

Aus der
Medizinische Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen
Abteilung Innere Medizin II
Hämatologie, Onkologie, Klinische Immunologie,
Rheumatologie

**Therapeutische Ansatzpunkte
der MLL rearrangierten Leukämie**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Fischer, Jacqueline Marie

2026

Dekanin: Professorin Dr. S. Y. Brucker

1. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. C. Schneidawind
2. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. M. Mezger
3. Berichterstatter: Professor Dr. K. Spiekermann

Tag der Disputation: 27.07.2026

Für Mimi

Inhalt

1. Einleitung	5
1.1. Leukämien	5
1.2. MLL Funktion und Regulation	7
1.3. Der Einfluss des Zellursprungs auf die Leukämogenese	10
1.4. PLK-1	12
1.5. NOTCH1	15
1.6. CRISPR/Cas9 MLLr-Zellmodell	17
1.7. Wissenschaftliche Fragestellung.....	18
2. Ergebnisse	19
2.1. Uncovering NOTCH1 as a Promising Target in the Treatment of MLL- Rearranged Leukemia.....	19
2.2. Only Infant MLL-Rearranged Leukemia Is Susceptible to an Inhibition of Polo-like Kinase 1 (PLK-1) by Volasertib.....	22
3. Diskussion.....	26
3.1. NOTCH1 als onkogener Treiber und therapeutisches Ziel in der MLLr- Leukämie	26
3.2. Die Bedeutung des Zellursprungs in der MLLr-Leukämogenese - PLK1 als Treiber der kindlichen Leukämogenese.....	30
3.3. Kombinierte Inhibition von PLK-1 und AURKA zur Überwindung der Volasertib-Resistenz in der erwachsenen MLLr-Leukämie	34
4. Zusammenfassung.....	36
5. Abkürzungsverzeichnis	38
6. Referenzen.....	42
7. Erklärung zum Eigenanteil	57
8. Danksagung	58

1. Einleitung

Zur leichteren Lesbarkeit und Übersichtlichkeit wird in dieser Dissertation das generische Maskulinum bei personenbezogenen Substantiven und Pronomen verwendet. Sämtliche Personenbezeichnungen beziehen sich selbstverständlich gleichermaßen auf alle Geschlechter und Identitäten und dienen allein der sprachlichen Vereinfachung. Zudem wird darauf hingewiesen, dass die hier verwendete Gennomenklatur nicht der aktuellen HUGO-Gennomenklatur entspricht, um den Bezug zu den Publikationen, auf denen diese Dissertation basiert, nicht zu verlieren.

1.1. Leukämien

Die Bildung der zellulären Blutbestandteile, auch Hämatopoese genannt, ist ein hochkomplexer und streng regulierter Prozess, der primär im roten Knochenmark abläuft (Till and McCulloch, 1980). Im Zentrum dieses Systems stehen die hämatopoetischen Stammzellen (*hematopoietic stem cell*, HSCs), die sich durch ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung und ihr Potenzial zur Differenzierung in sämtliche hämatopoetische Vorläuferzellen auszeichnen (Bujko et al., 2019, Till and McCulloch, 1980). Während der fortschreitenden Differenzierung verlieren diese Zellen sukzessive ihr Entwicklungspotenzial und spezialisieren sich auf bestimmte Zelltypen (Till and McCulloch, 1980). Die Organisation der Hämatopoese folgt einer hierarchischen Struktur: An der Spitze stehen die HSCs, gefolgt von multipotenten und anschließend oligopotenten Vorläuferzellen, die sich schließlich zu den reifen, funktionellen Zellen der myeloischen und lymphatischen Reihen entwickeln (Eaves, 2015, Notta et al., 2011, Zhang et al., 2018). Zu den myeloischen Zelltypen zählen Erythrozyten, Thrombozyten, Monozyten sowie Granulozyten (neutrophil, eosinophil, basophil), während die lymphatische Linie B-Zellen, T-Zellen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) umfasst (Eaves, 2015, Notta et al., 2011, Zhang et al., 2018).

Die Aufrechterhaltung einer kontinuierlichen und bedarfsgerechten Blutbildung erfordert eine präzise Regulation des Gleichgewichts zwischen Seneszenz,

Selbsterneuerung und Differenzierung der HSCs (Orkin, 1998). Dieses Gleichgewicht wird durch ein komplexes Netzwerk aus Kontroll- und Korrekturmechanismen gewährleistet, die Störungen frühzeitig erkennen und kompensieren können (Orkin, 1998). Bereits geringfügige Dysregulationen in diesem fein abgestimmten System können jedoch schwerwiegende hämatologische Erkrankungen nach sich ziehen (Bouligny et al., 2023). Genetische Aberrationen, darunter chromosomale Translokationen, Deletionen, Punktmutationen und epigenetische Veränderungen können die physiologische Reifung hämatopoetischer Stammzellen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien stören und so die Entstehung unreifer, nicht funktionsfähiger Zellklone begünstigen (Bouligny et al., 2023, Orkin and Zon, 2008, Ribatti and d'Amati, 2023, Shimony et al., 2023). Leukämie ist definiert als die klonale Expansion einer solchen genetisch veränderten Zelle im Knochenmark, die durch ungehemmte Proliferation und Differenzierungsblockade gekennzeichnet ist und in der Folge die gesunde Hämatopoese verdrängt (Bouligny et al., 2023, Zhang et al., 2018). Diese Infiltration des Knochenmarks, des peripheren Blutes sowie lymphatischer und nicht-lymphatischer Organe durch die malignen Klone führt zu den klinischen Symptomen einer Leukämie (Bouligny et al., 2023, Zhang et al., 2018). Neben Fieber, Nachtschweiß und ungewolltem Gewichtsverlust, die zusammen als B-Symptomatik bezeichnet werden, manifestiert sich die Leukämie in Zytopenien, die sich als verminderte Leistungsfähigkeit bei Anämie, Blutungsneigung bei Thrombozytopenie und vermehrte Infektanfälligkeit bei Granulozytopenie äußern (Gökbuget, 2024, Röllig, 2024). Zudem können Infiltrationen des lymphatischen Systems zu vergrößerten, nicht-infektassoziierten Lymphknoten führen (Gökbuget, 2024, Röllig, 2024).

Die Klassifikation der Leukämien erfolgt zunächst nach dem Differenzierungsgrad der Ursprungszelle: Akute Leukämien entstehen aus frühen Stamm- oder Vorläuferzellen und zeichnen sich durch einen raschen Verlauf aus, während chronische Leukämien aus reiferen Zellen hervorgehen und einen langsameren Progress zeigen (Arber et al., 2016). Eine weitere Einteilung erfolgt anhand des betroffenen Zelltyps, in myeloische und lymphatische Leukämien (Alaggio et al., 2022, Gökbuget, 2024, Khoury et al., 2022a, Röllig, 2024). Die

Identifikation der verschiedenen Zellstadien und -typen erfolgt unter anderem durch die Analyse spezifischer Oberflächenmarker (*cluster of differentiation*, CD). So sind humane HSCs typischerweise durch den Phänotyp CD34⁺/CD38⁻ charakterisiert (Notta et al., 2011), während lymphatische B-Zellen beispielsweise CD19⁺, CD20⁺ oder CD24⁺ und myeloische Zellen Marker wie CD11c⁺, CD16⁺ oder CD64⁺ exprimieren (Park et al., 2020). Die Integration von Zytomorphologie, Immunphänotypisierung anhand von CD-Markern und zytogenetischen Analysen ermöglicht die Unterscheidung der akuten Leukämien in die zwei folgenden Hauptformen: akute myeloische Leukämie (AML), akute lymphatische Leukämie (ALL). Es besteht eine Vielzahl an Unterklassen, die nach dem Schema der World Health Organisation (WHO) eingeteilt werden (Khoury et al., 2022b). Diese differenzierte Klassifikation bildet die Grundlage für Diagnostik, Prognoseabschätzung und Therapieplanung bei Leukämiepatienten (Alaggio et al., 2022, Gökbuget, 2024, Khoury et al., 2022b, Röllig, 2024).

1.2. MLL Funktion und Regulation

Das *Mixed-Lineage Leukemia* (MLL)-Gen, auch als KMT2A bezeichnet, kodiert eine Histon-Lysin-N-Methyltransferase, die eine zentrale Rolle in der epigenetischen Regulation der Genexpression spielt (Meyer et al., 2023). Lokalisiert auf Chromosom 11q23, katalysiert MLL die Methylierung von Histon H3 an Lysin 4 (H3K4me) und steuert damit die Transkription einer Vielzahl von Zielgenen. Insbesondere werden hierdurch die Homeobox (HOX)-Gene reguliert, welche essenziell für die embryonale Entwicklung und die Hämatopoese sind (Chang et al., 2010, Tkachuk et al., 1992, Yu et al., 1995). Akute myeloische und lymphatische Leukämien mit MLL-Rearrangements (MLLr) zählen zu den aggressivsten hämatologischen Neoplasien und sind mit einer äußerst ungünstigen Prognose assoziiert (Meyer et al., 2018). Diese chromosomalen Umlagerungen treten sowohl *de novo* als auch therapieassoziiert auf und repräsentieren einen erheblichen Anteil der Hochrisiko-Subgruppen innerhalb der akuten Leukämien (Meyer et al., 2023). Die MLL-Translokationen führen zur Entstehung von Fusionsgenen, wobei über 90 % der Fälle auf acht häufige

Partner entfallen, darunter ALF Transcription Elongation Facotor 1 (AF4, synonym AFF1), MLLT3 Super Elongation Complex Subunit (AF9, synonym MLLT3), MLLT1 Super Elongation Complex Subunit (MLLT1, ENL) oder Afadin Adherens Junction Formation Factor (AFDN, synonym AF6) (Marschalek, 2016). Die meisten dieser Fusionspartner kodieren für Proteine, die in Multiproteinkomplexe integriert sind und im Zellkern, an der Zellmembran oder im Zytoplasma lokalisiert sind (Meyer et al., 2023). Besonders hervorzuheben ist, dass einige dieser Proteine, darunter AF4, ALF Transcription Elongation Factor 4 (AFF4), MLLT1, AF9 und Elongation Factor for RNA Polymerase II (ELL), dem sogenannten *super elongation complex* (Superelongationskomplex, SEC) angehören, einem für die Transkriptionselongation essenziellen Komplex. Die Fusion von MLL mit einem dieser SEC-Gene resultiert in einem pathologisch stabilisierten Transkriptionskomplex an MLL-Zielgenen wie den HOX-Genen oder dem Protoonkogen BHLH Transcription Factor (MYC), was die leukämische Transformation maßgeblich fördert (Krivtsov et al., 2006, Marschalek, 2016).

Betrachtet man die Verteilung der häufigsten MLL-Fusionspartner kann man deutliche Unterschiede bezüglich des Leukämietyps und des Erkrankungsalters feststellen. Die MLL-Translokation mit dem Fusionspartner AF4 (MLL-AF4, t(4;11)) ist mit 56,5 % die häufigste Translokation in der MLL-rearrangierten ALL, wohingegen bei AML-Patienten die MLL-Translokation mit dem Fusionspartner AF9 (MLL-AF9, t(9;11)) mit 30,4 % dominiert (Meyer et al., 2023). Betrachtet man nun zusätzlich das Erkrankungsalter, sind bei diagnostizierten ALL MLL-Rearrangements im Säuglingsalter besonders häufig und liegen bei 70–80 %, während bei älteren Kindern etwa 5–6 % und im Erwachsenenalter etwa 13–15 % MLL-Rearrangements auftreten (Górecki et al., 2023, Hilden et al., 2006, Kim et al., 2023, Kulczycka et al., 2024, Shimony et al., 2023). Bei AML-Patienten treten MLL-Rearrangements im Kindesalter bei 16–20 % der Fälle auf und bei Kindern unter 2 Jahren sogar bis zu 47–55 % (Harrison et al., 2010, Tseng et al., 2023). Bei Erwachsenen mit *de novo* AML sind MLL-Rearrangements dagegen wesentlich seltener (2,6–6 %) (Hernández-Sánchez et al., 2024, Schoch et al., 2003), wohingegen jedoch bei therapieassoziiierter AML die Häufigkeit auf 9,4 % steigt (Schoch et al., 2003). Diese molekularen Unterschiede spiegeln sich in der

klinischen Präsentation, dem Krankheitsverlauf, der Prognose und dem Therapieansprechen wieder (Meyer et al., 2023). Infantile MLL-rearrangierte Leukämien sind überwiegend B-ALL-assoziiert und zeichnen sich durch eine besonders schlechte Prognose aus, wohingegen erwachsene MLL-rearrangierte Leukämien häufig einen myelomonozytären Phänotyp aufweisen und eine intermediäre Prognose besitzen (Creutzig, 2024, Dohner et al., 2022, Escherich, 2024, Inaba and Mullighan, 2020). Besonders ungünstig ist das Auftreten von MLL-Rearrangements in Erwachsenen mit ALL, da es hier mit einer hohen Rezidivrate und einer ausgeprägten Chemoresistenz verbunden ist (Gökbuget, 2024). Insgesamt zeigen diese Zahlen, dass MLL-Rearrangements vor allem bei Säuglingen mit ALL und bei Kindern mit AML eine herausragende Bedeutung haben, während sie bei Erwachsenen, mit Ausnahme von therapieassoziierten Fällen, deutlich seltener auftreten.

Die ausgeprägte Aggressivität und Therapieresistenz der MLLr-Leukämien erfordert intensive therapeutische Strategien, die in der Regel aus einer Induktionschemotherapie mit Cytarabin und Anthrazyklinen, gefolgt von Konsolidierungs- und Erhaltungstherapien, bestehen (Gökbuget, 2024, Röllig, 2024). Dennoch sind Rückfälle und Therapieversagen häufig, sodass alternative Behandlungsansätze wie die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation oder innovative Immuntherapien, etwa *chimeric antigen receptor* (chimärer Antigenrezeptor, CAR)-T-Zell-Therapien, zunehmend in den Fokus rücken (Balducci et al., 2017, Tomizawa et al., 2020). Angesichts der hohen Rezidivrate und der ausgeprägten Chemoresistenz liegt der Schwerpunkt aktueller translationaler Forschung auf der Entwicklung zielgerichteter Therapien, die epigenetische Mechanismen, zellzyklusregulierende Faktoren oder metabolische Prozesse, die beispielsweise den Cholesterinstoffwechsel adressieren (Erkner et al., 2024, Rice and Roy, 2020, Winters and Bernt, 2017). Ziel ist es, die molekularen Grundlagen der MLLr-Leukämien umfassend zu entschlüsseln und daraus innovative, personalisierte Therapiestrategien für diese Hochrisikopatienten abzuleiten.

1.3. Der Einfluss des Zellursprungs auf die Leukämogenese

In den letzten Jahren hat sich in der hämatologischen Forschung zunehmend herausgestellt, dass zwischen fetalen und adulten hämatopoetischen Zellen fundamentale Unterschiede bestehen, die weit über phänotypische Merkmale hinausgehen (Bowie et al., 2007). Insbesondere divergieren diese Zellen hinsichtlich ihres Proliferationspotenzials, ihrer Differenzierungsfähigkeit sowie ihrer Sensitivität gegenüber onkogenen Mutationen und therapeutischen Interventionen (Bowie et al., 2007). Diese Unterschiede besitzen erhebliche Auswirkungen auf die Pathogenese und das klinische Verhalten von Leukämien, insbesondere solcher mit Rearrangements des MLL-Gens (Duguid et al., 2021, Krivtsov et al., 2013, Meyer et al., 2023). Die Transition von fetalen zu adulten HSCs ist ein hoch regulierter, dynamischer Prozess, der mit tiefgreifenden Veränderungen im hämatopoetischen und immunologischen System einhergeht (Mack et al., 2021). Während der frühen Entwicklung koexistieren fetale und adulte HSCs, wobei die fetalen Zellen durch eine hohe lymphoide Differenzierungstendenz und eine größere Entwicklungsfähigkeit geprägt sind (Mack et al., 2021). Im Verlauf der postnatalen Reifung werden diese zunehmend durch adulte HSCs ersetzt, was mit einer Umstellung hämatopoetischer Programme und einer veränderten Immunantwort einhergeht. Störungen oder Verzögerungen in diesem Übergang können zu einer Persistenz fetaler Eigenschaften führen, was das Risiko für die Entwicklung bestimmter Leukämieformen im Kindesalter erhöht (Chen et al., 2019, Mack et al., 2021, Xie et al., 2024).

Die hämatopoetische Mikroumgebung während der fetalen Entwicklung stellt ein hochspezialisiertes, dynamisches System dar, das sich grundlegend von der adulten Knochenmarknische unterscheidet (Liu et al., 2022). Im fetalen Organismus übernehmen mesenchymale Stammzellen (*mesenchymal stem cells*, MSCs) eine Schlüsselrolle in der Regulation der hämatopoetischen Nische, indem sie die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix steuern und ein breites Spektrum an Wachstumsfaktoren und Zytokinen sezernieren (Campagnoli et al., 2001, O'Donoghue and Chan, 2006). Diese Faktoren

unterstützen die Selbsterneuerung, Differenzierung und Mobilisierung der HSCs und schaffen so ein mikroökologisches Milieu, das die Plastizität und Anpassungsfähigkeit der fetalen Hämatopoese fördert (Campagnoli et al., 2001, O'Donoghue and Chan, 2006, Zeng et al., 2020). Die fetale Leber fungiert als primäres hämatopoetisches Organ, bevor das Knochenmark kolonisiert wird. Spezialisierte stromale Zellpopulationen exprimieren hier Faktoren wie Stammzellfaktor (*stem cell factor*, SCF), angiopoietin-ähnliche Proteine und Insulin-like Growth Factor 2 (IGF2), die gemeinsam die Expansion und Funktion der HSCs unterstützen (Zeng et al., 2020). Die besonderen Eigenschaften der fetalen Mikroumgebung modulieren nicht nur die normale Hämatopoese, sondern schaffen auch ein Umfeld, das die Initiierung und Persistenz leukämischer Klone begünstigen kann (Liu et al., 2022, O'Donoghue and Chan, 2006). Die spezifische Prägung der Ursprungszelle und die molekularen Signale der Nische bestimmen, welche onkogenen Programme nach einer Transformation aktiviert werden können, und beeinflussen so die Aggressivität und Therapieresistenz kindlicher Leukämien, insbesondere bei MLL-Rearrangements (Chan and Chen, 2019, Li et al., 2025, Shimada et al., 2008, Viñado et al., 2022). Neben der Mikroumgebung, definiert die epigenetische Prägung der Ursprungszelle maßgeblich, welche onkogenen Programme nach einer Transformation aktiviert werden können. Das epigenetische Profil, insbesondere Methylierungsmuster und Chromatinstruktur, unterscheidet sich signifikant zwischen fetalen und adulten HSCs und beeinflusst, welche Signalwege und Zielgene wie HOXA9, MEIS1 oder FLT3 nach einer Transformation aktiviert werden (George et al., 2016). Dadurch werden nicht nur die initialen Transformationsereignisse, sondern auch die spätere Therapiesensitivität und das Rückfallrisiko entscheidend geprägt (Garcia et al., 2018, George et al., 2016). Experimentelle Studien belegen, dass ein Funktionsverlust des MLL-Gens während der Embryonalentwicklung zu gravierenden hämatopoetischen Defekten und letalen Verläufen führt (Butler et al., 1997, Ernst et al., 2004, Yu et al., 1995). Bereits pränatal auftretende genetische Veränderungen im fetalen hämatopoetischen System können die Grundlage für die spätere Manifestation einer ALL legen (Meyer et al., 2023). Besonders auffällig, ist die hohe Inzidenz und Aggressivität

der B-Zell-Vorläufer-ALL (*B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia*, BCP-ALL) im Säuglingsalter, die häufig mit chromosomalen Umlagerungen des MLL-Gens assoziiert ist. Im Vergleich zu Erwachsenen zeigen sich bei Säuglingen deutlich gravierendere Auswirkungen dieser Aberrationen, was sich in einer schlechteren Prognose und erhöhten Rezidivraten widerspiegelt (Creutzig, 2024, de Barrios and Parra, 2021, Dohner et al., 2022, Escherich, 2024). Zusätzlich gibt es Hinweise dafür, dass bereits pränatal chromosomale Translokationen bestehen, die Jahre vor dem Ausbruch der Leukämie nachgewiesen werden können. Dazu gehört neben ETV6-RUNX1 (TEL-AML1) mit großer Evidenz auch MLL-Rearrangements, wie durch Zwillingsstudien und Neugeborenen Blutanalyse gezeigt werden konnte (Inaba and Mullighan, 2020). In vielen kindlichen ALL-Fällen ist die MLL-Translokation die einzige *driver* Mutation, was ein Hinweis dafür ist, dass die MLL-Translokation alleine ausreichend ist, um die Leukämie auszulösen (Mack et al., 2021). Um die funktionelle Relevanz des Zellursprungs in der MLLr-Leukämogenese systematisch zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit ein CRISPR/Cas9-basiertes MLL-AF9-Modell in CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen etabliert, die sowohl aus humanem Nabelschnurblut (*human cord blood*, huCB) als auch aus adultem Knochenmark (*human bone marrow*, huBM) isoliert wurden (Fischer et al., 2024, Secker et al., 2020b) und somit die kindliche und erwachsene MLLr Leukämie imitiert.

1.4. PLK-1

Polo-like Kinase 1 (PLK-1) ist ein Mitglied der Familie der Serin/Threonin-Proteinkinasen und nimmt eine Schlüsselrolle in der Regulation des eukaryotischen Zellzyklus ein. Insbesondere im Hinblick auf den Eintritt in die Mitose, die Reifung der Zentrosomen, die korrekte Ausbildung des mitotischen Spindelapparats sowie die ordnungsgemäße Chromosomentrennung während der Zytokinese spielt PLK-1 eine wichtige Rolle (Barr et al., 2004, Chow et al., 2017, Renner et al., 2009). Die Expression von PLK-1 unterliegt einer strikten zellzyklusabhängigen Regulation: Während in der ruhenden G0-Phase nur geringe Mengen exprimiert werden, erreicht die PLK-1-Expression in der M-

Phase ihr Maximum (Takai et al., 2005). Strukturell gliedert sich PLK-1 in eine N-terminale Kinasedomäne, einer dazwischenliegenden Verbindungsregion sowie einer C-terminal gelegenen Polo-Box-Domäne (PBD). Die N-terminale Kinasedomäne enthält Serin/Threonin-Reste, deren Phosphorylierung essenziell für die Aktivierung der Kinasefunktion ist. Diese Aktivierung wird über die Phosphorylierung durch Aurora Kinase A (AURKA) in Verbindung mit dem Co-Faktor Aurora Kinase A Activator (BORA) gesteuert (Bruinsma et al., 2014). In der aktiven Form phosphoryliert PLK-1 unter anderem den CyclinB1/CDK1 (CCNB1/CDK1)-Komplex und initiiert gleichzeitig die Degradierung dessen Inhibitor WEE1 via Ubiquitinierung. Zusammen mit weiteren Faktoren ermöglicht dies den Übergang der Zelle in die Mitose (Gavet and Pines, 2010, Ghelli Luserna di Rora et al., 2017). Die Regulation von PLK-1 erfolgt über ein komplexes Netzwerk aus Zellzyklus-Checkpoints, insbesondere durch das Tumorsuppressor-Protein p53 (Fischer et al., 2015, Liu et al., 2010, McKenzie et al., 2010), sowie durch den Transkriptionsfaktor FOXM1 (Zhang et al., 2016).

Zahlreiche Studien belegen eine Überexpression von PLK-1 nicht nur in soliden Tumoren, wie dem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom, gastrointestinalen Tumoren, Mammakarzinomen oder Gliomen, sondern auch in hämatologischen Malignomen wie der akuten myeloischen und lymphatischen Leukämie (Goroshchuk et al., 2019, Takai et al., 2005). In Kaplan-Meier-Analysen zeigte sich, dass Patienten mit hoher PLK-1-Expression in insgesamt zehn Tumorentitäten eine signifikant schlechtere Gesamtüberlebensrate (*overall survival*, OS) aufwiesen als jene mit niedrigerer Expression (Liu et al., 2017). Diese Korrelation ließ sich ebenfalls für erwachsene AML-Patienten bestätigen (Renner et al., 2009). Weitergehend ist bemerkenswert, dass bei kindlichen AML-Erkrankungen noch deutlich höhere PLK-1-Genexpressionslevel gemessen wurden als bei erwachsenen AML-Patienten (Wang et al., 2015). Jüngste Untersuchungen belegen zudem, dass PLK-1 eine essenzielle Rolle für das Überleben von kindlichen ALL-Zellen mit MLL-Translokationen übernimmt (Symeonidou et al., 2021). Dies macht PLK-1 zu einem vielversprechenden therapeutischen Ziel bei kindlichen MLLr-Leukämien und stellt deshalb einen Schwerpunkt dieser Arbeit dar.

In den vergangenen Jahren wurden verschiedene PLK-1-Inhibitoren entwickelt und in klinischen Studien getestet. Trotz einer weitestgehend guten Verträglichkeit blieb der therapeutische Erfolg, insbesondere bei erwachsenen Leukämiepatienten in Monotherapieansätzen bislang begrenzt (Brandwein, 2015, Dohner et al., 2021, Gjertsen and Schöffski, 2015, Gutteridge et al., 2016, Liu et al., 2017, Murugan et al., 2011, Van den Bossche et al., 2016). Die ausgeprägt hohe PLK1-Expression in kindlichen Leukämien weist darauf hin, dass eine gezielte Inhibition von PLK-1 eine Therapieoption in dieser Patientengruppe sein könnte. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass der PLK-1-Inhibitor R03280 in kindlichen AML-Zellen eine ausgeprägte Apoptoseinduktion bewirkt (Wang et al., 2015). Vergleichbare Ergebnisse wurden für kindliche ALL-Zellen unter Behandlung mit dem PLK-1-Inhibitor NMS-P937 gezeigt (Hartsink-Segers et al., 2013). Der bislang vornehmlich bei erwachsenen AML-Patienten getestete Inhibitor Volasertib (BI6727) zeigte in klinischen Studien zwar eine gute Wirksamkeit, blieb jedoch hinter den Erwartungen zurück. Es zeigten sich nur unzureichende Therapierfolge, wie beispielsweise das Erreichen einer partiellen Remission (Van den Bossche et al., 2019, Van den Bossche et al., 2016).

Aktuelle Erkenntnisse weisen darauf hin, dass PLK-1 nicht nur eine zentrale Rolle in der Leukämogenese kindlicher Leukämien einnimmt, sondern auch an der Pathophysiologie von MLLr-Leukämien beteiligt ist. Es konnte gezeigt werden, dass PLK-1 ein onkogener Treiber ist, der für das Überleben von infantilen MLL-AF4 ALL-Zellen von zentraler Bedeutung ist (Symeonidou et al., 2021, Wang et al., 2015). Die Überexpression und funktionelle Relevanz von PLK-1 in diesem besonders aggressiven Subtyp unterstreicht die Bedeutung als molekulares Schlüsselprotein und vielversprechendem therapeutischem Angriffsziel. Insbesondere die gezielte pharmakologische Inhibition von PLK-1, etwa durch den Einsatz von Volasertib, eröffnet neue Perspektiven für die Entwicklung differenzierter und personalisierter Therapiestrategien bei kindlichen MLLr-Leukämien zur Verbesserung der Prognose in dieser Hochrisikogruppe.

1.5. NOTCH1

Das Neurogenic Locus Notch Homolog Protein 1 (NOTCH1) Gen kodiert für ein Mitglied der NOTCH-Rezeptorfamilie, dessen Protein mit charakteristischem Aufbau den Typ-I-Transmembranproteinen angehört. Eine extrazelluläre Domäne, welche zahlreiche Epidermal Growth Factor (EGF)-ähnliche Wiederholungen enthält, vermittelt die Interaktion mit spezifischen Liganden, während die intrazelluläre Domäne vielfältige funktionelle Abschnitte umfasst, die an Signaltransduktion und Transkriptionsregulation beteiligt sind (Fang-Fang et al., 2021). Im menschlichen Organismus sind vier verschiedene NOTCH-Rezeptoren und fünf korrespondierende Liganden bekannt, darunter Delta-like 1 (DLL1), Delta-like 4 (DLL4), Jagged 1 (JAG1) und Jagged 2 (JAG2) (McCarter et al., 2018).

Die Aktivierung des NOTCH1-Signalwegs erfolgt über die Bindung eines dieser Liganden an den Rezeptor, wobei calciumabhängige Strukturelemente für die Interaktion maßgeblich sind (Kopan and Ilagan, 2009). Daraufhin kommt es zu einer sequenziellen proteolytischen Spaltung durch ADAM10/17-Metalloproteasen gefolgt von einer intramembranösen Spaltung durch den γ -Sekretase-Komplex (Kopan and Ilagan, 2009). Diese Prozessierung resultiert in der Freisetzung der NOTCH1-intrazellulären Domäne (*Notch1 intracellular domain*, NICD), die als aktiver Signalmediator in den Zellkern transloziert. Dort wirkt die NICD als Transkriptionsfaktor und reguliert die Expression zahlreicher Zielgene, die an zentralen zellulären Prozessen wie Proliferation und Differenzierung beteiligt sind (Kopan and Ilagan, 2009). Relevant ist die zuletzt nachgewiesene Regulation der NICD-Stabilität durch die Cyclin-abhängige Kinase 1 (CDK1), wodurch die Funktionalität des aktiven NOTCH-Signalwegprodukts unmittelbar von der zellulären Zyklusregulation abhängt (Carrieri et al., 2019). Die Fehlregulation des NOTCH1-Signalwegs ist in den vergangenen Jahren detailliert für eine Reihe solider und hämatologischer Neoplasien, insbesondere der T-ALL, charakterisiert worden (Liu et al., 2013, Zhang et al., 2023) und hat Eingang in die onkologische Routinediagnostik gefunden (Duncavage et al., 2022). Im Kontext der akuten myeloischen

Leukämie ist der funktionelle Stellenwert des NOTCH1-Signalwegs hingegen bislang nur unzureichend untersucht (Li et al., 2023).

Je nach zellulärem Kontext kann NOTCH1 dabei sowohl tumorunterdrückende als auch onkogene Effekte entfalten (Klinakis et al., 2011, Stransky et al., 2011). Therapeutische Bestrebungen zur Inhibition dieser Signalachse erfolgten zunächst insbesondere durch γ -Sekretase-Inhibitoren (*γ -secretase inhibitors*, GSIs), die trotz vielversprechender klinischer Effekte insbesondere in Kombinationstherapien, nicht zuletzt aufgrund schwerer gastrointestinaler Nebenwirkungen in ihrer Anwendbarkeit limitiert waren (Golde et al., 2013, Krop et al., 2012, Mukherjee et al., 2016). Angesichts der pathophysiologischen Bedeutung des NOTCH1-Signalwegs, speziell im Kontext der Leukämie, wurden daher alternative gezielte Ansätze entwickelt (Roti and Stegmaier, 2011). Hierzu zählt die Pharmakotherapie mittels Inhibition der sarco-endoplasmatischen Ca^{2+} -ATPase (SERCA), einem essenziellen Regulator der Vorprozessierung des NOTCH1-Rezeptors (Roti and Stegmaier, 2011). Herkömmliche SERCA-Inhibitoren erwiesen sich jedoch als nur eingeschränkt klinisch einsetzbar, da sie häufig ausgeprägte kardiale Toxizität aufgrund einer unspezifischen Beeinflussung der Kalziumhomöostase induzieren (Gharaibeh et al., 2020). Mit der Entwicklung des SERCA-Inhibitors CAD204520, der eine deutlich verbesserte Selektivität und minimierte Off-Target-Toxizität gegenüber vorherigen Substanzen aufweist, besteht nun erstmals die Möglichkeit, die funktionellen Auswirkungen der gezielten NOTCH1-Inhibition präklinisch und translational in myeloischen Leukämiemodellen systematisch zu untersuchen und neue therapeutische Optionen zu erschließen (Marchesini et al., 2020, Pagliaro et al., 2021). Das in dieser Arbeit verwendete CRISPR/Cas9 MLLr-Zellmodell zeigte nicht nur eine erhöhte Expression des NOTCH1-Gens, sondern auch des Rezeptors an der Oberfläche (Fischer et al., 2023). Aufbauend auf diesen Erkenntnissen wurde gezielt der SERCA-Inhibitor CAD204520 eingesetzt, um das therapeutische Potenzial einer spezifischen NOTCH1-Inhibition in MLLr-Leukämien zu evaluieren (Fischer et al., 2023). Bislang existieren hierzu keine vergleichbaren Forschungsansätze, sodass diese Arbeit einen wichtigen Beitrag

zur Grundlagenforschung und zur Entwicklung neuer Therapiestrategien in diesem Kontext leistet.

1.6. CRISPR/Cas9 MLLr-Zellmodell

Für die Erforschung der Leukämogenese und die Entwicklung neuer Therapieansätze sind valide präklinische Modelle unverzichtbar. Während primäre Leukämiezellen von Patienten den höchsten klinischen Bezug bieten, ist ihre Verfügbarkeit insbesondere bei pädiatrischen Patienten limitiert, und ihre *ex vivo* Viabilität stark eingeschränkt (Bruserud et al., 2001, Mayani et al., 2009, Rynningen et al., 2007). Etablierte Zelllinien sind experimentell leicht handhabbar, weisen jedoch infolge langanhaltender *in vitro* Kultivierung genomische Veränderungen auf, die ihre Aussagekraft bei Studien zu spezifischen Mutationen reduzieren (Kasai et al., 2016, Rücker et al., 2006). Zudem weisen diese Zelllinien häufig multiple Mutationen und komplexe chromosomale Aberrationen auf, wodurch sich therapeutische Effekte nur schwer eindeutig auf einzelne molekulare Veränderungen zurückführen lässt (Kasai et al., 2016, Rücker et al., 2006).

Eine gute Alternative stellt die gezielte Induktion von MLL-typischen Translokationen t(4;11) (MLL-AF4) und t(9;11) (MLL-AF9) mittels CRISPR/Cas9 in CD34⁺ hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen dar. Hierzu werden hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen (*hematopoietic stem- and progenitor cells*, HSPCs) aus humanem Nabelschnurblut (*human cord blood*, huCB) und humanem adultem Knochenmark (*human bone marrow*, huBM) verwendet (Secker et al., 2020a, Secker et al., 2020b, Secker et al., 2019). Im Vergleich zu früheren Methoden wie *transcription activator-like effector nucleases* (TALENs) konnte durch den Einsatz von CRISPR/Cas9 die Effizienz der gezielten Translokationsinduktion deutlich gesteigert werden (Buechele et al., 2015). Das resultierende Modellsystem, unterstützt durch ein definiertes Zytokinmilieu, erlaubt die Nachbildung eines unreifen leukämischen Phänotyps mit Expressionsmustern charakteristischer Marker wie CD32⁺, CD33⁺ sowie die Aktivierung MLL-relevanter Schlüsselgene, darunter HOX, Homeobox Protein

Meis1 (MEIS1) und MYC (Secker et al., 2020a, Secker et al., 2020b, Secker et al., 2019). Ein besonderer Vorteil dieses Systems liegt in der Möglichkeit, sowohl kindliche als auch erwachsene MLLr Leukämien nachzustellen durch die Verwendung von HSPCs unterschiedlichen Ursprungs, um somit zellursprungsabhängige Unterschiede in Leukämieentstehung und Therapieansprechen präzise zu untersuchen (Fischer et al., 2024). Diese CRISPR/Cas9-basierten Modelle bilden damit eine patientennahe Plattform zur präklinischen Wirkstofftestung und tragen wesentlich zur translationalen Leukämieforschung bei.

1.7. Wissenschaftliche Fragestellung

Leukämien sind klonale Neoplasien des hämatopoetischen Systems, deren Pathogenese maßgeblich durch genetische und epigenetische Alterationen bestimmt wird. Insbesondere MLL-rearrangierte Leukämien gehen mit einer hohen Aggressivität, ungünstiger Prognose sowie ausgeprägter Therapieresistenz einher, vor allem bei akuten Leukämien im Säuglingsalter. In der Forschung rückt daher zunehmend der zelluläre Ursprung (*cell of origin*) der Leukämogenese in den Fokus, als auch die Entwicklung zielgerichteter therapeutischer Behandlungsstrategien.

Ziel dieser Dissertation ist es, die molekularen Mechanismen der MLLr-Leukämogenese unter besonderer Berücksichtigung des Zellursprungs zu charakterisieren und neue therapeutische Zielstrukturen zu identifizieren. Im Mittelpunkt stehen dabei die Identifikation und funktionelle Analyse der Signalwege von NOTCH1 und PLK-1. Zudem wird untersucht, inwieweit eine gezielte pharmakologische Hemmung dieser Signalwege differenzierte Therapieoptionen für MLLr-Leukämien darstellen. Dabei wird zudem der Einfluss der Ursprungszelle untersucht, um gezielte Therapieoptionen bei kindlichen oder erwachsenen MLLr-Leukämien zu identifizieren.

2. Ergebnisse

Im Folgenden sind die Ergebnisse zweier Forschungsartikel, die dieser kumulativen Dissertation zugrunde liegen, zusammengefasst (Fischer et al., 2023, Fischer et al., 2024). Beide Publikationen sind im Anhang beigelegt.

2.1. Uncovering NOTCH1 as a Promising Target in the Treatment of MLL-Rearranged Leukemia

Fischer J, Erkner E, Fitzel R, Radszuweit P, Keppeler H, Korkmaz F, Roti G, Lengerke C, Schneidawind D, Schneidawind C., *Int J Mol Sci.* 2023 Sep 23;24(19):14466. doi: 10.3390/ijms241914466

Im ersten Abschnitt dieser Arbeit wird die zentrale Bedeutung von NOTCH1 in der MLL-rearrangierten Leukämie umfassend untersucht. Zur Analyse der Rolle von NOTCH1 in der Pathogenese sowie zur Evaluierung seines Potenzials als therapeutische Zielstruktur in MLLr-Leukämien, wurde das CRISPR/Cas9-basierte Modellsystem eingesetzt (Secker et al., 2020a, Secker et al., 2020b, Secker et al., 2019). Dieses in der Einleitung beschriebene System ermöglicht die Induktion der spezifischen chromosomalen Translokationen MLL-AF4 und MLL-AF9 in CD34⁺ HSPCs aus huCB und bietet somit die Möglichkeit den Krankheitskontext realitätsnah *in vitro* abzubilden.

Durch RNA-Sequenzierungen (RNA-Seq) dieser MLLr-Zellen konnte im Gegensatz zu den nur mit Cas9-behandelten Wildtyp HSPCs Kontrollzellen, eine signifikante Überexpression von NOTCH1 detektiert werden. Dies konnte durch *reverse transcription quantitative Polymerase chain reaction* (RT-qPCR) Analysen bestätigt werden. Zusätzlich konnte dieser Befund untermauert werden durch ein erhöhtes Expressionsniveau der NOTCH1 *downstream*-Zielgene Hes Family BHLH Transcription Factor 1 (HES1), Insulin Like Growth Factor 1 Receptor (IGF1R), Phosphatase And Tensin Homolog (PTEN) sowie des Liganden Jagged Canonical Notch Ligand 1 (JAG2). Parallel dazu zeigte sich eine signifikante Herunterregulierung des negativen NOTCH1-Regulators NOTCH regulated Ankyrin Repeat Protein (NRARP). Dieses molekulare Profil

wurde gleichermaßen in den MLLr-Zelllinien SEM (MLL-AF4) und THP-1 (MLL-AF9) sowie in primären MLLr-Patientenproben verifiziert. Die Relevanz dieser Signalwegveränderungen für das Patientenüberleben wird durch die Auswertung öffentlich zugänglicher AML-Datensätze gestützt. In diesen Analysen zeigt sich, dass eine niedrige NOTCH1-Expression mit einer verlängerten mittleren Überlebenszeit assoziiert ist. Konkret liegt die mittlere Überlebensdauer bei AML Patienten mit niedriger NOTCH1-Expression bei 16,1 Monaten, während sie bei Patienten mit hoher NOTCH1-Expression nur 13,4 Monate beträgt (kmplot.com) und somit die pathobiologische Schlüsselrolle von NOTCH1 in dem Krankheitsverlauf unterstreicht.

Zur Evaluation des therapeutischen Potenzials dieser Signalachse kam der selektive und gut verträgliche NOTCH1-Inhibitor CAD204520 zum Einsatz, ein SERCA-Inhibitor, der durch die Blockade der Ca^{2+} -ATPase die Vorprozessierung und entsprechende Einlagerung des NOTCH1-Rezeptors in die Zellmembran effektiv unterbindet (Marchesini et al., 2020, Pagliaro et al., 2021). In MLLr-Zellen konnte mittels Durchflusszytometrie eine deutlich erhöhte Oberflächen-Basisexpression des NOTCH1-Rezeptors nachgewiesen werden, korrelierend zu erhöhten NOTCH1-Genexpression, wohingegen Kontrollzellen (CD34^+ HSPCs) keine signifikante Rezeptorexpression aufwiesen. Nach 72-stündiger Behandlung mit CAD204520 zeigte sich in den MLLr-Modellen und auch in primären Patientenproben eine ausgeprägte, dosisabhängige Reduktion der Rezeptor-Expression, während gesunde Kontrollzellen von der Behandlung unbeeinflusst blieben. Des Weiteren bewirkte die Behandlung mit CAD204520 eine signifikante Reduktion der NOTCH1-Genexpression sowie der Expression nachgeschalteter Zielgene wie beispielweise HES1. Im Gegensatz dazu konnte unter der Behandlung mit Cytarabin, einem etablierten Chemotherapeutikum in der AML-Therapie, keinerlei Einfluss auf die NOTCH1-Genexpression festgestellt werden. Dies weist auf eine spezifische Wirkung von CAD204520 sowohl auf Rezeptor- als auch auf Gen-Ebene hin.

Anschließend wurden MLLr-Zellen und primäre MLLr-Patientenzellen für 72 Stunden einer zunehmenden Konzentrationsreihe von CAD204520 ausgesetzt.

Die Zellproliferation, bestimmt nach Trypanblau-Färbung und Zellzählung, nahm in Abhängigkeit von der Wirkstoffkonzentration dosisabhängig ab. Aus diesen Daten ergeben sich signifikant niedrigere IC₅₀-Werte für MLL-AF4 (4,99 µM) und MLL-AF9 (3,92 µM) im Vergleich zu den robusteren Kontrollzellen (9,78 µM). Die Annexin-V/Propidiumiodid (PI)-Färbung wies eine klare, dosisabhängige Induktion der frühen und späten Apoptose in MLLr-Zellen nach Inhibitorbehandlung nach, während die Kontrollzellen nur marginal betroffen waren. Zusätzlich wurde diese Beobachtung durch die Bestimmung der Viabilität der Zellen mithilfe des AlamarBlue-Assay ergänzt: Hier zeigte sich nach Inhibitorbehandlung eine signifikante, konzentrationsabhängige Reduktion der Zellviabilität in den MLLr-Zellen. Zellzyklusanalysen mittels Bromodeoxyuridin (BrdU)- und 7-Aminoactinomycin (7-AAD)-Färbung, gemessen mittels Durchflusszytometrie, ergaben eine Reduktion der Zellzahl in S- und G2/M-Phasen, ein Hinweis auf einen durch die NOTCH1-Hemmung hervorgerufenen Zellzyklusarrest. Dies unterstreicht den antiproliferativen Effekt und die Induktion eines programmierten Zelltods. Eine detaillierte phänotypische Charakterisierung ergab, dass MLLr-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen (CD14⁺/CD33⁺) einen unreifen Immunphänotyp (CD14⁻/CD33⁺) aufwiesen. Um zu prüfen, ob der antiproliferative Effekt von CAD204520 auf einer Ausreifung oder Differenzierung der Zellen beruht, wurde nach der Behandlung unter anderem erneut der Differenzierungsmarker CD14 bestimmt. Es zeigte sich jedoch keine Veränderung des Phänotyps. In der May-Grünwald-Giemsa-Färbung ließen sich stattdessen vermehrt Merkmale einer apoptotischen Zellschädigung nachweisen, sichtbar durch pyknotische Nukleolen und degenerierte Zellkerne. Auf molekularer Ebene zeigte die RT-qPCR nach Behandlung mit CAD204520 eine signifikante Herunterregulierung der MLL-typischen Zielgene MEIS1 und HOXA9, beides zentrale Determinanten des leukämischen Stammzellprogramms. Zusätzlich dazu kommt es zu einer Herunterregulation NOTCH1 relevanter Zielgene. Mechanistisch relevant ist hier die Herabregulierung von CDK1, welches sowohl die Zellzyklusprogression als auch die Stabilisierung des aktiven NICD vermittelt, sowie von CXCR4, einem weiteren NOTCH1-Zielgen mit Einfluss auf die Migration leukämischer Zellen.

Insgesamt belegen diese Untersuchungen, dass NOTCH1 in MLLr-Leukämiezellen spezifisch überexprimiert ist und eine pathophysiologisch zentrale Rolle einnimmt. Die gezielte Inhibition durch CAD204520 bewirkt selektiv in MLLr-Zellen eine Reduktion der Rezeptorexpression, eine effektive Blockade des nachgeschalteten Signalwegs sowie die Induktion von Apoptose, bei gleichzeitiger Schonung gesunder hämatopoetischer Zellen. Die Daten liefern somit eine rationale und experimentell validierte Grundlage für den Einsatz von CAD204520 oder vergleichbaren Inhibitoren als innovative Behandlungsoption für diese prognostisch ungünstige Leukämieform.

2.2. Only Infant MLL-Rearranged Leukemia Is Susceptible to an Inhibition of Polo-like Kinase 1 (PLK-1) by Volasertib

Fischer J, Erkner E, Radszuweit P, Hentrich T, Keppeler H, Korkmaz F, Schulze-Hentrich J, Fitzel R, Lengerke C, Schneidawind D, Schneidawind C., *Int J Mol Sci.* 2024 Nov 27;25(23):12760. doi: 10.3390/ijms252312760

Im Rahmen der zweiten Arbeit dieser kumulativen Dissertation wurde der Einfluss des zellulären Ursprungs auf molekulare Charakteristika und das Therapieansprechen bei MLLr-Leukämien umfassend untersucht. Dazu wurde das CRISPR/Cas9 MLLr-Zellmodell verwendet, welches aus huCB und huBM die kindliche bzw. erwachsene MLLr-Leukämie imitiert und somit eine systematische Analyse dieser Fragestellung ermöglicht. Die Relevanz des zellulären Ursprungs (*cell of origin*) für immunphänotypische Prägung, Signalwegaktivität und Therapieresponse ist in verschiedene hämatologische Erkrankungen inzwischen gut belegt (Bowie et al., 2007, Chan and Chen, 2019, Li et al., 2025, O'Donoghue and Chan, 2006, Shimada et al., 2008, Viñado et al., 2022). Vor dem Hintergrund jüngerer Studien, die PLK-1 als entscheidenden onkogenen Treiber der kindlichen MLLr-Leukämogenese beschreiben (Symeonidou et al., 2021, Wang et al., 2015), wurde die Expressionsdynamik dieser Kinase im MLLr-Zellmodell analysiert. Transkriptom Analysen mittels RNA-Sequenzierung (RNA-Seq) zeigten eine signifikante Überexpression von PLK-1, ausschließlich in den kindlichen aus huCB gezogenen MLL-AF9-Zellen. Diese Beobachtungen wurden

anschließend durch RT-qPCR bestätigt und konnte zusätzlich auch in etablierten MLLr-Zelllinien gezeigt werden. Die höchste PLK-1-Expression wurde konsistent in kindlichen MLL-AF4 und MLL-AF9 Zelllinien (THP-1, SEM) detektiert, wohingegen erwachsene MLLr-Zelllinien (RS4;11, NOMO-1) und Kontrollzelllinien (SKM1) niedrigere Werte aufwiesen. Zusätzliche Analysen an primären Patientenmaterialien bestätigten dieses Muster, hierbei wiesen besonders Zellen kindlicher MLLr-Patienten erhöhte PLK1-Level auf. Weiterhin zeigte die Auswertung öffentlich verfügbarer AML-Datensätze (kmplot.com), dass eine hohe PLK-1-Expression mit einer reduzierten Gesamtüberlebensrate bei Erwachsenen korreliert. Die mittlere Überlebenszeit von Patienten mit einer niedrigen PLK-1 Expression liegt bei 16,4 Monaten, wohingegen bei den Patienten mit einer erhöhten PLK-1 Expression die mittlere Überlebensrate bei 12,1 Monaten liegt. Trotz unzureichender Datensätze für kindliche Leukämien wird dadurch die onkogene und therapeutische Schlüsselstellung von PLK-1 in der Leukämogenese deutlich.

Um die funktionelle Bedeutung der Unterschiede in der PLK-1-Expression zu evaluieren, wurde der spezifische PLK1-Inhibitor Volasertib in pharmakologischen Tests für die *in vitro* Behandlung eingesetzt. Die Analyse der Dosis-Wirk-Relation zeigte eine signifikant reduzierte Proliferation und Zellzahl ausschließlich in aus huCB stammenden MLLr-Zellen nach 72-stündiger Behandlung; huBM-abgeleitete MLLr-Zellen und Kontrollzellen (CD34⁺ HSPCs) zeigten sich dagegen weitestgehend unempfindlich. Die resultierenden IC₅₀-Werte bestätigten eine erhöhte Sensitivität kindlicher MLLr-Zellen gegenüber Volasertib: huCB MLLr 17,9 nM, huBM MLLr 43,5 nM, Kontrollzellen 35,1 nM. Die Färbung mit Annexin-V/PI und die anschließende durchflusszytometrische Auswertung zeigte, dass bereits bei 100 nM Volasertib mehr als 95 % der huCB-MLLr-Zellen apoptotisch oder frühapoptotisch waren, während erwachsene MLLr- und Kontrollzellen bei diesen Konzentrationen höhere Überlebensraten aufwiesen. Dieses spezifische anti-leukämische Wirkungsmuster von Volasertib konnte auch in kindlichen Zelllinien wie THP-1 und SEM validiert werden, wohingegen erwachsene Zelllinien (NOMO-1, RS4;11), die MLL-ENL-Zelllinie KOPN8 und non-MLLr-Zellen (SKM1) kaum beeinflusst waren.

AlamarBlue-Viabilitätsassays belegen die dosisabhängige Abnahme der Lebensfähigkeit nach Volasertib insbesondere in kindlichen MLLr-Zellen. BrdU/7-AAD-Zellzyklusanalysen zeigten nach Inhibitorbehandlung einen signifikanten Rückgang des S-Phasen-Anteils und eine deutliche Zunahme der M-Phase („mitotischer Arrest“) ausschließlich in kindlichen MLLr-Zellen. Nach May-Grünwald-Giemsa-Färbung lässt sich dies auch morphologisch anhand einer gesteigerten Anzahl an Mitosefiguren und apoptotische Zellen mit pyknotischen Zellkernen bestätigen, während erwachsene Zellen überwiegend vital blieben. Diese Beobachtungen unterstreichen, dass PLK-1-Inhibition primär in kindlichen MLLr-Zellen zu Proliferationsstopp, mitotischem Arrest und Apoptose führt.

Um die Ursachen für das unterschiedliche Ansprechen zu klären, wurden huCB und huBM MLLr-Zellen 72 Stunden mit Volasertib oder allein mit Dimethylsulfoxid (DMSO) als Kontrollgruppe behandelt und anschließend eine RNA-seq-Analyse durchgeführt. In kindlichen MLLr-Zellen wurden 151 differentiell exprimierte Gene (DEGs) detektiert, im Gegensatz zu 728 DEGs in erwachsenen MLLr-Zellen, jeweils im Vergleich zu unbehandelten Zellen desselben Zellursprungs. Die DEGs wurden dabei auf Basis des *adjusted p-value* ($p_{adj} < 0,05$) bestimmt. Während beide Subgruppen eine Herabregulation metabolischer Gene (Enolase 2 (ENO2), Stanniocalcin (STC2)) und eine Hochregulation myeloider Differenzierungsmerkmale zeigten (CD14, CD163, Ficolin-1 (FCN1), Macrophage Expressed 1 (MPEG1)), fiel auf, dass in kindlichen MLLr-Zellen die Transkription von PLK-1 und dessen Zielgene wie Cyclin Dependant Kinase 1 (CDK1), Cell Division Cycle 25C (CDC25C), oder Cyclin B1 (CCNB1) nach Inhibition effektiv supprimiert wurden. In erwachsenen MLLr-Zellen zeigte sich hingegen eine kompensatorische Hochregulation von PLK-1 und seinen mitotischen Effektoren einschließlich AURKA, BORA, Cell Division Cycle 20 (CDC20) oder G2 And S-Phase Expressed 1 (GTSE1), was auf einen kompensatorischen Rückkopplungsmechanismus zur Umgehung der PLK-1-Hemmung hindeutet. Neben hochregulierten *upstream*-Genen wie AURKA und BORA, steht auch die Hochregulation von *downstream*-Genen wie CCNB1 und FOXM1, ein Transkriptionsfaktor, der die Expression von PLK-1 verstärkt im Vordergrund (Zhang et al., 2016). Diese könnten mechanistisch im Zentrum des

beobachteten *rebound*-Effekts stehen und zur relativen Resistenz huBM MLLr-Zellen gegenüber Volasertib beitragen. Diese beobachteten Expressionsmuster in huBM MLLr-Zellen nach Volasertib Behandlung konnten mittels RT-qPCR Analysen bestätigt werden.

Basierend auf der beobachteten kompensatorischen AURKA- und PLK-1-Hochregulation in erwachsenen MLLr-Zellen nach Volasertib-Behandlung wurde die kombinatorische Therapie mit dem Aurora-Kinase A-Inhibitor Alisertib untersucht. Aurora-Kinase A fungiert zusammen mit dem Co-Faktor BORA als Aktivator von PLK-1 und ist somit maßgeblich an der PLK-1 Aktivität beteiligt. Während die Einzelinhibition mittels Volasertib im erwachsenen MLLr-Modell nur eine geringe Wirkung entfaltete, führte die duale Hemmung durch Kombination beider Inhibitoren in den huBM MLLr-Zellen zu einem signifikanten Synergismus. Die Synergie ließ sich mittels isobolografischer Darstellung (Chou-Talalay-Methode) quantifizieren (Kombinationsindex CI=0,25). Zusätzlich zeigte sich eine starke Reduktion der Zellviabilität: der Anteil der Zellen in S- und G0/G1-Phasen sank, während M-Phase und Apoptose signifikant zunahm. In kindlichen MLLr-Zellen zeigte sich kein synergistischer Vorteil gegenüber alleiniger Behandlung mit Volasertib (CI 1,56), was auf die zentrale Rolle des fehlenden Feedback-Mechanismus in diesen Zellen zurückzuführen ist.

Insgesamt demonstrieren diese Ergebnisse eindrücklich, dass die Zellherkunft nicht nur für die initiale onkogene Signaltransduktion und das molekulare Profil, sondern auch für die Wirksamkeit und Resistenzentwicklung gegenüber neuartigen, gezielten Therapien von zentraler Bedeutung ist. Gerade die Entschlüsselung und gezielte Modulation kompensatorischer *feedback loops* bietet für die Behandlung erwachsener MLLr-Leukämien neue und rationale Therapieperspektiven, während die selektive Empfindlichkeit kindlicher MLLr-Zellen gegenüber PLK1-Inhibition das Potenzial für personalisierte Therapieansätze in dieser Hochrisikogruppe aufzeigt.

3. Diskussion

Die akute Leukämie mit MLL-Rearrangements stellt eine der klinisch und pharmakologisch herausforderndsten Entitäten innerhalb der akuten Leukämien dar. Charakteristisch für diese Erkrankung ist eine hohe Aggressivität, eine schlechte Prognose insbesondere im Kindesalter sowie eine bemerkenswerte Resistenz gegenüber konventionellen Therapien (Meyer et al., 2023). Trotz des Wissens um die zentrale Rolle von MLL-Fusionsproteinen in der Leukämogenese ist die Entwicklung effektiver, zielgerichteter Therapieansätze bislang nur begrenzt gelungen (Meyer et al., 2023, Milne, 2017). Dies ist nicht zuletzt auf die ausgeprägte Heterogenität der Erkrankung zurückzuführen, die sich auf genetischer, epigenetischer und zellulärer Ebene manifestiert und maßgeblich durch den Zellursprung beeinflusst wird (Chaudhury et al., 2018, Meyer et al., 2018, Winters and Bernt, 2017).

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurden zwei innovative, auf der CRISPR/Cas9-Technologie basierende Modelle der MLLr-Leukämie verwendet, die es ermöglichen, die Pathogenese und Therapieansätze sowohl für die kindliche als auch die erwachsene Form der Erkrankung *in vitro* nachzuvollziehen. Im Zentrum der Untersuchungen standen die Identifikation und funktionelle Charakterisierung von PLK-1 und NOTCH1 als potenzielle onkogene Treiber sowie die Evaluation spezifischer Inhibitoren und kombinatorischer Therapieansätze. Die vorliegenden Ergebnisse liefern nicht nur neue Erkenntnisse zur Biologie der MLLr-Leukämie, sondern eröffnen auch Perspektiven für die Entwicklung personalisierter, molekular geführter Therapien (Fischer et al., 2023, Fischer et al., 2024).

3.1. NOTCH1 als onkogener Treiber und therapeutisches Ziel in der MLLr-Leukämie

Die Rolle von NOTCH1 als zentraler onkogener Treiber in der MLLr-Leukämie wurde in dieser Arbeit erstmals systematisch im Kontext der AML untersucht. Für diese Studie wurde das CRISPR/Cas9 Modell verwendet, das auf balancierten

Translokationen des MLL- und AF4- beziehungsweise AF9-Gens aus Nabelschnurblut stammenden HSPCs basiert (Fischer et al., 2023). Der NOTCH1-Signalweg ist in lymphatischen Leukämien wie T-ALL und CLL intensiv charakterisiert und eng mit ungünstiger Prognose sowie erhöhter Therapieresistenz verknüpft (Cao et al., 2023, Ma et al., 2018, Rossi et al., 2012). In der akuten myeloischen Leukämie (AML) hingegen ist die funktionelle Relevanz von NOTCH1 bislang wenig untersucht, jedoch deuten aktuelle Studien auf eine potenzielle Rolle dieses Signalwegs auch in der AML hin (Cao et al., 2023, Ma et al., 2018, Rossi et al., 2012).

Unsere Daten zeigen eine deutlich gesteigerte Expression von NOTCH1 und dessen Zielgenen (HES1, IGF1R) in MLLr-Leukämiezellen, was die pathophysiologische Relevanz dieses Signalwegs nahelegt (Fischer et al., 2023). HES1, ein zentrales Transkriptionsziel des NOTCH1-Signalwegs, spielt eine maßgebliche Rolle für die Proliferation und das Überleben von T-ALL-Zellen (D'Altri et al., 2011, Espinosa et al., 2010). Diese Wirkung wird insbesondere durch die Aktivierung der NOTCH–HES1–CYLD–NFκB-Signalkaskade vermittelt, die für die Pathogenese und Progression der T-ALL von entscheidender Bedeutung ist (D'Altri et al., 2011, Espinosa et al., 2010). In diesem Kontext fördert HES1 die Aufrechterhaltung des malignen, undifferenzierten Zellzustands und trägt so wesentlich zur Aggressivität der Erkrankung bei (D'Altri et al., 2011, Espinosa et al., 2010). Bemerkenswert ist jedoch, dass HES1 in myeloischen Leukämien eine gegensätzliche, tumorsuppressive Funktion entfalten kann. Hier hemmt HES1 die Proliferation und unterstützt einen weniger aggressiven Krankheitsverlauf, was die kontextabhängige Dualität der NOTCH1-Signalisierung unterstreicht (Aster et al., 2017). Ein weiteres zentrales Zielgen im nachgeschalteten Bereich des NOTCH1-Signalwegs ist der Insulin-like Growth Factor 1 Receptor (IGF1R) (Medyouf et al., 2011). IGF1R ist essenziell für die Funktion und das Überleben leukämieinitiierender Zellen in T-ALL und trägt zur Aufrechterhaltung des malignen Zellklons bei (Medyouf et al., 2011). Die Interaktion und wechselseitige Beeinflussung dieser Signalwege verdeutlicht die Komplexität der molekularen Netzwerke, die der Leukämogenese zugrunde

liegen, und hebt die Bedeutung einer differenzierten, kontextabhängigen Betrachtung potenzieller therapeutischer Angriffspunkte hervor.

Obwohl verschiedene NOTCH1-Inhibitoren, darunter γ -Sekretase-Inhibitoren (GSI) und SERCA-Inhibitoren, zur therapeutischen Hemmung des NOTCH1-Signalwegs entwickelt wurden, ist ihre klinische Anwendung durch erhebliche Nebenwirkungen limitiert (Golde et al., 2013). Die Toxizität von GSIs resultiert vor allem aus ihrer mangelnden Substratspezifität, durch die ubiquitäre Hemmung der NOTCH1-Rezeptoren (Golde et al., 2013, Krop et al., 2012, Riccio et al., 2008). Dies führt insbesondere in intestinalen Vorläuferzellen zu unerwünschten Effekten (Roti et al., 2013). SERCA-Inhibitoren wiederum können durch Störungen des Kalziumhaushalts kardiotoxische Nebenwirkungen verursachen (Roti et al., 2018). Im Gegensatz zu den genannten NOTCH1-Inhibitor-Gruppen weist der SERCA-Inhibitor CAD204520 eine deutlich geringere Kalzium-assoziierte Toxizität auf, behält jedoch seine Wirksamkeit auf den NOTCH1-Signalweg bei (Marchesini et al., 2020, Pagliaro et al., 2021). Aufgrund dieses günstigen Profils wurde CAD204520 in der vorliegenden Studie als Modellschubstanz zur Untersuchung der Rolle von NOTCH1 bei MLLr-Leukämien ausgewählt. Die gezielte Hemmung mit dem SERCA-Inhibitor CAD204520 in dieser Studie führte nicht nur zu einer signifikanten Reduktion des stark exprimierten NOTCH1-Rezeptors, sondern führte auch zu einer verminderten Proliferation, Viabilität und einer verstärkten Apoptose in MLLr-Zellen (Fischer et al., 2023). Währenddessen bleiben gesunde Kontrollzellen weitestgehend unbeeinträchtigt, was auf ein potenzielles therapeutisches Fenster hinweist (Fischer et al., 2023).

Die Analyse der zellulären Mechanismen der CAD204520-induzierten Zytotoxizität in MLLr-Leukämiezellen zeigt, dass die Hemmung des NOTCH1-Signalwegs Apoptose induziert und die Expression zentraler MLL-Zielgene wie HOXA9 und MEIS1 signifikant reduziert (Fischer et al., 2023). Zusätzlich wurde weder das Differenzierungsverhalten noch die Morphologie der behandelten Zellen beeinflusst. Diese Befunde stehen im Einklang mit bisherigen Erkenntnissen, wonach eine Dysregulation des Zellzyklus bei hämatologischen Neoplasien mit NOTCH1-Mutationen häufig auf eine Überexpression von Cyclin-

abhängigen Kinasen (CDKs) zurückzuführen ist (Carrillo-Tornel et al., 2023b). Insbesondere die Herunterregulierung von CDK1 nach CAD204520-Behandlung deutet auf eine gezielte Beeinflussung dieses Kontrollmechanismus durch die NOTCH1-Inhibition hin (Fischer et al., 2023). Darüber hinaus wurde eine verminderte Expression des Chemokinrezeptors CXCR4 festgestellt, der eine zentrale Rolle bei der Migration und Lokalisierung leukämischer Zellen im Knochenmark spielt (Fischer et al., 2023, Tavor et al., 2004). In T-ALL und verschiedenen soliden Tumoren ist eine erhöhte NOTCH1-Aktivität mit einer gesteigerten CXCR4-Expression und damit mit einer verstärkten Tumorprogression assoziiert (Passaro et al., 2015, Yi et al., 2019). Die Hemmung von NOTCH1 führt zu einer Reduktion von CXCR4 und kann das Tumorwachstum hemmen (Yi et al., 2019). Obwohl CXCR4 auch in der Pathogenese der AML eine Rolle spielt, ist der Zusammenhang zwischen NOTCH1 und CXCR4 in diesem Kontext bislang nur unzureichend erforscht (Zeng et al., 2009). Insgesamt unterstreichen diese Ergebnisse die Notwendigkeit weiterer Studien, um die pathophysiologische Bedeutung von NOTCH1, insbesondere in MLLr-Leukämien mit ungünstiger Prognose, besser zu verstehen.

Bereits im Vorfeld wurden präklinische Daten zur Pharmakokinetik und Gewebeverteilung von CAD204520 in Mausstudien erhoben (Marchesini et al., 2020, Roti and Stegmaier, 2011). In diesen Untersuchungen wurde eine maximale Wirkstoffkonzentration (C_{max}) von 1,1 ng/mL (entsprechend 2,5 μ M) erreicht, ein Wert, der im Bereich der *in vitro* nachgewiesenen Wirksamkeit gegen T-ALL liegt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass CAD204520 auch *in vivo* in präklinischen AML-Modellen eine therapeutische Wirkung entfalten kann (Marchesini et al., 2020, Roti and Stegmaier, 2011). Obwohl unsere *in vitro*-Experimente eine effektive Hemmung des NOTCH1-Signalwegs durch CAD204520 belegen (Fischer et al., 2023), ist davon auszugehen, dass eine Monotherapie angesichts der ausgeprägten Tumorheterogenität, des geringen therapeutischen Fensters langfristig nicht ausreicht, um eine Remission zu erzielen (Fischer et al., 2023). Vor diesem Hintergrund erscheint es sinnvoll, Kombinationsstrategien zu verfolgen, bei denen CAD204520 mit Inhibitoren des

CDK- oder CXCR4-Signalwegs kombiniert wird, da beide eng mit der NOTCH1-Signalkaskade verknüpft sind (Carrillo-Tornel et al., 2023a, Passaro et al., 2015, Tavor et al., 2004, Yi et al., 2019). Solche Ansätze könnten die anti-leukämische Wirksamkeit weiter steigern. Diese Überlegungen werden durch aktuelle klinische und präklinische Studien gestützt, die eine Blockade von CXCR4 in AML als zuversichtlich bewerten oder den Einsatz von CDK-Inhibitoren wie Palbociclib in Kombination mit NOTCH1-Inhibitoren als Möglichkeit für die Behandlung von Leukämien diskutieren (Cao et al., 2023, Chiarella et al., 2021, Jia et al., 2023, Tsakaneli and Williams, 2021). Die Ergebnisse dieser Studie liefern somit nicht nur neue Erkenntnisse zur Rolle von NOTCH1 in der AML-Pathogenese, sondern schaffen auch eine solide Grundlage, um kombinierte Therapiekonzepte weiterzuentwickeln. Zukünftige präklinische und klinische Studien sollten daher gezielt die Wirksamkeit und Sicherheit solcher kombinierten Ansätze untersuchen, um die Behandlungsmöglichkeiten für Patienten mit MLLr-Leukämien nachhaltig zu verbessern und zentrale onkogene Treiber gezielt zu adressieren.

3.2. Die Bedeutung des Zellursprungs in der MLLr-Leukämogenese - PLK1 als Treiber der kindlichen Leukämogenese

Jüngste wissenschaftliche Erkenntnisse zeigen, dass der zelluläre Ursprung einen entscheidenden Einfluss auf die Pathogenese und das klinische Verhalten von Leukämien ausübt (Duguid et al., 2021, Krivtsov et al., 2013, Meyer et al., 2023). Die vorliegende Arbeit konnte ebenfalls aufzeigen, dass der Zellursprung einen maßgeblichen Einfluss auf die Pathogenese, das Therapieansprechen und die molekulare Signatur der MLLr-Leukämie hat (Fischer et al., 2024). Während die Translokation des MLL-Gens in HSPCs als Treibermutation der Leukämogenese gilt, zeigen unsere Modelle, dass die daraus resultierenden Fusionsproteine in Abhängigkeit vom Ursprung der Zelle unterschiedliche onkogene Signalwege aktivieren (Secker et al., 2020b, Fischer et al., 2024, Milne, 2017). Die Identifikation von PLK-1 als spezifischen Treiber in kindlichen MLLr-

Zellen stellt einen bedeutenden Fortschritt für das Verständnis der molekularen Pathogenese dar (Symeonidou et al., 2021). PLK-1 ist als zentrale Kinase an der Regulation des Zellzyklus beteiligt und wird in zahlreichen Tumorentitäten als onkogenes Protein beschrieben (Ghelli Luserna di Rora et al., 2019, Goroshchuk et al., 2019, Takai et al., 2005). Die in dieser Arbeit durchgeführten RNA-Seq- und RT-qPCR-Analysen belegen eine signifikant erhöhte Expression von PLK-1 in kindlichen MLLr-Leukämiezellen, im Vergleich zu erwachsenen MLLr-Leukämiezellen. Dies wurde durch Untersuchungen an kommerziell erhältlichen MLLr-Zelllinien und primärem Patientenmaterial bestätigt (Fischer et al., 2024).

Die pharmakologische Inhibition von PLK-1 durch Volasertib zeigte im kindlichen MLLr-Modell eine ausgeprägte anti-leukämische Wirkung, manifestiert durch eine Reduktion der Zellproliferation, eine Abnahme der Zellviabilität und eine Induktion der Apoptose (Fischer et al., 2024). Im Gegensatz dazu erwiesen sich erwachsene MLLr-Zellen als deutlich resistenter gegenüber Volasertib (Fischer et al., 2024). Die Tatsache, dass kindliche und erwachsene MLLr-Leukämien trotz identischer genetischer Veränderungen ein divergierendes Expressionsmuster und unterschiedliche Vulnerabilitäten gegenüber Inhibitoren aufweisen, legt nahe, dass epigenetische Faktoren, das Transkriptom und die Interaktion mit der Mikroumgebung entscheidende Rollen spielen (Fischer et al., 2024). Aktuelle wissenschaftliche Arbeiten unterstreichen die herausragende Rolle des zellulären Ursprungs (*cell of origin*) für die Biologie und das therapeutische Verhalten hämatologischer und solider Tumoren. Es ist mittlerweile gut belegt, dass epigenetische Prägungen und der Differenzierungsstatus der Ursprungszelle maßgeblich das Mutationsspektrum sowie die molekulare Klassifikation verschiedener Krebsarten bestimmen (Polak et al., 2015). So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Chromatinorganisation und epigenetische Landschaft der Ursprungszelle einen prägenden Einfluss auf die spätere Tumorentwicklung und -heterogenität ausüben (Polak et al., 2015). Für die akute myeloische Leukämie wurde nachgewiesen, dass von hämatopoetischen Stammzellen ausgehende Leukämien einen deutlich aggressiveren Verlauf zeigen als solche, die aus weiter differenzierten Vorläuferzellen hervorgehen (Jung and Yang, 2015). Dies verdeutlicht, dass nicht

nur der Differenzierungsgrad, sondern auch das Entwicklungsstadium der Ursprungszelle einen entscheidenden Einfluss auf die Krankheitsbiologie hat. Darüber hinaus belegen experimentelle Modelle, dass das Alter der Ursprungszelle, also ob sie kindlichen oder erwachsenen Ursprungs ist, die Ausprägung und das Verhalten der Leukämie maßgeblich beeinflusst. So zeigen *in vivo*-Studien, dass aus jungen Zellen sowohl myeloide, lymphoide als auch gemischte Leukämieformen entstehen können, während adulte Zellen überwiegend zu AML mit kürzerer Latenz führen (Chaudhury et al., 2018). Insbesondere bei MLL-AF9-assoziierten Leukämien konnte demonstriert werden, dass das jeweilige Mikromilieu (kindlich vs. erwachsen) die Differenzierung in lymphoide oder myeloische Leukämie steuert (Rowe et al., 2019). Ein weiterer wichtiger Aspekt ist, dass kindliche und erwachsene Leukämien unterschiedliche pathogenetische Mechanismen aufweisen. Während bei Erwachsenen die Akkumulation somatischer Mutationen im Laufe des Lebens eine zentrale Rolle spielt, steht bei Kindern der Einfluss der Ursprungszelle und deren Entwicklungsprogramm im Vordergrund (Aung et al., 2021). Cazzola und Kollegen gehen noch einen Schritt weiter und zeigen, dass bereits pränatale, also *in utero* erworbene, molekulare Veränderungen die spätere Leukämogenese maßgeblich beeinflussen können (Cazzola et al., 2020). Embryonale Fehler und frühe Mutationen werden somit als Ursprung für im Kindesalter manifest werdende Leukämien diskutiert (Cazzola et al., 2020). Diese Erkenntnisse verdeutlichen, dass die Berücksichtigung des Zellursprungs, sowohl hinsichtlich des Differenzierungsgrades als auch des Entwicklungsstadiums, essenziell für das Verständnis der Tumorbilogie und die Entwicklung zielgerichteter Therapiestrategien ist.

Trotz der vielversprechenden Resultate, die durch das eingesetzte CRISPR/Cas9-basierte Modellsystem erzielt wurden, müssen die bestehenden Limitationen kritisch reflektiert werden, insbesondere im Hinblick auf die Abbildung der Mikroumgebung. Alle Experimente erfolgten unter *in vitro*-Bedingungen, wodurch die Übertragbarkeit der Befunde auf ein *in vivo*-System und letztlich auf den Patienten noch nicht abschließend gesichert ist. Die hochkomplexen Interaktionen zwischen Leukämiezellen und ihrer

Mikroumgebung, insbesondere im Knochenmark, lassen sich durch klassische *in vitro*-Modelle nur unzureichend nachbilden. Hierbei bleiben insbesondere die dynamischen Wechselwirkungen mit stromalen Zellen, Immunzellen und extrazellulären Matrixkomponenten unberücksichtigt, obwohl sie maßgeblich die Leukämogenese, das Therapieansprechen und die Entwicklung von Resistenzen beeinflussen (Kozlova et al., 2020, Magalhães-Gama et al., 2022, Nehrbaas et al., 2020, Sison and Brown, 2011, Zhao et al., 2023). Für eine belastbare klinische Translation der gewonnenen Erkenntnisse ist daher die Validierung in geeigneten *in vivo*-Systemen unerlässlich. Besonders patientenabgeleitete Xenograft-Modelle (*patient-derived xenografts*, PDX) bieten die Möglichkeit, sowohl die inter- als auch die intratumorale Heterogenität sowie das humane Mikroumfeld realitätsnäher abzubilden. Diese Modelle sind essenziell, um die Relevanz der *in vitro* identifizierten Signalwege und therapeutischen Angriffspunkte unter physiologischen Bedingungen zu überprüfen und potenzielle Limitationen frühzeitig zu erkennen. Ein weiterer zentraler Aspekt ist die differenzierte Betrachtung der myeloiden und lymphatischen Entwicklungslinien bei MLLr-Leukämien. Während die myeloide Differenzierung in vielen Modellen im Vordergrund steht, ist insbesondere bei kindlichen MLLr-Leukämien die lymphatische Differenzierung deutlich häufiger (Chaudhury et al., 2018, Meyer et al., 2023, Rowe et al., 2019). Um die gesamte Bandbreite der Pathogenese und die daraus resultierenden therapeutischen Implikationen adäquat zu erfassen, sind daher weiterführende funktionelle Studien erforderlich, die sowohl myeloide als auch lymphatische Entwicklungswege *in vitro* und *in vivo* abbilden.

Insgesamt liefern die vorliegenden Daten substanzielle Einblicke in die Bedeutung des Zellursprungs für die Biologie der MLLr-Leukämie. Sie eröffnen insbesondere für pädiatrische Patienten neue Perspektiven für die Entwicklung zielgerichteter, differenzierter Therapieansätze, die die spezifischen Eigenschaften des Ursprungszelltyps und des Mikroumfelds berücksichtigen.

3.3. Kombinierte Inhibition von PLK-1 und AURKA zur Überwindung der Volasertib-Resistenz in der erwachsenen MLLr-Leukämie

Die Feststellung, dass kindliche MLLr-Leukämien durch eine signifikant erhöhte PLK-1-Expression charakterisiert sind und infolgedessen eine ausgeprägte Sensitivität gegenüber einer pharmakologischen Inhibition mittels Volasertib aufweisen, wirft grundlegende Fragen hinsichtlich der molekularen Determinanten des Therapieansprechens in unterschiedlichen Altersgruppen auf. Insbesondere stellt sich die Frage, ob die reduzierte Ansprechrate erwachsener MLLr-Leukämien auf Volasertib primär auf eine niedrigere PLK-1-Expression zurückzuführen ist oder ob vielmehr komplexe zelluläre Adaptationsmechanismen existieren, die eine Umgehung der Apoptose und somit die Entwicklung von Therapieresistenz begünstigen.

Die Transkriptomanalyse mittels RNA-Sequenzierung offenbarte, dass erwachsene MLLr-Leukämiezellen nach Exposition gegenüber Volasertib, entgegen der initialen Annahme einer nachhaltigen Inhibition des mitotischen Apparates, eine ausgeprägte kompensatorische Hochregulation von PLK-1 sowie weiterer mitoseassoziierten Gene wie CCND1, AURKA und FOXM1 aufweisen (Bruinsma et al., 2014, Fischer et al., 2024, Goroshchuk et al., 2019, Zhang et al., 2016). Dieser adaptive Feedback-Mechanismus könnte es den Zellen ermöglichen, trotz pharmakologischer Blockade zentrale Zellzyklusregulatoren zu reaktivieren, wodurch die Proliferationsfähigkeit erhalten bleibt und der apoptotische Zelltod verhindert wird. Dieses Erkenntnis ist von hoher therapeutischer Relevanz, da sie einen Erklärungsansatz für die bislang nur mäßigen klinischen Erfolge von PLK-1-Inhibitoren bei erwachsenen Patienten liefert (Brandwein, 2015, Dohner et al., 2021, Gjertsen and Schöffski, 2015, Gutteridge et al., 2016, Liu et al., 2010, Liu et al., 2017, Murugan et al., 2011, Van den Bossche et al., 2016). Basierend auf diesen Beobachtungen wurde in dieser Arbeit ein gezielter Kombinationsansatz entwickelt, um den beschriebenen *feedback-loop* zu durchbrechen. Hierzu wurden erwachsene MLLr-Leukämiezellen mit einer Kombination aus Volasertib (PLK-1-Inhibitor) und

Alisertib (Aurora Kinase A-Inhibitor) behandelt. Die Wahl von Alisertib als Kombinationspartner erfolgte, da Aurora Kinase A als zentrales Element im Feedback-Mechanismus identifiziert wurde, das durch Phosphorylierung mit dem Cofaktor BORA maßgeblich zur Reaktivierung von PLK-1 beiträgt (Fathi et al., 2017, Fischer et al., 2024). Die Ergebnisse dieser Kombinationsbehandlung waren ausgesprochen vielversprechend: Im Vergleich zur Monotherapie mit Volasertib führte die gleichzeitige Hemmung von PLK-1 und Aurora Kinase A zu einem ausgeprägten Synergismus. Es konnte eine signifikant verstärkte Reduktion der Zellviabilität und eine erhöhte Apoptoserate in den erwachsenen MLLr-Leukämiezellen beobachtet werden. Dies belegt, dass die kombinierte Inhibition beider Kinasen in der Lage ist, den kompensatorischen Feedback-Loop zu überwinden und die Resistenzmechanismen der Leukämiezellen zu durchbrechen (Fischer et al., 2024).

Diese Ergebnisse verdeutlichen die Notwendigkeit einer gezielten Kombinationstherapie, die die molekularen Adaptationsmechanismen der Leukämiezellen adressiert. Sie zeigen, dass die alleinige Inhibition eines onkogenen Treibers häufig nicht ausreicht, um die Plastizität und Überlebensfähigkeit der Zellen nachhaltig zu beeinträchtigen. Effektive Therapien sollten daher zentrale Schaltstellen der Signaltransduktion simultan angreifen, um Resistenzmechanismen zu verhindern und die Wirksamkeit zu maximieren. Dabei gewinnt der zelluläre Ursprung der Leukämie zunehmend an Bedeutung. Er beeinflusst maßgeblich das molekulare Profil, das Therapieansprechen und die individuellen Resistenzmechanismen (Chaudhury et al., 2018, Duguid et al., 2021, Krivtsov et al., 2013, Meyer et al., 2023). Somit unterstreicht diese Arbeit, dass eine individualisierte, patientenspezifische Behandlungsstrategie, die sowohl die Signalweg-Interaktionen als auch den zellulären Ursprung berücksichtigt, essenziell ist für eine erfolgreiche Therapie der MLLr-Leukämien.

4. Zusammenfassung

Akute Leukämien mit MLL-Rearrangements sind besonders aggressive hämatologische Erkrankungen mit schlechter Prognose, besonders im Kindesalter. Konventionelle Therapien zeigen hier oft nur unzureichende Wirksamkeit. (Fischer et al., 2023, Fischer et al., 2024, Gökbuget, 2024, Marschalek, 2016, Röllig, 2024). Die vorliegende Dissertation liefert wesentliche neue Einblicke in die molekulare Pathogenese der MLLr-Leukämien und identifiziert mit PLK-1 und NOTCH1 zwei zentrale onkogene Signalachsen, die maßgeblich zur Aufrechterhaltung des malignen Phänotyps beitragen (Fischer et al., 2023, Fischer et al., 2024). Mittels CRISPR/Cas9-Technologie wurden MLL-AF4- und -AF9-Leukämiezellen aus Nabelschnurblut und Knochenmark generiert, entsprechend einem kindlichen und erwachsenen MLLr-Modellsystem, wodurch entscheidende Erkenntnisse zum Einfluss des Zellursprungs (*cell of origin*) auf die Leukämogenese gewonnen werden konnte (Fischer et al., 2024, Secker et al., 2020b).

Im kindlichen MLLr-Zellmodell wurde PLK-1 als zentraler onkogener Treiber identifiziert, dessen hohe Expression mit einer ausgeprägten Sensitivität gegenüber der PLK-1-Inhibition durch Volasertib korreliert. Volasertib zeigte konsistent starke anti-leukämische Effekte in präklinischen Modellen, Zelllinien und Patientenproben. Die geringere Wirksamkeit von Volasertib in erwachsenen MLLr-Zellen ließ sich durch einen Feedback-Mechanismus über Aurora Kinase A erklären: eine Kombinationstherapie mit dem Aurora-Kinase-A-Inhibitor Alisertib führte hier zu synergistischen antileukämischen Effekten und eröffnet somit auch für erwachsene MLLr-Patienten neue therapeutische Perspektiven (Fischer et al., 2024). Zusätzlich zu PLK-1, konnte in den beiden Modellsystemen MLL-AF4 und MLL-AF9, NOTCH1 und NOTCH1-assoziierte Gene als relevante onkogene Treiber identifiziert werden. Die gezielte Hemmung des NOTCH1-Signalwegs mit dem SERCA-Inhibitor CAD204520 führte zu einer signifikanten Reduktion der Proliferation und Viabilität von MLLr-Zellen, ohne das Differenzierungsverhalten oder die Morphologie zu beeinflussen. Zusätzlich zeigte sich eine Reduktion des NOTCH1-Rezeptors und eine Herunterregulierung onkogener Zielgene wie

MYC, CDK1 und CXCR4. Diese Ergebnisse unterstreichen das Potenzial einer zielgerichteten, molekular geführten Therapie der MLLr-Leukämie (Fischer et al., 2023).

Die Ergebnisse betonen die biologische Bedeutung des Zellursprungs und die Notwendigkeit personalisierter Therapieansätze. Sie zeigen, dass molekular definierte Kombinationstherapien, angepasst an Zellursprung und genetisches Profil, eine nachhaltige Verbesserung der Behandlungserfolge bei MLLr-Leukämien ermöglichen können. Zukünftige Ansätze sollten neben der präklinischen Validierung insbesondere die Entwicklung translationaler Therapiekonzepte mit Fokus auf individuelle, risiko-adaptierte Behandlungsstrategien adressieren.

5. Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin
AFDN	AF6, Afadin, <i>Adherens Junction Formation Factor</i>
AFF1	AF4, <i>ALF Transcription Elongation Factor 1</i>
AFF4	<i>ALF Transcription Elongation Factor 4</i>
ALL	Akute lymphatische/lymphoblastische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
AURKA	Aurora Kinase A
AURKB	Aurora Kinase B
BCP-ALL	<i>B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia</i> , B-Zell-Vorläufer akute lymphoblastische Leukämie
BORA	<i>Aurora Kinase A Activator</i>
BrdU	Bromodeoxyuridin
CAR	<i>Chimeric antigen receptor</i> , chimärer Antigen-Rezeptor
Cas9	Cas9 Endonuklease
CCNB1	Cyclin B1
CCND1	Cyclin D1
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CDC20	<i>Cell Division Cycle 20</i>
CDK-1	<i>Cyclin Dependent Kinase 1</i>
CI	<i>Combination index</i>
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CRISPR	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>

CXCR4	<i>C-X-C Motif Chemokine Receptor 4</i>
CYLD	<i>CYLD Lysine 63 Deubiquitinase</i>
DEGs	<i>Differentially expressed genes</i>
DLL1	<i>Delta Like Canonical Notch Ligand 1</i>
DLL4	<i>Delta Like Canonical Notch Ligand 4</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
ELL	<i>Elongation Factor for RNA Polymerase II</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ETV6	<i>TEL / ETS Variant Transcription Factor 6</i>
EVI1	<i>MDS1 and EVI1 Complex Locus</i>
FCN1	Ficolin-1
FLT3	<i>Fms Related Receptor Tyrosine Kinase 3</i>
FOXM1	<i>Forkhead Box M1</i>
GSI	γ -Sekretase Inhibitor
GTSE1	<i>G2 and S-Phase Expressed 1</i>
HES1	<i>Hes Family BHLH Transcription Factor 1</i>
HOX	<i>Homeobox</i>
HOXA9	<i>Homeobox A9</i>
HSCs	<i>Hematopoietic stem cells</i> , hämatopoetische Stammzellen
HSPCs	<i>Hematopoietic stem- and progenitor cells</i> , hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzelle
huBM	<i>Human bone marrow</i> , humanes Knochenmark
huCB	<i>Human umbilical cord blood</i> , humanes Nabelschnurblut

IC50	<i>Half maximal inhibitory concentration, halbmaximale inhibitorische Konzentration</i>
IGF1R	<i>Insulin Like Growth Factor 1 Receptor</i>
IGF2	<i>Insulin Like Growth Factor 2</i>
JAG1	<i>Jagged Canonical Notch Ligand 1</i>
JAG2	<i>Jagged Canonical Notch Ligand 2</i>
KMT2A	<i>MLL, histone-lysine N-methyltransferase 2A</i>
MEIS1	<i>Homeobox Protein Meis1</i>
MLL	<i>KMT2A, mixed lineage leukemia</i>
MLLr	<i>MLL-Rearrangements</i>
MLLT1	<i>ENL, MLLT1 Super Elongation Complex Subunit</i>
MLLT3	<i>AF9, MLLT3 Super Elongation Complex Subunit</i>
MPEG1	<i>Macrophage Expressed 1</i>
MSC	<i>Mesenchymal stem cell, mesenchymale Stammzelle</i>
MYC	<i>BHLH Transcription Factor</i>
NCID	<i>Notch Intracellular Domain</i>
NFκB	<i>Nuclear Factor Kappa B Subunit 1</i>
NOTCH1	<i>Notch Receptor 1</i>
NRARP	<i>NOTCH Regulated Ankyrin Repeat Protein</i>
OS	<i>Overall survival, Gesamtüberleben</i>
PBD	<i>Polo-Box-Domäne</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PI	<i>Propidiumiodid</i>
PLK-1	<i>Polo-like kinase 1</i>

PTEN	<i>Phosphatase And Tensin Homolog</i>
RNA-Seq	<i>RNA sequencing, RNA-Sequenzierung</i>
RT-qPCR	<i>Reverse transcription quantitative PCR</i>
RUNX1	<i>AML1, RUNX Family Transcription Factor 1</i>
SCF	<i>Stem cell factor, Stammzellfaktor</i>
SEC	<i>Super elongation complex, Superelongationskomplex</i>
SERCA	<i>Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase</i>
sgRNA	<i>Single guide RNA</i>
t	<i>Translokation</i>
TALEN	<i>Transcription Activator-like Effector Nucleases</i>
T-ALL	<i>T-Zell akute lymphatische Leukämie</i>
TP53	<i>Cyclin Dependent Kinase 1</i>
WEE1	<i>WEE1 G2 Checkpoint Kinase</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
ZNF521	<i>Zinc Finger Protein 521</i>

6. Referenzen

- ALAGGIO, R., AMADOR, C., ANAGNOSTOPOULOS, I., ATTYGALLE, A. D., ARAUJO, I. B. O., BERTI, E., BHAGAT, G., BORGES, A. M., BOYER, D., CALAMINICI, M., CHADBURN, A., CHAN, J. K. C., CHEUK, W., CHNG, W. J., CHOI, J. K., CHUANG, S. S., COUPLAND, S. E., CZADER, M., DAVE, S. S., DE JONG, D., DU, M. Q., ELENITOBA-JOHNSON, K. S., FERRY, J., GEYER, J., GRATZINGER, D., GUITART, J., GUJRAL, S., HARRIS, M., HARRISON, C. J., HARTMANN, S., HOCHHAUS, A., JANSEN, P. M., KARUBE, K., KEMPF, W., KHOURY, J., KIMURA, H., KLAPPER, W., KOVACH, A. E., KUMAR, S., LAZAR, A. J., LAZZI, S., LEONCINI, L., LEUNG, N., LEVENTAKI, V., LI, X. Q., LIM, M. S., LIU, W. P., LOUISSAINT, A., JR., MARCOGLIESE, A., MEDEIROS, L. J., MICHAL, M., MIRANDA, R. N., MITTELDORF, C., MONTES-MORENO, S., MORICE, W., NARDI, V., NARESH, K. N., NATKUNAM, Y., NG, S. B., OSCHLIES, I., OTT, G., PARRENS, M., PULITZER, M., RAJKUMAR, S. V., RAWSTRON, A. C., RECH, K., ROSENWALD, A., SAID, J., SARKOZY, C., SAYED, S., SAYGIN, C., SCHUH, A., SEWELL, W., SIEBERT, R., SOHANI, A. R., TOOZE, R., TRAVERSE-GLEHEN, A., VEGA, F., VERGIER, B., WECHALEKAR, A. D., WOOD, B., XERRI, L. & XIAO, W. 2022. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia*, 36, 1720-1748.
- ARBER, D. A., ORAZI, A., HASSERJIAN, R., THIELE, J., BOROWITZ, M. J., LE BEAU, M. M., BLOOMFIELD, C. D., CAZZOLA, M. & VARDIMAN, J. W. 2016. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, 127, 2391-405.
- ASTER, J. C., PEAR, W. S. & BLACKLOW, S. C. 2017. The Varied Roles of Notch in Cancer. *Annu Rev Pathol*, 12, 245-275.
- AUNG, M. M. K., MILLS, M. L., BITTENCOURT-SILVESTRE, J. & KEESHAN, K. 2021. Insights into the molecular profiles of adult and paediatric acute myeloid leukaemia. *Mol Oncol*, 15, 2253-2272.
- BALDUCCI, E., NIVAGGIONI, V., BOUDJARANE, J., BOURICHE, L., RAHAL, I., BERNOT, D., ALAZARD, E., DUPLOYEZ, N., GRARDEL, N., ARNOUX, I., LAFAGE-POCHITALOFF, M., MICHEL, G., NADEL, B. & LOOSVELD, M. 2017. Lineage switch from B acute lymphoblastic leukemia to acute monocytic leukemia with persistent t(4;11)(q21;q23) and cytogenetic evolution under CD19-targeted therapy. *Ann Hematol*, 96, 1579-1581.
- BARR, F. A., SILLJE, H. H. & NIGG, E. A. 2004. Polo-like kinases and the orchestration of cell division. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5, 429-40.
- BOULIGNY, I. M., MAHER, K. R. & GRANT, S. 2023. Mechanisms of myeloid leukemogenesis: Current perspectives and therapeutic objectives. *Blood Rev*, 57, 100996.
- BOWIE, M. B., KENT, D. G., DYKSTRA, B., MCKNIGHT, K. D., MCCAFFREY, L., HOODLESS, P. A. & EAVES, C. J. 2007. Identification of a new

- intrinsically timed developmental checkpoint that reprograms key hematopoietic stem cell properties. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 5878-82.
- BRANDWEIN, J. M. 2015. Targeting polo-like kinase 1 in acute myeloid leukemia. *Ther Adv Hematol*, 6, 80-7.
- BRUINSMA, W., MACUREK, L., FREIRE, R., LINDQVIST, A. & MEDEMA, R. H. 2014. Bora and Aurora-A continue to activate Plk1 in mitosis. *J Cell Sci*, 127, 801-11.
- BRUSERUD, O., GJERTSEN, B. T., FOSS, B. & HUANG, T. S. 2001. 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*, 19, 1-11.
- BUECHELE, C., BREESE, E. H., SCHNEIDAWIND, D., LIN, C. H., JEONG, J., DUQUE-AFONSO, J., WONG, S. H., SMITH, K. S., NEGRIN, R. S., PORTEUS, M. & CLEARY, M. L. 2015. MLL leukemia induction by genome editing of human CD34+ hematopoietic cells. *Blood*, 126, 1683-94.
- BUJKO, K., KUCIA, M., RATAJCZAK, J. & RATAJCZAK, M. Z. 2019. Hematopoietic Stem and Progenitor Cells (HSPCs). *Adv Exp Med Biol*, 1201, 49-77.
- BUTLER, L. H., SLANY, R., CUI, X., CLEARY, M. L. & MASON, D. Y. 1997. The HRX proto-oncogene product is widely expressed in human tissues and localizes to nuclear structures. *Blood*, 89, 3361-70.
- CAMPAGNOLI, C., ROBERTS, I. A. G., KUMAR, S., BENNETT, P. R., BELLANTUONO, I. & FISK, N. M. 2001. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood*, 98, 2396-2402.
- CAO, L., RUIZ BUENDIA, G. A., FOURNIER, N., LIU, Y., ARMAND, F., HAMELIN, R., PAVLOU, M. & RADTKE, F. 2023. Resistance mechanism to Notch inhibition and combination therapy in human T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood Adv*.
- CARRIERI, F. A., MURRAY, P. J., DITSOVA, D., FERRIS, M. A., DAVIES, P. & DALE, J. K. 2019. CDK1 and CDK2 regulate NICD1 turnover and the periodicity of the segmentation clock. *EMBO Rep*, 20, e46436.
- CARRILLO-TORNEL, S., CHEN-LIANG, T. H., ZURDO, M., PUIGGROS, A., GOMEZ-LLONIN, A., GARCIA-MALO, M. D., CUENCA-ZAMORA, E. J., ORTUNO, F. J., LOPEZ, A. M. H., ESPINET, B. & JEREZ, A. 2023a. NOTCH1 mutation in chronic lymphocytic leukaemia is associated with an enhanced cell cycle G1/S transition and specific cyclin overexpression: Preclinical ground for targeted inhibition. *Br J Haematol*, 201, 470-479.
- CARRILLO-TORNEL, S., CHEN-LIANG, T. H., ZURDO, M., PUIGGROS, A., GÓMEZ-LLONÍN, A., GARCÍA-MALO, M. D., CUENCA-ZAMORA, E. J., ORTUÑO, F. J., LÓPEZ, A. M. H., ESPINET, B. & JEREZ, A. 2023b. NOTCH1 mutation in chronic lymphocytic leukaemia is associated with an enhanced cell cycle G1/S transition and specific cyclin

- overexpression: Preclinical ground for targeted inhibition. *Br J Haematol*, 201, 470-479.
- CAZZOLA, A., CAZZANIGA, G., BIONDI, A., MENEVERI, R., BRUNELLI, S. & AZZONI, E. 2020. Prenatal Origin of Pediatric Leukemia: Lessons From Hematopoietic Development. *Front Cell Dev Biol*, 8, 618164.
- CHAN, A. K. N. & CHEN, C. W. 2019. Rewiring the Epigenetic Networks in MLL-Rearranged Leukemias: Epigenetic Dysregulation and Pharmacological Interventions. *Front Cell Dev Biol*, 7, 81.
- CHANG, P. Y., HOM, R. A., MUSSELMAN, C. A., ZHU, L., KUO, A., GOZANI, O., KUTATELADZE, T. G. & CLEARY, M. L. 2010. Binding of the MLL PHD3 finger to histone H3K4me3 is required for MLL-dependent gene transcription. *J Mol Biol*, 400, 137-44.
- CHAUDHURY, S., O'CONNOR, C., CAÑETE, A., BITTENCOURT-SILVESTRE, J., SARROU, E., PRENDERGAST, Á., CHOI, J., JOHNSTON, P., WELLS, C. A., GIBSON, B. & KEESHAN, K. 2018. Age-specific biological and molecular profiling distinguishes paediatric from adult acute myeloid leukaemias. *Nat Commun*, 9, 5280.
- CHEN, C., YU, W., TOBER, J., GAO, P., HE, B., LEE, K., TRIEU, T., BLOBEL, G. A., SPECK, N. A. & TAN, K. 2019. Spatial Genome Re-organization between Fetal and Adult Hematopoietic Stem Cells. *Cell Rep*, 29, 4200-4211.e7.
- CHIARELLA, E., ALOISIO, A., SCICCHITANO, S., TODOERTI, K., COSENTINO, E. G., LICO, D., NERI, A., AMODIO, N., BOND, H. M. & MESURACA, M. 2021. ZNF521 Enhances MLL-AF9-Dependent Hematopoietic Stem Cell Transformation in Acute Myeloid Leukemias by Altering the Gene Expression Landscape. *Int J Mol Sci*, 22.
- CHOW, Y. P., ALIAS, H. & JAMAL, R. 2017. Meta-analysis of gene expression in relapsed childhood B-acute lymphoblastic leukemia. *BMC Cancer*, 17, 120.
- CREUTZIG, U., M. DWORZAK, AND D. REINHARDT 2024. L11 Akute Myeloische Leukämie -AML im Kindes- und Jugendalter, www.awmf.org, 12 September 2024.
- D'ALTRI, T., GONZALEZ, J., AIFANTIS, I., ESPINOSA, L. & BIGAS, A. 2011. Hes1 expression and CYLD repression are essential events downstream of Notch1 in T-cell leukemia. *Cell Cycle*, 10, 1031-6.
- DE BARRIOS, O. & PARRA, M. 2021. Epigenetic Control of Infant B Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *Int J Mol Sci*, 22.
- DOHNER, H., SYMEONIDIS, A., DEEREN, D., DEMETER, J., SANZ, M. A., ANAGNOSTOPOULOS, A., ESTEVE, J., FIEDLER, W., PORKKA, K., KIM, H. J., LEE, J. H., USUKI, K., D'ARDIA, S., WON JUNG, C., SALAMERO, O., HORST, H. A., RECHER, C., ROUSSELOT, P., SANDHU, I., THEUNISSEN, K., THOL, F., DOHNER, K., TELEANU, V., DEANGELO, D. J., NAOE, T., SEKERES, M. A., BELSACK, V., GE, M., TAUBE, T. & OTTMANN, O. G. 2021. Adjunctive Volasertib in Patients With Acute Myeloid Leukemia not Eligible for Standard Induction Therapy: A Randomized, Phase 3 Trial. *Hemasphere*, 5, e617.
- DOHNER, H., WEI, A. H., APPELBAUM, F. R., CRADDOCK, C., DINARDO, C. D., DOMBRET, H., EBERT, B. L., FENAUX, P., GODLEY, L. A.,

- HASSERJIAN, R. P., LARSON, R. A., LEVINE, R. L., MIYAZAKI, Y., NIEDERWIESER, D., OSSENKOPPELE, G., ROLLIG, C., SIERRA, J., STEIN, E. M., TALLMAN, M. S., TIEN, H. F., WANG, J., WIERZBOWSKA, A. & LOWENBERG, B. 2022. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood*, 140, 1345-1377.
- DUGUID, A., MATTIUCCI, D. & OTTERSBBACH, K. 2021. Infant leukaemia - faithful models, cell of origin and the niche. *Dis Model Mech*, 14.
- DUNCAVAGE, E. J., BAGG, A., HASSERJIAN, R. P., DINARDO, C. D., GODLEY, L. A., IACOBUCCHI, I., JAISWAL, S., MALCOVATI, L., VANNUCCHI, A. M., PATEL, K. P., ARBER, D. A., ARCILA, M. E., BEJAR, R., BERLINER, N., BOROWITZ, M. J., BRANFORD, S., BROWN, A. L., CARGO, C. A., DOHNER, H., FALINI, B., GARCIA-MANERO, G., HAERLACH, T., HELLSTROM-LINDBERG, E., KIM, A. S., KLCO, J. M., KOMROKJI, R., LEE-CHEUN LOH, M., LOGHAVI, S., MULLIGHAN, C. G., OGAWA, S., ORAZI, A., PAPAEMMANUIL, E., REITER, A., ROSS, D. M., SAVONA, M., SHIMAMURA, A., SKODA, R. C., SOLE, F., STONE, R. M., TEFFERI, A., WALTER, M. J., WU, D., EBERT, B. L. & CAZZOLA, M. 2022. Genomic profiling for clinical decision making in myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, 140, 2228-2247.
- EAVES, C. J. 2015. Hematopoietic stem cells: concepts, definitions, and the new reality. *Blood*, 125, 2605-13.
- ERKNER, E., HENTRICH, T., SCHAIRER, R., FITZEL, R., SECKER-GROB, K. A., JEONG, J., KEPPELER, H., KORKMAZ, F., SCHULZE-HENTRICH, J. M., LENDERKE, C., SCHNEIDAWIND, D. & SCHNEIDAWIND, C. 2024. The ROR γ /SREBP2 pathway is a master regulator of cholesterol metabolism and serves as potential therapeutic target in t(4;11) leukemia. *Oncogene*, 43, 281-293.
- ERNST, P., FISHER, J. K., AVERY, W., WADE, S., FOY, D. & KORSMEYER, S. J. 2004. Definitive hematopoiesis requires the mixed-lineage leukemia gene. *Dev Cell*, 6, 437-43.
- ESCHERICH, G., AND M. SCHRAPPE 2024. Akute lymphoblastische Leukämie -ALL- im Kindesalter, <https://register.awmf.org/de/leitlinien/detail/025-014>, 14 September 2024.
- ESPINOSA, L., CATHELIN, S., D'ALTRI, T., TRIMARCHI, T., STATNIKOV, A., GUIU, J., RODILLA, V., INGLES-ESTEVE, J., NOMDEDEU, J., BELLOSILLO, B., BESES, C., ABDEL-WAHAB, O., KUCINE, N., SUN, S. C., SONG, G., MULLIGHAN, C. C., LEVINE, R. L., RAJEWSKY, K., AIFANTIS, I. & BIGAS, A. 2010. The Notch/Hes1 pathway sustains NF-kappaB activation through CYLD repression in T cell leukemia. *Cancer Cell*, 18, 268-81.
- FANG-FANG, Z., YOU, Y. & WEN-JUN, L. 2021. Progress in research on childhood T-cell acute lymphocytic leukemia, Notch1 signaling pathway, and its inhibitors: A review. *Bosn J Basic Med Sci*, 21, 136-144.
- FATHI, A. T., WANDER, S. A., BLONQUIST, T. M., BRUNNER, A. M., AMREIN, P. C., SUPKO, J., HERMANCE, N. M., MANNING, A. L., SADRZADEH, H., BALLEEN, K. K., ATTAR, E. C., GRAUBERT, T. A., HOBBS, G.,

- JOSEPH, C., PERRY, A. M., BURKE, M., SILVER, R., FOSTER, J., BERGERON, M., RAMOS, A. Y., SOM, T. T., FISHMAN, K. M., MCGREGOR, K. L., CONNOLLY, C., NEUBERG, D. S. & CHEN, Y. B. 2017. Phase I study of the aurora A kinase inhibitor alisertib with induction chemotherapy in patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica*, 102, 719-727.
- FISCHER, J., ERKNER, E., FITZEL, R., RADSZUWEIT, P., KEPPELER, H., KORKMAZ, F., ROTI, G., Lengerke, C., SCHNEIDAWIND, D. & SCHNEIDAWIND, C. 2023. Uncovering NOTCH1 as a Promising Target in the Treatment of MLL-Rearranged Leukemia. *Int J Mol Sci*, 24.
- FISCHER, J., ERKNER, E., RADSZUWEIT, P., HENTRICH, T., KEPPELER, H., KORKMAZ, F., SCHULZE-HENTRICH, J., FITZEL, R., Lengerke, C., SCHNEIDAWIND, D. & SCHNEIDAWIND, C. 2024. Only Infant MLL-Rearranged Leukemia Is Susceptible to an Inhibition of Polo-like Kinase 1 (PLK-1) by Volasertib. *Int J Mol Sci*, 25.
- FISCHER, M., QUAAS, M., NICKEL, A. & ENGELAND, K. 2015. Indirect p53-dependent transcriptional repression of Survivin, CDC25C, and PLK1 genes requires the cyclin-dependent kinase inhibitor p21/CDKN1A and CDE/CHR promoter sites binding the DREAM complex. *Oncotarget*, 6, 41402-17.
- GARCIA, E. G., IYER, S., GARCIA, S. P., LOONTIENS, S., SADREYEV, R. I., SPELEMAN, F. & LANGENAU, D. M. 2018. Cell of origin dictates aggression and stem cell number in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 32, 1860-1865.
- GAVET, O. & PINES, J. 2010. Progressive activation of CyclinB1-Cdk1 coordinates entry to mitosis. *Dev Cell*, 18, 533-43.
- GEORGE, J., UYAR, A., YOUNG, K., KUFFLER, L., WALDRON-FRANCIS, K., MARQUEZ, E., UCAR, D. & TROWBRIDGE, J. J. 2016. Leukaemia cell of origin identified by chromatin landscape of bulk tumour cells. *Nat Commun*, 7, 12166.
- GHARAIBEH, L., ELMADANY, N., ALWOSAIBAI, K. & ALSHAER, W. 2020. Notch1 in Cancer Therapy: Possible Clinical Implications and Challenges. *Mol Pharmacol*, 98, 559-576.
- GHELLI LUSERNA DI RORA, A., IACOBUCCI, I. & MARTINELLI, G. 2017. The cell cycle checkpoint inhibitors in the treatment of leukemias. *J Hematol Oncol*, 10, 77.
- GHELLI LUSERNA DI RORA, A., MARTINELLI, G. & SIMONETTI, G. 2019. The balance between mitotic death and mitotic slippage in acute leukemia: a new therapeutic window? *J Hematol Oncol*, 12, 123.
- GJERTSEN, B. T. & SCHÖFFSKI, P. 2015. Discovery and development of the Polo-like kinase inhibitor volasertib in cancer therapy. *Leukemia*, 29, 11-9.
- GÖKBUGET, N. 2024. Leitlinie Akute Lymphatische Leukämie (ALL) der Fachgesellschaften DGHO, OeGHO, SGMO, SGH+SSH, <https://www.dgho.de/aktuelles/news/newsarchiv/2022/onkopedia-all-aktualisiert>, 14 September 2024.

- GOLDE, T. E., KOO, E. H., FELSENSTEIN, K. M., OSBORNE, B. A. & MIELE, L. 2013. gamma-Secretase inhibitors and modulators. *Biochim Biophys Acta*, 1828, 2898-907.
- GÓRECKI, M., KOZIOŁ, I., KOPYSTECKA, A., BUDZYŃSKA, J., ZAWITKOWSKA, J. & LEJMAN, M. 2023. Updates in KMT2A Gene Rearrangement in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Biomedicines*, 11.
- GOROSHCHUK, O., KOLOSENKO, I., VIDARSDOTTIR, L., AZIMI, A. & PALM-APERGI, C. 2019. Polo-like kinases and acute leukemia. *Oncogene*, 38, 1-16.
- GUTTERIDGE, R. E., NDIAYE, M. A., LIU, X. & AHMAD, N. 2016. PIK1 Inhibitors in Cancer Therapy: From Laboratory to Clinics. *Mol Cancer Ther*, 15, 1427-35.
- HARRISON, C. J., HILLS, R. K., MOORMAN, A. V., GRIMWADE, D. J., HANN, I., WEBB, D. K., WHEATLEY, K., DE GRAAF, S. S., VAN DEN BERG, E., BURNETT, A. K. & GIBSON, B. E. 2010. Cytogenetics of childhood acute myeloid leukemia: United Kingdom Medical Research Council Treatment trials AML 10 and 12. *J Clin Oncol*, 28, 2674-81.
- HARTSINK-SEGERS, S. A., EXALTO, C., ALLEN, M., WILLIAMSON, D., CLIFFORD, S. C., HORSTMANN, M., CARON, H. N., PIETERS, R. & DEN BOER, M. L. 2013. Inhibiting Polo-like kinase 1 causes growth reduction and apoptosis in pediatric acute lymphoblastic leukemia cells. *Haematologica*, 98, 1539-46.
- HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, A., GONZÁLEZ, T., SOBAS, M., STRÄNG, E., CASTELLANI, G., ABÁIGAR, M., VALK, P. J. M., VILLAYERDE RAMIRO, Á., BENNER, A., METZELER, K. H., AZIBEIRO, R., TETTERO, J. M., MARTÍNEZ-LÓPEZ, J., PRATCORONA, M., MARTÍNEZ ELICEGUI, J., MILLS, K. I., THIEDE, C., SANZ, G., DÖHNER, K., HEUSER, M., HAERLACH, T., TURKI, A. T., REINHARDT, D., SCHULZE-RATH, R., BARBUS, M., HERNÁNDEZ-RIVAS, J. M., HUNTLY, B., OSSENKOPPELE, G., DÖHNER, H. & BULLINGER, L. 2024. Rearrangements involving 11q23.3/KMT2A in adult AML: mutational landscape and prognostic implications - a HARMONY study. *Leukemia*, 38, 1929-1937.
- HILDEN, J. M., DINNDORF, P. A., MEERBAUM, S. O., SATHER, H., VILLALUNA, D., HEEREMA, N. A., MCGLENNEN, R., SMITH, F. O., WOODS, W. G., SALZER, W. L., JOHNSTONE, H. S., DREYER, Z. & REAMAN, G. H. 2006. Analysis of prognostic factors of acute lymphoblastic leukemia in infants: report on CCG 1953 from the Children's Oncology Group. *Blood*, 108, 441-51.
- INABA, H. & MULLIGHAN, C. G. 2020. Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, 105, 2524-2539.
- JIA, Y., ZHANG, W., BASYAL, M., CHANG, K. H., OSTERMANN, L., BURKS, J. K., LY, C., MU-MOSLEY, H., ZHANG, Q., HAN, X., FOGLER, W. E., MAGNANI, J. L., LESEGRETAIN, A., ZAL, A. A., ZAL, T. & ANDREEFF, M. 2023. FLT3 inhibitors upregulate CXCR4 and E-selectin ligands via ERK suppression in AML cells and CXCR4/E-selectin inhibition enhances

- anti-leukemia efficacy of FLT3-targeted therapy in AML. *Leukemia*, 37, 1379-1383.
- JUNG, H. Y. & YANG, J. 2015. Unraveling the TWIST between EMT and cancer stemness. *Cell Stem Cell*, 16, 1-2.
- KASAI, F., HIRAYAMA, N., OZAWA, M., IEMURA, M. & KOHARA, A. 2016. Changes of heterogeneous cell populations in the Ishikawa cell line during long-term culture: Proposal for an in vitro clonal evolution model of tumor cells. *Genomics*, 107, 259-66.
- KHOURY, J. D., SOLARY, E., ABLA, O., AKKARI, Y., ALAGGIO, R., APPERLEY, J. F., BEJAR, R., BERTI, E., BUSQUE, L., CHAN, J. K. C., CHEN, W., CHEN, X., CHNG, W.-J., CHOI, J. K., COLMENERO, I., COUPLAND, S. E., CROSS, N. C. P., DE JONG, D., ELGHETANY, M. T., TAKAHASHI, E., EMILE, J.-F., FERRY, J., FOGELSTRAND, L., FONTENAY, M., GERMING, U., GUJRAL, S., HAFERLACH, T., HARRISON, C., HODGE, J. C., HU, S., JANSEN, J. H., KANAGAL-SHAMANNA, R., KANTARJIAN, H. M., KRATZ, C. P., LI, X.-Q., LIM, M. S., LOEB, K., LOGHAVI, S., MARCOGLIESE, A., MESHINCHI, S., MICHAELS, P., NARESH, K. N., NATKUNAM, Y., NEJATI, R., OTT, G., PADRON, E., PATEL, K. P., PATKAR, N., PICARSIC, J., PLATZBECKER, U., ROBERTS, I., SCHUH, A., SEWELL, W., SIEBERT, R., TEMBHARE, P., TYNER, J., VERSTOVSEK, S., WANG, W., WOOD, B., XIAO, W., YEUNG, C. & HOCHHAUS, A. 2022a. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia*, 36, 1703-1719.
- KHOURY, J. D., SOLARY, E., ABLA, O., AKKARI, Y., ALAGGIO, R., APPERLEY, J. F., BEJAR, R., BERTI, E., BUSQUE, L., CHAN, J. K. C., CHEN, W., CHEN, X., CHNG, W. J., CHOI, J. K., COLMENERO, I., COUPLAND, S. E., CROSS, N. C. P., DE JONG, D., ELGHETANY, M. T., TAKAHASHI, E., EMILE, J. F., FERRY, J., FOGELSTRAND, L., FONTENAY, M., GERMING, U., GUJRAL, S., HAFERLACH, T., HARRISON, C., HODGE, J. C., HU, S., JANSEN, J. H., KANAGAL-SHAMANNA, R., KANTARJIAN, H. M., KRATZ, C. P., LI, X. Q., LIM, M. S., LOEB, K., LOGHAVI, S., MARCOGLIESE, A., MESHINCHI, S., MICHAELS, P., NARESH, K. N., NATKUNAM, Y., NEJATI, R., OTT, G., PADRON, E., PATEL, K. P., PATKAR, N., PICARSIC, J., PLATZBECKER, U., ROBERTS, I., SCHUH, A., SEWELL, W., SIEBERT, R., TEMBHARE, P., TYNER, J., VERSTOVSEK, S., WANG, W., WOOD, B., XIAO, W., YEUNG, C. & HOCHHAUS, A. 2022b. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia*, 36, 1703-1719.
- KIM, R., BERGUGNAT, H., PASTORET, C., PASQUIER, F., RAFFOUX, E., LARCHER, L., PASSET, M., GRARDEL, N., DELABESSE, E., KUBETZKO, S., CAYE-EUDE, A., MEYER, C., MARSCHALEK, R., LAFAGE-POCHITALOFF, M., THIEBAUT-BERTRAND, A., BALSAT, M., ESCOFFRE-BARBE, M., BLUM, S., BAUMANN, M., BANOS, A., STRAETMANS, N., GALLEGUO-HERNANZ, M. P., CHALANDON, Y., GRAUX, C., SOULIER, J., LEGUAY, T., HUNAULT, M., HUGUET, F., LHÉRITIER, V., DOMBRET, H., BOISSEL, N. & CLAPPIER, E. 2023.

- Genetic alterations and MRD refine risk assessment for KMT2A-rearranged B-cell precursor ALL in adults: a GRAALL study. *Blood*, 142, 1806-1817.
- KLINAKIS, A., LOBRY, C., ABDEL-WAHAB, O., OH, P., HAENO, H., BUONAMICI, S., VAN DE WALLE, I., CATHELIN, S., TRIMARCHI, T., ARALDI, E., LIU, C., IBRAHIM, S., BERAN, M., ZAVADIL, J., EFSTRATIADIS, A., TAGHON, T., MICHOR, F., LEVINE, R. L. & AIFANTIS, I. 2011. A novel tumour-suppressor function for the Notch pathway in myeloid leukaemia. *Nature*, 473, 230-3.
- KMPLOT.COM <https://kmplot.com/analysis/index.php?p=service> [Zugriff 17.08.2025].
- KOPAN, R. & ILAGAN, M. X. 2009. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell*, 137, 216-33.
- KOZLOVA, N., GROSSMAN, J. E., IWANICKI, M. P. & MURANEN, T. 2020. The Interplay of the Extracellular Matrix and Stromal Cells as a Drug Target in Stroma-Rich Cancers. *Trends Pharmacol Sci*, 41, 183-198.
- KRIVTSOV, A. V., FIGUEROA, M. E., SINHA, A. U., STUBBS, M. C., FENG, Z., VALK, P. J., DELWEL, R., DOHNER, K., BULLINGER, L., KUNG, A. L., MELNICK, A. M. & ARMSTRONG, S. A. 2013. Cell of origin determines clinically relevant subtypes of MLL-rearranged AML. *Leukemia*, 27, 852-60.
- KRIVTSOV, A. V., TWOMEY, D., FENG, Z., STUBBS, M. C., WANG, Y., FABER, J., LEVINE, J. E., WANG, J., HAHN, W. C., GILLILAND, D. G., GOLUB, T. R. & ARMSTRONG, S. A. 2006. Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. *Nature*, 442, 818-22.
- KROP, I., DEMUTH, T., GUTHRIE, T., WEN, P. Y., MASON, W. P., CHINNAIYAN, P., BUTOWSKI, N., GROVES, M. D., KESARI, S., FREEDMAN, S. J., BLACKMAN, S., WATTERS, J., LOBODA, A., PODTELEZHNIKOV, A., LUNCEFORD, J., CHEN, C., GIANNOTTI, M., HING, J., BECKMAN, R. & LORUSSO, P. 2012. Phase I pharmacologic and pharmacodynamic study of the gamma secretase (Notch) inhibitor MK-0752 in adult patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol*, 30, 2307-13.
- KULCZYCKA, M., DERLATKA, K., TASIOR, J., SYGACZ, M., LEJMAN, M. & ZAWITKOWSKA, J. 2024. Infant Acute Lymphoblastic Leukemia-New Therapeutic Opportunities. *Int J Mol Sci*, 25.
- LI, F., HAN, Y., CHEN, R., JIANG, Y., CHEN, C., WANG, X., ZHOU, J., XU, Q., JIANG, S., ZHANG, S., YU, K. & ZHANG, S. 2023. MicroRNA-143 acts as a tumor suppressor through Musashi-2/DLL1/Notch1 and Musashi-2/Snail1/MMPs axes in acute myeloid leukemia. *J Transl Med*, 21, 309.
- LI, Z., FIERSTEIN, S., TANAKA-YANO, M., FRENIS, K., CHEN, C. C., WANG, D., FALCHETTI, M., CÔTÉ, P., CURRAN, C., LU, K., LIU, T., ORKIN, S., LI, H., LUMMERTZ DA ROCHA, E., HU, S., ZHU, Q. & ROWE, R. G. 2025. The epigenetic state of the cell of origin defines mechanisms of leukemogenesis. *Leukemia*, 39, 87-97.
- LIU, N., ZHANG, J. & JI, C. 2013. The emerging roles of Notch signaling in leukemia and stem cells. *Biomark Res*, 1, 23.

- LIU, X. S., LI, H., SONG, B. & LIU, X. 2010. Polo-like kinase 1 phosphorylation of G2 and S-phase-expressed 1 protein is essential for p53 inactivation during G2 checkpoint recovery. *EMBO Rep*, 11, 626-32.
- LIU, Y., CHEN, Q., JEONG, H. W., KOH, B. I., WATSON, E. C., XU, C., STEHLING, M., ZHOU, B. & ADAMS, R. H. 2022. A specialized bone marrow microenvironment for fetal haematopoiesis. *Nat Commun*, 13, 1327.
- LIU, Z., SUN, Q. & WANG, X. 2017. PLK1, A Potential Target for Cancer Therapy. *Transl Oncol*, 10, 22-32.
- MA, X., LIU, Y., LIU, Y., ALEXANDROV, L. B., EDMONSON, M. N., GAWAD, C., ZHOU, X., LI, Y., RUSCH, M. C., EASTON, J., HUETHER, R., GONZALEZ-PENA, V., WILKINSON, M. R., HERMIDA, L. C., DAVIS, S., SIOSON, E., POUNDS, S., CAO, X., RIES, R. E., WANG, Z., CHEN, X., DONG, L., DISKIN, S. J., SMITH, M. A., GUIDRY AUVIL, J. M., MELTZER, P. S., LAU, C. C., PERLMAN, E. J., MARIS, J. M., MESHINCHI, S., HUNGER, S. P., GERHARD, D. S. & ZHANG, J. 2018. Pan-cancer genome and transcriptome analyses of 1,699 paediatric leukaemias and solid tumours. *Nature*, 555, 371-376.
- MACK, R., ZHANG, L., BRESLIN SJ, P. & ZHANG, J. 2021. The Fetal-to-Adult Hematopoietic Stem Cell Transition and its Role in Childhood Hematopoietic Malignancies. *Stem Cell Rev Rep*, 17, 2059-2080.
- MAGALHÃES-GAMA, F., ALVES-HANNA, F. S., ARAÚJO, N. D., BARROS, M. S., SILVA, F. S., CATÃO, C. L. S., MORAES, J. S., FREITAS, I. C., TARRAGÔ, A. M., MALHEIRO, A., TEIXEIRA-CARVALHO, A. & COSTA, A. G. 2022. The Yin-Yang of myeloid cells in the leukemic microenvironment: Immunological role and clinical implications. *Frontiers in Immunology*, Volume 13 - 2022.
- MARCHESINI, M., GHERLI, A., MONTANARO, A., PATRIZI, L., SORRENTINO, C., PAGLIARO, L., ROMPIETTI, C., KITARA, S., HEIT, S., OLESEN, C. E., MØLLER, J. V., SAVI, M., BOCCHI, L., VILELLA, R., RIZZI, F., BAGLIONE, M., RASTELLI, G., LOIACONO, C., LA STARZA, R., MECUCCI, C., STEGMAIER, K., AVERSA, F., STILLI, D., LUND WINTER, A. M., SPORTOLETTI, P., BUBLITZ, M., DALBY-BROWN, W. & ROTI, G. 2020. Blockade of Oncogenic NOTCH1 with the SERCA Inhibitor CAD204520 in T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cell Chem Biol*, 27, 678-697.e13.
- MARSCHALEK, R. 2016. Systematic Classification of Mixed-Lineage Leukemia Fusion Partners Predicts Additional Cancer Pathways. *Ann Lab Med*, 36, 85-100.
- MAYANI, H., FLORES-FIGUEROA, E. & CHÁVEZ-GONZÁLEZ, A. 2009. In vitro biology of human myeloid leukemia. *Leuk Res*, 33, 624-37.
- MCCARTER, A. C., WANG, Q. & CHIANG, M. 2018. Notch in Leukemia. *Adv Exp Med Biol*, 1066, 355-394.
- MCKENZIE, L., KING, S., MARCAR, L., NICOL, S., DIAS, S. S., SCHUMM, K., ROBERTSON, P., BOURDON, J. C., PERKINS, N., FULLER-PACE, F. & MEEK, D. W. 2010. p53-dependent repression of polo-like kinase-1 (PLK1). *Cell Cycle*, 9, 4200-12.

- MEDYOUNG, H., GUSSCOTT, S., WANG, H., TSENG, J. C., WAI, C., NEMIROVSKY, O., TRUMPP, A., PFLUMIO, F., CARBONI, J., GOTTARDIS, M., POLLAK, M., KUNG, A. L., ASTER, J. C., HOLZENBERGER, M. & WENG, A. P. 2011. High-level IGF1R expression is required for leukemia-initiating cell activity in T-ALL and is supported by Notch signaling. *J Exp Med*, 208, 1809-22.
- MEYER, C., BURMEISTER, T., GRÖGER, D., TSAUR, G., FECHINA, L., RENNEVILLE, A., SUTTON, R., VENN, N. C., EMERENCIANO, M., POMBO-DE-OLIVEIRA, M. S., 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, V. H. J., DELABESSE, E., PARK, T. S., OH, S. H., SILVA, M. L. M., LUND-AHO, T., JUVONEN, V., MOORE, A. S., HEIDENREICH, O., VORMOOR, J., ZERKALENKOVA, E., OLSHANSKAYA, Y., BUENO, C., MENENDEZ, P., TEIGLER-SCHLEGEL, A., ZUR STADT, U., LENTES, J., GÖHRING, G., KUSTANOVICH, A., ALEINIKOVA, O., SCHÄFER, B. W., KUBETZKO, S., MADSEN, H. O., GRUHN, B., DUARTE, X., GAMEIRO, P., LIPPERT, E., BIDET, A., CAYUELA, J. M., CLAPPIER, E., ALONSO, C. N., ZWAAN, C. M., VAN DEN HEUVEL-EIBRINK, M. M., IZRAELI, S., TRAKHTENBROT, L., ARCHER, P., HANCOCK, J., MÖRICKE, A., ALTEN, J., SCHRAPPE, M., STANULLA, M., STREHL, S., ATTARBASCHI, A., DWORZAK, M., HAAS, O. A., PANZER-GRÜMAYER, R., SEDÉK, L., SZCZEPAŃSKI, T., CAYE, A., SUAREZ, L., CAVÉ, H. & MARSCHALEK, R. 2018. The MLL recombinome of acute leukemias in 2017. *Leukemia*, 32, 273-284.
- MEYER, C., LARGHERO, P., ALMEIDA LOPES, B., BURMEISTER, T., GROGER, D., SUTTON, R., VENN, N. C., CAZZANIGA, G., CORRAL ABASCAL, L., TSAUR, G., FECHINA, L., EMERENCIANO, M., POMBO-DE-OLIVEIRA, M. S., LUND-AHO, T., LUNDAN, T., MONTONEN, M., JUVONEN, V., ZUNA, J., TRKA, J., BALLERINI, P., LAPILLONNE, H., VAN DER VELDEN, V. H. J., SONNEVELD, E., DELABESSE, E., DE MATOS, R. R. C., SILVA, M. L. M., BOMKEN, S., KATSIBARDI, K., KEERNIK, M., GRARDEL, N., MASON, J., PRICE, R., KIM, J., ECKERT, C., LO NIGRO, L., BUENO, C., MENENDEZ, P., ZUR STADT, U., GAMEIRO, P., SEDEK, L., SZCZEPANSKI, T., BIDET, A., MARCU, V., SHICHRUR, K., IZRAELI, S., MADSEN, H. O., SCHAFFER, B. W., KUBETZKO, S., KIM, R., CLAPPIER, E., TRAUTMANN, H., BRUGGEMANN, M., ARCHER, P., HANCOCK, J., ALTEN, J., MORICKE, A., STANULLA, M., LENTES, J., BERGMANN, A. K., STREHL, S., KOHRER, S., NEBRAL, K., DWORZAK, M. N., HAAS, O. A., ARFEUILLE, C., CAYE-EUDE, A., CAVE, H. & MARSCHALEK, R. 2023. The KMT2A recombinome of acute leukemias in 2023. *Leukemia*, 37, 988-1005.
- MILNE, T. A. 2017. Mouse models of MLL leukemia: recapitulating the human disease. *Blood*, 129, 2217-2223.
- MUKHERJEE, N., ALMEIDA, A., PARTYKA, K. A., LU, Y., SCHWAN, J. V., LAMBERT, K., ROGERS, M., ROBINSON, W. A., ROBINSON, S. E., APPLGATE, A. J., AMATO, C. M., LUO, Y., FUJITA, M., NORRIS, D. A.

- & SHELLMAN, Y. G. 2016. Combining a GSI and BCL-2 inhibitor to overcome melanoma's resistance to current treatments. *Oncotarget*, 7, 84594-84607.
- MURUGAN, R. N., PARK, J. E., KIM, E. H., SHIN, S. Y., CHEONG, C., LEE, K. S. & BANG, J. K. 2011. Plk1-targeted small molecule inhibitors: molecular basis for their potency and specificity. *Mol Cells*, 32, 209-20.
- NEHRBAS, J., BUTLER, J. T., CHEN, D.-W. & KURRE, P. 2020. Extracellular Vesicles and Chemotherapy Resistance in the AML Microenvironment. *Frontiers in Oncology*, Volume 10 - 2020.
- NOTTA, F., DOULATOV, S., LAURENTI, E., POEPPL, A., JURISICA, I. & DICK, J. E. 2011. Isolation of single human hematopoietic stem cells capable of long-term multilineage engraftment. *Science*, 333, 218-21.
- O'DONOGHUE, K. & CHAN, J. 2006. Human fetal mesenchymal stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther*, 1, 371-86.
- ORKIN, S. H. 1998. Embryonic stem cells and transgenic mice in the study of hematopoiesis. *Int J Dev Biol*, 42, 927-34.
- ORKIN, S. H. & ZON, L. I. 2008. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*, 132, 631-44.
- PAGLIARO, L., MARCHESINI, M. & ROTI, G. 2021. Targeting oncogenic Notch signaling with SERCA inhibitors. *Journal of Hematology & Oncology*, 14, 8.
- PARK, L. M., LANNIGAN, J. & JAIMES, M. C. 2020. OMIP-069: Forty-Color Full Spectrum Flow Cytometry Panel for Deep Immunophenotyping of Major Cell Subsets in Human Peripheral Blood. *Cytometry A*, 97, 1044-1051.
- PASSARO, D., IRIGOYEN, M., CATHERINET, C., GACHET, S., DA COSTA DE JESUS, C., LASGI, C., TRAN QUANG, C. & GHYSDAEL, J. 2015. CXCR4 Is Required for Leukemia-Initiating Cell Activity in T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cell*, 27, 769-79.
- POLAK, P., KARLIĆ, R., KOREN, A., THURMAN, R., SANDSTROM, R., LAWRENCE, M., REYNOLDS, A., RYNES, E., VLAHOVIČEK, K., STAMATOYANNOPOULOS, J. A. & SUNYAEV, S. R. 2015. Cell-of-origin chromatin organization shapes the mutational landscape of cancer. *Nature*, 518, 360-364.
- RENNER, A. G., DOS SANTOS, C., RECHER, C., BAILLY, C., CREANCIER, L., KRUCZYNSKI, A., PAYRASTRE, B. & MANENTI, S. 2009. Polo-like kinase 1 is overexpressed in acute myeloid leukemia and its inhibition preferentially targets the proliferation of leukemic cells. *Blood*, 114, 659-62.
- RIBATTI, D. & D'AMATI, A. 2023. Hematopoiesis and Mast Cell Development. *Int J Mol Sci*, 24.
- RICCIO, O., VAN GIJN, M. E., BEZDEK, A. C., PELLEGRINET, L., VAN ES, J. H., ZIMMER-STROBL, U., STROBL, L. J., HONJO, T., CLEVERS, H. & RADTKE, F. 2008. Loss of intestinal crypt progenitor cells owing to inactivation of both Notch1 and Notch2 is accompanied by derepression of CDK inhibitors p27Kip1 and p57Kip2. *EMBO Rep*, 9, 377-83.
- RICE, S. & ROY, A. 2020. MLL-rearranged infant leukaemia: A 'thorn in the side' of a remarkable success story. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, 1863, 194564.

- RÖLLIG, C. 2024. Leitlinie Akute Myeloische Leukämie (AML) der Fachgesellschaften DGHO, OeGHO, SGMO, SGH+SSH, https://www.dgho.de/aktuelles/news/newsarchiv/2023/onkopedia_aml_aktualisiert, 14 September 2024.
- ROSSI, D., RASI, S., FABBRI, G., SPINA, V., FANGAZIO, M., FORCONI, F., MARASCA, R., LAURENTI, L., BRUSCAGGIN, A., CERRI, M., MONTI, S., CRESTA, S., FAMA, R., DE PAOLI, L., BULIAN, P., GATTEI, V., GUARINI, A., DEAGLIO, S., CAPELLO, D., RABADAN, R., PASQUALUCCI, L., DALLA-FAVERA, R., FOA, R. & GAIDANO, G. 2012. Mutations of NOTCH1 are an independent predictor of survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 119, 521-9.
- ROTI, G., CARLTON, A., ROSS, K. N., MARKSTEIN, M., PAJCINI, K., SU, A. H., PERRIMON, N., PEAR, W. S., KUNG, A. L., BLACKLOW, S. C., ASTER, J. C. & STEGMAIER, K. 2013. Complementary genomic screens identify SERCA as a therapeutic target in NOTCH1 mutated cancer. *Cancer Cell*, 23, 390-405.
- ROTI, G., QI, J., KITARA, S., SANCHEZ-MARTIN, M., SAUR CONWAY, A., VARCA, A. C., SU, A., WU, L., KUNG, A. L., FERRANDO, A. A., BRADNER, J. E. & STEGMAIER, K. 2018. Leukemia-specific delivery of mutant NOTCH1 targeted therapy. *J Exp Med*, 215, 197-216.
- ROTI, G. & STEGMAIER, K. 2011. Targeting NOTCH1 in hematopoietic malignancy. *Crit Rev Oncog*, 16, 103-15.
- ROWE, R. G., LUMMERTZ DA ROCHA, E., SOUSA, P., MISSIOS, P., MORSE, M., MARION, W., YERMALOVICH, A., BARRAGAN, J., MATHIEU, R., JHA, D. K., FLEMING, M. D., NORTH, T. E. & DALEY, G. Q. 2019. The developmental stage of the hematopoietic niche regulates lineage in MLL-rearranged leukemia. *J Exp Med*, 216, 527-538.
- RÜCKER, F. G., SANDER, S., DÖHNER, K., DÖHNER, H., POLLACK, J. R. & BULLINGER, L. 2006. Molecular profiling reveals myeloid leukemia cell lines to be faithful model systems characterized by distinct genomic aberrations. *Leukemia*, 20, 994-1001.
- RYNINGEN, A., STAPNES, C. & BRUSERUD, Ø. 2007. Clonogenic acute myelogenous leukemia cells are heterogeneous with regard to regulation of differentiation and effect of epigenetic pharmacological targeting. *Leuk Res*, 31, 1303-13.
- SCHOCH, C., SCHNITTGER, S., KLAUS, M., KERN, W., HIDDEMANN, W. & HAFERLACH, T. 2003. AML with 11q23/MLL abnormalities as defined by the WHO classification: incidence, partner chromosomes, FAB subtype, age distribution, and prognostic impact in an unselected series of 1897 cytogenetically analyzed AML cases. *Blood*, 102, 2395-402.
- SECKER, K. A., BLOEHL, B., KEPPELER, H., DUERR-STOERZER, S., SCHMID, H., SCHNEIDAWIND, D., JEONG, J., HENTRICH, T., SCHULZE-HENTRICH, J. M. & SCHNEIDAWIND, C. 2020a. MAT2A as Key Regulator and Therapeutic Target in MLLr Leukemogenesis. *Cancers (Basel)*, 12.
- SECKER, K. A., BRUNS, L., KEPPELER, H., JEONG, J., HENTRICH, T., SCHULZE-HENTRICH, J. M., MANKEL, B., FEND, F., SCHNEIDAWIND, D. & SCHNEIDAWIND, C. 2020b. Only Hematopoietic Stem and

- Progenitor Cells from Cord Blood Are Susceptible to Malignant Transformation by MLL-AF4 Translocations. *Cancers (Basel)*, 12.
- SECKER, K. A., KEPPELER, H., DUERR-STOERZER, S., SCHMID, H., SCHNEIDAWIND, D., HENTRICH, T., SCHULZE-HENTRICH, J. M., MANKEL, B., FEND, F. & SCHNEIDAWIND, C. 2019. Inhibition of DOT1L and PRMT5 promote synergistic anti-tumor activity in a human MLL leukemia model induced by CRISPR/Cas9. *Oncogene*, 38, 7181-7195.
- SHIMADA, A., ORWICK, S., FUJISAKI, H., CAMPANA, D. & BAKER, S. D. 2008. Microenvironmental Factors Determine the Sensitivity of Acute Myeloid Leukemia Cells to Tyrosine Kinase Inhibitors. *Blood*, 112, 1630-1630.
- SHIMONY, S., STAHL, M. & STONE, R. M. 2023. Acute myeloid leukemia: 2023 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*, 98, 502-526.
- SISON, E. A. & BROWN, P. 2011. The bone marrow microenvironment and leukemia: biology and therapeutic targeting. *Expert Rev Hematol*, 4, 271-83.
- STRANSKY, N., EGLOFF, A. M., TWARD, A. D., KOSTIC, A. D., CIBULSKIS, K., SIVACHENKO, A., KRYUKOV, G. V., LAWRENCE, M. S., SOUGNEZ, C., MCKENNA, A., SHEFLER, E., RAMOS, A. H., STOJANOV, P., CARTER, S. L., VOET, D., CORTES, M. L., AUCLAIR, D., BERGER, M. F., SAKSENA, G., GUIDUCCI, C., ONOFRIO, R. C., PARKIN, M., ROMKES, M., WEISSFELD, J. L., SEETHALA, R. R., WANG, L., RANGEL-ESCARENO, C., FERNANDEZ-LOPEZ, J. C., HIDALGO-MIRANDA, A., MELENDEZ-ZAJGLA, J., WINCKLER, W., ARDLIE, K., GABRIEL, S. B., MEYERSON, M., LANDER, E. S., GETZ, G., GOLUB, T. R., GARRAWAY, L. A. & GRANDIS, J. R. 2011. The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. *Science*, 333, 1157-60.
- SYMEONIDOU, V., JAKOBCZYK, H., BASHANFER, S., MALOUF, C., FOTOPOULOU, F., KOTECHA, R. S., ANDERSON, R. A., FINCH, A. J. & OTTERSBAACH, K. 2021. Defining the fetal origin of MLL-AF4 infant leukemia highlights specific fatty acid requirements. *Cell Rep*, 37, 109900.
- TAKAI, N., HAMANAKA, R., YOSHIMATSU, J. & MIYAKAWA, I. 2005. Polo-like kinases (Plks) and cancer. *Oncogene*, 24, 287-91.
- TAVOR, S., PETIT, I., POROZOV, S., AVIGDOR, A., DAR, A., LEIDER-TREJO, L., SHEMTOV, N., DEUTSCH, V., NAPARSTEK, E., NAGLER, A. & LAPIDOT, T. 2004. CXCR4 regulates migration and development of human acute myelogenous leukemia stem cells in transplanted NOD/SCID mice. *Cancer Res*, 64, 2817-24.
- TILL, J. E. & MCCULLOCH, E. A. 1980. Hemopoietic stem cell differentiation. *Biochim Biophys Acta*, 605, 431-59.
- TKACHUK, D. C., KOHLER, S. & CLEARY, M. L. 1992. Involvement of a homolog of Drosophila trithorax by 11q23 chromosomal translocations in acute leukemias. *Cell*, 71, 691-700.

- TOMIZAWA, D., MIYAMURA, T., IMAMURA, T., WATANABE, T., MORIYA SAITO, A., OGAWA, A., TAKAHASHI, Y., HIRAYAMA, M., TAKI, T., DEGUCHI, T., HORI, T., SANADA, M., OHMORI, S., HABU, M., IGUCHI, A., ARAKAWA, Y., KOGA, Y., MANABE, A., HORIBE, K., ISHII, E. & KOH, K. 2020. A risk-stratified therapy for infants with acute lymphoblastic leukemia: a report from the JPLSG MLL-10 trial. *Blood*, 136, 1813-1823.
- TSAKANELI, A. & WILLIAMS, O. 2021. Drug Repurposing for Targeting Acute Leukemia With KMT2A (MLL)-Gene Rearrangements. *Front Pharmacol*, 12, 741413.
- TSENG, S., LEE, M. E. & LIN, P. C. 2023. A Review of Childhood Acute Myeloid Leukemia: Diagnosis and Novel Treatment. *Pharmaceuticals (Basel)*, 16.
- VAN DEN BOSSCHE, J., DEBEN, C., DE PAUW, I., LAMBRECHTS, H., HERMANS, C., DESCHOOLMEESTER, V., JACOBS, J., SPECENIER, P., PAUWELS, P., VERMORKEN, J. B., PEETERS, M., LARDON, F. & WOUTERS, A. 2019. In vitro study of the Polo-like kinase 1 inhibitor volasertib in non-small-cell lung cancer reveals a role for the tumor suppressor p53. *Mol Oncol*, 13, 1196-1213.
- VAN DEN BOSSCHE, J., LARDON, F., DESCHOOLMEESTER, V., DE PAUW, I., VERMORKEN, J. B., SPECENIER, P., PAUWELS, P., PEETERS, M. & WOUTERS, A. 2016. Spotlight on Volasertib: Preclinical and Clinical Evaluation of a Promising Plk1 Inhibitor. *Med Res Rev*, 36, 749-86.
- VIÑADO, A. C., CALVO, I. A., CENZANO, I., OLAVERRI, D., COCERA, M., SAN MARTIN-URIZ, P., ROMERO, J. P., VILAS-ZORNOZA, A., VERA, L., GOMEZ-CEBRIAN, N., PUCHADES-CARRASCO, L., LISI-VEGA, L. E., APAOLAZA, I., VALERA, P., GURUCEAGA, E., GRANERO-MOLTO, F., RIPALDA-CEMBORAIN, P., LUCK, T. J., BULLINGER, L., PLANES, F. J., RIFON, J. J., MÉNDEZ-FERRER, S., YUSUF, R. Z., PARDO-SAGANTA, A., PROSPER, F. & SAEZ, B. 2022. The bone marrow niche regulates redox and energy balance in MLL::AF9 leukemia stem cells. *Leukemia*, 36, 1969-1979.
- WANG, N. N., LI, Z. H., ZHAO, H., TAO, Y. F., XU, L. X., LU, J., CAO, L., DU, X. J., SUN, L. C., ZHAO, W. L., XIAO, P. F., FANG, F., SU, G. H., LI, Y. H., LI, G., LI, Y. P., XU, Y. Y., ZHOU, H. T., WU, Y., JIN, M. F., LIU, L., NI, J., WANG, J., HU, S. Y., ZHU, X. M., FENG, X. & PAN, J. 2015. Molecular targeting of the oncoprotein PLK1 in pediatric acute myeloid leukemia: RO3280, a novel PLK1 inhibitor, induces apoptosis in leukemia cells. *Int J Mol Sci*, 16, 1266-92.
- WINTERS, A. C. & BERNT, K. M. 2017. MLL-Rearranged Leukemias-An Update on Science and Clinical Approaches. *Front Pediatr*, 5, 4.
- XIE, X., GOU, F., ZHENG, Z., ZHANG, Y., ZHANG, Y., DONG, F., CHENG, T. & CHENG, H. 2024. Decoding human bone marrow hematopoietic stem and progenitor cells from fetal to birth. *iScience*, 27, 110445.
- YI, L., ZHOU, X., LI, T., LIU, P., HAI, L., TONG, L., MA, H., TAO, Z., XIE, Y., ZHANG, C., YU, S. & YANG, X. 2019. Notch1 signaling pathway promotes invasion, self-renewal and growth of glioma initiating cells via modulating chemokine system CXCL12/CXCR4. *J Exp Clin Cancer Res*, 38, 339.

- YU, B. D., HESS, J. L., HORNING, S. E., BROWN, G. A. & KORSMEYER, S. J. 1995. Altered Hox expression and segmental identity in Mll-mutant mice. *Nature*, 378, 505-8.
- ZENG, H., CHENG, J., FAN, Y., LUAN, Y., YANG, J., WANG, F., YANG, S. & SHAO, L. 2020. Molecular Modulation of Fetal Liver Hematopoietic Stem Cell Mobilization into Fetal Bone Marrow in Mice. *Stem Cells Int*, 2020, 8885154.
- ZENG, Z., SHI, Y. X., SAMUDIO, I. J., WANG, R. Y., LING, X., FROLOVA, O., LEVIS, M., RUBIN, J. B., NEGRIN, R. R., ESTEY, E. H., KONOPLEV, S., ANDREEFF, M. & KONOPLEVA, M. 2009. Targeting the leukemia microenvironment by CXCR4 inhibition overcomes resistance to kinase inhibitors and chemotherapy in AML. *Blood*, 113, 6215-24.
- ZHANG, H., LIANG, J., LU, T., LI, M., SHAN, G., BI, G., ZHAO, M., JIN, X., WANG, Q., CHEN, Z. & ZHAN, C. 2023. AGRN promotes lung adenocarcinoma progression by activating Notch signaling pathway and acts as a therapeutic target. *Pharmacol Res*, 194, 106819.
- ZHANG, Y., GAO, S., XIA, J. & LIU, F. 2018. Hematopoietic Hierarchy - An Updated Roadmap. *Trends Cell Biol*, 28, 976-986.
- ZHANG, Z., ZHANG, G. & KONG, C. 2016. FOXM1 participates in PLK1-regulated cell cycle progression in renal cell cancer cells. *Oncol Lett*, 11, 2685-2691.
- ZHAO, Y., SHEN, M., WU, L., YANG, H., YAO, Y., YANG, Q., DU, J., LIU, L., LI, Y. & BAI, Y. 2023. Stromal cells in the tumor microenvironment: accomplices of tumor progression? *Cell Death & Disease*, 14, 587.

7. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Medizinischen Klinik Tübingen, Abteilung II Hämatologie, Onkologie, klinische Immunologie und Rheumatologie, unter Betreuung von PD Dr. med. Dr. phil. Corina Schneidawind, sowie der Abteilungsleiterin Prof. Dr. med. Claudia Lengerke durchgeführt. Die Konzeption der Studie erfolgte durch Corina Schneidawind in Zusammenarbeit mit Estelle Erkner und Jacqueline Fischer. Sämtliche Versuche wurden (nach Einarbeitung durch Estelle Erkner, Rahel Fitzel, Pia Radszuweit, Fulya Korkmaz, Hilde Keppeler) von mir eigenständig durchgeführt. Die Herstellung, sowie die Beschaffung der Labormaterialien und -reagenzien erfolgt durch Hilde Keppeler, Fulya Korkmaz und mir selbst. Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch Estelle Erkner und Corina Schneidawind, eigenständig durch mich selbst. Die Durchführung der RNA-Sequenzierung erfolgte durch die Arbeitsgruppe Prof. Dr. Julia Schulze-Hentrich, sowie dessen Auswertung durch Dr. Thomas Hentrich. Der Inhibitor CAD204520 wurde von der Arbeitsgruppe Roti et al. bereitgestellt.

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

Tübingen, den 13.11.2025

8. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich von Herzen bei meiner Doktormutter Corina Schneidawind PD Dr. med. Dr. phil. bedanken. Danke für deine verlässliche Betreuung, deine stets offene Tür, deine Unterstützung in allen Phasen des Projekts und deine Begleitung – vielen Dank für deine Geduld, dein Vertrauen und deine wertvolle Zeit.

Mein herzlicher Dank gilt der FACS Core Facility, die mich mit großer Expertise und Geduld durch zahlreiche Analysen begleitet hat. Ein ebenso großes Dankeschön gilt der Neonatologie für die Bereitstellung der Nabelschnurblutproben sowie der Medizinischen Klinik für die Bereitstellung des Knochenmarks. Ich danke auch Dr. Thomas Hentrich für die fachkundige Auswertung der RNA-Seq-Daten, inspirierender Telefonate und Unterstützung, sowie den Austausch.

Ein besonderer Dank geht an meine Arbeitsgruppe – Estelle, Pia, Rahel, Fulya, Rebekka, Hilde, Emma, Anton, Max und Dominik - ohne euch wäre diese Dissertation niemals entstanden. Danke für all die gemeinsamen Stunden im Labor, für eure Geduld, euren Humor, für 80er-Jahre-Hits und Disney-Songs, für Kaffee und Mittagspausen, für Grillabende und Gespräche, die weit über Wissenschaft hinausgingen. Ihr habt das Labor zu meinem zweiten Zuhause gemacht – mit eurer Freundschaft, eurer Herzlichkeit und eurer unerschütterlichen Unterstützung. Ein herzliches Danke an Anton, der nicht nur im Labor, sondern auch im Studium eine große Unterstützung war, vom Wochenpraktikum bis zum gemeinsamen Tanz durchs Examen.

Ein ganz besonderer Dank gebührt Pia! Du warst immer erreichbar, immer da, mit einem offenen Ohr, einem klaren Kopf oder einfach mit einem Kuchen zur rechten Zeit. Danke, dass du weit mehr bist als eine „Laborbekanntschaft“. Du bist einer der wichtigsten Menschen in meinem Leben geworden und ich freue mich darauf viele weitere Jahre mit dir zu erleben. Ohne dich wäre diese Arbeit nicht das, was sie ist. Danke für jede Minute, die wir teilen durften! Mein großer Dank gilt außerdem meinen Freunden, meinem Partner David und allen, die mich durch das Studium und diese Promotionszeit begleitet und gestützt haben – sei

es mit Gesprächen, Verständnis, Ablenkung oder einfach mit dem Wissen, dass ihr da seid.

Abschließend danke ich meinen Eltern von ganzem Herzen. Dafür, dass sie mir ermöglicht haben zu studieren, mich stets gefördert und ermutigt haben und mir von klein auf die Freude an Wissenschaft, Logik und Neugier mitgegeben haben. Eure Unterstützung war und ist, ein Geschenk, das ich zutiefst zu schätzen weiß.