur in humanen *KMT2A*-rearrangierten Zellen unter endogenen Promotoren darstellt.



**Abbildung 31: Erhöhte *PRMT5*-Expression in *KMT2A*-rearrangierten Zellen.** (A)  $t(4;11)$ -rearrangierte (*MLL-AF4*,  $n=2$ , schwarz) und Kontrollzellen (ctrl,  $n=2$ , weiß), die nur mit Cas9-Protein behandelt wurden, wurden mittels RNA-Sequenzierung analysiert. Die Rohdaten wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Epigenetik des Instituts für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik des Universitätsklinikums Tübingen ausgewertet. Die differenzielle Genexpression von *PRMT5* ist in *normalized reads per kilobase million* (nRPKM) dargestellt, jeder Datenpunkt repräsentiert eine Probe. Die Validierung der RNA-Sequenzierung mittels RT-qPCR ist in (B) gezeigt. Die Expression  $t(4;11)$ -rearrangierter (*MLL-AF4*) und  $t(9;11)$ -rearrangierter Zellen (*MLL-AF9*) wurde auf 18S-rRNA normalisiert und Kontrollzellen (ctrl) dienen als Kalibrator. Die Expression wurde mit jener der  $t(4;11)$ -rearrangierten Zelllinie SEM oder der  $t(9;11)$ -rearrangierten Zelllinie Mono-Mac-6 (MM6) sowie Patientenzellen (*unique patient number*, UPN1 und UPN2) mit jeweils  $t(4;11)(q21;q23)$  und  $t(9;11)(p22;q23)$  verglichen. Zusammengefasste Daten aus zwei biologischen Replikaten ( $n=2$ ) durchgeführt in technischen Duplikaten sind gezeigt. Balken zeigen das arithmetische Mittel, Fehlerbalken geben die SD an. Ein ungepaarter  $t$ -Test wurde verwendet. \* bedeutet  $p < 0,05$ . Daten publiziert in Secker et al., 2019.<sup>[157]</sup>

#### 4.3.2 Titration spezifischer Inhibitoren für DOT1L und PRMT5 in *KMT2A*-rearrangierten Zellen

Die Überexpression von *PRMT5* in CRISPR/Cas9-System generierten *KMT2A*-rearrangierten Zellen gibt einen ersten Einblick in die Pathophysiologie unter endogenen Promotoren im humanen System. Der Unterschied einer passiven Überexpression und einem aktiven Beitrag zum Überleben *KMT2A*-rearrangierter Zellen muss jedoch noch herausgearbeitet werden.

Die Wichtigkeit von *PRMT5* als Zielstruktur in *KMT2A*-rearrangierten Zellen sollte daher durch spezifische Inhibitoren getestet werden. Zur Absicherung der Spezifität und Konservierung hinsichtlich *KMT2A*-rearrangierter Zellen sollten gesunde kulturexpandierende  $CD34^+$   $huCB$  Zellen als Kontrollzellen verwendet werden. Weiterhin sollte eine mögliche Kombinationstherapie in Aussicht gestellt werden, indem sowohl *PRMT5* als auch *DOT1L* als Zielstrukturen adressiert werden, um die Effektivität der zunächst vielversprechenden zielgerichteten Therapie *KMT2A*-rearrangierter Leukämien zu verbessern.

Hierfür wurde zunächst die Proliferation der CRISPR/Cas9-generierten *KMT2A*-rearrangierten Zellen und Kontrollzellen untersucht, indem steigende Konzentrationen von *DOT1L*-Inhibitor EPZ004777 und *PRMT5*-Inhibitor EPZ015666 verwendet und die Zellen nach 6 Tagen Behandlung mittels Trypanblau-Färbung gezählt wurden. Für beide Inhibitoren konnte eine dosisabhängige reduzierte Zellzahl *KMT2A*-rearrangierter Zellen nach 6 Tagen

beobachtet werden (**Abbildung 32 A**). Gesunde Kontrollzellen wurden nicht oder erst mit der höchsten Konzentration des PRMT5-Inhibitors beeinträchtigt.

Die Wirkungsweisen beider Inhibitoren im humanen System sind entweder bekannt oder werden aus Tierversuchen vorgeschlagen. Im Hinblick auf DOT1L wird berichtet, dass das Protein zur transkriptionellen Aktivierung der *KMT2A*-translokationsspezifischen Signaturgene und damit zu einer reduzierten Differenzierung beiträgt. Folglich wurde die dosisabhängige Differenzierung mittels CD14 durchflusszytometrisch überwacht. Nach 6 Tagen Behandlung mit dem DOT1L-Inhibitor konnte eine Differenzierungssteigerung beobachtet werden (**Abbildung 32 B**). Kontrollzellen blieben unbeeinträchtigt. Diese Ergebnisse, die größtenteils aus anderen Modellen bereits bekannt sind, dienen hier vor allem zur Etablierung der *KMT2A*-rearrangierten Zellen als *in vitro* Testsystem für zielgerichtete Therapien. Außerdem konnte die optimale Konzentration für spätere Kombinationsversuche festgelegt werden. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse wurde eine Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  des DOT1L-Inhibitors EPZ004777 für weitere Versuche gewählt.

Für PRMT5 wird berichtet, dass das Protein für die Methylierung von p53 verantwortlich ist. Folglich wurde die dosisabhängige Apoptoseinduktion und somit die Externalisierung von Phosphatidylserin mittels Annexin V-Färbung nach 6 Tagen Inhibitorbehandlung durchflusszytometrisch gemessen. Es konnte eine dosisabhängige Steigerung der p53-abhängigen Apoptose gemessen werden (**Abbildung 32 B**). Kontrollzellen blieben erneut unbeeinträchtigt. Dieser Mechanismus ist aus Tierversuchen abgeleitet und konnte erstmals im humanen System bestätigt werden. Außerdem konnte die optimale Konzentration für spätere Kombinationsversuche festgelegt werden. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse wurde eine Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  des PRMT5-Inhibitors EPZ015666 für weitere Versuche gewählt. Diese Daten wurden publiziert in Secker et al., 2019.<sup>[157]</sup>

Zusammenfassend ist zu sagen, dass sich die CRISPR/Cas9-generierten *KMT2A*-rearrangierten Zellen als verlässliches *in vitro* Testsystem für zielgerichtete Therapien eignen. Des Weiteren konnte PRMT5 als rekrutierter Cofaktor im humanen System bestätigt werden und scheint allein auf endogenem Expressionsniveau eine Rolle zu spielen, da eine Inhibition spezifische Auswirkungen auf *KMT2A*-rearrangierte Zellen hatte.

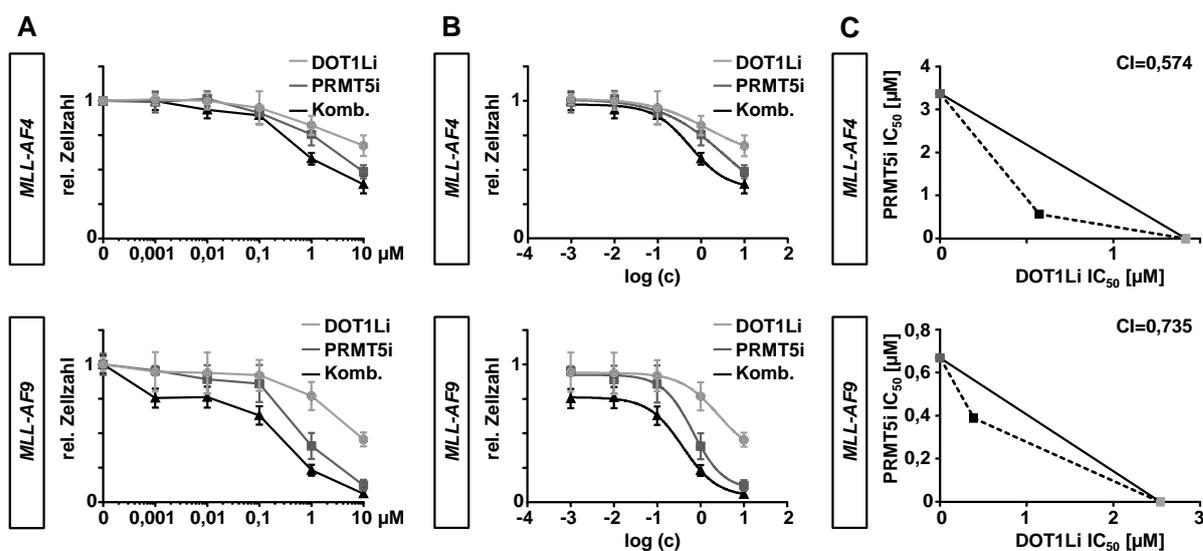
Eine weitere Anwendung des PRMT5-Inhibitors innerhalb einer Kombinationstherapie zur Steigerung der Effektivität einer zielgerichteten Therapie von *KMT2A*-rearrangierten Leukämien, bei der sowohl PRMT5 als auch DOT1L als Zielstrukturen adressiert werden, stellt demnach ein vielversprechendes Vorhaben dar.



## 4.4 *KMT2A*-rearrangierte Zellen als *in vitro* Modell zur kombinierten DOT1L- und PRMT5-Inhibition als mögliche zielgerichtete Therapie

### 4.4.1 Nachweis eines synergistischen Effekts der Inhibition beider Zielstrukturen mittels Dosis-Wirksamkeits-Kurven

Die zielgerichtete Therapie durch eine Inhibition des rekrutierten *KMT2A*-translokations-spezifischen Cofaktors DOT1L bleibt hinsichtlich der Wirksamkeit in klinischen Studien hinter den Erwartungen zurück. Eine Rationale für die Inhibition von PRMT5 ist aus vorherigen Tiermodellen und „Kapitel 4.3 *KMT2A*-rearrangierte Zellen zur Validierung von PRMT5 als Zielstruktur“ gegeben. Für beide Inhibitoren sind Wirkungsweisen bekannt, welche sich in ihren Signalwegen unterscheiden. Die Überlegung einer Anwendung des PRMT5-Inhibitors innerhalb einer Kombinationstherapie zur Steigerung der Effektivität der DOT1L-Inhibition in *KMT2A*-rearrangierten Leukämien stellt demnach ein aussichtreiches Konzept im Hinblick auf eine mögliche synergistische Wirkungsweise dar. Die durch das CRISPR/Cas9-System generierten *KMT2A*-rearrangierten Zellen können als verlässliches *in vitro* Testsystem dienen, um die Auswirkungen einer möglichen Kombinationstherapie festzulegen.



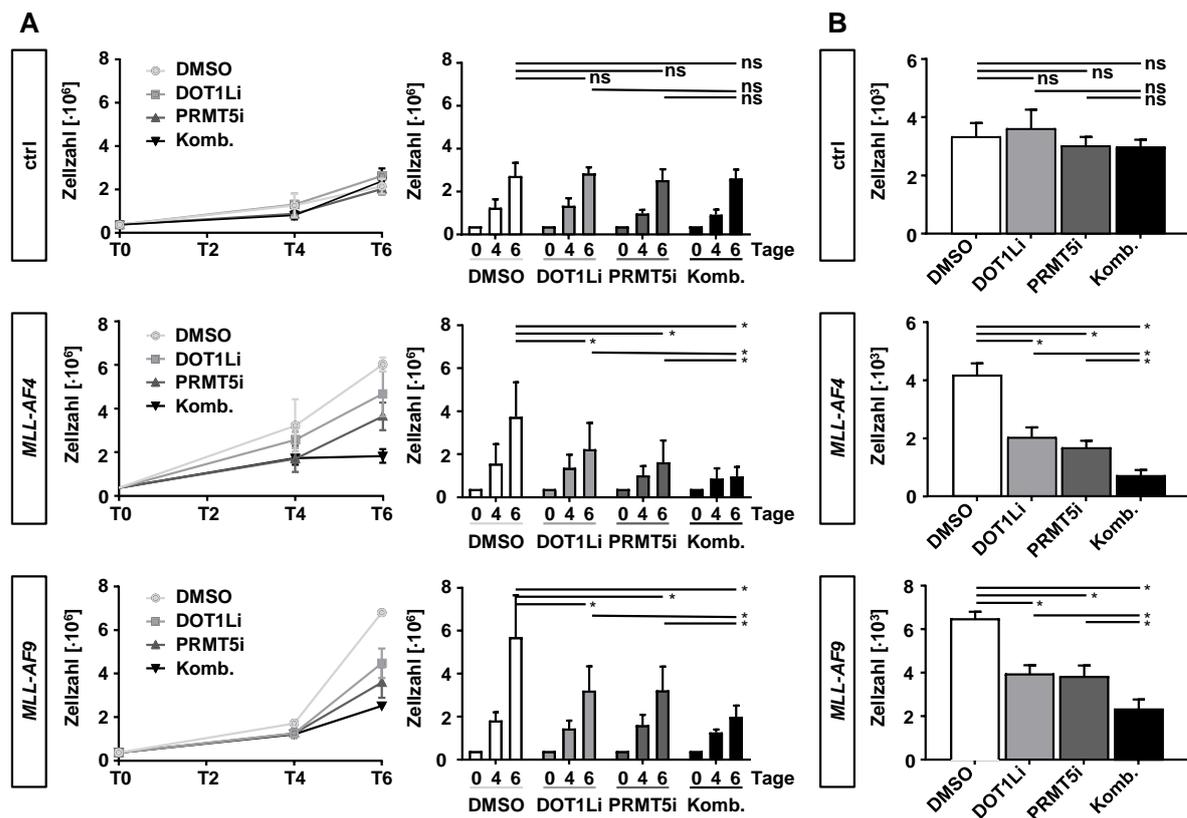
**Abbildung 33: Synergistischer Effekt der Inhibition von DOT1L und PRMT5.** *t(4;11)*-rearrangierte (*MLL-AF4*) und *t(9;11)*-rearrangierte Zellen (*MLL-AF9*) wurden mit steigenden Konzentrationen der Einzelsubstanzen (EPZ004777, DOT1Li hellgrau; EPZ015666, PRMT5i dunkelgrau) und der Kombination in konstantem Verhältnis (Komb., 1+1) für 6 Tage behandelt. **(A)** Eine dosisabhängige Sensitivität der relativen Zellzahl nach Einzel- und Kombinationsbehandlungen mittels Zellzahlbestimmung durch *counting beads* und Durchflusszytometrie ist gezeigt. Dargestellt sind drei biologische Replikate ( $n=3$ ) durchgeführt in technischen Triplikaten. Die Zellzahl wurde jeweils auf DMSO-behandelte Zellen normalisiert. **(B)** Die  $\text{IC}_{50}$ -Werte wurden aus einem vierparametrischen logarithmischen Modell interpoliert. **(C)** Die Isobologramme für die 50 %-Effektniveaus sowie die Kombinationsindizes (*combination indices*, CI) sind zur Bestimmung der Synergie dargestellt ( $\text{CI}<1$ ). Fehlerbalken geben die SD an. Daten publiziert in Secker et al., 2019.<sup>[157]</sup>

Um die therapeutische Effektivität zu verbessern, wurden folglich die DOT1L- und PRMT5-Inhibitoren in *KMT2A*-rearrangierten Zellen getestet. Um deren Auswirkungen genau berechnen zu können, wurden Dosis-Wirkungs-Kurven steigender Konzentrationen der Einzel- und der Kombinationsbehandlung nach 6 Tagen mit konstantem, äquipotenten Verhältnis erstellt (**Abbildung 33 A**). Hierfür wurde die relative Zellzahl mittels *counting beads* und Durchflusszytometrie bestimmt. Aus den Daten wurden Kurven nach einem vierparametrischen logarithmischen Modell interpoliert (**Abbildung 33 B**) und die  $IC_{50}$ -Werte bestimmt. Diese sind zur Bestimmung der Synergie in Isobologrammen zu 50 % Effektniveau in **Abbildung 33 C** dargestellt. Da die Datenpunkte der Kombinationstherapie unterhalb der Verbindungslinie der Einzelbehandlungen liegen, kann von Synergie gesprochen werden. Außerdem wurden anhand der  $IC_{50}$ -Werte entsprechende CIs berechnet. Ein CI kleiner als 1 indiziert Synergie (**Abbildung 33 C**,  $CI < 1$ ). So kann gesagt werden, dass eine kombinatorische Behandlung mit DOT1L- und PRMT5-Inhibitoren einen synergistischen Effekt auf *KMT2A*-rearrangierte Zellen hat. Diese Daten wurden publiziert in Secker et al., 2019.<sup>[157]</sup>

#### 4.4.2 Reduzierte Proliferation *KMT2A*-rearrangierter Zellen durch Einzelbehandlungen und gesteigerter Effekt durch eine Kombinationsbehandlung mit DOT1L- und PRMT5-Inhibitoren

Der Vorteil eines synergistischen Effekts über dem eines einfachen additiven Effekts stellt die Grundlage für eine möglichst effiziente zielgerichtete Therapie dar. Als nächster Schritt sollte die Behandlung *KMT2A*-rearrangierter Zellen und Kontrollzellen mit den entsprechenden Inhibitoren alleine und in Kombination erfolgen, um so eine *KMT2A*-translokations-spezifische Wirkung nachzuweisen und gesunde Zellen möglichst zu schonen.

Hierfür wurde zunächst die Proliferation CRISPR/Cas9-generierter *KMT2A*-rearrangierter Zellen und gesunder kulturexpandierter CD34<sup>+</sup> huCB Zellen als Kontrollzellen untersucht, indem 1  $\mu$ M DOT1L-Inhibitor EPZ004777 und 1  $\mu$ M PRMT5-Inhibitor EPZ015666 einzeln und in Kombination verwendet und die Zellen über 6 Tage mittels Trypanblau-Färbung gezählt wurden. Die Einzelbehandlungen zeigten bereits eine reduzierte Proliferation *KMT2A*-rearrangierter Zellen, während die Kombinationsbehandlung noch größere Auswirkungen hatte. In **Abbildung 34 A** sind repräsentative Proliferationskurven sowie zusammengefasste Daten gezeigt. Gesunde Kontrollzellen wurden nicht beeinträchtigt. Der gesteigerte wachstumshemmende Effekt der Kombinationsbehandlung konnte ebenso durch die Bestimmung der relativen Zellzahl an Tag 6 mittels *counting beads* und Durchflusszytometrie nachgewiesen werden (**Abbildung 34 B**). Diese Daten wurden publiziert in Secker et al., 2019.<sup>[157]</sup>

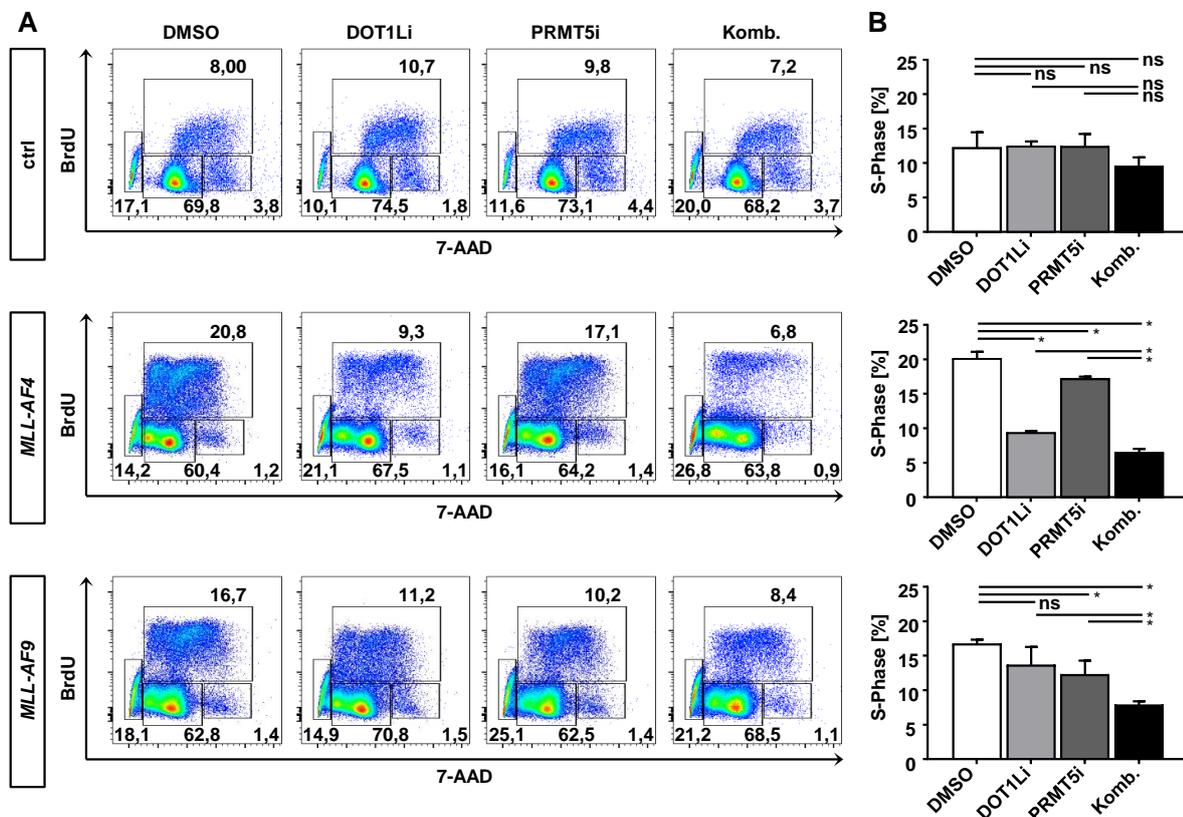


**Abbildung 34: Reduzierte Proliferation *KMT2A*-rearrangierter Zellen durch Einzelbehandlung mit DOT1L- und PRMT5-Inhibitoren und gesteigerter Effekt durch Kombinationsbehandlung.**  $t(4;11)$ -rearrangierte (*MLL-AF4*),  $t(9;11)$ -rearrangierte Zellen (*MLL-AF9*) und Kontrollzellen (ctrl), die nur mit Cas9-Protein behandelt wurden, wurden mit 1  $\mu\text{M}$  des DOT1L-Inhibitors (EPZ004777, DOT1Li), 1  $\mu\text{M}$  des PRMT5-Inhibitors (EPZ015666, PRMT5i), der Kombination beider Wirkstoffe (Komb.) oder DMSO für 6 Tage behandelt. **(A)** Für die Proliferationskurven wurde die Zellzahl alle zwei Tage mittels Trypanblau-Färbung und der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Eine jeweilige repräsentative Wachstumskurve und die zusammengefassten Daten aus drei biologischen Replikaten ( $n=3$ ) durchgeführt in technischen Triplikaten sind gezeigt. **(B)** Die Proliferation wurde weiter durch die Zellzahlbestimmung an Tag 6 mittels *counting beads* und Durchflusszytometrie verifiziert. Balken zeigen das arithmetische Mittel aus drei biologischen Replikaten ( $n=3$ ) durchgeführt in technischen Triplikaten. Fehlerbalken geben die SD an. Ein ungepaarter *t*-Test wurde verwendet. \* bedeutet  $p < 0,05$ . Daten publiziert in Secker et al., 2019.<sup>[157]</sup>

Zur Validierung der Ergebnisse und zur Gewährleistung der Spezifität der Effekte sollten alternative Inhibitoren der Zielstrukturen verwendet werden. Zunächst wurden der alternative DOT1L-Inhibitor EPZ5676 und der alternative PRMT5-Inhibitor EPZ015938 spezifisch für *KMT2A*-rearrangierte Zellen im Vergleich zu kulturexpandierten CD34<sup>+</sup> huCB Zellen als Kontrollzellen titriert (**Anhang 9 A**). Als nächster Schritt konnten sowohl die proliferationsinhibitorischen Auswirkungen der Einzelkomponenten als auch der gesteigerte kombinatorische Effekt des alternativen DOT1L-Inhibitors und des alternativen PRMT5-Inhibitors nachgewiesen werden. Es wurde je 1  $\mu\text{M}$  der alternativen Inhibitoren verwendet. Die Ergebnisse sind in **Anhang 9 B** gezeigt. Diese Daten wurden publiziert in Secker et al., 2019.<sup>[157]</sup>

#### 4.4.3 Beeinträchtigung des Zellzyklus der *KMT2A*-rearrangierten Zellen in der DNA-Synthese-Phase durch DOT1L- und PRMT5-Inhibitoren

Um die Auswirkungen der Behandlungen auf *KMT2A*-rearrangierte Zellen hinsichtlich der reduzierten Proliferation besser abschätzen und einordnen zu können, wurde eine Zellzyklusanalyse durchgeführt. Hier kann generell zwischen den einzelnen Phasen des Zellzyklus differenziert werden. Hierzu gehören die G0-, G1-, G2-, M- und S-Phase. Auch apoptotische Zellen können identifiziert werden. Änderungen der prozentualen Verteilung geben Aufschluss darüber, wie sich Zellen infolge einer Behandlung verhalten, ob sich mehr Zellen im dormanten Stadium (G0/G1-Phase) befinden und somit nicht mehr gut durch standardmäßig eingesetzte Chemotherapeutika adressiert werden können, ob hauptsächlich die DNA-Synthese verhindert wird (S-Phase) oder ob Zellen lediglich apoptotisch werden.



**Abbildung 35: Beeinträchtigung des Zellzyklus der *KMT2A*-rearrangierten Zellen in der DNA-Synthese-Phase durch DOT1L- und PRMT5-Inhibitoren.** *t*(4;11)-rearrangierte (*MLL-AF4*), *t*(9;11)-rearrangierte Zellen (*MLL-AF9*) und Kontrollzellen (ctrl), die nur mit Cas9-Protein behandelt wurden, wurden mit 1  $\mu$ M des DOT1L-Inhibitors (EPZ004777, DOT1Li), 1  $\mu$ M des PRMT5-Inhibitors (EPZ015666, PRMT5i), der Kombination beider Wirkstoffe (Komb.) oder DMSO für 6 Tage behandelt. Gezeigt sind repräsentative durchflusszytometrische Analysen (A) und zusammengefasste Daten der Zellen in S-Phase (B) aus drei biologischen Replikaten ( $n=3$ ) durchgeführt in technischen Triplikaten. Balken zeigen das arithmetische Mittel, Fehlerbalken geben die SD an. Ein ungepaarter *t*-Test wurde verwendet. \* bedeutet  $p < 0,05$ . Daten publiziert in Secker et al., 2019.<sup>[157]</sup>

Die Inhibition beider Zielstrukturen, DOT1L und PRMT5, wurde mittels Zellzyklusanalyse und Durchflusszytometrie untersucht. Es wurden *KMT2A*-rearrangierte und kulturexpandierende CD34<sup>+</sup> huCB Kontrollzellen für 6 Tage mit entsprechenden Inhibitoren (1 µM DOT1L-Inhibitor EPZ004777 und 1 µM PRMT5-Inhibitor EPZ015666) einzeln und in Kombination behandelt und anschließend analysiert. Repräsentative Ergebnisse durchflusszytometrischer Analysen sind in **Abbildung 35 A** gezeigt. Beide Inhibitoren trugen lediglich zu einer prozentualen Reduktion der *KMT2A*-rearrangierten Zellen in S-Phase bei. Eine Kombination beider Wirkstoffe resultierte in einem gesteigerten Effekt. Kontrollzellen blieben unbeeinträchtigt. Zusammengefasste Ergebnisse sind in **Abbildung 35 B** dargestellt. Diese Daten wurden publiziert in Secker et al., 2019.<sup>[157]</sup>

Eine Beeinträchtigung *KMT2A*-rearrangierter Zellen hinsichtlich des Zellzyklus und im Besonderen im Hinblick auf eine gestörte DNA-Synthese ohne Zunahme dormanter Zellen lässt erste Rückschlüsse auf eine mögliche verbleibende Vulnerabilität gegenüber Chemotherapeutika zu. Dieser Aspekt wird in „Kapitel 4.4.6 Kombination mit Chemotherapie als Möglichkeit für die klinische Anwendung“ näher beleuchtet. Zunächst war eine weitere Analyse der Gründe für die gestörte DNA-Synthese infolge der Behandlung mit der Kombinationstherapie durchzuführen. Eine Differenzierungsanalyse und eine spezifische Apoptoseuntersuchung trugen dann zur Aufklärung der betroffenen Signalwege bei.

#### **4.4.4 Induzierte Differenzierung *KMT2A*-rearrangierter Zellen durch eine Einzelbehandlung mit DOT1L-Inhibitor und nach Kombinationsbehandlung**

Für DOT1L ist bekannt, dass das Protein zur transkriptionellen Aktivierung der *KMT2A*-translokationsspezifischen Signaturgene und damit zu einem Differenzierungsblock führt. Für die Kombinationstherapie ist wichtig, zu evaluieren, ob diese Tatsache weiterhin gültig ist.

Hierfür wurden *KMT2A*-rearrangierte Zellen und kulturexpandierende CD34<sup>+</sup> huCB Kontrollzellen für 6 Tage mit 1 µM DOT1L-Inhibitor EPZ004777 und 1 µM PRMT5-Inhibitor EPZ015666 einzeln und in Kombination behandelt. Die Expression *KMT2A*-translokationsspezifischer Signaturgene, *MEIS1* und *HOXA9*, wurde anschließend mittels RT-qPCR analysiert. Während Kontrollzellen keine veränderte Expression infolge der verschiedenen Behandlungen aufwiesen, konnte gezeigt werden, dass die Expression von *MEIS1* und *HOXA9* in *KMT2A*-rearrangierten Zellen reduziert wurde, sobald der DOT1L-Inhibitor im Behandlungsschema enthalten war (**Abbildung 36 A**). Eine PRMT5-Inhibition hatte keinen Einfluss auf die Expression *KMT2A*-translokationsspezifischer Signaturgene, während der Effekt des DOT1L-Inhibitors innerhalb der Kombinationstherapie aufrechterhalten werden konnte.

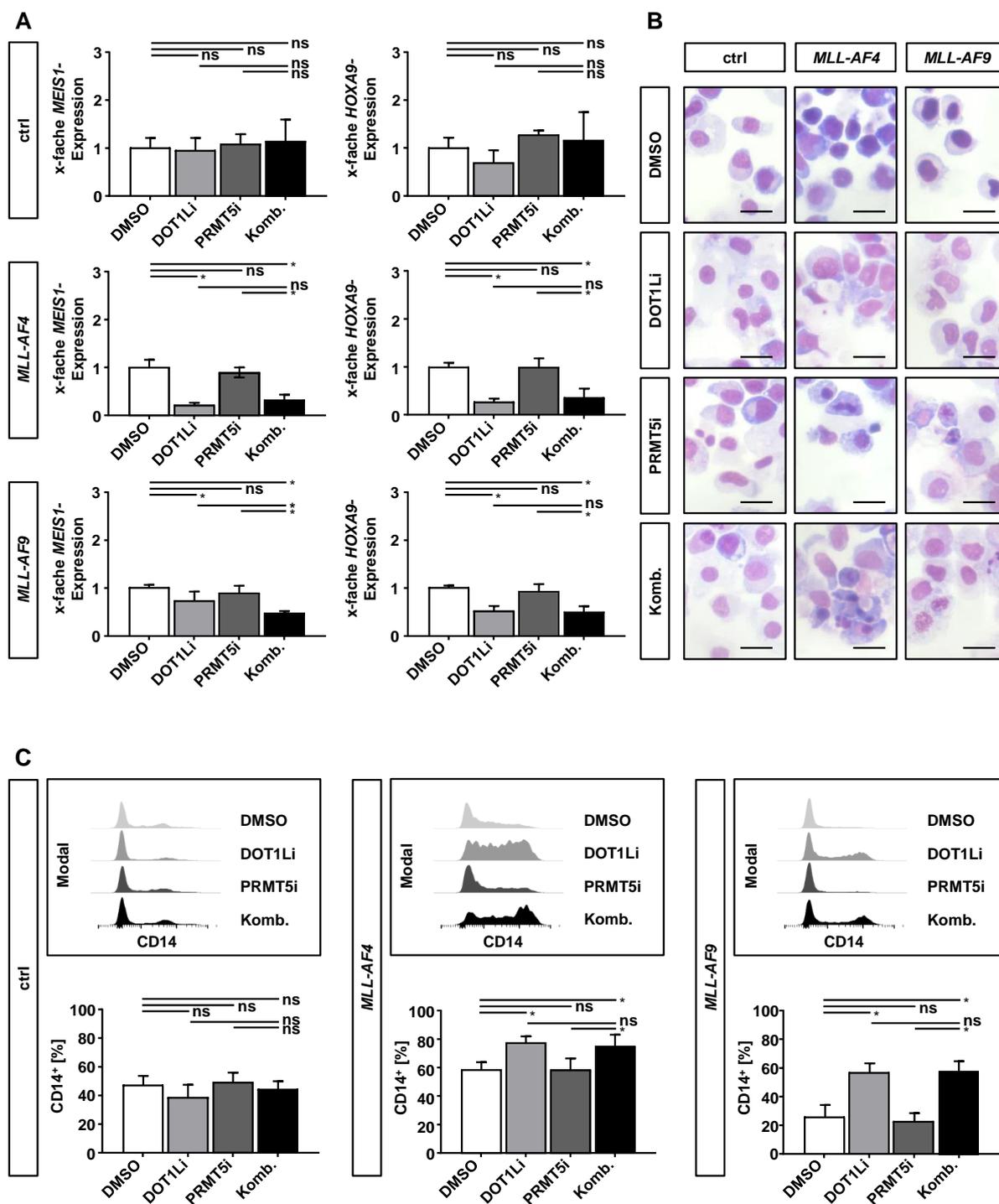
Die Expression der *KMT2A*-translokationsspezifischen Signaturgene führt in leukämischen Zellen zu einer reduzierten Differenzierung. Aufgrund dessen wurde die Morphologie der Zellen nach 6 Tagen Behandlung mittels histologischer May-Grünwald-Giemsa-Färbung be-

wertet. Während die Aufnahmen der Kontrollzellen keinen Hinweis auf weitere Differenzierung zuließen, konnte eine gesteigerte Differenzierung der Zellen nach DOT1L-Inhibition beobachtet werden (**Abbildung 36 B**). Zudem konnten vermehrt apoptotische Zellen nach PRMT5- und Kombinationsbehandlung identifiziert werden. Dieser Aspekt wird in weiteren Experimenten in „Kapitel 4.4.5 Induzierte Apoptose *KMT2A*-rearrangierter Zellen durch Einzelbehandlung und gesteigerter Effekt durch Kombinationsbehandlung“ untersucht.

Der Aspekt der Differenzierung, beobachtet durch Morphologieuntersuchungen, sollte mittels der Expression des Oberflächenmarkers CD14 validiert werden. Dazu wurden die Zellen nach 6 Tagen Behandlung mittels Durchflusszytometrie untersucht. Sobald der DOT1L-Inhibitor im Behandlungsschema enthalten war, konnte eine gesteigerte Differenzierung durch eine erhöhte Expression von CD14 auf der Oberfläche *KMT2A*-rearrangierter Zellen beobachtet werden (**Abbildung 36 C**). Kontrollzellen blieben unbeeinträchtigt. Eine PRMT5-Inhibition hatte keinen Einfluss auf die CD14-Expression, während der Effekt des DOT1L-Inhibitors innerhalb der Kombinationstherapie aufrechterhalten werden konnte. Diese Daten wurden publiziert in Secker et al., 2019.<sup>[157]</sup>

Zur Validierung der Ergebnisse wurden erneut alternative Inhibitoren der Zielstrukturen verwendet. Es wurde je 1  $\mu\text{M}$  des alternativen DOT1L-Inhibitors EPZ5676 und des alternativen PRMT5-Inhibitors EPZ015938 verwendet. Zur Identifikation DOT1L-induzierter reduzierter Differenzierung wurde die Expression des *KMT2A*-translokationsspezifischen Signaturgens *HOXA9* als Referenz untersucht. Die Ergebnisse sind vergleichbar zu denen der bisher verwendeten Inhibitoren und sind in **Anhang 9 C** gezeigt und wurden publiziert in Secker et al., 2019.<sup>[157]</sup>

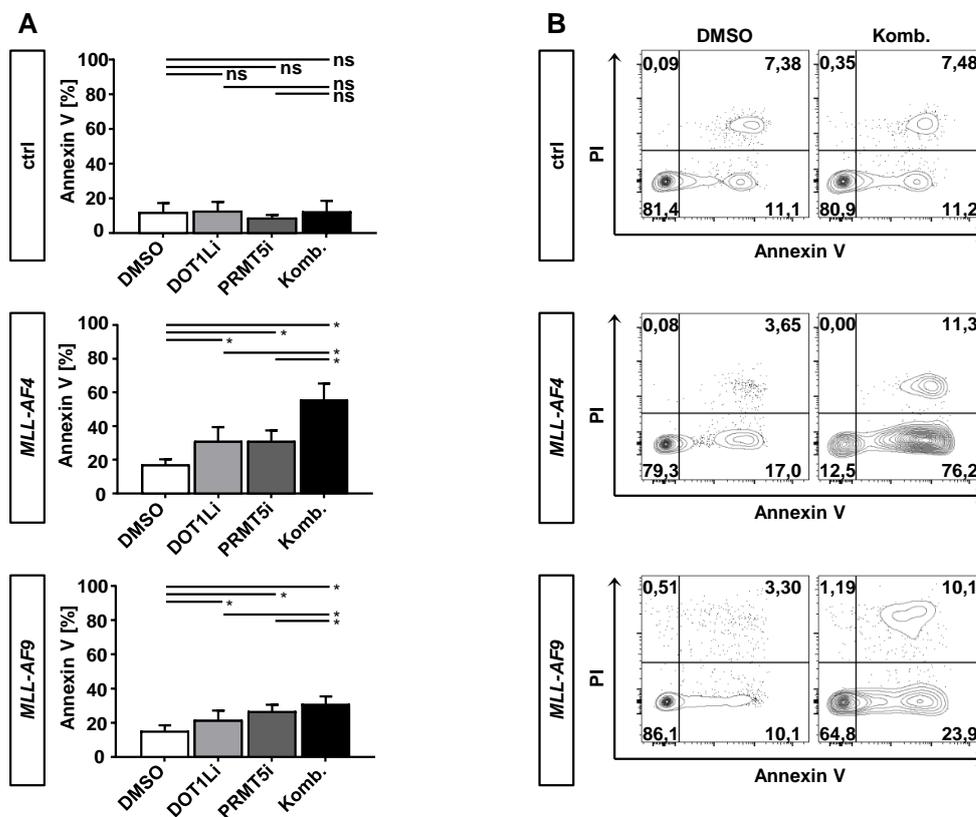
Zusammengefasst kann gesagt werden, dass die berichtete Wirkungsweise des DOT1L-Inhibitors, die Differenzierung *KMT2A*-rearrangierter Zellen zu induzieren, nachgewiesen werden konnte. Weiter konnte diese Wirkungsweise in der Kombinationstherapie bestätigt werden. Die Expression *KMT2A*-translokationsspezifischer Signaturgene, die Änderung der Morphologie und die CD14-Expression gehen miteinander einher.



**Abbildung 36: Induzierte Differenzierung *KMT2A*-rearrangierter Zellen durch Einzelbehandlung mit DOT1L-Inhibitor und nach Kombinationsbehandlung.** *t*(4;11)-rearrangierte (*MLL-AF4*), *t*(9;11)-rearrangierte Zellen (*MLL-AF9*) und Kontrollzellen (ctrl), die nur mit Cas9-Protein behandelt wurden, wurden mit 1  $\mu$ M des DOT1L-Inhibitors (EPZ004777, DOT1Li), 1  $\mu$ M des PRMT5-Inhibitors (EPZ015666, PRMT5i), der Kombination beider Wirkstoffe (Komb.) oder DMSO für 6 Tage behandelt. **(A)** Die Zielgenexpression nach Behandlung wurde mittels RT-qPCR gemessen. Die Balken zeigen das arithmetische Mittel aus drei biologischen Replikaten ( $n=3$ ) durchgeführt in technischen Triplikaten. Die Ergebnisse wurden auf 18S-rRNA normalisiert und DMSO-behandelte Zellen wurden als Kalibrator verwendet. **(B)** Die Bilder zeigen repräsentative Aufnahmen der Zellmorphologie mittels histologischer Färbung der Dünnschichtpräparate nach May-Grünwald-Giemsa nach Behandlung. Maßstabsbalken geben 20  $\mu$ m an. **(C)** Repräsentative durchflusszytometrische Analysen und zusammengefasste Daten der Expression des Differenzierungsmarkers CD14 aus drei biologischen Replikaten ( $n=3$ ) durchgeführt in technischen Triplikaten sind gezeigt. Balken zeigen das arithmetische Mittel, Fehlerbalken geben die SD an. Ein ungepaarter *t*-Test wurde verwendet. \* bedeutet  $p < 0,05$ . Daten publiziert in Secker et al., 2019.<sup>[157]</sup>

#### 4.4.5 Induzierte Apoptose *KMT2A*-rearrangierter Zellen durch Einzelbehandlung und gesteigerter Effekt durch Kombinationsbehandlung

Für PRMT5 wird berichtet, dass das Protein für die Methylierung von p53 verantwortlich ist. Außerdem wurde durch Morphologieuntersuchungen im Rahmen des Vergleichs einer Einzel- und Kombinationsbehandlung mit DOT1L- und PRMT5-Inhibitor in „Kapitel 4.4.4 Induzierte Differenzierung *KMT2A*-rearrangierter Zellen durch eine Einzelbehandlung mit DOT1L-Inhibitor und nach Kombinationsbehandlung“ deutlich, dass *KMT2A*-rearrangierte Zellen infolge der Behandlung verstärkt apoptotisch werden. Folglich ist der Aspekt der Apoptoseinduktion zur Charakterisierung der verschiedenen Behandlungsschemata wichtig.



**Abbildung 37: Induzierte Apoptose *KMT2A*-rearrangierter Zellen durch Einzelbehandlung und gesteigerter Effekt durch Kombinationsbehandlung.** *t*(4;11)-rearrangierte (*MLL-AF4*), *t*(9;11)-rearrangierte Zellen (*MLL-AF9*) und Kontrollzellen (ctrl), die nur mit Cas9-Protein behandelt wurden, wurden mit 1  $\mu$ M des DOT1L-Inhibitors (EPZ004777, DOT1Li), 1  $\mu$ M des PRMT5-Inhibitors (EPZ015666, PRMT5i), der Kombination beider Wirkstoffe (Komb.) oder DMSO für 6 Tage behandelt. Für die Bestimmung der Apoptose wurde die Externalisierung von Phosphatidylserin mittels Annexin V-Färbung durchflusszytometrisch bestimmt. **(A)** Balken zeigen das arithmetische Mittel zusammengefasster Daten aus drei biologischen Replikaten ( $n=3$ ) durchgeführt in technischen Triplikaten. **(B)** Repräsentative durchflusszytometrische Analysen sind gezeigt. Fehlerbalken geben die SD an. Ein ungepaarter *t*-Test wurde verwendet. \* bedeutet  $p<0,05$ . Daten in abgewandelter Form publiziert in Secker et al., 2019.<sup>[157]</sup>

Die Externalisierung von Phosphatidylserin während der Apoptose wurde nach 6 Tagen Inhibitorbehandlung analysiert. *KMT2A*-rearrangierte Zellen und kulturexpandierende CD34<sup>+</sup> huCB Kontrollzellen wurden dafür mit 1  $\mu$ M DOT1L-Inhibitor EPZ004777 und 1  $\mu$ M PRMT5-Inhibitor

EPZ015666 einzeln und in Kombination behandelt. Mittels Annexin V- und PI-Färbung konnte anschließend zwischen lebenden, nekrotischen, früh- und spätapoptotischen Zellen unterschieden werden. Die Analyse erfolgte durchflusszytometrisch. Ein insgesamt höherer prozentualer Anteil Annexin V<sup>+</sup> *KMT2A*-rearrangierter Zellen infolge einer Kombinationsbehandlung im Vergleich zu den Einzelbehandlungen konnte detektiert werden (**Abbildung 37**). Kontrollzellen blieben unbeeinträchtigt. Diese Daten wurden publiziert in Secker et al., 2019.<sup>[157]</sup>

Die gesteigerte Apoptose infolge der Kombinationsbehandlung konnte ebenso für den alternativen DOT1L-Inhibitor EPZ5676 und den alternativen PRMT5-Inhibitor EPZ015938 nachgewiesen werden. Es wurde je 1  $\mu$ M der alternativen Inhibitoren verwendet. Die Ergebnisse sind in **Anhang 9 D** gezeigt und wurden publiziert in Secker et al., 2019.<sup>[157]</sup>

Diese Ergebnisse zeigen, dass der synergistische Effekt aus den vorherigen Versuchen auch mittels einer spezifischen Apoptoseuntersuchung nachweisbar war. Aus den Ergebnissen der Einzelbehandlung ist zu schließen, dass sowohl der Signalweg über die Differenzierung als auch der Signalweg über p53 letztendlich zu Apoptose führten. Eine Kombination bediente beide Wege und führte zu einem verbesserten Effekt im Hinblick auf eine möglichst effiziente zielgerichtete Therapie *KMT2A*-rearrangierter Leukämien mit schlechter Prognose. CRISPR/Cas9-generierte *KMT2A*-rearrangierte Zellen können hier also als verlässliches *in vitro* Modell eine erste Rationale für eine zielgerichtete Kombinationstherapie von gleichzeitiger DOT1L- und PRMT5-Inhibition liefern.

#### 4.4.6 Kombination mit Chemotherapie als Möglichkeit für die klinische Anwendung

Eine klinische Anwendung möglicher zielgerichteter Therapien ist das erklärte Ziel jeden Forschungsansatzes und soll möglichst fokussiert umgesetzt werden. Jedoch bedarf es einer detaillierten vorherigen Analyse, um möglichst viele Abhängigkeiten und Limitationen zu charakterisieren und potenziell umgehen zu können. Die bisherige Charakterisierung der Kombinationstherapie trägt ihren Teil zur Aufklärung molekularer Prozesse infolge einer Behandlung bei. Jedoch bleibt abzuklären, wie sich das Verhalten der Zellen nach Behandlung *in vitro* als erster Hinweis für ein Verhalten leukämischer Zellen in Patienten verändern könnte. Die Frage, ob die Zellen nach Behandlung nachhaltig beeinträchtigt bleiben, dormant werden, oder in der Lage sein werden, ein erneutes Ausbrechen der Erkrankung zu induzieren, ist noch zu evaluieren. Auch deren Angreifbarkeit durch konventionelle Therapieformen, wie beispielsweise Chemotherapie, während oder nach der innovativen Behandlung ist ein Aspekt, der für den klinischen Einsatz wertvolle Zusatzinformationen bereithält.

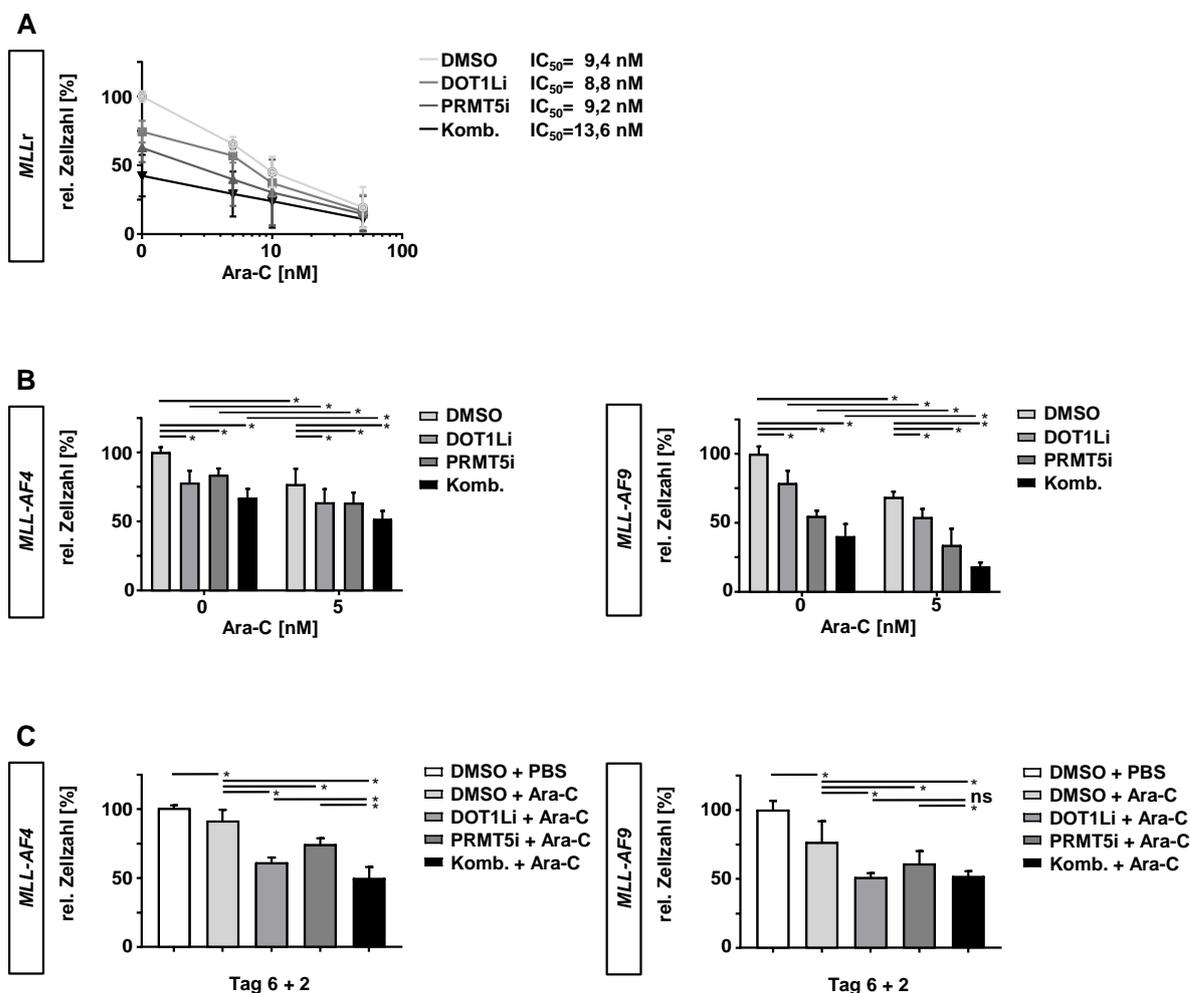
Um die Frage der nachhaltigen Auswirkungen DOT1L- und PRMT5-behandelter, *KMT2A*-rearrangierter Zellen zu beantworten, wurden *t*(4;11)- und *t*(9;11)-rearrangierte Zellen mit den entsprechenden Inhibitoren (1  $\mu$ M DOT1L-Inhibitor EPZ004777 und 1  $\mu$ M PRMT5-

Inhibitor EPZ015666) für 6 Tage einzeln oder in Kombination vorbehandelt. Anschließend wurden die verschiedenen Behandlungen ausgewaschen und die Zellen zu originaler Zelldichte wieder ausgesät. Die Entwicklung *KMT2A*-rearrangierter Zellen wurde über weitere 4 Tage beobachtet, die Proliferation wurde mittels Trypanblau-Färbung bestimmt und Zellzyklusanalysen an Tag 6 und Tag 6+4 wurden verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass die Verdopplungszeit und die Proliferation anhand der relativen Zellzahl an Tag 6+4 der kombinatorisch vorbehandelten Zellen noch immer signifikant reduziert waren, obwohl die Behandlung beendet war (**Anhang 10 A und B**). Dies wies auf beständige Änderungen der Epigenetik *KMT2A*-rearrangierter Zellen infolge der Kombinationsbehandlung hin. Wie erwartet induzierte die Kombinationsbehandlung Apoptose und reduzierte den Anteil *KMT2A*-rearrangierter Zellen in S-Phase (**Anhang 10 C**). Dieser Zustand konnte 4 Tage nach der Behandlung nur teilweise verbessert, jedoch nicht zum Ursprungszustand wiederhergestellt werden. Wichtig war, dass die Kombinationsbehandlung den Anteil der Zellen in G0/G1-Phase nicht beeinflusste und so keine Dormanz infolge der Behandlungen nachgewiesen werden konnte (**Anhang 10 C**). Diese Vorversuche implizieren eine mögliche Adressierbarkeit kombinatorisch behandelter *KMT2A*-rearrangierter Zellen mittels konventioneller Chemotherapie. Diese Daten wurden publiziert in Secker et al., 2019.<sup>[157]</sup>

Ara-C stellt ein üblicherweise verwendetes Chemotherapeutikum in akuten Leukämien dar.<sup>[1][2]</sup> Eine gleichzeitige und sequenzielle chemotherapeutische Behandlung *KMT2A*-rearrangierter Zellen mit Ara-C, DOT1L- und PRMT5-Inhibitoren bietet daher die Möglichkeit, Einblicke in das Verhalten *KMT2A*-rearrangierter Zellen im Hinblick auf eine mögliche klinische Anwendung zu bekommen. Zunächst sollte die Dosis an Ara-C ermittelt werden, bei der potenzielle gesteigerte Effekte noch sichtbar sind. Hierfür wurden *KMT2A*-rearrangierte Zellen für 6 Tage mit entsprechenden Inhibitoren (1  $\mu$ M DOT1L-Inhibitor EPZ004777 und 1  $\mu$ M PRMT5-Inhibitor EPZ015666) einzeln und in Kombination sowie in Kombination mit steigenden Konzentrationen von Ara-C behandelt (**Abbildung 38 A**). Aufgrund der Ergebnisse wurde eine Konzentration von 5 nM Ara-C für weitere Versuche gewählt. Wurden schließlich die entsprechenden Inhibitoren einzeln, in Kombination und gleichzeitig mit 5 nM Ara-C getestet, so ergab die Analyse der relativen Zellzahl einen weiteren zusätzlichen Effekt der Chemotherapie über die Kombinationsbehandlung alleine (**Abbildung 38 B**).

Für sequenzielle Versuche wurden *KMT2A*-rearrangierte Zellen für 6 Tage wie oben beschrieben vorbehandelt. Anschließend wurden die verschiedenen Behandlungen ausgewaschen und die Zellen zu originaler Zelldichte wieder ausgesät. Die Ergebnisse der Folgebehandlung von 5 nM Ara-C für weitere 2 Tage sind in **Abbildung 38 C** dargestellt. Bemerkenswerterweise wurde der komplementäre Effekt ebenfalls beobachtet. Dies bedeutet, dass nachhaltige epigenetische Änderungen in kombinatorisch behandelten *KMT2A*-rearrangierten Zellen zu einer Sensibilisierung dieser gegenüber konventioneller Chemotherapie führten. Diese Daten wurden publiziert in Secker et al., 2019.<sup>[157]</sup>

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass eine Inhibition von DOT1L und PRMT5 einen bleibenden Einfluss auf die Proliferation *KMT2A*-rearrangierter Zellen hat, während diese jedoch adressierbar für Chemotherapeutika bleiben. Dies deutet auf eine hohe Flexibilität der zeitlichen Dosierung in der klinischen Anwendung innovativer Therapien mit konventionellen Therapieformen hin.



**Abbildung 38: Die Behandlung mit DOT1L- und PRMT5-Inhibitoren sensibilisiert *KMT2A*-rearrangierte Zellen für Chemotherapie.** (A) *t*(4;11)-rearrangierte (*MLL-AF4*) und *t*(9;11)-rearrangierte Zellen (*MLL-AF9*) wurden mit 1  $\mu$ M des DOT1L-Inhibitors (EPZ004777, DOT1Li), 1  $\mu$ M des PRMT5-Inhibitors (EPZ015666, PRMT5i), der Kombination beider Wirkstoffe (Komb.) oder DMSO mit zusätzlich steigenden Konzentrationen von Cytarabin (Ara-C) für 6 Tage behandelt. Zusammengefasste Daten aus zwei biologischen Replikaten ( $n=2$ ) durchgeführt in technischen Triplikaten sind gezeigt. Die  $IC_{50}$ -Werte wurden aus einem vierparametrischen logarithmischen Modell interpoliert. (B) 5 nM Cytarabin (Ara-C) oder PBS (0 nM) wurden gleichzeitig zu den jeweiligen Inhibitor-Behandlungen für 6 Tage verwendet. Zusammengefasste Daten aus drei biologischen Replikaten ( $n=3$ ) durchgeführt in technischen Triplikaten sind gezeigt (C) Für sequenzielle Analysen wurden *KMT2A*-rearrangierte Zellen für 6 Tage mit entsprechenden Inhibitoren oder DMSO vorbehandelt. Die Behandlung wurde ausgewaschen, die Zellen wurden wieder ausgesät und anschließend für 2 Tage (Tag 6+2) mit Cytarabin (Ara-C) oder PBS behandelt. Zusammengefasste Daten aus drei biologischen Replikaten ( $n=3$ ) durchgeführt in technischen Triplikaten sind gezeigt. Proliferationsanalysen wurden mittels *counting beads* durchflusszytometrisch durchgeführt. Balken zeigen das arithmetische Mittel, Fehlerbalken geben die SD an. Ein ungepaarter *t*-Test wurde verwendet. \* bedeutet  $p<0,05$ . Daten publiziert in Secker et al., 2019.<sup>[157]</sup>

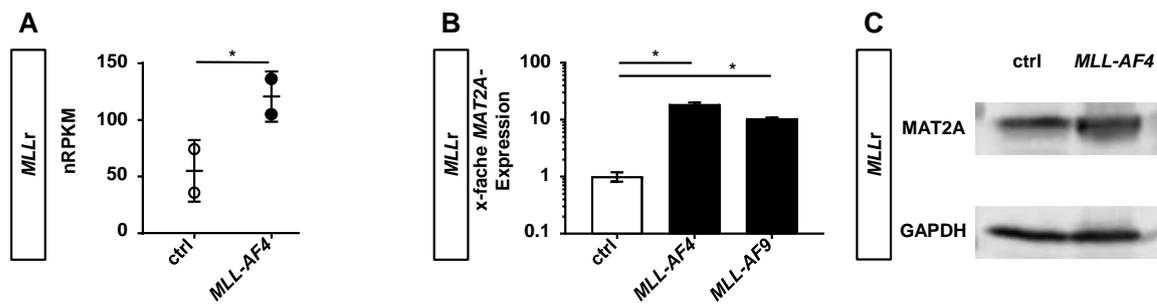
## 4.5 *KMT2A*-rearrangierte Zellen zur Identifikation von *MAT2A* als Zielstruktur

### 4.5.1 Erhöhte *MAT2A*-Expression in *KMT2A*-rearrangierten Zellen

Aufgrund der schlechten Prognose *KMT2A*-rearrangierter Leukämien ist eine fortwährende Identifizierung innovativer Strukturen für eine möglichst effiziente zielgerichtete Therapie anzustreben. Die durch das CRISPR/Cas9-System generierten *KMT2A*-rearrangierten Zellen stellen hierfür ein verlässliches *in vitro* Modell dar, um die Pathologie der zugrundeliegenden Erkrankung widerzuspiegeln und im selben Zuge als *in vitro* Testsystem für entsprechende Inhibitoren und somit für zukünftige Wirkstoffe zu fungieren. Die in „Kapitel 4.4 *KMT2A*-rearrangierte Zellen als *in vitro* Modell zur kombinierten DOT1L- und PRMT5-Inhibition als mögliche zielgerichtete Therapie“ gewonnenen Erkenntnisse zeigen das Potential des *in vitro* Modells hinsichtlich der Validierung und Optimierung zielgerichteter Therapien *KMT2A*-rearrangierter Leukämien. Als weiterer Schritt soll es nun dazu dienen, innovative Zielstrukturen zu identifizieren.

Es ist bekannt, dass das MLL-X-Fusionsprotein aufgrund seiner alternierten Struktur neue Funktionen durch die Rekrutierung anderer Cofaktoren gewinnt.<sup>[28][30][45][49][50][58][59]</sup> Daraus resultieren häufig Veränderungen auf epigenetischer Ebene. Ein Screening der vorhandenen RNA-Sequenzierungsdaten in Bezug auf epigenetische Signalwege und Schlüsselproteine sollte Aufschluss über weitere Veränderungen in *KMT2A*-rearrangierten Zellen geben. Diese Erkenntnisse sollten anschließend mit Patientendaten abgeglichen werden, um den realen Einfluss der gefundenen Strukturen zu belegen.

Hierfür wurden die RNA-Sequenzierungsdaten aus „Kapitel 4.2.4 Authentizität *KMT2A*-rearrangierter Zellen als patientenähnliches *in vitro* Modell“ manuell analysiert, auf einen Zusammenhang mit epigenetischen Signalwegen untersucht und schließlich mit bereits publizierten und bekannten Fakten abgeglichen. Als erste Annäherung war ein Signaturvergleich mit der allgemein verfügbaren *GO-Methylation-Signatur*<sup>[152][153]</sup> der *MSigDB database v7.0*<sup>[141][142]</sup> mittels GSEA möglich (**Anhang 11 A**). Als zentrale Substanz der DNA- und Histon-Methylierung rückten SAM und damit auch dessen Synthesekatalysator *MAT2A* in den Mittelpunkt der Untersuchungen (**Anhang 11 B**). Interessant war, dass die Expression von *MAT2A*, vergleichbar zu verschiedenen soliden Tumoren<sup>[69][70]</sup>, in CRISPR/Cas9-generierten *KMT2A*-rearrangierten Zellen hochreguliert war (**Abbildung 39 A**). In akuten Leukämien und speziell in *KMT2A*-rearrangierten Leukämien hingegen ist bis dato wenig über *MAT2A* als Zielstruktur beschrieben. Hauptsächlich fehlt bisher eine geeignete Möglichkeit, *MAT2A* zu adressieren.<sup>[75]</sup> Ein kürzlich veröffentlichter *MAT2A*-Inhibitor scheint diese Limitation zu überwinden, wodurch sich *MAT2A* zu einem interessanten Forschungsaspekt zielgerichteter Therapien *KMT2A*-rearrangierten Leukämien entwickelt.<sup>[75]</sup>



**Abbildung 39: Erhöhte MAT2A-Expression in KMT2A-rearrangierten Zellen.**  $t(4;11)$ -rearrangierte (*MLL-AF4*,  $n=2$ ),  $t(9;11)$ -rearrangierte Zellen (*MLL-AF9*,  $n=2$ ) (schwarz) und Kontrollzellen (ctrl,  $n=2$ , weiß), die nur mit Cas9-Protein behandelt wurden, wurden miteinander verglichen. **(A)** Die RNA-Sequenzierung wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Epigenetik des Instituts für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik des Universitätsklinikums Tübingen ausgewertet. Die differentielle Genexpression von *MAT2A* ist in *normalized reads per kilobase million* (nRPKM) dargestellt, jeder Datenpunkt repräsentiert eine Probe. Die Validierung der RNA-Sequenzierung mittels RT-qPCR ist in **(B)** gezeigt. Die Expression wurde auf 18S-rRNA normalisiert und Kontrollzellen (ctrl) dienten als Kalibrator. Zusammengefasste Daten aus zwei biologischen Replikaten ( $n=2$ ) durchgeführt in technischen Duplikaten sind gezeigt. **(C)** Ein repräsentativer Western-Blot aus drei biologischen Replikaten ( $n=3$ ) ist gezeigt. Der Proteingehalt wurde auf die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) normalisiert, der Faktor der relativen Quantifizierung beträgt 1,4. Balken zeigen das arithmetische Mittel, Fehlerbalken geben die SD an. Ein ungepaarter  $t$ -Test wurde verwendet. \* bedeutet  $p < 0,05$ . Unveröffentlichte Daten.

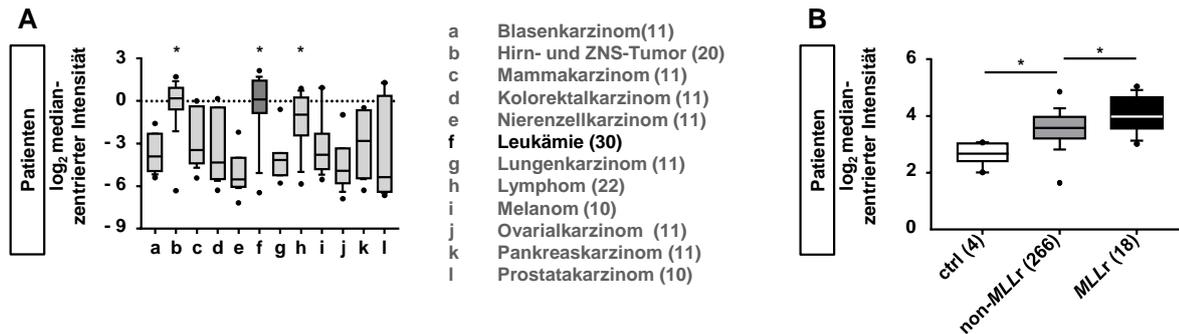
Für die Validierung von *MAT2A* als Zielstruktur wurden die RNA-Sequenzierungsergebnisse mittels RT-qPCR überprüft und die Überexpression von *MAT2A* in *KMT2A*-rearrangierten Zellen im Vergleich zu kulturreexpandierten  $CD34^+$  huCB Zellen konnte bestätigt werden (**Abbildung 39 B**). Auch auf Proteinebene konnte mehr *MAT2A* in *KMT2A*-rearrangierten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen detektiert werden (**Abbildung 39 C**).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass *MAT2A* ein interessantes Protein innerhalb der Methylierungsprozesse von Zellen im Allgemeinen darstellt und sich unter Berücksichtigung der Epigenetik *KMT2A*-rearrangierter Zellen im Speziellen als potenzielle komplementäre Zielstruktur eignet. Die durch die *KMT2A*-Translokation auf endogenem Expressionsniveau bedingte *MAT2A*-Überexpression lässt darauf schließen, dass ein direkter Zusammenhang über Signalwege besteht. Im Folgenden sollten die Erkenntnisse mit Patientendaten abgeglichen werden, um deren realen Einfluss zu belegen.

#### 4.5.2 Erhöhte Expression von *MAT2A* in publizierten *KMT2A*-rearrangierten Patientendaten

Die ersten Vorüberlegungen, *MAT2A* als Zielstruktur *KMT2A*-rearrangierter Zellen in Betracht zu ziehen, basieren auf den Erkenntnissen des *in vitro* Modells. Ob die *MAT2A*-Überexpression jedoch auch Einfluss in Patienten hat, sollte nun anhand von Patientendaten überprüft werden.

Hierzu wurden veröffentlichte Patientendatensätze hinsichtlich der *MAT2A*-Expression neu ausgewertet.<sup>[167][168]</sup> In Oncomine sind diesbezüglich Rohdaten hinterlegt.<sup>[169]</sup> Im Datensatz *Ramaswamy Multi-cancer*<sup>[167]</sup> wurde nach differentieller *MAT2A*-Expression innerhalb verschiedener Tumorentitäten gesucht und die Informationen wurden exportiert (**Abbildung 40 A**). *MAT2A* war in Hirn- und ZNS-Tumoren, Lymphomen und Leukämien signifikant differentiell exprimiert, sodass deutlich wurde, dass *MAT2A* als SAM-Lieferant in Leukämien eine wichtige Rolle spielen könnte.



**Abbildung 40: Erhöhte Expression von *MAT2A* in publizierten *KMT2A*-rearrangierten Patientendaten.** (A) Gezeigt ist die Analyse bereits publizierter Patientendatensätze verschiedener Tumorentitäten im Hinblick auf die *MAT2A*-Expression (Daten von Ramaswamy et al., 2001).<sup>[167]</sup> Die horizontalen Linien geben das arithmetische Mittel an, die Boxplots indizieren den Bereich vom 25. bis 75. Perzentil, die Fehlerbalken stellen den Bereich vom 10. Bis 90. Perzentil dar, die Einzelpunkte bezeichnen den maximalen und minimalen Wert. Die Anzahl der analysierten Patienten ist in Klammern angegeben. (B) Gezeigt ist der Vergleich von *KMT2A*-rearrangierten (*MLLr*) zu nicht-*KMT2A*-rearrangierten Patienten (*non-MLLr*) im Hinblick auf die *MAT2A*-Expression (Daten von Coustan-Smith et al., 2011).<sup>[168]</sup> Die horizontalen Linien geben das arithmetische Mittel an, die Boxplots indizieren den Bereich vom 25. bis 75. Perzentil, die Fehlerbalken stellen den Bereich vom 10. Bis 90. Perzentil dar, die Einzelpunkte bezeichnen den maximalen und minimalen Wert. Die Anzahl der analysierten Patienten ist in Klammern angegeben. Ein ungepaarter *t*-Test wurde verwendet. \* bedeutet  $p < 0,05$ .

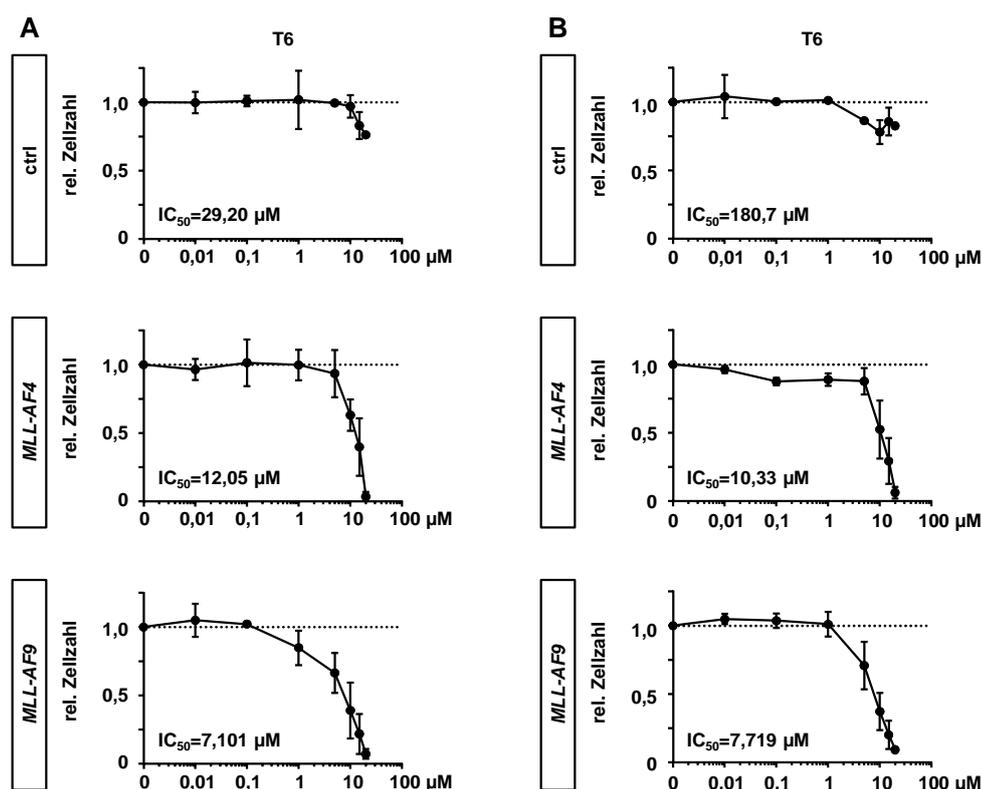
Im Datensatz *Coustan-Smith Leukemia*<sup>[168]</sup> wurde daher nach differentieller *MAT2A*-Expression innerhalb akuter Leukämien gesucht und nach *KMT2A*-Translokationsstatus und gesunden Kontrollen stratifiziert. Ergebnisse sind in **Abbildung 40 B** dargestellt. Die *MAT2A*-Expression war in akuten Leukämien im Allgemeinen signifikant erhöht, während sie im Vergleich von *KMT2A*-rearrangierter zu nicht-rearrangierten Leukämien nochmals als signifikant gesteigert identifiziert werden konnte.

Diese Daten zeigen, dass die *MAT2A*-Überexpression nicht nur im *in vitro* Modell *KMT2A*-rearrangierter Zellen als kausale Folge der Translokation eine Rolle spielt. Vielmehr bleibt sie auch in Patientenzellen erhalten und scheint besonders bei *KMT2A*-Translokationen eine besondere Bedeutung zu haben. Wie bereits in „Kapitel 4.3.1 Erhöhte *PRMT5*-Expression in *KMT2A*-rearrangierten Zellen“ beschrieben, muss der Unterschied einer passiven Überexpression und einem aktiven Beitrag zum Überleben *KMT2A*-rearrangierter Zellen für jede denkbare Zielstruktur abgesteckt werden. Die Wichtigkeit von *MAT2A* als Zielstruktur in *KMT2A*-rearrangierten Zellen sollte daher im Folgenden durch einen spezifischen Inhibitor getestet werden.

## 4.6 *KMT2A*-rearrangierte Zellen als *in vitro* Modell zur *MAT2A*-Inhibition als mögliche zielgerichtete Therapie

### 4.6.1 Titration eines innovativen, spezifischen Inhibitors für *MAT2A* in *KMT2A*-rearrangierten Zellen

Die Überexpression von *MAT2A* in CRISPR/Cas9-generierten *KMT2A*-rearrangierten und translokationspositiven Patientenzellen erlaubt einen erweiterten Einblick in die Pathophysiologie der Erkrankung. Ein aktiver Beitrag von *MAT2A* in zelluläre Malfunktionen bei epigenetischen Veränderungen *KMT2A*-rearrangierter Zellen sollte über eine passive Überexpression hinaus durch den Einsatz eines spezifischen Inhibitors validiert werden. Die generierten *KMT2A*-rearrangierten Zellen stellen hierfür ein verlässliches *in vitro* Modell dar, um als *in vitro* Testsystem für den entsprechenden Inhibitor zu fungieren. Die Verfügbarkeit eines spezifischen Inhibitors war jedoch lange Zeit limitiert, sodass infolge des kürzlich veröffentlichten *MAT2A*-Inhibitors PF-9366 erstmals dessen Wirksamkeit in *KMT2A*-rearrangierten Leukämien charakterisiert werden konnte.



**Abbildung 41: Titration eines innovativen, spezifischen Inhibitors für *MAT2A* in *KMT2A*-rearrangierten Zellen.** *t*(4;11)-rearrangierte (*MLL-AF4*), *t*(9;11)-rearrangierte Zellen (*MLL-AF9*) und Kontrollzellen (ctrl), die nur mit Cas9-Protein behandelt wurden, wurden mit steigenden Konzentrationen des *MAT2A*-Inhibitors (PF-9366) für 6 Tage behandelt. **(A)** Die relative Zellzahl wurde mittels Trypanblau-Färbung und der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Zusammengefassten Daten aus drei biologischen Replikaten ( $n=3$ ) durchgeführt in technischen Triplikaten sind gezeigt. **(B)** Die Proliferation wurde weiter durch die Zellzahlbestimmung an Tag 6 mittels *counting beads* und Durchflusszytometrie verifiziert. Die Zellzahl wurde jeweils auf DMSO-behandelte Zellen normalisiert (gepunktete Linie). Arithmetische Mittel sind gezeigt, Fehlerbalken geben die SD an. Die  $IC_{50}$ -Werte wurden aus einem vierparametrischen logarithmischen Modell interpoliert. Unveröffentlichte Daten.

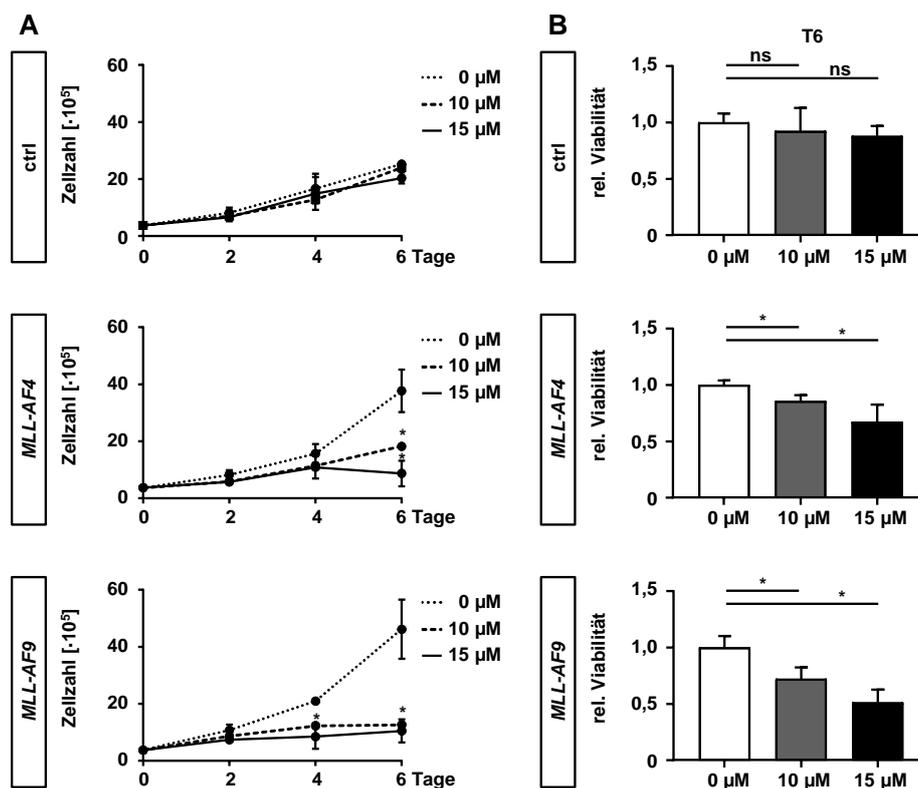
Zunächst wurde daher die Sensitivität CRISPR/Cas9-generierter *KMT2A*-rearrangierter Zellen gegenüber einer MAT2A-Inhibition untersucht, indem steigende Konzentrationen des MAT2A-Inhibitors PF-9366 verwendet und die Zellen nach 6 Tagen Behandlung mittels Trypanblau-Färbung und durchflusszytometrisch mittels *counting beads* analysiert wurden. Zur Absicherung der Spezifität des Inhibitors für *KMT2A*-rearrangierter Zellen wurden gesunde kulturexpandiertere CD34<sup>+</sup> huCB Zellen als Kontrollzellen verwendet. Es konnte eine dosisabhängige reduzierte Zellzahl *KMT2A*-rearrangierter Zellen nach 6 Tagen beobachtet werden (**Abbildung 41 A, B**). Gesunde Kontrollzellen wurden nur geringfügig beeinträchtigt. Aus den Daten wurden Kurven nach einem vierparametrischen logarithmischen Modell interpoliert und die IC<sub>50</sub>-Werte bestimmt. Für *KMT2A*-rearrangierte Zellen wurden IC<sub>50</sub>-Werte von ungefähr 10 µM bestimmt. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse wurden Konzentration von 10 µM und 15 µM für weitere Versuche gewählt.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass der Stellenwert von MAT2A hinsichtlich des Überlebens *KMT2A*-rearrangierter Zellen bestätigt werden konnte. Die Bedeutung von MAT2A in der Pathophysiologie des humanen *KMT2A*-Translokationsmodells auf endogenem Expressionsniveau konnte weiter belegt werden. Zudem eignen sich die CRISPR/Cas9-generierten *KMT2A*-rearrangierten Zellen wiederum als *in vitro* Testsystem für innovative zielgerichtete Therapien.

### 4.6.2 Reduzierte Proliferation und Viabilität durch MAT2A-Inhibition in *KMT2A*-rearrangierten Zellen

Die Sensitivität *KMT2A*-rearrangierter Zellen gegenüber einer MAT2A-Inhibition belegt die Bedeutung epigenetischer Veränderungen durch MAT2A in der Pathophysiologie und deren Stellenwert hinsichtlich des Überlebens *KMT2A*-rearrangierter Zellen. Eine Untersuchung der Auswirkungen einer Behandlung mit dem innovativen Inhibitor PF-9366 stellt die Grundlage für eine innovative zielgerichtete Therapie dar.

Hierfür wurden Proliferationskurven CRISPR/Cas9-generierter *KMT2A*-rearrangierter Zellen und gesunder kulturexpandierter CD34<sup>+</sup> huCB Zellen als Kontrollzellen erstellt, indem Behandlungen mit 10 µM oder 15 µM des MAT2A-Inhibitors PF-9366 oder DMSO als Kontrolle verwendet und die Zellen über 6 Tage mittels Trypanblau-Färbung gezählt wurden. Die Verwendung von bereits 10 µM zeigte eine reduzierte Proliferation, während weder 10 µM noch 15 µM Auswirkungen auf Kontrollzellen hatte (**Abbildung 42 A**).



**Abbildung 42: Reduzierte Proliferation und Viabilität durch MAT2A-Inhibition in *KMT2A*-rearrangierten Zellen.** *t*(4;11)-rearrangierte (*MLL-AF4*), *t*(9;11)-rearrangierte Zellen (*MLL-AF9*) und Kontrollzellen (ctrl), die nur mit Cas9-Protein behandelt wurden, wurden mit 10  $\mu$ M und 15  $\mu$ M des MAT2A-Inhibitors (PF-9366) oder DMSO für 6 Tage behandelt. **(A)** Für die Proliferationskurven wurde die Zellzahl alle zwei Tage mittels Trypanblau-Färbung und der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die zusammengefassten Wachstumskurven aus drei biologischen Replikaten ( $n=3$ ) durchgeführt in technischen Triplikaten sind gezeigt. **(B)** Die resultierende Viabilität an Tag 6 wurde weiter mittels des fluoreszenzbasierten *alamarBlue* assays verifiziert. Balken zeigen das arithmetische Mittel aus drei biologischen Replikaten ( $n=3$ ) durchgeführt in technischen Triplikaten. Fehlerbalken geben die SD an. Ein ungepaarter *t*-Test wurde verwendet. \* bedeutet  $p < 0,05$ . Unveröffentlichte Daten.

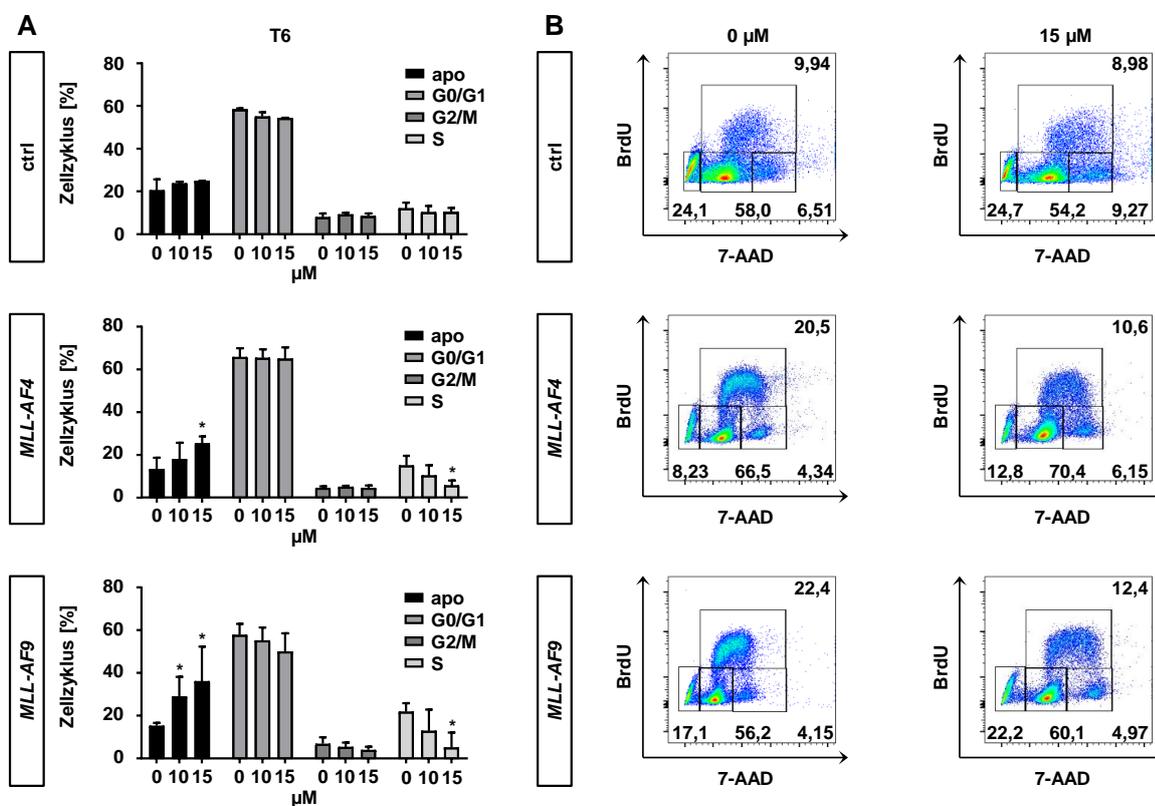
Der wachstumshemmende Effekt konnte ebenso durch die Bestimmung der Viabilität an Tag 6 mittels des fluoreszenzbasierten *alamarBlue* Assays nachgewiesen werden (**Abbildung 42 B**).

Die Ergebnisse zeigten den Wirkungsgrad des MAT2A-Inhibitors in *KMT2A*-rearrangierten Zellen auf. Bei der Verwendung einer  $IC_{50}$ -basierten Konzentration von 10  $\mu$ M konnte die Proliferation bereits erheblich gehemmt werden. Die Viabilität der vorhandenen *KMT2A*-rearrangierten Zellen nach 6 Tagen war nach Behandlung mit 10  $\mu$ M signifikant, mit 15  $\mu$ M deutlich stärker beeinflusst, während Kontrollzellen nicht signifikant inhibiert wurden.

Eine weitere Charakterisierung der inhibierten Zellen nach Behandlung sollte im Folgenden dabei helfen, die Reaktion der Zellen und deren Auswirkungen im Patienten besser abschätzen und einordnen zu können.

### 4.6.3 Beeinträchtigung des Zellzyklus der *KMT2A*-rearrangierten Zellen in der DNA-Synthese-Phase

Die reduzierte Proliferation *KMT2A*-rearrangierter Zellen infolge einer MAT2A-Inhibition kann durch die gehemmte Katalyse der SAM-Produktion und die darauf folgende veränderte Epigenetik verursacht werden. Die Folgen einer MAT2A-Inhibition in *KMT2A*-rearrangierten Zellen können zunächst durch eine Zellzyklusanalyse charakterisiert werden. Ähnlich wie auch im vorigen Behandlungsmodell der DOT1L- und PRMT5-Inhibition gezeigt, geben Änderungen der prozentualen Phasenverteilung infolge einer Behandlung Aufschluss darüber, ob sich mehr Zellen im dormanten Stadium befinden, ob hauptsächlich die DNA-Synthese verhindert wird, oder ob die Zellen apoptotisch werden.



**Abbildung 43: Beeinträchtigung des Zellzyklus der *KMT2A*-rearrangierten Zellen in der DNA-Synthese-Phase durch MAT2A-Inhibition.** *t*(4;11)-rearrangierte (*MLL-AF4*), *t*(9;11)-rearrangierte Zellen (*MLL-AF9*) und Kontrollzellen (ctrl), die nur mit Cas9-Protein behandelt wurden, wurden mit 10 µM und 15 µM des MAT2A-Inhibitors (PF-9366) oder DMSO für 6 Tage behandelt. Gezeigt sind zusammengefasste Daten des Zellzyklus (A) und repräsentative durchflusszytometrische Analysen (B) aus drei biologischen Replikaten ( $n=3$ ) durchgeführt in technischen Triplikaten. Balken zeigen das arithmetische Mittel, Fehlerbalken geben die SD an. Ein ungepaarter *t*-Test wurde verwendet. \* bedeutet  $p<0,05$ . Unveröffentlichte Daten.

Folglich wurden *KMT2A*-rearrangierte und kulturexpandierende CD34<sup>+</sup> huCB Kontrollzellen für 6 Tage mit 10 µM oder 15 µM des MAT2A-Inhibitors PF-9366 oder DMSO als Kontrolle behandelt und anschließend analysiert. Mittels BrdU- und 7-AAD-Färbung konnte zwischen den einzelnen Phasen des Zellzyklus, G0-, G1-, G2-, M- und S-Phase, differenziert werden. Zu-

sammengefasste Daten und repräsentative Ergebnisse durchflusszytometrischer Analysen sind in **Abbildung 43** gezeigt. Behandelte *KMT2A*-rearrangierte Zellen befanden sich prozentual weniger in der S-Phase und die Verteilung verschob sich in Richtung apoptotischer Zellen. Kontrollzellen blieben unbeeinflusst.

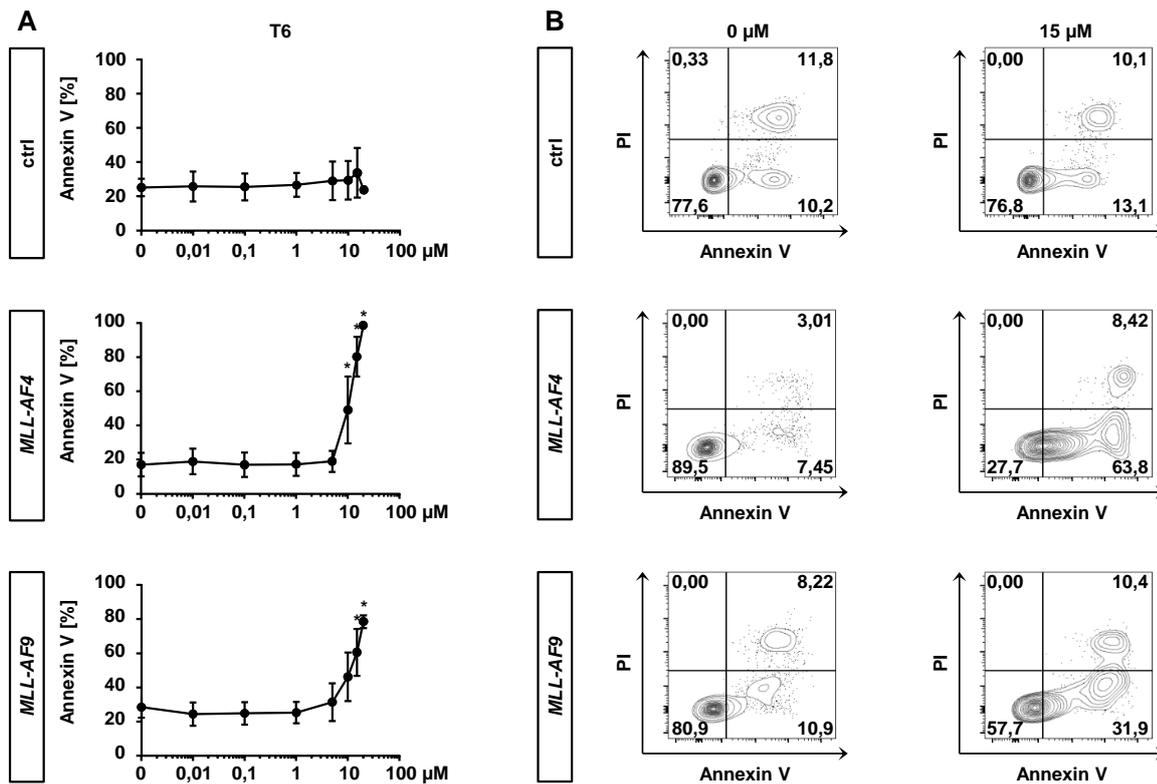
Eine Beeinträchtigung *KMT2A*-rearrangierter Zellen hinsichtlich des Zellzyklus und im Besonderen im Hinblick auf eine gestörte DNA-Synthese ohne Zunahme dormanter Zellen lässt erste Rückschlüsse auf eine mögliche verbleibende Adressierbarkeit mit Chemotherapeutika zu. Dieser Aspekt der klinischen Anwendung wird in „Kapitel 4.8 Mögliche Kombinationsstrategien zielgerichteter Therapien für die klinische Anwendung“ näher beleuchtet. Im Folgenden sollte jedoch zunächst eine weiterführende Analyse der Gründe für die gestörte DNA-Synthese infolge der Behandlung mit dem MAT2A-Inhibitor durchgeführt werden. Eine spezifische Apoptoseuntersuchung sowie eine Differenzierungsanalyse trugen zur Aufklärung der betroffenen Signalwege bei.

#### 4.6.4 Induzierte Apoptose durch MAT2A-Inhibition in *KMT2A*-rearrangierten Zellen

Während der Zellzyklusanalyse in „Kapitel 4.6.3 Beeinträchtigung des Zellzyklus der *KMT2A*-rearrangierten Zellen in der DNA-Synthese-Phase“ wurde eine Verschiebung der Phasenverteilung zugunsten vermehrter apoptotischer *KMT2A*-rearrangierter Zellen detektiert. Dieser Aspekt wurde hier allein durch die DNA-Quantifizierung der 7-AAD-Färbung charakterisiert. Eine spezifische Untersuchung der Apoptoseinduktion ist demnach notwendig.

Folglich wurde die Externalisierung von Phosphatidylserin während der Apoptose nach 6 Tagen Inhibitorbehandlung mit PF-9366 analysiert. *KMT2A*-rearrangierte Zellen und kulturexpandierte CD34<sup>+</sup> huCB Kontrollzellen wurden dafür für 6 Tage mit steigenden Konzentrationen des MAT2A-Inhibitors behandelt. Mittels Annexin V- und PI-Färbung konnte anschließend zwischen lebenden, nekrotischen, früh- und spätapoptotischen Zellen unterschieden werden. Die Analyse erfolgte durchflusszytometrisch. Ein dosisabhängiger prozentualer Anstieg Annexin V<sup>+</sup> *KMT2A*-rearrangierter Zellen infolge einer MAT2A-Inhibition konnte detektiert werden (**Abbildung 44**). Kontrollzellen blieben unbeeinträchtigt.

Diese Ergebnisse zeigen, dass der inhibitorische Effekt des MAT2A-Inhibitors aus den vorherigen Versuchen auch mittels einer spezifischen Apoptoseuntersuchung nachweisbar war. Bisher können so CRISPR/Cas9-generierte *KMT2A*-rearrangierte Zellen als verlässliches *in vitro* Modell eine erste Rationale für eine zielgerichtete Therapie durch eine MAT2A-Inhibition liefern.

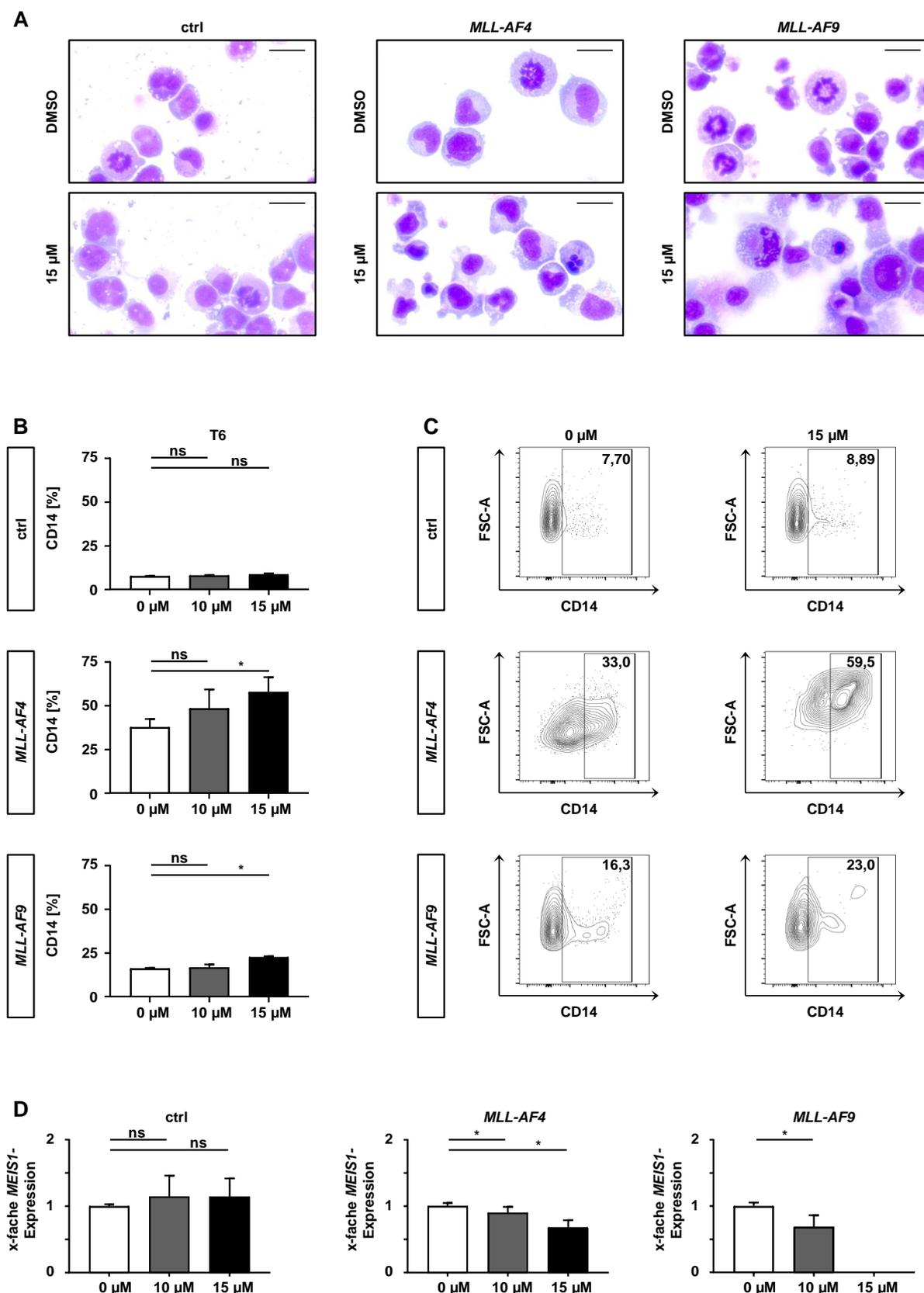


**Abbildung 44: Induzierte Apoptose durch MAT2A-Inhibition in *KMT2A*-rearrangierten Zellen.** *t*(4;11)-rearrangierte (*MLL-AF4*), *t*(9;11)-rearrangierte Zellen (*MLL-AF9*) und Kontrollzellen (ctrl), die nur mit Cas9-Protein behandelt wurden, wurden mit 10 µM und 15 µM des MAT2A-Inhibitors (PF-9366) oder DMSO für 6 Tage behandelt. Für die Bestimmung der Apoptose wurde die Externalisierung von Phosphatidylserin mittels Annexin V-Färbung durchflusszytometrisch bestimmt. Zusammengefasste Daten aus drei biologischen Replikaten ( $n=3$ ) durchgeführt in technischen Triplikaten (A) und repräsentative durchflusszytometrische Analysen (B) sind gezeigt. Punkte zeigen das arithmetische Mittel, Fehlerbalken geben die SD an. Ein ungepaarter *t*-Test wurde verwendet. \* bedeutet  $p<0,05$ . Unveröffentlichte Daten.

#### 4.6.5 Induzierte Differenzierung durch MAT2A-Inhibition in *KMT2A*-rearrangierten Zellen

MAT2A synthetisiert das zentrale Substrat SAM zur Übertragung von Methylgruppen, welches in Folge zusammen mit verschiedenen Methyltransferasen, wie beispielsweise DOT1L und PRMT5, für spezifische DNA- und Histon-Methylierungsmuster verantwortlich ist. Eine vergleichbare Differenzierungsinduktion wie in „Kapitel 4.4.4 Induzierte Differenzierung *KMT2A*-rearrangierter Zellen durch eine Einzelbehandlung mit DOT1L-Inhibitor und nach Kombinationsbehandlung“ infolge einer Behandlung *KMT2A*-rearrangierter Zellen bleibt folglich zu untersuchen.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden *KMT2A*-rearrangierte Zellen und kulturexpandierende CD34<sup>+</sup> huCB Kontrollzellen für 6 Tage mit 10 µM oder 15 µM des MAT2A-Inhibitors PF-9366 oder DMSO als Kontrolle behandelt und anschließend analysiert.



**Abbildung 45: Induzierte Differenzierung durch MAT2A-Inhibition in *KMT2A*-rearrangierten Zellen.**  $t(4;11)$ -rearrangierte (*MLL-AF4*),  $t(9;11)$ -rearrangierte Zellen (*MLL-AF9*) und Kontrollzellen (ctrl), die nur mit Cas9-Protein behandelt wurden, wurden mit 10  $\mu$ M und 15  $\mu$ M des MAT2A-Inhibitors (PF-9366) oder DMSO für 6 Tage behandelt. **(A)** Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen der Zellmorphologie mittels histologischer Färbung der Dünnschichtpräparate nach May-Grünwald-Giemsa nach Behandlung. Maßstabsbalken geben 20  $\mu$ m an. Die zusammengefassten Daten der CD14-Expression **(B)** und repräsentative durchflusszytometrische Analysen **(C)** aus drei biologischen Replikaten ( $n=3$ )

durchgeführt in technischen Triplikaten sind dargestellt. **(D)** Die Expression *KMT2A*-translokationsspezifischer Zielgene wurde nach 6 Tagen Behandlung mittels RT-qPCR analysiert. Die Expression von *MEIS1* wurde auf 18S-rRNA normalisiert und entsprechende DMSO-behandelte Zellen dienten als Kalibrator. Zusammengefasste Daten aus drei biologischen Replikaten ( $n=3$ ) durchgeführt in technischen Duplikaten sind gezeigt. Balken zeigen das arithmetische Mittel, Fehlerbalken geben die SD an. Ein ungepaarter *t*-Test wurde verwendet. \* bedeutet  $p<0,05$ . Unveröffentlichte Daten.

Eine Untersuchung der Morphologie mittel histologischer May-Grünwald-Giemsa-Färbung zeigte, dass eine gesteigerte Differenzierung *KMT2A*-rearrangierter Zellen nach MAT2A-Inhibition vorlag, während Kontrollzellen unbeeinflusst blieben und nach Behandlung weiterhin identische Anzahlen an Mitosen detektiert wurden (**Abbildung 45 A**). Außerdem konnten vermehrt apoptotische *KMT2A*-rearrangierte Zellen identifiziert werden. Dieser Aspekt wurde bereits in „Kapitel 4.6.4 Induzierte Apoptose durch MAT2A-Inhibition in *KMT2A*-rearrangierten Zellen“ untersucht.

Diese Ergebnisse gingen einher mit einer phänotypischen Bestimmung behandelter und nicht-behandelter Zellen nach 6 Tagen, wobei die Expression des Differenzierungsmarkers CD14 durchflusszytometrisch bestimmt wurde. Es konnte ebenfalls eine gesteigerte Differenzierung speziell für behandelte *KMT2A*-rearrangierte Zellen detektiert werden (**Abbildung 45 B, C**).

Die Differenzierung in *KMT2A*-rearrangierten Zellen kann beispielsweise durch DOT1L-Inhibition induziert werden, sodass geringere Mengen an nachfolgenden Zielgenen, wie *MEIS1* und *HOXA9*, abgelesen werden, die zur Steigerung der Proliferation und Inhibition der Differenzierung beitragen. Ob dieser Aspekt auch bei MAT2A-Inhibition eine Rolle spielt und die Signalwege so zusammenhängen, sollte eine Expressionsanalyse der *KMT2A*-translokationsspezifischen Signaturgene beispielhaft anhand von *MEIS1* mittels RT-qPCR darlegen. *KMT2A*-rearrangierte Zellen und kulturexpandierende CD34<sup>+</sup> huCB Kontrollzellen wurden für 6 Tage mit steigenden Konzentrationen des MAT2A-Inhibitors PF-9366 behandelt und anschließend analysiert. Während Kontrollzellen keine veränderte Expression infolge der Behandlung aufwiesen, konnte gezeigt werden, dass die Expression von *MEIS1* in *KMT2A*-rearrangierten Zellen ab einer Dosierung von 10  $\mu\text{M}$  beziehungsweise 15  $\mu\text{M}$  reduziert wurde (**Abbildung 45 D**). Die Effekte konnten aufgrund der hohen Zellsterblichkeit und der geringen resultierenden RNA-Menge nicht für alle höheren Konzentrationen bestimmt werden.

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass eine Wirkungsweise des MAT2A-Inhibitors über induzierte Differenzierung *KMT2A*-rearrangierter Zellen beobachtet werden konnte. Die Änderung der Morphologie und der CD14-Expression gehen miteinander einher. Zur Expression *KMT2A*-translokationsspezifischer Signaturgene infolge einer MAT2A-Inhibition ist zu sagen, dass eine Auswirkung festgestellt werden konnte. Trotzdem ist die Expressionsänderung im Vergleich zum vorhandenen inhibitorischen Effekt als gering zu bewerten. Eine detaillierte Analyse der Signalwege infolge einer MAT2A-Behandlung ist daher erforderlich.

#### 4.6.6 Einfluss der MAT2A-Inhibition auf nachfolgende Signalwege

Für eine genauere Analyse, welche Signalwege schließlich zu Differenzierung, Proliferationsinhibition und Apoptose führen, sollten RNA-Sequenzierungsdaten behandelter *KMT2A*-rearrangierter Zellen mit DMSO-behandelten Zellen verglichen werden. Zusätzlich zu bisherigen Untersuchungen bietet die Methode der RNA-Sequenzierung die Möglichkeit, die Gesamtheit differentiell exprimierter Gene zu identifizieren und die Bedeutung von MAT2A in der *KMT2A*-abhängigen Leukämogenese einzuordnen.

t(4;11)-rearrangierte Zellen wurden hierfür mit 15 µM MAT2A-Inhibitor PF-9366 oder DMSO für 4 Tage behandelt und anschließend mittels RNA-Sequenzierung untersucht. Wurden die Expressionsprofile der behandelten Zellen mit denen der DMSO-Kontrolle verglichen, konnten 74 DEGs ermittelt werden, wobei 36 hoch- und 38 herunterreguliert waren. Die Daten sind in **Abbildung 46 A** und **Anhang 12** dargestellt. Die bisherigen funktionellen Ergebnisse des Zellzyklusarrests und der Apoptoseinduktion konnten validiert werden. Zusätzlich wurden Veränderungen im Cholesterin- und Lipidmetabolismus gefunden.

Zunächst konnten unter den am häufigsten betroffenen Genen solche identifiziert werden, die den Zellzyklus G1/S-bedingt steuern. Hierzu gehören CDKN1A (p21), die *cyclin-dependent kinase 1* (CDK1), der *RB transcriptional corepressor 1* (RB1) und das MDM2 Protoonkogen. Deren Wechselwirkung ist im Interaktom der 74 DEGs gezeigt (**Abbildung 46 B**). Eine Schlüsselrolle nimmt hierbei CDKN1A als Zellzyklusinhibitor im Zusammenhang mit der *KMT2A*-abhängigen Leukämogenese, dem Zellzyklus und der Proliferation ein.<sup>[55][56][170]-[173]</sup>

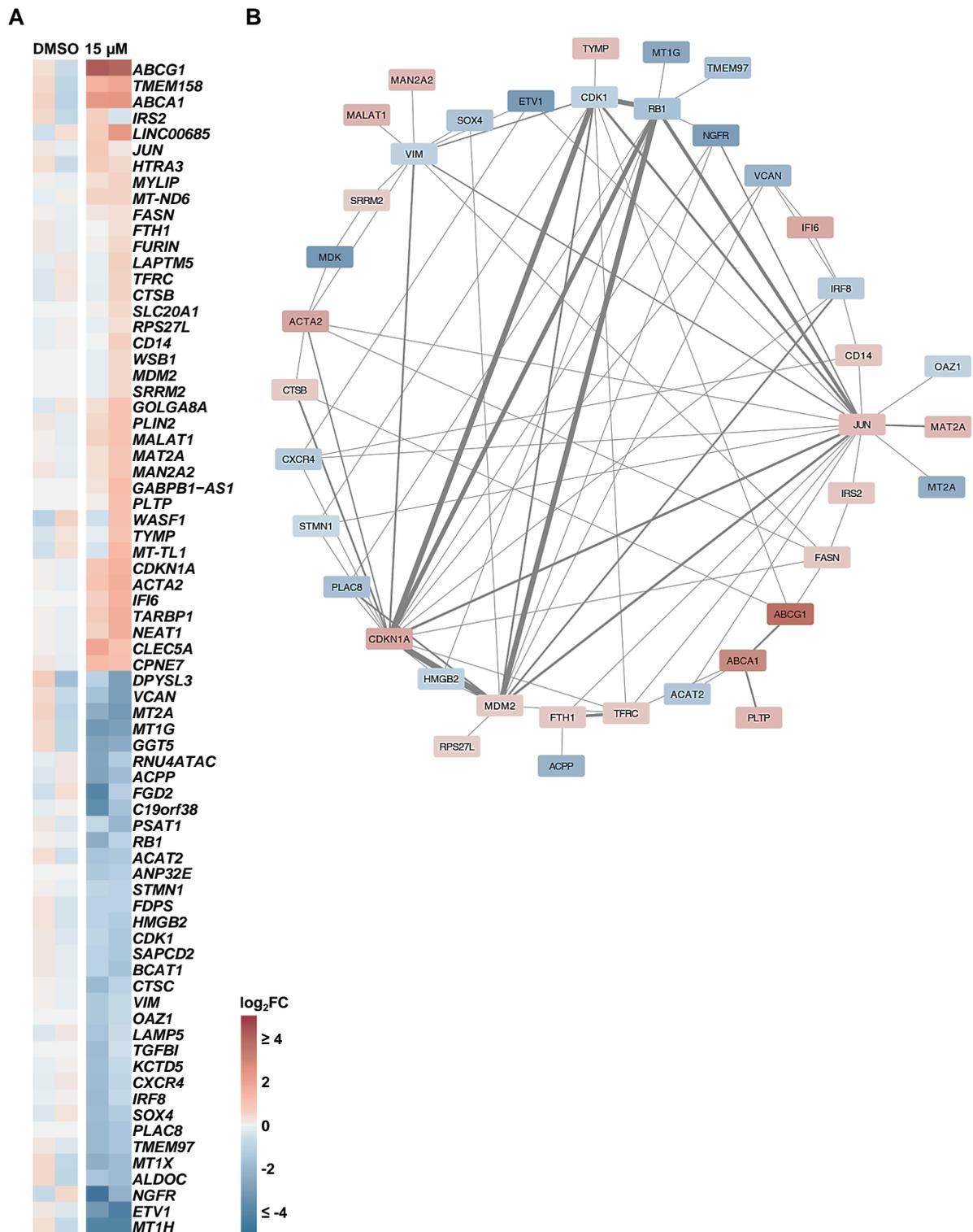
Zudem wurden verschiedene Gene gefunden, welche die Zellreifung beeinflussten: CD14 als klassischer Differenzierungsmarker wurde nach PF-9366-Behandlung hochreguliert.<sup>[162]</sup> Gleichermäßen wurden der *SRY-box transcription factor 4* (SOX4)<sup>[174][175]</sup> und das *placenta associated 8 protein* (PLAC8)<sup>[176]-[178]</sup> herunterreguliert sowie lange nicht-kodierende RNAs, wie das *nuclear paraspeckle assembly transcript 1* (NEAT1)<sup>[179]</sup> und das *metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1* (MALAT1)<sup>[180]</sup>, hochreguliert. Letzendlich führt dies zu einer myeloiden Differenzierung von AML-Zellen.

Ein Cholesterin- und Lipidstoffmetabolismus mit hohen Stoffwechselraten spielt bei vielen Neoplasien und myeloproliferativen Erkrankungen eine wichtige Rolle. Infolge einer MAT2A-Inhibition konnte festgestellt werden, dass die Cholesterin-Effluxtransporter *ATP binding cassette subfamily G member 1* (ABCG1) und *ATP binding cassette subfamily A member 1* (ABCA1) signifikant hochreguliert waren, was die antiproliferativen und apoptotischen Effekte der Behandlung erklärt.<sup>[181][182]</sup> Ein weiteres Gen, welches dem Cholesterinstoffwechsel zuzuordnen ist und infolge der PF-9366-Behandlung eine verringerte Expression aufwies, war der *sigma intracellular receptor 2 (transmembrane protein 97, TMEM97)*.<sup>[183]-[185]</sup> Es ist bekannt, dass die Überexpression von TMEM97 positiv mit der Tumorpheriferation, Metastasierung und dem verringerten Überleben der Patienten bei verschiedenen Krebstypen korreliert.

Daher wurden bereits erste Anstrengungen unternommen, um es als Ziel für die Krebsbehandlung zu verwenden.<sup>[186][187]</sup>

Schließlich wurden auch zwei bekannte leukämische Zielstrukturen, der *lysosomal associated membrane protein family member 5* (LAMP5) und der *C-X-C motif chemokine receptor 4* (CXCR4), infolge der MAT2A-Inhibition herunterreguliert. LAMP5 ist spezifisch in *KMT2A*-rearrangierten Leukämien überexprimiert, da es als direktes Ziel der H3K79-Histon-Methyltransferase DOT1L fungiert.<sup>[188]</sup> CXCR4 ist am Signalweg der Interaktion zwischen Tumor und Stromazellen, also der Mikroumgebung, beteiligt. So wird die Apoptose der LSC gehemmt, wodurch bei Leukämien eine therapeutische Resistenz induziert wird.<sup>[189][190]</sup>

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass sich das Expressionsprofil CRISPR/Cas9-generierter *KMT2A*-rearrangierter Zellen infolge einer MAT2A-Behandlung verändert. Biologische Prozesse des Zellzyklus, der Apoptose und der Differenzierung sind beeinflusst. Es kann gesagt werden, dass MAT2A in *KMT2A*-rearrangierten Zellen mitverantwortlich ist, den Überlebensvorteil und die *KMT2A*-charakteristische Differenzierungsblockade zu verstärken. Außerdem scheint MAT2A eine wichtige Rolle für den Cholesterinstoffwechsel in *KMT2A*-rearrangierten Zellen zu spielen.



**Abbildung 46: Differentielle Expression nach MAT2A-Inhibition in  $t(4;11)$ -rearrangierten Zellen.**  $t(4;11)$ -rearrangierte Zellen (*MLL-AF4*,  $n=2$ ) wurden nach MAT2A-Inhibition mit 15  $\mu$ M PF-9366 oder DMSO-Behandlung mittels RNA-Sequenzierung analysiert. Die Rohdaten wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Epigenetik des Instituts für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik des Universitätsklinikums Tübingen ausgewertet. **(A)** Die differentielle Genexpression aus der RNA-Sequenzierungs-Analyse ist gezeigt. **(B)** Das Interaktom der Gene aus **(A)** ist dargestellt. Unveröffentlichte Daten.

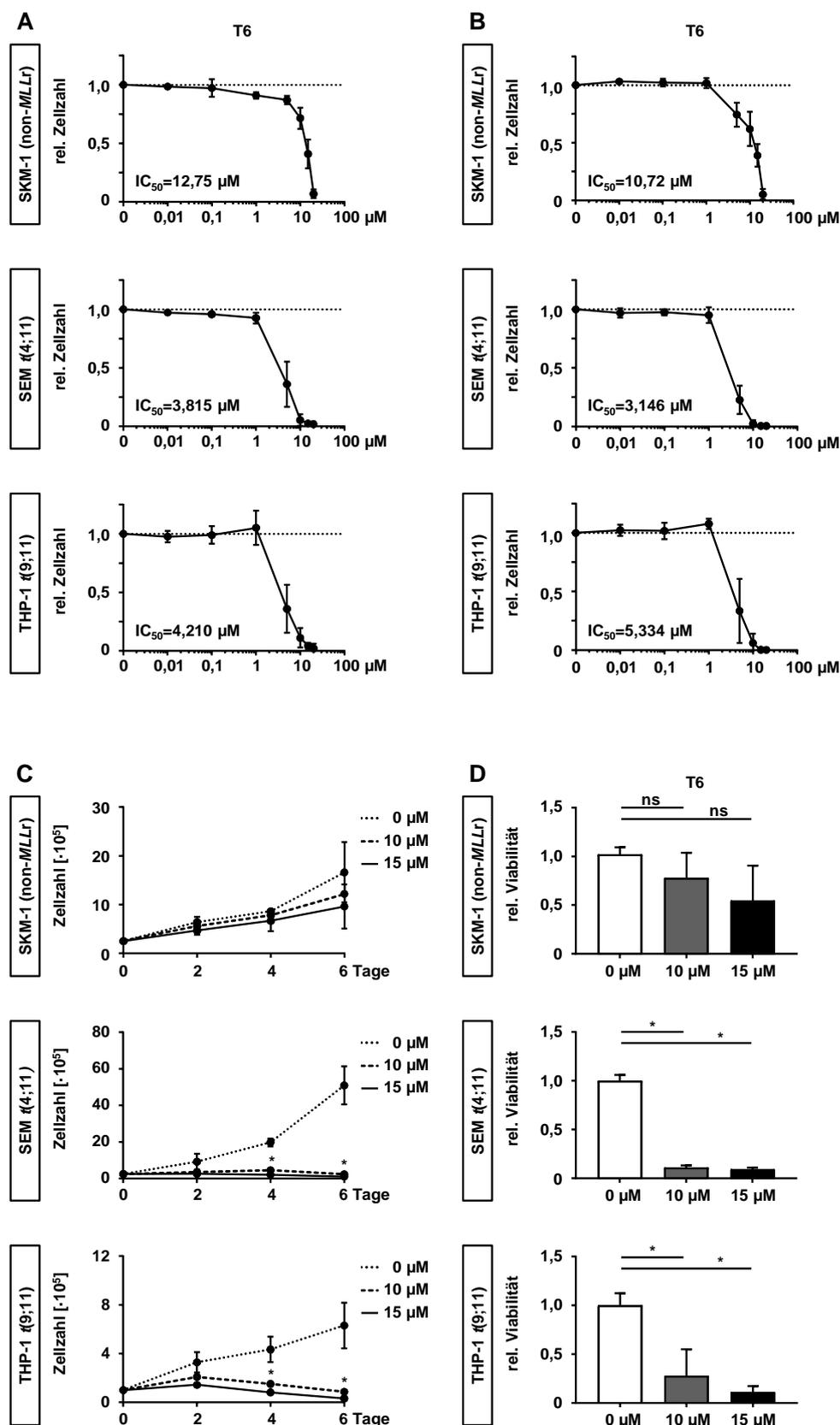
## 4.7 Validierung von MAT2A als mögliche Zielstruktur in *KMT2A*-rearrangierten Zelllinien

### 4.7.1 Unterschiede in Proliferation und Viabilität nach MAT2A-Inhibition in nicht-*KMT2A*- und *KMT2A*-rearrangierten Zelllinien

Die durch das CRISPR/Cas9-System generierten *KMT2A*-rearrangierten Zellen stellen ein verlässliches *in vitro* Modell dar, um die Pathologie beteiligter Signalwege widerzuspiegeln. Es trug maßgeblich dazu bei, MAT2A als innovative Zielstruktur zu identifizieren. Dieser Schritt in Richtung einer möglichst effizienten zielgerichteten Therapie hat das Potential, die schlechte Prognose *KMT2A*-rearrangierter Leukämien zu verbessern.

Erste Versuche an CRISPR/Cas9-generierten *KMT2A*-rearrangierten Zellen als *in vitro* Testsystem für einen entsprechenden MAT2A-Inhibitor lieferten Erkenntnisse hinsichtlich der Vulnerabilität *KMT2A*-rearrangierter Zellen. In „Kapitel 4.6 *KMT2A*-rearrangierte Zellen als *in vitro* Modell zur MAT2A-Inhibition als mögliche zielgerichtete Therapie“ konnte gezeigt werden, dass *KMT2A*-rearrangierte Zellen gegenüber gesunden Kontrollzellen spezifisch in Proliferation und Zellzyklus beeinträchtigt wurden. Die signifikant höhere MAT2A-Expression in *KMT2A*-rearrangierten Zellen deutet darauf hin, dass eine Inhibition in solchen Zellen einen stärker ausgeprägten Effekt haben könnte (**Abbildung 40 B**). Um eine spezifische Abhängigkeit von MAT2A in *KMT2A*-rearrangierten und nicht-*KMT2A*-rearrangierten Zellen nachzuweisen, können vergleichende Analysen mit nicht-*KMT2A*- und *KMT2A*-rearrangierten Leukämiezelllinien angestellt werden.

Zunächst wurde daher die Proliferation *KMT2A*-rearrangierter und nicht-*KMT2A*-rearrangierter Leukämiezelllinien untersucht, indem steigende Konzentrationen des MAT2A-Inhibitors PF-9366 verwendet und die Zellen nach 6 Tagen Behandlung mittels Trypanblau-Färbung und durchflusszytometrisch mittels *counting beads* analysiert wurden. Es konnte eine dosisabhängige reduzierte Zellzahl der *KMT2A*-rearrangierten Zelllinien SEM und THP-1 nach 6 Tagen beobachtet werden (**Abbildung 47 A, B**). Die nicht-*KMT2A*-rearrangierte Zelllinie SKM-1 war in ihrer relativen Zellzahl nach 6 Tagen weniger stark beeinträchtigt. Aus den Daten wurden Kurven nach einem vierparametrischen logarithmischen Modell interpoliert und die IC<sub>50</sub>-Werte bestimmt. Für *KMT2A*-rearrangierte Zelllinien wurden IC<sub>50</sub>-Werte von ungefähr 4 µM bestimmt, während für die nicht-*KMT2A*-rearrangierte Zelllinie SKM-1 IC<sub>50</sub>-Werte von mehr als 10 µM resultierten.



**Abbildung 47: Unterschiede in Proliferation und Viabilität nach MAT2A-Inhibition in nicht-KMT2A- und KMT2A-rearrangierten Zelllinien.** (A)  $t(4;11)$ -rearrangierte (SEM),  $t(9;11)$ -rearrangierte (THP-1) und nicht-KMT2A-rearrangierte Zelllinien (SKM-1) wurden mit steigenden Konzentrationen des MAT2A-Inhibitors (PF-9366) für 6 Tage behandelt. Die relative Zellzahl wurde mittels Trypanblau-Färbung und der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Zusammengefasste Daten aus drei biologischen Replikaten ( $n=3$ ) durchgeführt in technischen Triplikaten sind gezeigt. (B) Die Proliferation wurde weiter durch die Zellzahlbestimmung an Tag 6 mittels *counting beads* und Durchflusszytometrie verifiziert.

Die Zellzahl wurde jeweils auf DMSO-behandelte Zellen normalisiert (gepunktete Linie). Arithmetische Mittel sind gezeigt, Fehlerbalken geben die SD an. Die  $IC_{50}$ -Werte wurden aus einem vierparametrischen logarithmischen Modell interpoliert. **(C)** Für die Proliferationskurven wurde die Zellzahl 10  $\mu$ M-, 15  $\mu$ M- und DMSO-behandelter Zellen alle zwei Tage mittels Trypanblau-Färbung und der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die zusammengefassten Wachstumskurven aus drei biologischen Replikaten ( $n=3$ ) durchgeführt in technischen Triplikaten sind gezeigt. **(D)** Die resultierende Viabilität an Tag 6 wurde mittels des fluoreszenzbasierten *AlamarBlue* Assays verifiziert. Balken zeigen das arithmetische Mittel aus drei biologischen Replikaten ( $n=3$ ) durchgeführt in technischen Triplikaten. Fehlerbalken geben die SD an. Ein ungepaarter t-Test wurde verwendet. \* bedeutet  $p < 0,05$ . Daten wurden innerhalb einer Masterarbeit generiert.<sup>[191]</sup>

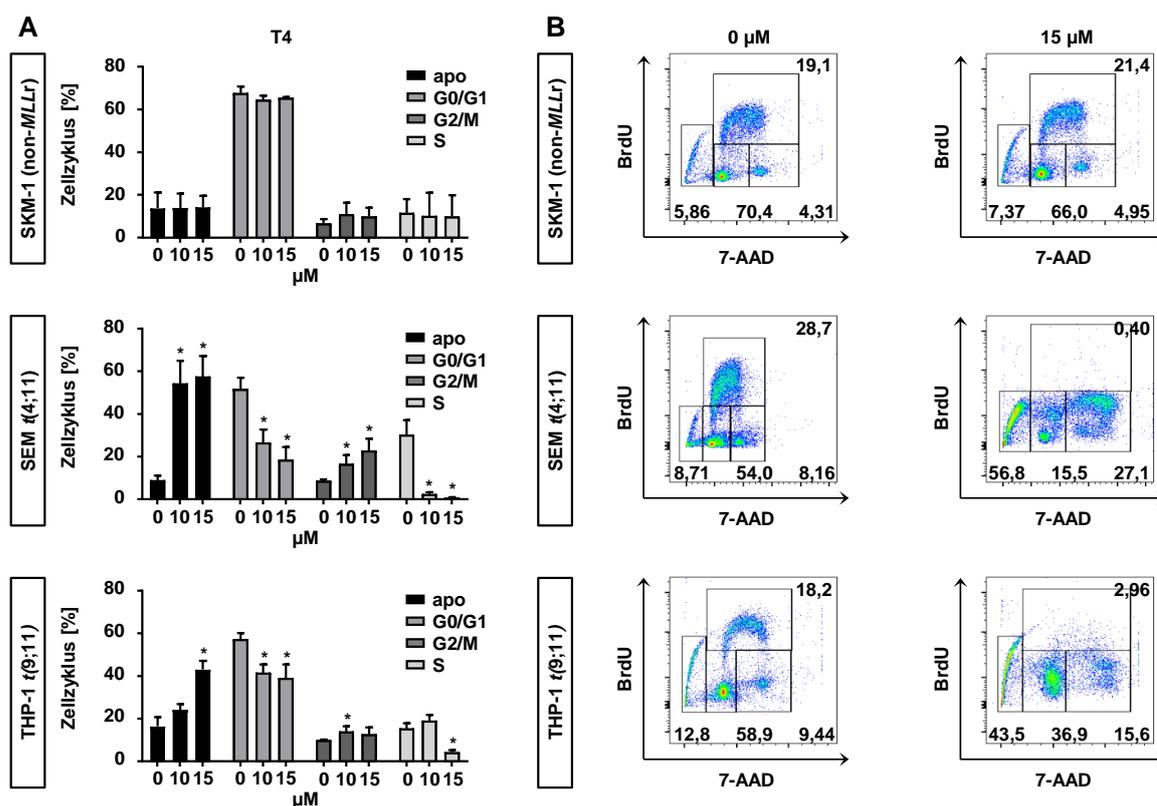
Zusätzlich wurden Proliferationskurven nicht-*KMT2A*- und *KMT2A*-rearrangierter Zelllinien erstellt, indem 10  $\mu$ M oder 15  $\mu$ M des *MAT2A*-Inhibitors PF-9366 oder DMSO als Kontrollbehandlung verwendet und die Zellen über 6 Tage mittels Trypanblau-Färbung gezählt wurden. Bereits die Verwendung von 10  $\mu$ M zeigte eine reduzierte Proliferation *KMT2A*-rearrangierter Zelllinien SEM und THP-1, während sogar eine Dosierung von 15  $\mu$ M kaum Auswirkungen auf SKM-1 Zellen hatte (**Abbildung 47 C**).

Der spezifische wachstumshemmende Effekt *KMT2A*-rearrangierter Zelllinien konnte ebenso durch die Bestimmung der Viabilität an Tag 6 mittels des fluoreszenzbasierten *AlamarBlue* assays nachgewiesen werden (**Abbildung 47 D**). Für die nicht-*KMT2A*-rearrangierte Zelllinie SKM-1 ist ein nicht signifikanter Trend zu erkennen.

Die Ergebnisse zeigen eine spezifische Proliferationsinhibition *KMT2A*-rearrangierter Zelllinien nach 6 Tagen Behandlung, während die nicht-*KMT2A*-rearrangierte Zelllinie SKM-1 weniger stark im Wachstum beeinträchtigt wurde. Die Daten wurden innerhalb einer Masterarbeit generiert.<sup>[191]</sup> Zusammenfassend ist zu sagen, dass der Stellenwert von *MAT2A* hinsichtlich des Überlebens *KMT2A*-rearrangierter Zellen weiter bestätigt werden konnte.

### 4.7.2 Beeinträchtigung des Zellzyklus der *KMT2A*-rearrangierten Zelllinien in der DNA-Synthese-Phase

Zur weiteren Untersuchung der spezifischen Proliferationsinhibition durch den *MAT2A*-Inhibitor in *KMT2A*-rearrangierten Zelllinien im Vergleich zu nicht-*KMT2A*-rearrangierten Zelllinien war eine Zellzyklusanalyse erforderlich. Wie bereits in CRISPR/Cas9-generierten *KMT2A*-rearrangierten Zellen gezeigt werden konnte, führt eine *MAT2A*-Inhibition zu einer Reduktion der Zellen in S-Phase, wobei Kontrollzellen nicht beeinträchtigt werden. Ob sich dieser spezifische Effekt auch im Vergleich zwischen *KMT2A*-rearrangierten und nicht-*KMT2A*-rearrangierten Leukämiezelllinien bestätigt, sollte im Folgenden untersucht werden. Die spezifische Vulnerabilität *KMT2A*-rearrangierter Zellen infolge einer *MAT2A*-Inhibition sollte so weiter herausgearbeitet werden.



**Abbildung 48: Beeinträchtigung des Zellzyklus der *KMT2A*-rearrangierten Zelllinien in der DNA-Synthese-Phase.**  $t(4;11)$ -rearrangierte (SEM),  $t(9;11)$ -rearrangierte (THP-1) und nicht-*KMT2A*-rearrangierte Zelllinien (SKM-1) wurden mit 10  $\mu\text{M}$  und 15  $\mu\text{M}$  des MAT2A-Inhibitors (PF-9366) oder DMSO für 6 Tage behandelt. Gezeigt sind zusammengefasste Daten des Zellzyklus (**A**) und repräsentative durchflusszytometrische Analysen (**B**) aus drei biologischen Replikaten ( $n=3$ ) durchgeführt in technischen Triplikaten. Balken zeigen das arithmetische Mittel, Fehlerbalken geben die SD an. Ein ungepaarter  $t$ -Test wurde verwendet. \* bedeutet  $p<0,05$ . Unveröffentlichte Daten. Daten wurden innerhalb einer Masterarbeit generiert.<sup>[191]</sup>

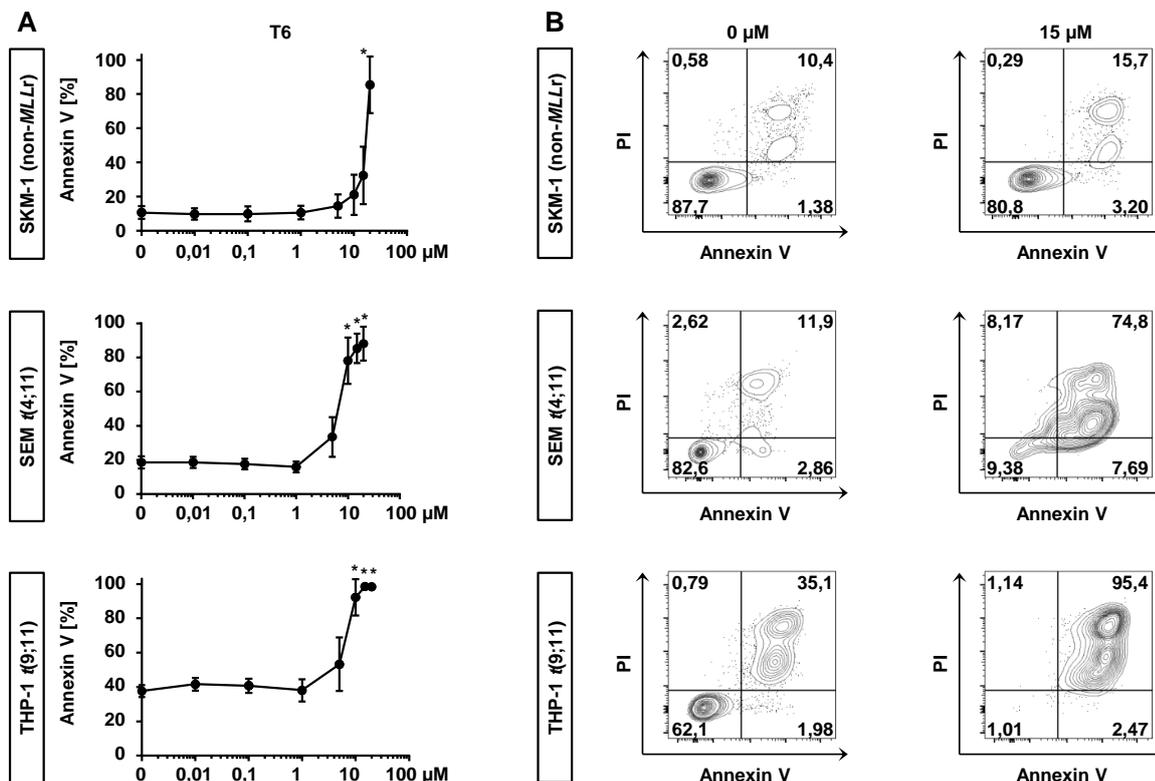
Folglich wurde die Inhibition von MAT2A in SEM, THP-1 und SKM-1 mittels Zellzyklusanalyse und Durchflusszytometrie untersucht. Die Zellen wurden für 6 Tage mit 10  $\mu\text{M}$  oder 15  $\mu\text{M}$  des MAT2A-Inhibitors PF-9366 oder DMSO als Kontrolle behandelt und anschließend analysiert. Mittels BrdU- und 7-AAD-Färbung konnte zwischen den einzelnen Phasen des Zellzyklus, G0-, G1-, G2-, M- und S-Phase, differenziert werden. Zusammengefasste Daten und repräsentative Ergebnisse durchflusszytometrischer Analysen sind in **Abbildung 48** gezeigt. Die mit 15  $\mu\text{M}$  behandelten *KMT2A*-rearrangierten Zelllinien SEM und THP-1 befanden sich signifikant weniger in der S-Phase und die Verteilung verschob sich in Richtung apoptotischer Zellen. Der Zellzyklus der nicht *KMT2A*-rearrangierten Zelllinie SKM-1 blieb unbeeinträchtigt. Die Daten wurden innerhalb einer Masterarbeit generiert.<sup>[191]</sup>

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die spezifische Proliferationsinhibition *KMT2A*-rearrangierter Zelllinien durch die Zellzyklusanalyse weiter bestätigt werden konnte. Im Folgenden sollte eine spezifische Untersuchung der Apoptoseinduktion in *KMT2A*-rearrangierten Zelllinien erfolgen.

### 4.7.3 Induzierte Apoptose durch MAT2A-Inhibition in *KMT2A*-rearrangierten Zelllinien

Während der Zellzyklusanalyse in „Kapitel 4.7.2 Beeinträchtigung des Zellzyklus der *KMT2A*-rearrangierten Zelllinien in der DNA-Synthese-Phase“ wurde eine Verschiebung der Phasenverteilung zugunsten vermehrter apoptotischer *KMT2A*-rearrangierter Zellen detektiert. Dieser Aspekt wurde hier durch die DNA-Quantifizierung mittels linearer Darstellung der 7-AAD-Färbung charakterisiert. Eine spezifische Untersuchung der Apoptoseinduktion ist weiterhin notwendig.

Folglich wurde die Externalisierung von Phosphatidylserin während der Apoptose nach Inhibitorbehandlung mit PF-9366 analysiert. *KMT2A*-rearrangierte und nicht-*KMT2A*-rearrangierte Zelllinien wurden dafür für 6 Tage mit steigenden Konzentrationen des MAT2A-Inhibitors behandelt. Mittels Annexin V- und PI-Färbung konnte anschließend zwischen lebenden, nekrotischen, früh- und spätapoptotischen Zellen unterschieden werden. Die Analyse erfolgte durchflusszytometrisch (**Abbildung 49**).



**Abbildung 49: Induzierte Apoptose durch MAT2A-Inhibition in *KMT2A*-rearrangierten Zelllinien.** t(4;11)-rearrangierte (SEM), t(9;11)-rearrangierte (THP-1) und nicht-*KMT2A*-rearrangierte Zelllinien (SKM-1) wurden mit 10 µM und 15 µM des MAT2A-Inhibitors (PF-9366) oder DMSO für 6 Tage behandelt. Für die Bestimmung der Apoptose wurde die Externalisierung von Phosphatidylserin mittels Annexin V-Färbung durchflusszytometrisch bestimmt. Zusammengefasste Daten aus drei biologischen Replikaten ( $n=3$ ) durchgeführt in technischen Triplikaten (**A**) und repräsentative durchflusszytometrische Analysen (**B**) sind gezeigt. Punkte zeigen das arithmetische Mittel, Fehlerbalken geben die SD an. Ein ungepaarter  $t$ -Test wurde verwendet. \* bedeutet  $p<0,05$ . Unveröffentlichte Daten. Daten wurden innerhalb einer Masterarbeit generiert.<sup>[191]</sup>

Ein dosisabhängiger prozentualer Anstieg Annexin<sup>+</sup> Zellen innerhalb der *KMT2A*-rearrangierten Zelllinien SEM und THP-1 konnte infolge einer MAT2A-Inhibition detektiert werden. SKM-1 Zellen reagierten erst bei hohen Konzentrationen von 20 µM mit einer signifikanten Externalisierung von Phosphatidylserin.

Diese Ergebnisse zeigen, dass der spezifische Effekt des MAT2A-Inhibitors auf *KMT2A*-rearrangierte Zelllinien aus den vorherigen Versuchen auch mittels einer spezifischen Apoptoseuntersuchung nachweisbar war. Die Daten wurden innerhalb einer Masterarbeit generiert.<sup>[191]</sup>

Die zusammengenommenen Ergebnisse der Validierung in *KMT2A*-rearrangierten Zelllinien bestätigen, dass bei MAT2A von einer adressierbaren Zielstruktur spezifisch für *KMT2A*-rearrangierte Zellen ausgegangen werden kann. Die vorhergehende Annahme, dass eine signifikant höhere MAT2A-Expression in *KMT2A*-rearrangierten Zellen im Vergleich zu anderen akuten Leukämien ein höheres Potential für dessen Inhibition bietet, konnte validiert werden.

Aus den Ergebnissen der CRISPR/Cas9-generierten *KMT2A*-rearrangierten Zellen sowie den *KMT2A*-rearrangierten Zelllinien kann insgesamt geschlossen werden, dass MAT2A eine spezifische Zielstruktur in *KMT2A*-rearrangierten Leukämien darstellt. Die Zellen werden infolge einer MAT2A-Inhibition in ihrer Proliferation und ihrer DNA-Synthese gestört und letztendlich wird Apoptose induziert. Kontrollzellen bleiben unbeeinträchtigt und es wird keine ausreichende Wirksamkeit in nicht-*KMT2A*-rearrangierten Leukämiezellen erreicht.

## 4.8 Mögliche Kombinationsstrategien zielgerichteter Therapien für die klinische Anwendung

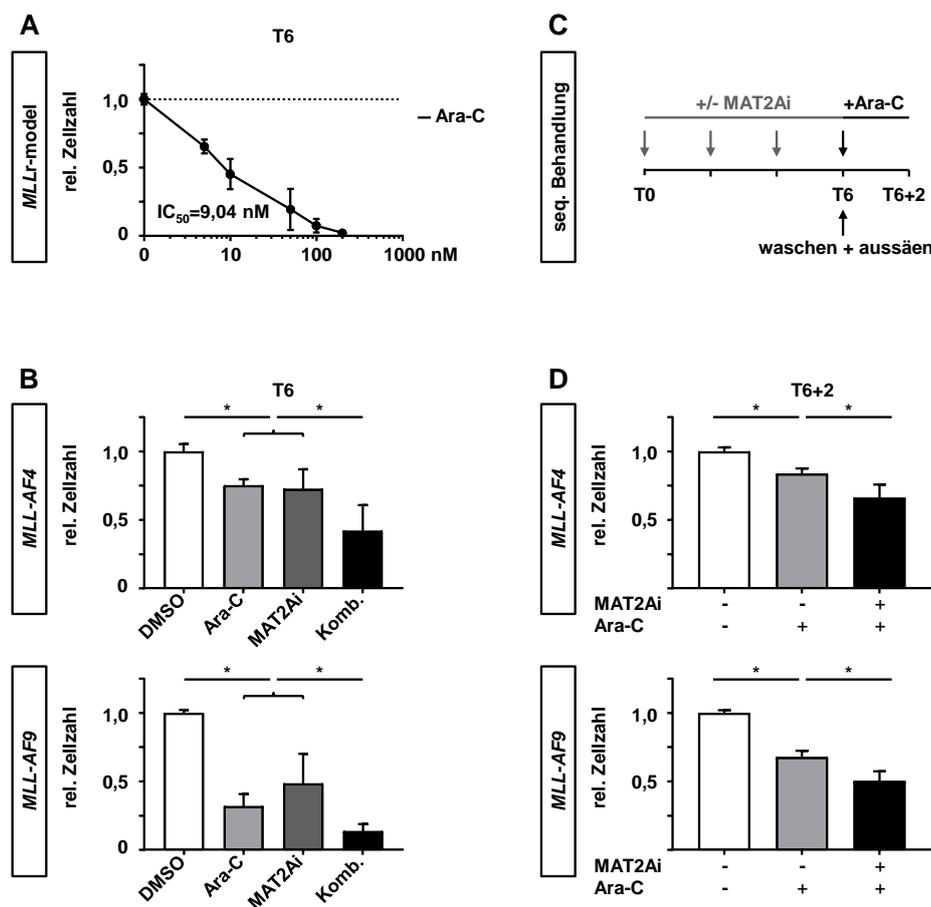
### 4.8.1 MAT2A-Inhibition in Kombination mit Chemotherapie

Für eine klinische Anwendung neuer Therapiemöglichkeiten können innovative Zielstrukturen als Einzeltherapie vorgeschlagen werden. Oft sind Kombinationsstrategien jedoch wünschenswert, um mehrere Angriffspunkte zu vereinen. Vor allem für *KMT2A*-rearrangierte Leukämien ist aufgrund der schlechten Prognose eine möglichst effiziente zielgerichtete Therapie, möglicherweise unter Berücksichtigung von Kombinationsstrategien, anzustreben. Wenn durch eine Behandlung zusätzlich die Möglichkeit eröffnet wird, Zellen für konventionelle Therapieformen, wie beispielsweise Chemotherapie, zu sensitiveren, wird die Therapie für den klinischen Einsatz umso wertvoller.

Wie bereits in „Kapitel 4.4.6 Kombination mit Chemotherapie als Möglichkeit für die klinische Anwendung“ erwähnt, stellt Ara-C ein üblicherweise verwendetes Chemotherapeutikum in akuten Leukämien dar. Eine gleichzeitige und sequenzielle chemotherapeutische Behandlung *KMT2A*-rearrangierter Zellen mit Ara-C und MAT2A bietet daher die Möglichkeit, eine mögliche klinische Anwendung zu simulieren. Als *in vitro* Testsystem können die eigens generierten *KMT2A*-rearrangierten Zellen eine geeignete Plattform bieten.

Zunächst wurde die Dosis an Ara-C ermittelt, welche für die folgenden Versuche als sinnvoll erachtet wurde, um einen gesteigerten Effekt herauszuarbeiten. Hierfür wurden *KMT2A*-rearrangierte Zellen für 6 Tage mit steigenden Konzentrationen von Ara-C behandelt (**Abbildung 50 A**). Aus den Daten wurde eine Kurve nach einem vierparametrischen logarithmischen Modell interpoliert und der  $IC_{50}$ -Wert bestimmt. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse wurde eine Konzentration von 10 nM Ara-C für weitere Versuche gewählt. Wurden schließlich 10  $\mu$ M des MAT2A-Inhibitors PF-9366 in Kombination mit 10 nM Ara-C getestet, ergab die Analyse der relativen Zellzahl mittels *counting beads* und Durchflusszytometrie einen weiteren zusätzlichen Effekt der Kombinationsbehandlung über jeweils der Chemotherapie oder der MAT2A-Inhibition alleine (**Abbildung 50 B**).

Für den sequenziellen Versuch wurden *KMT2A*-rearrangierte Zellen für 6 Tage mit 10  $\mu$ M MAT2A-Inhibitor PF-9366 oder DMSO behandelt. Anschließend wurde die Behandlung ausgewaschen, die Zellen zu originaler Zelldichte wieder ausgesät und für weitere 2 Tage mit 10 nM Ara-C oder PBS als Kontrolle behandelt (**Abbildung 50 C**). Die Ergebnisse der Folgebehandlung sind in **Abbildung 50 D** dargestellt. Bemerkenswerterweise wurde ebenso ein komplementärer Effekt beobachtet. Dies bedeutet, dass nachhaltige epigenetische Änderungen infolge einer Inhibition von MAT2A zu einer Sensibilisierung *KMT2A*-rearrangierter Zellen gegenüber konventioneller Chemotherapie führen.



**Abbildung 50: MAT2A-Inhibition in Kombination mit Chemotherapie.** (A) *t*(4;11)-rearrangierte (*MLL-AF4*) und *t*(9;11)-rearrangierte Zellen (*MLL-AF9*) wurden mit steigenden Konzentrationen von Cytarabin (Ara-C) für 6 Tage behandelt. Die relative Zellzahl wurde durch die Zellzahlbestimmung an Tag 6 mittels *counting beads* und Durchflusszytometrie bestimmt. Zusammengefasste Daten aus drei biologischen Replikaten ( $n=3$ ) durchgeführt in technischen Triplikaten sind gezeigt. Die Zellzahl wurde auf PBS-behandelte Zellen normalisiert (gepunktete Linie). Arithmetische Mittel sind gezeigt, Fehlerbalken geben die SD an. Der IC<sub>50</sub>-Wert wurde aus einem vierparametrischen logarithmischen Modell interpoliert. (B) 10 nM Cytarabin (Ara-C), 10  $\mu$ M des MAT2A-Inhibitors (PF-9366, MAT2Ai), deren Kombination (Komb.) oder DMSO wurden für 6 Tage in *KMT2A*-rearrangierten Zellen verwendet. Die relative Zellzahl wurde durch die Zellzahlbestimmung an Tag 6 mittels *counting beads* und Durchflusszytometrie bestimmt. Zusammengefasste Daten aus drei biologischen Replikaten ( $n=3$ ) durchgeführt in technischen Triplikaten sind gezeigt. (C) Für sequenzielle Analysen wurden *KMT2A*-rearrangierte Zellen für 6 Tage mit MAT2A-Inhibitor (PF-9366, MAT2Ai) vorbehandelt. Die Behandlung wurde ausgewaschen, die Zellen wurden erneut ausgesät und anschließend für 2 Tage (Tag 6+2) mit Cytarabin (Ara-C) oder PBS behandelt. (D) Zusammengefasste Daten aus drei biologischen Replikaten ( $n=3$ ) durchgeführt in technischen Triplikaten sind gezeigt. Proliferationsanalysen wurden mittels *counting beads* durchflusszytometrisch durchgeführt. Balken zeigen das arithmetische Mittel, Fehlerbalken geben die SD an. Ein ungepaarter *t*-Test wurde verwendet. \* bedeutet  $p < 0,05$ . Unveröffentlichte Daten.

Zusammengefasst lässt sich also sagen, dass eine MAT2A-Inhibition mit Chemotherapie kombinierbar ist und eine sequenzielle Verwendung des MAT2A-Inhibitors ein Ansprechen der Zellen auf die konventionelle Therapie durch Ara-C sogar favorisiert. Dies bedeutet eine hohe Flexibilität der zeitlichen Dosierung in der klinischen Anwendung innovativer Therapien mit konventioneller Chemotherapie.

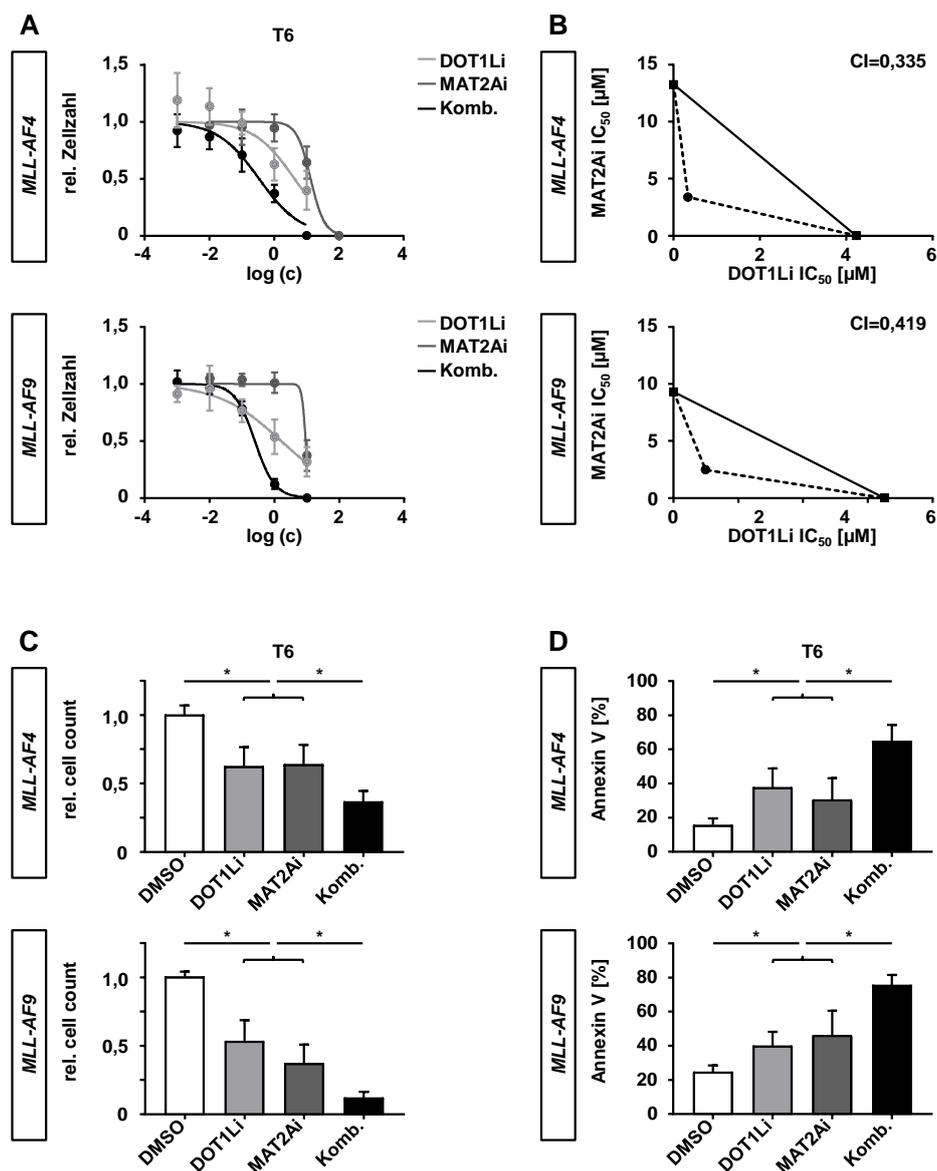
#### 4.8.2 MAT2A-Inhibition zur Steigerung der zielgerichteten Therapie mittels DOT1L-Inhibitoren

Um weitere mögliche klinische Therapiestrategien vorzuschlagen und um diese hinsichtlich ihrer möglichen Effektivität zu bewerten, können weiterhin CRISPR/Cas9-generierte *KMT2A*-rearrangierte Zellen verwendet werden. Die bisherigen Erkenntnisse aus vorherigen Kapiteln von DOT1L, PRMT5 und MAT2A als therapeutische Angriffspunkte liefern hierfür die Grundlage. Nun sollten die einzelnen Inhibitoren so kombiniert werden, dass die veränderte Epigenetik und zelluläre Methylierungsprozesse *KMT2A*-rearrangierter Zellen von zwei Seiten adressiert werden konnte (**Abbildung 6**). Da das MAT2A-Protein durch die Katalyse der SAM-Produktion eine zentrale Rolle einnimmt, sollte es in den Mittelpunkt der Kombinationsstrategien gestellt werden. Letzendlich sollte so eine möglichst effiziente klinische Anwendung zielgerichteter Therapien vorgeschlagen werden.

Die erste Option hierfür ist eine Kombinationsbehandlung des MAT2A-Inhibitors mit der Inhibition des in *KMT2A*-rearrangierten Zellen rekrutierten DOT1L.<sup>[28][49]</sup> Obwohl die Effizienz der DOT1L-Inhibition in klinischen Studien hinter den Erwartungen zurückblieb, sollten jahrelang akquirierte Erkenntnisse nicht ohne weiteres verworfen werden.

Zunächst war interessant zu sehen, wie sich die kombinierte Therapiestrategie auf die Proliferation auswirkte und ob hier eine überlegene Wirksamkeit festgestellt werden konnte. Für die Bewertung der therapeutischen Effektivität wurden daher die jeweiligen DOT1L- und MAT2A-Inhibitoren in CRISPR/Cas9-generierten *KMT2A*-rearrangierten Zellen getestet. Um deren Auswirkungen genau berechnen zu können, wurden Dosis-Wirkungs-Kurven steigender Konzentrationen der Einzel- und der Kombinationsbehandlung nach 6 Tagen mit konstantem, äquipotenten Verhältnis erstellt (**Abbildung 51 A**). Hierfür wurde die relative Zellzahl mittels *counting beads* und Durchflusszytometrie bestimmt. Aus den Daten wurden Kurven nach einem vierparametrischen logarithmischen Modell interpoliert und die  $IC_{50}$ -Werte bestimmt.

Diese sind zur Bestimmung der Synergie in Isobogrammen zu 50 % Effektniveau in **Abbildung 51 B** dargestellt. Da die Datenpunkte der Kombinationstherapie unterhalb der Verbindungslinie der Einzelbehandlungen liegen, kann von Synergie gesprochen werden. Außerdem wurden anhand der  $IC_{50}$ -Werte entsprechende CIs berechnet. Ein CI kleiner als 1 indiziert Synergie (**Abbildung 51 B**,  $CI < 1$ ). So kann gesagt werden, dass eine kombinatorische Behandlung mit DOT1L- und MAT2A-Inhibitoren einen synergistischen Effekt auf *KMT2A*-rearrangierte Zellen hat.



**Abbildung 51: MAT2A-Inhibition zur Steigerung der zielgerichteten Therapie mittels DOT1L-Inhibitoren.** (A) *t*(4;11)-rearrangierte (*MLL-AF4*) und *t*(9;11)-rearrangierte Zellen (*MLL-AF9*) wurden mit steigenden Konzentrationen von DOT1L-Inhibitor (EPZ004777, DOT1Li), MAT2A-Inhibitor (PF-9366, MAT2Ai) oder deren konstanten Kombination (Komb., 1+10) für 6 Tage behandelt. Die relative Zellzahl wurde durch die Zellzahlbestimmung an Tag 6 mittels *counting beads* und Durchflusszytometrie bestimmt. Zusammengefasste Daten aus drei biologischen Replikaten ( $n=3$ ) durchgeführt in technischen Triplikaten sind gezeigt. Die Zellzahl wurde auf PBS-behandelte Zellen normalisiert. Arithmetische Mittel sind gezeigt, Fehlerbalken geben die SD an. Die IC<sub>50</sub>-Werte wurden aus einem vierparametrischen logarithmischen Modell interpoliert und sind in (B) dargestellt. Die Isobologramme für die 50 %-Effektniveaus sowie die Kombinationsindizes (*combination indices*, CI) sind zur Bestimmung der Synergie dargestellt (CI<1). (C) Zusammengefasste Daten aus drei biologischen Replikaten ( $n=3$ ) durchgeführt in technischen Triplikaten zur Verdeutlichung der Signifikanz für die Einzelbehandlungen von 1 μM DOT1Li und 10 μM MAT2Ai oder deren Kombination (Komb.) nach 6 Tagen Behandlung sind gezeigt. (D) Für die Bestimmung der Apoptose wurde die Externalisierung von Phosphatidylserin mittels Annexin V-Färbung durchflusszytometrisch bestimmt. Zusammengefasste Daten aus drei biologischen Replikaten ( $n=3$ ) durchgeführt in technischen Triplikaten sind gezeigt. Balken zeigen das arithmetische Mittel, Fehlerbalken geben die SD an. Ein ungepaarter *t*-Test wurde verwendet. \* bedeutet  $p<0,05$ . Unveröffentlichte Daten.

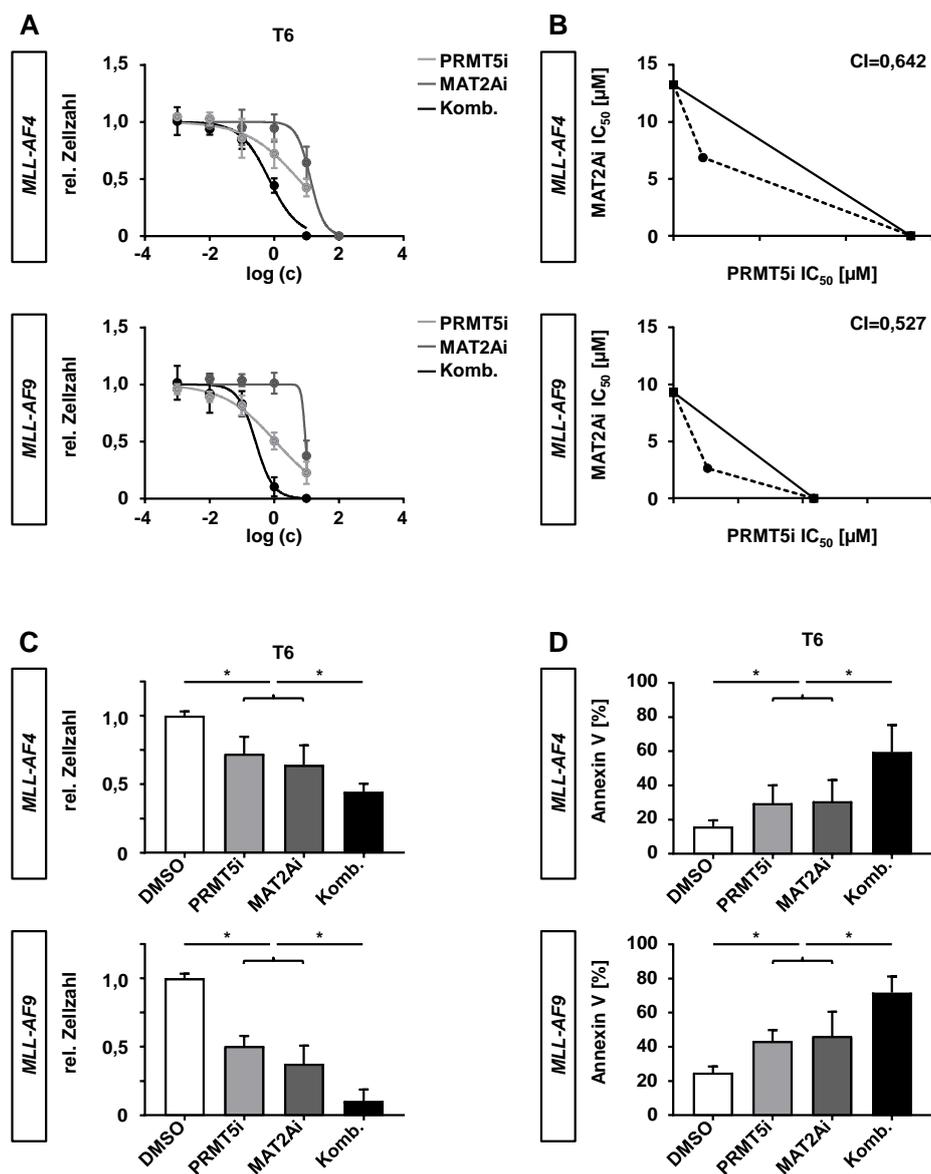
Weiterhin sollte eine kombinatorische Behandlung mit den Einzelbehandlungen hinsichtlich der Apoptoseinduktion untersucht werden. Als nächster Schritt wurden folglich *KMT2A*-rearrangierte Zellen für 6 Tage mit 1  $\mu\text{M}$  DOT1L-Inhibitor EPZ004777 und 10  $\mu\text{M}$  MAT2A-Inhibitor PF-9366 einzeln und in Kombination oder mit DMSO behandelt. Die relative Zellzahl nach 6 Tagen wurde mittels *counting beads* und Durchflusszytometrie analysiert (**Abbildung 51 C**). Die Einzelbehandlungen zeigten bereits eine reduzierte Zellzahl zur DMSO-Kontrolle, während die Kombinationsbehandlung noch größere Auswirkungen hatte.

Die Externalisierung von Phosphatidylserin während der Apoptose wurde ebenso nach 6 Tagen durchflusszytometrisch analysiert. Mittels Annexin V- und PI-Färbung konnte zwischen lebenden, nekrotischen, früh- und spätapoptotischen Zellen unterschieden werden. Ein insgesamt höherer prozentualer Anteil Annexin V<sup>+</sup> *KMT2A*-rearrangierter Zellen infolge einer Kombinationsbehandlung im Vergleich zu den Einzelbehandlungen konnte detektiert werden (**Abbildung 51 D**).

CRISPR/Cas9-generierte *KMT2A*-rearrangierte Zellen können folglich eine erste Rationale für eine zielgerichtete Kombinationstherapie von gleichzeitiger DOT1L- und MAT2A-Inhibition liefern. Für die klinische Anwendung kann trotz der bekannten Limitationen eine mögliche Kombinationstherapie in Aussicht gestellt werden, indem sowohl MAT2A als auch DOT1L als Zielstrukturen adressiert werden, um die Effektivität einer alleinigen DOT1L-Inhibition zu verbessern.

### 4.8.3 Kombinationsstrategie innovativer zielgerichteter Therapien mit PRMT5- und MAT2A-Inhibitoren

Als zweite Möglichkeit, die veränderte Epigenetik *KMT2A*-rearrangierter Zellen von zwei Seiten zu adressieren, sollte die Kombination von MAT2A- und PRMT5-Inhibition getestet werden. Zunächst war auch hier der Einfluss der Einzelsubstanzen im Vergleich zur Kombinationsbehandlung auf *KMT2A*-rearrangierte Zellen zu untersuchen. Eine überlegene Wirksamkeit der Kombination von MAT2A- und PRMT5-Inhibitoren sollte zunächst anhand der Proliferation untersucht werden. Für die Bewertung der therapeutischen Effektivität wurden wiederum Dosis-Wirkungs-Kurven steigender Konzentrationen der Einzel- und der Kombinationsbehandlung nach 6 Tagen mit konstantem, äquipotenten Verhältnis erstellt (**Abbildung 52 A**). Die relative Zellzahl wurde mittels *counting beads* und Durchflusszytometrie bestimmt. Anschließend wurden Kurven nach einem vierparametrischen logarithmischen Modell interpoliert und die IC<sub>50</sub>-Werte bestimmt.



**Abbildung 52: Kombinationsstrategie innovativer zielgerichteter Therapien mit PRMT5- und MAT2A-Inhibitoren.** (A)  $t(4;11)$ -rearrangierte (*MLL-AF4*) und  $t(9;11)$ -rearrangierte Zellen (*MLL-AF9*) wurden mit steigenden Konzentrationen von PRMT5-Inhibitor (EPZ015666, DOT1Li), MAT2A-Inhibitor (PF-9366, MAT2Ai) oder deren konstanten Kombination (Komb., 1+10) für 6 Tage behandelt. Die relative Zellzahl wurde durch die Zellzahlbestimmung an Tag 6 mittels *counting beads* und Durchflusszytometrie bestimmt. Zusammengefasste Daten aus drei biologischen Replikaten ( $n=3$ ) durchgeführt in technischen Triplikaten sind gezeigt. Die Zellzahl wurde auf PBS-behandelte Zellen normalisiert. Arithmetische Mittel sind gezeigt, Fehlerbalken geben die SD an. Die IC<sub>50</sub>-Werte wurden aus einem vierparametrischen logarithmischen Modell interpoliert und sind in (B) dargestellt. Die Isobogramme für die 50 %-Effektniveaus sowie die Kombinationsindices (*combination indices*, CI) sind zur Bestimmung der Synergie dargestellt (CI<1). (C) Zusammengefasste Daten aus drei biologischen Replikaten ( $n=3$ ) durchgeführt in technischen Triplikaten zur Verdeutlichung der Signifikanz für die Einzelbehandlungen von 1 μM DOT1Li und 10 μM MAT2Ai oder deren Kombination (Komb.) nach 6 Tagen Behandlung sind gezeigt. (D) Für die Bestimmung der Apoptose wurde die Externalisierung von Phosphatidylserin mittels Annexin V-Färbung durchflusszytometrisch bestimmt. Zusammengefasste Daten aus drei biologischen Replikaten ( $n=3$ ) durchgeführt in technischen Triplikaten sind gezeigt. Balken zeigen das arithmetische Mittel, Fehlerbalken geben die SD an. Ein ungepaarter *t*-Test wurde verwendet. \* bedeutet  $p<0,05$ . Unveröffentlichte Daten.

Diese sind zur Bestimmung der Synergie in Isobologrammen zu 50 % Effektniveau in **Abbildung 52 B** dargestellt. Da die Datenpunkte der Kombinationstherapie unterhalb der Verbindungslinie der Einzelbehandlungen liegen, kann von Synergie gesprochen werden. Außerdem wurden anhand der  $IC_{50}$ -Werte entsprechende CIs berechnet. Ein CI kleiner als 1 indiziert Synergie (**Abbildung 52 B**,  $CI < 1$ ). So kann gesagt werden, dass eine kombinatorische Behandlung mit PRMT5- und MAT2A-Inhibitoren einen synergistischen Effekt auf *KMT2A*-rearrangierte Zellen hat.

Auch hier wurde die Kombinationsbehandlung im Vergleich zu den jeweiligen Einzelsubstanzen hinsichtlich der Apoptoseinduktion untersucht. Für diese Intension wurden *KMT2A*-rearrangierte Zellen für 6 Tage mit 1  $\mu$ M PRMT5-Inhibitor EPZ015666 und 10  $\mu$ M MAT2A-Inhibitor PF-9366 einzeln und in Kombination oder mit DMSO behandelt. Die relative Zellzahl nach 6 Tagen wurde mittels *counting beads* und Durchflusszytometrie analysiert (**Abbildung 52 C**). Die Einzelbehandlungen zeigten bereits eine reduzierte Zellzahl, während die Kombinationsbehandlung noch größere Auswirkungen hatte.

Die Externalisierung von Phosphatidylserin während der Apoptose wurde ebenfalls nach 6 Tagen durchflusszytometrisch analysiert. Mittels Annexin V- und PI-Färbung konnte zwischen lebenden, nekrotischen, früh- und spätapoptotischen Zellen unterschieden werden. Ein insgesamt höherer prozentualer Anteil Annexin V<sup>+</sup> *KMT2A*-rearrangierter Zellen infolge einer Kombinationsbehandlung im Vergleich zu den Einzelbehandlungen konnte detektiert werden (**Abbildung 52 D**).

CRISPR/Cas9-generierte *KMT2A*-rearrangierte Zellen können hier also eine erste Rationale für eine innovative Kombinationstherapie durch gleichzeitige Inhibition von PRMT5 und MAT2A liefern.

Für die klinische Anwendung können folglich zwei neuartige Therapiestrategien vorgeschlagen werden, um einen überlegenen Effekt in der Behandlung *KMT2A*-rearrangierter Leukämien im Vergleich zu bisherigen Ansätzen zu erreichen. Eine Diagnose mit schlechter Prognose erfordert vielfältige Strategien, sodass die diversen Kombinationsmöglichkeiten aus DOT1L-, PRMT5- und MAT2A-Inhibition variable Ansätze bieten, *KMT2A*-rearrangierte Leukämien zu behandeln oder für Chemotherapie angreifbar zu machen.

## 5 Diskussion

### 5.1 Etablierung des humanen *KMT2A*-CRISPR/Cas9-Systems

Als häufige chromosomale Translokation kommt das *KMT2A*-Onkogen in 10 % aller Leukämien<sup>[138]</sup> und in 80 % aller Leukämien im Kleinkindesalter<sup>[38]</sup> vor und ist mit einer schlechten Prognose assoziiert.<sup>[2][22][138]</sup> Selbst die Anwendung aggressiver Therapieregimes aus Chemotherapie und allo-SZT führt noch immer nicht zu einer zufriedenstellenden Entwicklung des Krankheitsverlaufes.<sup>[1][2][22]-[24]</sup> Zur Entwicklung dringend erforderlicher innovativer therapeutischer Strategien sind Patientenzellen nur bedingt geeignet, da sie zum einen in *in vitro* Kulturen rasch ausdifferenzieren und die Apoptose induziert wird und zum anderen zusätzliche Mutationen enthalten, welche direkte Rückschlüsse der Erkenntnisse auf die *KMT2A*-Translokation einschränken.<sup>[87]-[90][91][103]</sup>

Folglich sind bereits unterschiedliche Modellsysteme entwickelt worden, um die Rolle der MLL-Fusionsproteine in der leukämischen Pathogenese zu charakterisieren.<sup>[93]-[98]</sup> Allerdings sind die bisherigen Mausmodelle von eingeschränkter Aussagekraft, da signifikante Unterschiede zwischen den genetischen Profilen von Maus und Mensch bestehen.<sup>[99]</sup> Auch die Verwendung von menschlichen Zellen mit viral transduzierten *KMT2A*-Onkogenen spiegelt die eigentliche Krankheitsbiologie aufgrund supraphysiologischer Expression nicht verlässlich wider.<sup>[95][100]-[102]</sup> Im humanen *KMT2A*-Translokationsmodell von Schneidawind (früher Büchele) et al. wird die Translokation durch TALENs induziert und die Onkogenexpression verläuft so unter endogenen Promotoren.<sup>[105]-[107]</sup> Durch die Verwendung von TALENs zur Induktion von DSB im *KMT2A*- und *AFF1*- oder *MLLT3*-Gen können so zunächst reziproke Translokationen sowohl von t(9;11) als auch von t(4;11) induziert werden.<sup>[106]</sup> Durch diese Methode werden jedoch nur begrenzt stabile *in vitro* Kulturen, vor allem die t(4;11) Translokation betreffend, erzeugt.<sup>[106]</sup>

In dieser Arbeit sollten die Limitationen dieses humanen *KMT2A*-TALEN-Translokationsmodells hinsichtlich der Effizienz mithilfe des CRISPR/Cas9-Systems überwunden werden. Diese innovative Form der Genomeditierung ist mit einer hohen Effizienz in HSPCs als Zielzellen einsetzbar.<sup>[137]</sup> Das erklärte Ziel, die Translokationen des *KMT2A*-TALEN-Translokationsmodells nachzustellen und hinsichtlich der Effizienz zu verbessern, konnte zufriedenstellend erreicht werden. Im Vergleich zur bisherigen TALEN-Methode konnten Translokationen bereits sehr früh detektiert werden. Einmal induziert, persistierten diese und die *in vitro* Kulturen reicherten sich schnell und beständig zu 100 % translokationspositiven Zellen an. Mit der TALEN-Methode gelingt dies bisher nur in Einzelfällen. Interessanterweise stellte sich das CRISPR/Cas9-System zudem als sehr präzise heraus. Im Gegensatz zur TALEN-Methode wurden hier keine unterschiedlichen Sequenzen der Translokationen gefunden.<sup>[106][107]</sup> Hierin begründet sich vermutlich auch die kurze Latenzzeit, da sich nicht nur eine Zelle als prominentester Klon durchgesetzt hat, sondern in mehreren Zellen eine

Translokation mit derselben Sequenz induziert wurde. Da für das CRISPR/Cas9-System eine definierte Schnittstelle abhängig vom PAM berichtet wird, kann diese Tatsache erklärt werden.<sup>[116]</sup> Die Möglichkeit, diese Präzision erfolgreich zur Generierung polyklonaler, jedoch homogener, reiner *in vitro* Kulturen nutzen zu können, stellt einen großen Vorteil gegenüber bisheriger Genomeditierungen dar. Das stabile t(9;11)-TALEN-Translokationsmodell konnte somit hinsichtlich der Präzision und der Effizienz technisch verbessert werden.<sup>[107]</sup> Das t(4;11)-TALEN-Translokationsmodell konnte durch die Verwendung des CRISPR/Cas9-Systems erstmals mit unbegrenzter Proliferation in *in vitro* Kultur umgesetzt werden.<sup>[106]</sup> Bisher sind t(4;11)-Translokationsmodelle aufgrund der Größe des Fusionsproteins auch mit viralen Methoden nur schwer zu verwirklichen, obwohl diese die häufigste Translokation in akuten Leukämien darstellt.<sup>[38][95][192][193]</sup>

Ein technisch persistierendes, verfügbares *KMT2A*-CRISPR/Cas9-Translokationsmodell eröffnet nun eine neue Bewertung kritischer Debatten. Es wird allgemeinhin diskutiert, ob eine reziproke Translokation für eine Leukämieinduktion nötig ist. In Patienten werden nicht immer beide Translokationspartner als gegenseitige Fusionsproteine gefunden.<sup>[84]</sup> Dabei kann die 5'-t(4;11)-Translokation in allen Patienten, die 3'-t(4;11)-Translokation nur in einem geringeren Prozentsatz identifiziert werden.<sup>[84]</sup> Da im hier generierten *KMT2A*-CRISPR/Cas9-Translokationsmodell immer eine reziproke Translokation induziert wurde, kann das Modell in Zukunft dazu beitragen, die Rolle der 3'-t(4;11)-Translokation aufzuklären. Ein spezifischer *knock-down* der 3'-t(4;11)-Translokation könnte hierfür Informationen liefern. Sollte die 3'-t(4;11)-Translokation einen aktiven Beitrag zum onkologischen Potential der Zellen liefern, muss die Frage nach der Leukämieinduktion in 3'-t(4;11)-translokationsnegativen Patienten gestellt werden. Eventuell sind hier andere zusätzliche Mutationen für das Auftreten der Leukämie mitverantwortlich.

Das Auftreten zusätzlicher Mutationen wird generell für *KMT2A*-translokationspositive Leukämien diskutiert. In Expertenkreisen kommt die Frage auf, ob eine *KMT2A*-Translokation alleine zur Leukämieinduktion ausreicht.<sup>[195]</sup> Für die t(9;11)-Translokation ist bereits bekannt, dass die *driver*-Mutation stark genug ist, um akute Leukämien in Mäusen zu induzieren.<sup>[107][194]</sup> Hinsichtlich der t(4;11)-Translokation führt selbst eine Verwendung von *KMT2A*-Translokationsprodukten unter supraphysiologischer Expression normalerweise zu keiner Leukämieinduktion.<sup>[196][197]</sup> Bisher ist dies lediglich in einem artifiziellen Modell aus humanen Stammzellen mit einem lentiviralen Fusionskonstrukt aus dem humanen *KMT2A*-Gen und dem murinen *AFF1*-Gen in NSG-Mäusen gelungen.<sup>[198]</sup> Es wird vermutet, dass zusätzliche Mutationen nötig sind, um eine Leukämieinduktion zu erreichen.<sup>[168][197]</sup> Das t(4;11)-CRISPR/Cas9-Translokationsmodell kann zukünftig dazu beitragen, diesen Sachverhalt zu untersuchen. Eine Transplantation der einzelmutierten Zellen in Mäuse könnte folglich Aufschluss über den endogenen Einfluss der t(4;11)-Translokation geben. Eine Erweiterung des vorhandenen Modells zur Einführung zusätzlicher Mutationen durch das CRISPR/Cas9-

System in bereits rearrangierte Zellen oder zusätzlich direkt zu Beginn der Genomeditierung könnte anschließend weitere wertvolle Informationen liefern. Vorarbeiten hierzu sind bereits vorhanden, sind in **Anhang 13** bis **Anhang 18** gezeigt und werden in „Kapitel 6 Zusammenfassung und Ausblick“ erläutert. Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag jedoch zunächst in der Generierung der *KMT2A*-Translokation, um direkte nachfolgende Effekte charakterisieren sowie allgemeingültige Therapieoptionen entwerfen und testen zu können.

## 5.2 Charakterisierung *KMT2A*-rearrangierter Zellen

*KMT2A*-translokationspositive Leukämien sind nicht nur bedingt durch ihre vergleichbar einfache genetische Zusammensetzung interessant für viele Forschende, die sich vor allem mit der Leukämieentstehung hinsichtlich der nötigen Mutationen beschäftigen.<sup>[197][199]</sup> Aufgrund ihrer schlechten Prognose und begrenzten Therapiemöglichkeiten gelten sie als besonders interessant, um geeignete zielgerichtete Therapien zu identifizieren und in der klinischen Anwendung zu etablieren.<sup>[2][22][24]</sup> Der Zugang zu verlässlichen Modellen verbessert die Möglichkeiten der Erforschung von akuten Leukämien wesentlich. Essenzielle Signalwege können dann nicht nur durch Momentaufnahmen, wie beispielsweise der Expressionsanalyse von Patientenzellen, identifiziert werden. Patientenzellen sind für eine längere Kultur ungeeignet, da sie zum einen apoptotisch werden und zum anderen zusätzliche Mutationen enthalten, die direkte Rückschlüsse auf die *KMT2A*-Translokation stark einschränken.<sup>[87]-[91][103]</sup> Die Bedeutung einzelner Signalwege und möglicher Zielstrukturen wird erst durch eine Inhibition unter der Verwendung von *in vitro* oder *in vivo* Modellen möglich. Führt eine Inhibition durch blockierende Antikörper oder *small molecules* zu einer zellulären Veränderung, so kann dem Signalweg oder der Zielstruktur eine wesentliche Rolle in der Pathophysiologie zugesprochen werden. Die Generierung von Modellen, die eine solche Möglichkeit bieten, ist daher von großem Wert. Allerdings muss ein solches Modell zunächst charakterisiert, mit Patientenzellen verglichen und auf seine Tauglichkeit hin untersucht werden.

Das humane *KMT2A*-CRISPR/Cas9-Translokationsmodell wurde nach Vorbild von Patientensequenzen erstellt, um nach Möglichkeit die wesentlichen Aspekte der Erkrankung verlässlich zu imitieren. Ohne lentiviralen Einfluss konnten so Translokationen unter endogenen Promotoren in Zellen eingeführt werden, die, im Gegensatz zu Patientenzellen, *in vitro* in Kultur gehalten werden konnten. Eine Charakterisierung der Zellen gab Aufschluss über deren Proliferationsverhalten, Morphologie, Phänotyp sowie differentielle Genexpression, um eine Vergleichbarkeit zu Patientenzellen zu belegen.

Sowohl in Flüssig- als auch in halbfester Kultur (CFU) zeigten *KMT2A*-rearrangierte Zellen einen deutlichen proliferativen Vorteil gegenüber nicht-rearrangierten Zellen. Dies ermöglichte zunächst ein Auswachsen der Zellen zu einer 100 % reinen polyklonalen Population. Weiterhin stellte diese Fähigkeit die Grundlage für eine unbegrenzt wachsende *in vitro* Kultur

dar, um letztendlich therapeutische Ansätze testen zu können. Interessant war zu sehen, dass auch nach Erreichen der 100 % reinen Kultur stets ein intaktes *KMT2A*-Gen durch die FISH-Analyse identifiziert werden konnte. Das durchweg heterozygote Auftreten der chromosomalen Aberration schien demnach wichtig für das Überleben der Zellen zu sein.<sup>[200]</sup>

Insgesamt ist zu sagen, dass die so generierten *KMT2A*-rearrangierten Zellen einen proliferativen Vorteil gegenüber nicht-editierten Kontrollzellen hatten. Interessanterweise unterschieden sich jedoch *t(4;11)*-rearrangierte von *t(9;11)*-rearrangierten Zellen hinsichtlich der Fähigkeit, Kolonien in halbfestem Medium auszubilden. Diese Untersuchung ließ Rückschlüsse auf die Fähigkeit der Selbsterneuerung der Zellen zu. Konsequenterweise waren daher *t(4;11)*-rearrangierte Zellen als jene mit geringerem onkologischen Potential anzusehen. Es müssen allerdings weitere Aspekte zur Bewertung dieser Auffälligkeit beachtet werden. Die hier verwendeten Kulturbedingungen, auch bereits zu Beginn der Genomeditierung, zielten auf eine Flüssigkultur unter myeloischen Einflüssen ab. Es ist jedoch bekannt, dass *t(4;11)*-Translokationen in Patienten eher zu einer ALL führen.<sup>[38]</sup> Ein unzutreffendes Zytokinmilieu könnte die *t(4;11)*-rearrangierten Zellen derart beeinflusst haben, dass ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung eingeschränkt wurde und sie aufgrund dessen keine Kolonien ausbildeten. Dieser Aspekt einer korrekten *in vitro* Kultur beschäftigt Experten schon lange.<sup>[201]-[205]</sup> Es ist bekannt, dass das Milieu der *in vitro* Kulturen von Stammzellen und Leukämiezellen maßgeblich für deren Überleben und Differenzierung verantwortlich ist.<sup>[204][206]</sup> In diesem Modell zeigten sowohl *t(9;11)*- als auch *t(4;11)*-rearrangierte Zellen einen myelomonozytären Phänotyp, der bedingt durch die Verwendung der angegebenen Zytokine ausgeprägt wurde. Eine entsprechende lymphatische Kultur muss daher noch entwickelt werden, um auch adäquate Kulturbedingungen für die *t(4;11)*-rearrangierten Zellen zu schaffen. In Folge einer optimierten *in vitro* Kultur können zukünftig noch präzisere Aussagen getroffen werden. Lymphatische Kulturen werden hauptsächlich durch Supplementierung des Mediums mit FLT3-L, SCF, IL-3 und IL-7 erreicht.<sup>[204]</sup> Ein zusätzlicher Zellkontakt zu *feeder*-Zellen ist außerdem in Betracht zu ziehen.<sup>[202]</sup> Hierfür kommen murine aber vor allem humane Stromazellen in Frage (HS-5 oder AFT024).<sup>[207][208]</sup>

Unabhängig vom Phänotyp konnte anhand der RNA-Sequenzierung hinreichend bewiesen werden, dass die *KMT2A*-Translokation die Zellpathophysiologie maßgeblich und patientenähnlich beeinflusste. Bereits etablierte, *KMT2A*-translokationsspezifische Signaturgene, wie *HOXA9* und *MEIS1*<sup>[163]-[165]</sup>, sowie spezifische Oberflächenmarker, wie CD32 und CD9<sup>[107][160]</sup>, konnten neben der Patientensignatur nachgewiesen werden und verifizierten die Verlässlichkeit des Modells. Außerdem wurde die LSC Signatur in *KMT2A*-rearrangierten Zellen detektiert.<sup>[166]</sup> Exemplarisch wurden hier Sequenzierungsdaten der differentiellen Expression des *t(4;11)*-Translokationsmodells verwendet. Für diese Translokation besteht bisher kein *in vitro* Modell, sodass die hier gezeigten Daten einen großen Stellenwert einnehmen. Die Erkennt-

nisse daraus konnten durch weitere Validierungsexperimente mittels RT-qPCR auch auf das  $t(9;11)$ -Translokationsmodell übertragen werden.

Auf Unterschiede zwischen der  $t(4;11)$ - und der  $t(9;11)$ -Translokation hinsichtlich deren Charakteristika wurde in dieser Arbeit nicht im Speziellen eingegangen. Da jedoch berichtet ist, dass die  $t(4;11)$ -Translokation eher in frühkindlichen Leukämien als ALL auftritt und die  $t(9;11)$ -Translokation hingegen eher in adulten Patienten zu einer AML führt<sup>[38]</sup>, sind Unterschiede der genetischen Auslöser in den jeweiligen Ursprungszellen durchaus interessant und werden derzeit parallel zu diesem Projekt untersucht. Auch hier sollen beide *KMT2A*-Translokationen in adulten HSPCs aus Knochenmark induziert und die Zellen schließlich hinsichtlich ihres onkologischen Potentials untersucht werden. Die offene Frage, welche genetische Mutation abhängig von der Ursprungszelle zu einem bestimmten Phänotyp führt, kann so zukünftig in abgegrenzten embryonalen und adulten *in vitro* Modellen mit  $t(4;11)$ - und  $t(9;11)$ -Translokationen untersucht werden. Weiter kann in Xenograftmodellen herausgefunden werden, ob die *KMT2A*-Translokation abhängig von der Ursprungszelle als alleinige *driver*-Mutation zum Ausbruch der Krankheit führt oder ob zusätzliche Mutationen nötig sind, sodass die Krankheitsformen noch besser abgegrenzt und charakterisiert werden können. Insgesamt konnten aus der Charakterisierung des vorliegenden *in vitro* Modells genügend Belege gesammelt werden, die dessen Vergleichbarkeit zu Patientenzellen nachwiesen, sodass die Krankheit als verlässlich imitiert angesehen werden konnte. Eine Identifizierung und Validierung innovativer Zielstrukturen für neue therapeutische Ansätze wurde so in der unbegrenzt wachsenden *in vitro* Kultur möglich.

### 5.3 *KMT2A*-rearrangierte Zellen zur Validierung von *PRMT5* als Zielstruktur

Die CRISPR/Cas9-generierten *KMT2A*-rearrangierten Zellen beinhalteten die Translokation, deren Fusionsproteine unter den jeweiligen endogenen Promotoren des *KMT2A*- und des *AFF1*- oder des *MLLT3*-Gens exprimiert werden, sodass direkte nachfolgende Effekte charakterisiert und Therapieoptionen entworfen werden konnten. Die Möglichkeit einer unbegrenzt wachsenden, stabilen *in vitro* Flüssigkultur stellt einen erheblichen Vorteil im Vergleich zu der Verwendung von Patientenzellen, die *in vitro* ausdifferenzieren, dar. Bisherige Ansätze, die vor allem auf murinen Modellen und viralen Xenografts basieren, bildeten zum einen die Grundlage für die Zusammenstellung der gesammelten Erkenntnisse *KMT2A*-rearrangierter Leukämien.<sup>[93]-[102][104]</sup> Ein Meilenstein hierbei ist die Identifizierung von *DOT1L* als mögliche Zielstruktur.<sup>[28][30]</sup> Trotzdem bleibt eine Translation einer Inhibition dieser vielversprechenden Zielstruktur in die klinische Anwendung hinter den Erwartungen zurück.<sup>[49]</sup> Dies zeigt, dass die dafür verwendeten Modelle die Situation im Patienten möglicherweise nicht hinreichend nachstellen können. Mausmodelle unterscheiden sich in den Punkten Genetik und Epigenetik erheblich vom Menschen und bisherige virale Modelle exprimieren das On-

kogen in supraphysiologischen Mengen.<sup>[95][99]</sup> Unter Verwendung des *KMT2A*-CRISPR/Cas9-Translokationsmodells konnte eine Inhibition von DOT1L zwar die Proliferation der Zellen verringern, zeigte jedoch, dass keinesfalls eine komplette Unterdrückung des Zellwachstums erreicht werden konnte. Das Modell spiegelte folglich die Situation im Patienten gut wider. Um auf den bisherigen Erkenntnissen aufbauen zu können, sollte in dieser Arbeit das innovative humane Modell dazu verwendet werden, den bestehenden Therapieversuch zu optimieren. Als innovative Therapiestrategien aus Tierstudien und Überexpressionsmodellen werden PAFc und PRMT5 als Zielstrukturen vorgeschlagen.<sup>[50][58][59]</sup> Die Ergebnisse der *PRMT5*-Überexpression in *KMT2A*-rearrangierten Zellen konnten durch das *KMT2A*-CRISPR/Cas9-Translokationsmodell bestätigt werden. Um sich letztendlich beider Signalwege der vorgeschlagenen Inhibitoren zu Nutze zu machen, sollten in dieser Arbeit beide Zielstrukturen adressiert werden. Bemerkenswerterweise konnte ein synergistischer Effekt nach Chou-Talalay nachgewiesen werden.<sup>[156]</sup> Eine Erklärung für die gesteigerte Hemmung der Proliferation und der DNA-Synthese sowie für die gesteigerte Apoptose liefert ein Blick auf die Wirkungsweise einer Inhibition von DOT1L und PRMT5. Während eine Inhibition von DOT1L einen Einfluss auf die Differenzierung hat, indem *KMT2A*-translokationsspezifische Zielgene weniger stark exprimiert werden, und so letztendlich Apoptose induziert wird<sup>[47][48]</sup>, wirkt eine PRMT5-Inhibition über eine reaktivierte Apoptose über p53 und CDKN1a.<sup>[50]</sup> Hier wurde keine Auswirkung auf die Differenzierung infolge einer PRMT5-Inhibition beobachtet. Aus Mausmodellen ist hierzu keine eindeutige Aussage zu treffen: Während Serio et al., 2018 ebenso von keiner Auswirkung auf die Differenzierung berichten, zeigen Kaushik et al., 2018 anderes.<sup>[50][55]</sup> Folglich wird erneut deutlich, wie wichtig ein verlässliches humanes Modell für die Untersuchung von neuartigen Inhibitoren ist. Für weitere klinische Anwendungen ist schließlich zu vermerken, dass eine Kombinationsbehandlung aus DOT1L- und PRMT5-Inhibition einen deutlichen Vorteil in Patienten haben könnte.

Weiter wird aufgrund des Zusammenhangs zwischen PRMT5 und des PAFc letzteres ebenfalls als mögliche Zielstruktur in *KMT2A*-rearrangierten Leukämien vorgeschlagen.<sup>[50]</sup> Auch hier werden leicht unterschiedliche Auswirkungen einer Inhibition hinsichtlich der Differenzierung berichtet, da PAFc im Signalweg ein der PRMT5 vorgeschaltetes Protein darstellt. PAFc reguliert nachfolgend einige PRMTs, sodass breitere Auswirkungen, die zudem eine Beteiligung der Expression von *MEIS1* und *HOXA9* beinhalten, beobachtet werden.<sup>[209]</sup> Allerdings sind viele der nachfolgenden Proteine des PAFc auch an der humanen Entwicklung beteiligt.<sup>[210]</sup> Eine kontrolliertere Herangehensweise ist es demnach, Zielstrukturen weiter *downstream* zu adressieren, um eine Wirkung und mögliche Nebenwirkungen besser steuern zu können.

Zellen, die folglich mit beiden Inhibitoren für DOT1L und PRMT5 behandelt wurden, waren nicht nur unter Behandlung in ihrem Wachstum beeinträchtigt, sondern zeigten auch darüber hinaus ein verringertes Proliferationspotential. Dennoch waren die Zellen weiterhin durch

Chemotherapeutika angreifbar und überdies sensibler gegenüber dieser Behandlung, so dass sich erhebliche Vorteile in der klinischen Anwendbarkeit ergeben. Cytarabin ist eines der häufig verwendeten Chemotherapeutika in Leukämiepatienten, sodass eine Kombination sehr wahrscheinlich sein würde.<sup>[1][2]</sup> Eine flexible Dosierung muss demnach gewährleistet sein. Erste Erkenntnisse für einen gesteigerten Effekt einer Kombinationstherapie mit Cytarabin wurden in dieser Arbeit gewonnen. Eine Aussage zur Synergie der DOT1L-Inhibition zusätzlich zur Chemotherapie ist bereits verfügbar.<sup>[211]</sup>

Das humane *KMT2A*-CRISPR/Cas9-Translokationsmodell konnte daher dazu herangezogen werden, um PRMT5 in einem humanen *in vitro* Modell als Zielstruktur zu bestätigen. Für die klinische Anwendung kann anhand dessen eine vielversprechende Kombinationstherapie zusammen mit einer DOT1L-Inhibition vorgeschlagen werden.

#### 5.4 *KMT2A*-rearrangierte Zellen zur Identifikation von *MAT2A* als Zielstruktur

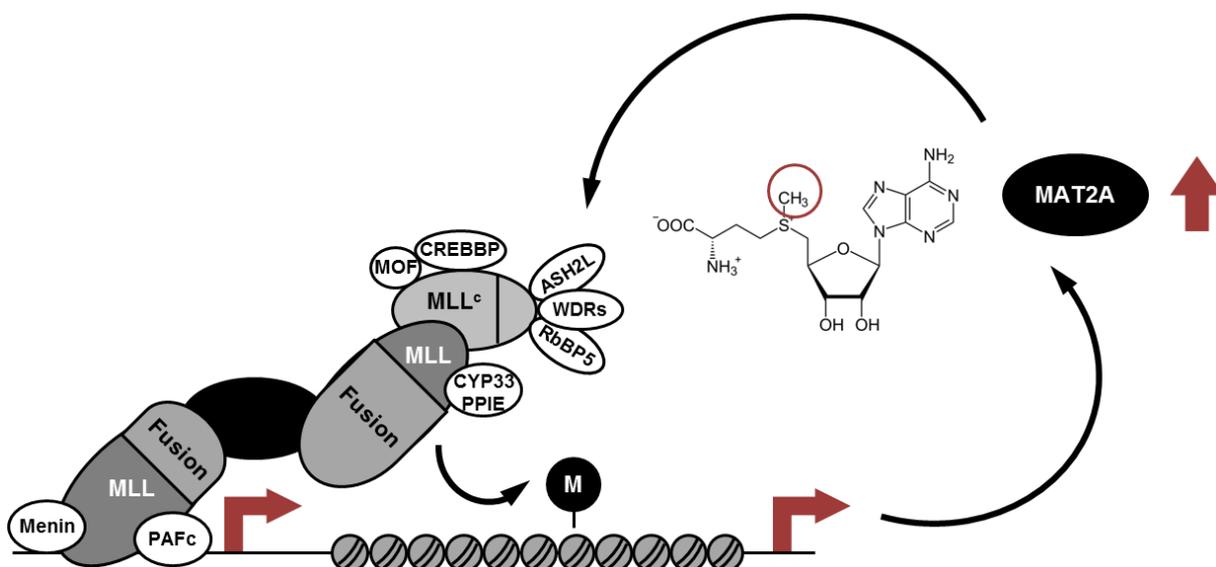
Einen Ansatz für eine innovative therapeutische Strategie lieferte die Anwendung des *KMT2A*-CRISPR/Cas9-Translokationsmodells im ersten Teil dieser Arbeit. Es wurden aus anderen Modellen abgeleitete Zielstrukturen im humanen System validiert und hinsichtlich ihrer Verwendung in einer Kombinationsstrategie für ein klinisches Modell verbessert. Die Möglichkeiten eines verlässlichen *in vitro* Modells gehen jedoch über die Validierung bekannter Zielstrukturen hinaus. Die Tatsache, die Erkrankung patientengetreu zu imitieren, bietet die weitergehende Möglichkeit der Identifizierung innovativer Zielstrukturen. Der zusätzliche Vorteil eines *in vitro* Systems, dessen Zellen über eine lange Zeit unverändert kultiviert werden können, gewährleistet eine schnelle und effiziente Testung innovativer Substanzen.

Gemäß aktuellem Kenntnisstand ist bekannt, dass *KMT2A*-rearrangierte Leukämien ein verändertes Methylierungsmuster aufweisen.<sup>[30][45]</sup> Dies konnte durch GSEA in CRISPR/Cas9-generierten *KMT2A*-rearrangierten Zellen bestätigt werden. Alle Vorgänge hinsichtlich der Histon- und DNA-Methylierung wurden demzufolge interessant für eine genauere Betrachtung. DNA- und Histon-Methylierungen werden von Methyltransferasen ausgeführt, die die Methylgruppe hauptsächlich mithilfe von SAM übertragen.<sup>[60][61]</sup> SAM ist so als wichtigster Methylgeber maßgeblich an der epigenetischen Regulation der Genexpressionen beteiligt. Da die Biosynthese von SAM aus ATP und L-Methionin durch MATs bewerkstelligt wird, sind diese Enzyme in onkologischen Fragestellungen interessant.<sup>[64]-[68]</sup> Je nach Zelltyp wird SAM durch unterschiedliche Isoformen synthetisiert, hepatisch spielt MAT1A, extrahepatisch spielen MAT2A und MAT2B eine Rolle.<sup>[62][63]</sup> Onkologisch ist eine Überexpression von *MAT2A* in aktivierten T-Zellen, T-Zell-Leukämiezellen sowie in anderen soliden Tumoren bekannt.<sup>[69][70]</sup> Dies konnte ebenso für die CRISPR/Cas9-generierten *KMT2A*-rearrangierte Zellen nachgewiesen werden. Interessanterweise ergab eine detaillierte Analyse bestehender Patientendaten, dass *MAT2A* vor allem bei Leukämien und darunter hauptsächlich in *KMT2A*-

rearrangierten Leukämien stark überexprimiert war. Es stellte sich demnach die Frage, ob *MAT2A* eine geeignete Zielstruktur für *KMT2A*-rearrangierte Leukämien darstellt und inwiefern eine erhöhte *MAT2A*-Expression direkt von der Translokation abhängt.

Der erst kürzlich veröffentlichte Inhibitor PF-9366 ermöglichte die Validierung der Zielstruktur in CRISPR/Cas9-generierten *KMT2A*-rearrangierten Zellen.<sup>[75]</sup> Eine Inhibition von *MAT2A* führte zu einer Beeinträchtigung der Proliferation und des Zellzyklus sowie zur Induktion von Apoptose. Des Weiteren konnten eine gesteigerte Differenzierung sowie eine geringere Expression von *MEIS1* infolge einer Behandlung mit *MAT2A*-Inhibitor gezeigt werden. Es ist bekannt, dass eine erhöhte *MAT2A*-Expression in Lymphozyten zu einer ebenfalls erhöhten SAM-Konzentration führt. Die Auswirkungen gesteigerter SAM-Level sind sehr stark vom Zelltyp abhängig.<sup>[63]</sup> Während viel SAM in Hepatozyten eher zu einer geringeren Proliferation führt, steigert es die Proliferation von Lymphozyten.<sup>[63][67]</sup> Durch eine hohe SAM-Konzentration werden nicht nur DNA-Methylierungen bewerkstelligt, sondern SAM ist zusätzlich auch an der Polyamin- und Glutathionbiosynthese beteiligt und kann so das Zellwachstum, Apoptose und Differenzierung beeinflussen.<sup>[62][212]</sup> Deutlich wurde dies zusätzlich durch die Ergebnisse der RNA-Sequenzierung. Infolge einer *MAT2A*-Inhibition wurde die Expression transkriptioneller und proproliferativer Gene inhibiert und die Expression proapoptotischer und Zellzyklusarrest-induzierender Gene hochreguliert. Die beobachteten Effekte lassen sich vermutlich auf den geringeren SAM-Level nach *MAT2A*-Inhibition zurückführen. Für ein Monitoring der intrazellulären SAM-Level infolge einer *MAT2A*-Inhibition werden in der Literatur Methoden der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*high performance liquid chromatography*, HPLC) gepaart mit einer massenspektrometrischen Detektion angewendet.<sup>[75]</sup> Diese Methodik wird derzeit im Labor für *KMT2A*-rearrangierte Zellen etabliert.

Eine *MAT2A*-Inhibition hatte weitreichende Effekte in *KMT2A*-rearrangierten Zellen, sodass es zu evaluieren gilt, ob die *MAT2A*-Expression direkt von der *KMT2A*-Translokation abhängt oder die Zellen *MAT2A* aus einem anderen Grund überexprimieren. Es ist bekannt, dass bestimmte Proteine an den *MAT2A*-Promotor binden können.<sup>[213]</sup> Ein prominentes Beispiel ist c-Myb als Teil der LSC-Signatur, das auch im Zusammenhang mit *KMT2A*-Leukämien als überexprimiert bekannt ist.<sup>[69][166]</sup> In Zukunft kann eine Chromatin-Immunpräzipitation zeigen, ob das MLL-Fusionsprotein in der Lage ist, direkt an den Promotor von *MAT2A* zu binden oder ob eine indirekte Stimulation durch c-Myb auch in diesen Zellen verantwortlich ist. In beiden Fällen könnte ein positiver *feedforward*-Mechanismus, wie in **Abbildung 53** gezeigt, resultieren. Hinzu kommt, dass Methylthioadenosin (MTA) durch erhöhte SAM-Level während der Polyaminbiosynthese als Nebenprodukt entstehen kann.<sup>[214]</sup> Dieses Molekül ist in der Lage, die H3K4-Methylierung zu blockieren, sodass ein weiterer Faktor vorliegt, der die physiologische Zellfunktion des MLL-Proteins verhindert.<sup>[215][216]</sup>



**Abbildung 53: Denkbare feedforward-Regulation in *KMT2A*-rearrangierten Zellen im Hinblick auf *MAT2A*.** Lysin-Acetyltransferase 5 (KAT5, MOF), *cAMP response element-binding protein* (CREBP), *CREB-binding protein* (CREBBP), Prolyltransferase (PPIE, CYP33), *WD repeat-containing protein 5* (WDR5), *retinoblastoma-binding protein 5* (RbBP5), *Set1/Ash2 histone methyltransferase complex subunit ASH2* (ASH2L), *polymerase associated factor complex* (PAFc), Methioninadenosyltransferase 2A (*MAT2A*), S-Adenosylmethionin (SAM). Gezeigt ist eine schematische Darstellung möglicher Komplexpartner und rekrutierter Proteine (schwarz), veränderter Methylierungsmuster (M), veränderter Genexpression (roter Pfeil) und die denkbare Beteiligung *MAT2A*s unter Bereitstellung einer Methylgruppe (roter Kreis) mittels SAM (chemische Strukturformel).<sup>[28][30][45]</sup>

Eine Inhibition von *MAT2A* erscheint sinnvoll, um diesen Kreislauf zu durchbrechen. Für eine zusätzliche Validierung von *MAT2A* als essentielle Zielstruktur in *KMT2A*-rearrangierten Zellen könnte eine alternative Inhibition durch *small interfering* (si) RNAs durchgeführt werden.<sup>[71]</sup> Die Etablierung dieser Methode wird derzeit im Rahmen einer Masterarbeit im Labor durchgeführt.<sup>[191]</sup>

Für eine klinische Anwendung rückt jedoch die Anwendung des erst kürzlich veröffentlichten *MAT2A*-Inhibitors PF-9366 in den Vordergrund der Bemühungen.<sup>[75]</sup> Bisher kann *MAT2A* lediglich unspezifisch und mit hoher Konzentration durch Cycloleucin blockiert werden.<sup>[217]</sup> Die unerwünschten Wirkungen dieser Substanz sind bereits lange bekannt und beruhen vor allem auf der strukturellen Ähnlichkeit zu Aminosäuren. Der Aminosäuretransport wird beeinträchtigt, wodurch die Aminosäurezusammensetzung verschiedener Gewebe verändert und die Proteinsynthese gestört werden kann.<sup>[218]-[223]</sup> Es ist zudem bekannt, dass Cycloleucin zur Degeneration von Axonen beiträgt<sup>[224]</sup>, den Verlust der Myelinscheiden induziert und somit als neurotoxisch einzustufen ist<sup>[225]</sup>, sodass sich eine klinische Translation als schwierig darstellt.

Die erfolgreiche Etablierung von PF-9366 als antileukämische Substanz in CRISPR/Cas9-generierten *KMT2A*-rearrangierten Zellen stellte folglich einen ersten Schritt dar. Vor einer möglichen klinischen Anwendung müssen zunächst Limitationen einer *MAT2A*-Inhibition überprüft werden. Quinlan et al., 2017 schränken eine mögliche Verwendung der therapeuti-

schen Strategie in Hepatokarzinomen dahingehend ein, dass die Zellen infolge einer Behandlung die *MAT2A*-Expression gegenregulieren und damit eine höhere Konzentration des Inhibitors als errechnet für eine Proliferationsinhibition benötigt wird.<sup>[75]</sup> Diese Konzentration konnte für *KMT2A*-rearrangierte Zellen bestätigt werden, wobei jedoch Kontrollzellen noch nicht beeinflusst wurden. Durch Langzeitexperimente könnte eine Toleranzinduktion ausgeschlossen werden. Als nächster Schritt könnten CRSIPR/Cas9-generierte *KMT2A*-rearrangierte Zellen in NSG-Mäusen als *in vivo* Modell etabliert werden, um die Wirksamkeit gegenüber einer potenziellen Toleranzinduktion zu untersuchen. Weiter könnte ein Xenograftmodell mit Patientenzellen etabliert werden und mit beiden Modellen so die Applizierbarkeit *in vivo* untersucht, die Plasmaspiegel nachverfolgt und Dosis-Wirkungs-Kurven für eine klinische Translation erstellt werden.

Für potenzielle klinische Therapiestrategien, die eine *MAT2A*-Inhibition beinhalten, lieferten die Ergebnisse dieser Arbeit bereits wichtige Erkenntnisse. Zusätzlich zur Monotherapie mit PF-9366 konnten *KMT2A*-rearrangierte Zellen mit einer Kombination aus *MAT2A*-Inhibition und Chemotherapie noch besser in ihrem Wachstum gehemmt werden. Eine Kombination mit konventioneller Chemotherapie kann also zukünftig in Betracht gezogen werden. Zudem resultierte eine Vorbehandlung der Zellen mit PF-9366 in einer anhaltenden Beeinträchtigung, sodass sie infolge besser durch eine Chemotherapie angreifbar waren. Um die Patienten mit *KMT2A*-translokationspositiven Leukämien für eine Chemotherapie zu sensibilisieren, könnte demnach auch eine vorgeschaltete *MAT2A*-Inhibition in Frage kommen.

Weiter wurden hier flexible Kombinationsmöglichkeiten zielgerichteter Therapien im *KMT2A*-CRISPR/Cas9-Translokationsmodell untersucht, um künftig eine möglichst effektive zielgerichtete Therapie zu erreichen. Da Methylierungen in *KMT2A*-rearrangierten Zellen eine große Rolle spielen, wurden hier jeweils die SAM-Synthese sowie eine Methyltransferase, DOT1L oder PRMT5, inhibiert. *In vitro* zeigten die verschiedenen Kombinationen einen überlegenen synergistischen Effekt. Ob infolge einer *MAT2A*-Inhibition die typischen Stellen der Methyltransferasen DOT1L und PRMT5 auch geringer methyliert werden<sup>[28][51]-[57][226]</sup>, oder ob hauptsächlich andere Methylierungen der DNA betroffen sind, soll in weiterführenden DNA-Methylierungsanalysen mittels des *Infinium MethylationEPIC Kit* von Illumina untersucht werden. Die Ergebnisse können dann mit den RNA-Sequenzierungsdaten korreliert werden, um den synergistischen Effekt weiter zu erklären.

Eine möglichst effiziente klinische Anwendung zielgerichteter Therapien in Kombination soll schließlich dazu führen, die veränderte Epigenetik *KMT2A*-rearrangierter Zellen an zwei Angriffspunkten zu adressieren. Eine Dreifachkombination ist künftig eventuell in Betracht zu ziehen.

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

Das *KMT2A*-Gen spielt eine wichtige Rolle während der Hämatopoese, Proliferation und Differenzierung.<sup>[25]-[27]</sup> Genetische Veränderungen können hier einen erheblichen Einfluss auf die Physiologie einer Zelle nehmen, sodass von einem Protoonkogen gesprochen werden kann. Eine *KMT2A*-Translokation führt nicht nur zu einem Verlust der inhibitorischen Funktion des MLL-Proteins, entstehende Fusionsproteine können zudem neuartige Komplexe bilden, die in aberranten Funktionen resultieren können. *KMT2A*-Translokationen führen somit zu einer drastischen pathologischen Veränderung und folglich zu Leukämien mit schlechter Prognose.<sup>[2][22]-[24]</sup> Daher sind innovative Therapien dringend erforderlich.

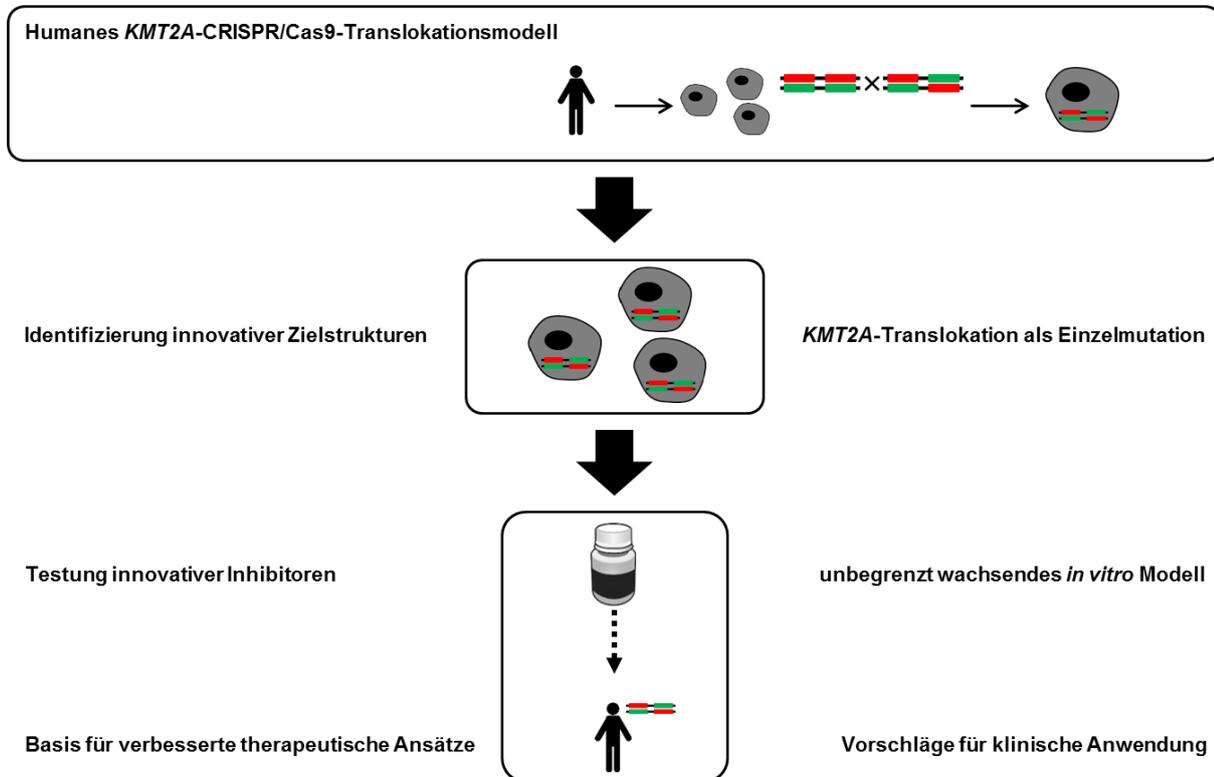
Zur Identifizierung und nachfolgenden Inhibition neuer Zielstrukturen *KMT2A*-rearrangierter Leukämien sind Patientenzellen nicht verwendbar, da sie *in vitro* ausdifferenzieren.<sup>[87]-[91]</sup> Ein *in vitro* *KMT2A*-Translokationsmodell wird daher benötigt, um die direkten Effekte der *KMT2A*-Translokation auf nachfolgende Signalwege identifizieren und direkt innovative Therapiestrategien *in vitro* testen zu können.

In dieser Arbeit konnte ein humanes *KMT2A*-Translokationsmodell mithilfe des CRISPR/Cas9-Systems etabliert werden, in dem die Translokation patientengetreu unter endogenen Promotoren induziert wurde. Es wurden stabile *in vitro* Modelle der *t*(9;11)- und der *t*(4;11) Translokation erzeugt, wobei letztere erstmals als stabile *in vitro* Kultur persistierte. Die so generierten Zellen wiesen einen proliferativen Vorteil gegenüber Kontrollzellen auf und hatten eine blastenartige Morphologie. Die Untersuchung der Oberflächenmarker zeigte einen myelomonozytären Phänotyp, wobei *KMT2A*-rearrangierte Zellen gegenüber Kontrollzellen als weniger differenziert anzusehen waren. Insgesamt konnten typische Oberflächenmarker und die Expression *KMT2A*-translokationsspezifischer Marker nachgewiesen werden. Schließlich waren die CRISPR/Cas9-generierten Zellen hinsichtlich oben genannter Eigenschaften mit Patientenzellen vergleichbar.

Das erhaltene Modell konnte anschließend für die Validierung von PRMT5 als Zielstruktur in einem humanen System verwendet werden. Ein neuer zusätzlicher Angriffspunkt für eine Optimierung der vielversprechenden zielgerichteten Therapie der DOT1L-Inhibition konnte so gefunden werden. In Kombination zeigte eine duale Inhibition von DOT1L und PRMT5 einen synergistischen Effekt der Proliferationsinhibition, wobei, bedingt durch unterschiedliche Signalwege, letztendlich eine gesteigerte Apoptose induziert werden konnte.

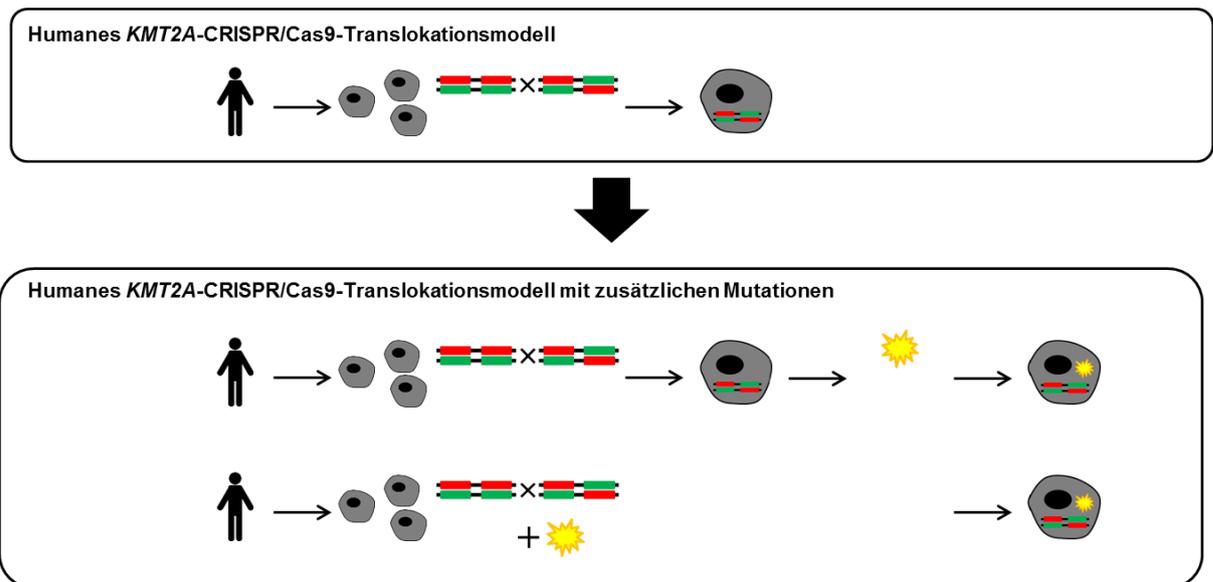
Weiter konnte das *KMT2A*-CRISPR/Cas9-Translokationsmodell für die Identifikation von MAT2A als innovative Zielstruktur *KMT2A*-rearrangierter Leukämien verwendet werden. Als weitere Möglichkeit, *KMT2A*-rearrangierte Leukämien zielgerichtet zu adressieren, wurde der MAT2A-Inhibitor PF-9366 erstmals in einem Leukämiemodell getestet. Verschiedene Kombinationen sowohl oben genannter zielgerichteter Therapien als auch mit konventioneller Chemotherapie lieferten mögliche Therapiestrategien. Das innovative *KMT2A*-CRISPR/Cas9-Translokationsmodell konnte demnach erfolgreich als Plattform für die Identi-

fikation und Testung innovativer Therapien etabliert werden, sodass eine Rationale zu möglichen zielgerichteten Therapien *KMT2A*-rearrangierter Leukämien geliefert wurde. Eine Übersicht der erreichten Aspekte ist in **Abbildung 54** dargestellt.



**Abbildung 54: Schematische Zusammenfassung.** Gezeigt ist die Etablierung des *KMT2A*-CRISPR/Cas9-Translokationsmodells aus gesunden humanen Stamm- und Vorläuferzellen (schwarzes Personen-Piktogramm, graue Zellen). Die DSB im *KMT2A*- (rot) und Translokationspartnern (grün) führen zur Translokation und einer onkologischen Transformation. Nach der Generierung einer reinen Zellpopulation folgt die Charakterisierung. Die nachfolgenden Effekte der *KMT2A*-Translokation tragen zur Identifizierung innovativer Zielstrukturen bei. Das unbegrenzt wachsende *in vitro* Modell kann im Folgenden zur Testung innovativer Inhibitoren verwendet werden. Die Erkenntnisse stellen eine Basis für verbesserte therapeutische Ansätze und eine klinische Anwendung dar.

In folgenden Experimenten kann das verlässliche *KMT2A*-CRISPR/Cas9-Modell künftig weiterentwickelt werden. Noch immer ist zu bewerten, inwieweit weitere kooperierende Mutationen benötigt werden, um eine Leukämie zu induzieren. Des Weiteren ist interessant zu sehen, ob Zellen mit multiplen Mutationen auch auf eine Inhibition der identifizierten Zielstrukturen ansprechen. Für ein solches Modell gibt es mehrere Ansätze (**Abbildung 55**). Eine elegante Möglichkeit stellt das sequenzielle Tumormodell dar, wobei zunächst die *KMT2A*-Translokation und anschließend eine zweite Mutation mittels des CRISPR/Cas9-Systems eingebracht werden. Die häufigsten kooperierenden Mutationen, die in *KMT2A*-rearrangierten Leukämien auftreten, sind Punktmutationen des *kirsten rat sarcoma virus* (*kRas*) -Gens sowie *internal tandem duplications* (ITD) im *fms related tyrosine kinase 3* (FLT3) -Gen.<sup>[84][85]</sup> Durch HDR mittels ssODN und geeigneter sgRNAs könnten diese in rearrangierten Zellen durch eine erneute Nukleofektion induziert werden (**Anhang 13** bis **Anhang 18**).



**Abbildung 55: Schematische Darstellung einer möglichen Erweiterung des CRISPR/Cas-9-basierten Leukämiemodells.** Gezeigt ist die Erweiterung des *KMT2A*-CRISPR/Cas9-Translokationsmodells. In gesunden humane Stamm- und Vorläuferzellen (schwarzes Personen-Piktogramm, graue Zellen) kann die Translokation durch DSB im *KMT2A*- (rot) und Translokationspartnergen (grün) induziert werden. Eine zweite Mutation (gelb) kann entweder nach der Generierung einer reinen Zellpopulation erfolgen (obere Reihe) oder gleichzeitig zur Translokation eingebracht werden (untere Reihe). In beiden Fällen können doppelt- mit einzelmutierten Zellen verglichen werden.

Im Falle technischer Limitationen bezüglich der erneuten Nukleofektion gibt es eine alternative Herangehensweise. Direkt zu Beginn der Genomeditierung können Zellen für die Translokationen alleine und Zellen mit zusätzlichem CRISPR/Cas9-System für weitere Mutationen behandelt werden. Ein anschließender Vergleich beider Ansätze wäre so möglich. Voraussetzung hierfür ist eine hohe Editierungseffizienz der Sekundärmutation, da sich Einzelzellklone aus HSPCs technisch nur in Ko-Kultur mit *feeder*-Zellen oder als CFU umsetzen lassen.<sup>[227]</sup> Da ein *knock-out* mittels NHEJ im Vergleich zu HDR effizienter ist, gibt es die Möglichkeit, den *kRas*-Signalweg auch durch einen *knock-out* im Neurofibromin 1 (NF1) -Gen zu adressieren.<sup>[228][229]</sup> Erste technische Ergebnisse sind in **Anhang 19** dargestellt.

Die geplanten Erweiterungen des hier beschriebenen Modells können durch die Abgrenzung der  $t(4;11)$ - und  $t(9;11)$ -Translokation in embryonalen und adulten Zielzellen sowie eine optimierte lymphatische Kultur komplettiert werden. Künftig wäre eine Abhängigkeit der Leukämieentstehung einer AML oder ALL vom Translokationspartner, der Ursprungszelle und sekundären Mutationen untersuchbar. Um den Einfluss der Mikroumgebung zu evaluieren, können diese vielfältigen *in vitro* Modelle letztendlich als Xenograftmodelle *in vivo* erweitert werden. Primäre Transplantationen können so Aufschluss über die Leukämieinitiierung geben, sekundäre Transplantationen können die Aussage hinsichtlich LSC komplettieren. Dieses erweiterte Modell könnte weiter zur Identifizierung von Zielstrukturen und Testung neuer Wirkstoffe beitragen.

## 7 Anhang

AAGTGACCTTTCTCTCTCCACAGGAGGATTGTGAAGCAGAAAATGTGTGGGAGATGGGAGGCTTAGGAATCT  
TGACTTCTGTTCCCTATAACACCCAGGGTGGTTTGCTTTCTCTGTGCCAGTAGTGGGCATGTAGAGGTAAGGC  
 ATCCTGCTTCTTTGTACCCCAGGAAGTACATAAATTATTTTTCTGTGGATGAAATTACTATAGTCTGTTTTGTG  
 GTATTTAGCAGGTACTATTCCCTGTTAAACCAGCTAAAGAAATGTTTTGAAGTATTTAGAGATTAGGAAG  
 GAATCTGCTATTAGAGTAGCAAAGTTATTGAGAGTGAAAAGATCAATAATCCCATCTCTCTTAAATTCAGTCTT  
 TATTAGAGTTCTGATCTTTCTGTTAGATGTCTAAATAAGAGAAAAAATTATACAGTGGTCTATTAAGGGATG  
 CTATTGATGGTTATTTATATTGTATATCAAAGCCTCTTCATCTATAAGGAGCTCTTACCAATTAATAAGAAAA  
 GGAATGACATCCAGAAAAAATAGGCAAAGACAGAAATAGATAATTCACAAAATTAGAAAATAATACATGT  
 TGGGTGGCAGGGGGAGGTGAAGGGAGGGTGTCTGTTTTTTAGCCCTCTAGTGACCAAAAACTGGAATTA  
 GCATGATAAAAAAGAATCCTGAATAAATGGGGACTTTCTGT

**Anhang 1: Sequenzausschnitt des *KMT2A*-Gens zur Genomeditierung.** Exon (rot), Intron (schwarz), Primer (unterstrichen), sgRNA-Zielsequenzen (grün). Gezeigt sind der zu editierende Genabschnitt des *KMT2A*-Gens und die Lage der sgRNA-Zielsequenzen.

GACCTAGCAGTGAAAGTCCATGATAAAGAGACCCCTCAAGACAGTTTGGTGGCCCTGCCAGCCGCTTCT  
CAGACATTTCCACCTCCCTCCCTCCCCTCAAAAAGTGTTGCAATGCAGCAGAAGCCACGGCTTATGTCCGG  
CCCATGGATGGTCAAGATCAGGCCCCTAGTGAATCCCCTGAACTGAAACCACTGCCGGAGGACTATCGACA  
GCAGACCTTTGAAAAACAGACTTGAAAGTGCTGCCAAAGCCAAGCTCACCAAAGTGAAGATGCCTTCTCA  
GTCACTTAGGTGTGTGGAATTTCTTATCTTGGGAATTCCAATTCGAAGACGGATTTGAGATGAAAATGTCC  
 GGAGGATGTGGGGCAAGGTGGGGAGGTTAGTCCATGGCTTTGGGTAGCGGGAATCTTTTTGGCTTTAGG  
 ATCTTGTTAATAACCCGCGAAAAACTCAGATCTGAGATGGACGACTGATTATAGATATTGAAATGCAGTTTGC  
 AGAAAGTTTTAGAGAACCCTTTTTATGGAGCCAAAATTTATACAGTAAAACATAGAGATCATAAGAGTACAGT  
 TTGTGTTTCAAAAAATAGATACACCTATAGGATCCAAAACCCAATCAAGAGAGAGAAGATTTTCGGTTACCAG

**Anhang 2: Sequenzausschnitt des *AFF1*-Gens zur Genomeditierung.** Exon (rot), Intron (schwarz), Primer (unterstrichen), sgRNA-Zielsequenzen (grün). Gezeigt sind der zu editierende Genabschnitt des *AFF1*-Gens und die Lage der sgRNA-Zielsequenzen.

GCCTTGACTTCTCTCTAGCTATGAAAGCTCTAGATGGCATCTTGTTCCAGTAGAAGGCTGTTTCGTCTACATA  
 GAAAATTTGTGTAGTGTAGCCACCTTCATCAATGTTGTTAGCTAGATCTTCTGGATAACTTCTGCAGCTTCTG  
 TATCAGCTCTTGCTGCTTCAACTTGCACTTTTATGTTACAGAGATGGCTTATTTCCCTAACCTTATGAACCAA  
CCTCTGCTAGCATCAAACTTTTTGTCTGCAGCTTCCCTCATCTCTCGATTTTATAAAATTAAGAGAATTAGGGC  
 TTTGCTCTTGATTAGGCTTTGGTTAAGGAAGTGTGTGGCTGGTGTGATCTTATATCCAGACCACTACAACCT  
TCTCCATATCAGCAATAAGGCTGTTTTGCTTCTTATCATTGATGAGTTCACTGGAGTAGCACTTTTAATTCCA  
 TTCAAGAACTTTTCTTTGCATTCACAACCTGGCTAAATATTTGGTGCAAGAGGCCTAGCATTGGCCTGTCA  
 CCTTTGACATGCCTTTCTACTAAGCCTAATCATTTATAGCTTTGATTTAAAGTGAGAGATGTGTCTTGGTGC  
 AGTGGCTCACACTTGTAATCCCAGCAGTTT

**Anhang 3: Sequenzausschnitt des *MLL3*-Gens zur Genomeditierung.** Exon (rot), Intron (schwarz), Primer (unterstrichen), sgRNA-Zielsequenzen (grün). Gezeigt sind der zu editierende Genabschnitt des *MLL3*-Gens und die Lage der sgRNA-Zielsequenzen.

ATTCCCTGTTTAAACCAGCTAAAGAAATGTTTTGAAGTATTTTAGAGATTTTAGGAAGGAATCTGCTATTAGAG  
TAGCAAAGTTATTGAGAGTGAAAAGATCAATAATCCCATCTCTCTTAAATTCAGTCTTTATTAGAGTTCTGATCT  
TTCTGTTAGATGTCTAAATAAGAGAAAAAATTATACAGTGGTCTATTAAGGGATGCTATTGATGGTTATTTA  
TATTGTATATCAAAGCCT **CTT\*CATCTATAAGGAGCT**  
**GAG\*GACTATCGACAGCAG** ACCTTTGAAAAACAGACTTGAAAGTGCCTGCCAAAGCCAAGCTCACCAAAC  
GAAGATGCCTTCTCAGTCAGTTGAGGTGTGTGGAATTTCTTATCTTGGGAATTCCAATTC GAAGACGGATTT  
GAGATGAAAATGTC

und

GCAGTGAAAGTCCATGATAAAGAGACCCCTCAAGACAGTTTGGTGGCCCCTGCCAGCCGCCTTCTCAGAC  
ATTTCCACCTCCCTCCCTCCCCTCAAAAAGTGTGCAATGCAGCAGAAGCCCACGGCTTATGTCCGGCCCAT  
GGATGGTCAAGATCAGGCCCTAGTGAATCCCCTGAACTGAAACCACTGCCG **GAG\*GACTATCGACAGCAG**  
**CTT\*CATCTATAAGGAGCT** CTTACCAATTAATAAGAAAAAGGAATGACATCCAGAAAAAATAGGCAAAGA  
CAGAAATAGATAATTCACAAAATTAGAAATAAATACATGTTGGGTGGCAGGGGAGGTGAAGGGAGGGTGTC  
TGTTTTTTAGCCCTCTAGTGACCAAAAAGTAAAGCATGATAAAAAAGAATCCTGAATAAATGGGGA  
CTTTCT

**Anhang 4: Vorüberlegungen der reziproken t(4;11)-Translokationssequenzen.** *KMT2A*-Gen (kursiv), *AFF1*-Gen (nicht-kursiv), Exon (rot), Intron (schwarz), Primer (unterstrichen), sgRNA-Zielsequenzen (grün). Gezeigt sind die geplanten reziproken Translokationen und die Lage der sgRNA-Zielsequenzen. \* markiert die Schnittstelle.

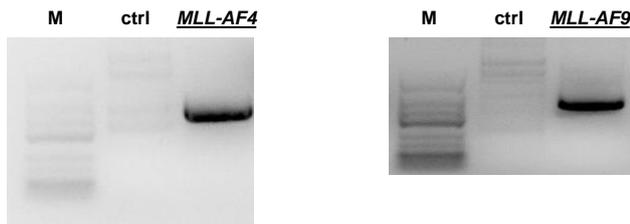
TTCCCTGTTTAAACCAGCTAAAGAAATGTTTTGAAGTATTTTAGAGATTTTAGGAAGGAATCTGCTATTAGAGT  
AGCAAAGTTATTGAGAGTGAAAAGATCAATAATCCCATCTCTCTTAAATTCAGTCTTTATTAGAGTTCTGATCTT  
TCTGTTAGATGTCTAAATAAGAGAAAAAATTATACAGTGGTCTATTAAGGGATGCTATTGATGGTTATTTAT  
ATTGTATATCAAAGCCT **CTT\*CATCTATAAGGAGCT**  
**CTA\*CAACTTTCTCCATAT** CAGCAATAAGGCTGTTTTGCTTCCTTATCATTGAGTTCACTGGAGTAGCACT  
TTTAATTCCATTCAAGAAGCTTTTCTTTGCATTCACA CAACTTGGCTAAATATTTGGTGCAAGA

und

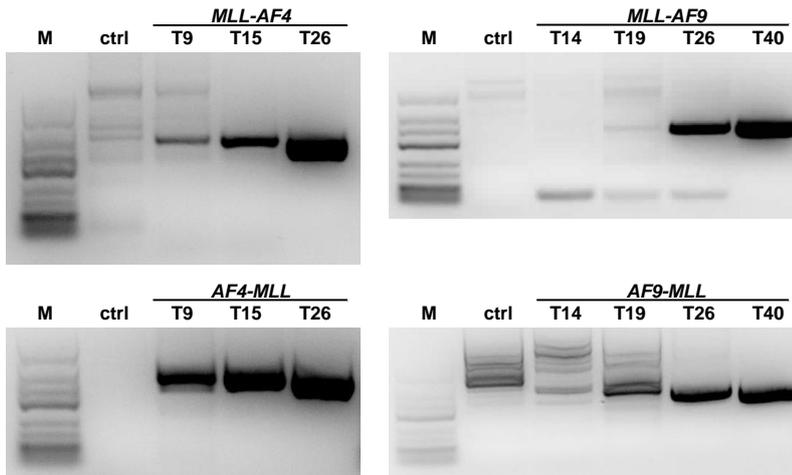
CAACCTCTGCTAGCATCAAACCTTTTGTCTGCAGCTTCCTCATCTCTCAGATTTTATAAAATTAAGAGAATTA  
GGGCTTTGCTCTTGATTAGGCTTTGGTTAAGGAAGTGTGTGGCTGGTGTGATCTTATATCCAGACCA **CTA\***  
**CAACTTTCTCCATAT**  
**CTT\*CATCTATAAGGAGCT** CTTACCAATTAATAAGAAAAAGGAATGACATCCAGAAAAAATAGGCAAAGA  
CAGAAATAGATAATTCACAAAATTAGAAATAAATACATGTTGGGTGGCAGGGGAGGTGAAGGGAGGGTGTC  
TGTTTTTTAGCCCTCTAGTGACCAAAAAGTAAAGCATGATAAAAAAGAATCCTGAATAAATGGGGA  
CTTTCTGTTGGTG

**Anhang 5: Vorüberlegungen der reziproken t(9;11)-Translokationssequenzen.** *KMT2A*-Gen (kursiv), *MLL3*-Gen (nicht-kursiv), Exon (rot), Intron (schwarz), Primer (unterstrichen), sgRNA-Zielsequenzen (grün). Gezeigt sind die geplanten reziproken Translokationen und die Lage der sgRNA-Zielsequenzen. \* markiert die Schnittstelle.

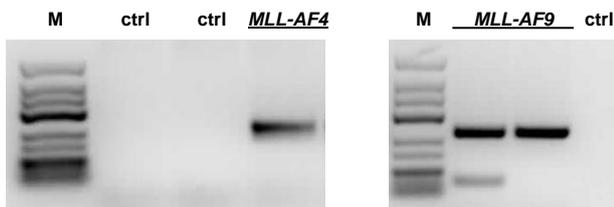
**A**



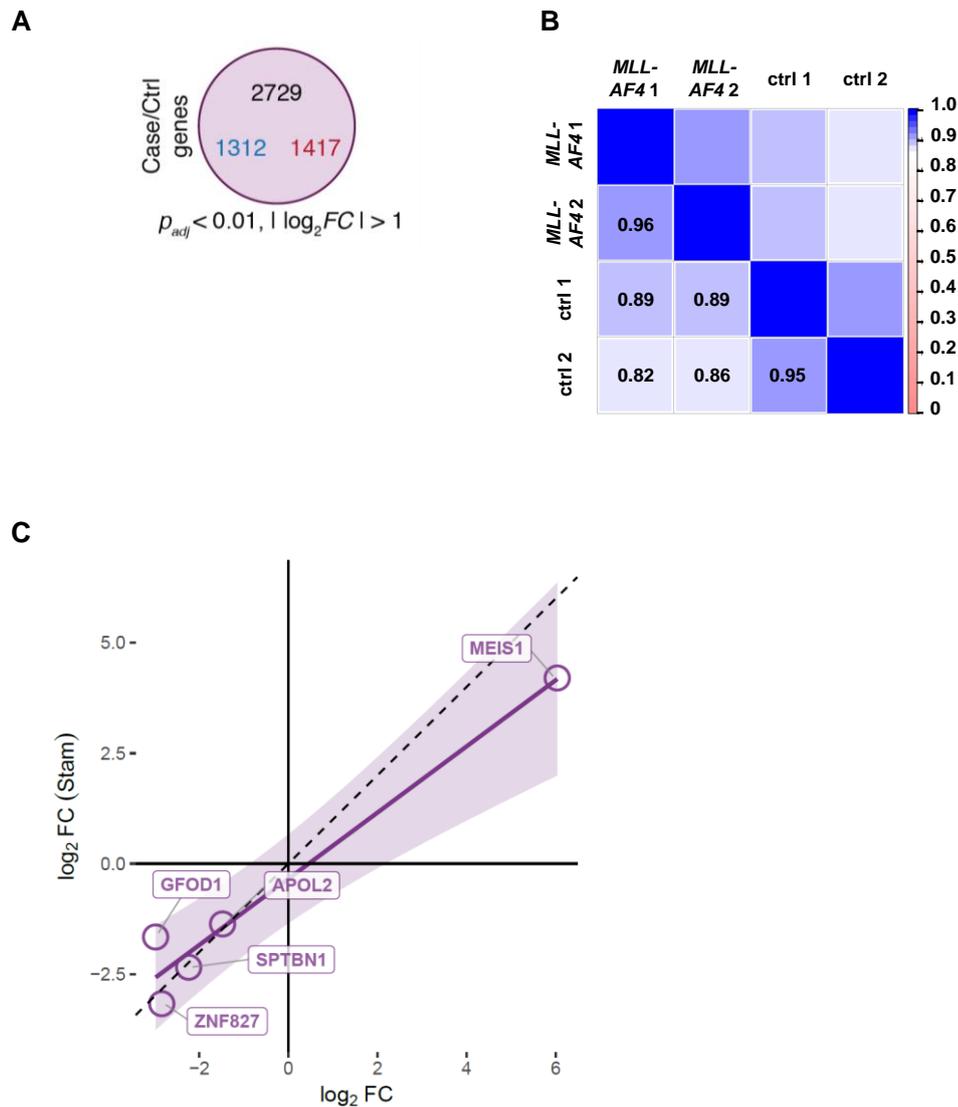
**B**



**C**



**Anhang 6: Vollständige Version aller Agarose-Gel-Bilder.** Vollständige Version der Agarose-Gel-Bilder aus Abbildung 25 (A), aus Abbildung 26 (B) und (C) mit Molekulargewichtsmarker (M). Daten publiziert in Secker et al., 2019.<sup>[157]</sup>

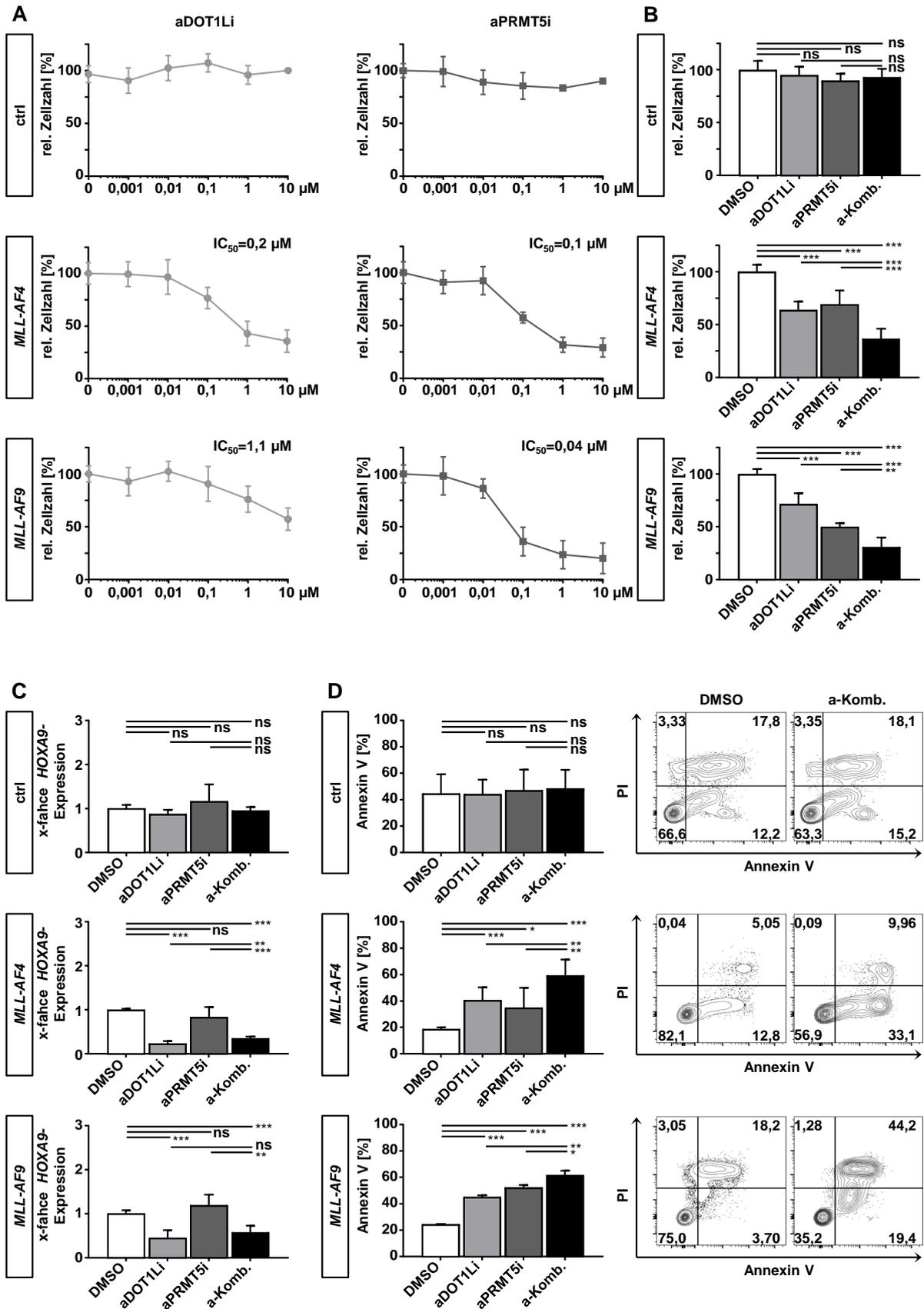


**Anhang 7: Expressionsanalysen *KMT2A*-rearrangierter Zellen und Relation zu Patientendaten.** *t*(4;11)-rearrangierte Zellen (*MLL-AF4*,  $n=2$ ) und Kontrollzellen derselben Spender (ctrl,  $n=2$ ), die nur mit Cas9-Protein behandelt wurden, wurden nach identischer Zeit in Kultur mittels RNA-Sequenzierung analysiert. Die Rohdaten wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Epigenetik des Instituts für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik des Universitätsklinikums Tübingen ausgewertet. **(A)** Die Gesamtheit aller differentiell exprimierten Gene (DEGs, schwarz) mit hochregulierten (rot) und herunterregulierten Genen (blau) ist gezeigt. **(B)** Die Korrelation der analysierten Proben zeigt eine größere Übereinstimmung der *t*(4;11)-rearrangierten Proben (*MLL-AF4* 1, 2) untereinander als zu den jeweiligen Kontrollzellen (ctrl 1, 2). Die Werte zeigen den *Spearman's rank correlation coefficient*. **(C)** Dargestellt sind die log<sub>2</sub>-Werte der x-fachen Änderung signifikanter DEGs nach dem Vergleich mit *KMT2A*-rearrangierten Patientendaten aus Stam et al., 2010.<sup>[153]</sup> Es wurden die 50 Gene beachtet, die nach Rangliste der adjustierten p-Werte jeweils am meisten hoch- und herunterreguliert waren. Wiederkehrende Gene in *t*(4;11)-rearrangierte Zellen sowie Patientenzellen sind als Punkte dargestellt. Eine lineare Regression (durchgezogene Linie) und das Konfidenzintervall des Standardfehlers (Schattierung) sind gezeigt. Die gestrichelte Linie stellt eine ideale Korrelation dar. Daten publiziert in Secker et al., 2019.<sup>[157]</sup>

**Anhang 8: Meist differentiell exprimierte Gene t(4;11)-rearrangierter Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen.** Die 50 Gene, die nach adjustiertem p-Wert und aufsteigender Reihenfolge am meisten differentiell hoch- und herunterreguliert waren, sind gezeigt. Die Rohdaten wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Epigenetik des Instituts für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik des Universitätsklinikums Tübingen ausgewertet. Gene, die mit Patientendaten aus Stam et al., 2010 übereinstimmen, sind fett dargestellt.<sup>[153]</sup> Daten publiziert in Secker et al., 2019.<sup>[157]</sup>

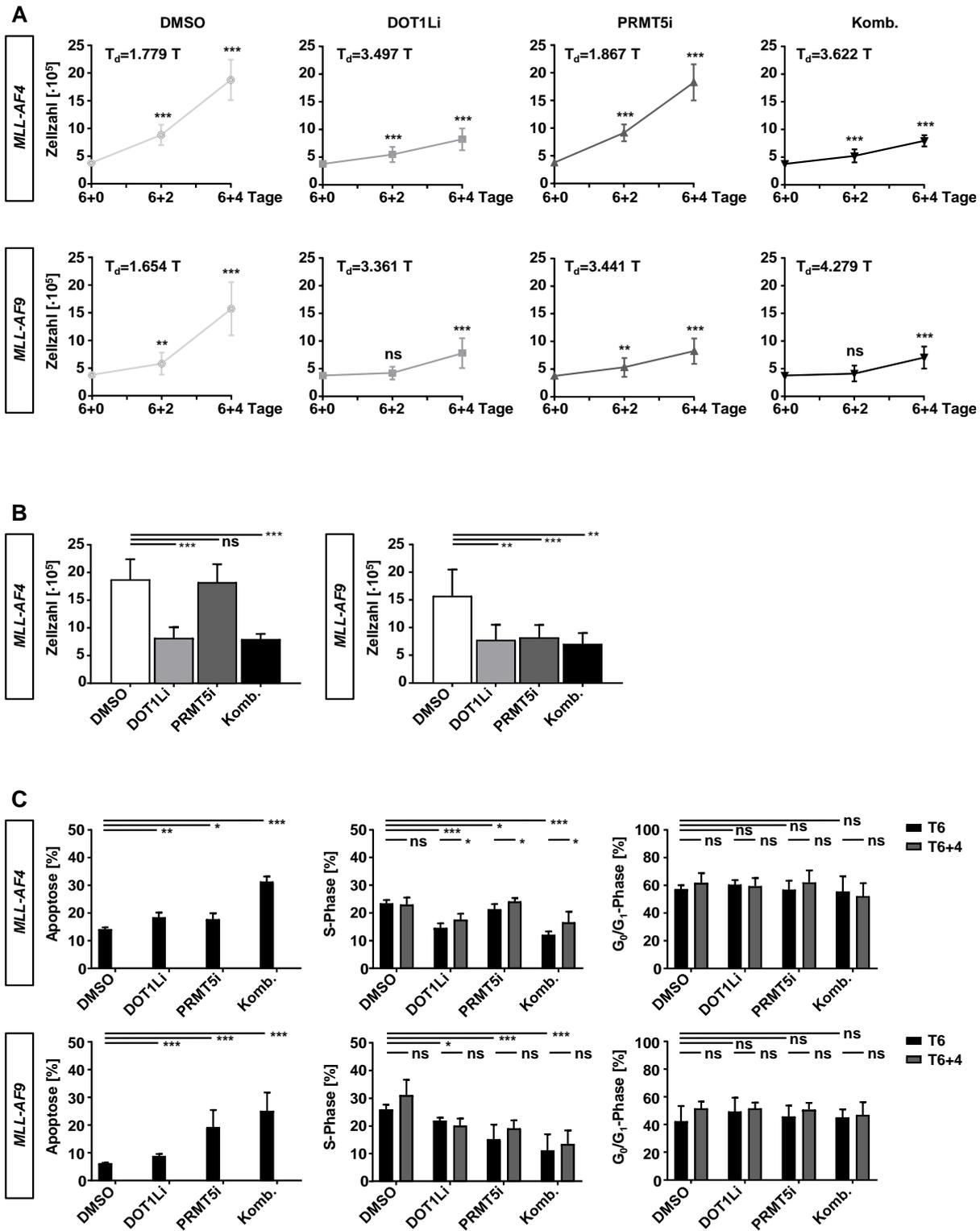
Genname (hochreguliert)	logFC	adjustierter P-Wert
GRIP1	8.367127573	4.08952E-78
LAMP5	5.487877532	7.84388E-63
B3GNT7	6.08254051	1.49414E-62
WHAMMP2	5.906849364	9.80102E-46
IRF4	7.181290805	4.20076E-44
AHRR	6.114318524	6.41335E-43
HTR7	6.533705598	8.10456E-40
<b>MEIS1</b>	6.0344769	3.19181E-38
GATM	5.711268313	3.70941E-38
RUNX2	4.95809905	5.85358E-37
TIFAB	6.375813363	6.29502E-35
BAHCC1	4.259332038	6.23815E-35
ZNF532	5.010051192	2.06235E-33
SMPD3	5.085553988	3.31588E-33
CACNB4	4.476108921	9.77149E-33
C12orf75	6.389357857	1.55522E-32
NDFIP2	5.272932903	5.81889E-32
FCER2	4.351359121	1.05044E-31
GOLGA8M	4.483995903	3.26342E-31
CD70	4.250331273	1.09689E-30
KCNK10	10.17342115	1.1439E-30
CADM1	6.503427558	8.66079E-30
DTNA	6.801403059	1.15345E-29
PKIB	5.479754814	1.44461E-29
TGM5	8.09425444	3.08285E-29
CSPG4	6.974873682	1.73645E-28
APBA1	6.835010036	1.76338E-28
DUSP4	3.926800293	2.58149E-28
ALDH1L2	6.32334876	1.18395E-27
<b>FLT3</b>	6.062145538	1.59634E-27
ITGA4	3.36436281	1.11236E-26
SATB1	3.294197845	2.6975E-26
OPN3	4.533904831	6.44594E-26
PDLIM1	4.889649661	2.7922E-25
NCS1	4.116493449	1.29583E-24
DPYSL3	5.390787571	1.3361E-23
PHLPP1	3.540523163	2.74801E-23
LRP5	3.431998736	3.78515E-23
GOLGA8O	3.381946511	4.9444E-23
ARTN	5.116235994	6.06411E-23
GOLGA8Q	3.371601606	1.50293E-22
PLEKHG5	10.89379256	1.82851E-22
AGRN	3.508708916	3.24307E-22
PPP1R16B	4.787069814	4.43093E-22
BCL2	3.71289582	6.11717E-22
IGFBP4	3.934912093	6.24798E-22
SFMBT2	3.637430125	6.87271E-22
SLC1A4	3.120058323	2.61425E-21
CACNA2D4	3.262834475	3.10164E-21
LINC00599	3.632447837	4.48328E-21

Genname (herunterreguliert)	logFC	adjustierter P-Wert
Gene name (down)	logFC	adj. P-value
CEACAM1	-9.788826273	1.0588E-105
APOE	-7.33861467	3.11083E-81
ELANE	-6.122691909	1.01456E-78
CTSL	-6.599851811	1.19465E-76
CD24	-7.80774713	4.51758E-76
ORM1	-7.101998097	1.26218E-67
ADGRG3	-7.215656751	2.94961E-66
SLCO2B1	-5.32887742	4.19219E-65
CD163	-5.823399629	8.51528E-65
BCL2A1	-6.132986558	2.42373E-64
HP	-5.267995063	1.35394E-62
S100A12	-5.167401702	2.54578E-58
FCGR3A	-4.830236267	3.01629E-58
COLEC12	-5.986029775	5.45546E-56
PRTN3	-4.849540604	8.85312E-56
MCEMP1	-4.745416857	1.12694E-54
LTA4H	-4.717727205	8.6896E-53
CHST15	-6.084478923	9.6161E-53
LILRA5	-5.26764348	6.3944E-52
EPX	-6.629854743	1.44552E-51
NPL	-4.454542627	1.89205E-50
MARCO	-5.723942985	2.62495E-49
TGM2	-4.909929101	2.66307E-48
CD69	-6.910586093	2.36416E-47
CYBB	-4.667253266	3.7195E-47
DNASE2	-4.662978325	1.08208E-46
S100A8	-4.537681103	1.87667E-44
LGMN	-5.206985932	1.15197E-43
LTF	-12.43764439	1.222E-43
CTSD	-4.793952311	5.97003E-43
CYP3A5	-5.324767509	6.91143E-43
PADI4	-7.091619092	2.91709E-42
CEACAM3	-7.280749296	5.87324E-42
SGK1	-4.190417102	7.45181E-42
ADGRE3	-6.371088046	9.89374E-42
MPO	-6.602839812	2.52711E-41
CYP1B1	-4.475410734	2.49343E-41
CYP27A1	-4.224555663	6.29944E-41
CXCL2	-6.329989003	7.72259E-41
C1QC	-4.021150798	7.80506E-41
RAB42	-6.122232308	3.08715E-40
NRP2	-5.906440205	8.33063E-40
DYSF	-4.9428274	9.52457E-40
NEAT1	-3.89328255	1.3996E-39
DAPK1	-4.334567145	1.67825E-39
ACE	-4.807615649	4.79431E-39
RGL4	-4.815696256	1.47643E-38
CXCL8	-4.646123135	4.06731E-38
IL18RAP	-7.24515009	5.28515E-38
CXCL3	-6.461564554	6.5761E-38



**Anhang 9: Validierung der Kombinationsbehandlung durch DOT1L- und PRMT5- Inhibition mittels alternativer Inhibitoren.** *t*(4;11)-rearrangierte (*MLL-AF4*), *t*(9;11)-rearrangierte Zellen (*MLL-AF9*) und Kontrollzellen (ctrl), die nur mit Cas9-Protein behandelt wurden, wurden mit steigenden Konzentrationen der alternativen Einzelsubstanzen (EPZ5676, aDOT1Li hellgrau; EPZ015938, aPRMT5i dunkelgrau) und der Kombination in konstantem Verhältnis (a-Komb., 1+1) für 6 Tage behandelt. **(A)** Eine dosisabhängige Sensitivität der relativen Zellzahl nach Einzelbehandlung mittels Zellzahlbestimmung

an Tag 6 durch *counting beads* und Durchflusszytometrie ist gezeigt. Dargestellt sind drei biologische Replikate ( $n=3$ ) durchgeführt in technischen Triplikaten. Die Zellzahl wurde jeweils auf DMSO-behandelte Zellen normalisiert. Die  $IC_{50}$ -Werte wurden aus einem vierparametrischen logarithmischen Modell interpoliert. **(B)** Die Balken zeigen das arithmetische Mittel zusammengefasster Daten aus drei biologischen Replikaten ( $n=3$ ) durchgeführt in technischen Triplikaten zur Verdeutlichung der Signifikanz für die Einzelbehandlungen von 1  $\mu$ M aDOT1Li und 1  $\mu$ M aPRMT5i oder deren Kombination (a-Komb.) nach 6 Tagen Behandlung. **(C)** Die Zielgenexpression von *HOXA9* nach Behandlung wurde mittels RT-qPCR gemessen. Die Balken zeigen das arithmetische Mittel aus drei biologischen Replikaten ( $n=3$ ) durchgeführt in technischen Triplikaten. Die Ergebnisse wurden auf 18S-rRNA normalisiert und DMSO-behandelte Zellen wurden als Kalibrator verwendet. **(D)** Für die Bestimmung der Apoptose wurde die Externalisierung von Phosphatidylserin mittels Annexin V-Färbung durchflusszytometrisch bestimmt. Balken zeigen das arithmetische Mittel zusammengefasster Daten aus drei biologischen Replikaten ( $n=3$ ) durchgeführt in technischen Triplikaten. Repräsentative durchflusszytometrische Analysen sind zusätzlich gezeigt. Fehlerbalken geben die SD an. Ein ungepaarter *t*-Test wurde verwendet. \* bedeutet  $p < 0,05$ . Daten publiziert in Secker et al., 2019.<sup>[157]</sup>



**Anhang 10: Eine Kombinationsbehandlung mit DOT1L- und PRMT5-Inhibition resultiert in einer bleibenden Proliferationsinhibition.** *t*(4;11)-rearrangierte (*MLL-AF4*) und *t*(9;11)-rearrangierte Zellen (*MLL-AF9*) wurden mit 1  $\mu$ M des DOT1L-Inhibitors (EPZ004777, DOT1Li), 1  $\mu$ M des PRMT5-Inhibitors (EPZ015666, PRMT5i), der Kombination beider Wirkstoffe (Komb.) oder DMSO für 6 Tage behandelt. Anschließend wurden die Behandlungen ausgewaschen, die Zellen ausgesät und über weitere 4 Tage analysiert (Tag 6+2, Tag 6+4). Für die Proliferationsbestimmung wurde die Zellzahl alle zwei Tage mittels Trypanblau-Färbung und der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Zusammengefasste Daten der Wachstumskurven (**A**) und die relative Zellzahl an Tag 6+4 (**B**) aus drei biologischen Replikaten ( $n=3$ ) durchgeführt in technischen Triplikaten sind gezeigt. T<sub>d</sub> bedeutet errechnete Verdopplungszeit. (**C**) Zusammengefasste Daten der Zellzyklusanalyse an Tag 6 und Tag 6+4 aus drei biologischen Replikaten ( $n=3$ ) durchgeführt in technischen Triplikaten sind gezeigt. Balken zeigen das arithmetische Mittel,



**Anhang 12: Meist differentiell exprimierte Gene t(4;11)-rearrangierter Zellen nach Behandlung mit 15  $\mu$ M PF-9366 im Vergleich zur DMSO-Behandlung.** Die 74 Gene, die nach adjustiertem p-Wert und aufsteigender Reihenfolge am meisten differentiell hoch- und herunterreguliert waren, sind gezeigt. Die Rohdaten wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Epigenetik des Instituts für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik des Universitätsklinikums Tübingen ausgewertet.

Genname	logFC	adjustierter P-Wert
VCAN	-1,75424241	2,3502E-17
MALAT1	1,23960918	5,5077E-15
ABCG1	4,53786533	6,8832E-12
NEAT1	1,54858668	3,6131E-11
CDKN1A	1,63818129	2,5831E-10
TARBP1	1,59297755	2,7678E-09
IFI6	1,54993958	8,3779E-08
PLAC8	-1,31980931	8,3779E-08
MT2A	-2,17730764	1,1129E-07
SOX4	-1,15971622	1,1281E-06
CXCR4	-0,94062791	2,1118E-06
ACPP	-1,89200163	3,9511E-06
PLIN2	1,19252527	7,5285E-06
CTSC	-1,03995125	9,7484E-06
MT-TL1	0,96366607	4,3491E-05
MAT2A	1,04809981	6,6571E-05
MT1H	-3,58994646	9,1747E-05
TYMP	0,91988146	0,00017035
MT-ND6	0,93029829	0,00017035
GABPB1-AS1	1,16341383	0,00023592
ACAT2	-1,02169596	0,00039853
ANP32E	-0,92615736	0,00105122
OAZ1	-0,67269662	0,00105122
ABCA1	3,0159732	0,00163224
IRF8	-0,91266434	0,00181206
HMGB2	-0,73968999	0,00215973
C19orf38	-2,13047762	0,00335439
TMEM97	-1,25392963	0,00394383
FGD2	-2,05658855	0,00578347
MAN2A2	1,07818151	0,00618254
LINC00685	2,01729224	0,00813506
CD14	0,70081371	0,00881832
NGFR	-3,0884782	0,0089542
MYLIP	0,87693769	0,00903504
VIM	-0,70787279	0,01359915
RB1	-1,27508179	0,01359915
PLTP	1,04604357	0,01359915
LAPTM5	0,67118504	0,01690308
MT1X	-1,56656477	0,019355
SRRM2	0,58245028	0,01935625
FASN	0,66011712	0,01935625
BCAT1	-0,86734093	0,0226492
SAPCD2	-0,82305676	0,02379786
FTH1	0,61891478	0,02473858
ACTA2	1,74733019	0,02473858
ETV1	-3,27142883	0,02533037
PSAT1	-0,95821737	0,02533037
JUN	0,94619992	0,02547328
MT1G	-2,49105465	0,03788124
IRS2	0,70454355	0,03864554
HTRA3	1,13739561	0,04771929
TGFB1	-0,76339965	0,05345073
CTSB	0,60951319	0,05450355
GOLGA8A	1,13291029	0,05450355
GGT5	-2,08399121	0,05450355
SLC20A1	0,71301397	0,05616531
STMN1	-0,55588437	0,06043213
TMEM158	2,21094617	0,06052583
CLEC5A	1,85066641	0,06739138
MDK	-3,43802962	0,06739138
MDM2	0,59029142	0,06739138
WSB1	0,6121163	0,06739138
LAMP5	-0,61469936	0,06739138

CPNE7	1,65893052	0,07569192
RNU4ATAC	-1,5679689	0,07666438
RPS27L	0,51840689	0,08337264
TFRC	0,65673972	0,0943774
CDK1	-0,72323939	0,0943774
FURIN	0,69614509	0,0943774
KCTD5	-0,82984697	0,0943774
FDPS	-0,59437789	0,09754882
DPYSL3	-1,21154341	0,09754882
WASF1	0,8929807	0,09786513
ALDOC	-1,11734961	0,09805786

TCGATGGAGGAGTTTGTAAATGAAGTACAGTTCATTACGATACACGTCTGCAGTCAACTGGAATTTTCATGAT  
TGAATTTTGTAAAGTATTTTAAAATAATTTTTCATATAAAGGTGAGTTTGTATTA AAAAGTACTGGTGGAGTATT  
TGATAGTGATTAACCTTATGTGTGACATGTTCTAATATAGTCACATTTTCATTATTTTATTTAAGGCCTGCTG  
AAATGACTGAAATATAAAGTGGTGGTGGAGCTGGTGGCCGTAGGCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTA  
ATTCAGAATCATTGTTGTGGACGAATATGATCCAACAATAGAGGTAATCCTGTTTTAATATGCATATTACTGGT  
GCAGGACCATTCTTTGATACAGATAAAGGTTTCTCTGACCATTTTCATGAGTACTTATTACAAGATAATTATGC  
TGAAAGTTAAGTTATCTGAAATGTACCTTGGGTTTCAAGTTATATGTAACCATAATATGGGAACTTTACTTTCC  
TTGGGAGTATGTCAGGGTCCATGATGTTCACTCTCTGTGCATTTTGATTGGAAGTGATTTTCAGAGTTTCGTG  
AGAGGGTAGAAATTTGTATCCTATCTGGACCTAAAAGACAATCTTTTTATTGTAACTTTATTTTTATGGGTTTC  
TTGGTATTGTGACATCATATGTAAGGTTAGATTTAATTGACTAGTGAAATATAATTGTTTGATGGTTGATTTT  
TTTAAACTTCATCAGCAGTATTTTCTATCTTCTTCTCAACATTAGAGAACCTACAACCTACCGGAT

**Anhang 13: Sequenzausschnitt des *kRas*-Gens zur Genomeditierung.** Exon (rot), Intron (schwarz), Primer (unterstrichen), sgRNA-Zielsequenzen (grün). Gezeigt sind der zu editierende Genabschnitt des *kRas*-Gens und die Lage der sgRNA-Zielsequenzen. Die zu editierende Base für eine dauerhafte Aktivierung ist fett und unterstrichen dargestellt.

ATGTAGAGTGGTTGTTAGGACTGAAAATGATTATTACTGAAACAGGATGTGAGAGATTATAATGAGTTGTCCA  
CTATTTATAATGTCACACAGGAATTCTGTTTCATCGCTGAGTGACACTCTTTTGTTCAGGCCCTTCCCITTC  
ATCCAAGACAACATCTCATTCTATGCAACAATTGGTGTGTTGCTCCTCTTCATTGTCGTTTTAACCTGCTAAT  
TTGTCACAAGTACAAAAAGGTAAGCAAGGTAAGAAATTCATTATTCTTCTCTATCTGCAGAACTGCCTAT  
TCCTAACTGACTCATCTTTTCATCTCTGAAGCAATTTAGGTATGAAAGCCAGCTACAGATGGTACAGGTGACC  
GGCTCCTCAGATAATGAGTACTTCTACGTTGATTTTCAGAGAATATGAATATGATCTCAATGGGAGTTTCCAA  
GAGAAAATTTAGAGTTTGGTAAGAATGGAATGTGCCAATGTTTCTGCAGCATTTCTTTCCATTGGAAAATCT  
TTAAAATGCACGTAATCACCATTTGTCTTTGCAGGGAAGGTAAGGATCAGGTGCTTTTGGAAAAGTGATGA  
ACGCAACAGCTTATGGAATTAGCAAAAAGAGGAGTCTCAATCCAGGTTGCCGTCAAATGCTGAAAGGTACAG  
TATAGTGAAGGACAGCAACAAAGATGCACAAAATGGGAGGCACAGTTTCCCACCCATGCCTTCTTCTCTTT  
TCCATCCTTTAATGGTTACTGTTTGCCATGTTTCA

**Anhang 14: Sequenzausschnitt des *FLT3*-Gens zur Genomeditierung.** Exon (rot), Intron (schwarz), Primer (unterstrichen), sgRNA-Zielsequenzen (grün). Gezeigt sind der zu editierende Genabschnitt des *FLT3*-Gens und die Lage der sgRNA-Zielsequenzen. Die Sequenz, die bei einer *internal tandem duplication* (ITD) wiederholt wird, ist kursiv und unterstrichen dargestellt.

## Anhang

ATAAGGGAAACGGTTGTATGCATTTTATTGCAGACATTCTCTGAAATAATTTTTAGCCACAAGCAAATAGCTCT  
 GTTTCTGTGAGTCATCATTCTTCTTATATAGTGCTGGATAAAGAATTCTATTTTGTAGATAGAGATTTATGACT  
 TCCAGAAAGAAAGCTGCAAAAATGGAAGTTTCCAAAGAATTTAAGATTTGCTATAATAAATGCTATCATATATT  
 GGTGTTTGAGATGCAAATGTACATATCTGTGTATCATATATTGGAGGTTGATTGAAAATCGGAGTTTGAGATG  
 CAAGTATAGGTATCTGTGGTTGATGCAGTTTTCTAAAACGTCATGATTTTCAATGGCAAGTAAGTTATTTATG  
 GTCGTTTTTAAGGATAAGCTGTTAACGTGTTTTTTTTTTCTTTTTTTTTTCAGCTTCCAATAAAAAACAGGACAGCA  
 GAACACACATACCAAGTCAGTACTGAGCACACAAGGAATGTCTAATCAATATTTCCAATACAAGTTTTCTT  
 TGGTTATAAGCGGCCTCACTACTATTTAAAGAATGTTAACAAATATG GTGAGTATTTGGGTTACTGTGTTTTGG  
 GGAATTTGCTTTCTTTCTTTTTGATTA AAAAGTTAGAACAGCATATTTGAAGTATGGAAAGTGATTTTCTGT  
 GGACTTTGGATATAACCATTAATCTTATTTGTTTACGAGCACAGATAACCTTTTA

**Anhang 15: Sequenzausschnitt des NF1-Gens zur Genomeditierung.** Exon (rot), Intron (schwarz), Primer (unterstrichen), sgRNA-Zielsequenzen (grün). Gezeigt sind der zu editierende Genabschnitt des NF1-Gens und die Lage der sgRNA-Zielsequenzen. Um einen *frame shift* zu gewährleisten, wird der *knock-out* durch zwei sgRNAs durchgeführt.

## Anhang 16: Primersequenzen für die sgRNA-Produktion

vorwärts (*forward*, fwd), rückwärts (*reverse*, rev)

Name	Sequenz (5'3')
<i>kRas</i> sgRNA1 fwd	taatacgcactactataGGAGTTGGAGCTGGTGGCGTgttttagagctagaaATAGC
<i>kRas</i> sgRNA2 fwd	taatacgcactactataGGATATAAACTTGTGGTAGTgttttagagctagaaATAGC
<i>kRas</i> sgRNA3 fwd	taatacgcactactataGGAATATGATCCAACAATAGgttttagagctagaaATAGC
<i>FLT3</i> sgRNA1 fwd	taatacgcactactataGGATGTTGTCTTGGATGAAAgttttagagctagaaATAGC
<i>FLT3</i> sgRNA2 fwd	taatacgcactactataGGACTCATTATCTGAGGAGCgttttagagctagaaATAGC
<i>FLT3</i> sgRNA3 fwd	taatacgcactactataGGTTATGGAATTAGCAAAACgttttagagctagaaATAGC
<i>NF1</i> sgRNA1 fwd	taatacgcactactataGGTGTGCTCAGTACTGACTTgttttagagctagaaatagc
<i>NF1</i> sgRNA2 fwd	taatacgcactactataGGATTCTTTAAAATAGTAGTgttttagagctagaaatagc
universal rev	AGCACCGACTCGGTGCCACT

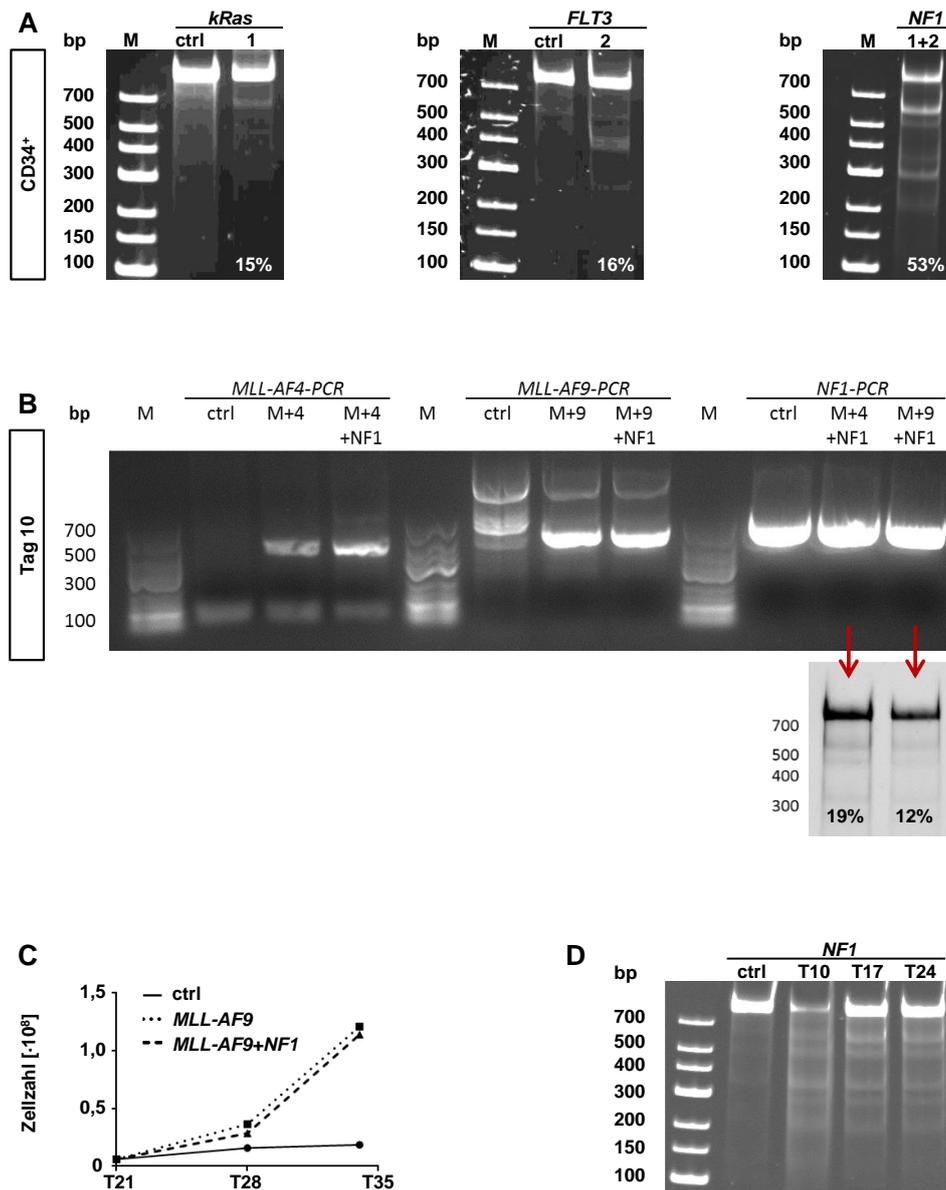
## Anhang 17: Analyseprimer für *kRas*, *FLT3* und *NF1*

vorwärts (*forward*, fwd), rückwärts (*reverse*, rev)

Name	Sequenz (5'3')	Temperatur
<i>kRas</i> fwd	GTCGATGGAGGAGTTTGTAATGAAG	64 °C
<i>kRas</i> rev	ATCCGGTAGTTGTAGGTTCTCTAATG	
<i>FLT3</i> fwd	ATGTAGAGTGGTTGTTAGGACTGAAA	58 °C
<i>FLT3</i> rev	TGAAACATGGCAAACAGTAACCATTA	
<i>NF1</i> fwd	ATAAGGGAAACGGTTGTATGCATTTT	60 °C
<i>NF1</i> rev	TAAAAGGTTATCTGTGCTCGTAAACA	

## Anhang 18: Sequenzen für ssODN-Korrektur

Name	Sequenz (5'3')
<i>kRas</i>	A TAT TAA AAC AAG ATT TAC CTC TAT TGT TGG ATC ATA TTC GTC CAC mit <i>silent mutations</i> , XhoI cut site und gewünschter Mutation AAA ATG ATT CTG AAT TAG CTG TAT CGT CAA GGC ACT CTT GCC TAC GCC A TC <u>GGC GCC</u> TAC TAC TAC AAG TTT ATA TTC AGT CAT
<i>FLT3</i>	AAC TGA CTC ATC ATT TCA TCT CTG AAG CAA TTT AGG TAT GAA AGC mit <i>silent mutations</i> und XhoI cut site CAG CTA CAG ATG GTA CAG GTG ACA <u>GGA TCT</u> TCA GAT AAT GAG TAC <u>TTC TAC GTT GAT TTC AGA GAA TAT GGC TCT TCA GAT AAT GAG TAC</u> <u>TTC TAC GTT GAT TTC AGA GAA TAT</u> GAA TAT GAT CTC AAA TGG GAG TTT CCA AGA GAA AAT TTA



**Anhang 19: Etablierung von Sekundärmutationen.** (A) Die Polyacrylamid-Gel-Bilder zeigen repräsentative Ergebnisse des T7-Endonuclease-I-Assays von CD34<sup>+</sup> HSPCs aus huCB, die mit sgRNAs für *kRas* (sgRNA1), *FLT3* (sgRNA2) und *NF1* (sgRNA1+2) sowie Cas9-Protein nukleofiziert wurden. Zellen, die nur mit Cas9-Protein behandelt wurden, dienen als jeweilige Kontrollen (ctrl). Die Menge an verdauten PCR-Produkten definierter Größe (*base pairs*, bp) repräsentiert die durch NHEJ entstandene fehlerhafte Reparatur der DSB und wurde mittels T7-Endonuclease-I-Assay und ImageJ quantifiziert. Schneideeffizienzen in %. (B) Die jeweiligen sgRNAs für *KMT2A* (*MLL*) und *AFF1* (*AF4*) oder *MLLT3* (*AF9*) wurden zur Translokationsinduktion entsprechend paarweise verwendet. Zusätzlich wurden die sgRNAs für *NF1* entsprechend zugesetzt. Zellen, die nur mit Cas9-Protein behandelt wurden, dienen als Kontrolle (ctrl). Repräsentative Agarose-Gel-Bilder positiver PCR-Produkte definierter Größe (bp) für *t*(4;11) (*MLL-AF4*), *t*(9;11) (*MLL-AF9*) und *NF1* von CD34<sup>+</sup> HSPCs aus huCB an Tag 10 sind gezeigt. Das *NF1*-PCR-Produkt wurde zusätzlich mit dem T7-Endonuclease-I-Assay untersucht (roter Pfeil). Schneideeffizienzen in %. (C) Die Proliferation *t*(9;11)-rearrangierter Zellen ohne (*MLL-AF9*) und mit *NF1*-knock-out (*MLL-AF9+NF1*) und Kontrollzellen (ctrl), die nur mit Cas9-Protein behandelt wurden, wurde nach Translokationsidentifikation überwacht. Gezeigt sind die errechneten Gesamtzellzahlen repräsentativer Kulturen. (D) Das *NF1*-PCR-Produkt wurde über die Zeit in *t*(9;11)-rearrangierten und in Kontrollzellen mit dem T7-Endonuclease-I-Assay überwacht. Eine Editierung persistiert.

## 8 Literaturverzeichnis

- [1] Röllig C, Beelen DW, Braess J, Greil R, Niederwieser D, Passweg J, Reinhardt D, Schlenk RF. Empfehlungen der Fachgesellschaft zur Diagnostik und Therapie hämatologischer und onkologischer Erkrankungen – Leitlinie Akute Myeloische Leukämie (AML). *DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie*. 2018 Apr. [www.onkopedia.com](http://www.onkopedia.com)
- [2] Gökbüget N, Baldus C, Brüggemann M, Hauswirth AW, Schanz U. Empfehlungen der Fachgesellschaft zur Diagnostik und Therapie hämatologischer und onkologischer Erkrankungen – Leitlinie Akute Lymphatische Leukämie (ALL). *DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie*. 2018 Feb. [www.onkopedia.com](http://www.onkopedia.com)
- [3] Seita J, Weissman IL. Hematopoietic Stem Cell: Self-renewal versus Differentiation. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*. 2010 Nov-Dec; 2(6): 640-653.
- [4] Mezey E. On the origin of blood cells - Hematopoiesis revisited. *Oral Diseases*. 2016 May, 22(4): 247-248.
- [5] BioRender <https://biorender.com/> [17.07.2019;11:18 Uhr]
- [6] Kraywinkel K, Spix C. Epidemiologie akuter Leukämien in Deutschland. *Der Onkologe*. 2017 Jul, 23(7):499-503.
- [7] American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2019. *American Cancer Society*. 2019.
- [8] Juliusson G, Antunovic P, Derolf A, Lehmann S, Möllgård L, Stockelberg D, Tidfeldt U, Wahlin A, Höglund M. Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry. *Blood*. 2009 Apr, 113(4):4179-4187.
- [9] Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2016, *National Cancer Institute*. Bethesda, MD, [https://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2016/](https://seer.cancer.gov/csr/1975_2016/), based on November 2018 SEER data submission, posted to the SEER web site. 2019 Apr.
- [10] Kaatsch P, Spix C, German Childhood Cancer Registry - Report 2012 (1980-2012). *Institute of Medical Biostatistics, Epidemiology and Informatics (IMBEI) at the University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz*. 2013 Nov.
- [11] Swerdlow SH, Campo 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] ICD-10-GM Version 2019, Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme, 10. Revision - German Modification. *Deutsches Institut für Medizinische Dokumentation und Information (DIMDI) im Auftrag des Bun-*

- desministeriums für Gesundheit (BMG) unter Beteiligung der Arbeitsgruppe ICD des Kuratoriums für Fragen der Klassifikation im Gesundheitswesen (KKG). 2019.
- [13] International statistical classification of diseases and related health problems. 10<sup>th</sup> revision. Fifth edition. *WHO Library Cataloguing-in-Publication Data*. 2016
- [14] International statistical classification of diseases and related health problems. 11<sup>th</sup> revision. Submitted for start of using ICD-11 on 1 January 2022. *WHO*. 2018 Jun.
- [15] Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *British Journal of Haematology*. 1976 Aug, 33(4):451-458.
- [16] Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Annals of Internal Medicine*. 1985 Oct, 103(4):620-625.
- [17] Walter RW, Othus M, Burnett AK, Löwenberg B, Kantarjian HM, Ossenkoppele GJ; Hills RK, van Montfort KGM, Ravandi F, Evans A, Pierce SR, Appelbaum FR; Estey EH. Significance of FAB subclassification of “acute myeloid leukemia, NOS” in the 2008 WHO classification: analysis of 5848 newly diagnosed patients. *Blood* 2013 Mar, 121(3):2424-2431.
- [18] Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellström-Lindberg E, Tefferi A; Bloomfield CD. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009 Jul, 114(5):937-951.
- [19] Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, van't Veer MB. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia*. 1995 Oct, 9(10):1783-1786.
- [20] Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, Bloomfield CD, Cazzola M, Vardiman JW. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016 May, 127(20):2391-2405.
- [21] Kreuzer K-A, Bettelheim P, Haferlach T, Rosenwald A. Empfehlungen der Fachgesellschaft zur Diagnostik und Therapiehämatologischer und onkologischer Erkrankungen – Leitlinie Hämatologische Diagnostik. *DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie*. 2018 Mai. [www.onkopedia.com](http://www.onkopedia.com)
- [22] Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK, Dombret H, Fenaux P, Grimwade D, Larson RA, Lo-Coco F, Naoe T, Niederwieser D, Ossenkoppele GJ, Sanz MA, Sierra J, Tallman MS, Löwenberg B, Bloomfield CD; European Leukemia-Net. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations

- from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2010 Jan, 115(3):453-474.
- [23] Creutzig U, Dworzak M, Reinhardt D. Akute myeloische Leukämie – AML – im Kindes- und Jugendalter. *Deutsche Gesellschaft für Kinderheilkunde und Jugendmedizin (DGKJ), Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH)*. 2019 Mrz. [www.awmf.org/leitlinien](http://www.awmf.org/leitlinien)
- [24] Escherich G, Schrappe M, Creutzig U. Akute lymphoblastische Leukämie – ALL – im Kindesalter. *Deutsche Gesellschaft für Kinderheilkunde und Jugendmedizin (DGKJ), Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH)*. 2016 Apr. [www.awmf.org/leitlinien](http://www.awmf.org/leitlinien)
- [25] Milne TA, Briggs SD, Brock HW, Martin ME, Gibbs D, Allis CD, Hess JL. MLL Targets SET Domain Methyltransferase Activity to *Hox* Gene Promoters. *Molecular Cell*. 2002 Nov, 10:1107-1117.
- [26] Hess JL, Yu BD, Li B, Hanson R, Korsmeyer SJ. Defects in yolk sac hematopoiesis in Mll-null embryos. *Blood*. 1997 Sep, 90(5):1799-1806.
- [27] McMahon KA, Hiew SY, Hadjur S, Veiga-Fernandes H, Menzel U, Price AJ, et al. Mll has a critical role in fetal and adult hematopoietic stem cell self-renewal. *Cell stem cell*. 2007 Sep, 1(3):338-345.
- [28] Okada Y, Feng Q, Lin Y, Jiang Q, Li Y, Coffield VM, Su L, Xu G, Zhang Y. hDOT1L links histone methylation to leukemogenesis. *Cell*. 2005 Apr, 121(2):167-78.
- [29] Hsieh JJD, Cheng EHY, Korsmeyer SJ. Taspase1: A Threonine Aspartase Required for Cleavage of MLL and Proper *HOX* Gene Expression. *Cell*. 2003 Oct, 115(3):293-303.
- [30] Marschalek R. Systematic Classification of Mixed-Lineage Leukemia Fusion Partners Predicts Additional Cancer Pathways. *Annals of Laboratory medicine*. 2016 Mar, 36(2):85-100.
- [31] Nakamura T, Mori T, Tada S, Krajewski W, Rozovskaia T, Wassell R, Dubois G, Mazo A, Croce CM, Canaani E. ALL-1 is a histone methyltransferase that assembles a supercomplex of proteins involved in transcriptional regulation. *Molecular Cell*. 2002 Nov, 10(5):1119-1128.
- [32] Yokoyama A, Wang Z, Wysocka J, Sanyal M, Aufiero DJ, Kitabayashi I, Herr W, Cleary ML. Leukemia proto-oncoprotein MLL forms a SET1-like histone methyltransferase complex with menin to regulate Hox gene expression. *Molecular and Cell Biology*. 2004 Jul, 24(13):5639-5649.
- [33] Milne TA, Hughes CM, Lloyd R, Yang Z, Rozenblatt-Rosen O, Dou Y, Schnepf RW, Krankel C, Livolsi VA, Gibbs D, Hua X, Roeder RG, Meyerson M, Hess JL. 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 Jan 18, 102(3):749-754.

- [34] Ernst P, Wang J, Huang M, Goodman RH, Korsmeyer SJ. MLL and CREB Bind Cooperatively to the Nuclear Coactivator CREB-Binding Protein. *Molecular and Cell Biology*. 2001 Apr, 21(7): 2249-2258.
- [35] Chang PY, Hom RA, Musselman CA, Zhu L, Kuo A, Gozani O, Kutateladze TG, Cleary ML. Binding of the MLL PHD3 finger to histone H3K4me3 is required for MLL-dependent gene transcription. *Journal of Molecular Biology*. 2010 Jul 9, 400(2):137-144.
- [36] Hom RA, Chang PY, Roy S, Musselman CA, Glass KC, Selezneva AI, Gozani O, Ismagilov RF, Cleary ML, Kutateladze TG. Molecular mechanism of MLL PHD3 and RNA recognition by the Cyp33 RRM domain. *Journal of Molecular Biology*. 2010 Jul, 400(2):145-154.
- [37] Wang Z, Song J, Milne TA, Wang GG, Li H, Allis CD, Patel DJ. Pro isomerization in MLL1 PHD3-bromo cassette connects H3K4me readout to Cyp33 and HDAC-mediated repression. *Cell*. 2010 Jun, 141(7):1183-1194.
- [38] Meyer C, Burmeister T, Gröger D, Tsauro G, Fechina L, Renneville A, Sutton R, Venn NC, Emerenciano M, Pombo-de-Oliveira MS, Barbieri Blunck C, Almeida Lopes B, Zuna J, Trka J, Ballerini P, Lapillonne H, De Braekeleer M, Cazzaniga G, Corral Abascal L, van der Velden VHJ, Delabesse E, Park TS, Oh SH, Silva MLM, Lund-Aho T, Juvonen V, Moore AS, Heidenreich O, Vormoor J, Zerkalenkova E, Olshanskaya Y, Bueno C, Mendez P, Teigler-Schlegel A, Zur Stadt U, Lentjes J, Göhring G, Kustanovich A, Aleinikova O, Schäfer BW, Kubetzko S, Madsen HO, Gruhn B, Duarte X, Gameiro P, Lippert E, Bidet A, Cayuela JM, Clappier E, Alonso CN, Zwaan CM, van den Heuvel-Eibrink MM, Izraeli S, Trakhtenbrot L, Archer P, Hancock J, Möricke A, Alten J, Schrappe M, Stanulla M, Strehl S, Attarbaschi A, Dworzak M, Haas OA, Panzer-Grümayer R, Sedék L, Szczepański T, Caye A, Suarez L, Cavé H, Marschalek R. The MLL recombinome of acute leukemias in 2017. *Leukemia*. 2018 Feb, 32(2):273-284.
- [39] Nilson I, Löchner K, Siegler G, Greil J, Beck JD, Fey GH, Marschalek R. Exon/intron structure of the human ALL-1 (MLL) gene involved in translocations to chromosomal region 11q23 and acute leukaemias. *British Journal of Haematology*. 1996 Jun, 93(4):966-972.
- [40] Zhang Y, Chen A, Yan XM, Huang G. Disordered epigenetic regulation in MLL-related leukemia. *International Journal of Hematology*. 2012 Oct, 96(4):428-437.
- [41] Chen J, Santillan DA, Koonce M, Wei W, Luo R, Thirman MJ, Zeleznik-Le NJ, Diaz MO. Loss of MLL PHD finger 3 is necessary for MLL-ENL-induced hematopoietic stem cell immortalization. *Cancer Research*. 2008 Aug, 68(15):6199-6207.
- [42] Muntean AG, Giannola D, Udager AM, Hess JL. The PHD fingers of MLL block MLL fusion protein-mediated transformation. *Blood*. 2008 Dec, 112(12):4690-4693.
- [43] Emerenciano M, Meyer C, Mansur MB, Marschalek R, Pombo-de-Oliveira MS; Brazilian Collaborative Study Group of Infant Acute Leukaemia. The distribution of MLL break-

- points correlates with outcome in infant acute leukaemia. *British Journal of Haematology*. 2013 Apr, 161(2):224-236.
- [44] Wang J, Muntean AG, Hess JL. ECSASB2 mediates MLL degradation during hematopoietic differentiation. *Blood*. 2012 Feb, 119(5):1151-1161.
- [45] Benedikt A, Baltruschat S, Scholz B, Bursen A, Arrey TN, Meyer B, Varagnolo L, Müller AM, Karas M, Dingermann T, Marschalek R. The leukemogenic AF4-MLL fusion protein causes P-TEFb kinase activation and altered epigenetic signatures. *Leukemia*. 2011 Jan, 25(1):135-144.
- [46] Orlovsky K, Kalinkovich A, Rozovskaia T, Shezen E, Itkin T, Alder H, et al. Down-regulation of homeobox genes MEIS1 and HOXA in MLL-rearranged acute leukemia impairs engraftment and reduces proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011 May, 108(19):7956-7961.
- [47] Daigle SR, Olhava EJ, Therkelsen CA, Majer CR, Sneeringer CJ, Song J, Johnston LD, Scott MP, Smith JJ, Xiao Y, Jin L, Kuntz KW, Chesworth R, Moyer MP, Bernt KM, Tseng JC, Kung AL, Armstrong SA, Copeland RA, Richon VM, Pollock RM. Selective killing of mixed lineage leukemia cells by a potent small-molecule DOT1L inhibitor. *Cancer Cell*. 2011 Jul, 20(1):53-65.
- [48] Daigle SR, Olhava EJ, Therkelsen CA, Basavapathruni A, Jin L, Boriack-Sjodin PA, Allain CJ, Klaus CR, Raimondi A, Scott MP, Waters NJ, Chesworth R, Moyer MP, Copeland RA, Richon VM, Pollock RM. Potent inhibition of DOT1L as treatment of MLL-fusion leukemia. *Blood*. 2013 Aug, 122(6):1017-1025.
- [49] Stein EM, Garcia-Manero G, Rizzieri DA, Tibes R, Berdeja JG, Savona MR, Jongen-Lavrenic M, Altman JK, Thomson B, Blakemore SJ, Daigle SR, Waters NJ, Suttle AB, Clawson A, Pollock R, Krivtsov A, Armstrong SA, DiMartino J, Hedrick E, Löwenberg B, Tallman MS. The DOT1L inhibitor pinometostat reduces H3K79 methylation and has modest clinical activity in adult acute leukemia. *Blood*. 2018 Jun, 131(24):2661-2669.
- [50] Serio J, Ropa J, Chen W, Mysliwski M, Saha N, Chen L, Wang J, Miao H, Cierpicki T, Grembecka J, Muntean AG. The PAF complex regulation of Prmt5 facilitates the progression and maintenance of MLL fusion leukemia. *Oncogene*. 2018 Jan, 37(4):450-460.
- [51] Pal S, Vishwanath SN, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sif S. Human SWI/SNF-associated PRMT5 methylates histone H3 arginine 8 and negatively regulates expression of ST7 and NM23 tumor suppressor genes. *Molecular and Cellular Biology*. 2004 Nov, 24:9630–9645.
- [52] Hsu JM, Chen CT, Chou CK, Kuo HP, Li LY, Lin CY, Lee HJ, Wang YN, Liu M, Liao HW, Shi B, Lai CC, Bedford MT, Tsai CH, Hung MC. Crosstalk between Arg 1175 methylation and Tyr 1173 phosphorylation negatively modulates EGFR-mediated ERK activation. *Nature Cell Biology*. 2011 Feb, 13:174-181.

- [53] Zheng S, Moehlenbrink J, Lu YC, Zalmas LP, Sagum CA, Carr S, McGouran JF, Alexander L, Fedorov O, Munro S, Kessler B, Bedford MT, Yu Q, La Thangue NB. Arginine methylation-dependent reader-writer interplay governs growth control by E2F-1. *Molecular Cell*. 2013 Oct, 52(1):37-51.
- [54] Jansson M, Durant ST, Cho EC, Sheahan S, Edelmann M, Kessler B, La Thangue NB. Arginine methylation regulates the p53 response. *Nature Cell Biology*. 2008 Dec, 10(12):1431-1439.
- [55] Kaushik S, Liu F, Veazey KJ, Gao G, Das P, Neves LF, Lin K, Zhong Y, Lu Y, Giuliani V, Bedford MT, Nimer SD, Santos MA. Genetic deletion or small-molecule inhibition of the arginine methyltransferase PRMT5 exhibit anti-tumoral activity in mouse models of MLL-rearranged AML. *Leukemia*. 2018 Feb, 32(2):499-509.
- [56] Zhang Y, Zhang YJ, Zhao HY, Zhai QL, Zhang Y, Shen YF. The impact of R213 mutation on p53-mediated p21 activity. *Biochimie*. 2014 Apr, 99:215-218.
- [57] Gerhart SV, Kellner WA, Thompson C, Pappalardi MB, Zhang XP, Montes de Oca R, Penebre E, Duncan K, Boriack-Sjodin A, Le B, Majer C, McCabe MT, Carpenter C, Johnson N, Kruger RG, Barbash O. Activation of the p53-MDM4 regulatory axis defines the anti-tumour response to PRMT5 inhibition through its role in regulating cellular splicing. *Scientific Reports*. 2018 Jun, 8(1):9711.
- [58] Muntean AG, Tan J, Sitwala K, Huang Y, Bronstein J, Connelly JA, Basrur V, Elenitoba-Johnson KS, Hess JL. The PAF complex synergizes with MLL fusion proteins at HOX loci to promote leukemogenesis. *Cancer Cell*. 2010 Jun, 17(6):609-621.
- [59] Muntean AG, Chen W, Jones M, Granowicz EM, Maillard I, Hess JL. MLL fusion protein-driven AML is selectively inhibited by targeted disruption of the MLL-PAF<sub>c</sub> interaction. *Blood*. 2013 Sep, 122(11):1914-1922.
- [60] Mato JM, Alvarez L, Ortiz P, Pajares MA. S-adenosylmethionine synthesis: molecular mechanisms and clinical implications. *Pharmacology & Therapeutics*. 1997, 73(3):265-280.
- [61] Chiang PK, Gordon RK, Tal J, Zeng GC, Doctor BP, Pardhasaradhi K, McCann PP. S-Adenosylmethionine and methylation. *FASEB Journal*. 1996 Mar, 10(4):471-480.
- [62] Timp W, Feinberg AP. Cancer as a dysregulated epigenome allowing cellular growth advantage at the expense of the host. *Nature Reviews. Cancer*. 2013 Jul, 13(7):497-510.
- [63] Lu SC, Mato JM. S-adenosylmethionine in liver health, injury, and cancer. *Physiological Reviews*. 2012 Oct, 92(4):1515-1542.
- [64] Horikawa S, Tsukada K. Molecular cloning and developmental expression of a human kidney S-adenosylmethionine synthetase. *FEBS Letters*. 1992 Nov, 312(1):37-41.
- [65] Alvarez L, Corrales F, Martín-Duce A, Mato JM. Characterization of a full-length cDNA encoding human liver S-adenosylmethionine synthetase: tissue-specific gene ex-

- pression and mRNA levels in hepatopathies. *The Biochemical Journal*. 1993 Jul, 293 (Pt2):481-486.
- [66] Kotb M, Mudd SH, Mato JM, Geller AM, Kredich NM, Chou JY, Cantoni GL. Consensus nomenclature for the mammalian methionine adenosyltransferase genes and gene products. *Trends in Genetics*. 1997 Feb, 13(2):51-52.
- [67] De La Rosa J, Ostrowski J, Hryniewicz MM, Kredich NM, Kotb M, LeGros HL Jr, Valentine M, Geller AM. Chromosomal localization and catalytic properties of the recombinant alpha subunit of human lymphocyte methionine adenosyltransferase. *The Journal of Biological Chemistry*. 1995 Sep, 270(37):21860-21868.
- [68] LeGros HL Jr, Halim AB, Geller AM, Kotb M. Cloning, expression, and functional characterization of the beta regulatory subunit of human methionine adenosyltransferase (MAT II). *The Journal of Biological Chemistry*. 2000 Jan, 275(4):2359-2366.
- [69] Zeng Z, Yang H, Huang ZZ, Chen C, Wang J, Lu SC. The role of c-Myb in the up-regulation of methionine adenosyltransferase 2A expression in activated Jurkat cells. *The Biochemical Journal*. 2001 Jan, 353(Pt 1):163-168.
- [70] Chen H, Xia M, Lin M, Yang H, Kuhlenkamp J, Li T, Sodir NM, Chen YH, Josef-Lenz H, Laird PW, Clarke S, Mato JM, Lu SC. Role of methionine adenosyltransferase 2A and S-adenosylmethionine in mitogen-induced growth of human colon cancer cells. *Gastroenterology*. 2007 Jul, 133(1):207-218.
- [71] Jani TS, Gobejishvili L, Hote PT, Barve AS, Joshi-Barve S, Kharebava G, Suttles J, Chen T, McClain CJ, Barve S. Inhibition of methionine adenosyltransferase II induces FasL expression, Fas-DISC formation and caspase-8-dependent apoptotic death in T leukemic cells. *Cell Research*. 2009 Mar, 19(3):358-369.
- [72] Liu Q, Wu K, Zhu Y, He Y, Wu J, Liu Z. Silencing MAT2A gene by RNA interference inhibited cell growth and induced apoptosis in human hepatoma cells. *Hepatology Research*. 2007 May, 37(5):376-388.
- [73] Chen H, Xia M, Lin M, Yang H, Kuhlenkamp J, Li T, Sodir NM, Chen YH, Josef-Lenz H, Laird PW, Clarke S, Mato JM, Lu SC. Role of methionine adenosyltransferase 2A and S-adenosylmethionine in mitogen-induced growth of human colon cancer cells. *Gastroenterology*. 2007 Jul, 133(1):207-218.
- [74] Lombardini JB, Coulter AW, Talalay P. Analogues of methionine as substrates and inhibitors of the methionine adenosyltransferase reaction. Deductions concerning the conformation of methionine. *Molecular Pharmacology*. 1970 Sep, 6(5):481-499.
- [75] Quinlan CL, Kaiser SE, Bolaños B, Nowlin D, Grantner R, Karlicek-Bryant S, Feng JL, Jenkinson S, Freeman-Cook K, Dann SG, Wang X, Wells PA, Fantin VR, Stewart AE, Grant SK. Targeting S-adenosylmethionine biosynthesis with a novel allosteric inhibitor of Mat2A. *Nature Chemical Biology*. 2017 Jul, 13(7):785-792.
- [76] Royal Society of Chemistry. <http://www.chemspider.com/> . Accessed 10/2019

- [77] Isnard P, Coré N, Naquet P, Djabali M. Altered lymphoid development in mice deficient for the mAF4 proto-oncogene. *Blood*. 2000 Jul, 96(2):705-710.
- [78] Peterlin BM, Price DH. Controlling the elongation phase of transcription with P-TEFb. *Molecular Cell*. 2006 Aug, 23(3):297-305.
- [79] Winters AC, Bernt KM. MLL-Rearranged Leukemias-An Update on Science and Clinical Approaches. *Frontiers in Pediatrics*. 2017 Feb, 5:4.
- [80] Li Y, Wen H, Xi Y, Tanaka K, Wang H, Peng D, Ren Y, Jin Q, Dent SY, Li W, Li H, Shi X. AF9 YEATS domain links histone acetylation to DOT1L-mediated H3K79 methylation. *Cell*. 2014 Oct, 159(3):558-571.
- [81] Hemenway CS, de Erkenez AC, Gould GC. The polycomb protein MPc3 interacts with AF9, an MLL fusion partner in t(9;11)(p22;q23) acute leukemias. *Oncogene*. 2001 Jun, 20(29):3798-3805.
- [82] Nilson I, Reichel M, Ennas MG, Greim R, Knörr C, Siegler G, Greil J, Fey GH, Marschalek R. 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. *British Journal of Haematology*. 1997 Jul, 98(1):157-169.
- [83] Strissel PL, Strick R, Tomek RJ, Roe BA, Rowley JD, Zeleznik-Le NJ. 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 Jul, 9(11):1671-1679.
- [84] Andersson AK, Ma J, Wang J, Chen X, Gedman AL, Dang J, Nakitandwe J, Holmfeldt L, Parker M, Easton J, Huether R, Kriwacki R, Rusch M, Wu G, Li Y, Mulder H, Raimondi S, Pounds S, Kang G, Shi L, Becksfort J, Gupta P, Payne-Turner D, Vadodaria B, Boggs K, Yergeau D, Manne J, Song G, Edmonson M, Nagahawatte P, Wei L, Cheng C, Pei D, Sutton R, Venn NC, Chetcuti A, Rush A, Catchpoole D, Heldrup J, Fioretos T, Lu C, Ding L, Pui CH, Shurtleff S, Mullighan CG, Mardis ER, Wilson RK, Gruber TA, Zhang J, Downing JR; St. Jude Children's Research Hospital–Washington University Pediatric Cancer Genome Project. The landscape of somatic mutations in infant MLL-rearranged acute lymphoblastic leukemias. *Nature Genetics*. 2015 Apr, 47(4):330-337.
- [85] Cancer Genome Atlas Research Network, Ley TJ, Miller C, Ding L, Raphael BJ, Mungall AJ, Robertson A, Hoadley K, Triche TJ Jr, Laird PW, Baty JD, Fulton LL, Fulton R, Heath SE, Kalicki-Veizer J, Kandoth C, Klco JM, Koboldt DC, Kanchi KL, Kulkarni S, Lamprecht TL, Larson DE, Lin L, Lu C, McLellan MD, McMichael JF, Payton J, Schmidt H, Spencer DH, Tomasson MH, Wallis JW, Wartman LD, Watson MA, Welch J, Wendl MC, Ally A, Balasundaram M, Birol I, Butterfield Y, Chiu R, Chu A, Chuah E, Chun HJ, Corbett R, Dhalla N, Guin R, He A, Hirst C, Hirst M, Holt RA, Jones S, Karsan A, Lee D, Li HI, Marra MA, Mayo M, Moore RA, Mungall K, Parker J, Pleasance E, Plettner P, Schein J, Stoll D, Swanson L, Tam A, Thiessen N, Varhol R, Wye N, Zhao Y, Gabriel S,

- Getz G, Sougnez C, Zou L, Leiserson MD, Vandin F, Wu HT, Applebaum F, Baylin SB, Akbani R, Broom BM, Chen K, Motter TC, Nguyen K, Weinstein JN, Zhang N, Ferguson ML, Adams C, Black A, Bowen J, Gastier-Foster J, Grossman T, Lichtenberg T, Wise L, Davidsen T, Demchok JA, Shaw KR, Sheth M, Sofia HJ, Yang L, Downing JR, Eley G. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2013 May, 368(22):2059-2074.
- [86] Liu H, Cheng EH, Hsieh JJ. MLL fusions: pathways to leukemia. *Cancer Biology and Therapy*. 2009 Jul, 8(13):1204-1211.
- [87] Bruserud O, Gjertsen BT, Foss B, Huang TS. 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*. 2001 Jan, 19(1):1-11.
- [88] Rynningen A, Stapnes C, Bruserud Ø. Clonogenic acute myelogenous leukemia cells are heterogeneous with regard to regulation of differentiation and effect of epigenetic pharmacological targeting. *Leukemia Research*. 2007 Sep, 31(9):1303-1313.
- [89] Boutter J, Huang Y, Marovca B, Vonderheit A, Grotzer MA, Eckert C, Cario G, Wollscheid B, Horvath P, Bornhauser BC, Bourquin JP. Image-based RNA interference screening reveals an individual dependence of acute lymphoblastic leukemia on stromal cysteine support. *Oncotarget*. 2014 Nov, 5(22):11501-11512.
- [90] Manabe A, Coustan-Smith E, Behm FG, Raimondi SC, Campana D. Bone marrow-derived stromal cells prevent apoptotic cell death in B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1992 May, 79(9):2370-2377.
- [91] Mihara K, Imai C, Coustan-Smith E, Dome JS, Dominici M, Vanin E, Campana D. Development and functional characterization of human bone marrow mesenchymal cells immortalized by enforced expression of telomerase. *British Journal of Haematology*. 2003 Mar, 120(5):846-849.
- [92] Drexler HG, Quentmeier H, MacLeod RA. Malignant hematopoietic cell lines: in vitro models for the study of MLL gene alterations. *Leukemia*. 2004 Feb, 18(2):227-232.
- [93] Corral J, Lavenir I, Impey H, Warren AJ, Forster A, Larson TA, Bell S, McKenzie AN, King G, Rabbitts TH. An Mll-AF9 fusion gene made by homologous recombination causes acute leukemia in chimeric mice: a method to create fusion oncogenes. *Cell*. 1996 Jun, 85(6):853-861.
- [94] Chen W, Li Q, Hudson WA, Kumar A, Kirchhof N, Kersey JH. A murine Mll-AF4 knock-in model results in lymphoid and myeloid deregulation and hematologic malignancy. *Blood*. 2006 Jul, 108(2):669-677.
- [95] Milne TA. Mouse models of MLL leukemia: recapitulating the human disease. *Blood*. 2017 Apr, 129(16):2217-2223.

- [96] Collins EC, Pannell R, Simpson EM, Forster A, Rabbitts TH. Inter-chromosomal recombination of Mll and Af9 genes mediated by cre-loxP in mouse development. *EMBO Reports*. 2000 Aug, 1(2):127-132.
- [97] Stavropoulou V, Kaspar S, Brault L, Sanders MA, Juge S, Morettini S, Tzankov A, Iacovino M, Lau IJ, Milne TA, Royo H, Kyba M, Valk PJM, Peters AHFM, Schwaller J. MLL-AF9 Expression in Hematopoietic Stem Cells Drives a Highly Invasive AML Expressing EMT-Related Genes Linked to Poor Outcome. *Cancer Cell*. 2016 Jul, 30(1):43-58.
- [98] Metzler M, Forster A, Pannell R, Arends MJ, Daser A, Lobato MN, Rabbitts TH. A conditional model of MLL-AF4 B-cell tumourigenesis using invertebrate technology. *Oncogene*. 2006 May, 25(22):3093-3103.
- [99] Mestas J, Hughes CC. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *Journal of Immunology*. 2004 Mar, 172(5):2731-2738.
- [100] Barabé F, Kennedy JA, Hope KJ, Dick JE. Modeling the initiation and progression of human acute leukemia in mice. *Science*. 2007 Apr, 316(5824):600-604.
- [101] Wei J, Wunderlich M, Fox C, Alvarez S, Cigudosa JC, Wilhelm JS, Zheng Y, Cancelas JA, Gu Y, Jansen M, Dimartino JF, Mulloy JC. Microenvironment determines lineage fate in a human model of MLL-AF9 leukemia. *Cancer Cell*. 2008 Jun, 13(6):483-495.
- [102] Montes R, Ayllón V, Gutierrez-Aranda I, Prat I, Hernández-Lamas MC, Ponce L, Bresolin S, Te Kronnie G, Greaves M, Bueno C, Menendez P. Enforced expression of MLL-AF4 fusion in cord blood CD34+ cells enhances the hematopoietic repopulating cell function and clonogenic potential but is not sufficient to initiate leukemia. *Blood*. 2011 May, 117(18):4746-4758.
- [103] Townsend EC, Murakami MA, Christodoulou A, Christie AL, Köster J, DeSouza TA, Morgan EA, Kallgren SP, Liu H, Wu SC, Plana O, Montero J, Stevenson KE, Rao P, Vadhi R, Andreeff M, Armand P, Ballen KK, Barzaghi-Rinaudo P, Cahill S, Clark RA, Cooke VG, Davids MS, DeAngelo DJ, Dorfman DM, Eaton H, Ebert BL, Etchin J, Firestone B, Fisher DC, Freedman AS, Galinsky IA, Gao H, Garcia JS, Garnache-Ottou F, Graubert TA, Gutierrez A, Halilovic E, Harris MH, Herbert ZT, Horwitz SM, Inghirami G, Intlekofer AM, Ito M, Izraeli S, Jacobsen ED, Jacobson CA, Jeay S, Jeremias I, Kelliher MA, Koch R, Konopleva M, Kopp N, Kornblau SM, Kung AL, Kupper TS, LeBoeuf NR, LaCasce AS, Lees E, Li LS, Look AT, Murakami M, Muschen M, Neuberg D, Ng SY, Odejide OO, Orkin SH, Paquette RR, Place AE, Roderick JE, Ryan JA, Sallan SE, Shoji B, Silverman LB, Soiffer RJ, Steensma DP, Stegmaier K, Stone RM, Tamburini J, Thorner AR, van Hummelen P, Wadleigh M, Wiesmann M, Weng AP, Wuerthner JU, Williams DA, Wollison BM, Lane AA, Letai A, Bertagnolli MM, Ritz J, Brown M, Long H, Aster JC, Shipp MA, Griffin JD, Weinstock DM. The Public Repository of Xenografts Enables Dis-

- covery and Randomized Phase II-like Trials in Mice. *Cancer Cell*. 2016 Apr, 29(4):574-586.
- [104] Antonelli A, Noort WA, Jaques J, de Boer B, de Jong-Korlaar R, Brouwers-Vos AZ, Lubbers-Aalders L, van Velzen JF, Bloem AC, Yuan H, de Bruijn JD, Ossenkoppele GJ, Martens AC, Vellenga E1, Groen RW, Schuringa JJ. Establishing human leukemia xenograft mouse models by implanting human bone marrow-like scaffold-based niches. *Blood*. 2016 Dec, 128(25):2949-2959.
- [105] Buechele C, Breese EH, Schneidawind D, Lin CH, Jeong J, Duque-Afonso J, Wong SH, Smith KS, Negrin RS, Porteus M, Cleary ML. MLL leukemia induction by genome editing of human CD34+ hematopoietic cells. *Blood*. 2015 Oct, 126(14):1683-1694.
- [106] Breese EH, Buechele C, Dawson C, Cleary ML, Porteus MH. Use of Genome Engineering to Create Patient Specific MLL Translocations in Primary Human Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *PLoS One*. 2015 Sep, 10(9):e0136644.
- [107] Schneidawind C, Jeong J, Schneidawind D, Kim IS, Duque-Afonso J, Wong SHK, Iwasaki M, Breese EH, Zehnder JL, Porteus M, Cleary ML. MLL leukemia induction by t(9;11) chromosomal translocation in human hematopoietic stem cells using genome editing. *Blood Advances*. 2018 Apr, 2(8):832-845.
- [108] Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology*. 1987 Dec, 169(12):5429-5433.
- [109] Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*. 2005 Aug, 151(8):2551-2561.
- [110] Cavanagh P, Garrity A. CRISPR/Cas9, Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR Associated Protein 9. *Tufts University*. 2014. <https://sites.tufts.edu/crispr/>
- [111] Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJJ, Charpentier E, Horvath P, Moineau S, Mojica FJM, Wolf YI, Yakunin AF, van der Oost J, Koonin EV. Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*. 2011 May, 9:467-477.
- [112] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*. 2007 Mar, 315(5819):1709-1712.
- [113] Makarova KS, Grishin NV, Shabalina SA, Wolf YI, Koonin EV. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biology Direct*. 2006 Mar, 1:7.

- [114] Heler R, Samai P, Modell JW, Weiner C, Goldberg GW, Bikard D, Marraffini LA. Cas9 specifies functional viral targets during CRISPR-Cas adaptation. *Nature*. 2015 Mar, 519(7542):199-202.
- [115] Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K, Chao Y, Pirzada ZA, Eckert MR, Vogel J, Charpentier E. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*. 2011 Mar, 471(7340):602-607.
- [116] Anders C, Niewoehner O, Duerst A, Jinek M. Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature*. 2014 Sep, 513(7519):569-573.
- [117] Saprunauskas R, Gasiunas G, Fremaux C, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*. 2011 Nov, 39(21):9275-9282.
- [118] Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*. 2014 Jun, 157(6):1262-1278.
- [119] Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, Konermann S, Shehata SI, Dohmae N, Ishitani R, Zhang F, Nureki O. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*. 2014 Feb, 156(5):935-949.
- [120] Jinek M, Jiang F, Taylor DW, Sternberg SH, Kaya E, Ma E, Anders C, Hauer M, Zhou K, Lin S, Kaplan M, Iavarone AT, Charpentier E, Nogales E, Doudna JA. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science*. 2014 Mar, 343(6176):1247997.
- [121] Marraffini LA. CRISPR-Cas immunity in prokaryotes. *Nature*. 2015 Oct, 526:55-61.
- [122] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012 Aug, 337(6096):816-821.
- [123] Sternberg SH, Redding S, Jinek M, Greene EC, Doudna JA. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*. 2014 Mar, 507(7490):62-67.
- [124] Ran FA, Hsu PD, Lin CY, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, Scott DA, Inoue A, Matoba S, Zhang Y, Zhang F. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*. 2013 Sep, 154(6):1380-1389.
- [125] Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Almendros C. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology*. 2009 Mar, 155(3):733-740.
- [126] Ariyoshi M, Vassilyev DG, Iwasaki H, Nakamura H, Shinagawa H, Morikawa K. Atomic structure of the RuvC resolvase: a holliday junction-specific endonuclease from *E. coli*. *Cell*. 1994 Sep, 78(6):1063-1072.
- [127] Górecka KM, Komorowska W, Nowotny M. Crystal structure of RuvC resolvase in complex with Holliday junction substrate. *Nucleic Acids Research*. 2013 Nov, 41(21):9945-9955.

- [128] Li CL, Hor LI, Chang ZF, Tsai LC, Yang WZ, Yuan HS. DNA binding and cleavage by the periplasmic nuclease Vvn: a novel structure with a known active site. *The EMBO Journal*. 2003 Aug, 22(15):4014-4025.
- [129] Biertümpfel C, Yang W, Suck D. Crystal structure of T4 endonuclease VII resolving a Holliday junction. *Nature*. 2007 Oct, 449(7162):616-620.
- [130] Jasin M. Genetic manipulation of genomes with rare-cutting endonucleases. *Trends in Genetics*. 1996 Jun, 12(6):224-228.
- [131] Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*. 2013 Feb, 339(6121):823-826.
- [132] Bak RO, Porteus MH. CRISPR-Mediated Integration of Large Gene Cassettes Using AAV Donor Vectors. *Cell Reports*. 2017 Jul, 20(3):750-756.
- [133] Bak RO, Dever DP, Porteus MH. CRISPR/Cas9 genome editing in human hematopoietic stem cells. *Nature Protocols*. 2018 Feb, 13(2):358-376.
- [134] Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnyš 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 Sep, 109(39):E2579-2586.
- [135] Kim YB, Komor AC, Levy JM, Packer MS, Zhao KT, Liu DR. Increasing the genome-targeting scope and precision of base editing with engineered Cas9-cytidine deaminase fusions. *Nature Biotechnology*. 2017 Apr, 35(4):371-376.
- [136] Komor AC, Kim YB, Packer MS, Zuris JA, Liu DR. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*. 2016 May, 533(7603):420-424.
- [137] Gundry MC, Brunetti L, Lin A, Mayle AE, Kitano A, Wagner D, Hsu JI, Hoegenauer KA, Rooney CM, Goodell MA, Nakada D. Highly Efficient Genome Editing of Murine and Human Hematopoietic Progenitor Cells by CRISPR/Cas9. *Cell Reports*. 2016 Oct, 17(5):1453-1461.
- [138] Muntean AG and Hess. The Pathogenesis of Mixed Lineage Leukemia. *Annual Review of Pathology*. 2012, 7: 283–301.
- [139] Moreno-Mateos MA, Vejnar CE, Beaudoin JD, Fernandez JP, Mis EK, Khokha MK, Giraldez AJ. CRISPRscan: designing highly efficient sgRNAs for CRISPR-Cas9 targeting in vivo. *Nature Methods*. 2015 Oct, 12(10):982-988.
- [140] Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*. 2014, 15(12):550.
- [141] Hunt SE, McLaren W, Gil L, Thormann A, Schuilenburg H, Sheppard D, Parton A, Armean IM, Trevanion SJ, Flicek P, Cunningham F. Ensembl variation resources. *Database Volume 2018*.

- [142] Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, Subramanian A, Sihag S, Lehar J, Puigserver P, Carlsson E, Ridderstråle M, Laurila E, Houstis N, Daly MJ, Patterson N, Mesirov JP, Golub TR, Tamayo P, Spiegelman B, Lander ES, Hirschhorn JN, Altshuler D, Groop LC. PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nature Genetics*. 2003 Jul, 34(3):267-273.
- [143] Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Pavlovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2005 Oct, 102(43):15545-15550.
- [144] Liberzon A, Subramanian A, Pinchback R, Thorvaldsdóttir H, Tamayo P, Mesirov JP. Molecular signatures database (MSigDB) 3.0. *Bioinformatics*. 2011 Jun, 27(12):1739-1740.
- [145] Edgar R, Domrachev M, Lash AE. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Research*. 2002 Jan, 30(1):207-210.
- [146] Barrett T, Wilhite SE, Ledoux P, Evangelista C, Kim IF, Tomashevsky M, Marshall KA, Phillippy KH, Sherman PM, Holko M, Yefanov A, Lee H, Zhang N, Robertson CL, Serova N, Davis S, Soboleva A. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets--update. *Nucleic Acids Research*. 2013 Jan, 41(Database issue):D991-995.
- [147] Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*. 2012 Aug, 40(15):e115.
- [148] Koressaar T, Remm M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics*. 2007 May, 23(10):1289-1291.
- [149] Kõressaar T, Lepamets M, Kaplinski L, Raime K, Andreson R, Remm M. Primer3\_masker: integrating masking of template sequence with primer design software. *Bioinformatics*. 2018 Jun, 34(11):1937-1938.
- [150] Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, Ran FA, Konermann S, Agarwala V, Li Y, Fine EJ, Wu X, Shalem O, Cradick TJ, Marraffini LA, Bao G, Zhang F. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature Biotechnology*. 2013 Sep, 31(9):827-832.
- [151] Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 2013 Feb, 339(6121):819-823.
- [152] Schneider CA1, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*. 2012 Jul, 9(7):671-675.
- [153] Stam RW, Schneider P, Hagelstein JA, van der Linden MH, Stumpel DJ, de Menezes RX, de Lorenzo P, Valsecchi MG, Pieters R. Gene expression profiling-based dissection

- of MLL translocated and MLL germline acute lymphoblastic leukemia in infants. *Blood*. 2010 Apr, 115(14):2835-2844.
- [154] Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nature Genetics*. 2000 May, 25(1):25-29.
- [155] The Gene Ontology Consortium. The Gene Ontology Resource: 20 years and still GOing strong. *Nucleic Acids Research*. 2019 Jan , 47(D1):D330-D338.
- [156] Chou TC. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacological Reviews*. 2006 Sep, 58(3):621-681.
- [157] Secker KA, Keppeler H, Duerr-Stoerzer S, Schmid H, Schneidawind D, Hentrich T, Schulze-Hentrich JM, Mankel B, Fend F, Schneidawind C. Inhibition of DOT1L and PRMT5 promote synergistic anti-tumor activity in a human MLL leukemia model induced by CRISPR/Cas9. *Oncogene*. 2019 Nov, 38(46):7181-7195.
- [158] Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, Lim A, Osborne CS, Pawliuk R, Morillon E, Sorensen R, Forster A, Fraser P, Cohen JL, de Saint Basile G, Alexander I, Wintergerst U, Frebourg T, Aurias A, Stoppa-Lyonnet D, Romana S, Radford-Weiss I, Gross F, Valensi F, Delabesse E, Macintyre E, Sigaux F, Soulier J, Leiva LE, Wissler M, Prinz C, Rabbitts TH, Le Deist F, Fischer A, Cavazzana-Calvo M. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*. 2003 Oct, 302(5644):415-419.
- [159] Notta F#, Zandi S#, Takayama N, Dobson S, Gan OI, Wilson G, Kaufmann KB, McLeod J, Laurenti E, Dunant CF, McPherson JD, Stein LD, Dror Y, Dick JE. Distinct routes of lineage development reshape the human blood hierarchy across ontogeny. *Science*. 2016 Jan, 351(6269):aab2116.
- [160] Aoki Y, Watanabe T, Saito Y, Kuroki Y, Hijikata A, Takagi M, Tomizawa D, Eguchi M, Eguchi-Ishimae M, Kaneko A, Ono R, Sato K, Suzuki N, Fujiki S, Koh K, Ishii E, Shultz LD, Ohara O, Mizutani S, Ishikawa F. Identification of CD34+ and CD34- leukemia-initiating cells in MLL-rearranged human acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2015 Feb, 125(6):967-980.
- [161] Baer MR, Stewart CC, Lawrence D, Arthur DC, Mrózek K, Strout MP, Davey FR, Schiffer CA, Bloomfield CD. Acute myeloid leukemia with 11q23 translocations: myelomonocytic immunophenotype by multiparameter flow cytometry. *Leukemia*. 1998 Mar, 12(3):317-325.
- [162] van Lochem EG, van der Velden VH, Wind HK, te Marvelde JG, Westerdaal NA, van Dongen JJ. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human

- bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. *Cytometry. Part B, Clinical Cytometry*. 2004 Jul, 60(1):1-13.
- [163] Armstrong SA, Staunton JE, Silverman LB, Pieters R, den Boer ML, Minden MD, Sallan SE, Lander ES, Golub TR, Korsmeyer SJ. MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nature Genetics*. 2002 Jan, 30(1):41-47.
- [164] Lavallée VP, Baccelli I, Kros J, Wilhelm B, Barabé F, Gendron P, Boucher G, Lemieux S, Marinier A, Meloche S, Hébert J, Sauvageau G. The transcriptomic landscape and directed chemical interrogation of MLL-rearranged acute myeloid leukemias. *Nature Genetics*. 2015 Sep, 47(9):1030-1037.
- [165] Mullighan CG, Kennedy A, Zhou X, Radtke I, Phillips LA, Shurtleff SA, Downing JR. Pediatric acute myeloid leukemia with NPM1 mutations is characterized by a gene expression profile with dysregulated HOX gene expression distinct from MLL-rearranged leukemias. *Leukemia*. 2007 Sep, 21(9):2000-2009.
- [166] Somerville TC, Matheny CJ, Spencer GJ, Iwasaki M, Rinn JL, Witten DM, Chang HY, Shurtleff SA, Downing JR, Cleary ML. Hierarchical maintenance of MLL myeloid leukemia stem cells employs a transcriptional program shared with embryonic rather than adult stem cells. *Cell Stem Cell*. 2009 Feb, 4(2):129-140.
- [167] Ramaswamy S, Tamayo P, Rifkin R, Mukherjee S, Yeang CH, Angelo M, Ladd C, Reich M, Latulippe E, Mesirov JP, Poggio T, Gerald W, Loda M, Lander ES, Golub TR. Multiclass cancer diagnosis using tumor gene expression signatures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2001 Dec, 98(26):15149-15154.
- [168] Coustan-Smith E, Song G, Clark C, Key L, Liu P, Mehrpooya M, Stow P, Su X, Shurtleff S, Pui CH, Downing JR, Campana D. New markers for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2011 Jun, 117(23):6267-6276.
- [169] Rhodes DR, Yu J, Shanker K, Deshpande N, Varambally R, Ghosh D, Barrette T, Pandey A, Chinnaiyan AM. ONCOMINE: a cancer microarray database and integrated data-mining platform. *Neoplasia*. 2004 Jan-Feb, 6(1):1-6.
- [170] Ren S, Rollins BJ. Cyclin C/cdk3 promotes Rb-dependent G0 exit. *Cell*. 2004 Apr 16;117(2):239-51.
- [171] Ducoux M, Urbach S, Baldacci G, Hübscher U, Koundrioukoff S, Christensen J, Hughes P. Mediation of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)-dependent DNA replication through a conserved p21(Cip1)-like PCNA-binding motif present in the third subunit of human DNA polymerase delta. *Journal of Biological Chemistry*. 2001 Dec, 276(52):49258-49266.
- [172] Santos MA, Faryabi RB, Ergen AV, Day AM, Malhowski A, Canela A, Onozawa M, Lee JE, Callen E, Gutierrez-Martinez P, Chen HT, Wong N, Finkel N, Deshpande A, Sharrow S, Rossi DJ, Ito K, Ge K, Aplan PD, Armstrong SA, Nussenzweig A. DNA-

- damage-induced differentiation of leukaemic cells as an anti-cancer barrier. *Nature*. 2014 Oct, 514(7520):107-111.
- [173] Wong P, Iwasaki M, Somerville TC, Ficara F, Carico C, Arnold C, Chen CZ, Cleary ML. The miR-17-92 microRNA polycistron regulates MLL leukemia stem cell potential by modulating p21 expression. *Cancer Research*. 2010 May, 70(9):3833-3842.
- [174] Wang L, Zhang J, Yang X, Chang YW, Qi M, Zhou Z, Zhang J, Han B. SOX4 is associated with poor prognosis in prostate cancer and promotes epithelial-mesenchymal transition in vitro. *Prostate Cancer and Prostatic Disease*. 2013 Dec, 16(4):301-307.
- [175] Boyd KE, Xiao YY, Fan K, Poholek A, Copeland NG, Jenkins NA, Perkins AS. Sox4 cooperates with Evi1 in AKXD-23 myeloid tumors via transactivation of proviral LTR. *Blood*. 2006 Jan, 107(2):733-741.
- [176] Rogulski K1, Li Y, Rothermund K, Pu L, Watkins S, Yi F, Prochownik EV. Onzin, a c-Myc-repressed target, promotes survival and transformation by modulating the Akt-Mdm2-p53 pathway. *Oncogene*. 2005 Nov, 24(51):7524-7541.
- [177] Jia Y, Ying X, Zhou J, Chen Y, Luo X, Xie S, Wang QC, Hu W, Wang L. The novel KLF4/PLAC8 signaling pathway regulates lung cancer growth. *Cell Death and Disease*. 2018 May, 9(6):603.
- [178] Wu SF, Huang Y, Hou JK, Yuan TT, Zhou CX, Zhang J, Chen GQ. The downregulation of onzin expression by PKCepsilon-ERK2 signaling and its potential role in AML cell differentiation. *Leukemia*. 2010 Mar, 24(3):544-551.
- [179] Zeng C, Xu Y, Xu L, Yu X, Cheng J, Yang L, Chen S, Li Y. Inhibition of long non-coding RNA NEAT1 impairs myeloid differentiation in acute promyelocytic leukemia cells. *BMC Cancer*. 2014 Sep, 14:693.
- [180] Kim J, Piao HL, Kim BJ, Yao F, Han Z, Wang Y, Xiao Z, Siverly AN, Lawhon SE, Ton BN, Lee H, Zhou Z, Gan B, Nakagawa S, Ellis MJ, Liang H, Hung MC, You MJ, Sun Y, Ma L. Long noncoding RNA MALAT1 suppresses breast cancer metastasis. *Nature Genetics*. 2018 Dec, 50(12):1705-1715.
- [181] Ceroi A, Masson D, Roggy A, Roumier C, Chagué C, Gauthier T, Philippe L, Lamarthée B, Angelot-Delette F, Bonnefoy F, Perruche S, Biichle S, Preudhomme C, Macintyre E, Lagrost L, Garnache-Ottou F, Saas P. LXR agonist treatment of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm restores cholesterol efflux and triggers apoptosis. *Blood*. 2016 Dec 8, 128(23):2694-2707.
- [182] Gautier EL, Westerterp M, Bhagwat N, Cremers S, Shih A, Abdel-Wahab O, Lütjohann D, Randolph GJ, Levine RL, Tall AR, Yvan-Charvet L. HDL and Glut1 inhibition reverse a hypermetabolic state in mouse models of myeloproliferative disorders. *Journal of Experimental Medicine*. 2013 Feb, 210(2):339-353.

- [183] Bartz F, Kern L, Erz D, Zhu M, Gilbert D, Meinhof T, Wirkner U, Erfle H, Muckenthaler M, Pepperkok R, Runz H. Identification of cholesterol-regulating genes by targeted RNAi screening. *Cell Metabolism*. 2009 Jul, 10(1):63-75.
- [184] Alon A, Schmidt HR, Wood MD, Sahn JJ, Martin SF, Kruse AC. Identification of the gene that codes for the  $\sigma_2$  receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2017 Jul, 114(27):7160-7165.
- [185] Huang YS1, Lu HL, Zhang LJ, Wu Z. Sigma-2 receptor ligands and their perspectives in cancer diagnosis and therapy. *Medical Research Reviews*. 2014 May, 34(3):532-566.
- [186] Wheeler KT, Wang LM, Wallen CA, Childers SR, Cline JM, Keng PC, Mach RH. Sigma-2 receptors as a biomarker of proliferation in solid tumours. *British Journal of Cancer*. 2000 Mar, 82(6):1223-1232.
- [187] Mach RH, Zeng C, Hawkins WG. The  $\sigma_2$  receptor: a novel protein for the imaging and treatment of cancer. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2013 Sep, 56(18):7137-7160.
- [188] Wang WT, Han C, Sun YM, Chen ZH, Fang K, Huang W, Sun LY, Zeng ZC, Luo XQ, Chen YQ. Activation of the Lysosome-Associated Membrane Protein LAMP5 by DOT1L Serves as a Bodyguard for MLL Fusion Oncoproteins to Evade Degradation in Leukemia. *Clinical Cancer Research*. 2019 May, 25(9):2795-2808.
- [189] Tavor S, Petit I, Porozov S, Avigdor A, Dar A, Leider-Trejo L, Shemtov N, Deutsch V, Naparstek E, Nagler A, Lapidot T. CXCR4 regulates migration and development of human acute myelogenous leukemia stem cells in transplanted NOD/SCID mice. *Cancer Research*. 2004 Apr, 64(8):2817-2824.
- [190] Sison EA, Magoon D, Li L, Annesley CE, Romagnoli B, Douglas GJ, Tuffin G, Zimmermann J, Brown P. POL5551, a novel and potent CXCR4 antagonist, enhances sensitivity to chemotherapy in pediatric ALL. *Oncotarget*. 2015 Oct, 6(31):30902-30918.
- [191] Blöchl B. Antileukaemic Effects of MAT II Inhibition on MLL-Rearranged Cell Lines and Establishment of siRNA-Mediated Knockdown of MAT2A in CRISPR/Cas9-Generated MLL-Rearranged Cells. *Master's Thesis of the University of Tübingen*. 2019 Nov.
- [192] Lin S, Luo RT, Ptasinska A, Kerry J, Assi SA, Wunderlich M, Imamura T, Kaberlein JJ, Rayes A, Althoff MJ, Anastasi J, O'Brien MM, Meetei AR, Milne TA, Bonifer C, Mulloy JC, Thirman MJ. Instructive Role of MLL-Fusion Proteins Revealed by a Model of t(4;11) Pro-B Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cell*. 2016 Nov, 30(5):737-749.
- [193] Liu H, Cheng EH, Hsieh JJ. MLL fusions: pathways to leukemia. *Cancer Biology and Therapy*. 2009 Jul, 8(13):1204-1211.
- [194] Jeong J, Jager A, Domizi P, Pavel-Dinu M, Gojenola L, Iwasaki M, Wei MC, Pan F, Zehnder JL, Porteus MH, Davis KL, Cleary ML. High-efficiency CRISPR induction of t(9;11) chromosomal translocations and acute leukemias in human blood stem cells. *Blood Advances*. 2019 Oct, 3(19):2825-2835.

- [195] Stam RW. The ongoing conundrum of MLL-AF4 driven leukemogenesis. *Blood*. 2013 May, 121(19):3780-3781.
- [196] Montes R, Ayllón V, Gutierrez-Aranda I, Prat I, Hernández-Lamas MC, Ponce L, Bresolin S, Te Kronnie G, Greaves M, Bueno C, Menendez P. Enforced expression of MLL-AF4 fusion in cord blood CD34+ cells enhances the hematopoietic repopulating cell function and clonogenic potential but is not sufficient to initiate leukemia. *Blood*. 2011 May, 117(18):4746-4758.
- [197] Dobbins SE, Sherborne AL, Ma YP, Bardini M, Biondi A, Cazzaniga G, Lloyd A, Chubb D, Greaves MF, Houlston RS. The silent mutational landscape of infant MLL-AF4 pro-B acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes and Cancer*. 2013 Oct, 52(10):954-960.
- [198] Lin S, Luo RT, Shrestha M, Thirman MJ, Mulloy JC. The full transforming capacity of MLL-Af4 is interlinked with lymphoid lineage commitment. *Blood*. 2017 Aug, 130(7):903-907.
- [199] Cancer Genome Atlas Research Network, Ley TJ, Miller C, Ding L, Raphael BJ, Mungall AJ, Robertson A, Hoadley K, Triche TJ Jr, Laird PW, Baty JD, Fulton LL, Fulton R, Heath SE, Kalicki-Veizer J, Kandoth C, Klco JM, Koboldt DC, Kanchi KL, Kulkarni S, Lamprecht TL, Larson DE, Lin L, Lu C, McLellan MD, McMichael JF, Payton J, Schmidt H, Spencer DH, Tomasson MH, Wallis JW, Wartman LD, Watson MA, Welch J, Wendt MC, Ally A, Balasundaram M, Birol I, Butterfield Y, Chiu R, Chu A, Chuah E, Chun HJ, Corbett R, Dhalla N, Guin R, He A, Hirst C, Hirst M, Holt RA, Jones S, Karsan A, Lee D, Li HI, Marra MA, Mayo M, Moore RA, Mungall K, Parker J, Pleasance E, Plettner P, Schein J, Stoll D, Swanson L, Tam A, Thiessen N, Varhol R, Wye N, Zhao Y, Gabriel S, Getz G, Sougnez C, Zou L, Leiserson MD, Vandin F, Wu HT, Applebaum F, Baylin SB, Akbani R, Broom BM, Chen K, Motter TC, Nguyen K, Weinstein JN, Zhang N, Ferguson ML, Adams C, Black A, Bowen J, Gastier-Foster J, Grossman T, Lichtenberg T, Wise L, Davidsen T, Demchok JA, Shaw KR, Sheth M, Sofia HJ, Yang L, Downing JR, Eley G. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2013 May, 368(22):2059-2074.
- [200] Keefe JG, Sukov WR, Knudson RA, Nguyen LP, Williamson C, Sinnwell JP, Ketterling RP. Development of five dual-color, double-fusion fluorescence in situ hybridization assays for the detection of common MLL translocation partners. *Journal of Molecular Diagnosis*. 2010 Jul, 12(4):441-52.
- [201] Smith SD, Uyeki EM, Lowman JT. Colony formation in vitro by leukemic cells in acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Blood*. 1978 Oct, 52(4):712-718.
- [202] Manabe A, Coustan-Smith E, Behm FG, Raimondi SC, Campana D. Bone marrow-derived stromal cells prevent apoptotic cell death in B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1992 May, 79(9):2370-2377.

- [203] Mihara K, Imai C, Coustan-Smith E, Dome JS, Dominici M, Vanin E, Campana D. Development and functional characterization of human bone marrow mesenchymal cells immortalized by enforced expression of telomerase. *British Journal of Haematology*. 2003 Mar, 120(5):846-849.
- [204] Bruserud Ø, Glenjen N, Rynningen A, Ulvestad E. In vitro culture of human acute lymphoblastic leukemia (ALL) cells in serum-free media; a comparison of native ALL blasts, ALL cell lines and virus-transformed B cell lines. *Leukemia Research*. 2003 May, 27(5):455-464.
- [205] Pal D, Blair HJ, Elder A, Dormon K, Rennie KJ, Coleman DJ, Weiland J, Rankin KS, Filby A, Heidenreich O, Vormoor J. Long-term in vitro maintenance of clonal abundance and leukaemia-initiating potential in acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia*. 2016 Aug, 30(8):1691-1700.
- [206] Bruserud O, Gjertsen BT, von Volkman HL. In vitro culture of human acute myelogenous leukemia (AML) cells in serum-free media: studies of native AML blasts and AML cell lines. *Journal of Hematotherapy and Stem Cell Research*. 2000 Dec, 9(6):923-932.
- [207] Garrido SM, Appelbaum FR, Willman CL, Banker DE. Acute myeloid leukemia cells are protected from spontaneous and drug-induced apoptosis by direct contact with a human bone marrow stromal cell line (HS-5). *Experimental Hematology*. 2001 Apr, 29(4):448-457.
- [208] Moore KA, Ema H, Lemischka IR. In vitro maintenance of highly purified, transplantable hematopoietic stem cells. *Blood*. 1997 Jun, 89(12):4337-4347.
- [209] Tomson BN, Arndt KM. The many roles of the conserved eukaryotic Paf1 complex in regulating transcription, histone modifications, and disease states. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2013 Jan, 1829(1):116-126.
- [210] Yang Y, Bedford MT. Protein arginine methyltransferases and cancer. *Nature Reviews. Cancer*. 2013 Jan, 13(1):37-50.
- [211] Klaus CR, Iwanowicz D, Johnston D, Campbell CA, Smith JJ, Moyer MP, Copeland RA, Olhava EJ, Scott MP, Pollock RM, Daigle SR, Raimondi A. DOT1L inhibitor EPZ-5676 displays synergistic antiproliferative activity in combination with standard of care drugs and hypomethylating agents in MLL-rearranged leukemia cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2014 Sep, 350(3):646-656.
- [212] Lin DW, Chung BP, Kaiser P. S-adenosylmethionine limitation induces p38 mitogen-activated protein kinase and triggers cell cycle arrest in G1. *Journal of Cell Science*. 2014 Jan, 127(1): 50-59.
- [213] Halim AB, LeGros HL Jr, Chamberlin ME, Geller A, Kotb M. Distinct patterns of protein binding to the MAT2A promoter in normal and leukemic T cells. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2001 Jul, 1540(1):32-42.

- [214] Mato JM, Lu SC. Role of S-adenosyl-L-methionine in liver health and injury. *Hepatology*. 2007 May, 45(5):1306-1312.
- [215] Song MR, Ghosh A. FGF2-induced chromatin remodeling regulates CNTF-mediated gene expression and astrocyte differentiation. *Nature Neuroscience*. 2004 Mar, 7(3):229-235.
- [216] Chau CM, Lieberman PM. Dynamic chromatin boundaries delineate a latency control region of Epstein-Barr virus. *Journal of Virology*. 2004 Nov, 78(22):12308-12319.
- [217] Sufrin JR, Coulter AW, Talalay P. Structural and conformational analogues of L-methionine as inhibitors of the enzymatic synthesis of S-adenosyl-L-methionine. IV. Further mono-, bi- and tricyclic amino acids. *Molecular Pharmacology*. 1979 May, 15(3):661-677.
- [218] Clark AJ, Matsutani O, Swendseid ME. Food intake, weight gain and amino acid pools of rats receiving 1-aminocyclopentane-1-carboxylic acid. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1967 Apr, 124(4):1093-1096.
- [219] Zand R, Sellinger OZ, Water R, Harris R. Alpha-aminocyclic and bicyclic alkane carboxylic acids: differential effects on selected amino acids of rat brain cortex. *Journal of Neurochemistry*. 1974 Dec, 23(6):1201-1206.
- [220] Scholefield PG. Competition between amino acids for transport into Ehrlich ascites carcinoma cells. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 1961 Nov, 39:1717-1735.
- [221] Sterling WR, Henderson JF. Studies of the mechanism of action 1-aminocyclopentane-1-carboxylic acid. *Biochemical Pharmacology*. 1963 Apr, 12:303-316.
- [222] Berlinguet L, Begin N, Sarkar NK. Mechanism of antitumour action of 1-aminocyclopentane carboxylic acid. *Nature*. 1962 Jun, 194:1082-1083.
- [223] Jacobson W, Gandy G, Sidman RL. Experimental subacute combined degeneration of the cord in mice. *The Journal of Pathology*. 1973 Jan, 109(1):P13-14.
- [224] Nixon RA. Neurotoxicity of a non-metabolizable amino acid, 1-aminocyclopentane-1-carboxylic acid (ACPC): ACPC transport mechanisms in tissues. *Biochemical Pharmacology*. 1976 Mar, 25(6):726-729.
- [225] Ramsey RB, Fischer VW. Effect of 1-aminocyclopentane-1-carboxylic acid (cycloleucine) on developing rat central nervous system phospholipids. *Journal of Neurochemistry*. 1978 Feb, 30(2):447-457.
- [226] Marjon K, Cameron MJ, Quang P, Clasquin MF, Mandley E, Kunii K, McVay M, Choe S, Kernytsky A, Gross S, Konteatis Z, Murtie J, Blake ML, Travins J, Dorsch M, Biller SA, Marks KM. MTAP Deletions in Cancer Create Vulnerability to Targeting of the MAT2A/PRMT5/RIOK1 Axis. *Cell Reports*. 2016 Apr, 15(3):574-587.
- [227] Notta F, Zandi S, Takayama N, Dobson S, Gan OI, Wilson G, Kaufmann KB, McLeod J, Laurenti E, Dunant CF, McPherson JD, Stein LD, Dror Y, Dick JE. Distinct routes of

- lineage development reshape the human blood hierarchy across ontogeny. *Science*. 2016 Jan, 351(6269):aab2116.
- [228] Bollag G, Clapp DW, Shih S, Adler F, Zhang YY, Thompson P, Lange BJ, Freedman MH, McCormick F, Jacks T, Shannon K. Loss of NF1 results in activation of the Ras signaling pathway and leads to aberrant growth in haematopoietic cells. *Nature Genetics*. 1996 Feb;12(2):144-148.
- [229] Liu Z, Hui Y, Shi L, Chen Z, Xu X, Chi L, Fan B, Fang Y, Liu Y, Ma L, Wang Y, Xiao L, Zhang Q, Jin G, Liu L, Zhang X. Efficient CRISPR/Cas9-Mediated Versatile, Predictable, and Donor-Free Gene Knockout in Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports*. 2016 Sep, 7(3):496-507.

## 9 Publikationen und Kongressbeiträge

### 9.1 Publikationen

**Secker KA**, Keppeler H, Duerr-Stoerzer S, Schmid H, Schneidawind D, Hentrich T, Schulze-Hentrich JM, Mankel B, Fend F, Schneidawind C. Inhibition of DOT1L and PRMT5 promote synergistic anti-tumor activity in a human *MLL* leukemia model induced by CRISPR/Cas9. *Oncogene*. 2019 Nov, 38(46):7181-7195.

Pecher AC, Kettemann F, Asteriti E, Schmid H, Duerr-Stoerzer S, Keppeler H, Henes JC, Klein R, Hinterleitner C, **Secker KA**, Schneidawind C, Kanz L, Schneidawind D. Invariant natural killer T cells are functionally impaired in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Research and Therapy*. 2019 Oct, 21(1):212.

Jahnke S, Schmid H, **Secker KA**, Einhaus J, Duerr-Stoerzer S, Keppeler H, Schober-Melms I, Baur R, Schumm M, Handgretinger R, Bethge W, Kanz L, Schneidawind C, Schneidawind D. Invariant NKT Cells From Donor Lymphocyte Infusions (DLI-iNKTs) Promote *ex vivo* Lysis of Leukemic Blasts in a CD1d-Dependent Manner. *Frontiers in Immunology*. 2019 Jul,10:1542.

Keller BM, Maier J, **Secker KA**, Egetemaier SM, Parfyonova Y, Rothbauer U, Traenkle B. Chromobodies to Quantify Changes of Endogenous Protein Concentration in Living Cells. *Molecular and Cellular Proteomics*. 2018 Dec, 17(12):2518-2533.

Schmid H, Schneidawind C, Jahnke S, Kettemann F, **Secker KA**, Duerr-Stoerzer S, Keppeler H, Kanz L, Savage PB, Schneidawind D. Culture-Expanded Human Invariant Natural Killer T Cells Suppress T-Cell Alloreactivity and Eradicate Leukemia. *Frontiers in Immunology*. 2018 Aug, 9:1817.

## 9.2 Kongressbeiträge

Blöchl B, **Secker KA**, Keppeler H, Dürr-Störzer S, Schmid H, Jeong J, Mankel B, Fend F, Schneidawind D, Schneidawind C. MAT2A as key regulator and therapeutic target in *MLL* leukemogenesis. *Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Medizinische Onkologie (DGHO)*. Berlin, 2019. Vortrag der betreuten Masterstudentin

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. Vortrag des betreuten Medizinstudenten

**Secker KA**, Keppeler H, Duerr-Stoerzer S, Schmid H, Schneidawind D, Hentrich T, Schulze-Hentrich J, Kanz L, Schneidawind C. Myc Drives *MLL* Leukemogenesis in a Human CRISPR/Cas9 Leukemia Model and Indirect Inhibition with JQ1 Diminishes Leukemia Activity. *Blood, The American Society of Hematology (ASH)*. San Diego 2018. Posterpräsentation

**Secker KA**, Keppeler H, Duerr-Stoerzer S, Schmid H, Schneidawind D, Mankel B, Fend F, Schneidawind C. Inhibition of DOT1L and PRMT5 promote anti-tumor activity in human *MLL* leukemia model induced by CRISPR/Cas9. *Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Medizinische Onkologie (DGHO)*. Wien, 2018. Vortrag

**Secker KA**, Keppeler H, Salih HR, Kanz L, Schneidawind D, Schneidawind C. Using CRISPR/Cas9 to study key oncogenes in tumorigenesis. *Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Medizinische Onkologie (DGHO)*. Stuttgart, 2017. Posterpräsentation

## 10 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Kathy-Ann Secker
Geburtsdaten	28.08.1992 in Nürtingen
Nationalität	deutsch

### Akademische Laufbahn

11/2016 – jetzt	<b>Naturwissenschaftliche Doktorandin</b> der AG Schneidawind in der Inneren Medizin II am Universitätsklinikum Tübingen
12/2016	<b>Approbation als Apothekerin</b> durch die Landesapothekerkammer Baden-Württemberg in Folge des dritten Abschnitts der Pharmazeutischen Prüfung
10/2015 – 09/2016	<b>Master of Science</b> in Pharmaceutical Sciences and Technologies an der Eberhard Karls Universität Tübingen
10/2011 – 09/2015	<b>Studium der Pharmazie</b> an der Eberhard Karls Universität Tübingen mit erstem und zweiten Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung

### Praktische Erfahrungen

05/2016 – 10/2016	<b>Pharmaziepraktikum</b> in der Rosen Apotheke Wolfschlugen
10/2015 – 03/2016	<b>Pharmaziepraktikum</b> im Fachbereich pharmazeutische Biotechnologie an der Eberhard Karls Universität Tübingen unter Anfertigung einer wissenschaftlichen Abschlussarbeit (Anrechnung als Masterarbeit)
07/2012 – 08/2012	<b>Famulatur</b> in der Rosen Apotheke Wolfschlugen
02/2012 – 03/2012	<b>Famulatur</b> in der Zentralapotheke der Kreiskliniken Esslingen

## 11 Danksagung

Zuallererst möchte ich den Gutachtern dieser Arbeit, Prof. Dr. Ruth und Prof. Dr. Skokowa, danken, die mich und mein Projekt über die ganze Zeit begleitet haben. Ich möchte mich für jede gute Idee, jeden kritischen Einwand und Ihr wissenschaftliches Interesse am Fortgang meiner Doktorarbeit herzlich bedanken. Ihre freundliche und entgegenkommende Art hat mich durchweg motiviert und bestärkt. Weiter möchte ich mich bei Prof. Dr. Robert Lukowski und Prof. Dr. Matthias Schwab für die Bereitschaft bedanken, als Prüfer dieser Disertation zu fungieren.

Der größte Dank geht an Dr. Corina Schneidawind, die die Rahmenbedingungen für diese Doktorarbeit geschaffen hat. Danke dir, Corina, für das interessante Projekt und die Möglichkeit, mich als erste Doktorandin in deiner Arbeitsgruppe beweisen zu können. Ich bedanke mich herzlich für dein Vertrauen während der gesamten Doktorarbeit und die individuelle Betreuung. In diesem Kontext möchte ich auch PD Dr. Dominik Schneidawind danken, mit dessen Arbeitsgruppe wir von Beginn an eng zusammengearbeitet haben. Lieber Dominik, ich danke dir, dass ich immer in alle Projekte beider Arbeitsgruppen miteingebunden wurde und jeden Tag über den Tellerrand meines eigenen Projektes hinaus schauen konnte.

An dieser Stelle möchte ich allen Labormitgliedern der AG Schneidawind für den täglichen wissenschaftlichen Austausch und die tolle Arbeitsatmosphäre während meiner Doktorandenzeit danken. Die Möglichkeit, jederzeit Erfahrungen auszutauschen, gemeinsam Projekte voranzutreiben und Wissen zu teilen, hat mir jeden Tag großen Spaß bereitet. Danke euch Hilde, Silke, Hannes, Elisa, Emma, Felix, Timo, Marcus, Simona, Lukas, Jakob, Ann-Christin, Ruoyun und Bianca für die produktive, lustige und vor allem unvergessliche Zeit. Ich möchte die Zeit mit euch nicht missen und hoffe, dass es noch viele weitere schöne Momente für uns zusammen gibt.

Die wissenschaftliche Unterstützung ging weit über unsere Arbeitsgruppe hinaus. Ich möchte mich daher bei allen Kooperationspartnern für den regen wissenschaftlichen Austausch, die kompetente Unterstützung bei Analysen und die stets freundliche Kommunikation bedanken. Insbesondere danke ich den DoktorandInnen der Neonatologie, die mir das Nabelschnurblut bereitgestellt haben. Ich bedanke mich herzlich bei Dr. Thomas Hentrich und Dr. Julia Schulze-Hentrich für den bioinformatischen Support. Ein weiterer Dank geht an Barbara Mankel und Prof. Dr. Falko Fend für die FISH-Analysen. Der FACS-Core-Facility Berg unter Leitung von PD Dr. Stella Autenrieth möchte ich für die Unterstützung bei durchflusszytometrischen Analysen und bei Problemen an den Geräten bedanken.

## Danksagung

---

Ein besonderer Dank geht an alle Mitglieder der Forschungslabore der Inneren Medizin II und der KKE Translationale Immunologie, die mir während meiner Promotion mit Rat und Tat zur Seite standen. Liebe AG Autenrieth, liebe AG Salih, liebe AG Skokowa, danke für die angenehme Arbeitsatmosphäre, für eure fachlichen Kompetenz, die schnelle Hilfe in Notfällen und die netten Gesprächen auf dem Gang. Herzlichst danken möchte ich hier meiner Kindergartenfreundin Kim für das Korrekturlesen dieser Arbeit und ich wünsche mir, dass sich unsere Wege weiterhin beruflich und privat kreuzen.

Nicht zuletzt gebührt meinen Eltern und Großeltern Dank, die mich immer unterstützt und weiter ermutigt haben. Danke für alles. Ich bedanke mich außerdem bei meinem Bruder Benjamin und meinem Freund Christian. Danke für eure Geduld und für die schönen Ablenkungen in schwierigen Tagen.