

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Forschungsinstitut Kinderkrebs-Zentrum Hamburg

Direktor: Prof. Dr. med. Martin Horstmann

Charakterisierung des Einflusses verschiedener Ph-like Fusionsproteine der ABL-Class auf Tyrosinphosphorylierung und Genexpression in Ba/F3-Zellen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Tobias Erwin Schmitt

aus Landstuhl

Hamburg 2023

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am 10.01.2024**

**Veröffentlichung mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der /die Vorsitzende: PD Dr. Jasmin Wellbrock

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Martin Horstmann

Inhaltsverzeichnis

Fragestellung, Arbeitshypothesen und Ziele der Arbeit	III
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Die akute lymphatische Leukämie	1
1.2 Die Ph-like akute lymphatische Leukämie.....	2
1.3 Die ABL-Kinasen	3
1.4 Die 5`-Fusionspartner	5
1.5 Gezielte Therapie der akuten lymphatischen Leukämie	12
1.6 Zielsetzung der Arbeit.....	13
2 Material	14
2.1 Medien und Reagenzien der zellbiologischen Methoden	14
2.2 Medien und Reagenzien der proteinbiochemischen Methoden	15
2.3 Primäre Antikörper.....	15
2.4 Sekundäre, HRP-markierte Antikörper.....	16
2.5 Fluoreszenzmarkierte Antikörper	16
2.6 Kits	16
2.7 Puffer.....	16
2.8 Fusionsproteine	17
2.9 Verbrauchsmaterialien.....	17
2.10 Geräte	17
3 Methoden	18
3.1 Zellbiologische Methoden	18
3.2 Proteinbiochemische Methoden.....	22
3.3 Konfokale Laserscanningmikroskopie.....	22
3.4 Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)	23
4 Ergebnisse.....	24
4.1 Etablierung des Testsystems.....	24

4.2	Vergleichende Analyse der ABL-Class Fusionsproteine bezüglich Expressionsstärke und Tyrosinkinase-Aktivität per Western Blot.....	30
4.3	Phosphorylierung von STAT3 und STAT5 durch ABL-Class Fusionsproteine....	33
4.4	ABL-Class Fusionsproteine induzieren IL3-unabhängiges Wachstum	36
4.5	Vergleich der Proliferationsaktivität der mit ABL-Class Fusionsgenen transfezierten Ba/F3-Zellen	37
4.6	Erhöhte Sensitivität von ABL-Class Fusionsproteinen gegenüber Tyrosinkinase-Inhibitoren	38
4.7	Ausgeprägte zytoplasmatische Lokalisation der ABL-Class Fusionsproteine.....	41
4.8	ABL-Class Fusionsgene erzeugen differentielle Genexpressionsprofile.....	44
4.9	GeneSetEnrichment Analysis (GSEA) zeigt inflammatorische Gensignatur der ABL-Class Fusionsgene	47
5	Diskussion.....	56
5.1	Diskussion des Testsystems.....	56
5.2	Kinaseaktivität und TKI-Empfindlichkeit	57
5.3	Signaltransduktion über STAT3 und STAT5	59
5.4	Zytoplasmatische Lokalisation der Fusionsproteine	60
5.5	Einfluss des 5`-Partners auf die Leukämogenese	61
5.6	Einordnung der GSEA Ergebnisse.....	62
5.7	Inflammatorische Gensignatur	64
5.8	Fazit und Ausblick.....	66
6	Zusammenfassung.....	68
7	Abkürzungsverzeichnis	70
8	Literaturverzeichnis	71
9	Anhang.....	81
10	Danksagung.....	82
11	Lebenslauf	83
12	Eidesstaatliche Erklärung.....	84

Fragestellung, Arbeitshypothesen und Ziele der Arbeit

Zur Behandlung von akuten lymphatischen Leukämien (ALL) werden intensiven Chemotherapien und das Verfahren der hämatopoetischen Stammzelltransplantation (HSZT) eingesetzt. Diese Behandlungsmethoden stellen eine enorme physische und psychische Belastung für die Patienten dar, die im Extremfall bis zum Therapie-assoziierten Tod führen kann. Insbesondere bei pädiatrischen Patienten spielen zudem negative Langzeitfolgen der Therapie wie neurokognitive Beeinträchtigung, Kardiotoxizität, Osteonekrose oder sekundäre Malignome eine Rolle (Silverman 2014). Bei pädiatrischen Niedrigrisiko-Patienten ist heutzutage dank stetiger Verbesserung der Therapieregime eine weniger intensive Behandlung bei gleichbleibenden Heilungsraten möglich (Pui 2020). Um auch in Hochrisiko-Gruppen wie Ph-positiven und Ph-like ALL die Intensität der Chemotherapien verringern zu können und ohne den Einsatz der HSZT eine langfristige Remission zu erreichen, müssen neben i.d.R. Phänotyp-gerichteten, immuntherapeutischen Behandlungsstrategien neue, zielgerichtete Therapien entwickelt werden. Diese Arbeit untersucht in einer vergleichenden Analyse fünf mit Ph-like ALL assoziierte ABL-Class Fusionsproteine sowie BCR-ABL1 hinsichtlich ihrer Expressionsstärke, der Tyrosinphosphorylierung und des Genexpressionsprofils in einem pro-B-Zell-Kontext. Ziel ist dabei die Aufdeckung charakteristischer Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen den Fusionsproteinen, die als Ansätze für die tiefergehende Untersuchung neuer Therapieziele dienen können.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Schematische Darstellung von ABL1 und ABL2.	4
Abbildung 2 Schematische Darstellung des BCR-ABL1 Fusionsproteins.	5
Abbildung 3 Schematische Darstellung des ETV6-ABL1 Fusionsproteins.	7
Abbildung 4 Schematische Darstellung der RCSD1-enthaltenden Fusionsproteine.	8
Abbildung 5 Schematische Darstellung des NUP214-ABL1 Fusionsproteins.	9
Abbildung 6 Schematische Darstellung des EBF1-PDGFR β Fusionsproteins.	11
Abbildung 7 Schematische Darstellung des verwendeten Expressionsvektors.	25
Abbildung 8 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der GFP-Expression in stabil transfezierten Ba/F3.	26
Abbildung 9 Selektionswege der mit Fusionsgenen transfezierten Ba/F3-Zellkulturen zu monoklonalen IL3-unabhängigen Kulturen.	27
Abbildung 10 Transkriptanzahl der Fusionsgene.	28
Abbildung 11 Qualitativer Nachweis der Expression der Fusionsproteine per Western Blot.	29
Abbildung 12 Qualitativer Nachweis der Tyrosinphosphorylierung per Western Blot.	30
Abbildung 13 Vergleichende Western Blot Analyse der Expression der Fusionsproteine. .	31
Abbildung 14 Vergleichende Western Blot Analyse der Tyrosinphosphorylierung.	32
Abbildung 15 Nachweis von STAT3/STAT5-Expression und -Phosphorylierung per Western Blot.	34
Abbildung 16 STAT3 und STAT5 Phosphorylierung durch ABL-Class Fusionsproteine und BCR-ABL1 in Ba/F3-Zellen.	35
Abbildung 17 Die Kinase-aktivierenden Fusionsproteine induzieren IL3-unabhängiges Wachstum.	36
Abbildung 18 Proliferationsaktivität nach IL3-Entzug.	37
Abbildung 19 Dasatinib hemmt Expression und Kinaseaktivität Kinase-getriebener Fusionsproteine.	38
Abbildung 20 Kinase-getriebene Fusionsproteine zeigen erhöhte Imatinib-Sensitivität.	39
Abbildung 21 Langfristige Imatinib-Behandlung steigert Expression der Fusionsproteine.	40
Abbildung 22 Vorwiegend zytoplasmatische Lokalisation der Fusionsproteine.	42
Abbildung 23 ABL-Class Fusionsgene verursachen differentielle Genexpressionsprofile.	45
Abbildung 24 Hierarchische Cluster Analyse der Genexpressionsprofile unterschiedlicher ABL-Class Fusionsgene.	46
Abbildung 25 GeneSetEnrichment Analysis der hochregulierten Gene.	49

Abbildung 26 GeneSetEnrichment Analysis der herunterregulierten Gene.....	53
Abbildung 27 Relative Veränderungen in den mRNA-Expressionsspiegeln von Mitgliedern der APOBEC-Familie, der aktivierungsinduzierten Cytidindesaminase (AICDA) und der Rekombination-aktivierenden Gene RAG1 und RAG2.	65

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Medien und Reagenzien der zellbiologischen Methoden.....	14
Tabelle 2 Medien und Reagenzien der proteinbiochemischen Methoden.	15
Tabelle 3 Primäre Antikörper.....	15
Tabelle 4 Sekundäre Antikörper.....	16
Tabelle 5 Fluoreszenzmarkierte Antikörper.....	16
Tabelle 6 Kits.....	16
Tabelle 7 Puffer-Zusammensetzung.	16
Tabelle 8 Aufbau der Fusionsproteine mit Uniprot-Identifizier und Größe der Proteinfragmente.	17
Tabelle 9 Verbrauchsmaterialien.....	17
Tabelle 10 Geräte.....	17
Tabelle 11 Kulturmedien.....	18
Tabelle 12 Zusammenfassung der Ergebnisse der Zellfärbung aus Abbildung 22.	43
Tabelle 13 Betrachtung verschiedener Genmengen sortiert nach Fusionsprotein und Regulationsrichtung.....	47
Tabelle 14 Zuordnung der Gruppen der GeneSetEnrichment Analysis von hochregulierten Genen in Hauptkategorien anhand der „leading terms“.	50
Tabelle 15 Schnittmenge der hochregulierten Gene in der Kategorie „Immunsystem“ zwischen den Konstrukten.....	51
Tabelle 16 Zuordnung der Gruppen der GeneSetEnrichment Analysis von herunterregulierten Genen in Hauptkategorien anhand der „leading terms“.	54
Tabelle 17 Schnittmenge der herunterregulierten Gene in der Kategorie „Immunsystem“ zwischen den Konstrukten.....	55

1 Einleitung

1.1 Die akute lymphatische Leukämie

Die akute lymphatische Leukämie (ALL) ist eine maligne Erkrankung des blutbildenden (hämatopoetischen) Systems. Durch das deregulierte Wachstum einer klonalen Zellpopulation kommt es zur Verdrängung der normalen Hämatopoese im Knochenmark. Der so verursachte Mangel an gesunden Lymphozyten, Myelozyten, Thrombozyten und Erythrozyten führt zu Infekt- und Blutungsneigung, Anämie und unbehandelt schließlich zum Tod.

Krebs ist eine (epi)genetische Krankheit. In der Entstehungsgeschichte der ALL des Kindesalters sind initiiierende genetische Veränderungen oft bereits in utero nachweisbar, deren Ursachen meist unklar sind. Eine gestörte Immunantwort im Kontext von Infektionen könnte bei definierten Subtypen der ALL eine kollaborative Rolle spielen (Greaves 2018). Darüber hinaus beobachtet man ein erhöhtes ALL-Risiko in der Kindheit bei syndromalen Erkrankungen wie z.B. der Trisomie 21 und nach Exposition gegenüber ionisierender Strahlung (Hasle et al. 2000; Inaba et al. 2013).

Im Kindesalter ist die ALL mit einem Anteil von 25 % die mit Abstand häufigste Krebserkrankung. Der Erkrankungsgipfel liegt zwischen dem zweiten und fünften Lebensjahr. Auch im Erwachsenenalter spielt die ALL eine Rolle, hat aufgrund der Zunahme anderer Krebserkrankungen mit steigendem Alter jedoch einen deutlich geringeren Anteil an der Gesamtheit der Krebserkrankungen (Kaatsch et al. 2019). Bei der ALL des Kindesalters handelt es sich in 85 % der Fälle um dereguliert wachsende B-Vorläuferzellen und in ca. 15 % um T-Zellen (Hunger et al. 2012; Hunger und Mullighan 2015a). Mit einem Gesamtüberleben von über 90 % ist die Prognose der ALL bei Kindern dank stetiger Verbesserung der Therapie-regime heute insgesamt sehr gut, jedoch sind Hochrisiko-ALL-Subtypen unverändert mit einer schlechten Prognose assoziiert (Moorman 2012; Pui und Evans 2013).

Die B-Vorläufer ALL kann anhand spezifischer Gen- oder Chromosomenaberrationen in Subtypen mit prognostischer Relevanz unterteilt werden. Die Gentranslokation t(12;21) [*ETV6-RUNX1*] sowie die Vervielfältigung ganzer Chromosomen, die zu hyperdiploiden Chromosomensätzen (> 50 Chromosomen) führen kann, treten bei je 25 % aller ALL des Kindesalters auf und haben mit einem Langzeitüberleben von über 90 % eine sehr gute Prognose. Der Subtyp iAMP21, der sich durch die Instabilität des Chromosoms 21 auszeichnet (2 % der kindlichen ALL), und die Gentranslokation t(1;19) [*TCF3-PBX1*] (5 %) weisen unter intensivierter Therapie ebenfalls eine günstige Prognose auf. Mit einer schlechten Prognose verbunden sind Philadelphia-Chromosom t(9;22) [*BCR-ABL1*] positive ALL (3 %), Philadelphia-Chromosom-like ALL (10 %), *KMT2A*-rearrangierte ALL (5 %), hypodiploide (< 44 Chromosomen) ALL (1 %) sowie die sehr seltene t(17;19) [*TCF3-HLF*] positive ALL (Moorman 2012; Bhojwani et al. 2015; Kato und Manabe 2018).

Philadelphia-Chromosom (Ph) positive akute lymphatische Leukämie

Benannt ist die Ph-positive ALL nach der erstmals 1960 in Philadelphia beschriebenen Chromosomenaberration t(9;22) (q34;q11.1), die durch eine reziproke Translokation zwischen den Chromosomen 22 und 9 entsteht (Nowell und Hungerford 1960). Durch diese Translokation werden der 5'-Anteil des *BCR*-Gens (Breakpoint Cluster Region) und der 3'-Anteil des *ABL1*-Gens (Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1) miteinander verknüpft, was zum Verlust regulatorischer Elemente und somit zur dauerhaften Aktivierung der ABL1-Tyrosinkinase führt. Diese unkontrolliert aktivierte Kinase ist der vorherrschende Faktor, allerdings tragen auch zusätzliche Mutationen - z.B. in Genen der B-Zell-Differenzierung wie *IKZF1* (Ikaros family zinc finger protein 1) und *PAX5* (Paired box protein 5) oder dem Zellzyklus-Inhibitor *CDKN2A/B* - zur Entstehung des Vollbilds einer Ph-positiven ALL bei (Bernt und Hunger 2014). Die Prognose der Ph-positiven ALL hat sich in den letzten Jahren durch hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSZT) und den Einsatz zielgerichteter Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) wie Imatinib signifikant verbessert. Sie ist aufgrund des erhöhten Resistenz- und Rückfallrisikos jedoch bei einem Langzeitüberleben von ca. 70 % immer noch ungünstig (Schultz et al. 2014; Leoni und Biondi 2015).

Neben der eher seltenen Ph-positiven ALL ist das *BCR-ABL1* Fusionsgen im Rahmen der chronisch myeloischen Leukämie (CML), in der es in Form unterschiedlicher Transkript-Subtypen in nahezu 100 % der Fälle vorkommt, fest etabliert (Arun et al. 2017; Zhou et al. 2018).

1.2 Die Ph-like akute lymphatische Leukämie

Der ALL-Subtyp Ph-like oder auch BCR-ABL1-like wurde erstmals 2009 nach Analyse der Genexpressionsprofile neu diagnostizierter ALL-Fälle von zwei unabhängigen Gruppen beschrieben. In beiden Studien zeigten die später Ph-like genannten Fälle ein den Ph-positiven ALL ähnliches Genexpressionsprofil, ohne dass das namensgebende Philadelphia-Chromosom nachzuweisen war (Den Boer et al. 2009; Mullighan et al. 2009). Zudem waren diese Ph-like Fälle wie auch die Ph-positiven ALL häufig mit *IKZF1*-Deletionen assoziiert (Den Boer et al. 2009).

Klinisch präsentiert sich die Ph-like ALL im Vergleich zu anderen ALL-Subtypen meist mit prognostisch ungünstigen Parametern. Diese umfassen ein höheres Erkrankungsalter (≥ 10 Jahre), eine Leukozytenzahl $\geq 50.000/\mu\text{l}$ zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, eine hohe MRD (minimal residual disease) -Last nach Induktionstherapie sowie erhöhte Rückfallraten, womit sie auch klinisch der klassischen Ph-positiven ALL ähnelt (Den Boer et al. 2009; van der Veer et al. 2013; Roberts et al. 2014b; Herold et al. 2017).

Die Häufigkeit der Ph-like ALL an der Gesamtheit der ALL-Fälle steigt mit dem Alter von 10 % in der Standard Risiko-Gruppe bis 15 % in der Hochrisiko-Gruppe bei Kindern ≤ 16 Jahren über 21 % bei Jugendlichen (16-20 Jahre) und erreicht ihr Maximum mit 25-30 % bei jungen Erwachsenen (20-39 Jahre). Im Kindesalter stellt die Ph-like ALL den größten genetisch definierten Subtyp in den als Hochrisiko eingestuften ALL dar (Roberts et al. 2014a; Hunger und Mullighan 2015b).

Die Prognose der Ph-like ALL ist über alle Altersgruppen gesehen ungünstig, ähnlich der Prognose der Ph-positiven ALL (Roberts et al. 2014a). Es wird vermutet, dass die Prognose der Ph-like ALL durch die Anwendung risikoadaptierter Therapien basierend auf der Höhe der MRD-Spiegel verbessert werden kann. Hierzu ist die Studienlage bisher jedoch nicht eindeutig (Roberts et al. 2014b; Chiaretti et al. 2020).

Charakteristisch für die Ph-like ALL ist im Gegensatz zu den meisten anderen ALL-Subtypen nicht eine einzelne genetische Veränderung, sondern eine große Diversität an genetischen Veränderungen. In über 90 % der Fälle werden durch Mutationen in Zytokin-Rezeptor- oder Kinase-Genen abhängige Signalwege aktiviert. Zusätzlich sind häufig Gene der B-Zell-Entwicklung (*IKZF1*, *EBF1*, *PAX5*, *VPREB1*, *TCF3*) als Mutationsziele betroffen (Den Boer et al. 2009; Roberts et al. 2014a). Roberts et al. ordneten diese Kinase-aktivierenden Gen-Veränderungen den sieben Gruppen „ABL-Class“, „*EPOR/JAK2* rearranged“, „*CRLF2* rearranged“, „Other *JAK-STAT*“, „Miscellaneous“, „*Ras*-only“ und „no kinase alteration“ zu (Roberts et al. 2014a).

Die vorliegende Arbeit befasst sich paradigmatisch mit der „ABL-Class“, die ca. 14 % der pädiatrischen Ph-like ALL bzw. 2-3 % aller pädiatrischen B-ALL verkörpert (Reshmi et al. 2017; Tran und Hunger 2020). In der ABL-Class sind Genfusionen zusammengefasst, deren 3`-Anteil eine intakte, Imatinib-sensitive Tyrosinkinase (*ABL1*, *ABL2*, *CSF1R*, *PDGFRβ*) codiert. Die 5`-Fusionspartner sind deutlich diverser und meist in B-Vorläuferzellen hoch exprimiert (Roberts et al. 2014a).

1.3 Die ABL-Kinasen

Die beiden ABL Non-Rezeptor-Tyrosinkinasen ABL1 und ABL2 sind sich sowohl in Aufbau als auch Funktion sehr ähnlich und unterscheiden sich lediglich in wenigen C-terminalen Abschnitten. Am N-Terminus tragen beide Proteine eine CAP-Struktur mit darauffolgender hochkonservierter SH3-SH2-TK-Domäne (SH = SRC homologe Domäne; TK = Tyrosinkinase) (Colicelli 2010).

Es existieren von ABL1 und ABL2 je zwei Transkriptvarianten (1a und 1b) (Chissoe et al. 1995). Am N-Terminus enthält die Transkriptvariante 1b eine zusätzliche

Myristoylierungsstelle, die im Zusammenspiel mit der CAP-Struktur, der SH3- und der SH2-Domäne, analog einer Klammer, die intramolekulare Inhibition (Autoinhibition) der Tyrosinkinase vermittelt (Cilloni und Saglio 2007). Die genauen Mechanismen der intramolekularen Inhibition der Transkriptvariante 1a, der die Myristoylierungsstelle fehlt, sind noch nicht aufgeklärt. Neben seiner inhibitorischen Funktion bindet die SH2-Domäne unter physiologischen Bedingungen an phosphorylierte Tyrosinreste und trägt so maßgeblich zur Aktivierung und Substratspezifität der ABL-Kinase bei (Filippakopoulos et al. 2008; Yadav und Miller 2008).

C-terminal enthalten ABL1 und ABL2 für die Aktin-Remodellierung wichtige F-Aktin-Bindungsstellen. Zusätzlich besitzt ABL1 eine DNA-Bindungsstelle, eine G-Aktin-Bindungsstelle und mehrere nukleäre Lokalisations- und Exportsignale (NLS bzw. NES), die den Übergang aus dem Zytoplasma in den Kern ermöglichen (Wang 1993; Taagepera et al. 1998; Colicelli 2010; De Braekeleer et al. 2011).

ABL2 enthält zwischen den beiden F-Aktin-Bindungsstellen eine Mikrotubuli-Bindungsstelle, die durch Bindung dicker und dünner Filamente weitere Möglichkeiten zur Remodellierung des Zytoskeletts bietet (Colicelli 2010).

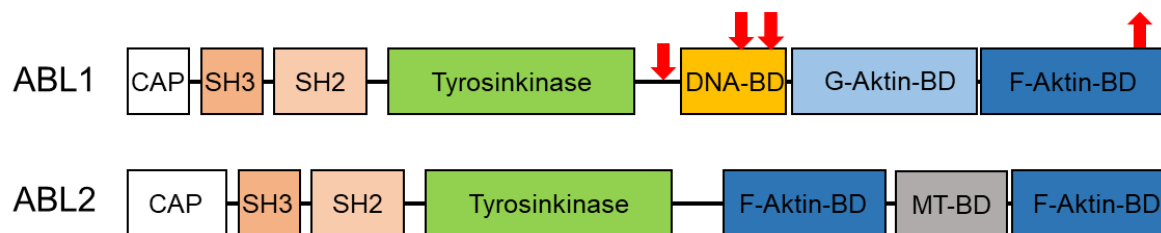


Abbildung 1 Schematische Darstellung von ABL1 und ABL2. Legende: BD = Bindungsdomäne; MT = Mikrotubuli; Roter Pfeil nach oben = Nukleäres Exportsignal; Roter Pfeil nach unten = Nukleäres Lokalisationssignal. Modifiziert nach (Greuber et al. 2013).

Werden ABL1 oder ABL2 z.B. durch Protein-Proteinwechselwirkungen oder (Auto-) Phosphorylierung aktiviert, wird die Kinaseaktivität induziert, die durch Substratbindung und Phosphorylierung von Substraten die Weitergabe vielschichtiger Signale ermöglicht (Colicelli 2010; Greuber et al. 2013). Physiologisch ist ABL1 an einer Vielzahl unterschiedlicher zellulärer Prozesse beteiligt, die sich je nach der zellulären Lokalisation unterscheiden. Als nukleäres Protein vermag ABL1 die Zellproliferation zu hemmen, Apoptose zu vermitteln und sich an DNA-Reparaturmechanismen zu beteiligen (Dasgupta et al. 2016). Zytoplasmatisch lokalisiertes ABL1 ist hingegen eher an Prozessen wie Proliferation, Aktin-Remodellierung und Zellmigration beteiligt (Sirvent et al. 2008). Durch Fusionspartner wie BCR oder ETV6 ist ABL1 in Fusionsproteinen meist zytoplasmatisch fixiert und agiert durch die Phosphorylierung physiologischer, aber auch untypischer Substrate pro-proliferativ (McWhirter und Wang 1991; Golub et al. 1996). Durch die Aktivierung von RAS-MAPK-,

JAK-STAT- oder PI3K-AKT-Signalwegen hat dies ein unkontrolliertes Wachstum hämatopoetischer Vorläuferzellen zur Folge (Sawyers 1997; Zou und Calame 1999).

ABL2 hingegen ist aufgrund des Fehlens eines NLS nahezu ausschließlich zytoplasmatisch lokalisiert. Es spielt hauptsächlich eine Rolle in der Remodellierung des Zytoskeletts und ist häufig mit F-Aktin-Bündeln in der Zellperipherie assoziiert (Wang et al. 2001; Greuber et al. 2013).

1.4 Die 5'-Fusionspartner

1.4.1 BCR

Das Gen *BCR* wurde erstmals im Zuge seines Rearrangements mit *ABL1* im Philadelphia-Chromosom beschrieben (Groffen et al. 1984). Besonders stark exprimiert wird das ubiquitär vorkommende BCR in der Frühphase der myeloischen Hämatopoese. Das erste Exon codiert eine coiled-coil-Oligomerisierungsdomäne, eine Serin/Threoninkinase-Domäne, in der zwei SH2-Bindungsdomänen liegen, eine GRB2 (growth factor receptor-bound protein 2) Bindungsstelle bei Y177 (Tyrosin an Aminosäurestelle 177) und eine BAP-1 (BCR-assoziiertes Protein) Bindungsstelle. In weiteren Exons folgen ein GEF (guanine nucleotide exchange factor), an dem die ATP-abhängige Helicase XPB (xeroderma pigmentosum Typ B) bindet, eine RacGAP Domäne (Rac GTPase activating protein) sowie ein PDZ-Motiv (PSD95, DLG1, ZO-1) (Peiris et al. 2019).

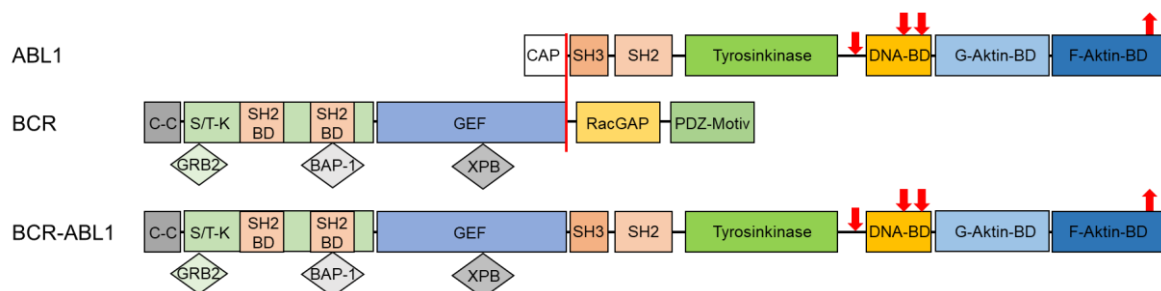


Abbildung 2 Schematische Darstellung des BCR-ABL1 Fusionsproteins. Legende: BD = Bindungsdomäne; Roter Pfeil nach oben = Nukleäres Exportsignal; Roter Pfeil nach unten = Nukleäres Lokalisationssignal; C-C = coiled-coil-Oligomerisierungsdomäne; S/T-K = Serin/Threonin-Kinase; GEF = guanine nucleotide exchange factor; RacGAP = Rac GTPase activating protein; PDZ = PSD95, DLG1, ZO-1; GRB2 = growth factor receptor-bound protein 2; BAP-1 = BCR-assoziiertes Protein; XPB = xeroderma pigmentosum Typ B; Raute = Bindungsstelle des angegebenen Proteins. Der rote Strich kennzeichnet die Position der jeweiligen Bruchpunkte. Modifiziert nach (Greuber et al. 2013; Peiris et al. 2019).

Unter physiologischen Bedingungen kann BCR die Zellproliferation und onkogene Transformation hemmen, indem es die PDZ-Bindungsdomäne von AF-6 (RAS association family 6) bindet. BCR und AF-6 komplexieren anschließend RAS, was zu einer Verminderung der RAS-abhängigen Signalaktivität und damit der proliferativen Wirkung des RAS-Signalweges führt (Radziwill et al. 2003).

Die onkogene Wirkung des BCR-ABL1 Fusionsproteins hat vielfältige Ursachen. Wichtige Mechanismen sind die Bildung von Dimeren/Oligomeren, vermittelt über die coiled-coil-Oligomerisierungsdomäne von BCR sowie das Fehlen des N-terminalen, inhibitorischen Teils des ABL1 Proteins in der Fusion. Beides fördert die Autophosphorylierung und somit die konstitutive Aktivität der ABL1-Tyrosinkinase (Colicelli 2010). Zudem interagieren die SH2-Bindungsdomänen von BCR mit der ABL1 SH2-Domäne, wodurch deren katalytische Wirkung auf die ABL1-Tyrosinkinase gesteigert wird (McWhirter et al. 1993).

Die dauerhaft aktive Kinase phosphoryliert die im BCR-Anteil der Fusion enthaltene GRB2-Bindungsstelle, woraufhin GRB2 binden kann. Im Zusammenspiel mit weiteren Adapterproteinen werden darüber proliferationsfördernde und anti-apoptische Signalwege wie der RAS-MAPK- und der PI3K-AKT-Signalweg aktiviert (Pendergast et al. 1993; Sattler et al. 2002). Außerdem werden biologische Effekte des BCR-ABL1 Fusionsproteins über die direkte Phosphorylierung von STAT-Proteinen vermittelt (Carlesso et al. 1996).

Des Weiteren blockiert BCR die Kernlokalisierung des Fusionsproteins, wodurch die im Kern vermittelte, proliferationshemmende Wirkung von ABL1 eingeschränkt wird (McWhirter und Wang 1991; Dasgupta et al. 2016). Auch das physiologisch in BCR vorhandene PDZ-Motiv, das den RAS-Signalweg hemmt und so tumorsuppressiv fungiert, fehlt im BCR-ABL1 Fusionsprotein (Peiris et al. 2019).

1.4.2 ETV6

ETV6 codiert einen Transkriptionsfaktor der sogenannten ETS-Familie. In Abhängigkeit von interagierenden Proteinen kann ETV6 einen stark repressiven Effekt auf die Transkription ausüben. Besonders in der Embryonalentwicklung sowie in der Regulation der Hämatopoese spielt ETV6 eine wichtige Rolle. Die Exons 3 und 4 von *ETV6* codieren eine Helix-Loop-Helix (HLH) Domäne, die als Homo-Oligomerisierungsdomäne fungiert. Die für die nukleäre Lokalisation und die Bindung spezifischer DNA-Sequenzen wichtige ETS-Domäne wird von den Exons 6 bis 8 codiert. Zwischen der HLH- und der ETS-Domäne liegt die sogenannte „Internal Domain“. Diese vermittelt gemeinsam mit der HLH-Domäne den starken repressiven Effekt auf die Transkription (De Braekeleer et al. 2012; Hock und Shimamura 2017).

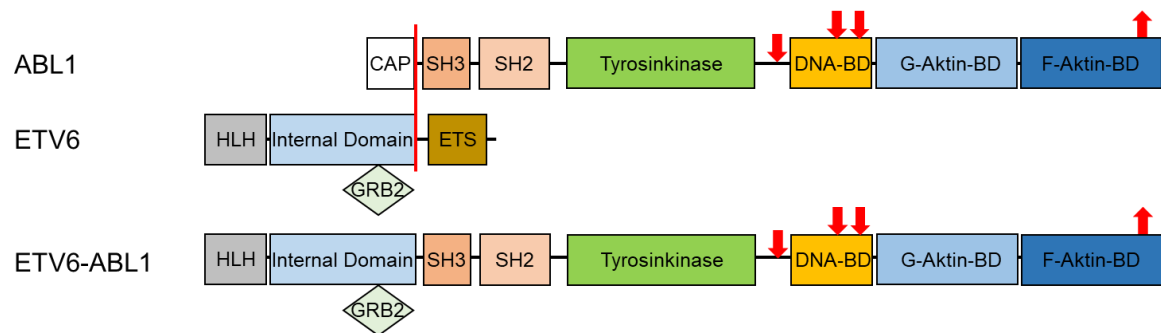


Abbildung 3 Schematische Darstellung des ETV6-ABL1 Fusionsproteins. Legende: BD = Bindungsdomäne; Roter Pfeil nach oben = Nukleäres Exportsignal; Roter Pfeil nach unten = Nukleäres Lokalisationssignal; HLH = Helix-Loop-Helix Domäne; ETS = ETS-Domäne; GRB2 = growth factor receptor-bound protein 2; Raute = Bindungsstelle des angegebenen Proteins. Der rote Strich kennzeichnet die Position der jeweiligen Bruchpunkte. Modifiziert nach (Million et al. 2004; De Braekeleer et al. 2012; Greuber et al. 2013).

ETV6-ABL1 Fusionsproteine sind relativ selten, da aufgrund der unterschiedlichen Orientierung der beiden Gene zum Zentromer mindestens drei Bruchpunkte erforderlich sind (Van Limbergen et al. 2001).

Die Mechanismen, die zur malignen Transformation durch ETV6-ABL1 führen, sind denen der BCR-ABL1 Fusion ähnlich. Dimerisierung des Fusionsproteins – in diesem Fall durch die HLH-Domäne vermittelt –, und das Fehlen des N-terminalen, inhibitorischen Teils des ABL1-Proteins in der Fusion führen auch bei ETV6-ABL1 zur konstitutiven Aktivierung der ABL-Kinase (Golub et al. 1996; Colicelli 2010). Weiterhin spielt auch die Phosphorylierung einer GRB2-Bindungsstelle, die bei ETV6 durch den Tyrosinrest Y314 repräsentiert wird, eine wichtige Rolle, denn diese aktiviert wiederum den RAS-MAPK- und den PI3K-AKT-Signalweg (Million et al. 2004). Zudem ist anzunehmen, dass der Verlust der ETS-Domäne eine zytoplasmatische Lokalisation des Fusionsproteins begünstigt, sodass ETV6 seine physiologische, transkriptionshemmende Wirkung nur eingeschränkt entfalten kann und ebenso die proliferationshemmende Wirkung von nukleär lokalisiertem ABL1 beeinträchtigt wird (Dasgupta et al. 2016; Hock und Shimamura 2017).

1.4.3 RCSD1

RCSD1 codiert das CapZ-interacting protein (CapZIP), das in Immun- und Muskelzellen als Substrat Stress-aktivierter Proteinkinasen (SAPKs) nachgewiesen wurde (Eyers et al. 2005). CapZIP ist ein Downstream-Effektor des Wnt-Signalweges in der Kardiogenese (Hempel et al. 2017). Eine weitere Funktion wird in der Regulierung des Aktin-Zytoskeletts vermutet. Dies geschieht durch die Interaktion mit CapZ, einem direkten Regulator des Aufbaus und der Organisation von Aktinfilamenten. Bei zellulärem Stress wird CapZIP jedoch durch SAPKs phosphoryliert und löst sich daraufhin von CapZ, wodurch es seine regulatorische Wirkung auf CapZ verliert (Eyers et al. 2005; Hernandez-Valladares et al. 2010).

Als Bestandteile von CapZIP sind das CapZ-Interaktionsmotiv (CPI) sowie ein hoch konserviertes NLS beschrieben, welches eine funktionelle Bedeutung der Kernlokalisierung von CapZIP nahelegt (Hernandez-Valladares et al. 2010; Hempel et al. 2017).

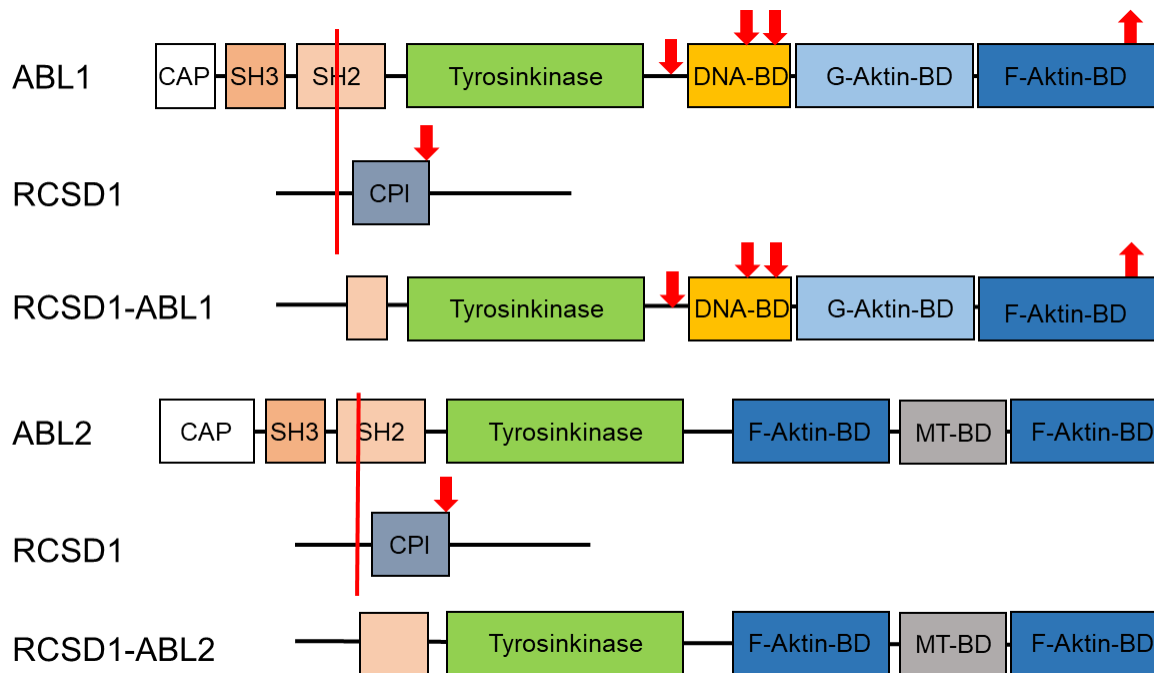


Abbildung 4 Schematische Darstellung der RCSD1-enthaltenden Fusionsproteine. Legende: BD = Bindungsdomäne; MT = Mikrotubuli; Roter Pfeil nach oben = Nukleäres Exportsignal; Roter Pfeil nach unten = Nukleäres Lokalisationssignal; CPI = CapZ-Interaktionsmotiv. Der rote Strich kennzeichnet die Position der jeweiligen Bruchpunkte. (Greuber et al. 2013; Hempel et al. 2017)

Der onkogene Beitrag von RCSD1, das mit 66 Aminosäuren des N-terminalen Teils nur einen geringen Anteil am RCSD1-ABL1 bzw. RCSD1-ABL2 Fusionsprotein ausmacht, ist wenig erforscht. Auf Grundlage der bekannten Funktion von CapZIP werden Veränderungen in der Regulation des Aktin-Zytoskeletts als eine Ursache der Leukämogenese vermutet (De Braekeleer et al. 2011).

Eine Besonderheit der Fusionsproteine RCSD1-ABL1 und RCSD1-ABL2 ist, dass im Gegensatz zu vielen anderen ABL-Fusionsproteinen keine SH3-Domäne und nur eine partiell trunkierte SH2-Domäne enthalten sind (Roberts et al. 2014a). Es wird angenommen, dass ABL-Fusionen mit unvollständigen SH2-Domänen typischerweise mit B-ALL und nicht mit CML assoziiert sind (De Braekeleer et al. 2011; Kamran et al. 2015).

1.4.4 NUP214

Das Nucleoporin NUP214 ist Teil des Nuclear Pore Complex (NPC), der einzigen Kommunikationspforte zwischen Kern und Zytoplasma. Dort vermittelt es den nukleozytoplasmatischen Transport von Proteinen und mRNA über Interaktion mit Proteinen wie

CRM-1 (Chromosomal Maintenance 1) oder NXF1 (nuclear RNA export factor). Weiterhin ist NUP214 an der Regulation von Zellzyklus, Mitose und Genexpression beteiligt (Mendes und Fahrenkrog 2019).

N-terminal enthält NUP214 einen β -Propeller und coiled-coil-Domänen, die nicht wie bei BCR die Oligomerisierung, sondern die Bindung von NUP214 an die zytoplasmatische Seite des NPC vermitteln. Im unstrukturierten C-terminalen Anteil von NUP214 sind zahlreiche FG-Repeats (F = Phenylalanin; G = Glycin) enthalten, die der Bindung von CRM-1 dienen (Simon und Rout 2014).

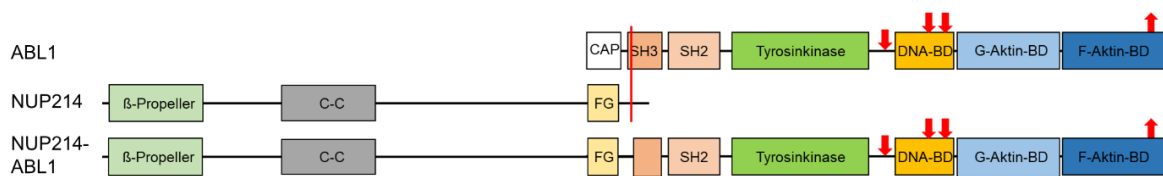


Abbildung 5 Schematische Darstellung des NUP214-ABL1 Fusionsproteins. Legende: BD = Bindungsdomäne; Roter Pfeil nach oben = Nukleäres Exportsignal; Roter Pfeil nach unten = Nukleäres Lokalisationssignal; C-C = coiled-coil-Oligomerisierungsdomäne; FG = FG-Repeats. Der rote Strich kennzeichnet die Position der jeweiligen Bruchpunkte. Modifiziert nach (Greuber et al. 2013; Simon und Rout 2014).

NUP214-ABL1 wird sehr selten in B-ALL aber in ca. 6 % der T-ALL nachgewiesen und ist damit nach *BCR-ABL1* die häufigste ABL1 enthaltende Genfusion in hämatologischen Erkrankungen (Zhou und Yang 2014). Das *NUP214-ABL1* Fusionsgen liegt insbesondere in T-ALL zumeist als episodale, d.h. als extrachromosomale, zirkuläre DNA vor (Graux et al. 2009). Es sind jedoch sowohl für T-ALL als auch für B-ALL Fälle beschrieben, in denen kein Episom nachgewiesen werden konnte, sodass hier von einem intrachromosomalen Vorliegen des *NUP214-ABL1* Fusionsgens auszugehen ist (Graux et al. 2009; Roberts et al. 2012).

Das episodale Material entsteht aus einem Teil der Chromosomenregion 9q34 und enthält das *ABL1*-Gen meist ab Exon 2, das vollständige *LAMC3*-Gen (laminin subunit gamma-3) sowie variable Anteile des *NUP214*-Gens. Durch die Zirkularisierung der DNA entsteht in-frame das *NUP214-ABL1* Fusionsgen, welches die SH2-, SH3- und TK-Domänen von ABL1 sowie den β -Propeller, die coiled-coil-Domänen und FG-Repeats des NUP214-Proteins codiert (Xu und Powers 2009; Zhou und Yang 2014).

Die Amplifikation des episodally vorliegenden Fusionsgens ist ein Kennzeichen der *NUP214-ABL1* positiven Leukämien (Graux et al. 2009). Dies ist von Bedeutung, da sich physiologisch acht nah beieinanderliegende Bindungsstellen für NUP214 am NPC befinden. Durch die Amplifikation konkurriert *NUP214-ABL1* erfolgreich mit endogenem NUP214 und verdrängt dieses vom NPC. So gelangen die Fusionsproteine in enge Nachbarschaft zueinander, was mechanistisch einer Oligomerisierung gleicht. Es kommt zur gegenseitigen

Kreuzphosphorylierung der ABL1-TK-Domänen, die aberrant aktiviert werden (De Keersmaecker et al. 2008a).

Inwiefern das Fusionsprotein zusätzlich den nukleozytoplasmatischen Transport stört und so auch Kinase-unabhängig zur Leukämogenese beiträgt, ist unbekannt (De Keersmaecker et al. 2008a; Xu und Powers 2009). De Keersmaecker et al. beschreiben *NUP214-ABL1* als vergleichsweise schwaches Onkogen gegenüber *BCR-ABL1*, da es für die maligne Transformation von Lymphozyten auf Amplifikation und Einbindung in den NPC angewiesen ist (De Keersmaecker et al. 2008a). Einschränkend ist jedoch zu sagen, dass die bisherigen Erkenntnisse zu *NUP214-ABL1* sich auf T-ALL beziehen und größtenteils an humanen T-ALL Zelllinien gewonnen wurden. Untersuchungen diesbezüglich in B-ALL liegen nicht vor. Weiterhin ist der Transformationsmechanismus von intrachromosomal vorliegenden, nicht amplifizierten *NUP214-ABL1* Fusionsgenen bis dato nicht aufgeklärt.

1.4.5 EBF1-PDGFR β

Als weiterer Vertreter der ABL-Class Kinasen wurde in dieser Arbeit auch PDGFR β in der Fusion mit EBF1 untersucht.

EBF1

Der early B-cell factor (EBF) 1 ist ein im hämatopoetischen System ausschließlich in der B-Zelllinie vorkommender Transkriptionsfaktor. Er ist essenziell für die Entwicklung von frühen B-Vorläuferzellen zu reifen B-Zellen (Boller und Grosschedl 2014). Während eine EBF1-Überexpression zur vorrangigen B-Zell-Differenzierung auf Kosten anderer hämatopoetischer Zelllinien führt, bewirkt eine EBF1-Defizienz einen Mangel an reifen B-Zellen, da die B-Zell-Entwicklung im Stadium der prä-pro-B-Zellen arretiert wird (Lin und Grosschedl 1995; Zhang et al. 2003).

EBF1 besteht aus einer N-terminalen DNA-Bindungsdomäne, einer Immunglobulin-ähnlichen Plexin-Transkriptionsfaktor (IPT)-Domäne sowie einer atypischen, drei Helix-Motive enthaltenden HLH-Domäne, die die Homodimerisierung von EBF1 bestimmen. Am C-Terminus befindet sich die Transaktivierungsdomäne (Hagman et al. 2012; Boller und Grosschedl 2014).

PDGFR β

PDGFR β (Platelet-derived growth factor receptor beta) ist eine Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK), die in der Vaskulogenese und frühen Hämatopoese eine wichtige Rolle spielt (Andrae et al. 2008). Nach Abschluss der Gefäßbildung ist die Expression von PDGFR β

streng reguliert und wird lediglich nach Gefäßverletzungen für Gewebereparatur und Wundheilung aktiviert (Chen et al. 2013).

PDGFR β besteht aus einer extrazellulären Domäne, die der Liganden-Bindung dient und aus fünf Immunglobulin-ähnlichen Domänen gebildet wird sowie einer Transmembran-Helix-Domäne, die die Liganden-vermittelte Konformationsänderung des Rezeptors in das Innere der Zelle überträgt. Intrazellulär folgt eine Juxtamembran-Domäne, die die Autoinhibition der TK-Domäne vermittelt sowie die geteilte TK-Domäne. Der C-Terminus ist in die Ubiquitinierung und den Abbau des Rezeptors involviert (Chen et al. 2013; Appiah-Kubi et al. 2017).

Die Bindung eines PDGF (Platelet-derived growth factor)-Dimers an die extrazellulären Domänen zweier PDGFR β -Rezeptoren bewirkt deren Dimerisierung. Es folgt die Annäherung der intrazellulären Domänen und die Autophosphorylierung von Tyrosinresten, wodurch die Hemmung der Tyrosinkinase durch die Juxtamembran-Domäne aufgehoben wird (Heldin et al. 1998; Chen et al. 2013). Die so entstandenen Phosphotyrosinreste bilden Bindungsstellen für Downstream-Signalmoleküle bekannter Signalwege wie RAS-MAPK, PI3K-AKT und PLC- γ . Die Aktivierung dieser Signalwege bewirkt verstärktes Zellwachstum, Zellmigration, Differenzierung und verminderte Apoptose (Heldin et al. 1998; Andrae et al. 2008; Chen et al. 2013). Typischerweise wird PDGFR β circa 30 - 60 Minuten nach Liganden-Bindung internalisiert und abgebaut, wodurch die Dauer der PDGFR β -Signalaktivität reguliert wird (Heldin et al. 1998).

EBF1-PDGFR β

Das Fusionsgen *EBF1-PDGFR β* entsteht zumeist durch eine Deletion zwischen Exon 15 von *EBF1* und Exon 11 von *PDGFR β* auf Chromosom 5q33 (Roberts et al. 2012; Schwab et al. 2016). Im Fusionsprotein bleibt EBF1 nahezu vollständig erhalten. PDGFR β enthält in der Fusion sowohl die Transmembran- als auch die Tyrosinkinase-Domäne.

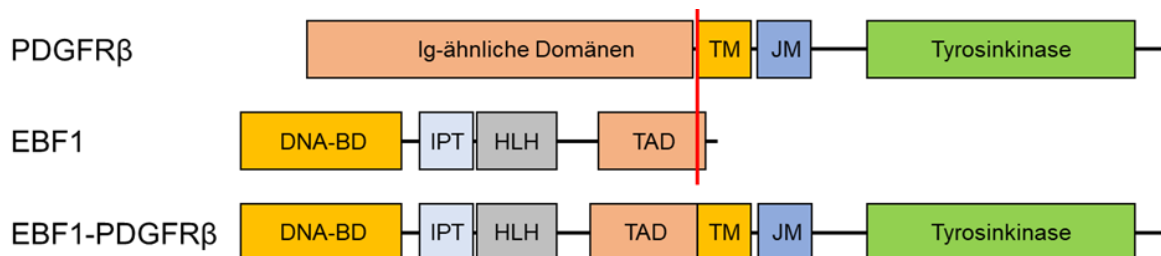


Abbildung 6 Schematische Darstellung des EBF1-PDGFR β Fusionsproteins. Legende: TM = Transmembran-Domäne; JM = Juxtamembran-Domäne; BD = Bindungsdomäne; IPT = Immunglobulin-ähnliche Plexin-Transkriptionsfaktor-Domäne; HLH = Helix-Loop-Helix Domäne; TAD = Transaktivierungs-Domäne. Der rote Strich kennzeichnet die Position der jeweiligen Bruchpunkte. Modifiziert nach (Boller und Grosschedl 2014; Appiah-Kubi et al. 2017; Welsh et al. 2018).

Die Transmembran-Domäne vermittelt die ausschließlich zytoplasmatische Lokalisation des Fusionsproteins, die die Aktivierung von B-Zell spezifischen Genen durch EBF1 im Kern verhindert und folglich die Entwicklung und Reifung von B-Zellen stört. Weiterhin bildet das Fusionsprotein Dimere - vermutlich durch die in EBF1 enthaltene HLH-Domäne bedingt - sodass die Tyrosinkinase dauerhaft Liganden-unabhängig aktiviert wird. Zusätzlich wird das über die Tyrosinkinase vermittelte Proliferationssignal verlängert, da der EBF1-Anteil das Fusionsprotein vor lysosomalem Abbau zu schützen scheint (Hagman und Lukin 2005; Welsh et al. 2018). Diese Kombination aus dem Verlust der zur Differenzierung der B-Zellen notwendigen EBF1-Funktion und der gesteigerten Proliferation durch die konstitutiv aktive Tyrosinkinase ist hier die Grundlage der malignen Transformation.

1.5 Gezielte Therapie der akuten lymphatischen Leukämie

Das übergeordnete Ziel in der Therapie der ALL ist das Erreichen einer dauerhaften Remission, die die vollständige Eradikation des malignen Klon voraussetzt. Wie auch in der Behandlung anderer maligner Erkrankungen sollte die systemische Therapie der hämatologischen Neoplasien maligne Zellen gezielt zerstören und gesundes Gewebe möglichst schonen. Die moderne Behandlung hämatologischer Neoplasien beruht auf kombinatorischer Chemo- und Immuntherapie. Letztere umfasst therapeutische Antikörper und Chimeric-Antigen Receptor tragende T-Zellen (sog. CAR-T Cells) und/oder HSZT. Die therapeutische Bestrahlung des zentralen Nervensystems (ZNS) zur Rezidivprophylaxe oder bei initialem ZNS-Befall kommt nur noch in Ausnahmefällen zur Anwendung (Escherich et al. 2016; Stary und Hrusak 2016; Gökbüget et al. 2020).

Durch stetige Verbesserung der Therapieregime und risikoadaptierte Behandlungsstrategien wurde das Langzeit-Überleben von an ALL erkrankten Kindern und Erwachsenen in den letzten Jahrzehnten enorm gesteigert, während gleichzeitig bei Niedrigrisiko-Patienten eine weniger intensive Behandlung möglich ist (Pulte et al. 2009; Hunger et al. 2012; Pui 2020).

Bei Ph-positiven ALL und den als Hochrisiko eingestuften Fällen der Ph-like ALL bietet sich der Einsatz eines zielgerichteten TKI (z.B. Imatinib) an. Die Behandlungseffizienz der Ph-positiven ALL hat sich durch TKI deutlich verbessert (Fielding et al. 2014; Schultz et al. 2014). Erste Studien zur Ph-like ALL deuten ebenfalls eine Verbesserung der Behandlungsergebnisse an (Weston et al. 2013; Yeung et al. 2015; Tanasi et al. 2019). Dennoch kann es trotz der Kombination von Chemotherapie und Imatinib nach anfänglicher Remission zu Rückfällen durch z.B. Resistenzentwicklung kommen, sodass unter anderem auf zelluläre immuntherapeutische Verfahren zurückgegriffen werden muss (Maude et al. 2014; Martinelli et al. 2017; Stock et al. 2020).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die zur Behandlung von ALL eingesetzten intensiven Chemotherapien und das Verfahren der hämatopoetischen Stammzelltransplantation stellen eine enorme physische und psychische Belastung für die Patienten dar, die im Extremfall bis zum Therapie-assoziierten Tod führen kann. Insbesondere bei pädiatrischen Patienten spielen zudem negative Langzeitfolgen der Therapie wie neurokognitive Beeinträchtigung, Kardiotoxizität, Osteonekrose oder sekundäre Malignome eine Rolle (Silverman 2014). Um die Intensität der Chemotherapie verringern zu können und ohne den Einsatz der HSZT in Hochrisiko-Gruppen wie Ph-positiven und Ph-like ALL eine langfristige Remission zu erreichen, müssen neben i.d.R. Phänotyp-gerichteten, immuntherapeutischen Behandlungsstrategien neue, zielgerichtete Therapien entwickelt werden. Diese Arbeit untersucht in einer vergleichenden Analyse fünf mit Ph-like ALL assoziierte ABL-Class Fusionsproteine sowie BCR-ABL1 hinsichtlich ihrer Expressionsstärke, der Tyrosinphosphorylierung und des Genexpressionsprofils in einem pro-B-Zell-Kontext. Ziel ist dabei die Aufdeckung charakteristischer Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen den Fusionsproteinen, die als Ansätze für die tiefergehende Untersuchung neuer Therapieziele dienen können.

2 Material

2.1 Medien und Reagenzien der zellbiologischen Methoden

Produkt	Hersteller	Unternehmenssitz	Anmerkung
Alexa Fluor™ 488 Phalloidin	Thermo Fisher	Waltham, MA, US	FITC-markiertes Phalloidin
BSA	Sigma-Aldrich/ Merck	St. Louis, MO, US	Bovines Serumalbumin
Cell line Nucleofector® Solution V + Supplement	Lonza	Basel, CH	
Cell Proliferation Reagent WST-1	Roche	Basel, CH	Tetrazoliumsalz Maximale Absorption bei 440nm
DAPI	Thermo Fisher	Waltham, MA, US	4', 6-Diamidin-2-phenylindol; Fluoreszenzfarbstoff
DMSO	Sigma-Aldrich/ Merck	St. Louis, MO, US	Dimethyl-Sulfoxid
FCS	Gibco/ Thermo Fisher	Waltham, MA, US	Fetales Kälberserum
G418-BC	Biochrom AG/ Merck	Berlin, DE	Geneticin
Imatinib-Mesylate	Sigma-Aldrich/ Merck	St. Louis, MO, US	Tyrosinkinase-Inhibitor
IL3	Immunotools	Friesoythe, DE	Murines Interleukin 3
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich/ Merck	St. Louis, MO, US	
PBS	Gibco/ Thermo Fisher	Waltham, MA, US	Phosphate-buffered Saline
Penicillin/ Streptomycin	Gibco/ Thermo Fisher	Waltham, MA, US	Penicillin: 10.000 U/ml, Streptomycin: 10 mg/ml
ProLong Gold Antifade	Invitrogen/ Thermo Fisher	Waltham, MA, US	
RPMI 1640	Gibco/ Thermo Fisher	Waltham, MA, US	+ L-Glutamin
Triton X-100	Sigma-Aldrich/ Merck	St. Louis, MO, US	
Trizol	Invitrogen/ Thermo Fisher	Waltham, MA, US	
Trypanblau	Biochrom AG/ Millipore	Billerica, MA, US	

Tabelle 1 Medien und Reagenzien der zellbiologischen Methoden.

2.2 Medien und Reagenzien der proteinbiochemischen Methoden

Produkt	Hersteller	Unternehmenssitz	Anmerkung
4x NuPAGE™ LDS Sample buffer	Invitrogen/ Thermo Fisher	Waltham, MA, US	
Amersham™ ECL™ Western Blotting Detection Reagent	GE healthcare	Chalfont St. Giles, GB	
DTT	Sigma-Aldrich/Merck	St. Louis, MO, US	1, 4-Dithiothreitol
Magermilchpulver	Spinrad	Bad Segeberg, DE	
NuPAGE™ Antioxidans	Invitrogen/ Thermo Fisher	Waltham, MA, US	
NuPAGE™ MES SDS-Running buffer	Invitrogen/ Thermo Fisher	Waltham, MA, US	
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo scientific/ Thermo Fisher	Waltham, MA, US	

Tabelle 2 Medien und Reagenzien der proteinbiochemischen Methoden.

2.3 Primäre Antikörper

Zielprotein	Klon	Spezies	Hersteller	Unternehmenssitz	Verdünnung
ABL1	Polyklonal	Kaninchen	Cell Signaling	Danvers, MA, US	1:1.000
Flag	M2	Maus	Sigma	St. Louis, MO, US	1:1.000
GAPDH	14C10	Kaninchen	Cell Signaling	Danvers, MA, US	1:1.000
Phospho-Tyrosin	4G10	Maus	Merck	Darmstadt, DE	1:12.500
Stat3	Polyklonal	Kaninchen	Cell Signaling	Danvers, MA, US	1:1.000
Stat5	D206Y	Kaninchen	Cell Signaling	Danvers, MA, US	1:1.000
pStat3 (Tyr705)	D3A7	Kaninchen	Cell Signaling	Danvers, MA, US	1:1.000
pStat5 (Tyr694)	D47E7	Kaninchen	Cell Signaling	Danvers, MA, US	1:1.000

Tabelle 3 Primäre Antikörper. Verdünnung = Primärantikörperverdünnung für Western Blot Analysen mit TBS-T.

2.4 Sekundäre, HRP-markierte Antikörper

Zielspezies	Spezies	Hersteller	Unternehmenssitz	Verdünnung
Maus	Ziege	Dako/ Agilent	Santa Clara, CA, US	1:5.000
Kaninchen	Ziege	Dako/ Agilent	Santa Clara, CA, US	1:5.000

Tabelle 4 Sekundäre Antikörper. Verdünnung = Sekundärantikörperverdünnung für Western Blot Analysen mit TBS-T.

2.5 Fluoreszenzmarkierte Antikörper

Zielspezies	Spezies	Fluoreszenzfarbstoff	Hersteller	Unternehmenssitz	Verdünnung
Maus	Ziege	Alexa Fluor™ 555	Cell Signaling	Danvers, MA, US	1:1.000

Tabelle 5 Fluoreszenzmarkierte Antikörper.

2.6 Kits

Kit	Hersteller	Unternehmenssitz
Pierce™ Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit	Thermo Fisher	Waltham, MA, US
Amaxa® Cell Line Nucleofector® Kit V	Lonza	Basel, CH

Tabelle 6 Kits.

2.7 Puffer

Die Reagenzien für die Puffer wurden, insofern nicht anders vermerkt, von *Merck* (Darmstadt, DE), *Roth* (Karlsruhe, DE) oder *Sigma-Aldrich* (St. Louis, MO, US) bezogen und mit doppelt deionisiertem Wasser (ddH₂O) angesetzt.

Puffer	Zusammensetzung
KLB-Puffer	25 mM Tris; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 10 % Glycerol; 1 % Triton X-100; 10 mM Na-Pyrophosphat; 1 mM Na-Orthovanadat; 10 mM Glycerolphosphat Zugabe direkt vor Anwendung: 10 µl/ml 0,1 M PMSF; 10 µl/ml 3-7 TIU/mg Aprotinin; 1 µl/ml 1M DTT; 20 µl/ml 0,5 M NaF; 2µl/ml Pervanadat (frisch angesetzt aus 50 µl Orthovanadat (50 mM) + 8 µl H ₂ O ₂ , bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert)
CAPS-Transferpuffer	0,01 M CAPS pH11; 20 % Methanol
TBS-T	150 mM NaCl; 10mM Tris/ HCl pH8; 0,05 % Tween 20
BSA-Puffer	1 % BSA; 0,3 % Triton X-100; 4 % FCS in PBS

Tabelle 7 Puffer-Zusammensetzung.

2.8 Fusionsproteine

Fusionsprotein	Uniprot-Nr./ AS 5'	Uniprot-Nr./ AS 3'
BCR-ABL1	BCR: P11274/ AS 1-902	ABL1: P00159/ AS 27-1130 b2-a2 Fusion
EBF1-PDGFRβ	EBF1: Q9UH73/ AS 1-582	PDGFRβ: P09619/ AS 527-1106
ETV6-ABL1	ETV6: P41212/ AS 1-336	ABL1: P00159/ AS 27-1130 Isoform a
NUP214-ABL1	NUP214: P35658/ AS 1-2071	ABL1: P00159/ AS 85-1130 Iso- form a
RCSD1-ABL1	RCSD1: Q6JBY9/ AS 1-66	ABL1: P00159/ AS 184-1130 Isoform a
RCSD1-ABL2	RCSD1: Q6JBY9/ AS 1-66	ABL2: P42684/ AS 230-1079 Isoform 5

Tabelle 8 Aufbau der Fusionsproteine mit Uniprot-Identifizierung und Größe der Proteinf Fragmente. AS = Aminosäure

2.9 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller	Unternehmenssitz
1,5 ml Eppendorf-Tube	Eppendorf	Hamburg, DE
12- bzw. 96-Well-Platte	Sarstedt	Nümbrecht, DE
15 ml Zentrifugenröhrchen	Greiner	Kremsmünster, AT
Cryotube®	NUNC®/ Thermo Fisher	Waltham, MA, US
Immobilon®-P PVDF-Membran	Merck	Darmstadt, DE
NuPAGE™ 4-12 % Bis-Tris-Gele	Invitrogen/ Thermo Fisher	Waltham, MA, US
Röntgenfilme	CEA	Assamstadt, DE
T25- bzw. T75-Zellkulturflaschen	Sarstedt	Nümbrecht, DE

Tabelle 9 Verbrauchsmaterialien.

2.10 Geräte

Gerät	Hersteller	Unternehmenssitz
Amaxa Nucleofector® II	Lonza	Basel, CH
Heizblock	Grant	Cambridge, UK
Inkubator Hera cell 240	Heraeus	Hanau, DE
Mikroskop Leica DM IL	Leica Biosystems	Nußloch, DE
Neubauer-Zählkammer	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, DE
Platten-Reader Infinite M200	Tecan	Männedorf, CH
Reagenzglasschüttler Unitexer	LLG labware	Meckenheim, DE
Röntgenfilm-Entwickler Structurix M ECO	GE healthcare	Chalfonts St. Giles, GB
TE22 tank transfer unit	GE healthcare	Chalfont St. Giles, GB
Zentrifuge Cytospin 4	Thermo scientific	Waltham, MA, US
Zentrifuge Heraeus™ Fresco™ 21 Mikrozentrifuge	Thermo scientific	Waltham, MA, US
Zentrifuge Multifuge 3s-R	Heraeus	Hanau, DE

Tabelle 10 Geräte.

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

Alle Versuche wurden an Ba/F3-Zellen, einer IL3-abhängigen, murinen pro-B-Zelllinie, durchgeführt. Die Zellen wurden kommerziell bezogen und nach den Empfehlungen der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) kultiviert.

3.1.1 Kultivierung der Ba/F3-Zellen

Die Ba/F3-Zellen wurden in T25- bzw. T75-Zellkulturflaschen für Suspensionszellen (*Sarstedt*, Nümbrecht, DE) bei 37 °C und 5 % CO₂ (*Hera cell 240*, *Heraeus*, Hanau, DE) in Kulturmedium (Tabelle 11) nach Angaben der DSMZ kultiviert. Die Zellpopulationen wurden je nach Zelldichte alle 2-3 Tage passagiert, sodass die Zelldichte stets unter 2x10⁶ Zellen/ml lag. Dafür wurden die Zellen zunächst unter dem Mikroskop (*Leica DM IL*, *Leica Biosystems*, Nußloch, DE) im Phasenkontrast begutachtet und die Zellsuspension anschließend im erforderlichen Verhältnis mit frischem Kulturmedium verdünnt. War ein vollständiger Wechsel des Kulturmediums erforderlich, so wurden die Zellen in 15 ml Zentrifugenröhrchen (*Greiner*, Kremsmünster, AT) überführt und für 10 min bei 90 g zentrifugiert (*Multifuge 3s-R*, *Heraeus*, Hanau, DE). Der gesamte Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in frischem Kulturmedium aufgenommen und in Zellkulturflaschen ausgesetzt.

Zellen	Kulturmedium
Unbehandelte Ba/F3	RPMI 1640 + 10 % FCS h.i. + 1 % P/S + IL3 _{10ng/ml}
Stabil transfezierte Ba/F3	RPMI 1640 + 10 % FCS h.i. + G418 _{750µg/ml} + IL3 _{10ng/ml}
Stabil transfezierte, IL3-unabhängige Ba/F3	RPMI 1640 + 10 % FCS h.i. + G418 _{750µg/ml}

Tabelle 11 Kulturmedien. h.i.= Hitze-inaktiviert bei 56 °C für 30 min; P/S = Penicillin/Streptomycin

3.1.2 Kryokonservierung der Zellen

Für die Herstellung der Kryostocks von Ba/F3-Zellen wurde die jeweilige Zellsuspension für 10 min bei 90 g zentrifugiert (*Multifuge 3s-R*). Der Überstand wurde bis auf 1 ml abgesaugt und das Zellpellet darin resuspendiert. 700 µl dieser Zellsuspension wurden mit 200 µl FCS *h.i.* und 100 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) versetzt, in einem *Cryotube*[®] (*NUNC*[®]/*Thermo Fisher*, Waltham, MA, US) für eine Stunde bei –20 °C vorgekühlt und anschließend bei –80 °C eingefroren. Die Langzeitlagerung der Zellen erfolgte bei –200 °C im Stickstofftank.

3.1.3 Auftauen der Zellen

Die bei -80 °C gelagerten Kryostocks der Ba/F3-Zellen wurden in einem Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Die aufgetaute Zellsuspension wurde in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen mit 5 ml vorgewärmtem Kulturmedium überführt und für 10 min bei 90 g zentrifugiert (*Multifuge 3s-R*). Durch Abnahme des Überstandes wurde das DMSO-haltige Gefriermedium entfernt. Das Zellpellet wurde anschließend in 5 ml frischem Zellkulturmedium resuspendiert und die Zellsuspension für die Kultivierung in T25-Zellkulturflaschen ausgesät.

3.1.4 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl der Ba/F3-Zellen wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (*Carl Roth GmbH*, Karlsruhe, DE) mit Kammerfaktor 1:10.000 nach Herstellerprotokoll bestimmt. Zur Anfärbung der toten Zellen wurde Trypanblau in einer 1:1 Verdünnung mit der Zellsuspension verwendet.

3.1.5 Transfektion der Ba/F3-Zellen mit AMAXA®

Für die Transfektion wurden 6×10^6 Ba/F3-Zellen für 10 min bei 90 g in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen zentrifugiert (*Multifuge 3s-R*). Anschließend wurde das Zellpellet für 4 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Der Überstand wurde vollständig abgesaugt. Die Transfektion der Ba/F3-Zellen wurde in Anlehnung an das *Amaxa® Cell Line Nucleofector® Kit V*-Protokoll für Ba/F3-Zellen durchgeführt. Hierfür wurde das Zellpellet in 100 μl *Cell line Nucleofector® Solution V + Supplement* aufgenommen und mit 10 μg DNA des zu transfezierenden Vektorkonstrukts vermischt. Der für die Transfektion vorbereitete Ansatz wurde in eine Küvette überführt und die Transfektion unter dem Programm X-001 mit einem *Amaxa Nucleofector® II* (*Lonza*, Basel, CH) durchgeführt. Anschließend wurden 500 μl auf 37 °C vorgewärmtes Kulturmedium zugegeben und der gesamte Ansatz mit einer Pasteurpipette vorsichtig zu 1 ml vorgewärmtem Kulturmedium in eine 12-Well-Platte (*Sarstedt*, Nümbrecht, DE) überführt. Das Kulturmedium enthielt RPMI 1640 + 10 % FCS h.i. + 10 ng/ml IL3. Nach 48 h wurden 750 $\mu\text{g/ml}$ G418 (Geneticin) zur Selektion der transfezierten Zellen hinzugefügt.

3.1.6 Isolation von Einzelzellklonen

Zunächst wurde die Zellzahl bestimmt (siehe Kapitel 3.1.4). Anschließend wurde eine Zellsuspension mit 2,5 Zellen/ml hergestellt. Davon wurden 200 μl pro Vertiefung in eine 96-Well-Platte ausgesät.

3.1.7 Zellviabilitätsbestimmung per WST-Assay

Zur Ermittlung der Zellviabilität wurde ein kolorimetrischer Assay durchgeführt. Nach Bestimmung der Zellzahl wurde die Zellsuspension auf 100.000 Zellen/ml verdünnt. Je 100 µl dieser Zellsuspension wurden pro Vertiefung in eine 96-Well-Platte pipettiert und diese dann bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Zur Bestimmung der Zellviabilität wurden am Tag der Messung 10 µl *Cell Proliferation Reagent WST-1* hinzugefügt. Nach 2 Stunden Inkubationszeit im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde die Messung der Absorption mittels eines *Infinite M200* (Tecan, Männedorf, CH) nach dem Protokoll der Firma Roche durchgeführt (Messwellenlänge: 440 nm; Referenzwellenlänge: 600 nm).

3.1.7.1 IL3-Entzugs-Assay

Zur Bestimmung der Zellviabilität nach IL3-Entzug wurde ein WST-Assay durchgeführt. Dafür wurde die Zellsuspension zunächst in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 10 min bei 90 g zentrifugiert (*Multifuge 3s-R*), der Überstand wurde verworfen. 1 ml PBS wurde auf das Zellpellet gegeben und erneut für 5 min bei 90 g zentrifugiert. Anschließend wurde das PBS verworfen und das Zellpellet in Kulturmedium ohne IL3 aufgenommen. Im Anschluss wurden die Zellen nach dem in Kapitel 3.1.7 beschriebenen Schema ausgesät.

3.1.7.2 Zellviabilitätsbestimmung nach Imatinib-Behandlung

Zunächst wurden die Zellen gezählt und in eine 96-Well-Platte pipettiert, diese wurde für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, bevor in jede Vertiefung Imatinib in der vorgesehenen Konzentration hinzugefügt wurde. Die behandelten Zellen wurden für 48 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde die Zellviabilität, wie in Kapitel 3.1.7 beschrieben, bestimmt.

3.1.8 Bradford-Test

Zur quantitativen Proteinbestimmung wurde ein Bradford-Test nach Herstellerangaben durchgeführt (*Pierce™ Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit, Thermo Fisher, Waltham, MA, US*). Die Messung erfolgte im *Infinite M200* bei einer Wellenlänge von 595 nm.

3.1.9 Herstellung von Zelllysat

Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 10 min bei 90 g zentrifugiert (*Multifuge 3s-R*). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 1 ml PBS

bedeckt und erneut für 5 min bei 90 *g* zentrifugiert. Das PBS wurde verworfen und das Zellpellet in KLB-Puffer resuspendiert. Die Inkubation erfolgte für 30 min auf Eis. Danach wurde das Lysat in ein 1,5 ml *Eppendorf-Tube* (*Eppendorf*, Hamburg, DE) überführt und für 10 min bei 4 °C und 13.000 rpm zentrifugiert (*Heraeus™ Fresco™ 21 Mikrozentrifuge*, *Thermo scientific*, Waltham, MA, US). Das im Überstand enthaltene Lysat wurde direkt weiterverarbeitet oder bei –80 °C gelagert.

3.1.10 RNA-Sequenzierung (RNA-Seq)

Um einheitliche Bedingungen zu schaffen, wurden 1×10^6 Zellen in 5 ml Medium in eine T25-Zellkulturflasche ausgesät und für 2 Tage inkubiert (37 °C, 5 % CO₂). Anschließend wurden die Zellen erneut gezählt und $1,5 \times 10^6$ Zellen in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen für 10 min bei 90 *g* zentrifugiert (*Multifuge 3s-R*). Das überstehende Medium wurde abgenommen und die RNA nach Zugabe von *TRIzol®*-Reagenz entsprechend den Herstellerangaben isoliert. Durchgeführt wurde die RNA-Seq in Kooperation mit Dr. Daniela Indenbirken am Leibniz-Institut für Virologie (LIV) Hamburg in der Forschungsgruppe für Virusgenomik unter Leitung von Prof. Dr. Adam Grundhoff. Die Auswertung erfolgte in der Bioinformatik-Facility des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE) in Zusammenarbeit mit Michael Spohn.

3.1.11 Zytospin und Zellfärbung

Nach Bestimmung der Zellzahl wurden 5×10^4 Zellen, enthalten in 200 µl Zellsuspension, für 5 min bei 600 rpm (*Cytospin 4*, *Thermo scientific*, Waltham, MA, US) auf einen Objektträger zentrifugiert. Zur Fixierung wurden die Zellen für 15 min bei Raumtemperatur mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit PBS wurde mit BSA-Puffer für 15 min in der Feuchtkammer blockiert. Es folgte die Zugabe des Flag-Antikörpers, 1:500 in BSA-Puffer verdünnt, und Inkubation für 2 h bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde der fluoreszenzmarkierte Antikörper 1:1.000 in PBS verdünnt und zugegeben. Nach Inkubation für 1 h im Dunklen bei Raumtemperatur folgte zweimaliges Waschen mit PBS und anschließend eine 30-sekündige Inkubation mit DAPI (1:1.000 in PBS verdünnt). Nach einmaligem Waschen mit PBS erfolgten 30 Sekunden Inkubation mit Alexa Fluor™ 488 Phalloidin (1:1.000 in PBS verdünnt). Zuletzt wurden die Deckgläschen mit *ProLong Gold Antifade* fixiert.

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe wurde eine SDS-PAGE durchgeführt. Der Probenansatz wurde in einem 1,5 ml *Eppendorf*-Tube aus 65 % Zellysat, 10 % 0,5 M DTT und 25 % *4x NuPAGE™ LDS Sample buffer* hergestellt. Er wurde für 1 s mittels *Unitexer* (*LLG labware*, Meckenheim, DE) gemischt und dann für 5 min bei 95 °C im Heizblock (*Grant*, Cambridge, GB) erhitzt. Anschließend wurden die Proben auf *NuPAGE™ 4-12 % Bis-Tris-Gele* (*Invitrogen/ Thermo Fisher*, Waltham, MA, US) aufgetragen. Als Puffer wurde *NuPAGE™ MES SDS-Running buffer* mit 0,5 ml *NuPAGE™ Antioxidans* und als Größenstandard *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 180 Volt.

3.2.2 Western Blot

Nach der Auftrennung der Proteine in der SDS-PAGE erfolgte der Nachweis relevanter Proteine mittels spezifischer Antikörper. Dafür wurden die Proteine zunächst in einer *TE22 tank transfer unit* (*GE healthcare*, Chalfont St. Giles, GB) von dem Polyacrylamidgel auf eine zuvor mit Methanol aktivierte *Immobilon®-P* PVDF-Membran (*Merck*, Darmstadt, DE) übertragen. Der Transfer erfolgte bei 400 mA für 2 Stunden bei 4 °C in CAPS-Puffer. Anschließend wurde die Membran für 30 min in 10 %-iger in TBS-T gelöster Magermilchpulverlösung blockiert. Die Inkubation der Antikörper erfolgte entweder bei 4 °C über Nacht (primäre Antikörper) oder für eine Stunde bei Raumtemperatur (sekundäre Antikörper; direkt-markierte primäre Antikörper). Alle Waschschriffe wurden mit TBS-T durchgeführt. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte durch eine Chemolumineszenzreaktion. Dafür wurde die Membran mit *Amersham™ ECL™ Western Blotting Detection Reagent* behandelt und das Signal in der Dunkelkammer auf Röntgenfilme (*CEA*, Assamstadt, DE) übertragen. Diese wurden am *Structurix M ECO* (*GE healthcare*, Chalfonts St. Giles, GB) entwickelt.

3.3 Konfokale Laserscanningmikroskopie

Für die konfokale Laserscanningmikroskopie wurden entweder ein *Nikon C2+* Mikroskop oder ein *Nikon A1R* Mikroskop verwendet. Das *Nikon C2+* Mikroskop war ausgestattet mit 4 Lasern: ein 405 nm Diodenlaser (100 mW, *Coherent Inc.* Santa Clara, CA, US), ein 488 nm DPSS-Laser (10 mW, *Melles Griot GmbH*, Bensheim, DE), ein 543 nm HeNe-Laser (5 mW, *Melles Griot GmbH*, Bensheim, DE) und ein 642 nm Diodenlaser (45 mW, *Melles Griot GmbH*, Bensheim, DE). Die Bilder wurden mit einem 20x Luftobjektiv (CFI Plan Apochromat Lambda 20X, NA: 0.75, *Nikon GmbH*, Chiyoda, JP) aufgenommen. Das Nikon

A1R Mikroskop war ausgestattet mit 4 Festfasenlasern: 405 nm, 489 nm, 562 nm, 638 nm. Die Bilder wurden mit einem 60x Ölimmersionsobjektiv (CFI Plan Apochromat Lambda 60X Oil, NA: 1.4, *Nikon GmbH*, Chiyoda, JP) aufgenommen.

3.4 Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)

Die GSEA der im Vergleich zur Leervektorkontrolle differentiell regulierten Gene ($|\log_2\text{fold-change}| \geq 1$; $\text{FDR} < 0,1$) wurde mit der Cytoscape (Version 3.7.2) App ClueGO (Version 2.5.6) für KEGG- und Reactome-Signalwege durchgeführt (Bindea et al. 2009; Bindea et al. 2013), wobei nur proteincodierende Gene in die Analyse einfließen. ClueGO ordnet zunächst die differentiell regulierten Gene Funktionskategorien, sogenannten Terms, zu. Basierend auf gemeinsamen Genen ($\text{Kappa Score} \geq 0,4$) werden die signifikant angereicherten Terms zu Gruppen zusammengefasst, ein Term kann hier auch Teil mehrerer Gruppen sein. Stimmen Gruppen in mindestens 50 % ihrer enthaltenen Gene und Terms überein, werden sie zu einer Gruppe subsummiert. Eine Gruppe wird durch den signifikantesten Term („leading term“) repräsentiert. Ist ein Term „leading term“ mehrerer Gruppen, so wird in den folgenden Gruppen der nächst signifikante Term als „leading term“ ausgezeichnet. Zur Verbesserung der Übersichtlichkeit wurden die durch ClueGO erstellten Gruppen anschließend anhand der „leading terms“ manuell den fünf Kategorien „Immunsystem“, „PIP-Metabolismus/PI3K“, „Malignom-assoziiert“, „Regulation des Zell-Zell Kontakts“ und „Weitere“ zugeordnet. Die Kategorie „Weitere“ umfasste alle Gruppen, die in keine der genannten Kategorien eingeordnet werden konnten.

4 Ergebnisse

Ph-like ALL ist ein erstmals 2009 von den Boer et al. sowie Mullighan et al. beschriebener ALL-Subtyp mit ungünstiger Prognose, welcher sich durch ein den Ph-positiven ALL ähnliches Genexpressionsprofil auszeichnet (Den Boer et al. 2009; Mullighan et al. 2009). Die Mehrzahl der Ph-like ALL wird durch genomische Veränderungen verursacht, die Proteinkinasen konstitutiv aktivieren. Dabei kann es sich entweder um Veränderungen in Proteinkinase- oder Zytokin-Rezeptor-Genen handeln (Roberts et al. 2014a). In bis zu 14 % der Ph-like ALL bilden sogenannte ABL-Class Tyrosinkinasen (*ABL1*, *ABL2*, *CSF1R* oder *PDGFRβ*) den 3'-Anteil des entstehenden Fusionsgens (Reshmi et al. 2017). Der 5'-Anteil der Fusionsgene ist sehr variabel; er vermittelt meist die Dimerisierung des entstehenden Fusionsproteins und aktiviert so konstitutiv die Tyrosinkinase (siehe Kapitel 1.4). Die Integration mutations-spezifischer TKI in risiko-adaptierte, intensivierete Chemotherapie-Protokolle führte zu verzögertem Auftreten, aber letztlich oft nicht zur Verhinderung von Rezidiven. Die Nebenwirkungen der intensivierten Behandlung sind oft schwerwiegend und neu auftretende Resistenzen gegenüber den eingesetzten TKI stellen ein signifikantes klinisches Problem dar. Diese Arbeit fokussiert daher auf die Charakterisierung und vergleichende Analyse der durch verschiedene 5'-Partner (hier untersucht: BCR, ETV6, RCSD1, NUP214 und EBF1) entstehenden Fusionsproteine, mit dem Ziel so neue, gegebenenfalls noch unbekannte therapeutische Zielstrukturen zu identifizieren und charakteristische Unterschiede zwischen den Fusionsproteinen herauszuarbeiten.

4.1 Etablierung des Testsystems

Als Testsystem wurde die erstmals von Palacios und Steinmetz beschriebene IL3-abhängige, murine, pro-B-Zelllinie Ba/F3 ausgewählt (Palacios und Steinmetz 1985). In dieser Zelllinie wurde die transformierende Wirkung von BCR-ABL1 nachgewiesen und sie wird auch heute vielfach in der Erforschung von Kinase-getriebenen Fusionsproteinen eingesetzt (Daley und Baltimore 1988; Warmuth et al. 2007). Wachstumsfaktor-Unabhängigkeit ist ein relevantes Kriterium onkogener Aktivität. In dem hier gewählten zellulären System führt die Expression von Onkogenen oder konstitutiv aktiven Tyrosinkinasen zu IL3-unabhängigem Wachstum. Bei Hemmung der Tyrosinkinasen durch TKI wird Apoptose der Kinase-getriebenen Ba/F3-Zellen ausgelöst, sodass diese sich nicht nur zur Überprüfung der Onkogenität eignen, sondern auch zur Messung der Inhibitor-Sensitivität von exprimierten Fusionsproteinen (Warmuth et al. 2007).

Die in dieser Arbeit verwendeten Fusionsgene wurden zunächst von Dr. Sophia Buhs nach der 2014 von Roberts et al. publizierten Beschreibung kloniert und in einen pCMV6-AC-

IRES-GFP-Vektor eingebracht (Abbildung 7) (Roberts et al. 2014a). Anschließend wurden Ba/F3-Zellen mit diesen Vektorkonstrukten per Amaxa®-Nucleofektion transfeziert.

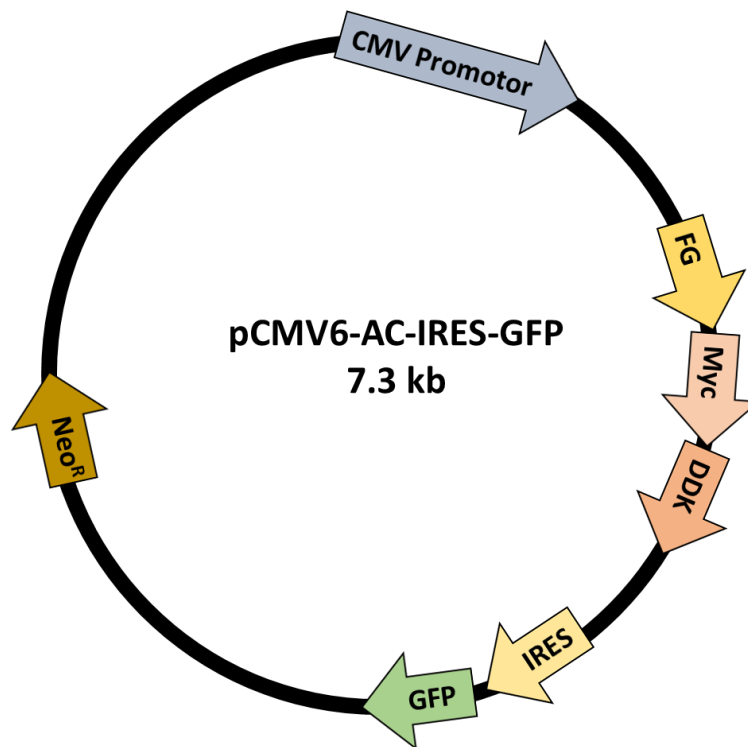


Abbildung 7 Schematische Darstellung des verwendeten Expressionsvektors. Legende: CMV= Cytomegalie Virus; FG= Fusionsgen ist C-terminal Myc und Flag (DDK) markiert; IRES= Interne ribosomale Eintrittsstelle; GFP= Grün fluoreszierendes Protein; Neo^R= Neomycin Resistenz. Abbildung modifiziert nach Origene (Origene 2019).

4.1.1 GFP-Reporter Expression nach Transfektion des Expressionsvektors in Ba/F3-Zellen

Nach der Transfektion wurden die Ba/F3-Zellen über die im pCMV6-AC-IRES-GFP-Vektor enthaltene Neomycin-Resistenz mit G418 selektiert. Bei erfolgreicher Transfektion überleben die Zellen diese Selektion und das grün fluoreszierende Reporter-Protein (GFP) wird dauerhaft über die interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) des Vektors exprimiert. Die GFP-Expression als Marker für erfolgreiche Transfektion wurde fluoreszenzmikroskopisch in allen Kulturen nachgewiesen (Abbildung 8). Die Expressionsstärke der klonalen, biologischen Triplikate zeigte sich untereinander weitgehend konstant; sie variierte jedoch zwischen den einzelnen Fusionsproteinen. Insbesondere EBF1-PDGFR β , NUP214-ABL1 und RCSD1-ABL1 zeigten sehr starke Fluoreszenzsignale. ETV6-ABL1 zeigte im Vergleich dazu ein leicht abgeschwächtes Signal und für RCSD1-ABL2 waren nur wenige GFP-exprimierende Zellen nachzuweisen.

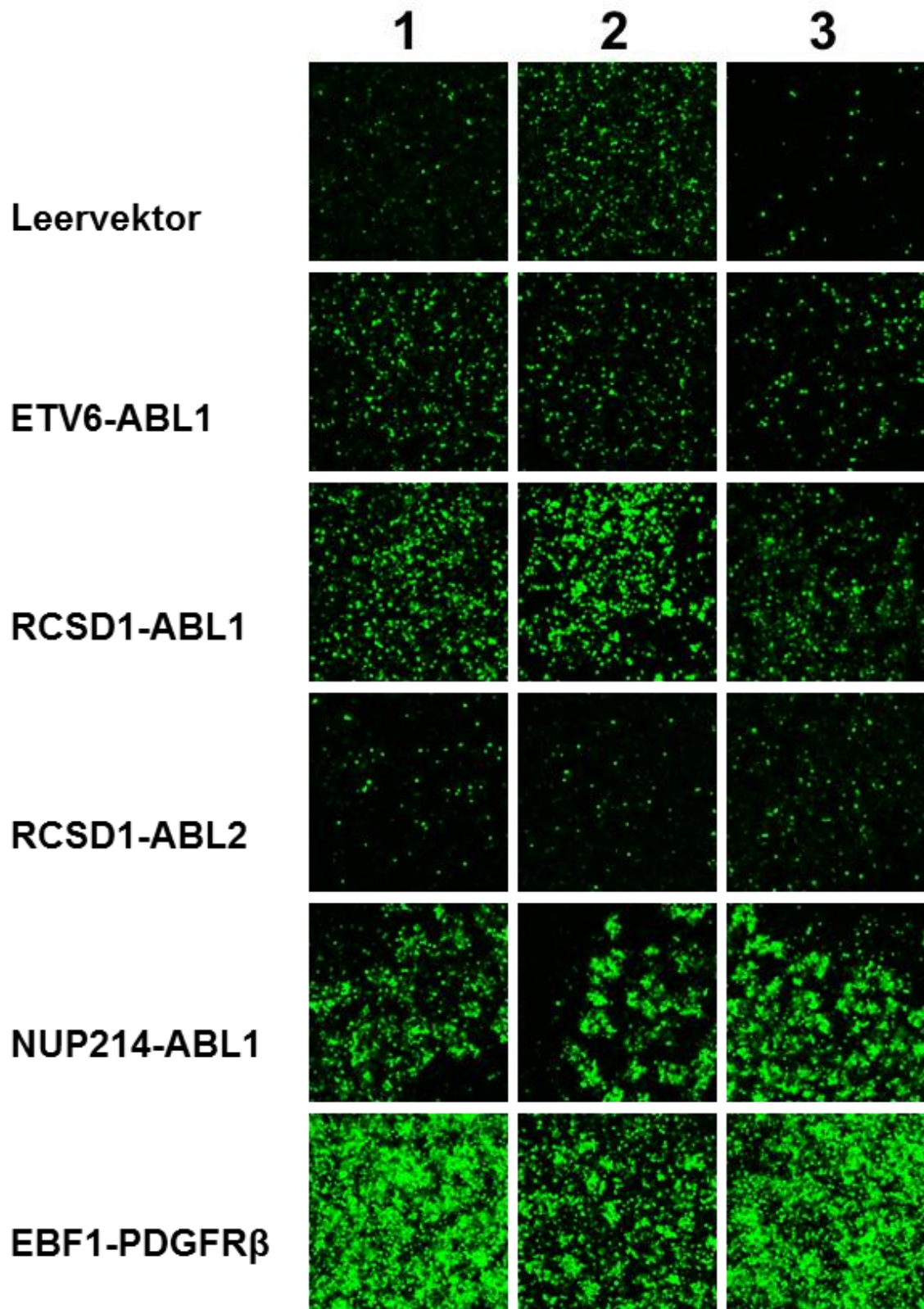


Abbildung 8 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der GFP-Expression in stabil transfezierten Ba/F3. Die verschiedenen Ba/F3 Zellklone (1-3) wurden mit der in einen pCMV6-AC-IRES-GFP-Vektor klonierten DNA der Fusionsgene oder Leervektor transfeziert. Wachstum und Selektion in Anwesenheit von IL3 und G418. Gezeigt sind klonale, biologische Triplikate je Fusionsgen. Mikroskopie in Kooperation mit Dr. Dennis Eggert, LIV, Hamburg.

4.1.2 Selektionswege

Die Herstellung IL3-unabhängiger, stabil transfezierter, klonaler Kulturen erfolgte je nach Konstrukt auf unterschiedliche Art und Weise (Abbildung 9); Konstrukt bezeichnet im Folgenden mit einem Fusionsgen stabil transfezierte Ba/F3-Zellen. Unter Expression von *BCR-ABL1* wurde eine duale Selektion - mit IL3-Entzug unmittelbar nach Transfektion und G418-Zugabe 48 h nach Transfektion - erfolgreich durchgeführt. Klonale *BCR-ABL1* exprimierende Kulturen wurden nach dem Auswachsen isoliert. Die mit den weiteren ABL1-enhaltenden Fusionsgenen (*NUP214-ABL1*, *ETV6-ABL1*, *RCSD1-ABL1*) transfezierten Ba/F3-Zellen wurden unter G418 Selektion in IL3-supplementierter Kultur über zwei Wochen selektioniert. Anschließend wurden Zellklone isoliert und nach dem Auswachsen klonaler Kulturen konnte IL3 dem Kulturmedium entzogen werden. Mit *RCSD1-ABL2* oder *EBF1-PDGFR β* transfezierte Ba/F3-Zellkulturen wurden ebenfalls über zwei Wochen mit G418 selektioniert. Zudem musste vor der Isolation der klonalen Kulturen eine zusätzliche Selektion per IL3-Entzug stattfinden, um im Folgenden IL3-unabhängige, klonale Kulturen effizient generieren zu können, da trotz stabiler Transfektion nur wenige Zellen IL3-unabhängig auswuchsen (Abbildung 9).

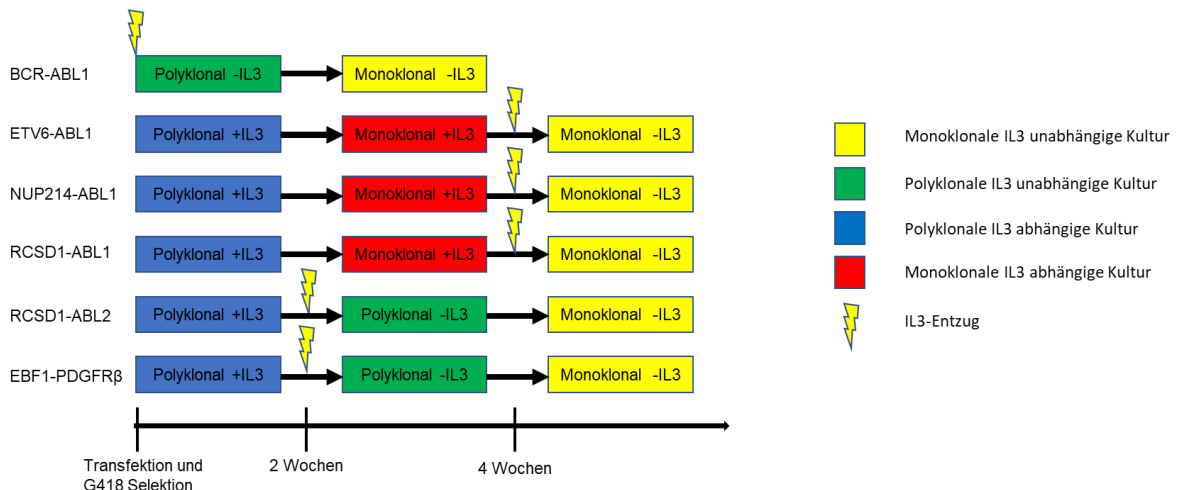


Abbildung 9 Selektionswege der mit Fusionsgenen transfezierten Ba/F3-Zellkulturen zu monoklonalen IL3-unabhängigen Kulturen. Ba/F3-Zellen wurden mit in einen pCMV6-AC-IRES-GFP-Vektor klonierter DNA der Fusionsgene transfeziert. Anschließend wurden die Ba/F3-Zellen ab 48 h nach Transfektion mit G418 selektioniert und zu verschiedenen Zeitpunkten IL3 entzogen sowie Einzelzellklone isoliert. Generelles Vorgehen siehe Kapitel 3.1.5 und 3.1.6.

4.1.3 Validierung der Expression der ABL-Class Fusionsgene per RNA-Sequenzierung

Zur Validierung der Expression der Fusionsgene wurde im Rahmen der RNA-Sequenzierung die Anzahl der die Bruchpunkte überspannenden Reads ermittelt. Aufgrund unterschiedlicher Sequenziertiefen, Transkriptlängen und Vektor-Effizienzen sind Aussagen über die tatsächlichen Expressionsstärken nicht möglich. Die Transkriptanzahl innerhalb der Triplikate war weitgehend homogen.

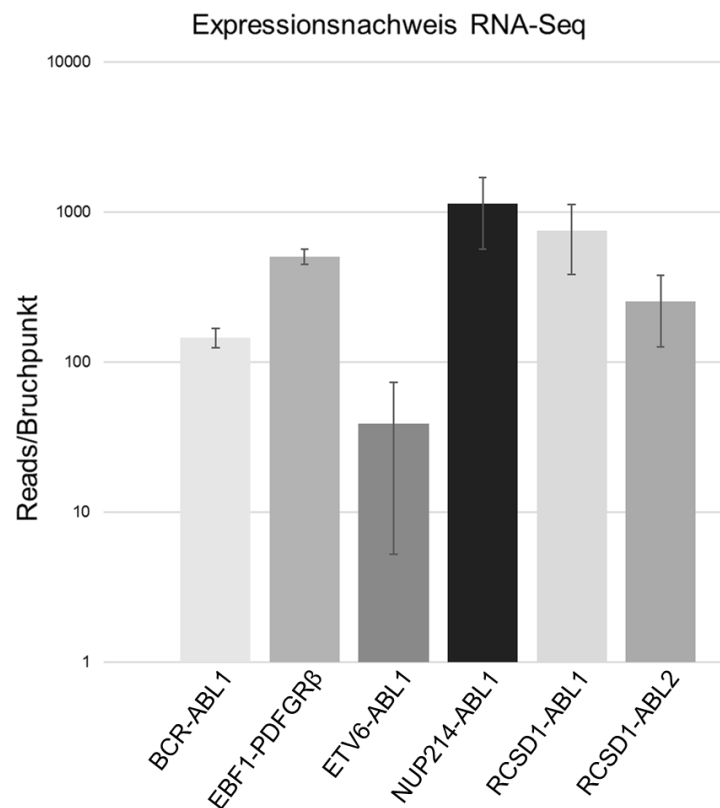


Abbildung 10 Transkriptanzahl der Fusionsgene. Die RNA der mit der DNA der Fusionsgene in einem pCMV6-AC-IRES-GFP-Vektor transfezierten IL3-unabhängigen Ba/F3 wurden präpariert und sequenziert. Dargestellt ist die Anzahl der in der RNA-Seq nachgewiesenen Transkripte der Bruchpunktsequenz je Fusionsgen als Mittelwert eines biologischen Triplikats. Die vertikalen Balken zeigen die Standardabweichung.

4.1.4 Qualitativer Nachweis der Expression der ABL-Class Fusionsproteine per Western Blot

Die Translation des Fusionsproteins wurde per Western Blot für alle Fusionen erfolgreich nachgewiesen (Abbildung 11). Außer bei NUP214-ABL1, welches in einem Klon deutlich schwächer exprimiert wurde, zeigte sich innerhalb aller Triplikate eine vergleichbare Expression des Fusionsproteins. Bei je einem RCSD1-ABL1 und ETV6-ABL1-Klon waren zusätzliche Banden zu erkennen, welche durch Abbau- oder unvollständig translatierte Produkte sowie aberrante proteolytische Spaltung bedingt sein könnten.

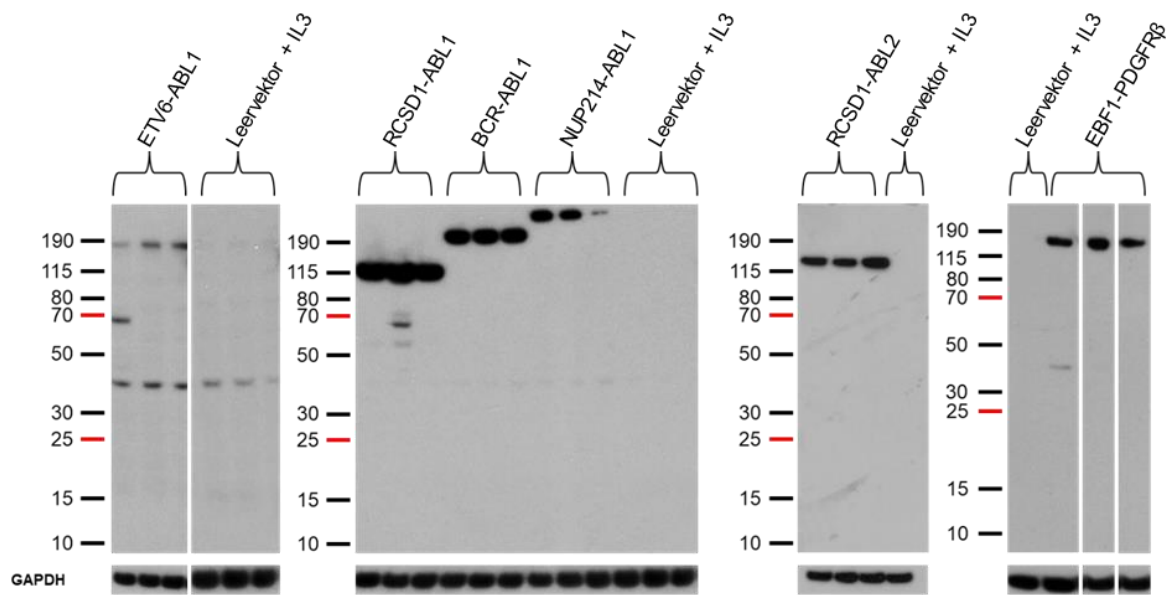


Abbildung 11 Qualitativer Nachweis der Expression der Fusionsproteine per Western Blot. Ba/F3 wurden nach Transfektion mit einem das Fusionsgen enthaltenden pCMV6-AC-IRES-GFP-Vektor mit G418 selektioniert, alle Klone außer die Leervektorkontrolle wurden in Abwesenheit von IL3 kultiviert. Alle Fusionsproteine sind durch den pCMV6-AC-IRES-GFP-Vektor C-terminal Flag-markiert. Proteinlysate in KLB-Puffer hergestellt. Nachweis der Fusionsproteine mittels Flag-Antikörper (Klon M2). GAPDH diente als Beladungskontrolle. Gezeigt sind biologische Triplikate.

4.1.5 Qualitativer Nachweis der Tyrosinkinase-Aktivität der ABL-Class Fusionsproteine per Western Blot

Die Überprüfung der Aktivität der in den Fusionsproteinen enthaltenen Tyrosinkinasen (ABL1, ABL2, PDGFR β) wurde per Western Blot Analyse mit einem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper (4G10) durchgeführt (Abbildung 12). Im Vergleich zu den Leervektorkontrollen war in allen mit einem Fusionsgen transfezierten Ba/F3-Zellen, mit Ausnahme von EBF1-PDGFR β , Tyrosinphosphorylierung zu erkennen. BCR-ABL1 zeigte eine starke, im Triplikate homogene Tyrosinphosphorylierung. Bei ETV6-ABL1, RCSD1-ABL1 und RCSD1-ABL2 war die Tyrosinphosphorylierung innerhalb des Triplikats ebenfalls vergleichbar, jedoch schwächer ausgeprägt. Im NUP214-ABL1 Triplikate war die Auto-Phosphorylierung in allen Klonen vorhanden, darüber hinaus bestanden jedoch Unterschiede zwischen den Klonen. So zeigte der dritte Klon eine bei den anderen beiden Klonen fehlende Tyrosinphosphorylierung bei circa 200 kDa. Die Klone eins und zwei wiesen im Gegensatz zu dem dritten Klon Phosphotyrosin-Signale bei circa 50 kDa und 60 kDa auf.

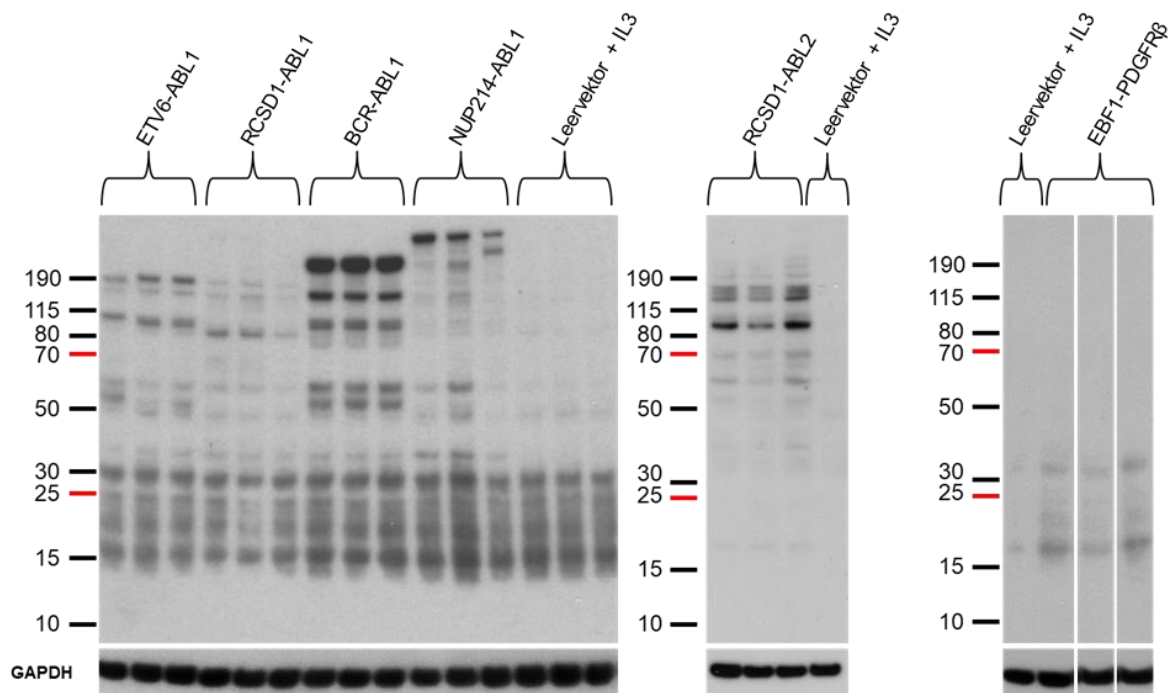


Abbildung 12 Qualitativer Nachweis der Tyrosinphosphorylierung per Western Blot. Herstellung der Proteinlysate und vorhergehende Behandlung der Ba/F3 wie in Abbildung 11 beschrieben. Nachweis der Tyrosinphosphorylierung mittels Anti-Phosphotyrosin-Antikörper (4G10). GAPDH diente als Beladungskontrolle. Gezeigt sind biologische Triplikate.

4.2 Vergleichende Analyse der ABL-Class Fusionsproteine bezüglich Expressionsstärke und Tyrosinkinase-Aktivität per Western Blot

Die in Kapitel 4.1.4 und 4.1.5 abgebildeten Western Blot Analysen wurden teilweise in unabhängigen Experimenten und zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt. Diese dienen nicht dem Vergleich der Fusionsproteine untereinander, sondern der Etablierung des

Testsystems und dem Nachweis, dass alle Fusionsproteine exprimiert wurden und deren Tyrosinkinase aktiv waren. Zur besseren Vergleichbarkeit und um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu zeigen, wurden diese Western Blots erneut, diesmal für alle Fusionsproteine gleichzeitig und unter identischen Bedingungen, angefertigt.

4.2.1 Vergleichende Analyse der Expressionsstärke der ABL-Class Fusionsproteine per Western Blot

In dieser vergleichenden Analyse wiesen RCSD1-ABL1, RCSD1-ABL2, BCR-ABL1 und EBF1-PDGFR β die stärkste Expression auf Proteinebene auf. NUP214-ABL1 wurde schwächer exprimiert; die Heterogenität innerhalb des Triplikats hatte im Vergleich zu dem in Abbildung 11 gezeigten Vorexperiment abgenommen. Unter allen Konstrukten war die Expression von ETV6-ABL1 am niedrigsten (Abbildung 13).

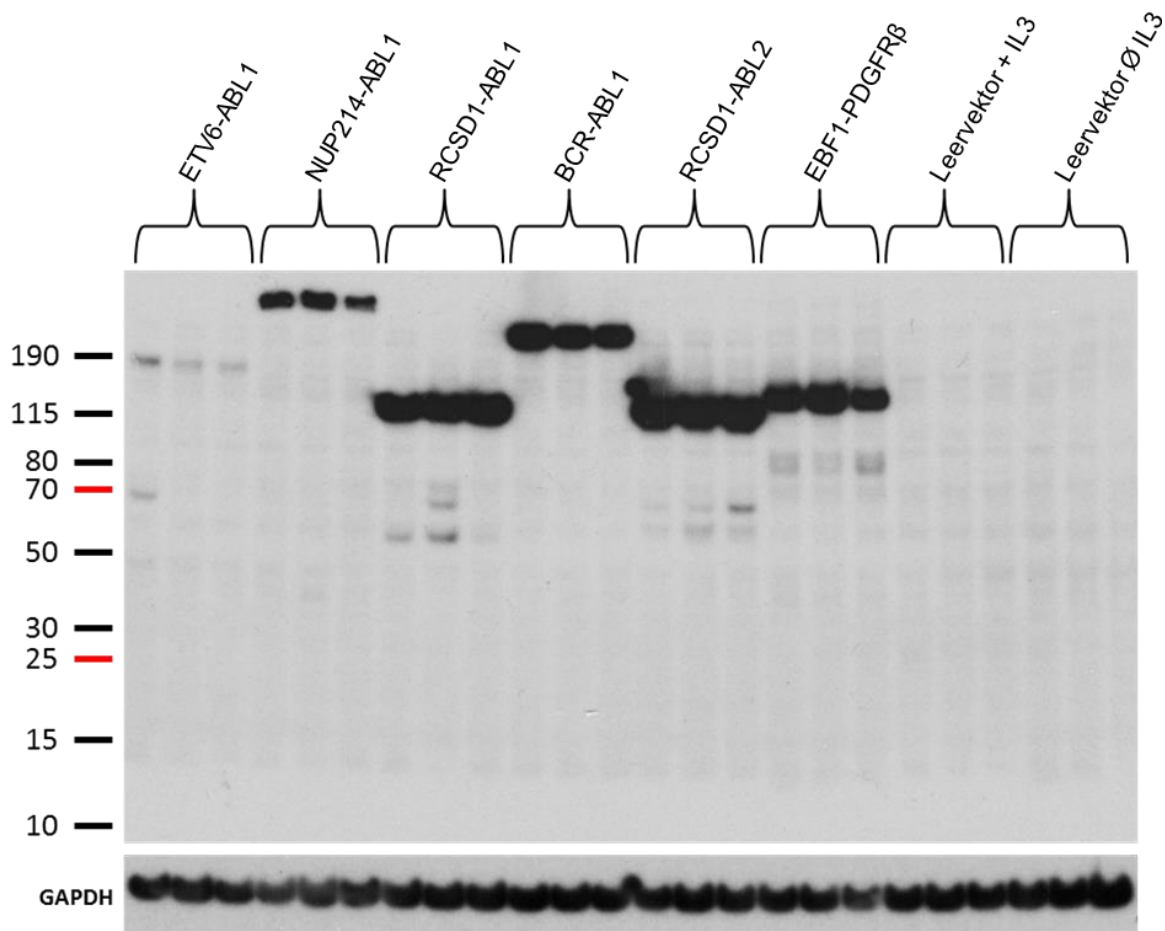


Abbildung 13 Vergleichende Western Blot Analyse der Expression der Fusionsproteine. Herstellung der Proteinlysate, Nachweis des Fusionsproteins und vorhergehende Behandlung der Ba/F3 wie in Abbildung 11 beschrieben. Die Zellen der Leervektorkontrolle ohne IL3 wurden 24 h nach IL3-Entzug lysiert. Im Unterschied zu Abbildung 11 wurden alle Lysate gleichzeitig, unter identischen Bedingungen hergestellt. GAPDH diente als Beladungskontrolle. Gezeigt sind biologische Triplikate.

4.2.2 Vergleichende Analyse der Tyrosinkinase-Aktivität der ABL-Class Fusionsproteine per Western Blot

In der vergleichenden Western Blot Analyse der Kinaseaktivität mittels Phosphotyrosin-Antikörper wurden deutliche Unterschiede zwischen den Fusionsproteinen beobachtet (Abbildung 14). BCR-ABL1 zeigte das stärkste Phosphotyrosin-Signal. Neben einer markanten Auto-Phosphorylierung waren auch zwei Banden um 150 kDa sowie zwei Banden bei circa 100 kDa deutlich ausgeprägter als in der Leervektorkontrolle. Die genannten Banden waren ebenso bei den weiteren eine ABL-Kinase enthaltenden Fusionsproteinen stärker ausgeprägt als in der Leervektorkontrolle, jedoch schwächer als bei BCR-ABL1. Darüber hinaus zeigte ETV6-ABL1 leichte Auto-Phosphorylierung und RCSD1-ABL1 und RCSD1-ABL2 weitere Banden bei etwa 200 kDa. Das NUP214-ABL1 Triplikate wies wie schon in Abbildung 12 die höchste Varianz in der Signalstärke auf; vor allem die zusätzlichen Banden über 200 kDa unterschieden sich deutlich innerhalb des Triplikats. EBF1-PDGFR β zeigte im Vergleich zur Leervektorkontrolle keine weiteren Banden.

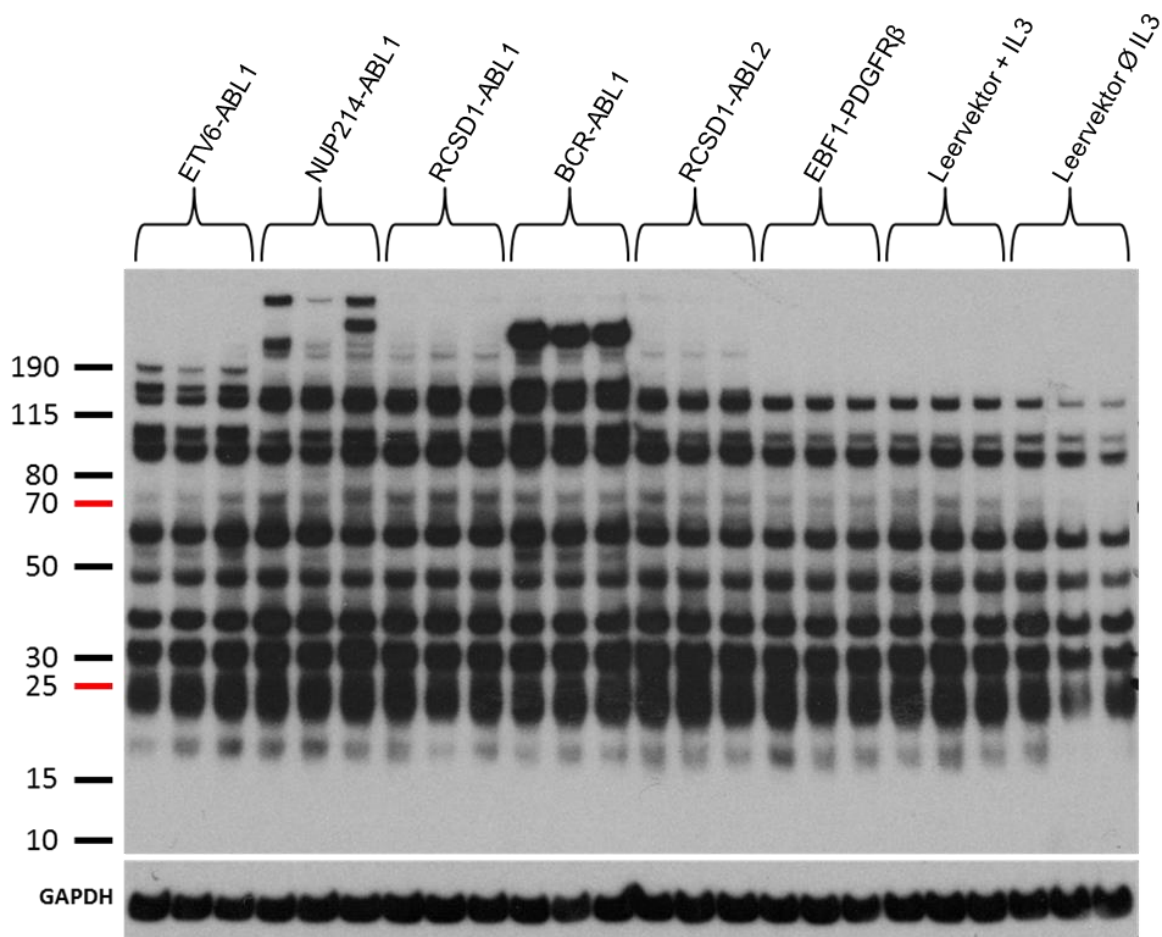


Abbildung 14 Vergleichende Western Blot Analyse der Tyrosinphosphorylierung. Es wurden die gleichen Proteinlysate wie in Abbildung 13 verwendet. Nachweis der Tyrosinphosphorylierung mittels Anti-Phosphotyrosin-Antikörper (4G10). GAPDH diente als Beladungskontrolle.

Bei der Betrachtung des Verhältnisses von Expressionsstärke zu Tyrosinphosphorylierung fiel auf, dass RCSD1-ABL1 und RCSD1-ABL2 eine sehr starke Proteinexpression zeigten, aber lediglich schwache Phosphorylierung. BCR-ABL1 wies hingegen eine starke Proteinexpression sowie eine starke Tyrosinphosphorylierung auf und ETV6-ABL1 sogar eine starke Phosphorylierung trotz schwacher Proteinexpression. Somit scheinen ETV6 und BCR die Kinaseaktivität von ABL1 deutlich zu steigern, während die Fusion mit RCSD1 die Aktivität von ABL in eher geringem Ausmaß aktiviert. Das divergente Bandenmuster in der Phosphotyrosin-Analyse innerhalb des NUP214-ABL1 Triplikats steht im Gegensatz zu seiner gleichmäßigen Proteinexpression, was daraufhin deuten könnte, dass die ABL1-Kinase in den verschiedenen NUP214-ABL1 Klonen in unterschiedlichem Ausmaß ihre Substrate phosphoryliert. EBF1-PDGFR β zeigte trotz ausgeprägter Proteinexpression keine zusätzliche Tyrosinphosphorylierung, die über die Phosphorylierung der IL3-behandelten Leervektorkontrolle hinausging.

4.3 Phosphorylierung von STAT3 und STAT5 durch ABL-Class Fusionsproteine

Die „Signal Transducer and Activator of Transcription“ STAT3 und 5 werden durch Tyrosinphosphorylierung von Janus Kinasen (JAK) nach Stimulation der Zelle durch Zytokine oder Wachstumsfaktoren aktiviert (Zhuang 2013). Verschiedene Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass die als Signaltransduktoren und Transkriptionsfaktoren wirksamen Proteine auch in zahlreichen Tumorerkrankungen, insbesondere in Leukämien, phosphoryliert sind und dort wesentlich zu Entstehung und Fortschreiten der Erkrankung beitragen (Dovat und Payne 2017; Shi et al. 2018). Unterstrichen wird ihre Bedeutung dadurch, dass die Expression von dauerhaft aktiven STAT3 oder STAT5 Mutanten ausreichte, um Ba/F3-Zellen zu transformieren (Spiekermann et al. 2002). Zudem wird bereits in ersten klinischen Phase I und II Studien der Nutzen von STAT3 bzw. STAT5-Inhibitoren in Leukämien erforscht (Tolomeo et al. 2019; Brown et al. 2021).

Daher sollte die Bedeutung von STAT3 und STAT5 im Signalverhalten der in dieser Arbeit betrachteten Fusionsproteine genauer untersucht werden. Hierfür wurde zunächst eine auf die ABL1 enthaltenden Fusionsproteine beschränkte Analyse der Phosphorylierung von STAT3 und STAT5 durchgeführt. Zusätzlich wurde die Expression der Fusionsproteine über einen Anti-ABL1 Antikörper überprüft (Abbildung 15).

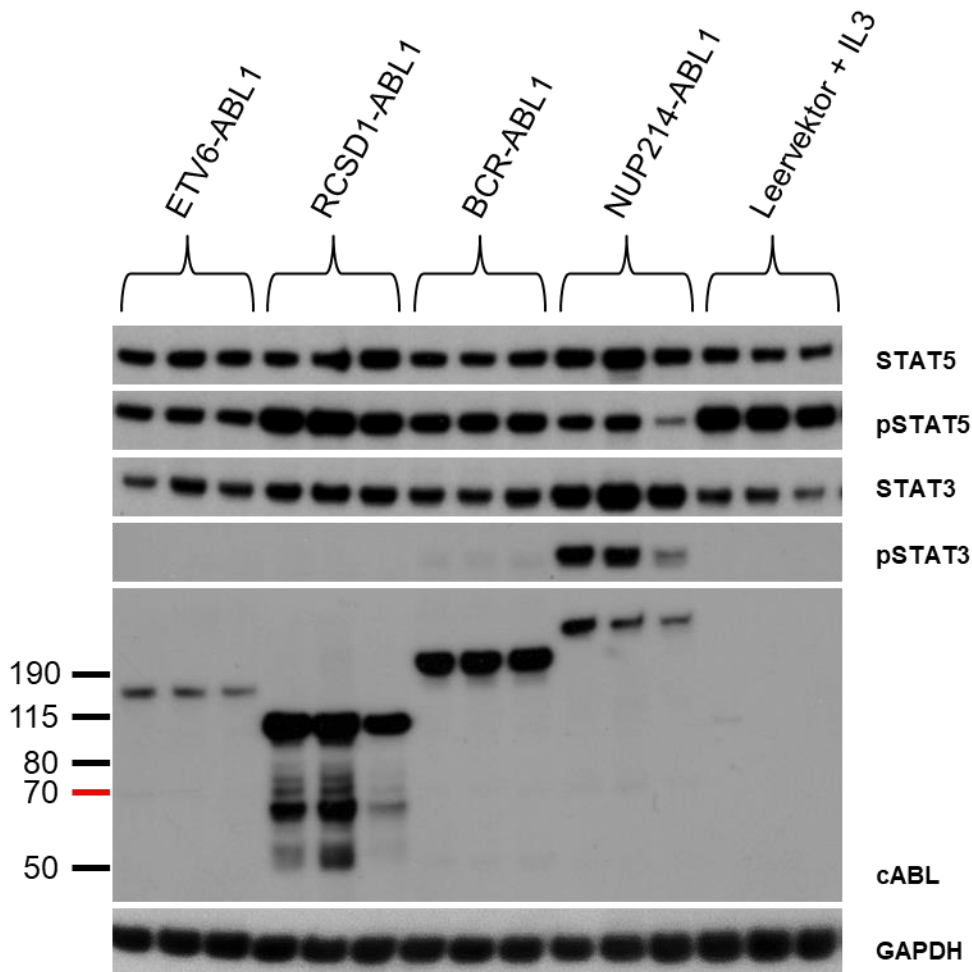


Abbildung 15 Nachweis von STAT3/STAT5-Expression und -Phosphorylierung per Western Blot. Nachweis der Proteinexpressionsspiegel von STAT5, pSTAT5 (Y694), STAT3, pSTAT3 (Y705) und cABL1 per Western Blot mittels spezifischer Antikörper in biologischen Triplikaten von mit den angegebenen Fusionsgenen stabil transfezierten, IL3-unabhängigen Ba/F3-Zellen. Die Herstellung der Proteinlysate erfolgte mittels KLB-Puffer. GAPDH diene als Beladungskontrolle.

STAT5 war in allen Zellklonen nahezu gleichmäßig exprimiert, dagegen zeigte sich bei RCSD1-ABL1 im Vergleich zu den anderen Fusionsproteinen eine stärkere STAT5-Phosphorylierung, während sie zwischen ETV6-ABL1, BCR-ABL1 und NUP214-ABL1 kaum variierte. Lediglich der dritte NUP214-ABL1 Klon wies deutlich weniger STAT5-Phosphorylierung auf. In der Leervektorkontrolle unter IL3-Substitution wurde STAT5 stärker phosphoryliert als in den Kinase-getriebenen, IL3-unabhängigen Ba/F3.

Die Expression von STAT3 war bis auf NUP214-ABL1 in allen Proben relativ gleichmäßig, bei NUP214-ABL1 war sie erhöht. NUP214-ABL1 war zudem das einzige Konstrukt in dem STAT3-Phosphorylierung nachgewiesen wurde. Die Leervektorkontrolle zeigte trotz IL3-Substitution keine STAT3-Phosphorylierung.

Mit dem cABL-Antikörper konnten alle Fusionsproteine mit dem erwarteten Molekulargewicht nachgewiesen werden. Unterschiede in den Expressionsspiegeln wurden in vergleichbarer Weise bereits mit dem Flag-Antikörper beobachtet (Abbildung 11). Auffällig waren zusätzliche Banden mit niedrigeren Molekulargewichten in den RCSD1-ABL1 Klonen,

die bereits in schwächerer Ausprägung mit dem Flag-Antikörper beobachtet wurden (Abbildungen 11 und 13) und möglicherweise auf eine partielle Degradation oder unvollständige Translation des Fusionsproteins hinweisen.

Um die Unterschiede von ABL1 oder ABL2 als respektiven Bindungspartner von RCSD1 im Hinblick auf die STAT-Phosphorylierung erfassen zu können und um die bisher nicht nachweisbare Kinaseaktivität von EBF1-PDGFR β tiefergehend zu untersuchen, wurden RCSD1-ABL2 und EBF1-PDGFR β in die vorhergehende Analyse einbezogen. Zudem wurden Leervektor-tragende Zellen als Kontrolle 24 h nach IL3-Entzug lysiert, um den Effekt von IL3 auf die STAT5- und die STAT3-Phosphorylierung in der Bewertung der Ergebnisse berücksichtigen zu können (Abbildung 16).

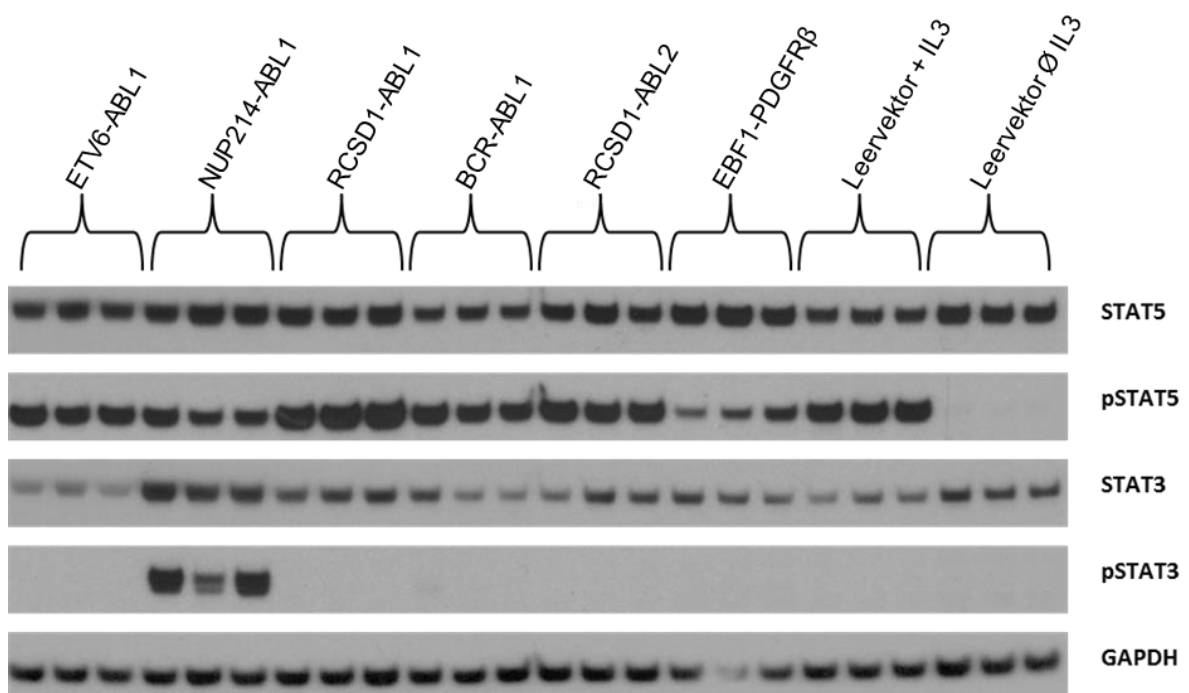


Abbildung 16 STAT3 und STAT5 Phosphorylierung durch ABL-Class Fusionsproteine und BCR-ABL1 in Ba/F3-Zellen. Behandlung der Ba/F3-Zellen und Herstellung der Proteinlysate wie in Abbildung 15. Ba/F3-Zellen der Leervektorkontrolle ohne IL3 wurden 24 h nach IL3-Entzug lysiert. Gezeigt sind biologische Triplikate.

Die Stärke der Proteinexpression von STAT5 war in allen Proben nahezu identisch. Alle Fusionsproteine phosphorylierten STAT5, verstärkte STAT5-Phosphorylierung war sowohl bei RCSD1-ABL1 als auch bei RCSD1-ABL2 zu beobachten. Bemerkenswert war die - hier durch die STAT5-Phosphorylierung gezeigte - Kinaseaktivität in allen EBF1-PDGFR β Klonen, da diese in den allgemeinen Anti-Phosphotyrosin Western Blots nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte (Abbildung 12 und 14). Weiterhin wurde in der Leervektorkontrolle 24 h nach IL3-Entzug keine STAT5-Phosphorylierung detektiert. Die STAT3-Expression variierte leicht zwischen den verschiedenen Konstrukten und war in dem NUP214-ABL1 Triplikat am stärksten. In Übereinstimmung mit Abbildung 15 wurde die Phosphorylierung von STAT3 nur bei NUP214-ABL1 beobachtet.

4.4 ABL-Class Fusionsproteine induzieren IL3-unabhängiges Wachstum

Ba/F3 ist eine IL3-abhängige Zelllinie, die IL3-Abhängigkeit kann jedoch durch Expression von Onkogenen überwunden werden. Daher sind Ba/F3-Zellen ein sehr gutes Modell zur Überprüfung des onkogenen Potenzials von Fusionsproteinen (Warmuth et al. 2007). Um den onkogenen Effekt der transfezierten Fusionsgene zu prüfen, wurde den transfezierten Ba/F3-Zellen IL3 als Wachstumsfaktor entzogen und anschließend ein Zellviabilitäts- (WST)-Assay durchgeführt (Abbildung 17). Nach Aussaat identischer Zellzahlen waren in der Leervektorkontrolle 48 h nach IL3-Entzug keine lebenden Zellen mehr nachweisbar. Dagegen zeigten alle mit einem Fusionsgen transfezierten Zellklone eine kontinuierliche Proliferation. Somit ist gezeigt, dass alle Fusionsproteine trotz Differenzen in der Expressions- und Tyrosinphosphorylierungsstärke zu einem IL3-unabhängigen Wachstum führen, welches im Ba/F3-Zellsystem als transformierendes Ereignis eingestuft werden kann.

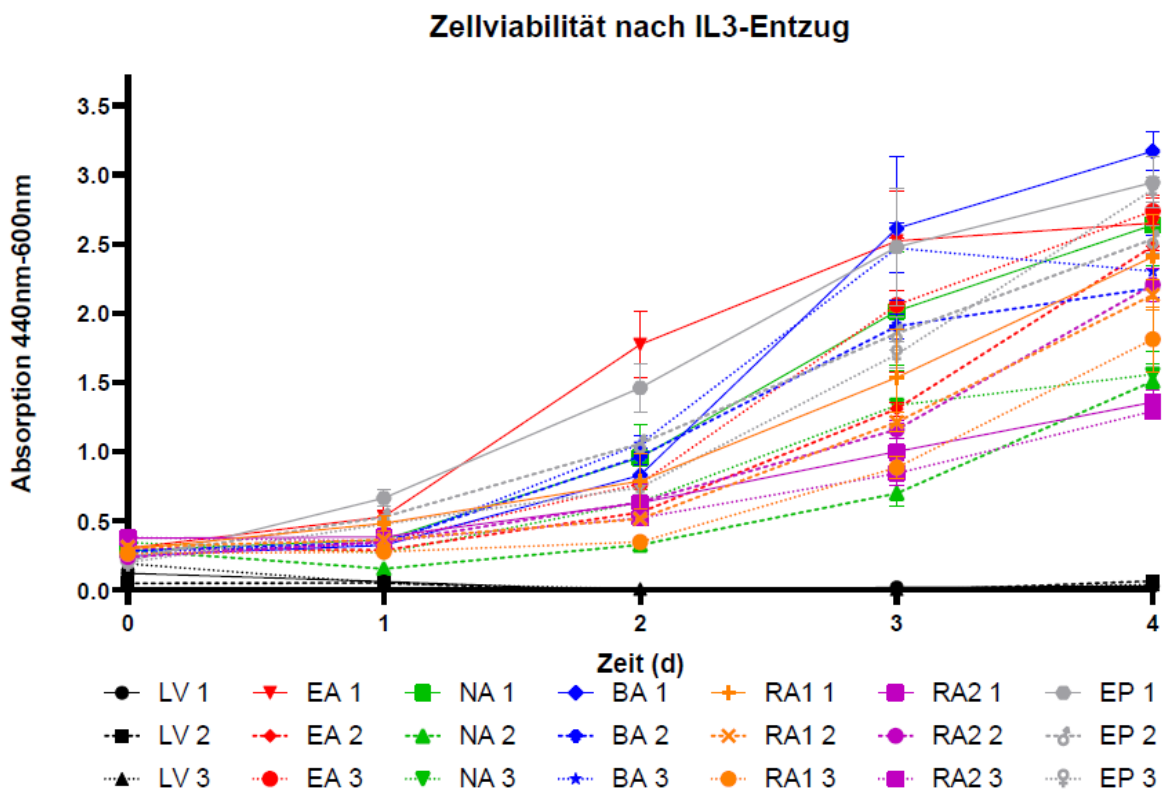


Abbildung 17 Die Kinase-aktivierenden Fusionsproteine induzieren IL3-unabhängiges Wachstum. Mit dem angegebenen Fusionsgen oder Leervektor stabil transfezierte Ba/F3-Zellen wurden in Abwesenheit von IL3 in einer 96-Well-Platte kultiviert (Startzellzahl: 10^4 Zellen/ Well). Die Viabilität wurde photometrisch mittels WST-Assay nach Herstellerangaben (Roche, Basel, CH) bestimmt. Alle Fusionsproteine wurden in biologischen Triplikaten vermessen (1-3); jedes biologische Unikat in einem technischen Triplikat. Die vertikalen Balken zeigen den SEM (Standard error of the mean). LV= Leervektor; EA= ETV6-ABL1; NA= NUP214-ABL1; BA= BCR-ABL1; RA1= RCSD1-ABL1; RA2= RCSD1-ABL2; EP= EBF1-PDGFR β .

4.5 Vergleich der Proliferationsaktivität der mit ABL-Class Fusionsgenen transfizierten Ba/F3-Zellen

Eine hohe Proliferationsaktivität der Tumorzellen ist insbesondere bei Leukämien durch Verdrängung weiterer, lebenswichtiger hämatopoetischer Zellen prognostisch ungünstig. Um zu untersuchen, inwiefern sich die mit den Fusionsgenen transfizierten Ba/F3-Zellen in dieser Hinsicht unterscheiden, wurde die Proliferationsaktivität der drei Klone jedes Triplikats aus Abbildung 17 gemittelt und in Abbildung 18 dargestellt. Mit den an Tag 4 nach IL3-Entzug gemessenen Werten wurde zunächst eine einfache Varianzanalyse (one-way Welch-ANOVA) durchgeführt, da eine Inhomogenität der Varianzen vorlag. Anschließend wurden alle Konstrukte mittels Dunnett-T3-Test auf signifikante Unterschiede getestet (Signifikanzniveau: $p < 0,05$; Datensatz siehe Anhang). In dieser Analyse zeigte sich, dass EBF1-PDGFR β signifikant schneller proliferierte als RCSD1-ABL1, RCSD1-ABL2 und NUP214-ABL1. Zudem proliferierten BCR-ABL1 und ETV6-ABL1 signifikant schneller als RCSD1-ABL2. Weitere signifikante Unterschiede in der Proliferationsaktivität wurden zu diesem Zeitpunkt nicht gemessen.

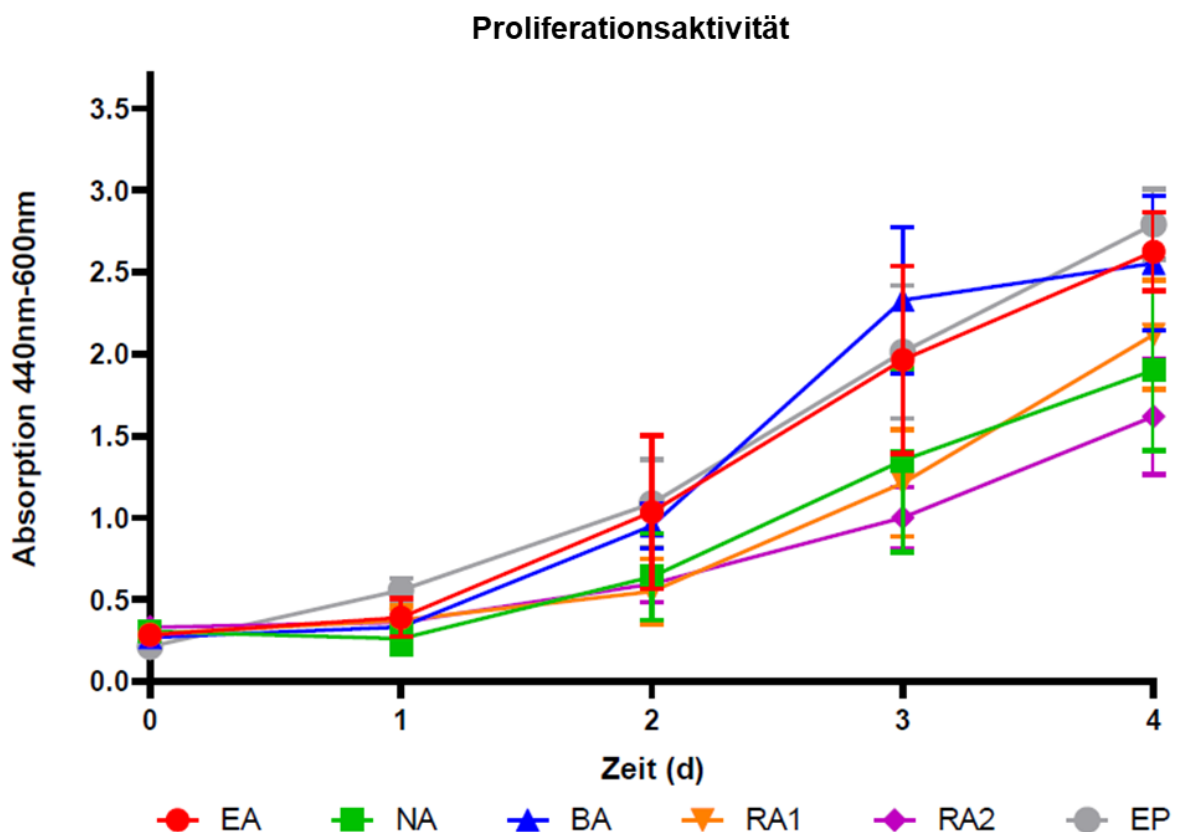


Abbildung 18 Proliferationsaktivität nach IL3-Entzug. Dargestellt ist das gemittelte Wachstum der in Abbildung 17 gezeigten Triplikate. Die vertikalen Balken zeigen das 95 % Konfidenzintervall. EA= ETV6-ABL1; NA= NUP214-ABL1; BA= BCR-ABL1; RA1= RCSD1-ABL1; RA2= RCSD1-ABL2; EP= EBF1-PDGFR β .

4.6 Erhöhte Sensitivität von ABL-Class Fusionsproteinen gegenüber Tyrosinkinase-Inhibitoren

Die meisten klinisch zugelassenen TKI verringern die Kinaseaktivität durch einen ATP-kompetitiven Mechanismus, seltener beruhen sie auf einer allosterischen Hemmung (Hartmann et al. 2009). Dasatinib ist ein TKI der zweiten Generation und zur Behandlung von CML und Ph-positiven ALL bei Imatinib-Unverträglichkeit oder Resistenzen zugelassen. Gegenüber Imatinib hat Dasatinib ein deutlich breiteres Wirkspektrum (Hantschel et al. 2008). Die hier beispielhaft gezeigten Ergebnisse der Behandlung von NUP214-ABL1 transfezierten Ba/F3-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Dasatinib zeigen, dass sich mit steigender Dasatinib-Dosis sowohl die Kinaseaktivität, die sich durch Tyrosinphosphorylierung zeigt, als auch die Expression des NUP214-ABL1 Fusionsproteins verringerte (Abbildung 19 A und 19 B).

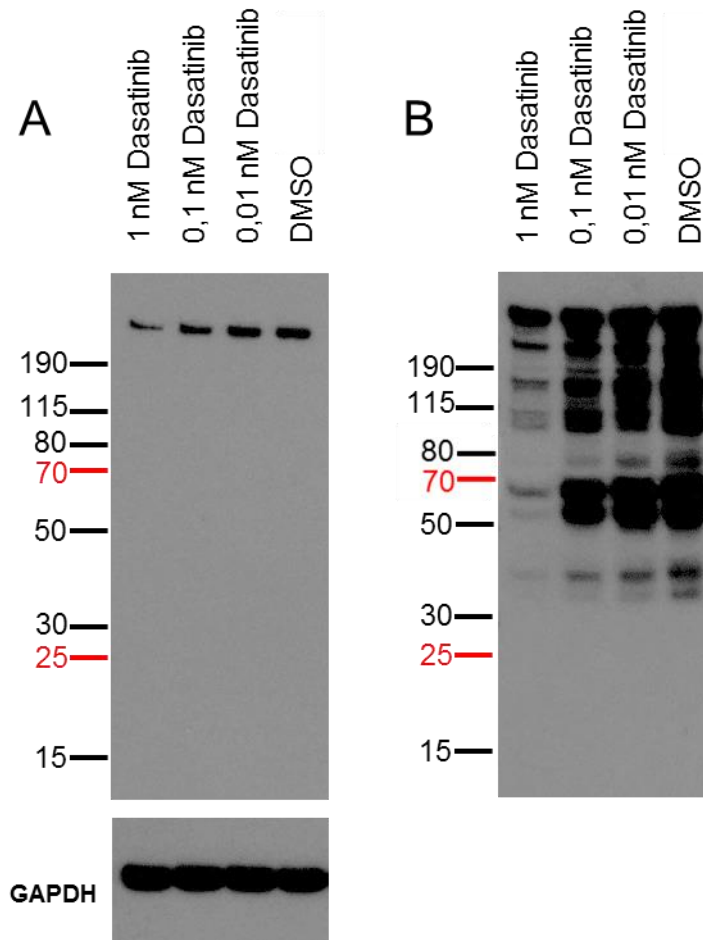


Abbildung 19 Dasatinib hemmt Expression und Kinaseaktivität Kinase-getriebener Fusionsproteine. Western Blot Analyse von stabil mit NUP214-ABL1 transfezierten, IL3 unabhängigen Ba/F3-Zellen nach 72 h Behandlung mit Dasatinib. **A:** Nachweis der Proteinexpression mittels Flag-Antikörper (Klon M2). **B:** Nachweis der Tyrosinphosphorylierung mittels Anti-Phosphotyrosin-Antikörper 4G10. Dasatinib ist in DMSO gelöst, daher enthält die DMSO-Kontrolle die höchste in den Dasatinib-Proben vorkommende DMSO-Konzentration (0,1 %). Herstellung der Proteinlysate mittels KLB-Puffer. DMSO = Dimethylsulfoxid. GAPDH diente als Beladungskontrolle.

Wie in Abbildung 17 gezeigt, wuchsen die mit einem Fusionsgen transfezierten Ba/F3-Zellen IL3-unabhängig, wohingegen die Leervektorkontrolle ohne IL3-Zusatz abstarb. Die konstitutiv aktiven Tyrosinkinase der Fusionsproteine wurden mit dem TKI Imatinib für 48 h gehemmt. Anschließend wurde ein Zellviabilitäts-(WST)-Assay durchgeführt (Abbildung 20) und die IC50 (mittlere inhibitorische Konzentration) berechnet, um den Einfluss der Tyrosinkinase-Aktivität auf die Wachstumsfaktorunabhängigkeit zu zeigen.

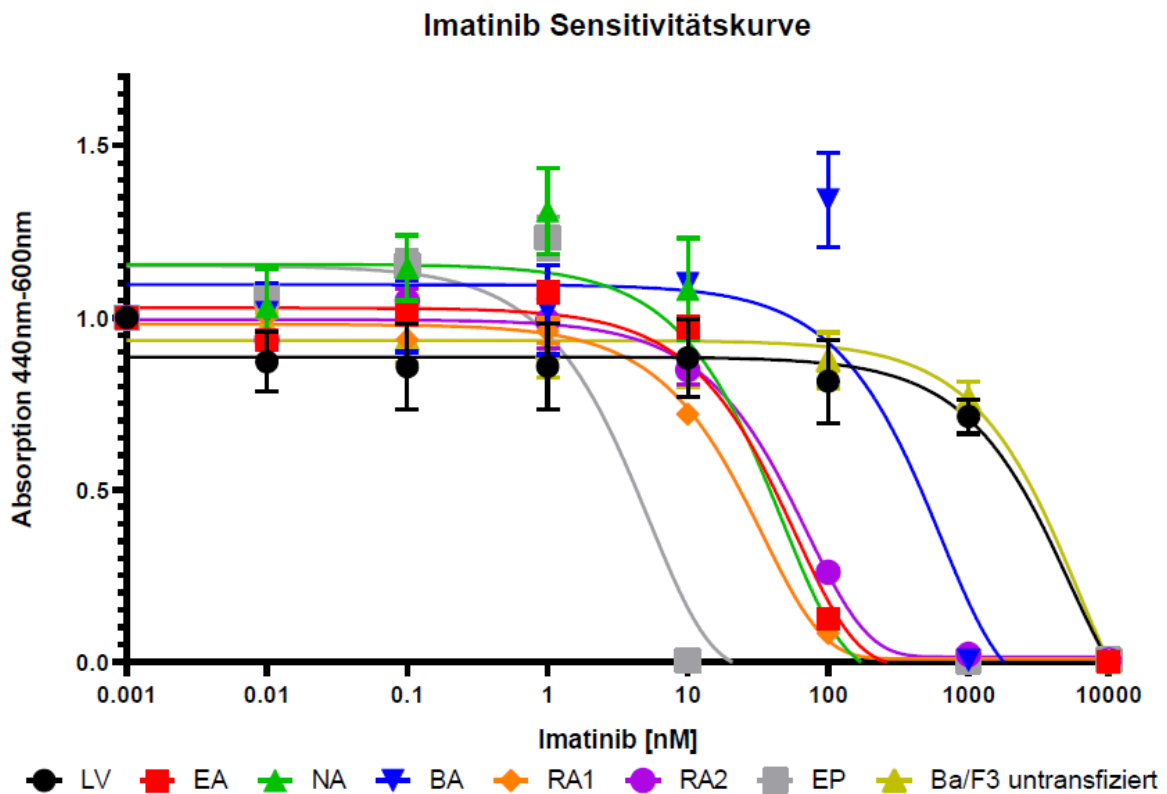


Abbildung 20 Kinase-getriebene Fusionsproteine zeigen erhöhte Imatinib-Sensitivität. Mit dem angegebenen Fusionsgen oder Leervektor transfezierte Ba/F3 Zellen sowie untransfezierte Ba/F3 wurden in einer 96-Well-Platte (10^4 Zellen/ Well) kultiviert und mit steigenden Imatinib Konzentrationen behandelt. LV und Ba/F3 untransfeziert wurden in Anwesenheit von IL3 kultiviert; alle anderen in Abwesenheit von IL3. Die Viabilität wurde mittels WST-Assay nach Herstellerangaben (Roche, Basel, CH) bestimmt. Alle Proben wurden in technischen Triplikaten vermessen. Die vertikalen Balken zeigen den SEM (Standard error of the mean). LV= Leervektor; EA= ETV6-ABL1; NA= NUP214-ABL1; BA= BCR-ABL1; RA1= RCSD1-ABL1; RA2= RCSD1-ABL2; EP= EBF1-PDGFR β .

EBF1-PDGFR β reagierte am sensitivsten auf die Imatinib-Behandlung mit einer IC50 von 3,7 nM. Die Ph-like Konstrukte mit einer ABL-Kinase (ETV6-ABL1, RCSD1-ABL1, RCSD1-ABL2, NUP214-ABL1) reagierten sehr ähnlich mit einer IC50 zwischen 23-49 nM, während BCR-ABL1 mit einer IC50 von 446 nM am wenigsten sensitiv war. Die mit Leervektor transfezierten und die untransfezierten Ba/F3-Zellen lagen mit einer IC50 von ca. 4 μ M zwischen ein und drei Log-Stufen über den Kinase-getriebenen IL3-unabhängigen Ba/F3-Zellen. Dies zeigt, dass die TKI die Tyrosinkinase der untersuchten Fusionsproteine hemmen (Abbildung 19 B) und folglich das Wachstum der Kinase-getriebenen Ba/F3-Zellen stoppen (Abbildung 20). Dadurch ist bestätigt, dass die konstitutiv aktiven Kinasen der Fusionsproteine essenziell für die IL3-Unabhängigkeit der transfezierten Ba/F3-Zellen sind.

4.6.1 Expression und Tyrosinkinase-Aktivität von BCR-ABL1 und ETV6-ABL1 unter kontinuierlicher Langzeit-TKI-Behandlung

Ziel eines Nebenprojekts war es, mit einer langfristigen Imatinib-Behandlung im nicht letalen Dosisbereich resistente Klone zu züchten, um nachfolgend mögliche Resistenzmechanismen bei Ph-like ALL zu analysieren. Dafür wurden mit BCR-ABL1 bzw. ETV6-ABL1 transfezierte Ba/F3-Zellen über drei Wochen mit Imatinib behandelt und anschließend per Western Blot analysiert (Abbildung 21).

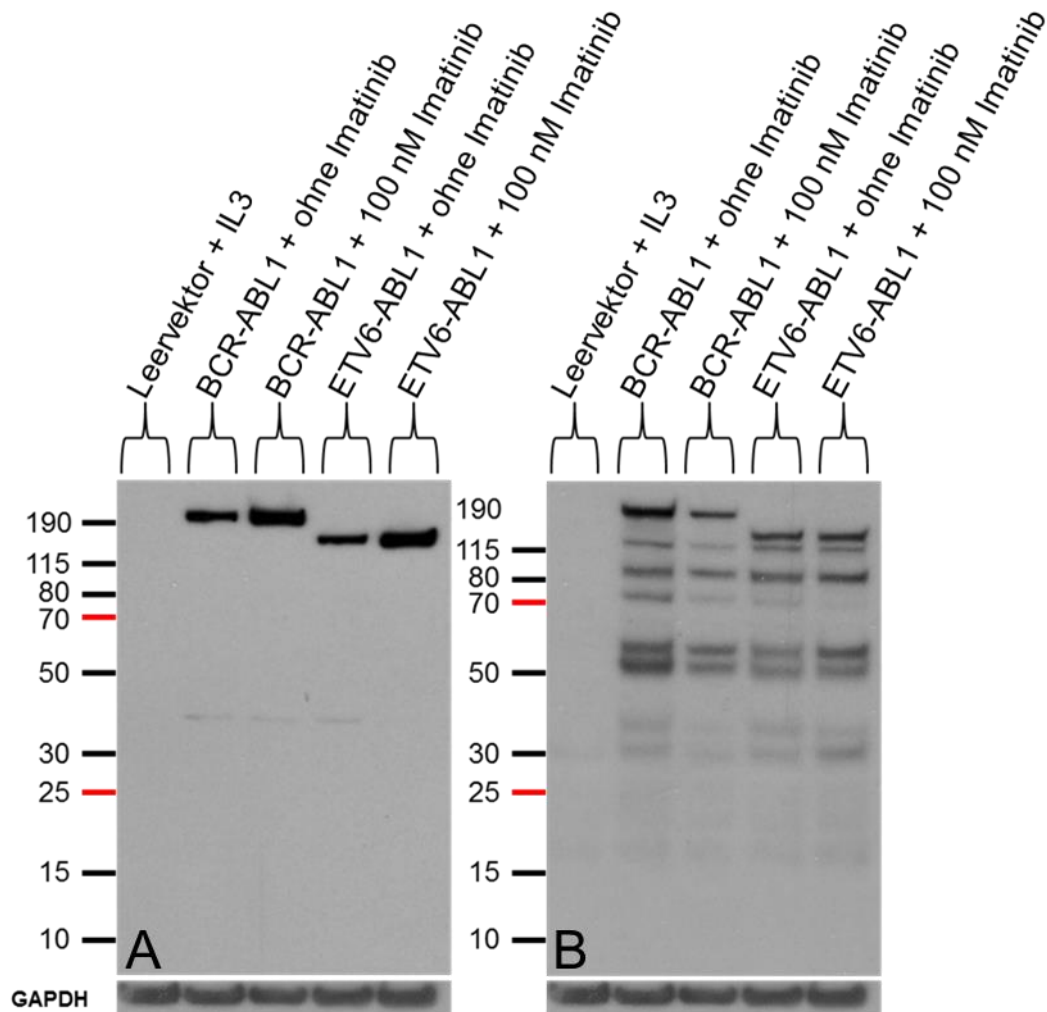


Abbildung 21 Langfristige Imatinib-Behandlung steigert Expression der Fusionsproteine. Western Blot Analyse von mit den angegebenen Fusionsgenen oder Leervektor stabil transfezierten Ba/F3-Zellen nach dreiwöchiger Behandlung mit 100 nM Imatinib. Alle Kulturen außer der Leervektorkontrolle wuchsen IL3-unabhängig. **A:** Nachweis der Proteinexpression per Flag-Antikörper (Klon M2). **B:** Nachweis der Tyrosinphosphorylierung per Anti-Phosphotyrosin-Antikörper 4G10. Herstellung der Proteinlysate mittels KLB-Puffer. GAPDH diene als Beladungskontrolle.

Bei ETV6-ABL1 waren zwischen der mit Imatinib behandelten und der unbehandelten Kultur keine Unterschiede in der Phosphorylierungsstärke festzustellen. Bei BCR-ABL1 nahm die Phosphorylierung in der behandelten Kultur leicht ab. In beiden Kulturen steigerte sich die Expression der Fusionsproteine als Reaktion auf die Inhibitor-Behandlung, was einen Resistenzmechanismus darstellen könnte. Die Imatinib-Konzentration in mit BCR-ABL1

transfezierten Ba/F3-Zellen konnte bis auf 900 nM gesteigert werden, bei mit ETV6-ABL1 transfezierten Ba/F3-Zellen lag die höchste Imatinib-Konzentration bei 150 nM (Daten nicht gezeigt). Weiterführende Untersuchungen dieser Kulturen stehen zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit aus.

4.7 Ausgeprägte zytoplasmatische Lokalisation der ABL-Class Fusionsproteine

Die genaue Lokalisation eines Proteins innerhalb der Zelle kann wichtige Aufschlüsse über seine Funktion liefern. Dies ist insbesondere im Falle der in dieser Arbeit untersuchten Fusionsproteine von Bedeutung, da eine zytoplasmatische Lokalisation des Fusionsproteins das transformierende Potenzial der Fusion stark beeinflussen kann (siehe Kapitel 1.4). Zur Ermittlung der zellulären Lokalisation der Fusionsproteine wurden Zytospins von jeweils einem Klon je Fusionsprotein hergestellt und zum Nachweis der Fusionsproteine mit einem Anti-Flag Primärantikörper und einem Alexa-555 markierten Sekundärantikörper sowie zur Darstellung des Zytoskeletts mit FITC (Fluorescein-Isothiocyanat) markiertem Phalloidin behandelt; für die Kernfärbung wurde der Farbstoff DAPI verwendet. Anschließend wurden konfokalmikroskopische Aufnahmen der Zellen angefertigt (Abbildung 22).

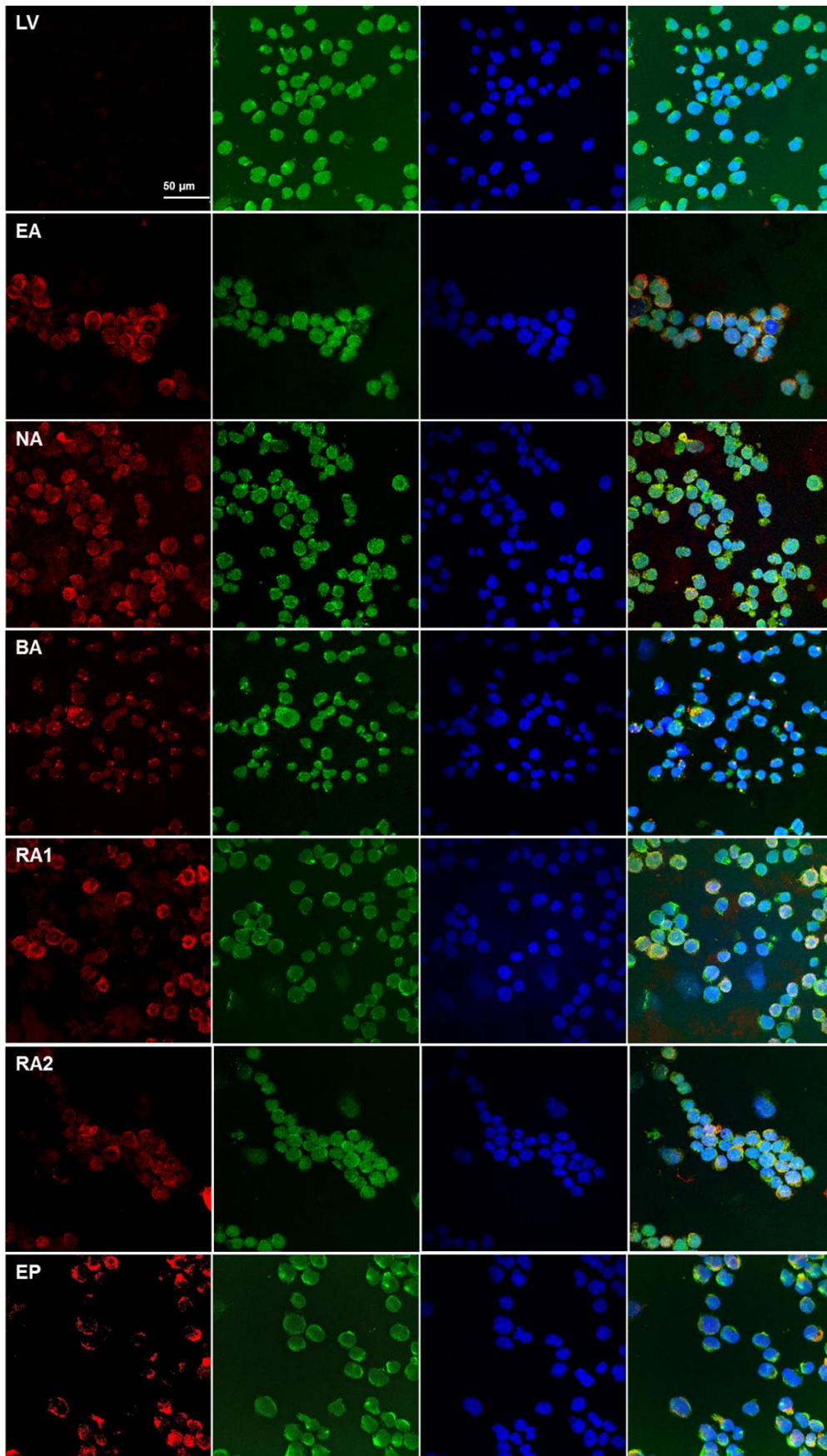


Abbildung 22 Vorwiegend zytoplasmatische Lokalisation der Fusionsproteine. Konfokalmikroskopische Aufnahme von mit den angegebenen Fusionsgenen stabil transfezierten Ba/F3-Zellen nach Zytospin und Zellfärbung. Alle außer LV wuchsen IL3-unabhängig. Färbung von links nach rechts: Flag – Phalloidin – DAPI – Overlay aller Signale. LV= Leervektor; EA= ETV6-ABL1; NA= NUP214-ABL1; BA= BCR-ABL1; RA1= RCSD1-ABL1; RA2= RCSD1-ABL2; EP= EBF1-PDGFR β ; DAPI= 4',6-Diamidin-2-phenylindol. Mikroskopie in Kooperation mit Dr. Dennis Eggert, LIV, Hamburg.

Die Fusionen unterschieden sich vor allem in ihrem Signalmuster im Zytoplasma. NUP214-ABL1 und RCSD1-ABL2 waren diffus über das gesamte Zytoplasma verteilt, während ETV6-ABL1, RCSD1-ABL1 und EBF1-PDGFR β überwiegend randständig lokalisiert waren und dort einen Saum bildeten. Am deutlichsten unterschied sich BCR-ABL1 mit punktförmigen Anhäufungen im Zytoplasma.

Alle Fusionsproteine waren gelegentlich mit Aktin, erkennbar am Phalloidin Signal, kolokalisiert. Eindeutige Anzeichen für eine bevorzugte Kernlokalisierung eines Fusionsproteins waren nicht zu erkennen. Dies passt zu der in Kapitel 1.4 beschriebenen überwiegend zytoplasmatischen Lokalisation einiger Fusionsproteine, die zumeist durch den 5'-Partner verursacht wird und eine nukleäre Translokation des Fusionsproteins verhindert.

Fusionsprotein	Zytoplasmatisches Signal	Co-Lokalisationen
Leervektor	Kein Signal	Keine Co-Lokalisationen
ETV6-ABL1	Größtenteils diffus über das Zytoplasma verteilt; teilweise hufeisenförmiger Randsaum	Co-Lokalisation mit Aktin im Randsaum; Kernlokalisierung nicht auszuschließen
NUP214-ABL1	Diffus punktförmig über das Zytoplasma verteilt	Teilweise mit Aktin co-lokalisiert; Kernlokalisierung nicht auszuschließen
BCR-ABL1	Punktförmige Anhäufungen	Teilweise mit Aktin co-lokalisiert; Kernlokalisierung nicht auszuschließen
RCSD1-ABL1	Randsaum bildend	Co-Lokalisation mit Aktin im Randsaum; Kernlokalisierung nicht auszuschließen
RCSD1-ABL2	Diffus über das Zytoplasma verteilt	Teilweise mit Aktin co-lokalisiert; Kernlokalisierung nicht auszuschließen
EBF1-PDGFR β	Überwiegend randständige Anhäufungen	Wenige Co-Lokalisationen mit Aktin; Kernlokalisierung nicht auszuschließen

Tabelle 12 Zusammenfassung der Ergebnisse der Zellfärbung aus Abbildung 22. Beschreibung der Färbemuster, der nukleären Lokalisation und der Co-Lokalisationen mit zytoplasmatischen Strukturen.

4.8 ABL-Class Fusionsgene erzeugen differentielle Genexpressionsprofile

Zur Untersuchung der Auswirkungen der Fusionsgene auf die Genexpression der transfizierten Ba/F3-Zellen wurden RNA-Sequenzierungen durchgeführt. Die Ähnlichkeit der Genexpressionsprofile der verschiedenen Fusionen und der Leervektorkontrolle wurde durch eine Principal component analysis (PCA) dargestellt (Abbildung 23). Je dichter Proben in der PCA beieinander liegen, desto ähnlicher sind ihre Genexpressionsprofile. Zu beachten ist dabei die Varianz der Dimension, in der die Distanz gesehen wird. Je größer die Varianz, desto größer sind die mit der Distanz korrespondierenden Unterschiede des Genexpressionsprofils.

In der PCA zeigten besonders BCR-ABL1, EBF1-PDGFR β sowie RCSD1-ABL2 distinkte, weit voneinander entfernte Cluster. Leervektor, ETV6-ABL1, NUP214-ABL1 und RCSD1-ABL1 lagen vor allem in PC1 eng beisammen (Abbildung 23 A). Jedoch zeigte Abbildung 23 B, dass NUP214-ABL1 und RCSD1-ABL1 ebenfalls eigene, von ETV6-ABL1 und Leervektor klar zu unterscheidende Cluster bildeten. Einer der ETV6-ABL1 Klone lag in der Nähe der Leervektorkontrolle und weiter von den anderen ETV6-ABL1 Klonen entfernt. Dieser Klon ist möglicherweise als Ausreißer zu interpretieren, da die beiden weiteren ETV6-ABL1 Proben eine große Ähnlichkeit zueinander zeigten und sich deutlich von der Leervektorkontrolle absetzten.

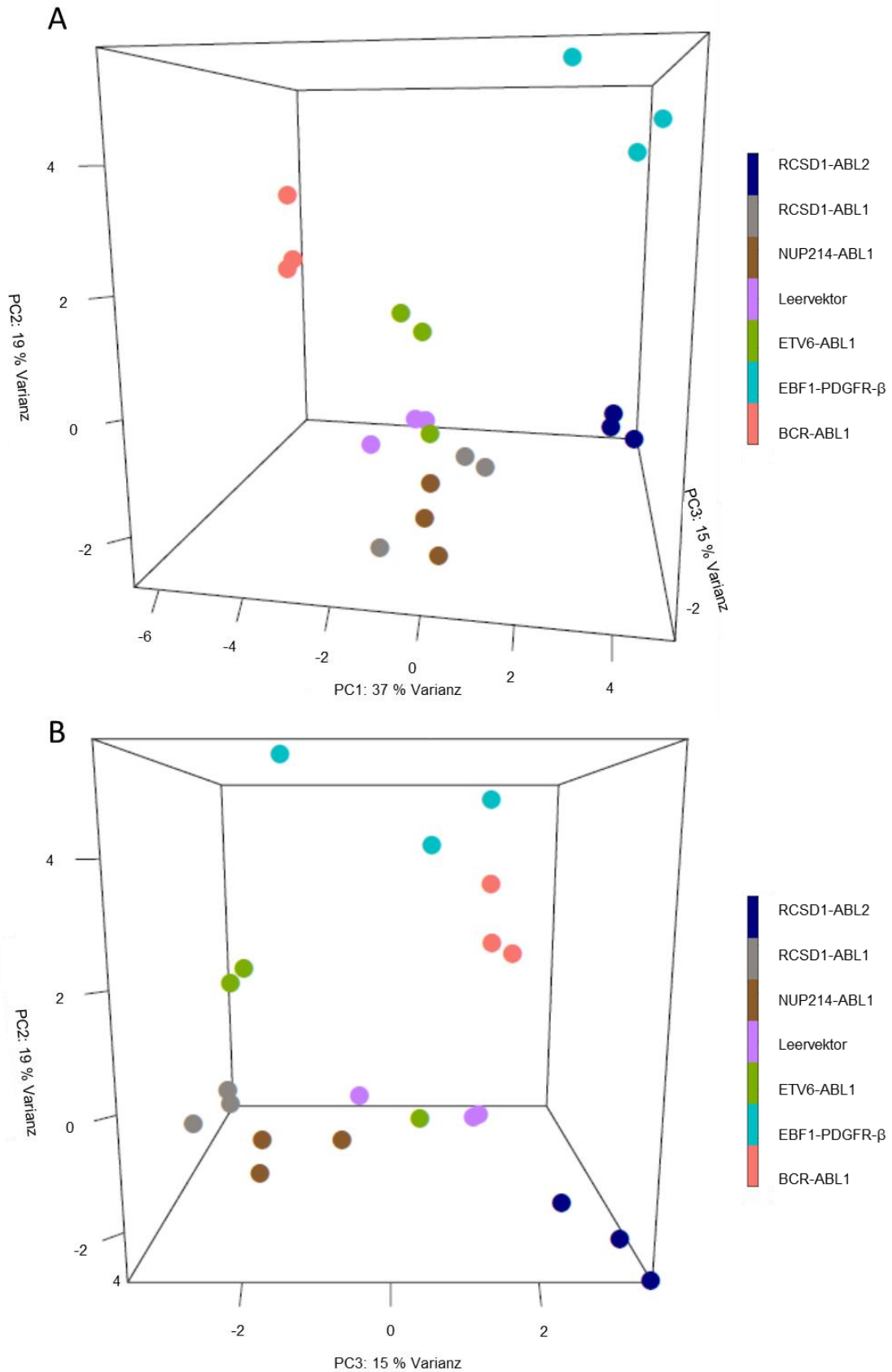


Abbildung 23 ABL-Class Fusionsgene verursachen differenzielle Genexpressionsprofile. Principal component analysis (PCA) basierend auf den 500 Genen mit der größten Varianz in der RNA-Seq. RNA wurde aus mit den dargestellten Fusionsgenen stabil transfizierten Ba/F3-Zellen extrahiert. Alle Kulturen außer der Leervektorkontrolle wurden in Abwesenheit von IL3 kultiviert. Jeder Punkt repräsentiert ein biologisches Unikat. Abbildung erstellt in Kooperation mit Michael Spohn, M.Sc., Forschungsinstitut Kinderkrebszentrum Hamburg und Bioinformatics Core Unit am UKE.

Neben der PCA wurden die Ergebnisse der RNA-Sequenzierung auch mittels hierarchischer Cluster Analyse dargestellt (Abbildung 24). Hier bildeten alle Triplikate eigenständige Cluster. Insbesondere die BCR-ABL1, RCSD1-ABL2 und EBF1-PDGFR β Triplikate wiesen spezifische Sets differenziell exprimierter Gene (DEG) auf, die sich eindeutig von den anderen Konstrukten sowie der Leervektorkontrolle unterschieden. Im NUP214-ABL1 Triplikate waren DEG-Sets ebenfalls zu erkennen, diese waren jedoch schwächer ausgeprägt. Bei ETV6-ABL1 und RCSD1-ABL1 war die differenzielle Genexpression weniger stringent im Vergleich zu den übrigen ABL-Class Fusionen; sie ließ sich jedoch eindeutig von der Expressionssignatur der Leervektorkontrolle abgrenzen.

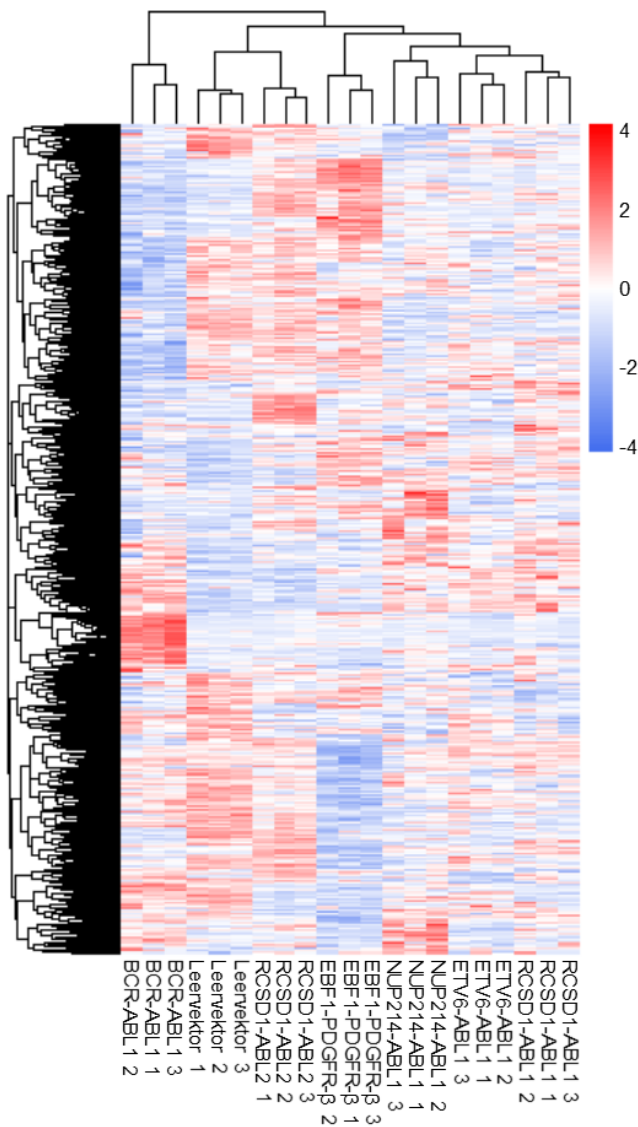


Abbildung 24 Hierarchische Cluster Analyse der Genexpressionsprofile unterschiedlicher ABL-Class Fusionsgene. Genexpressionsanalyse per RNA-Seq. RNA wurden aus mit den dargestellten Fusionsgenen stabil transfezierten Ba/F3-Zellen extrahiert. Alle Kulturen ausgenommen der Leervektorkontrolle wurden in Abwesenheit von IL3 kultiviert. Die Heat Map zeigt alle Gene, die in mindestens einem Sample einen Expressionsunterschied zur Leervektorkontrolle von $|\log_2\text{foldchange}| \geq 1$ und eine FDR $< 0,1$ aufweisen. Die Counts pro Gen und Replikate sind normalisiert, jedes Gen wurde mittels Z-Score skaliert. Die Skala zeigt die Anzahl der Standardabweichungen vom Mittelwert einer Zeile. Abbildung erstellt in Kooperation mit Michael Spohn, M.Sc., Forschungsinstitut Kinderkrebszentrum Hamburg und Bioinformatik Core Unit am UKE.

4.9 GeneSetEnrichment Analysis (GSEA) zeigt inflammatorische Gensignatur der ABL-Class Fusionsgene

Um ein übergeordnetes Verständnis der differentiellen Genregulation zu erlangen, wurde unter forcierter Expression der einzelnen ABL-Class Fusionsgene eine GSEA mit der Cytoscape App ClueGO für die gegenüber Leervektor signifikant hoch- bzw. herunterregulierten, proteincodierenden Gene durchgeführt. Bei einer GSEA werden die eingespeisten Gene mit den in Datenbanken hinterlegten Genen definierter Funktionskategorien (Terms) abgeglichen und in Hinblick auf eine signifikante Häufung der Gene eines Terms analysiert. Terms mit einer hohen Ähnlichkeit der angereicherten Gene (Kappa Score $\geq 0,4$) wurden zu Gruppen zusammengefasst, die durch den signifikantesten Term der Gruppe („leading term“) repräsentiert werden. Die Gruppen wurden anhand der „leading terms“ manuell den fünf Kategorien „Immunsystem“, „Malignom-assoziiert“, „Regulation des Zell-Zell Kontakts“, „PIP-Metabolismus/PI3K“ und „Weitere“ zugeordnet (Tabellen 14 und 16). Außerdem wurden die Ergebnisse der GSEA in Abbildung 25 und 26 grafisch dargestellt.

Zur besseren Einordnung der Ergebnisse der GSEA sind drei Genmengen von Bedeutung: N_G : Die Anzahl aller im Vergleich zur Leervektorkontrolle differentiell regulierten, proteincodierenden Gene eines Konstrukts; N_Z : Die Anzahl aller differentiell regulierten, proteincodierenden Gene eines Konstrukts, die von ClueGO einem signifikant angereicherten Term zugeordnet werden konnten und N_S : Die Summe der Gene aller Gruppen eines Diagramms inklusive Wiederholungen. In Tabelle 13 sind diese Genmengen sortiert nach Fusionsprotein und Regulationsrichtung im Vergleich zur Leervektorkontrolle aufgeführt.

Regulationsrichtung der Gene	Fusionsprotein	N_G	N_Z	N_S
↑	BCR-ABL1	301	130	710
	ETV6-ABL1	97	16	26
	NUP214-ABL1	346	129	441
	RCSD1-ABL1	253	58	120
	RCSD1-ABL2	376	113	213
	EBF1-PDGFR β	404	77	96
↓	BCR-ABL1	448	80	101
	ETV6-ABL1	218	51	74
	NUP214-ABL1	263	41	65
	RCSD1-ABL1	250	55	117
	RCSD1-ABL2	167	28	41
	EBF1-PDGFR β	691	208	481

Tabelle 13 Betrachtung verschiedener Genmengen sortiert nach Fusionsprotein und Regulationsrichtung. N_G = Anzahl aller differentiell regulierten, proteincodierenden Gene eines Konstrukts im Vergleich zur Leervektorkontrolle; N_Z = Anzahl der differentiell regulierten, proteincodierenden Gene eines Konstrukts, die von ClueGO einem signifikant angereicherten Term zugeordnet wurden; N_S = Summe der Gene aller Gruppen eines Diagramms (Abbildung 25 und 26) inklusive Wiederholungen.

Am Beispiel von BCR-ABL1 bedeutet dies, dass insgesamt 301 proteincodierende Gene im Vergleich zur Leervektorkontrolle differentiell hochreguliert waren. Davon konnten durch ClueGO 130 einem signifikant angereicherten Term zugeordnet werden. Die Summe der Gene aller Gruppen inklusive Wiederholungen war mit 710 jedoch deutlich höher, da Gene Teil verschiedener Gruppen sein konnten. Für die Genanzahl der in Abbildung 25 gezeigten Gruppen von BCR-ABL1 bedeutete dies beispielsweise, dass in der Gruppe „Herpes simplex virus 1 infection“ 96 einzigartige durch BCR-ABL1 hochregulierte, proteincodierende Gene angereichert waren und in der Gruppe „Immune System“ 68. Die Überschneidung der Gene verschiedener Gruppen war also möglich und ist bei der Betrachtung der Ergebnisse zu beachten. Die in den Diagrammen angegebenen Prozentzahlen beziffern den Anteil einer Gruppe an der sich aus den Genen aller Gruppen eines Diagramms inklusive Wiederholungen ergebenden Genmenge (N_S).

4.9.1 GSEA der hochregulierten Gene

Die GSEA der hochregulierten Gene (Abbildung 25) zeigte, dass Gruppen der Kategorie „Immunsystem“ (rot) innerhalb aller Konstrukte einen großen Anteil ausmachten. Im Falle von BCR-ABL1 wurden sogar alle Gruppen mit einem Anteil $> 5\%$ an N_S dieser Kategorie zugeordnet. Mit deutlich geringerem Anteil war die Kategorie „Regulation des Zell-Zell Kontakts“ (gelb) vertreten, die bei vier von sechs Konstrukten vorhanden war. Einen besonders großen Genanteil hatte die Kategorie „Regulation des Zell-Zell Kontakts“ bei ETV6-ABL1 (38,5 %) und EBF1-PDGFR β (32,3 %), aber auch bei RCSD1-ABL1 und RCSD1-ABL2 spielte sie eine Rolle (9,2 % bzw. 6,6 %).

Gruppen der Kategorie „Malignom-assoziiert“ (grün) waren in allen Konstrukten außer bei BCR-ABL1 vertreten. Sie repräsentierten allerdings nur einen geringen Anteil der Genmenge N_S , von 5,2 % bei NUP214-ABL1 bis 15,8 % bei RCSD1-ABL1. Gruppen, die keiner spezifischen Kategorie zugeordnet und in der Kategorie „Weitere“ zusammengefasst wurden (braun), waren bei ETV6-ABL1 (23,1 %), RCSD1-ABL1 (18,3 %), RCSD1-ABL2 (38,5 %) und EBF1-PDGFR β (12,5 %) angereichert.

ETV6-ABL1 stellte in dieser Analyse einen Sonderfall dar. Hier wurden bei der Analyse auch Terms berücksichtigt, in denen die differentiell regulierten Gene nur mindestens 2 % aller Gene des Terms ausmachten, da nur wenige Terms angereichert waren. In den anderen Konstrukten mussten mindestens 4 % der Gene eines Terms enthalten sein, damit dieser berücksichtigt wurde.

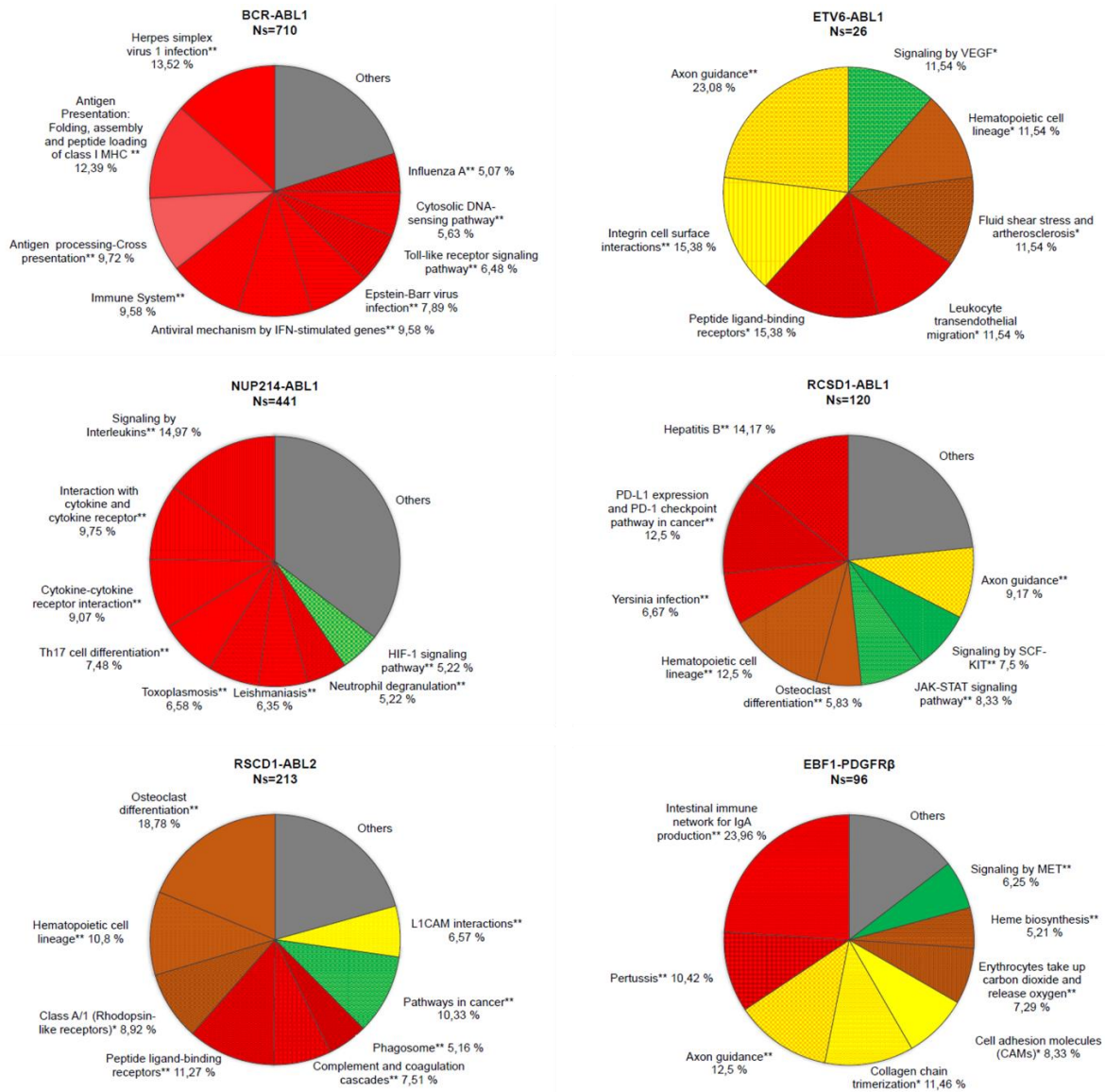


Abbildung 25 GeneSetEnrichment Analysis der hochregulierten Gene. Die GSEA wurde mit der Cytoscape App ClueGo für KEGG- und Reactome-Signalwege durchgeführt. Analysiert wurden alle proteincodierenden Gene, die im Vergleich zur Leervektorkontrolle signifikant differentiell hochreguliert waren ($|\log_2\text{foldchange}| \geq 1$; $\text{FDR} < 0,1$). Die Prozentzahl beziffert den Genanteil einer Gruppe an der sich aus den Genen aller Gruppen eines Diagramms ergebenden Genmenge (N_s). Gene, die Teil verschiedener Gruppen waren, gingen mehrfach in die Berechnung von N_s ein. Unter „Others“ wurden alle Gruppen zusammengefasst, deren Genanteil an $N_s < 5\%$ war. Abbildungskriterien: In den Gruppen befanden sich nur signifikant angereicherte Terms ($p < 0,05$, Benjamini-Hochberg korrigiert), in denen mindestens 3 differentiell regulierte Gene enthalten waren, die mindestens 4 % aller Gene des Terms ausmachten (bei ETV6-ABL1 mindestens 2 %). Legende: Rot = Immunsystem; Gelb = Regulation des Zell-Zell Kontakts; Grün = Malignom-assoziiert; Braun = Weitere; Die angegebenen p-Werte beziehen sich auf die Signifikanz der Gruppen, in denen die Terms zusammengefasst wurden: ** = $p < 0,01$; * = $p < 0,05$

Immunsystem		Malignom-assoziert	Regulation des Zell-Zell Kontakts	Weitere
Antigen Presentation: Folding, assembly and peptide loading of class I MHC/ Antigen processing- Cross presentation	Leishmaniasis	HIF-1 signaling pathway	Axon guidance	Class A/1 (Rhodopsin-like receptors)
Antiviral mechanism by IFN-stimulated genes	Leukocyte transendothelial migration	JAK-STAT signaling pathway	Cell adhesion molecules (CAMs)	Erythrocytes take up carbon dioxide and release oxygen
Complement and coagulation cascades	Neutrophil degranulation	Pathways in cancer	Collagen chain trimerization	Fluid shear stress and arteriosclerosis
Cytosolic DNA sensing pathway	PD-L1 expression and PD-1 checkpoint pathway in cancer	Signaling by MET	Integrin cell surface interaction	Hematopoietic cell lineage
Epstein-Barr virus infection	Pertussis	Signaling by VEGF	L1CAM interactions	Heme biosynthesis
Hepatitis B	Phagosome			Osteoclast differentiation
Herpes simplex virus 1 infection	Signaling by Interleukins			
Immune System	<i>Signaling by SCF-KIT</i>			
Influenza A	Th17 cell differentiation			
Interaction with cytokine and cytokine receptor	Toll-like receptor signaling pathway			
Intestinal immune network for IgA production	Toxoplasmosis			
<i>JAK-STAT signaling pathway</i>	Yersinia infection			

Tabelle 14 Zuordnung der Gruppen der GeneSetEnrichment Analysis von hochregulierten Genen in Hauptkategorien anhand der „leading terms“. Legende: Fettdruck = Gruppe bei hoch- und herunterregulierten Genen repräsentiert; Kursivdruck = Mehrfach zugeordnete Gruppe, die in einer anderen Kategorie abgebildet wurde (siehe Abbildung 25).

Die GSEA der hochregulierten Gene zeigte, dass Terms, die mit dem Immunsystem assoziiert sind, in allen Konstrukten angereichert waren. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass die Fusionsproteine gleiche Gene differentiell regulieren. Um dies zu überprüfen wurde betrachtet, inwiefern bei den durch die einzelnen Konstrukte hochregulierten Genen, die den Gruppen der Kategorie „Immunsystem“ zugeordnet wurden, Überschneidungen zwischen den Konstrukten vorlagen (Tabelle 15).

	BCR-ABL1	ETV6-ABL1	NUP214-ABL1	RCSD1-ABL1	RCSD1-ABL2	EBF1-PDGFRβ
BCR-ABL1(119)						
ETV6-ABL1 (6)	1/124 (0,8 %)					
NUP214-ABL1(94)	23/190 (12,1 %)	2/98 (2,0 %)				
RCSD1-ABL1 (22)	4/137 (2,9 %)	1/27 (3,7 %)	9/107 (8,4 %)			
RCSD1-ABL2 (40)	8/151 (5,3 %)	4/42 (9,5 %)	18/116 (15,5 %)	6/56 (10,7 %)		
EBF1-PDGFRβ (30)	6/143 (4,2 %)	1/35 (2,9 %)	10/114 (8,8 %)	6/46 (13,0 %)	11/59 (18,6 %)	
Median (Range)	6 (1-23)	1 (1-4)	10 (2-23)	6 (1-9)	8 (4-18)	6 (1-11)

Tabelle 15 Schnittmenge der hochregulierten Gene in der Kategorie „Immunsystem“ zwischen den Konstrukten. Diese Schnittmenge wurde aus einem Venn-Diagramm abgelesen (Oliveros 2007-2015). Der Zähler des Bruchs stellt die Anzahl der Gene dar, die durch beide Konstrukte hochreguliert und Gruppen der Kategorie „Immunsystem“ zugeordnet wurden; der Nenner bildet sich aus der Summe der hochregulierten Gene der Konstrukte in dieser Kategorie, wobei Gene, die bei beiden hochreguliert waren, nur einmal gezählt wurden. In Klammern hinter dem Fusionsprotein steht die Anzahl der durch diese differentiell hochregulierten Gene in dieser Kategorie. Legende: ■ < 5 % ■ < 10 % ■ < 15 % ■ < 20 %

Die prozentualen Schnittmengen reichten von 0,8 % zwischen BCR1-ABL1 und ETV6-ABL1 bis zu 18,6 % zwischen RCSD1-ABL2 und EBF1-PDGFRβ. In 5 von 15 Vergleichen lag die Schnittmenge über 10 %, in 2 über 15 %. Weniger als 5 % Überschneidung zeigte sich in 6 von 15 Vergleichen. Bei ETV6-ABL1 bestand die geringste Überlappung mit anderen Konstrukten (Median von 1 [Range: 1-4]), hierbei ist jedoch die sehr geringe Anzahl (N = 6) der durch ETV6-ABL1 hochregulierten Gene in dieser Kategorie zu beachten. NUP214-ABL1 wies die größte Schnittmenge mit anderen Konstrukten auf (Median 10 [Range: 2-23]). Insgesamt zeigten sich jedoch wenig Überschneidungen zwischen den durch die Fusionsproteine differentiell hochregulierten Genen dieser Kategorie. Die Immunsystem-assoziierte Gensignatur der Fusionsproteine scheint somit hauptsächlich durch unterschiedliche Gene zu entstehen.

4.9.2 GSEA der herunterregulierten Gene

Bei der GSEA der herunterregulierten Gene (Abbildung 26) stand insbesondere die Kategorie „Malignom-assoziiert“ (grün) im Vordergrund. Bei NUP214-ABL1 und RCSD1-ABL1 machten Gruppen dieser Kategorie circa 50 % der Genmenge N_s aus, in den vier anderen Konstrukten enthielten sie jeweils noch mindestens ein Viertel der Gene. Auch die Kategorie „Immunsystem“ (rot) war in allen Konstrukten vertreten, jedoch deutlich schwächer ausgeprägt als in der GSEA der hochregulierten Gene. Weiterhin waren Gruppen der Kategorie „PIP-Metabolismus/PI3K“ (blau) in allen Konstrukten außer bei EBF1-PDGFR β vorhanden; während ihr Anteil bei RCSD1-ABL2 19,5 % erreichte, repräsentierten sie in allen anderen Konstrukten einen eher geringen Genanteil zwischen 5,1 % bei RCSD1-ABL1 und 11,9 % bei BCR-ABL1.

Bei BCR-ABL1, ETV6-ABL1 und NUP214-ABL1 war je eine Gruppe der Kategorie „Regulation des Zell-Zell Kontakts“ (gelb) angereichert. Der Genanteil der Gruppen, die keiner spezifischen Kategorie zugeordnet wurden (braun), war bei BCR-ABL1 (27,7 %) und RCSD1-ABL2 (22,0 %) besonders hoch, in geringerem Ausmaß waren solche Gruppen auch bei ETV6-ABL1 (5,4 %) und EBF1-PDGFR β (6,9 %) zu finden. Zu beachten ist, dass im Falle von BCR-ABL1 - aufgrund einer geringen Anzahl von angereicherten Terms - auch Terms bis zu einem p-Wert von 0,1 innerhalb der Gruppen zugelassen wurden.

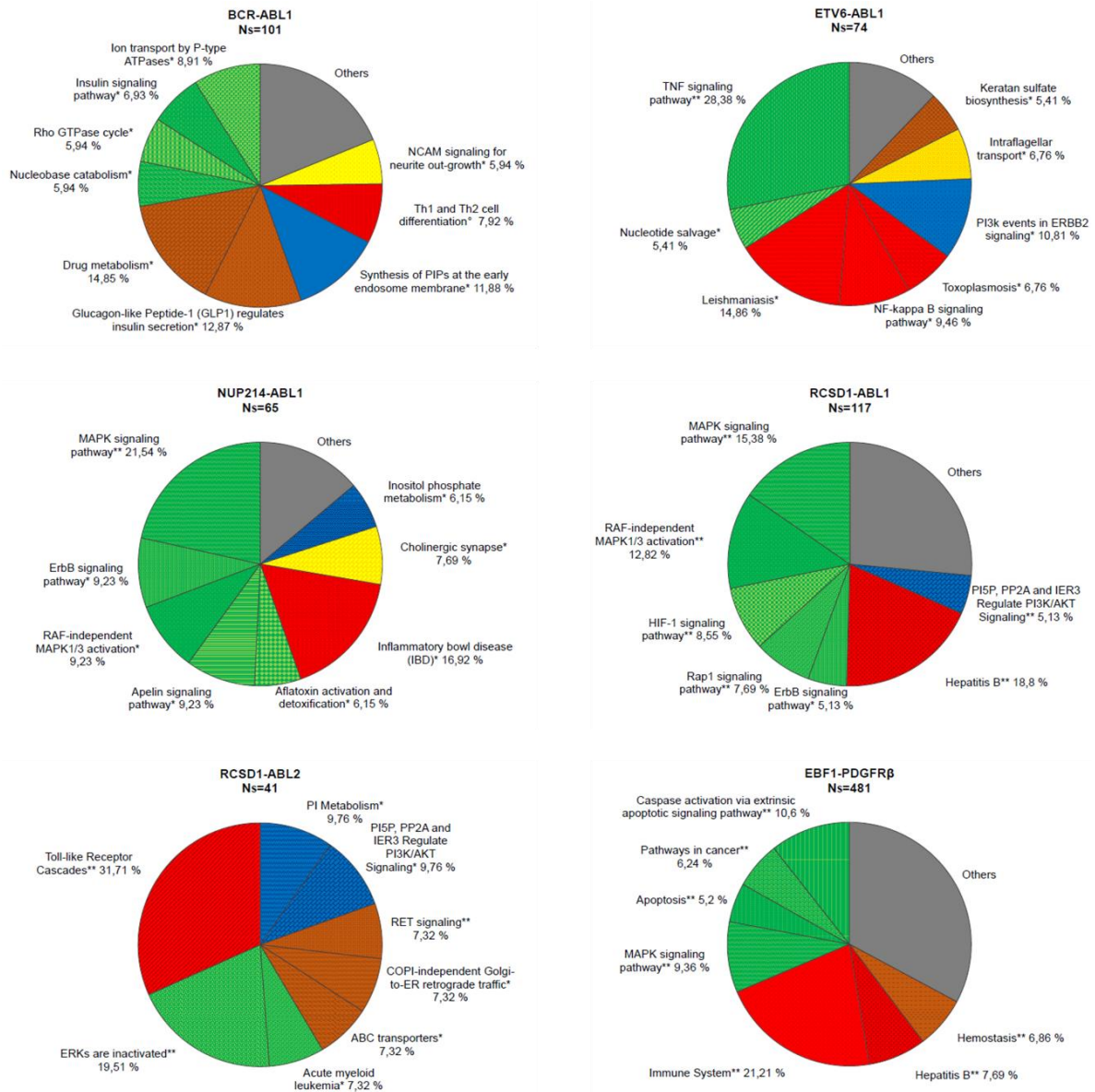


Abbildung 26 GeneSetEnrichment Analysis der herunterregulierten Gene. Abbildungserläuterung siehe Abbildung 25. Abbildungskriterien: In den Gruppen befanden sich nur signifikant angereicherte Terms ($p < 0,05$, Benjamini-Hochberg korrigiert; Ausnahme BCR-ABL1: hier wurden auch Terms bis $p < 0,1$ zugelassen), in denen mindestens 3 differentiell regulierte Gene enthalten waren, die mindestens 4 % aller Gene des Terms ausmachten.

Legende: Rot = Immunsystem; Blau = PIP-Metabolismus/PI3K; Gelb = Regulation des Zell-Zell Kontakts; Grün = Malignom-assoziiert; Braun = Weitere; Die angegebenen p-Werte beziehen sich auf die Signifikanz der Gruppen, in denen die Terms zusammengefasst wurden: ** = $p < 0,01$; * = $p < 0,05$; ° = $p < 0,1$

Immunsystem	PIP-Metabolismus/ PI3K	Malignom-assoziiert		Regulation des Zell-Zell Kontakts	Weitere
<i>Aflatoxin activation and detoxification</i>	Inositol phosphate metabolism	Acute myeloid leukemia	MAPK signaling pathway	Cholinergic synapse	ABC transporters
<i>Caspase activation via extrinsic apoptotic signaling pathway</i>	PI metabolism	Aflatoxin activation and detoxification	<i>NF-kappa B signaling pathway</i>	Intraflagellar transport	COPI-independent Golgi-to-ER retrograde traffic
Hepatitis B	PI3K events in ERBB2 signaling	Apelin signaling pathway	Nucleotide salvage/catabolism	NCAM signaling for neurite outgrowth	Drug metabolism
Immune System	PI5P, PP2A and IER3 regulate PI3K/AKT signaling	Apoptosis	Pathways in cancer		Glucagon-like Peptide-1 (GLP1) regulates insulin secretion
Inflammatory bowel disease	Synthesis of PIP at the early endosome membrane	Caspase activation via extrinsic apoptotic signaling pathway	RAF-independent MAPK1/3 activation		Hemostasis
Leishmaniasis		ErbB signaling pathway	Rap1 signaling pathway		Keratan sulfate biosynthesis
NF-kappa B signaling pathway		ERKs are inactivated	RET signaling		
Th1 and Th2 cell differentiation		HIF-1 signaling pathway	Rho GTPase cycle		
<i>TNF signaling pathway</i>		Insulin signaling pathway	TNF signaling pathway		
Toll-like Receptor cascades		Ion transport by P-type ATPases			

Toxoplasmosis

Tabelle 16 Zuordnung der Gruppen der GeneSetEnrichment Analysis von herunterregulierten Genen in Hauptkategorien anhand der „leading terms“. Legende: Fettdruck = Gruppe bei hoch- und herunterregulierten Genen repräsentiert; Kursivdruck = Mehrfach zugeordnete Gruppe, die in einer anderen Kategorie abgebildet wurde (siehe Abbildung 26).

Anschließend an die GSEA der herunterregulierten Gene folgte ebenfalls eine paarweise Betrachtung der Schnittmenge der differentiell regulierten Gene aus der Kategorie „Immunsystem“ zwischen den Konstrukten. Das Ergebnis war mit der Schnittmengen-Betrachtung der hochregulierten Gene in dieser Kategorie vergleichbar (Tabelle 17).

	BCR-ABL1	ETV6-ABL1	NUP214-ABL1	RCSD1-ABL1	RCSD1-ABL2	EBF1-PDGFRβ
BCR-ABL1 (8)						
ETV6-ABL1 (20)	1/27 (3,7 %)					
NUP214-ABL1 (11)	2/17 (11,8 %)	4/27 (14,8 %)				
RCSD1-ABL1 (22)	1/29 (3,4 %)	4/38 (10,5 %)	6/27 (22,2 %)			
RCSD1-ABL2 (13)	1/20 (5 %)	2/31 (6,5 %)	3/21 (14,3 %)	5/30 (16,7 %)		
EBF1-PDGFRβ (122)	3/127 (2,4 %)	6/136 (4,4 %)	6/127 (4,7 %)	13/131 (9,9 %)	9/126 (7,1 %)	
Median (Range)	1 (1-3)	4 (1-6)	4 (2-6)	5 (1-13)	3 (1-9)	6 (3-13)

Tabelle 17 Schnittmenge der herunterregulierten Gene in der Kategorie „Immunsystem“ zwischen den Konstrukten. Diese Schnittmenge wurde aus einem Venn-Diagramm abgelesen (Oliveros 2007-2015). Der Zähler des Bruchs stellt die Anzahl der Gene dar, die durch beide Konstrukte herunterreguliert und Gruppen der Kategorie „Immunsystem“ zugeordnet wurden; der Nenner bildet sich aus der Summe der herunterregulierten Gene der Konstrukte in dieser Kategorie, wobei Gene, die bei beiden herunterreguliert waren, nur einmal gezählt wurden. In Klammern hinter dem Fusionsprotein steht die Anzahl der durch diese differentiell herunterregulierten Gene in dieser Kategorie. Legende: Schnittmenge beträgt: ■ < 5 % ■ < 10 % ■ < 15 % ■ < 20 % ■ > 20 %

In 5 von 15 Vergleichen war die Überlappung weniger als 5 %, in 6 Vergleichen war sie über 10 %. Die geringste Überschneidung zeigte der Vergleich zwischen BCR-ABL1 und EBF1-PDGFRβ (2,4 %), die größte Überschneidung der Vergleich von NUP214-ABL1 mit RCSD1-ABL1 (22,2 %). Am geringsten war die Überschneidung mit anderen Konstrukten bei BCR-ABL1 (Median von 1 [Range: 1-3]), das allerdings auch nur mit acht Genen in dieser Kategorie vertreten war. Die größte Überschneidung mit anderen Konstrukten bestand bei EBF1-PDGFRβ (Median von 6 [Range: 3-13]). EBF1-PDGFRβ war allerdings mit 122 Genen in dieser Kategorie auch mit Abstand am stärksten vertreten.

Insgesamt lagen nur wenige Übereinstimmungen vor, sodass die Ergebnisse der Schnittmengenbetrachtung der hochregulierten Gene bestätigt wurden. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass zwar in allen Konstrukten Gene Immunsystem-assoziiertes Terms differentiell reguliert waren, es sich jedoch nur in Ausnahmefällen um die gleichen Gene handelte.

5 Diskussion

5.1 Diskussion des Testsystems

Das primäre Ziel dieser Arbeit war es, durch die detaillierte Charakterisierung sowie den Vergleich von Ph-like Fusionsproteinen und dem BCR-ABL1 Fusionsprotein neue Therapieansätze für die ALL zu identifizieren. Zur Untersuchung einer solchen Fragestellung eignen sich sowohl in vitro Experimente wie Zellkulturen als auch in vivo Experimente an Modellorganismen wie der Maus. Der Vorteil, der in dieser Arbeit zur Charakterisierung der Fusionsproteine gewählten Zellkultur-Experimente, liegt gegenüber in vivo Experimenten in der schnelleren und gut kontrollierbaren Durchführbarkeit; zudem können viele parallele Ansätze gleichzeitig bearbeitet werden.

Als Zellsystem wurde die murine, IL3-abhängige pro-B-Zelllinie Ba/F3 verwendet, die als Modellsystem in der hämatologischen Forschung weit verbreitet ist. Durch ihr rasches Wachstum werden experimentelle Effekte innerhalb weniger Tage oder Wochen deutlich und sowohl die Transfektion als auch die Transduktion der Ba/F3-Zellen zeigt eine hohe Effizienz. Zudem gilt der Verlust der IL3-Abhängigkeit nach genetischer Modifikation der Ba/F3-Zellen als Indikator eines transformierenden Prozesses (Warmuth et al. 2007).

Bei der Generation IL3-unabhängiger Ba/F3-Zellen ist jedoch zu beachten, dass diese auch spontan unter inadäquaten Kulturbedingungen, insbesondere bei einer zu hohen Zelldichte, entstehen können (DSMZ 2020). Dem wurde durch regelmäßiges Verdünnen der Zelldichte in der in vitro Kultur vorgebeugt. Zum anderen ist die Entstehung von de novo Mutationen innerhalb des Transgens, vor allem nach viraler Transduktion, beschrieben. Diese Mutationen können zur IL3-Unabhängigkeit beitragen und so die Ergebnisse verfälschen (Watanabe-Smith et al. 2017). Um die Integrität der eingebrachten Mutationen während der Transfektion, Selektion und Kultivierung der Ba/F3-Zellen zu bestätigen, wurde gezielt die Basenabfolge der Fusionsgene durch RNA-Sequenzierung überprüft. Mit einer medianen Basenabdeckung von 6 Reads/Base [Range: 1 - 16 Reads/Base] waren im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz in keinem der Fusionsgene de novo Mutationen nachweisbar. Diese Befunde zeigen, dass es während der Generierung und Kultivierung der Zelllinien nicht zu zusätzlichen Mutationen in den Fusionsgenen kam, die auf Transkript-Ebene bei gegebener Sequenziertiefe identifiziert werden konnten.

Die Integration des Fusionsgens und anderer Vektorbestandteile wie z.B. des Antibiotikaresistenzgens erfolgt nach Transfektion der Ba/F3-Zellen an nicht vorbestimmten Orten im Genom. Daher können Einflüsse des Integrationsorts auf die Versuchsergebnisse und Unterschiede zwischen den verschiedenen Klonen nicht ausgeschlossen werden. Außerdem kann durch Variationen der Versuchsbedingungen die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse gefährdet werden, da unterschiedliche Zelldichten, Medienvolumina oder CO₂/O₂-Konzentrationen Auswirkungen auf den Metabolismus und das Signalverhalten der Zellen haben

(Place et al. 2017). Um die Variabilität in den Experimentalbedingungen möglichst gering zu halten, wurde stets auf eine einheitliche Zelldichte und möglichst identische Medienvolumina geachtet, Unterschiede in den Versuchsabläufen vermieden und alle Untersuchungen an biologischen Triplikaten durchgeführt.

Weiterhin ist die Frage nach der Übertragbarkeit von in vitro Ergebnissen auf die Situation in vivo von zentraler Bedeutung. Tumorzellen werden in ihrer Entwicklung durch ein komplexes Wechselspiel mit ihrer Mikroumgebung bestehend aus Stroma- und Endothelzellen, einer extrazellulären Matrix und nicht zuletzt diversen Immunzellen beeinflusst, welches unter Zellkulturbedingungen nicht oder nur unzureichend nachgebildet werden kann (Hanahan und Weinberg 2011; Nicholas et al. 2016). Hinzu kommt, dass zumeist mehrere genetische Veränderungen zur malignen Transformation einer Zelle nötig sind (Nowell 1976). Bei der Ph-like ALL spielen neben den Kinase-aktivierenden Genveränderungen auch Mutationen in Genen der B-Zell-Entwicklung wie *IKZF1*, *PAX5* und *EBF1* eine wichtige Rolle (Den Boer et al. 2009). Im hier verwendeten Versuchsdesign wurde jedoch auf die Simulation dieser verschiedenen, komplexen Einflüsse verzichtet, um eine isolierte Betrachtung der Fusionsproteine zu ermöglichen und ihre unterschiedlichen Effekte deutlich zeigen zu können. Um eine bessere Übertragbarkeit auf den Menschen zu ermöglichen und die Bedeutung der Fusionsgene für die Transformation von B-Zellen in vivo beurteilen zu können, sind ergänzend zu dieser Arbeit weiterführende Experimente nötig. Hierfür kommen insbesondere PDX-Modelle (Patient derived xenograft) oder Untersuchungen direkt an Primärmaterial von Patienten in Betracht.

5.2 Kinaseaktivität und TKI-Empfindlichkeit

Aberrant aktivierte Tyrosinkinase sind in einer Vielzahl von Tumorentitäten hauptverantwortlich für die maligne Transformation der Zellen (Paul und Mukhopadhyay 2004). Eine hohe Tyrosinkinase-Aktivität sorgt für eine starke Aktivierung proliferationsfördernder Signalwege und folglich für eine schnellere Zellproliferation (Drake et al. 2014; Jiao et al. 2018). Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass alle in dieser Arbeit untersuchten Fusionsgene die Fähigkeit zur Transformation von Ba/F3-Zellen haben, sodass diese IL3-unabhängig proliferierten (Daley und Baltimore 1988; Golub et al. 1996; De Keersmaecker et al. 2008a; Roberts et al. 2017; Welsh et al. 2018). Der aberranten Tyrosinkinase-Aktivität wird dabei eine wichtige Rolle zugeschrieben. Unterstrichen wird dies dadurch, dass transformierte Zelllinien oder humane Leukämiezellen, die eines der untersuchten Fusionsgene tragen, empfindlich gegenüber dem Einsatz von TKI sind (Roberts et al. 2014a).

In der durchgeführten Western Blot Analyse war die Tyrosinkinase-Aktivität zwischen den meisten untersuchten Fusionsproteinen vergleichbar (Abbildung 14). Es zeigten sich

lediglich geringe Unterschiede in den Bandenmustern der Western Blot Analyse, die jedoch größtenteils auf Autophosphorylierung der Fusionsproteine zurückzuführen waren. Passend zu den Ergebnissen von Keersmaecker et al. (De Keersmaecker et al. 2008b) sowie Okuda et al. (Okuda et al. 1996), die eine stärkere Tyrosinkinase-Aktivität von BCR-ABL1 im Vergleich mit NUP214-ABL1 bzw. ETV6-ABL1 zeigten, wies BCR-ABL1 eine besonders ausgeprägte Tyrosinkinase-Aktivität auf. Bei EBF1-PDGFR β war im Vergleich zur Leervektorkontrolle keine erhöhte Tyrosinkinase-Aktivität nachweisbar, möglicherweise durch die relativ hohe Hintergrundfärbung des hier verwendeten Phosphotyrosin-Antikörpers bedingt. In Folgeuntersuchungen der Arbeitsgruppe konnte die Tyrosinphosphorylierung von EBF1-PDGFR β mittels SH2-Profilings und unter Verwendung Phosphotyrosin-spezifischer - gegen PDGFR β gerichteter - Antikörper nachgewiesen werden (unpublizierte Daten).

BCR-ABL1 zeigte eine moderate TKI-Sensitivität (IC₅₀: 446 nM Imatinib) während EBF1-PDGFR β am sensitivsten auf die TKI-Behandlung reagierte (IC₅₀: 3,7 nM Imatinib). Dies steht im Einklang mit unpublizierten Daten des ALLtogether-Konsortiums, welches ebenfalls eine äußerst hohe Sensitivität primärer humaner EBF1-PDGFR β ⁺ ALL gegenüber Imatinib beobachtete. Die Hemmkonzentration (IC₅₀) für die weiteren Konstrukte lag zwischen 23 – 49 nM des Wirkstoffs Imatinib (Abbildung 20).

Ein klarer Zusammenhang zwischen der Tyrosinkinase-Aktivität und der Proliferationsaktivität der mit den jeweiligen Fusionsgenen stabil transfezierten Ba/F3-Zellen konnte nicht beobachtet werden. EBF1-PDGFR β ⁺ Ba/F3-Zellen proliferierten signifikant schneller als RCSD1-ABL1, RCSD1-ABL2 und NUP214-ABL1. BCR-ABL1 und ETV6-ABL1 proliferierten signifikant schneller als RCSD1-ABL2, jedoch nicht schneller als RCSD1-ABL1 oder NUP214-ABL1 (Abbildung 18).

Am ehesten sind die Unterschiede hinsichtlich der Tyrosinkinase-Aktivität und der TKI-Sensitivität durch die unterschiedlichen N-terminalen Anteile der ABL-Kinase (CAP; SH2; SH3) in den Fusionsproteinen sowie die verschiedenen Mechanismen der aberranten Aktivierung der Tyrosinkinase zu erklären (siehe Kapitel 1.4). Dazu passend waren die beobachteten Unterschiede zwischen RCSD1-ABL1 und RCSD1-ABL2 hinsichtlich der untersuchten Eigenschaften der Tyrosinkinase gering. Die Unterschiede zwischen RCSD1-ABL1 und RCSD1-ABL2 liegen vorwiegend im C-terminalen Teil der Fusionsproteine und betreffen DNA- bzw. Aktin-Bindungsdomänen, während die N-terminalen Teile der Fusionsproteine mit CPI, SH2- und Tyrosinkinase-Domäne weitgehend gleich aufgebaut sind.

Des Weiteren müssen bei der Begutachtung der Ergebnisse experimentelle Faktoren berücksichtigt werden. Neben dem zufälligen Integrationsort des Fusionsgens in das Genom der Ba/F3-Zellen sind auch die Transfektionseffizienz und Integrationshäufigkeit Schwankungen unterworfen, sodass die Fusionsgen-Dosis je Klon variieren kann. Auswirkungen dieser Schwankungen auf die Tyrosinkinase-Aktivität oder die Proliferationsaktivität sind

möglich. Auch das zugrundeliegende Zellsystem kann Einfluss auf die Ergebnisse gehabt haben. Es ist beispielsweise denkbar, dass ETV6-ABL1 und BCR-ABL1 gegenüber anderen Fusionsproteinen einen Wachstumsvorteil hatten, da das durch sie ausgelöste Signalverhalten IL3-abhängigen Signalprozessen in Ba/F3-Zellen ähnelt (Okuda et al. 1996). Um repräsentative Aussagen über qualitative und quantitative Unterschiede zwischen den durch die unterschiedlichen Fusionsproteine ausgelösten Signalprozessen und deren Auswirkungen treffen zu können, erscheint die Überprüfung der Ergebnisse in mehreren unabhängigen Zellsystemen daher sinnvoll.

Insgesamt bleibt festzuhalten, dass das Versuchsdesign auf die Verifizierung des Testsystems ausgelegt war, indem Tyrosinkinase-Aktivität und TKI-Sensitivität der Fusionsproteine qualitativ nachgewiesen wurden. Zur besseren Abbildung quantitativer Unterschiede zwischen den Konstrukten hinsichtlich der Tyrosinkinase-Aktivität, der TKI-Sensitivität sowie der Proliferationsaktivität und um die Ursachen der aufgezeigten Unterschiede detaillierter betrachten zu können, sind umfassendere Versuche erforderlich. Diese konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht umgesetzt werden.

5.3 Signaltransduktion über STAT3 und STAT5

In allen mit einem Fusionsgen transfezierten Ba/F3-Zellen konnte phosphoryliertes STAT5 (pSTAT5) mittels phospho-spezifischer Antikörper in der Western Blot Analyse nachgewiesen werden (Abbildung 16), wie auch bereits in anderen Studien zuvor gezeigt wurde (Frank und Varticovski 1996; Spiekermann et al. 2002; Kleppe et al. 2010; Roberts et al. 2017; Zhang et al. 2018). Zu bedenken ist, dass neben den Fusionsproteinen auch andere, zell-spezifische Faktoren die Phosphorylierung von STAT5 sowie die Auswirkungen dieser Phosphorylierung beeinflussen können. Darauf schließen lassen Ergebnisse von Spiekermann et al., die Unterschiede in der Intensität der STAT5-Phosphorylierung zwischen mit BCR-ABL1 transfezierten HEK293- und Ba/F3-Zellen zeigen (Spiekermann et al. 2002). Weiterhin wurde beschrieben, dass STAT5 in Fibroblasten eine antiproliferative Wirkung entfalten kann, während in malignen Erkrankungen des hämatopoetischen Systems über STAT5-Phosphorylierung häufig Onkogen-Aktivität vermittelt wird (Yu et al. 2010; Ferbeyre und Moriggl 2011). In von Fusionsproteinen mit aberranter Tyrosinkinase-Aktivität getriebenen Leukämien kann durch den Einsatz von TKIs diese STAT5-Phosphorylierung abgeschwächt werden (Nam et al. 2007; Kleppe et al. 2010; Roberts et al. 2014a; Welsh et al. 2018). Umgekehrt ist es auch möglich, mittels der Inhibition von STAT5 die onkogene Wirkung der konstitutiv aktiven Kinase zu verringern. So zeigte eine Studie positive Ergebnisse, die die Kombination eines STAT5-Inhibitors mit Imatinib bei an Ph-positiver CML erkrankten

Patienten testete (Rousselot et al. 2017). Der Einsatz von STAT5-Inhibitoren könnte folglich auch für Ph-like ALL eine sinnvolle Therapieergänzung darstellen.

Im Gegensatz zu pSTAT5 wurde pSTAT3 in dieser Arbeit nur in NUP214-ABL1 transfezierten Ba/F3-Zellen nachgewiesen (Abbildung 16). Spiekermann et al. konnten STAT3-Phosphorylierung jedoch auch unter Expression von ETV6-ABL1 und BCR-ABL1 in Ba/F3-Zellen zeigen (Spiekermann et al. 2002). Ursächlich für diese Diskrepanzen könnte eine zu geringe Sensitivität des verwendeten Antikörpers sein. In diesem Fall könnte der Nachweis von pSTAT3 mittels eines sensitiveren Antikörpers oder einer der Western Blot Analyse vorangehenden Immunpräzipitation der STAT3-Proteine gelingen. Letztere Methode wurde auch von Spiekermann et al. angewandt (Spiekermann et al. 2002).

Von besonderem Interesse ist der STAT3 aktivierende Signalweg IL6-JAK-STAT3, da er in einer Vielzahl von Tumoren hyperaktiv ist und dort Prozesse wie Wachstum, Überleben und Metastasierung fördert, gleichzeitig unterdrückt er die Antitumor-Reaktion des Immunsystems (Chang et al. 2013; Johnson et al. 2018). Momentan werden daher zahlreiche präklinische und klinische Studien zur Entwicklung von Medikamenten durchgeführt, die diesen Signalweg zielgerichtet angreifen (Johnson et al. 2018). Es konnte zwar nur für NUP214-ABL1 STAT3 Phosphorylierung gezeigt werden, IL6 war jedoch in allen untersuchten Konstrukten außer ETV6-ABL1 auf Transkriptebene signifikant hochreguliert. Daher könnten Medikamente, die den IL6-JAK-STAT3 Signalweg hemmen, in einigen Ph-like ALL eine interessante Therapieoption darstellen.

5.4 Zytoplasmatische Lokalisation der Fusionsproteine

Die Funktion von Proteinen ist maßgeblich von ihrer subzellulären Lokalisation abhängig. Insbesondere bei Fusionsproteinen, die unter Umständen aus in unterschiedlichen Zellkompartimenten vorkommenden Protein(anteilen) bestehen, kann es jedoch zu einer Fehllokalisierung und folglich zu einer veränderten Funktion eines Fusionspartners kommen (siehe Kapitel 1.4). Zur Überprüfung der subzellulären Lokalisation der untersuchten Fusionsproteine wurden Zytospins der transfezierten Zellen angefertigt und die Fusionsproteine mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper nachgewiesen (Abbildung 22). Hierbei bestanden nur geringfügige Unterschiede zwischen den untersuchten Fusionsproteinen, die alle vorwiegend zytoplasmatisch lokalisiert waren. Allerdings zeigte BCR-ABL1 mit granulären Strukturen vergleichbare punktuelle Anreicherungen im Zytoplasma. Verantwortlich für die Bildung dieser BCR-ABL1 Granula ist die durch den N-terminalen Abschnitt von BCR vermittelte Oligomerisierung (Kashiwagi et al. 2019). Zudem ist die Co-Lokalisation von BCR-ABL1 in solchen Granula mit zahlreichen Substraten der Kinase wie PI3K, GRB2 und CrkL beschrieben (Skourides et al. 1999). Kashiwagi et al. vermuten, dass diese Nähe von

Substrat und Kinase zum leukämogenen Potenzial von BCR-ABL1 beiträgt (Kashiwagi et al. 2019). Bei den weiteren Fusionsproteinen war solch eine Granula-Bildung nicht nachweisbar; diese waren eher diffus im Zytoplasma verteilt.

Unabhängig von der Granula-Bildung ist jedoch die aus der pathologischen Genfusion resultierende, zytoplasmatische Fehllokalisierung von ABL1 bzw. EBF1 bei allen untersuchten Fusionsproteinen von Bedeutung. ABL1 und EBF1 entfalten viele ihrer physiologischen Funktionen im Zellkern. Eine aberrante zytoplasmatische Lokalisation führt zu pathologischen Signalprozessen bzw. zu einer Störung essenzieller B-Zell-Differenzierungsprogramme, wodurch die Entstehung von ALL begünstigt werden könnte (Wang 2000; Sirvent et al. 2008; Welsh et al. 2018).

Aufgrund der nukleär vermittelten wachstumshemmenden bzw. differenzierungsfördernden Wirkung von ABL1 und EBF1 besteht die Theorie, dass eine Translokation der Fusionsproteine in den Zellkern zu einer Wiederherstellung dieser Funktion führen könnte und die Erkrankung sich folglich selbst limitiert. Erste Studien, bei denen BCR-ABL1 in den Kern transloziert und dort fixiert wurde, zeigten eine Apoptose der Leukämiezellen in vitro (Dixon et al. 2009; Huang et al. 2013; Li et al. 2017). Die Anwendung solcher Systeme könnte insbesondere für TKI-resistente, durch ABL1-Fusionsproteine ausgelöste Leukämien, in denen ABL1 durch das Fusionsprotein zytoplasmatisch gebunden wird, eine interessante Therapieoption darstellen. Auch bei EBF1-PDGFR β zeigte sich, dass das Fusionsprotein bei nukleärer Lokalisation auch ohne die Hemmung der Tyrosinkinase die Wachstumsfaktorabhängigkeit der Zellen wiederherstellt (Welsh et al. 2018).

Die hier ebenfalls untersuchte Tyrosinkinase ABL2 enthält im Gegensatz zu ABL1 keine NLS und ist infolgedessen physiologisch überwiegend zytoplasmatisch lokalisiert (Greuber et al. 2013). Über die Auswirkung einer Kernlokalisierung von ABL2 ist nur wenig bekannt (Bianchi et al. 2013) und die Wirksamkeit einer kerntranslozierenden Therapie von ABL2-Fusionsproteinen daher nicht zu beurteilen.

5.5 Einfluss des 5`-Partners auf die Leukämogenese

In den bisher diskutierten Analysen lag der Fokus primär auf der Tyrosinkinase, welche in allen Fusionsproteinen Teil des 3`-Partners der Fusion ist. Die 5`-Partner sind deutlich diverser und spielen eine wichtige Rolle bei der aberranten Aktivierung der Tyrosinkinase sowie der zytoplasmatischen Lokalisation des Fusionsproteins. Ob es weitere Effekte gibt, die je nach Fusionsprotein möglicherweise unterschiedliche Einflüsse auf die Leukämogenese haben könnten, ist bisher noch weitgehend ungeklärt. Um Unterschiede im Transkriptom der Konstrukte abzubilden, wurde daher eine RNA-Sequenzierung der transfezierten Ba/F3-Zellen durchgeführt. Hier zeigte sich, dass sich die Transkriptome der Konstrukte

deutlich voneinander und von dem der Leervektorkontrolle unterschieden. Nahezu alle Triplikate der Konstrukte bildeten sowohl in der PCA (Abbildung 23) als auch in der Hierarchischen Cluster Analyse (Abbildung 24), die beide anhand der Daten der RNA-Sequenzierung angefertigt wurden, eindeutige Cluster. Lediglich ein Klon von ETV6-ABL1 lag in der PCA weit entfernt von den anderen beiden Klonen des Triplikats. Dies spricht für die Trennschärfe des verwendeten Modellsystems und zeigt außerdem, dass die 5`-Fusionspartner Auswirkungen auf das Transkriptom haben, die über die reine Aktivierung der Tyrosinkinase hinausgehen. Inwiefern diese Auswirkungen funktionell relevant für die Leukämogenese sind, müssen weitere Untersuchungen zeigen. Der von De Keersmaecker et al. durchgeführte Vergleich von NUP214-ABL1 und BCR-ABL1 lässt allerdings eine solche Relevanz vermuten (De Keersmaecker et al. 2008b). Dort wurde gezeigt, dass sich die Fusionsproteine unter anderem hinsichtlich Substratpräferenz, TKI-Sensitivität, subzellulärer Lokalisation und aktivierten Signalwegen unterscheiden. Konträr dazu sind die Ergebnisse von Okuda et al., die große Gemeinsamkeiten bezüglich der durch BCR-ABL1 und ETV6-ABL1 phosphorylierten Substrate und aktivierten Signalwege beobachteten (Okuda et al. 1996). Aufgrund der Austauschbarkeit von BCR durch ETV6 nahmen sie an, dass die mit BCR assoziierten Funktionen abgesehen von der Aktivierung der ABL1-Tyrosinkinase keinen wesentlichen Einfluss auf die Leukämogenese hätten. Es ist hier anzumerken, dass sowohl BCR als auch ETV6 über eine Dimerisierungsdomäne und einen GRB2-bindenden Tyrosinrest verfügen, mit denen sie ABL1 über einen sehr ähnlichen Mechanismus aktivieren (siehe Kapitel 1.4). Wären in dieser Studie 5`-Fusionspartner als Vergleich gewählt worden, die weniger ähnliche Mechanismen involvieren, hätten möglicherweise unterschiedliche Einflüsse gezeigt werden können.

Insgesamt kann aufgrund der Beobachtungen von De Keersmaecker et al. bezüglich NUP214 und BCR und der in dieser Arbeit gezeigten signifikanten Unterschiede in den Genexpressionsprofilen mit hoher Wahrscheinlichkeit von einem - über die reine Aktivierung der Tyrosinkinase hinausgehenden - funktionellen Einfluss des 5`-Partners auf die Leukämogenese ausgegangen werden (De Keersmaecker et al. 2008b).

5.6 Einordnung der GSEA Ergebnisse

Die in der RNA-Sequenzierung differentiell regulierten Gene wurden anschließend mittels der Cytoscape App ClueGO per GSEA tiefgehend analysiert, um einen ersten Überblick über mögliche der differentiellen Genregulation zugrundeliegende Mechanismen zu erhalten. Bei der Einordnung der Ergebnisse sind durch die GSEA bedingte Besonderheiten zu beachten. Die GSEA schloss nur proteincodierende Gene ein, die einem signifikant angereicherten Term zugeordnet wurden. Dies waren im Median 25,99 % aller differentiell

regulierten, proteincodierenden Gene eines Konstrukts (Range: 20,63 % - 28,03 %; Daten anhand von Tabelle 13 berechnet), somit konnten auf der Basis des festgelegten Signifikanzniveaus ein erheblicher Teil differentiell regulierter, proteincodierender Gene nicht entsprechenden Funktionskategorien zugeordnet werden.

Zudem ist zu beachten, dass die Überlappung der Gene zwischen Gruppen, die der gleichen Kategorie zugeordnet wurden, teilweise erheblich war. Aufgrund dessen kann es zu einer Verzerrung zwischen den tatsächlich durch eine Kategorie repräsentierten einzigartigen Genen und dem prozentualen Anteil der Gruppen einer Kategorie in der Analyse kommen. In dieser Arbeit spiegeln die prozentualen Anteile der Kategorien jedoch größtenteils auch die Rate der einzigartigen Gene je Kategorie wider (Daten nicht gezeigt). Außerdem ist die klare Zuordnung eines Gens in eine Funktionskategorie schwierig, da auch die zeitliche und räumliche Organisation der Gene eines Signalwegs dessen Funktion verändern kann (Kholodenko et al. 2010). Das an einem definierten singulären Zeitpunkt erhobene Transkriptomprofil detektiert jedoch keine dynamischen Prozesse, es bildet lediglich die Genexpression zum Zeitpunkt der Messung ab.

Ergänzend könnte die Betrachtung der Genexpressionsprofile der Konstrukte zu verschiedenen Zeitpunkten, beispielsweise direkt nach IL3-Entzug und im Verlauf nach mehreren Wochen interessant sein. Dies könnte Informationen darüber liefern, welche Signalwege insbesondere zum Überwinden der Wachstumsfaktorabhängigkeit vonnöten sind und wie und ob sich die Netzwerke im Laufe des Selektionsprozesses und der Kultivierung verändern.

Weiterhin fiel in der GSEA der herunterregulierten Gene auf, dass viele Gruppen angereichert waren, die mit Signalwegen wie PI3K-AKT oder RAS-MAPK in Zusammenhang stehen (Abbildung 26). Diese Signalwege, die sowohl in zahlreichen Tumoren als auch in der B-Zell-Differenzierung eine wichtige Rolle spielen, werden auch durch das der Leervektor-kontrolle als Wachstumsfaktor zugesetzte IL3 aktiviert (Reddy et al. 2000). Daher war es nicht möglich zu differenzieren, ob diese Signalwege durch die Fusionsproteine aktiv gehemmt oder lediglich schwächer als durch IL3 aktiviert wurden. Dies zeigt beispielhaft, dass bei der Einordnung der angereicherten Gruppen der GSEA ein Einfluss des nur in der Leervektorkontrolle zugesetzten IL3 nicht ausgeschlossen werden konnte, was eine eindeutige Zuordnung und Interpretation der Ergebnisse erschwerte. Eine Wiederholung der RNA-Sequenzierung und der GSEA, bei der als Kontrolle eine mit Leervektor transfezierte Ba/F3-Zellkultur nach kurzzeitigem IL3-Entzug ohne Induktion der Apoptose verwendet wird, um so den Effekt des IL3 auf die Genexpression zu vermindern, wäre daher sinnvoll. Angesichts der IL3-Abhängigkeit der Ba/F3-Zellen ist eine dauerhafte Kultivierung der Leervektorkontrolle ohne IL3 leider nicht möglich.

Trotz dieser Einschränkungen vermag die GSEA einen ersten Überblick über mögliche Verbindungen zwischen den differentiell regulierten Genen zu gewinnen. Alle darauf basierenden Aussagen sind spekulativ, eignen sich jedoch zur Hypothesenbildung. Um belastbare Aussagen über die Bedeutung einzelner, angereicherter Signalnetzwerke für die Leukämogenese und das Wachstumsverhalten der Zellen treffen zu können, sind allerdings umfassendere Untersuchungen notwendig. Dies gilt auch für die folgenden Überlegungen zur Bedeutung der beobachteten inflammatorischen Gensignatur.

5.7 Inflammatorische Gensignatur

In der GSEA der hochregulierten Gene waren die der Kategorie „Immunsystem“ zugeordneten Gruppen bei allen Konstrukten deutlich ausgeprägt (Abbildung 25). Größtenteils waren diese Gruppen mit Infektionskrankheiten oder infektionsgerichteter Immunreaktion assoziiert. Ein Zusammenhang zwischen Infektionen im Kindesalter und Leukämien wird bereits seit über 100 Jahren vermutet (Ward 1917). Heute wird angenommen, dass pathologische Immunreaktionen auf im Kindesalter auftretende Infektionen die Entstehung von Leukämie fördern, indem sie sekundäre Mutationen in Zellen mit bereits in utero vorliegenden präleukämischen Mutationen begünstigen (Greaves 2018). Untermuert wird diese Annahme durch Mausmodelle, welche zeigen konnten, dass Mäuse mit präleukämischen Genmutationen wie *PAX5^{+/-}* oder *ETV6-RUNX1* in hämatopoetischen Stamm- oder Vorläuferzellen oder in der Keimbahn nur eine ALL entwickelten, wenn diese aus einem sterilen in ein pathogen-haltiges Umfeld gelangten (Martin-Lorenzo et al. 2015; Rodriguez-Hernandez et al. 2017). Die zugrundeliegenden Mechanismen sind allerdings noch nicht vollständig geklärt. Eine Möglichkeit könnte sein, dass pathologische Immunreaktionen zu einer verstärkten Aktivierung der an der V(D)J-Rekombination beteiligten Rekombinationsaktivierenden Gene *RAG1/RAG2* und/oder der an der somatischen Hypermutation beteiligten aktivierungsinduzierten Cytidindesaminase (*AICDA*) führen, wodurch die Wahrscheinlichkeit für leukämogene Mutationen in Non-Ig (Immunglobulin) Genen gesteigert wird (Tsai et al. 2008; Swaminathan et al. 2015).

Dafür spricht, dass in *ETV6-RUNX1⁺* Leukämien *RAG1* gesteigert exprimiert wird und *RAG*-vermittelte Mutationen wesentlich zur Leukämogenese beitragen könnten (Papaemmanuil et al. 2014; Jakobczyk et al. 2022). Zudem entwickelten immundefiziente Mäuse in 100 % der Fälle eine ALL nach Transplantation von zuvor inflammatorisch mittels Lipopolysacchariden stimulierten *ETV6-RUNX1⁺* oder *BCR-ABL1⁺* B-Vorläuferzellen, insofern diese *AICDA* exprimierten. Wurden diese Experimente in *AICDA⁻* B-Vorläuferzellen durchgeführt, entwickelten sich Leukämien deutlich seltener und nur mit signifikanter Verzögerung (Swaminathan et al. 2015; Zhang et al. 2022). Dem entgegen stehen Untersuchungen von

Rodriguez-Hernandez et al., welche keine erhöhte *AICDA*-Expression in *ETV6-RUNX1*⁺ Mäusen nach Exposition gegenüber natürlichen Infektionen zeigen konnten. Ferner beobachteten sie, dass natürliche Infektionen auch *AICDA*-unabhängig die Entwicklung von B-ALL im Mausmodell förderten (Rodriguez-Hernandez et al. 2019). Sie vermuten daher, dass die von Swaminathan et al. und Zhang et al. beschriebenen Auswirkungen von *AICDA* auf die Infekt-assoziierte Leukämogenese am ehesten ein Artefakt der in vitro Stimulation darstellen.

In der vorliegenden Arbeit zeigte insbesondere RCSD1-ABL2, aber auch RCSD1-ABL1, EBF1-PDGFR β und NUP214-ABL1 in der durchgeführten RNA-Sequenzierung eine im Vergleich zur Leervektorkontrolle gesteigerte Expression von *AICDA*. *RAG1* und *RAG2* waren im Vergleich zur Leervektorkontrolle in keinem der Konstrukte gesteigert exprimiert. Bei RCSD1-ABL2 wurden zudem Gene der APOBEC-Familie (Akronym für: Apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide) gesteigert exprimiert; schwächer ausgeprägt auch bei BCR-ABL1 und EBF1-PDGFR β (Abbildung 27). Die APOBEC-Gene sind ebenfalls Teil des Immunsystems und wirken durch Mutation von viralem Genom in der antiviralen Immunität, darüber hinaus spielen sie aufgrund ihres mutagenen Potenzials eine Rolle in der Onkogenese diverser Tumore (Salter et al. 2016).

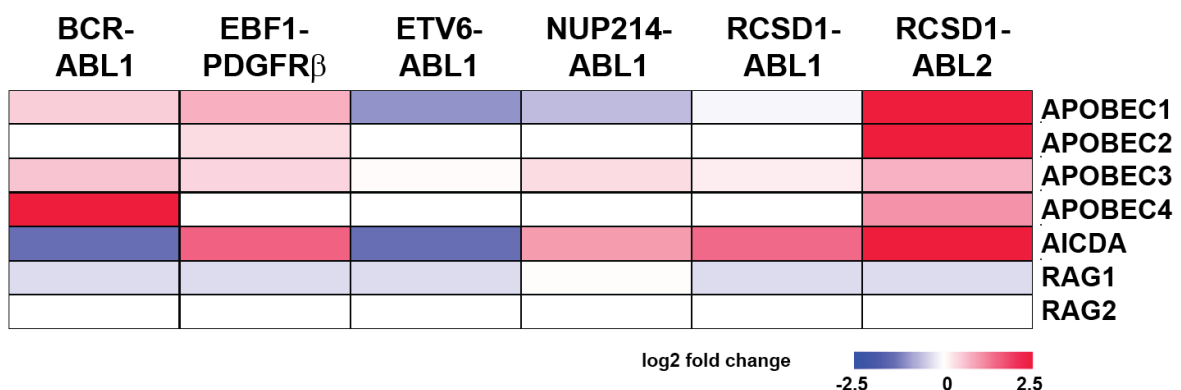


Abbildung 27 Relative Veränderungen in den mRNA-Expressionspegeln von Mitgliedern der APOBEC-Familie, der aktivierungsinduzierten Cytidinesaminase (AICDA) und der Rekombination-aktivierenden Gene RAG1 und RAG2. Dargestellt sind die log₂-transformierten Mittelwerte der Expressionsänderungen der untersuchten Gene in mit den angegebenen Fusionsgenen stabil transfezierten, IL3-unabhängigen Ba/F3-Zellen, relativ zur Leervektorkontrolle. Die Abbildung wurde von Dr. Peter Nollau mit dem Multiple Experiment Viewer (MeV 4.9.0) erstellt.

Zukünftig gilt es zu klären, inwiefern *AICDA* und *APOBEC* durch die untersuchten Ph-like Genfusionen auch in vivo gesteigert exprimiert werden und ob auch natürliche Infektionen zu der gesteigerten Expression von *AICDA* und *APOBEC* in Ph-like ALL beitragen. Dies könnte spannende neue Erkenntnisse hinsichtlich der genauen Mechanismen der Infekt-assoziierten Leukämogenese, insbesondere bei Ph-like ALL, liefern.

Ein weiterer Aspekt, wie Infektionen und Inflammation zur Entstehung und dem Fortschreiten einer ALL beitragen, ist das Zusammenspiel von proinflammatorischen Zytokinen mit Zellen des Knochenmarks und mit Leukämiezellen. Dies erzeugt ein Milieu, welches unter

anderem Überleben, Resistenz gegenüber Chemotherapie sowie die Migration der Leukämiezellen unterstützt, während die normale Hämatopoese beeinträchtigt wird (Dander et al. 2021). Proinflammatorische Zytokine wie IL6/IL1 β /TNF α förderten in vitro im Zusammenspiel mit mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks die Entwicklung von *ETV6-RUNX1*⁺ Klonen und führte zu einer signifikant erhöhten Anzahl an Mutationen (Beneforti et al. 2020). IL6 wurde von allen in dieser Arbeit untersuchten Fusionsproteinen außer ETV6-ABL1 auf Transkriptebene signifikant hochreguliert. Es besteht somit die Möglichkeit, dass die Ph-like Fusionsproteine durch ihre inflammatorische Gensignatur und insbesondere die gesteigerte Expression von IL6 ein inflammatorisch verändertes Knochenmark unabhängig von natürlichen Infektionen fördern. Die Fusionsproteine könnten somit nicht nur eine präleukämische Genaberration darstellen, sondern im Zusammenspiel mit mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks aktiv das Auftreten weiterer Mutationen und die Evolution präleukämischer Klone begünstigen. Inwiefern natürliche Infektionen diesen Mechanismus verstärken und auf diese Weise oder anderweitig die Entstehung von Ph-like ALL fördern, gilt es tiefergehend zu untersuchen.

Vor diesem Hintergrund könnten die im Zuge der aktuellen Sars-CoV2-Pandemie getroffenen verstärkten Isolations- und Hygienemaßnahmen eine große Chance darstellen (Lillie 2021). Bereits in Folge der Sars-CoV1-Pandemie in Hongkong 2003 kam es durch Isolationsmaßnahmen zu einer deutlich verringerten Inzidenz klassischer Infektionskrankheiten bei Kindern und infolgedessen auch zu einer verringerten Inzidenz von ALL (Li et al. 2007). Die Maßnahmen im Rahmen der Sars-CoV2-Pandemie bieten nun die Möglichkeit, an einer sehr großen Kohorte den Einfluss von Infektionen auf die Leukämogenese zu untersuchen. Die Ergebnisse solcher Studien könnten spannende Hinweise liefern, inwiefern Infektionen Ph-like ALL begünstigen und welchen Nutzen die Überlegungen zur Prävention von Leukämien im Kindesalter mittels gezielter Modulationen des Immunsystems durch Impfungen, Immuntraining oder Erhaltung eines natürlichen Mikrobioms des Darms auch für Ph-like ALL haben könnten (Greaves et al. 2021; Hauer et al. 2021).

5.8 Fazit und Ausblick

Aus der vorliegenden Arbeit ergaben sich drei Hauptaspekte, die zukünftig näher betrachtet werden sollten, vorausgesetzt die im murinen pro-B-Zell-System erhobenen Befunde lassen sich im Menschen reproduzieren. Zum Ersten hatten die untersuchten Fusionsproteine gemeinsame Eigenschaften, deren therapeutische Nutzung möglich erscheint. Diese waren neben der TKI-Sensitivität auch die Phosphorylierung von STAT5, im speziellen Fall von NUP214-ABL1 die Phosphorylierung von STAT3, die differentielle Regulation von IL6 sowie die zytoplasmatische Lokalisation. Zielgerichtete Inhibitoren für STAT3, STAT5 sowie IL-6

werden derzeit in unterschiedlichen Tumorentitäten intensiv erforscht (Rousselot et al. 2017; Johnson et al. 2018; Tolomeo et al. 2019; Kumar et al. 2020; Brown et al. 2021). Insofern diese Inhibitoren in Leukämien klinisch zur Anwendung gebracht werden können, ergäbe sich daraus die Möglichkeit, eine Vielzahl unterschiedlicher Ph-like Fusionsproteine durch die Integration dieser Inhibitoren in bestehende Therapieschemata effektiver therapieren zu können. Dies erscheint insbesondere vielversprechend, da die Prävalenz spezifischer Genfusionen aufgrund der hohen Diversität der Ph-like ALL teilweise sehr gering ist und es aufwändig wäre, für jede Genfusion individuelle Therapien zu entwickeln. Angesichts der hohen Plastizität der Signalwege ist jedoch davon auszugehen, dass Kombinationen verschiedener Signalweg-Inhibitoren benötigt werden, um eine ausreichende Wirksamkeit zu erzielen.

Zweitens bestanden nur wenige Überschneidungen bei den insgesamt durch die Fusionsproteine differentiell regulierten Genen. Dies bestätigt den erheblichen Einfluss der 5'-Partner auf die Genexpression. Es wirft aber auch die Frage auf, ob die wenigen übereinstimmenden Gene für die Gemeinsamkeiten der Fusionsproteine verantwortlich sind oder ob die Gemeinsamkeiten über komplexe Netzwerke vermittelt werden, in denen unterschiedliche Gene ähnliche Rollen übernehmen können.

Drittens erzeugten alle Fusionsproteine – wenn auch in unterschiedlich starker Ausprägung – eine inflammatorische Gensignatur. Es erscheint in Zusammenschau mit der Annahme, dass eine überschießende Immunreaktion Mutationen fördert, möglich, dass die Fusionsproteine durch die Aktivierung dieser Gensignatur aktiv zur Entstehung weiterer Mutationen beitragen, insbesondere weil am RNA/DNA-Editing beteiligte Gene wie *APOBEC* und *AICDA* durch die Fusionsproteine verstärkt exprimiert werden. Auch die in allen Konstrukten außer ETV6-ABL1 nachgewiesene verstärkte IL6-Expression ist interessant und könnte in vivo im Zusammenspiel mit mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks die Leukämogenese begünstigen. Gelingt es, diese Annahme zu bestätigen und die ursächlichen Mechanismen zu entschlüsseln, könnte dies einen wichtigen Fortschritt für das Verständnis der Leukämogenese bedeuten.

6 Zusammenfassung

Die Philadelphia Chromosom-like (Ph-like) akute lymphatische Leukämie (ALL) zeichnet sich durch eine hohe Diversität der zugrundeliegenden Genaberrationen aus und gehört zu den besonders aggressiven ALL-Subtypen. In der ABL-Class werden Ph-like Genfusionen zusammengefasst, deren 3`-Anteil eine Imatinib-sensitive Tyrosinkinase codiert. Ziel der Arbeit war es, ein besseres Verständnis über die ABL-Class zu erlangen und neue Ansätze für patientenschonende, zielgerichtete Therapieoptionen der ABL-Class zu entdecken. Hierfür wurden fünf Fusionsproteine der ABL-Class (ETV6-ABL1, NUP214-ABL1, RCSD1-ABL1, RCSD1-ABL2, EBF1-PDGFR β) sowie das BCR-ABL1 Fusionsprotein hinsichtlich Proteinexpression, Tyrosinkinase-Aktivität, Phosphorylierung von STAT3 und STAT5 sowie der TKI-Sensitivität in einem Ba/F3-Zellsystem untersucht. Weiterhin wurden die intrazelluläre Lokalisation der Fusionsproteine und die Genexpressionsprofile der mit einem Fusionsgen transfezierten Ba/F3-Zellen analysiert.

Alle untersuchten Fusionsproteine waren Imatinib-sensitiv (IC₅₀: 3,7 nM – 446 nM), phosphorylierten STAT5 und waren vorwiegend zytoplasmatisch lokalisiert. Phosphorylierung von STAT3 zeigte sich ausschließlich bei NUP214-ABL1. In der Genexpressionsanalyse bestanden nur wenige Überschneidungen bei den durch die Fusionsproteine differentiell regulierten Genen, jedoch erzeugten alle Fusionsproteine eine inflammatorische Gensignatur.

Aus den gezeigten gemeinsamen Eigenschaften der Fusionsproteine könnten sich interessante Ansätze für neue Therapieoptionen ergeben, um die große Diversität der ABL-Class Genfusionen zielgerichteter behandeln zu können.

Des Weiteren sollte eine tiefere Untersuchung der der inflammatorischen Gensignatur zugrundeliegenden Mechanismen erfolgen. Da ein Zusammenhang zwischen Infektionen, Immunantwort und der Entstehung von ALL vermutet wird, könnte dies einen großen Beitrag zum besseren Verständnis der Leukämogenese leisten. Zudem ist es vor diesem Hintergrund denkbar, dass durch neue immunmodulatorische Therapien Ph-like ALL effektiv behandelt werden könnte.

Summary

The Philadelphia chromosome-like (Ph-like) acute lymphoblastic leukaemia (ALL) is characterized by its high diversity of the underlying gene aberrations and confers a rather poor prognosis. The ABL-class contains Ph-like gene fusions the 3'-part of which encodes an imatinib-sensitive tyrosine kinase. The aim of this work was to get a better understanding of the ABL-class and to discover new approaches for patient-friendly, targeted therapy options. Therefore, five fusion proteins of the ABL-class (ETV6-ABL1, NUP214-ABL1, RCSD1-ABL1, RCSD1-ABL2, EBF1-PDGFR β) and the BCR-ABL1 fusion protein were analysed regarding their protein expression, tyrosine kinase activity, TKI sensitivity and downstream phosphorylation of STAT3 and STAT5 in Ba/F3 cells. Furthermore, the intracellular localization of the fusion proteins and the gene expression profiles under forced expression of the fusion genes in Ba/F3 cells were analysed.

All investigated fusion proteins were sensitive to Imatinib (IC₅₀: 3,7 nM – 446 nM), phosphorylated STAT5 and were predominantly localized in the cytoplasm. Phosphorylation of STAT3 was exclusively seen in NUP214-ABL1. The gene expression analysis showed only a little overlap between the genes differentially regulated by each fusion protein, but all fusion proteins produced an inflammatory gene signature.

These common characteristics of the fusion proteins could pave the way for novel therapeutic approaches to more specifically target the large diversity of ABL-class Ph-like ALL. Furthermore, a deeper investigation of the mechanisms underlying the inflammatory gene signature should be considered. Since a mechanistic link between infection, immune response and emerging ALL has been proposed, this could contribute to a better understanding of leukemogenesis. Moreover, in this context, it is conceivable that new immunomodulatory interventions could effectively treat Ph-like ALL.

7 Abkürzungsverzeichnis

AICDA	<i>Aktivierungsinduzierte Cytidindesaminase</i>
ALL	<i>Akute lymphatische Leukämie</i>
APOBEC	<i>Apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide</i>
B-ALL	<i>B-Zell ALL</i>
CML	<i>Chronisch myeloische Leukämie</i>
DEG	<i>Differenziell exprimierte Gene</i>
DMSO	<i>Dimethylsulfoxid</i>
G418	<i>Geneticin</i>
GFP	<i>Grün fluoreszierendes Protein</i>
GRB2	<i>Growth factor receptor bound protein2</i>
GSEA	<i>Gene Set Enrichment Analysis</i>
HLH	<i>Helix-Loop-Helix Domäne</i>
HSZT	<i>Hämatopoetische Stammzelltransplantation</i>
IC50	<i>Mittlere inhibitorische Konzentration</i>
IL3	<i>Interleukin 3</i>
IL6	<i>Interleukin 6</i>
LIV	<i>Leibniz-Institut für Virologie Hamburg</i>
MRD	<i>Minimal residual disease</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NLS	<i>Nukleäres Lokalisationssignal</i>
NPC	<i>Nuclear Pore Complex</i>
PCA	<i>Principal component analysis</i>
Ph	<i>Philadelphia-Chromosom</i>
RAG1/RAG2	<i>Rekombination-aktivierendes Gen 1 bzw. 2</i>
Sars-CoV	<i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus</i>
SH	<i>SRC homologe Domäne</i>
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
T-ALL	<i>T-Zell ALL</i>
TK	<i>Tyrosinkinase</i>
TKI	<i>Tyrosinkinase-Inhibitor</i>
UKE	<i>Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf</i>
Y177	<i>Tyrosin an Aminosäurestelle 177</i>

8 Literaturverzeichnis

- Andrae, J., R. Gallini und C. Betsholtz. 2008. 'Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine', *Genes Dev*, 22: 1276-312.
- Appiah-Kubi, K., T. Lan, Y. Wang, H. Qian, M. Wu, X. Yao, Y. Wu und Y. Chen. 2017. 'Platelet-derived growth factor receptors (PDGFRs) fusion genes involvement in hematological malignancies', *Crit Rev Oncol Hematol*, 109: 20-34.
- Arun, A. K., A. Senthamizhselvi, S. Mani, K. Vinodhini, N. B. Janet, K. M. Lakshmi, A. Abraham, B. George, A. Srivastava, V. M. Srivastava, V. Mathews und P. Balasubramanian. 2017. 'Frequency of rare BCR-ABL1 fusion transcripts in chronic myeloid leukemia patients', *Int J Lab Hematol*, 39: 235-42.
- Beneforti, L., E. Dander, S. Bresolin, C. Bueno, D. Acunzo, M. Bertagna, A. Ford, B. Gentner, G. T. Kronnie, P. Vergani, P. Menendez, A. Biondi, G. D'Amico, C. Palmi und G. Cazzaniga. 2020. 'Pro-inflammatory cytokines favor the emergence of ETV6-RUNX1-positive pre-leukemic cells in a model of mesenchymal niche', *Br J Haematol*, 190: 262-73.
- Bernt, K. M. und S. P. Hunger. 2014. 'Current concepts in pediatric Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia', *Front Oncol*, 4: 54.
- Bhojwani, D., J. J. Yang und C. H. Pui. 2015. 'Biology of childhood acute lymphoblastic leukemia', *Pediatr Clin North Am*, 62: 47-60.
- Bianchi, C., B. Torsello, V. Di Stefano, M. A. Zipeto, R. Facchetti, S. Bombelli und R. A. Perego. 2013. 'One isoform of Arg/Abl2 tyrosine kinase is nuclear and the other seven cytosolic isoforms differently modulate cell morphology, motility and the cytoskeleton', *Exp Cell Res*, 319: 2091-102.
- Bindea, G., J. Galon und B. Mlecnik. 2013. 'CluePedia Cytoscape plugin: pathway insights using integrated experimental and in silico data', *Bioinformatics*, 29: 661-3.
- Bindea, G., B. Mlecnik, H. Hackl, P. Charoentong, M. Tosolini, A. Kirilovsky, W. H. Fridman, F. Pages, Z. Trajanoski und J. Galon. 2009. 'ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks', *Bioinformatics*, 25: 1091-3.
- Boller, S. und R. Grosschedl. 2014. 'The regulatory network of B-cell differentiation: a focused view of early B-cell factor 1 function', *Immunol Rev*, 261: 102-15.
- Brown, J. R., S. R. Walker, L. N. Heppler, S. Tyekucheva, E. A. Nelson, J. Klitgaard, M. Nicolais, Y. Kroll, M. Xiang, J. E. Yeh, M. Chaudhury, Z. T. Giaccone, S. M. Fernandes, E. D. Jacobsen, D. C. Fisher, A. S. Freedman, M. S. Davids, J. G. Supko, C. Wu und D. A. Frank. 2021. 'Targeting constitutively active STAT3 in chronic lymphocytic leukemia: A clinical trial of the STAT3 inhibitor pyrimethamine with pharmacodynamic analyses', *Am J Hematol*, 96: E95-E98.
- Carlesso, N., D. A. Frank und J. D. Griffin. 1996. 'Tyrosyl phosphorylation and DNA binding activity of signal transducers and activators of transcription (STAT) proteins in hematopoietic cell lines transformed by Bcr/Abl', *J Exp Med*, 183: 811-20.
- Chang, Q., E. Bournazou, P. Sansone, M. Berishaj, S. P. Gao, L. Daly, J. Wels, T. Theilen, S. Granitto, X. Zhang, J. Cotari, M. L. Alpaugh, E. de Stanchina, K. Manova, M. Li, M. Bonafe, C. Ceccarelli, M. Taffurelli, D. Santini, G. Altan-Bonnet, R. Kaplan, L. Norton, N. Nishimoto, D. Huszar, D. Lyden und J. Bromberg. 2013. 'The IL-6/JAK/Stat3 feed-forward loop drives tumorigenesis and metastasis', *Neoplasia*, 15: 848-62.
- Chen, P. H., X. Chen und X. He. 2013. 'Platelet-derived growth factors and their receptors: structural and functional perspectives', *Biochim Biophys Acta*, 1834: 2176-86.
- Chiaretti, S., M. Messina, I. Della Starza, A. Piciocchi, L. Cafforio, M. Cavalli, A. Taherinasab, M. Ansuinelli, L. Elia, G. Albertini Petroni, R. La Starza, M. Canichella, A. Lauretti, M. C. Puzzolo, V. Pierini, A. Santoro, O. Spinelli, V. Apicella, S. Capria, F. Di Raimondo, P. De Fabritiis, C. Papayannidis, A. Candoni, R. Cairoli, M. Cerrano, N. Fracchiolla, D. Mattei, C. Cattaneo, A. Vitale, E. Crea, P. Fazi, C. Mecucci, A. Rambaldi, A. Guarini, R. Bassan und R. Foa. 2020. 'Philadelphia-like acute lymphoblastic leukemia is associated with minimal residual disease

- persistence and poor outcome. First report of the minimal residual disease-oriented GIMEMA LAL1913', *Haematologica*.
- Chisoe, S. L., A. Bodenteich, Y. F. Wang, Y. P. Wang, D. Burian, S. W. Clifton, J. Crabtree, A. Freeman, K. Iyer, L. Jian und et al. 1995. 'Sequence and analysis of the human ABL gene, the BCR gene, and regions involved in the Philadelphia chromosomal translocation', *Genomics*, 27: 67-82.
- Cilloni, Daniela und Giuseppe Saglio. 2007. 'Bcr-Abl and Signal Transduction.' in, *Myeloproliferative Disorders* (Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg).
- Colicelli, J. 2010. 'ABL tyrosine kinases: evolution of function, regulation, and specificity', *Sci Signal*, 3: re6.
- Daley, G. Q. und D. Baltimore. 1988. 'Transformation of an interleukin 3-dependent hematopoietic cell line by the chronic myelogenous leukemia-specific P210bcr/abl protein', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85: 9312-6.
- Dander, E., C. Palmi, G. D'Amico und G. Cazzaniga. 2021. 'The Bone Marrow Niche in B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: The Role of Microenvironment from Pre-Leukemia to Overt Leukemia', *Int J Mol Sci*, 22.
- Dasgupta, Y., M. Koptyra, G. Hoser, K. Kantekure, D. Roy, B. Gornicka, M. Nieborowska-Skorska, E. Bolton-Gillespie, S. Cerny-Reiterer, M. Muschen, P. Valent, M. A. Wasik, C. Richardson, O. Hantschel, H. van der Kuip, T. Stoklosa und T. Skorski. 2016. 'Normal ABL1 is a tumor suppressor and therapeutic target in human and mouse leukemias expressing oncogenic ABL1 kinases', *Blood*, 127: 2131-43.
- De Braekeleer, E., N. Douet-Guilbert, F. Morel, M. J. Le Bris, A. Basinko und M. De Braekeleer. 2012. 'ETV6 fusion genes in hematological malignancies: a review', *Leuk Res*, 36: 945-61.
- De Braekeleer, E., N. Douet-Guilbert, D. Rowe, N. Bown, F. Morel, C. Berthou, C. Ferec und M. De Braekeleer. 2011. 'ABL1 fusion genes in hematological malignancies: a review', *Eur J Haematol*, 86: 361-71.
- De Keersmaecker, K., J. L. Rocnik, R. Bernad, B. H. Lee, D. Leeman, O. Gielen, H. Verachtert, C. Folens, S. Munck, P. Marynen, M. Fornerod, D. G. Gilliland und J. Cools. 2008a. 'Kinase activation and transformation by NUP214-ABL1 is dependent on the context of the nuclear pore', *Mol Cell*, 31: 134-42.
- De Keersmaecker, K., M. Versele, J. Cools, G. Superti-Furga und O. Hantschel. 2008b. 'Intrinsic differences between the catalytic properties of the oncogenic NUP214-ABL1 and BCR-ABL1 fusion protein kinases', *Leukemia*, 22: 2208-16.
- Den Boer, M. L., M. van Slegtenhorst, R. X. De Menezes, M. H. Cheek, J. G. Buijs-Gladdines, S. T. Peters, L. J. Van Zutven, H. B. Beverloo, P. J. Van der Spek, G. Escherich, M. A. Horstmann, G. E. Janka-Schaub, W. A. Kamps, W. E. Evans und R. Pieters. 2009. 'A subtype of childhood acute lymphoblastic leukaemia with poor treatment outcome: a genome-wide classification study', *Lancet Oncol*, 10: 125-34.
- Dixon, A. S., M. Kakar, K. M. Schneider, J. E. Constance, B. C. Paullin und C. S. Lim. 2009. 'Controlling subcellular localization to alter function: Sending oncogenic Bcr-Abl to the nucleus causes apoptosis', *J Control Release*, 140: 245-9.
- Dovat, S. und K. J. Payne. 2017. 'STAT5 alters the state of transcriptional networks, driving aggressive leukemia', *Nat Immunol*, 18: 597-98.
- Drake, J. M., J. K. Lee und O. N. Witte. 2014. 'Clinical targeting of mutated and wild-type protein tyrosine kinases in cancer', *Mol Cell Biol*, 34: 1722-32.
- DSMZ. 2020. 'Ba/F3 [Online im Internet] URL: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-300> [Stand: 20.04.2020]'
- Escherich, G., M. Schrappe und U. Creutzig. 2016. 'S1-Leitlinie 025/014: Akute lymphoblastische- (ALL) Leukämie im Kindesalter', *AWMF online*.
- Eyers, C. E., H. McNeill, A. Knebel, N. Morrice, S. J. Arthur, A. Cuenda und P. Cohen. 2005. 'The phosphorylation of CapZ-interacting protein (CapZIP) by stress-activated protein kinases triggers its dissociation from CapZ', *Biochem J*, 389: 127-35.
- Ferbeyre, G. und R. Moriggl. 2011. 'The role of Stat5 transcription factors as tumor suppressors or oncogenes', *Biochim Biophys Acta*, 1815: 104-14.

- Fielding, A. K., J. M. Rowe, G. Buck, L. Foroni, G. Gerrard, M. R. Litzow, H. Lazarus, S. M. Luger, D. I. Marks, A. K. McMillan, A. V. Moorman, B. Patel, E. Paietta, M. S. Tallman und A. H. Goldstone. 2014. 'UKALLXII/ECOG2993: addition of imatinib to a standard treatment regimen enhances long-term outcomes in Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia', *Blood*, 123: 843-50.
- Filippakopoulos, P., M. Kofler, O. Hantschel, G. D. Gish, F. Grebien, E. Salah, P. Neudecker, L. E. Kay, B. E. Turk, G. Superti-Furga, T. Pawson und S. Knapp. 2008. 'Structural coupling of SH2-kinase domains links Fes and Abl substrate recognition and kinase activation', *Cell*, 134: 793-803.
- Frank, D. A. und L. Varticovski. 1996. 'BCR/abl leads to the constitutive activation of Stat proteins, and shares an epitope with tyrosine phosphorylated Stats', *Leukemia*, 10: 1724-30.
- Gökbuget, N., C. Baldus, M. Brüggemann, A.W. Hauswirth und U. Schanz. 2020. 'Akute Lymphatische Leukämie (ALL)', [Online im Internet] URL: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/akute-lymphatische-leukaemie-all/@guideline/html/index.html> [Stand: 09.12.2020].
- Golub, T. R., A. Goga, G. F. Barker, D. E. Afar, J. McLaughlin, S. K. Bohlander, J. D. Rowley, O. N. Witte und D. G. Gilliland. 1996. 'Oligomerization of the ABL tyrosine kinase by the Ets protein TEL in human leukemia', *Mol Cell Biol*, 16: 4107-16.
- Graux, C., M. Stevens-Kroef, M. Lafage, N. Dastugue, C. J. Harrison, F. Mugneret, K. Bahloula, S. Struski, M. J. Gregoire, N. Nadal, E. Lippert, S. Taviaux, A. Simons, R. P. Kuiper, A. V. Moorman, K. Barber, A. Bosly, L. Michaux, P. Vandenberghe, I. Lahortiga, K. De Keersmaecker, I. Wlodarska, J. Cools, A. Hagemeijer, H. A. Poirel, Hematologique Groupe Francophone de Cytogenetique, Hematology Belgian Cytogenetic Group for und Oncology. 2009. 'Heterogeneous patterns of amplification of the NUP214-ABL1 fusion gene in T-cell acute lymphoblastic leukemia', *Leukemia*, 23: 125-33.
- Greaves, M. 2018. 'A causal mechanism for childhood acute lymphoblastic leukaemia', *Nat Rev Cancer*, 18: 471-84.
- Greaves, Mel, Valeria Cazzaniga und Anthony Ford. 2021. 'Can we prevent childhood Leukaemia?', *Leukemia*, 35: 1258-64.
- Greuber, Emileigh K., Pameeka Smith-Pearson, Jun Wang und Ann Marie Pendergast. 2013. 'Role of ABL family kinases in cancer: from leukaemia to solid tumours', *Nature Reviews Cancer*, 13: 559-71.
- Groffen, J., J. Stephenson, N. Heisterkamp, A. Deklein, C. Bartram und G. Grosveld. 1984. 'Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22', *Cell*, 36: 93-99.
- Hagman, J. und K. Lukin. 2005. 'Early B-cell factor 'pioneers' the way for B-cell development', *Trends Immunol*, 26: 455-61.
- Hagman, J., J. Ramirez und K. Lukin. 2012. 'B lymphocyte lineage specification, commitment and epigenetic control of transcription by early B cell factor 1', *Curr Top Microbiol Immunol*, 356: 17-38.
- Hanahan, D. und R. A. Weinberg. 2011. 'Hallmarks of cancer: the next generation', *Cell*, 144: 646-74.
- Hantschel, O., U. Rix und G. Superti-Furga. 2008. 'Target spectrum of the BCR-ABL inhibitors imatinib, nilotinib and dasatinib', *Leuk Lymphoma*, 49: 615-9.
- Hartmann, J. T., M. Haap, H. G. Kopp und H. P. Lipp. 2009. 'Tyrosine kinase inhibitors - a review on pharmacology, metabolism and side effects', *Curr Drug Metab*, 10: 470-81.
- Hasle, Henrik, Inge Haunstrup Clemmensen und Margareta Mikkelsen. 2000. 'Risks of leukaemia and solid tumours in individuals with Down's syndrome', *The Lancet*, 355: 165-69.
- Hauer, Julia, Ute Fischer und Arndt Borkhardt. 2021. 'Toward prevention of childhood ALL by early-life immune training', *Blood*, 138: 1412-28.

- Heldin, Carl-Henrik, Arne Östman und Lars Rönstrand. 1998. 'Signal transduction via platelet-derived growth factor receptors', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1378: F79-F113.
- Hempel, Annemarie, Susanne J. Köhl, Melanie Rothe, Purushothama Rao Tata, Ioan Ovidiu Sirbu, Seppo J. Vainio und Michael Köhl. 2017. 'The CapZ interacting protein Rcsd1 is required for cardiogenesis downstream of Wnt11a in *Xenopus laevis*', *Developmental Biology*, 424: 28-39.
- Hernandez-Valladares, M., T. Kim, B. Kannan, A. Tung, A. H. Aguda, M. Larsson, J. A. Cooper und R. C. Robinson. 2010. 'Structural characterization of a capping protein interaction motif defines a family of actin filament regulators', *Nat Struct Mol Biol*, 17: 497-503.
- Herold, T., S. Schneider, K. H. Metzeler, M. Neumann, L. Hartmann, K. G. Roberts, N. P. Konstandin, P. A. Greif, K. Braundl, B. Ksienzyk, N. Huk, I. Schneider, E. Zellmeier, V. Jurinovic, U. Mansmann, W. Hiddemann, C. G. Mullighan, S. K. Bohlander, K. Spiekermann, D. Hoelzer, M. Bruggemann, C. D. Baldus, M. Dreyling und N. Gokbuget. 2017. 'Adults with Philadelphia chromosome-like acute lymphoblastic leukemia frequently have IGH-CRLF2 and JAK2 mutations, persistence of minimal residual disease and poor prognosis', *Haematologica*, 102: 130-38.
- Hock, H. und A. Shimamura. 2017. 'ETV6 in hematopoiesis and leukemia predisposition', *Semin Hematol*, 54: 98-104.
- Huang, Z. L., M. Gao, Q. Y. Li, K. Tao, Q. Xiao, W. X. Cao und W. L. Feng. 2013. 'Induction of apoptosis by directing oncogenic Bcr-Abl into the nucleus', *Oncotarget*, 4: 2249-60.
- Hunger, S. P., X. Lu, M. Devidas, B. M. Camitta, P. S. Gaynon, N. J. Winick, G. H. Reaman und W. L. Carroll. 2012. 'Improved survival for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia between 1990 and 2005: a report from the children's oncology group', *J Clin Oncol*, 30: 1663-9.
- Hunger, S. P. und C. G. Mullighan. 2015a. 'Acute Lymphoblastic Leukemia in Children', *N Engl J Med*, 373: 1541-52.
- Hunger, S. P. und C. G. Mullighan. 2015b. 'Redefining ALL classification: toward detecting high-risk ALL and implementing precision medicine', *Blood*, 125: 3977-87.
- Inaba, Hiroto, Mel Greaves und Charles G. Mullighan. 2013. 'Acute lymphoblastic leukaemia', *The Lancet*, 381: 1943-55.
- Jakobczyk, H., Y. Jiang, L. Debaize, B. Soubise, S. Avner, A. A. Serandour, J. Rouger-Gaudichon, A. G. Rio, J. S. Carroll, H. Raslova, D. Gilot, Z. Liu, J. Demengeot, G. Salbert, N. Douet-Guilbert, L. Corcos, M. D. Galibert, V. Gandemer und M. B. Troadec. 2022. 'ETV6-RUNX1 and RUNX1 directly regulate RAG1 expression: one more step in the understanding of childhood B-cell acute lymphoblastic leukemia leukemogenesis', *Leukemia*, 36: 549-54.
- Jiao, Q., L. Bi, Y. Ren, S. Song, Q. Wang und Y. S. Wang. 2018. 'Advances in studies of tyrosine kinase inhibitors and their acquired resistance', *Mol Cancer*, 17: 36.
- Johnson, D. E., R. A. O'Keefe und J. R. Grandis. 2018. 'Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer', *Nat Rev Clin Oncol*, 15: 234-48.
- Kaatsch, P., D. Grabow und C. Spix. 2019. '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*.
- Kamran, S., G. Raca und K. Nazir. 2015. 'RCSD1-ABL1 Translocation Associated with IKZF1 Gene Deletion in B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia', *Case Rep Hematol*, 2015: 353247.
- Kashiwagi, S., Y. Fujioka, T. Kondo, A. O. Satoh, A. Yoshida, M. Fujioka, H. Sasajima, M. Amano, T. Teshima und Y. Ohba. 2019. 'Localization of BCR-ABL to Stress Granules Contributes to Its Oncogenic Function', *Cell Struct Funct*, 44: 195-204.
- Kato, M. und A. Manabe. 2018. 'Treatment and biology of pediatric acute lymphoblastic leukemia', *Pediatr Int*, 60: 4-12.

- Kholodenko, B. N., J. F. Hancock und W. Kolch. 2010. 'Signalling ballet in space and time', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11: 414-26.
- Kleppe, Maria, Idoya Lahortiga, Tiama El Chaar, Kim De Keersmaecker, Nicole Mentens, Carlos Graux, Katrien Van Roosbroeck, Adolfo A. Ferrando, Anton W. Langerak, Jules P. P. Meijerink, François Sigaux, Torsten Haferlach, Iwona Wlodarska, Peter Vandenberghe, Jean Soulier und Jan Cools. 2010. 'Deletion of the protein tyrosine phosphatase gene PTPN2 in T-cell acute lymphoblastic leukemia', *Nature Genetics*, 42: 530-35.
- Kumar, H., S. Chattopadhyay, N. Das, S. Shree, D. Patel, J. Mohapatra, A. Gurjar, S. Kushwaha, A. K. Singh, S. Dubey, K. Lata, R. Kushwaha, R. Mohammed, K. G. Dastidar, N. Yadav, A. L. Vishwakarma, J. R. Gayen, S. Bandyopadhyay, A. Chatterjee, M. R. Jain, A. K. Tripathi, A. K. Trivedi, N. Chattopadhyay, R. Ramachandran und S. Sanyal. 2020. 'Leprosy drug clofazimine activates peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and synergizes with imatinib to inhibit chronic myeloid leukemia cells', *Haematologica*, 105: 971-86.
- Leoni, V. und A. Biondi. 2015. 'Tyrosine kinase inhibitors in BCR-ABL positive acute lymphoblastic leukemia', *Haematologica*, 100: 295-9.
- Li, C. K., B. Zee, J. Lee, K. W. Chik, S. Y. Ha und V. Lee. 2007. 'Impact of SARS on development of childhood acute lymphoblastic leukaemia', *Leukemia*, 21: 1353-6.
- Li, Q., Z. Huang, M. Gao, W. Cao, Q. Xiao, H. Luo und W. Feng. 2017. 'Blockade of Y177 and Nuclear Translocation of Bcr-Abl Inhibits Proliferation and Promotes Apoptosis in Chronic Myeloid Leukemia Cells', *Int J Mol Sci*, 18.
- Lillie, K. 2021. 'Leukaemia and lockdown: The delayed infection model of childhood acute lymphoblastic leukaemia and the COVID-19 pandemic', *Pediatr Blood Cancer*, 68: e29194.
- Lin, H. und R. Grosschedl. 1995. 'Failure of B-cell differentiation in mice lacking the transcription factor EBF', *Nature*, 376: 263-7.
- Martin-Lorenzo, A., J. Hauer, C. Vicente-Duenas, F. Auer, I. Gonzalez-Herrero, I. Garcia-Ramirez, S. Ginzel, R. Thiele, S. N. Constantinescu, C. Bartenhagen, M. Dugas, M. Gombert, D. Schafer, O. Blanco, A. Mayado, A. Orfao, D. Alonso-Lopez, L. Rivas Jde, C. Cobaleda, M. B. Garcia-Cenador, F. J. Garcia-Criado, I. Sanchez-Garcia und A. Borkhardt. 2015. 'Infection Exposure is a Causal Factor in B-cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia as a Result of Pax5-Inherited Susceptibility', *Cancer Discov*, 5: 1328-43.
- Martinelli, G., N. Boissel, P. Chevallier, O. Ottmann, N. Gokbuget, M. S. Topp, A. K. Fielding, A. Rambaldi, E. K. Ritchie, C. Papayannidis, L. R. Sterling, J. Benjamin und A. Stein. 2017. 'Complete Hematologic and Molecular Response in Adult Patients With Relapsed/Refractory Philadelphia Chromosome-Positive B-Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia Following Treatment With Blinatumomab: Results From a Phase II, Single-Arm, Multicenter Study', *J Clin Oncol*, 35: 1795-802.
- Maude, S. L., N. Frey, P. A. Shaw, R. Aplenc, D. M. Barrett, N. J. Bunin, A. Chew, V. E. Gonzalez, Z. Zheng, S. F. Lacey, Y. D. Mahnke, J. J. Melenhorst, S. R. Rheingold, A. Shen, D. T. Teachey, B. L. Levine, C. H. June, D. L. Porter und S. A. Grupp. 2014. 'Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia', *N Engl J Med*, 371: 1507-17.
- McWhirter, J. R., D. L. Galasso und J. Y. Wang. 1993. 'A coiled-coil oligomerization domain of Bcr is essential for the transforming function of Bcr-Abl oncoproteins', *Mol Cell Biol*, 13: 7587-95.
- McWhirter, J. R. und J. Y. Wang. 1991. 'Activation of tyrosinase kinase and microfilament-binding functions of c-abl by bcr sequences in bcr/abl fusion proteins', *Mol Cell Biol*, 11: 1553-65.
- Mendes, A. und B. Fahrenkrog. 2019. 'NUP214 in Leukemia: It's More than Transport', *Cells*, 8.
- Million, R. P., N. Harakawa, S. Roumiantsev, L. Varticovski und R. A. Van Etten. 2004. 'A direct binding site for Grb2 contributes to transformation and leukemogenesis by the Tel-Abl (ETV6-Abl) tyrosine kinase', *Mol Cell Biol*, 24: 4685-95.

- Moorman, A. V. 2012. 'The clinical relevance of chromosomal and genomic abnormalities in B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia', *Blood Rev*, 26: 123-35.
- Mullighan, C. G., X. Su, J. Zhang, I. Radtke, L. A. Phillips, C. B. Miller, J. Ma, W. Liu, C. Cheng, B. A. Schulman, R. C. Harvey, I. M. Chen, R. J. Clifford, W. L. Carroll, G. Reaman, W. P. Bowman, M. Devidas, D. S. Gerhard, W. Yang, M. V. Relling, S. A. Shurtleff, D. Campana, M. J. Borowitz, C. H. Pui, M. Smith, S. P. Hunger, C. L. Willman, J. R. Downing und Group Children's Oncology. 2009. 'Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia', *N Engl J Med*, 360: 470-80.
- Nam, S., A. Williams, A. Vultur, A. List, K. Bhalla, D. Smith, F. Y. Lee und R. Jove. 2007. 'Dasatinib (BMS-354825) inhibits Stat5 signaling associated with apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells', *Mol Cancer Ther*, 6: 1400-5.
- Nicholas, N. S., B. Apollonio und A. G. Ramsay. 2016. 'Tumor microenvironment (TME)-driven immune suppression in B cell malignancy', *Biochim Biophys Acta*, 1863: 471-82.
- Nowell, P. C. 1976. 'The clonal evolution of tumor cell populations', *Science*, 194: 23-8.
- Nowell, P. C. und D. A. Hungerford. 1960. 'Chromosome Studies on Normal and Leukemic Human Leukocytes', *Jnci-Journal of the National Cancer Institute*, 25: 85-109.
- Okuda, K., T. R. Golub, D. G. Gilliland und J. D. Griffin. 1996. 'p210BCR/ABL, p190BCR/ABL, and TEL/ABL activate similar signal transduction pathways in hematopoietic cell lines', *Oncogene*, 13: 1147-52.
- Oliveros, J.C. 2007-2015. 'VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams. [Online im Internet] URL: <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>. [Stand: 10.04.2020]'.
<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>. [Stand: 10.04.2020]'
- Origene. 2019. 'pCMV6-AC-IRES-GFP Mammalian Expression Vector [Online im Internet] URL: <https://www.origene.com/catalog/vectors/mammalian-expression-vectors/ps100027/pcmv6-ac-ires-gfp-mammalian-expression-vector> [Stand: 17.09.2019]'.
<https://www.origene.com/catalog/vectors/mammalian-expression-vectors/ps100027/pcmv6-ac-ires-gfp-mammalian-expression-vector> [Stand: 17.09.2019]'
- Palacios, Ronald und Michael Steinmetz. 1985. 'IL3-dependent mouse clones that express B-220 surface antigen, contain ig genes in germ-line configuration, and generate B lymphocytes in vivo', *Cell*, 41: 727-34.
- Papaemmanuil, E., I. Rapado, Y. Li, N. E. Potter, D. C. Wedge, J. Tubio, L. B. Alexandrov, P. Van Loo, S. L. Cooke, J. Marshall, I. Martincorena, J. Hinton, G. Gundem, F. W. van Delft, S. Nik-Zainal, D. R. Jones, M. Ramakrishna, I. Tittley, L. Stebbings, C. Leroy, A. Menzies, J. Gamble, B. Robinson, L. Mudie, K. Raine, S. O'Meara, J. W. Teague, A. P. Butler, G. Cazzaniga, A. Biondi, J. Zuna, H. Kempster, M. Muschen, A. M. Ford, M. R. Stratton, M. Greaves und P. J. Campbell. 2014. 'RAG-mediated recombination is the predominant driver of oncogenic rearrangement in ETV6-RUNX1 acute lymphoblastic leukemia', *Nat Genet*, 46: 116-25.
- Paul, M. K. und A. K. Mukhopadhyay. 2004. 'Tyrosine kinase - Role and significance in Cancer', *Int J Med Sci*, 1: 101-15.
- Peiris, M. N., F. Li und D. J. Donoghue. 2019. 'BCR: a promiscuous fusion partner in hematopoietic disorders', *Oncotarget*, 10: 2738-54.
- Pendergast, Ann Marie, Lawrence A. Quilliam, Larry D. Cripe, Craig H. Bassing, Zonghan Dai, Nanxin Li, Andreas Batzer, Kelly M. Rabun, Channing J. Der, Joseph Schlessinger und Mikhail L. Gishizky. 1993. 'BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein', *Cell*, 75: 175-85.
- Place, T. L., F. E. Domann und A. J. Case. 2017. 'Limitations of oxygen delivery to cells in culture: An underappreciated problem in basic and translational research', *Free Radic Biol Med*, 113: 311-22.
- Pui, C. H. 2020. 'Precision medicine in acute lymphoblastic leukemia', *Front Med*.
- Pui, C. H. und W. E. Evans. 2013. 'A 50-year journey to cure childhood acute lymphoblastic leukemia', *Semin Hematol*, 50: 185-96.
- Pulte, D., A. Gonds und H. Brenner. 2009. 'Improvement in survival in younger patients with acute lymphoblastic leukemia from the 1980s to the early 21st century', *Blood*, 113: 1408-11.

- Radziwill, G., R. A. Erdmann, U. Margelisch und K. Moelling. 2003. 'The Bcr kinase downregulates Ras signaling by phosphorylating AF-6 and binding to its PDZ domain', *Mol Cell Biol*, 23: 4663-72.
- Reddy, E. P., A. Korapati, P. Chaturvedi und S. Rane. 2000. 'IL-3 signaling and the role of Src kinases, JAKs and STATs: a covert liaison unveiled', *Oncogene*, 19: 2532-47.
- Reshmi, S. C., R. C. Harvey, K. G. Roberts, E. Stonerock, A. Smith, H. Jenkins, I. M. Chen, M. Valentine, Y. Liu, Y. Li, Y. Shao, J. Easton, D. Payne-Turner, Z. Gu, T. H. Tran, J. V. Nguyen, M. Devidas, Y. Dai, N. A. Heerema, A. J. Carroll, 3rd, E. A. Raetz, M. J. Borowitz, B. L. Wood, A. L. Angiolillo, M. J. Burke, W. L. Salzer, P. A. Zweidler-McKay, K. R. Rabin, W. L. Carroll, J. Zhang, M. L. Loh, C. G. Mullighan, C. L. Willman, J. M. Gastier-Foster und S. P. Hunger. 2017. 'Targetable kinase gene fusions in high-risk B-ALL: a study from the Children's Oncology Group', *Blood*, 129: 3352-61.
- Roberts, K. G., Y. Li, D. Payne-Turner, R. C. Harvey, Y. L. Yang, D. Pei, K. McCastlain, L. Ding, C. Lu, G. Song, J. Ma, J. Becksfort, M. Rusch, S. C. Chen, J. Easton, J. Cheng, K. Boggs, N. Santiago-Morales, I. Iacobucci, R. S. Fulton, J. Wen, M. Valentine, C. Cheng, S. W. Paugh, M. Devidas, I. M. Chen, S. Reshmi, A. Smith, E. Hedlund, P. Gupta, P. Nagahawatte, G. Wu, X. Chen, D. Yergeau, B. Vadodaria, H. Mulder, N. J. Winick, E. C. Larsen, W. L. Carroll, N. A. Heerema, A. J. Carroll, G. Grayson, S. K. Tasian, A. S. Moore, F. Keller, M. Frei-Jones, J. A. Whitlock, E. A. Raetz, D. L. White, T. P. Hughes, J. M. Guidry Auvil, M. A. Smith, G. Marcucci, C. D. Bloomfield, K. Mrozek, J. Kohlschmidt, W. Stock, S. M. Kornblau, M. Konopleva, E. Paietta, C. H. Pui, S. Jeha, M. V. Relling, W. E. Evans, D. S. Gerhard, J. M. Gastier-Foster, E. Mardis, R. K. Wilson, M. L. Loh, J. R. Downing, S. P. Hunger, C. L. Willman, J. Zhang und C. G. Mullighan. 2014a. 'Targetable kinase-activating lesions in Ph-like acute lymphoblastic leukemia', *N Engl J Med*, 371: 1005-15.
- Roberts, K. G., R. D. Morin, J. Zhang, M. Hirst, Y. Zhao, X. Su, S. C. Chen, D. Payne-Turner, M. L. Churchman, R. C. Harvey, X. Chen, C. Kasap, C. Yan, J. Becksfort, R. P. Finney, D. T. Teachey, S. L. Maude, K. Tse, R. Moore, S. Jones, K. Mungall, I. Birol, M. N. Edmonson, Y. Hu, K. E. Buetow, I. M. Chen, W. L. Carroll, L. Wei, J. Ma, M. Kleppe, R. L. Levine, G. Garcia-Manero, E. Larsen, N. P. Shah, M. Devidas, G. Reaman, M. Smith, S. W. Paugh, W. E. Evans, S. A. Grupp, S. Jeha, C. H. Pui, D. S. Gerhard, J. R. Downing, C. L. Willman, M. Loh, S. P. Hunger, M. A. Marra und C. G. Mullighan. 2012. 'Genetic alterations activating kinase and cytokine receptor signaling in high-risk acute lymphoblastic leukemia', *Cancer Cell*, 22: 153-66.
- Roberts, K. G., D. Pei, D. Campana, D. Payne-Turner, Y. Li, C. Cheng, J. T. Sandlund, S. Jeha, J. Easton, J. Becksfort, J. Zhang, E. Coustan-Smith, S. C. Raimondi, W. H. Leung, M. V. Relling, W. E. Evans, J. R. Downing, C. G. Mullighan und C. H. Pui. 2014b. 'Outcomes of children with BCR-ABL1-like acute lymphoblastic leukemia treated with risk-directed therapy based on the levels of minimal residual disease', *J Clin Oncol*, 32: 3012-20.
- Roberts, K. G., Y. L. Yang, D. Payne-Turner, W. Lin, J. K. Files, K. Dickerson, Z. Gu, J. Taunton, L. J. Janke, T. Chen, M. L. Loh, S. P. Hunger und C. G. Mullighan. 2017. 'Oncogenic role and therapeutic targeting of ABL-class and JAK-STAT activating kinase alterations in Ph-like ALL', *Blood Adv*, 1: 1657-71.
- Rodriguez-Hernandez, G., J. Hauer, A. Martin-Lorenzo, D. Schafer, C. Bartenhagen, I. Garcia-Ramirez, F. Auer, I. Gonzalez-Herrero, L. Ruiz-Roca, M. Gombert, V. Okpanyi, U. Fischer, C. Chen, M. Dugas, S. Bhatia, R. M. Linka, M. Garcia-Suquia, M. V. Rascon-Trincado, A. Garcia-Sanchez, O. Blanco, M. B. Garcia-Cenador, F. J. Garcia-Criado, C. Cobaleda, D. Alonso-Lopez, J. De Las Rivas, M. Muschen, C. Vicente-Duenas, I. Sanchez-Garcia und A. Borkhardt. 2017. 'Infection Exposure Promotes ETV6-RUNX1 Precursor B-cell Leukemia via Impaired H3K4 Demethylases', *Cancer Res*, 77: 4365-77.
- Rodriguez-Hernandez, G., F. V. Opitz, P. Delgado, C. Walter, A. F. Alvarez-Prado, I. Gonzalez-Herrero, F. Auer, U. Fischer, S. Janssen, C. Bartenhagen, J. Raboso-Gallego, A. Casado-Garcia, A. Orfao, O. Blanco, D. Alonso-Lopez, J. L. Rivas, S.

- G. Tena-Davila, M. Muschen, M. Dugas, F. J. G. Criado, M. B. G. Cenador, C. Vicente-Duenas, J. Hauer, A. R. Ramiro, I. Sanchez-Garcia und A. Borkhardt. 2019. 'Infectious stimuli promote malignant B-cell acute lymphoblastic leukemia in the absence of AID', *Nat Commun*, 10: 5563.
- Rousselot, P., S. Prost, J. Guilhot, L. Roy, G. Etienne, L. Legros, A. Charbonnier, V. Coiteux, P. Cony-Makhoul, F. Huguet, E. Cayssials, J. M. Cayuela, F. Relouzat, M. Delord, H. Bruzzoni-Giovanelli, L. Morisset, F. X. Mahon, F. Guilhot und P. Leboulch. 2017. 'Pioglitazone together with imatinib in chronic myeloid leukemia: A proof of concept study', *Cancer*, 123: 1791-99.
- Salter, J. D., R. P. Bennett und H. C. Smith. 2016. 'The APOBEC Protein Family: United by Structure, Divergent in Function', *Trends Biochem Sci*, 41: 578-94.
- Sattler, Martin, M. Golam Mohi, Yuri B. Pride, Laura R. Quinnan, Nicole A. Malouf, Klaus Podar, Franck Gesbert, Hiromi Iwasaki, Shaoguang Li, Richard A. Van Etten, Haihua Gu, James D. Griffin und Benjamin G. Neel. 2002. 'Critical role for Gab2 in transformation by BCR/ABL', *Cancer Cell*, 1: 479-92.
- Sawyers, C. L. 1997. 'Signal transduction pathways involved in BCR-ABL transformation', *Baillieres Clin Haematol*, 10: 223-31.
- Schultz, K. R., A. Carroll, N. A. Heerema, W. P. Bowman, A. Aledo, W. B. Slayton, H. Sather, M. Devidas, H. W. Zheng, S. M. Davies, P. S. Gaynon, M. Trigg, R. Rutledge, D. Jorstad, N. Winick, M. J. Borowitz, S. P. Hunger, W. L. Carroll, B. Camitta und Group Children's Oncology. 2014. 'Long-term follow-up of imatinib in pediatric Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: Children's Oncology Group study AALL0031', *Leukemia*, 28: 1467-71.
- Schwab, C., S. L. Ryan, L. Chilton, A. Elliott, J. Murray, S. Richardson, C. Wragg, J. Moppett, M. Cummins, O. Tunstall, C. A. Parker, V. Saha, N. Goulden, A. Vora, A. V. Moorman und C. J. Harrison. 2016. 'EBF1-PDGFRB fusion in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL): genetic profile and clinical implications', *Blood*, 127: 2214-8.
- Shi, Y., Z. Zhang, X. Qu, X. Zhu, L. Zhao, R. Wei, Q. Guo, L. Sun, X. Yin, Y. Zhang und X. Li. 2018. 'Roles of STAT3 in leukemia (Review)', *Int J Oncol*, 53: 7-20.
- Silverman, L. B. 2014. 'Balancing cure and long-term risks in acute lymphoblastic leukemia', *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2014: 190-7.
- Simon, Dan N. und Michael P. Rout. 2014. 'Cancer and the Nuclear Pore Complex.' in Eric C. Schirmer und Jose I. de las Heras (Hrsg.), *Cancer Biology and the Nuclear Envelope: Recent Advances May Elucidate Past Paradoxes* (Springer New York: New York, NY).
- Sirvent, A., C. Benistant und S. Roche. 2008. 'Cytoplasmic signalling by the c-Abl tyrosine kinase in normal and cancer cells', *Biol Cell*, 100: 617-31.
- Skourides, P. A., S. A. Perera und R. Ren. 1999. 'Polarized distribution of Bcr-Abl in migrating myeloid cells and co-localization of Bcr-Abl and its target proteins', *Oncogene*, 18: 1165-76.
- Spiekermann, K., M. Pau, R. Schwab, K. Schmieja, S. Franzrahe und W. Hiddemann. 2002. 'Constitutive activation of STAT3 and STAT5 is induced by leukemic fusion proteins with protein tyrosine kinase activity and is sufficient for transformation of hematopoietic precursor cells', *Exp Hematol*, 30: 262-71.
- Sary, J. und O. Hrusak. 2016. 'Recent advances in the management of pediatric acute lymphoblastic leukemia', *F1000Res*, 5: 2635.
- Stock, W., G. Martinelli, M. Stelljes, D. J. DeAngelo, N. Gokbuget, A. S. Advani, S. O'Brien, M. Liedtke, A. A. Merchant, R. D. Cassaday, T. Wang, H. Zhang, E. Vandendries, E. Jabbour, D. I. Marks und H. M. Kantarjian. 2020. 'Efficacy of inotuzumab ozogamicin in patients with Philadelphia chromosome-positive relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia', *Cancer*.
- Swaminathan, S., L. Klemm, E. Park, E. Papaemmanuil, A. Ford, S. M. Kweon, D. Trageser, B. Hasselfeld, N. Henke, J. Mooster, H. Geng, K. Schwarz, S. C. Kogan, R. Casellas, D. G. Schatz, M. R. Lieber, M. F. Greaves und M. Muschen. 2015. 'Mechanisms of

- clonal evolution in childhood acute lymphoblastic leukemia', *Nat Immunol*, 16: 766-74.
- Taagepera, S., D. McDonald, J. E. Loeb, L. L. Whitaker, A. K. McElroy, J. Y. Wang und T. J. Hope. 1998. 'Nuclear-cytoplasmic shuttling of C-ABL tyrosine kinase', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 7457-62.
- Tanasi, I., I. Ba, N. Sirvent, T. Braun, W. Cuccuini, P. Ballerini, N. Duployez, A. Tanguy-Schmidt, J. Tamburini, S. Maury, E. Dore, C. Hemberlin, C. Duclos, P. Chevallier, P. Rousselot, M. Bonifacio, H. Cave, A. Baruchel, H. Dombret, J. Soulier, J. Landman-Parker, N. Boissel und E. Clappier. 2019. 'Efficacy of tyrosine kinase inhibitors in Ph-like acute lymphoblastic leukemia harboring ABL-class rearrangements', *Blood*, 134: 1351-55.
- Tolomeo, M., M. Meli und S. Grimaudo. 2019. 'STAT5 and STAT5 Inhibitors in Hematological Malignancies', *Anticancer Agents Med Chem*, 19: 2036-46.
- Tran, T. H. und S. P. Hunger. 2020. 'ABL-class fusion positive acute lymphoblastic leukemia: can targeting ABL cure ALL?', *Haematologica*, 105: 1754-57.
- Tsai, A. G., H. Lu, S. C. Raghavan, M. Muschen, C. L. Hsieh und M. R. Lieber. 2008. 'Human chromosomal translocations at CpG sites and a theoretical basis for their lineage and stage specificity', *Cell*, 135: 1130-42.
- van der Veer, A., E. Waanders, R. Pieters, M. E. Willemse, S. V. Van Reijmersdal, L. J. Russell, C. J. Harrison, W. E. Evans, V. H. van der Velden, P. M. Hoogerbrugge, F. Van Leeuwen, G. Escherich, M. A. Horstmann, L. Mohammadi Khankahdani, D. Rizopoulos, H. A. De Groot-Kruseman, E. Sonneveld, R. P. Kuiper und M. L. Den Boer. 2013. 'Independent prognostic value of BCR-ABL1-like signature and IKZF1 deletion, but not high CRLF2 expression, in children with B-cell precursor ALL', *Blood*, 122: 2622-9.
- Van Limbergen, H., H. B. Beverloo, E. van Drunen, A. Janssens, K. Hahlen, B. Poppe, N. Van Roy, P. Marynen, A. De Paepe, R. Slater und F. Speleman. 2001. 'Molecular cytogenetic and clinical findings in ETV6/ABL1-positive leukemia', *Genes Chromosomes Cancer*, 30: 274-82.
- Wang, J. Y. 2000. 'Regulation of cell death by the Abl tyrosine kinase', *Oncogene*, 19: 5643-50.
- Wang, Jean Y. J. 1993. 'Abl tyrosine kinase in signal transduction and cell-cycle regulation', *Current Opinion in Genetics & Development*, 3: 35-43.
- Wang, Y., A. L. Miller, M. S. Mooseker und A. J. Koleske. 2001. 'The Abl-related gene (Arg) nonreceptor tyrosine kinase uses two F-actin-binding domains to bundle F-actin', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 14865-70.
- Ward, Gordon. 1917. 'The infective theory of acute leukaemia', *Br J Child Dis*, 14: 10-20.
- Warmuth, M., S. Kim, X. J. Gu, G. Xia und F. Adrian. 2007. 'Ba/F3 cells and their use in kinase drug discovery', *Curr Opin Oncol*, 19: 55-60.
- Watanabe-Smith, K., J. Godil, A. Agarwal, C. Tognon und B. Druker. 2017. 'Analysis of acquired mutations in transgenes arising in Ba/F3 transformation assays: findings and recommendations', *Oncotarget*, 8: 12596-606.
- Welsh, S. J., M. L. Churchman, M. Togni, C. G. Mullighan und J. Hagman. 2018. 'Deregulation of kinase signaling and lymphoid development in EBF1-PDGFRB ALL leukemogenesis', *Leukemia*, 32: 38-48.
- Weston, B. W., M. A. Hayden, K. G. Roberts, S. Bowyer, J. Hsu, G. Fedoriw, K. W. Rao und C. G. Mullighan. 2013. 'Tyrosine kinase inhibitor therapy induces remission in a patient with refractory EBF1-PDGFRB-positive acute lymphoblastic leukemia', *J Clin Oncol*, 31: e413-6.
- Xu, S. und M. A. Powers. 2009. 'Nuclear pore proteins and cancer', *Semin Cell Dev Biol*, 20: 620-30.
- Yadav, S. S. und W. T. Miller. 2008. 'The evolutionarily conserved arrangement of domains in SRC family kinases is important for substrate recognition', *Biochemistry*, 47: 10871-80.
- Yeung, D. T., D. J. Moulton, S. L. Heatley, E. Nievergall, P. Dang, J. Braley, S. Branford, S. Moore, C. G. Mullighan, T. P. Hughes und D. L. White. 2015. 'Relapse of BCR-

- ABL1-like ALL mediated by the ABL1 kinase domain mutation T315I following initial response to dasatinib treatment', *Leukemia*, 29: 230-2.
- Yu, J. H., B. M. Zhu, M. Wickre, G. Riedlinger, W. Chen, A. Hosui, G. W. Robinson und L. Hennighausen. 2010. 'The transcription factors signal transducer and activator of transcription 5A (STAT5A) and STAT5B negatively regulate cell proliferation through the activation of cyclin-dependent kinase inhibitor 2b (Cdkn2b) and Cdkn1a expression', *Hepatology*, 52: 1808-18.
- Zhang, P., M. Qin, Y. Wang, X. Chen, Y. Miao, M. Yuan, W. Zhou, D. Li, D. Wang, M. Wang, L. Ai, Y. Ma, Y. Dong und Y. Ji. 2022. 'Inflammation accelerates BCR-ABL1+ B-ALL development through upregulation of AID', *Blood Adv*, 6: 4060-72.
- Zhang, Y., Y. Gao, H. Zhang, J. Zhang, F. He, A. Hnizda, M. Qian, X. Liu, Y. Gocho, C. H. Pui, T. Cheng, Q. Wang, J. J. Yang, X. Zhu und X. Liu. 2018. 'PDGFRB mutation and tyrosine kinase inhibitor resistance in Ph-like acute lymphoblastic leukemia', *Blood*, 131: 2256-61.
- Zhang, Z., C. V. Cotta, R. P. Stephan, C. G. deGuzman und C. A. Klug. 2003. 'Enforced expression of EBF in hematopoietic stem cells restricts lymphopoiesis to the B cell lineage', *EMBO J*, 22: 4759-69.
- Zhou, M. H. und Q. M. Yang. 2014. 'NUP214 fusion genes in acute leukemia (Review)', *Oncol Lett*, 8: 959-62.
- Zhou, T., L. J. Medeiros und S. Hu. 2018. 'Chronic Myeloid Leukemia: Beyond BCR-ABL1', *Curr Hematol Malign Rep*, 13: 435-45.
- Zhuang, S. 2013. 'Regulation of STAT signaling by acetylation', *Cell Signal*, 25: 1924-31.
- Zou, X. und K. Calame. 1999. 'Signaling pathways activated by oncogenic forms of Abl tyrosine kinase', *J Biol Chem*, 274: 18141-4.

9 Anhang

	(A)	(B)	Mittelwertdifferenz		Sig.	95% Konfidenzintervall	
			(A-B)	Std.-Fehler		Untergrenze	Obergrenze
Dunnett-T3	ETV6-ABL1	NUP214-ABL1	,723	,237	,118	-,122	1,568
		BCR-ABL1	,072	,206	1,000	-,649	,793
		RCSD1-ABL1	,508	,178	,145	-,102	1,117
		RCSD1-ABL2	1,006 *	,186	,001	,367	1,646
		EBF1-PDGFR β	-,166	,139	,965	-,638	,305
	NUP214-ABL1	ETV6-ABL1	-,723	,237	,118	-1,568	,122
		BCR-ABL1	-,651	,278	,332	-1,593	,291
		RCSD1-ABL1	-,215	,257	,998	-1,101	,670
		RCSD1-ABL2	,283	,263	,984	-,616	1,183
		EBF1-PDGFR β	-,890 *	,232	,035	-1,727	-,052
	BCR-ABL1	ETV6-ABL1	-,072	,206	1,000	-,793	,649
		NUP214-ABL1	,651	,278	,332	-,291	1,593
		RCSD1-ABL1	,436	,229	,605	-,343	1,214
		RCSD1-ABL2	,934 *	,235	,015	,138	1,731
		EBF1-PDGFR β	-,239	,201	,962	-,949	,471
	RCSD1-ABL1	ETV6-ABL1	-,508	,178	,145	-1,117	,102
		NUP214-ABL1	,215	,257	,998	-,670	1,101
		BCR-ABL1	-,436	,229	,605	-1,214	,343
		RCSD1-ABL2	,499	,211	,319	-,213	1,211
		EBF1-PDGFR β	-,674 *	,171	,021	-1,267	-,081
RCSD1-ABL2	ETV6-ABL1	-1,006 *	,186	,001	-1,646	-,367	
	NUP214-ABL1	-,283	,263	,984	-1,183	,616	
	BCR-ABL1	-,934 *	,235	,015	-1,731	-,138	
	RCSD1-ABL1	-,499	,211	,319	-1,211	,213	
	EBF1-PDGFR β	-1,173 *	,179	,000	-1,797	-,548	
EBF1-PDGFR β	ETV6-ABL1	,166	,139	,965	-,305	,638	
	NUP214-ABL1	,890 *	,232	,035	,052	1,727	
	BCR-ABL1	,239	,201	,962	-,471	,949	
	RCSD1-ABL1	,674 *	,171	,021	,081	1,267	
	RCSD1-ABL2	1,173 *	,179	,000	,548	1,797	

Mit dem angegebenen Fusionsgen stabil transfezierte Ba/F3-Zellen wurden in Abwesenheit von IL3 in einer 96-Well-Platte kultiviert (Startzellzahl: 10^4 Zellen/ Well). Die Viabilität wurde photometrisch mittels WST-Assay nach Herstellerangaben (Roche, Basel, CH) bestimmt. Alle Fusionsproteine wurden in biologischen Triplikaten vermessen (1-3); jedes biologische Unikat in einem technischen Triplikat. Mit den an Tag 4 nach IL3-Entzug gemessenen Werten wurde zunächst eine einfache Varianzanalyse (one-way Welch-ANOVA) durchgeführt, da eine Inhomogenität der Varianzen vorlag. Anschließend wurden alle Konstrukte mittels Dunnett-T3 auf signifikante Unterschiede getestet. * = Die Mittelwertdifferenz ist in Stufe 0.05 signifikant

10 Danksagung

11 Lebenslauf

Lebenslauf aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht enthalten.

12 Eidesstaatliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: