

Aus der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Onkologie und Hämatologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Induzierbare *ETV6-RUNX1* Repression im humanen Zellmodell
akuter lymphoblastischer Leukämie – Auswirkungen auf das
Wachstumsverhalten und den JAK-STAT Signalweg

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Ivo Noack

aus Berlin

Datum der Promotion: 17.09.2021

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	8
TABELLENVERZEICHNIS	10
ABSTRACT (DEUTSCH)	11
ABSTRACT (ENGLISH)	13
1. EINLEITUNG	14
1.1 Akute lymphoblastische Leukämie im Kindesalter	14
1.2 <i>ETV6-RUNX1</i> positive ALL	15
1.3 JAK-STAT Signalweg.....	19
1.4 Induzierbare Genexpression mittels Tet-On System.....	20
1.5 <i>Gene silencing</i> mittels RNA Interferenz	21
1.6 pLT3GEPIR mit miR-E <i>enhanced backbone</i>	22
1.7 Zielsetzung	23
2. METHODIK	25
2.1 Material.....	25
2.1.1 Medien und Zusätze.....	25
2.1.2 Chemikalien und Enzyme.....	25
2.1.3 Puffer und Lösungen	26
2.1.4 Verbrauchsmittel	27
2.1.5 Kits	27
2.1.6 Geräte	28
2.1.7 Software	28
2.1.8 Antikörper	29
2.1.9 Plasmide.....	29
2.1.9.1 pMD2.G	30
2.1.9.2 psPAX2.....	30
2.1.9.3 mPB.....	30
2.1.9.4 mPB-SM	30
2.1.9.5 pRRLSIN.cPPT.PGK-GFP.WPRE.....	30
2.1.9.6 pPB.tetR.ETV6-RUNX1.1-796.mC	30
2.1.9.7 pLT3GEPIR	31
2.1.10 Oligonukleotide.....	32
2.1.11 Zelllinien und Mikroorganismen.....	34

2.1.11.1	<i>Escherichia coli</i> NEB5α	34
2.1.11.2	HEK 293T	34
2.1.11.3	HAP1	34
2.1.11.4	SEM.....	35
2.1.11.5	KG-1	35
2.1.11.6	HEL.....	35
2.1.11.7	THP-1	35
2.1.11.8	REH	35
2.1.11.9	UoC-B6.....	35
2.1.11.10	AT-2.....	36
2.2	Methoden	36
2.2.1	Zellkulturmethoden.....	36
2.2.1.1	Kultivierung von adhärenenten Zellen	36
2.2.1.2	Kultivierung von Suspensionszellen.....	37
2.2.1.3	Kultivierung von Bakterien.....	37
2.2.1.4	Bestimmung der Zellzahl.....	37
2.2.1.5	Kryokonservierung und Reaktivierung von Zellen	37
2.2.1.6	Transfektion von adhärenenten Zellen.....	38
2.2.1.7	Produktion von Lentiviren.....	38
2.2.1.8	Lentivirale Transduktion von Suspensionszellen.....	39
2.2.1.9	Selektieren von Klonen.....	39
2.2.1.10	Regulation des Tet-On Systems mittels Doxycyclin	39
2.2.1.11	Wachstumsanalyse	39
2.2.1.12	Mykoplasmen-PCR.....	40
2.2.2	Klonierungen	40
2.2.2.1	<i>Annealing</i>	40
2.2.2.2	Restriktionsverdau.....	40
2.2.2.3	Gelelektrophorese	41
2.2.2.4	DNA Purifikation aus Agarosegel	41
2.2.2.5	Ligation	41
2.2.2.6	Transformation	42
2.2.2.7	DNA-Amplifikation und Purifikation aus <i>E. coli</i>	42
2.2.2.8	Bestimmung der DNA-Konzentration	42
2.2.2.9	Sequenzierung der DNA.....	42
2.2.3	Analyse von Genexpressionsdaten.....	43
2.2.4	Durchflusszytometrie.....	44
2.2.4.1	Färbung von Oberflächenproteinen.....	44

2.2.4.2	Färbung von intrazellulären Proteinen.....	45
2.2.4.3	Präparation für Fluoreszenzproteinanalysen.....	45
2.2.5	XTT-Viabilitätsassay.....	45
2.2.5.1	Puromycin <i>kill-curves</i>	46
2.2.5.2	Zytokin-Viabilitätsassays	46
2.2.6	Immunzytochemie für die Fluoreszenzmikroskopie	47
2.2.7	Auswertung der immunzytochemischen Analysen	48
3.	ERGEBNISSE	49
3.1	Charakterisierung <i>ETV6-RUNX1</i> positiver BVZ-ALL Zelllinien	49
3.1.1	REH.....	49
3.1.2	UoC-B6.....	51
3.1.3	AT-2.....	53
3.2	JAK-STAT in <i>ETV6-RUNX1</i> positiven BVZ-ALL Zelllinien	56
3.2.1	Expression von Rezeptoren des JAK-STAT Signalwegs	56
3.2.2	Oberflächenexpression der Zytokinrezeptoren für IL-7, IL-9, EPO	58
3.2.3	XTT-Viabilitätsassay von IL-7, IL-9 und EPO.....	60
3.3	Induzierbares <i>ETV6-RUNX1 silencing</i> in BVZ-ALL Zelllinien.....	61
3.3.1	Herstellung des Plasmids LT3GEPiR	62
3.3.2	Herstellung des Reporterzellmodells HAP1 ER1+ mCh+	63
3.3.3	<i>ETV6-RUNX1 silencing</i> im Reporterzellmodell	64
3.3.4	Lentivirale Transduktion der BVZ-ALL Zelllinien	65
3.3.5	<i>ETV6-RUNX1</i> Fusionsprotein nach genetischem <i>silencing</i>	67
3.3.5.1	Durchflusszytometrische Analysen von <i>ETV6-RUNX1</i>	67
3.3.5.2	Fluoreszenzmikroskopische Analysen von <i>ETV6-RUNX1</i>	69
3.4	Auswirkungen des <i>ETV6-RUNX1 knockdowns</i> in REH	73
3.4.1	Zellwachstum und Zellmorphologie nach <i>ETV6-RUNX1 knockdown</i>	73
3.4.2	Differenzierungsmarker nach <i>ETV6-RUNX1 knockdown</i>	78
3.4.3	Oberflächenexpression von IL-7R α nach <i>ETV6-RUNX1 knockdown</i>	80
4.	DISKUSSION	83
4.1	Zusammenfassung.....	83
4.2	Charakterisierung der BVZ-ALL Zelllinien REH, UoC-B6 und AT-2.....	84
4.3	Analysen des JAK-STAT Signalwegs in <i>ETV6-RUNX1</i> positiver ALL	85
4.4	Induzierbarer <i>ETV6-RUNX1 knockdown</i> in BVZ-ALL Zelllinien	89
4.5	Zellwachstum und Zellmorphologie nach <i>ETV6-RUNX1 knockdown</i>	94
4.6	JAK-STAT Signalweg nach <i>ETV6-RUNX1 knockdown</i>	98
4.7	Schlussfolgerungen.....	100

5.	LITERATURVERZEICHNIS	102
6.	ANHANG	111
6.1	Genexpression von Rezeptoren des JAK-STAT Signalwegs in <i>ETV6-RUNX1</i> positiver ALL.....	111
7.	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	115
8.	CURRICULUM VITAE	116
9.	DANKSAGUNG	116

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ALL	Akute lymphoblastische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
BSA	Bovines Serumalbumin
BVZ-ALL	B-Vorläuferzell-ALL
CBF	<i>core binding factor</i>
ChIP-on-Chip	<i>chromatin immunoprecipitation DNA microarray</i>
ChIP-Seq	<i>chromatin immunoprecipitation DNA sequencing</i>
CML	Chronische myeloische Leukämie
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CNA	<i>copy number alteration</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EPO	Erythropoietin
FI	Fluoreszenzintensität
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FKS	Fetales Kälberserum
HAT	Histonacetyltransferase
HDAC	Histondeacetylase
IL	Interleukin
JAK	Januskinase
ITS	Insulin-Transferrin-Selenium
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
MAS5	<i>MicroArraySuite5.0</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
miRNA	<i>micro ribonucleic acid</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PE	Phycoerythrin

PEI	Polyethylenimin
PMS	Phenazinmethosulfat
qPCR	<i>real-time quantitative PCR</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RMA	<i>robust multiarray average</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
rtTA	<i>reverse tetracycline-induced transactivator</i>
SAM	<i>sterile alpha motif</i>
shRNA	<i>short hairpin ribonucleic acid</i>
siRNA	<i>short interfering ribonucleic acid</i>
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
STR	<i>short tandem repeat</i>
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TetR	Tet Repressor
<i>tetO</i>	<i>Tet Operator</i>
TPM	<i>transcript per million</i>
TRE	<i>tet responsive element</i>
<i>tTa</i>	<i>tetracycline-induced transactivator</i>
XTT	2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Wirkmechanismus des Transkriptionsfaktors RUNX1	16
Abbildung 2:	Wirkmechanismus des leukämogenen Fusionsproteins ETV6-RUNX1.....	17
Abbildung 3:	Schematische Darstellung des Tet-On Systems.....	21
Abbildung 4:	RNA Interferenz mittels miRNA.....	22
Abbildung 5:	Schematische Darstellung des Tet-regulierten Vektors LT3GEPIR.....	23
Abbildung 6:	Transferplasmid pPB.tetR.ETV6-RUNX1.1-796.mC.....	31
Abbildung 7:	Transferplasmid pLT3GEPIR	32
Abbildung 8:	Karyogramm von REH	49
Abbildung 9:	Immunzytochemischer Nachweis der ETV6-RUNX1 Expression in REH Zellen	50
Abbildung 10:	Puromycin <i>kill-curve</i> in REH Zellen.....	51
Abbildung 11:	Karyogramm von UoC-B6	51
Abbildung 12:	Immunzytochemischer Nachweis der ETV6-RUNX1 Expression in UoC-B6 Zellen	52
Abbildung 13:	Puromycin <i>kill-curve</i> in UoC-B6 Zellen.....	53
Abbildung 14:	Karyogramm von AT-2	54
Abbildung 15:	Immunzytochemischer Nachweis der ETV6-RUNX1 Expression in AT-2 Zellen	55
Abbildung 16:	Puromycin <i>kill-curve</i> in AT-2 Zellen.....	55
Abbildung 17:	Streudiagramme der Expressionsdaten von JAK-STAT Genen in REH.....	56
Abbildung 18:	Immunzytochemische Analysen der IL-7 Rezeptorexpression	59
Abbildung 19:	Immunzytochemische Analyse der EPO Rezeptorexpression.....	59
Abbildung 20:	XTT Assay nach Inkubation mit IL-7	60
Abbildung 21:	XTT Assay nach Inkubation mit IL-9	61
Abbildung 22:	Schematische Darstellung der Plasmidherstellung von pLT3GEPIR mit den jeweiligen shRNA Zielsequenzen.....	62
Abbildung 23:	HAP1 <i>ETV6-RUNX1</i> positive Reporterzellmodelle mit <i>mCherry</i> Fluoreszenz im Vergleich	63
Abbildung 24:	<i>ETV6-RUNX1 silencing</i> im Reporterzellmodell HAP1 ER1+ mCh+ Klon A5 ..	64
Abbildung 25:	<i>ETV6-RUNX1 silencing</i> im Reporterzellmodell HAP1 ER1+ mCh+ Klon F8 ..	65
Abbildung 26:	EGFP Signal nach 24 Stunden Doxycyclin-Gabe in REH LT3GEPIR shREN Zellen	67
Abbildung 27:	Immunzytochemische Analysen von ETV6-RUNX1 nach genetischem <i>silencing</i>	68

Abbildung 28:	Zelluläres Verteilungsmuster des ETV6-RUNX1 Signals nach genetischem <i>silencing</i>	69
Abbildung 29:	Exemplarische konfokalmikroskopische Aufnahmen durch die Äquatorialebene nach shRNA Expression für 30 Tage in den einzelnen Farbkanälen	70
Abbildung 30:	Fluoreszenzmikroskopische Analysen von ETV6-RUNX1 im Zellkern nach 30-tägiger shRNA Expression	72
Abbildung 31:	Zellwachstum nach induziertem <i>ETV6-RUNX1 silencing</i>	74
Abbildung 32:	Kompetitiver Proliferationsassay nach induziertem <i>ETV6-RUNX1 silencing</i> ..	75
Abbildung 33:	Anteil an Zelldebris nach shRNA Expression für 34 Tage bzw. für 11 Tage ..	76
Abbildung 34:	Apoptose nach <i>ETV6-RUNX1 silencing</i> in REH	77
Abbildung 35:	Streudiagramm von shETV6_819 Pool Zellen nach <i>ETV6-RUNX1 silencing</i> ..	78
Abbildung 36:	Expression der B-Zell-Differenzierungsmarker CD19, CD21, CD38 und CD40	79
Abbildung 37:	Expression von CD72 nach 38 Tagen shRNA Expression in REH Zellen mit verschiedenen Zielsequenzen der shRNA gegen <i>ETV6</i>	80
Abbildung 38:	IL-7R α Expression in REH LT3GEPiR shETV6_819 Zellen nach 28 Tagen Inkubation mit Doxycyclin im Vergleich zu den Kontrollzellen	81
Abbildung 39:	Relative Fluoreszenzintensität (FI) von IL-7R α in Bezug auf die jeweilige Kontrolle ohne Doxycyclin	82

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Zellkulturbedingungen	36
Tabelle 2:	Verwendete Antikörperkonzentrationen für ETV6-RUNX1 Färbungen	48
Tabelle 3:	Zytokinrezeptoren des JAK-STAT Signalwegs mit Genexpression aller funktional relevanten Untereinheiten in <i>ETV6-RUNX1</i> positiver ALL.....	57
Tabelle 4:	Zytokinrezeptoren des JAK-STAT Signalwegs mit herunterregulierter Genexpression in <i>ETV6-RUNX1</i> positiver ALL	57
Tabelle 5:	Relative Fluoreszenzintensität (FI) nach 8 Tagen shRNA Expression im Reporterzellmodell HAP1 ER1+ mCh+ Klon F8.....	65
Tabelle 6:	Genexpression von Rezeptoren des JAK-STAT Signalwegs in <i>ETV6-</i> <i>RUNX1</i> positiver ALL	111

ABSTRACT (Deutsch)

Die bei etwa 25% der B-Vorläuferzell akuten lymphoblastischen Leukämien (BVZ-ALL) im Kindesalter zu findende Chromosomentranslokation t(12;21) resultiert in der Bildung des chimären Fusionsproteins ETV6-RUNX1. Trotz des hohen Forschungsinteresses der vergangenen Jahre, basierend auf der hohen Prävalenz der chromosomalen Veränderung, ist diese zur Leukämieentstehung essenziell beitragende Fusion zweier Transkriptionsfaktoren auf molekularer Ebene noch weitestgehend unerforscht. Mit dieser Arbeit soll durch die Etablierung eines Modells zur induzierbaren Repression von *ETV6-RUNX1* in BVZ-ALL Zelllinien sowie der systematischen Analyse des JAK-STAT Signalwegs zum besseren Verständnis des Fusionsproteins beigetragen werden.

Hierfür wurden zunächst Rezeptoren des JAK-STAT Signalwegs mittels *in silico* Analysen, Durchflusszytometrie sowie XTT-Viabilitätsassays untersucht. Anschließend erfolgte nach Klonierung von mehreren shRNA Zielsequenzen gegen *ETV6* in ein Plasmid mit einem miR-E *enhanced backbone* die Auswahl der effektivsten Sequenzen mithilfe eines Reporterzellmodells. Die ausgewählten Plasmide wurden lentiviral in die BVZ-ALL Zelllinien REH, UoC-B6 und AT-2 transduziert. Der *knockdown* von ETV6-RUNX1 wurde durchflusszytometrisch sowie konfokalmikroskopisch quantifiziert, anschließend erfolgten Wachstumsanalysen, Analysen zur Apoptose sowie immunzytometrische Untersuchungen von Differenzierungsmarkern und Rezeptoren des JAK-STAT Signalwegs.

Es konnten *in silico* neun verschiedene Rezeptoren des JAK-STAT Signalwegs identifiziert werden, die in ihrer vollen funktionellen Form in den *ETV6-RUNX1* positiven Zelllinien REH, UoC-B6, AT-2 sowie in primären *ETV6-RUNX1* positiven Blasten exprimiert werden. In den folgenden Analysen bestätigte sich insbesondere für den Interleukin 7 (IL-7) Rezeptor, der aus den Untereinheiten IL-7R α (CD127) sowie IL-2-R γ (CD132) besteht, die starke Expression und die volle Funktionalität des Rezeptors. Drei Zielsequenzen konnten im Reporterzellmodell für das effektivste *silencing* von *ETV6-RUNX1* identifiziert und erfolgreich in die BVZ-ALL Zelllinie REH transduziert werden. Nach 30 Tagen induzierter shRNA Expression konnte ein intranukleärer *knockdown* des Fusionsproteins ETV6-RUNX1 auf etwa 8 - 26% nachgewiesen werden. Nach erfolgtem *knockdown* konnten eine gesteigerte Apoptoserate sowie eine abnehmende Wachstumsgeschwindigkeit beobachtet werden. Ferner wurde nach 38 Tagen induzierter shRNA Expression eine starke Herunterregulation der Untereinheit IL-7R α (CD127) auf 10 - 14% gemessen.

In dieser Arbeit konnte somit ein vielversprechendes Modell zum kontrollierten und effizienten *knockdown* des Fusionsproteins ETV6-RUNX1 in REH etabliert werden. Die anhand dieses Modells nachgewiesene verstärkte Apoptoserate sowie die Reduktion der zellulären Wachstumsgeschwindigkeit unterstreichen die wichtige Rolle von ETV6-RUNX1 in der Leukämogenese. Die Effizienz des Modells konnte durch die Abnahme der Expression des IL-7 Rezeptors belegt werden. Die Bedeutung und Mechanismen der Hochregulation von IL-7R α in *ETV6-RUNX1* positiven BVZ-ALL Zelllinien und die Implikationen des IL-7 Rezeptors in der Leukämogenese von *ETV6-RUNX1* positiver ALL gilt es nun weiter zu erforschen.

ABSTRACT (English)

The chromosomal translocation t(12;21), found in approximately 25% of childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BVZ-ALL), results in the formation of the chimeric fusion protein ETV6-RUNX1. Many questions remain surrounding this leukemia initiating gene fusion despite great research interest due to its high prevalence rate. This thesis aimed to better understand the effect of the fusion protein by systematically analyzing JAK-STAT signaling in *ETV6-RUNX1* positive BVZ-ALL cells and by establishing a model for the inducible silencing of *ETV6-RUNX1* in BVZ-ALL cell lines.

Receptors of the JAK-STAT signaling pathway were examined using *in silico*, flow cytometry and XTT viability analyses. After several shRNA target sequences against *ETV6* were cloned into miR-E enhanced backbone plasmids, the most effective sequences were identified using a reporter cell model. The chosen plasmids were lentivirally transduced into the BVZ-ALL cell lines REH, UoC-B6 and AT-2. Protein knockdown of ETV6-RUNX1 was quantified through flow cytometry and confocal microscopy, subsequently analyses of cell growth, apoptosis, cell differentiation and expression of receptors of the JAK-STAT signaling pathway were performed.

Nine different receptors of the JAK-STAT signaling pathway that are expressed in their complete functional form in *ETV6-RUNX1* positive cell lines REH, UoC-B6 and AT-2 as well as in primary *ETV6-RUNX1* positive blasts were identified. For the interleukin 7 (IL-7) receptor, which consists of the two subunits IL-7R α (CD127) and IL2-R γ (CD132), high expression rate and full functionality were observed. Three target sequences for the most effective silencing of *ETV6-RUNX1* were identified and successfully transduced into REH cells. After 30 days of induced shRNA expression, an intranuclear knockdown of the fusion protein ETV6-RUNX1 to 8 - 26% was detected. After protein knockdown, an increased apoptosis rate and a decreased growth rate were observed. In addition, downregulation of the subunit IL-7R α (CD127) to 10 - 14% was detected.

This thesis established a promising model for the controlled and efficient knockdown of the fusion protein ETV6-RUNX1 in REH. The enhanced apoptosis rate and reduction of the cellular growth rate, demonstrated by this model, underline the important role of ETV6-RUNX1 in leukemogenesis. The efficiency of the model was demonstrated by the reduced expression of the IL-7 receptor. The importance and mechanisms of IL-7R α upregulation in *ETV6-RUNX1* positive BVZ-ALL cell lines and the implications of the IL-7 receptor in the leukemogenesis of *ETV6-RUNX1* positive ALL need to be further investigated.

1. EINLEITUNG

1.1 Akute lymphoblastische Leukämie im Kindesalter

Die akute lymphoblastische Leukämie (ALL) ist die häufigste der malignen Erkrankungen im Kindesalter. Allein in Deutschland erkranken jährlich durchschnittlich 441 Kinder unter 15 Jahren an einer ALL, wobei insbesondere Kinder im Alter von 2 - 5 Jahren betroffen sind (1). Somit macht die ALL einen Anteil von 24,9% an den malignen Neuerkrankungen im Kindesalter aus (1).

Durch einheitliche Therapieprotokolle sowie den konsequenten Einschluss in Studien haben sich die Heilungschancen in der pädiatrischen Onkologie in den vergangenen Jahrzehnten erheblich verbessert. Während die kumulativen 5-Jahres-Überlebensraten aller malignen Erkrankungen im Kindesalter in den 50er und 60er Jahren noch unter 20% betrug (2, 3), sind es heute in Deutschland mittlerweile 85% (1). In der Therapie der ALL werden sogar 15-Jahres-Überlebensraten von 90% erreicht (1), jedoch geht die erforderliche Hochdosischemotherapie mit erheblichen Nebenwirkungen, sowie einem deutlich erhöhten Risiko für Zweitmalignomen einher (4-7).

Die ALL im Kindesalter lässt sich anhand des Immunphänotyps der entarteten Ursprungszelle in folgende Unterformen unterscheiden: die am häufigsten vorkommende B-Vorläuferzell-ALL (BVZ-ALL), die nochmal in die Untergruppen Pro-B-, Common- sowie Prä-B-ALL unterteilt werden kann, die reife B-ALL, sowie die T-ALL. Es wird von einer multifaktoriellen Leukämogenese ausgegangen. Der folgende Erklärungsansatz bezieht sich hier insbesondere auf die Common-ALL sowie die Prä-B-ALL, die den Großteil der kindlichen ALL ausmachen (1, 8).

Zur Leukämieentstehung scheinen zwei Schritte notwendig zu sein. Zunächst kommt es *in utero*, meist durch chromosomale Translokationen oder Hyperdiploidien, zur Entstehung eines präleukämischen Zellklons (8-11). Anschließend bedarf es jedoch weiterer genetischer Veränderungen des Klons zur Ausbildung einer Leukämie. Es wird angenommen, dass diese postnatal durch fehlregulierte Immunantworten auf Infektionen ausgelöst werden (8, 11-13), die wiederum vor allem zu Kopienzahlveränderungen (*copy number alterations*, CNA) von Genen führen (14). Nur die Kombination beider Schritte, in Übereinstimmung mit Knudsons Two-Hit-Theorie zur Tumorentstehung (15), führt anschließend zur Ausbildung einer manifesten ALL. Die genauen Mechanismen der leukämischen Transformation, insbesondere die Ursachen und Folgen der fehlregulierten Immunantworten, sind jedoch noch nicht endgültig verstanden und Gegenstand heutiger Forschung (16). Für einen aktuellen Überblick vgl. Greaves, 2018 (8).

1.2 ***ETV6-RUNX1* positive ALL**

Eine häufige *in utero* entstehende chromosomale Translokation ist die t(12;21)(p13;q22). Diese führt zur Genfusion *ETV6-RUNX1*, synonym auch *TEL-AML1* genannt, und ist in etwa 25% der ALL im Kindesalter nachweisbar (17, 18).

Wie bereits für die allgemeine Leukämogenese beschrieben, finden auch hier die chromosomalen Veränderungen *in utero* statt. Ford et al. konnten 1998 anhand von Untersuchungen an monozygoten, monochorialen Zwillingen, die später beide an einer *ETV6-RUNX1* positiven ALL erkrankten, den pränatalen Ursprung der chromosomalen Translokation aufzeigen (9). Die Gensequenz der chromosomalen Bruchstelle ist in der Regel einzigartig, begründet durch die große Varianz von möglichen Bruchpunkten. Für die häufigste *ETV6-RUNX1* Variante bricht das Chromosom 12 meist innerhalb des 5. Introns von *ETV6* in einem Bereich von circa 12.000 Basenpaaren, Chromosom 21 innerhalb des etwa 150.000 Basenpaaren langen 1. Intron von *RUNX1* (19, 20). Bei den von Ford et al. beschriebenen Zwillingen konnte jedoch dieselbe Gensequenz der Fusionsstelle nachgewiesen werden. Ford et al. schlussfolgerten einen gemeinsamen Ursprung aus einem *ETV6-RUNX1* positiven präleukämischen Klon, welcher über Anastomosen in der Plazenta in den anderen Zwilling metastasierte.

Der Nachweis für das postnatale Auftreten der sekundären Veränderungen konnte folgendermaßen erbracht werden: trotz identischer Gensequenz der Bruchstelle unterschieden sich die sekundären CNA bei den Geschwistern, mussten also nach Metastasierung des Klons aufgetreten sein (21). Auch die geringen Konkordanzraten sprechen für eine erst postnatale Entstehung der Leukämie, lediglich 5 - 10% der monozygoten Zwillingsgeschwister von Kindern mit einer *ETV6-RUNX1* positiven ALL erkrankten ebenfalls (22, 23).

Untersuchungen zur Häufigkeit von *ETV6-RUNX1* im Blut von gesunden Neugeborenen zeigten die Translokation bei 1% der Neugeborenen, ein etwa 100-fach erhöhtes Auftreten, als es die Inzidenz der *ETV6-RUNX1* positiven ALL vermuten ließe. Über die genauen Zahlen ist man sich in der Literatur noch uneins (23-27). Neuere Daten von Schäfer et al. (27) zeigen jedoch, dass sogar bei bis zu 5% der Neugeborenen die *ETV6-RUNX1* Translokation im Blut nachweisbar ist. Da allerdings lediglich etwa 0,01% der Kinder auch an der ALL erkranken, scheint das onkogene bzw. leukämogene Potenzial des alleinigen Fusionsproteins *ETV6-RUNX1* gering zu sein (23).

Bei den Proteinen *ETV6* und *RUNX1* handelt es sich jeweils um essenzielle Transkriptionsfaktoren und Regulatoren der physiologischen Hämatopoese. *ETV6* (synonym *TEL*) gehört zur Familie der ETS-Transkriptionsfaktoren und bindet über seine *desoxyribonucleic acid* (DNA)-bindende Domäne an zumeist regulatorische Elemente von Genen in

hämatoopoetischen Vorläuferzellen (28). Durch die Rekrutierung von Histondeacetylasen (HDAC) durch verschiedene Korepressoren wie N-CoR, mSin3 und SMRT werden die Histone deacetyliert und das Chromatin kondensiert, es kann nicht mehr transkribiert werden. Die Wirkung von ETV6 kann also als repressorisch auf die Transkription bezeichnet werden und gilt als tumorsuppressiv (29-31). Die Bindung des Korepressors mSin3 an ETV6 findet über eine sogenannte SAM-Domäne (*sterile alpha motif*) statt, auch als *pointed domain* bezeichnet, über die das Protein auch mit anderen ETS-Transkriptionsfaktoren homo- oder heterodimerisieren kann (32, 33).

RUNX1 (synonym AML1) bindet über seine DNA-bindende Domäne Runt vor allem an Gene der Hämatopoese. Es gehört zur Gruppe der *core binding factors* (CBF) und dimerisiert mit dem Protein CBF β , welches die DNA-Bindungsaffinität von RUNX1 erhöht sowie dessen Proteasom-vermittelten Abbau verhindert (34). Es kann sowohl Histonacetyltransferasen (HAT) durch Koaktivatoren p300/CBP rekrutieren, so eine Dekondensation des Chromatins durch Acetylierung der Histone bewirken und zur Aktivierung der Transkription von Genen beitragen (35). Durch Bindung von mSin3 und darauffolgender Bindung von HDAC kann jedoch auch eine Repression der Transkription stattfinden (36). Die letztendliche Funktion von RUNX1, ob es aktivierend oder reprimierend wirkt, wird durch verschiedene Faktoren reguliert, hier seien vor allem posttranslationale Modifikationen wie z.B. Methylierungen, Phosphorylierungen und Acetylierungen, sowie die Bindungen von Koaktivatoren und Korepressoren genannt (37-39). Zelent et al. skizzierten 2004 die Funktion von RUNX1, wie sie in Abbildung 1 zu sehen ist (20).

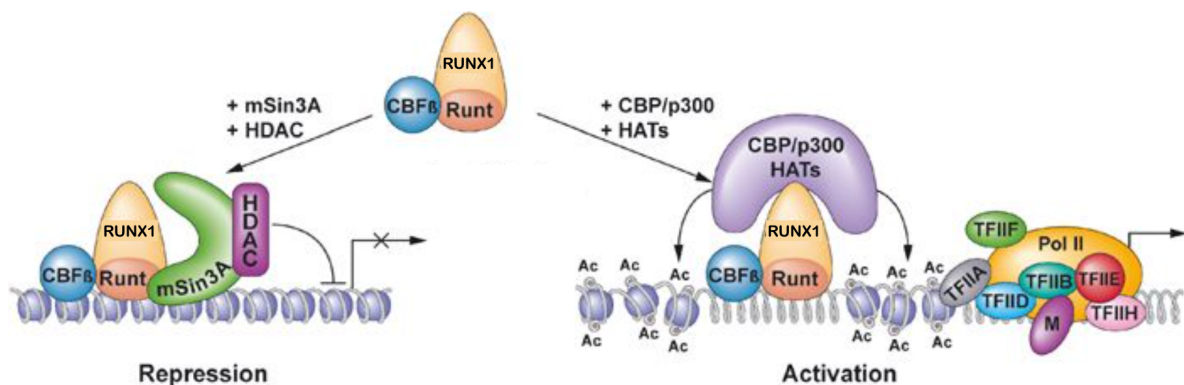


Abbildung 1: Wirkmechanismus des Transkriptionsfaktors RUNX1: RUNX1 (AML1) Wildtyp dimerisiert mit CBF β und bindet über seine Runt-Domäne an die DNA-Zielsequenz. Durch Rekrutierung von Korepressoren wie mSin3 binden Histondeacetylasen (HDAC), die über die Kondensation des Chromatins zur Repression der Transkription führen. Alternativ kann durch Rekrutierung von Koaktivatoren wie p300/CBP eine Acetylierung der Histone durch Histonacetyltransferasen (HAT) und dadurch die Auflockerung des Chromatins erfolgen, wodurch der RNA-Polymerase II Multiproteinkomplex ansetzen und die mRNA-Synthese beginnen kann. Abbildung modifiziert aus (20).

Per ChIP-Seq (*chromatin immunoprecipitation plus DNA sequencing*) sowie ChIP-on-Chip (*chromatin immunoprecipitation plus DNA microarray*) konnte nachgewiesen werden, dass ETV6-RUNX1 auch als Transkriptionsfaktor für zahlreiche Gene wirken kann, die physiologischerweise nicht von RUNX1 oder ETV6 reguliert werden (45, 46).

Einzelne Gene und Proteine wurden diesbezüglich schon genauer beschrieben. So konnte der Erythropoietin Rezeptor (EPO Rezeptor) schon früh als hochreguliert identifiziert werden (47, 48). Torrano et al. lieferten 2011 schließlich den Nachweis, dass *EPOR* ein direktes Zielgen von ETV6-RUNX1 als Transkriptionsfaktor darstellt, welches daraufhin vermehrt exprimiert wird und es zu einer stärkeren Aktivierung des JAK2-STAT5 Signalwegs kommt (49).

Des Weiteren zeigten Diakos et al. 2010, dass ETV6-RUNX1 die Expression der miRNA 494 sowie 320a herunterreguliert, die wiederum die mRNA des Proteins Survivin negativ regulieren (50). Durch das Fusionsprotein kommt es so zu erhöhten Spiegeln von Survivin. In vorherigen Versuchen konnte nach *ETV6-RUNX1 silencing* mittels siRNA Transfektion in REH Zellen, einer *ETV6-RUNX1* positiven BVZ-ALL Zelllinie, außerdem eine vermehrte Apoptose beobachtet werden (51), was Zaliova et al. 2011 in einem ähnlichen Ansatz so jedoch nicht bestätigen konnten (52).

Nach Transduktion von shRNA gegen den Übergangsbereich von ETV6-RUNX1 zeigten Fuka et al. 2011 in Zelllinien mithilfe von Affymetrix Genexpressionsanalysen den Einfluss des Fusionsproteins auf zahlreiche Signalwege auf (53). Insbesondere den PI3K/AKT/mTOR Signalweg identifizierten Fuka et al. 2012 als interessantes Ziel neuer Therapieansätze (54), nachdem nachgewiesen werden konnte, dass der Signalweg durch das Fusionsprotein hochreguliert wird und die pharmakologische Inhibition ebendiesen zur Apoptose der Zellen führte.

Auch STAT3 erscheint als pharmakotherapeutisches Ziel in *ETV6-RUNX1* positiver ALL als sehr interessant. Mangolini et al. konnten 2013 zeigen, wie ETV6-RUNX1 zur Phosphorylierung von STAT3 führt, welches so wiederum unter anderem die Transkription von *MYC* induziert (55). Durch spezifische Hemmung von STAT3 sowohl durch ein Pharmakon als auch durch shRNA vermitteltes *silencing*, ließ sich eine verminderte Proliferation sowie eine verstärkte Apoptose nachweisen.

Ein weiteres direktes aktivierendes Transkriptionsziel von ETV6-RUNX1 konnten Kaindl et al. 2014 in *MDM2* nachweisen (56), welches als negativer Regulator des Tumorsuppressors p53 fungiert. ETV6-RUNX1 führt somit zum Abbau und zur Inaktivierung von p53.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die Wirkungen von ETV6-RUNX1 sehr heterogen präsentieren und noch nicht erschöpfend beschrieben wurden. Es konnten bereits mehrere potenzielle Ansätze für Therapien identifiziert werden, die Wirkung des Fusionsproteins wirft jedoch noch weitere Fragen auf und bedarf weiterer Forschung.

1.3 JAK-STAT Signalweg

Der JAK-STAT Signalweg stellt einen der zentralen Signalwege von Zytokinrezeptoren dar. Neben den Rezeptoren sind die wichtigsten Komponenten die Proteine der Januskinasen (JAK) sowie der *signal transducers and activators of transcription* (STAT). Im menschlichen Genom wird für vier verschiedene Varianten von JAK kodiert (JAK1, JAK2, JAK3 und TYK2) sowie für sieben Varianten von STAT (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B und STAT6), welche die Signaltransduktion von über 40 Zytokinrezeptoren vermitteln (57, 58).

Der Signalweg beginnt mit der Bindung eines Zytokins an den entsprechenden Rezeptor. Ein Teil dieser Rezeptoren weist die Besonderheit auf, dass sie mit einer spezifischen und für mehrere Zytokine gleichen Untereinheit heterodimerisieren müssen. Dadurch entstehen drei größere Familien von Zytokinrezeptoren, entsprechend ihrer spezifischen Untereinheiten *common-β*, *common-γ* sowie gp130. Eine Folge dieser für unterschiedliche Zytokine gemeinsamen Rezeptoruntereinheiten ist eine gewisse Redundanz in ihrer intrazellulären Wirkung (59). Gleichzeitig wird mit besserem Verständnis des Signalwegs eine immer größere Heterogenität und Spezifität in der Wirkung der Zytokine erkannt, was aufgrund der genannten Redundanzen noch nicht endgültig erklärt werden kann (60, 61).

An die intrazelluläre Domäne der Rezeptoren binden JAKs, welche in der Regel schon vor dem Einbau in die Zellmembran miteinander assoziieren und für die Stabilität des Rezeptors notwendig sind (62, 63). Da die Rezeptoren des JAK-STAT Signalwegs keine eigene Tyrosinkinaseaktivität besitzen, wird diese Funktion von den JAKs übernommen. Nach Ligandbindung kommt es je nach Rezeptor zu einer Dimerisierung oder Oligomerisierung der Untereinheiten, die JAKs werden aktiviert und phosphorylieren sowohl sich selbst als auch die zytoplasmatischen Bereiche der Rezeptoren.

An diese phosphorylierten Tyrosinresten können anschließend STATs binden, die ihrerseits auch wieder phosphoryliert werden. Diese phosphorylierten STATs können so homo- oder heterodimerisieren und werden in dieser Form in den Zellkern transloziert, wo sie schließlich als Transkriptionsfaktor wirken und die Expression bestimmter Gene ermöglichen. Zusätzlich zur Aktivierung von STAT kann es durch JAK auch zur Aktivierung anderer Signalwege wie Ras/Raf/MAPK oder PI3K/AKT/mTOR kommen (64).

Der JAK-STAT Signalweg spielt in den Zellen von Menschen eine zentrale Rolle durch Regulation von Funktionen wie Proliferation, Überleben, Differenzierung sowie Immunreaktion. Insbesondere in der myeloischen und lymphatischen Zellentwicklung spielt der Signalweg eine bedeutende Rolle. Dementsprechend naheliegend ist auch das onkogene Potenzial von JAK-STAT. Als Beispiel sei die Mutation V617F in JAK2 genannt, die zu einer konstitutiven Aktivierung des Proteins führt und sehr häufig in myeloproliferativen Neoplasien wie der Polycythaemia vera oder der Essenziellen Thrombozythämie gefunden wird. Es wurden jedoch auch vielfältige weitere Mutationen in JAK und STAT Proteinen in Zusammenhang mit malignen Erkrankungen gebracht (57, 64) und die spezifische Inhibition des Signalwegs bleibt weiterhin ein vielversprechender therapeutischer Ansatz (65).

1.4 Induzierbare Genexpression mittels Tet-On System

Das weitverbreitetste System für eine experimentelle Regulation der Genexpression in Eukaryoten ist das Tet-System, welches auf den Tetracyclin-Resistenzmechanismen in *Escherichia coli* (*E. coli*) basiert. Dabei sind die wichtigsten Bestandteile des Systems der Tet Repressor (TetR) sowie der *Tet Operator* (*tetO*). Der Tet Repressor bindet hochspezifisch an die DNA-Sequenz von *tetO* und inhibiert so die Expression des dahinter liegenden bakteriellen Tetracyclinresistenzgens. Kommt es nun zu einem intrazellulären Anstieg des Antibiotikums Doxycyclin, bindet dieses an den TetR, dieser löst sich vom *tetO* auf der DNA und die Repression des dahinterliegenden Resistenzgens wird aufgehoben. 1992 konnten Gossen und Bujard dieses System erstmals von *E. coli* in eine humane Zelllinie übertragen (66). Sie entwickelten hier zunächst das sogenannte **Tet-Off** System, wobei der Tet Repressor mit einer hochaktiven die Transkription aktivierenden Domäne, vp16 aus dem Herpes Simplex Virus, zu einem Fusionsprotein gekoppelt wurde, welches sie als *tetracycline-induced transactivator* (tTA) bezeichneten. Außerdem integrierten sie in die DNA ein sogenanntes *tet responsive element* (TRE), welches aus multiplen *tetO* Sequenzen sowie einem minimalen CMV Promotor besteht, und keine Bindungsstelle für humane Transkriptionsfaktoren darstellt. tTA bindet nun physiologisch an die *tetO* Sequenzen im TRE und die Transkription wird initiiert. Nach Zugabe von Doxycyclin dissoziiert der Tet Repressor, und damit auch die Aktivierungsdomäne, von der DNA ab und die Transkription wird unterbunden.

Das **Tet-On** System wurde einige Jahre später etabliert und aktiviert die Transkription, gegensätzlich zum Tet-Off System, erst nach Zugabe von Doxycyclin (67). Hierbei wurde eine Mutation im TetR genutzt, die die Bindung an *tetO* ohne Doxycyclin verhindert. Bindet Doxycyclin, kann der Tet Repressor an die *tetO* Sequenzen binden und die Genexpression wird induziert. In Fusion mit VP16 wird es als *reverse tetracycline-induced transactivator* (rtTA) bezeichnet und bindet an das gleiche TRE wie im Tet-Off System, wie in Abbildung 3 zu erkennen ist.

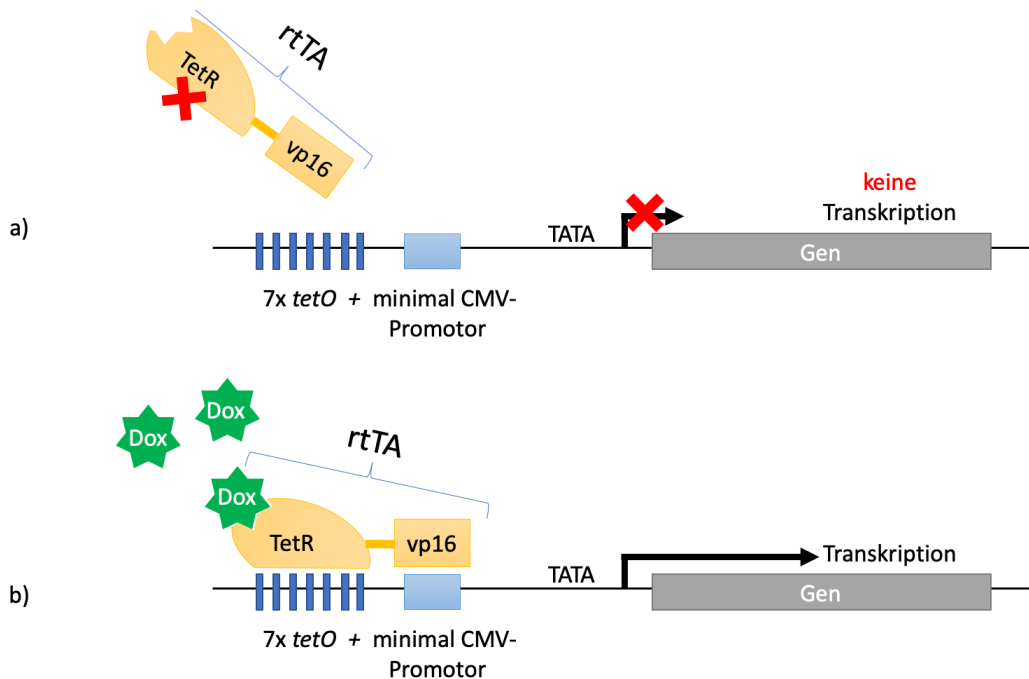


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Tet-On Systems: a) Das tet responsive element (TRE), bestehend aus sieben tetO Sequenzen und einem minimal CMV Promotor, wird von keinem endogenen Transkriptionsfaktor erkannt. rtTA kann ohne Doxycyclin nicht binden, die Transkription des dahinterliegenden Gens findet nicht statt. b) Nach Doxycyclinzugabe kann rtTA an das TRE binden, die Transkription findet statt.

1.5 Gene silencing mittels RNA Interferenz

Die Ribonukleinsäure, englisch *ribonucleic acid* (RNA), genauer in Form der *messenger RNA* (mRNA) als transkriptionelles Produkt der DNA, kann durch verschiedene Wege reguliert werden. Eine Möglichkeit ist die der auch natürlich vorkommenden RNA Interferenz, die durch Fire und Mello 1998 im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* erstmals als Methode des genetischen *silencings* mittels doppelsträngiger RNA beschrieben werden konnte (68). Die am besten charakterisierten regulatorischen RNAs in Säugetieren sind die *short interfering RNAs* (siRNAs) sowie *micro RNAs* (miRNAs) (69, 70). Dabei finden die siRNAs ihren Ursprung in doppelsträngiger RNA, während die miRNAs aus einzelsträngiger RNA bestehen, die einen sogenannten *hairpin loop* (eine Haarnadelstruktur) formen. Diese miRNAs kodieren meist in Introns und sind häufig evolutionär hochkonservierte Konstrukte, die auch in anderen Spezies zu finden sind. Nach ihrer Transkription und Weiterverarbeitung in reife miRNA (siehe Abbildung 4) fungiert der in den *RNA-induced silencing complex* (RISC) eingebettete miRNA-Strang schließlich als Wegweiser zur komplementären mRNA, die daraufhin herunterreguliert wird.

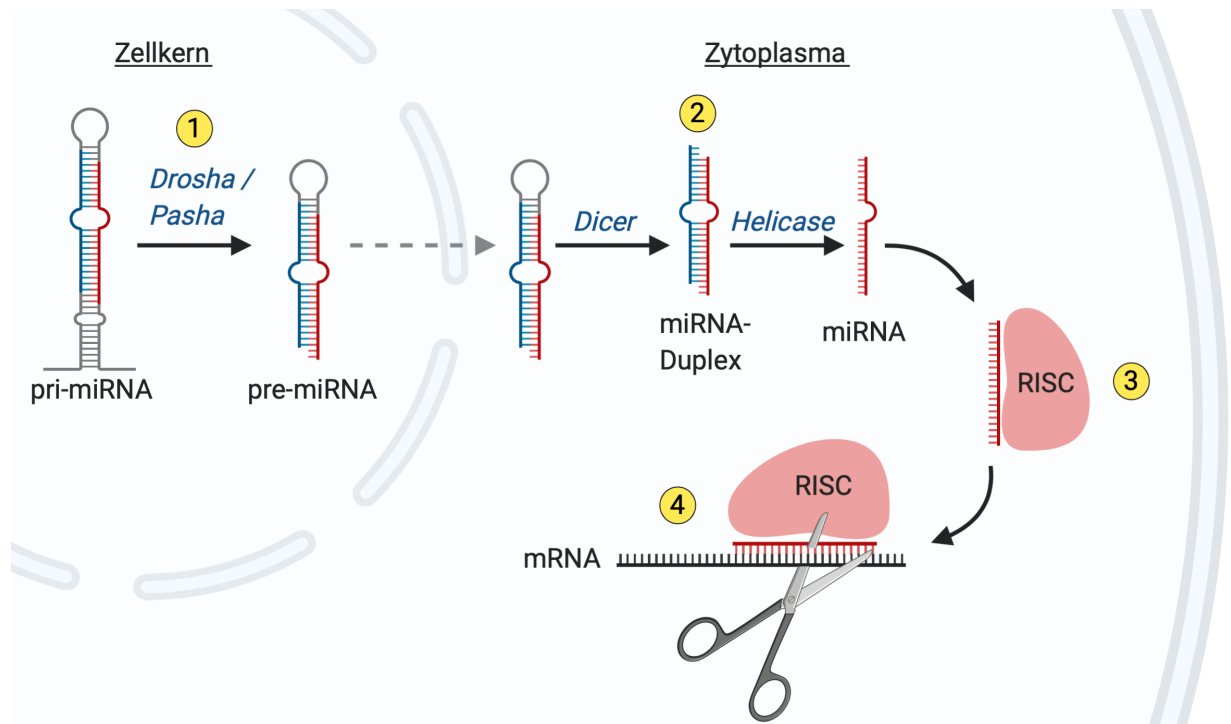


Abbildung 4: RNA Interferenz mittels miRNA: 1) Die von der RNA-Polymerase II transkribierte RNA bildet einen Doppelstrang in Form einer pri-miRNA aus, welcher anschließend vom Enzymkomplex Drosha / Pasha (DGCR8) zu einer etwa 70 Nukleotide langen pre-miRNA prozessiert wird. 2) Nach Transport der pre-miRNA in das Zytoplasma schneidet der Komplex Dicer / TRBP weitere Nukleotide heraus, sodass ein miRNA-Duplex mit einer Länge von etwa 21 Basenpaaren entsteht. Eine Helicase trennt den Doppelstrang anschließend in zwei komplementäre Einzelstränge auf. 3) Der Führungsstrang bildet zusammen mit dem Protein Argonaut den RISC-Komplex aus. 4) Nach Bindung des RISC-Komplexes an die komplementäre mRNA kann bei perfekter Komplementarität die mRNA abgebaut werden. Bei nur teilweise bestehender Komplementarität erfolgt lediglich die Repression der Translation (nicht gezeigt). Abbildung erstellt mithilfe von BioRender.

Mit der Entdeckung des Mechanismus der RNA Interferenz wurden in der Forschergemeinschaft zahlreiche Wege beschritten, sich diese Mechanismen zu Nutze zu machen. So konnte mittels siRNA schon sehr früh ein *gene silencing* durchgeführt werden, dies ist jedoch auf transiente Transfektionen beschränkt und führt somit nicht zu einem stabilen *knockdown*. Alternativ etablierten sich die *short hairpin RNAs* (shRNAs), die am ehesten der miRNA Vorstufe pre-miRNA ähneln. Sie können mittels Transduktion stabil in das Genom integriert werden und bilden nach der Transkription über ihren *hairpin loop* anschließend einen Doppelstrang aus. Im Anschluss werden sie dann ähnlich der miRNA prozessiert und können über den RISC-Komplex ihre komplementäre mRNA reprimieren und abbauen.

1.6 pLT3GEPIR mit miR-E *enhanced backbone*

Eine Variante von shRNAs ist die Integration der Zielsequenzen in bestehende, endogene miRNA Sequenzen in Form von sogenannten "shRNAmirs". Beispiele solcher verwendeter miRNA *backbones* sind miR-30 sowie miR-155 (71, 72). Durch Integration in diese *backbones* kann

verhindert werden, dass der miRNA Reaktionsweg durch zu viel shRNA übersättigt und gestoppt wird, was wiederum zu einer erhöhten Toxizität aufgrund mangelnder miRNAs führt, die für zentrale regulatorische Prozesse essenziell sind (73, 74). Es ist jedoch ein häufiges Problem der "shRNAmirs", einen zuverlässigen *knockdown* zu erreichen.

Fellmann und Zuber adressierten dieses Problem 2013 in einem systematischen Ansatz, indem sie den miR-30 *backbone* optimierten, welches sie anschließend als miR-E bezeichneten (75). Es zeigte sich unter anderem nach Insertion eines evolutionär konservierten Elements am 3' Ende der Haarnadelstruktur eine 10- bis 30-fach erhöhte Konzentration maturer *small RNA* durch eine verbesserte pri-miRNA Prozessierung.

Im Rahmen der Arbeiten von Fellmann und Zuber wurden schließlich mehrere Plasmide erstellt, unter anderem das Plasmid pLT3GEPIR, dessen wichtigste Elemente in Abbildung 5 dargestellt werden und dessen shRNA Expression mittels Tet-On System reguliert werden kann. Elementar sind hier insbesondere die shRNA im verbesserten miR-E *backbone* sowie das grüne Fluoreszenzprotein EGFP.



Abbildung 5: Schematische Darstellung des Tet-regulierten Vektors LT3GEPIR (75): Der lentivirale Vektor enthält nach einem optimierten TRE der 3. Generation (T3G) das Fluoreszenzprotein EGFP sowie die shRNA, eingebettet im verbesserten miR-E backbone. Hinter dem PGK Promotor werden die Elemente für die Puromycinresistenz, sowie das hinter einem IRES-Element gelegene reverse tetracyclin-induced transactivator (rtTA3), welches in Abwesenheit von Doxycyclin T3G hemmt, kodiert.

1.7 Zielsetzung

Die *ETV6-RUNX1* positive ALL ist die häufigste durch ein Fusionsgen definierten Leukämie im Kindesalter. Doch trotz enormer Behandlungsfortschritte in den vergangenen 50 Jahren zeigen die große Häufigkeit von Rezidiven sowie die sehr nebenwirkungsreiche intensive Chemotherapie den weiterhin großen therapeutischen sowie forschenden Handlungsbedarf auf. In der Forschungsgemeinschaft wird ein großer Aufwand betrieben, um insbesondere die Rolle des Fusionsproteins ETV6-RUNX1 näher zu verstehen sowie zu präzisieren, wie es zur Leukämogenese beiträgt. Diese Fragen sind jedoch bislang nur teilweise beantwortet worden, entsprechend war die Entwicklung neuer, effektiver und zielgerichteter Therapieansätze, wie auch bei anderen onkogenen Fusionstranskriptionsfaktoren, nur bedingt möglich.

Bisher wurde noch kein induzierbarer und stabiler *knockdown* des Fusionsproteins ETV6-RUNX1 beschrieben, dieser Ansatz stellt jedoch eine interessante Möglichkeit dar. In bisherigen Publikationen wurden die Auswirkungen eines *silencings* stets in direktem Anschluss an eine lediglich transiente Transfektion, beziehungsweise direkt nach erfolgter lentiviraler Transduktion untersucht (50, 52, 54, 55). Frühere Projekte in der Arbeitsgruppe konnten mittels Hammerhead-Ribozym sowie konventioneller shRNA die Expression von *ETV6-RUNX1* nicht erfolgreich verringern (46, 76). Eine Möglichkeit für die induzierbare stabile Expression von shRNA bietet das sogenannte Tet-On System. Außerdem soll zum sicheren ETV6-RUNX1 *knockdown* in dieser Arbeit auf eine shRNA mit dem miR-E *enhanced backbone* zurückgegriffen werden, die durch einen verbesserten Algorithmus für die Vorhersage effektiver shRNAs erstellt wurde (75, 77). Anschließend können mit diesem Modell kontrolliert Fragen zu verschiedenen Zeitpunkten des *silencings* untersucht werden.

In früheren Projekten der Arbeitsgruppe wurde außerdem JAK-STAT als potenziell interessanter Signalweg der *ETV6-RUNX1* positiven ALL identifiziert (78). Auch weitere Gruppen beleuchteten Teilaspekte des Signalwegs, wie z.B. das EPO Rezeptor *signaling* über JAK2-STAT5 sowie einer STAT3 Inhibition (49, 55). Anhand des beschriebenen Modells des induzierbaren ETV6-RUNX1 *knockdowns* soll dieser nun noch näher untersucht werden. Dazu wurde zunächst eine systematische Untersuchung der Expression aller Rezeptoren des JAK-STAT Signalwegs durchgeführt.

Ziel dieser Promotionsarbeit ist es, ein besseres Verständnis des Fusionsproteins ETV6-RUNX1 insbesondere in Hinblick auf den JAK-STAT Signalweg zu erwerben. Hierfür wurde das Projekt in folgende Teilaspekte unterteilt:

1. Biologische und molekulargenetische Charakterisierung der humanen *ETV6-RUNX1* positiven BVZ-ALL Zelllinien REH, UoC-B6 und AT-2
2. Durchführung von *in silico* und funktionellen *in vitro* Analysen des JAK-STAT Signalwegs in *ETV6-RUNX1* positiver ALL in Hinblick auf dessen Funktion sowie der Rezeptorexpression
3. Etablierung eines stabilen induzierbaren *knockdowns* von ETV6-RUNX1 in den Zelllinien REH, UoC-B6 sowie AT-2 mittels miR-E *enhanced backbone* shRNA
4. Analysen der Auswirkungen des ETV6-RUNX1 *knockdowns* auf Zellwachstum, Apoptose sowie im Speziellen auf den JAK-STAT Signalweg.

2. METHODIK

2.1 Material

2.1.1 Medien und Zusätze

Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
Advanced DMEM	Thermo Fisher	#12491015
Ampicillin	Sigma-Aldrich	#A9518
Ampicillin/Streptomycin	Biochrom	#A2212
Blasticidin	InvivoGen	#ant-bl-1
DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>)	Thermo Fisher	#41966029
Doxycyclin SF	Ratiopharm	
Erythropoietin	Peprtech	#100-64
FKS (Fetales Kälberserum)	Sigma-Aldrich	#F7524
IMDM (<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>)	Thermo Fisher	#12440053
IMDM ohne Phenolrot	Thermo Fisher	#21056023
Insulin-Transferrin-Selenium (ITS)	Sigma-Aldrich	#I3146
Interleukin-7	Peprtech	#200-07
Interleukin-9	Peprtech	#200-09
LB-Agar (<i>Luria Broth Agar</i>)	Sigma-Aldrich	#L2897
LB-Medium (<i>Luria Broth Miller's Modification</i>)	Sigma-Aldrich	#L3522
Puromycin	InvivoGen	#ant-pr-1
RPMI-1640 (<i>Roswell Park Memorial Institute</i>)	Biochrom	#FG385
RPMI-1640 ohne Phenolrot	Thermo Fisher	#11835030
Trypsin/Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Biochrom	#L2143

2.1.2 Chemikalien und Enzyme

Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid (XTT)	AppliChem	#A2240
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich	#D9542
Agarose	Carl Roth	#T846.3
Annexin V Phycoerythrin (PE)	Biolegend	#540907
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth	#8076.2
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich	#D4540
EcoRI	New England BioLabs	#R3101S
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Life Technologies	#15575020

Essigsäure	Merck	#1000632511
Ethanol absolut	Merck	#1009832500
Ethidiumbromid	AppliChem	#A1152
Formaldehyd 16%	Thermo Fisher	#28906
<i>Hyperladder</i>	Bioline	#BIO-33026
NaOH pellets	Carl Roth	#P031.2
Natriumazid (NaN ₃)	Sigma-Aldrich	#71289
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich	#S7653
<i>Normal Donkey Serum</i>	Jackson ImmunoResearch	#017000121
Phenazinmethosulfat (PMS)	Sigma-Aldrich	#P9625
<i>Phosphate-buffered saline (PBS)</i>	Thermo Fisher	#10010015
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich	#P8920
<i>Polybrene</i>	Sigma-Aldrich	#TR-1003-G
Polyethylenimin (PEI)	Polysciences	#23966
Primer DNA Seq miRseq5 (5'-TGTTTGAATGAGGCTTCAGTAC-3')	TIB MOLBIOL	
Saponin Quillaja sp.	Sigma-Aldrich	#S4521
<i>T4 Quick DNA Ligase</i>	New England BioLabs	#M2200L
Tris-Base	Sigma-Aldrich	#T8524
Tris-Hydrochlorid (HCl)	Carl Roth	#9090.3
TritonX	Sigma-Aldrich	#T-8787
Trypanblau	Sigma-Aldrich	#93595
<i>Ultrapure DNase-Free Water</i>	Invitrogen	#10977035
Vectashield	VectorLaboratories	#H-1400
XhoI	New England BioLabs	#RO146S

2.1.3 Puffer und Lösungen

Puffer

Elutionspuffer AE
CutSmart Puffer
DNA Gel Ladepuffer
Fixierlösung 0,3x
Fixierlösung 1x
PBS Saponin
Poly-L-Lysin Lösung
Quick DNA Ligase Puffer

Zusammensetzung

5 mM Tris-HCl (pH 8.5)
New England BioLabs #B7204S
New England BioLabs #B7024S
4% Formaldehyd in 0,3x PBS
4% Formaldehyd in 1x PBS
1x PBS, 1% BSA, 0,1% Saponin, 0,09% NaN₃
0,1% Poly-L-Lysin in H₂O
New England BioLabs #M2200L

Reinigungslösung	2,5 M NaOH in 60% Ethanol
Stabilisierungs-Puffer	1x PBS, 1% BSA, 0,09% NaN ₃
TAE Puffer 50x	2 M Tris-Base, 0,05 M EDTA (pH 8,0), 2 M Essigsäure
TBS 10x (<i>Tris Buffered Saline</i>)	1,4 M NaCl, 30 mM KCl, 80 mM Tris-HCl (pH 7,4)
TBS Saponin	1x TBS, 0,1% Saponin, 0,09% NaN ₃
TritonX TBS	0,5% TritonX-100 in 1x PBS

2.1.4 Verbrauchsmittel

Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
12-Well Platten	Falcon	#353043
6-Well Platten	Greiner Bio-One	#657160
96-Well Platten	Falcon	#82.1581.001
Deckgläser	Carl Roth	#LH25.1
Eppendorf Röhrchen	Sarstedt	#72.706
FACS Röhrchen	Corning Falcon	#352054
Falcon Röhrchen 15 ml	Corning Falcon	#352096
Falcon Röhrchen 50 ml	Corning Falcon	#352070
Feuchte Kammer <i>StainTray</i>	Thermo Fisher	#44-0404-10
Hellendahl Küvetten (Färbekasten)	Vitlab	#80355
Kryoröhrchen	Sarstedt	#72.380.004
Liquid Blocker	Science Services	#SCI71310
<i>Mr. Frosty Freezing Container</i>	Thermo Fisher	#5100-0001
Neubauer Zählkammer	Carl Roth	#T728.1
Petrischale 15 cm	Corning Falcon	#353025
Serologische Pipette 10 ml	Corning Falcon	#357551
Serologische Pipette 25 ml	Corning Falcon	#357525
Serologische Pipette 5 ml	Corning Falcon	#357543
Sterilfilter 0,45 µm	Sarstedt	#83.1826
Zellkulturflaschen 25 cm ²	TPP	#90026
Zellkulturflaschen 75 cm ²	Corning Falcon	#353136

2.1.5 Kits

Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
<i>NucleoBond Xtra Midi Plus</i>	Macherey-Nagel	#740412.50
<i>NucleoSpin Gel and PCR Clean-up</i>	Macherey-Nagel	#740609.50

<i>NucleoSpin Plasmid</i>	Macherey-Nagel	#740588.50
<i>PCR Mycoplasma Test Kit</i>	AppliChem	#A3744,0020
<i>Quick Ligation Kit</i>	New England BioLabs	# M2200L

2.1.6 Geräte

Bezeichnung	Hersteller	Modell
Brutschrank	Thermo Fisher	Cytoperm 2
Durchflusszytometer	Miltenyi Biotec	MACSQuant VYB
Durchflusszytometer	Becton Dickinson	FACSAria III
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss	Axiovert 200
Konfokales Mikroskop	Leica	DM 2500 TCS SPE
Lichtmikroskop	Zeiss	Telaval 31
Fotometer	Thermo Fisher	Multiskan Ascent 96/384 Plate Reader
Spectrofotometer	Thermo Fisher	NanoDrop 1000 Spectrofotometer
Sterilbank	Holsten	Sicherheitswerkbank LaminAir
Thermocycler	Eppendorf	Mastercycler EP Gradient
Thermomix	Eppendorf	Thermomixer comfort
Wasserbad	GFL	Typ: 1003
Wipptisch	Biometra	WT15 rocking platform
Zentrifuge	Hettich	Rontanta/R (3501)
Zentrifuge Eppis	Hettich	Mikro 22R

2.1.7 Software

Bezeichnung	Hersteller
Adobe Photoshop CC 2017	Adobe
Ascent Software 2.6	Thermo Fisher
AxioVision 4.5.0.0	Carl Zeiss Imaging Solutions
BioRender	BioRender
Expression Console Software 1.4.1	Affymetrix
FCS Express 6.06	De Novo Software
FlowJo 10.6.1	Becton Dickinson
ImageJ 1.51	Fiji
MACSQuantify 2.11.1907	Miltenyi Biotec
NanoDrop 1000 3.8.1	Thermo Fisher
Office 365	Microsoft
Prism 8.4	GraphPad Software

2.1.8 Antikörper

Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
CD132 (IL2-R γ) PE	Becton Dickinson	#561699
CD127 (IL-7R α) PE	Becton Dickinson	#561028
CD129 (IL-9R α) PE	Biologend	#310403
EPO R PE	R&D Systems	#FAB3072P
CD19 PE	ImmunoTools	#21270194S
CD21 PE	ImmunoTools	#21270214S
CD38 PE	Becton Dickinson	#555460
CD40 APC-H7	Becton Dickinson	#561211
CD72 PE	ImmunoTools	#21270724S
Isotypkontrolle-IgG1 κ -PE	Becton Dickinson	#555749
Isotypkontrolle-IgG2 κ -PE	ImmunoTools	#21275534S
<i>Rat anti</i> ETV6-RUNX1 (TEL6F2)	Sigma-Aldrich	#MABE1007
<i>Rabbit anti</i> ETV6	Atlas Antibodies	#HPA000264
<i>Donkey anti Rat</i> Cy5	Jackson Immunoresearch	#712-175-153
<i>Donkey anti Rat Rhodamine Red</i>	Jackson Immunoresearch	#712-296-150
<i>Donkey anti Rabbit</i> Alexa 488	Jackson Immunoresearch	#711-546-152
<i>Donkey anti Rabbit Rhodamine Red</i>	Jackson Immunoresearch	#711-295-152

Der Antikörper *Rat anti* ETV6-RUNX1 (TEL6F2) wurde freundlicherweise von Andrew Flatley (Helmholtz Zentrum München, Bayern) zur Verfügung gestellt. Mittlerweile wurde der gleiche Antikörper von der Firma Sigma-Aldrich zum Erwerb freigegeben und kann unter der Bestellnummer #MABE1007 erworben werden. Er bindet den typischen Übergangsbereich des Fusionsproteins ETV6-RUNX1, weder aber an Wildtyp ETV6 oder Wildtyp RUNX1 (45). Vor den Versuchen wurde der Antikörper bereits in der Arbeitsgruppe validiert (79, 80).

2.1.9 Plasmide

In dieser Arbeit wurden für die lentivirale Transduktion Plasmide der zweiten Generation benutzt, das in Kapitel 1.6 beschriebene pLT3GEPIR Transferplasmid, ein Kontrolltransferplasmid für die lentivirale Transduktion sowie ein *ETV6-RUNX1* enthaltendes Transferplasmid zur Erstellung einer Reporterzelllinie, das mithilfe einer *piggyBac* Transposase, die in mPB enthalten ist, stabil in HAP1 Zellen transfiziert wurde.

2.1.9.1 pMD2.G

pMD2.G ist ein lentivirales Hüllplasmid (*envelope*) der zweiten Generation, welches das G-Protein vom *vesicular stomatitis virus* exprimiert. Es wurde uns freundlicherweise von Prof. D. Trono (Lausanne, Schweiz) über die Firma Addgene (Cambridge, USA) unter der Artikelnummer #12259 zur Verfügung gestellt.

2.1.9.2 psPAX2

psPAX2 ist ein lentivirales Verpackungsplasmid (*packaging*) der zweiten Generation, welches die HIV-1 Elemente *gag*, *pol*, *tat* und *rev* exprimiert. Es wurde uns freundlicherweise von Prof. D. Trono (Lausanne, Schweiz) über die Firma Addgene (Cambridge, USA) unter der Artikelnummer #12260 zur Verfügung gestellt.

2.1.9.3 mPB

Das Plasmid mPB enthält die Elemente für die optimierte *piggyBac* Transposase (81), die in dieser Arbeit für eine stabile Transfektion benutzt wurde. Es wurde uns freundlicherweise von Dr. M. Gossen (BCRT, Berlin) zur Verfügung gestellt.

2.1.9.4 mPB-SM

Das Plasmid mPB enthält die Elemente für eine durch eine *silencing mutation* funktionsunfähig gemachte *piggyBac* Transposase, die in dieser Arbeit als Kontrolle für eine stabile Transfektion benutzt wurde. Es wurde uns freundlicherweise von Dr. M. Gossen (BCRT, Berlin) zur Verfügung gestellt.

2.1.9.5 pRRLSIN.cPPT.PGK-GFP.WPRE

pRRLSIN.cPPT.PGK-GFP.WPRE fungiert als Transferplasmid zur positiven Kontrolle. Über die dauerhafte *enhanced green fluorescent protein* (EGFP)-Expression kann so der Erfolg der lentiviralen Transduktion zeitnah bestätigt werden. Es wurde uns freundlicherweise von Prof. D. Trono (Lausanne, Schweiz) über die Firma Addgene (Cambridge, USA) unter der Artikelnummer #12252 zur Verfügung gestellt.

2.1.9.6 pPB.tetR.ETV6-RUNX1.1-796.mC

pPB.tetR.ETV6-RUNX1.1-796.mC ist ein Transferplasmid, welches in HAP1 Zellen zur Erstellung eines Reporterzellmodells eingebracht werden soll. Es kodiert für das ETV6-RUNX1 Fusionsprotein. Andere wichtige Elemente sind das hinter demselben Promotor liegende, und durch eine T2A Peptidsequenz verbundene *mCherry*, ein Blasticidin-Resistenzgen für die spätere Selektion sowie die Erkennungssequenzen für die *piggyBac* Transposase. Das Plasmid wurde

durch Veränderung eines von Werner et al. 2015 entwickelten Plasmids, dessen KRAB silencing Domäne durch humanes *ETV6-RUNX1* ausgetauscht wurde, hergestellt (82). Sequenzierungen sowie Validierungen des Plasmids fanden als Vorarbeiten innerhalb der Arbeitsgruppe statt (unveröffentlichte Arbeiten).

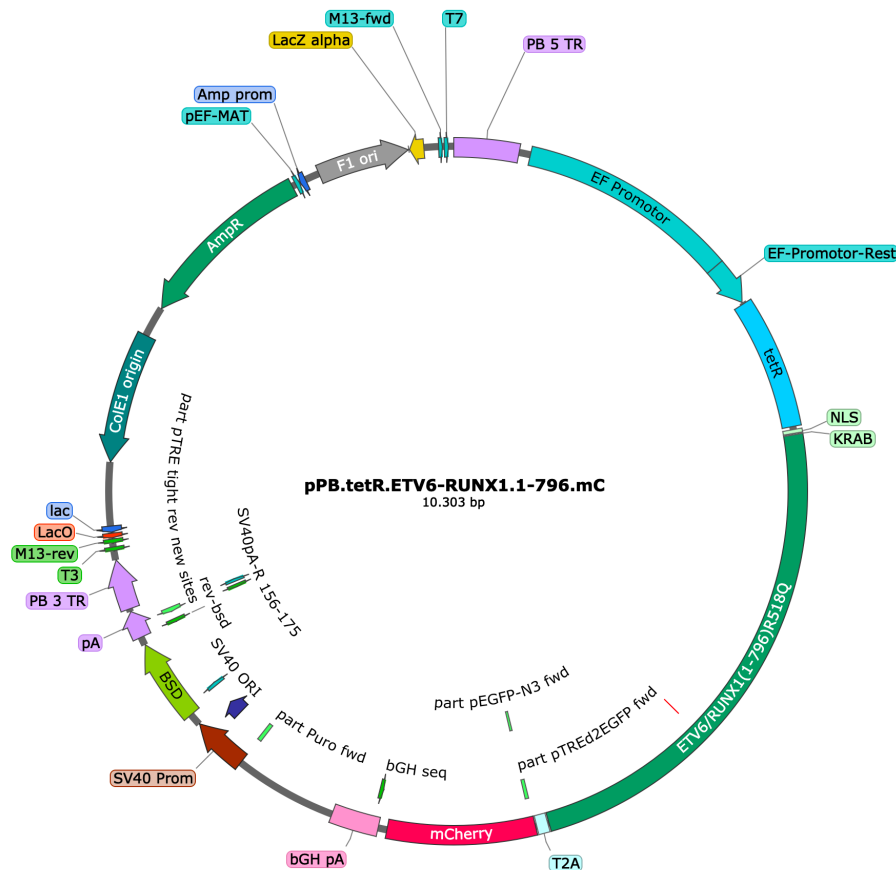


Abbildung 6: Transferplasmid pPB.tetR.ETV6-RUNX1.1-796.mC: Die Abbildung zeigt das Plasmid, welches für das Fusionsprotein ETV6-RUNX1 sowie das Fluorochrom mCherry kodiert, die jeweils über den selben Promotor transkribiert werden und über eine T2A Peptidsequenz miteinander verbunden sind.

2.1.9.7 pLT3GEPIR

Das Plasmid pLT3GEPIR kann über die Firma Mirimus (NY, USA) oder über Addgene (Cambridge, USA) unter der Artikelnummer #111177 erworben werden und basiert auf der mittels Tet-On induzierten Expression von shRNA mit dem miR-E *enhanced backbone* aus den Arbeiten von Fellmann und Zuber (75). Nähere Informationen zum Plasmid und der Funktion in Kapitel 1.6.

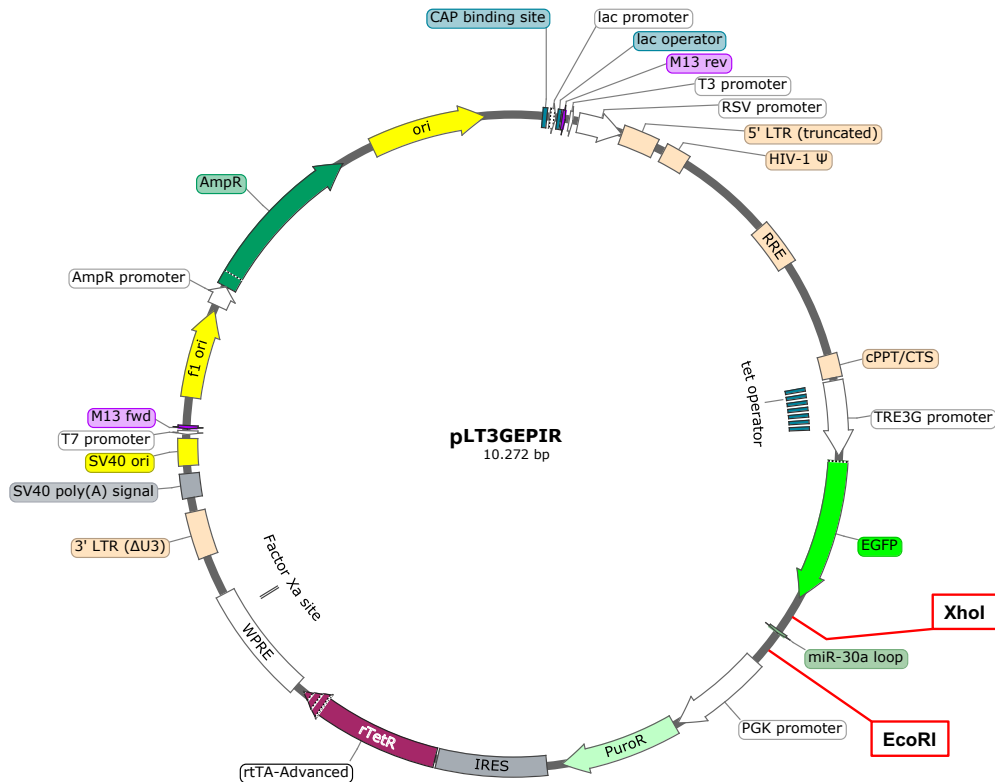


Abbildung 7: Transferplasmid pLT3GEPIR: Das Plasmid beinhaltet ein Tet-On System der dritten Generation sowie die von diesem gesteuerten Elemente für das Fluorochrom EGFP, den miR-E enhanced backbone sowie einem Puromycin-Resistenzgen. Markiert sind die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme EcoRI sowie XhoI.

2.1.10 Oligonukleotide

Die folgenden Oligonukleotide wurden zum Einbau in pLT3GEPIR von der Firma Integrated DNA Technologies (Coralville, USA) erworben. Es handelt sich um Sequenzen im Haarnadelformat, die zur RNA Interferenz mit dem humanen ETV6 (im Bereich der Exons 1-5) führen. Die Sequenzen wurden durch einen verbesserten Algorithmus für die Vorhersage effektiver shRNAs der Firma Mirimus ermittelt und vertrieben, welcher von Fellmann und Zuber (Research Institute for Molecular Pathology, Wien) entwickelt wurde (75, 77).

ETV6_Exon_1-5_159

5'-GAAGGCTCGAGAAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGATGGAAGAACTTCTTAAATG
 ATAGTGAAGCCACAGATGTATCATTAAAGAAGTTTCTTCCAGTGCCTACTGCCTCGGACTT
 CAAGGGGCTAGAATTCGAGCA-3'

ETV6_Exon_1-5_530

5'-GAAGGCTCGAGAAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGAACGTTTGAATGAATGGCA
 AATAGTGAAGCCACAGATGTATTTGCCATTCAATTCAAACGTGTGCCTACTGCCTCGGACT
 T CAAGGGGCTAGAATTCGAGCA-3'

ETV6_Exon_1-5_581

5'-GAAGGCTCGAGAAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGCCGCTATCGATCTCCTCATT
ATAGTGAAGCCACAGATGTATGAATGAGGAGATCGATAGCGATGCCTACTGCCTCGGACT
TCAAGGGGCTAGAATTCGAGCA-3'

ETV6_Exon_1-5_678

5'-GAAGGCTCGAGAAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGAACCCTGGAACTCTATACA
CATAGTGAAGCCACAGATGTATGTGTATAGAGTTTCCAGGGTGTGCCTACTGCCTCGGAC
TTCAAGGGGCTAGAATTCGAGCA-3'

ETV6_Exon_1-5_721

5'-GAAGGCTCGAGAAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGCTCAGAACCATGAAGAAGAT
AATAGTGAAGCCACAGATGTATTATCTTCTTCATGGTTCTGATTGCCTACTGCCTCGGACTT
CAAGGGGCTAGAATTCGAGCA-3'

ETV6_Exon_1-5_768

5'-GAAGGCTCGAGAAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGCCCGTGGATAATGTGCACCA
TATAGTGAAGCCACAGATGTATATGGTGCACATTATCCACGGATGCCTACTGCCTCGGACT
TCAAGGGGCTAGAATTCGAGCA-3'

ETV6_Exon_1-5_769

5'-GAAGGCTCGAGAAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACGTGGATAATGTGCACCAT
AATAGTGAAGCCACAGATGTATTATGGTGCACATTATCCACGGTGCCTACTGCCTCGGACT
TCAAGGGGCTAGAATTCGAGCA-3'

ETV6_Exon_1-5_819

5'-GAAGGCTCGAGAAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGCCCAGGTCACCTATCACGAC
AATAGTGAAGCCACAGATGTATTGTCGTGATAGGTGACCTGGATGCCTACTGCCTCGGAC
TTCAAGGGGCTAGAATTCGAGCA-3'

Die folgenden Sequenzen sind nach Einbau in pLT3GEPIR zur Benutzung als Kontrollplasmide für das *silencing* gedacht und interferieren mit der RNA des humanen MYB, des humanen MYC beziehungsweise der nichthumanen Renilla Luciferase. Die Sequenzen wurden durch einen verbesserten Algorithmus für die Vorhersage effektiver shRNAs erstellt (75, 77) und uns freundlicherweise von Johannes Zuber (Research Institute for Molecular Pathology, Wien) zur Verfügung gestellt. Die Oligonukleotide wurden von der Firma Integrated DNA Technologies (Coralville, USA) hergestellt.

MYB_721

5'-GAAGGCTCGAGAAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCG**ACTGGACGAACTGATAATGC**
TATAGTGAAGCCACAGATGTAT**AGCATTATCAGTTCGTCCAGG**TGCCTACTGCCTCGGACT
TCAAGGGGCTAGAATTCGAGCA-3'

MYC_1834

5'-GAAGGCTCGAGAAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCG**CACGACGAGAACAGTTGAAA**
CATAGTGAAGCCACAGATGTAT**GTTTCAACTGTTCTCGTCGTT**TGCCTACTGCCTCGGACT
TCAAGGGGCTAGAATTCGAGCA-3'

REN_713 Control

5'-GAAGGCTCGAGAAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCG**CAGGAATTATAATGCTTATCT**
ATAGTGAAGCCACAGATGTAT**AGATAAGCATTATAATTCCTAT**GCCCTACTGCCTCGGACTT
CAAGGGGCTAGAATTCGAGCA-3'

2.1.11 Zelllinien und Mikroorganismen

2.1.11.1 *Escherichia coli* NEB5 α

Der *E. coli* Stamm NEB5 α diente zur Amplifikation rekombinanter Plasmide und kann von der New England BioLabs GmbH unter der Nummer #C2987 käuflich erworben werden.

2.1.11.2 HEK 293T

HEK 293T ist eine Zelllinie aus humanen embryonalen Nierenzellen, die das SV40 T-Antigen enthalten (83). Die Zelllinie wird zur Produktion von Lentiviren benutzt, das SV40-Antigen sorgt dabei für besonders hohe Virustiter. Die Zellen können unter der Nummer #ACC635 von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH bestellt werden.

2.1.11.3 HAP1

HAP1 wurde 2011 als nahezu haploide Zelllinie (ein Bruchstück von Chromosom 15 existiert in diploider Form) aus der Zelllinie KBM7 gewonnen, welche von einem Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie (CML) gewonnen wurde (84, 85). Durch den haploiden sowie adhärenen Charakter, der Empfänglichkeit für Transfektionen, die kurze Verdopplungszeit sowie einem guten Wachstum bei Einzelzellverdünnungen eignete sie sich in dieser Arbeit sehr gut für die Vortestungen sowie für die Auswahl der effektivsten Plasmide vor der lentiviralen Transduktion der *ETV6-RUNX1* positiven BVZ-ALL Zelllinien.

2.1.11.4 SEM

SEM wurde als Zelllinie 1990 aus dem peripheren Blut eines 5-jährigen Mädchens mit einem Rezidiv einer ALL etabliert. Die Zellen exprimieren einen funktionalen IL-7 Rezeptor an der Zelloberfläche und dienen so als positive Kontrolle in der Durchflusszytometrie und im XTT-Viabilitätsassay (86). SEM kann unter der Nummer #ACC546 von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH erworben werden.

2.1.11.5 KG-1

Die Zelllinie KG-1 wurde 1977 aus dem Knochenmark eines 59-jährigen Patienten im Rezidiv seiner akuten myeloischen Leukämie (AML) gewonnen. Sie exprimiert den IL-9 Rezeptor an der Oberfläche und dient so als positive Kontrolle in der Durchflusszytometrie sowie im XTT-Viabilitätsassay (87). KG-1 kann unter der Nummer #ACC14 von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH erworben werden.

2.1.11.6 HEL

HEL wurde 1980 aus dem peripheren Blut eines 30-jährigen Patienten mit einer AML gewonnen. Die Zelllinie exprimiert den EPO Rezeptor an der Oberfläche und dient so als positive Kontrolle in der Durchflusszytometrie (88). HEL kann unter der Nummer #ACC11 von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH erworben werden.

2.1.11.7 THP-1

THP-1 ist eine Zelllinie aus dem peripheren Blut eines 1-jährigen Jungen mit einer AML, die im Jahre 1978 etabliert wurde. Sie dient als negative Kontrolle für die Färbungen der IL-7 und IL-9 Rezeptoren (89). Unter der Nummer #ACC16 kann THP-1 von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH erworben werden.

2.1.11.8 REH

Die Zelllinie REH ist eine humane B-Vorläuferzell-Leukämie-Zelllinie, die 1973 von einem 15-jährigen Mädchen im ersten Rezidiv einer ALL gewonnen wurde (90). Das Besondere an der Zelllinie ist die vorhandene *ETV6-RUNX1* Genfusion sowie eine Deletion des *ETV6*-Wildtyp Allels. Die Zelllinie kann unter der Nummer #ACC22 von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH erworben werden.

2.1.11.9 UoC-B6

Die B-Vorläuferzell-Leukämie-Zelllinie UoC-B6 stammt von Blasten aus dem Knochenmark eines 8-jährigen Mädchens im wiederholten Rezidiv ihrer ALL ab (44). Sie wurde uns freundlicherweise

von Prof. H. Hock (Massachusetts General Hospital, MA) überlassen. Die Zelllinie weist eine t(12;21) Translokation mit *ETV6-RUNX1* Genfusion auf, sowie eine Deletion des *ETV6*-Wildtyp Allels.

2.1.11.10 AT-2

Die Zelllinie AT-2 ist ebenfalls eine humane B-Vorläuferzell-Leukämie-Zelllinie und wurde von einem Jungen während des zweiten Rezidivs seiner ALL gewonnen (91). Die Zelllinie wurde uns freundlicherweise von Prof. J. Rowley (University of Chicago, IL) via Dr. C. Miller (University of Washington, WA) zur Verfügung gestellt. Auch diese Zelllinie weist die *ETV6-RUNX1* Genfusion sowie eine Deletion des *ETV6*-Wildtyp Allels auf.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkulturmethoden

In der folgenden Tabelle 1 werden die verwendeten Zellkulturmedien und Zusätze je Zelllinie zusammengefasst.

Tabelle 1: Zellkulturbedingungen

Zelllinie	Kulturmedium
HEK 293T	Advanced DMEM, 5% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin
HAP1	IMDM, 10% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin
SEM	IMDM, 10% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin
KG-1	RPMI, 10% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin
HEL	RPMI, 10% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin
THP-1	RPMI, 10% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin
REH	RPMI, 10% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin
UoC-B6	RPMI, 10% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin
AT-2	RPMI, 10% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin, ITS 1x

2.2.1.1 Kultivierung von adhärennten Zellen

Die Zelllinien HAP1 und HEK 293T sind adhärennt wachsend und wurden unter Bedingungen von 37°C und 5% CO₂ in den jeweils in Tabelle 1 genannten Medien inkubiert. Die Zelllinien wurden entsprechend der Zelldichte etwa zweimal wöchentlich passagiert. Hierzu wurde das Medium durch Absaugen komplett entnommen, anschließend die Zellen mit PBS gewaschen und mittels Trypsin/EDTA Lösung vom Boden der Kulturflaschen gelöst. Die gelösten Zellen wurden, je nach weiterer Versuchsplanung, im Verhältnis von etwa 1:10 entnommen und in frisches Medium überführt.

2.2.1.2 Kultivierung von Suspensionszellen

Bei den B-Vorläuferzell-Leukämie Zelllinien REH, UoC-B6 und AT-2 sowie den Zelllinien SEM, KG-1, HEL und THP-1 handelt es sich um Suspensionszellen. Mit Ausnahme von SEM wurden sie bei 37°C und 5% CO₂ in RPMI-1640 mit 10% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin inkubiert. Die Zelllinie AT-2 benötigte für ein stabiles Wachstum die zusätzliche Gabe von ITS 1x (entspricht 1 mg/ml Insulin, 0,5mg/ml Transferrin, 0,5 µg/ml Natriumselenit). SEM wurde bei 37°C und 5% CO₂ in IMDM mit 10% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin inkubiert. Wegen der eher langsamen Teilungsraten wurden die Zellen nur etwa 1 bis 2 mal wöchentlich passagiert, wozu sie zentrifugiert (500 x g, 5 Minuten), und anschließend in einem Verhältnis von etwa 1:10 in frisches Medium aufgenommen wurden.

2.2.1.3 Kultivierung von Bakterien

Die Bakterien *E. coli* vom Stamm NEB5α wurden in 300 ml LB-Medium bei 200 Umdrehungen pro Minute bei 37°C über Nacht oder vor der Selektion einzelner Kolonien in 250 µl LB Medium für eine Stunde bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Für die Kultivierung auf LB-Agar-Platten wurden die Bakterien auf den Platten ausgestrichen und bei 37°C über Nacht kultiviert. Bei Bedarf wurde dem Medium bzw. dem LB-Agar zusätzlich Ampicillin (100 µg/ml) zur Selektion der transformierten Bakterien hinzugefügt.

2.2.1.4 Bestimmung der Zellzahl

Die Anzahl und Viabilität der Zellen konnten mittels einer Neubauer Zählkammer ermittelt werden. Hierfür wurden die Zellen mit Trypanblau versetzt, die Adhäsionszellen mussten vorher mit Hilfe von Trypsin/EDTA in Suspension überführt werden. Aufgrund der Fähigkeit von Trypanblau, die Zytoplasmamembran abgestorbener Zellen, nicht aber die Membran lebender Zellen zu permeieren, konnten die Zellen anschließend lichtmikroskopisch gut in tot oder lebendig differenziert und gezählt sowie die jeweiligen Konzentrationen errechnet werden.

2.2.1.5 Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen

Vor dem Einfrieren der Zellen wurden diese zunächst gezählt, sowie eine ausreichende Viabilität sichergestellt. Anschließend wurden sie in einer Konzentration von 1×10^6 - 1×10^7 / ml in ein Medium aus 90% FKS und 10% DMSO überführt. Die mit einem Volumen von 1 ml gefüllten Kryoröhrchen wurden anschließend langsam bei -80°C in mit Isopropanol gefüllten Kühlcontainern eingefroren und für mindestens 48 Stunden gelagert. Für die langfristige Aufbewahrung wurden sie anschließend in einem Tank mit flüssigem Stickstoff und einer Temperatur von etwa -196°C gelagert.

Zum Auftauen der Zellen wurden die gefrorenen Kryoröhrchen im Wasserbad auf 37°C rasch erwärmt und deren Inhalt im Verhältnis 1:10 in vorgewärmtes Medium entsprechend der Tabelle 1 überführt und zentrifugiert (500 x g, 5 Minuten). Anschließend wurden sie in Zellkulturmedium resuspendiert und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Vor Versuchsbeginn wurde immer ein gutes und gleichmäßiges Zellwachstum abgewartet, mindestens aber eine Passage.

2.2.1.6 Transfektion von adhärennten Zellen

Die Transfektion der adhärennten Zellen HEK 293T und HAP1 erfolgte mittels des kationischen Polymers Polyethylenimin (PEI). Hierfür wurden zunächst 9 µl 7,5 mM PEI Lösung in 91 µl 150 mM NaCl Lösung verdünnt sowie in einem zweiten Ansatz 3 µg des zu transfizierenden Plasmids in 100 µl 150 mM NaCl Lösung aufgenommen. Anschließend wurden beide Ansätze vermischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der Reaktionsmix tröpfchenweise in das frisch gewechselte Medium von etwa 50% konfluenten Zellen in einer 6-Well Platte gegeben, welches nach 16 Stunden Inkubation schließlich ausgetauscht wurde.

Um eine dauerhafte, stabile Transfektion des pPB.tetR.ETV6-RUNX1.1-796.mC in HAP1 Zellen zu gewährleisten wurde die Transposition mittels *piggyBac* gewählt. Die hierfür benötigten 3' und 5' *piggyBac terminal repeats* auf dem Plasmid pPB.tetR.ETV6-RUNX1.1-796.mC können von der *piggyBac* Transposase erkannt werden, die wiederum durch das Plasmid mPB transkribiert werden. Während der Transfektion wurde hier das oben genannte Protokoll verwendet, das Transferplasmid pPB.tetR.ETV6-RUNX1.1-796.mC jedoch im Verhältnis von 9:1 mit dem Plasmid für die Transposase mPB gemischt.

2.2.1.7 Produktion von Lentiviren

Zur Produktion der Viren diente die Zelllinie HEK 293T. Es wurde ein lentivirales System der zweiten Generation verwendet, das aus den Hilfsplasmiden pMD2.G sowie psPAX2 besteht, welche für die Produktion von infektiösen Viruspartikeln essenziell sind.

Zunächst wurden etwa 2×10^6 HEK 293T Zellen in einer 15 cm Petrischale ausgesät, sodass eine Konfluenz von etwa 50% bestand. Am Folgetag wurde die Transfektion mittels PEI durchgeführt. Dafür wurden 90 µl 7,5 mM PEI Lösung in 910 µl 150 mM NaCl Lösung verdünnt sowie in einem zweiten Ansatz 10 µg des zu transfizierenden Plasmids, 3,3 µg des Hüllplasmids pMD2.G sowie 6,7 µg des Verpackungsplasmids psPAX2 in 1 ml 150 mM NaCl Lösung aufgenommen. Die beiden Ansätze wurden vermischt und tröpfchenweise auf die Zellen gegeben. Nach 12 Stunden folgte der Mediumwechsel, anschließend wurden nach 24, 48 und 72 Stunden die virushaltigen Überstände abgenommen und mit frischem Medium ersetzt, die

Überstände durch einen Filter mit einer Porengröße von 0,45 µm sterilfiltriert und anschließend bei 4°C für wenige Tage gelagert oder sofort verwendet.

2.2.1.8 Lentivirale Transduktion von Suspensionszellen

Für die lentivirale Transduktion der BVZ-ALL Zelllinien REH, UoC-B6 und AT-2 wurden diese zunächst in einer Konzentration von 2×10^5 Zellen pro Well in 6-Well Platten ausgesät. Pro Well wurden 8 µg/ml *Polybrene* sowie der Virusüberstand hinzugegeben. Nach 24 Stunden erfolgte der Mediumwechsel. Für einen Einbau von nur einer einzelnen Kopie des Vektors in die Zielzellen wird von Fellmann und Zuber eine Infektionsrate von unter 20% empfohlen (75).

2.2.1.9 Selektieren von Klonen

Die Selektion von Klonen erfolgte entweder mittels *fluorescence activated cell sorting* mit dem Gerät FACSAria III der Firma Becton Dickinson oder per *limiting dilution*.

Bei der durchflusszytometrischen Selektion können nach vorher definierten Parametern wie der Fluoreszenzintensität einzelne Zellen heraussortiert und beispielsweise in 96-Well Platten transferiert werden. Vor der Sortierung wurden die Zellen durch ein 35 µm großen Filter vereinzelt und in die BIH Cytometry Core Facility transportiert.

Für die *limiting dilution* wurden die Zellen in Medium auf eine Konzentration von 5 Zellen / ml verdünnt und anschließend in eine 96-Well Platte mit 200 µl pro Well pipettiert. Am Folgetag wurde die 96-Well Platte lichtmikroskopisch kontrolliert und Wells mit nur einer enthaltenen Zelle markiert.

2.2.1.10 Regulation des Tet-On Systems mittels Doxycyclin

Das Tet-On System reguliert die hinter dem *tet responsive element* liegenden Gene und reprimiert sie in Abwesenheit von Doxycyclin. Zur Aktivierung der Genexpression wurde dem Medium 1 µg/ml Doxycyclin zugesetzt.

2.2.1.11 Wachstumsanalyse

Zur Erstellung der Wachstumsanalysen wurden die das transduzierte pLT3GEPIR tragende Zellen in je zweifacher Ausführung in Kulturflaschen mit 5 ml Medium in einer Konzentration von 2×10^5 / ml ausgesät und inkubiert. Zweimal wöchentlich wurde ein Teil der Zellen entnommen und verworfen, vorher wurden durch Verdunstungen entstandene Ungleichheiten im Volumen gewogen und ausgeglichen. Etwa einmal wöchentlich fand eine durchflusszytometrische Bestimmung der Zellzahl eines definierten Volumens im Zellkulturmedium statt. Nach etwa zwei

Wochen wurde bei der Hälfte der Zellen das Tet-On System mittels Doxycyclin aktiviert. Unter Berücksichtigung der gemessenen Konzentrationen sowie der verworfenen Zellen konnten so die Zellzahlen extrapoliert und graphisch dargestellt werden. Hierfür wurde der Verdünnungsfaktor in Bezug zur Ursprungsprobe bestimmt, um die Zellzahl zu bestimmen, die bei fiktiv nie stattgefundener Passage vorhanden wäre.

2.2.1.12 Mykoplasmen-PCR

Kontaminationen von Zellkulturen mit Mykoplasmen führen zu zahlreichen Veränderungen der Zellen. Unter anderem können biochemische und genetische Veränderungen in den Zellen hervorgerufen werden, die sich auf Stoffwechsel, Morphologie und das Wachstumsverhalten auswirken. Aufgrund der natürlichen Resistenz von Mykoplasmen gegen Penicilline und Aminoglykoside schützt die Penicillin/Streptomycin-Prophylaxe in den Kulturmedien nicht vor Kontaminationen. Deshalb wurde in regelmäßigen Abständen ein Mycoplasmentest auf Grundlage einer *polymerase chain reaction* (PCR) zum Ausschluss einer Besiedlung durchgeführt. Die PCR hat den Vorteil einer sehr hohen Sensitivität. Hierfür wurden das "PCR Mykoplasmen-Testkit" von AppliChem verwendet und die Versuche entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.2 Klonierungen

Die folgenden Schritte beschreiben die Herstellung sowie die Amplifikation der Plasmide, die in den darauffolgenden Schritten in die BVZ-ALL Zelllinien eingebaut werden sollen.

2.2.2.1 Annealing

Das *Annealing* beschreibt die Hybridisierung zweier komplementärer DNA-Abschnitte. Die von uns bestellten und in Kapitel 2.1.10 beschriebenen Oligonukleotide wurden in Einzelstrangform geliefert und von uns zunächst in AE-Puffer in einer Endkonzentration von 20 µMol gelöst. Die Ansätze der komplementären Oligonukleotide wurden gemischt und der Reaktionsmix anschließend für 5 Minuten auf 96°C im Thermomixer erhitzt und auf Raumtemperatur herunterkühlen gelassen.

2.2.2.2 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen sind Proteine, die meist palindromische DNA-Sequenzen erkennen und an definierten Stellen trennen. Zum Zerschneiden der DNA-Doppelstränge der Oligonukleotide sowie des pLT3GEPIR wurden die Restriktionsendonukleasen XhoI und EcoRI eingesetzt, welche von New England BioLabs erworben wurden. Für den Reaktionsansatz wurden 1 µg der zu schneidenden DNA, 0,5 µl XhoI, 0,5 µl EcoRI sowie 2 µl 10x CutSmart Puffer

des Herstellers mit nukleasefreiem Wasser auf 20 µl verdünnt. Der Ansatz wurde für 12 Stunden auf 37°C erwärmt.

2.2.2.3 Gelelektrophorese

Zur Isolation der gewünschten Fragmente aus dem geschnittenen pLT3GEPIR wurde eine Gelelektrophorese in einem 0,8% Agarosegel durchgeführt. Dafür wurde zunächst die Agarose in der entsprechenden Konzentration in TAE-Puffer zum Kochen gebracht bis sie sich vollständig gelöst hatte. Ethidiumbromid, welches an die DNA bindet und unter UV-Licht fluoresziert, wurde zur Darstellung der Fragmente in einer Endkonzentration von 5 µg / 100 ml hinzugegeben, das Gel wurde anschließend zum Härten auf Raumtemperatur abgekühlt. Als Referenz wurden 5 µl der *Hyperladder* in eine Geltasche pipettiert. Die DNA-Fragmente wurden mit 6x Ladepuffer vermischt und in das Gel inseriert. Bei 100V Spannung, die über eine Stunde angelegt wurde, migrierten die Fragmente entsprechend ihrer Größe unterschiedlich weit zur Anode. Das gewünschte Fragment konnte so mit Hilfe der Referenz identifiziert und der erfolgreiche Restriktionsverdau kontrolliert werden.

2.2.2.4 DNA Purifikation aus Agarosegel

Um die gewünschten Fragmente aus dem Gel zu isolieren, wurden diese zunächst mit einem Skalpell aus dem Gel getrennt und anschließend mit Hilfe des "*NucleoSpin Gel and PCR Clean-up*" Kits von Macherey-Nagel nach Herstellerangaben aufgereinigt. Das Verfahren basiert darauf, das Gel zunächst bei 50°C in einem Puffer zu lösen und die DNA-Fragmente über einer Silica Membran mehrmals zu waschen, um sie schließlich aus dieser herauszulösen.

2.2.2.5 Ligation

Für die Ligation des mit Restriktionsendonukleasen linearisierten pLT3GEPIR mit dem neuen Oligonukleotid musste zunächst die jeweilige DNA-Konzentration bestimmt werden. Für eine möglichst erfolgreiche Ligation empfiehlt sich ein Stoffmengenverhältnis von etwa 1:3 zugunsten des zu inserierenden Fragmentes. Somit ergibt sich die folgende Formel:

$$\text{Genfragment (ng)} = \text{Masse des Vektors (ng)} \times 3 \times \frac{\text{Genfragment (bp)}}{\text{linearisiertes Plasmid (bp)}}$$

Der Ligationsansatz setzt sich schließlich aus den Genfragmenten und dem gelösten und linearisierten pLT3GEPIR, 10 µl 2x *Quick DNA Ligase* Puffer sowie 1 µl T4 *Quick DNA Ligase* zusammen, aufgefüllt auf 20 µl mit DNase freiem Wasser. Darauf folgte eine Inkubation von 5 Minuten bei Raumtemperatur. Der Puffer und das Enzym sind Bestandteil des "*Quick Ligation Kits*" der Firma New England BioLabs.

2.2.2.6 Transformation

Um die DNA zu amplifizieren muss sie zunächst in transformationskompetente Bakterien eingeschleust werden. Als Bakterienstamm wurde der Stamm NEB5 α gewählt, welcher aus *E. coli* Bakterien besteht und sich als sehr effektiv für die Plasmidpräparation erwiesen hat (92). Als Transformationsmethode wurde die sogenannte Hitzeschock Methode gewählt. Hierzu wurden die Bakterien zunächst langsam auf Eis von -80°C auf etwa 0°C aufgetaut und 50 μ l der Bakterien mit 2 μ l Ligationsansatz vorsichtig vermischt. Nach 30 Minuten Inkubation auf Eis erfolgte ein 45 sekündiges Erwärmen im Wasserbad bei 42°C, anschließend erneut die 2-minütige Abkühlung auf Eis. Nach Zugabe von 250 μ l LB-Medium wurden die Zellen für eine Stunde schüttelnd bei 37°C inkubiert, bevor sie auf LB-Agar-Platten mit 100 μ g/ml Ampicillin, welches der Selektion der erfolgreichen Transformanden diente, ausgestrichen wurden. Es folgte die Inkubation über Nacht bei 37°C.

2.2.2.7 DNA-Amplifikation und Purifikation aus *E. coli*

Zur Amplifikation der DNA wurden *E. coli* Kolonien, die unter dem Selektionsdruck von Ampicillin auf der LB-Agar-Platte wuchsen, gepickt. Anschließend wurden sie in 300 ml LB-Medium mit einem Zusatz von 100 μ g/ml Ampicillin überführt und über 12 bis 16 Stunden bei 37°C in einer Schüttelkultur bei 200 Umdrehungen pro Minute inkubiert. Darauf folgte die Isolation der DNA aus den Bakterien mit dem "NucleoBond Xtra Midi Plus" Kit der Firma Macherey-Nagel nach Herstellerangaben. Hierbei werden die Bakterien zunächst lysiert und der Ansatz danach neutralisiert. Anschließend wird die DNA an eine Silica Membran gebunden und mehrmals gewaschen, bevor sie aus dieser gelöst und in Elutionspuffer AE aufgenommen wird.

2.2.2.8 Bestimmung der DNA-Konzentration

Um die anschließende Bestimmung der DNA-Konzentration durchzuführen wurden die gewonnenen Plasmide, die nach der Purifikation in Elutionspuffer AE aufgenommen wurden, spektralfotometrisch untersucht. Hierfür wurde das Gerät NanoDrop 1000 von Thermo Fisher mit der Software NanoDrop 1000 Version 3.8.1 verwendet. Zur Konzentrationsbestimmung wird hierbei die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt, bei der es zur maximalen Absorption von UV-Licht durch Nukleinsäuren kommt, und mittels Lambert-Beer'schen Gesetz auf die vorliegende Konzentration geschlossen.

2.2.2.9 Sequenzierung der DNA

Zur Kontrolle der erfolgreichen Klonierungen wurden Sanger-Sequenzierungen der DNA vorgenommen. Diese wurden bei der Firma SeqLab in Göttingen durchgeführt und die DNA von uns nach Firmenvorgaben präpariert. Der nach Fellmann et al. (75) ausgewählte Primer miRseq5

(5'-TGTTTGAATGAGGCTTCAGTAC-3') wurde von der Firma TIB MOLBIOL in Berlin bezogen. Die Auswertung erfolgte schließlich mit der Software Snapgene Viewer 5.07.

2.2.3 Analyse von Genexpressionsdaten

Zur Identifizierung von Rezeptoren des JAK-STAT Signalwegs, die in *ETV6-RUNX1* positiven ALL eine besondere Rolle spielen, wurden Genexpressionsdaten der Plattform Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 herangezogen, die in der Literatur besonders häufig benutzt wurde. Mit Hilfe von Dr. U. Ungethüm (BIH, Genomik Core Facility) wurden mit dieser Plattform Analysen der Zelllinien REH und UoC-B6 durchgeführt. Des Weiteren wurden bereits veröffentlichte Datensätze von REH (53, 89, 93-96) (GSE13313, GSE20011, GSE20115, GSE29639, GSE34880, GSE36133), AT-2 (53) (GSE29639), von *ETV6-RUNX1* positiven Blasten aus dem Knochenmark von 219 Patient/-innen (97-102) (GSE11877, GSE13159, GSE13351, GSE17459, GSE47051, GSE73578, GSE79533) sowie von 19 gesunden Kindern im Alter von unter 15 Jahren (103) (GSE11504), herangezogen. Dabei wurden die Daten sowohl nach dem RMA-, als auch nach dem MAS5-Algorithmus normalisiert und zusammengeführt. Die Probesets wurden mittels MAS5 in *present*, *marginal* und *absent* unterteilt, über den RMA Algorithmus hingegen konnte die Expressionsstärke besser eingeschätzt werden, dies entspricht auch dem Vorgehen der *Cancer Cell Line Encyclopedia*. Die Rezeptoren und Gene des Signalwegs wurden der Literatur entnommen (57, 58). Für gleiche Probesets gleicher Zelllinien aus unterschiedlichen Datensätzen wurden schließlich Durchschnittswerte der Genexpression (RMA) ermittelt, hierfür wurde aufgrund des logarithmischen Charakters des vom Algorithmus ermittelten Wertes zunächst der Numerus zur Basis 2 gebildet, der Durchschnitt ermittelt und daraus wieder der Logarithmus errechnet. Schließlich wurde für die im Anhang dieser Arbeit dargestellte Tabelle 6 der verbesserten Übersichtlichkeit halber für jedes Gen, bei dem mehrere *probesets* zur Verfügung standen, nur jeweils das *probeset* mit dem stärksten Signal ausgewählt.

Interessante Rezeptoren wurden durch starke Expression aller funktional relevanten Gene eines Rezeptors oder deutlich verringerte Expression eines oder mehrerer funktional relevanter Gene im Vergleich zur gesunden Vergleichspopulation identifiziert.

Weiterhin wurden RNA-Sequenzierungsdaten der Zelllinie REH in die tabellarische Darstellung mitaufgenommen. Diese konnten aus den Veröffentlichungen des *Human Protein Atlas* Projekt entnommen werden (104).

Die *Cancer Cell Line Encyclopedia* wurde 2020 mit Proteomdaten aus der Veröffentlichung von Nusinow et al. ergänzt, die mittels *liquid chromatography - mass spectrometry* Verfahren aus unter anderem der Zelllinie REH gewonnen wurden (105). Auch diese Daten wurden in den Vergleich

der JAK-STAT Rezeptorgene mit einbezogen, da jedoch für nur 7 der 63 untersuchten Gene Proteomdaten vorlagen, wurden diese nicht in die im Anhang dieser Arbeit befindliche Tabelle 6 mit aufgenommen.

Mithilfe von SPSS statistics (v25) wurden schließlich die Affymetrix Genexpressionsdaten mit den RNA-Sequenzierungsdaten sowie mit den Proteomdaten nach Pearson korreliert. Hierfür wurden die Proteomdaten nach Rücksprache mit David P. Nusinow (Harvard Medical School, MA) über die Erstellung einer Rangabfolge der Expressionsstärke vergleichbar gemacht.

2.2.4 Durchflusszytometrie

Messungen der Expression des intrazellulären Fusionsproteins, der Oberflächenexpression von Proteinen, der Expression von Fluoreszenzproteinen sowie des Zellwachstums wurden durchflusszytometrisch durchgeführt. Hierbei werden die Zellen in hoher Geschwindigkeit nacheinander durch eine Küvette gelenkt, in welcher sie von Lasern mit unterschiedlichen Wellenlängen angeregt werden und das emittierende Streulicht oder Fluoreszenzsignal von Detektoren aufgefangen wird. Anhand des Streulichts kann auf die Größe und Granularität der Zellen geschlossen werden, anhand der Fluoreszenzsignale können Fluoreszenzintensität sowie gleichzeitiges Vorliegen von fluoreszierenden Proteinen in unterschiedlichen Farbspektren wahrgenommen werden. Zur Vermeidung von Verstopfungen der Messküvette wurden alle Suspensionen mit Ausnahme der Messungen während der Wachstumsanalysen vor der Messung durch ein Sieb mit einer Porengröße von 35 µm gefiltert. Die Messungen erfolgten an einem MACSQuant VYB der Firma Miltenyi Biotec, welches mit einem Laser im violetten Spektrum (405 nm), einem Laser im blauen Spektrum (488 nm) sowie einem Laser im gelben Spektrum (561 nm) ausgestattet ist. Die Auswertungen erfolgten mittels FlowJo (Version 10.6.1) oder FCS Express (Version 6). Wurde zum besseren Vergleich der Signalintensität die relative Fluoreszenzintensität (FI) benötigt, wurde die gemessene Probe mithilfe der folgenden Formel in Relation zur entsprechenden Kontrolle bzw. Referenz gesetzt:

$$\text{relative Fluoreszenzintensität} = \frac{FI(\text{Referenz}) - FI(\text{Isotyp})}{FI(\text{Probe}) - FI(\text{Isotyp})}$$

2.2.4.1 Färbung von Oberflächenproteinen

Für die Immunfärbungen der Oberflächenantigene wurden primär fluoreszenzmarkierte, monoklonale Antikörper verwendet. Pro Ansatz wurden $0,5 \times 10^6$ Zellen in FACS-Röhrchen überführt, zentrifugiert (500 x g, 5 Minuten) und mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 200 µl Stabilisierungspuffer aus 1x PBS, 1% BSA und 0,09% NaN₃ aufgenommen und

mit dem primären Antikörper bzw. der Isotypkontrolle lichtgeschützt für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal zentrifugiert (500 x g, 5 Minuten), mit je 1 ml PBS gewaschen und erneut in 200 µl Stabilisierungs-Puffer aufgenommen, um anschließend am MACSQuant VYB analysiert zu werden.

2.2.4.2 Färbung von intrazellulären Proteinen

Für die intrazellulären Färbungen von ETV6-RUNX1 wurden 5×10^5 Zellen zunächst zweimal in PBS gewaschen und anschließend für 10 Minuten in 500 µl 4% Formaldehyd in 1x PBS Lösung fixiert. In TBS Saponin Puffer (1x TBS, 0,1% Saponin, 0,09% NaN_3) wurden die Zellen zweimalig gewaschen und die Membran gleichzeitig für Proteine permeabel gemacht. Bei 4°C erfolgte für 30 Minuten das Blockieren unspezifischer Bindungsstellen des sekundären Antikörpers mit 1:20 *normal donkey serum* in PBS Saponin Puffer (1x PBS, 1% BSA, 0,1% Saponin, 0,09% NaN_3). Nach einmaligem Waschen erfolgte für 60 Minuten bei 4°C die Inkubation des primären Antikörpers in 200 µl PBS Saponin Puffer (*Rabbit anti ETV6* 1:100 verdünnt). Anschließend wurden die Zellen zweimalig in 3 ml TBS Saponin gewaschen, lichtgeschützt und bei 4°C in 200 µl PBS Saponin Puffer folgte nun die Inkubation mit dem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper (*Donkey anti Rabbit Rhodamine Red* 1:400 verdünnt). Zuletzt wurden die Zellen erneut zweimalig in TBS Saponin Lösung gewaschen, in 400 µl Stabilisierungs-Puffer aufgenommen und 10 Minuten vor der durchflusszytometrischen Analyse mit 10 µM DAPI gefärbt.

Es erfolgten zusätzlich jeweils Färbungen von Kontrollansätzen entsprechend dem oben beschriebenen Protokoll ohne primären Antikörper jedoch mit sekundärem Antikörper.

2.2.4.3 Präparation für Fluoreszenzproteinanalysen

Für die Messung der transduzierten und transfizierten Zellen, die EGFP bzw. *mCherry* exprimierten, wurden diese zunächst zentrifugiert (500 x g, 5 Minuten) und anschließend in Stabilisierungs-Puffer resuspendiert. Vor der Messung wurden die Zellen bei Bedarf mit 1 µM DAPI versetzt.

2.2.5 XTT-Viabilitätsassay

Zum Erstellen der *kill-curves* sowie der Viabilitätsassays nach Zytokingaben wurde das Tetrazoliumsalz XTT verwendet. Der Versuch basiert darauf, dass das gelbe XTT in Anwesenheit metabolisch aktiver Zellen zu einem rötlichen Formazan-Farbstoff reduziert wird. Metabolisch aktivere Zellen und eine höhere Zellzahl führen so zu einer stärkeren Absorption in der anschließenden fotometrischen Untersuchung. Bei gleicher Ausgangszellzahl kann so auf die Vitalität der Zellen geschlossen werden.

Die Messungen erfolgten mit dem Fotometer Multiskan Ascent 96/384 Plate Reader der Firma Thermo Fisher in den Wellenlängen 492 nm und 630 nm. Um Störgrößen zu verringern, die beispielsweise durch Fingerabdrücke zustande kommen können, wurde die optische Dichte bei 630 nm anschließend immer von der optischen Dichte bei 492 nm subtrahiert.

2.2.5.1 Puromycin *kill-curves*

Die BVZ-ALL Zelllinien REH, UoC-B6 und AT-2 wurden jeweils in RPMI ohne Phenolrot mit 10% FKS in einer Konzentration von 100.000 Zellen / ml aufgenommen und auf 96-Well Platten mit je 200 µl pro Well verteilt. Für die spätere Berechnung wurden außerdem einige Wells nur mit Medium ohne Zellen befüllt. Anschließend wurden die verschiedenen Reihen mit Konzentrationen von 0, 0,25, 0,5, 1, 2 und 3 µg/ml Puromycin beimpft. Nach 24, 48 und 72 Stunden Inkubationszeit bei 37°C wurden jeweils 100 µl des XTT-Reaktionsansatzes, bestehend aus 1 mg/ml XTT gelöst in RPMI ohne Phenolrot sowie 1,25 mM PMS im Verhältnis 50:1, hinzugegeben. Nach drei weiteren Stunden Inkubation wurde die Platte wie oben beschrieben fotometrisch untersucht. Nach Subtraktion der optischen Dichte des Mediums ohne Zellen von den weiteren Ansätzen wurden für jeweils gleiche Ansätze Durchschnittswerte gebildet.

2.2.5.2 Zytokin-Viabilitätsassays

Für den Versuch wurden die Zelllinien REH, UoC-B6 und AT-2 sowie die jeweiligen positiven Kontrollzelllinien KG-1 und SEM in RPMI bzw. IMDM ohne Phenolrot sowie ohne FKS aufgenommen und auf 96-Well Platten in einer Konzentration von 20.000 Zellen pro 190 µl pro Well verteilt. Einige Wells wurden außerdem mit den jeweiligen Medien aber ohne Zellen befüllt. Die zu testenden Zytokine wurden in verschiedenen Konzentrationen verdünnt und jeweils in 10 µl Medium verdünnt den jeweiligen Ansätzen hinzugefügt. Es wurden pro Ansatz immer mindestens 3 Wells verwendet. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurden jeweils 100 µl des XTT-Reaktionsansatzes, bestehend aus 1 mg/ml XTT gelöst in RPMI ohne Phenolrot sowie 1,25 mM PMS im Verhältnis 50:1, hinzugegeben. Weitere drei Stunden Inkubation später wurde die fotometrische Untersuchung durchgeführt. Die optische Dichte des Mediums ohne Zellen wurde von den anderen Ansätzen subtrahiert, anschließend wurden Durchschnittswerte gebildet. Eine weitere fotometrische Messung in einem jeweils gesonderten Ansatz fand bereits direkt nach Aussäen der Zellen und Inkubation mit XTT zu einem Zeitpunkt t_0 statt.

2.2.6 Immunzytochemie für die Fluoreszenzmikroskopie

Das folgende Protokoll zur Anfertigung geschichteter Aufnahmen von Immunfärbungen basiert auf den Arbeiten von Solovei et al. 2002 (106, 107). Das Besondere ist hier die Erhaltung der dreidimensionalen Struktur des Zellkerns während der Färbung.

Vor dem Aufbringen der Zellen auf Deckgläser erfolgte die Reinigung dieser, indem sie in Hellendahl Küvetten für zwei Stunden auf dem Wipptisch in Reinigungslösung (2,5 M NaOH in 60% Ethanol) aufbewahrt wurden, anschließend erfolgte das viermalige Waschen für je 5 Minuten in Hellendahlküvetten mit reinem, entionisiertem Wasser. Mit einem Liquid-Blocker Fettstift wurde eine Begrenzung auf den Deckgläsern aufgetragen und für 45 Minuten getrocknet. Für die verbesserte Adhäsion der Suspensionszellen auf den Deckgläsern folgte die Beschichtung mit 200 µl Poly-L-Lysin Lösung (0,1% Poly-L-Lysin in H₂O) innerhalb der Liquid-Blocker Begrenzung, eine einstündige Inkubation in einer feuchten Kammer (*Stain Tray*) und ein einmaliges Spülen mit reinem, entionisiertem Wasser. Nach der Lufttrocknung folgte das Auftragen von 1×10^6 Zellen in 200 µl Medium auf das Deckglas und die Inkubation für 60 Minuten in der feuchten Kammer im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂.

Nach Inkubation und Anheftung der Zellen an die Deckgläser wurde das Medium vorsichtig ablaufen gelassen und die Zellen für 60 Sekunden in 300 µl 0,3x PBS in der feuchten Kammer inkubiert. Anschließend erfolgte die Fixierung der Zellen für 10 Minuten mit 200 µl 4% Formaldehyd in 0,3x PBS Lösung. Das Formaldehyd wurde zunächst dreimal für 5 Minuten in 1x TBS herausgewaschen, anschließend wurde die Zellmembran permeabilisiert, indem die Deckgläser dreimal für 5 Minuten in 1x TBS mit 0,5% TritonX gewaschen wurden.

Im nächsten Schritt wurden zunächst die unspezifischen Bindungsstellen für den sekundären Antikörper blockiert, indem 200 µl 1:20 *normal donkey serum* in Stabilisierungs-Puffer (1x PBS 1% BSA und 0,09% NaN₃) auf die Zellen gegeben wurden, es folgte die 30-minütige Inkubation in der feuchten Kammer.

Die Blockierungslösung wurde vorsichtig ablaufen gelassen, danach erfolgte zunächst für den primären Antikörper (in 200 µl Stabilisierungs-Puffer gelöster Antikörper gemäß Tabelle 2) und anschließend für den sekundären Antikörper (in 200 µl Stabilisierungs-Puffer gelöster Antikörper gemäß Tabelle 2) die Inkubation für je eine Stunde in der feuchten Kammer, danach wurden die nicht gebundenen Antikörper jeweils dreimalig für 2 Minuten mit 1x TBS herausgewaschen. Ab dem Auftragen des sekundären Antikörpers erfolgten alle weiteren Schritte lichtgeschützt im abgedunkelten Raum.

Tabelle 2: Verwendete Antikörperkonzentrationen für ETV6-RUNX1 Färbungen

Primäre Antikörper	Verdünnung
<i>Rabbit anti ETV6</i>	1:100
<i>Rat anti ETV6-RUNX1 (TEL6F2)</i>	1:100
Sekundäre Antikörper	Verdünnung
<i>Donkey anti Rabbit Alexa 488</i>	1:100
<i>Donkey anti Rabbit Rhodamine Red</i>	1:400
<i>Donkey anti Rat Cy5</i>	1:50
<i>Donkey anti Rat Rhodamine Red</i>	1:100

Zur Darstellung der DNA erfolgte dann die Färbung mit 10 µM DAPI gelöst in 200 µl 1x PBS, welches nach 10 Minuten Inkubation entfernt wurde. Die Deckgläser wurden schließlich in 1x TBS getaucht und zum Schutz der fotosensiblen Fluorochrome in 50 µl Vectashield Medium eingebettet. Nach 10-minütiger Trocknung wurden die Deckgläser kurzzeitig bei 4°C aufbewahrt, bis sie am konfokalen Mikroskop (Leica DM 2500 TCS SPE) oder am konventionellen Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiovert 200) analysiert werden konnten.

Es erfolgten jeweils zusätzliche Immunfärbungen von Kontrollansätzen nach dem oben beschriebenen Protokoll ohne primären Antikörper jedoch mit sekundärem Antikörper.

2.2.7 Auswertung der immunzytochemischen Analysen

Die Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurde mithilfe der Programme ImageJ, Adobe Photoshop sowie Microsoft Excel durchgeführt. Um die intranukleäre Signalintensität in allen Ebenen des Zellkerns zu beurteilen wurden die Präparate mit einem konventionellen Fluoreszenzmikroskop untersucht und unter gleichen Bedingungen aufgenommen. Anschließend wurden anhand der DAPI Aufnahmen die Zellkerne identifiziert, umrundet und mit den Aufnahmen der EGFP und *Rhodamine Red* Signale zusammengefügt. Somit konnten mittels ImageJ die Signalintensitäten innerhalb des Zellkerns gemessen und einander zugeordnet werden. Dies erfolgte im Mittel für etwa 150 Zellen. Ein *spillover* der Fluoreszenzen in den jeweils anderen Farbkanal konnte schließlich optisch anhand des Streudiagramms kompensiert werden.

3. ERGEBNISSE

3.1 Charakterisierung *ETV6-RUNX1* positiver BVZ-ALL Zelllinien

3.1.1 REH

Für die Zelllinie REH existieren bereits zahlreiche veröffentlichte zytogenetische Charakterisierungen (108-110). Die vorgenommenen Untersuchungen wie die *short tandem repeat* Analyse (STR), ein Karyogramm (siehe Abbildung 8) sowie die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) entsprechen den in der Literatur beschriebenen Charakteristika und werden im Folgenden aufgeführt (78). Die Charakterisierung von REH erfolgte in Zusammenarbeit mit K. Schelling sowie dem Institut für Medizinische Genetik und Humangenetik, Charité - Universitätsmedizin Berlin (Prof. M. Digweed).

Konventionelle Chromosomenanalyse:

46,X,-X,del(3)(p21p22-4),del(4)(q32),del(5)(q31),der(12)inv(12)t(12;?),der(12)t(12;?),add(16)(q24),+add(16)(q24)

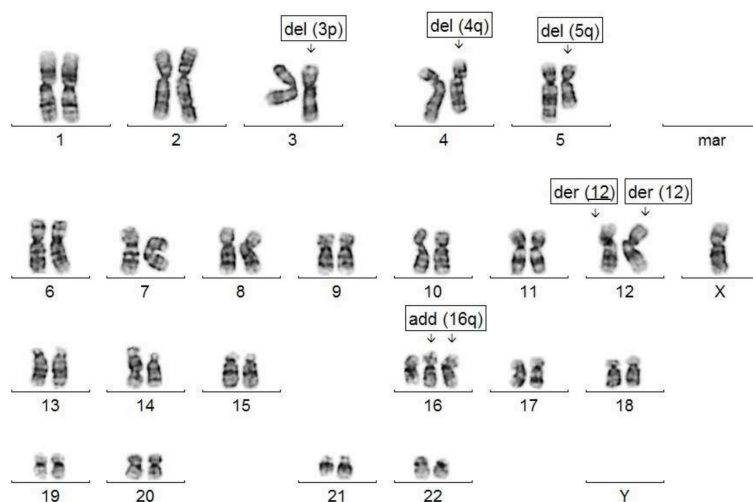


Abbildung 8: Karyogramm von REH. In Zusammenarbeit mit K. Schelling.

Molekularzytogenetik mittels FISH:

nuc ish 12p13(*ETV6*x1),21q22(*RUNX1*x4)(*ETV6* con *RUNX1*x1)

STR-Analyse:

vWA: 14, 15; **HUMTH01:** 7, 9; **D16S539:** 9, 13; **D7S820:** 9, 12; **CSF1PO:** 12, 13; **D5S818:** 11, 12; **TPOX:** 8, 8; **D13S317:** 11, 14; **DXS101:** 25; **HUMARA:** 21

Immunzytochemie

In REH Zellen konnte das Fusionsprotein ETV6-RUNX1 aufgrund der *ETV6*-Wildtyp Deletion sowohl durch einen ETV6-Antikörper als auch durch den spezifischen ETV6-RUNX1 Antikörper TEL6F2, der an den klassischen Übergangsbereich bindet, nachgewiesen werden (siehe Abbildung 9). Dessen Verteilungsmuster ist, wie vorbeschrieben, intranukleär und eher granulär (79, 80).

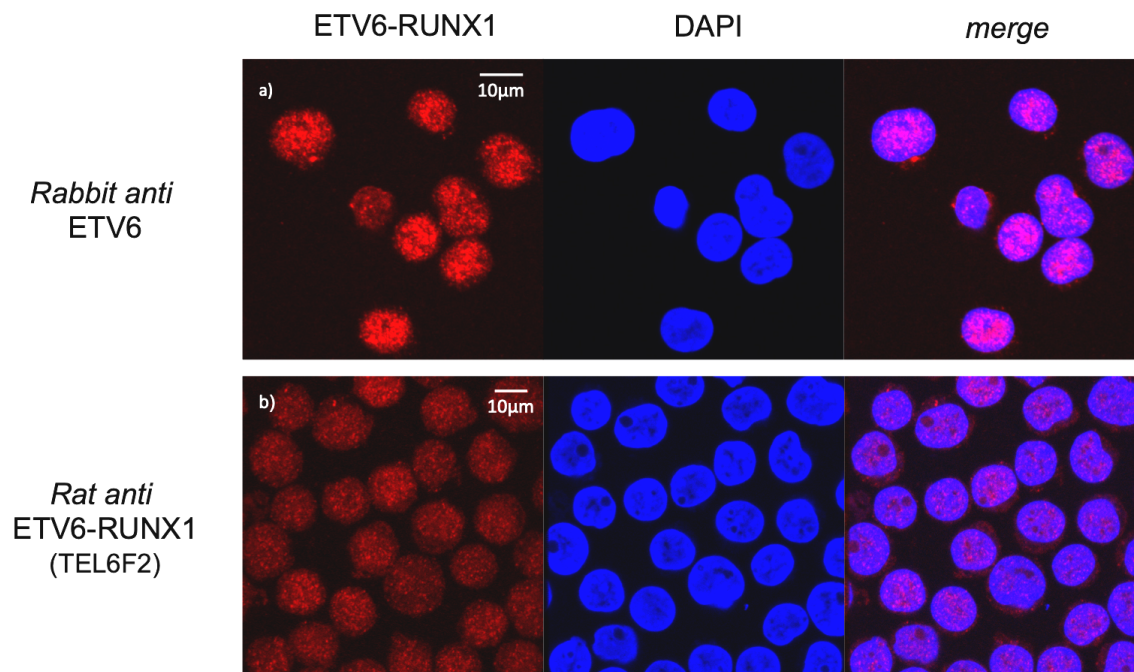


Abbildung 9: Immunzytochemischer Nachweis der ETV6-RUNX1 Expression in REH Zellen: Konfokale, überwiegend äquatoriale Aufnahmen von REH Zellen mit typischem (granulär, vor allem intranukleär) Verteilungsmuster von ETV6-RUNX1 a) Anti ETV6 mit *Rhodamine Red*-Fluorochrom im linken Bild, DAPI-Kernfärbung im mittleren Bild, *overlay* im rechten Bild b) Anti ETV6-RUNX1 (TEL6F2) mit *Cy5*-Fluorochrom im linken Bild, DAPI-Kernfärbung im mittleren Bild, *overlay* im rechten Bild. In Zusammenarbeit mit Dr. K. Kaulfuß.

Puromycin kill-curve

Als Vorversuch zur späteren lentiviralen Transduktion und anschließender Selektion mit Puromycin wurde ein XTT-Assay zur Ermittlung der Toxizität durchgeführt. Eine Konzentration von etwa 1 µg/ml für REH erscheint als ausreichend toxisch (siehe Abbildung 10).

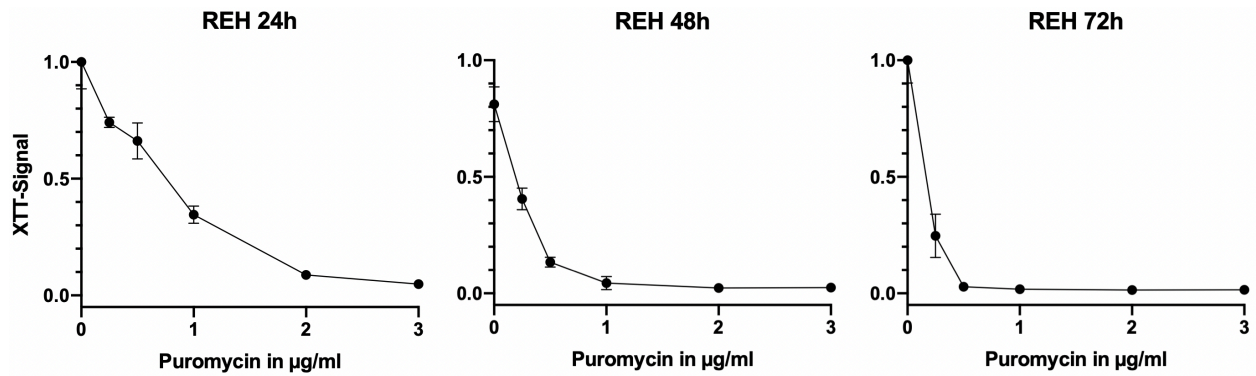


Abbildung 10: Puromycin kill-curve in REH Zellen: XTT-Assay von REH Zellen in Abhängigkeit der Puromycin-Konzentration nach 24, 48 und 72 Stunden. In Zusammenarbeit mit P. Buder und P. Deichmann.

3.1.2 UoC-B6

Die UoC-B6 Zelllinie wurde innerhalb der Arbeitsgruppe bereits von Dr. Kaulfuß 2016 zytogenetisch charakterisiert, das ETV6-RUNX1 Fusionsprotein konnte hier nachgewiesen werden (46). In dieser Arbeit werden ergänzend die bislang unveröffentlichte STR-Analyse von UoC-B6 sowie weitere immunzytochemische Analysen der Zelllinie dargestellt. Die Erstellung des Karyogramms (siehe Abbildung 11) sowie der STR-Analyse erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Genetik und Humangenetik, Charité - Universitätsmedizin Berlin (Dr. V. Boldt, Dr. H. Pimentel).

Konventionelle Chromosomenanalyse:

47~49,X,-X[20],t(2;14)(p11.2;q32)[20],del(6)(q15q22)[20],t(7;15)(q36;q21)[20],
der(8)del(8)(p21)add(8)(q24)x2[20],add(13)(q34)[7],add(16)(p13.2),+1~2x21[20]



Abbildung 11: Karyogramm von UoC-B6. In Zusammenarbeit mit Dr. V. Boldt.

Molekularzytogenetik mittels FISH:

nuc ish 12p13(ETV6x2),21q22(RUNX1x4~5)(ETV6 con RUNX1x2)[172/200]/

12p13(ETV6x1),21q22(RUNX1x4)(ETV6 con RUNX1x1)[14/200]/

12p13(ETV6x3),21q22(RUNX1x4~5)(ETV6 con RUNX1x2)[8/200]

STR-Analyse:

vWA: 17, 18; **HUMTH01:** 7, 8; **D16S539:** 11, 13; **D7S820:** 8, 10; **CSF1PO:** 10, 11; **D5S818:** 12, 12; **TPOX:** 8, 11; **D13S317:** 10, 12; **DXS101:** 28; **HUMARA:** 19

Immunzytochemie

Sowohl mit einem ETV6-Antikörper als auch mit einem spezifischen ETV6-RUNX1-Antikörper, der an den klassischen Übergangsbereich bindet, konnte das ETV6-RUNX1 Fusionsprotein immunzytochemisch nachgewiesen werden (siehe Abbildung 12). Dessen Verteilung ist, wie vorbeschrieben, vor allem im Zellkern und granulär angeordnet (79, 80).

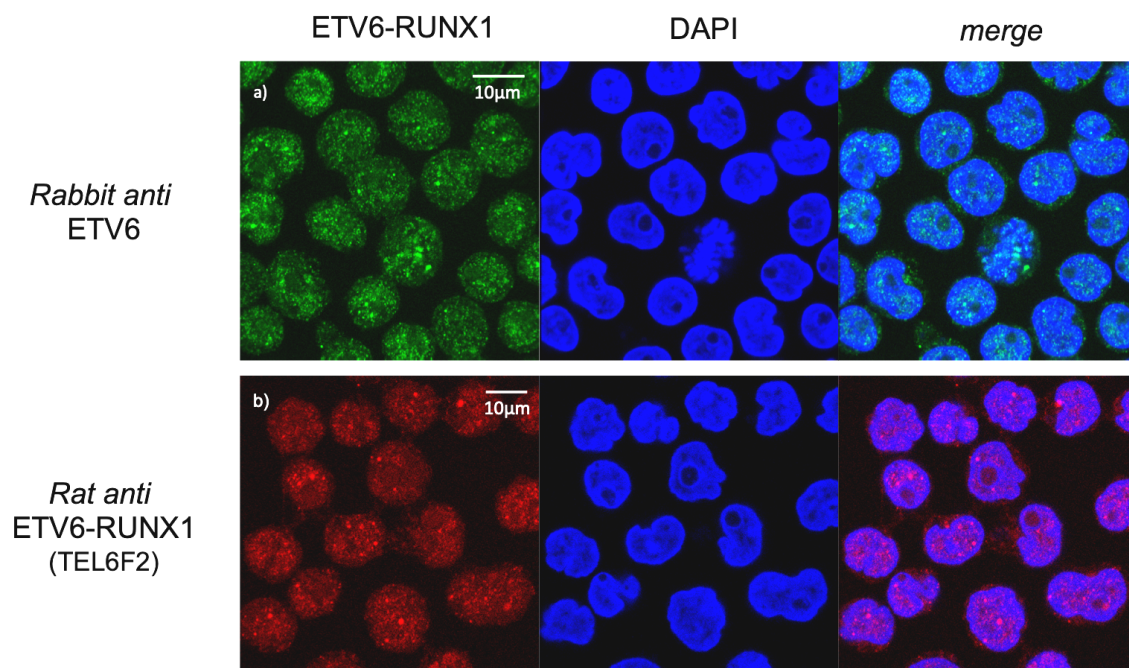


Abbildung 12: Immunzytochemischer Nachweis der ETV6-RUNX1 Expression in UoC-B6 Zellen: Konfokale, überwiegend äquatoriale Aufnahmen von UoC-B6 Zellen mit typischem (granulär, überwiegend intranukleär) Verteilungsmuster von ETV6-RUNX1 a) Anti ETV6 mit Alexa 488-Fluorochrom im linken Bild, DAPI-Kernfärbung im mittleren Bild, *overlay* im rechten Bild b) Anti ETV6-RUNX1 (TEL6F2) mit *Rhodamine Red*-Fluorochrom im linken Bild, DAPI-Kernfärbung im mittleren Bild, *overlay* im rechten Bild. In Zusammenarbeit mit P. Buder und P. Deichmann.

Puromycin kill-curve

Als Vorversuch zur späteren lentiviralen Transduktion und anschließender Selektion mit Puromycin wurde ein XTT-Assay zur Ermittlung der Toxizität durchgeführt. Eine Konzentration von etwa 1 µg/ml für UoC-B6 erscheint als ausreichend toxisch (siehe Abbildung 13).

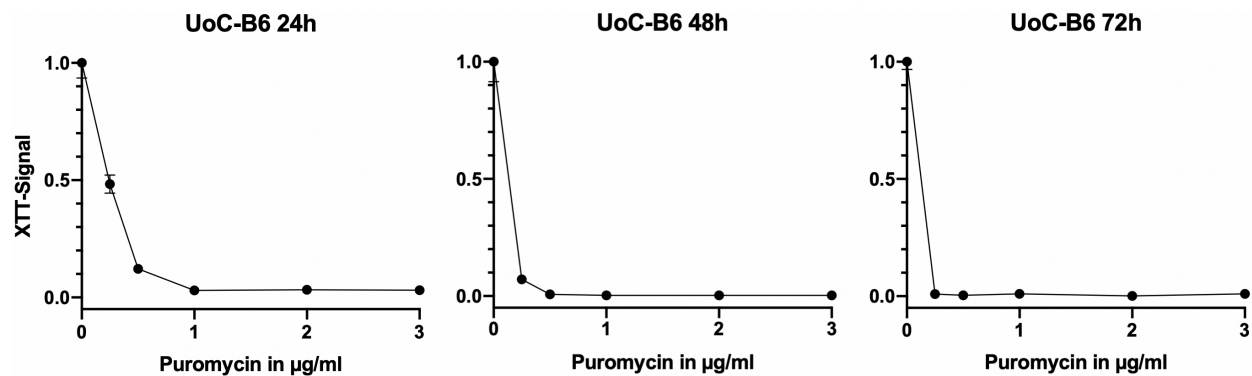


Abbildung 13: Puromycin kill-curve in UoC-B6 Zellen: XTT-Assay von UoC-B6 Zellen in Abhängigkeit der Puromycin Konzentration nach 24, 48 und 72 Stunden. In Zusammenarbeit mit P. Buder und P. Deichmann.

3.1.3 AT-2

Die zunächst von uns erhaltenen AT-2 Zellen präsentierten sich nach STR-Analyse als REH Zellen und konnten dementsprechend zunächst nicht in unsere Versuche mit einfließen. Über Dr. C. Miller (University of Washington, WA) konnten schließlich AT-2 Zellen bezogen werden, die sich als die von Prof. J. Rowley (University of Chicago, IL) ursprünglich etablierten darstellten. Mittels konventioneller Chromosomenanalyse (siehe Abbildung 14) wurde der von Fears et al. (91) beschriebene Karyotyp bestätigt, außerdem zeigte sich in 10 von 20 analysierten Metaphasen eine zusätzliche Deletion im langen Arm (q-Arm) eines Chromosoms 6. Des Weiteren konnte mittels FISH die *ETV6-RUNX1* Fusion sowie die *ETV6*-Wildtyp Deletion bestätigt werden. In dieser Arbeit wird außerdem erstmals die STR-Analyse von AT-2 gezeigt, anhand derer die Zelllinie gut identifiziert werden kann. Die zytogenetische Charakterisierung, die FISH sowie die STR-Analyse der AT-2-Zellen erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Genetik und Humangenetik, Charité - Universitätsmedizin Berlin (Dr. V. Boldt, Prof. M. Digweed).

Konventionelle Chromosomenanalyse:

48,XY,ins(5;8)(q3?5;q2?2q24),der(12)t(X,12)(?p22;p13),t(12;21)(p13;q22),+21,+21[10]/48,idem, del(6)(q13)[10]

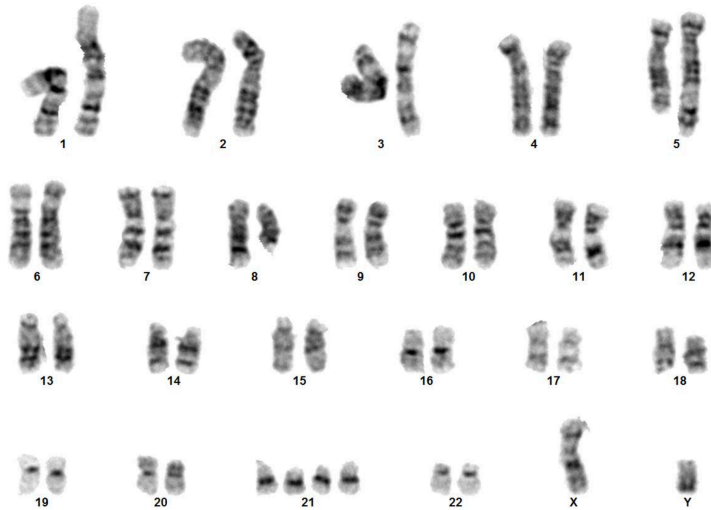


Abbildung 14: Karyogramm von AT-2. In Zusammenarbeit mit Dr. V. Boldt.

Molekularzytogenetik mittels FISH:

nuc ish 12p13(ETV6x1),21q22(RUNX1x4~5)(ETV6 con RUNX1x1) [99/100]

STR-Analyse:

vWA: 17, 17; **HUMTH01:** 9, 9.3; **D16S539:** 9, 9; **D7S820:** 10, 10; **CSF1PO:** 11, 12; **D5S818:** 10, 12; **TPOX:** 8, 11; **D13S317:** 10, 10; **DXS101:** 24; **HUMARA:** 20

Immunzytochemie

Immunzytochemisch ließ sich das Fusionsprotein ETV6-RUNX1 wegen der vorhandenen *ETV6*-Wildtyp Deletion durch einen ETV6-Antikörper nachweisen und zeigt das typische granuläre und intranukleäre Verteilungsmuster (79, 80). Der für den spezifischen Übergangsbereich konstruierte Antikörper ETV6-RUNX1 (TEL6F2) zeigt kein Signal (siehe Abbildung 15). Dies weist darauf hin, dass in AT-2 Zellen eine atypische Form des Fusionsproteins vorliegt.

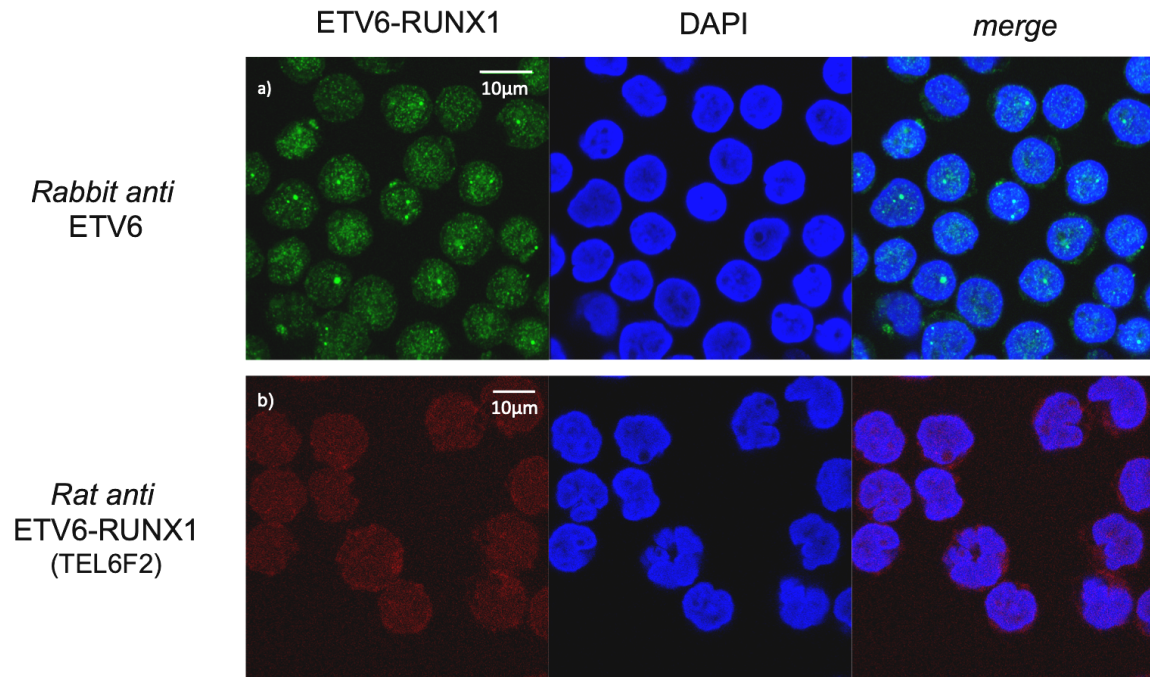


Abbildung 15: Immunzytochemischer Nachweis der ETV6-RUNX1 Expression in AT-2 Zellen: Konfokale, überwiegend äquatoriale Aufnahmen von AT-2, das Fusionsprotein wird vom ETV6-Antikörper gebunden, nicht aber vom ETV6-RUNX1 (TEL6F2) Antikörper gegen den Übergangsbereich a) Anti ETV6 und Alexa 488-Fluorochrom im linken Bild, DAPI Kernfärbung im mittleren Bild, *overlay* im rechten Bild b) Anti ETV6-RUNX1 (TEL6F2) und *Rhodamine Red*-Fluorochrom im linken Bild, DAPI Kernfärbung im mittleren Bild, *overlay* im rechten Bild. In Zusammenarbeit mit P. Buder und P. Deichmann.

Puromycin *kill-curve*

Als Vorversuch zur späteren lentiviralen Transduktion und anschließender Selektion mit Puromycin wurde ein XTT-Assay zur Ermittlung der Toxizität durchgeführt. Eine Konzentration von etwa 1 µg/ml für AT-2 erscheint als ausreichend toxisch (siehe Abbildung 16).

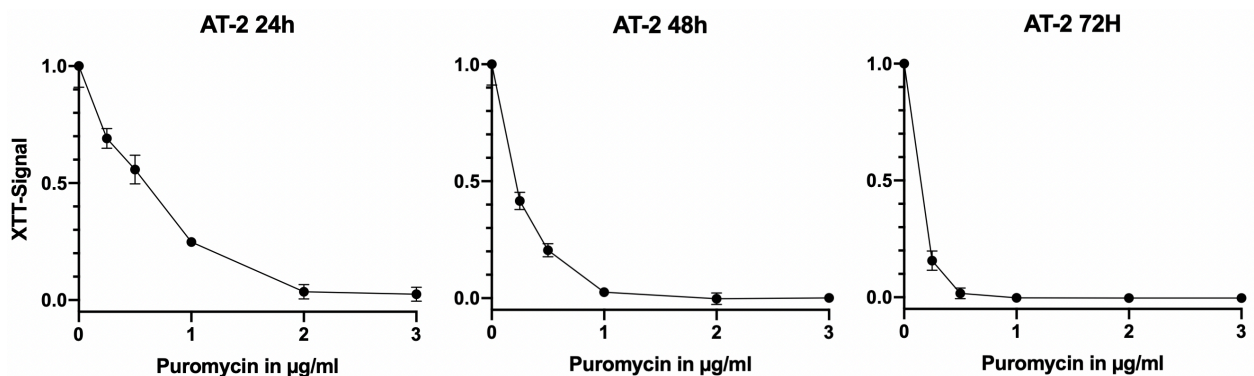


Abbildung 16: Puromycin *kill-curve* in AT-2 Zellen: XTT-Assay von AT-2 Zellen in Abhängigkeit der Puromycin Konzentration nach 24, 48 und 72 Stunden. In Zusammenarbeit mit P. Buder und P. Deichmann.

3.2 JAK-STAT in *ETV6-RUNX1* positiven BVZ-ALL Zelllinien

Um den JAK-STAT Signalweg in *ETV6-RUNX1* positiver ALL näher zu charakterisieren, wurde zunächst ein systematischer Ansatz gewählt, um *in silico* interessante Rezeptoren des JAK-STAT Signalwegs zu identifizieren. Hierfür wurden 63 Gene betrachtet, die für Rezeptoren des JAK-STAT Signalwegs kodieren (57, 58). Im nächsten Schritt wurden ausgewählte Rezeptoren davon näher untersucht.

3.2.1 Expression von Rezeptoren des JAK-STAT Signalwegs

Zur Identifizierung von zellulären Zytokinrezeptoren des JAK-STAT Signalwegs, die in *ETV6-RUNX1* positiver ALL exprimiert werden, wurden insbesondere *microarray* Genexpressionsdaten der BVZ-ALL Zelllinien REH, UoC-B6 und AT-2 sowie von *ETV6-RUNX1* positiven Blasten von 219 Patient/-innen analysiert, aber auch RNA-Sequenzierungsdaten sowie Proteomdaten der Zelllinie REH.

Um die Reliabilität der *microarray* Genexpressionsdaten besser einzuschätzen, wurden die ermittelten Durchschnittswerte des RMA-Algorithmus der Affymetrix *microarray* Genexpression der Rezeptoren des JAK-STAT Signalwegs von REH sowohl mit den veröffentlichten RNA-Sequenzierungsdaten aus den Arbeiten von Thul et al. (104) im Rahmen des *Human Protein Atlas* Projektes, als auch mit den erst kürzlich publizierten Proteomdaten aus den Arbeiten von Nusinow et al. im Rahmen des *Cancer Cell Line Encyclopedia* Projektes (105) korreliert. Es lagen jedoch lediglich für 7 der 63 betrachteten Gene für Zytokinrezeptoren von JAK-STAT Proteomdaten vor, die in Austausch mit David P. Nusinow (Harvard Medical School, MA) mit den Affymetrix *microarray* Genexpressionsdaten vergleichbar gemacht wurden.

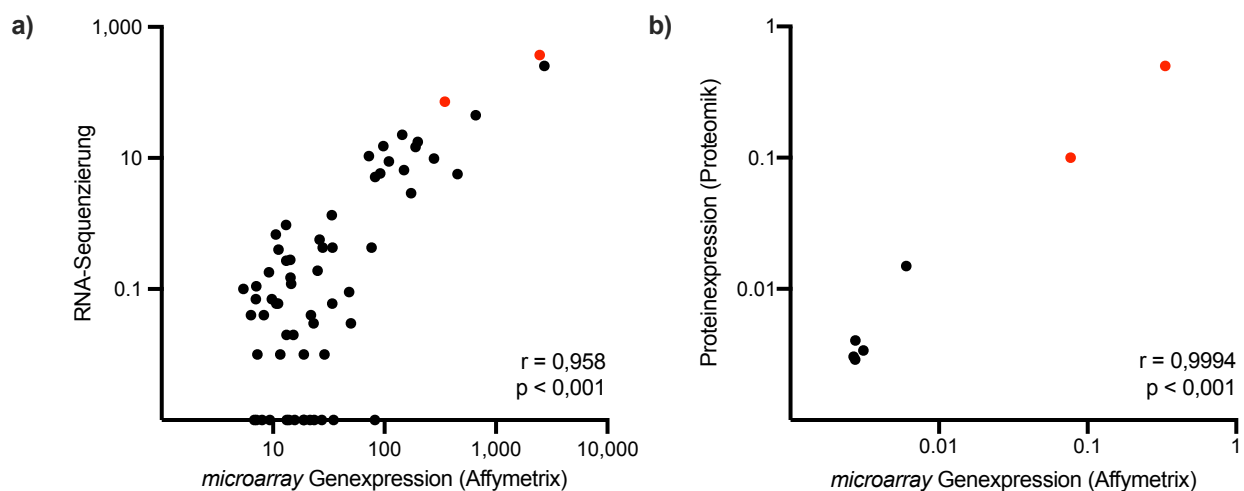


Abbildung 17: Streudiagramme der Expressionsdaten von JAK-STAT Genen in REH. Rote Markierung: Gene des IL-7 Rezeptors. a) Gene der JAK-STAT Rezeptoren ($n = 63$) in Affymetrix *microarray* (RMA-Algorithmus) Daten vs.

RNA-Sequenzierungsdaten aus den Arbeiten von Thul et al. (104). b) Gene der JAK-STAT Rezeptoren aus den RNA-Sequenzierungsdaten der Arbeiten von Thul et al. vs. Proteomdaten (n = 7) aus den Arbeiten von Nusinow et al. (105).

Der Vergleich der Affymetrix *microarray* Genexpression mit den RNA-Sequenzierungsdaten in REH ergibt eine klare Korrelation ($r = 0,958$ $p < 0,001$). Auch die Proteomdaten der 7 Zytokinrezeptoren des JAK-STAT Signalwegs korrelieren stark mit den Affymetrix *microarray* Genexpressionsdaten ($r = 0,9994$ $p < 0,001$). Die graphische Darstellung erfolgt in Abbildung 17.

Nach Überprüfung der Genexpressionsdaten von 63 unterschiedlichen Genen von Rezeptoren des JAK-STAT Signalwegs konnten 19 Gene, die die funktional relevanten Bestandteile für 13 verschiedene Rezeptoren darstellen, als interessant identifiziert werden. Sie sind in den Tabellen 3 und 4 dargestellt, die zum einen die Rezeptoren mit einer Expression aller funktional relevanten Gene in *ETV6-RUNX1* positiver ALL und zum anderen die Rezeptoren, die auf RNA-Ebene im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden herunterreguliert sind, zeigen.

Tabelle 3: Zytokinrezeptoren des JAK-STAT Signalwegs mit Genexpression aller funktional relevanten Untereinheiten in *ETV6-RUNX1* positiver ALL

Rezeptor	Ligand	GeneID*
CXCR4 Rezeptor	CXCL12	<i>CXCR4</i>
EPO Rezeptor	EPO	<i>EPOR</i>
Interferon α/β Rezeptor	Interferon α/β	<i>IFNAR1 + IFNAR2</i>
Interferon γ Rezeptor	Interferon γ	<i>IFNGR1 + IFNGR2</i>
Interleukin 7 Rezeptor	IL-7	<i>IL7R + IL2RG</i>
Interleukin 9 Rezeptor	IL-9	<i>IL9R + IL2RG</i>
Interleukin 11 Rezeptor	IL-11	<i>IL11RA + IL6ST</i>
Interleukin 27 Rezeptor	IL-27, IL-35	<i>IL27RA + IL6ST</i>
Thrombin Rezeptor	Thrombin	<i>F2R</i>

* Für Rezeptoren, die für die korrekte Funktion heterodimerisieren müssen, wurden die Gene beider Heterodimere angegeben.

Tabelle 4: Zytokinrezeptoren des JAK-STAT Signalwegs mit herunterregulierter Genexpression in *ETV6-RUNX1* positiver ALL

Rezeptor	Ligand	GeneID*
GM-CSF Rezeptor	GM-CSF	<i>CSF2RA + CSF2RB</i>
Interleukin 6 Rezeptor	IL-6	<i>IL6R + IL6ST</i>
Interleukin 13 Rezeptor	IL-13	<i>IL13RA1 + IL4R</i>
Leptin Rezeptor	Leptin	<i>LEPR</i>

* Für Rezeptoren, die für die korrekte Funktion heterodimerisieren müssen, wurden die Gene beider Heterodimere angegeben.

Von den genannten Rezeptoren sind insbesondere die Gene für den Rezeptor für Interleukin 7 (IL-7), *IL7R* und *IL2RG*, auffällig stark exprimiert und wurden in Abbildung 17 rot hervorgehoben.

Die Gene der folgenden Liganden von Zytokinrezeptoren im JAK-STAT Signalweg werden in *ETV6-RUNX1* positiven ALL-Blasten nicht signifikant exprimiert: Angiotensin, CNTF, EGF, G-CSF, GH, GM-CSF, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-26, IL-28, IL-29, IL-31, LIF, OSM, PDGF, Prolactin, Serotonin, TPO, TSLP.

Eine Auflistung der Expressionsdaten aller Gene von Rezeptoren des JAK-STAT Signalwegs in *ETV6-RUNX1* positiver ALL befindet sich mit Tabelle 6 im Anhang (siehe Kapitel 6.1).

3.2.2 Oberflächenexpression der Zytokinrezeptoren für IL-7, IL-9, EPO

Von den in Kapitel 3.2.1 genannten, exprimierten Rezeptoren des Signalwegs JAK-STAT in *ETV6-RUNX1* positiver ALL wurden die Rezeptoren für IL-7, IL-9 und EPO ausgewählt, um sie immunzytochemisch anzufärben und die Proteinexpression durchflusszytometrisch zu bestimmen. Hierfür wurden monoklonale, direkt konjugierte Antikörper verwendet, die im Kapitel 2.1.8 aufgeführt werden. Da die Rezeptoren für IL-7 sowie IL-9 für die korrekte Signaltransduktion mit der gemeinsamen Untereinheit IL-2R γ (CD132, *GeneID IL2RG*) heterodimerisieren müssen, ist die Expression dieses weiteren Proteins Voraussetzung für die Funktion. Der EPO Rezeptor homodimerisiert wiederum, weshalb kein weiteres Protein für die Funktionalität exprimiert werden muss.

Für den verwendeten IL-9 Rezeptor α (CD129) Antikörper zeigte sich sowohl für die *ETV6-RUNX1* positiven BVZ-ALL Zelllinien als auch für Kontrollproben kein spezifisches Signal (Daten nicht gezeigt), die Funktionalität des Antikörpers konnte daher so nicht validiert werden. Die Proteinexpression des IL-9 Rezeptors an der Zelloberfläche konnte auf immunzytochemische Art hier nicht bestätigt werden.

Für die Untereinheit *common- γ chain* (CD132, IL-2R γ) sowie für die IL-7 Rezeptorkette α (CD127, IL-7R α) konnte die Expression der Oberflächenproteine immunzytochemisch nachgewiesen werden, die Expression der IL-7 Rezeptorkette α in AT-2 Zellen fällt im Vergleich eher gering aus (siehe Abbildung 18). Es sind somit alle funktional relevanten Rezeptorkettenanteile der IL-7 Signaltransduktion an der Zelloberfläche von BVZ-ALL Zelllinien vorhanden. Als negative Kontrolle dienten THP-1 Zellen (Daten nicht gezeigt).

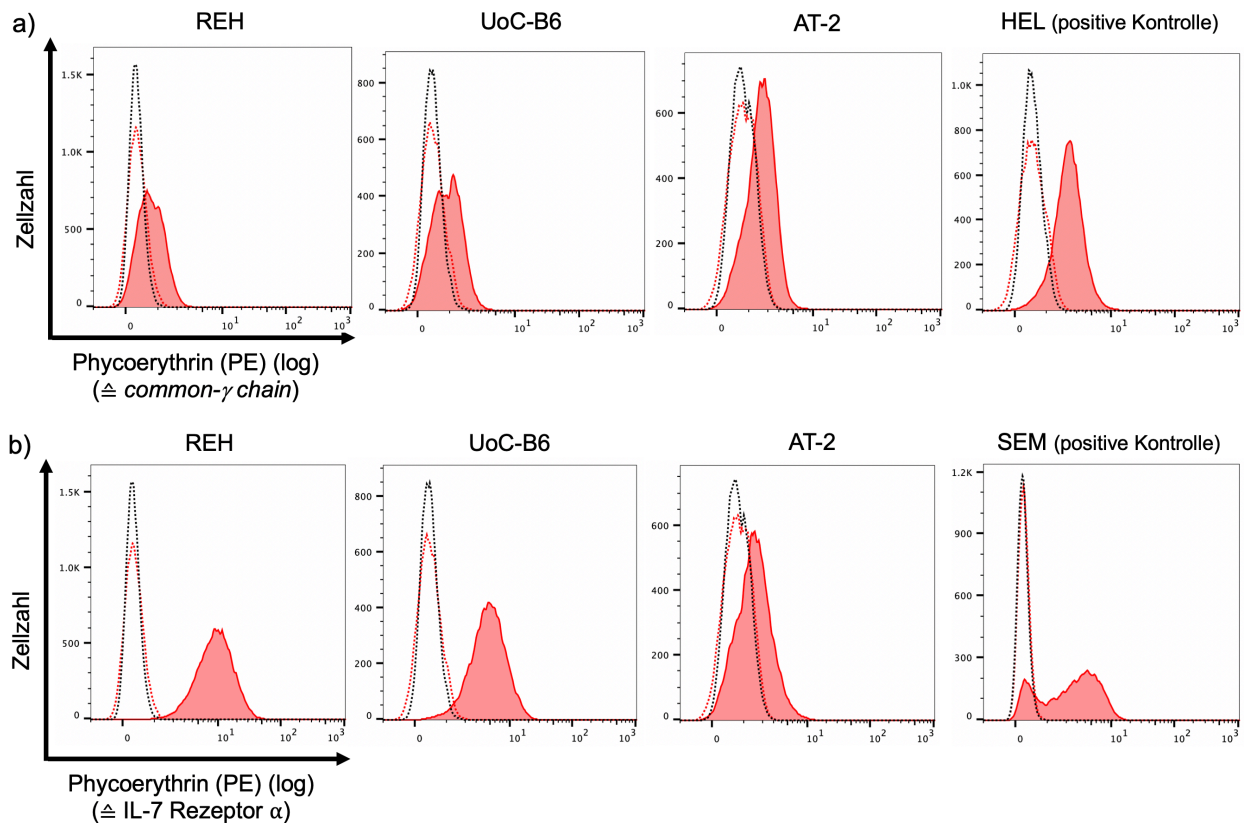


Abbildung 18: Immunzytochemische Analysen der IL-7 Rezeptorexpression: in REH, UoC-B6, AT-2 und HEL bzw. SEM. a) Die Expression der *common-γ chain* Untereinheit kann in allen drei Zelllinien nachgewiesen werden. b) Die IL-7 Rezeptorkette α wird in REH und UoC-B6 exprimiert, in AT-2 schwach. Schwarz gepunktet: Ansatz ohne Antikörper, rot gepunktet: Isotypkontrolle IgG1k mit rotem Fluorochrom (PE), rote Kurve: Antikörper mit rotem Fluorochrom (PE). *Gating* für alle Zellen: Scatter vital / SSC Singlets / FSC Singlets / DAPI negativ.

Auch für den EPO Rezeptor konnte die Expression in allen BVZ-ALL Zelllinien gezeigt werden, die Signale sind im Vergleich zur positiven Kontrollzelllinie HEL jedoch eher gering (siehe Abbildung 19).

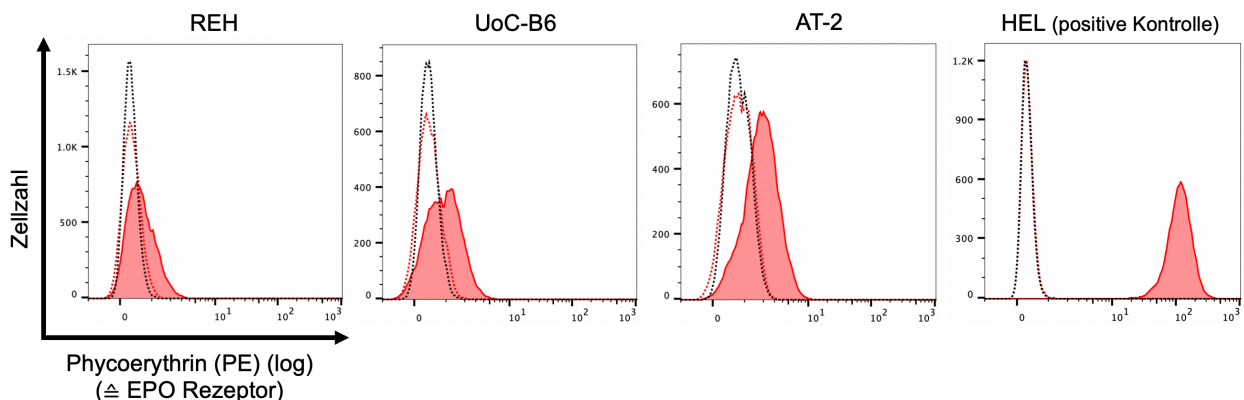


Abbildung 19: Immunzytochemische Analyse der EPO Rezeptorexpression: in REH, UoC-B6, AT-2 und HEL. Eine geringe Expression des Proteins an der Zelloberfläche kann in allen BVZ-ALL Zelllinien nachgewiesen werden. Schwarz gepunktet: Ansatz ohne Antikörper, rot gepunktet: Isotypkontrolle IgG1k mit rotem Fluorochrom (PE), rote Kurve: Antikörper mit rotem Fluorochrom (PE). *Gating* für alle Zellen: Scatter vital / SSC Singlets / FSC Singlets / DAPI negativ.

3.2.3 XTT-Viabilitätsassay von IL-7, IL-9 und EPO

Um die Funktionalität der jeweiligen Signaltransduktionskaskade zu erfassen, wurden XTT-Viabilitätsassays erstellt. Hiermit kann in Abhängigkeit von steigender Zytokinkonzentration im Medium der Unterschied in der metabolischen Aktivität der Zelllinien dargestellt werden, eine hohe metabolische Aktivität ist hier äquivalent zur Zellvitalität anzusehen.

Bei steigenden Konzentrationen von IL-7 zeigte sich bei allen drei *ETV6-RUNX1* positiven BVZ-ALL Zelllinien ein deutlich stärker werdendes XTT-Signal (siehe Abbildung 20). Es ist somit davon auszugehen, dass neben beiden notwendigen Untereinheiten des IL-7 Rezeptors an der Zelloberfläche auch die intrazellulären Bestandteile des Signalwegs exprimiert werden und einen Wachstumsreiz in den Zellen auslösen. Im Vergleich zwischen den BVZ-ALL Zelllinien zeigte sich das XTT-Signal in AT-2 absolut als eher gering.

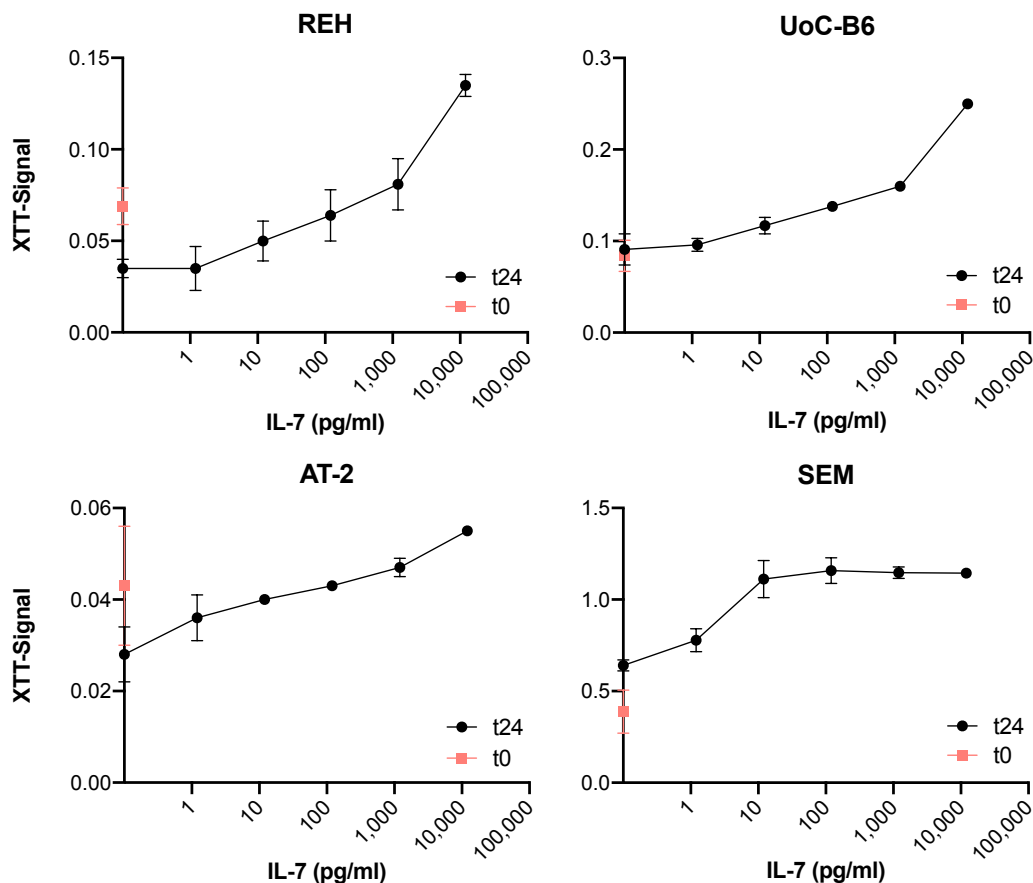


Abbildung 20: XTT Assay nach Inkubation mit IL-7: Die *ETV6-RUNX1* positiven BVZ-ALL Zelllinien REH, UoC-B6 und AT-2 zeigen in Abhängigkeit von steigenden IL-7 Konzentrationen ein steigendes XTT-Signal. Die Zelllinie SEM dient als positive Kontrolle (86). Rot: Messung zum Zeitpunkt t0, schwarz: Messung zum Zeitpunkt t24.

Im XTT-Viabilitätsassay von IL-9 kann auch ein stärker werdendes XTT-Signal in REH, UoC-B6 sowie der positiven Kontrollzelllinie KG-1 beobachtet werden (siehe Abbildung 21). In AT-2 ist die

Zunahme eher schwach ausgeprägt. Ein Vorliegen aller relevanten Bestandteile des IL-9 Rezeptor Signalwegs scheint in REH, UoC-B6 sowie AT-2 gegeben zu sein.

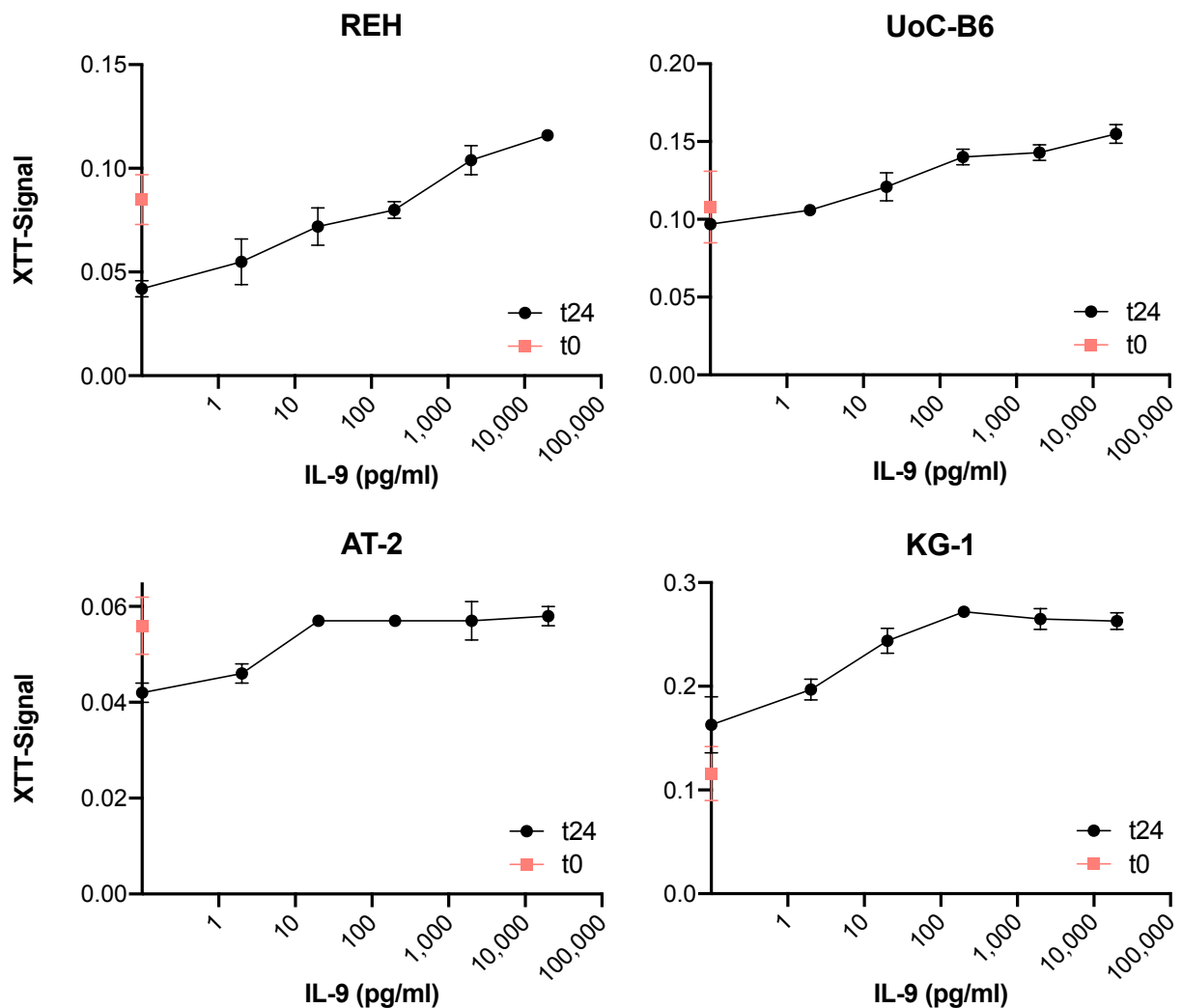


Abbildung 21: XTT Assay nach Inkubation mit IL-9: Die *ETV6-RUNX1* positiven BVZ-ALL Zelllinien REH und UoC-B6 zeigen in Abhängigkeit von steigenden IL-9 Konzentrationen ein steigendes XTT-Signal, bei AT-2 jedoch nur in geringem Maße zu beobachten ist. Die Zelllinie KG-1 dient als positive Kontrolle (87). Rot: Messung zum Zeitpunkt t0. Schwarz: Messung zum Zeitpunkt t24.

Die XTT-Viabilitätsassays von EPO lieferten inkonsistente Ergebnisse und werden nicht gezeigt. Die in der Literatur vorbeschriebene Expression eines funktionellen EPO Rezeptors konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

3.3 Induzierbares *ETV6-RUNX1* silencing in BVZ-ALL Zelllinien

Um einen induzierbaren *knockdown* des Fusionsproteins in *ETV6-RUNX1* positiven BVZ-ALL Zelllinien zu erreichen, wurde das in Kapitel 1.6 beschriebene Plasmid pLT3GEPIR mit dem miR-

E *enhanced backbone* für die shRNA genutzt. Dies sollte ermöglichen, ein Modell zu schaffen, in dem unter kontrollierten Bedingungen die Effekte des Fusionsproteins ETV6-RUNX1 untersucht werden können.

Um dies zu erreichen, wurde zunächst das Plasmid mit den in Kapitel 2.1.10 gelisteten Sequenzen für die shRNA versehen. Die nun klonierten Plasmide wurden auf ihre Effektivität in einem Reporterzellmodell getestet und die Plasmide mit dem effizientesten *silencing* ausgewählt. Mit diesen ausgewählten Plasmiden sollten schließlich Lentiviren hergestellt werden, um sie in die Zelllinien REH, UoC-B6 und AT-2 zu transduzieren.

3.3.1 Herstellung des Plasmids LT3GEPIR

Im ersten Schritt wurden, wie in Abbildung 22 schematisch dargestellt, folgende Oligonukleotide in das Plasmid LT3GEPIR kloniert:

- die 8 verschiedenen ETV6-Oligonukleotide ETV6_Exon_1-5_159, ETV6_Exon_1-5_530, ETV6_Exon_1-5_581, ETV6_Exon_1-5_678, ETV6_Exon_1-5_721, ETV6_Exon_1-5_768, ETV6_Exon_1-5_769 und ETV6_Exon_1-5_819,
- die Kontrollen MYB_721 und MYC_1834 sowie
- die negative Kontrolle REN_713.

Die Sequenzen für die Oligonukleotide wurden in Zusammenarbeit mit der Firma Mirimus (NY, USA) bestimmt. Sie wurden auf Basis eines verbesserten Algorithmus für die Vorhersage effektiver shRNAs erstellt (Fellmann und Zuber (75, 77)).

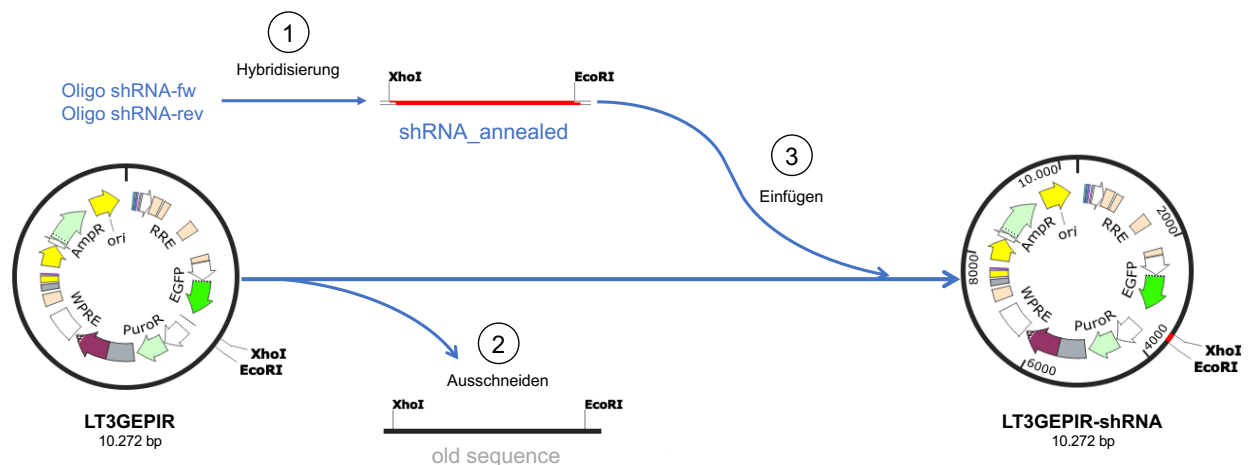


Abbildung 22: Schematische Darstellung der Plasmidherstellung von pLT3GEPIR mit den jeweiligen shRNA Zielsequenzen: 1) Hybridisierung (*annealing*) der neuen komplementären Oligonukleotide. 2) Herausschneiden der alten Zielsequenz aus dem ursprünglichen Plasmid mittels Restriktionsendonukleasen XhoI und EcoRI 3) Einfügen und Ligation der neuen Oligonukleotidsequenz in das Plasmid.

Im Anschluss wurde die Korrektheit aller hergestellten Plasmide durch 1.) einen Restriktionsverdau mit gelelektrophoretischer Überprüfung der Fragmentlänge sowie 2.) durch eine Sequenzierung kontrolliert (Seqlab, Göttingen).

3.3.2 Herstellung des Reporterzellmodells HAP1 ER1+ mCh+

Für die weitere Testung und Auswahl der besten shRNA Zielsequenzen erfolgte nun zunächst die Herstellung eines *ETV6-RUNX1* positiven Reporterzellmodells in HAP1 Zellen, in dem das Fusionsprotein sowie das Fluorochrom *mCherry* aufgrund der Lage hinter demselben Promotor im Verhältnis 1:1 koexprimiert werden. Hierfür wurde das Plasmid PB.tetR.ETV6-RUNX1.1-796.mC mithilfe einer *piggybac* Transposase stabil in HAP1 Zellen transfiziert. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Selektion einzelner Klone. In einem ersten Versuch wurde hierbei der Klon HAP1 ER1+ mCh+ Klon A5 hergestellt. Zur noch besseren Differenzierung der effektivsten shRNA Sequenzen wurde ein Klon mit noch stärkerer *ETV6-RUNX1* Expression benötigt. In einer erneuten Transfektion konnte der Klon HAP1 ER1+ mCh+ Klon F8 hergestellt werden, die Signalintensitäten beider Klone werden in Abbildung 23 dargestellt. Es kann eine etwa 1,5-fach stärkere Signalintensität von HAP1 ER1+ mCh+ Klon F8 gegenüber HAP1 ER1+ mCh+ Klon A5 erkannt werden, was mit einer 1,5-fach erhöhten *ETV6-RUNX1* Expression einhergehen sollte.

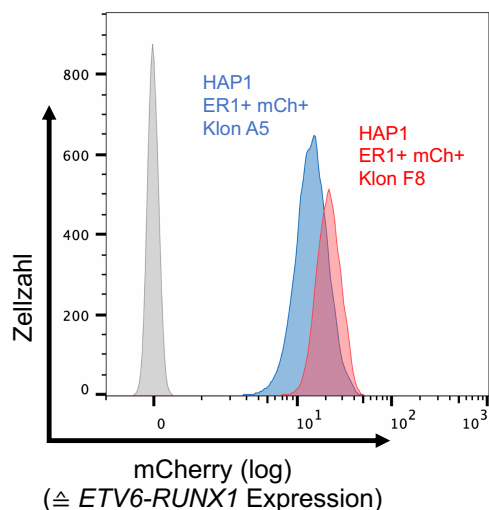


Abbildung 23: HAP1 *ETV6-RUNX1* positive Reporterzellmodelle mit *mCherry* Fluoreszenz im Vergleich. Der Klon F8 besitzt eine 1,5-fach intensivere *mCherry* Fluoreszenz und damit einhergehende *ETV6-RUNX1* Expression im Gegensatz zum Klon A5. Rot: HAP1 ER1+ mCh+ Klon F8, grau: native HAP1 Zellen, blau: HAP1 ER1+ mCh+ Klon A5. *Gating* für alle Zellen: Scatter vital / SSC Singlets / FSC Singlets / DAPI negativ.

3.3.3 *ETV6-RUNX1 silencing* im Reporterzellmodell

In einem ersten Versuchsansatz erfolgte die Transfektion von 6 verschiedenen Plasmiden mit den shRNA Zielsequenzen gegen *ETV6* in den Zellen HAP1 ER1+ mCh+ Klon A5. Nach 24 Tagen Doxycyclin-Inkubation zeigte sich noch immer ein EGFP Signal in den transfizierten Zellen. Die *mCherry* Fluoreszenz nahm in den EGFP positiven Zellen deutlich ab, wie in Abbildung 24 dargestellt ist. Die shRNA shETV6_159 richtet sich gegen die Splicevariante *transcription variant X5*, die in dieser Form im Reporterzellmodell nicht vorkommt und so als negative Kontrolle verwendet wurde. Aufgrund des sehr starken Signalverlusts von *mCherry* lässt sich die Effizienz der weiteren shRNA Zielsequenzen nicht ausreichend vergleichen, weshalb ein signalintensiverer Klon mit stärkerer *ETV6-RUNX1* Expression benötigt wurde (siehe Kapitel 3.3.2).

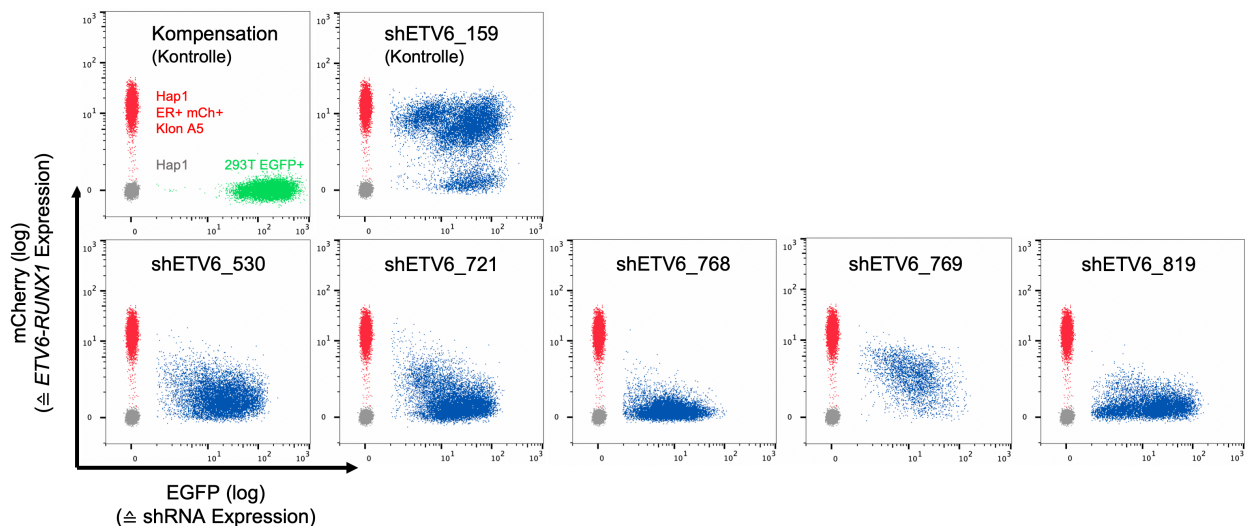


Abbildung 24: *ETV6-RUNX1 silencing* im Reporterzellmodell HAP1 ER1+ mCh+ Klon A5. Ein Teil der verschiedenen shRNA Zielsequenzen werden verglichen und zeigen unterschiedliche Effektivität im *silencing* von *ETV6-RUNX1* bis hin zur nahezu vollständigen Unterdrückung des *mCherry* Signals. Rot: HAP1 ER1+ mCh+ Klon A5 Reporterzellen mit *mCherry* Fluoreszenz ohne Transfektion von pLT3GEPIR, grau: native HAP1 Zellen, blau: HAP1 ER1+ mCh+ Klon A5 Reporterzellen nach Transfektion und Doxycyclin-Aktivierung von pLT3GEPIR mit verschiedenen shRNA Zielsequenzen, *gating* zusätzlich auf EGFP positive Zellen, grün: 293T EGFP+ positive Kontrolle ohne *mCherry* Expression. *Gating* für alle Zellen: Scatter vital / SSC Singlets / FSC Singlets / DAPI negativ.

Nach Herstellung dieses neuen Reporterzell-Klons HAP1 ER1+ mCh+ Klon F8 mit stärkerer *ETV6-RUNX1* Expression erfolgte die Transfektion mit allen 8 zu vergleichenden shRNA Zielsequenzen gegen *ETV6* sowie der shRNA gegen *REN*, das für die nichthumane Renilla Luciferase kodiert und als weitere negative Kontrolle dient. Nach 8 Tagen Doxycyclin-Inkubation mit konsekutiver shRNA Expression zeigte sich eine deutliche Reduktion der *mCherry* Signalintensität in allen Zielsequenzen (siehe Abbildung 25). Da beim neuen, signalintensiveren Klon das *mCherry* Signal jedoch nicht auf 0 sank, ließen sich die verschiedenen Zielsequenzen besser voneinander differenzieren. Zum Vergleich wurde die relative Fluoreszenzintensität (FI)

des medianen *mCherry* Signals herangezogen und in Tabelle 5 dargestellt. Die Zielsequenzen shETV6_678, shETV6_768 sowie shETV6_819 erwiesen sich als am effektivsten und wurden für die lentivirale Transduktion der BVZ-ALL Zelllinien ausgewählt.

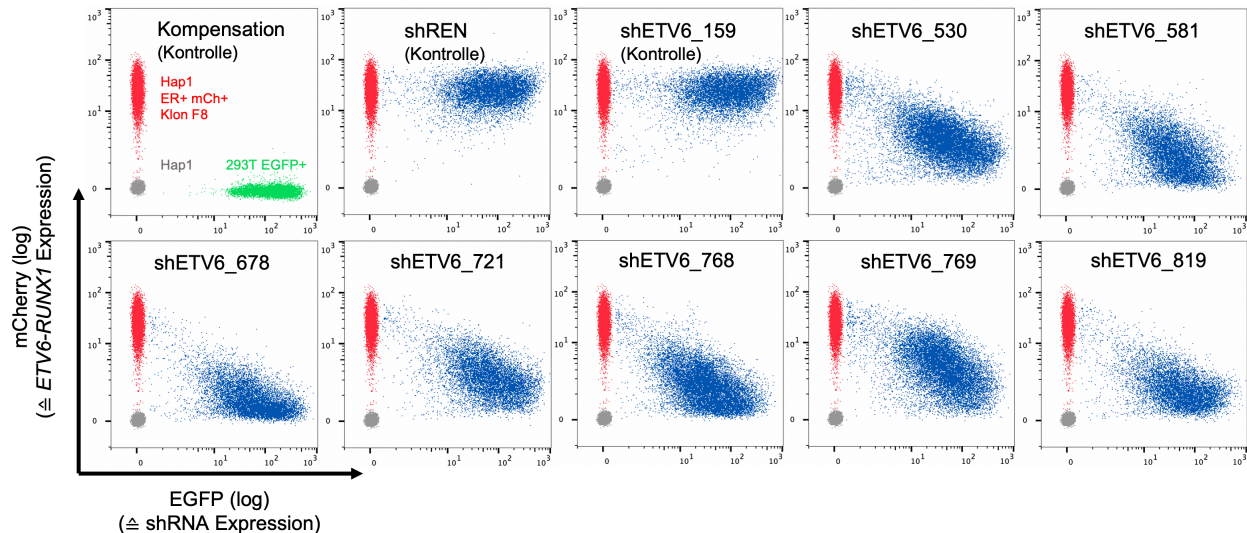


Abbildung 25: *ETV6-RUNX1* silencing im Reporterzellmodell HAP1 ER1+ mCh+ Klon F8. Die verschiedenen shRNA Zielsequenzen zeigen eine unterschiedliche Effektivität im *silencing* von *ETV6-RUNX1*, shREN ist gegen die nichthumane Renilla Luciferase gerichtet und dient als Kontrolle. Rot: HAP1 ER1+ mCh+ Klon F8 Reporterzellen mit *mCherry* Fluoreszenz ohne Transfektion von pLT3GEPIR, grau: native HAP1 Zellen, blau: HAP1 ER1+ mCh+ Klon F8 Reporterzellen nach Transfektion und Doxycyclin-Aktivierung von pLT3GEPIR mit verschiedenen shRNA Zielsequenzen, *gating* zusätzlich auf EGFP positive Zellen, grün: 293T EGFP+ positive Kontrolle ohne *mCherry* Expression. *Gating* für alle Zellen: Scatter vital / SSC Singlets / FSC Singlets / DAPI negativ.

Tabelle 5: Relative Fluoreszenzintensität (FI) nach 8 Tagen shRNA Expression im Reporterzellmodell HAP1 ER1+ mCh+ Klon F8

	shREN	shETV6_159	shETV6_530	shETV6_581	shETV6_678	shETV6_721	shETV6_768	shETV6_769	shETV6_819
FI	0,92	0,9	0,14	0,09	0,04	0,12	0,08	0,18	0,07

Anmerkungen: Ausgewählte Zielsequenzen gegen *ETV6* fett gedruckt.

3.3.4 Lentivirale Transduktion der BVZ-ALL Zelllinien

Die lentivirale Transduktion der BVZ-ALL Zelllinien erfolgte in Übereinstimmung mit den Auflagen des Landesamts für Gesundheit und Soziales Berlin zum Projekt "*Induzierbare ETV6/RUNX1 Repression in Zelllinien mit Hilfe von optimierten microRNAs (Mirimus)*". Für die Transduktion wurde ein lentivirales System der zweiten Generation gewählt. Aus Sicherheitsgründen werden die für die Virusreplikation benötigten Gene in der zweiten sowie in der dritten Generation auf mehrere Plasmide aufgeteilt. Des Weiteren besteht ein Vorteil bei der Wahl von lentiviralen Systemen darin, dass auch nicht-teilende Zellen infiziert werden können. Da die Zelllinien REH,

UoC-B6 und AT-2 eine Verdopplungszeit von etwa 50 bis 70 Stunden aufweisen erscheint dieses System hier als sinnvoll.

Die Virusproduktion sowie Transduktion erfolgte nach den in den Kapiteln 2.2.1.7 sowie 2.2.1.8 beschriebenen Protokollen. Auf die Kontrollen der Virustiter sowie die Einhaltung einer bestimmten *multiplicity of infection* konnte hier verzichtet werden, da die Anzahl der Kopien des Vektors, die integriert werden, für die vorgesehenen Versuche von nachrangiger Bedeutung waren. Der Hersteller empfiehlt für eine *single copy integration* eine Infektionsrate von unter 20%. Deshalb erfolgte die quantitative Kontrolle des Transduktionserfolges fluoreszenzmikroskopisch durch näherungsweise Überprüfung der Grünfluoreszenz. Es konnten nach der Transduktion sowohl die GFP Expression des Kontrollvektors pRRLSIN.cPPT.PGK-GFP.WPRE, als auch die EGFP Expression nach Doxycyclin-Behandlung in den Zellen mit integriertem pLT3GEPIR erkannt werden. Die transduzierten Zellen wurden mittels Puromycin mit der in den Vorversuchen bestimmten Konzentration von 1 µg/ml selektiert, um den Anteil der erfolgreich transduzierten Zellen zu erhöhen. Auch in mehreren Versuchen überlebten die BVZ-ALL Zelllinien UoC-B6 sowie AT-2 die lentivirale Transduktion mit anschließender Puromycin-Selektion nicht.

Erfolgreich transduziert werden konnte somit nur die Zelllinie REH, welche anschließend in den Varianten REH LT3GEPIR shETV6_678, shETV6_768, shETV6_819 sowie der Kontrollen shREN, shMYB und shMYC vorlag. Für die Zielsequenzen shETV6_678, shETV6_768, shETV6_819 sowie shREN wurden anschließend jeweils ein bis zwei Klone selektiert. Eine exemplarische durchflusszytometrische Kontrolle der EGFP Expression von REH LT3GEPIR shREN nach 24 Stunden Inkubation mit Doxycyclin ist in Abbildung 26 zu sehen. Innerhalb von 24 Stunden konnte bereits in über 80% der Zellen eine Grünfluoreszenz beobachtet werden, das Plasmid pLT3GEPIR kommt demnach in mindestens 80% der Zellen vor.

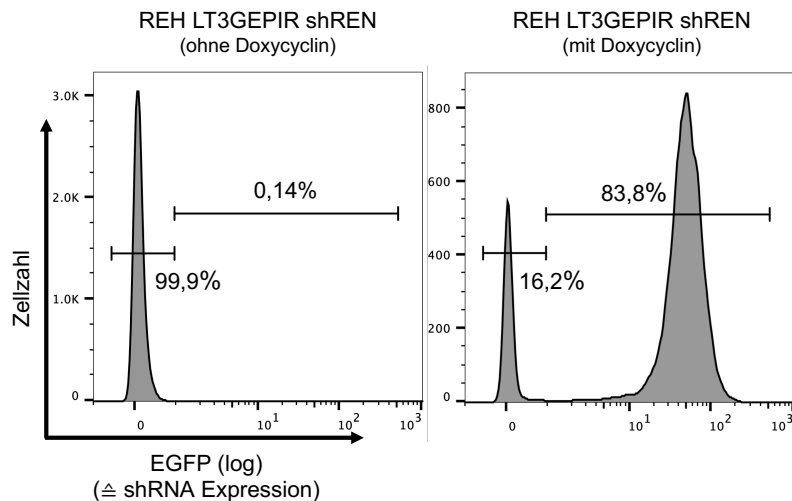


Abbildung 26: EGFP Signal nach 24 Stunden Doxycyclin-Gabe in REH LT3GEPiR shREN Zellen. Nach Doxycyclin-Gabe fluoreszieren 83,8% der transduzierten REH Zellen grün und zeigen somit die erfolgreiche lentivirale Transduktion mit Einbau des Plasmids in das Genom auf. *Gating:* Scatter vital / SSC Singlets / FSC Singlets / DAPI negativ.

3.3.5 ETV6-RUNX1 Fusionsprotein nach genetischem *silencing*

Die Kontrolle eines erfolgreichen *silencings* der eingebrachten Zielsequenzen sollte auf Proteinebene durch Nachweis des ETV6-RUNX1 Fusionsproteins erfolgen. Hierfür erfolgten immunzytochemische Färbungen, die sowohl durchflusszytometrisch als auch fluoreszenzmikroskopisch kontrolliert werden sollten. Da in der BVZ-ALL Zelllinie REH auf Grund einer Deletion das *ETV6*-Wildtyp Allel nicht exprimiert wird, konnte hier ein Antikörper genutzt werden, der gegen ETV6 gerichtet ist.

3.3.5.1 Durchflusszytometrische Analysen von ETV6-RUNX1

Die durchflusszytometrischen Analysen der REH LT3GEPiR shRNA Zellen erfolgte nach 35 tägiger Aktivierung des Tet-On Systems, damit Auswirkungen des genetischen *silencings* auch auf Proteinebene sicher messbar sind. Diese erfolgten an den heterogenen Pools von transduzierten REH Zellen sowie an den Klonen shETV6_819 D5 sowie F10, bei denen sich in Vorversuchen an transduzierten REH Zellen der effektivste *knockdown* zeigte. Als negative Kontrolle wurden REH shREN Zellen mit aktiviertem *silencing* der nichthumanen Renilla Luciferase verwendet.

Bei der Analyse der Wirksamkeit der verschiedenen shRNAs in transduzierten REH Zellen fiel eine unterschiedliche Effektivität im ETV6-RUNX1 *knockdown* für die verschiedenen Zielsequenzen auf. Zunächst wurde die FI für ETV6-RUNX1 der verschiedenen Pools und Klone nach ETV6-RUNX1 knockdown nach 35 tägiger Doxycyclin-Behandlung im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen ohne induziertes *silencing* ermittelt. Hier zeigte sich in shETV6_678 Pool

eine FI von 0,82, in shETV6_768 Pool eine FI von 0,98, in shETV6_819 Pool eine FI von 0,69, in shETV6_819 Klon D5 eine FI von 0,66, in shETV6_819 Klon F10 eine FI von 0,57 und in der negativen Kontrolle shREN eine FI von 0,97.

Als nächstes wurde als interne Kontrolle die relative FI für ETV6-RUNX1 der EGFP positiven Zellpopulationen innerhalb der jeweiligen mit Doxycyclin behandelten Zellen mit den EGFP negativen Zellpopulationen verglichen und in Abbildung 27 dargestellt. Insbesondere die heterogenen Pools wiesen hier größere Fraktionen EGFP negativer Zellen auf. In allen Zellen wurde eine 10 - 40%ige Abnahme des Signals von ETV6-RUNX1 in den shRNA exprimierenden Zellen gemessen. Dabei zeigten die Zellen mit der Zielsequenz shETV6_819 die stärkste Abnahme.

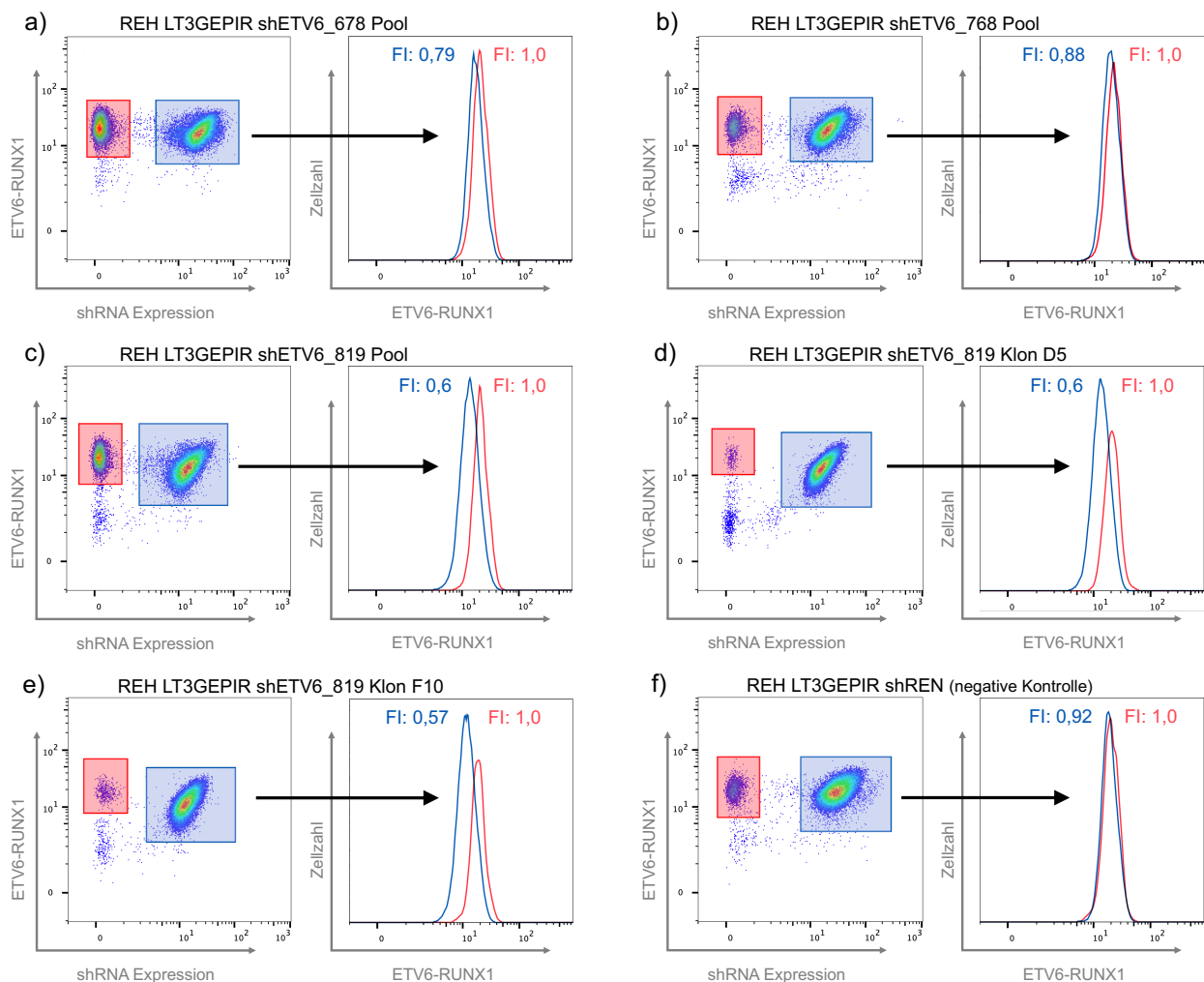


Abbildung 27: Immunzytochemische Analysen von ETV6-RUNX1 nach genetischem silencing. Zu sehen sind REH Zellen, die die drei unterschiedlichen shETV6 Zielsequenzen exprimieren (a bis c), zwei Klone der Zielsequenz shETV6_819 (d und e) sowie die negative Kontrolle shREN (f), die gegen die nichthumane Renilla Luciferase gerichtet ist. Nach 35-tägiger Behandlung mit Doxycyclin und Aktivierung des Tet-On Systems zeigte sich in der Zellpopulation,

die shRNA exprimiert (blau) eine verringerte Signalintensität (FI) von ETV6-RUNX1 im Vergleich zu der Zellpopulation, die keine shRNA exprimiert (rot). *Gating* für alle Zellen: Scatter vital / SSC Singlets / FSC Singlets / DAPI negativ.

3.3.5.2 Fluoreszenzmikroskopische Analysen von ETV6-RUNX1

Das Fusionsprotein ETV6-RUNX1 weist, wie bereits in Kapitel 3.1.1 beschrieben, in REH Zellen eine vor allem intranukleäre, granuläre Verteilung auf und kommt kaum im Zytoplasma vor. In dieser Arbeit wurde jedoch beobachtet, dass Zellen mit aktiviertem *ETV6-RUNX1 silencing* häufig zytoplasmatische, sich dem Zellkern anschmiegende Signale für ETV6-RUNX1 zeigten, die Signale im Zellkern jedoch gleichzeitig stark verringert waren (siehe Abbildung 28). Da diese Unterschiede durchflusszytometrisch nicht hinreichend erfasst werden konnten, wurden nachfolgend fluoreszenzmikroskopische Analysen von ETV6-RUNX1 nach genetischem *silencing* durchgeführt. So konnten auch Veränderungen in einzelnen Zellkompartimenten wie dem Zellkern erfasst werden.

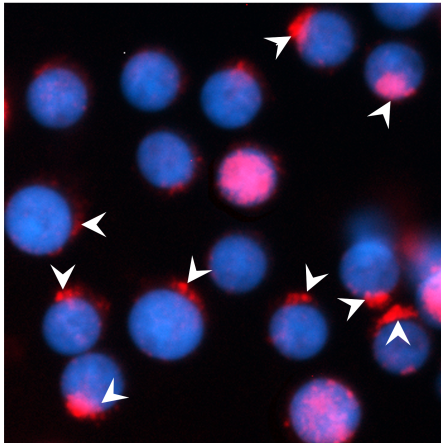


Abbildung 28: Zelluläres Verteilungsmuster des ETV6-RUNX1 Signals nach genetischem *silencing*: Exemplarisches Bild von REH LT3GEPIR shETV6_678 Pool Zellen. Nach shRNA Expression zeigt sich häufig ein extranukleäres Signal für ETV6-RUNX1 in der immunzytochemischen Färbung, welches sich dem Zellkern anschmiegt (weiße Pfeile). Blau: DAPI Färbung der DNA, entspricht dem Zellkern, rot: ETV6-RUNX1 Signal.

Anhand von hochauflösenden und konfokalen Aufnahmen von Zellen des shETV6_819 Pools konnte eine deutliche Abnahme des intranukleären und granulären ETV6-RUNX1 Signals nach *silencing* der mRNA gezeigt werden (siehe Abbildung 29). EGFP negative Zellen in denen das *silencing* nicht stattfindet weisen weiterhin das typische granuläre Signal auf. Zusätzlich ist auch eine EGFP negative Zellpopulation in shETV6_819 zu beobachten, die kein ETV6-RUNX1 Signal zeigt und präapoptotischen Zellen entspricht. In der negativen Kontrolle shREN werden die shRNA und das Fusionsprotein ETV6-RUNX1 weiterhin koexprimiert.

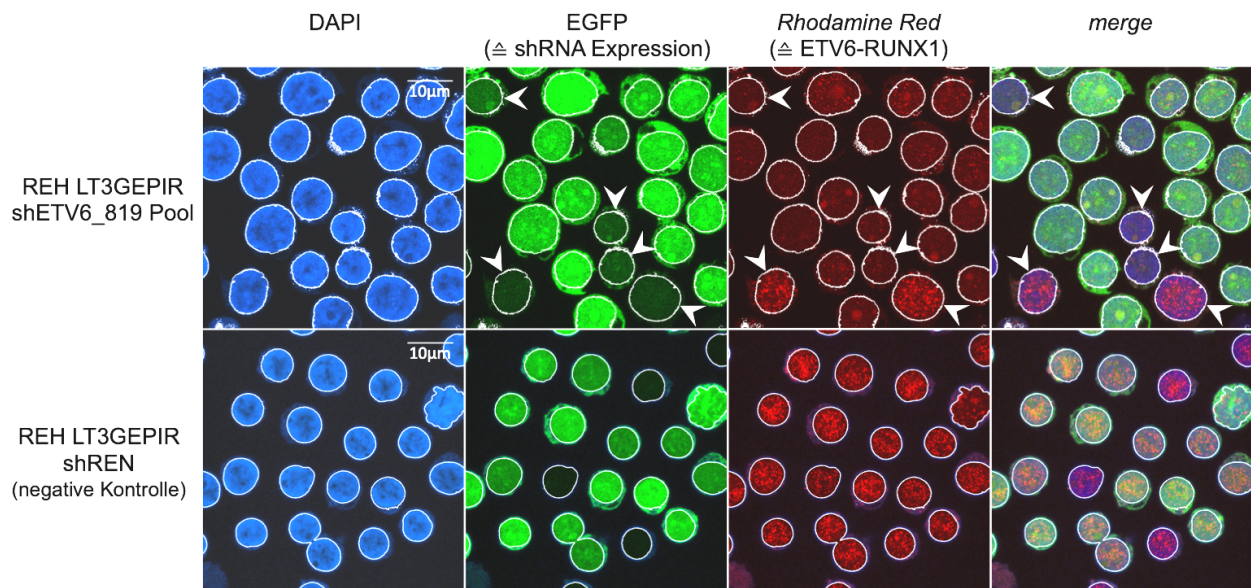


Abbildung 29: Exemplarische konfokalmikroskopische Aufnahmen durch die Äquatorialebene nach shRNA Expression für 30 Tage in den einzelnen Farbkanälen. Der Zellkern wurde anhand der DAPI Färbung identifiziert, umrundet und in allen Abbildungen dargestellt. Es ist in den Aufnahmen der REH LT3GEPiR shETV6_819 Pool Zellen zu erkennen, dass jene Zellen mit shRNA Expression gegen *ETV6* (grüne Fluoreszenz) weniger ETV6-RUNX1 Protein exprimieren (rote Fluoreszenz), insbesondere die typischen granulären Signale im Zellkern nehmen ab. Die Kontrolle REH LT3GEPiR shREN mit einer Zielsequenz gegen die nichthumane Renilla Luciferase zeigt diesen Effekt nicht. Weiße Pfeile: EGFP negative Zellen, die entweder ETV6-RUNX1 exprimieren oder ehemals EGFP positive Zellen ohne ETV6-RUNX1 Expression, die im Prozess der Apoptose bereits die EGFP Fluoreszenz verloren haben.

Im nächsten Schritt wurden konventionelle fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der REH LT3GEPiR Zellen mit den verschiedenen Zielsequenzen angefertigt, um die intranukleäre Signalintensität objektiv zu quantifizieren und die Effektivität des *knockdowns* wiederzugeben. Die konfokalen Aufnahmen in lediglich einer Ebene boten sich hierfür nicht an.

Als technische Kontrollen wurden Färbungen der Zellen REH LT3GEPiR shREN genutzt. Die Grünfluoreszenz wurde mithilfe von shREN Zellen nach Doxycyclin-Behandlung sowie ohne Einsatz eines primären Antikörpers gegen ETV6-RUNX1 überprüft. Als Kontrolle für die Rotfluoreszenz wurden shREN Zellen ohne Doxycyclin-Behandlung jedoch mit primären und sekundären Antikörpern verwendet und als Kontrolle für die Hintergrundfluoreszenz wurden shREN Zellen ohne Doxycyclin-Behandlung und ohne primäre Antikörper jedoch mit sekundären Antikörpern verwendet. In hier nicht gezeigten Voruntersuchungen wurde diesbezüglich eine Verstärkung der Rotfluoreszenz von REH Zellen ohne primärem Antikörper jedoch mit sekundärem Antikörper gegenüber autofluoreszierenden REH Zellen um den Faktor 1,78 beobachtet, nach Verwendung des primären Antikörpers gegen ETV6 verstärkte sich das Signal gegenüber den REH Zellen mit nur sekundärem Antikörper um den Faktor 10,76.

Bei Beurteilung der intranukleären Signalintensität ergab sich eine deutliche Abschwächung in Zellen mit induzierten *silencing* von *ETV6-RUNX1*, wie in Abbildung 30 zu erkennen ist. In shETV6_678 Pool Zellen ergab sich eine FI in der internen Kontrolle zu den EGFP negativen Zellen von 0,09. In shETV6_768 Pool zeigte sich eine FI von 0,26, in shETV6_819 Pool Zellen eine FI von 0,08 sowie in den Kontrollzellen shREN eine FI von 1,02. Die Auswertung konnte nicht auf die Klone D5 und F10 von shETV6_819 angewendet werden, da sie zu wenige EGFP negative und *Rhodamine Red* positive Zellen für die Berechnung aufwiesen.

Insbesondere in den Pools der Zellen REH LT3GEPiR shETV6_678 und shETV6_768 konnten bei dieser Untersuchung zytoplasmatische Signale von *ETV6-RUNX1* erkannt werden (siehe Abbildung 30). In shETV6_819 Pool Zellen war dies weniger ausgeprägt der Fall.

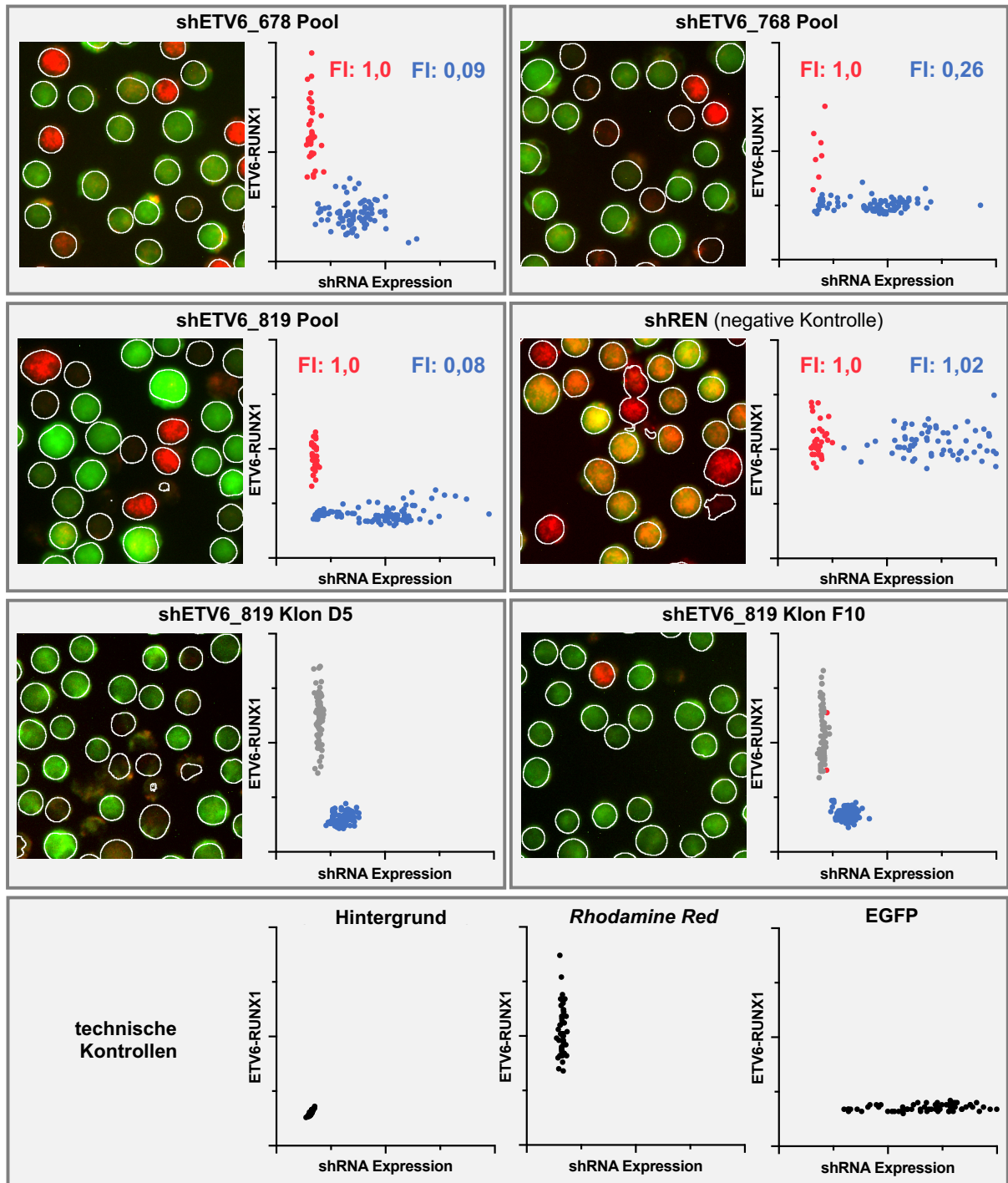


Abbildung 30: Fluoreszenzmikroskopische Analysen von ETV6-RUNX1 im Zellkern nach 30-tägiger shRNA Expression. Links: Zusammengeführte EGFP (\triangleq shRNA Expression) und *Rhodamine Red* (\triangleq ETV6-RUNX1 Expression) Signale, der Zellkern wurde mittels DAPI Signal identifiziert, die Kontur berechnet und umrandet und ebenfalls in allen Abbildungen dargestellt. Die Signalintensitäten wurden für die verbesserte Darstellung angepasst. Rechts: Streudiagramme intranukleärer Fluoreszenzintensitäten der Zellen. In den EGFP positiven Zellen mit stabiler shRNA Expression gegen ETV6-RUNX1 ist intranukleär eine starke Verringerung des ETV6-RUNX1 Signals zu erkennen. In den Kontrollzellen shREN ist dies nicht der Fall, das ETV6-RUNX1 Signal bleibt stabil. Rot: EGFP negative Zellen ohne shRNA Expression, blau: EGFP positive Zellen mit shRNA Expression, grau: entsprechende Proben ohne Doxycyclin-Behandlung und ohne shRNA Expression zur verbesserten Darstellung in Proben mit geringem Anteil

EGFP negativer Zellen. Die relative Fluoreszenzintensität (FI) von ETV6-RUNX1 berechnet sich aus der medianen Signalintensität für ETV6-RUNX1 der EGFP positiven Zellen abzüglich des Hintergrundsignals der Kontrolle geteilt durch die mediane Signalintensität für ETV6-RUNX1 der EGFP negativen Zellen abzüglich des Hintergrundsignals der Kontrolle.

3.4 Auswirkungen des ETV6-RUNX1 *knockdowns* in REH

Nach dem Nachweis des erfolgreichen ETV6-RUNX1 *knockdowns* sollten die Auswirkungen dessen untersucht werden. Hierfür sollten insbesondere allgemeine Eigenschaften wie das Zellwachstum betrachtet werden, als auch die zuvor als interessant identifizierten Zytokinrezeptoren des JAK-STAT Signalwegs näher betrachtet werden.

3.4.1 Zellwachstum und Zellmorphologie nach ETV6-RUNX1 *knockdown*

Um in einem systematischen Ansatz die Auswirkungen des ETV6-RUNX1 *knockdowns* auf die Überlebensfähigkeit der REH Zellen zu überprüfen, wurde zunächst eine Wachstumsanalyse über einen längeren Zeitraum durchgeführt. Als positive Kontrolle wurden hier die Zellen REH LT3GEPIR shMYB sowie REH LT3GEPIR shMYC verwendet, deren Plasmide analog zu den Plasmiden mit shRNA Zielsequenzen gegen *ETV6* kloniert und in REH Zellen transduziert wurden. Durch genetisches *silencing* der Gene *MYB* und *MYC* ist mit einem raschen Einsetzen der Apoptose zu rechnen (75).

Nach einer Inkubation der Zellen von 55 Tagen, davon fanden 38 Tage der Inkubation mit Doxycyclin und konsekutiver Expression der shRNA statt, sowie regelmäßigen durchflusszytometrischen Messungen, zeigte sich keine relevante Änderung der Wachstumsgeschwindigkeit gegenüber den Kontrollzellen (siehe Abbildung 31).

Bei genauerer Betrachtung der EGFP positiven und EGFP negativen Zellpopulationen der mit Doxycyclin behandelten Zellen zeigte sich in shETV6_678 Pool sowie shETV6_819 Pool jedoch eine reduzierte Wachstumsgeschwindigkeit der EGFP positiven Zellpopulationen gegenüber den EGFP negativen Zellpopulationen. In den Zellen shETV6_768 Pool sowie der Kontrolle shREN blieb das Zellwachstum gleich.

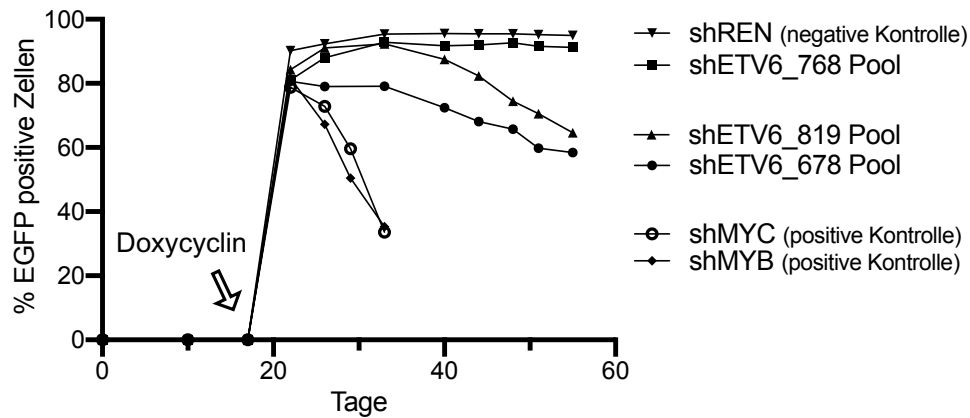


Abbildung 32: Kompetitiver Proliferationsassay nach induziertem *ETV6-RUNX1 silencing*. Es ist zu erkennen, dass der Anteil der REH LT3GEPiR Zellen mit den Zielsequenzen shETV6_678 sowie shETV6_819 nach Aktivierung des Tet-On Systems mit konsekutiver shRNA Expression abnimmt und die Population der EGFP negativen Zellen der jeweiligen Probe, die die shRNA nicht exprimieren, zunimmt. In den positiven Kontrollen shMYB sowie shMYC ist dieser Effekt noch stärker zu beobachten. In der negativen Kontrolle shREN sowie den REH LT3GEPiR Zellen mit der Zielsequenz shETV6_768 bleibt der Anteil der EGFP positiven Zellen mit Expression der shRNA stabil.

Während der Messungen konnte festgestellt werden, dass in den REH Zellen mit den Zielsequenzen shETV6_768 Pool, shETV6_819 (Pool, Klon D5, Klon F10) sowie den Kontrollzellen für eine induzierte Apoptose shMYB und shMYC nach aktiviertem *ETV6-RUNX1 silencing* vermehrt Zelldebris anfällt. Dies kann gut im Streudiagramm der Durchflusszytometrie dargestellt werden und ist in Abbildung 33 zu sehen. In den REH Zellen mit der Zielsequenz shETV6_678 sowie der negativen Kontrolle shREN war dies nicht der Fall, es kam umgekehrt zu einem geringeren Anteil von Zelldebris.

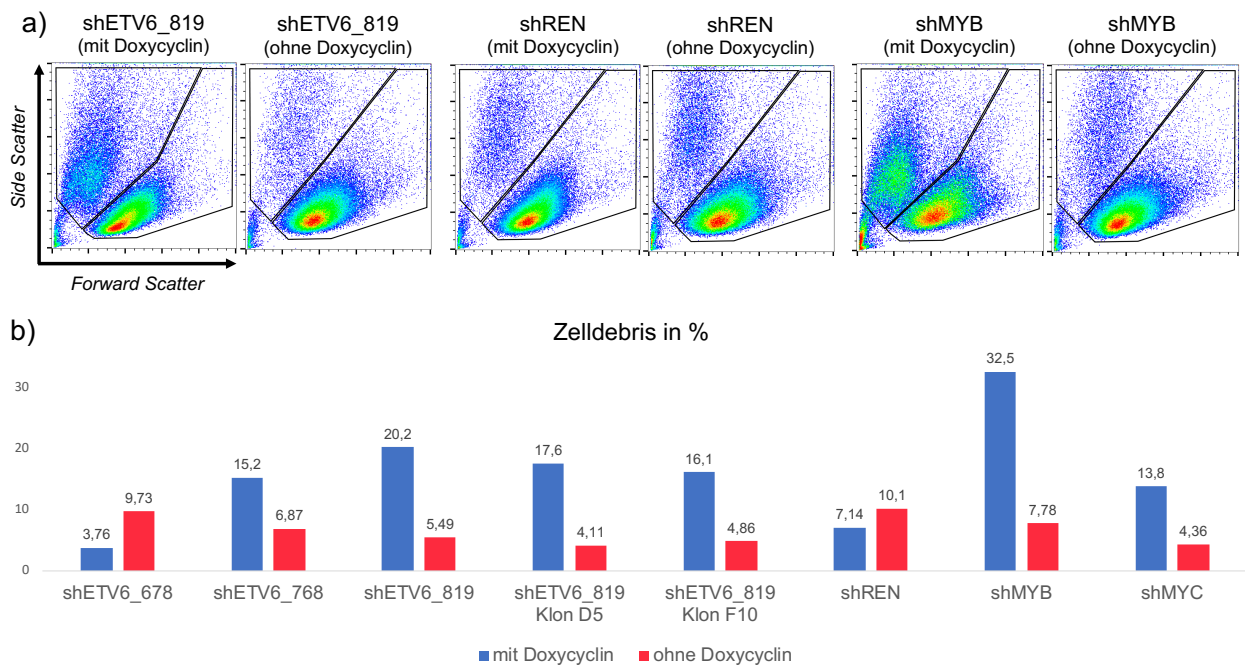


Abbildung 33: Anteil an Zelldebris nach shRNA Expression für 34 Tage (shETV6_678, shETV6_768, shETV6_819, shREN) bzw. für 11 Tage (shMYB, shMYC). a) exemplarische Streudiagramme von REH LT3GEPIR shETV6_819 Pool, einer negativen Kontrolle (shREN) und einer positiven Kontrolle (shMYB) nach Aktivierung der shRNA Expression durch Doxycyclin im Vergleich zu den Kontrollen ohne Doxycyclin. b) Balkendiagramm mit dem Anteil des Zelldebris am Streudiagramm nach *ETV6-RUNX1 silencing* in den jeweiligen Zellen. Für die Zellen shETV6_768, shETV6_819 Pool, shETV6_819 Klon D5, shETV6_819 Klon F10 sowie den positiven Kontrollzellen für eine induzierte Apoptose shMYB und shMYC ist ein deutlich erhöhter Anteil an Zelldebris im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollzellen ohne Doxycyclin-Behandlung zu erkennen. Für die Zellen shETV6_678 kann ein verringerter Anteil an Zelldebris festgestellt werden, die negative Kontrollzellen weist nach Doxycyclin-Aktivierung ebenfalls einen gering verminderten Anteil an Zelldebris auf.

Um zu erkennen, ob die Abnahme des Anteils an EGFP positiven Zellen sowie der vermehrte Anfall von Zelldebris ein Zeichen für eine vermehrt stattfindende Apoptose sind, wurde eine Färbung mit Annexin V vorgenommen, welches in dem verwendeten Assay externalisiertes Phosphatidylserin in der Zellmembran anfärbt. In vitalen Zellen findet sich Phosphatidylserin nur auf der Innenseite der Zytoplasmamembran. Die Umlagerung zur Außenseite findet schon zu Beginn der Apoptose statt, wodurch somit frühapoptotische Zellen erkannt werden können. Mittels DNA-Färbungen z.B. mit DAPI können diese Zellen zusätzlich von bereits toten Zellen mit durchlässiger Zytoplasmamembran unterschieden werden.

Die Färbung von Annexin V wurde an Tag 31 der Doxycyclin-Behandlung der Zellen shREN, shETV6_678 Pool, shETV6_768 Pool, shETV6_819 Pool, shETV6_819 Klon D5 sowie shETV6_819 Klon F10 sowie an Tag 8 der Doxycyclin-Behandlung der Zellen shMYB durchgeführt. Wie in Abbildung 34 zu sehen, konnten dabei für die Zellen shETV6_768, shETV6_819, shETV6_819 Klon D5, shETV6_Klon F10 sowie der positiven Kontrolle shMYB

deutlich erhöhte Raten an früher Apoptose sowie Zelltod gegenüber den Kontrollen ohne Doxycyclin festgestellt werden. In shETV6_678 Pool ließ sich nach Doxycyclin-Behandlung eine geringere Rate des Zelltods sowie der frühen Apoptose feststellen und in der negativen Kontrolle shREN zeigte sich kein signifikanter Unterschied nach Doxycyclin-Behandlung.

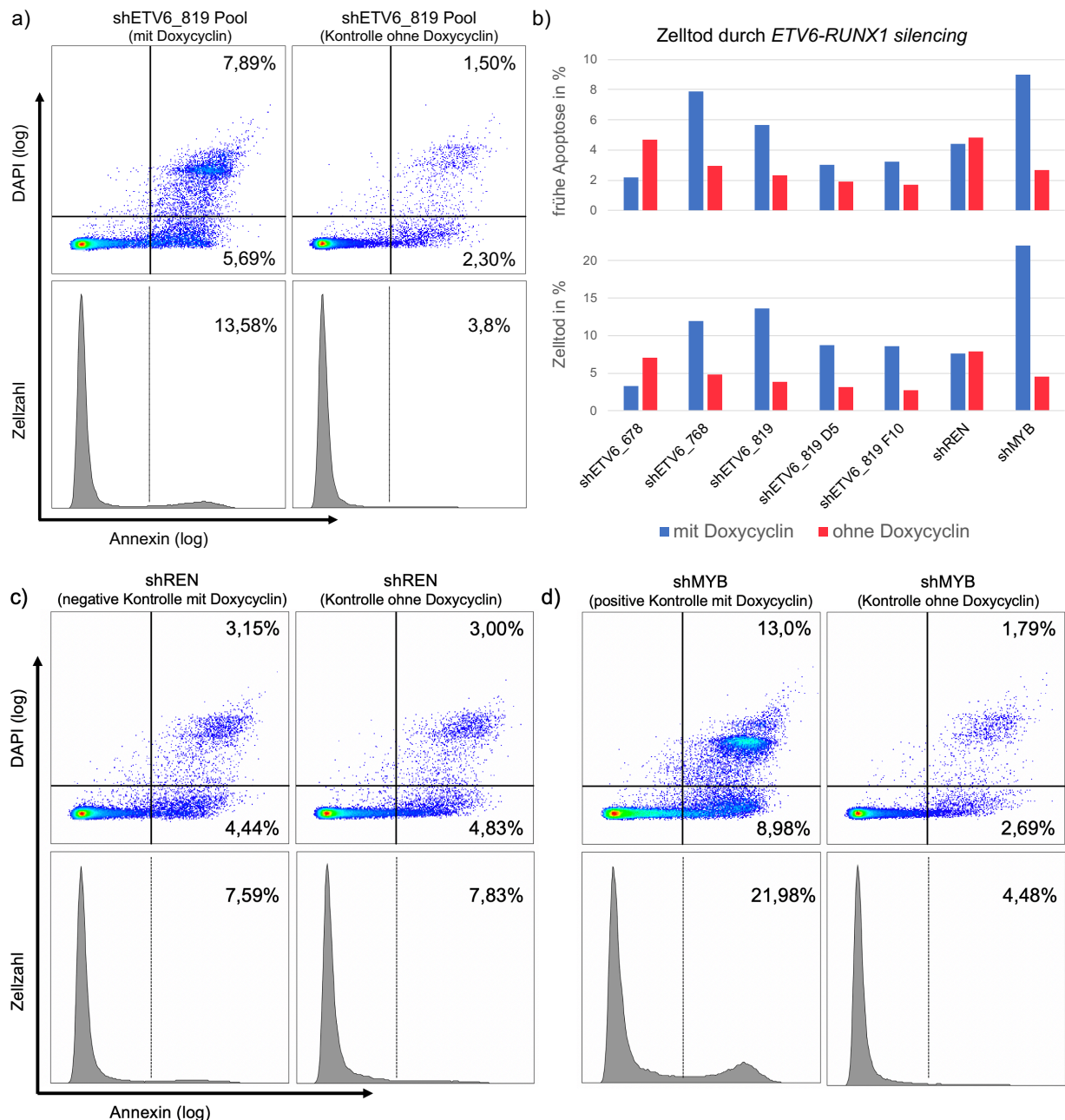


Abbildung 34: Apoptose nach ETV6-RUNX1 silencing in REH. a) Annexin V-Färbung in REH LT3GEPIR shETV6_819 Pool Zellen mit 31 Tagen shRNA Expression im Vergleich zu Kontrollzellen, in denen das pLT3GEPIR nicht durch Doxycyclin aktiviert wurde. Es sind deutlich erhöhte Fraktionen frühapoptotischer (rechter unterer Quadrant) sowie apoptotischer Zellen (rechter oberer Quadrant) zu erkennen. b) Prozentuale Verteilung apoptotischer Zellen (Annexin V positiv) in REH Zellen unterschiedlicher shRNA Sequenzen mit aktiviertem pLT3GEPIR (blau) im Vergleich zu nicht aktiviertem pLT3GEPIR (rot). shREN fungiert als negative Kontrolle durch silencing der nichthumanen Renilla Luciferase, shMYB fungiert als positive Kontrolle für eine durch silencing von MYB induzierte Apoptose. c) Annexin V-

Färbung (Kontrolle) in REH LT3GEPiR shREN Zellen mit 31 Tagen shRNA Expression im Vergleich zu Kontrollzellen, in denen das pLT3GEPiR nicht durch Doxycyclin aktiviert wurde. d) Annexin V-Färbung (Kontrolle) in REH LT3GEPiR shMYB Zellen nach 8 Tagen shRNA Expression im Vergleich zu Kontrollzellen, in denen das pLT3GEPiR nicht durch Doxycyclin aktiviert wurde. *Gating* aller Zellen: Scatter Cells.

Um das Wachstum durch Zellzyklusanalysen weiter zu charakterisieren wurden ebendiese durchgeführt. Dabei zeigte sich in allen Zellen mit der Zielsequenz shETV6_819 nach induziertem *silencing* eine deutliche Zunahme der S-Phase sowie der G2/M-Phase gegenüber den Kontrollzellen. Aufgrund widersprüchlicher Ergebnisse in den weiteren shRNA Sequenzen sind diese Beobachtungen jedoch noch zu überprüfen und werden hier nicht gezeigt.

Während der regelmäßigen Messungen der Wachstumsanalyse konnte weiterhin beobachtet werden, dass die Zellen mit den Zielsequenzen shETV6_819 Pool, shETV6_819 Klon D5 sowie shETV6_819 Klon F10 nach induziertem *ETV6-RUNX1 silencing* eine deutliche Veränderung in der Zellmorphologie aufweisen. Wie in Abbildung 35 exemplarisch zu sehen ist, verlieren die Zellen an Granularität.

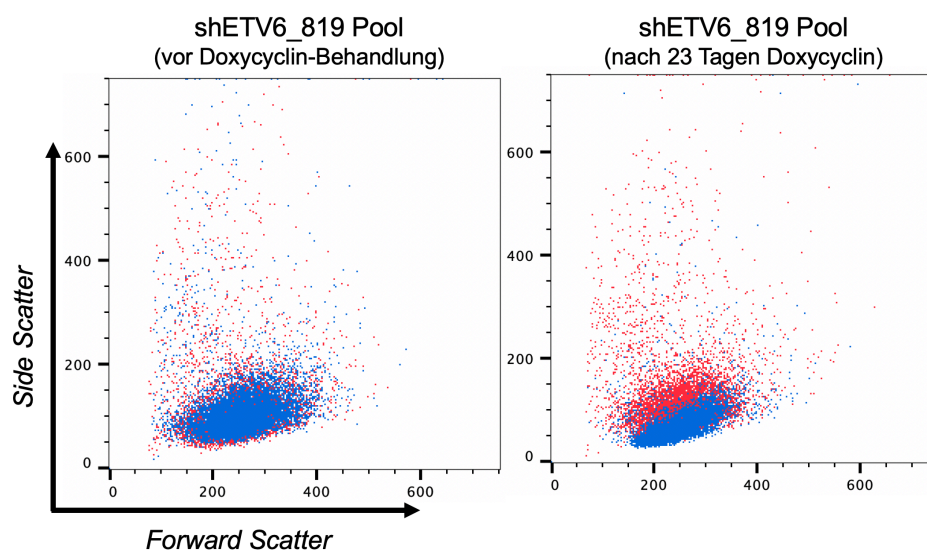


Abbildung 35: Streudiagramm von shETV6_819 Pool Zellen nach *ETV6-RUNX1 silencing*. *Side Scatter* gibt Informationen über die Granularität der Zellen, *Forward Scatter* über die Zellgröße. Links: Zellen vor der Behandlung mit Doxycyclin und konsekutivem *ETV6-RUNX1 silencing*, rechts: Zellen nach 23 Tagen Doxycyclin-Behandlung. Es ist zu erkennen, dass es nach *ETV6-RUNX1 silencing* in shETV6_819 Zellen zu einer deutlichen Abnahme der Granularität der Zellen kommt. Rot: shETV6_819 Pool Kontrollzellen ohne Doxycyclin, blau: shETV6_819 Pool Zellen mit Doxycyclin. *Gating*: Scatter vital / SSC Singlets / FSC Singlets / DAPI negativ.

3.4.2 Differenzierungsmarker nach *ETV6-RUNX1 knockdown*

In Anlehnung an die veränderte Zellmorphologie, wie sie in Kapitel 3.4.1 beschrieben wurde, wurden in einem nächsten Schritt Untersuchungen des B-lymphatischen Differenzierungsstatus

nach *ETV6-RUNX1 silencing* durchgeführt. Hierfür dienten uns sowohl Oberflächenmarker, auch *cluster of differentiation* (CD) genannt, die in B-Vorläufer-Zellen im Pro-B- / Prä-B-Stadium typischerweise exprimiert werden und in kommenden Entwicklungsstadien verloren gehen (CD19, CD38, CD72), als auch Oberflächenmarker, die erst in zukünftigen B-Zell Entwicklungsstadien exprimiert werden (CD21, CD40). Es zeigte sich jedoch keine signifikante Änderung der Expression der Oberflächenmarker CD19, CD21, CD38 sowie CD40, wie exemplarisch an den Zellen REH LT3GEPiR shETV6_819 Pool in Abbildung 36 dargestellt.

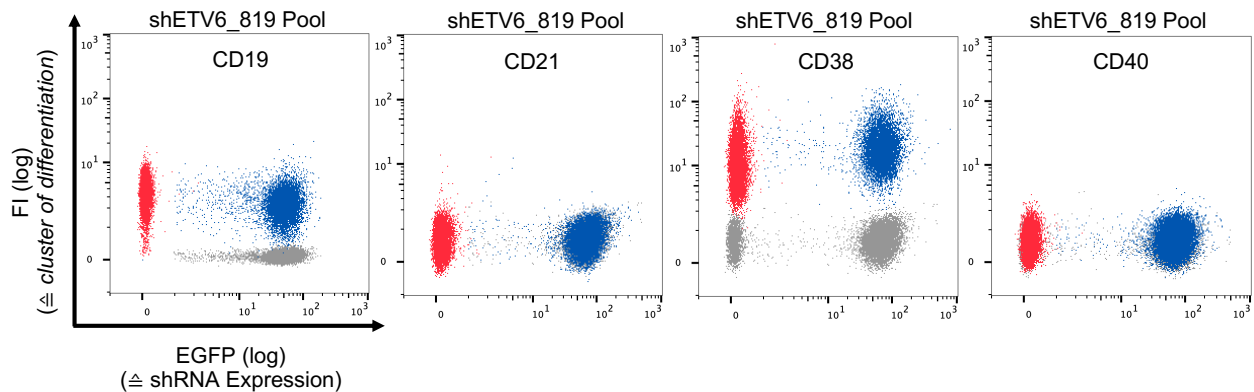


Abbildung 36: Expression der B-Zell-Differenzierungsmarker CD19 (nach 38 Tagen shRNA Expression), **CD21, CD38 und CD40** (nach 29 Tagen shRNA Expression), exemplarisch gezeigt an den Zellen REH LT3GEPiR shETV6_819 Pool. Auch nach längerem *silencing* von *ETV6-RUNX1* ist keine signifikante Änderung der dargestellten Oberflächenmoleküle zu beobachten. Grau: ungefärbte Kontrolle von shETV6_819 Pool mit Doxycyclin-Behandlung, rot: shETV6_819 Pool ohne Doxycyclin-Behandlung zur Kontrolle, blau: shETV6_819 Pool mit Doxycyclin-Behandlung. *Gating* für alle Zellen: Scatter vital / SSC Singlets / FSC Singlets / DAPI negativ.

In der Expression von CD72, für dessen Gen im Promotorbereich eine Bindung des transkriptionellen Repressors ETV6-RUNX1 nachgewiesen wurde und dessen Transkription demnach direkt durch das Fusionsprotein reprimiert werden kann wie Kaulfuß 2016 zeigen konnte (46), zeigte sich nach ETV6-RUNX1 *knockdown* eine Hochregulation um das etwa 2- bis 3-fache (siehe Abbildung 37).

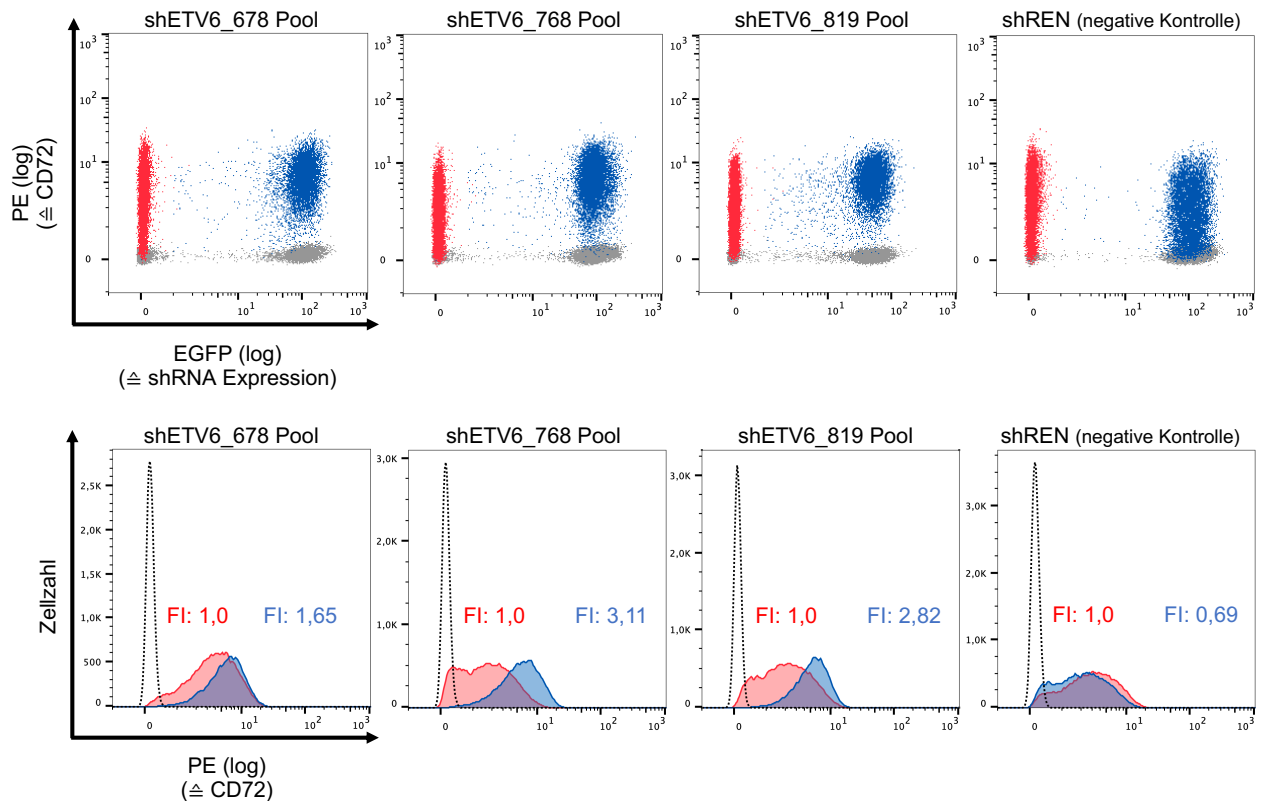


Abbildung 37: Expression von CD72 nach 38 Tagen shRNA Expression in REH Zellen mit verschiedenen Zielsequenzen der shRNA gegen *ETV6*. Nach der Expression der shRNA und konsekutivem *silencing* von *ETV6-RUNX1* kann eine erhöhte Expression des Oberflächenmoleküls CD72 beobachtet werden. Grau: ungefärbte Kontrolle der jeweiligen Zellen, rot: Kontrolle ohne Doxycyclin-Behandlung der jeweiligen Zellen, blau: REH Zellen mit unterschiedlichen shRNA Zielsequenzen gegen *ETV6* sowie der negativen Kontrolle shREN mit einer Zielsequenz gegen die nichthumane Renilla Luciferase. *Gating* für alle Zellen: Scatter vital / SSC Singlets / FSC Singlets / DAPI negativ.

3.4.3 Oberflächenexpression von IL-7 α nach *ETV6-RUNX1 knockdown*

Um die Effekte des *ETV6-RUNX1 silencing* auf die IL-7 Rezeptorketten (IL-7 α und IL-2 β) sowie den EPO Rezeptor darzustellen, wurden diese analog zu Kapitel 3.2.2 immunzytochemisch gefärbt. Hierfür wurden die REH Zellen shETV6_819 Pool, shETV6_819 Klon D5 und shETV6 Klon F10 ausgewählt, sowie zur negativen Kontrolle die Zellen mit der Zielsequenz shREN. Für alle Ansätze wurden jeweils die Zellen mit induziertem *silencing* von *ETV6-RUNX1* sowie die Zellen ohne Doxycyclin zur Kontrolle gefärbt.

Es zeigte sich eine verminderte Expression der IL-7 Rezeptorkette α in den Zellen mit der Zielsequenz shETV6_819 nach induziertem *ETV6-RUNX1 silencing*. In den Zellen shETV6_819 Pool kam es nach 28 Tagen induziertem *silencing* zu einer Reduktion der IL-7 α Expression auf 30%, in shETV6_819 Klon D5 auf 18% sowie in shETV6 819 Klon F10 auf 17%, wie in Abbildung 38 gezeigt. Die Kontrolle shREN zeigte die Reduktion nicht.

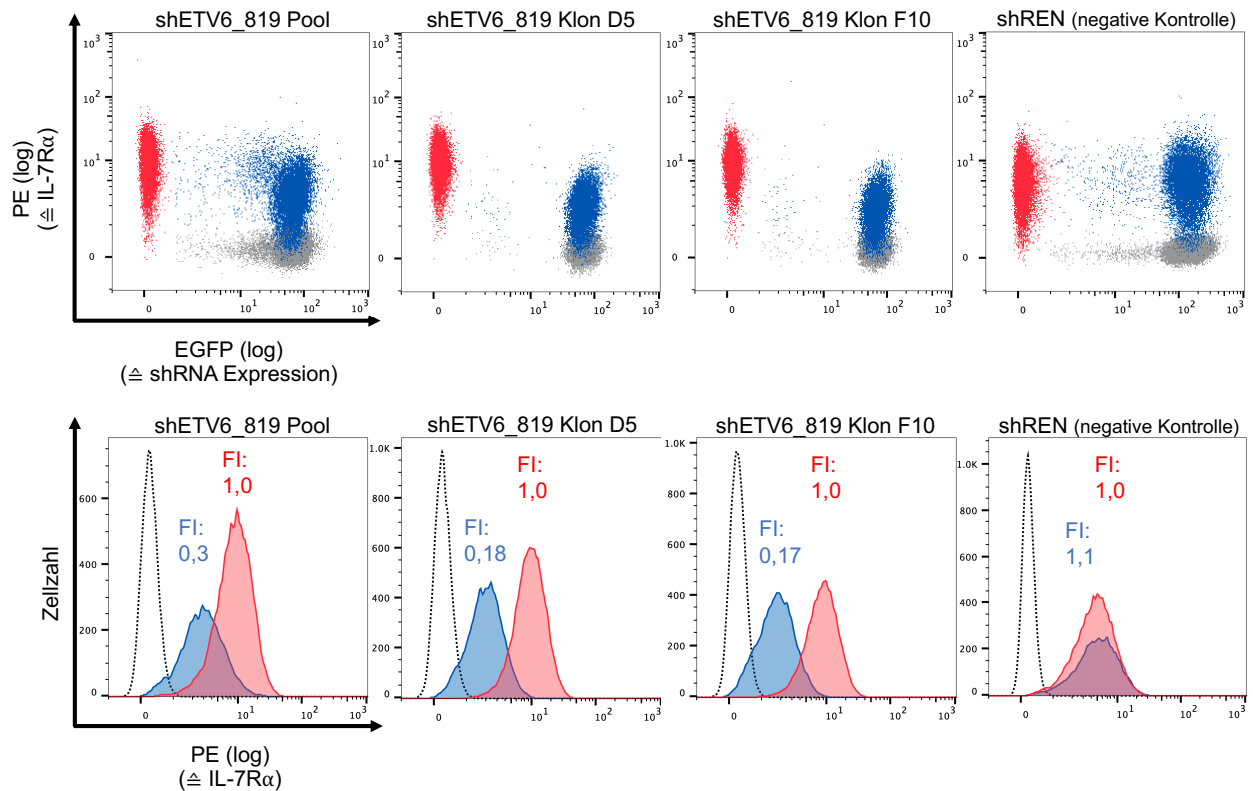


Abbildung 38: IL-7R α Expression in REH LT3GEPIR shETV6_819 Zellen nach 28 Tagen Inkubation mit Doxycyclin im Vergleich zu den Kontrollzellen. Eine Expression von EGFP bedeutet die Anschaltung des Tet-On Systems mit konsekutivem *silencing* von *ETV6-RUNX1*. Es ist zu erkennen, dass die EGFP positiven Zellen die IL-7 Rezeptorkette α weniger stark exprimieren. In der negativen Kontrolle shREN kann dies nicht beobachtet werden. Rot: REH LT3GEPIR Zellen ohne Doxycyclin und mit IL-7R α Antikörper als Kontrollzellen, blau: REH LT3GEPIR Zellen mit Doxycyclin und mit IL-7R α Antikörper, grau: REH LT3GEPIR mit Doxycyclin und mit Isotypkontrolle IgG1 κ . *Gating* für alle Zellen: Scatter vital / SSC Singlets / FSC Singlets / DAPI negativ.

In weiteren Untersuchungen nach fortgeführtem *ETV6-RUNX1 silencing* konnte beobachtet werden, dass die Expression von IL-7R α fortschreitend abnimmt (siehe Abbildung 39). Die Veränderungen in der Expression der Proteine IL-2R γ sowie EPO-R erschien in allen untersuchten Zellen nicht signifikant (Daten nicht gezeigt).

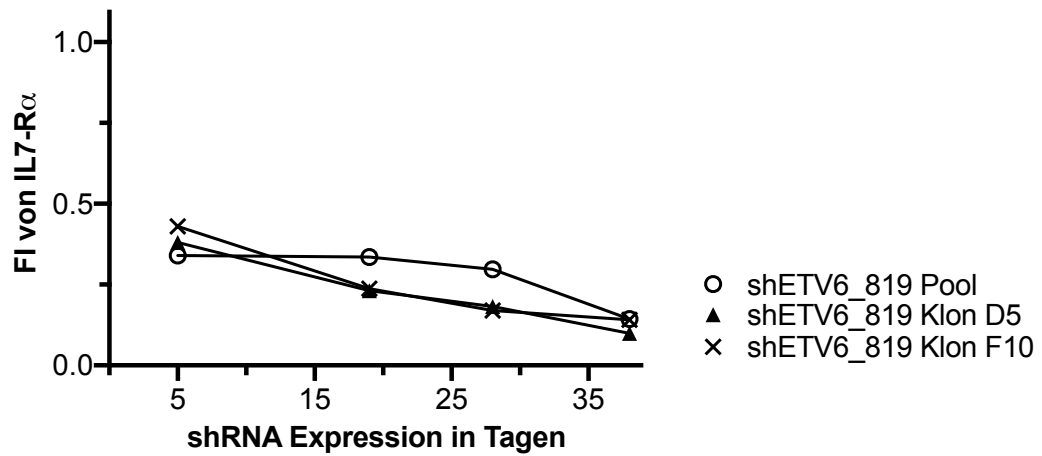


Abbildung 39: Relative Fluoreszenzintensität (FI) von IL-7R α in Bezug auf die jeweilige Kontrolle ohne Doxycyclin. Mit fortschreitender Inkubationszeit mit Doxycyclin und konsekutivem *ETV6-RUNX1* silencing nimmt die Expression von IL-7R α zunehmend ab.

4. DISKUSSION

4.1 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Untersuchung des JAK-STAT Signalwegs in *ETV6-RUNX1* positiver ALL und der Etablierung eines Modells zum induzierten *knockdown* des Fusionsproteins in Zelllinien. Mit RNA-basierten *in silico* Analysen konnte gezeigt werden, dass nach gegenwärtigen Erkenntnissen 9 verschiedene Rezeptoren des JAK-STAT Signalwegs in ihrer vollen funktionellen Form mit allen Untereinheiten in den *ETV6-RUNX1* positiven BVZ-ALL Zelllinien REH, UoC-B6, AT-2 sowie in Blasten von Patient/-innen exprimiert werden. Insbesondere der IL-7 Rezeptor erscheint in REH Zellen stark exprimiert. Des Weiteren konnte durchflusszytometrisch die Proteinexpression aller Rezeptoruntereinheiten des IL-7 Rezeptors und des EPO Rezeptors aufgezeigt werden. Mittels XTT-Viabilitätsassays konnte zudem der funktionelle Nachweis erbracht werden, dass die Zytokine IL-7 und IL-9 in den BVZ-ALL Zelllinien REH, UoC-B6 sowie AT-2 einen Effekt auf die Anzahl vitaler Zellen haben, die jeweiligen Signalwege demnach intakt sind.

Als nächstes wurden anhand eines Reporterzellmodells drei shRNA Sequenzen gegen *ETV6* identifiziert, die ein effektives *silencing* des Fusionsgens *ETV6-RUNX1* in Zellen ohne *ETV6*-Wildtyp erreichen. Anschließend wurden diese Sequenzen in einem induzierbaren Tet-On miR-E *enhanced backbone* System erfolgreich in die Zelllinie REH transduziert und nach 30 Tagen shRNA Expression ein intranukleärer *knockdown* des Fusionsproteins je nach Zielsequenz auf etwa 8 - 26% des Ausgangswertes nachgewiesen.

Nach Induktion der shRNA Expression konnte in den Zellen REH LT3GEPiR shETV6_678 Pool sowie REH LT3GEPiR shETV6_819 Pool eine leichte Abnahme der Wachstumsgeschwindigkeit festgestellt werden, die erstmals zwischen den Tagen 16 - 23 nach shRNA Expression sichtbar wurde. In den Zellen mit den shRNA Zielsequenzen shETV6_768 sowie shETV6_819 ging die shRNA Expression außerdem mit einer erhöhten Rate an Apoptose sowie einem vermehrten Anfallen von Zelldebris einher. In Zellen mit der Zielsequenz shETV6_819 wurde dies außerdem von einer deutlichen Abnahme der Granularität der Zellen begleitet, die durchflusszytometrisch mittels *side scatter* Analysen objektiviert wurde.

Eine signifikante Änderung der Expression von Zelldifferenzierungsmarkern ließ sich dabei durch Analysen von IL-7R α (CD127) sowie des Oberflächenmarkers CD72 nach *ETV6-RUNX1 knockdown* zeigen. Vor allem konnte für die IL-7 spezifische Oberflächenrezeptorkette IL-7R α , der Untereinheit des IL-7 Rezeptors, die in REH Zellen als stark exprimiert identifiziert wurde,

nach ETV6-RUNX1 *knockdown* eine deutliche Herunterregulation auf Proteinebene gezeigt werden.

4.2 Charakterisierung der BVZ-ALL Zelllinien REH, UoC-B6 und AT-2

Für die Charakterisierung sowie Identifizierung der Identität der *ETV6-RUNX1* positiven BVZ-ALL Zelllinien wurden Karyogramme, FISH-Analysen und STR-Analysen durchgeführt. Des Weiteren wurde der jeweilige immunzytochemische Nachweis des ETV6-RUNX1 Fusionsproteins erbracht. Zusätzlich erfolgte mit einem XTT-Viabilitätsassay die Bestimmung der optimalen Puromycin-Konzentration für folgende Einsätze des Antibiotikums zur Selektion von molekularbiologisch veränderten Zellen. Die Untersuchungen dienten in erster Linie der zweifelsfreien Identifikation der Zelllinien sowie dem Nachweis der jeweiligen *ETV6*-Wildtyp Deletion der Zellen. Letztere ist Voraussetzung dafür, dass in den späteren Versuchen ein Anti ETV6 Antikörper verwendet werden kann, der sowohl ein sehr gutes Signal-Rausch-Verhältnis aufweist als auch unabhängig vom jeweiligen Übergangsbereich des Fusionsproteins ist. Die Verwendung des alternativen Anti ETV6-RUNX1 (TEL6F2) Antikörpers setzt die spezifische Aminosäuresequenz "PIGRIAECILGM" im Übergangsbereich der häufigsten Variante des Fusionsproteins voraus (45). Weiterhin weist TEL6F2 ein etwas geringeres Signal-Rausch-Verhältnis als der verwendete Anti ETV6 Antikörper auf (Daten nicht gezeigt).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die verwendete Zelllinie REH der von Uphoff et al. 1997 erstmals vollständig karyotypisierten Zelllinie mit der komplexen Translokation t(4;12;21;16) entspricht (109). Außerdem wurde durch konfokalmikroskopische Aufnahmen der immunzytochemischen Färbung die Expression des Fusionsproteins nachgewiesen. Auch für UoC-B6 wurde 1.) mittels FISH das Vorliegen der Chromosomentranslokation t(12;21) sowie 2.) mittels immunzytochemischer Färbung die daraus resultierende Expression des aberranten Fusionsproteins ETV6-RUNX1 nachgewiesen. Erstmals wurde außerdem das STR-Profil für UoC-B6 ermittelt. Für die Zelllinie AT-2 wurde der Karyotyp anhand bereits publizierter Daten verifiziert (91) und die Deletion des *ETV6*-Wildtyp Allels bestätigt. Interessanterweise ließ sich immunzytochemisch das Fusionsprotein lediglich mit dem Anti ETV6 Antikörper darstellen, was darauf hinweist, dass in AT-2 ein atypischer Bruchpunkt der Chromosomen 12 und 21, bzw. eine atypische Spleißvariante des Fusionstranskripts vorliegt. Dadurch kommt es zu einem untypischen Übergangsbereich des Hybridproteins, der nicht die häufige "PIGRIAECILGM" Sequenz aufweist.

Das ETV6-RUNX1 Fusionsprotein zeigte sich in den immunzytochemischen Färbungen der Zelllinien REH, UoC-B6 sowie AT-2 fast ausschließlich intranukleär in Granula angeordnet, wie bereits von Buder 2017 (80) und Deichmann 2018 (79) in ihren Bachelorarbeiten vorbeschrieben.

Über den Grund der granulären Anordnung ist bislang nichts bekannt. Eine Kolo­kalisierung mit *nuclear speckles* kann diskutiert und sollte in zukünftigen Arbeiten überprüft werden, beispielsweise mittels Doppelfärbung von ETV6-RUNX1 sowie SC-35 oder SRSF1. *Nuclear speckles* sind intranukleäre Domänen, in der Regel 20 - 50 Stück pro Zellkern, die die integrierte Regulierung der Genexpression ermöglichen (111, 112) und fluoreszenzmikroskopisch am ehesten der Formation von ETV6-RUNX1 ähneln.

In diesem Teil der Arbeit konnten so demnach die Richtigkeit der Zelllinien verifiziert sowie bislang unveröffentlichte Charakteristika zur weiteren zweifelsfreien Identifizierung dargestellt werden. Außerdem konnte die für die kommenden Versuche wichtige ETV6-Wildtyp Deletion sowie das Vorhandensein des Fusionsproteins nachgewiesen werden.

4.3 Analysen des JAK-STAT Signalwegs in ETV6-RUNX1 positiver ALL

Um den JAK-STAT Signalweg in ETV6-RUNX1 positiver ALL zu analysieren, wurde zunächst in einem breiten Ansatz eine *in silico* Analyse von Affymetrix Genexpressionsdaten angefertigt. Dafür wurde im Rahmen dieser Arbeit eine genomweite mRNA-Analyse von REH und UoC-B6 Zellen mit Oligonukleotid *microarrays* (Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Plattform) durchgeführt. Außerdem standen multiple mit derselben Plattform erstellte Datensätze der ETV6-RUNX1 positiven Zelllinien REH und AT-2 zur Verfügung, die Datensätze von 219 primären ETV6-RUNX1 positiven ALL-Blasten sowie die Datensätze von 19 Proben von gesunden Kindern (Alter < 15 Jahre). Für die Zelllinie REH lagen außerdem RNA-Sequenzierungsdaten sowie Proteomdaten vor. Um die Validität der Affymetrix Plattform zu überprüfen und die angefertigten Auswertungen zu kontrollieren, wurden für die Zytokinrezeptoren des JAK-STAT Signalwegs die untersuchten Affymetrix Genexpressionsdaten der Zelllinie REH mit veröffentlichten RNA-Sequenzierungsdaten, sowie mit kürzlich veröffentlichten Proteomdaten korreliert. Für ausgewählte, als interessant identifizierte, Rezeptoren wurden in den nächsten Schritten Antikörperfärbungen sowie XTT-Viabilitätsassays durchgeführt, um die Proteinexpression sowie die Funktionalität des gesamten Signalwegs weiter zu untersuchen. Letztere erscheinen notwendig aufgrund der breiten Beeinflussung intrazellulärer Signalwege durch ETV6-RUNX1 (46, 49, 53, 55), woraus sich die Fragestellung nach der Intaktheit sowie therapeutischen Beeinflussbarkeit spezifischer JAK-STAT Signalwege ergibt.

In den vergangenen Jahren hat die RNA-Sequenzierung in vielen Bereichen der Transkriptomanalysen begonnen, die vorher weit verbreiteten *microarray* Genexpressionsanalysen abzulösen. Die gute Reproduzierbarkeit, ein sehr geringes Hintergrundsignal sowie die Möglichkeit, auch Mutationen und alternative Splicevarianten zu detektieren sind nur einige der Vorteile, die die RNA-Sequenzierung bietet (113). Allerdings gibt

es nach wie vor viele Gründe für die Nutzung von *microarray* Genexpressionsdaten wie die große Zahl von bereits veröffentlichten Datensätzen, die gute Vergleichbarkeit zwischen Analysen der gleichen Plattform, die im Vergleich überschaubaren Kosten sowie die Handhabbarkeit der Daten. Deshalb wurde entschieden, die vielen verfügbaren *microarray* Genexpressionsdaten der Plattform Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 zu nutzen und sie mit veröffentlichten RNA-Sequenzierungsdaten von REH zu vergleichen. Dadurch wird es jedoch nicht möglich sein, Mutationen in den untersuchten Genen zu identifizieren.

Die in dieser Arbeit im Anschluss an die Genexpressionsanalysen durchgeführten Antikörperfärbungen wurden mit direkt konjugierten monoklonalen Antikörpern gegen die jeweiligen Rezeptoruntereinheiten erstellt. Alternativ sieht man in der Literatur auch häufiger den Einsatz von biotinylierten Zytokinen, die anschließend fluoreszenzmarkiert werden, beispielsweise in den Arbeiten von Torrano et al. 2011 zum Nachweis des EPO Rezeptors (49). Dies hat den Vorteil, dass nur vollständig exprimierte Rezeptoren sowie funktionelle Spleißvarianten nachgewiesen werden können, die auch in der Lage sind, das entsprechende Zytokin zu binden (114). Allerdings führen Zytokine, die von mehreren Rezeptoren gebunden werden können, zu einer schlechteren Spezifität der Untersuchung. Auf der anderen Seite hat die Nutzung von direkt konjugierten monoklonalen Antikörpern wiederum den Vorteil, den Besatz der einzelnen Rezeptoruntereinheiten besser differenzieren zu können. Da der verwendete IL-9 Rezeptor α Antikörper zu keiner erfolgreichen Immunfärbung führte, empfiehlt sich hier die Testung eines alternativen monoklonalen Antikörpers oder die Nutzung eines Systems mit biotinyliertem IL-9.

Die durchgeführten Viabilitätsassays mittels XTT dienen dazu, die getesteten Liganden bzw. Rezeptoren auf eine erfolgreiche Signaltransduktion hin zu untersuchen. Durch die Reduktion des Redoxfarbstoffes XTT in Formazan lässt sich in diesen Assays auf die Zahl metabolisch aktiver Zellen schließen. Da in dieser Arbeit den Zellen 24 Stunden vor Zytokingabe alle Wachstumsfaktoren entzogen wurden, konnte so auf eine mögliche antiapoptotische oder proliferationsfördernde Wirkung der Zytokine geschlossen werden. XTT-Assays stellen damit eine relativ einfache Möglichkeit dar, die Wirkung der Zytokine zu überprüfen. Weil die Zellvitalität so jedoch nur indirekt über die metabolische Aktivität bestimmt werden kann, lädt diese Methode zu Verfälschungen durch unspezifische und *off-target* Effekte ein. Beispiele sind hier unterschiedliche Zusammensetzungen des Kulturmediums oder die Testung bestimmter Inhibitoren, die sich direkt auf die metabolische Aktivität der Zellen auswirken (115). Zur Validierung und spezifischeren Untersuchung des Signalwegs könnten neutralisierende Rezeptorantikörper oder Inhibitoren gegenüber JAK oder STAT eingesetzt werden, eine gute Übersicht bieten hier Bousoik et al. (64). Hier sollte jedoch aufgrund der *off-target* Effekte nicht

auf die alleinige Auswertung von XTT-Assays gesetzt werden. Häufig genutzte Assays, die ergänzend Verwendung finden könnten, sind beispielsweise LDH-Assays oder ATP-Assays (116, 117).

Die mittels *microarray* Genexpressionsdaten untersuchten 63 Gene für Rezeptoren im JAK-STAT Signalweg korrelierten in der Zelllinie REH positiv mit den RNA-Sequenzierungsdaten des *Human Protein Atlas* Projektes. Ebenfalls positiv korrelierten die *microarray* Genexpressionsdaten mit den Proteomdaten des *Cancer Cell Line Encyclopedia* Projektes, allerdings konnten hier nur 7 verschiedene Gene im JAK-STAT Signalweg untersucht werden, da für alle weiteren keine Proteomdaten vorlagen. Die Vergleiche bestätigen die Validität der *microarray* Genexpressionsdaten der gewählten Plattform sowie der durchgeführten Normalisierungen der Daten. Es konnten schließlich 19 Gene identifiziert werden, die für 13 verschiedene interessante Zytokinrezeptoren des JAK-STAT Signalwegs kodieren. Dabei wurde unterschieden in Rezeptoren, die generell in *ETV6-RUNX1* positiver ALL exprimiert werden (CXCR4 Rezeptor, EPO Rezeptor, Interferon α/β Rezeptor, Interferon γ Rezeptor, IL-7 Rezeptor, IL-9 Rezeptor, IL-11 Rezeptor, IL-27 Rezeptor, Thrombin Rezeptor) sowie in Rezeptoren, die im Vergleich zu den 19 gesunden Kontrollprobanden herunterreguliert sind (GM-CSF Rezeptor, IL-6 Rezeptor, IL-13 Rezeptor, Leptin Rezeptor). Insbesondere der IL-7 Rezeptor wird in den *ETV6-RUNX1* positiven Zelllinien auffallend stark exprimiert. Eine starke Genexpression konnte in einigen der Blasten der Patient/-innen zwar ebenfalls nachgewiesen werden, hier präsentiert sich die Expression jedoch insgesamt eher heterogen. Hierbei ist zu bedenken, dass alle verwendeten *ETV6-RUNX1* positiven Zelllinien im Rezidiv der Erkrankung gewonnen worden sind, während die Patient/-innenproben ausschließlich aus dem Stadium der Ersterkrankung stammen.

In einem nächsten Schritt konnte die Proteinexpression der *common- γ* Zytokinrezeptoruntereinheit (CD132), der IL-7 Rezeptorkette α (CD127) sowie des EPO Rezeptors auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Hierbei zeigte sich die Expressionsstärke des EPO Rezeptors im Vergleich zur positiven Kontrolle HEL als eher gering. Von den Bestandteilen des IL-7 Rezeptors wurde insbesondere die Rezeptorkette α (CD127) sehr stark an der Zelloberfläche exprimiert und präsentiert sich damit ähnlich wie in den *microarray* Genexpressionsdaten. Für AT-2 konnte nur ein deutlich geringerer Rezeptorbesatz festgestellt werden, als es die *microarray* Genexpressiondaten erwarten ließen.

In den durchgeführten XTT-Analysen zeigte sich für IL-7 und IL-9 ein stärker werdendes Signal mit steigenden Zytokinkonzentrationen. Hier ist zu erwähnen, dass im verwendeten Protokoll den Zellen zuvor die Wachstumsfaktoren entzogen wurden, worauf es zu einer kontinuierlichen Abnahme der Zellzahl kam. Es kann demnach geschlussfolgert werden, dass IL-7 und IL-9 in

steigenden Konzentrationen verstärkt das Wachstum fördern und die Rezeptoren sowie die anschließende Signaltransduktion funktional aktiv sind. Für den EPO Rezeptor konnte dies aufgrund von fehlender Reproduzierbarkeit bedauerlicherweise nicht gezeigt werden.

Damit wurden in dieser Arbeit nur einige der Literaturdaten über die Expression des EPO Rezeptors bestätigt. Inthal et al. wiesen die Expression von *EPO* per *real-time quantitative* PCR (qPCR) nach und konnten zusätzlich in einem ³H-Thymidin Assay eine verstärkte Proliferation nach Inkubation mit EPO in REH Zellen zeigen (48). Im MTT Assay, der auf ähnlichen Prinzipien wie der hier angewandte XTT Assay basiert, zeigten sich bei Inthal et al. eine EPO Wirkung lediglich nach induzierter Apoptose mittels Prednison. Torrano et al. wiederum zeigten mit einer Antikörperfärbung die Proteinexpression des EPO Rezeptors, die hier bestätigt werden konnte (49). Anders als in dieser Arbeit wurde von Torrano et al. auf ein System basierend auf biotinyliertem EPO eingesetzt.

Die Expression des IL-7 Rezeptors auf REH Zellen konnte auch schon von González-García et al. per Antikörperfärbung gezeigt werden (118). Da das IL-7 Signal eine kritische Rolle in der Entwicklung von Lymphozyten spielt (119) und zu einem verstärkten Überleben und Zellwachstum unter anderem durch die Expression von BCL2 führt (120), könnte dieses Ergebnis von größerer Bedeutung in Zusammenhang mit der Tumorgenese von *ETV6-RUNX1* positiver ALL sein. Im XTT Viabilitätsassay konnte ein Wachstumseffekt bei steigenden IL-7 Konzentrationen beobachtet werden. Eine vermehrte Expression des IL-7 Rezeptors in *ETV6-RUNX1* positiven Blasten könnte somit einen Überlebens- und Wachstumsvorteil bedeuten. Schon Korte et al. sowie Kebelmann-Betzing et al. beschreiben jeweils die Expression der IL-7 Rezeptorkette α im Großteil der von ihnen analysierten primären Blasten pädiatrischer B-ALL (121, 122). Zusätzlich konnten Kovac et al. nachweisen, dass die Konzentration von IL-7 im Knochenmark von Kindern mit BVZ-ALL erhöht ist (123). Vilchis-Ordoñez et al. wiesen sogar ein proinflammatorisches Milieu im Knochenmark von Kindern mit einer ALL nach, hierbei wurde explizit auch die Erhöhung von IL-7 genannt (124). Von González-García et al. konnte schließlich in einem B-ALL Xenograft Modell gezeigt werden, dass ein *silencing* des IL-7 Rezeptors zu einem massiv gestörten *engraftment* der Tumorzellen in die Organe führt und schlussfolgerten so die essenzielle Rolle von IL-7R in der Leukämogenese (118).

Unklar bleibt, wie die IL-7 Rezeptor Expression in *ETV6-RUNX1* positiver BVZ-ALL reguliert wird. Für T-Zellen konnte nachgewiesen werden, dass die Oberflächenexpression des IL-7 Rezeptor α (CD127) nach IL-7 Stimulation stark herunterreguliert wird (125, 126). Es könnte spekuliert werden, dass die erhöhte Expression in *ETV6-RUNX1* positiver ALL möglicherweise auf eine gestörte Regulation des Rezeptors zurückzuführen ist. In weiteren Untersuchungen sollte hier

zunächst funktional untersucht werden, was die Unterdrückung des IL-7 Signals in den leukämischen Zelllinien bewirkt. Hier würden sich beispielsweise Experimente mit dem neutralisierende monoklonale Anti IL7R Antikörper A7R34, der gegen die IL-7 Rezeptor α Untereinheit gerichtet ist, anbieten (127). Ebenso könnte entsprechend der Untersuchungen von Park et al. die Proteinexpression sowie die mRNA Expression vor und kurz nach IL-7 Inkubation bestimmt werden, um eine mögliche Herunterregulation zu untersuchen (125).

Durch die IL-7 Stimulation werden sowohl STAT3 als auch STAT5 aktiviert, beide Transkriptionsfaktoren wurden in Zusammenhang mit IL-7 als essenziell für die B-Zell Entwicklung identifiziert (128, 129). Mangolini et al. entdeckten STAT3 in *ETV6-RUNX1* positiver ALL als vielversprechendes Ziel einer Pharmakotherapie, nachdem sie zeigten, dass ein *ETV6-RUNX1 silencing* zu verringerten Spiegeln von phosphoryliertem STAT3 führt und die Inhibierung ebendiesen eine vermehrte Apoptose in REH und AT-2 Zellen auslöst (55). Ob die hohe Expression des IL-7 Rezeptors für diese Effekte mitursächlich ist, sollte zukünftig in weiteren Versuchen getestet werden.

Der IL-9 Rezeptor α gehört der gleichen Rezeptorfamilie wie der IL-7 Rezeptor an und heterodimerisiert ebenfalls wie der IL-7 Rezeptor α mit der gemeinsamen Untereinheit *common- γ* . Auch für diesen Rezeptor wurden bereits JAK-STAT vermittelte antiapoptotische Effekte beschrieben (130-132). Diese bezogen sich jedoch nur zum Teil auf B-Zellen und stattdessen meist auf Untersuchungen an T-Zellen. Der Nachweis der antiapoptotischen Wirkung von IL-9 in den XTT-Viabilitätsassays unterstützt dies jedoch.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass 9 verschiedene Rezeptoren des JAK-STAT Signalwegs in *ETV6-RUNX1* positiver ALL mit allen für die Funktion relevanten Untereinheiten exprimiert werden, wovon neben dem EPO Rezeptor und dem IL-9 Rezeptor insbesondere der IL-7 Rezeptor als interessant ausgemacht wurde und durch antiapoptotische sowie wachstumsfördernde Effekte in der Leukämogenese eine größere Rolle spielen könnte.

4.4 Induzierbarer *ETV6-RUNX1 knockdown* in BVZ-ALL Zelllinien

Für den induzierbaren *ETV6-RUNX1 knockdown* in BVZ-ALL Zelllinien wurde das in Kapitel 1.6 beschriebene Plasmid pLT3GEPIR verwendet, welches eine mittels Tet-On System aktivierte Expression von shRNA in einem miR-E *enhanced backbone* ermöglicht. Dieses System wurde zunächst in einem Reporterzellmodell getestet, in welches zuvor das Fusionsgen *ETV6-RUNX1* stabil transfiziert wurde. Mit diesem Modellsystem wurden die drei effektivsten shRNA Sequenzen gegen *ETV6* ausgewählt. Die Auswahl erfolgte über die Messungen der Fluoreszenz von *mCherry*, das mit dem Fusionsprotein in diesem Reporterzellmodell koexprimiert wurde.

Anschließend erfolgte die lentivirale Transduktion des Plasmids in die *ETV6-RUNX1* positiven BVZ-ALL Zelllinien REH, UoC-B6 sowie AT-2. Um die Effektivität des *knockdowns* zu testen, wurden schließlich immunzytochemische Färbungen des Fusionsproteins durchgeführt, welche sowohl durchflusszytometrisch als auch fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet wurden, um die Effektivität des *knockdowns* zu bestimmen.

Das verwendete Tet-On System zur induzierten shRNA-Expression bringt den Vorteil mit sich, dass dabei die Effekte der shRNA kontrolliert analysiert werden können und so die Auswirkungen des *silencings* nicht von den Effekten der viralen Transduktion überlagert werden. *Off-target* Effekte und Mutationen durch lentivirale Transduktionen sind bekannt und wurden bereits beschrieben (133, 134). Auch *Polybrene*, ein kationisches Polymer das zur Verbesserung des lentiviralen Transduktionserfolges genutzt wird, kann unter Umständen zytotoxisch wirken (135, 136). Da durch das Tet-On System die shRNA Expression erst nach dessen Aktivierung erfolgt, kann so die Überlagerung dieser Effekte verhindert werden. Das Tet-On System wird allerdings durch das Antibiotikum Doxycyclin aktiviert, für Tetracycline wurden konzentrationsabhängige *off-target* Effekte auf die Funktion der Mitochondrien beschrieben (137, 138).

Auch die Verwendung von shRNA selbst kann zu unerwünschten Wirkungen wie der Übersättigung des miRNA Reaktionsweges führen (73, 74), während wiederum siRNA, eine alternative Möglichkeit zur RNA Interferenz, oft zur Aktivierung des Interferon Signalwegs führt (139). Deshalb wurde auf ein System gesetzt, welches die shRNA Zielsequenz in einem bestehenden, optimierten endogenen *backbone* einbettet und diese Probleme somit umgehen soll (74, 75). Um dennoch mögliche *off-target* Effekte beispielsweise durch die Verwendung von Doxycyclin aufzudecken, wurde zusätzlich eine shRNA Zielsequenz gegen die nichthumane Renilla Luciferase transduziert, die keinen spezifischen Effekt in den transduzierten BVZ-ALL Zellen haben sollte. Effekte, die in diesen Kontrollzellen auftreten, wären dementsprechend am ehesten auf *off-target* Effekte durch Doxycyclin oder die Expression des gesamten Plasmids zurückzuführen.

Ein weiteres Problem neben den unspezifischen Effekten von Doxycyclin sowie der shRNA-Expression stellt die sogenannte *insertional mutagenesis* durch die Verwendung von Lentiviren dar. Durch die stabile Integration der viralen DNA in das Genom der Zielzellen kann es zu zufälligen Mutationen und Veränderungen kommen. Um diese zufälligen Effekte auszuschließen und zu minimieren, hilft es, heterogene Pools von transduzierten Zellen anstatt einzelner Klone zu untersuchen.

Das Reporterzellmodell HAP1 ER1+ mCh+ wurde mittels PEI Transfektion generiert und anschließend nach stärkster *mCherry* Fluoreszenz selektiert, welche aufgrund der Koexpression mit dem Fusionsgen ebenfalls mit der stärksten *ETV6-RUNX1* Expression einhergeht (siehe Abbildung 6). Da in diesem Modell potenziell auch mehrere Kopien des Plasmids in das Genom integriert wurden und weiterhin *mCherry* sowie *ETV6-RUNX1* durch den potenten Promotor *hEF1 α* kontrolliert werden, liegt die *ETV6-RUNX1* Expression in diesem Modell um ein Vielfaches über der in primär *ETV6-RUNX1* positiven Zellen, wie von Kaulfuß in einem ähnlichen Modell gezeigt werden konnte (46). Dies hat den Vorteil, dass die Effektivität der shRNA Zielsequenzen besser eingeschätzt und voneinander differenziert werden kann. Allerdings entspricht die Expression hier äußerst unphysiologisch hohen Werten.

Die Zielsequenzen der von uns verwendeten shRNA liegen im Bereich der Exons 1-5 im *ETV6* Gen. Dadurch ist die Wirkung des *silencings* nicht spezifisch gegen das Fusionsgen gerichtet. Es wurde sich gegen Zielsequenzen im spezifischen Übergangsbereich von *ETV6-RUNX1* entschieden, wodurch zwar eine hohe Spezifität erreicht werden könnte, allerdings durch atypische Genfusionen oder Spleißvarianten und konsekutiv atypische Übergangsbereiche eine schlechtere Sensitivität in Kauf genommen werden müsste. Aufgrund der Deletionen des *ETV6*-Wildtyp Allels in den verwendeten *ETV6-RUNX1* positiven BVZ-ALL Zelllinien kann dennoch von einem spezifischen *silencing* ausgegangen werden.

Auch der quantitative Nachweis des Fusionsproteins durch immunzytochemische Färbungen basiert auf einem spezifischen Antikörper gegen ETV6. Dieser konnte ebenso aufgrund der Deletionen des *ETV6*-Wildtyp Allels in den in dieser Arbeit verwendeten *ETV6-RUNX1* positiven BVZ-ALL Zelllinien zum spezifischen Nachweis von ETV6-RUNX1 verwendet werden. Über den quantitativen Nachweis des Proteins sollte so der funktionierende *knockdown* nachgewiesen werden. Alternativ hätte der Nachweis auch per ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), Immunoblot oder auf transkriptioneller Ebene per qPCR stattfinden können. Diese Nachweismethoden stellen jedoch breitere Ansätze dar und lassen keinen Rückschluss auf einzelne Zellen zu, wie es die Durchflusszytometrie sowie Mikroskopie ermöglichen. Eine Kombination von immunzytochemischen Färbungen sowie qPCRs ließe besser auf die Stabilität und Halbwertszeit des Fusionsproteins schließen, da diese Nachweise auf unterschiedlichen Ebenen der Proteinbiosynthese stattfinden. Ein Vorteil der hier gewählten Methoden ist die gleichzeitig zum Signal des Antikörpers beurteilbare EGFP Expression. So ist es möglich, den *knockdown* nur in den Zellen zu beurteilen, in denen auch die shRNA exprimiert wird. Außerdem lässt sich die Messung, wie in dieser Arbeit durchgeführt, auf bestimmte Zellkompartimente wie den Zellkern beschränken. Hierfür wurden im vorliegenden Fall konventionelle fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen angefertigt und anhand des DAPI Signals das Profil des

Zellkerns identifiziert und markiert. Die Messung fand schließlich innerhalb dieser Markierung statt. Übersetzt man dies jedoch in ein dreidimensionales Bild, wurden die Messungen innerhalb eines Zylinders getätigt, während der Zellkern eher einer Kugel entsprechen würde. Ein Signal, das in der Betrachtungsebene über oder unter dem Zellkern liegt, würde in dieser Weitfeld-Konfiguration mitgemessen werden. Daraus folgt limitierend, dass hier zu einem gewissen Teil auch extranukleäre Signale gemessen wurden.

Nach erfolgreicher Klonierung der Plasmide mit den jeweiligen Zielsequenzen und der Herstellung eines Reporterzellmodells HAP1 ER1+ mCh+ wurden die Plasmide mittels PEI Transfektion in das Reporterzellmodell transfiziert. Dabei konnte die Überlegenheit der shRNA Zielsequenzen shETV6_678, shETV6_768 sowie shETV6_819 (*silencing* Effizienz von 96%, 92% sowie 93%) erkannt werden, die dann ebenso wie die Kontrollzielsequenzen shREN, shMYB und shMYC in die BVZ-ALL Zelllinien REH, UoC-B6 sowie AT-2 transduziert wurden. Bedauerlicherweise überlebten die Zelllinien UoC-B6 sowie die AT-2 Zellen die lentivirale Transduktion auch in mehreren Versuchen nicht. Hierfür können die Gründe auch in den zytotoxischen Eigenschaften von *Polybrene* sowie der lentiviralen Transduktion selbst gesucht werden. Da sich an die Transduktion immer eine Puromycinselektion anschloss, könnte der massive Zelluntergang auch damit zu erklären sein, dass das Plasmid mit dem enthaltenden Puromycinresistenzgen erst gar nicht eingebaut wurde. Um das Plasmid auch noch in UoC-B6 sowie AT-2 einzubringen, sollte in einem systematischen Ansatz versucht werden, die Transduktionsbedingungen weiter zu verbessern. Die Länge von pLT3GEPIR mit 10.272 Basenpaaren ist eher durchschnittlich lang und spricht daher nicht gegen eine erfolgreiche Transduktion (140). Eine Bestimmung des Virustiters und der *multiplicity of infection* für die Zelllinien sowie die Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen von *Polybrene* bzw. der Austausch dessen mit alternativen Reagenzien wie Retronectin könnten jedoch sinnvolle Ansatzpunkte zur Verbesserung darstellen. Sowohl Fuka et al. als auch Mangolini et al. nutzten jedoch eine lentivirale Transduktion zum *silencing* von *ETV6-RUNX1* in REH und AT-2, jeweils mit *Polybrene* Konzentrationen von 5 bzw. 6 µg/ml (54, 55). In dieser Arbeit wurden Endkonzentrationen von 8 µg/ml *Polybrene* verwendet, eine mögliche Verringerung ist also ebenfalls denkbar.

Ein *silencing* von *ETV6-RUNX1* in BVZ-ALL Zelllinien wurde bisher von vier weiteren Arbeitsgruppen durchgeführt und beschrieben. Dabei wurden jeweils unterschiedliche Ansätze genutzt. Diakos et al. wählten eine transiente zweifache Transfektion von siRNA gegen die Übergangsregion von *ETV6-RUNX1* in REH mittels Lipofectamin, den erfolgreichen *knockdown* zeigten sie im Western Blot ohne nähere Quantifizierung (50, 51). Zaliova et al. wählten ebenfalls einen Ansatz mit siRNA, als Transfektionsmethode nutzten sie eine Elektroporation, den

knockdown quantifizierten sie mithilfe eines Western Blots und kamen auf Werte zwischen 68 und 81% in REH (52). Besonders ist hier, dass sie die einzige Gruppe sind, die bisher auch ein *silencing* von *ETV6-RUNX1* in UoC-B6 beschrieben haben, der *knockdown* betrug hier zwischen 75 - 93%. Fuka et al. wählten erstmals einen lentiviralen Ansatz, mit dem sie shRNA gegen den *ETV6-RUNX1* Übergangsbereich in REH und AT-2 transduzierten und einen *knockdown* von etwa 50 bis 80% beschrieben, welcher sowohl per qPCR als auch per Western Blot nachgewiesen wurde (53, 54). Mangolini et al. nutzten schließlich einen Ansatz mit shRNA gegen *ETV6*, welche sie lentiviral per Spinokulation in REH und AT-2 transduzierten und per Western Blot eine *ETV6-RUNX1* Konzentration in REH von 13% gegenüber einer Kontrolle sowie per qPCR eine Transkriptmenge in REH von etwa 40% gegenüber einer Kontrolle zeigten (55). Betrachtet man die Ergebnisse des intranukleären *knockdowns*, zeigt sich in der Literatur somit ein ähnlich starker *knockdown* wie in dieser Arbeit. Während für shETV6_678 sowie shETV6_819 sogar eine geringere Expression des Fusionsproteins gezeigt werden kann, sind die Werte jedoch aufgrund der methodischen Unterschiede nur bedingt vergleichbar. In allen anderen beschriebenen Versuchen wurde zum Nachweis des *knockdowns* ein Western Blot erstellt, dieser böte sich zum besseren Vergleich an.

Eine weitere Möglichkeit der besseren Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen wäre beispielsweise die Klonierung des Plasmids pLT3GEPIR mit der shRNA Zielsequenz gegen den spezifischen Übergangsbereich von *ETV6-RUNX1*, wie sie auch Diakos et al. sowie Fuka et al. verwendeten. Durch den in dieser Arbeit verwendeten miR-E *enhanced backbone* ist allerdings ein noch effektiverer *knockdown* vorstellbar (75).

Alternativ zum *silencing* stellt der genetische *knockout* mittels CRISPR/Cas9 *gene editing* eine weitere vielversprechende Option zur Untersuchung des Fusionsproteins dar. Montano et al. waren 2020 die erste Gruppe, die mit dieser Methode einen *knockout* von *ETV6-RUNX1* zeigten (141). Hier berichteten sie von einer vollständig fehlenden Genexpression, welche mittels qPCR nachgewiesen wurde. Ein Nachweis des Fusionsproteins erfolgte jedoch nicht. Das Ausschalten des Fusionsgens mittels CRISPR/Cas9 stellt somit eine weitere Alternative zum in dieser Arbeit verwendeten *silencing* dar, bringt allerdings den Nachteil der Irreversibilität mit sich, den das Tet-On System umgeht.

Nach dem erfolgreichen *silencing* von *ETV6-RUNX1* in dieser Arbeit konnte nicht nur eine Abnahme des intranukleären und granulären Signals des Fusionsproteins erkannt werden, es wurden auch in vielen Zellen zytoplasmatische Signale für *ETV6-RUNX1* beobachtet, die den Zellkern von außen halbmondförmig umgeben. Eine Erklärung für dieses Phänomen kann mithilfe der aktuellen Literatur nicht geliefert werden. Es kann hypothetisiert werden, dass es sich

möglicherweise um unlösliche Komplexe mit erhöhter Halbwertszeit handelt, gebildet durch die Polymerisierung von ETV6-RUNX1 mit sich selbst oder anderen ETS-Faktoren über die SAM-Domäne (43). Eine weitere Hypothese für das zytoplasmatische ETV6-RUNX1 Signal wäre, dass es während der RNA Interferenz im RISC Komplex nicht zu einem *perfect match* der shRNA mit der mRNA von *ETV6-RUNX1* kommt. Aufgrund des in diesem Fall nicht stattfindenden Abbaus der mRNA könnte es zur beginnenden Synthese der Aminosäureketten bis zum Bindungsbereich des RISC Komplexes kommen. Dieser liegt für die Zielsequenzen shETV6_678, shETV6_768 und shETV6_819 in den Exons 4 bzw. 5 von *ETV6*. Der Bindungsbereich des verwendeten *Rabbit anti ETV6* wiederum liegt vor dem Bindungsbereich der shRNA in Richtung 5'-Ende im Bereich der SAM-Domäne, die sich über die Exons 2 - 4 erstreckt (46). Damit ist denkbar, dass es zu einer teilweisen und beginnenden Translation des Fusionsproteins kommt (142), an dessen Produkt der Antikörper bereits binden kann. Dies bleibt jedoch in Zukunft zu überprüfen, beispielsweise durch Färbungen mit dem Antikörper gegen den spezifischen Übergangsbereich von ETV6-RUNX1, welcher in Richtung 3'-Ende, bzw. N-Terminal hinter dem Bindungsbereich der shRNA bindet.

In den immunzytochemischen Färbungen des Fusionsproteins konnte ein starker Verlust an EGFP Fluoreszenz festgestellt werden. Dies kann durch die im Protokoll vorkommende hypotone Behandlung der Zellen vor der Fixierung durch Formaldehyd zu erklären sein und wurde für niedermolekulare Verbindungen bereits beobachtet (79, 107). Da nicht davon ausgegangen werden kann, dass durch den Verlust von EGFP das Verhältnis der Grün-Fluoreszenzintensität zwischen den unterschiedlichen untersuchten Proben gewahrt wird, stellte dies ein Problem bei der quantitativen Bestimmung des intranukleären *knockdowns* dar. Die unterschiedlichen EGFP Fluoreszenzintensitäten führten somit zu unterschiedlich starken Kompensationen des *spillovers* zwischen den Proben. Für eine noch bessere Vergleichbarkeit sollte demnach das Protokoll verbessert werden hin zu einem Erhalt der nativen EGFP Fluoreszenz, beispielsweise durch Verzicht der hypotonen Behandlung.

Zusammenfassend konnte in diesem Abschnitt der Arbeit erstmalig ein Modell zum induzierbaren *ETV6-RUNX1 silencing* etabliert werden, welches anschließend in REH Zellen erfolgreich transduziert werden konnte. Die Transduktion in die weiteren *ETV6-RUNX1 positiven* Zelllinien UoC-B6 und AT-2 gelang bedauerlicherweise nicht. Es konnte schließlich den Nachweis des effektiven und stabilen *knockdowns* von ETV6-RUNX1 in REH auf Proteinebene erbracht werden.

4.5 Zellwachstum und Zellmorphologie nach ETV6-RUNX1 knockdown

Zur Analyse des Wachstums wurden die Zellen zunächst systematisch sowohl mit als auch ohne aktiviertes *silencing* über mehrere Wochen in der Zellkultur unter gleichen Bedingungen inkubiert

und regelmäßig durchflusszytometrisch in Bezug auf EGFP-Fluoreszenz sowie Zellzahl untersucht. Zusätzlich wurden DAPI/Annexin V-Färbungen durchgeführt, um die Apoptoseraten zu bestimmen. Mögliche Änderungen der Zelldifferenzierung wurden mittels Oberflächenfärbungen durch direkt konjugierte monoklonale Antikörper gegen bekannte Differenzierungsmarker bestimmt.

Die verwendete Zählmethode per Durchflusszytometer bringt den Vorteil einer hohen statistischen Robustheit mit sich. Zusätzlich lässt sich der Anteil der EGFP positiven Zellen in den Proben bestimmen, wodurch ein kompetitiver Proliferationsassay erstellt werden konnte. Mit diesem können auch subtile Änderungen der Wachstumsgeschwindigkeit sensitiv und intern kontrolliert erfasst werden (143). Des Weiteren können mithilfe der Durchflusszytometrie auch Rückschlüsse auf Zelldebris sowie Zellgröße und -granularität gezogen werden, welche Hinweise auf eine eventuell stattfindende Apoptose liefern können (144). Alternative Methoden, die hier nicht verwendet wurden, sind beispielsweise die einfache Zellzählung mittels Neubauer-Zählkammer und Trypanblau-Färbung, welche im Vergleich zur durchflusszytometrischen Messung statistisch weitaus weniger robust ist und keine Hinweise auf die Expression der Fluoreszenzproteine zulässt. Ein Viabilitätsassay mit z.B. dem schon zuvor verwendeten XTT lässt eine Aussage über die metabolische Aktivität der Zelle sowie einen Rückschluss auf das Wachstumsverhalten zu. Aufgrund der fehlenden Möglichkeit, bei solchen breiten Analysen zwischen EGFP-positiven und -negativen Zellen zu unterscheiden, sowie der Einflüsse von Doxycyclin auf die Mitochondrien, ist dieser Ansatz jedoch nicht zu bevorzugen und wurde hier nicht verwendet (137, 138).

Das verwendete Protokoll zur Färbung des intrazellulären Fusionsproteins, welches in Kapitel 2.2.6 beschrieben wird, lässt durch die sättigende Färbung der DNA mittels DAPI eine Darstellung des Zellzyklus zu. Die Verwendung von DAPI gegenüber Propidiumiodid hat den Vorteil, dass spezifisch nur die DNA angefärbt wird, und keine Ribonuklease zur Entfernung der RNA verwendet werden muss, zusätzlich kommt es durch DAPI mit den im Rahmen der in dieser Arbeit gewählten Fluorochromen zu weniger Überlappungen des Farbspektrums. Durch die quantitative Darstellung der DAPI Fluoreszenz kann ein Rückschluss auf die Anzahl der Chromatiden der Zelle erfolgen und demnach eine Differenzierung in Sub-G0, G0/G1-Phase, S-Phase sowie G2/M-Phase erfolgen. Über den Vergleich der prozentuellen Verteilung des Zellzyklus innerhalb einer Population können Rückschlüsse auf die Teilungsgeschwindigkeiten der Zellen gezogen werden. Allerdings wurden in dieser Arbeit keine ausreichenden Kontrollen des Zellzyklus erstellt, eine valide Aussage ist so kaum möglich. Um bessere Aussagen über den Zellzyklus zu treffen sollten mehrere parallele Messungen des Zellzyklus in Reihe zu verschiedenen Zeitpunkten des *ETV6-RUNX1* silencings erfolgen.

Für den Nachweis einer stattfindenden Apoptose sowie des Anteils der frühapoptotischen Zellen wurde eine Färbung mittels DAPI/Annexin V gewählt. Hiermit wird Phosphatidylserin in der äußeren Zytoplasmamembran dargestellt, ein Phospholipid der Zellmembran welches physiologisch nach innen gerichtet ist und während des programmierten Zelltods frühzeitig auch in die äußere Schicht der Membran gelangt. Durch die DAPI Färbung konnten die frühapoptotischen Zellen anschließend von den toten Zellen differenziert werden. Aufgrund der verschiedenen Möglichkeiten, wie die Zellen den programmierten Zelltod durchlaufen können sowie der nicht ausreichenden Spezifität von Phosphatidylserin, empfiehlt es sich jedoch weitere Methoden zur genaueren Differenzierung des Zelltodes heranzuziehen (144-146). Die Darstellung aktivierter Caspasen oder das Aufzeigen von DNA Fragmentierung mittels TUNEL Assay seien hier beispielsweise genannt (147).

Überraschenderweise konnte in den Analysen des Zellwachstums selbst nach 38 Tagen shRNA Expression keine klare Veränderung der Wachstumsraten der REH Zellen mit den Zielsequenzen shETV6_678, shETV6_768, shETV6_819 und shREN erkannt werden. Bei genauerer Betrachtung der EGFP positiven Fraktionen mit aktiviertem *silencing* sowie der EGFP negativen Fraktionen ohne *silencing* des Fusionsproteins zeigten sich für die Zielsequenzen shETV6_678 sowie shETV6_819 eine langsamere Wachstumsgeschwindigkeit der Fraktionen mit aktiviertem *silencing*. In einer Analyse im Sinne eines kompetitiven Proliferationsassays ließ sich dieser Effekt besser erkennen, die Fraktion der EGFP positiven Zellen mit *silencing* nahm aufgrund des langsameren Wachstums an Anteil ab. In den Zellen mit der Zielsequenz shETV6_768 ließ sich interessanterweise, ebenso wie in der negativen Kontrolle shREN, keine Veränderung in der Wachstumsgeschwindigkeit erkennen. In den positiven Kontrollzellen mit den Zielsequenzen shMYB sowie shMYC konnte die Abnahme der Wachstumsgeschwindigkeit schon deutlich eher und deutlich stärker ausgeprägt beobachtet werden.

Gleichzeitig kam es unter der Doxycyclin-Behandlung und dem *ETV6-RUNX1 silencing* zu einem verstärkten Anfallen von Zelldebris im Sinne eines kleiner werdenden *forward scatters* sowie größer werdenden *side scatters*, was einen Hinweis auf einen verstärkt stattfindenden Zelltod innerhalb der Population darstellen kann (144). Dies konnte mittels DAPI/Annexin V-Färbung bestätigt werden, es zeigten sich nach Doxycyclin-Behandlung deutlich gesteigerte Anteile frühapoptotischer Zellen sowie toter Zellen im Vergleich zu den Kontrollen ohne Doxycyclin. Interessant ist, dass sich die REH Zellen mit der shRNA Zielsequenz shETV6_678 bezüglich des Zelldebris und der Annexin V-Färbung genau gegensätzlich zu den Zellen shETV6_768 sowie shETV6_819 verhielten. So ließen sich nach Doxycyclin-Behandlung in shETV6_678 sowohl eine geringere Menge an Zelldebris als auch geringere Apoptoseraten beobachten.

In der Literatur zeigen Diakos et al. nur 8 Tage nach *silencing* von *ETV6-RUNX1* in REH Zellen mittels Annexin V-Färbung die gestartete Apoptose in nahezu allen Zellen (51). Mangolini et al. zeigten wiederum für REH Zellen einen Zellzyklusarrest in der G0/G1-Phase 6 Tage nach *silencing* von *ETV6-RUNX1* (55). Gegensätzlich berichteten Fuka et al. davon, dass die transduzierten Zellen mit *ETV6-RUNX1 silencing* auch nach 20 - 30 Tagen noch lebten (53). Auch Zaliova et al. berichteten nach erfolgtem *ETV6-RUNX1 silencing* von einer gleichbleibenden Apoptoserate nach Annexin V-Färbung sowie einer dezent erhöhten Proliferationsrate mit Anstieg der Fraktion der sich in der S-Phase befindlichen Zellen (52). Schließlich konnten Montano et al. im MTT-Proliferationsassay ebenfalls kein verringertes Zellwachstum nach *ETV6-RUNX1 knockout* im Vergleich zu den Kontrollen feststellen (141).

Diese heterogenen Ergebnisse decken den Bedarf an weiteren Analysen des Zellwachstums nach *silencing* von *ETV6-RUNX1* auf. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach *ETV6-RUNX1 silencing* das Zellwachstum geringfügig verringert wird, bei gleichzeitig erhöhten Apoptoseraten, die in der Quantität jedoch nicht denen von Diakos et al. entsprechen. Zusätzlich geben die widersprüchlichen Daten von REH LT3GEPiR shETV6_678 Rätsel auf. Wichtig wäre deshalb, den Nachweis von Phosphatidylserin in der äußeren Zellmembran über die Annexin V-Färbung sequenziell auch zu früheren Zeitpunkten des *silencings* von *ETV6-RUNX1* zu erbringen. Eine zu einem früheren Moment des *silencings* veränderte Apoptoserate ist vorstellbar und gilt es dementsprechend nachzuweisen bzw. auszuschließen. Im kompetitiven Proliferationsassay zeigte sich der Abfall der EGFP positiven Zellen erstmals im Zeitraum von 16 - 23 Tagen des *silencings*. Die gezeigten Annexin V-Färbungen fanden nach 31 Tagen statt. Demnach wären weitere Messungen nach weniger als 16 Tagen, sowie im Zeitraum von 16 - 23 Tagen als sinnvoll zu erachten.

Für die REH Zellen mit der shRNA Zielsequenz shETV6_819 konnte nach shRNA Expression außerdem beobachtet werden, dass die Granularität der Zellen im Sinne eines kleiner werdenden *side scatter* Signals im Durchflusszytometer abnahm. Die Ursache hierfür ist nicht bekannt. Man kann jedoch spekulieren, dass der Grund in einer veränderten Organisation des Zellkerns zu suchen ist (148). Die Hauptwirkung des Fusionsproteins *ETV6-RUNX1* besteht in einer stabilen epigenetischen Repression mittels Deacetylierung der Histone. Durch den *knockdown* von *ETV6-RUNX1* und den dadurch verringerten Deacetylierungen könnte es dazu kommen, dass es zu einer verringerten Kondensation des Chromatins kommt. Gibson et al. zeigten 2019, dass es durch vermehrte Acetylierungen von Histonen und konsekutiver verringerten Kondensation von Chromatin zu einer Verminderung der *liquid-liquid phase separation* und der intranukleären Kompartimentierung kommt (149). Der Mechanismus der intranukleären *liquid-liquid phase separation* könnte demnach einen Erklärungsansatz für den Rückgang an Granularität nach

ETV6-RUNX1 *knockdown* in REH LT3GEPiR shETV6_819 Zellen darstellen. Hierbei bleibt allerdings unklar, wieso die Zellen mit den anderen Zielsequenzen gegen *ETV6* diese morphologische Veränderung nicht zeigen.

Im nächsten Schritt folgte die Untersuchung ausgewählter Oberflächenproteine der Zellen, um eine Aussage über ihren Differenzierungsstatus zu machen. Hierbei ließen sich für die Proteine CD19, CD21, CD38 sowie CD40 keine signifikanten Veränderungen nach *ETV6-RUNX1 silencing* darstellen. Allerdings konnte eine Hochregulation von CD72 um das 2- 3-fache beobachtet werden. CD72 gilt als negativer Regulator der B-Zell Entwicklung und wird typischerweise in allen Entwicklungsstadien ab dem Pro-B Stadium exprimiert und erst in entdifferenzierten Plasmazellen herunterreguliert (150, 151). Kaulfuß konnte in ihren Arbeiten zeigen, dass ETV6-RUNX1 im Promotorbereich von CD72 binden kann, was eine epigenetische Repression des Gens durch das Fusionsprotein ermöglicht (46). Die verstärkte Expression des Proteins nach *ETV6-RUNX1 knockdown* scheint dies zu bestätigen. Montano et al. konnten 2020 in ihrem *ETV6-RUNX1 knockout* Modell ebenfalls eine Hochregulation von CD72 auf RNA Ebene zeigen (141).

Es konnte zusammenfassend gezeigt werden, dass ein *silencing* von *ETV6-RUNX1* zu einer, wenn auch marginal, verringerten Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen führt. Gleichzeitig ergaben sich Hinweise für eine erhöhte Apoptoserate der Zellen mit *ETV6-RUNX1 knockdown*. Insgesamt präsentierten sich die Ergebnisse zwischen den verschiedenen Zielsequenzen des *silencings* von *ETV6-RUNX1* zum Teil heterogen.

4.6 JAK-STAT Signalweg nach ETV6-RUNX1 *knockdown*

Die im vorherigen Teil der Arbeit dargestellten Analysen des JAK-STAT Signalwegs sollten auch nach dem erfolgreichen *knockdown* von *ETV6-RUNX1* fortgeführt werden. Hierfür wurden die schon zuvor durchgeführten Färbungen der Oberflächenproteine für den IL-7 Rezeptor (IL-7R α und IL-2R γ) sowie den EPO Rezeptor wiederholt. Auf die Wiederholung der XTT-Viabilitätsassays nach erfolgtem *ETV6-RUNX1 knockdown* wurde aufgrund der bereits in Kapitel 4.3 diskutierten Einflüsse von Doxycyclin auf die Mitochondrien und der dadurch nicht auszuschließenden verfälschten Ergebnisse verzichtet (137, 138). Durch einen Vergleich mit der Kontrolle shREN könnte jedoch dennoch ein Informationsgewinn aus einem XTT-Viabilitätsassay resultieren, weshalb eine Durchführung in Zukunft in Erwägung gezogen werden sollte. Da die Kontrolle REH LT3GEPiR shREN ebenso den Einflüssen der Doxycyclin-Behandlung unterliegt, gleichzeitig jedoch kein *silencing* eines Gens erfährt, könnte sie hier als Referenz bzw. Nullpunkt der Messung dienen. Auch eine Analyse der Genexpressionsdaten nach dem *silencing* von *ETV6-RUNX1* ist denkbar, hier böte sich eine erneute Analyse mithilfe der Affymetrix Human

Genome U133 Plus 2.0 Plattform an. Allerdings wurde dies bereits von Fuka et al. mit REH und AT-2 Zellen durchgeführt und eine systematische Analyse aller veränderter Genexpressionsdaten erstellt, die allerdings nicht auf einem induzierbaren *knockdown* basiert (53). Sollte eine solche Analyse mithilfe des hier verwendeten REH LT3GEPIR Modells durchgeführt werden, wäre der optimale Zeitpunkt der Analyse entscheidend um die Gene zu identifizieren, die primär von ETV6-RUNX1 beeinflusst werden. Hierfür sollte zunächst ermittelt werden, ab welchem Zeitpunkt der *knockdown* des Fusionsproteins ausreichend stark wäre. Führt man die *microarray* Analysen zu spät durch, würden sich auch sekundäre Effekte des *silencings* zeigen und eine Zuordnung zur direkten Wirkung des Fusionsproteins wäre erschwert. Äquivalent zu den *microarray* Analysen böte sich auch die Durchführung einer RNA-Sequenzierung an. Eine weitere interessante Untersuchung wäre der quantitative Nachweis von Transkripten der Gene im JAK-STAT Signalweg mittels qPCR mit und ohne erfolgtem *silencing*, um den JAK-STAT Signalweg in ETV6-RUNX1 positiver ALL weiter systematisch zu analysieren.

Für die Expression der IL-7R α Untereinheit des IL-7 Rezeptors nach *ETV6-RUNX1 silencing* zeigte sich eine deutliche Herunterregulation, in den REH Zellen mit der Zielsequenz shETV6_819 sogar um das 3- bis 5-fache. Die Bedeutung des IL-7 Rezeptors wurde bereits in Kapitel 4.3 ausführlich diskutiert. Die Gründe für die Herunterregulation des IL-7 Rezeptors könnten einerseits in einer verminderten Genexpression oder in einem verstärkten Abbau des Rezeptors zu finden sein. Dies sollte, ähnlich wie für die nativen *ETV6-RUNX1* positiven BVZ-ALL Zelllinien vorgeschlagen, untersucht werden. So sollten beispielsweise sowohl die Protein als auch mRNA Expression untersucht werden, jeweils in Zellen mit verschiedenen Kombinationen aus IL-7 Stimulation, neutralisierender Rezeptor-Antikörper sowie *ETV6-RUNX1 silencing*. Danach ließe sich in Verbindung mit weiteren Wachstumsanalysen auch eine bessere Aussage über die antiapoptischen oder wachstumsstimulierenden Eigenschaften einer IL-7 Stimulation in *ETV6-RUNX1* positiven BVZ-ALL Zelllinien treffen sowie die Frage klären, ob diese Eigenschaften durch ein *silencing* von *ETV6-RUNX1* aufgehoben werden.

Der wachstumsstimulierende Effekt von IL-7 auf die in dieser Arbeit verwendeten *ETV6-RUNX1* positiven BVZ-ALL Zelllinien in Kombination mit der Herunterregulation der IL-7R α Untereinheit nach *ETV6-RUNX1 silencing* lassen eine größere Rolle des IL-7 Rezeptors in der Leukämogenese von *ETV6-RUNX1* positiver ALL vermuten. Zusammen mit den Ergebnissen von González-García et al., die den IL-7 Rezeptor als essenziell in der Leukämieinitiierung im Xenograft-Modell identifizierten, rückt der IL-7 Rezeptor als generelles interessantes Therapieziel in den Fokus (118). Seine Implikationen in Zusammenhang mit der *ETV6-RUNX1* positiven ALL sollten künftig näher erforscht werden.

Die Expression des EPO Rezeptors sowie der IL-2R γ Untereinheit zeigte sich nach dem *ETV6-RUNX1 silencing* nicht signifikant verändert, diese Beobachtung muss jedoch durch erneute Färbungen sowie die bereits angesprochene qPCR validiert werden. Ergänzend zu den bereits genannten Untersuchungen des IL-7 Rezeptors bietet sich an, die intrazelluläre Aktivierung bzw. Phosphorylierung von JAK1 sowie JAK3 darzustellen, welche die intrazellulären Bindungspartner der jeweiligen Untereinheiten IL-7R α sowie IL-2R γ sind (152). Hierbei würde sich zeigen, ob es durch die Herunterregulation von IL-7R α überhaupt zu einer verminderten Aktivierung des JAK-STAT Signalwegs käme.

In diesem Abschnitt konnte demnach gezeigt werden, ergänzend zu den vorherigen JAK-STAT Analysen, die eine starke Expression des entsprechenden Gens identifizierten, dass nach erfolgtem *ETV6-RUNX1 knockdown* die IL-7 Rezeptorkette α herunterreguliert wird.

4.7 Schlussfolgerungen

Die *ETV6-RUNX1* positive ALL ist bis heute in ihrer komplexen molekularen Dysregulation unverstanden. Trotz im Allgemeinen guter Heilungschancen von Kindern mit *ETV6-RUNX1* positiver ALL sind Rezidive sowie die Nebenwirkungen und Spätfolgen konventioneller Chemotherapie ungelöste Probleme. Bislang gibt es nur wenige zielgerichtete Therapieansätze bei Neoplasien im Kindesalter, insbesondere keine, die sich an den molekularen Auswirkungen der Genfusion *ETV6-RUNX1* orientieren.

In dieser Arbeit konnten nun neue Hinweise für die Bedeutung des JAK-STAT Signalwegs in *ETV6-RUNX1* positiver ALL geliefert werden, welcher für Proliferation, Überleben, Differenzierung sowie Immunreaktion der Zellen von essenzieller Bedeutung ist. Hierbei erscheint insbesondere der IL-7 Rezeptor als interessant, da er sowohl in den untersuchten *ETV6-RUNX1* positiven BVZ-ALL Zelllinien stark exprimiert wird als auch nach erfolgtem *knockdown* des Fusionsproteins deutlich herunterreguliert wird. Inwiefern der Rezeptor an der Leukämogenese der *ETV6-RUNX1* positiven ALL involviert ist, und ob er sogar therapeutisch beeinflussbar ist, gilt es nun weiter zu ergründen.

Es ist außerdem gelungen, erstmalig ein Modell mit einem induzierbaren *silencing* des Fusionsgens im REH Zellmodell zu etablieren und den effizienten *knockdown* des nukleären Fusionsproteins nachzuweisen. Dieses Modell wird es in Zukunft ermöglichen, die Mechanismen der *ETV6-RUNX1* Genfusion besser untersuchen und verstehen zu können. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst die Wachstumsgeschwindigkeit nach erfolgtem *knockdown* des Fusionsproteins in REH Zellen analysiert, hier konnte eine relativ spät einsetzende und langsame

Reduktion der Wachstumsgeschwindigkeit, verbunden mit einer erhöhten Apoptoserate, nachgewiesen werden.

Da die etablierten Zelllinien *ETV6-RUNX1* positiver BVZ-ALL (REH, UoC-B6 sowie AT-2) alle aus einem späten Krankheitsstadium abgeleitet worden sind und zusätzlich noch zahlreiche *in vitro* erworbene Veränderungen aufweisen müssen, bleibt zu überprüfen, ob sich die beobachteten Änderungen auch auf primäre Erkrankungen der *ETV6-RUNX1* positiven ALL übertragen lassen.

Ob das Ausschalten des Fusionsproteins, eventuell in Kombination mit weiteren möglicherweise synergistisch wirkenden Therapeutika, einen vielversprechenden Therapieansatz darstellt, oder ob man sich besser auf die von *ETV6-RUNX1* dysregulierten Zielgene konzentriert, gilt es nun in Zukunft ebenfalls zu erforschen.

5. LITERATURVERZEICHNIS

1. Kaatsch P, Grabow D, Spix C. German Childhood Cancer Registry - Annual Report 2018 (1980-2017). Institute of Medical Biostatistics, Epidemiology and Informatics (IMBEI) at the University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz, 2019.
2. Creutzig U, Henze G, Bielack S, Herold R, Kaatsch P, Klussmann J, Graf N, Reinhardt D, Schrappe M, Zimmermann M, Jürgens H. Krebserkrankungen bei Kindern - Erfolg durch einheitliche Therapiekonzepte seit 25 Jahren. *Dtsch Arztebl* 2003; 100: A 842-852 [Heft 13].
3. O'Leary M, Krailo M, Anderson JR, Reaman GH. Progress in Childhood Cancer: 50 Years of Research Collaboration, a Report From the Children's Oncology Group. *Semin Oncol*. 2008;35(5):484-93.
4. Robison LL, Hudson MM. Survivors of childhood and adolescent cancer: life-long risks and responsibilities. *Nat Rev Cancer*. 2014;14(1):61-70.
5. Choi DK, Helenowski I, Hijjiya N. Secondary malignancies in pediatric cancer survivors: perspectives and review of the literature. *Int J Cancer*. 2014;135(8):1764-73.
6. Landier W, Skinner R, Wallace WH, Hjorth L, Mulder RL, Wong FL, Yasui Y, Bhakta N, Constine LS, Bhatia S, Kremer LC, Hudson MM. Surveillance for Late Effects in Childhood Cancer Survivors. *J Clin Oncol*. 2018;36(21):2216-22.
7. Essig S, Li QZ, Chen Y, Hitzler J, Leisenring W, Greenberg M, Sklar C, Hudson MM, Armstrong GT, Krull KR, Neglia JP, Oeffinger KC, Robison LL, Kuehni CE, Yasui Y, Nathan PC. Risk of late effects of treatment in children newly diagnosed with standard-risk acute lymphoblastic leukaemia: a report from the Childhood Cancer Survivor Study cohort. *Lancet Oncol*. 2014;15(8):841-51.
8. Greaves M. A causal mechanism for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2018;18(8):471-84.
9. Ford AM, Bennett CA, Price CM, Bruin MC, Van Wering ER, Greaves M. Fetal origins of the TEL-AML1 fusion gene in identical twins with leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(8):4584-8.
10. Wiemels JL, Cazzaniga G, Daniotti M, Eden OB, Addison GM, Masera G, Saha V, Biondi A, Greaves MF. Prenatal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children. *Lancet*. 1999;354(9189):1499-503.
11. Hein D, Borkhardt A, Fischer U. Insights into the prenatal origin of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Metastasis Rev* 2020.
12. Rodriguez-Hernandez G, Hauer J, Martin-Lorenzo A, Schafer D, Bartenhagen C, Garcia-Ramirez I, Auer F, Gonzalez-Herrero I, Ruiz-Roca L, Gombert M, Okpanyi V, Fischer U, Chen C, Dugas M, Bhatia S, Linka RM, Garcia-Suquia M, Rascon-Trincado MV, Garcia-Sanchez A, Blanco O, Garcia-Cenador MB, Garcia-Criado FJ, Cobaleda C, Alonso-Lopez D, De Las Rivas J, Muschen M, Vicente-Duenas C, Sanchez-Garcia I, Borkhardt A. Infection Exposure Promotes ETV6-RUNX1 Precursor B-cell Leukemia via Impaired H3K4 Demethylases. *Cancer Research*. 2017;77(16):4365-77.
13. Martin-Lorenzo A, Hauer J, Vicente-Duenas C, Auer F, Gonzalez-Herrero I, Garcia-Ramirez I, Ginzler S, Thiele R, Constantinescu SN, Bartenhagen C, Dugas M, Gombert M, Schafer D, Blanco O, Mayado A, Orfao A, Alonso-Lopez D, De Las Rivas J, Cobaleda C, Garcia-Cenador MB, Garcia-Criado FJ, Sanchez-Garcia I, Borkhardt A. Infection Exposure Is a Causal Factor in B-cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia as a Result of Pax5-Inherited Susceptibility. *Cancer Discov*. 2015;5(12):1328-43.
14. Mullighan CG, Goorha S, Radtke I, Miller CB, Coustan-Smith E, Dalton JD, Girtman K, Mathew S, Ma J, Pounds SB, Su X, Pui CH, Relling MV, Evans WE, Shurtleff SA, Downing JR. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*. 2007;446(7137):758-64.
15. Knudson AG, Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1971;68(4):820-3.
16. Vicente-Duenas C, Janssen S, Oldenburg M, Auer F, Gonzalez-Herrero I, Casado-Garcia A, Isidro-Hernandez M, Raboso-Gallego J, Westhoff P, Pandya AA, Hein D, Gossling KL,

- Alonso-Lopez D, De Las Rivas J, Bhatia S, Garcia-Criado FJ, Garcia-Cenador MB, Weber APM, Kohrer K, Hauer J, Fischer U, Sanchez-Garcia I, Borkhardt A. An intact gut microbiome protects genetically predisposed mice against leukemia. *Blood*. 2020;136(18):2003-17.
17. Golub TR, Barker GF, Bohlander SK, Hiebert SW, Ward DC, Bray-Ward P, Morgan E, Raimondi SC, Rowley JD, Gilliland DG. Fusion of the TEL gene on 12p13 to the AML1 gene on 21q22 in acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(11):4917-21.
 18. Pui CH, Carroll WL, Meshinchi S, Arceci RJ. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. *J Clin Oncol*. 2011;29(5):551-65.
 19. Wiemels JL, Greaves M. Structure and possible mechanisms of TEL-AML1 gene fusions in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res*. 1999;59(16):4075-82.
 20. Zelent A, Greaves M, Enver T. Role of the TEL-AML1 fusion gene in the molecular pathogenesis of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Oncogene*. 2004;23(24):4275-83.
 21. Bateman CM, Colman SM, Chaplin T, Young BD, Eden TO, Bhakta M, Gratias EJ, van Wering ER, Cazzaniga G, Harrison CJ, Hain R, Ancliff P, Ford AM, Kearney L, Greaves M. Acquisition of genome-wide copy number alterations in monozygotic twins with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2010;115(17):3553-8.
 22. Greaves MF, Maia AT, Wiemels JL, Ford AM. Leukemia in twins: lessons in natural history. *Blood*. 2003;102(7):2321-33.
 23. Mori H, Colman SM, Xiao Z, Ford AM, Healy LE, Donaldson C, Hows JM, Navarrete C, Greaves M. Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(12):8242-7.
 24. Skovvaga M, Nikitina E, Kubes M, Kosik P, Gajdosechova B, Leitnerova M, Copakova L, Belyaev I. Incidence of Common Preleukemic Gene Fusions in Umbilical Cord Blood in Slovak Population. *Plos One*. 2014;9(3).
 25. Olsen M, Hjalgrim H, Melbye M, Madsen HO, Schmiegelow K. RT-PCR Screening for ETV6-RUNX1-positive Clones in Cord Blood From Newborns in the Danish National Birth Cohort. *J Pediat Hematol Onc*. 2012;34(4):301-3.
 26. Lausten-Thomsen U, Hjalgrim H, Marquart H, Lutterodt M, Petersen BL, Schmiegelow K. ETV6-RUNX1 transcript is not frequent in early human haematopoiesis. *Eur J Haematol*. 2008;81(2):161-2.
 27. Schafer D, Olsen M, Lahnemann D, Stanulla M, Slany R, Schmiegelow K, Borkhardt A, Fischer U. Five percent of healthy newborns have an ETV6-RUNX1 fusion as revealed by DNA-based GIPFEL screening. *Blood*. 2018;131(7):821-6.
 28. Golub TR, Barker GF, Lovett M, Gilliland DG. Fusion of PDGF receptor beta to a novel ets-like gene, tel, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12) chromosomal translocation. *Cell*. 1994;77(2):307-16.
 29. Lopez R, Carron C, Oury C, Gardellin P, Bernard O, Ghysdael J. TEL is a sequence-specific transcriptional repressor. *J Biol Chem*. 1999;274(42):30132-8.
 30. Wang L, Hiebert SW. TEL contacts multiple co-repressors and specifically associates with histone deacetylase-3. *Oncogene*. 2001;20(28):3716-25.
 31. Gunji H, Waga K, Nakamura F, Maki K, Sasaki K, Nakamura Y, Mitani K. TEL/AML1 shows dominant-negative effects over TEL as well as AML1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;322(2):623-30.
 32. Fenrick R, Amann JM, Lutterbach B, Wang L, Westendorf JJ, Downing JR, Hiebert SW. Both TEL and AML-1 contribute repression domains to the t(12;21) fusion protein. *Mol Cell Biol*. 1999;19(10):6566-74.
 33. Jousset C, Carron C, Boureux A, Quang CT, Oury C, Dusanter-Fourt I, Charon M, Levin J, Bernard O, Ghysdael J. A domain of TEL conserved in a subset of ETS proteins defines a specific oligomerization interface essential to the mitogenic properties of the TEL-PDGFR beta oncoprotein. *EMBO J*. 1997;16(1):69-82.
 34. Yamagata T, Maki K, Mitani K. Runx1/AML1 in normal and abnormal hematopoiesis. *Int J Hematol*. 2005;82(1):1-8.

35. Kitabayashi I, Yokoyama A, Shimizu K, Ohki M. Interaction and functional cooperation of the leukemia-associated factors AML1 and p300 in myeloid cell differentiation. *EMBO J.* 1998;17(11):2994-3004.
36. Lutterbach B, Westendorf JJ, Linggi B, Isaac S, Seto E, Hiebert SW. A mechanism of repression by acute myeloid leukemia-1, the target of multiple chromosomal translocations in acute leukemia. *J Biol Chem.* 2000;275(1):651-6.
37. Bonifer C, Levantini E, Kouskoff V, Lacaud G. Runx1 Structure and Function in Blood Cell Development. *Adv Exp Med Biol.* 2017;962:65-81.
38. Zhao X, Jankovic V, Gural A, Huang G, Pardani A, Menendez S, Zhang J, Dunne R, Xiao A, Erdjument-Bromage H, Allis CD, Tempst P, Nimer SD. Methylation of RUNX1 by PRMT1 abrogates SIN3A binding and potentiates its transcriptional activity. *Genes Dev.* 2008;22(5):640-53.
39. Tanaka T, Kurokawa M, Ueki K, Tanaka K, Imai Y, Mitani K, Okazaki K, Sagata N, Yazaki Y, Shibata Y, Kadowaki T, Hirai H. The extracellular signal-regulated kinase pathway phosphorylates AML1, an acute myeloid leukemia gene product, and potentially regulates its transactivation ability. *Mol Cell Biol.* 1996;16(7):3967-79.
40. Hiebert SW, Sun W, Davis JN, Golub T, Shurtleff S, Buijs A, Downing JR, Grosveld G, Russell MF, Gilliland DG, Lenny N, Meyers S. The t(12;21) translocation converts AML-1B from an activator to a repressor of transcription. *Mol Cell Biol.* 1996;16(4):1349-55.
41. Fears S, Gavin M, Zhang DE, Hetherington C, Ben-David Y, Rowley JD, Nucifora G. Functional characterization of ETV6 and ETV6/CBFA2 in the regulation of the MCSFR proximal promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(5):1949-54.
42. McLean TW, Ringold S, Neuberg D, Stegmaier K, Tantravahi R, Ritz J, Koeffler HP, Takeuchi S, Janssen JW, Seriu T, Bartram CR, Sallan SE, Gilliland DG, Golub TR. TEL/AML-1 dimerizes and is associated with a favorable outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 1996;88(11):4252-8.
43. Kim CA, Phillips ML, Kim W, Gingery M, Tran HH, Robinson MA, Faham S, Bowie JU. Polymerization of the SAM domain of TEL in leukemogenesis and transcriptional repression. *EMBO J.* 2001;20(15):4173-82.
44. Kim DH, Moldwin RL, Vignon C, Bohlander SK, Suto Y, Giordano L, Gupta R, Fears S, Nucifora G, Rowley JD. TEL-AML1 translocations with TEL and CDKN2 inactivation in acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Blood.* 1996;88(3):785-94.
45. Linka Y, Ginzel S, Kruger M, Novosel A, Gombert M, Kremmer E, Harbott J, Thiele R, Borkhardt A, Landgraf P. The impact of TEL-AML1 (ETV6-RUNX1) expression in precursor B cells and implications for leukaemia using three different genome-wide screening methods. *Blood Cancer J.* 2013;3:e151.
46. Kaulfuß K. Identifizierung von Zielgenen des chimären Transkriptionsfaktors ETV6/RUNX1. *Charité - Universitätsmedizin Berlin.* 2016.
47. Fine BM, Stanulla M, Schrappe M, Ho M, Viehmann S, Harbott J, Boxer LM. Gene expression patterns associated with recurrent chromosomal translocations in acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2004;103(3):1043-9.
48. Inthal A, Krapf G, Beck D, Joas R, Kauer MO, Orel L, Fuka G, Mann G, Panzer-Grumayer ER. Role of the erythropoietin receptor in ETV6/RUNX1-positive acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res.* 2008;14(22):7196-204.
49. Torrano V, Procter J, Cardus P, Greaves M, Ford AM. ETV6-RUNX1 promotes survival of early B lineage progenitor cells via a dysregulated erythropoietin receptor. *Blood.* 2011;118(18):4910-8.
50. Diakos C, Zhong S, Xiao Y, Zhou M, Vasconcelos GM, Krapf G, Yeh RF, Zheng S, Kang M, Wiencke JK, Pombo-de-Oliveira MS, Panzer-Grumayer R, Wiemels JL. TEL-AML1 regulation of survivin and apoptosis via miRNA-494 and miRNA-320a. *Blood.* 2010;116(23):4885-93.
51. Diakos C, Krapf G, Gerner C, Inthal A, Lemberger C, Ban J, Dohnal AM, Panzer-Grumayer ER. RNAi-mediated silencing of TEL/AML1 reveals a heat-shock protein- and survivin-dependent mechanism for survival. *Blood.* 2007;109(6):2607-10.

52. Zaliova M, Madzo J, Cario G, Trka J. Revealing the role of TEL/AML1 for leukemic cell survival by RNAi-mediated silencing. *Leukemia*. 2011;25(2):313-20.
53. Fuka G, Kauer M, Kofler R, Haas OA, Panzer-Grumayer R. The leukemia-specific fusion gene ETV6/RUNX1 perturbs distinct key biological functions primarily by gene repression. *Plos One*. 2011;6(10):e26348.
54. Fuka G, Kantner HP, Grausenburger R, Inthal A, Bauer E, Krapf G, Kaindl U, Kauer M, Dworzak MN, Stoiber D, Haas OA, Panzer-Grumayer R. Silencing of ETV6/RUNX1 abrogates PI3K/AKT/mTOR signaling and impairs reconstitution of leukemia in xenografts. *Leukemia*. 2012;26(5):927-33.
55. Mangolini M, de Boer J, Walf-Vorderwulbecke V, Pieters R, den Boer ML, Williams O. STAT3 mediates oncogenic addiction to TEL-AML1 in t(12;21) acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2013;122(4):542-9.
56. Kaindl U, Morak M, Portsmouth C, Mecklenbrauker A, Kauer M, Zeginigg M, Attarbaschi A, Haas OA, Panzer-Grumayer R. Blocking ETV6/RUNX1-induced MDM2 overexpression by Nutlin-3 reactivates p53 signaling in childhood leukemia. *Leukemia*. 2014;28(3):600-8.
57. Vainchenker W, Constantinescu SN. JAK/STAT signaling in hematological malignancies. *Oncogene*. 2013;32(21):2601-13.
58. Abroun S, Saki N, Ahmadvand M, Asghari F, Salari F, Rahim F. STATs: An Old Story, Yet Mesmerizing. *Cell J*. 2015;17(3):395-411.
59. Kelso A. The enigma of cytokine redundancy. *Immunol Cell Biol*. 1994;72(1):97-101.
60. Kiu H, Nicholson SE. Biology and significance of the JAK/STAT signalling pathways. *Growth Factors*. 2012;30(2):88-106.
61. Villarino AV, Kanno Y, Ferdinand JR, O'Shea JJ. Mechanisms of Jak/STAT signaling in immunity and disease. *J Immunol*. 2015;194(1):21-7.
62. Huang LJ, Constantinescu SN, Lodish HF. The N-terminal domain of Janus kinase 2 is required for Golgi processing and cell surface expression of erythropoietin receptor. *Mol Cell*. 2001;8(6):1327-38.
63. Radtke S, Hermanns HM, Haan C, Schmitz-Van De Leur H, Gascan H, Heinrich PC, Behrmann I. Novel role of Janus kinase 1 in the regulation of oncostatin M receptor surface expression. *J Biol Chem*. 2002;277(13):11297-305.
64. Bousoik E, Montazeri Aliabadi H. "Do We Know Jack" About JAK? A Closer Look at JAK/STAT Signaling Pathway. *Front Oncol*. 2018;8:287.
65. Groner B, von Manstein V. Jak Stat signaling and cancer: Opportunities, benefits and side effects of targeted inhibition. *Mol Cell Endocrinol*. 2017;451:1-14.
66. Gossen M, Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(12):5547-51.
67. Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Muller G, Hillen W, Bujard H. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science*. 1995;268(5218):1766-9.
68. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998;391(6669):806-11.
69. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116(2):281-97.
70. Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*. 2009;136(4):642-55.
71. Chung KH, Hart CC, Al-Bassam S, Avery A, Taylor J, Patel PD, Vojtek AB, Turner DL. Polycistronic RNA polymerase II expression vectors for RNA interference based on BIC/miR-155. *Nucleic Acids Res*. 2006;34(7):e53.
72. Zeng Y, Wagner EJ, Cullen BR. Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells. *Mol Cell*. 2002;9(6):1327-33.
73. Grimm D, Streetz KL, Jopling CL, Storm TA, Pandey K, Davis CR, Marion P, Salazar F, Kay MA. Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature*. 2006;441(7092):537-41.

74. Boudreau RL, Martins I, Davidson BL. Artificial microRNAs as siRNA shuttles: improved safety as compared to shRNAs in vitro and in vivo. *Mol Ther.* 2009;17(1):169-75.
75. Fellmann C, Hoffmann T, Sridhar V, Hopfgartner B, Muhar M, Roth M, Lai DY, Barbosa IA, Kwon JS, Guan Y, Sinha N, Zuber J. An optimized microRNA backbone for effective single-copy RNAi. *Cell Rep.* 2013;5(6):1704-13.
76. Lobitz S. Posttranskriptionelle Expressionshemmung von ETV6/RUNX1 durch lentivirale Transduktion mit dem Ribozym buRz28. Charité - Universitätsmedizin Berlin. 2012.
77. Fellmann C, Zuber J, McJunkin K, Chang K, Malone CD, Dickins RA, Xu Q, Hengartner MO, Elledge SJ, Hannon GJ, Lowe SW. Functional identification of optimized RNAi triggers using a massively parallel sensor assay. *Mol Cell.* 2011;41(6):733-46.
78. Schelling K. Analysen des JAK-STAT Signalwegs in TEL/AML1 positiven Zellmodellen. Freie Universität Berlin. 2011.
79. Deichmann P. Die intrazelluläre Verteilung von ETV6/RUNX1 bei akuter lymphoblastischer Leukämie in Zelllinien, rekombinanten Zellmodellen und Patienten Blasten. Technische Hochschule Wildau. 2018.
80. Buder P. Kolokalisierung von ETV6/RUNX1 mit anderen Transkriptionsfaktoren und gamma-Tubulin bei akuter lymphoblastischer Leukämie (ALL) - Analysen von Zelllinien, Patienten Blasten und rekombinanten Zellmodellen. Technische Hochschule Wildau. 2017.
81. Cadinanos J, Bradley A. Generation of an inducible and optimized piggyBac transposon system. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(12):e87.
82. Werner J, Gossen M. Modes of TAL effector-mediated repression. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(21):13061-73.
83. DuBridg RB, Tang P, Hsia HC, Leong PM, Miller JH, Calos MP. Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol.* 1987;7(1):379-87.
84. Andersson BS, Beran M, Pathak S, Goodacre A, Barlogie B, McCredie KB. Ph-positive chronic myeloid leukemia with near-haploid conversion in vivo and establishment of a continuously growing cell line with similar cytogenetic pattern. *Cancer Genet Cytogenet.* 1987;24(2):335-43.
85. Carette JE, Raaben M, Wong AC, Herbert AS, Obernosterer G, Mulherkar N, Kuehne AI, Kranzusch PJ, Griffin AM, Ruthel G, Dal Cin P, Dye JM, Whelan SP, Chandran K, Brummelkamp TR. Ebola virus entry requires the cholesterol transporter Niemann-Pick C1. *Nature.* 2011;477(7364):340-3.
86. Greil J, Gramatzki M, Burger R, Marschalek R, Peltner M, Trautmann U, Hansen-Hagge TE, Bartram CR, Fey GH, Stehr K, et al. The acute lymphoblastic leukaemia cell line SEM with t(4;11) chromosomal rearrangement is biphenotypic and responsive to interleukin-7. *Br J Haematol.* 1994;86(2):275-83.
87. Lemoli RM, Fortuna A, Tafuri A, Fogli M, Amabile M, Grande A, Ricciardi MR, Petrucci MT, Bonsi L, Bagnara G, Visani G, Martinelli G, Ferrari S, Tura S. Interleukin-9 stimulates the proliferation of human myeloid leukemic cells. *Blood.* 1996;87(9):3852-9.
88. Chu J, Gui CY, Fan J, Tang XD, Qiao RL. STAT1 is involved in signal transduction in the EPO induced HEL cells. *Cell Res.* 1998;8(2):105-17.
89. Barretina J, Caponigro G, Stransky N, Venkatesan K, Margolin AA, Kim S, Wilson CJ, Lehár J, Kryukov GV, Sonkin D, Reddy A, Liu M, Murray L, Berger MF, Monahan JE, Morais P, Meltzer J, Korejwa A, Jane-Valbuena J, Mapa FA, Thibault J, Bric-Furlong E, Raman P, Shipway A, Engels IH, Cheng J, Yu GK, Yu J, Aspesi P, Jr., de Silva M, Jagtap K, Jones MD, Wang L, Hatton C, Palescandolo E, Gupta S, Mahan S, Sougnez C, Onofrio RC, Liefeld T, MacConaill L, Winckler W, Reich M, Li N, Mesirov JP, Gabriel SB, Getz G, Ardlie K, Chan V, Myer VE, Weber BL, Porter J, Warmuth M, Finan P, Harris JL, Meyerson M, Golub TR, Morrissey MP, Sellers WR, Schlegel R, Garraway LA. The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature.* 2012;483(7391):603-7.

90. Rosenfeld C, Goutner A, Choquet C, Venuat AM, Kayibanda B, Pico JL, Greaves MF. Phenotypic characterisation of a unique non-T, non-B acute lymphoblastic leukaemia cell line. *Nature*. 1977;267(5614):841-3.
91. Fears S, Chakrabarti SR, Nucifora G, Rowley JD. Differential expression of TCL1 during pre-B-cell acute lymphoblastic leukemia progression. *Cancer Genet Cytogenet*. 2002;135(2):110-9.
92. Kostylev M, Otwell AE, Richardson RE, Suzuki Y. Cloning Should Be Simple: Escherichia coli DH5alpha-Mediated Assembly of Multiple DNA Fragments with Short End Homologies. *Plos One*. 2015;10(9):e0137466.
93. Bhatla T, Wang J, Morrison DJ, Raetz EA, Burke MJ, Brown P, Carroll WL. Epigenetic reprogramming reverses the relapse-specific gene expression signature and restores chemosensitivity in childhood B-lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2012;119(22):5201-10.
94. Guenther MG, Lawton LN, Rozovskaia T, Frampton GM, Levine SS, Volkert TL, Croce CM, Nakamura T, Canaani E, Young RA. Aberrant chromatin at genes encoding stem cell regulators in human mixed-lineage leukemia. *Genes Dev*. 2008;22(24):3403-8.
95. Kochert K, Ullrich K, Kreher S, Aster JC, Kitagawa M, Johrens K, Anagnostopoulos I, Jundt F, Lamprecht B, Zimmer-Strobl U, Stein H, Janz M, Dorken B, Mathas S. High-level expression of Mastermind-like 2 contributes to aberrant activation of the NOTCH signaling pathway in human lymphomas. *Oncogene*. 2011;30(15):1831-40.
96. Lamprecht B, Walter K, Kreher S, Kumar R, Hummel M, Lenze D, Kochert K, Bouhlel MA, Richter J, Soler E, Stadhouders R, Johrens K, Wurster KD, Callen DF, Harte MF, Giefing M, Barlow R, Stein H, Anagnostopoulos I, Janz M, Cockerill PN, Siebert R, Dorken B, Bonifer C, Mathas S. Derepression of an endogenous long terminal repeat activates the CSF1R proto-oncogene in human lymphoma. *Nat Med*. 2010;16(5):571-9, 1p following 9.
97. Den Boer ML, van Slegtenhorst M, De Menezes RX, Cheok MH, Buijs-Gladdines JG, Peters ST, Van Zutven LJ, Beverloo HB, Van der Spek PJ, Escherich G, Horstmann MA, Janka-Schaub GE, Kamps WA, Evans WE, Pieters R. A subtype of childhood acute lymphoblastic leukaemia with poor treatment outcome: a genome-wide classification study. *Lancet Oncol*. 2009;10(2):125-34.
98. Haferlach T, Kohlmann A, Wiczorek L, Basso G, Kronnie GT, Bene MC, De Vos J, Hernandez JM, Hofmann WK, Mills KI, Gilkes A, Chiaretti S, Shurtleff SA, Kipps TJ, Rassenti LZ, Yeoh AE, Papenhausen PR, Liu WM, Williams PM, Foa R. Clinical utility of microarray-based gene expression profiling in the diagnosis and subclassification of leukemia: report from the International Microarray Innovations in Leukemia Study Group. *J Clin Oncol*. 2010;28(15):2529-37.
99. Harvey RC, Mullighan CG, Wang X, Dobbin KK, Davidson GS, Bedrick EJ, Chen IM, Atlas SR, Kang H, Ar K, Wilson CS, Wharton W, Murphy M, Devidas M, Carroll AJ, Borowitz MJ, Bowman WP, Downing JR, Relling M, Yang J, Bhojwani D, Carroll WL, Camitta B, Reaman GH, Smith M, Hunger SP, Willman CL. Identification of novel cluster groups in pediatric high-risk B-precursor acute lymphoblastic leukemia with gene expression profiling: correlation with genome-wide DNA copy number alterations, clinical characteristics, and outcome. *Blood*. 2010;116(23):4874-84.
100. Hertzberg L, Vendramini E, Ganmore I, Cazzaniga G, Schmitz M, Chalker J, Shiloh R, Iacobucci I, Shochat C, Zeligson S, Cario G, Stanulla M, Strehl S, Russell LJ, Harrison CJ, Bornhauser B, Yoda A, Rechavi G, Bercovich D, Borkhardt A, Kempinski H, te Kronnie G, Bourquin JP, Domany E, Izraeli S. Down syndrome acute lymphoblastic leukemia, a highly heterogeneous disease in which aberrant expression of CRLF2 is associated with mutated JAK2: a report from the International BFM Study Group. *Blood*. 2010;115(5):1006-17.
101. Hirabayashi S, Ohki K, Nakabayashi K, Ichikawa H, Momozawa Y, Okamura K, Yaguchi A, Terada K, Saito Y, Yoshimi A, Ogata-Kawata H, Sakamoto H, Kato M, Fujimura J, Hino M, Kinoshita A, Kakuda H, Kurosawa H, Kato K, Kajiwara R, Moriwaki K, Morimoto T, Nakamura K, Noguchi Y, Osumi T, Sakashita K, Takita J, Yuza Y, Matsuda K, Yoshida T, Matsumoto K, Hata K, Kubo M, Matsubara Y, Fukushima T, Koh K, Manabe A, Ohara A, Kiyokawa N, Tokyo Children's Cancer Study G. ZNF384-related fusion genes define a

- subgroup of childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with a characteristic immunotype. *Haematologica*. 2017;102(1):118-29.
102. Nordlund J, Backlin CL, Wahlberg P, Busche S, Berglund EC, Eloranta ML, Flaegstad T, Forestier E, Frost BM, Harila-Saari A, Heyman M, Jonsson OG, Larsson R, Palle J, Ronnblom L, Schmiegelow K, Sinnott D, Soderhall S, Pastinen T, Gustafsson MG, Lonnerholm G, Syvanen AC. Genome-wide signatures of differential DNA methylation in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Genome Biol*. 2013;14(9):r105.
 103. Jensen K, Schaffer L, Olstad OK, Bechensteen AG, Hellebostad M, Tjonnfjord GE, Kierulf P, Gautvik KM, Osnes LT. Striking decrease in the total precursor B-cell compartment during early childhood as evidenced by flow cytometry and gene expression changes. *Pediatr Hematol Oncol*. 2010;27(1):31-45.
 104. Thul PJ, Akesson L, Wiking M, Mahdessian D, Geladaki A, Ait Blal H, Alm T, Asplund A, Bjork L, Breckels LM, Backstrom A, Danielsson F, Fagerberg L, Fall J, Gatto L, Gnann C, Hober S, Hjelmare M, Johansson F, Lee S, Lindskog C, Mulder J, Mulvey CM, Nilsson P, Oksvold P, Rockberg J, Schutten R, Schwenk JM, Sivertsson A, Sjostedt E, Skogs M, Stadler C, Sullivan DP, Tegel H, Winsnes C, Zhang C, Zwahlen M, Mardinoglu A, Ponten F, von Feilitzen K, Lilley KS, Uhlen M, Lundberg E. A subcellular map of the human proteome. *Science*. 2017;356(6340).
 105. Nusinow DP, Szpyt J, Ghandi M, Rose CM, McDonald ER, 3rd, Kalocsay M, Jane-Valbuena J, Gelfand E, Schweppe DK, Jedrychowski M, Golji J, Porter DA, Rejtar T, Wang YK, Kryukov GV, Stegmeier F, Erickson BK, Garraway LA, Sellers WR, Gygi SP. Quantitative Proteomics of the Cancer Cell Line Encyclopedia. *Cell*. 2020;180(2):387-402 e16.
 106. Solovei I, Cavallo A, Schermelleh L, Jaunin F, Scasselati C, Cmarko D, Cremer C, Fakan S, Cremer T. Spatial preservation of nuclear chromatin architecture during three-dimensional fluorescence in situ hybridization (3D-FISH). *Exp Cell Res*. 2002;276(1):10-23.
 107. Solovei I, Walter J, Cremer M, Habermann F. FISH on three-dimensionally preserved nuclei. *FISH: a practical approach*. 2002:119-57.
 108. Venuat AM, Testu MJ, Rosenfeld C. Cytogenetic abnormalities in a human null cell leukemia line (REH). *Cancer Genet Cytogenet*. 1981;3(4):327-34.
 109. Uphoff CC, MacLeod RA, Denkmann SA, Golub TR, Borkhardt A, Janssen JW, Drexler HG. Occurrence of TEL-AML1 fusion resulting from (12;21) translocation in human early B-lineage leukemia cell lines. *Leukemia*. 1997;11(3):441-7.
 110. Horsley SW, Mackay A, Irvani M, Fenwick K, Valgeirsson H, Dexter T, Ashworth A, Kearney L. Array CGH of fusion gene-positive leukemia-derived cell lines reveals cryptic regions of genomic gain and loss. *Genes Chromosomes Cancer*. 2006;45(6):554-64.
 111. Galganski L, Urbanek MO, Krzyzosiak WJ. Nuclear speckles: molecular organization, biological function and role in disease. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(18):10350-68.
 112. Spector DL, Lamond AI. Nuclear speckles. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3(2).
 113. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet*. 2009;10(1):57-63.
 114. Zola H. Detection of cytokine receptors by flow cytometry. *Curr Protoc Immunol*. 2001;Chapter 6:Unit 6 21.
 115. Stepanenko AA, Dmitrenko VV. Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. *Gene*. 2015;574(2):193-203.
 116. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay. *Cold Spring Harb Protoc*. 2018;2018(6).
 117. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, Minor L. Cell Viability Assays. In: Sittampalam GS, Grossman A, Brimacombe K, Arkin M, Auld D, Austin CP, et al., editors. *Assay Guidance Manual*. Bethesda (MD)2004.
 118. Gonzalez-Garcia S, Mosquera M, Fuentes P, Palumbo T, Escudero A, Perez-Martinez A, Ramirez M, Corcoran AE, Toribio ML. IL-7R is essential for leukemia-initiating cell activity of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2019;134(24):2171-82.

119. Peschon JJ, Morrissey PJ, Grabstein KH, Ramsdell FJ, Maraskovsky E, Gliniak BC, Park LS, Ziegler SF, Williams DE, Ware CB, Meyer JD, Davison BL. Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J Exp Med.* 1994;180(5):1955-60.
120. Nishii K, Katayama N, Miwa H, Shikami M, Masuya M, Shiku H, Kita K. Survival of human leukaemic B-cell precursors is supported by stromal cells and cytokines: association with the expression of bcl-2 protein. *Br J Haematol.* 1999;105(3):701-10.
121. Kebelmann-Betzing C, Korner G, Badiali L, Buchwald D, Moricke A, Korte A, Kochling J, Wu S, Kappelmeier D, Oettel K, Henze G, Seeger K. Characterization of cytokine, growth factor receptor, costimulatory and adhesion molecule expression patterns of bone marrow blasts in relapsed childhood B cell precursor all. *Cytokine.* 2001;13(1):39-50.
122. Korte A, Kochling J, Badiali L, Eckert C, Andreae J, Geilen W, Kebelmann-Betzing C, Taube T, Wu S, Henze G, Seeger K. Expression analysis and characterization of alternatively spliced transcripts of human IL-7Ralpha chain encoding two truncated receptor proteins in relapsed childhood all. *Cytokine.* 2000;12(11):1597-608.
123. Kovac M, Vaskova M, Petrackova D, Pelkova V, Mejstrikova E, Kalina T, Zaliova M, Weiser J, Sary J, Hrusak O. Cytokines, growth, and environment factors in bone marrow plasma of acute lymphoblastic leukemia pediatric patients. *Eur Cytokine Netw.* 2014;25(1):8-13.
124. Vilchis-Ordóñez A, Contreras-Quiroz A, Vadillo E, Dorantes-Acosta E, Reyes-Lopez A, Quintela-Núñez del Prado HM, Venegas-Vázquez J, Mayani H, Ortiz-Navarrete V, López-Martínez B, Pelayo R. Bone Marrow Cells in Acute Lymphoblastic Leukemia Create a Proinflammatory Microenvironment Influencing Normal Hematopoietic Differentiation Fates. *Biomed Res Int.* 2015;2015:386165.
125. Park JH, Yu Q, Erman B, Appelbaum JS, Montoya-Durango D, Grimes HL, Singer A. Suppression of IL7Ralpha transcription by IL-7 and other prosurvival cytokines: a novel mechanism for maximizing IL-7-dependent T cell survival. *Immunity.* 2004;21(2):289-302.
126. Henriques CM, Rino J, Nibbs RJ, Graham GJ, Barata JT. IL-7 induces rapid clathrin-mediated internalization and JAK3-dependent degradation of IL-7Ralpha in T cells. *Blood.* 2010;115(16):3269-77.
127. Sudo T, Nishikawa S, Ohno N, Akiyama N, Tamakoshi M, Yoshida H, Nishikawa S. Expression and function of the interleukin 7 receptor in murine lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(19):9125-9.
128. Chou WC, Levy DE, Lee CK. STAT3 positively regulates an early step in B-cell development. *Blood.* 2006;108(9):3005-11.
129. Malin S, McManus S, Cobaleda C, Novatchkova M, Delogu A, Bouillet P, Strasser A, Busslinger M. Role of STAT5 in controlling cell survival and immunoglobulin gene recombination during pro-B cell development. *Nat Immunol.* 2010;11(2):171-9.
130. Bauer JH, Liu KD, You Y, Lai SY, Goldsmith MA. Heteromerization of the gammac chain with the interleukin-9 receptor alpha subunit leads to STAT activation and prevention of apoptosis. *J Biol Chem.* 1998;273(15):9255-60.
131. Benczik M, Gaffen SL. The interleukin (IL)-2 family cytokines: survival and proliferation signaling pathways in T lymphocytes. *Immunol Invest.* 2004;33(2):109-42.
132. Knoops L, Renauld JC. IL-9 and its receptor: from signal transduction to tumorigenesis. *Growth Factors.* 2004;22(4):207-15.
133. Huang H, Zhang C, Wang B, Wang F, Pei B, Cheng C, Yang W, Zhao Z. Transduction with Lentiviral Vectors Altered the Expression Profile of Host MicroRNAs. *J Virol.* 2018;92(18).
134. Ranzani M, Annunziato S, Adams DJ, Montini E. Cancer gene discovery: exploiting insertional mutagenesis. *Mol Cancer Res.* 2013;11(10):1141-58.
135. Lin P, Correa D, Lin Y, Caplan AI. Polybrene inhibits human mesenchymal stem cell proliferation during lentiviral transduction. *Plos One.* 2011;6(8):e23891.
136. Seitz B, Baktanian E, Gordon EM, Anderson WF, LaBree L, McDonnell PJ. Retroviral vector-mediated gene transfer into keratocytes: in vitro effects of polybrene and protamine sulfate. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1998;236(8):602-12.

137. Chatzisprou IA, Held NM, Mouchiroud L, Auwerx J, Houtkooper RH. Tetracycline antibiotics impair mitochondrial function and its experimental use confounds research. *Cancer Res.* 2015;75(21):4446-9.
138. Moullan N, Mouchiroud L, Wang X, Ryu D, Williams EG, Mottis A, Jovaisaite V, Frochoux MV, Quiros PM, Deplancke B, Houtkooper RH, Auwerx J. Tetracyclines Disturb Mitochondrial Function across Eukaryotic Models: A Call for Caution in Biomedical Research. *Cell Rep.* 2015;10(10):1681-91.
139. Kenworthy R, Lambert D, Yang F, Wang N, Chen Z, Zhu H, Zhu F, Liu C, Li K, Tang H. Short-hairpin RNAs delivered by lentiviral vector transduction trigger RIG-I-mediated IFN activation. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(19):6587-99.
140. Kumar M, Keller B, Makalou N, Sutton RE. Systematic determination of the packaging limit of lentiviral vectors. *Hum Gene Ther.* 2001;12(15):1893-905.
141. Montano A, Ordonez JL, Alonso-Perez V, Hernandez-Sanchez J, Santos S, Gonzalez T, Benito R, Garcia-Tunon I, Hernandez-Rivas JM. ETV6/RUNX1 Fusion Gene Abrogation Decreases the Oncogenicity of Tumour Cells in a Preclinical Model of Acute Lymphoblastic Leukaemia. *Cells.* 2020;9(1).
142. Petersen CP, Bordeleau ME, Pelletier J, Sharp PA. Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol Cell.* 2006;21(4):533-42.
143. Eekels JJ, Pasternak AO, Schut AM, Geerts D, Jeeninga RE, Berkhout B. A competitive cell growth assay for the detection of subtle effects of gene transduction on cell proliferation. *Gene Ther.* 2012;19(11):1058-64.
144. Wlodkowic D, Telford W, Skommer J, Darzynkiewicz Z. Apoptosis and beyond: cytometry in studies of programmed cell death. *Methods Cell Biol.* 2011;103:55-98.
145. Leist M, Jaattela M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2(8):589-98.
146. Saraste A, Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res.* 2000;45(3):528-37.
147. Galluzzi L, Aaronson SA, Abrams J, Alnemri ES, Andrews DW, Baehrecke EH, Bazan NG, Blagosklonny MV, Blomgren K, Borner C, Bredesen DE, Brenner C, Castedo M, Cidlowski JA, Ciechanover A, Cohen GM, De Laurenzi V, De Maria R, Deshmukh M, Dynlacht BD, El-Deiry WS, Flavell RA, Fulda S, Garrido C, Golstein P, Gougeon ML, Green DR, Gronemeyer H, Hajnoczky G, Hardwick JM, Hengartner MO, Ichijo H, Jaattela M, Kepp O, Kimchi A, Klionsky DJ, Knight RA, Kornbluth S, Kumar S, Levine B, Lipton SA, Lugli E, Madeo F, Malomi W, Marine JC, Martin SJ, Medema JP, Mehlen P, Melino G, Moll UM, Morselli E, Nagata S, Nicholson DW, Nicotera P, Nunez G, Oren M, Penninger J, Pervaiz S, Peter ME, Piacentini M, Prehn JH, Puthalakath H, Rabinovich GA, Rizzuto R, Rodrigues CM, Rubinsztein DC, Rudel T, Scorrano L, Simon HU, Steller H, Tschopp J, Tsujimoto Y, Vandenabeele P, Vitale I, Vousden KH, Youle RJ, Yuan J, Zhivotovsky B, Kroemer G. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death Differ.* 2009;16(8):1093-107.
148. Aumiller WM, Jr., Davis BW, Keating CD. Phase separation as a possible means of nuclear compartmentalization. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2014;307:109-49.
149. Gibson BA, Doolittle LK, Schneider MWG, Jensen LE, Gamarra N, Henry L, Gerlich DW, Redding S, Rosen MK. Organization of Chromatin by Intrinsic and Regulated Phase Separation. *Cell.* 2019;179(2):470-84 e21.
150. Parnes JR, Pan C. CD72, a negative regulator of B-cell responsiveness. *Immunol Rev.* 2000;176:75-85.
151. Bendall SC, Davis KL, Amir el AD, Tadmor MD, Simonds EF, Chen TJ, Shenfeld DK, Nolan GP, Pe'er D. Single-cell trajectory detection uncovers progression and regulatory coordination in human B cell development. *Cell.* 2014;157(3):714-25.
152. Carrette F, Surh CD. IL-7 signaling and CD127 receptor regulation in the control of T cell homeostasis. *Semin Immunol.* 2012;24(3):209-17.

6. ANHANG

6.1 Genexpression von Rezeptoren des JAK-STAT Signalwegs in *ETV6-RUNX1* positiver ALL

Tabelle 6: Genexpression von Rezeptoren des JAK-STAT Signalwegs in *ETV6-RUNX1* positiver ALL

Gruppe	Ligand	Gen	REH (11 samples)		REH (RNA-Seq)	UoC-B6 (3 samples)		AT-2 (2 samples)		ETV6-RUNX1 pos. Blasten (219 samples)		gesunde, <15- jährige Kontrollprobanden (19 samples)	
			RMA Ø	Present		RMA Ø	Present	RMA Ø	Present	RMA Ø	Present	RMA Ø	Present
common-β	IL-3	IL3RA	5,069	0 %	1,34	5,171	0 %	4,740	0 %	6,668	38 %	6,405	5 %
		CSF2RB	8,111	100 %	9,8	8,149	100 %	8,190	100 %	8,589	100 %	9,650	100 %
	IL-5	IL5RA	4,848	0 %	0,01	4,708	0 %	4,685	0 %	4,996	21 %	6,506	89 %
		CSF2RB	8,111	100 %	9,8	8,149	100 %	8,190	100 %	8,589	100 %	9,650	100 %
common-γ	GM-CSF	CSF2RA	3,830	9 %	0,28	4,133	33 %	3,577	0 %	3,975	15 %	7,328	100 %
		CSF2RB	8,111	100 %	9,8	8,149	100 %	8,190	100 %	8,589	100 %	9,650	100 %
	IL-2	IL2RA	4,646	9 %	0,19	4,477	0 %	4,805	50 %	5,080	26 %	4,795	11 %
		IL2RB	5,082	27 %	0,06	5,551	67 %	5,531	50 %	7,379	86 %	6,973	95 %
common-γ	IL-4	IL2RG	8,437	100 %	72,43	8,153	100 %	7,552	100 %	9,534	100 %	9,804	100 %
		IL4R	5,088	64 %	0,43	5,378	100 %	5,639	100 %	5,453	81 %	5,508	74 %
	IL-7	IL2RG	8,437	100 %	72,43	8,153	100 %	7,552	100 %	9,534	100 %	9,804	100 %
		IL7R	11,266	100 %	372,52	10,769	100 %	11,289	100 %	9,340	100 %	9,713	100 %
gp1	IL-9	IL2RG	8,437	100 %	72,43	8,153	100 %	7,552	100 %	9,534	100 %	9,804	100 %
		IL9R	4,703	45 %	0,57	4,982	100 %	4,465	100 %	5,057	72 %	4,751	42 %
	IL-15	IL2RG	8,437	100 %	72,43	8,153	100 %	7,552	100 %	9,534	100 %	9,804	100 %
		IL15RA	6,770	73 %	8,87	6,747	0 %	6,567	50 %	7,003	63 %	6,252	84 %
gp1	IL-21	IL2RB	5,082	27 %	0,06	5,551	67 %	5,531	50 %	7,379	86 %	6,973	95 %
		IL2RG	8,437	100 %	72,43	8,153	100 %	7,552	100 %	9,534	100 %	9,804	100 %
	IL-6	IL21R	4,794	64 %	0,43	5,503	100 %	3,252	0 %	6,154	76 %	4,612	84 %
		IL2RG	8,437	100 %	72,43	8,153	100 %	7,552	100 %	9,534	100 %	9,804	100 %
gp1	IL-6	IL6R	3,708	9 %	0,27	4,151	33 %	3,346	0 %	5,050	48 %	8,557	100 %
		IL6ST	7,433	100 %	2,91	7,938	100 %	7,496	100 %	9,733	100 %	9,185	100 %

Gruppe	Ligand	Gen	REH (11 samples)		REH (RNA-Seq)	UoC-B6 (3 samples)		AT-2 (2 samples)		ETV6-RUNX1 pos. Blasten (219 samples)		gesunde, <15- jährige Kontrollprobanden (19 samples)	
			RMA Ø	Present		RMA Ø	Present	RMA Ø	Present	RMA Ø	Present	RMA Ø	Present
gp130	IL-11	IL11RA	6,356	100 %	5,13	6,172	100 %	6,754	100 %	6,375	43 %	5,042	0 %
		IL6ST	7,433	100 %	2,91	7,938	100 %	7,496	100 %	9,733	100 %	9,185	100 %
		IL27RA	6,174	100 %	10,71	6,577	100 %	5,716	100 %	5,533	57 %	6,265	42 %
	OSM	IL6ST	7,433	100 %	2,91	7,938	100 %	7,496	100 %	9,733	100 %	9,185	100 %
		OSMR	3,466	0 %	0,06	3,621	0 %	3,457	0 %	3,715	12 %	3,595	0 %
		IL6ST	7,433	100 %	2,91	7,938	100 %	7,496	100 %	9,733	100 %	9,185	100 %
	LIF	LIFR	2,814	0 %	0,11	2,437	0 %	2,811	0 %	3,272	21 %	2,702	0 %
		IL6ST	7,433	100 %	2,91	7,938	100 %	7,496	100 %	9,733	100 %	9,185	100 %
		CNTFR	5,636	0 %	0,03	5,531	0 %	5,378	0 %	5,719	8 %	5,793	0 %
	EPO	IL6ST	7,433	100 %	2,91	7,938	100 %	7,496	100 %	9,733	100 %	9,185	100 %
		EPOR	7,217	100 %	6,53	7,803	100 %	7,359	100 %	7,705	98 %	7,890	100 %
		LEPR	3,476	64 %	0,4	4,182	100 %	3,752	100 %	4,910	79 %	6,956	100 %
Angiotensin	AGTR1	3,725	27 %	0	3,561	33 %	3,896	50 %	3,839	38 %	3,914	68 %	
	AGTR2	2,990	0 %	0	3,139	0 %	3,304	0 %	2,927	5 %	2,763	0 %	
	HTR1A	4,542	0 %	0	4,572	0 %	4,379	0 %	4,676	0 %	5,062	0 %	
andere	5-HT	HTR1B	3,793	0 %	0	3,988	0 %	3,854	0 %	3,831	5 %	4,222	0 %
		HTR1D	3,716	0 %	0,02	3,470	0 %	3,763	0 %	3,653	0 %	4,088	0 %
		HTR1E	4,232	27 %	0,01	4,481	33 %	4,216	0 %	4,245	35 %	4,357	68 %
	HTR1F	3,410	0 %	0,06	3,504	0 %	3,384	50 %	3,636	8 %	3,832	5 %	
	HTR2A	3,532	36 %	0,01	3,635	100 %	3,658	0 %	3,764	37 %	3,882	42 %	
	HTR2B	2,802	0 %	0,07	2,773	0 %	2,869	0 %	4,242	32 %	3,043	0 %	
	HTR2C	2,848	0 %	0,01	2,778	0 %	3,011	0 %	2,755	0 %	2,741	0 %	
	HTR3A	4,528	9 %	0,03	4,086	0 %	3,981	0 %	4,314	0 %	4,580	0 %	

Gruppe	Ligand	Gen	REH (11 samples)		REH (RNA-Seq) TPM	UoC-B6 (3 samples)		AT-2 (2 samples)		ETV6-RUNX1 pos. Blasten (219 samples)		gesunde, <15- jährige Kontrollprobanden (19 samples)	
			RMA Ø	Present		RMA Ø	Present	RMA Ø	Present	RMA Ø	Present	RMA Ø	Present
andere	5-HT	HTR3B	3,964	0 %	0	3,982	0 %	3,798	0 %	4,332	9 %	4,547	0 %
		HTR3C	4,422	0 %	0	4,702	0 %	4,226	0 %	4,551	0 %	4,704	0 %
		HTR4	6,353	0 %	0	6,062	0 %	6,293	0 %	6,507	5 %	7,025	79 %
		HTR5A	4,243	0 %	0	4,627	0 %	4,033	0 %	4,594	0 %	4,738	0 %
		HTR6	4,224	0 %	0	4,367	0 %	4,207	0 %	4,605	0 %	5,019	0 %
		HTR7	3,702	27 %	0,95	3,477	67 %	3,030	0 %	3,514	2 %	3,672	0 %
		PRLR	2,430	0 %	0,1	2,305	0 %	2,626	0 %	2,555	7 %	2,697	16 %
	PDGF	3,401	0 %	0,68	3,439	0 %	3,553	0 %	3,462	1 %	3,595	11 %	
	EGF	3,858	0 %	0,12	4,017	0 %	3,782	0 %	4,008	2 %	4,120	0 %	
	TPO	3,196	0 %	0,18	3,251	0 %	3,429	0 %	3,429	0 %	3,635	11 %	
	GH	2,661	0 %	0,04	2,627	0 %	2,666	0 %	2,917	9 %	2,990	16 %	
	IL-12	IL12RB1	6,511	91 %	5,83	6,583	100 %	6,117	100 %	6,187	68 %	6,104	68 %
		IL12RB2	3,283	0 %	0,07	3,722	0 %	3,543	0 %	4,052	25 %	3,691	26 %
	IL-13	IL13RA1	3,837	27 %	0,15	3,734	33 %	3,555	0 %	5,372	94 %	7,378	100 %
		IL4R	6,129	9 %	0,43	6,197	0 %	6,816	50 %	7,314	53 %	8,031	95 %
	IL-22	IL22RA1	3,924	0 %	0,02	3,927	0 %	3,918	0 %	4,330	10 %	4,267	11 %
		IL22RA2	3,218	0 %	0	3,276	0 %	3,420	0 %	3,284	4 %	3,360	11 %
		IL10RB	7,632	100 %	17,56	8,053	100 %	7,728	100 %	7,022	100 %	8,916	100 %
	IL-23	IL12RB1	6,511	91 %	5,83	6,583	100 %	6,117	100 %	6,187	68 %	6,104	68 %
		IL23R	2,756	0 %	0	2,654	0 %	2,648	0 %	2,989	0 %	3,168	5 %

Gruppe	Ligand	Gen	REH (11 samples)		REH (RNA-Seq)	UoC-B6 (3 samples)		AT-2 (2 samples)		ETV6-RUNX1 pos. Blasten (219 samples)		gesunde, <15- jährige Kontrollprobanden (19 samples)	
			RMA Ø	Present		TPM	RMA Ø	Present	RMA Ø	Present	RMA Ø	Present	RMA Ø
andere	IL-20, IL-24	IL22RA1	3,924	0 %	0,02	3,927	0 %	3,918	0 %	4,330	10 %	4,267	11 %
		IL10RB	7,632	100 %	17,56	8,053	100 %	7,728	100 %	7,022	100 %	8,916	100 %
		IL20RB	4,773	73 %	0	4,509	33 %	4,239	50 %	4,354	14 %	4,127	11 %
	IL-19, IL-20, IL-24	IL20RA	2,827	0 %	0	2,695	0 %	2,761	0 %	2,699	1 %	2,759	5 %
		IL20RB	4,773	73 %	0	4,509	33 %	4,239	50 %	4,354	14 %	4,127	11 %
	IL-26	IL20RA	2,827	0 %	0	2,695	0 %	2,761	0 %	2,699	1 %	2,759	5 %
		IL10RB	7,632	100 %	17,56	8,053	100 %	7,728	100 %	7,022	100 %	8,916	100 %
	IL-28, IL-29	IFNLR1	5,586	18 %	0,09	7,278	67 %	3,699	0 %	4,274	12 %	4,802	21 %
		IL10RB	7,632	100 %	17,56	8,053	100 %	7,728	100 %	7,022	100 %	8,916	100 %
	IL-31	IL31RA	3,039	0 %	0,04	2,874	0 %	2,699	0 %	2,808	6 %	2,997	26 %
		OSMR	3,466	0 %	0,06	3,621	0 %	3,457	0 %	3,715	12 %	3,595	0 %
	G-CSF	CSF3R	6,254	0 %	0,43	6,304	0 %	6,192	0 %	8,288	90 %	9,130	100 %
		CRLF2	5,119	0 %	0	4,752	0 %	4,764	0 %	5,248	3 %	4,991	0 %
	TSLP	IL7R	11,266	100 %	372,52	10,769	100 %	11,289	100 %	9,340	100 %	9,713	100 %
		IFNAR1	7,170	100 %	22,64	7,639	100 %	7,150	100 %	6,431	69 %	7,699	100 %
	INF α/β	IFNAR2	7,567	91 %	14,74	8,053	100 %	7,234	100 %	7,767	68 %	8,413	95 %
		IFNGR1	9,357	100 %	45,06	8,854	100 %	9,034	100 %	9,208	100 %	10,479	100 %
	INF γ	IFNGR2	8,814	100 %	5,69	9,276	100 %	8,823	100 %	8,374	98 %	10,069	100 %
		IL10RA	4,446	9 %	0,04	4,256	0 %	4,510	0 %	7,082	80 %	7,476	100 %
	IL-10	IL10RB	7,632	100 %	17,56	8,053	100 %	7,728	100 %	7,022	100 %	8,916	100 %
F2R		6,601	100 %	15,23	7,319	100 %	6,561	100 %	6,332	95 %	5,402	95 %	
Thrombin													
CXCL12		CXCR4	11,403	100 %	253,21	11,166	100 %	12,139	100 %	6,218	100 %	12,034	100 %

Anmerkungen: Grün = Vollständiger funktioneller Rezeptor wird exprimiert; Gelb = Rezeptor im Vergleich zu Kontrollprobanden herunterreguliert; RMA Ø = Durchschnittlicher RMA-Wert unterschiedlicher Datensätze der gleichen Zelllinie und des gleichen Probesets.

7. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

„Ich, Ivo Noack, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: "Induzierbare *ETV6-RUNX1* Repression im humanen Zellmodell akuter lymphoblastischer Leukämie – Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten und den JAK-STAT Signalweg“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

8. CURRICULUM VITAE

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

9. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Dr. Karlheinz Seeger für die Überlassung des Themas, den regen Austausch, die vielen tollen Ratschläge sowie die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe diese Arbeit verfassen zu dürfen. Danke auch für den stetigen Witz auf Deinen Lippen, auch dadurch hat die Betreuung jederzeit Spaß gemacht. Bei Dr. Dr. Thomas Heiden möchte ich mich für die umfassendste Betreuung, die ich mir vorstellen kann, bedanken, für all die langen Gespräche, späten Telefonate, die Supervision zu allen Zeitpunkten der Arbeit, danke einfach für alles.

Bei Dr. Manfred Gossen bedanke ich mich herzlich für die Möglichkeit, einen Teil der Arbeiten in seinem Labor im BCRT absolvieren zu können, sowie seine guten Hinweise, beispielsweise zur Nutzung des Tet-Systems. Ebenso möchte ich Jörg Contzen danken, insbesondere zur lentiviralen Transduktion konnte ich von Dir unheimlich viel lernen, deine Tipps waren immer willkommen. Ein weiteres großes Dankeschön gilt Dr. Johannes Zuber, der mit seinen wertvollen Tipps in Zusammenhang mit unserem Reporterzellmodell sowie der Bereitstellung der Sequenzen shMYB und shMYC eine große Hilfe war.

Paul, Philipp, Melanie, mit Euch war das Arbeiten immer doppelt so schön, insbesondere wenn es mal wieder lange Abende im Labor wurden. Danke für Alles. Helia, Juan, Madlen, vielen Dank für das geduldige Beantworten meiner vielen Fragen, es war schön mit Euch das Labor zu teilen. Ebenso möchte ich vielmals den tollen Kolleginnen und Kollegen der Forschungsabteilung der pädiatrischen Onkologie im Forum 4 danken, für die spannenden Vorträge, den regen Austausch sowie die gute Zusammenarbeit.

Zuletzt gilt mein Dank natürlich meinen Freunden, meiner Familie und Nora, die mich in dieser intensiven Phase begleiteten, unterstützten sowie mir allzeit die Daumen drückten.

Danke.