

Aus der Klinik für Anästhesiologie
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München
Abteilung für Transfusionsmedizin, Zelltherapeutika und Hämostaseologie
Direktor: Prof. Dr. med. Andreas Humpe

Mechanismen und molekulare Zielstrukturen in der leukämischen CD34+ Blutvorläuferzell-Expansion

Habilitationsschrift
zum Erwerb der Lehrbefähigung für Experimentelle Transfusionsmedizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München



vorgelegt von
Dr. med. Christian Wichmann
München
2019

Inhalt

1.	Fragestellung und Thema	3
2.	Forschungsfelder	3
3.	Hintergrund	4
4.	Eigene Arbeiten	9
4.1.	Ergebnisse im Forschungsfeld „Molekulare Mechanismen der RUNX1/ETO induzierten CD34+ Progenitorzell-Expansion“	9
4.1.1	STAT5/RAR α : Dimerisierung und RAR α -unabhängige SMRT-Bindung über die zentrale Coiled-Coil Domäne des onkogenen Fusionsproteins erklären die Resistenz der Patienten gegenüber ATRA	10
4.1.2	RUNX1/ETO-Tetramere aber nicht dessen Dimere führen zur Leukämie im t(8;21)-Mausmodell	11
4.1.3	RUNX1/ETO führt zur Hochregulation des Adhäsionsmoleküls VLA-4	13
4.1.4	Epigenetische Repression von PSGL-1 und miR144 durch RUNX1/ETO	13
4.1.5	RUNX1/ETO kooperiert mit aktiviertem c-KIT in der CD34+ Zellexpansion	15
4.2	Ergebnisse im Forschungsfeld „Entwicklung von spezifischen Onkogeninhibitoren“	16
4.2.1	Entwicklung eines Tetramerinhibitors: Spezifische Inhibition der NHR2-Tetramerisierung durch niedermolekulare Substanzen	17
4.2.2	Entwicklung eines Tetramerinhibitors: Differenzierung und Apoptoseinduktion von t(8;21)-positiven SKNO-1 Zellen durch 7.13	18
4.2.3	Entwicklung eines Tetramerinhibitors: <i>Ex vivo</i> Differenzierung und Wachstumsarrest von RUNX1/ETO-positiven primären humanen CD34+ Vorläuferzellen durch 7.13	19
4.2.4	Entwicklung eines Tetramerinhibitors: <i>In vivo</i> Nachweis der Wirkung von 7.13 in einem RUNX1/ETO-abhängigen Leukämiemausmodell	20
4.3	Ergebnisse im Forschungsfeld „Entwicklung von Vektoren zur steuerbaren CD34+ Zellexpansion“	21
4.3.1	Entwicklung eines induzierbaren RUNX1/ETO-Proteinkomplexes	21
5.	Zusammenfassung und Ausblick	24
	Literaturverzeichnis	25
	Verzeichnis der wissenschaftlichen Veröffentlichungen	29
	Eidesstattliche Erklärung	32
	Danksagung	33

1. Fragestellung und Thema

Wie alle malignen Erkrankungen entstehen auch hämatologische Krebserkrankungen durch Anhäufung von genetischen Veränderungen in Proto-Onkogenen und Tumorsuppressorgenen (Schuendeln *et al.*, 2004; Hanahan and Weinberg, 2011). Diese Gruppe von Genen steuert wesentliche Eigenschaften von Blutzellen wie deren Proliferation, Differenzierung, Selbsterneuerung und Apoptose. Die schrittweise Transformation von gesunden Blutvorläuferzellen zu transformierten Leukämiezellen wird derzeit intensiv untersucht und ist insbesondere für die Entwicklung neuer zielgerichteter Therapeutika von Bedeutung. Wegweisend ist hier die Aufdeckung der molekularen Mechanismen in BCR/ABL+ Leukämie und die Entwicklung spezifischer Onkogeninhibitoren.

2. Forschungsfelder

Zu Beginn stand das Studium der molekularen Mechanismen des in der akuten myeloischen Leukämie gefundenen Onkogens *RUNX1/ETO* im Vordergrund. *RUNX1/ETO* entsteht durch chromosomale Translokation und stellt einen neuartigen Transkriptionsfaktor dar. Die gewonnenen Erkenntnisse waren dann Ausgangspunkt für die Entwicklung zielgerichteter neuer therapeutischer Moleküle. Ein zweiter translatorischer Teil beschäftigte sich mit der Entwicklung von steuerbaren Vektoren zur gezielten Vermehrung von humanen CD34-positiven Blutvorläufer-/Stammzellen in der *ex vivo* Kultur.

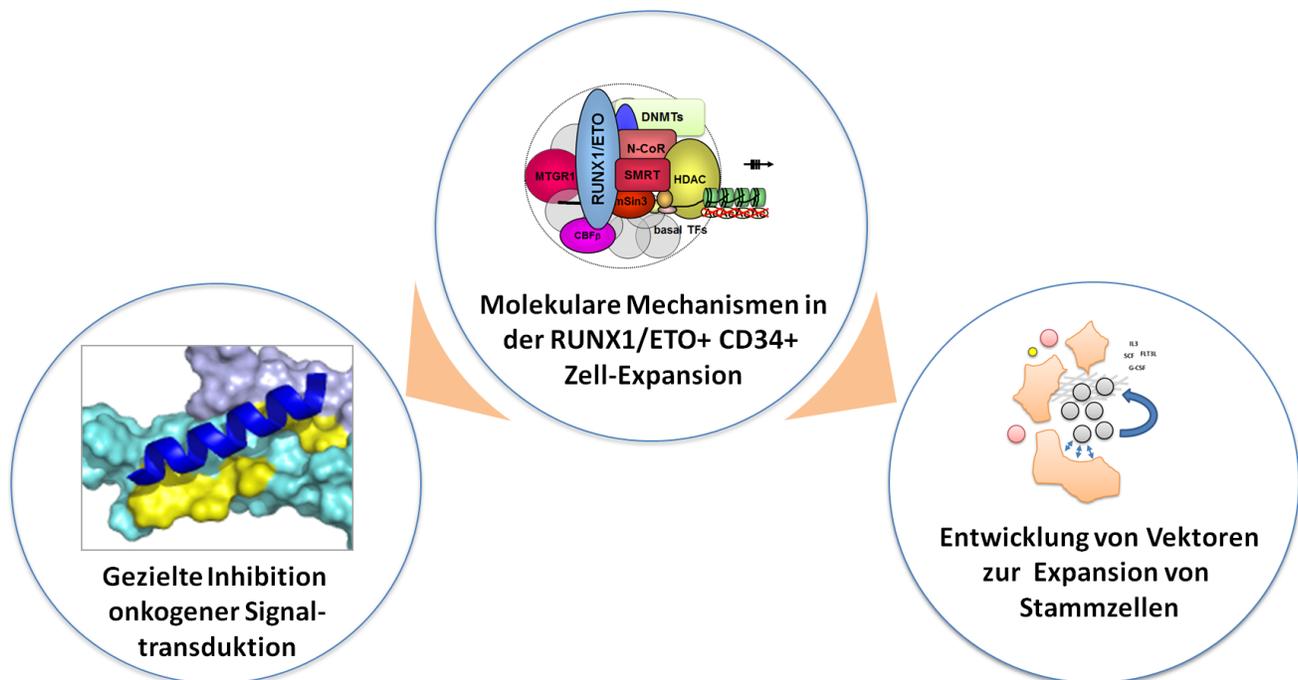


Abbildung 1. Darstellung der Forschungsfelder ausgehend von „Molekulare Mechanismen in der RUNX1/ETO+ CD34+ Zell-Expansion“. Daraus abgeleitet sind die translatorischen Forschungsfelder „Zielgerichtete Inhibition onkogener Signaltransduktion“ und „Entwicklung von Vektoren zur gezielten Vermehrung von Blutstammzellen“.

3. Hintergrund

Genetische Veränderungen in der akuten myeloischen Leukämie (AML)

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine klonale Erkrankung einer frühen myeloischen Vorläuferzelle, die klinisch zur hämatopoetischen Insuffizienz mit Anämie, Thrombopenie und Neutropenie führt. 80% aller Leukämien im Erwachsenenalter sind akute myeloische Leukämien, während es sich bei dem Großteil der Leukämien im Kindesalter um akute lymphatische Leukämien handelt. Man unterscheidet die primäre *de novo* - AML von der sekundären AML, der entweder ein Myelodysplastisches Syndrom (MDS), eine Behandlung einer Neoplasie mit zytotoxischen Substanzen oder die Exposition mit ionisierenden Strahlen vorausgegangen ist. Bei den akuten myeloischen Leukämien sind die Blasten in ihrer normalen Differenzierung blockiert. Im Knochenmark und im peripheren Blut kommt es zu einer massiven Anreicherung proliferierender hämatopoetischer Vorläuferzellen, die unfähig sind, terminal auszdifferenzieren. Anhand der FAB-Klassifikation werden die myeloischen Leukämien nach dem dominierenden Zelltyp und dessen Differenzierungsgrad in das hämatopoetische System eingeordnet (Hoffbrand, 2002, Abbildung 2).

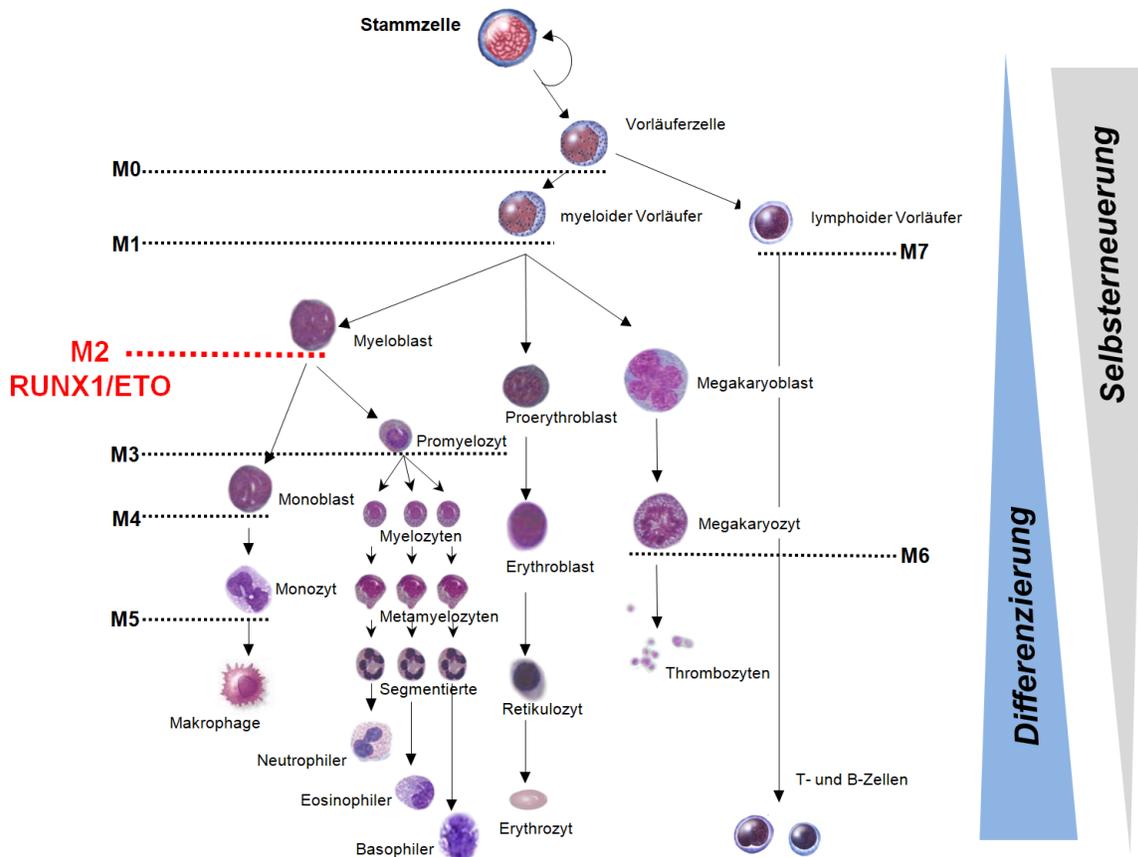


Abbildung 2. Stammbaum der Blutbildung und FAB-Klassifizierung der AML. Ausgehend von Stamm- und Progenitorzellen entwickeln sich unter Zunahme der Zelldifferenzierung und Abnahme der Selbsterneuerungskapazität funktionelle Blutzellen. Bei der AML (M0-M7) liegen jeweils Blockaden der Liniendifferenzierungsschritte vor.

Bei zwei Drittel der AML-Patienten können numerische oder strukturelle Chromosomenaberrationen nachgewiesen werden, denen eine ursächliche Rolle in der Leukämogenese zugeschrieben wird. Bei den strukturellen Chromosomenaberrationen handelt es sich in den meisten Fällen um reziproke Translokationen zwischen unterschiedlichen Chromosomen. Eine Translokation ist eine Umlagerung eines Bruchstücks eines Chromosoms an ein anderes Chromosom, die wahrscheinlich durch eine Störung während der Mitose bedingt ist. Durch den Bruch von zwei Genen an zwei verschiedenen Chromosomenorten in funktionell relevanter Position und folgender Fusion entsteht ein neues Genprodukt. Dieses durch genetische Rekombination entstandene neue Protein kann onkogene Eigenschaften besitzen, wie zum Beispiel BCR/ABL als Konsequenz der Translokation t(9;22)(q34;q11). Dieses Translokationsprodukt stellt eine qualitativ völlig neue Tyrosinkinase dar, deren entscheidende funktionelle Bedeutung für die Chronische Myeloische Leukämie (CML) aufgezeigt werden konnte (Spiekermann and Hiddemann, 2005).

Durch Translokation häufig betroffene Gene sind die Gruppe der Transkriptionsfaktoren, zu denen RUNX1/ETO gehört. Durch Mutation aktivierte Gene stellen häufig Kinasen dar, die dann hyperaktiv sind und ständig aktivierende Signal senden, wie z.B. aktiviertes c-KIT (Scholl, Gilliland and Fröhling, 2008).

RUNX1, ein Schlüsselfaktor in der Blutzellentwicklung

RUNX1 (Runt-related protein 1), auch genannt PEBP2 α B (Polyoma-Virus-Enhancer-bindendes Protein 2 α B) oder CBF α (Kernbindungsfaktor α) ist eine der beiden Untereinheiten des heterodimeren CBF α / β -Transkriptionsfaktorkomplexes. Zusammen mit dem RUNX1-Protein gehören RUNX2 (AML2, CBF α 3, PEBP2 α C) und RUNX3 (AML3, CBF α 1 oder PEBP2 α A) zur Familie der RUNX-Proteine. Von RUNX1 existieren jeweils die drei Isoformen, RUNX1a, RUNX1b und RUNX1c. RUNX-Proteine bilden einen heterodimeren Transkriptionsfaktorkomplex mit CBF β . In diesem Komplex stellen die RUNX1-Proteine die Alpha-Untereinheit dar, die direkt an DNA binden, wohingegen CBF β keine direkte DNA-Bindung eingeht, aber eine Verstärkung der DNA-Bindung der α -Untereinheiten bewirkt. DNA-Bindung und Bindung an CBF β erfolgen über die *runt homology domain* (RHD). Die Namensgebung der RHD resultierte aus den Homologien zu dem primären Paarregel-Gen *runt* aus *Drosophila melanogaster*, welches während der embryonalen Segmentierung die Expression von Paarregel-Genen reguliert. Die Runt-Domäne vermittelt sowohl die DNA-Bindung als auch die Heterodimerisierung mit CBF β . Die DNA-Konsensussequenz TGT/cGGT wurde als Bindesequenz für RUNX1 identifiziert. CBF β , das selbst nicht an DNA bindet, verstärkt die DNA-Bindungsfähigkeit des Heterodimerkomplexes und schützt vor Ubiquitin-vermittelter Proteolyse. Durch RUNX1 werden spezifische Proteine der Hämatopoese, wie z.B. Interleukin-3, *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF), Neutrophile Elastase (NE), Myeloperoxidase sowie Granzym B, sowie Untereinheiten des T-Zell und B-Zell Antigen Rezeptors exprimiert. Vermutlich fördert RUNX1 den Aufbau eines transkriptionellen Aktivierungs-Komplexes, da in der Nähe von RUNX1-Bindestellen häufig

Bindestellen für Myb (myeloblastosis oncogene), ETS (E-twenty six), AP-1 (activator protein 1) und C/EBP lokalisiert sind. RUNX1 kooperiert mit diesen Transkriptionsfaktoren, um die Transkription zu aktivieren. Weiterhin wurde gezeigt, dass RUNX1 mit ko-aktivierenden Proteinen wie p300 (E1A-associated protein p300) und CBP (CREB-binding protein) interagiert. P300 und CBP fungieren als Histon-Acetylasen, welche die Zugänglichkeit des Chromatins und somit die Transkription fördern können. Neben der transkriptionellen Aktivierung ist RUNX1 auch für die Repression einiger Gene verantwortlich. Die Repression wird einerseits durch das C-terminal lokalisierte WRPW-Motiv und andererseits durch zwei weitere Bereiche innerhalb des RUNX1-Proteins vermittelt. Es wurde gezeigt, dass über einen dieser Bereiche, die C-terminal zur RHD lokalisiert ist, die Interaktion mit den Korepressor-Proteinen mSin3A und mSin3B erfolgt (Kumano and Kurokawa, 2010; Lam and Zhang, 2012). Der Transkriptionsfaktor RUNX1 spielt eine zentrale Rolle in der Blutbildung. Experimente in der RUNX1-Knockout-Maus haben gezeigt, dass das Fehlen von RUNX1 zur Störung der definitiven Hämatopoese im Embryo führt. Bei Mausembryonen, die für RUNX1-homozygot negativ sind, findet keine fetale Hämatopoese in der Leber statt. Die Embryonen sterben im Embryonalstadium an Tag 12,5. In RUNX1-heterozygoten Mäusen wurde eine verringerte Anzahl an myeloiden und erythroiden Vorläuferzellen gefunden. Wird das Fehlen von RUNX1 erst während der adulten Hämatopoese durch ein induzierbares Knockout-System eingeleitet, kommt es zur Inhibition der Megakaryozytenreifung, einer erhöhten Anzahl von hämatopoetischen Vorläuferzellen und zu einer gestörten Entwicklung der T- und B-Lymphozyten. Neben der Funktion in der Blutbildung scheint RUNX1 auch eine Rolle in der Entwicklung und Reifung der T-Zellen zu spielen. Im Thymus, einem der Reifungsorte für lymphatische Zellen, konnten hohe RUNX1 Expressionslevel nachgewiesen werden. Für die Erhaltung von hämatopoetischen Stammzellen ist RUNX1 hingegen nicht erforderlich. CBF β -negative Mausembryonen zeigen vergleichbare Abnormitäten der Hämatopoese wie RUNX1-negative Embryonen. Diese Ergebnisse zeigen, dass der Transkriptionsfaktorkomplex aus RUNX1 und CBF β essentiell für die fetale Hämatopoese ist (Swiers, de Bruijn and Speck, 2010). RUNX1 ist insgesamt einer der am häufigsten mutierten Gene der AML (Schnittger *et al.*, 2011; Haferlach *et al.*, 2016). Es kann durch Mutationen, Proteinabbrüche und durch Translokation verändert sein. Eine der häufigsten Veränderungen ist die chromosomale Translokation mit dem Gen ETO.

RUNX1/ETO - ein modular aufgebauter aberranter Transkriptionsfaktor

Die reziproke Translokation t(8;21) ist eine der häufigsten chromosomalen Aberrationen der akuten myeloischen Leukämie (AML). Man findet sie bei etwa 40 % der Patienten mit dem Subtyp AML-M2 und bei 12 % aller *de novo* AML-Patienten. Diese Entität wird einer eher günstigen Prognosegruppe der AMLs mit einem 5-Jahresüberleben von ca. 45% zugerechnet. Allerdings ist die Prognose bei hoher RUNX1/ETO-Expression und zusätzlicher, aktivierender c-KIT Mutation mit 27% 5-Jahresüberleben deutlich schlechter (Jiao *et al.*, 2009). Bei der t(8;21)-Translokation kommt es zu der Fusion der Gene RUNX1, das auf

Chromosom 21 lokalisiert ist, und ETO („eight-twenty-one“), lokalisiert auf Chromosom 8. ETO besitzt vier hoch konservierte Domänen (*nervy homology regions*; NHR1-4), die eine starke Homologie zu dem Drosophila Gen *nervy* aufweisen. Tetramerisierung, DNA-Bindung und Kofaktorrekrutierung sind wesentliche Voraussetzungen für die leukämogene Funktion von RUNX1/ETO. Diesen Funktionen sind spezifische Domänen zugeordnet. Über die NHR2-Domäne, welche eine amphipathische Helixstruktur darstellt, tetramerisiert RUNX1/ETO. Die Tetramerisierung wiederum erhöht die Affinität an RUNX1 DNA-Bindemotive (Okumura *et al.*, 2008). Über den ETO-Anteil rekrutiert RUNX1/ETO zudem E-Proteine und Repressormoleküle wie N-CoR, SMRT und HDACs und reprimiert Schlüssel-Zielgene der myeloischen Zelldifferenzierung wie *PU.1*, *cEBP α* , *NE* und den *GM-CSF-Rezeptor* (Peterson and Zhang, 2004; Sun *et al.*, 2013; Abbildung 3).

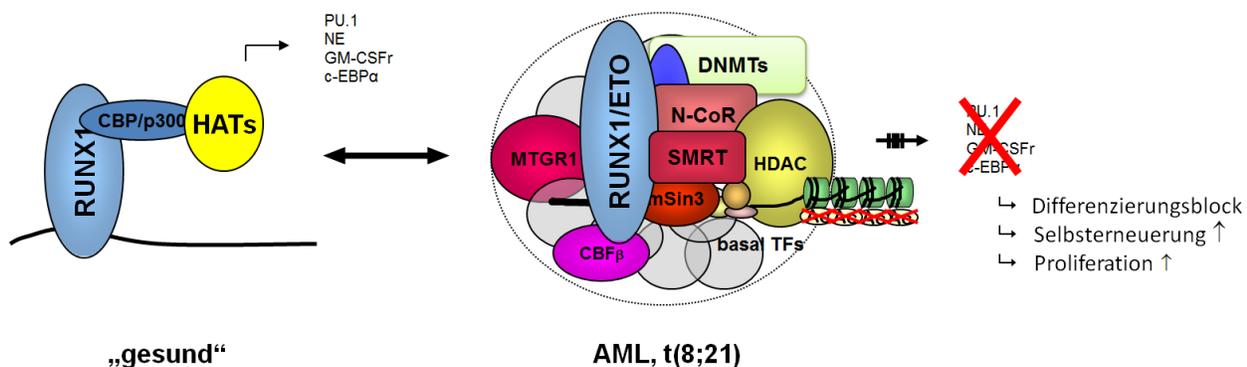


Abbildung 3. Vergleich der Proteinkomplexe von RUNX1 und RUNX1/ETO. In der gesunden Zelle scheint RUNX1 vornehmlich als Aktivator der Transkription zu fungieren. Durch Translokation mit ETO entsteht ein transkriptionell konstitutiver Repressor der RUNX1 Zielgene. Es resultiert ein Block in der zellulären Differenzierung, erhöhte Selbsterneuerung und vermehrte Zellteilung.

Es werden aber auch die Gene *OGG1*, *ATM* und *BRCA2*, die eine wichtige Rolle in der DNA-Reparatur spielen, unterdrückt (Boyapati *et al.*, 2007). So führt die Expression des RUNX1/ETO zu einer gesteigerten Mutationsrate in den betroffenen Zellen (Forster *et al.*, 2015). Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Expression von RUNX1/ETO zur Hochregulation von *TRKA*, *hTert* und *AES* (amino terminal enhancer of split), Gene die für die Progenitorzellproliferation eine Rolle spielen, führt (Mulloy *et al.*, 2005; Gessner *et al.*, 2010; Steffen *et al.*, 2011). Um die biologische Funktion von RUNX1/ETO aufzuklären, wurden funktionelle *ex vivo* Zellkultur-Assays für murine und humane hämatopoietische Vorläuferzellen entwickelt. Zuerst beschrieben wurde der Replattierungs-Assay von murinen RUNX1/ETO-überexprimierenden Knochenmarkzellen. RUNX1/ETO vermag, verglichen mit Kontrollzellen, bis zu 13-mal Kolonien in Methylzellulose zu bilden (*Replating*), wobei eine signifikante Population an *c-kit*⁺/*Sca1*⁺-Zellen erhalten wird (Rhoades *et al.*, 2000). Mit RUNX1/ETO retroviral transduzierte humane CD34⁺-Vorläuferzellen konnten ebenso über längere Zeit *ex vivo* kultiviert werden, ohne ihre koloniebildende Fähigkeit zu verlieren (Mulloy *et al.*, 2002; Mulloy *et al.*, 2003). RUNX1/ETO exprimierende humane CD34⁺-Knochenmarkzellen behalten

ihren Vorläuferzellcharakter bei und können die wachsende *ex vivo* Kultur über einen Zeitraum von bis zu 12 Monaten erhalten. Die Kultur enthielt außerdem hierarchisch angeordnete Subpopulationen, da nach Entfernung der CD34⁺-Zellen aus den Kulturen keine Proliferation mehr nachweisbar war.

Mit RUNX1/ETO kooperierende Gene in t(8;21) positiver AML

Interessanterweise konnte in Blutproben von gesunden Probanden die Expression von RUNX1/ETO mittels hochsensitiver RT-PCR nachgewiesen werden, obwohl die Individuen keine nennenswerten Blutbildveränderungen oder andere Symptome einer Leukämie aufwiesen (Song *et al.*, 2011). Dies weist unter anderem darauf hin, dass die alleinige Expression von RUNX1/ETO nicht das Vollbild der Leukämie induziert. RUNX1/ETO-„knock-in“-Mäuse sind nicht viabel. Ihre Embryonen zeigen, ähnlich wie RUNX1-„knock-out“-Mäuse, einen Defekt in der Blutbildung (Okuda *et al.*, 1998; Gowney *et al.*, 2005). In einer konditionalen „knock-in“-Maus wurde daher die embryonale Letalität der „knock-in“-RUNX1/ETO-Maus umgangen. Es zeigte sich wiederum, dass die alleinige Expression von RUNX1/ETO nicht zur Leukämieentstehung ausreicht (Higuchi *et al.*, 2002). Allerdings konnten bereits zusätzliche Faktoren identifiziert werden, die gemeinsam mit RUNX1/ETO im Maus-Transplantationsmodell eine Leukämie induzieren können. Darunter befinden sich das Onkogen FLT3-ITD und der Wachstumsfaktor-Rezeptor PDGFR-β. Weitere Faktoren, die mit RUNX1/ETO Kooperativität im Mausmodell zeigten, sind eine Defizienz für IRF8 (Interferon regulatory factor 8), ein Transkriptionsfaktor, der an der Interferon-Antwort beteiligt ist, die Koexpression des Wilms Tumor Gens WT1 und die Defizienz des Zellzyklusregulatorproteins p21 (Peterson *et al.*, 2007). Für ein humanisiertes Mausmodell wurden mit RUNX1/ETO immortalisierte humane CD34⁺-Zellen in subletal bestrahlte NOD/SCID-Mäuse transplantiert. Die Zellen konnten dort zum Teil *engraften*, jedoch keine Leukämie induzieren (Mulloy *et al.*, 2002; Mulloy *et al.*, 2003). Auch die Koexpression von aktiviertem N-RAS, das ebenfalls mit RUNX1/ETO assoziiert gefunden wird, konnte in diesem NOD/SCID Transplantations-Mausmodell nicht zur Entwicklung einer Leukämie beitragen (Chou *et al.*, 2011). Es stellt sich die Frage, welche weiteren aktivierenden Mutationen nötig sind, die humanen Zellen zur vollständigen Transformation zu bringen. Insgesamt scheinen murine Blutvorläuferzellen schneller zum Stadium der Transformation zu gelangen. Das humanisierte Modell entspricht somit eher der Situation der Leukämieentstehung im Menschen, da für die volle Transformation wahrscheinlich mehr als zwei Mutationen nötig sind (Ley *et al.*, 2013).

4. Eigene Arbeiten

4.1 Ergebnisse im Forschungsfeld „Molekulare Mechanismen der RUNX1/ETO induzierten CD34+ Progenitorzell-Expansion“

Dieses Forschungsfeld beschäftigte sich mit den zugrunde liegenden molekularen Mechanismen der RUNX1/ETO getriggerten leukämischen CD34+ Zellerweiterung und bildet den Ausgangspunkt für die beiden translatorischen Forschungsfelder 4.2. Onkogeninhibitoren und 4.3. Werkzeuge zur CD34+ Zell-Expansion. Ziel war es, insbesondere für den aberranten Transkriptionsfaktor RUNX1/ETO solche Pathogenitätsmechanismen aufzudecken, die für eine molekulare Intervention interessant schienen.

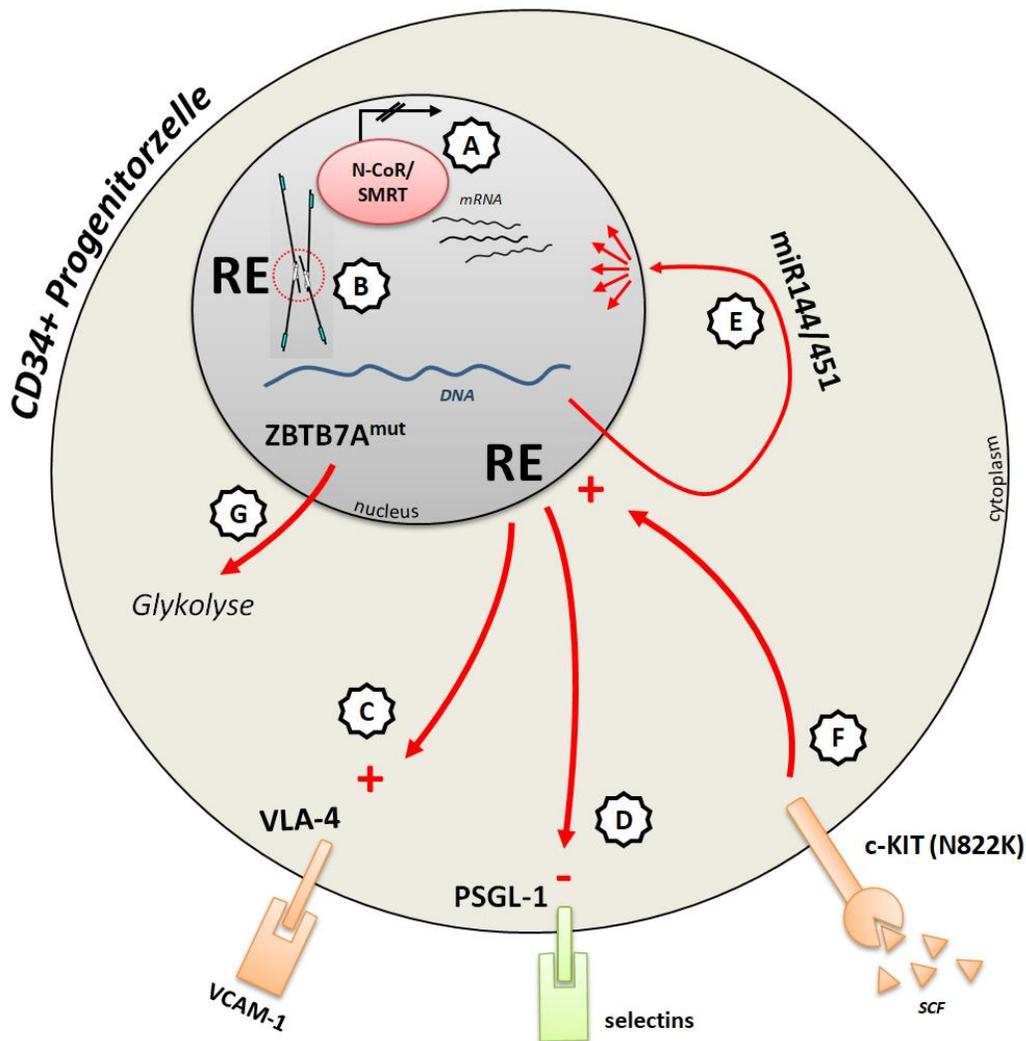


Abbildung 4. Überblick über neue onkogene Mechanismen in der RUNX1/ETO induzierten Leukämogenese. (A) Transkriptionelle Repression als wesentlicher Faktor der STAT5/RAR α bzw. RUNX1/ETO (RE) induzierten aberranten Genexpression und CD34+ Progenitorzell-Expansion (Maurer *et al.*, 2001; Chen-Wichmann *et al.*, 2019). (B) RUNX1/ETO Tetramere, aber nicht deren dimere Formen, können zur Transformation von Blutvorläuferzellen in Mäusen führen (Wichmann *et al.*, 2010a). (C) RUNX1/ETO aktiviert die Expression des Adhäsionsmoleküls VLA-4 in t(8;21) positiven Blutzellen (Ponnusamy *et al.*, 2014). (D&E) RUNX1/ETO reprimiert epigenetisch die Expression des Adhäsionsmoleküls PSGL-1 und der Micro-RNA miR144 (Ponnusamy *et al.*, 2015; Kohrs *et al.*, 2016). (F) Aktiviertes c-KIT vermag die RUNX1/ETO getriebene CD34+ Stammzellerweiterung zu verstärken (Wichmann *et al.*, 2015). (G) ZBTB7A ist ein häufig mutiertes Gen in t(8;21) positiver AML und beeinflusst metabolische Prozesse (Hartmann *et al.*, 2016).

4.1.1. STAT5/RAR α : Dimerisierung und RAR α -unabhängige SMRT-Bindung über die zentrale Coiled-Coil Domäne des onkogenen Fusionsproteins erklären die Resistenz der Patienten gegenüber ATRA

Die akute Promyelozytenleukämie (APL) stellt einen Subtyp der akuten myeloischen Leukämien dar (AML-M3). Der Erkrankung liegen jeweils chromosomale Translokationen mit dem Gen des Retinsäurerezeptors (RAR α) zugrunde, der eine entscheidende Rolle in der myeloischen Zelldifferenzierung spielt. Bisher sind fünf Translokationsprodukte mit dem Retinsäurerezeptor RAR α gefunden worden: PML/RAR α , PLZF/RAR α , NPM/RAR α , NuMA/RAR α und STAT5b. Für PML/RAR α und PLZF/RAR α wurde eine verstärkte Wechselwirkung mit den nukleären transkriptionellen Repressorproteinen N-CoR und SMRT nachgewiesen, welche in PML/RAR α -exprimierenden Zellen durch all-trans-Retinsäure (ATRA) und in PLZF/RAR α -exprimierenden Zellen mit ATRA und einem Histondeacetylasehemmer *in vitro* und *in vivo* unterbunden werden konnte. So kann die Blockade der RAR α -Zielgene aufgehoben werden und die Zellen können zu reifen Granulozyten ausdifferenzieren. In der vorliegenden Arbeit wurden STAT5/RAR α und davon abgeleitete Deletionskonstrukte mittels retroviralen Vektoren in hämatopoetischen Zelllinien exprimiert und untersucht (Maurer *et al.*, 2001). Neben dem „full-length“ STAT5(1-636)/RAR α wurden die Konstrukte STAT5(1-333)/RAR α , ein Konstrukt welches lediglich die Coiled-Coil Domäne von STAT5 enthält, und STAT5(1-174)/RAR α , ein Konstrukt das lediglich eine deletierte Coiled-Coil Domäne von STAT5 enthält, in einen retroviralen Expressionsvektor kloniert und in U937 Zellen auf Differenzierungsblockade nach 48 Stunden VitaminD3/TGF β -Stimulation untersucht. Während mehr als 95% der U937 Wildtypzellen den Oberflächenmarker CD14 exprimieren, sind es bei Zellen, die mit STAT5(1-636)/RAR α oder STAT5(1-333)/RAR α transduziert werden, nur etwa 60%. U937-Zellen, die STAT5(1-174)/RAR α exprimieren, also lediglich eine verkürzte/deletierte Coiled-Coil Domäne von STAT5 aufweisen, verhalten sich annähernd wie U937 Wildtyp-Zellen. Weiterhin wurde untersucht, inwiefern STAT5/RAR α die durch ATRA induzierte Differenzierung beeinflusst. Sowohl der Retinsäurerezeptor RAR α alleine, als auch STAT5(1-174)/RAR α befähigen die Zellen, nach Zugabe von 1 μ M ATRA zu 80 % auszdifferenzieren. Wurde jedoch STAT5(1-636)/RAR α oder STAT5(1-333)/RAR α in den Zellen exprimiert, konnte die CD11b-Expression nur in 50% der Zellen nachgewiesen werden. Wurde zusätzlich zu ATRA noch Trichostatin A (TSA), ein hochselektiver Histondeacetylasehemmer, dazugegeben, konnte dieser Differenzierungsblock überwunden werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass STAT5/RAR α die myeloische Differenzierung beeinflusst, indem es ATRA-abhängige und unabhängige Differenzierungswege blockiert. Hierfür ist die Coiled-Coil Domäne in dem STAT5-Anteil des Translokationsproteins essentiell. Weitere Experimente konnten zeigen, dass die Coiled-Coil Domäne von STAT5 verstärkt mit dem nukleären Korepressor SMRT interagiert und somit zur Differenzierungshemmung und Leukämogenese beiträgt. Da sowohl PLZF/RAR α als auch STAT5/RAR α in der Lage ist, zusätzliche nukleäre Repressoren zu binden, deren Interaktion durch ATRA nicht beeinflusst werden kann, können die molekularen Eigenschaften die klinischen Therapieerfahrungen erklären. Patienten, bei welchen die Translokation PML/RAR α nachgewiesen wurde, konnten durch zusätzliche Gabe von ATRA

zur Chemotherapie eine Remission erlangen, während Patienten sowohl mit PLZF/RAR α , als auch STAT5/RAR α resistent gegenüber einer Differenzierungstherapie mit ATRA blieben.

4.1.2. RUNX1/ETO-Tetramere aber nicht dessen Dimere führen zur Leukämie im t(8;21)-Mausmodell

Auch für das in der AML mit Translokation t(8;21) gefundene RUNX1/ETO spielt die Dimerisierungsdomäne eine entscheidende Rolle. Es wurde bereits gezeigt, dass der Zerfall des RUNX1/ETO-Tetramers in Monomere durch den Austausch von sieben Leucinen gegen Arginin und Glutaminsäure innerhalb der NHR2-Tetramerdomäne zum vollständigen Verlust der onkogenen Funktion von RUNX1/ETO führt. Die Tetramerisierung von RUNX1/ETO stellt somit eine potenzielle Angriffsstelle zur Inhibition der RUNX1/ETO-Funktion dar. Die Inhibition durch therapeutisch relevante Moleküle wie z.B. Peptide oder niedermolekulare Substanzen (*small molecules*) wird aufgrund der Tatsache erschwert, dass die Interaktion der NHR2-Monomere über eine relativ große Interaktionsoberfläche von 10.645 Å² erfolgt (Liu *et al.*, 2006). Da es aber zunehmend Hinweise dafür gibt, dass nur wenige Aminosäuren den Großteil des energetischen Beitrags zu Stabilität einer Protein-Protein-Interaktion (PPI) leisten, könnte trotz der großen Interaktionsfläche eine Inhibition der NHR2-Oligomerisierung möglich sein. Die Aminosäuren, die den Großteil des energetischen Beitrags zur PPI leisten, werden als *Hot Spots* bezeichnet und sind meist von energetisch weniger wichtigen Aminosäurereste umgeben (Bogan und Thorn, 1998). In diesem Arbeitsabschnitt wurden in einem Kooperationsprojekt mit der AG Prof. Gohlke (Bioinformatik, Universität Düsseldorf) neue Erkenntnisse über die Verteilung der Bindungsenergien innerhalb der NHR2-Domäne gewonnen (Wichmann *et al.*, 2010a). Hierzu wurden computergestützte Methoden angewandt, mit denen der energetische Beitrag jeder einzelnen Aminosäure zur Tetramerstabilisierung berechnet wurde. Anhand dieser Berechnungen konnten fünf Aminosäuren (W498, W502, D533, E536 und W540) identifiziert werden, die einen hohen energetischen Beitrag zur Tetramerausbildung leisten. Diese fünf Aminosäuren sind innerhalb des Tetramers auf der hydrophoben Seite der α -Helix lokalisiert. Aufgrund der antiparallelen Orientierung zweier Monomere im Dimer kommen die *Hot Spots* W498 und W502 in die räumliche Nähe von den drei weiteren *Hot Spot*-Aminosäure D533, E536 und W540. Im Dimer existieren somit zwei *Hot Spot*-Regionen, die nicht im Zentrum des Dimers, sondern jeweils an den Enden lokalisiert sind. Die *Hot Spot*-Region umfasst zudem die größte Taschen-ähnliche Vertiefung im Bindungs-Epitop mit einer Größe von ca. 269 Å³. Um die Relevanz der fünf *Hot Spots* für die Tetramerbildung zu untersuchen, wurden diese Aminosäuren im RUNX1/ETO-Protein zu Alanin mutiert (RUNX1/ETO-m5). Anhand von Gelfiltrationsexperimenten konnte gezeigt werden, dass der Elutions-*Peak* der RUNX1/ETO-m5-Mutante zwischen dem *Peak* des Tetramers und der bereits beschriebenen Monomer-Mutante liegt, und somit mit großer Wahrscheinlichkeit als Dimer vorliegt. Dieses Ergebnis wurde durch die analytische Ultrazentrifugation validiert, bei der eine Proteingröße von etwa 24 kDa für das NHR2-m5-Protein bestimmt wurde. Dieser Wert liegt nahe bei der theoretischen Proteingröße von 22.2 kDa, die für das Dimer bestehend aus 2-mal 95 Aminosäuren berechnet wurde. Diese Ergebnisse bestätigen

somit die *in silico* Analyse, welche die fünf *Hot Spots* als essentielle Aminosäuren für die Dimer-Dimer Interaktion, also für die Tetramerstabilität der NHR2-Domäne, identifizierte. Anhand einer CD-Spektroskopie konnte außerdem gezeigt werden, dass die gestörte Dimer-Dimer Interaktion der m5-Mutante nicht auf eine verringerte Helikalität der NHR2-Domäne zurückzuführen ist (Wichmann *et al.*, 2010a). Ferner konnte in dieser Studie nachgewiesen werden, dass RUNX1/ETO als Dimer seine onkogene Wirkung komplett verliert. Die durch RUNX1/ETO induzierte Hochregulation der RUNX1-Zielgene *p21*, *c-JUN* und *TrkA* (*neurotrophic tyrosine kinase receptor type 1*) geht in RUNX1/ETO-m5-exprimierenden Zellen verloren. In weiteren Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass die dimere Form nicht mehr an DNA binden kann. Anhand von Mastransplantationsexperimenten konnte schließlich gezeigt werden, dass die Tetramerisierung von RUNX1/ETO einen essentiellen Schritt für das leukämogene Potenzial darstellt. Hierbei wurden *lineage-negative* Knochenmarkszellen mit RUNX1/ETO oder RUNX1/ETO-m5 transduziert und in Mäuse transplantiert. Die Expression von RUNX1/ETO führte in allen Mäusen innerhalb von 6 Monaten zur einer Leukämie. Mäuse, die hingegen die RUNX1/ETO-m5-Mutante exprimierten, zeigten keine Anzeichen einer Erkrankung (Abbildung 5). Demnach ist die onkogene Wirkung von RUNX1/ETO als Monomer und auch als Dimer blockiert.

Der Dimer-Tetramerübergang stellt also eine attraktive Stelle zur Inhibition mittels kleiner Peptide und niedermolekularer Substanzen dar (siehe Forschungsfeld 4.2. Entwicklung von spezifischen Onkogeninhibitoren).

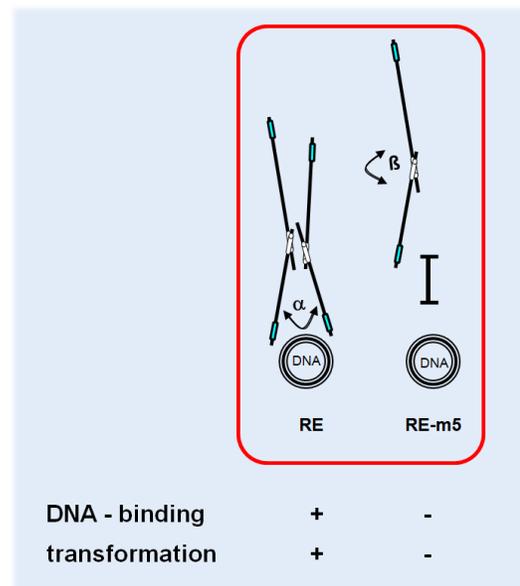
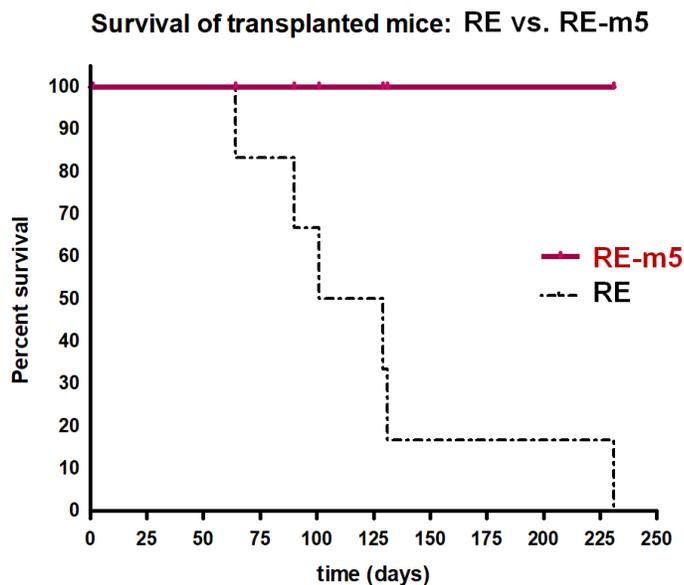


Abbildung 5. RUNX1/ETO's Dimer-Tetramer-Übergang ist kritisch für die Leukämieentstehung im Mausmodell. RUNX1/ETO-Tetramere können effektiv an DNA binden und Transkription steuern. Einhergehend damit führt die Expression im Mausmodell zur Leukämie mit hoher Penetranz. Dimere haben DNA-Bindung und Leukämieinduktionsfähigkeit komplett verloren (Wichmann *et al.*, 2010a).

4.1.3. RUNX1/ETO führt zur Hochregulation des Adhäsionsmoleküls VLA-4

RUNX1/ETO reprimiert die Expression von Genen, die an myeloischen Differenzierungs-, Zellzyklus- und Selbsterneuerungsprogrammen in hämatopoetischen Vorläuferzellen beteiligt sind. In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass die Expression der Integrin-Untereinheiten $\alpha 4$, $\alpha 5$ und $\beta 1$, die die Integrine VLA-4 ($\alpha 4/\beta 1$) und VLA-5 ($\alpha 5/\beta 1$) bilden, in leukämischen Mäusen, die mit RUNX1/ETO-exprimierenden hämatopoetischen Progenitoren transplantiert wurden, hochreguliert werden (Ponnusamy *et al.*, 2014). Für diesen Effekt reicht die trunkierte Form von RUNX1/ETO, das RUNX1/ETO-tr, aus. Die DNA-bindedefekte Mutante L148D verliert die Fähigkeit, die Integrin- $\alpha 4$ -, $\alpha 5$ - und $\beta 1$ -Untereinheiten auf der mRNA- und Proteinebene in hämatopoetischen Progenitoren hochzuregulieren. Interessanterweise korreliert das Maß der Hochregulation direkt mit dem RUNX1/ETO-Expressionsniveau, was auf eine RUNX1/ETO-dosisabhängige Regulation hindeutet. Der selektive Abbau des RUNX1/ETO-Onkoproteins unter Verwendung von siRNA oder die Hemmung der Onkoprotein-Funktion durch Tetramer-blockierende Peptide reduziert die Integrinexpression der $\alpha 4$, $\alpha 5$ und $\beta 1$ -Ketten in Patienten-abgeleiteten t(8;21)+ Kasumi-1 Zellen auf das Niveau von Kontrollzellen. Funktionell verstärkt die beobachtete RUNX1/ETO-getriebene Integrin-Hochregulation die Adhäsionseigenschaften von hämatopoetischen Progenitoren an den VLA-4-Liganden VCAM-1 unter Scherspannung. Die VLA-4/VCAM-1-Interaktion induziert Aktin-zytoskeletales *Remodeling* und verstärkt die Migration von hämatopoetischen Progenitorzellen nach SDF-1 α -Stimulation. Die Vorbehandlung von t(8;21)+ Kasumi-1-Zellen mit PI3K- und Rac1-GTPase-Inhibitoren reduziert die schubspannungs-abhängige Adhäsionswirkung an VCAM-1, was darauf hindeutet, dass RUNX1/ETO konstitutiv VLA-4-Integrine in einer PI3K/Rac1-abhängigen Weise aktivieren kann.

Insgesamt stellen diese Daten erstmalig dar, dass RUNX1/ETO die Integrin-abhängige Adhäsion und Migration von t(8;21)+ Leukämiezellen dereguliert. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass RUNX1/ETO durch Hochregulation von Integrinen zur festen Verankerung der leukämischen Zellen in der Knochenmarknische führt. Die Rolle der Adhäsionsmolekülderegulation für die RUNX1/ETO abhängige CD34+ Zellexpansion ist Gegenstand aktueller Studien.

4.1.4. Epigenetische Repression von PSGL-1 und miR144 durch RUNX1/ETO

In einem komplementären Ansatz wurden die Adhäsionsmolekülexpressionslevel von humanen hämatopoetischen CD34+-Zellen aus peripherem Blut von gesunden Spendern mit t(8;21)+ Kasumi-1-Zellen verglichen (Ponnusamy *et al.*, 2015). Hierbei haben wir beobachtet, dass im Vergleich zu normalen CD34+ Zellen RUNX1/ETO-positive Kasumi-1-Zellen kaum nachweisbar P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 (PSGL-1), ein Mucin-ähnliches Zelladhäsionsmolekül, exprimieren. PSGL-1 ist ein Selektin-Ligand, der weitgehend auf myeloischen, lymphoiden und dendritischen Zellen exprimiert wird. PSGL-1 erkennt je nach Glykosylierung alle drei L-, P- und E-Selektin-Typen. PSGL-1 induziert das sogenannte „Rollen“ von hämatopoetischen Zellen auf Endothelzellen, der erste Schritt vor der festen Anhaftung an Gewebe, gefolgt

von der Migration. Somit beeinflusst PSGL-1 auch das *Homing* von hämatopoetischen Stammzellen in die Knochenmarknische. Die lentiviral-vermittelte Expression des RUNX1/ETO in murinen und humanen Blutvorläuferzellen gesunder Spender kann die PSGL-1-Zelloberflächenexpression deutlich reduzieren, was nahelegt, dass RUNX1/ETO ausreichend ist, die PSGL-1-Expression herunterzuregulieren. Darüber hinaus korreliert das RUNX1/ETO-Expressionsniveau invers mit dem von PSGL-1 in transduzierten myeloischen FDCP-mix Vorläuferzellen. Dies deutet darauf hin, dass die Dosis des RUNX1/ETO-Onkogens eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Expression von PSGL-1 spielt. Interessanterweise bewirkt die Herunterregulierung von RUNX1/ETO über spezifische siRNA die vollständige Re-Expression von PSGL-1 auf der Zelloberfläche von t(8;21)+ Kasumi-1-Zellen. Ebenso induziert die Inhibitorpeptid-vermittelte Hemmung der RUNX1/ETO-Tetramerbildung die komplette Re-Expression des PSGL-1 auf der Oberfläche von Kasumi-1-Zellen. Auch auf mRNA-Ebene reguliert RUNX1/ETO die PSGL-1-Expression, was nahelegt, dass RUNX1/ETO direkt die Transkription von PSGL-1 reguliert. Um den Mechanismus der Regulierung weiter zu verstehen, wurden PSGL-1-Gen-Sequenzen aus dem UCSC-Genom-Browser auf RUNX1 Konsensusmotive (TGT/CGGT) hin analysiert. Das PSGL-1-Genom besteht aus zwei Exonen und einem Intron, einschließlich SP-1 und ETS-Transkriptionsfaktor-Bindemotiven. Eine TATA-Box vor der Transkriptionsstartstelle fehlt allerdings. Basierend auf diesen *in-silico*-Analysen konnten vier verschiedene RUNX1-Konsensusmotive innerhalb der genomischen Sequenz von PSGL-1 identifiziert werden, die mittels Chromatin-Immunoprecipitation (ChIP) näher untersucht wurden. Interessanterweise kann die RUNX1/ETO-DNA-Interaktion ausschließlich mit dem Cluster der Promotorregion des PSGL-1-Gens beobachtet werden. Diese Ergebnisse konnten durch Gesamtgenom-ChIP-Sequenzierungsdaten bestätigt werden (AG Prof. Constanze Bonifer, UK). ChIP-Analysen ergaben, dass das identifizierte RUNX1-Bindungsmotiv innerhalb der PSGL-1-Promotor-Region durch H3K27-Trimethylierung, einer starken repressiven Histonmarkierung, gekennzeichnet ist. Durch epigenetische Repression ist das PSGL-1 Gen von RUNX1/ETO in der transkriptionellen Expression unterdrückt. Um zu untersuchen, ob das hochregulierte PSGL-1 in RUNX1/ETO-depletierten Kasumi-1-Zellen funktional ist, wurde die Interaktionskapazität von RUNX1/ETO-depletierten Kasumi-1-Zellen mit P-Selektin, einem Rezeptor für PSGL-1, untersucht. Im Vergleich zu Kontrollzellen können gegen RUNX1/ETO shRNA-behandelte Kasumi-1-Zellen effizient mit einer P-Selektin-beschichteten Oberfläche interagieren, was darauf hindeutet, dass das re-exprimierte PSGL-1 auf der Kasumi-1-Zelloberfläche funktionell ist. Da PSGL-1 wichtig für den ersten Schritt der Migration, das sogenannte „Rollen“ ist, könnte RUNX1/ETO durch PSGL-1 Herunterregulation somit zum Verbleib von Leukämiezellen in der Stammzellnische führen. Diese Hypothese bedarf weiterer Untersuchungen.

In einem kollaborativen Projekt haben wir ferner festgestellt, dass RUNX1 die Expression bestimmter microRNAs steuert, die eine Rolle für die erythroide und megakaryozytäre Differenzierung spielen (Kohrs *et al.*, 2016). Diese miRNAs können wiederum zahlreiche andere Gene regulieren und somit ganze Genexpressionsmuster verändern. Insbesondere konnte gezeigt werden, dass das miR144/451-Cluster durch

RUNX1 während der Megakaryopoese epigenetisch unterdrückt wird. RUNX1/ETO kann so die miR144/451 Pre-microRNA transkriptionell unterdrücken. Damit trägt RUNX1/ETO zu einer erhöhten Expression von miR451-Zielgenen bei und stört die normale Genexpression während der zellulären Differenzierung. Es konnte gezeigt werden, dass die Hemmung von RUNX1/ETO in Kasumi1-Zellen und in RUNX1/ETO immortalisierten primären AML Patienten-Proben zur Hochregulation der miR144/451 führt. RUNX1 stellt also einen zentralen Regulator eines microRNA-Netzwerks dar, das wesentlich an der zellulären Differenzierung am Megakaryozyten/Erythroid-Gabelungspunkt beteiligt ist. Dieses Netzwerk wird durch das RUNX1/ETO Fusionsprotein in der AML gestört. Somit stellt die Herunterregulation des miR144/451-Clusters einen weiteren Baustein in der RUNX1/ETO-getriggerten Differenzierungsblockade dar.

4.1.5. RUNX1/ETO kooperiert mit aktiviertem c-KIT in der CD34+ Zellexpansion

Zusätzlich zur Translokation t(8;21) ist in bis zu 50% der Fälle das c-KIT-Gen durch Mutation aktiviert. Wir konnten zeigen, dass aktiviertes c-KIT die RUNX1/ETO-induzierte CD34+-Transformation und -Vorläuferexpansion deutlich verstärkt. Die stabile Expression der Onkogene erlaubt die Selektion von RUNX1/ETO und c-KIT(N822K), doppelpositiven CD34⁺-Zellen *ex vivo* (Wichmann *et al.*, 2015). Die durch RUNX1/ETO und c-KIT selektionierten Zellen gleichen morphologisch dem primären AML-M2 myeloblastischen Phänotyp, während RUNX1/ETO exprimierende Zellen größtenteils granulozytär ausreifen. Auch mehrere Wochen nach Transduktion verbleiben CD34⁺-Zellen in der c-KIT(N822K) ko-exprimierenden Population. C-KIT aktivierte Signalwege vermindern die Apoptoserate, schützen vor Zytokinentzug und erhöhen die Selbsterneuerung. Aktiviertes c-KIT steigert ferner die DNA-Reparaturrate und schützt die Zellen so vor RUNX1/ETO induzierten DNA-Schäden. Dies könnte die erhöhte Rückfallrate und das erniedrigte Gesamtüberleben der c-KIT positiven AML-M2 Patienten nach Standardchemotherapie erklären. Die Anwesenheit des c-KIT(N822K) führt die RUNX1/ETO-induzierte genomische Instabilität dosisabhängig zurück. Es wurde beschrieben, dass RUNX1/ETO die Zielgene OGG1, ATM und BRCA2, die eine wichtige Rolle in der DNA-Reparatur spielen, unterdrückt und somit das *DNA-Damage-Signaling* anschaltet (Boyapati *et al.*, 2007; Krejci *et al.*, 2008). C-KIT Signalwege vermögen diese transkriptionelle Repression der DNA-Reparatur-Gene wieder aufzuheben. Wurden die doppel Onkogen-positiven humanen CD34+ Zellen in NOG Mäuse transplantiert, so konnten die Zellen zwar über einen längeren Zeitraum nachgewiesen werden. Die transplantierten Tiere haben allerdings keine Leukämie entwickelt. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass zur vollen Transformation weitere Mutationen in Driver-Onkogenen nötig sind. RUNX1/ETO und c-KIT(N822K) vermitteln in diesem humanen CD34⁺-Zellmodell die Proliferation und den Differenzierungsblock und führen so zur schrittweisen Transformation und *ex vivo* Expansion der Zellen. Daher eignet sich dieses humanisierte Zellmodell auch, um neue gegen die beiden Onkogene zielgerichtete Substanzen zu testen (siehe Forschungsfeld 4.2. Entwicklung spezifischer Onkogeninhibitoren).

4.2 Ergebnisse im Forschungsfeld „Entwicklung von spezifischen Onkogeninhibitoren“

In vorausgegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Expression des Polypeptids NC128 in t(8;21) positiven Zellen die Oligomerisierung von RUNX1/ETO hemmt und infolgedessen die Zellen ihr leukämisches Potential vollständig verlieren (Wichmann *et al.*, 2007; Wichmann *et al.*, 2009; Bartel *et al.*, 2013; Thirant *et al.*, 2017). Weiterführende Analysen zeigten, dass bereits die Blockade des Dimer-Tetramer Übergangs ausreicht, das leukämogene Potential von RUNX1/ETO aufzuheben (Wichmann *et al.*, 2010a). Das Ziel dieses Arbeitsabschnittes lag in der Identifizierung von kleinen Peptiden und niedermolekularen Substanzen, welche die Dimer-Dimer Interaktion der NHR2-Tetramerdomäne blockieren können (Metz *et al.*, 2013; Schanda *et al.*, 2017). Die hierzu entwickelten niedermolekularen Substanzen wurden patentiert (WO2014177464 EU Application 2014; US20160108031A1, US Application 2016).

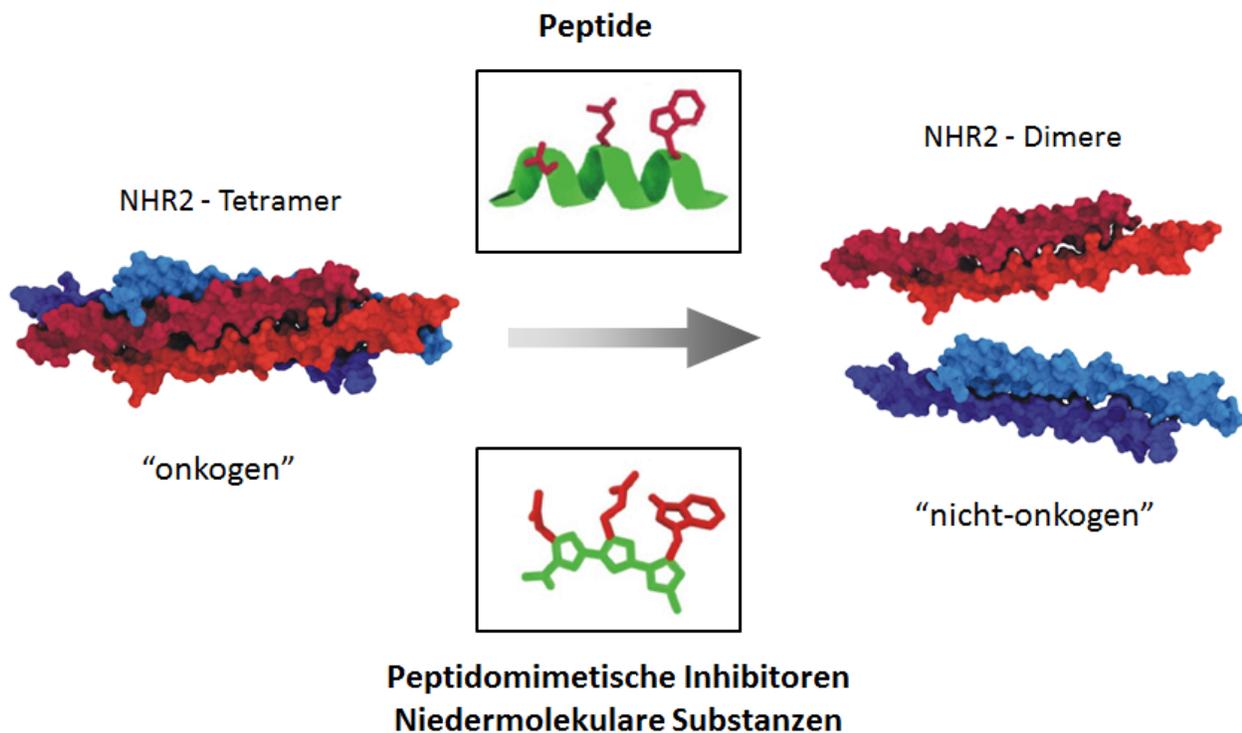


Abbildung 6: Prinzip der NHR2-Tetramerinhibition durch Peptide und niedermolekulare Substanzen. Die Tetramerisierung des RUNX1/ETO-Proteins erfolgt über die NHR2-Domäne. Nur als Tetramer kann RUNX1/ETO seine leukämogene Funktion ausüben, wohingegen bereits die Dimerisierung zum vollständigen Funktionsverlust des Onkoproteins führt. Das Ziel dieses Arbeitsabschnittes war die Identifizierung von Peptiden und niedermolekularen Substanzen, die den Dimer-Tetramer Übergang stören können.

4.2.1 Entwicklung eines Tetramerinhibitors: Spezifische Inhibition der NHR2-Tetramerisierung durch niedermolekulare Substanzen

Eine bereits identifizierte *Hot Spot*-Region auf dem NHR2-Dimer Interface stellte eine geeignete Zielregion für niedermolekulare Inhibitoren dar. Zunächst wurde mit Hilfe eines 18-mer Peptids, welches diese *Hot Spot*-Region adressiert, die NHR2-Tetramerinhibition *in vitro* gezeigt (Metz *et al.*, 2013). Innerhalb der Peptidsequenz konnten dann Aminosäuren definiert werden, die für den Inhibitionseffekt dieses Peptids essentiell sind. Diese Aminosäuren wurden im Folgenden als Suchstruktur für ein virtuelles Screening genutzt, um niedermolekulare Substanzen zu ermitteln, die in gleicher Weise die *Hot Spot*-Region adressieren (Kooperationspartner AG Prof. Gohlke Uni Düsseldorf). Mit Hilfe eines ELISA-Assays wurden Substanzen identifiziert, die eine Verringerung der RUNX1-NHR2 Bindung an ein AML-Target (RUNX3-Oligonukleotid) um etwa 30% bewirkten. RUNX1-NHR2 kann nur im tetrameren Zustand an das Oligonukleotid binden, Monomere und Dimere jedoch nicht. Zur Untersuchung, ob die Reduktion auf eine spezifische Inhibition der NHR2-Tetramerisierung zurückgeführt werden kann, wurde analog die DNA-Interaktion eines RUNX1-BCR-Proteins (BCR, fremde Tetramerdomäne) in Gegenwart der Substanzkandidaten analysiert. Die Differenz der prozentualen Inhibitionswerte (Inhibition (%) NHR2 - Inhibition (%) BCR) spricht in den meisten Fällen für eine spezifische Inhibition der NHR2-Protein-DNA-Bindung und Tetramerisierung. Die Ergebnisse aus Abbildung 7 legen nahe, dass 10 der *gescreenten* Substanzen eine verminderte Proteinbindung aufgrund der Inhibition der NHR2-Tetramerisierung bewirken können. In weiteren Analysen konnte die Substanz 7.13 als spezifischster und stärkster NHR2-Tetramerinhibitor herausgearbeitet werden.

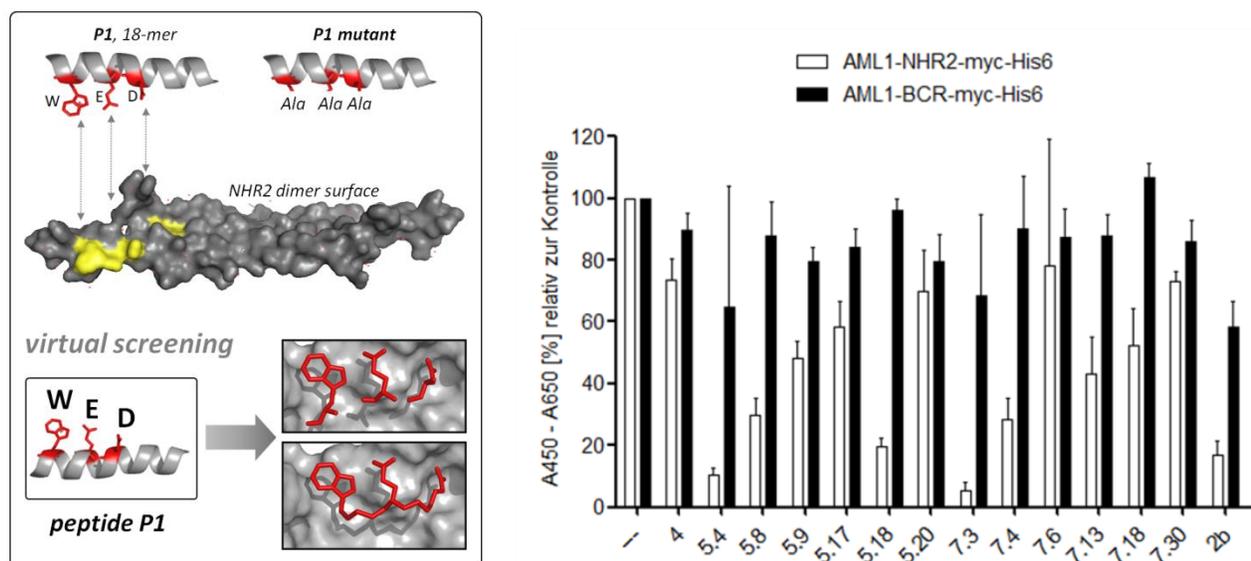


Abbildung 7. Virtuelles Screening und ELISA-Assay: Wirkung der Substanzen auf die Tetramerbildung und DNA-Bindung von RUNX1-Fusionsproteinen. *In silico*-Ableitung von niedermolekularen Substanzen, die am NHR2-*Hot-Spot* binden (AG Prof. Gohlke, Düsseldorf). Differentielle Tetramerinhibition des RUNX1(AML1)-NHR2 und RUNX1(AML1)-BCR Proteins in Anwesenheit niedermolekularer Substanzen. Gezeigt ist der prozentuale Anteil der RUNX1-NHR2 und RUNX1-BCR Bindung an das RUNX3-Oligonukleotid relativ zur Kontrolle (--).

4.2.2 Entwicklung eines Tetramerinhibitors: Differenzierung und Apoptoseinduktion von t(8;21)-positiven SKNO-1 Zellen durch 7.13

Es stellte sich im Folgenden die Frage, ob die gefundenen NHR2-Tetramerinhibitoren auch auf zellulärer Ebene zur Inhibition der RUNX1/ETO Funktion führen. Hierzu wurden t(8;21)+ SKNO-1 Zellen (humane, RUNX1/ETO+ AML-M2 Zelllinie) täglich mit 25 μ M der niedermolekularen Substanzen 7.13 oder 7.38 (Kontroll-Substanz) behandelt. An Tag 5 wurde mittels FACS-Messung die zelluläre Differenzierung anhand der CD11b-Oberflächenexpression gemessen. In Abbildung 8 ist zu sehen, dass unbehandelte SKNO-1 Zellen nur eine geringe CD11b-Expression von etwa 3% aufweisen. Durch Behandlung mit der Substanz 7.13 konnte dagegen eine Zunahme um etwa 30% an CD11b positiven Zellen beobachtet werden. Die Behandlung mit der Kontroll-Substanz 7.38 bewirkte keinen Anstieg der CD11b-Expression. Diese Unterschiede konnten zytomorphologisch bestätigt werden. Neben Differenzierung konnten auch eine hemmende Wirkung auf Proliferation und Koloniebildung für 7.13 nachgewiesen werden, sowie eine Apoptose-auslösende Wirkung.

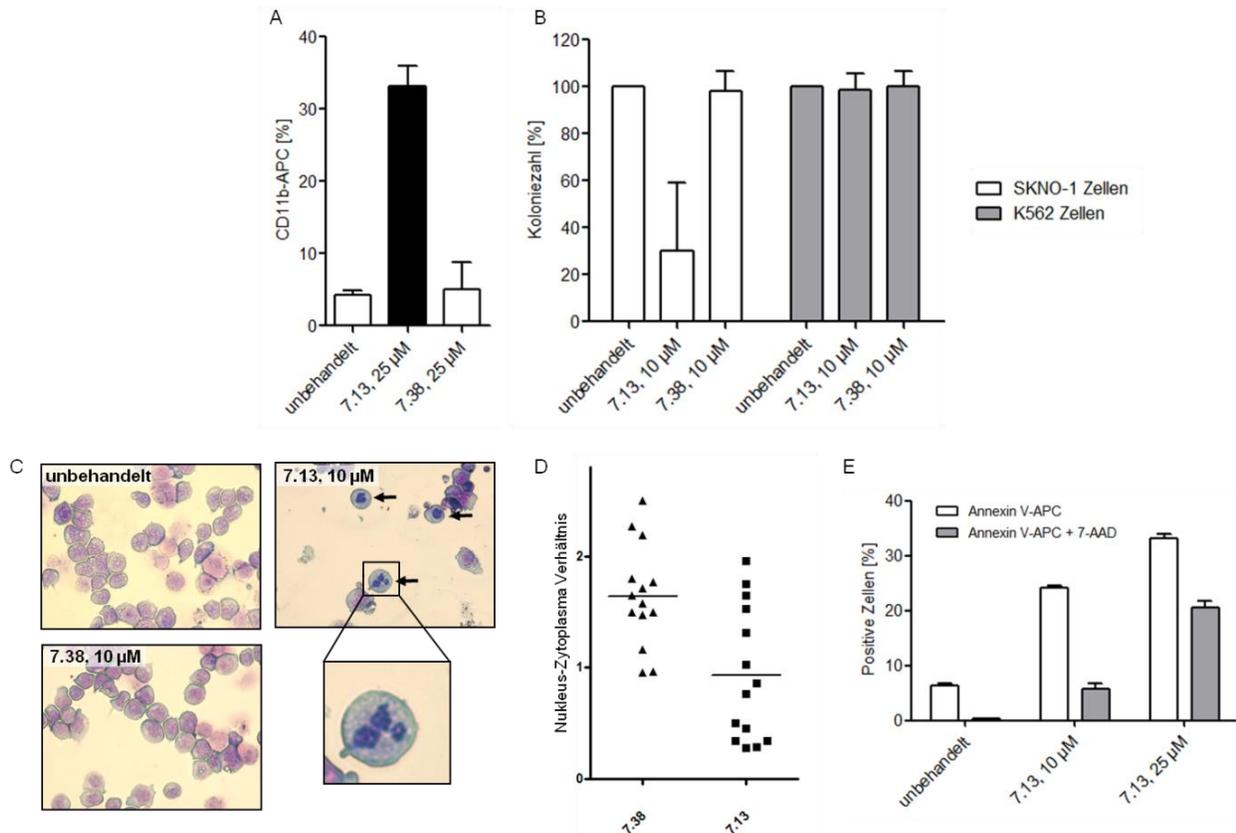


Abbildung 8. Differenzierung, Koloniebildung und Apoptose von t(8;21)-positiven SKNO-1 Zellen nach Behandlung mit der Substanz 7.13. A: Prozentualer Anteil CD11b-positiver Zellen an Tag 5 nach täglicher Behandlung mit 25 μ M der Substanz 7.13 oder 7.38. B: CFU-Assay: SKNO-1 und K562 (RUNX1/ETO-negativ) Zellen wurden 3 Tage mit 10 μ M der Substanz 7.13 oder 7.38 behandelt und anschließend 14 Tage in Methylzellulose kultiviert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Kolonien. C: Färbung der SKNO-1 Zellen mit dem Hemacolor Kit nach 4-tägiger Substanzbehandlung mit 10 μ M 7.13 oder 7.38. D: Quantifizierung des Nukleus-Zytoplasma Größenverhältnisses an Tag 5. E: Prozentualer Anteil an AnnexinV- und 7-AAD-positiver Zellen an Tag 5 nach täglicher Behandlung mit 10 μ M und 25 μ M 7.13.

4.2.3 Entwicklung eines Tetramerinhibitors: *Ex vivo* Differenzierung und Wachstumsarrest von RUNX1/ETO-positiven primären humanen CD34+ Vorläuferzellen durch 7.13

Die primären humanen RUNX1/ETO-positiven Vorläuferzellen wurden täglich jeweils mit 100 μM 7.13 bzw. 7.38 behandelt. Während der 7-tägigen Substanzbehandlung wurde regelmäßig die Lebendzellzahl bestimmt. Abbildung 9 zeigt, dass 7.13 ein deutlich reduziertes Zellwachstum der CD34+/RUNX1/ETO+ Vorläuferzellen gegenüber den unbehandelten Zellen bewirkte. 7.38 Kontroll-Substanz behandelte Zellen weisen ein normales Zellwachstum auf. Das Wachstum der CD34+/RUNX1/ETO-positiven Vorläuferzellen konnte somit spezifisch durch die Behandlung mit der Substanz 7.13 gehemmt werden. Neben Wachstumsarrest bewirkte 7.13 eine deutlich erhöhte CD11b-Zelloberflächenexpression und reduzierte außerdem signifikant die Koloniezahl in CFU-Assays. Zusammen mit der beobachteten Zunahme der CD11b-Expression sprechen diese Ergebnisse dafür, dass die Substanz 7.13 die zelluläre Differenzierung der primären RUNX1/ETO-exprimierenden CD34-positiven Vorläuferzellen auslöst.

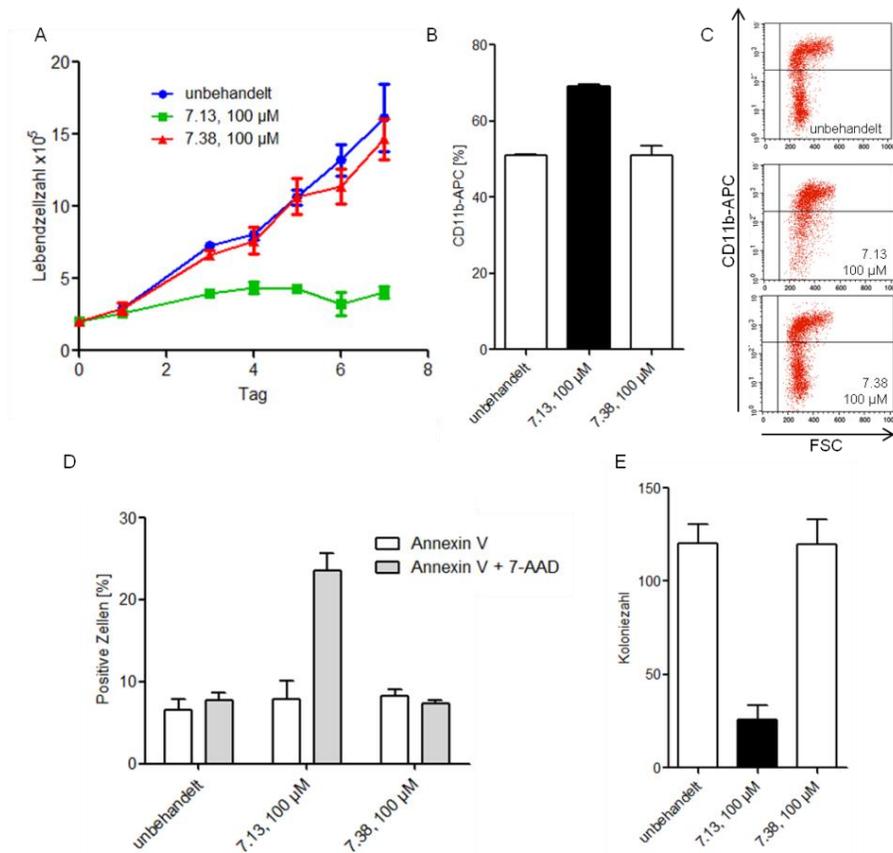


Abbildung 9. Wachstumsarrest und Differenzierung von RUNX1/ETO-positiven Vorläuferzellen nach Behandlung mit der Substanz 7.13. RUNX1/ETO-exprimierende CD34-positive Zellen wurden für 7 Tage mit 100 μM der Substanz 7.13 oder 7.38 behandelt. A: Darstellung der Lebendzellzahl, die mittels Trypanblau bestimmt wurde. B: Prozentualer Anteil CD11b-positiver Zellen an Tag 8. C: Repräsentative CD11b-FACS-Messung an Tag 8. D: Prozentuale Darstellung der AnnexinV- und 7-AAD-Färbung an Tag 8. E: CFU-Assay: Nach 7-tägiger Substanzbehandlung wurden RUNX1/ETO-exprimierende CD34-positive humane Vorläuferzellen in Methylzellulose aufplattiert und deren Koloniezahl nach 14-tägiger Kultivierung bestimmt.

4.2.4 Entwicklung eines Tetramerinhibitors: *In vivo* Nachweis der Wirkung von 7.13 in einem RUNX1/ETO-abhängigen Leukämiemausmodell

Zuletzt wurde untersucht, ob die Behandlung mit der Substanz 7.13 das Tumorwachstum von transplantierten RUNX1/ETO+ SKNO-1 Zellen in SCID-gc Mäusen *in vivo* verringert. Als Kontroll-Experiment erfolgte die Transplantation von K562 (RUNX1/ETO-negativ) Zellen sowie unbehandelter SKNO-1 bzw. K562 Zellen. Die Zellen wurden vor Transplantation *in vitro* täglich mit 25 μ M der Substanzen behandelt. Pro Maus wurden jeweils unbehandelte und behandelte Zellen in die linke bzw. rechte Flanke injiziert. Zur Bestimmung des Tumor-Volumens wurde eine Woche nach Transplantation die Länge und Breite des Tumors bestimmt. Im Vergleich zu unbehandelten SKNO-1 Zellen bewirkte 7.13 eine starke Reduktion des Tumorwachstums. 7.13 hatte jedoch kaum Einfluss auf das Tumorwachstum der K562 Zellen. Nach Beendigung des Experiments wurden die Tumore präpariert und gewogen. Auch anhand dieser Ergebnisse konnte demonstriert werden, dass 7.13 das Tumorwachstum der t(8;21)+ SKNO-1 Zellen deutlich einschränkte. Insgesamt zeigen diese Daten eine spezifische Wirkung von 7.13 auf das Tumorwachstum RUNX1/ETO-positiver SKNO-1 Zellen *in vivo*.

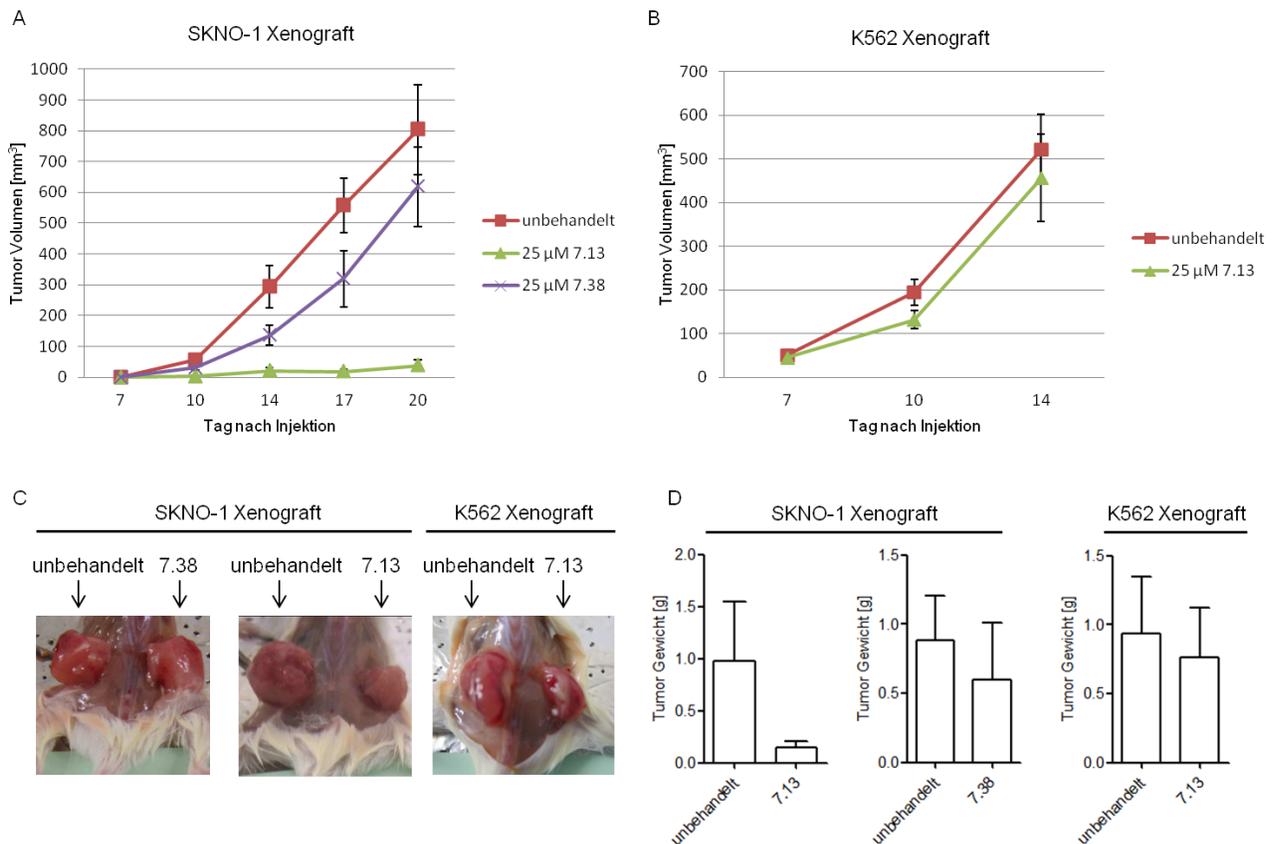


Abbildung 10. Verringertes Tumorwachstum von SKNO-1-Zellen in SCID-gc Mäusen nach Behandlung mit 7.13.

A: SKNO-1 Zellen wurden täglich für 4 Tage mit 25 μ M der Substanz 7.13 oder 7.38 behandelt. An Tag 5 wurden jeweils 5×10^5 SKNO-1 Zellen subkutan in die linke (unbehandelte Zellen) und rechte Flanke (mit 7.13 oder 7.38 behandelte Zellen) injiziert. B: Analoges Versuchsdesign mit K562 Zellen. C: Freipräparierte Tumore, die durch die Xenotransplantation von behandelten oder unbehandelten SKNO-1 oder K562 Zellen gewachsen sind. D: Graphische Darstellung des Tumorgewichts der Xenotransplantate.

4.3 Ergebnisse im Forschungsfeld „Entwicklung von Vektoren zur steuerbaren CD34+ Zellexpansion“

Ziel der Projekte aus diesem Forschungsfeld war es, die Aktivität des RUNX1/ETO-Fusionsproteins in humanen CD34+ Progenitorzellen steuerbar an- und abzuschalten, um so humane Blutvorläuferzellen gezielt zu vermehren und dann deren Differenzierung durch Abschaltung der RUNX1/ETO-Funktion einzuleiten. Mit Hilfe solcher Vektoren sollen in Zukunft Blutvorläuferzellen gezielt für zelltherapeutische Zwecke *ex vivo* vermehrt werden (Faridi *et al.*, 2013; Moslem *et al.*, 2017; Chen-Wichmann *et al.*, 2019). Mit diesen Arbeiten sollte das *Proof of Principle* erbracht werden, dass leukämieassoziierte Genprodukte zur gezielten Expansion von humanen CD34⁺-Zellen eingesetzt werden können. Dieses Zellsystem könnte zukünftig z.B. für die Generierung von funktionellen Blutzellen bei genetischen Erkrankungen wie der Chronischen Granulomatose genutzt werden. Funktionstüchtige Vektoren sollen dann in einem zweiten Schritt in nicht-integrierende lentivirale Vektoren überführt werden, die für eine Anwendung zur Zelltherapeutikaherstellung eine wesentliche höhere genotoxische Sicherheit aufweisen.

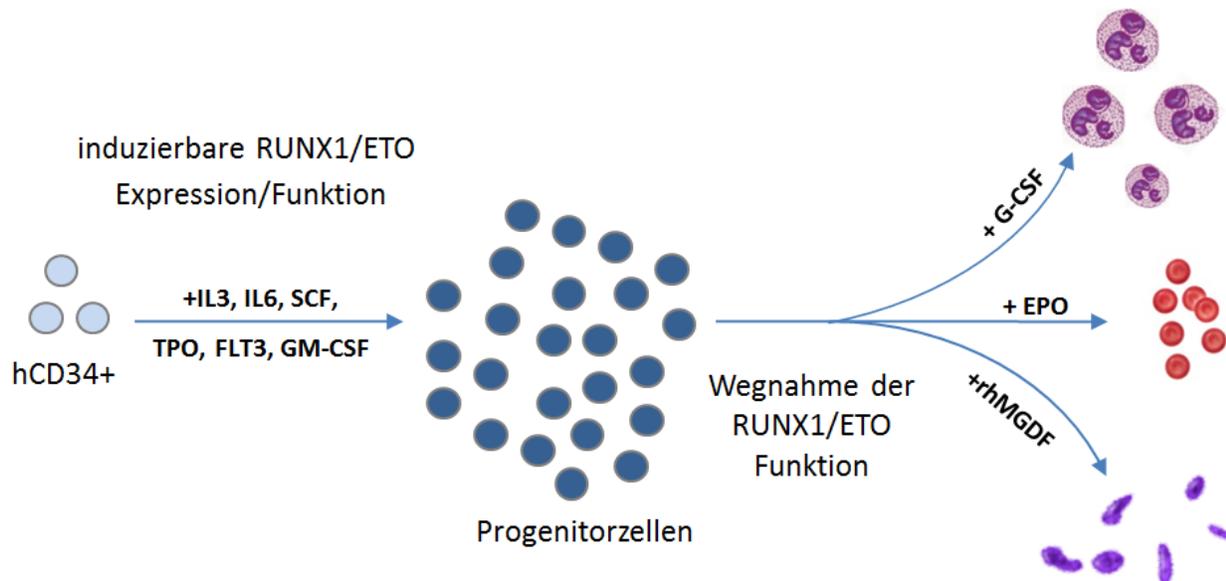


Abbildung 11. Schema der steuerbaren Expansion und gezielten Ausreifung humaner CD34⁺-Zellen *ex vivo*. RUNX1/ETO induziert zusammen mit zahlreichen Zytokinen die Expansion humaner Blutprogenitorzellen. Das Abschalten des RUNX1/ETO-Fusionsgens lässt in Zusammenwirken mit linienspezifischen Zytokinen eine Ausreifung in bestimmte Zellreihen zu.

4.3.1 Entwicklung eines induzierbaren RUNX1/ETO-Proteinkomplexes

Basierend auf den Ergebnissen von „Domain-Switch“-Experimenten, die gezeigt haben, dass das RUNX1/ETO Fusionsprotein modular zusammengesetzt ist, wurde eine regulierbare RUNX1/ETO-Proteinkomplexzusammensetzung etabliert (Chen-Wichmann *et al.*, 2019). Die beiden Komponenten des induzierbaren Systems wurden in den bi-cistronischen retroviralen MSCV-Vektor kloniert (AiO, all-in-one;

Abbildung 12). In diesem induzierbaren Heterodimerizer-System kann eine definierte transkriptionelle Repressordomäne durch Zugabe eines chemischen Dimerizer-Moleküls an das an DNA gebundene RUNX1/ETO herangeführt werden. Hierfür wurde die NHR4-Zinkfinger Repressordomäne verwendet. Mit diesem System kann die Expansion der humanen CD34+ Vorläuferzellen durch Zugabe des Heterodimerizer-Moleküls initiiert werden. Unter der Zugabe von 500uM AP werden die Zellen *ex vivo* selektioniert und können unter ständiger Dimerizerzugabe expandiert werden. Aus dieser Kultur resultieren Zellpopulationen mit einem ca. 10%-igen Anteil an CD34+ Zellen die zur Ausbildung von Kolonien in Methylzellulose fähig sind. Ohne den Dimerizer hingegen differenzieren die Zellen komplett aus. Hier entstehen keine koloniebildenden Zellen nach der *ex vivo* Expansion. Ohne die Zinkfingerdomäne ist der RUNX1/ETO-Proteinkomplex zwar an DNA gebunden, es fehlt jedoch eine transkriptionell repressive Domäne. Die Zielgene von RUNX1 können dann nicht reprimiert werden. Somit können die Progenitorzellen nicht vermehrt werden, die Zellen reifen komplett zu Monozyten aus (Abbildung 13; Chen-Wichmann *et al.*, 2019).

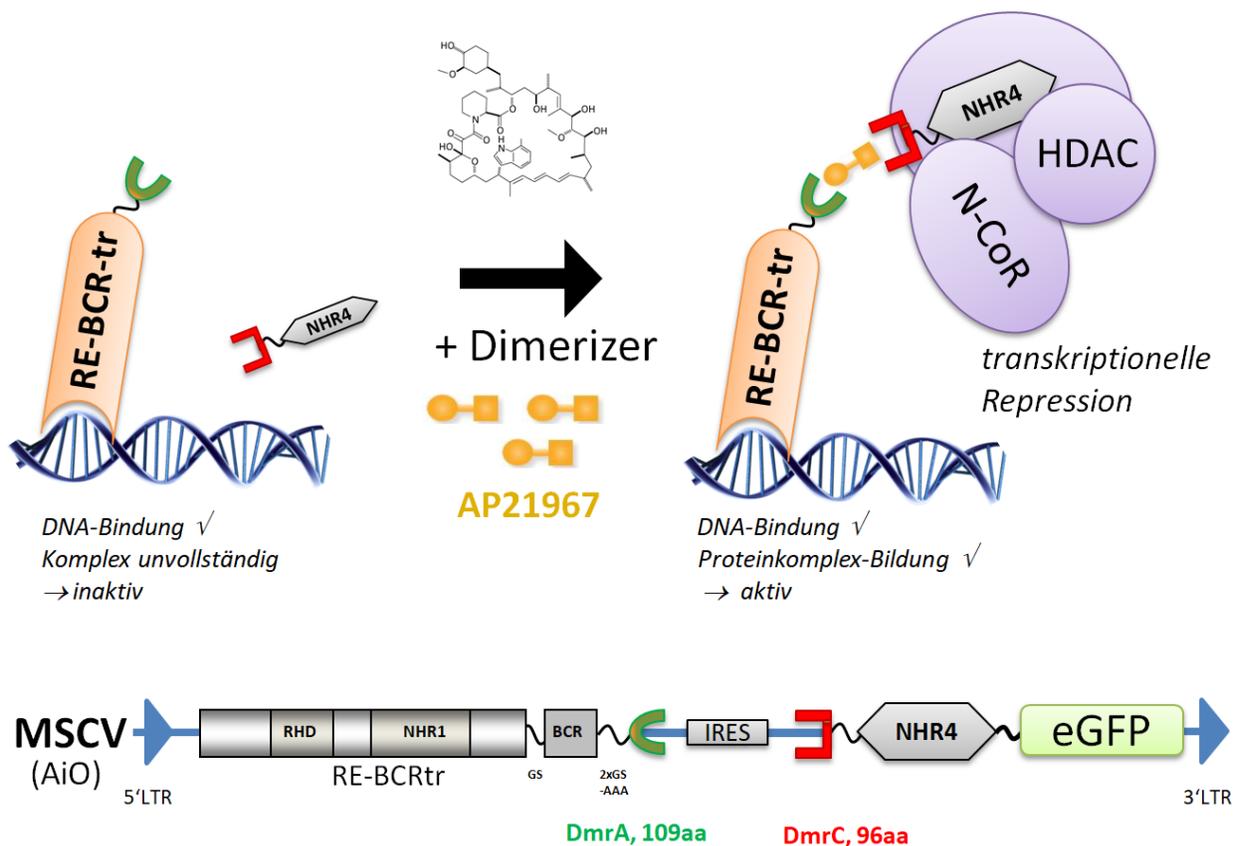


Abbildung 12. Induzierbarer RUNX1/ETO-Multiproteinkomplex. Schema der regulierbaren RUNX1/ETO-Komplexzusammensetzung: über Heterodimerisierungsdomänen (DmrA und DmrC) soll RUNX1/ETO-BCRtr mit der NHR4-Domäne zusammengeführt werden. Dies geschieht über einen sogenannten *Dimerizer*: ein kleines membranpermeables Molekül (AP21967), welches an die Dimerisierungsdomänen mit hoher Affinität bindet. Durch Zugabe dieses *Dimerizers* soll ein funktionell aktiver RUNX/ETO-BCR-NHR4 Proteinkomplex generiert werden.

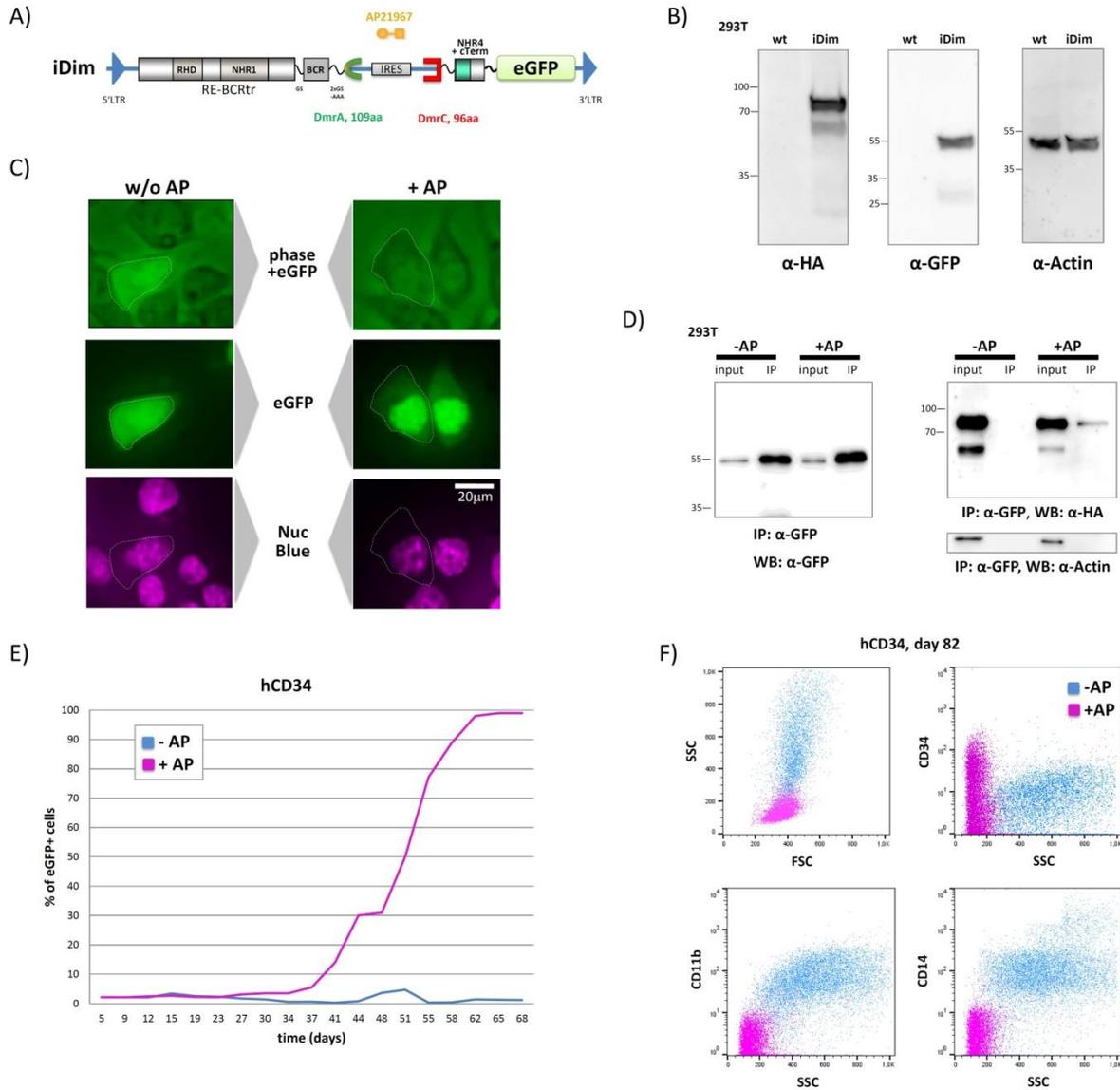


Abbildung 13. Gezieltes Anschalten der humanen CD34+ Zellexpansion durch ein RUNX1/ETO-Heterodimerisierungssystem. (A) Schema des MSCV *All-in-One* Vektors *iDim* (*inducible dimerization*). (B) Nachweis der Proteinexpression mittels Westernblotverfahren (HA-RE-BCR). (C) Kernlokalisierung des NHR4-GFP Repressormoleküls nach Dimerizier-Zugabe (AP). (D) Interaktion der Heterodimerisierungspartner, nachgewiesen in Immunopräzipitationsstudien von transfizierten 293T-Zellen. (E) Selektion der Dimerizer-behandelten Zellen über die Zeit gemessen. (F) FACS-Oberflächenmarkeranalyse der mit und ohne AP behandelten Zellen in der *ex vivo* Kultur.

5. Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnten neue molekulare Mechanismen der leukämischen, RUNX1/ETO-Onkogen getriggerten, CD34+ Blutprogenitorzell-Expansion herausgearbeitet werden. Diese molekularen Pathogenitätsmechanismen sind zum einen für die Entwicklung Onkogen-gerichteter Inhibitoren in der t(8;21)-positiven AML relevant. Zum anderen sollen diese Erkenntnisse für die Etablierung sogenannter Expansionsvektoren zur steuerbaren Vermehrung von unreifen CD34-positiven Blutvorläufer-/Stammzellen gesunder Spender und anschließender zellulärer Differenzierung zu funktionellen Blutzellen verwendet werden.

Aus den beiden translatorischen Projekten sind zunächst molekulare Werkzeuge hervorgegangen, die ein *Proof of Principle* belegen. So konnten erstmals niedermolekulare Substanzen gefunden werden, welche gezielt die RUNX1/ETO-Proteinkomplexbildung stören und damit dessen onkogene Wirkung unterdrücken können. Die Substanzen überwinden die Zellmembran und binden an eine kritische Protein-Protein-Interaktionsoberfläche eines intrazellulären onkogenen Transkriptionsfaktors. Diese patentierten Prototyp-Substanzen wirken derzeit noch im hochmolaren Bereich. In weiterführenden Arbeiten sollen diese Leitstrukturen in Wirkung und Spezifität für die NHR2-Tetramerdomäne des RUNX1/ETO-Onkoproteins verbessert werden. Weiterhin ist es gelungen, ein retrovirales regulierbares RUNX1/ETO-Konstrukt zur steuerbaren *ex vivo* CD34+-Zellexpansion zu entwickeln. Mithilfe dieses Vektors konnten humane Blutvorläuferzellen von gesunden Spendern gezielt vermehrt werden. Zugrunde liegt ein modifizierter RUNX1/ETO-Proteinkomplex, der durch eine Substanz induzierbar in seiner Proteinkomplexzusammensetzung auf- und abgebaut werden kann.

Die hier gezeigten molekularen Werkzeuge sollen in Zukunft zu verbesserten, klinisch nutzbaren Onkogeninhibitoren für die Behandlung der t(8;21)-positiven akuten myeloischen Leukämie, als auch zu hocheffizienten CD34+-Expansionsvektoren für diagnostische und zelltherapeutische Zwecke weiterentwickelt werden. Mithilfe der verbesserten Expansionsvektoren sollen in Zukunft, ähnlich dem iPS(*induced pluripotent stem cell*)-Zellprogrammierungs- und Expansionsverfahren, patientenspezifische Zelltherapeutika für die klinische Anwendung hergestellt werden.

Literaturverzeichnis

- A V Hoffbrand, J E Pettit, P A Moss, D Hoelzer: Grundkurs Hämatologie. 2002
- Bartel Y, Grez M, and Wichmann C: Interference with RUNX1/ETO Leukemogenic Function by Cell-Penetrating Peptides Targeting the NHR2 Oligomerization Domain. *Biomed Res Int.* 2013; 2013:297692. doi: 10.1155/2013/297692.
- Bogan AA, Thorn KS. Anatomy of hot spots in protein interfaces. *J Mol Biol.* 1998 Jul 3;280(1):1-9.
- Boyapati A, Yan M, Peterson LF, Biggs JR, Le Beau MM, Zhang DE. A leukemia fusion protein attenuates the spindle checkpoint and promotes aneuploidy. *Blood.* 2007 May 1;109(9):3963-71.
- Chen-Wichmann L, Shvartsman M, Preiss C, Hockings C, Windisch R, Redondo-Monte E, Leupolt G, Spiekermann K, Lausen J, Brendel C, Grez M, Greif P, Wichmann C: Compatibility of RUNX1/ETO fusion protein modules driving CD34+ human progenitor cell expansion. *Oncogene.* 2019, Jan;38(2):261-272.
- Chou FS, Wunderlich M, Griesinger A, Mulloy JC. N-Ras(G12D) induces features of stepwise transformation in preleukemic human umbilical cord blood cultures expressing the AML1-ETO fusion gene. *Blood.* 2011 Feb 17;117(7):2237-40.
- Faridi F, Ponnusamy K, Quagliano I, Chen-Wichmann L, Grez M, Henschler R, and Wichmann C: Aberrant epigenetic regulators control expansion of human CD34+ hematopoietic stem/progenitor cells. *Front. Genet.* 2013; 28, 254.
- Forster VJ, Nahari MH, Martinez-Soria N, Bradburn AK, Ptasinska A, Assi SA, Fordham SE, McNeil H, Bonifer C, Heidenreich O, Allan JM. The leukemia-associated RUNX1/ETO oncoprotein confers a mutator phenotype. *Leukemia.* 2015 Jun 8. doi: 10.1038/leu.2015.133.
- Gessner A, Thomas M, Castro PG, Büchler L, Scholz A, Brümmendorf TH, Soria NM, Vormoor J, Greil J, Heidenreich O. Leukemic fusion genes MLL/AF4 and AML1/MTG8 support leukemic self-renewal by controlling expression of the telomerase subunit TERT. *Leukemia.* 2010 Oct;24(10):1751-9.
- Growney JD, Shigematsu H, Li Z, Lee BH, Adelsperger J, Rowan R, Curley DP, Kutok JL, Akashi K, Williams IR, Speck NA, Gilliland DG. Loss of Runx1 perturbs adult hematopoiesis and is associated with a myeloproliferative phenotype. *Blood.* 2005 Jul 15;106(2):494-504.
- Haberberger AK, Kirchner B, Riedmaier I, Henschler R, Wichmann C, Buhmann R and Pfaffl MW. Changes in the microRNA expression profile during blood storage. *BMJ Open Sport & Exercise Medicine.* 2018 Jul 5;4(1):e000354. doi: 10.1136/bmjsem-2018-000354.
- Haferlach T, Stengel A, Eckstein S, Perglerová K, Alpermann T, Kern W, Haferlach C, Meggendorfer M. The new provisional WHO entity 'RUNX1 mutated AML' shows specific genetics but no prognostic influence of dysplasia. *Leukemia.* 2016 Oct;30(10):2109-2112.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011 Mar 4;144(5):646-74.
- Hartmann L, Dutta S, Opatz S, Vosberg S, Reiter K, Leubolt G, Metzeler KH, Herold T, Bamopoulos S, Bräundl K, Zellmeier E, Ksienzyk B, Konstandin NP, Schneider S, Hopfner KP, Graf A, Krebs S, Blum H, Middeke JM, Stölzel F, Thiede C, Wolf S, Bohlander SK, Preiss C, Chen-Wichmann L, Wichmann C, Sauerland MC, Büchner T, Berdel WE, Woermann BJ, Braess J, Hiddemann W, Spiekermann K and Greif PA: ZBTB7A Mutations in Acute Myeloid Leukemia with t(8;21) Translocation. *Nature Communications.* 2016 Jun 2;7:11733. doi: 10.1038/ncomms11733.
- Hennig D, Müller S, Wichmann C, Drube S, Pietschmann K, Pelzl L, Grez M, Bug G, Heinzel T, Krämer OH. Antagonism between granulocytic maturation and deacetylase inhibitor-induced apoptosis in acute promyelocytic leukaemia cells. *Br J Cancer.* 2015 Jan 20;112(2):329-37.
- Higuchi M, O'Brien D, Kumaravelu P, Lenny N, Yeoh EJ, Downing JR. Expression of a conditional AML1-ETO oncogene bypasses embryonic lethality and establishes a murine model of human t(8;21) acute myeloid leukemia. *Cancer Cell.* 2002 Feb;1(1):63-74.
- Jiao B, Wu CF, Liang Y, Chen HM, Xiong SM, Chen B, Shi JY, Wang YY, Wang JH, Chen Y, Li JM, Gu LJ, Tang JY, Shen ZX, Gu BW, Zhao WL, Chen Z, Chen SJ. AML1-ETO9a is correlated with C-KIT

- overexpression/mutations and indicates poor disease outcome in t(8;21) acute myeloid leukemia-M2. *Leukemia*. 2009 Sep;23(9):1598-604.
- Kohrs N, Kolodziej S, Kuvardina ON, Herglotz J, Yillah J, Herkt S, Piechatzek A, Salinas Riester G, Lingner T, Wichmann C, Bonig H, Seifried E, Platzbecker U, Medyouf H, Grez M, Lausen J. MiR144/451 Expression Is Repressed by RUNX1 During Megakaryopoiesis and Disturbed by RUNX1/ETO. *PLoS Genet*. 2016 Mar 18;12(3):e1005946.
- Krejci O, Wunderlich M, Geiger H, Chou FS, Schleimer D, Jansen M, Andreassen PR, Mulloy JC. p53 signaling in response to increased DNA damage sensitizes AML1-ETO cells to stress-induced death. *Blood*. 2008 Feb 15;111(4):2190-9.
- Kumano K, Kurokawa M. The role of Runx1/AML1 and Evi-1 in the regulation of hematopoietic stem cells. *J Cell Physiol*. 2010 Feb;222(2):282-5.
- Lam K, Zhang DE. RUNX1 and RUNX1-ETO: roles in hematopoiesis and leukemogenesis. *Front Biosci (Landmark EdF)*. 2012 Jan 1;17:1120-39.
- Ley *et al.* Cancer Genome Atlas Research Network. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2013 May 30;368(22):2059-74.
- Liu Y, Cheney MD, Gaudet JJ, Chruszcz M, Lukasik SM, Sugiyama D, Lary J, Cole J, Dauter Z, Minor W, Speck NA, Bushweller JH. The tetramer structure of the Nervy homology two domain, NHR2, is critical for AML1/ETO's activity. *Cancer Cell*. 2006 Apr;9(4):249-60.
- Marneth AE, Botezatu L, Hönes JM, Israël J, Schütte J, Lams RF, Bergevoet SM, Groothuis L, Mandoli A, Lo MC, Martens JH, Huls G, Jansen JH, Dühsen U, Berg T, Möroy T, Wichmann C, Lo MC, Zhang DE, van der Reijden BA, and Khandanpour C. GFI1 is required for RUNX1/ETO positive acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2018;103(9):e395-e399.
- Martinez-Soria N, McKenzie L, Draper J, Ptasinska A, Issa H, Potluri S, Blair HJ, Pickin A, Isa A, Tirtakusuma R, Coleman D, Pal D, Nakjang S, Chin PS, Assi S, Forster V, Reza M, Law E, Berry P, Mueller D, Elder A, Veal G, Cockerill PN, Wichmann C, Vormoor J, Lacaud G, Bonifer C, Heidenreich O. The Oncogenic Transcription Factor RUNX1/ETO Corrupts Cell Cycle Regulation to Drive Leukemic Transformation. *Cancer Cell*. 2018 Oct 8;34(4):626-642.
- Maurer AB, Wichmann C, Gross A, Kunkel H, Heinzel T, Ruthardt M, Groner B, Grez M: The Stat5-RARalpha fusion protein represses transcription and differentiation through interaction with a corepressor complex. *Blood*. 2002, 99(8): 2647-52.
- Metz A, Schanda J, Grez M, Wichmann C, Gohlke H: From Determinants of RUNX1/ETO Tetramerization to Small-Molecule Protein-Protein Interaction Inhibitors Targeting Acute Myeloid Leukemia. *J Chem Inf Model*. 2013; 53, 2197-202.
- Moslem M, Eggenschwiler R, Wichmann C, Buhmann R, Cantz T, Henschler R: Kindlin-2 modulates the survival, differentiation and migration of Induced Pluripotent Stem Cell-derived Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cells Int*. 2017: 7316354. doi: 10.1155/2017/7316354.
- Mulloy JC, Cammenga J, Berguido FJ, Wu K, Zhou P, Comenzo RL, Jhanwar S, Moore MA, Nimer SD. Maintaining the self-renewal and differentiation potential of human CD34+ hematopoietic cells using a single genetic element. *Blood*. 2003 Dec 15;102(13):4369-76.
- Mulloy JC, Cammenga J, MacKenzie KL, Berguido FJ, Moore MA, Nimer SD. The AML1-ETO fusion protein promotes the expansion of human hematopoietic stem cells. *Blood*. 2002 Jan 1;99(1):15-23.
- Mulloy JC, Jankovic V, Wunderlich M, Delwel R, Cammenga J, Krejci O, Zhao H, Valk PJ, Lowenberg B, Nimer SD. AML1-ETO fusion protein up-regulates TRKA mRNA expression in human CD34+ cells, allowing nerve growth factor-induced expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Mar 15;102(11):4016-21.
- Okuda T, Cai Z, Yang S, Lenny N, Lyu CJ, van Deursen JM, Harada H, Downing JR. Expression of a knocked-in AML1-ETO leukemia gene inhibits the establishment of normal definitive hematopoiesis and directly generates dysplastic hematopoietic progenitors. *Blood*. 1998 May 1;91(9):3134-43.
- Okumura AJ, Peterson LF, Okumura F, Boyapati A, Zhang DE. t(8;21)(q22;q22) Fusion proteins preferentially bind

- to duplicated AML1/RUNX1 DNA-binding sequences to differentially regulate gene expression. *Blood*. 2008 Aug 15;112(4):1392-401.
- Peterson LF, Boyapati A, Ahn EY, Biggs JR, Okumura AJ, Lo MC, Yan M, Zhang DE. Acute myeloid leukemia with the 8q22;21q22 translocation: secondary mutational events and alternative t(8;21) transcripts. *Blood*. 2007 Aug 1;110(3):799-805.
- Peterson LF, Zhang DE. The 8;21 translocation in leukemogenesis. *Oncogene*. 2004 May 24;23(24):4255-62.
- Ponnusamy K, Chen-Wichmann L, Kuvardina ON, Lausen J, Henschler R, Wichmann C. The truncated RUNX1/ETO activates VLA-4-dependent adhesion and migration of hematopoietic progenitor cells. *Haematologica*. 2014 Dec;99(12):e253-6.
- Ponnusamy K, Kohrs N, Ptasinska A, Assi SA, Herold T, Hiddemann W, Lausen J, Bonifer C, Henschler R, Wichmann C. RUNX1/ETO blocks selectin-mediated adhesion via epigenetic silencing of PSGL-1. *Oncogenesis*. 2015 Apr 13;4:e146.
- Pons M, Reichardt CM, Hennig D, Nathan A, Kiweler N, Stocking C, Wichmann C, Christmann M, Butter F, Reichardt S, Schneider G, Heinzel T, Englert C, Hartkamp J, Krämer OH, Mahendrarajah N. Loss of Wilms tumor 1 protein is a marker for apoptosis in response to replicative stress in leukemic cells. *Arch Toxicol*. 2018 Jun;92(6):2119-2135.
- Rhoades KL, Hetherington CJ, Harakawa N, Yergeau DA, Zhou L, Liu LQ, Little MT, Tenen DG, Zhang DE. Analysis of the role of AML1-ETO in leukemogenesis, using an inducible transgenic mouse model. *Blood*. 2000 Sep ;96(6):2108-15.
- Schanda J, Chun-Wie L, Wohlan K, Müller-Kuller U, Kunkel H, Quagliano-Lo Coco I, Stein S, Metz A, Koch J, Lausen J, Medyouf H, Gohlke H, Heuser M, Eder M, Grez M, Scherr M, and Wichmann C. Suppression of RUNX1/ETO oncogenic activity by a small molecule inhibitor of NHR2 tetramerization. *Haematologica*. 2017 May;102(5):e170-e174.
- Schanda J, Henschler R, Grez M, Wichmann C: Analysis of leukemogenic gene products in hematopoietic progenitor cells. (2011) In: *Acute Leukemia: Basic Mechanisms of Leukemogenesis*. Koschmieder S & Krug U, ed. (InTech) p339-362.
- Schnittger S, Dicker F, Kern W, Wendland N, Sundermann J, Alpermann T, Haferlach C, Haferlach T. RUNX1 mutations are frequent in de novo AML with noncomplex karyotype and confer an unfavorable prognosis. *Blood*. 2011 Feb 24;117(8):2348-57.
- Schuendeln MM, Piekorz RP, Wichmann C, Lee Y, McKinnon PJ, Boyd K, Takahashi Y, Ihle JN: The Centrosomal, Putative Tumor Suppressor Protein TACC2 Is Dispensable for Normal Development, and Deficiency Does Not Lead to Cancer. *Mol Cell Biol*. 2004, 24(14): 6403–6409.
- Song J, Mercer D, Hu X, Liu H, Li MM. Common leukemia- and lymphoma-associated genetic aberrations in healthy individuals. *J Mol Diagn*. 2011 Mar;13(2):213-9.
- Spiekermann K, Hiddemann W. Molecular target structures in oncology. *Internist (Berl)*. 2005 Aug;46(8):847-8, 850-4, 856-60.
- Steffen B, Knop M, Bergholz U, Vakhrusheva O, Rode M, Köhler G, Henrichs MP, Bulk E, Hehn S, Stehling M, Dugas M, Bäumer N, Tschanter P, Brandts C, Koschmieder S, Berdel WE, Serve H, Stocking C, Müller-Tidow C. AML1/ETO induces self-renewal in hematopoietic progenitor cells via the Groucho-related amino-terminal AES protein. *Blood*. 2011 Apr 21;117(16):4328-37.
- Sun XJ, Wang Z, Wang L, Jiang Y, Kost N, Soong TD, Chen WY, Tang Z, Nakadai T, Elemento O, Fischle W, Melnick A, Patel DJ, Nimer SD, Roeder RG. A stable transcription factor complex nucleated by oligomeric AML1-ETO controls leukaemogenesis. *Nature*. 2013 Aug 1;500(7460):93-7.
- Swiers G, de Bruijn M, Speck NA. Hematopoietic stem cell emergence in the conceptus and the role of Runx1. *Int J Dev Biol*. 2010;54(6-7):1151-63.
- Thirant C, Ignacimoutou C, Lopez CK, Mouël LL, Diop M, Mouel LL, Thiollier C, Siret A, Dessen P, Aid Z, Rivière J, Rameau P, Lefebvre C, Khaled M, Leverger G, Ballerini P, Petit A, Raslova H, Carmichael CL, Kile BT, Soler E, Crispino JD, Wichmann C, Pflumio F, Schwaller J, Vainchenker W, Lobry C, Droin N, Bernard OA, Malinge S, and Mercher T: ETO2-GLIS2 hijacks transcriptional complexes to

- drive cellular identity and self-renewal in pediatric acute megakaryoblastic leukemia. *Cancer Cell*. 2017 Mar 13;31(3):452-465.
- Wichmann C, Becker Y, Chen-Wichmann L, Vogel V, Vojtkova A, Herglotz J, Moore S, Koch J, Lausen J, Mäntele W, Gohlke H, Grez M. Dimer-tetramer transition controls RUNX1/ETO leukemogenic activity. *Blood*. 2010; 116, 603-613.
- Wichmann C, Becker Y, Chen-Wichmann L, Vogel V, Vojtkova A, Herglotz J, Moore S, Koch J, Lausen J, Mäntele W, Gohlke H, Grez M. Dimer-tetramer transition controls RUNX1/ETO leukemogenic activity. *Blood* 2010a; 116, 603-613.
- Wichmann C, Becker Y, Grez M: Intracellular expression of peptides. (2009). In: Peptides as drugs. Groner B, ed. (Wiley-VCH) p103 -123.
- Wichmann C, Chen L, Heinrich M, Baus D, Pfitzner E, Zörnig M, Ottmann OG, Grez M. Targeting the oligomerization domain of ETO interferes with RUNX1/ETO oncogenic activity in t(8;21)-positive leukemic cells. *Cancer Research*. 2007; 67, 2280-2289.
- Wichmann C, Grez M, Lausen J: Molecular targeting of leukemic transcription factors: Strategies for RUNX1/ETO. *Curr Drug Targets*. 2010b; 11, 1181-91.
- Wichmann C, Quagliano-Lo Coco I, Yildiz O, Chen-Wichmann L, Weber H, Syzonenko T, Döring C, Brendel C, Ponnusamy K, Kinner A, Brandts C, Henschler R, Grez M. Activating c-KIT mutations confer oncogenic cooperativity and rescue RUNX1/ETO-induced DNA damage and apoptosis in human primary CD34+ hematopoietic progenitors. *Leukemia*. 2015 Feb;29(2):279-89.

Verzeichnis der wissenschaftlichen Veröffentlichungen

Originalarbeiten (Erst- & Letztautor):

1. Chen-Wichmann L, Shvartsman M, Preiss C, Hockings C, Windisch R, Redondo-Monte E, Leupolt G, Spiekermann K, Lausen J, Brendel C, Grez M, Greif P, **Wichmann C**: Compatibility of RUNX1/ETO fusion protein modules driving CD34+ human progenitor cell expansion. *Oncogene*. 2019, Jan;38(2):261-272. IF 6.8
2. Schanda J, Chun-Wie L, Wohlan K, Müller-Kuller U, Kunkel H, Quagliano-Lo Coco I, Stein S, Metz A, Koch J, Lausen J, Medyouf H, Gohlke H, Heuser M, Eder M, Grez M, Scherr M, and **Wichmann C**. Suppression of RUNX1/ETO oncogenic activity by a small molecule inhibitor of NHR2 tetramerization. *Haematologica*. 2017 May;102(5):e170-e174. IF 9.0
3. Ponnusamy K, Kohrs N, Ptasinska A, Assi SA, Herold T, Hiddemann W, Lausen J, Bonifer C, Henschler R, **Wichmann C**. RUNX1/ETO blocks selectin-mediated adhesion via epigenetic silencing of PSGL-1. *Oncogenesis*. 2015 Apr 13;4:e146. IF 4.5
4. **Wichmann C**, Quagliano-Lo Coco I, Yildiz O, Chen-Wichmann L, Weber H, Syzonenko T, Döring C, Brendel C, Ponnusamy K, Kinner A, Brandts C, Henschler R, Grez M. Activating c-KIT mutations confer oncogenic cooperativity and rescue RUNX1/ETO-induced DNA damage and apoptosis in human primary CD34+ hematopoietic progenitors. *Leukemia*. 2015 Feb;29(2):279-89. IF 11.7
5. Ponnusamy K, Chen-Wichmann L, Kuvardina ON, Lausen J, Henschler R, and **Wichmann C**: The truncated RUNX1/ETO activates VLA-4-dependent adhesion and migration of hematopoietic progenitor cells. *Haematologica*. 2014 Dec;99(12):e253-6. IF 9.0
6. Metz A, Schanda J, Grez M*, **Wichmann C***, Gohlke H*: From Determinants of RUNX1/ETO Tetramerization to Small-Molecule Protein-Protein Interaction Inhibitors Targeting Acute Myeloid Leukemia. *J Chem Inf Model*. 2013; 53, 2197-202. **shared corresponding & senior authorships* IF 4.0
7. Bartel Y, Grez M, and **Wichmann C**: Interference with RUNX1/ETO Leukemogenic Function by Cell-Penetrating Peptides Targeting the NHR2 Oligomerization Domain. *Biomed Res Int*. 2013; 2013:297692. doi: 10.1155/2013/297692. IF 2.7
8. **Wichmann C**, Becker Y, Chen-Wichmann L, Vogel V, Vojtkova A, Herglotz J, Moore S, Koch J, Lausen J, Mäntele W, Gohlke H, Grez M. Dimer-tetramer transition controls RUNX1/ETO leukemogenic activity. *Blood*. 2010; 116, 603-613. IF 15.1
9. **Wichmann C**, Chen L, Heinrich M, Baus D, Pfitzner E, Zörnig M, Ottmann OG, Grez M. Targeting the oligomerization domain of ETO interferes with RUNX1/ETO oncogenic activity in t(8;21)-positive leukemic cells. *Cancer Research*. 2007; 67, 2280-2289. IF 9.1

Originalarbeiten (Ko-Autor):

1. Martinez-Soria N, McKenzie L, Draper J, Ptasinska A, Issa H, Potluri S, Blair HJ, Pickin A, Isa A, Tirtakusuma R, Coleman D, Pal D, Nakjang S, Chin PS, Assi S, Forster V, Reza M, Law E, Berry P, Mueller D, Elder A, Veal G, Cockerill PN, **Wichmann C**, Vormoor J, Lacaud G, Bonifer C, Heidenreich O. The Oncogenic Transcription Factor RUNX1/ETO Corrupts Cell Cycle Regulation to Drive Leukemic Transformation. *Cancer Cell*. 2018, Oct 8; 34(4): 626-642. IF 27.4

2. Haberberger AK, Kirchner B, Riedmaier I, Henschler R, **Wichmann C**, Buhmann R and Pfaffl MW. Changes in the microRNA expression profile during blood storage. *BMJ Open Sport & Exercise Medicine*. 2018 Jul 5;4(1):e000354. doi: 10.1136/bmjsem-2018-000354. IF N/A
3. Marneth AE, Botezatu L, Hönes JM, Israël J, Schütte J, Lams RF, Bergevoet SM, Groothuis L, Mandoli A, Lo MC, Martens JH, Huls G, Jansen JH, Dührsen U, Berg T, Möröy T, **Wichmann C**, Lo MC, Zhang DE, van der Reijden BA, and Khandanpour C. GFI1 is required for RUNX1/ETO positive acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2018;103(9):e395-e399. IF 9.0
4. Pons M, Reichardt CM, Hennig D, Nathan A, Kiweler N, Stocking C, **Wichmann C**, Christmann M, Butter F, Reichardt S, Schneider G, Heinzel T, Englert C, Hartkamp J, Krämer OH, Mahendrarajah N. Loss of Wilms tumor 1 protein is a marker for apoptosis in response to replicative stress in leukemic cells. *Arch Toxicol*. 2018 Jun;92(6):2119-2135. IF 5.9
5. Thirant C, Ignacimoutou C, Lopez CK, Mouël LL, Diop M, Mouel LL, Thiollier C, Siret A, Dessen P, Aid Z, Rivière J, Rameau P, Lefebvre C, Khaled M, Leverger G, Ballerini P, Petit A, Raslova H, Carmichael CL, Kile BT, Soler E, Crispino JD, **Wichmann C**, Pflumio F, Schwaller J, Vainchenker W, Lobry C, Droin N, Bernard OA, Malinge S, and Mercher T: ETO2-GLIS2 hijacks transcriptional complexes to drive cellular identity and self-renewal in pediatric acute megakaryoblastic leukemia. *Cancer Cell*. 2017 Mar 13;31(3):452-465. IF 27.4
6. Moslem M, Eggenschwiler R, **Wichmann C**, Buhmann R, Cantz T, Henschler R: Kindlin-2 modulates the survival, differentiation and migration of Induced Pluripotent Stem Cell-derived Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cells Int*. 2017: 7316354. doi: 10.1155/2017/7316354. IF 3.7
7. Hartmann L, Dutta S, Opatz S, Vosberg S, Reiter K, Leubolt G, Metzeler KH, Herold T, Bamopoulos S, Brändl K, Zellmeier E, Ksienzyk B, Konstandin NP, Schneider S, Hopfner KP, Graf A, Krebs S, Blum H, Middeke JM, Stölzel F, Thiede C, Wolf S, Bohlander SK, Preiss C, Chen-Wichmann L, **Wichmann C**, Sauerland MC, Büchner T, Berdel WE, Woermann BJ, Braess J, Hiddemann W, Spiekermann K and Greif PA: ZBTB7A Mutations in Acute Myeloid Leukemia with t(8;21) Translocation. *Nature Communications*. 2016 Jun 2;7:11733. doi: 10.1038/ncomms11733. IF 12.3
8. Kohrs N, Kolodziej S, Kuvardina ON, Herglotz J, Yillah J, Herkt S, Piechatzek A, Salinas Riester G, Lingner T, **Wichmann C**, Bonig H, Seifried E, Platzbecker U, Medyouf H, Grez M, Lausen J. MiR144/451 Expression Is Repressed by RUNX1 During Megakaryopoiesis and Disturbed by RUNX1/ETO. *PLoS Genet*. 2016 Mar 18;12(3):e1005946. IF 7.2
9. Hennig D, Müller S, **Wichmann C**, Drube S, Pietschmann K, Pelzl L, Grez M, Bug G, Heinzel T, Krämer OH. Antagonism between granulocytic maturation and deacetylase inhibitor-induced apoptosis in acute promyelocytic leukaemia cells. *Br J Cancer*. 2015 Jan 20;112(2):329-37. IF 6.1
10. Schuendeln MM*, Piekorz RP*, **Wichmann C**, Lee Y, McKinnon PJ, Boyd K, Takahashi Y, Ihle JN: The Centrosomal, Putative Tumor Suppressor Protein TACC2 Is Dispensable for Normal Development, and Deficiency Does Not Lead to Cancer. *Mol Cell Biol*. 2004, 24(14): 6403–6409. *equal contribution IF 4.8
11. Maurer AB, **Wichmann C**, Gross A, Kunkel H, Heinzel T, Ruthardt M, Groner B, Grez M: The Stat5-RARalpha fusion protein represses transcription and differentiation through interaction with a corepressor complex. *Blood*. 2002, 99(8): 2647-52. *Plenary paper* IF 15.1

Übersichtsarbeiten:

1. Faridi F, Ponnusamy K, Quagliano I, Chen-Wichmann L, Grez M, Henschler R, and **Wichmann C**: Aberrant epigenetic regulators control expansion of human CD34+ hematopoietic stem/progenitor cells. *Front. Genet.* 2013; 28, 254. IF 4.1
2. **Wichmann C**, Grez M, Lausen J: Molecular targeting of leukemic transcription factors: Strategies for RUNX1/ETO. *Curr Drug Targets.* 2010; 11, 1181-91. IF 3.5

Buchkapitel:

1. Schanda J, Henschler R, Grez M, **Wichmann C**: Analysis of leukemogenic gene products in hematopoietic progenitor cells. (2011) In: *Acute Leukemia: Basic Mechanisms of Leukemogenesis*. Koschmieder S & Krug U, ed. (InTech) p339-362.
2. **Wichmann C**, Becker Y, Grez M: Intracellular expression of peptides. (2009). In: *Peptides as drugs*. Groner B, ed. (Wiley-VCH) p103 -123.

Patentveröffentlichungen:

1. Alexander Metz, Holger Gohlke, Julia Schanda, **Christian Wichmann**, Manuel Grez: Inhibitors of nhr2 and/or runx1/eto-tetramerization, WO2014177464A2, EU Application 2014
2. Alexander Metz, Holger Gohlke, Julia Schanda, **Christian Wichmann**, Manuel Grez: Inhibitors of nhr2 and/or runx1/eto-tetramerization, US20160108031A1, US Application 2016

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass

- die schriftliche Habilitationsleistung selbständig verfasst wurde und die Herkunft des verwendeten oder zitierten Materials ordnungsgemäß kenntlich gemacht wurde.
- mir bisher kein akademischer Grad entzogen wurde und kein Verfahren gegen mich anhängig ist, welches die Entziehung eines akademischen Grades zur Folge haben könnte.
- ich noch kein Habilitationsverfahren im gleichen Fach erfolglos beendet habe.

München, 10.02.2019

Dr. med. Christian Wichmann

Danksagung

Mein Dank gilt den Mitgliedern des Fachmentorates: Herrn Prof. Dr. Andreas Humpe, Herrn Prof. Dr. Bernhard Zwißler und Herrn Prof. Dr. Karsten Spiekermann.

Ich danke Dr. Manuel Grez, Dr. James N. Ihle und Dr. Roland Piekorz für die wissenschaftliche Anleitung im Labor. Außerdem den wissenschaftlichen Doktoranden und Diplomanden für ihren Einsatz.

Schließlich danke ich meiner Familie, vor allem meiner Frau, Dr. Linping Chen-Wichmann.