

Aus der
Abteilung für Transfusionsmedizin, Zelltherapeutika und Hämostaseologie
des Klinikums der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Andreas Humpe

**Vergleich und Charakterisierung zweier retroviraler
KMT2A::MLLT1-Konstrukte mit und ohne intronischer
Sequenz im Translokationsbereich**



Dissertation
Zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Nina Vanessa Pirschtat
aus Oberhausen

2024

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Michael Spannagl
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Tobias Herold PD Dr. Felix Lichtenegger
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	PD Dr. Christian Wichmann Dr. Linping Chen-Wichmann
Dekan:	Prof. Dr. med. Thomas Gudermann
Tag der mündlichen Prüfung:	14.11.2024

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Zusammenfassung	III
1 Einleitung	1
1.1 Physiologische Hämatopoese im Menschen	1
1.2 Von DNA zu Protein: Die Proteinbiosynthese des Menschen	2
1.2.1 Transkription und Termination	3
1.2.2 Prozessierung der hnRNA	4
1.2.3 Spleißen in malignen Erkrankungen	8
1.3 Neoplastische Erkrankungen des hämatopoietischen Systems	9
1.3.1 Was ist Leukämie?	9
1.4 Das KMT2A::MLLT1 Fusionsprotein	10
1.4.1 KMT2A als universeller Fusionspartner in Leukämien	11
1.4.2 MLLT1 als Fusionspartner	14
2 Zielsetzung	16
3 Material und Methoden	17
3.1 Material	17
3.1.1 Zellen	17
293T Zellen	17
Humane CD34+ Blutprogenitorzellen	17
3.1.2 Untersuchungskonstrukt	17
3.2 Geräte	18
3.3 Reagenzien und Medien	19
3.4 Verbrauchsmaterial	22
3.5 Software:	23
3.6 Methoden	24
3.6.1 293T-Zellkulturpflege	24
3.6.2 Transfektion für die Herstellung retroviraler Partikel	24
3.6.3 Zellkulturpflege humaner CD34+ Zellen	25
3.6.4 γ -retrovirale Transduktion	25
3.6.5 Durchflusszytometrie (FACS)	26
3.6.6 DRAQ5 Färbung (Zellzyklus)	26
3.6.7 FACS-Messungen von antikörpermarkierten Zellen	26
3.6.8 Methylzelluloseassay	27

3.6.9	Cytopins.....	27
3.7	Molekularbiologische Methoden	27
3.7.1	Western Blot.....	27
4	Ergebnisse.....	30
4.1	Direkter und indirekter Nachweis eines KMT2A::MLLT1-Fusionsproteins durch Western Blot und Fluoreszenzmikroskopie.....	30
4.2	Nachweis der Funktionalität des Konstruktes mit intronischer Sequenz in humanen CD34+Progenitorzellen	38
4.3	Nachweis der Abhängigkeit der leukämogen Eigenschaften des KMT2A::MLLT1 Konstruktes mit intronischer Sequenz von der Möglichkeit zu Spleißens	40
4.4	Vergleich der Konstrukte KMT2A::MLLT1 mit und ohne intronischer Sequenz im Bezug auf hCD34+-Zellexpansion	44
4.5	Vergleich der Konstrukte KMT2A::MLLT1 mit intronischer Sequenz und KMT2A::MLLT1 ohne intronische Sequenz in Bezug auf Zelldifferenzierung humaner CD34+ Zellen in Langzeitkulturen.....	46
5	Diskussion	49
5.1	Nachweis eines KMT2A::MLLT1-Fusionsproteins einer Translokation mit intronischer Sequenz im Bereich der Genfusion in Western Blot und Mikroskopie.....	49
5.2	Funktionalität des Konstruktes mit intronischer Sequenz humanen Progenitorzellen (CD34+) durch FACS-Messung.....	49
5.3	Entfaltung der leukämogen Wirkung des Konstruktes mit intronischer Sequenz durch Spleißen	50
5.4	Vergleich der Konstrukte KMT2A::MLLT1 mit und ohne intronischer Sequenz in Bezug auf die Expansion hCD34+-Blutvorläuferzellen.....	51
5.5	Vergleich der Konstrukte KMT2A::MLLT1 mit und ohne intronische Sequenz im Bereich der Genfusion im Bezug auf Zelldifferenzierung	52
6	Schlussfolgerungen.....	54
7	Verzeichnisse	55
7.1	Literaturverzeichnis.....	55
7.2	Abbildungsverzeichnis.....	61
7.3	Tabellenverzeichnis.....	62
7.4	Abkürzungsverzeichnis.....	63
8	Danksagung.....	66
9	Eidesstattliche Versicherung	67
10	Veröffentlichungen.....	68

• This work is licensed under CC BY 4.0. <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Zusammenfassung

Vielfältige genetische Mutationen können an der Entstehung und Entwicklung einer Leukämie beteiligt sein. Bei Translokationen können die Bruchpunkte unter anderem im proteincodierenden Exon oder aber im Intron liegen. Hier wurde eine KMT2A::MLLT1 Translokation, deren Bruchpunkte im nicht proteincodierenden Intron liegen mit einer Abwandlung dieser verglichen, deren Bruchpunkte ein gemeinsames Exon bilden. Es konnte gezeigt werden, dass der physiologischen Mechanismus des Spleißens zu der Bildung eines leukämogenen Fusionsproteins bei einer intronischen Lage des Bruchpunktes führt. Unterschiede in Bezug auf die Expansionsgeschwindigkeit der transduzierten humanen CD34+ Zellen oder Zellmorphologie zwischen dieser intronischen KMT2A::MLLT1 Translokation und einer exonischen KMT2A::MLLT1 Translokation, konnten nicht gezeigt werden.

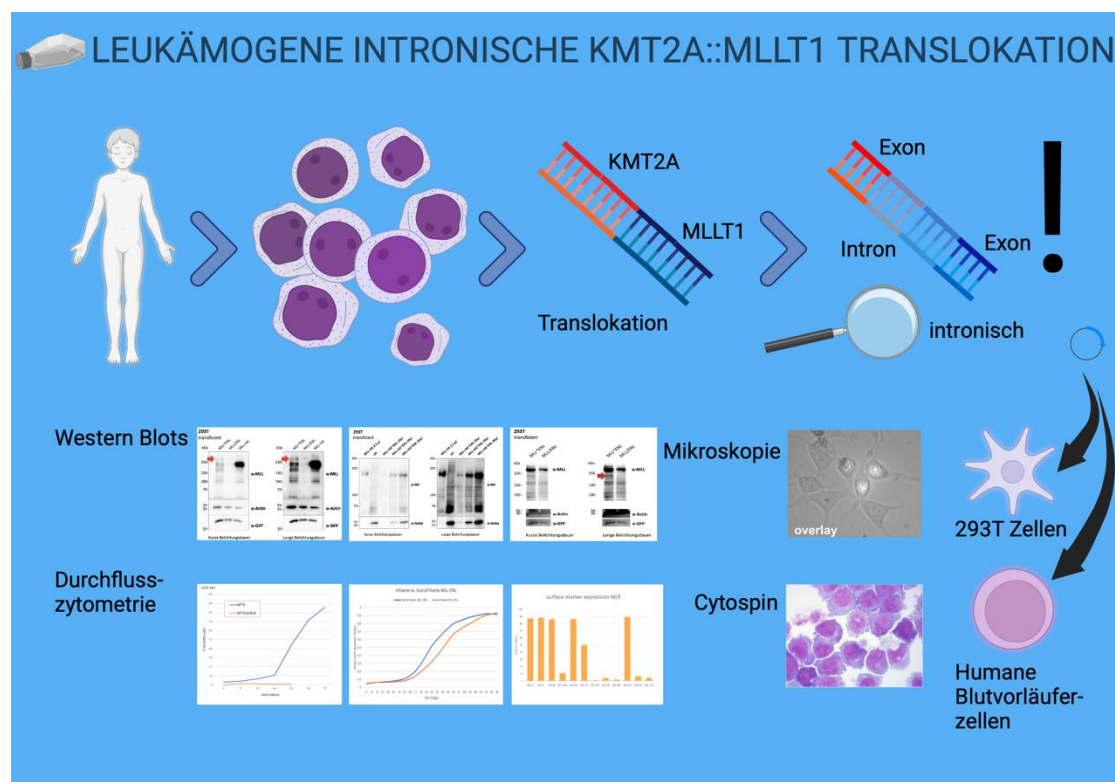


Abbildung I.1 Graphische Darstellung der Arbeit. Die Translokationsregion einer KMT2A-Patientenprobe wurde genauer untersucht. Die Bruchpunkte dieser KMT2A::MLLT1 Translokation sind intronisch. Die Mutation wurde in den folgenden Versuchen in 293T-beziehungswise humane Blutprogenitorzellen eingebracht. In 293T-Zellen wurde der KMT2A::MLLT1 Fusionsproteinnachweis einer intronischen Translokation mittels Western Blot und Fluoreszenzmikroskopie erbracht. In humanen Blutvorläuferzellen wurde die Funktionalität der intonischen KMT2A::MLLT1 Translokation mit der einer exonischen Variante verglichen. Dazu wurden Durchflusszytometrie und Cytospin genutzt.

1 Einleitung

Das Themenfeld Leukämie ist weit und so ist es zu Beginn sinnvoll, einen grundlegenden Überblick zu gewinnen. Wie funktioniert die Blutzellbildung physiologisch? Wie beeinflusst die Erbinformation einer Zelle ihren Zellstoffwechsel? Und was ist Leukämie?

1.1 Physiologische Hämatopoese im Menschen

Unser Blut ist von einem ständigen Zellumsatz geprägt. Dabei ist die Lebensdauer der verschiedenen Blutzelltypen sehr unterschiedlich. Am langlebigsten sind mit durchschnittlich 120 Tagen die Erythrozyten. Neutrophile Granulozyten sind hingegen eine äußerst kurzlebige Blutzellpopulation. Nach weniger als einem Tag im Blut treten sie in das Interstitium über und leben dort noch maximal zwei weitere Tage (1). Die Bildung der zellulären Blutbestandteile findet beim Erwachsenen physiologischer Weise im roten Knochenmark (*Medulla ossium rubra*) statt, welches sich in den platten Knochen wie beispielsweise *Scapula* und *Os ileum* befindet. Bei Embryonen und später Feten findet sich zudem hämatopoietisches Gewebe in Dottersack (Mesoblastische Phase), Leber und Milz (Hepatische Phase). Erst ab dem 5. Entwicklungsmonat beginnt mit der medullären Phase die Blutbildung im Knochenmark jeglicher Knochenformen (1). Dabei entstammen die verschiedenen Blutzelltypen einer gemeinsamen Stammzellpopulation. Ausgangspunkt sind multipotente hämatopoietische Stammzellen (HSC). Diese besitzen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und bringen durch asymmetrische Teilung pluripotente hämatopoietische Stammzellen hervor, während eine multipotente HSC zurückbleibt. Dabei werden die einzelnen Stamm- und auch Progenitorzellen von ihrer Umwelt beeinflusst. Verschiedene Zytokine wirken auf die Zellen ein. Auch ihre individuelle Sauerstoffversorgung, Zell-Matrix- und Zell-Zellkontakte haben Auswirkung auf die Zelle. Die pluripotente HSC kann sich je nach äußerem Einfluss zu einer Vorläuferzelle (Progenitorzellen) der myeloischen oder der lymphatischen Reihe entwickeln. Aus diesen oligopotenten reihenspezifischen Progenitorzellen gehen in der myeloischen Reihe zelltypspezifische Vorläuferzellen, sogenannte *Colony forming Units* (CFU) hervor. In der lymphatischen Reihe folgt auf die spezifischen Progenitorzellen eine Auftrennung in B- und T-Vorläuferzellen. Die multipotente HSC ist nur wenig mitotisch aktiv. Die ihr folgenden Zellformen bis zu den

oligopotenten Progenitorzellen beziehungsweise CFU sind hingegen mitotisch hochaktiv (1). Die sich daraus entwickelnden Zellvorstufen (Progenitoren) durchlaufen nur noch bis zu vier Mitosen, sind also deutlich weniger mitotisch aktiv als ihre vorhergegangenen Entwicklungsstufen. Reife Zellen befinden sich in der Regel in der G0-Phase des Zellzykluses, sie führen also ohne Teilungsschritte zu durchlaufen bis zu ihrem Tod ihre zelltypspezifischen Aufgaben aus.

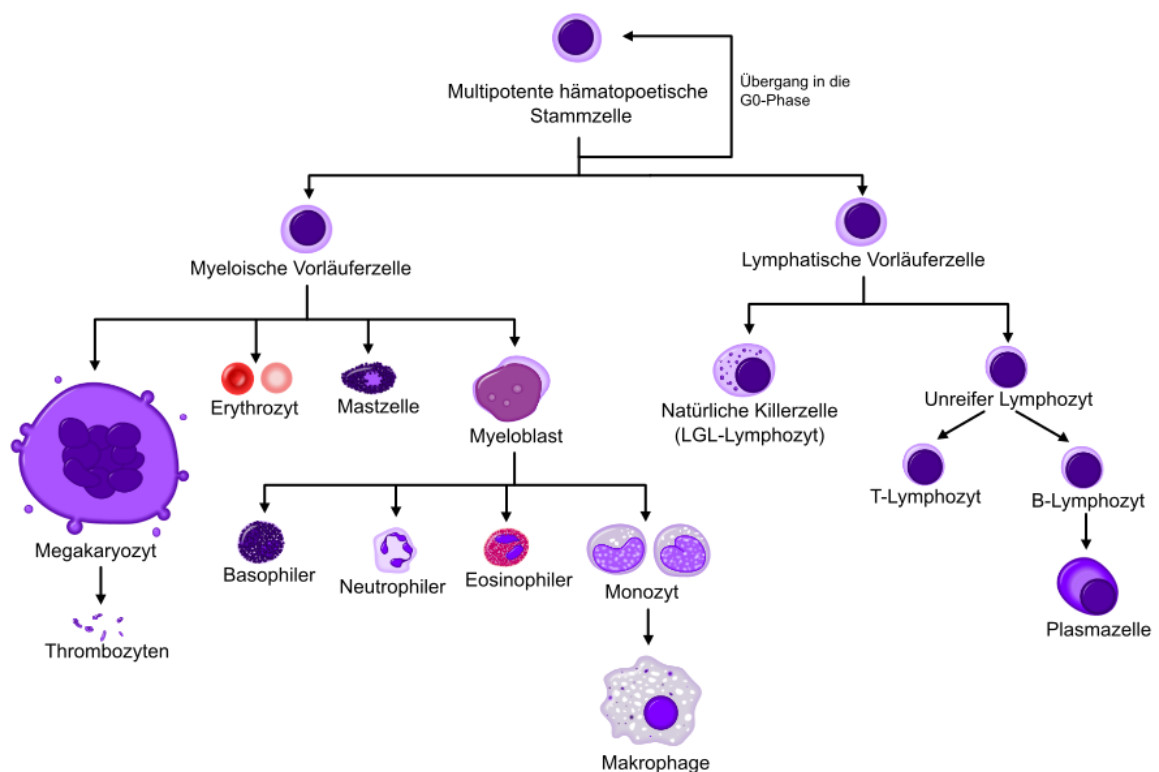


Abbildung 1.1 Schematische Darstellung der Hämatopoese im Menschen (2). Aus einer gemeinsamen Stammzelle leiten sich verschiedene Vorläuferzellen ab. Diese sind für ihre entsprechende Linie spezifisch und wiederum selbst teilungsaktiv. Die reifen Blutzellen sind physiologischer Weise nicht mehr teilungsaktiv und erfüllen jeweils verschiedene Aufgaben.

1.2 Von DNA zu Protein: Die Proteinbiosynthese des Menschen

Die gesamte Molekülinformation unserer Zellen ist, bis auf wenige Ausnahmen, in der DNA im Zellkern kodiert. Die genetische Information ist in Form eines quaternären Systems aus Basen gespeichert. Dabei bilden drei aufeinander folgende Basen eine

Informationseinheit. Diese wird im Zytoplasma in eine Aminosäure übersetzt. Die chromosomale DNA selbst kann den Zellkern nicht verlassen. Zur Informationsweitergabe innerhalb der Zelle dienen daher Abschriften, die sogenannten Messenger RNAs (mRNAs). Bevor mRNAs den Zellkern verlassen, werden sie jedoch noch auf verschiedene Weisen prozessiert. Sie werden gekürzt und gegen Abbau geschützt. Dennoch ist die zytosolische Halbwertszeit von mRNA gering und variiert zwischen zehn Minuten und zehn Stunden (3). Das Herstellen einer Abschrift der DNA, die Transkription, geschieht durch RNA-Polymerasen. Dabei führt die Transkription desselben DNA-Abschnittes jedoch nicht immer zu der Herstellung des gleichen Proteins. Eukaryotische Gene wie unsere menschlichen sind diskontinuierlich, also ein Mosaik aus Introns und Exons. In der Regel sind nur exonische Abschnitte in der fertigen mRNA enthalten. Intronische Sequenzen werden durch Spleißen entfernt. Der Spleißprozess ist reguliert und kann nach unterschiedlichen Mustern ablaufen. Alternatives Spleißen ist die Regel und erweitert unsere Proteindiversität. Die entstehenden Proteine sind verwandt, können jedoch unterschiedliche Eigenschaften aufweisen. Pro Strukturgen können häufig drei bis acht Isoformen gebildet werden (4)(5). So erweitert sich das Reaktionsspektrum der Zelle (6). Weiter wird die Aktivität verschiedener Gene auch durch epigenetische Faktoren beeinflusst, also durch „(...) mitotisch vererbaren Veränderungen in der Genexpression, die nicht in der DNA-Sequenz selbst codiert sind“ (7).

1.2.1 Transkription und Termination

Ziel der Transkription ist die Herstellung einer mRNA-Vorstufe, der heterogenen nukleären RNA (hnRNA). Katalysatoren dieser Reaktion sind die RNA-Polymerasen. Als Vorlage dient dabei die genomische DNA. Die DNA liegt in der Regel als Doppelstrang vor. Dabei wird der Strang, dem die spätere hnRNA entspricht, codierender Strang genannt. Der dazu komplementäre Matrizenstrang dient der RNA-Polymerase als Vorlage bei der Transkription. Auf diesem liegt eine Promotorsequenz, an welcher RNA-Polymerase-II-spezifische Transkriptionsfaktoren die Bindung der RNA-Polymerase II vermitteln. Der Komplex aus den verschiedenen Transkriptionsfaktoren und der RNA-Polymerase II wird Präinitiationskomplex genannt. Promotoren bestehen unter anderem aus der Sequenz TATAAA, naheliegend TATA-Box genannt. Sie liegt bei

etwa 25 Basen stromaufwärts, also an Position -25. Den Beginn der RNA markiert die Position Eins. Gelegentlich sind noch weitere Aktivatoren der Transkription wie zum Beispiel CAAT-Boxen (GGNCAATCT-Konsensussequenz) oder GC-Boxen bis zu 250 Basen stromaufwärts zu finden. An diese können konstitutiv aktivierende Transkriptionsfaktoren spezifisch binden. Fernab können auch distale Kontrollelemente wie *Enhancer* (Verstärker) oder *Silencer* (Dämpfer) die Transkription des Gens beeinflussen. An diese Kontrollelemente können Faktoren wie beispielsweise Produkte eines Stoffwechselweges binden und so die Expression des Gens fördern beziehungsweise hemmen. Sie bieten dadurch die Möglichkeit, die Ableseaktivität extern zu regulieren (3).

Die Transkription beginnt mit der Initiation. Dabei binden verschiedene RNA-Polymerase-II-spezifische Transkriptionsfaktoren die Promotorregion zur Bildung des Präinitiationskomplex zusammen mit der RNA-Polymerase II. Einer dieser Faktoren besitzt Helikaseaktivität und entwindet den DNA-Doppelstrang. Ein offener Initiationskomplex liegt vor. Enzymatisch katalysiert zerfällt die Bindung der Transkriptionsfaktoren an die RNA-Polymerase II und somit der gesamte Initiationskomplex. Dies gibt den Elongationsfaktoren die Möglichkeit, die RNA-Polymerase II zu binden. Damit beginnt die Elongation, der Vorgang der eigentlichen Abschrift. Während der Elongation bestehen über einen kurzen Abschnitt Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Matrizenstrang und wachsender hnRNA. Der Elongationskomplex löst sich bei Erreichen des Terminationssignals. Dabei handelt es sich um GC-reiche Haarnadelschleifen gefolgt von mehreren Uracilbasen am 3'Ende des neu synthetisierten RNA-Stranges. Nach der Termination ist der RNA-Strang bereit, den Matrizenstrang und den Transkriptionsapparat zu verlassen (8).

1.2.2 Prozessierung der hnRNA

Nach der Transkription wird der entstandene Abschnitt der hnRNA prozessiert. Eine Kopfgruppe aus methyliertem Guanin (*Cap*) schützt vor Abbau und initiiert später die Translation. Zum gleichen Zweck wird auch ein Polyadenylatschwanz angehängen. Die Prozessierung der zuerst transkribierten hnRNA-Abschnitte findet simultan zur Transkription der folgenden Abschnitte einer hnRNA statt (9). Auch das Spleißen gehört zur Prozessierung.

1.2.2.1 Spleißen

Der Vorgang des Spleißens beschreibt die Intronentfernung und anschließende Zusammenführung der Exons. Exons sind der für ein Protein codierende Anteil eines Gens. Dieser modulare Genaufbau bietet die Möglichkeit, unterschiedliche auf die Erfordernisse der Zelle angepasste Proteine zu bilden. Dazu können beispielsweise alternative Spleißstellen genutzt oder Exons übersprungen werden (10)(11). Das Überspringen von Exons ist eine häufige Form des alternativen Spleißens, die Retention von Introns hingegen ist selten (12). Durch alternatives Spleißen werden verschiedene Isoformen eines Proteins ermöglicht, das Genom aber trotzdem kompakt gehalten. Ein Beispiel ist das für die Funktion von Muskelzellen benötigte Titin (13). Abhängig vom Muskeltyp werden unterschiedlich elastische und lange Titinisoformen aus demselben Gen abgeleitet. So ist die Titinisoform der Herzkammern von Säugetieren durch Überspringen von Exons deutlich kürzer als die Isoform der Herzvorhöfe (14).

Der Komplex aus der zu spleißenden RNA und benötigten funktionellen Gruppen, wie beispielsweise Enzymen und Regulatoren, wird Spleißosom genannt (3). Vier aktive Spleißosomen eines hnRNA-Strangs bündeln sich zu einer makromolekularen Struktur im Zellkern, dem Supraspleißosom (15). Autokatalytisches Spleißen durch die hnRNA selbst und ohne die Beteiligung weiterer Faktoren ist für den Menschen nicht beschrieben (16).

Das Spleißosom an sich setzt sich aus verschiedenen proteingebundenen kleinen Kern-RNA (*small nuclear RNP*, kurz snRNP) und verschiedenen weiteren Proteinen (non-snRNP) zusammen (17). Darin gebunden ist die zu spleißende hnRNA. Die Spleißstellen sind durch eine hochkonservierte Basenabfolge in der hnRNA markiert. Das Intron trägt am Beginn seiner Sequenz in der Regel die Basen GU und endet auf den Basen AG. Nur in seltenen Fällen bei sogenannten *Minor Introns* weicht die begrenzende Sequenz ab. Diese sind von U2snRNA unabhängig und werden über U12snRNA erkannt. *Minor Introns* sind nur selten im Menschen zu finden. In der Regel kommen sie in Genen vor, die übergeordnete Informationen tragen, wie beispielsweise DNA-Reparatur oder Zytoskelettorganisation (18)(19). Die Spleißrate der *Minor Introns* ist im allgemeinen langsamer als die der häufiger anzutreffenden *Major Introns* (20).

Einleitung

Die Initiierung des Spleißens geschieht durch Proteininteraktion mit einer Domäne der RNA-Polymerase II (21). Die notwendigen snRNPs werden in den Kernsprenkel (Interchromatin Granule Cluster) bereitgehalten. Kernsprenkel sind häufig in der Nähe von aktiven Genen zu finden (22). Sobald das 5'-Ende des ersten Introns transkribiert wurde, bindet U1snRNP an die 5'-Spleißstelle. SnRNPs haben eine ringförmige Struktur, da sie durch die Bindung von Sm-Proteinen an einen innenliegenden offenen snRNA-Ring entstehen. Als nächstes bindet Spleißfaktor1 (SF1) an die Verzweigungsstelle (*Branchingside*). SF1 erfüllt dabei auch Aufgaben in der Transkriptionsregulation (23)(24). Des Weiteren bindet U2snRNP an den Polypyrimidintrakt der hnRNA, nachdem eine Untereinheit des Hilfsfaktors *U2-auxiliary-factors 65* (U2AF65), benannt nach seiner Masse in Kilodalton, vorab dort gebunden hat. Die 35 kDa Untereinheit des *U2-auxiliary-faktors* (U2AF35) bindet an das 3'-Ende des Introns. Bei sehr kurzen oder besonders langen Introns kann der Anlagerungsablauf der Spleißfaktoren abweichen (9). Die Verzweigungsstelle im Intron ist im Menschen nicht in dem Maße konserviert wie die 3'-und 5'-Spleißstellen. Sie folgt auf einen Polypyrimidintrakt und ist eine kurze Sequenz, am häufigsten mit einem Adenosin als Knotenpunkt, der entstehenden intronischen RNA-Schlaufe (Lariat) (25). Zu diesem Zeitpunkt wird der Protein-RNA-Komplex auch Prespleißosom oder Komplex A genannt. U4-, U5- und U6snRNP binden gemeinsam als Tri-snRNP an die hnRNA. Teil des U5snRNP ist das Protein PRPF8, das vor allem durch Protein-Protein-Interaktionen eine zentrale Rolle im Spleißosom einnimmt (26). Der Kern des Spleißvorganges sind zwei Umesterungen. Als Komplex B* Spleißosomübergangsform findet die erste der zwei Umesterungen statt. Damit diese Übergangsform erreicht werden kann, müssen U1- und U4snRNP das Spleißosom wieder verlassen. Durch einen nukleophilen Angriff der Verzweigungsstelle auf das Phosphatrückgrat des 5'-Spleißstellennukleotids wird die Kontinuität des hnRNA-Strangs unterbrochen. Das Exon bleibt an U5snRNP gebunden, während das Intronende mit seiner Verzweigungsstelle verbunden wird. Das Lariat ist entstanden. Die nun erreichte Spleißosomform wird als C Spleißosomübergangsform bezeichnet. Um die für die zweite Umesterung nötige C* Spleißosomübergangsform zu erreichen, finden unter anderem Konformationsänderungen statt. Bei der zweiten Umesterung kommt es zum nukleophilen Angriff auf das Phosphatrückgrat des 3'-Exons durch die 3'OH-Gruppe des 5'-Exons. Die hnRNA ist nun um ein Intron kürzer und die Kontinuität

Einleitung

der hnRNA ist wiederhergestellt. Das Lariat bleibt zunächst noch an den Post-Spleißkomplex (auch Komplex P genannt) gebunden. ATP-abhängig werden das Lariat und die neu verbundenen Exonabschnitte von den snRNPs gelöst. U2-, U5- und U6snRNP lösen sich schließlich und stehen wie die anderen UsnRNPs für erneute Spleißrunden wieder parat (9)(27).

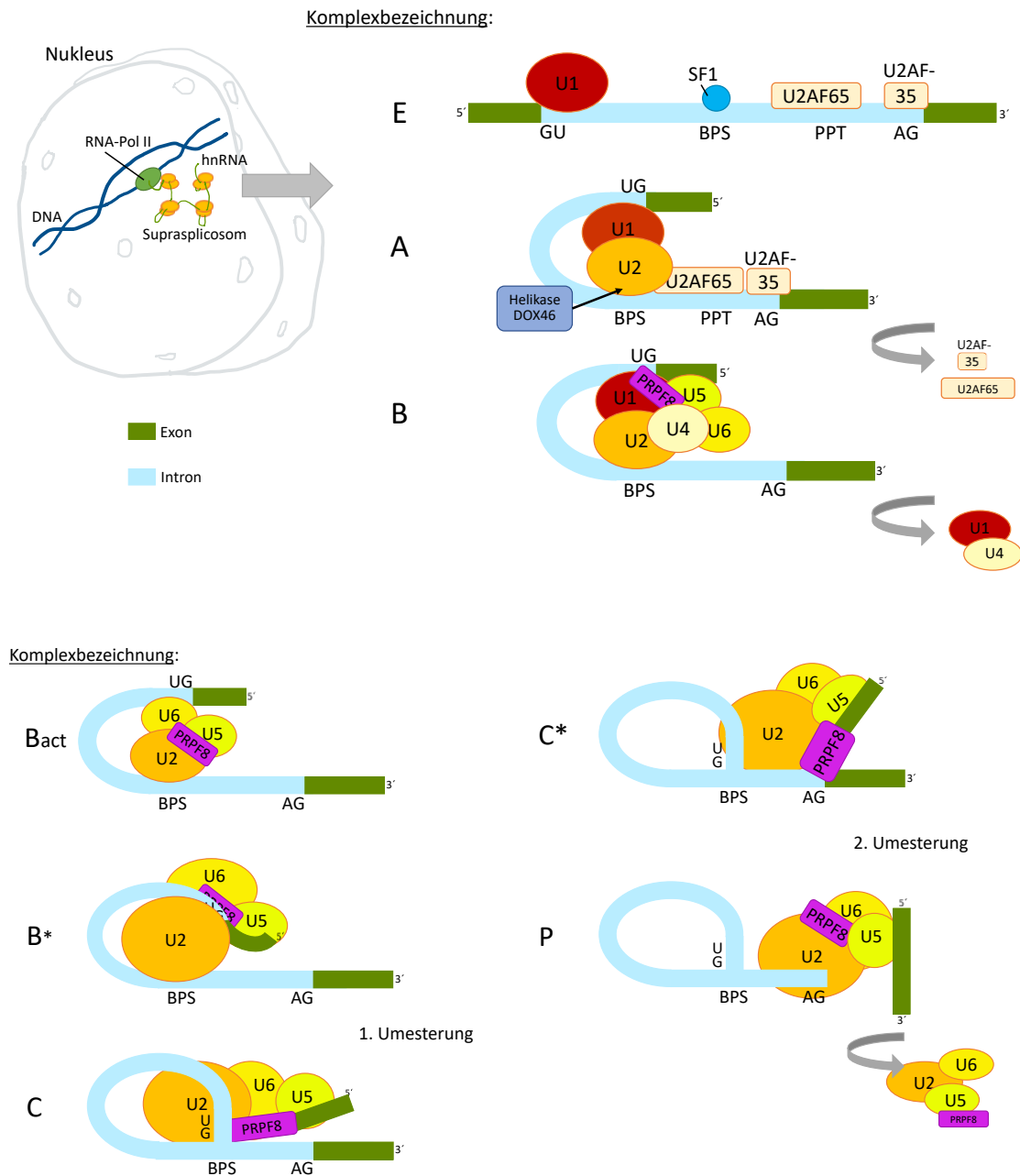


Abbildung 1.2 Schematische Darstellung des Spleißvorgangs eines Major Introns. Die Reihenfolge der gebildeten Komplexe ist E,A,B,Bact,B*,C,C* und P. (9)(26)(28) PRPF8 ist eine funktionelle Domäne von U5. Quelle: eigene Darstellung

1.2.2.2 RNA Editing

Wird die Basenabfolge eines Transkriptes ausgenommen des Spleißens noch weiter verändert, spricht man allgemein von *RNA-Editing*. Es umfasst sowohl die Deletion und Insertion von Basen als auch der Austausch einzelner Basen. Durch neue Stoppcodons oder die Codierung einer alternativen Base kann *RNA-Editing* deutliche Auswirkungen auf das Proteinprodukt haben (29).

1.2.2.3 Nonsense mediated mRNA Decay

Die Erstellung von fehlerhafter mRNA führt zur Belastung der Zelle durch die Produktion von unbrauchbaren Proteinen. Proteine, denen funktionelle Bereiche fehlen, können außerdem toxisch wirken. Um den Zellstoffwechsel effizient zu gestalten und die Zelle vor den Folgen von einigen DNA-Mutationen zu schützen, werden mRNA, die Fehlinformationen im Sinne vorzeitiger Stoppcodons enthalten, abgebaut. *Nonsense mediated mRNA Decay* (NMD) hat dabei Einfluss auf mRNA mit vorzeitigen Stoppcodons in exonischen Abschnitten. Anders als reguläre Stoppcodons sind vorzeitige Stoppcodons dabei stromaufwärts von zwei durch Spleißen verbundenen Exons lokalisiert (30). Vorzeitige Stoppcodons können von NMD-Regulierungsmechanismen erkannt werden. Diese sorgen für den Abbau der betreffenden mRNA nach dem ersten Translationsdurchlauf durch Abbau der Cap. NMD ist im Mausmodell vor allem bei hämatopoietischen Zellen von Bedeutung. In weniger teilungsaktiven Zellpopulation spielt NMD eine untergeordnete Rolle (31). Die Rolle des Nonsense mediated Decay ist jedoch noch nicht abschließend geklärt (32).

1.2.3 Spleißen in malignen Erkrankungen

In malignen Erkrankungen kann neben dem Zellzyklus und Zellstoffwechselwegen auch das Spleißen der hnRNA dysreguliert sein. In Tumorzellen können bis zu 30% mehr alternative Spleißvorgänge als in gesunden Zellen nachgewiesen werden. Das kann auch die Resistenz gegenüber Therapien beeinflussen (9)(33). Beispielsweise kann durch alternatives Spleißen bei Patienten mit AML eine Cytarabinresistenz durch Exprimierung einer veränderten Desoxycytidinkinase hervorgerufen werden (34).

1.3 Neoplastische Erkrankungen des hämatopoietischen Systems

1.3.1 Was ist Leukämie?

Leukämie ist der Oberbegriff für eine Gruppen von Erkrankungen, welche die Blutbildung betreffen. Das Wort leitet sich dabei aus den altgriechischen Wörtern für *weiß* (leukós) und *Blut* (haima) ab. Leukämien können sich entweder auf die myeloische Reihe oder aber die lymphatische Reihe beziehen. Nur selten gibt es akute Leukämieformen, die ihren Ursprung so früh in der Blutzellreifung haben, dass beide Linien betroffen sind. Diese Zellen zeigen dann Merkmale beider Zelllinien. Grob lassen sich myeloproliferative beziehungsweise myelodysplastische Erkrankungen und akute Leukämien unterscheiden (35). Im Folgenden wird sich auf akute Leukämien beschränkt.

Die Symptome akuter Leukämien sind vielschichtig und sind großteils durch die Verdrängung der physiologischen Hämatopoiese im Knochenmark gekennzeichnet. So können reife Blutzellen fehlen und dadurch zu Immunschwäche, Blutungsneigung und Anämie führen. Weiter gibt es eine Vielzahl anderer leukämietypischer Symptome, die bei jedem Patienten in unterschiedlicher Ausprägung auftreten können.

Verschiedene Eigenschaften von Leukämiezellen führen zu ihrer Malignität. Bei akuten Leukämieformen sind die typischen Zellen *Blasten*, die von einer Leukämienstammzelle abstammen und nicht zu funktionsfähigen Zellen ausreifen. Es liegt ein sogenannter Differenzierungsblock vor (36). Weiter zeichnen sich Leukämiezellen durch eine Verhinderung der Apoptose aus. Viele Eigenschaften also, die den klassischen Eigenschaften maligner Zellen entsprechen: Anhaltende Proliferation, Verhinderung des Zelltodes, phänotypische Plastizität, Umgehung eines immunvermittelten Abbaus und ungesteuerte beziehungsweise verlorene physiologische Funktion (37)(38).

Auch die begünstigenden Faktoren einer Leukämie sind vielfältig. Eine neoplastische Erkrankung ist in der Regel nicht auf eine einzige Veränderung des Erbgutes zurückzuführen, sondern auf eine Kombination verschiedener Ereignisse, die das Erbgut derselben Zelle verändern (39). Eine Neoplasie entwickelt sich *in vivo* also nicht einheitlich, es ist vielmehr ein mehrstufiger Prozess (40). Oft über Jahre hinweg sammeln sich verschiedene Mutationen im Erbgut einer Zelle. Bei einer Kombination von Mutationen verschiedener regulatorischer Genabschnitte kann eine Metaplasie in

eine Neoplasie übergehen (41). Dabei ist die Transformationskraft von Onkogenen unterschiedlich. *In Vitro* wurden wenige Fusionsgene nachgewiesen, die bereits durch *eine* Änderung der genetischen Information zu einer Expansion von Blutzellpopulationen führen können. Dies wird auch als *Single-hit* Expansionseigenschaft bezeichnet. Diese Fusionsgene sind besonders in der Forschung relevant, da sie mit wenig Aufwand zur Vermehrung von Zellkolonien genutzt werden können. *In vivo* bedarf es jedoch auch bei diesen Fusionsgenen häufig weiterer Genabberationen, um eine Leukämie auszulösen (42).

KMT2A::MLLT3	Barabe et al., 2007
KMT2A::MLLT1	Wei et al., 2008
KMT2A::AFF1	Montes et al., 2011
RUNX1::RUNX1T1	Mulloy et al., 2002
NUP98::HOXA9	Chung et al., 2006

Tabelle 1.1 Beispiele von Fusionsgenen mit *Single-hit* Expansionseigenschaft und die zugrundeliegende Literatur. Diese können unter Laborbedingungen bereits alleinig zu einer Vermehrung von Blutstammzellen führen (42)(43). Quelle: eigene Darstellung

Dabei sind auch die leukämischen Zellen eines Individuums auf DNA-Ebene eine heterogene Gruppe mit unterschiedlichen genetischen Informationen. Deutlich wird dies zum Beispiel bei therapierefraktären Verläufen. Diese können durch therapiebedingte Selektion einzelner Leukämiesubpopulationen hervorgerufen werden (44).

1.4 Das KMT2A::MLLT1 Fusionsprotein

KMT2A-Translokation sind die häufigsten Translokationen in akuten Leukämien, vor allem im Säuglingsalter (45). So zeigen zum Beispiel bis zu 80% der Fälle von Leukämien bei Kindern unter einem Jahr KMT2A-Translokationen (46). MLLT1 ist dabei ein wiederkehrender Partner und in etwa 10-24% der Leukämiefälle mit KMT2A-Rearrangements beteiligt (45)(47)(48). KMT2A steht für Histon-Lysin-N-Methyltransferase 2A. Eine frühere Bezeichnung dieses Genes war MLL (*Mixed Lineage Leukemia*), denn Leukämiezellen, die Veränderungen dieses Genes tragen, können Merkmale verschiedener Blutzelllinien exprimieren. Auch die Translokation KMT2A::MLLT1 kann zu morphologisch unterschiedlichen Leukämieformen führen,

typisch sind beispielsweise pro-B-Zell-ALL, selten aber auch T-Zell-ALL und AML (45)(48). Betroffen sind also Vorläuferzellen verschiedener Zellreihen der Hämatopoiese. KMT2A-Fusionen fördern die Expression bereits aktivierter Gene mit unmethylierten CpG-Inseln oder zwei- bis dreifach methylierten Lysin26 an HistonH3. Für den Phänotyp ist daher die Ausgangszelle und die Lage des Bruchpunktes möglicherweise entscheidender als der Fusionspartner des KMT2A (48)(49). Dabei variieren KMT2A::MLLT1 Fusionskonstrukte verschiedener Erkrankter in der Höhe des Bruch- und Fusionspunktes im Gen. Therapieassoziierte Leukämien nach einer Behandlung mit Topoisomerase II-Inhibitoren sowie Leukämien bei Säuglingen (Kinder unter einem Jahr) entstehen bevorzugt an Bruchstellen in der 3'-Hälfte der KMT2A-*breakpoint cluster region* (KMT2A Exon 9 bis Intron 11), wohingegen der Bruchpunkt bei Kindern über einem Jahr und Erwachsenen häufiger in der 5'-Hälfte zu finden ist (46)(50). Bei KMT2A::MLLT1-Fusionen wurden auch „Spliced Fusions“ beschrieben. Bei diesen liegt der KMT2A-Bruchpunkt stromabwärts des 5'Endes, jedoch vor dem Terminationssignal und der MLLT1-Bruchpunkt stromaufwärts von Exon eins. So kommt es nicht zu reziproken Fusionsprodukten (48)(51)(52). Diese Konfiguration der Translokationspartner zueinander liegt bei der hier untersuchten Translokation jedoch nicht vor.

1.4.1 KMT2A als universeller Fusionspartner in Leukämien

KMT2A-Translokationen führen zu phänotypisch verschiedenen Leukämieformen. Durch die Translokation gehen dem Fusionskonstrukt einige funktionelle Domänen des KMT2A verloren. Ein Beispiel ist die SET-Domäne des KMT2A, die Fähigkeiten einer Methyltransferase besitzt (53). Andere hingegen sind Teil des Fusionskonstruktes und erfüllen essenzielle Funktionen in der Pathogenese akuter Leukämien.

Einleitung

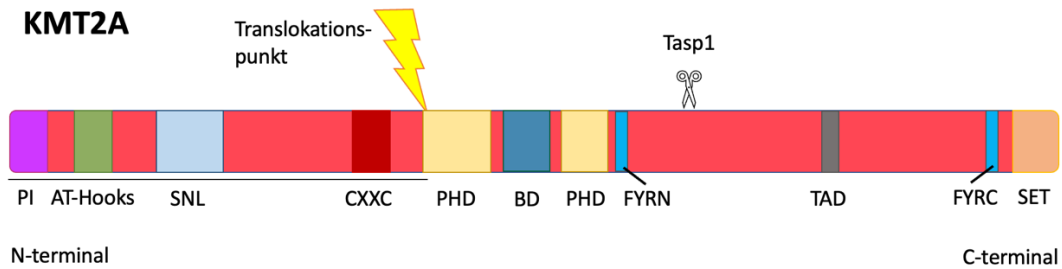


Abbildung 1.3 Funktionelle Abschnitte von KMT2A (51). PI (Protein Interaction-Domain): Hier können Menin und PSIP1 binden (hMBM und IBD); Der Unterstrich markiert den KMT2A-Anteil unseres Fusionskonstruktes. Quelle: eigene Darstellung

Im Weiteren wird sich auf das untersuchte Ausgangskonstrukt (*pMizi-MLL-ENL-i-EGFP*) bezogen. Andere KMT2A::MLLT1 Fusionen können gegebenenfalls in der Höhe der Fusion abweichen.

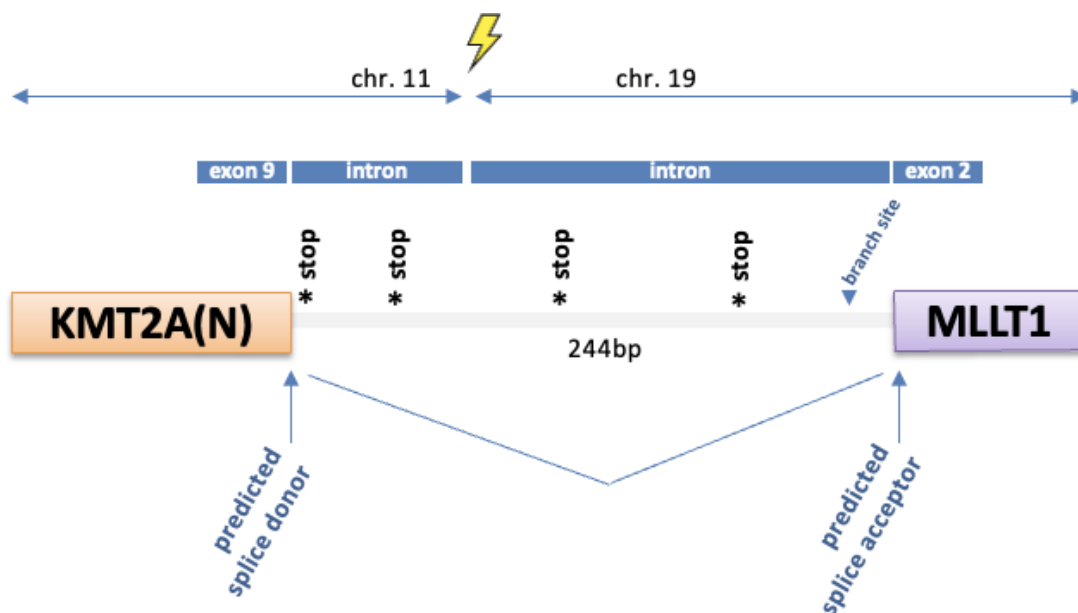


Abbildung 1.4 Fusionsbereich von *pMizi-MLL-ENL-i-GFP* (54) Der Bruchpunkt des n-terminalen KMT2A-Anteils liegt im Intron stromabwärts hinter Exon 9. Der Bruchpunkt des MLLT1-Anteils liegt ebenfalls in einem Intron. Darauf folgt das Exon 2 von MLLT1. Der intronische Bereich beinhaltet 4 Stoppcodons (*stop) und eine Verzweigungsstelle (branch side). Begrenzt wird der intronische Bereich durch mögliche Spleißdonor- beziehungsweise Spleißakzeptorstellen.

Einleitung

Die N-terminale Proteininteraktionsdomäne von KMT2A mit ihrem hochaffinen Meninbindemotiv (hMBM) und einer PSIP1-Bindedomäne (IBD) sorgt für die Aufrechterhaltung der Ableseaktivität an Genen des hämatopoietischen Stammzellprogramms (*HSC programm genes*) (53)(55)(49). Diese Interaktion ist sowohl wichtig für die physiologische Funktion des KMT2A, als auch für die leukämogene Eigenschaft von KMT2A-Fusionen (56). Insbesondere die posterioren HOX-Gene HOXA7,9 und 10 und Meis1 werden durch Menin und PSIP1 c-Myb-vermittelt während der G1 Phase des Zellzyklus vermehrt expremiert (57). Dadurch erhalten multipotente Progenitorzellen (MPP) ihr physiologische Fähigkeit zur Selbsterneuerung.

Auch Myeloische Progenitorzellen (*Common-Myeloid-Progenitor*, kurz CMP) und Granulozyten/ Makrophagen-Progenitorzellen (GMP) werden durch KMT2A-Fusionen zur Selbsterneuerung befähigt (49). In Zellen der myeloischen Reihe betrifft dies vor allem HOXA7 und HOXA9. In Zellen der lymphatischen Reihe werden vor allem HOXA9 und HOXA10 in der Expression gefördert (51)(49). Die Interaktion mit Menin ist Voraussetzung für die Bindung des *PC4 And SFRS1 Interacting Protein 1* (PSIP1) an die Integrase-Bindedomäne (IBD) des KMT2A. PSIP1 trägt ein PWWP-Motiv, das im Zellkern an Nukleosomen mit zwei- oder dreifach methylenisiertem Lysin36 in HistonH3 (H3K36me 2/3) binden kann (58). PWWP-Motive sind häufig Bestandteil von Transkriptionsfaktoren, welche die Entwicklung regulieren (59). Ein Fehlen sowohl Menins als auch PSIP1 macht eine leukämische Transformation unmöglich, da keine PWWP-vermittelte Interaktion stattfinden kann (60). Für die leukämogene Transformation ist weiter die CXXC-Domäne des KMT2A von Bedeutung. Sie vermittelt die Bindung an nichtmethylierte CpG-reiche DNA-Abschnitte in HOXA9 und schützt diese vor Methylierung. So fördert CXXC-Domäne in KMT2A die Exprimierung von HOXA9. Dies ist entscheidend sowohl für die immortalisierende Fähigkeit von KMT2A-Fusionen als auch für die Leukämogenese (61). Eine weitere Domäne des Fusionsproteins von *pMizi-MLL-ENL-i-EGFP* sind AT-Hooks am N-terminalen Ende von KMT2A. AT-Hooks stellen ein Peptid-DNA-Bindemotiv dar. Sie sind in verschiedenen Genen zu finden, also für verschiedene Molekülinteraktionen von Bedeutung (62). Im Kern dieses Motives findet sich häufig eine Abfolge von Glycin, Arginin und Prolin(63). Dieser Kern bindet AT-reiche Regionen in der kleinen Furche der DNA-Helix (64). AT-Hooks sind häufig mit anderen DNA-bindenden oder funktionellen Domänen assoziiert

und unterstützen so deren jeweilige Funktion (65)(66). Häufig sind das Proteine, die die Chromatinstruktur regulieren oder Histone modifizieren (67). Sie vermitteln zum Beispiel physiologischerweise einen Zellzyklusarrest und eine monozytäre Differenzierung mit Expression von CD11b und CD14 (68). Außerdem unterstützen sie eine Hochregulation von den Tumorsuppressoren CDK-Inhibitor 1 (auch p21) und CDK-Inhibitor 1B (auch p27) (68). Für diese Wirkung wird jedoch die Interaktion mit weiteren Domänen benötigt. Beispielhaft ist die SET-Domäne zu nennen, die C-terminal auf KMT2A liegt und in dem betrachteten Konstrukt wie zuvor beschrieben durch die Translokation fehlt. Daher kommt die tumorsuppremierende Wirkung der AT-Hooks auf KMT2A im untersuchten Modell nicht zum Tragen.

1.4.2 MLLT1 als Fusionspartner

MLLT1 ist ein Sensor für die Histonmodifikation und beteiligt an der Elongationserhaltung während der Transkription (36)(66). MLLT1 ist essenziell für die globale HistonH3 Lysin79 (H3K79) Dimethylierung. Eine H3K79-Dimethylierung ist typischerweise an aktiven Promotorsequenzen zu finden (69). Physiologisch führt MLLT1 zu der Bildung eines AFF1-Multiproteinkomplexes. Auch KMT2A::MLLT1-Fusionen führen in der Regel zur Bildung des physiologischen AFF1-Multiproteinkomplexes mit verschiedenen Anteilen, die durch MLLT1 verbunden sind (70). Diese Anteile sind zum einem der DOT1L-Komplex, bestehend aus der Histon-3-Methyltransferase DOT1L, MLLT10 und MLLT1 und zum anderen das AEP-Komplex-Dimer aus jeweils einem Mitglied der AFF1-Familie (AFF1, AFF2, AFF3 oder AFF4), MLLT1-Familie (MLLT1 oder MLLT3) und dem positiven Transkriptions-Elongations-Faktor b (P-TEFb)-Komplex. Anders als unter physiologischen Bedingungen besteht der P-TEFb-Komplex hier aus CyclinT2 und CDK9 (49). Physiologisch bilden sich jedoch nur 20% der P-TEFb-Komplexe aus CyclinT2a/b und CDK9, der Hauptteil setzt sich zusammen aus CyclinT1 und CDK9 (71). Die verschiedenen Formen von CyclinT unterscheiden sich an ihrem C-Terminus und vermitteln so die Bindung abweichender Proteine (71). Essenzieller funktioneller Bereich des MLLT1 ist dabei die ANC1 homologe Domäne (AHD). AHD vermittelt die Bindung zwischen MLLT1, AFF1 und DOT1L (49). Zum Teil wird ein eigenständiges Vorliegen der einzelnen Komplexe abhängig von der Gegebenheiten diskutiert (49). MLLT1 fördert so die

Einleitung

Aufrechterhaltung einer deregulierten Genexpression in KMT2A::MLLT1 vermittelten Leukämien.

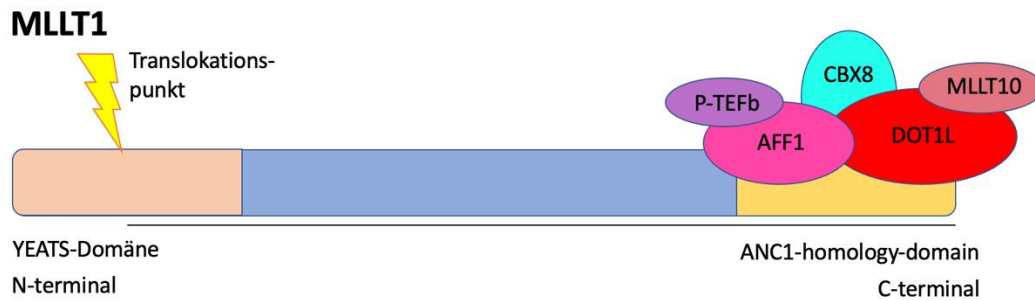


Abbildung 1.5 Funktionelle Abschnitte von MLLT1 mit wichtigen Bindungspartnern der ANC1-homologen-Domäne (ADH). Der Bruchpunkt des von uns untersuchten Konstruktes pMizi-MLL-ENL-i-GFP liegt innerhalb der YEATS-Domäne. Die c-terminale ANC1-homology-domain ist erhalten und kann mit verschiedenen Proteinen interagieren. Der Unterstrich markiert den Anteil von MLLT1, der in das KMT2A::MLLT1 Fusionskonstrukt einfließt (72)(73).
Quelle: eigene Darstellung

2 Zielsetzung

In der vorliegenden Promotionsarbeit wurde der leukämieinduzierende Mechanismus einer KMT2A::MLLT1-Translokation (*pMizi-MLL-ENL-i-EGFP*) mit intronischer Sequenz im Bereich der Genfusion in 293T-Zellen und an einem humanen CD34+ Blutvorläuferzellmodell untersucht. Weiter wurde verglichen, ob funktionelle oder morphologische Unterschiede zu einer Version bestehen, der dieser intronische Bereich fehlt und deren Bruchpunkte im exonischen Bereich liegen.

Es ist bekannt, dass die Bruchpunkte von KMT2A-Translokationen häufig in intronischen Bereichen liegen. Bislang wurde das Spleißen als notwendiger Schritt zur Fusionsproteinbildung jedoch nicht weiter beleuchtet. Weiter soll hier gezeigt werden, dass die Eigenschaften beider Fusionspartner elementar sind, um humane CD34+ Blutstamm- und Progenitorzellen *in vitro* zu vermehren und dass diese Expansionsfähigkeit abhängig ist von einem gemeinsamen Vorliegen im gleichen Protein. Über Fluoreszenzmikroskopie und molekularbiologische Verfahren soll die Bildung dieses KMT2A::MLLT1 Fusionsproduktes nachgewiesen werden. Zudem soll gezeigt werden, ob sich funktionelle Unterschiede zwischen KMT2A::MLLT1 mit und ohne intronischer Sequenz im Bereich der Genfusion ergeben. Die Ergebnisse können therapeutisch weitere Angriffspunkte in der Leukämiebehandlung bieten, ergänzend ihrer Nutzung in der Arbeit mit Zellkulturen.

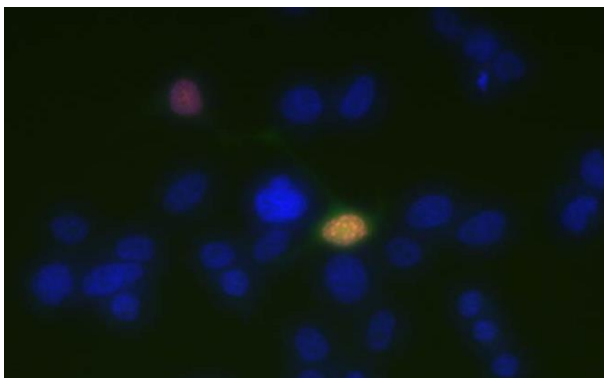


Abbildung 2.1: Auf den ersten Blick erkennbar: KMT2A::MLLT1-Fusionsprotein exprimierende Zellen können durch ihr Fluoreszenzverhalten detektiert werden. (Grünes Cytoplasma und roter Nukleus). Um die Bildung des Fusionsproteins zu ermöglichen, muss die in der Zelle enthaltene intronische KMT2A::MLLT1 Translokation gespleißt werden. Das Fusionsprotein trägt für diesen Nachweis ein zusätzliches rotfluoreszierendes Protein, welches nur nach erfolgtem Spleißen gebildet wird. Sie sind umgeben von 293T-Zellen ohne KMT2A::MLLT1 Translokation (Blaue Fluoreszenz).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Zellen

Die Zellkulturen wurden bei 37°C in einer Atmosphäre mit 5% CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert.

<i>Zellen</i>	<i>Herkunft</i>	<i>Anwendung</i>
293T	Humane embryonische Nierenzellen	Proteinexpression nach Transfektion, Produktion viraler Partikel
hCD34+	Apherese von Knochenmarkszellen gesunder Spender	Proteinexpression nach Transduktion, FACS

Tabelle 3.1. Verwendete Zellen. Für unterschiedliche Anwendungsgebiete wurden die jeweils geeigneten Zellen gewählt.

293T Zellen

293T-Zellen wurden über die *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)* erworben (Katalognummer: ACC 635). Sie wachsen adhärent in 25 cm² Cell Culture Flasks der Firma Greiner bio-one. Als Medium wurde DMEM -komplett verwendet. Dieses setzt sich aus 87% Dulbeccos Modified Eagles Medium (DMEM), 10% fetalem Kälberserum (FBS), 2% Glutamin und 1% Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml) zusammen.

Humane CD34+ Blutprogenitorzellen

Humane CD34 positive Blutprogenitorzellen (hCD34+ Zellen) sind primäre Suspensionszellen. Diese wurden über die Firma Lonza (Katalognummer: 2M-101) bezogen. Dabei handelt es sich um Knochenmarkszellen gesunder Spender. Die CD34+ Zellen wurden durch positive immunomagnetische Separation aus den mononukleären Knochenmarkszellen gewonnen und wiesen eine Reinheit von $\geq 90\%$ auf.

3.1.2 Untersuchungskonstrukt

Das verwendete Konstrukt *pMizi-MLL-ENL-i-EGFP* ist eine KMT2A::MLLT1 Translokation t(11;19)(q23;p13.3). Die jeweiligen Bruchpunkte sind: Intron 9 (KMT2A) und Intron 1 (MLLT1). Es wurde zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Rolf Marschalek, Goethe-Universität Frankfurt/Main.

3.2 Geräte

<i>Laborgerät</i>	<i>Hersteller, Artikelbezeichnung</i>
Durchflusszytometer	Becton Dickinson, FACSCalibur
Zentrifuge groß	Beckman Coulter, Avanti J-26 XP, JA-10
Zentrifuge medium	Heraeus, Megafuge 1.0R, 2704
Zentrifuge klein	Eppendorf, Centrifuge5424, FA-45-24-11
Zentrifuge Virusverarbeitung	Eppendorf, 5810 R
Zentrifuge Zellkultur	Eppendorf, 5804 R
Heizblock	EGT, MBT 250
Wasserbad	Julaba, MP-5
Taumelschüttler	GFL, 3012
Vortex	Scientific Industries, Vortex Genie 2
Thermocycler	Eppendorf, Mastercycler epgradient S
Inkubator Bakterien	New Brunswick Scientific, Innova 42
Inkubator Zellkultur	Eppendorf, Galaxy 170S
Transformator für DNA-Elektrophorese	Pharmacia, LKB GPS 200/400
Transformator für Proteinelektrophorese	BioRad, Power Pac 300
Elektrophoresekammer DNA	BioRad, Wide Mini C
Elektrophoresekammer Protein	BioRad, Mini-Protean Tetra System
Chemilumineszenz-/UV-System	Vilber, Lourmat Fusion SL
UV-Handlampe	Faust, 6.282 876
Mikroskop	Zeiss, Primo Vert
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Observer D1

Tabelle 3.2. Verwendete Geräte. Hersteller und Bezeichnung der für die Experimente nötigen Geräte.

3.3 Reagenzien und Medien

<i>Reagenz/ Medium</i>	<i>Hersteller, Artikelnummer</i>
DMEM	Gibco 41965-039
IMDM-Modified	GE SH 30228.01
FBS	Biochrom 50615
DPBS	Gibco 14190-094
Trypsin 0,25%	Gibco 25050-014
HBSS	Gibco 14025-050
PEN-STREP	Lonza DE 17-602E
L-Glutamin	Biochrom K0283
Annexin V Binding Buffer	BD 51-66121E
hSCF	PEPROTECH 300-07-10UG
hTPO	PEPROTECH 300-18-10UG
FLT-3-Ligand	PEPROTECH 300-19-10UG
hGM-CSF	PEPROTECH AF-300-03-20UG
hIL-3	PEPROTECH 200-03-10UG
hIL-6	PEPROTECH 200-06-20UG
Trypanblau	SIGMA T8154
Envelopeplasmid M620	Plasmidfactory PF 727-150623
Envelopeplasmid M634	Plasmidfactory PF 762-150422
DRAQ 5	Thermo Scientific 62254
Polyethylemin (PEI)	Sigma-Aldrich 9002-98
MethoCult	Stem Cell Technologies, H4434

Tabelle 3.3: Reagenzien und Inhaltsstoffe des humanen Stammzellmediums. Hersteller und genaue Bezeichnung für die Herstellung des verwendeten Stammzellmediums.

<i>Reagenz/ Medium</i>	<i>Hersteller, Artikelnummer</i>
PBS	Gilbco, 70011-036
Tween 20	Carl Roth, 9127.2
Wasser, doppelt destilliert	Carl Roth, 21364830001
SDS	Carl Roth, 2326.2
Glycin	Carl Roth, 3790.3
TRIS, basisch	Carl Roth, 5429.3
Acrylamid-Mix 30%	Carl Roth, 3029.2
TEMED	Carl Roth, 2367.3
Luminol-Wasserstoffperoxid-Set	Milipore, WBKLS0500
Milchpulver, fettarm	Carl Roth, T 145.2
TAE (x50)	Thermo Scientific B49
Agarose, molecular grade	Bioline, BIO-41025
LB-Medium (Lennox)	Carl Roth, X 964.2
LB-Agar (Lennox)	Carl Roth, 965.2
S.O.C. Medium	Invitrogen, 15544-034
Nucleospin, Gel und PCR-Aufreinigung	Macherey-Nagel, 740609.50
NucleoBond Maxi, DNA-Aufreinigung	Macherey-Nagel, 740424.10
Proteaseinhibitor-Cocktail	Sigma-Aldrich, 11 836 153 001
Zelllysatpuffer (10x)	Cell Signaling 9803S
Re-Blot Plus (10x)	Millipore, 2502

Tabelle 3.4. Reagenzien und Medien für die Molekularbiologie. Hersteller der verwendeten Substanzen mit genauer Bezeichnung.

<i>Western Blot Antikörper</i>	<i>Hersteller, Artikelnummer</i>
<i>Primär:</i>	
GFP	Roche 11514 460 001
Aktin	Santa Cruz SC-1616R
KMT2A	Cell Signaling 14689
HA	Biolegend 901501
<i>Sekundär:</i>	
Mouse	Santa Cruz SC-2005
Rabbit	Santa Cruz SC-2357

Tabelle 3.5. Primäre und sekundäre Antikörper verwendet für Western Blot. Primäre Antikörper binden das gesuchte Protein. Sekundäre Antikörper binden an den primären Antikörper und tragen ein Enzym zur Chemilumineszenz.

<i>FACS-Antikörper</i>	<i>Hersteller, Katalognummer</i>
CD3	Invitrogen 699538C
CD4	BD 345771
CD8	Invitrogen MHCD0805
CD11b	BD 550019
CD14	BD 561383
CD15	BD 551376
CD19	BD 555415
CD25	BD 560987
CD34	BD 555824
CD38	BD 345806
CD44	BD 560890
CD61	BD 56174

CD117	BD 550412
ISO-APC	BD 550931
ISO-PE	BD 555749
AnnexinV	BD 550474

Tabelle 3.6. Antikörper verwendet für die fluoreszenzaktivierte Zellanalyse (FACS). Hersteller und genaue Bezeichnung.

<i>Bakterienstamm</i>	<i>Hersteller, Katalognummer</i>
DH5 α -ME	Invitrogen 18258012
DH5 α -SE	Invitrogen 18265-017
One-Shot TOP10	Invitrogen C4040-03
XL10-Gold	Agilent Technologies 200314

Tabelle 3.7. Bakterienstämme für die Plasmidproduktion. Hersteller und genaue Bezeichnung.

3.4 Verbrauchsmaterial

<i>Material</i>	<i>Hersteller, Artikelnummer</i>
Tube, 50 ml (konischer Boden)	BD Falcon, 352070
Tube, 15 ml (konischer Boden)	Sarstedt AG, 8041711
Tube, 14ml (runder Boden)	BD Falcon, 352059
Epi-Tubes 1,5ml	Sarstedt AG, 72.690.001
Epi-Tube 2,0ml	Greiner bio-one, 623201
Epi-Tube 0,5ml	Brand, 781305
Zellkulturflasche 25 cm ²	Greiner bio-one, 690 175
Zellkulturflasche 75 cm ²	Greiner bio-one, 658 175

Zellkulturflasche 175 cm ²	Greiner bio-one, 660 175
Zellkulturplatte 24-Well	Greiner bio-one, 662 160
Zellkulturplatte 24-Well non-tissue-coated	BD Falcon, 351147
TC-Schale	Sarstedt AG, 83.3902
Spritze 10 ml	BD, 309110
Virusfilter	Millipore, SLGS033RS
Serologische Pipettenspitze 25 ml	Greiner bio-one, 760 107
Serologische Pipettenspitze 10 ml	BD Falcon, 357530
Serologische Pipettenspitze 5 ml	Greiner bio-one, 606 107
Filterpipettenspitzen 1000 µl	Sarstedt AG, 732 732
Filterpipettenspitzen 200 µl	Brand, 732732
Filterpipettenspitzen 100 µl	Eppendorf, 0030 077.547
Filterpipettenspitzen 20 µl	Eppendorf, 022491270
Filterpipettenspitzen 10 µl	Brand, 732724

Tabelle 3.8. Verbrauchsmaterial für Zellkultur und molekularbiologische Untersuchungen.
Hersteller und genaue Bezeichnung.

3.5 Software:

- Spleißstellenauffindung: Human Splice Finder (Version 3.1):
<http://www.umd.be/SSF/#>
- Speißstellenauffindung: Spliceator
<http://www.lbgi.fr/spliceator/>
- Eukaryotische Promoter Vorhersage:
https://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html
- Berechnung des Molekulargewichts (Protein Molecular Weight):
https://www.bioinformatics.org/sms/prot_mw.html
- DNA in Aminosäuresequenz
<https://web.expasy.org/translate/>

3.6 Methoden

3.6.1 293T-Zellkulturpflege

293T Zellen wurden alle zwei Tage unter einem Auflichtmikroskop auf Kontamination und Populationszustand hin untersucht. Dreimal pro Woche wurden die Zellkulturen auch *gesplittet*. Dazu wurde das verbrauchte Medium entfernt. Anschließend wurden die Zellen mit 3 ml 1xPBS vorsichtig gewaschen. 1xPBS wurde entfernt und 1 ml Trypsin wurde hinzugegeben. Nach einer Minute Inkubation im Brutschrank (37°C und 5% CO₂) wurden die Zellen durch leichtes Beklopfen der Flasche vom Boden gelöst. Zu der Zellsuspension wurde 1,5 ml frisches DMEM-komplett Medium gegeben. Durch Auf- und Abpipettieren wurde das Medium unter die Zellsuspension gemischt. Von dieser verdünnten Zellsuspension wurde ein Teil in eine frische Zellkulturflasche mit 6ml frischen DMEM-komplett Medium überführt. Unter der Woche wurden 500 µl (1:5) Zellsuspension überführt, an Freitagen 250 µl (1:3).

3.6.2 Transfektion für die Herstellung retroviraler Partikel

293T Zellen wurden mittels Polyethylenimin (PEI) transfiziert, eine für die Zellen schonende Methode. PEI ist ein positiv geladenes Polymer, welches mit DNA als Poly-anion Komplexe bilden kann. Diese werden durch Endozytose von den Zellen aufgenommen.

Für die Transfektion mittels PEI wurden 293T Zellen in 10 cm TC-Schalen ausplattiert. Pro Schale werden morgens zwischen $1,0$ und $2,4 \times 10^6$ Zellen benötigt. Am nächsten Tag wurden die Platten auf die Konfluenz der Zellen hin untersucht. Bei der Verwendung von PEI wurden entweder etwa 10 % Konfluenz (für mikroskopische Aufnahmen) oder 50 % Konfluenz (für Lysate und Virusproduktion) benötigt. Pro Platte wurden nun in einer sterilen Werkbank je zwei 15 ml Falcons mit konischem Boden bereitgestellt. In Falcon A wurden 586 µl DMEM-leer, das heißt ohne Zusätze pipettiert. Dazu wurden 15 µg des zu transfizierenden Plasmids gegeben. Gegebenenfalls werden zusätzlich noch 7,5 µg M624 und 2,5 µg M620 hinzugefügt, falls virale Partikel zur Transduktion von Humanzellen hergestellt werden sollten. Anschließend wurde die gesamte Lösung zehn Sekunden auf dem Vortexer gemischt. Falcon B wurde mit 1ml DMEM-leer befüllt. 70 µl Polyethylenimin (PEI) 20 mM wurden unter ständigem Mischen auf dem Vortexer tröpfchenweise zugefügt. Danach wurde

der Inhalt von Falcon B tröpfchenweise unter kontinuierlichem Mischen auf dem Vortexer in Falcon A gegeben. Im Anschluss wurde 20 Minuten bei RT inkubiert. Zu der Lösung wurde im Weiteren 5 ml DMEM-leer gegeben und kurz gemischt. Das verbrauchte Medium wurde von den 293T Zellkulturschalen entfernt und die angesetzten Lösungen wurden langsam auf die Platten gegeben (50 µl pro Sekunde). Nach vier Stunden Inkubation im Brutschrank wurde das Transfektionsmedium durch 10 ml DMEM-komplett ersetzt. Bei Transfektionen zur Virusproduktion wurden nur 4,5 ml DMEM-komplett zum Ersetzen des Transfektionsmediums verwendet.

3.6.3 Zellkulturpflege humaner CD34+ Zellen

Humane CD34+ Zellen wurden in oberflächenbehandelten 24-Well Cell Culture Plates der Firma Greiner bio-one kultiviert. Als Medium wurde ein Humanzellmedium verwendet, das sich wie folgt zusammensetzt: IMDM mit 20 % FBS, 2% Glutamin, 1% Penicillin/ Streptomycin und die Zytokine IL-3 10 ng/ml, IL-6 20 ng/ml, Flt3-L 20 ng/ml, EPO 6 U/ml, GM-CSF 20 ng/ml, SCF 20 ng/ml und TPO 20 ng/ml.

Humane CD34+ Zellen wurden täglich auf ihre Kulturdichte hin überprüft. Je nach Zustand wurden sie etwa dreimal pro Woche gesplittet. Die Gesamtmenge der Zellsuspension ist in der Regel 800-1000 µl pro Well. Zum Splitten werden unter der Woche 200-300 µl, vor dem Wochenende 400-500 µl aus der Zellkultur entnommen und durch die gleiche Menge frischen Humanzellmediums ersetzt.

3.6.4 γ -retrovirale Transduktion

Die Transduktion der hCD34+ Zellen wurde auf retronectinbeschichteten 24-well Platten durchgeführt. Diese wurden am Vortag vorbereitet: Pro benötigtem Well wurden 500 µl Retronektinlösung (RN) mit einer Konzentration von 50 µg/ml auf eine unbehandelte Zellkulturplatte gegeben. Die Platten inkubierten über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurde die Retronektinlösung aus den Platten entfernt und 1 ml Stopplösung (1x PBS mit 2% BSA) in die betreffenden Wells gegeben. Nun inkubierten die Platten 30 Minuten bei Raumtemperatur. Danach wurde die Stopplösung verworfen. Die behandelten Wells wurden kurz mit HBSS gespült und danach mit 1xPBS feucht gehalten. Zur Virusbeladung wurden 500 µl des virushaltigen Überstands von den transfizierten 293T-Platten (siehe Kapitel Transfektion) in die vorbereiteten Wells gegeben, nachdem 1xPBS entfernt wurde. Diese wurden anschließend 50

Minuten bei 10°C und 3700 rpm zentrifugiert. Das Medium wurde danach verworfen und der Schritt mindestens dreimal wiederholt. Nach dem Entfernen des virushaltigen Mediums wurden mindestens 500 µl Zellsuspension humaner CD 34 + Zellen in einer Verdünnung von $7,5 \times 10^5$ Zellen pro ml in die Wells überführt. Die Zellen inkubierten nun für acht Stunden im Brutschrank, danach wurde dieser Schritt wiederholt und die Zellen inkubierten über Nacht. Am Folgetag wurden zwei weitere Transduktionen durchgeführt.

3.6.5 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Oberflächenmerkmale der transduzierten hCD34+ Zellen wurden mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper in der Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting) bestimmt. Voraussetzung dafür war, dass die zu untersuchenden Zellen vereinzelt und in Suspension vorliegen. Das FACS-Messverfahren funktioniert laser-gestützt. Durch FACS-Messung können zum einen Aussagen zur Quantität des gebundenen Antikörpers und somit zu der Menge des Antigens getroffen werden. Zum anderen können abhängig von der Streuung des Lichtes Informationen zur Granularität des Zytoplasmas oder der Zellgröße gesammelt werden.

3.6.6 DRAQ5 Färbung (Zellzyklus)

Zur DRAQ5 Färbung wurden 500 µl Suspensionszellen (etwa 1×10^6) in frischem Medium in ein FACS-Röhrchen gefüllt. Nach der Zugabe von 1 µl DRAQ5 (5 mM) wurden die Zellen kurz auf dem Vortexer gemischt. Anschließend musste der Ansatz zehn Minuten bei 37 °C inkubieren, bevor er im FACS in den Kanälen FL-3-A versus FL-3-W gemessen wurde. Für valide Ergebnisse müssen etwa 25.000 Ereignisse (Zellen) untersucht werden.

3.6.7 FACS-Messungen von antikörpermarkierten Zellen

Für die Untersuchung von Zelloberflächenmolekülen mittels Antikörpern wurden 50 µl Zellsuspension in ein mit 3 ml gekühlten 1xPBS (5°C) vorgefülltes FACS-Röhrchen gegeben. Nach fünf Minuten Zentrifugation bei RT mit 1500 rpm wurde der Überstand dekantiert. Anschließend wurden 2 µl Antikörper dazugegeben und 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Dann wurden die Zellen wiederholt mit 3 ml kaltem 1xPBS gewaschen (fünf Minuten bei RT, 1500 rpm). Nach Verwurf des PBS-Überstandes konnte die FACS-Messung durchgeführt werden.

3.6.8 Methylzelluloseassay

Um die Zahl der koloniebildenden Zellen zu untersuchen, wurden jeweils 2500 Zellen, die das zu untersuchende Konstrukt tragen, in IMDM im 90% Methylcellulose (MethoCult) gelöst. Diesem wurde zusätzlich 20 ng/ml G-CSF und 20ng/ml GM-CSF zugesetzt. Die Zellen wurden in offenen Platten mit PBS für 14 Tage kultiviert. Danach wurde fluoreszenzmikroskopisch die Zahl der GFP-positiven Kolonien bestimmt. Als Kolonie wurden Gruppen größer 30 Zellen gewertet.

3.6.9 Cytospins

Diese Methode ermöglicht es, Zellen in Suspension durch Zentrifugation auf einen Objektträger aufzubringen. So können sie regulär gefärbt und mikroskopisch untersucht werden. Die gezeigten Cytospins entstanden in Kollaboration mit dem Labor für Leukämiediagnostik der Medizinischen Klinik III, LMU Klinikum München.

3.7 Molekularbiologische Methoden

3.7.1 Western Blot

Für den Nachweis von Proteinen wurde auch der Western Blot genutzt. Dazu wurde das Versuchsprotokoll zum Nachweis von Proteinen größer 200 kDa optimiert. Der Transfer erfolgte auf Grund der Größe des KMT2A::MLLT1-Fusionsproteins mit einer langen Laufzeit über Nacht. Beim Western Blot werden Proteingemische durch Gel-Elektrophorese anhand ihrer Größe aufgeteilt. Weitere Eigenschaften wie beispielsweise die Ladung der Proteine nehmen auch Einfluss auf die Auftrennung. Anschließend werden die Proteine auf eine Membran übertragen. So sind sie zugänglich für die gezielte Bindung durch spezifische Antikörper. An diese primären Antikörper können im Anschluss sekundäre Antikörper binden, an welche eine Peroxidase gekoppelt ist. Durch eine Chemilumineszenzreaktion können so die Proteinbanden dargestellt werden.

3.7.1.1 Probenvorbereitung

Die benötigten Zelllysate wurden auf Eis aufgetaut. Pro Probe wurden 40 µl Lysat und 13 µl 4xSDS Protein Sample Buffer in ein 1,5 ml Epi tube gefüllt. Anschließend wurden

die Proben mit dem Puffer vermischt und bei 95°C für fünf Minuten gekocht. Danach mussten sie für zehn Sekunden auf Eis abkühlen.

3.7.1.2 Vorbereitung des Elektrophoresetanks

Für Proteine größer 200 kDa empfiehlt sich die Verwendung von 6% SDS-PAGE Gelen. Ist das nachzuweisende Protein kleiner, sollte mindestens ein 8% Gel verwendet werden. Das Gel wurde in den Elektrophoresetank eingespannt. Der Tank wurde anschließend mit der benötigten Menge SDS-Laufpuffer gefüllt.

3.7.1.3 Auftragen der Proben

Gemäß Auftragschema wurden Proteinmaßstab und Proben aufgetragen. Ein Überlaufen von Proben in benachbarte Taschen gilt es grundsätzlich zu vermeiden.

3.7.1.4 Elektrophorese

Um zu ermöglichen, dass die gesamten Proben gleichmäßig in das Gel übertreten konnten, wurde zunächst für 30 Minuten eine Spannung von 60V angelegt. Danach wurde die Spannung für weitere zweieinhalb Stunden auf 100V erhöht.

3.7.1.5 Transfervorbereitung

Die Transferkassette wurde in einer ausreichend großen Schale zusammengesetzt. Dies geschah *unter Wasser*, das heißt, die Schale wurde etwa fünf Zentimeter hoch mit vorgekühlten Transferpuffer (mindestens vier Stunden bei -20°C) gefüllt. Anschließend wurde die Kassette in den Transfertank gesetzt und dieser mit dem vorgekühlten Transferpuffer gefüllt.

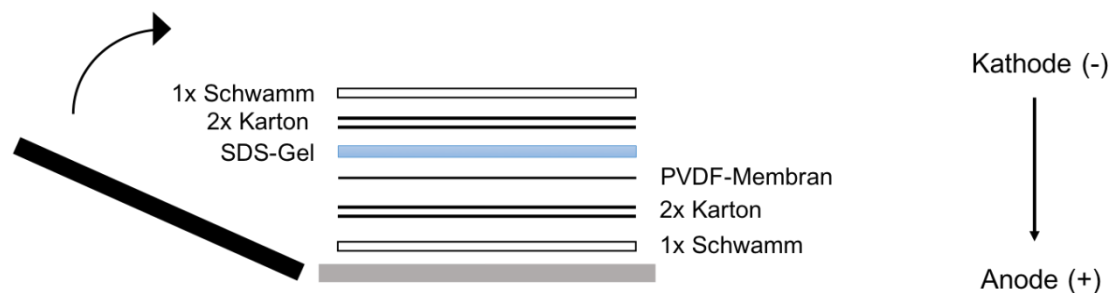


Abbildung 3.1. Aufbau der Transferkassette. Spätere Flussrichtung des elektrischen Stroms. Die Proteine sind durch den 4x SDS-Auftragspuffer ebenfalls negativ geladen und folgen der gleichen Laufrichtung.

3.7.1.6 Transfer

Der Transfer fand in einem Kühlschrank bei +4°C statt. Eine Stunde lang wurde eine Spannung von 35V, anschließend für 16,5 Stunden eine Spannung von 30V angelegt.

3.7.1.7 Primärer Antikörper

Nach einem kurzen Waschschrift in 1xPBS+T wurde die Membran in 4%igen MP-1xPBS+T für 20 Minuten blockiert. Anschließend wurde der primäre Antikörper in MP-1xPBS+T dazugegeben und für eine Stunde bei RT inkubiert.

3.7.1.8 Sekundärer Antikörper

Die Membran wurde nun dreimal kurz (zehn Sekunden) und dreimal lang (fünf Minuten) in 1xPBS+T gewaschen. Danach wurde der sekundäre Antikörper in MP-1xPBS+T zu der Membran gegeben und für 45 Minuten inkubiert.

3.7.1.9 Chemilumineszenz

Im letzten Schritt wurde die Membran dreimal kurz, dreimal lang (dieses Mal zehn Minuten) und siebenmal kurz in 1xPBS+T gewaschen. Im Anschluss wurde ein Luminol-Wasserstoffperoxid Gemisch auf die Membran gegeben und für drei Minuten inkubiert.

Nun konnten Aufnahmen gemacht werden. Dazu wurden verschiedene Belichtungszeiten angewandt.

3.7.1.10 Membranaufreinigung (*Stripping*)

Um eine Membran mit anderen primären Antikörpern zu färben, können die Antikörper eines ersten Färbedurchlaufes entfernt werden. Dazu wurde die Membran in 1xPBS-T gewaschen. Anschließend wurde die gewaschene Membran in 10ml 1x Stripping-Lösung (Re-blot Plus, 1:10 mit destilliertem Wasser) für 15 Minuten inkubiert. Es folgten vier kurze Waschschriffe (je drei Minuten) mit 1x PBS. Nun musste die Membran erneut mit 4% Milchpulverlösung blockiert werden. Anschließend konnte die Membran von einem neuen Primären Antikörper gebunden werden.

4 Ergebnisse

Um den Nachweis eines durch Spleißen entstandenen Fusionsproteins einer *intronischen* KMT2A::MLLT1 Translokation und dessen biologischer Funktionalität zu erbringen, müssen verschiedene Aspekte geprüft werden. Die Leukämogenität, sowie die Bedeutung des Spleißens für die untersuchte Gentranslokation KMT2A::MLLT1 t(11;19)(q23;p13.3) mit Translokation in einer intronischen Sequenz ließen sich sowohl durch molekularbiologische Methoden, als auch mit Hilfe zellbiologischer Experimente an humanen Zellen zeigen. Einerseits konnte im Western Blot die Bildung des KMT2A::MLLT1 Fusionsproteins und eines alternativ gespleißten kurzen KMT2A-Proteins gezeigt werden. Durch Klonierung eines grün fluoreszierenden Proteins (eGFP) in ein gemeinsames Leseraster mit MLLT1 (KMT2A::MLLT1-eGFP) konnte andererseits auch fluoreszenzmikroskopisch die Bildung des KMT2A::MLLT1 Fusionsproteins bewiesen werden. Die Funktionalität des Konstruktes und etwaige Unterschiede im Einfluss auf humane CD34+-Blutvorläuferzellen zwischen KMT2A::MLLT1 Gentranslokationen mit und ohne intronischer Sequenz im Translokationsbereich konnten in Langzeitkulturen dargestellt werden. Unterschiede in Bezug auf die Zellmorphologie wurden nach Cytospin und Zellfärbung mittels Mikroskopie untersucht.

4.1 Direkter und indirekter Nachweis eines KMT2A::MLLT1-Fusionsproteins durch Western Blot und Fluoreszenzmikroskopie

Nach erfolgreicher Transfektion adhärent wachsender 293T Zellen mit einem KMT2A::MLLT1 Konstrukt mit intronischer Sequenz sind erwartungsgemäß zwei Proteine nachzuweisen: Zum einen ein Volllängen-KMT2A::MLLT1 Fusionsprotein, zum anderen ein kurzer KMT2A-Anteil, der sich von dem KMT2A-Genfragment der Translokation ableiten lässt. Dieses kurze KMT2A wird dann gebildet, wenn es nicht zum regulären Spleißvorgang kommt (alternatives Spleißen). Die Stoppcodons im Bereich der sonst intronischen Sequenzen verhindern in diesem Fall die Bildung des MLLT1-Anteils und somit des vollen Fusionsproteins. Das volle Fusionsprodukt verfügt sowohl über den KMT2A- als auch den MLLT1-Anteil der Translokation.

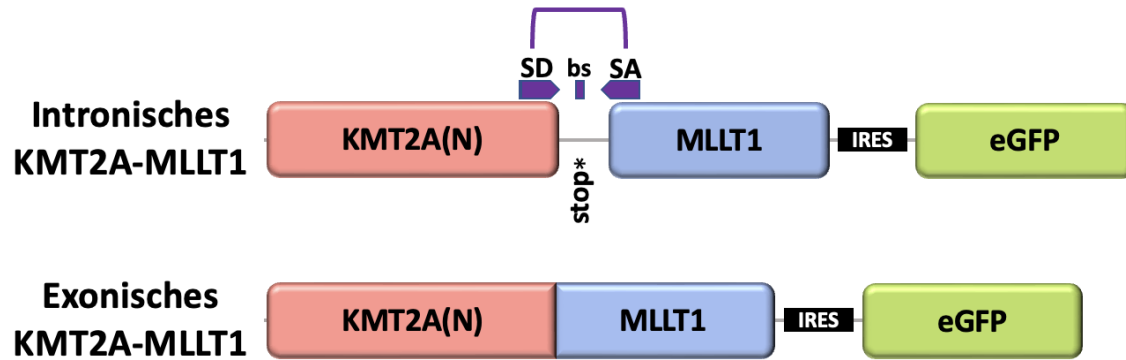


Abbildung 4.1. Für die Herleitung der Arbeitshypothese benötigte Grundkonstrukte KMT2A::MLLT1 mit und ohne intronischer Sequenz im Translokationsbereich. Der N-terminale KMT2A-Anteil der Translokation ist bei KMT2A::MLLT1 ohne Intronsequenz im Translokationsbereich in einem durchgehenden Leseraster mit dem MLLT1-Anteil verbunden. Bei KMT2A::MLLT1 mit Intronsequenz sind beide Translokationspartner KMT2A und MLLT1 durch einen intronischen Bereich mit Stoppcodons (stop*), Spleißstellen (SD und SA) und Verzweigungsstelle (bs) verbunden.

Ein KMT2A::MLLT1 Fusionsprotein mit oben genannten Bruchpunkten hat ein errechnetes Molekulargewicht von 213 kDA. Der Nachweis von KMT2A::MLLT1-Fusionproteinen ist grundsätzlich schwierig, da es sich um große Proteine handelt. Die Anpassung des Versuchsprotokolls war langwierig. Schließlich konnte bei herabgesetzter Spannung und 4°C Umgebungstemperatur ein Transfer über Nacht erreicht werden. Auch die Größenbestimmung im Western Blot mittels Proteinleiter ist von derart langen Proteinen aufwändig. Als Größenvergleich dient deshalb eine Probe mit KMT2A-HA (siehe Abbildung 4.3. Konstrukte zum Nachweis des Alternativen Spleißens mit Bildung eines kurzen KMT2A-Proteins. Einem KMT2A::MLLT1 Konstrukt mit intronischer Sequenz wurde ein kurzes Erkennungsmerkmal (HA-Anhang) hinzugefügt. Dieser HA-Anhang folgt direkt auf den KMT2A-Anteil. Er kann durch spezifische Antikörper gebunden und angefärbt werden. Er liegt in einem Bereich, der von einem Spleißdonor (SD) und -akzeptor (SA) begrenzt wird, also intronisch. Führt ein Spleißvorgang durch die Entfernung des Introns zwischen dem KMT2A- und MLLT1-Anteil zur Bildung des Fusionsproteins, fehlt diesem Fusionsprotein auch der im Intron liegende HA-Anhang. Um im Western Blot das kurze KMT2A als Referenz darstellen zu können, wurde einem weiteren Konstrukt ein HA-Anhang an den KMT2A-Anteil angehängen (KMT2A-HA). Diesem Konstrukt fehlt der MLLT1-Anteil. Beide Konstrukte tragen zur Kontrolle der Transfektionseffizienz ein eGFP, welches durch eine

Ergebnisse

Interne Ribosomale Eintrittsstelle (IRES) unabhängig von KMT2A gebildet werden kann.). Deutlich sichtbar ist der Laufstreckenunterschied zwischen den Banden einer Probe mit KMT2A::MLLT1 mit intronischer Sequenz im Translokationsbereich und einer Probe mit KMT2A-HA. Eine Proteinbande von KMT2A::MLLT1 mit intronischer Sequenz läuft deutlich höher als die Laufstreckenreferenzbande des KMT2A-HA.

Das physiologisch vorliegende KMT2A hat nach Teilung durch die Taspase 1 zwei verschieden große Teile. Das N-terminale KMT2A-N mit 320 kDa und das C-terminale KMT2A-C mit 180 kDa. Da beide Anteile der physiologischen Regulation der Zelle unterliegen, kommen sie in weitaus geringeren Mengen vor als die Produkte der transfizierten Plasmide (74). So sind sie für dieses Nachweisverfahren nebensächlich.

293T

transfiziert

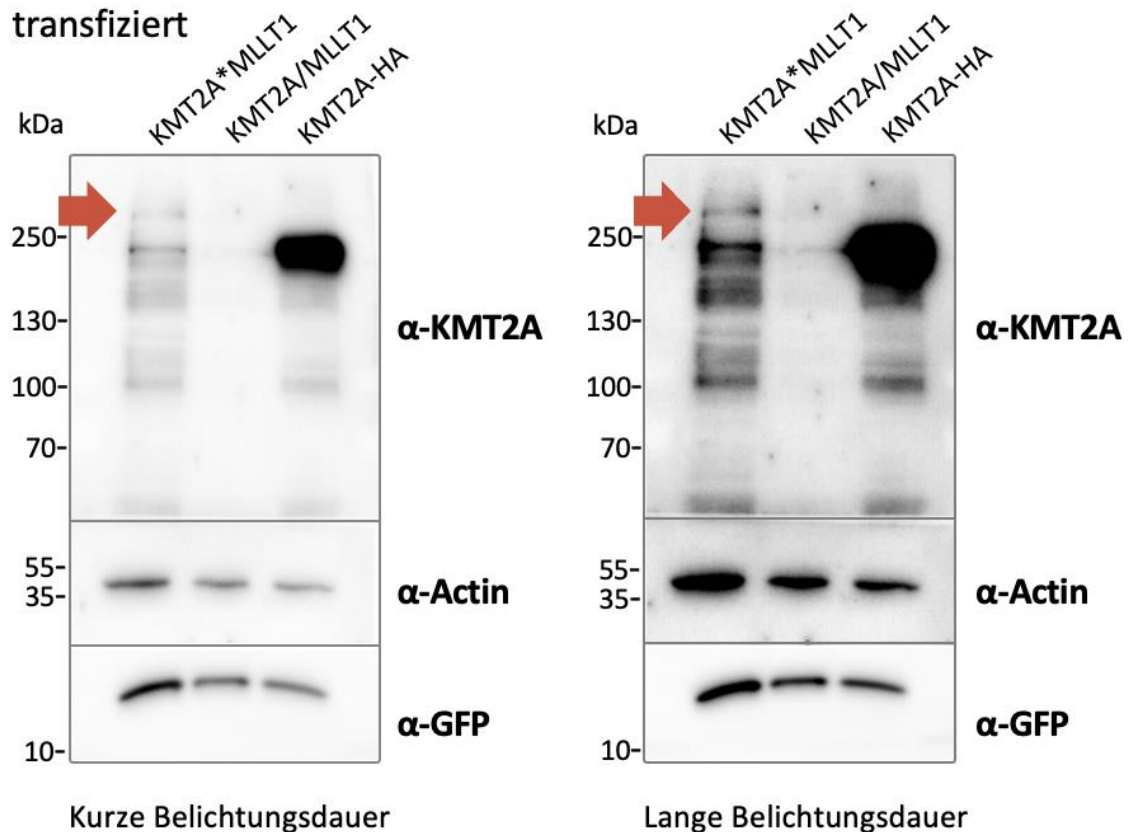


Abbildung 4.2. Nachweis des KMT2A::MLLT1 Fusionsproteins nach Transfektion von 293T Zellen mit dem KMT2A::MLLT1-Konstruktes mit intronischer Sequenz. Die Bande von KMT2A::MLLT1 mit intronischer Sequenz (KMT1A*MLLT1) läuft höher als die Bande von KMT2A-HA. Unterschiedliche Bandenhöhen sind primär Ausdruck unterschiedlicher Molekularmasse. Proteine mit geringer Masse stellen sich im Bild in einer tiefer laufenden Bande dar. Proteine mit großer Molekülmasse bilden höher laufende Banden. Bei der KMT2A::MLLT1 Probe ohne intronische Sequenz (KMT2A/MLLT1) konnten in diesem Western Blot keine KMT2A-Banden nachgewiesen werden.

In einer Verdünnungsreihe konnte die Bildung des kurzen KMT2A durch alternatives Spleißen nach Transfektion mit dem KMT2A::MLLT1 Konstrukt mit intronischer Sequenz gezeigt werden. Dabei wurden die 293T Zellen mit unterschiedlichen Mengen Plasmid bei ähnlicher Zelldichte transfiziert. Die Stoppcodons im Bereich der intronischen Sequenz der Translokationsstelle terminieren das KMT2A. Voraussetzung ist, dass zuvor kein Spleißvorgang an der hnRNA stattgefunden hat, durch den diese Stoppcodons entfernt werden. Die Bildung eines kurzen KMT2A neben einem Vollängen-KMT2A::MLLT1-Proteins ist also in Zellen mit KMT2A::MLLT1 Konstrukten mit intronischer Sequenz regelhaft nachweisbar. Da der HA-Anhang im Falle eines Spleißvorgangs entfernt wird, sind KMT2A::MLLT1 Fusionsproteine in diesem Anti-HA Western Blot nicht darstellbar. Durch die Markierung HA-tragender Banden konnte der Nachweis eines kurzen, durch alternatives Spleißen entstandenen KMT2A erbracht werden. Die fehlende Darstellbarkeit von Banden oberhalb des kurzen KMT2A ist außerdem ein Hinweis auf stattgehabtes Herausspleißen des Introns zwischen KMT2A- und MLLT1-Anteil.

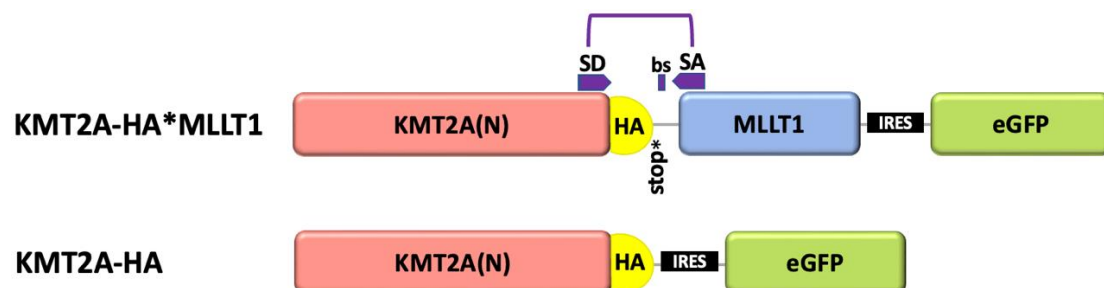


Abbildung 4.3. Konstrukte zum Nachweis des Alternativen Spleißens mit Bildung eines kurzen KMT2A-Proteins. Einem KMT2A::MLLT1 Konstrukt mit intronischer Sequenz wurde ein kurzes Erkennungsmerkmal (HA-Anhang) hinzugefügt. Dieser HA-Anhang folgt direkt auf den KMT2A-Anteil. Er kann durch spezifische Antikörper gebunden und angefärbt werden. Er liegt in einem Bereich, der von einem Spleißdonor (SD) und -akzeptor (SA) begrenzt wird, also intronisch. Führt ein Spleißvorgang durch die Entfernung des Introns zwischen dem KMT2A- und MLLT1-Anteil zur Bildung des Fusionsproteins, fehlt diesem Fusionsprotein auch der im Intron liegende HA-Anhang. Um im Western Blot das kurze KMT2A als Referenz darstellen zu können, wurde einem weiteren Konstrukt ein HA-Anhang an den KMT2A-Anteil angehängen (KMT2A-HA). Diesem Konstrukt fehlt der MLLT1-Anteil. Beide Konstrukte tragen zur Kontrolle der Transfektionseffizienz ein eGFP, welches durch eine Interne Ribosomale Eintrittsstelle (IRES) unabhängig von KMT2A gebildet werden kann.

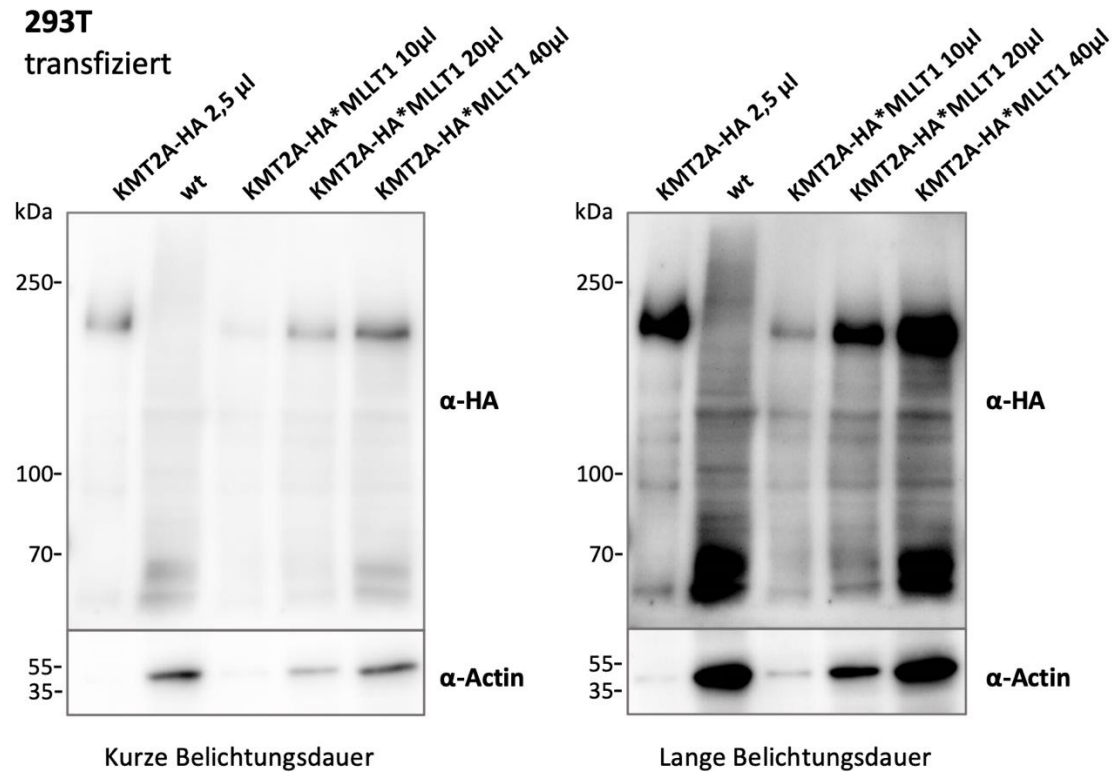


Abbildung 4.4 Nachweis des kurzen KMT2A-Proteins in einem 293T Zelllysat nach Transfektion mit KMT2A::MLLT1 mit intronischer Sequenz in einer Verdünnungsreihe. Die Bande des kurzen KMT2A läuft auf Höhe von KMT2A-HA. Zelllysat einer Wildtyp-Kontrolle (wt) trennt die Proben zur Verhinderung von Überlauf. Actin dient als Ladekontrolle.

Ein weiterer Western Blot stellt Lysate von 293T Zellen einander gegenüber, die entweder mit KMT2A::MLLT1 mit intronischer Sequenz oder mit KMT2A::MLLT1 ohne intronischer Sequenz transfiziert wurden. In diesem Blot zeigt sich bei beiden Konstrukten eine KMT2A-Bande, die auf der Höhe der bereits gezeigten Bande des KMT2A::MLLT1-Fusionsproteins (Abbildung 4.2) läuft. Nach Transfektion mit sowohl dem Kontrukt mit als auch ohne intronischer Sequenz lässt sich folglich die Bildung eines chimären Volllängen-KMT2A::MLLT1 Fusionsprotein nachweisen. Auffällig ist weiter, dass sich nur bei dem Konstrukt mit intronischer Sequenz, nicht aber bei dem KMT2A::MLLT1 Konstrukt ohne intronische Sequenz das kurze, durch ein alternatives Spleißereignis entstandene KMT2A nachweisen lässt. Daraus lässt sich ableiten, dass es, anders als bei dem Konstrukt mit intronischer Sequenz, bei dem KMT2A::MLLT1 Konstrukt ohne intronische Sequenz regelhaft nicht zur Bildung des kurzen KMT2A-Proteins kommt. In der Anti-GFP Färbungen (α -GFP) lässt sich eine erfolgreiche Transfektion der Proben mit den jeweiligen Konstrukten beweisen. Die KMT2A::MLLT1 Proteinbandendarstellungen stimmt mit der Literatur überein (75).

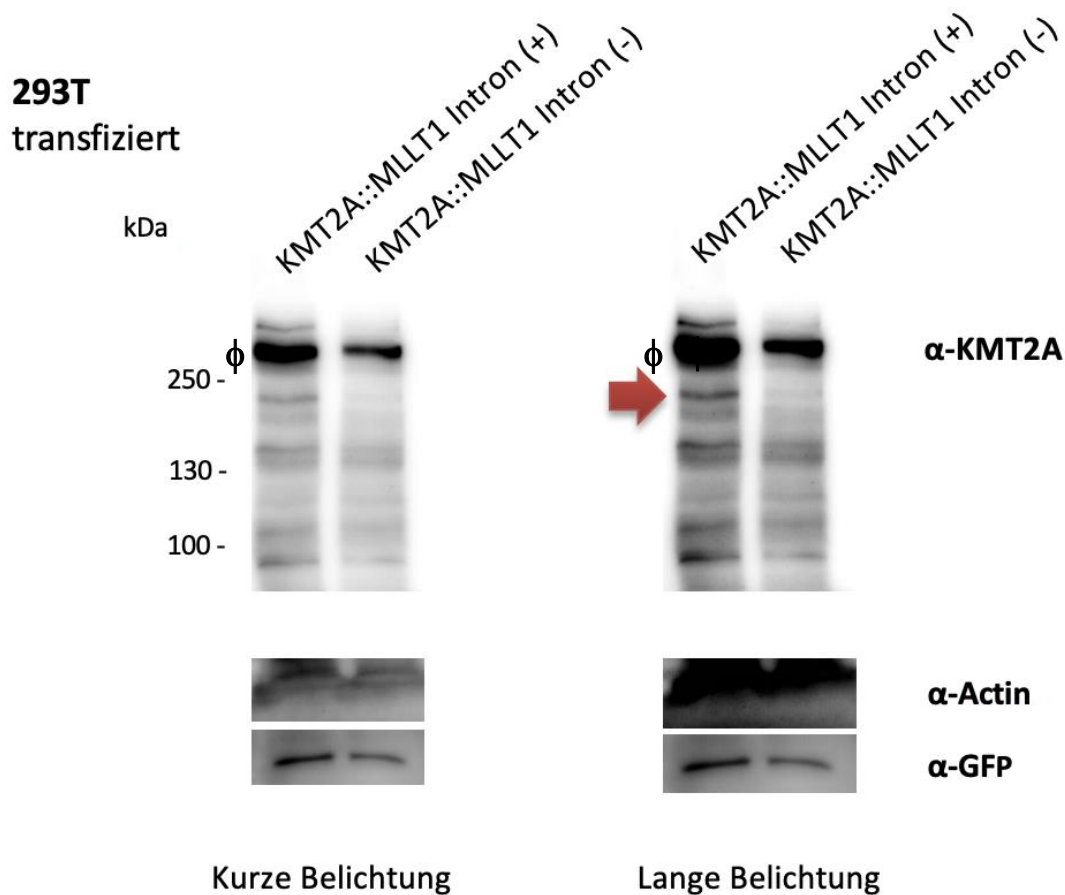


Abbildung 4.5 Darstellung des Fusionsproteins nach Transfektion mit Konstrukten mit und ohne intronischer Sequenz. Sowohl bei dem KMT2A::MLLT1 Lysat mit intronischer Sequenz (Intron (+)) als auch bei dem KMT2A::MLLT1 Lysat ohne intronische Sequenz (Intron (-)) ist eine deutliche Bande im Western Blot auf der erwarteten Höhe des KMT2A::MLLT1 Fusionsproteins erkennbar (ϕ). Auf zu erwartender Höhe des kurzen KMT2A erscheint bei KMT2A*MLLT1 eine Bande (roter Pfeil), bei KMT2A/MLLT1 fehlt diese Bande jedoch.

Um anschließend auch mikroskopisch zu zeigen, dass ein Volllängen KMT2A::MLLT1 Fusionsprotein trotz intronischer Stoppcodons gebildet wird, wurde ein Gen für das grün fluoreszierendes Protein eGFP in einem durchgehenden Leseraster an das 3'-Ende von MLLT1 kloniert.

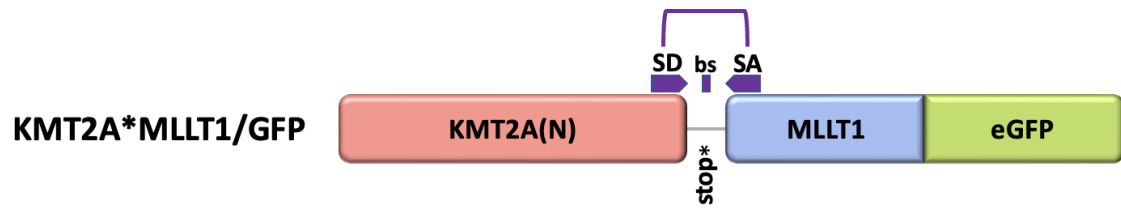


Abbildung 4.6 Schematische Darstellung von KMT2A::MLLT1/GFP mit intronischer Sequenz im Translokationsbereich. Alle zum Spleißen benötigten Genabschnitte zwischen KMT2A und MLLT1 sind vorhanden. GFP schließt sich ohne weiteres Intron an MLLT1 an. Nur nach stattgehabten Spleißen an den dargestellten Spleißstellen sollte ein ausschließlich auf den Zellkern begrenztes GFP-Signal erkennbar sein.

Nur Zellen, die ein Fusionsprotein aus KMT2A und MLLT1-eGFP bilden, können im Kern grün fluoreszieren. Vor eGFP liegt keine weitere Promotorsequenz, die eine eGFP-Bildung ohne die Bildung eines KMT2A::MLLT1 Fusionsproteins vermitteln könnte. Da sowohl KMT2A als auch MLLT1 Kernproteine sind, sollte eine Fluoreszenz auf den Zellkern beschränkt sein. Das Zytoplasma bleibt frei von Fluoreszenz. Die im Weiteren gezeigte grüne Fluoreszenz im Zellkern (Abbildung 4.7) impliziert, dass ein regulärer Spleißvorgang die Bildung eines KMT2A::MLLT1-eGFP Fusionsproteins ermöglicht hat.

293T, transfected

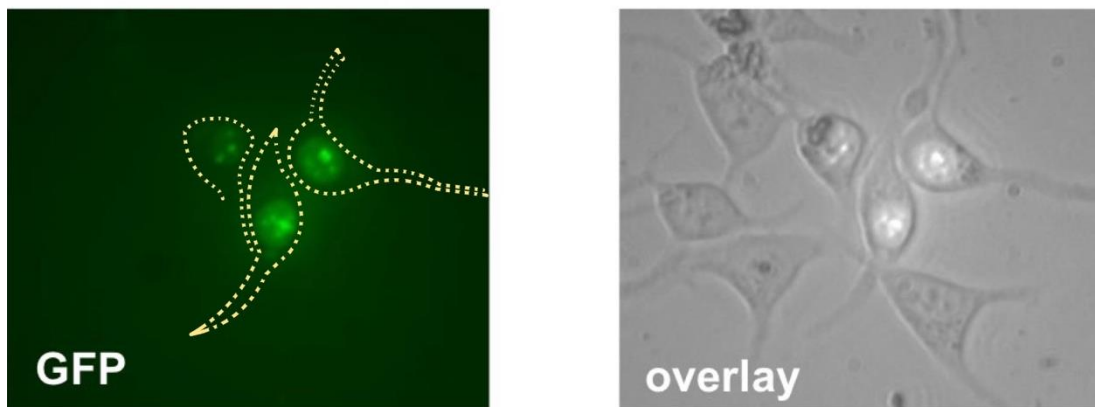


Abbildung 4.7 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von KMT2A::MLLT1/eGFP transfizierten 293T Zellen (Konstrukt mit intronischer Sequenz im Translokationsbereich). 40-fache Vergrößerung. Links: Alleiniger eGFP-Fluoreszenzkanal, Zellumrisse gelb umrandet. Rechts: gleicher Bildausschnitt mit eGFP-Fluoreszenz bei gleichzeitigem Auflicht.

Ergebnisse

Zudem konnte die Bildung eines großen Fusionsproteins bestehend aus KMT2A::MLLT1 und dem eGFP auch in einem weiteren Western Blot gezeigt werden (Abbildung 4.8). Auf derselben Laufhöhe lassen sich sowohl eine KMT2A- als auch eine eGFP-Bande darstellen. Zur präziseren Bandenidentifizierung wurden beide Anfärbungen mit der gleichen Transfermembran erstellt. Sowohl primärer als auch sekundärer Antikörper wurden nach erfolgter Anti-KMT2A Darstellung von den Membranen entfernt. Anschließend erfolgte die Anti-GFP Darstellung. Der Transfer gestaltete sich aufwendig. Der Transfer über Nacht bei 4°C war schlussendlich erfolgreich.

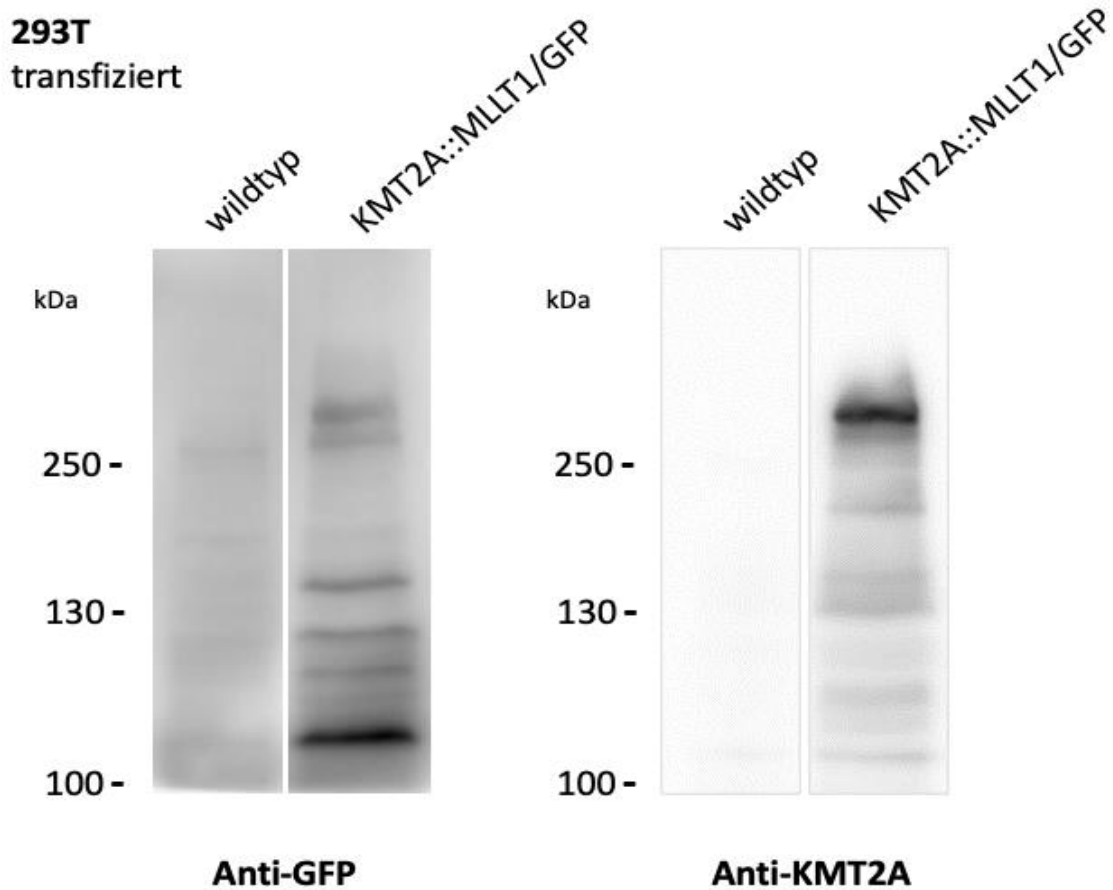


Abbildung 4.8 Western Blot mit Nachweis eines KMT2A::MLLT1-eGFP Fusionsproteins. In mit einem KMT2A::MLLT1-eGFP Konstrukt transduzierten 293T-Zellen lässt sich bei einer Laufhöhe über 250 kDa eine Bande sowohl bei Anti-KMT2A als auch bei Anti-GFP Färbung darstellen.

4.2 Nachweis der Funktionalität des Konstruktes mit intronischer Sequenz in humanen CD34+Progenitorzellen

Der Nachweis des KMT2A::MLLT1 Fusionsproteins auf Grundlage einer Translokation mit intronischer Sequenz im Translokationsbereich wurde im Western Blot und der Fluoreszenzmikroskopie erbracht. Die Funktionalität, das heißt die leukämischen Eigenschaften dieses KMT2A::MLLT1 Konstruktes wurden in *ex vivo* Langzeitzellkulturen humaner CD34+Blutprogenitorzellen (hCD34+ Zellen) untersucht. Die Transduktion dieser humanen CD34+ Blutvorläuferzellen mit dem KMT2A::MLLT1 Konstrukte mit intronischer Sequenz im Translokationsbereich führte zum Herauswachsen dieser Zellen. Wohingegen Zellen, die mit den nicht leukämogenen Konstrukten KMT2AdeIMLLT1, KMT2A-HA und KMT2A-spacer transduziert wurden, keinen Expansionsvorteil aufwiesen. Ebenso wurden Zellen, die nicht transduziert wurden, allmählich überwachsen. Untersucht wurde die Präsenz der transduzierten Zellen über ein im Transfervektor enthaltenes Gen für eGFP. Dieses kommt in den Ausgangszellen nicht vor und so kann eGFP nur nach erfolgreicher Transduktion von den Zellen gebildet werden. In der Durchflusszytometrie wurde zu festgelegten Zeitpunkten der Anteil an eGFP bildenden Zellen bestimmt. Jedes untersuchte Konstrukt wurde dabei in einem eigenen Ansatz untersucht. Zellen, die durch das eingebrachte Konstrukt einen Teilungs- oder Überlebensvorteil erwerben, können sich über die Zeit zunehmend gegen nicht transduzierte Zellen durchsetzen.

Um die Notwendigkeit des KMT2A-Bindungspartners MLLT1 in dem von uns untersuchten Konstrukt zu belegen, wurde der KMT2A-Genanteil mit alternativen Bindungspartnern kombiniert. Dazu wurden durch aufwendige Klonierungsarbeiten Genabschnitte aus anderen Konstrukten enzymatisch herausgeschnitten und in das KMT2A::MLLT1 mit intronischer Sequenz im Translokationsbereich eingefügt. Die zur Auswahl stehenden Schnittstellen des Ausgangskonstruktes KMT2A::MLLT1 sind begrenzt, so mussten aus den verfügbaren weiteren Konstrukten die passenden Abschnitte ausgewählt werden. Diese konstruierten Abwandlungen des Originalkonstruktes KMT2A::MLLT1 mit intronischer Sequenz im Translokationsbereich wurden mittels retroviraler Vektoren in die hCD34+ Zellen eingeschleust. Zum einen wurde so untersucht, ob der MLLT1-Anteil entbehrlich ist und schlicht aus

dem Konstrukt entfernt werden kann, ohne dessen leukämogene Wirkung zu beeinflussen (KMT2A Δ MLLT1). Zum anderen wurde untersucht, ob auch ein willkürlicher Proteinrest hinter dem kurzen KMT2A, die Wirkung von MLLT1 ersetzen kann (KMT2A-HA und KMT2A-spacer). Anschließend wurde ihr Einfluss auf die Zellen mittels kontinuierlicher FACS-Messung untersucht. Die alternativen KMT2A-Konstrukte führten jedoch nicht zur Expansion der transduzierten Zellen. Auch das kurze KMT2A allein war in dem untersuchten CD34⁺ Expansionsassay nicht leukämogen. Bis zum elften Tag nach Transduktion ließ sich kein Unterschied zwischen den Konstrukten zeigen, ab dem 14. Tag stieg jedoch der Anteil der eGFP positiven Zellen nach Transduktion mit KMT2A::MLLT1 mit intronischer Sequenz sigmoid an. So konnte gezeigt werden, dass der MLLT1-Anteil des verwendeten Fusionskonstruktes essenziell für die leukämogene Wirkung des KMT2A::MLLT1 ist.

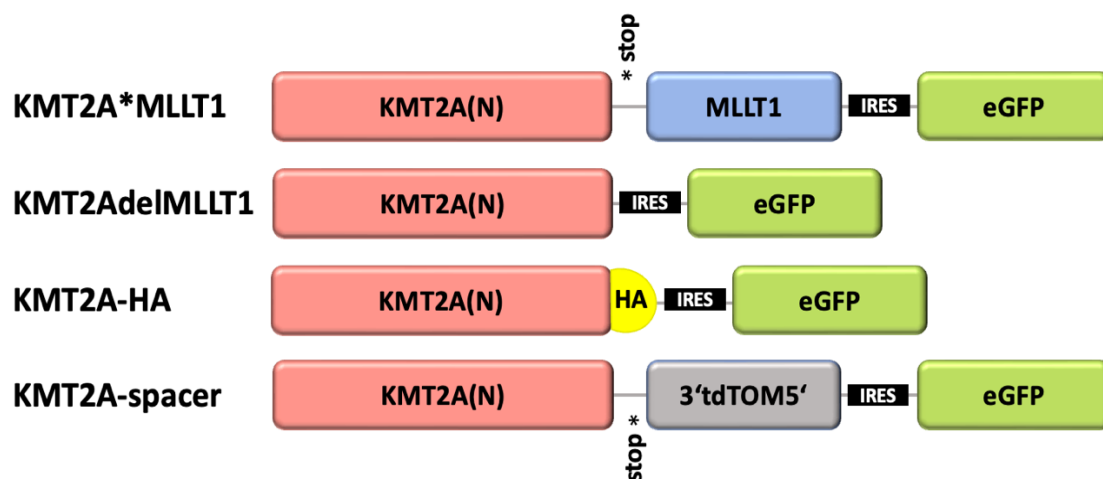


Abbildung 4.9 KMT2A-Genkonstrukte zur Überprüfung der Notwendigkeit des MLLT1-Anteils. Die abgebildeten Konstrukte wurden mittels retroviraler Vektoren in hCD34⁺ Zellen eingebracht und von diesen exprimiert. Absteigend: Zu Grunde liegendes Originalkonstrukt KMT2A::MLLT1 mit intronischer Sequenz (pMizi-MLL-ENL-i-GFP); KMT2A-Anteil ohne jegliche Erweiterung; KMT2A-Anteil mit HA-Anhang; Austausch von MLLT1 durch ein inverses Tomatogen als Platzhalter (Spacer).

Nach Transduktion der humanen CD34⁺Blutprogenitorzellen zeigten sich über die Zeit nachstehende Selektionskurven für eGFP bildende Zellen:

Ergebnisse

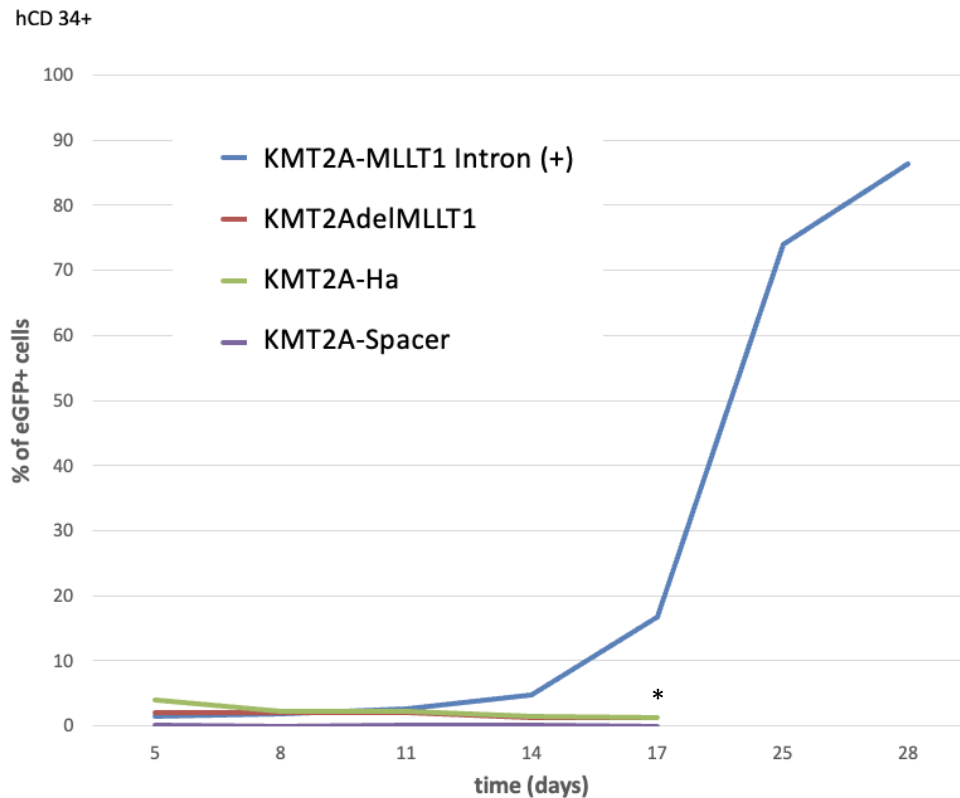


Abbildung 4.10 Herauswachsen humaner CD34+ Zellen, die mit den verschiedenen KMT2A::MLLT1 Konstrukten transduziert wurden. Nur die Zellpopulation mit dem Konstrukt mit intronischer Sequenz kann sich ausreichend vermehren, um zu expandieren. Die übrigen Konstrukte führen nicht zur Expansion der humanen CD34+ Blutvorläuferzellen. An Tag 17 liesen sich keine transduzierten Zellen in den Ansätzen von KMT2AΔeIMLLT1, KMT2A-Ha und KMT2A-spacer mehr nachweisen (*). Daten repräsentativ für 3 unabhängige Versuche.

Der MLLT1-Anteil erfüllte somit für die Leukämogenität der KMT2A::MLLT1 Genaberration mit intronischer Sequenz eine wichtige Funktion. MLLT1 kann nicht durch ein beliebiges Protein ersetzt werden, um die transduzierten hCD34+ Zellen expandieren zu lassen.

4.3 Nachweis der Abhängigkeit der leukämogen Eigenschaften des KMT2A::MLLT1 Konstruktes mit intronischer Sequenz von der Möglichkeit zu Spleißens

Ein erster Hinweis auf Spleißen als ursächlichen Mechanismus hinter der Fusionsproteinbildung ergab sich aus einer Sequenzanalyse auf Spleißstellen. Eine computerbasierte Analyse konnte zeigen, dass das KMT2A::MLLT1 mit intronischer Sequenz im

Ergebnisse

Translokationsbereich mit einer sehr hohen Wahrscheinlichkeit regelhaft wie in folgenden Darstellungen gespleißt wird.

input DNA (intron retention):

AACAAAAACCAAAGAAAAG**GTGAGGAGAG**A
 TTTGTTTCTCTGCCATTTCTCAGGGATGTATTCT
 ATTTT**GTAG**GGGAAAAGCCTTATCCTTGACTTCTA
 TGTAGATGGCAGTGGCTCGAGCGATAGGAAGC
 CGTCTGTGTGCTGCTCACTGGGTTGAGAGCGT
 ATTGCACTGCTGGGGTCTTTATCGAAAGTTCT
 CTGTGGGTAAGGGGACAGTCCCCTGCTTGAG
 GCGTGT**GCTGAC**TCATCTCCCACCTCTCTCTC
 CTCAG**TGCACCGTCC**

- splice donor/acceptor
- branch site

Donor splice sites, direct strand						
pos 5'->3'	phase	strand	confidence	5'	exon	intron 3'
490	0	+	0.67	AAAAGAAAAG	^	GTGAGGAGAG
672	1	+	0.47	TTCTCTGTGG	^	GTAAGGGGAC
1152	0	+	0.51	CGGGGTGATG	^	GTAATGCCCG
1534	1	+	0.60	TCCCCAAGG	^	GTGGGCCCC
1746	0	+	0.61	AGGGGAGAAG	^	GTGAAGCCCG

Acceptor splice sites, direct strand						
pos 5'->3'	phase	strand	confidence	5'	exon	intron 3'
523	2	+	0.22	CATTTCTCAG	^	GGATGTATTC
543	1	+	0.14	TATTTTGTAG	^	GGAAAAGCCT
573	1	+	0.26	TTCTATGTAG	^	ATGGCAGTGG
737	0	+	1.00	TCTCTCCAG	^	TGCACCGTCC
749	0	+	0.55	CACCGTCCAG	^	GTGAGGTAG
754	2	+	0.34	TCCAGGTGAG	^	GTTAGAGCTG
759	1	+	0.32	GTGAGGTAG	^	AGCTGGGGCA
761	0	+	0.31	GAGGTAGAG	^	CTGGGGCATC
1244	0	+	0.19	TGACCCCAAG	^	AAGACCAAC
1247	0	+	0.07	CCCCAAGAAG	^	ACCAAACCAT
1576	2	+	0.34	GGGCTTCCAG	^	CAAGCGGCCG
1580	0	+	0.34	TTCCAGCAAG	^	CGGCCGGCCA
1607	0	+	0.17	CTGCCAAG	^	CCCAGCGCCA
1893	1	+	0.14	TCAGACTCAG	^	ACTTCGAGCC

Human Splicing Finder 3.1

Spliceator-Ergebnis

Funktion	Position	Konfidenz	Basensequenz
Acceptor	499	0.99549353	CCCCAGGCTC
Acceptor	1822	0.9873885	TCCTCCAGTG
Acceptor	1823	0.98960495	CCTCCAGTGC
Acceptor	1824	0.9979595	CTCCAGTGCA
Acceptor	1825	0.9901417	TCCAGTGAC
Acceptor	1836	0.9808632	GTCCAGGTGA
Acceptor	2327	0.98159057	TGACCCCAAG
Acceptor	2328	0.9842562	GACCCCAAGA
Donor	1578	0.99898726	AAAGGTGAGG
Donor	1838	0.9927201	CCAGGTGAGG
Donor	2402	0.9849877	CAAGGTGACC

Abbildung 4.11 Ergebnisse der webbasierten Spleißstellensuche. Es werden die jeweiligen Basensequenzen dargestellt, so wie die Vorhersagekraft und die Funktion der entsprechenden Basensequenz. Oben: Ausschnitt aus der Basensequenz des Translokationsbereiches (links), Ergebnis der Spleißstellenanalyse mittels *Human Splicing Finder 3.1* (rechts). Das Programm konnte einen 100% Spleißakzeptor aufzeigen. Weiter konnte ein fast 70% Spleißdonor identifiziert werden. Weitere Stellen mit geringerer Vorhersagekraft konnten ebenfalls identifiziert werden, ebenso wie eine Verzweigungsstelle (Branchsite). Unten: Vorhergesagte Spleißstellen des Programms *Spliceator*. Auch hier konnten dieselben Sequenzen mit hoher Verlässlichkeit gefunden werden. Die Nummerierung der Basenposition ist relativ zur eingegebenen Sequenz.

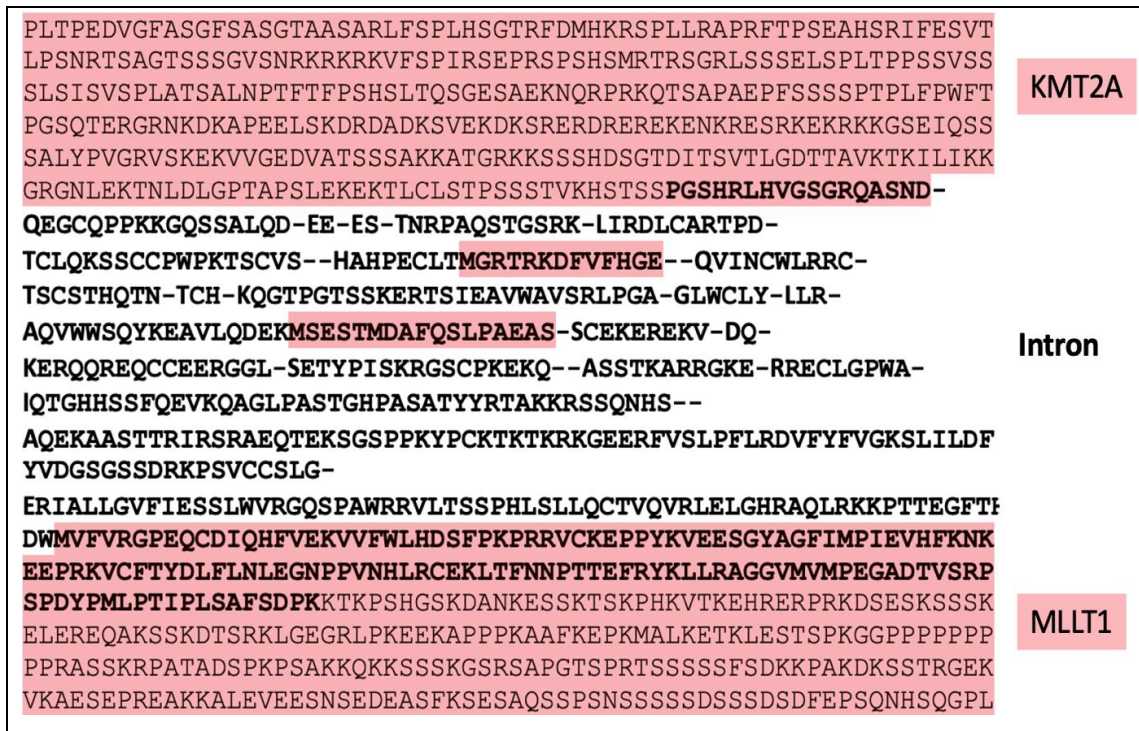


Abbildung 4.12 Ausschnitt aus der Proteinsequenz der Spleißstelle von KMT2A::MLLT1 mit intronischer Sequenz in 1-BCode. Rot markiert sind offene Leserahmen. Der obere offene Leserahmen entstammt KMT2A, der untere MLLT1. Die farblich nicht markierten Bereiche bleiben untranslatiert. Der fettgeschriebene Abschnitt ist nach Tabelle 4.11 durch Spleißstellen eingefasst und dadurch ein denkbare Intron. Es kann durch Spleißen entfernt werden, sodass ein durchgehender offener Leserahmen geschaffen wird. Hierdurch ist die Bildung eines KMT2A::MLLT1 Fusionsprotein möglich. Quelle: eigene Darstellung.

Um das Spleißen tiefergehend als ursächlichen Mechanismus zu untersuchen, wurde ein Genkonstrukt hergestellt, dem sowohl die Sequenz der Verzweigungsstelle (branchsite) als auch des Spleißakzeptors fehlten. Ein Stoppcodon zwischen dem KMT2A- und dem MLLT1-Genfragment blieb jedoch erhalten. Es handelte sich also weiterhin um ein Konstrukt mit intronischer Sequenz, allerdings mit deletiertem Spleißdonor und -akzeptor. Wie zuvor gezeigt, ist der MLLT1-Anteil des Fusionsproteins für dessen Leukämogenität unerlässlich. Es ist zu erwarten, dass ein intronisches Konstrukt ohne intakte Spleißstelle (KMT2A*MLLT1delSA) nicht zur Expansion der humanen CD34+ Zellen führt. Die Stoppcodons werden nicht durch einen Spleißvorgang aus der hnRNA entfernt und verhindern so die Bildung des Vollängen KMT2A::MLLT1 Fusionsproteins.

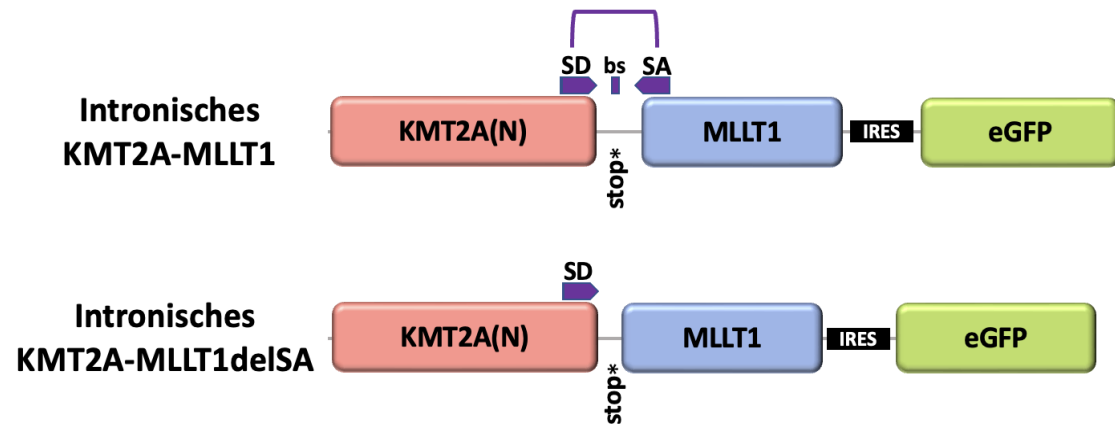


Abbildung 4.13 Schematische Darstellung der Konstrukte zur Überprüfung der Spleißnotwendigkeit für die leukämogene Funktion. Absteigend: Ursprungskonstrukt (*KMT2A::MLLT1 mit intronischer Sequenz*); Neue entwickeltes Konstrukt, dem Verzweigungsstelle (bs) und Spleißakzeptor (SA) fehlen (*KMT2A::MLLT1delSA*). Der Spleißdonor (SD) bleibt erhalten. Die *Internal ribosome entry side* (IRES) ist eine Sequenz, die 5'-Cap-unabhängig weiteren Abschnitten zur Translation verhilft, in diesem Fall eGFP.

Um dies zu untersuchen, wurde das KMT2A::MLLT1 Konstrukt mit intronischer Sequenz und defekter Spleißstelle in hCD34+ Zellen transduziert. Es konnte gezeigt werden, dass KMT2A*MLLT1delSA nicht zur Selektion der transduzierten Zellen führt (Abbildung 4.14).

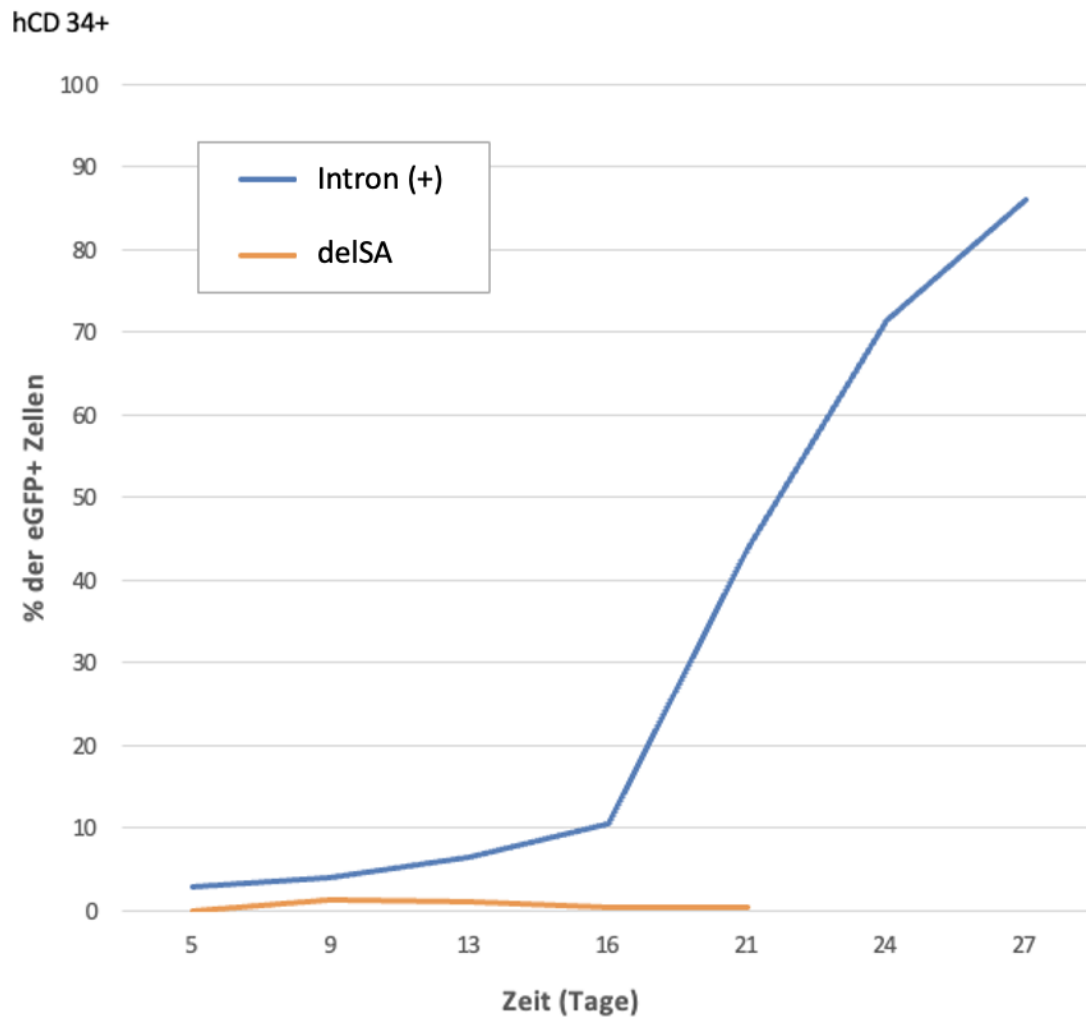


Abbildung 4.14 Ergebnis der FACS-Messreihe des Ausgangskonstruktes KMT2A::MLLT1 mit intronischer Sequenz (Intron (+)) gegen KMT2A::MLLT1 mit intronischer Sequenz und unvollständiger Spleißstelle (delSA). Nur das KMT2A::MLLT1 Ursprungskonstrukt mit intronischer Sequenz und intakter Speißstelle führt zum Herauswachsen einer Zellpopulation. Das Konstrukt, dem essenzielle Spleißelemente fehlen, führt nicht zum Herauswachsen einer Zellpopulation. Zellen, die mit diesem veränderten Konstrukt transduziert wurden, sind ab dem 24. Tag nicht mehr nachweisbar (ausdifferenziert). Daten repräsentativ für 3 unabhängige Versuche.

4.4 Vergleich der Konstrukte KMT2A::MLLT1 mit und ohne intronischer Sequenz im Bezug auf hCD34+-Zellexpansion

KMT2A::MLLT1 mit als auch ohne intronischer Sequenz führt zu einer leukämogenen Expansion von hCD34+ Blutprogenitorzellen. Weiter wurde untersucht, ob es Unterschiede in der Expansionsstärke zwischen den beiden Konstrukten gibt. Es konnte gezeigt werden, dass Zellen, die mit dem KMT2A::MLLT1 Konstrukt mit intronischer Sequenz transduziert wurden, tendenzieller schneller herauswachsen als

Ergebnisse

Zellen, die mit dem KMT2A::MLLT1 Konstrukt ohne intronische Sequenz transduziert wurden. Für diesen Versuchsansatz wurden beide Zellpopulationen unter gleichen Bedingungen kultiviert. Die Zellen wurden in Zellkulturschalen (24-Well-Platten) versorgt. Das Zellmedium enthielt neben fetalen Kälberserum weitere Zytokine und zellstimulierende Faktoren. Dazu gehören unter anderem IL-3, IL-6, Erythropoetin, Thrombopoetin, Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor und Stammzellfaktor. Die Zellen wurden regelmäßig vereinzelt. Der Anteil der eGFP+ Zellen an der Population wurde in regelmäßigen Abständen erhoben. Erfolgreich transduzierte Zellen lassen sich im Durchflusszytometer (FACS) durch ihre grüne Fluoreszenz erkennen. Ist diese nachzuweisen, ist anzunehmen, dass in die Zelle auch das entsprechende KMT2A::MLLT1 Konstrukt erfolgreich eingebracht wurde.

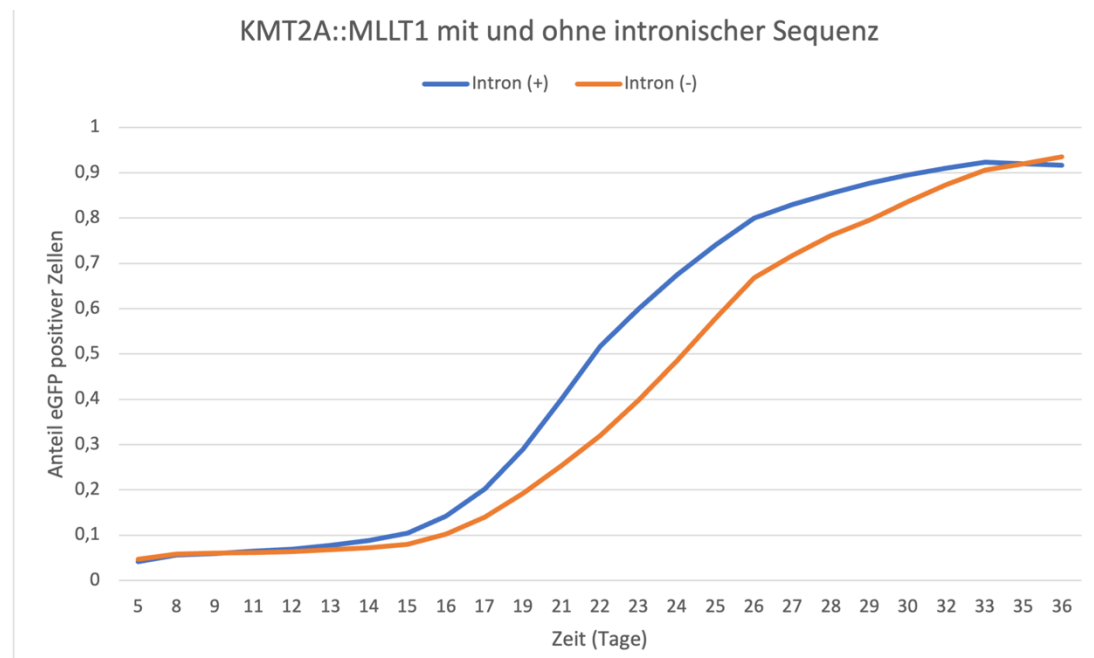


Abbildung 4.15 Auswuchsverhalten von hCD34+ Zellen die mit dem Konstrukt mit intronischer Sequenz (Intron (+)) beziehungsweise dem Konstrukt ohne intronische Sequenz (Intron (-)) transduziert wurden. Zellen mit Intron (+) Konstrukt wachsen schneller heraus als solche, die mit der Intron (-)-Variante transduziert wurden. Darstellung der Mittelwerte repräsentativ für n=6 Versuche.

Eine ähnliche Auswirkung der beiden KMT2A::MLLT1 Konstrukte mit und ohne intronischer Sequenz konnte bei der Befähigung hCD34+ Blutprogenitorzellen zur Koloniebildung auf Methylcellulose beobachtet werden. Das KMT2A::MLLT1 mit intronischer Sequenz führte im Durchschnitt zu einer geringfügig höheren Kolonieanzahl, als es bei dem Konstrukt ohne intronische Sequenz zu beobachten war.

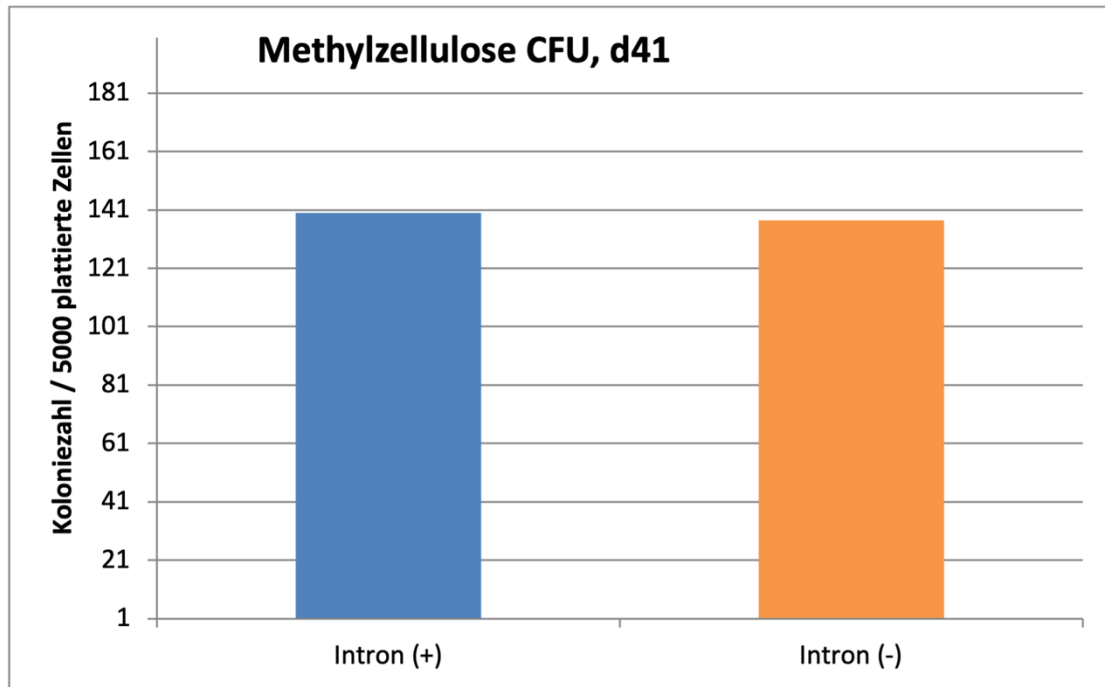


Abbildung 4.16 Kolonieformende Einheiten (CFU) hCD34+ Blutprogenitorzellen nach Transduktion mit KMT2A::MLLT1 mit beziehungsweise ohne intronischer Sequenz. Die Kulturen beider Konstrukte wurden jeweils nach 41 Tagen untersucht. Darstellung repräsentativ für n=2 Versuche.

4.5 Vergleich der Konstrukte KMT2A::MLLT1 mit intronischer Sequenz und KMT2A::MLLT1 ohne intronische Sequenz in Bezug auf Zelldifferenzierung humaner CD34+ Zellen in Langzeitkulturen

Anhand ihrer Oberflächenmerkmale (CD-Marker) wurden transduzierte humane Progenitorzellen beider Konstrukte auch auf Unterschiede in der Differenzierung hin untersucht. Typische Merkmale von Blutprogenitorzellen wie beispielsweise CD34 und CD117 sind kaum exprimiert. Ein Unterschied bestand in der Exprimierung von CD25 (typisch für T-Lymphozyten). Diese wurden häufiger nach der Transduktion mit KMT2A::MLLT1 ohne intronische Sequenz exprimiert. CD25 ist die Alphakette des Interleukin A-Rezeptor. CD15 ist ein Ligand für Selektine und vermittelt Granulozyten und Monozyten die Extravasion, also den spezifischen Gefäßaustritt von Blutzellen im Rahmen von Entzündungsprozessen. Merkmale reifer Blutzellen sind in mehr als 80% der Zellen beider Konstrukte nachzuweisen. Die Antigene CD3 (T-Zellenmerkmal), CD4 (T-Helferzellenmerkmal), CD8 (Cytotoxische T-Zellenmerkmal), CD14 (Monozytenmerkmal), CD15 (Granulozytenmerkmal) und CD44 (Makrophagenmerkmal (76)) sind

Ergebnisse

sowohl entweder der lymphatischen, als auch der myeloischen Reihe zuzuordnen und sind bei beiden Konstrukten in ähnlichen Anteilen exprimiert. So konnten zwischen den beiden Konstrukten die marginal abweichende Exprimierung weniger Oberflächenmerkmale gezeigt werden. Insgesamt exprimieren die Zellen beider Konstrukte im Wesentlichen ähnliche Oberflächenmerkmale. Diese Untersuchung zeigt nur den Anteil der Zellen, die ein Merkmal aufweisen. Sie zeigt jedoch nicht, in welchem Ausmaß diese Zellen jeweils die Oberflächenmerkmale ausbilden.

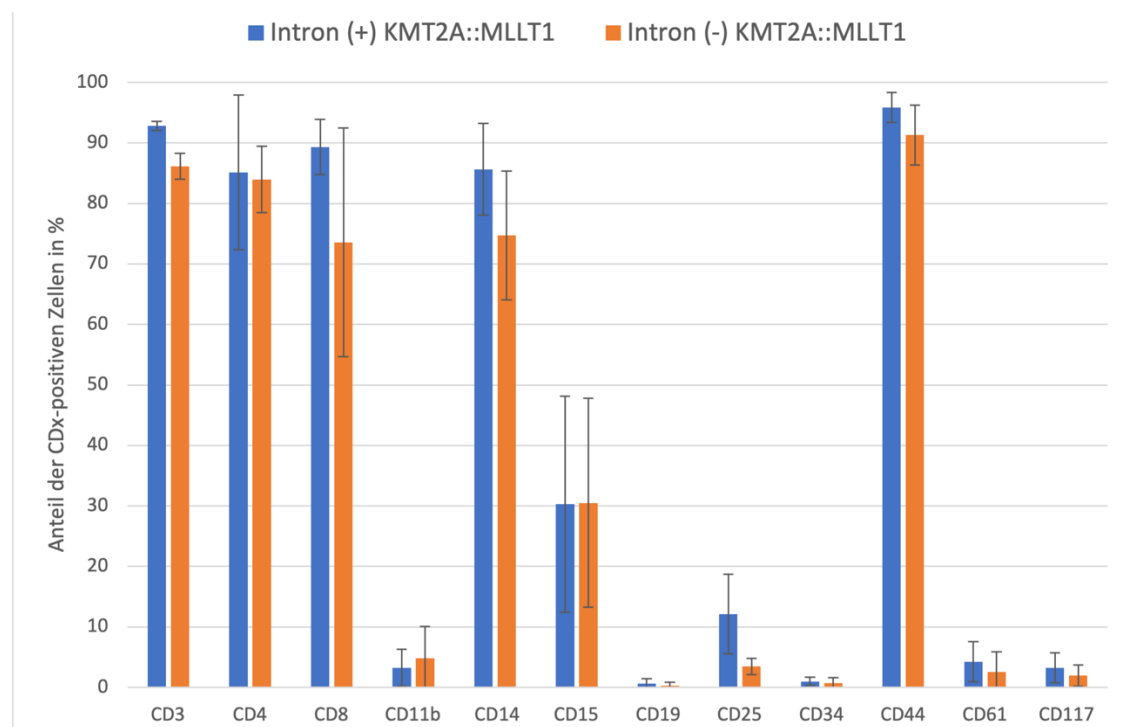


Abbildung 4.17 CD-Markerbestimmung von hCD34+ Zellen, die mit dem KMT2A::MLLT1 Konstrukt mit beziehungsweise ohne intronischer Sequenz transduziert wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte und die zugehörige Standardabweichung. Die Mehrheit der Zellen tragen CD3, CD4, CD8, CD14 und CD44 auf ihrer Zelloberfläche. Einige Zellen tragen CD15 und CD25 auf ihrer Zellmembran. Abbildung repräsentativ für n=3 Versuche.

Auch die lichtmikroskopische Darstellung der Morphologie der transduzierten Zellen wurde verglichen. Hierzu wurden die Zellen nach *Cytospin*-Zentrifugation nach Pappenheim angefärbt. Grundsätzlich zeigen beide Populationen eine ähnliche Morphologie. Die Zellen beider Konstrukte wirken insgesamt unreif. Ihr Zytoplasma ist basophil mit gelegentlichen Vakuolen, die Zellkerne sind groß. Unterschiede in Bezug auf Basophilie des Zytoplasmas und Zytoplasma/Kern-Verhältnis sind gering.

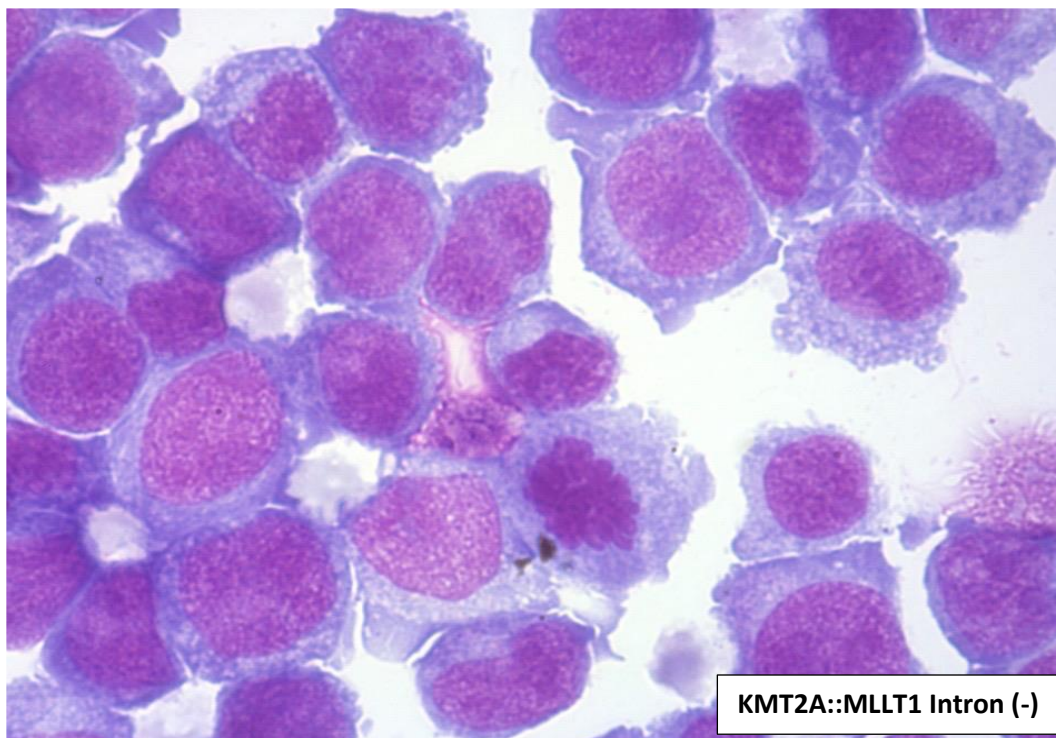
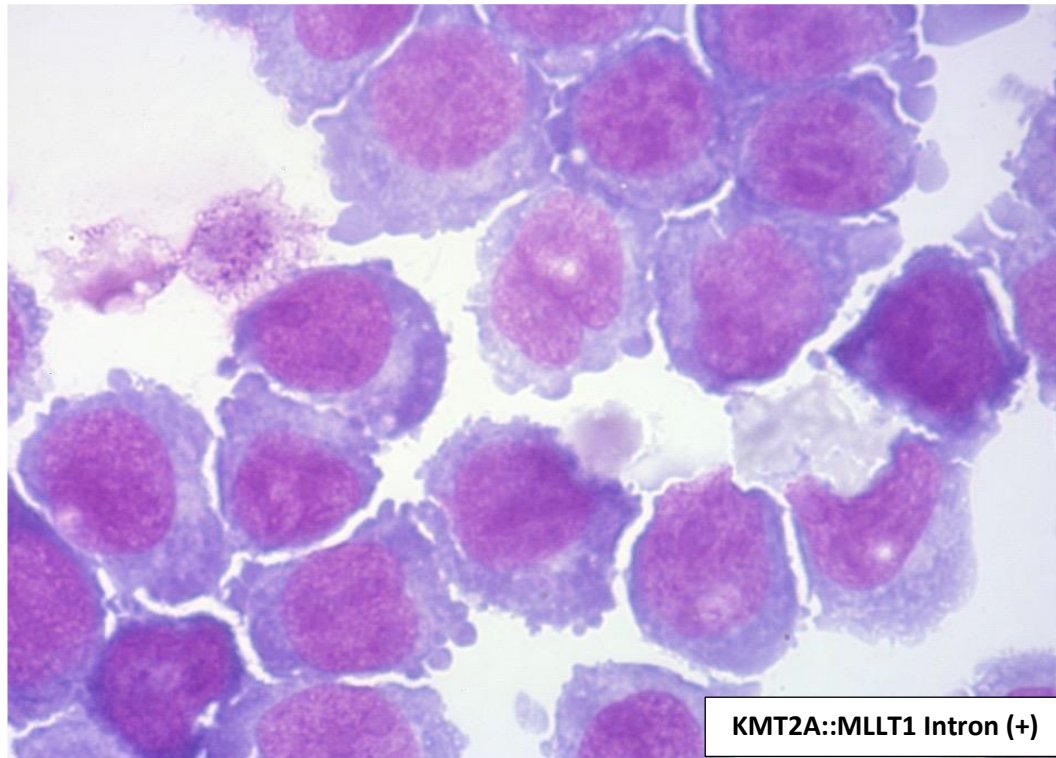


Abbildung 4.18 Morphologie der KMT2A::MLL1 expandierten myeloischen Vorläuferzellen mit und ohne intronische Sequenz in Langzeitkulturen an Tag 45, gefärbt nach Pappenheim. Oben finden sich hCD34+ Zellen, die mit dem Konstrukt mit intronischer Sequenz transduziert wurden (KMT2A::MLL1 Intron(+)). Unten wurden hCD34+ Zellen mit dem Konstrukt ohne intronische Sequenz transfiziert (KMT2A::MLL1 Intron(-)).(77).

5 Diskussion

5.1 Nachweis eines KMT2A::MLLT1-Fusionsproteins einer Translokation mit intronischer Sequenz im Bereich der Genfusion in Western Blot und Mikroskopie

Nach Überexpression des KMT2A::MLLT1 mit intronischer Sequenz durch die Transduktion ist neben dem KMT2A::MLLT1-Fusionsprotein auch das kurze KMT2A-Protein in den Zellen nachweisbar. Möglich ist dies, da es zusätzlich zum Herausspleißen des Translokationsstellenintrons auch immer zur Intronretention kommen kann. In diesem Fall folgt auf die Intronretention durch die retendierten Stoppcodons die Bildung eines kurzen KMT2A mit baldigem Nonsense Mediated Decay der mRNA. Somit konnte gezeigt werden, dass neben dem KMT2A::MLLT1 Fusionsprotein auch immer ein kurzes KMT2A gebildet wird. Weiterführend wäre der fluoreszenzmikroskopische Nachweis mittels Cytospin in primären hCD34+Blutprogenitorzellen sachdienlich, wenn auch äußerst aufwendig.

5.2 Funktionalität des Konstruktes mit intronischer Sequenz humanen Progenitorzellen (CD34+) durch FACS-Messung

Neben dem KMT2A-Anteil bedarf es bestimmte Translokationspartner für die leukämogene Wirkung des KMT2A-Fusionsproteins (47). In den bisherigen Veröffentlichungen wird von KMT2A-Rearrangements und die Lage der Bruchpunkte berichtet, ohne näher zu beleuchten, wie es nach intronischer Fusion zu der Bildung eines leukämogenen Proteins kommen kann. Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen jedoch erstmals die Entfaltung der leukämogene Wirkung einer KMT2A::MLLT1 Translokation mit intronischer Sequenz im Fusionsbereich durch Spleißen. In anders gearteten Fällen kann sich die onkogene Wirkung vor allem durch Trunkierung eines der beteiligten Gene entfalten. Dies wäre bei Translokationen mit Veränderung des Leserahmens der Fall. Beispiele dafür sind REL in T- und B-Zell-Leukämien, beziehungsweise Lymphomen und RUNX1 in akuten myeloischen Leukämien (78)(79). Zudem sind RUNX1::RUNX1T1 Translokationen in zuvor intronischen Sequenzen beschrieben, die jedoch durch Zerstörung der Exongrenze und Abwesenheit von Stoppcodons in dem retendierten Intronanteilen (Premature termination codons) einen unveränderten Leserahmen vorweisen (80).

5.3 Entfaltung der leukämogen Wirkung des Konstruktes mit intronischer Sequenz durch Spleißen

Das KMT2A::MLLT1 mit intronischer Sequenz führt zu der Bildung eines Fusionsproteins. Als zugrunde liegender Mechanismus liegt das Spleißen nahe. Spleißen ist ein physiologischer Routineablauf des Zellstoffwechsels. Die Spleißstellensuche in zwei webbasierten Computerprogrammen zeigt, dass mehrere geeignete Spleißstellen in dem untersuchten KMT2A::MLLT1-Konstrukt mit intronischer Sequenz vorhanden sind. Grundsätzlich ist Spleißen ein komplexer Vorgang mit diversen alternativen Spleißstellen und Regulationsfaktoren. Einfache Computerprogramme zur Vorhersage der Spleißstellen unterliegen Limitierungen, da sie die Komplexität der alternativ möglichen Spleißstellen aktuell nur partiell abbilden können. Neuere Ansätze, deren Technik auf maschinellem Lernen basiert, könnten ergänzende Informationen zur komplexen Beeinflussung des Spleißablauf von Translokationen mit intronischen Sequenzen im Bereich der Genfusion bieten. Allerdings passen die hier durch die aktuell verwendeten Computerprogrammen gezeigten Spleißstellen mit den durch Klonierungsarbeiten erreichten Ergebnissen gut zusammen.

Ein ungestörter Spleißablauf ist Voraussetzung für die Bildung des Fusionsproteins aus dem KMT2A::MLLT1 mit intronischer Sequenz im Bereich der Genfusion. Ohne geeignete Spleißstellen, wie beispielsweise in KMT2AdeISA, können die intronischen Stoppcodons der Translokationsregion während der hnRNA-Prozessierung nicht entfernt werden. Nicht herausgespleißte intronische Stoppcodons führen so zu einem vorzeitigen Terminationssignal (Premature Termination Signal, PTS), welches die Translation des MLLT1-Anteils verhindert. Es wird folglich ausschließlich ein kurzes KMT2A gebildet. Außerhalb maligner Erkrankungen wurde gezeigt, dass die Häufigkeit von Stoppcodons in Introns auch die Wahrscheinlichkeit des Spleißereignis beeinflussen kann (81)(82). Auch die Rolle des Spleißens in malignen Erkrankungen wurde mit Schwerpunkt auf solide Tumore sowie in akuten Leukämien bereits beleuchtet (83)(84). Mehr als 90% der KMT2A-Bruchpunkte bei KMT2A::MLLT1 Translokationen liegen in einem Intron (47). Dennoch wurde die Abhängigkeit vom Spleißprozess für die Bildung eines Fusionsproteins einer Translokation mit Stoppcodons in den intronischen Sequenzen der Translokationsstelle bis dato noch nicht näher beleuchtet. Zur Herkunft der Stoppcodons ist ein originäres Vorkommen

in den Ausgangssequenzen vor Translokation am wahrscheinlichsten. Sowohl der MLLT1-, als auch der KMT2A-Anteil tragen Stoppcodons. Allgemein kann durch Reparaturmechanismen eingebrachte Füll-DNA auch Ursprung solcher Stoppcodons sein (52)(85). Es konnte gezeigt werden, dass im Falle einer Intronretention durch Verhinderung des Spleißens, eine leukämische Transformation ausbleibt. Das KMT2A::MLLT1 Fusionsprotein ist Voraussetzung für die leukämischen Eigenschaften der Zellen. Bleiben Stoppcodons als vorzeitiges Terminationssignal (PTS) in der reifen mRNA erhalten, ist es wahrscheinlich, dass diese mRNA nach einem Translationsdurchlauf durch *Nonsense mediated mRNA Decay* (NMD) abgebaut wird. In diesem Translationsdurchlauf vor *Nonsense mediated decay* wird durch die erhaltenden Stoppcodons nur das kurze KMT2A und nicht das leukämogenen Fusionsprotein gebildet.

Weiter ist NMD in Zusammenhang mit leukämogenen Translokationen mit intronischer Sequenz im Bereich der Genfusion auch für die zukünftige Forschung interessant, da die durch Ausbleiben des Spleißens ausgelöste Retention des Introns mit folgendem NMD auch therapeutische Optionen eröffnen kann (86)(87). Die dazu notwendige induzierte Intronretention ist aktuell im Menschen noch nicht etabliert. Die gezielte Regulation der Intronexzision ist jedoch bereits in Hefen erfolgreich (88). Und auch für den Menschen werden erste Spleißmodulatoren erprobt. Diese können zu einer häufigeren Intronretention führen (90). Die Wirksamkeit von Spleißmodulatoren *in vitro* war für Leukämiezellen mit Mutationen des Spleißosom höher (91). Ein therapeutischen Effekt wäre jedoch auch für Zellen mit KMT2A::MLLT1 Mutation mit intronischer Sequenz im Bereich der Genfusion denkbar. In humanen Zellen konnten zudem synthetische Introns bei abberanten Speißfaktoren *in vitro* therapeutisch genutzt werden(89).

5.4 Vergleich der Konstrukte KMT2A::MLLT1 mit und ohne intronischer Sequenz in Bezug auf die Expansion hCD34+-Blutvorläuferzellen

Die Notwendigkeit eines zusätzlichen Spleißschrittes beziehungsweise das Beibehalten eines weiteren Introns kann für die Zelle vorteilhaft sein. Ursächlich dafür sind Interaktionen des Introns, aber auch die reine Länge des Exons. Für das erste Exon eines Transskriptes ist beschrieben, dass seine Länge die Genaktivität beeinflusst. Kürzere erste Exons führen über veränderte Histonmodifikationen zu einer gesteigerten

Genaktivität (92)(93). Ob die Länge von distaler gelegenen Exons einen Einfluss auf die Proteinexpression hat, ist in der Literatur bislang nicht beschrieben. Der Einfluss von Introns auf die Proteinexpression ist jedoch gut untersucht. So ist eine bidirektionale Interaktion von dem Spleißfaktor U1 snRNP mit der RNA-Polymerase II beschrieben (94). Die Bindung von U1 snRNP an den Elongationskomplex beschleunigt die Transkriptionsgeschwindigkeit der RNA-Polymerase II (95). Zudem unterstützen Introns den Transport der hnRNA aus dem Zellkern in das Zytoplasma mit positiven Effekt vor allem während der Zellentwicklung (96)(97). Da sich die hier gegenübergestellten Konstrukte KMT2A::MLLT1 mit und ohne intronischer Sequenz im Bereich der Genfusion jedoch nur um ein Intro unterscheiden, ist die Stärke dieses Effektes vermutlich gering. Bei den geringen Unterschieden in der Expansionskraft der beiden Konstrukten sind diese Mechanismen jedoch als Ursache denkbar.

5.5 Vergleich der Konstrukte KMT2A::MLLT1 mit und ohne intronische Sequenz im Bereich der Genfusion im Bezug auf Zelldifferenzierung

In Anbetracht geringer Unterschiede in der Expression von CD3, CD8, CD14 und CD25 muss berücksichtigt werden, dass die Zellpopulation an unterschiedlichen Tagen nach Transduktion untersucht wurden. Die Untersuchungen der Zellpopulation, die mit dem Konstrukt ohne intronische Sequenz transfiziert wurde, fanden am 30., 34., beziehungsweise 35. Tag nach Transfektion statt. Die Untersuchungen der Zellpopulationen mit Konstrukt mit intronischer Sequenz fanden an Tag 30., 31. beziehungsweise 39. Statt. Die Unterschiede in der Ausprägungshäufigkeit der anderen CD-Marker ist nicht statistisch signifikant. Einige Antigene sind entweder der lymphatischen oder der myeloischen Reihe zuzuordnen und sind bei beiden Konstrukten in ähnlichen Anteilen exprimiert. Allgemein zeigen die Zellen in Leukämien mit KMT2A-Rearrangement häufig sowohl myeloische als auch lymphatische Phänotypen, ohne dass die therapeutische Adressierung der exprimierten Phänotypen zufriedenstellende Ergebnisse zeigt (98). Daher ist die Phänotypisierung in KMT2A-Translokationen nur unter Vorbehalt zu bewerten. Der klinische Nutzen ist anders als bei Leukämien durch andere Genaberrationen eingeschränkt. Im Vordergrund steht die zugrunde liegende genetische Mutation, die bei dem Vergleich von KMT2A::MLLT1 mit und ohne intronische Sequenz sehr ähnliche bis annähernd gleiche Fusionsproteine hervorbringt.

Der Unterschied zwischen den beiden Konstrukten ist die Bildung von mRNAs mit vorzeitigem Terminationssignal (PTS) in Zellen mit dem KMT2A::MLLT1 mit intronischer Sequenz im Bereich der Genfusion. Dieses führt zu einer zur Bildung des kurzen KMT2A, zum anderen führt sie durch Nonsense mediated Decay (NMD) zum Abbau der mRNA. NMD ist ursprünglich als Sicherungsmechanismus beschrieben worden, der verhindert, dass durch Intronretention mit vorzeitigem Stoppcodons übermäßig fehlerhafte Proteine gebildet werden und ist für Zellen lebensnotwendig (31). NMD betrifft gezielt mRNAs mit PTS. Durch NMD wird bei einem vorzeitigem Stoppcodon nach dem ersten Translationsdurchlauf am Ribosom die Cap der mRNA abgebaut und die mRNA zerstört (32). Anders als in den untranslatierten Regionen der DNA, tritt die Intronretention in Strukturgenen effektiv seltener in Erscheinung, mögliche Erklärung ist der NMD (86). Dabei unterliegt NMD auch Einflussfaktoren. Je nach Position des PTS kann es NMD initiieren oder als Stoppsignal erhalten bleiben (99). In Bezug auf die hier genutzten KMT2A::MLLT1 Konstrukte zeigten sich im Western Blot wiederholt Banden, die gut vereinbar mit der Bildung eines kurzen KMT2A sind (Siehe Abbildung 4.2 und Abbildung 4.4). Ob es sich dabei ausschließlich um die Produkte eines einzelnen Translationsdurchlaufes vor NMD handelt oder ob der Abbau der PTS tragenden mRNAs hier anderweitig beeinflusst wird, ist nicht geklärt.

In der Literatur wurde gezeigt, dass NMD auch fester Bestandteil der Granulozyten-differenzierung ist. Während dieser kommt es durch eine Zunahme an Intronretention in dem *Lmnb1*-Gen zu verstärktem NMD und so zu einer erniedrigten Proteinmasse in Granulozyten (100).

Auch wenn die Zelldifferenzierung zwischen beiden Konstrukten ähnlich ist, bietet die Spleißabhängigkeit der KMT2A::MLLT1 Translokation mit intronischer Sequenz im Bereich der Genfusion Ansatzpunkte für eine zielgerichtete Therapie. Diese Therapie könnte den Erkrankungsprogress verlangsamen. Durch spezifische therapeutische Spleißmodulation der Translokation wird jedoch die Selektion von alternativen Spleißstellen provoziert. Dies könnte zu der Bildung von neuen Antigenen (Neoantigenen) führen. Diese neuen Antigene erweitern das Epitoprepertoire der malignen Zelle und können durch ihre Lage auf der Zellmembran auch für eine spezifische Immuntherapie zugänglich sein (101). Dieser Ansatz ist aktuell noch

Schlussfolgerungen

experimentell und nur im Zusammenhang mit der Wirkverstärkung therapeutischer Checkpointinhibitoren bei soliden Tumoren beschrieben. Ein Einsatz bei Leukämien ist jedoch denkbar.

Morphologisch gibt es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Zellen beider Konstrukte. Wie bereits diskutiert ist im Falle von KMT2A-Rearrangements die zugrunde liegende Genetik der Mutation therapeutisch entscheidender als die morphologische Einordnung der Leukämiezellen.

6 Schlussfolgerungen

Leukämien mit zugrundeliegenden KMT2A-Rearrangements haben eine schlechte Prognose. Sie betreffen dabei Menschen unterschiedlicher Altersgruppen. Die Bruchpunkte der möglichen Translokationen liegen häufig im intronischen Bereich. Der leukämogene Mechanismus hinter einer KMT2A::MLLT1 Translokation mit intronischer Sequenz wurde in dieser Form erstmalig näher untersucht. Für das untersuchte KMT2A::MLLT1 Konstrukt mit intronischer Sequenz im Bereich der Genfusion konnte gezeigt werden, dass es spleißabhängig zu der Bildung eines leukämogenen Fusionsproteins kommt. Im Vergleich zu einem KMT2A::MLLT1 Konstrukt ohne intronische Sequenz im Bereich der Genfusion zeigten sich keine klaren Unterschiede in der Zellmorphologie, sowie in der CD34+ Zellexpansionskraft. Die Abhängigkeit dieser Translokation vom Spleißen bietet Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen über den therapeutischen oder experimentellen Nutzen.

7 Verzeichnisse

7.1 Literaturverzeichnis

1. Lüllmann-Rauch R. Taschenatlas Histologie. 5. Stuttgart: Thieme; 2015.
2. Mikael Häggström, Furfur. Hematopoiesis_simple.svg [Internet]. [zitiert 23. Mai 2021]. Verfügbar unter: https://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Hematopoiesis_simple_de.svg
3. Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R. Biochemie. 4. Stuttgart: Thieme; 2016.
4. Plattner H, Hentschel J. Zellbiologie. 4. Stuttgart: Thieme; 2006.
5. Lee Y, Rio DC. Mechanisms and Regulation of Alternative Pre-mRNA Splicing. Annual Review of Biochemistry. 2. Juni 2015;84(1):291–323.
6. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Stryer Biochemie. 6. München: Elsevier Spektrum akademischer Verlag; 2007.
7. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. Nature. Mai 2004;429(6990):457–63.
8. Orphanides G, Lagrange T, Reinberg D. The general transcription factors of RNA polymerase II. Genes Dev. 11. Januar 1996;10(21):2657–83.
9. Blijlevens M, Li J, van Beusechem VW. Biology of the mRNA Splicing Machinery and Its Dysregulation in Cancer Providing Therapeutic Opportunities. Int J Mol Sci. 12. Mai 2021;22(10):5110.
10. Sultan M, Schulz MH, Richard H, Magen A, Klingenhoff A, Scherf M, u. a. A Global View of Gene Activity and Alternative Splicing by Deep Sequencing of the Human Transcriptome. Science. 15. August 2008;321(5891):956–60.
11. Nilsen TW, Graveley BR. Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. Nature. Januar 2010;463(7280):457–63.
12. Ge Y, Porse BT. The functional consequences of intron retention: Alternative splicing coupled to NMD as a regulator of gene expression: Prospects & Overviews. BioEssays. März 2014;36(3):236–43.
13. Tharp CA, Haywood ME, Sbaizero O, Taylor MRG, Mestroni L. The Giant Protein Titin's Role in Cardiomyopathy: Genetic, Transcriptional, and Post-translational Modifications of TTN and Their Contribution to Cardiac Disease. Front Physiol. 28. November 2019;10:1436.
14. Freiburg A, Trombitas K, Hell W, Cazorla O, Fougerousse F, Centner T, u. a. Series of Exon-Skipping Events in the Elastic Spring Region of Titin as the Structural Basis for Myofibrillar Elastic Diversity. Circulation Research. 9. Juni 2000;86(11):1114–21.
15. Azubel M, Habib N, Sperling R, Sperling J. Native Spliceosomes Assemble with Pre-mRNA to Form Supraspliceosomes. Journal of Molecular Biology. 3. März 2006;356(4):955–66.

16. Haugen P, Simon DM, Bhattacharya D. The natural history of group I introns. *Trends in Genetics*. Februar 2005;21(2):111–9.
17. Amboss [Internet]. 2018. Verfügbar unter: <https://www-amboss-com.emedien.uni-muenchen.de/de/library#xid=0p0eLS>
18. Baumgartner M, Drake K, Kanadia RN. An Integrated Model of Minor Intron Emergence and Conservation. *Front Genet* [Internet]. 2019 [zitiert 18. Juni 2021];10. Verfügbar unter: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2019.01113/full>
19. Pessa HKJ, Ruokolainen A, Frilander MJ. The abundance of the spliceosomal snRNPs is not limiting the splicing of U12-type introns. *RNA*. Oktober 2006;12(10):1883–92.
20. Patel AA, McCarthy M, Steitz JA. The splicing of U12-type introns can be a rate-limiting step in gene expression. *EMBO J*. 15. Juli 2002;21(14):3804–15.
21. Bentley D. Rules of engagement: Co-transcriptional recruitment of pre-mRNA processing factors. *Current opinion in cell biology*. 1. Juli 2005;17:251–6.
22. Galganski L, Urbanek MO, Krzyzosiak WJ. Nuclear speckles: molecular organization, biological function and role in disease. *Nucleic Acids Res*. 13. Oktober 2017;45(18):10350–68.
23. Johnson TL, Vilardell J. Regulated pre-mRNA splicing: The ghostwriter of the eukaryotic genome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*. 1. Juni 2012;1819(6):538–45.
24. Shao C, Yang B, Wu T, Huang J, Tang P, Zhou Y, u. a. Mechanisms for U2AF to define 3' splice sites and regulate alternative splicing in the human genome. *Nat Struct Mol Biol*. November 2014;21(11):997–1005.
25. Gao K, Masuda A, Matsuura T, Ohno K. Human branch point consensus sequence is yUnAy. *Nucleic Acids Res*. April 2008;36(7):2257–67.
26. GRAINGER RJ, BEGGS JD. Prp8 protein: At the heart of the spliceosome. *RNA*. Mai 2005;11(5):533–57.
27. Singh RK, Cooper TA. Pre-mRNA splicing in disease and therapeutics. *Trends Mol Med*. August 2012;18(8):472–82.
28. Mao YS, Zhang B, Spector DL. Biogenesis and Function of Nuclear Bodies. *Trends Genet*. August 2011;27(8):295–306.
29. Berg JM, Tymoczko JL, Gatto GJ, Stryer L. *Stryer Biochemie*. 8. Auflage. Berlin [Heidelberg]: Springer Spektrum; 2018. 1401 S. (Lehrbuch).
30. Kashima I, Yamashita A, Izumi N, Kataoka N, Morishita R, Hoshino S, u. a. Binding of a novel SMG-1–Upf1–eRF1–eRF3 complex (SURF) to the exon junction complex triggers Upf1 phosphorylation and nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev*. 1. Februar 2006;20(3):355–67.
31. Weischenfeldt J, Damgaard I, Bryder D, Theilgaard-Mönch K, Thoren LA, Nielsen FC, u. a. NMD is essential for hematopoietic stem and progenitor cells and for eliminating by-

products of programmed DNA rearrangements. *Genes Dev.* 15. Mai 2008;22(10):1381–96.

32. Brogna S, Wen J. Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) mechanisms. *Nat Struct Mol Biol.* Februar 2009;16(2):107–13.

33. Sciarrillo R, Wojtuszkiewicz A, Assaraf YG, Jansen G, Kaspers GJL, Giovannetti E, u. a. The role of alternative splicing in cancer: From oncogenesis to drug resistance. *Drug Resist Updat.* Dezember 2020;53:100728.

34. Veuger MJT, Honders MW, Landegent JE, Willemze R, Barge RMY. High incidence of alternatively spliced forms of deoxycytidine kinase in patients with resistant acute myeloid leukemia. *Blood.* 15. August 2000;96(4):1517–24.

35. Klinke R, Papa HC, Kurtz A, Silbernagl S. *Physiologie.* 6. Stuttgart: Thieme; 2010.

36. Mueller D, Bach C, Zeisig D, Garcia-Cuellar MP, Monroe S, Sreekumar A, u. a. A role for the MLL fusion partner ENL in transcriptional elongation and chromatin modification. *Blood.* 15. Dezember 2007;110(13):4445–54.

37. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell.* März 2011;144(5):646–74.

38. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery.* 1. Januar 2022;12(1):31–46.

39. Davidow K, Mumanachit S, Mangum DS. The two-hit hypothesis in practice: Monozygotic twins with simultaneous hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia. *Pediatric Blood & Cancer* [Internet]. Oktober 2022 [zitiert 17. Oktober 2022];69(10). Verfügbar unter: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pbc.29885>

40. Wagener C, Müller O. *Molekulare Onkologie.* 3. Stuttgart: Thieme; 2010.

41. Weinberg RA. *The Biologie of Cancer.* 2. New York: Garland Science; 2014.

42. Faridi F, Ponnusamy K, Quagliano-Lo Coco I, Chen-Wichmann L, Grez M, Henschler R, u. a. Aberrant epigenetic regulators control expansion of human CD34+ hematopoietic stem/progenitor cells. *Front Genet* [Internet]. 2013 [zitiert 16. Oktober 2022];4. Verfügbar unter: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2013.00254/abstract>

43. Abdul-Nabi AM, Yassin ER, Varghese N, Deshmukh H, Yaseen NR. In Vitro Transformation of Primary Human CD34+ Cells by AML Fusion Oncogenes: Early Gene Expression Profiling Reveals Possible Drug Target in AML. Kashanchi F, Herausgeber. *PLoS ONE.* 27. August 2010;5(8):e12464.

44. Schulz WL, Rinder HM, Durant TJS, Tormey CA, Torres R, Smith BR, u. a. Impact of intra-tumoral heterogeneity detected by next-generation sequencing on acute myeloid leukemia survival. *Leukemia & Lymphoma.* 9. November 2020;61(13):3269–71.

45. Fu JF, Liang DC, Shih LY. Analysis of acute leukemias with MLL/ENL fusion transcripts: identification of two novel breakpoints in ENL. *Am J Clin Pathol.* Januar 2007;127(1):24–30.

46. J D Rowley. The role of chromosome translocations in leukemogenesis. *Semin*

Hematol. Oktober 1999;

47. Meyer C, Burmeister T, Gröger D, Tsaour G, Fechina L, Renneville A, u. a. The MLL recombinome of acute leukemias in 2017. *Leukemia*. Februar 2018;32(2):273–84.
48. Meyer C, Larghero P, Almeida Lopes B, Burmeister T, Gröger D, Sutton R, u. a. The KMT2A recombinome of acute leukemias in 2023. *Leukemia*. Mai 2023;37(5):988–1005.
49. Takahashi S, Yokoyama A. The molecular functions of common and atypical MLL fusion protein complexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*. 1. Juli 2020;1863(7):194548.
50. Meyer C, Hofmann J, Burmeister T, Gröger D, Park TS, Emerenciano M, u. a. The MLL recombinome of acute leukemias in 2013. *Leukemia*. November 2013;27(11):2165–76.
51. Marschalek R. The reciprocal world of MLL fusions: A personal view. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*. 1. Juli 2020;1863(7):194547.
52. Meyer C, Burmeister T, Strehl S, Schneider B, Hubert D, Zach O, u. a. Spliced MLL fusions: a novel mechanism to generate functional chimeric MLL-MLLT1 transcripts in t(11;19)(q23;p13.3) leukemia. *Leukemia*. März 2007;21(3):588–90.
53. Antunes ETB, Ottersbach K. The MLL/SET family and haematopoiesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*. 1. August 2020;1863(8):194579.
54. Jansen MWJC, Corral L, van der Velden VHJ, Panzer-Grümayer R, Schrappe M, Schrauder A, u. a. Immunobiological diversity in infant acute lymphoblastic leukemia is related to the occurrence and type of MLL gene rearrangement. *Leukemia*. April 2007;21(4):633–41.
55. Yu BD, Hanson RD, Hess JL, Horning SE, Korsmeyer SJ. MLL, a mammalian trithorax-group gene, functions as a transcriptional maintenance factor in morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1. September 1998;95(18):10632–6.
56. Yokoyama A, Somervaille TCP, Smith KS, Rozenblatt-Rosen O, Meyerson M, Cleary ML. The Menin Tumor Suppressor Protein Is an Essential Oncogenic Cofactor for MLL-Associated Leukemogenesis. *Cell*. 21. Oktober 2005;123(2):207–18.
57. Matkar S, Thiel A, Hua X. Menin: a scaffold protein that controls gene expression and cell signaling. *Trends in Biochemical Sciences*. August 2013;38(8):394–402.
58. Eidahl JO, Crowe BL, North JA, McKee CJ, Shkriabai N, Feng L, u. a. Structural basis for high-affinity binding of LEDGF PWWP to mononucleosomes. *Nucleic Acids Res*. April 2013;41(6):3924–36.
59. Letunic I, Bork P. PWWP-Domain. *Nucleic Acids Research*. 4. Januar 2018;46(D1):D493–6.
60. Čermáková K, Tesina P, Demeulemeester J, Ashkar SE, Méreau H, Schwaller J, u. a. Validation and Structural Characterization of the LEDGF/p75–MLL Interface as a New Target for the Treatment of MLL-Dependent Leukemia. *Cancer Res*. 15. September 2014;74(18):5139–51.

61. Cierpicki T, Risner LE, Grembecka J, Lukasik SM, Popovic R, Omonkowska M, u. a. Structure of the MLL CXXC domain – DNA complex and its functional role in MLL-AF9 leukemia. *Nat Struct Mol Biol.* Januar 2010;17(1):62–8.
62. Reeves R, Nissen MS. The A.T-DNA-binding domain of mammalian high mobility group I chromosomal proteins. A novel peptide motif for recognizing DNA structure. *Journal of Biological Chemistry.* Mai 1990;265(15):8573–82.
63. Aravind L. AT-hook motifs identified in a wide variety of DNA-binding proteins. *Nucleic Acids Research.* 1. Oktober 1998;26(19):4413–21.
64. Huth JR, Bewley CA, Nissen MS, Evans JNS, Reeves R, Gronenborn AM, u. a. The solution structure of an HMG-I(Y)–DNA complex defines a new architectural minor groove binding motif. *Nat Struct Mol Biol.* August 1997;4(8):657–65.
65. Aravind L. AT-hook motifs identified in a wide variety of DNA-binding proteins. *Nucleic Acids Research.* 1. Oktober 1998;26(19):4413–21.
66. Zhou J, Ng Y, Chng WJ. ENL: structure, function, and roles in hematopoiesis and acute myeloid leukemia. *Cell Mol Life Sci.* November 2018;75(21):3931–41.
67. Filarsky M, Zillner K, Araya I, Villar-Garea A, Merkl R, Längst G, u. a. The extended AT-hook is a novel RNA binding motif. *RNA Biology.* 3. August 2015;12(8):864–76.
68. Caslini C, Shilatfard A, Yang L, Hess JL. The amino terminus of the mixed lineage leukemia protein (MLL) promotes cell cycle arrest and monocytic differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 14. März 2000;97(6):2797–802.
69. Lu X, Simon MD, Chodaparambil JV, Hansen JC, Shokat KM, Luger K. The effect of H3K79 dimethylation and H4K20 trimethylation on nucleosome and chromatin structure. *Nat Struct Mol Biol.* Oktober 2008;15(10):1122–4.
70. Marschalek R. MLL leukemia and future treatment strategies. *Arch Pharm (Weinheim).* April 2015;348(4):221–8.
71. Luca AD, Falco MD, Baldi A, Paggi MG. Cyclin T: Three forms for different roles in physiological and pathological functions. *Journal of Cellular Physiology.* 2003;194(2):101–7.
72. ENL-Genetischer Code Exons. In [zitiert 17. Oktober 2022]. Verfügbar unter: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_005934.4
73. ENL-YEATS Domäne. In [zitiert 14. Oktober 2022]. Verfügbar unter: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q03111/entry>
74. Hsieh JJD, Ernst P, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Korsmeyer SJ. Proteolytic Cleavage of MLL Generates a Complex of N- and C-Terminal Fragments That Confers Protein Stability and Subnuclear Localization. *Molecular and Cellular Biology.* 1. Januar 2003;23(1):186–94.
75. Stavropoulou V, Almosailekh M, Royo H, Spetz JF, Juge S, Brault L, u. a. A Novel Inducible Mouse Model of MLL-ENL-driven Mixed-lineage Acute Leukemia. *HemaSphere.* August 2018;2(4):e51.

76. Solier S, Müller S, Cañeque T, Versini A, Mansart A, Sindikubwabo F, u. a. A druggable copper-signalling pathway that drives inflammation. *Nature*. 11. Mai 2023;617(7960):386–94.
77. Labor für Leukämiediagnostik der Medizinischen Klinik III, LMU Klinikum München /AG Spieckermann. Cytospins.
78. Panagopoulos I, Heim S. Neoplasia-associated Chromosome Translocations Resulting in Gene Truncation. *Cancer Genomics Proteomics*. 2022;19(6):647–72.
79. Tighe JE, Calabi F. Alternative, out-of-frame runt/MTG8 transcripts are encoded by the derivative (8) chromosome in the t(8;21) of acute myeloid leukemia M2. *Blood*. 1. Oktober 1994;84(7):2115–21.
80. Miyoshi H, Kozu T, Shimizu K, Enomoto K, Maseki N, Kaneko Y, u. a. The t(8;21) translocation in acute myeloid leukemia results in production of an AML1-MTG8 fusion transcript. *The EMBO Journal*. Juli 1993;12(7):2715–21.
81. Miriami E, Sperling R, Sperling J, Motro U. Regulation of splicing: The importance of being translatable: FIGURE 1. *RNA*. Januar 2004;10(1):1–4.
82. Galante PAF, Sakabe NJ, Kirschbaum-Slager N, De Souza SJ. Detection and evaluation of intron retention events in the human transcriptome. *RNA*. Mai 2004;10(5):757–65.
83. Öther-Gee Pohl S, Myant KB. Alternative RNA splicing in tumour heterogeneity, plasticity and therapy. *Disease Models & Mechanisms*. 1. Januar 2022;15(1):dmm049233.
84. Grinev VV, Barneh F, Ilyushonak IM, Nakjang S, Smink J, Van Oort A, u. a. RUNX1/RUNX1T1 mediates alternative splicing and reorganises the transcriptional landscape in leukemia. *Nat Commun*. 22. Januar 2021;12(1):520.
85. Meyer C, Burmeister T, Strehl S, Schneider B, Hubert D, Zach O, u. a. Spliced MLL fusions: a novel mechanism to generate functional chimeric MLL-MLLT1 transcripts in t(11;19)(q23;p13.3) leukemia. *Leukemia*. März 2007;21(3):588–90.
86. Monteuuis G, Wong JLL, Bailey CG, Schmitz U, Rasko JEJ. The changing paradigm of intron retention: regulation, ramifications and recipes. *Nucleic Acids Research*. 14. November 2019;gkz1068.
87. Tan K, Stupack DG, Wilkinson MF. Nonsense-mediated RNA decay: an emerging modulator of malignancy. *Nat Rev Cancer*. August 2022;22(8):437–51.
88. Rogalska ME, Vivori C, Valcárcel J. Regulation of pre-mRNA splicing: roles in physiology and disease, and therapeutic prospects. *Nat Rev Genet*. April 2023;24(4):251–69.
89. North K, Benbarche S, Liu B, Pangallo J, Chen S, Stahl M, u. a. Synthetic introns enable splicing factor mutation-dependent targeting of cancer cells. *Nat Biotechnol*. Juli 2022;40(7):1103–13.
90. Stanley RF, Abdel-Wahab O. Dysregulation and therapeutic targeting of RNA splicing in cancer. *Nat Cancer*. 27. Mai 2022;3(5):536–46.

91. Lee SCW, Dvinge H, Kim E, Cho H, Micol JB, Chung YR, u. a. Modulation of splicing catalysis for therapeutic targeting of leukemia with mutations in genes encoding spliceosomal proteins. *Nat Med.* Juni 2016;22(6):672–8.
92. Bieberstein NI, Carrillo Oesterreich F, Straube K, Neugebauer KM. First Exon Length Controls Active Chromatin Signatures and Transcription. *Cell Reports.* Juli 2012;2(1):62–8.
93. Furger A, Binnie JMO Alexandra, Lee BA, Proudfoot NJ. Promoter proximal splice sites enhance transcription. *Genes Dev.* 1. November 2002;16(21):2792–9.
94. Damgaard CK, Kahns S, Lykke-Andersen S, Nielsen AL, Jensen TH, Kjems J. A 5' Splice Site Enhances the Recruitment of Basal Transcription Initiation Factors In Vivo. *Molecular Cell.* Februar 2008;29(2):271–8.
95. Mimoso CA, Adelman K. U1 snRNP increases RNA Pol II elongation rate to enable synthesis of long genes. *Molecular Cell.* April 2023;83(8):1264-1279.e10.
96. Brinster RL, Allen JM, Behringer RR, Gelinas RE, Palmiter RD. Introns increase transcriptional efficiency in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* Februar 1988;85(3):836–40.
97. Reed R, Hurt E. A Conserved mRNA Export Machinery Coupled to pre-mRNA Splicing. *Cell.* Februar 2002;108(4):523–31.
98. Khabirova E, Jardine L, Coorens THH, Webb S, Treger TD, Engelbert J, u. a. Single-cell transcriptomics reveals a distinct developmental state of KMT2A-rearranged infant B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med.* April 2022;28(4):743–51.
99. Supek F, Lehner B, Lindeboom RGH. To NMD or Not To NMD: Nonsense-Mediated mRNA Decay in Cancer and Other Genetic Diseases. *Trends in Genetics.* Juli 2021;37(7):657–68.
100. Wong JYL, Ritchie W, Ebner OA, Selbach M, Wong JWH, Huang Y, u. a. Orchestrated Intron Retention Regulates Normal Granulocyte Differentiation. *Cell.* August 2013;154(3):583–95.
101. Lu SX, De Neef E, Thomas JD, Sabio E, Rousseau B, Gigoux M, u. a. Pharmacologic modulation of RNA splicing enhances anti-tumor immunity. *Cell.* Juli 2021;184(15):4032-4047.e31.

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung I.1 Graphische Darstellung der Arbeit.....	III
Abbildung 1.1 Schematische Darstellung der Hämatopoiese im Menschen.....	2
Abbildung 1.2 Schematische Darstellung des Spleißvorgangs eines <i>Major Introns</i>	7
Abbildung 1.3 Funktionelle Abschnitte von KMT2A (51).....	12
Abbildung 1.4 Fusionsbereich von <i>pMizi-MLL-ENL-i-GFP</i>	12
Abbildung 1.5 Funktionelle Abschnitte von MLLT1 mit wichtigen Bindungspartnern der ANC1-homologen-Domäne (ADH).	15

Verzeichnisse

Abbildung 2.1: Auf den ersten Blick erkennbar: KMT2A::MLLT1-Fusionsprotein expremierende Zellen.....	16
Abbildung 3.1. Aufbau der Transferkassette	28
Abbildung 4.1. Für die Herleitung der Arbeitshypothese benötigte Grundkonstrukte KMT2A::MLLT1 mit und ohne intronischer Sequenz im Translokationsbereich.	31
Abbildung 4.2. Nachweis des KMT2A::MLLT1 Fusionsproteins.....	32
Abbildung 4.3. Konstrukte zum Nachweis des Alternativen Spleißens.	33
Abbildung 4.4 Nachweis des kurzen KMT2A-Proteins.....	34
Abbildung 4.5 Darstellung des Fusionsproteins nach.....	35
Abbildung 4.6 Schematische Darstellung von KMT2A::MLLT1/GFP mit intronischer Sequenz im Translokationsbereich..	36
Abbildung 4.7 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von KMT2A::MLLT1/eGFP transfizierten 293T Zellen.....	36
Abbildung 4.8 Western Blot mit Nachweiß eines KMT2A::MLLT1-eGFP Fusionsproteins.	37
Abbildung 4.9 KMT2A-Genkonstrukte zur Überprüfung der Notwendigkeit des MLLT1-Anteils.	39
Abbildung 4.10 Herauswachsen humaner CD34+ Zellen, die mit den verschiedenen KMT2A::MLLT1 Konstrukten transduziert wurden.....	40
Abbildung 4.11 Ergebnisse der webbasierten Spleißstellensuche	41
Abbildung 4.12 Ausschnitt aus der Proteinsequenz der Spleißstelle von KMT2A::MLLT1 mit intronischer Sequenz in 1-BCode.....	42
Abbildung 4.13 Schematische Darstellung der Konstrukte zur Überprüfung der Spleißnotwendigkeit für die leukämogene Funktion..	43
Abbildung 4.14 Ergebnis der FACS-Messreihe.....	44
Abbildung 4.15 Auswachsverhalten von hCD34+ Zellen	45
Abbildung 4.16 Kolonieformende Einheiten (CFU)	46
Abbildung 4.17 CD-Markerbestimmung.....	47
Abbildung 4.18 Morphologie der KMT2A::MLLT1	48

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1 Beispiele von Fusionsgenen mit <i>Single-hit</i> Expansionseigenschaft und die zugrundeliegende Literatur. Diese können unter Laborbedingungen bereits alleinig zu einer Vermehrung von Blutstammzellen führen (42)(43). Quelle: eigene Darstellung.....	10
Tabelle 3.1. Verwendete Zellen. Für unterschiedliche Anwendungsgebiete wurden die jeweils geeigneten Zellen gewählt.....	17
Tabelle 3.2. Verwendete Geräte. Hersteller und Bezeichnung der für die Experimente nötigen Geräte.	18
Tabelle 3.3: Reagenzien und Inhaltsstoffe des humanen Stammzellmediums. Hersteller und genaue Bezeichnung für die Herstellung des verwendeten Stammzellmediums.	19
Tabelle 3.4. Reagenzien und Medien für die Molekularbiologie. Hersteller der verwendeten Substanzen mit genauer Bezeichnung.....	20

7.4 Abkürzungsverzeichnis

A	Adeninbase
AEP	AFF1-MLLT1-P-TEFb Komplex
AFF1	ALF Transcription Elongation Factor 1; früher AF4
AFF2	ALF Transcription Elongation Factor 2; früher FMR2
AFF3	ALF Transcription Elongation Factor 3; früher LAF4
AFF4	ALF Transcription Elongation Factor 4; früher AF5Q31
AHD	ANC1 homologe Domäne
AML	Akute myeloische Leukämie
APC	Allophycocyanin
ATMZH	Abteilung für Transfusionsmedizin, Zelltherapeutika und Hämostaseologie
ATP	Adenosintriphosphat
B-Lymphozyt	Bone Marrow-Lymphocyt/ Knochenmarklymphozyt
B(P)S	Branching (Point) Side/ Verzweigungsstelle
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosinbase
°C	Grad Celsius
CD	Cluster of differentiation/ Differenzierungscluster
CDK	Cyclin-dependent Kinase/ Cyclin-abhängige Kinase
CFU	Colony forming Units/ Kolonieformende Einheiten
cm	Zentimeter
CMP	Common-Myeloid-Progenitor/ Myeloische Progenitorzelle
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
C-Terminus	Carboxyl-Terminus
del	Deleted/ Entfernt
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DH5α	Spezielle Escherichia coli-Stämme; konstruiert von Douglas Hanahan
DMEM	Dulbeccos Modified Eagles Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOT1L	Disruptor of telomeric silencing 1-like
DPBS	Dulbecco's Balanced Salt Solution
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
eGFP	Engineered / konstruiertes grün fluoreszierendes Protein
ENL	Eleven-Nineteen-Leukemia Protein/ MLLT1
ETO	RUNX1 Partner Transcriptional Co-Repressor 1, RUNX1T1
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting/ Durchflusszytometrie
FBS	Fetal Bovine Serum/ Fetales Kälberserum
FLT	FMS-verwandte Tyrosinkinase
FL-3-A/-W	FACS-Fluoreszenzkanal der Wellenlänge 670 nm mit Pulsfläche/Pulsbreite
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
G	Guaninbase
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GM	Granulozyten und Makrophagen
GMP	Granulozyten und Makrophagen-Progenitorzellen
G0/1	Gap-0/1
HA	Hämagglutinin

Verzeichnisse

HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
hCSF	Human Colony-stimulating Factor/ Humaner koloniestimulierender Faktor
hIL	Humanes Interleukin
hMBM	Hochaffines Meninbindemotiv
hnRNA	Heterogene nukleäre Ribonukleinsäure
HSC	Hämatopoetische Stammzelle
hSCF	Human Stem Cell Factor/ humaner Stammzellefaktor
hTPO	Humanes Thrombopoietin
H3K79	HistonH3 Lysin79
IBD	PSIP1-Integrase-Bindungsdomäne
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
IRES	Internal Ribosome Entry Side/ Interne Ribosomen Eintrittsstelle
ISO	Isotypenkontrolle
kDa	Kilodalton
KMT2A	Histon-Lysin N-Methyltransferase 2A; früher: MLL
LB	Lyogeny Broth/ Komplexes Nährmedium
LBD	LEDGF-Bindedomäne, siehe IBD
LEDGF	Lens Epithelium-derived Growth Factor, siehe PSIP1
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
µg	Mikrogramm
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mM	Millimolar
MLL	Mixed-Lineage Leukemia1/ Histon-Lysin N-Methyltransferase 2A (KMT2A)
MLLT1	MLLT1 Super Elongation Komplex Untereinheit; früher: ENL
MLLT10	MLLT10 Histon Lysin Methltransferase DOT1L Cofaktor; früher AF10
MP	Milchpulver
MPP	Multipotente Progenitorzellen
mRNA	Messenger RNA/ Boten-Ribonukleinsäure
ng	Nanogramm
n	Stichprobengröße
nm	Nanometer
NMD	Nonsense mediated mRNA Decay
N-Terminus	Amino-Terminus
p	Region des kurzen Chromosomenarms
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phospaht Buffered Saline/ Phosphatgepufferte Salzlösung
PBS+T	Phosphatgepufferte Salzlösung mit Polyoxyethylen(20)-Sorbinmonolaurat
PCR	Polymerase Chain Reaction/ Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PEN-STREP	Penicillin-Streptomycin-Lösung
PEI	Polyethlemin
PI	Proteininteraktionsdomäne
PRPF8	Pre-mRNA-Processing-Spleißfaktor 8
PS	Phosphatidlyserin
PSIP1	PC4 And SFRS1 Interacting Protein 1, binder an IBD; früher LEDGF
PTS	Premature Termination Signal/ Vorzeitiges Terminationssignal
P-TEFb	Positiven Transkriptions Elongations Faktor b

Verzeichnisse

PVDF	Polyvinylidenfluorid
PWWP	Prolin-Tryptophan-Tryptophan-Prolin
q	Region des langen Chromosomenarms
RN	Retronektin
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Runden pro Minute
RT	Raumtemperatur
RUNX1	Runt-related Transcription Factor 1/ AML1
RUNX1T1	RUNX1 Partner Transcriptional Co-Repressor 1, früher ETO
SA	Spleißakzeptor
SD	Speißdonor
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate/ Natriumlaurylsulfat
SET	Su(var)3-9, Enhancer-of-zeste und Trithorax
SF1	Spleißfaktor 1
snRNA	Small Nuclear Ribonucleic Acid/ kleine nukleäre Ribonukleinsäure
snRNP	Small Nuclear Ribonucleic Protein/ kleine nukleäre Ribonukleoproteine
S.O.C.	Super Optimal Broth / Komplexes Nährmedium
T	Thyminbase
t	Translokation
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TC	Tissue Culture/ Gewebekultur
TEMED	Tetramethylethyldiamin
T-Lymphozyt	Thymus-Lymphozyt
TRIS	Trisaminomethan
U	Uracilbase
UV	Ultraviolette Strahlung
U2AF	U2-auxiliary-factor/ U2-Hilfsfaktor
V	Volt
Wt	Wildtyp
1BCode	Einbuchstabencode

8 Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Spannagl für die Bereitstellung des Laborplatzes in der Abteilung Transfusionsmedizin, Zelltherapeutika und Hämostaseologie, Experimentelle Zelltherapie am Klinikum Großhadern der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Insbesondere möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Betreuer Herrn PD Dr. Christian Wichmann als Leiter der Experimentellen Zelltherapie für die freundliche und umfangreiche Betreuung, die fachliche Unterstützung, sowie für die sehr hilfreichen Ideen und seine Motivation bedanken, die eine angenehme Zusammenarbeit ermöglicht haben.

Ein besonderer Dank gilt meinen Kolleginnen und Kollegen im Labor für die großartige Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre, sowie für jede fachliche Unterstützung. Speziell möchte ich mich bei Frau Dr. Linping Chen-Wichmann für die vielseitigen labortechnischen und methodischen Unterstützungen und Ratschläge während der Bearbeitung meiner Dissertation bedanken.

Vor allem aber möchte ich meiner Familie und meinen Freunden von ganzem Herzen für ihre unerschöpfliche Geduld und ihr Verständnis, das sie mir insbesondere während meines Studiums gezeigt haben, danken.

9 Eidesstattliche Versicherung

Nina Vanessa Pirschtat, geboren am 15. April 1994 in Oberhausen im Rheinland

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema:

Vergleich und Charakterisierung zweier retroviraler KMT2A::MLLT1-Konstrukte mit und ohne intronischer Sequenz im Translokationsbereich

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Mülheim, den 15. November 2024

Nina Vanessa Pirschtat

10 Veröffentlichungen

Windisch R, **Pirschtat N**, Kellner C, Chen-Wichmann L, Lausen J, Humpe A, Krause DS, and Wichmann C: Oncogenic deregulation of cell adhesion molecules in leukemia. **Cancers** (Basel). 2019;11(3):311. doi:10.3390/cancers11030311. **IF 5.2**

Windisch R, **Pirschtat N**, Soliman S, Chen-Wichmann L, Kellner C, Setzer S, Shvartsman M, Herold T, Humpe A, Greif PA, Wichmann C: Unexpected properties of a novel t(11;19) out-of-frame MLL fusion gene in expanding human CD34+ blood progenitor cells resembling acute myelomonoblastic leukemia AML M4/5. **ACUTE LEUKEMIAS XVII Biology and Treatment Strategies, Munich, February 24-27, 2019. Ann Hematol 98 (Suppl. 1):S5.**

Soliman S, Windisch R, **Pirschtat N**, Setzer S, Chen-Wichmann L, Humpe A, Wichmann C: Engineering of inducible transcription factors (iTFs) to explore human ex vivo CD34+ cell expansion and differentiation. **51. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie (DGTI), Lübeck, September 19-21, 2018. Transfus Med Hemother 45 (Suppl. 1): 9.**

Pirschtat N, Soliman S, Windisch R, Chen-Wichmann L, Kellner C, Humpe A, Greif P.A., Wichmann C: A t(11;19) out-of-frame MLL fusion gene expands human CD34+ blood progenitor cells resembling acute myelomonoblastic leukemia AML M4/5. **International Symposium Cancer Evolution, Munich, March 1-3, 2018.**