

Ressortforschungsberichte zur kerntechnischen Sicherheit und zum Strahlenschutz

Übersicht über vorhandene Tiermodelle, die für die
Leukämieforschung angewandt werden könnten
- Vorhaben 3612S70029

Auftragnehmer:

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf - Universitätsklinikum -
Klinik für Kinder-Onkologie, Hämatologie und Klinische Immunologie

A. Borkhardt
I. Sanchez-Garcia
C. Cobaleda
J. Hauer

Das Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz, Bau und
Reaktorsicherheit (BMUB) und im Auftrag des Bundesamtes für Strahlenschutz (BfS) durchgeführt.



Bundesamt für Strahlenschutz

Dieser Band enthält einen Ergebnisbericht eines vom Bundesamt für Strahlenschutz im Rahmen der Ressortforschung des BMUB (UFOPLAN) in Auftrag gegebenen Untersuchungsvorhabens. Verantwortlich für den Inhalt sind allein die Autoren. Das BfS übernimmt keine Gewähr für die Richtigkeit, die Genauigkeit und Vollständigkeit der Angaben sowie die Beachtung privater Rechte Dritter. Der Auftraggeber behält sich alle Rechte vor. Insbesondere darf dieser Bericht nur mit seiner Zustimmung ganz oder teilweise vervielfältigt werden.

Der Bericht gibt die Auffassung und Meinung des Auftragnehmers wieder und muss nicht mit der des BfS übereinstimmen.

BfS-RESFOR-102/15

Bitte beziehen Sie sich beim Zitieren dieses Dokumentes immer auf folgende URN:
urn:nbn:de:0221-2015012912274

Salzgitter, Januar 2015

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Zusammenfassung	5
Summary	6
Vorwort	7
A. Einleitung	8
A.1. Überlegungen für die Wahl eines geeigneten Tiermodells.	8
A.1.1. Genetische und ontogenetische Analogie zur humanen Pathogenese.	8
A.1.2. Möglichkeiten der Modifikation und Modulation des Genotyps.	9
A.1.3. Reproduzierbarkeit experimenteller Bedingungen.....	10
A.1.4. Experimentelle Durchführbarkeit.....	10
A.2. Bisheriger Beitrag der Forschung im Mausmodell für die Leukämieforschung.	11
A.2.1. „Proof of concept“ der Bedeutung von Onkogenen in-vivo.	11
A.2.2. Identifizierung und Charakterisierung hämatopoetischer Stammzellen.....	13
A.2.3. Beitrag der Modelle für die Entwicklung therapeutischer Ansätze.	14
A.2.4. Identifizierung und Charakterisierung der leukämischen Stammzelle.	15
B. Hauptteil	18
B.1. Klinische und biologische Besonderheiten der ALL im Kindesalter.....	18
B.1.1. Haupttypen und Charakteristika der Leukämie im Kindesalter.....	18
B.1.2. Abgrenzung der kindlichen von der erwachsenen ALL.....	20
B.2. Verfügbare Tiermodelle.	21
B.2.1. Verfügbare Tiermodelle für die AML.	21
B.2.2. Verfügbare Tiermodelle für das Myelodysplastische Syndrom.....	24
B.2.3. Verfügbare Tiermodelle für die ALL.	26
B.2.3.1. T-ALL	26
B.2.3.1.1 T-ALL nicht-murine Modelle.....	26
B.2.3.1.2. T-ALL murine Modelle.....	28
B. 2.3.1.2.1. Gentechnisch modifizierte Mausmodelle	28
B.2.3.1.2.1.1. Modelle basierend auf Proteinen mit Helix-Loop-Helix Domänen.	28
B.2.3.1.2.1.2. Modelle basierend auf Proteinen mit LIM Domänen (LMO).....	30
B.2.3.1.2.1.3. Modelle basierend auf Proteinen mit Homeodomänen.....	31
B.2.3.1.2.1.4. Modelle basierend auf repetitiven genetischen Alterationen der T-ALL.	32
B.2.3.2. B-ALL	34
B.2.3.2.1. Nicht-murine Modelle.....	34
B.2.3.2.2. Murine Modelle.....	35
B.2.3.2.2.1. Xenograft Modelle.....	35
B.2.3.2.2.2. Retrovirale Transduktions/Transplantations Modelle.....	36
B.2.3.2.2.3. Gentechnisch veränderte Mausmodelle (GEMMs).....	37
B.2.3.2.2.3.1. BCR-ABL+ Modelle.....	38
B.2.3.2.2.3.2. E2A-PBX1+ oder E2A-HLF+ Modelle.....	42
B.2.3.2.2.3.3. TEL-AML1+ Modelle.....	44

B.2.3.2.2.3.4.	MLL+ Modelle.	46
B.2.3.2.2.3.5.	„Loss-of-function“ basierte B-ALL Modelle.....	50
B.2.3.3.	Allgemeine Anmerkungen zu Modellen der ALL.....	53
B.2.4.	Neue konzeptionelle, wissenschaftliche Struktur zum Verständnis von Leukämien.....	54
B.2.4.1.	Neue Konzepte der Leukämieentstehung, - Progression, - Rückfall und Prognose.....	54
B.2.4.2.	Methoden der fortgeschrittenen Modellentwicklung.....	56
B.2.4.2.1.	Knock-in Technik.....	56
B.2.4.2.2.	Knock-out Technik.	58
B.2.4.2.3.	Konditionelle Expressionstechnik.	59
B.2.4.2.4.	Xenograftmodelle.....	60
B.2.4.3.	Vor- und Nachteile der unterschiedlichen murinen Modelle.	60
C	Diskussion	62
C.1.	Generelle Diskussion <u>verfügbarer</u> muriner Modelle einschließlich sinnvoller Optionen für weitere Verbesserungen.	62
C.2.	Diskussion noch <u>nicht verfügbarer</u> Modelle fokussiert auf die akute B-lymphoblastische Leukämie.....	65
Literatur	69

Zusammenfassung

Der Überbegriff "Leukämie" schließt eine Gruppe von Erkrankungen ein die klinisch und pathologisch sehr unterschiedlich sind. Aufgrund ihres unterschiedlichen zellulären Ursprungs, ihrer Biologie und ihrer zugrunde liegenden molekularen Alterationen sind sie durch einen sehr facettenartigen Verlauf gekennzeichnet.

Der Fokus dieses Berichtes ist es die bedeutendsten Richtlinien für die Entwicklung eines "idealen" Tiermodells zu diskutieren. Dabei sollte das Tiermodell alle klinischen, gewebspezifischen und molekulargenetischen Eigenschaften des humanen Phänotyps widerspiegeln und als klinisch prädiktives Modell einsetzbar sein. Es sollte die Anforderungen erfüllen als ein Standardmodell zu fungieren und gleichermaßen von Forschungsgruppen und Pharmaunternehmen verwendet werden können. Es sollte des Weiteren alle Kriterien für die Untersuchung des Einflusses umweltbedingter Risikofaktoren, genomischer Mutationen und die Testung von Therapeutika erfüllen. Diese Auflagen limitieren die Zweckmäßigkeit einiger experimenteller Tiermodelle, die jedoch für die Grundlagenforschung sehr erfolgreich sind. Aus diesem Grund behandeln wir in diesem Bericht für die Untersuchung der häufigsten Formen der Leukämie im Kindesalter hauptsächlich gentechnisch entwickelte murine Modelle (GEMMs). GEMMs sind robuste Modelle, die mit relativ geringer standortspezifischer Variabilität verwendet werden können und die mit Hilfe der neuesten gentechnischen Methoden an individuelle Fragestellungen adaptiert werden können. Sie bieten darüberhinaus die Möglichkeit die Onkogenexpression zeitlich und auf eine genau definierte Zielpopulation zu beschränken.

Da es aber bisher nur in Einzelfällen gelungen ist Mausmodelle zu entwickeln, die die oben genannten Anforderungen erfüllen, sollte vor allem die Entwicklung neuer regulatorischer Elemente vorrangig sein, um die Onkogenexpression gezielt steuern zu können. Diese sollten, kombiniert mit einem knock-in Ansatz ein robustes Modell darstellen, welches eine möglichst physiologische Onkogenexpression sicherstellt, folglich den humanen Phänotyp detailgetreu widerspiegelt und somit die Anforderungen an ein „ideales“ Tiermodell erfüllt.

Summary

The term “leukemia” encompasses a group of diseases with a variable clinical and pathological presentation. Its cellular origin, its biology and the underlying molecular genetic alterations determine the very variable and individual disease phenotype.

The focus of this review is to discuss the most important guidelines to be taken into account when we aim at developing an “ideal” animal model to study leukemia. The animal model should mimic all the clinical, histological and molecular genetic characteristics of the human phenotype and should be applicable as a clinically predictive model. It should achieve all the requirements to be used as a standardized model adaptive to basic research as well as to pharmaceutical practice. Furthermore it should fulfill all the criteria to investigate environmental risk factors, the role of genomic mutations and be applicable for therapeutic testing. These constraints limit the usefulness of some existing animal models, which are however very valuable for basic research. Hence in this review we will primarily focus on genetically engineered mouse models (GEMMs) to study the most frequent types of childhood leukemia. GEMMs are robust models with relatively low site specific variability and which can, with the help of the latest gene modulating tools be adapted to individual clinical and research questions. Moreover they offer the possibility to restrict oncogene expression to a defined target population and regulate its expression level as well as its timely activity.

Until recently it was only possible in individual cases to develop a murine model, which fulfills the above mentioned requirements. Hence the development of new regulatory elements to control targeted oncogene expression should be priority. Tightly controlled and cell specific oncogene expression can then be combined with a knock-in approach and will depict a robust murine model, which enables almost physiologic oncogene expression, subsequently mimics the human phenotype in detail and hence fulfills the requirements of an „ideal“ animal model.

Vorwort:

Der Überbegriff "Leukämie" schließt eine Gruppe von Erkrankungen ein die klinisch und pathologisch sehr unterschiedlich sind. Aufgrund ihres unterschiedlichen zellulären Ursprungs, ihrer Biologie und ihrer zugrunde liegenden molekularen Alterationen sind sie durch einen sehr facettenartigen Verlauf gekennzeichnet. Als Grundvoraussetzung für Ihre Behandlung und Heilung müssen wir zunächst einmal ihre Biologie verstehen und benötigen dafür den multidisziplinären Einsatz von Fachleuten aus vielen unterschiedlichen Bereichen. Um dieses Ziel zu erreichen sollten alle zur Verfügung stehenden wissenschaftlichen und technischen Möglichkeiten unterstützt und weiterentwickelt werden, denn nur durch die Kombination der Ergebnisse aus den unterschiedlichen Forschungsbereichen wird man zielführende Schlussfolgerungen ziehen können. Es ist aber dennoch eindeutig, dass unter allen, der zur Verfügung stehenden experimentellen Möglichkeiten die Verwendung von Tiermodellen mit der überzeugendste und vielversprechendste Ansatz ist. Schließlich helfen uns Tiermodelle nicht nur den Ursprung und die Evolution der Erkrankung zu verstehen, sondern auch neue Therapieoptionen zu entwickeln.

Der Fokus dieses Berichtes ist es, die bedeutendsten Richtlinien, für die Entwicklung eines "idealen" Tiermodells zu diskutieren. Dabei sollte das Tiermodell alle Anforderungen erfüllen, um als ein Standardmodell für Untersuchungen der humanen Leukämie zu fungieren und gleichermaßen von Forschungsgruppen und Pharmaunternehmen verwendet werden können. Des Weiteren muss es alle Kriterien für z.B. die Testung von Therapeutika, die Untersuchung des Einflusses umweltbedingter Risikofaktoren, oder die Untersuchung der Bedeutung von Mutationen mit niedriger Penetranz erfüllen. Diese Auflagen limitieren, in diesem Kontext, die Zweckmäßigkeit einiger experimenteller Tiermodelle, die jedoch für die Grundlagenforschung sehr erfolgreich sind. Aus diesem Grund werden wir uns in diesem Bericht hauptsächlich auf gentechnisch entwickelte murine Modelle (GEMMs) für die Untersuchung der Leukämie beschränken.

A. Einleitung

A.1. Überlegungen für die Wahl eines geeigneten Tiermodells.

A.1.1. Genetische und ontogenetische Analogie zur humanen Pathogenese.

Die Entwicklung der hämatopoetischen Stammzelle hin zur ausdifferenzierten hämatopoetischen Zelle ist einerseits abhängig von intrinsischen Faktoren wie den zeitlich exakt festgelegten Genexpressionsmustern. Andererseits spielen extrinsische Faktoren wie die Interaktion mit unterschiedlichen Zellen des Immunsystems, sowie die Umgebungsfaktoren in den hämatopoetischen und lymphatischen Organen, wie dem Knochenmark, dem Thymus, der Milz, den Lymphknoten und dem Blut eine bedeutende Rolle. Die Entwicklung von der hämatopoetischen Stammzelle zur reifen hämatopoetischen Zelle ist derartig komplex, und bisher auch noch nicht detailliert genug verstanden, sodass artifizielle *in vitro* Modelle nur sehr begrenzt über Stammzellendifferenzierung und über Leukämogenese Aufschluss geben können. Um angemessene Rückschlüsse auf die Leukämieentstehung *in vivo* ziehen zu können ist daher ein Modell, das genetisch und biologisch an der humane Pathologie anknüpft und gleichzeitig ethisch vertretbar ist unverzichtbar.

Vorteile eines *in vivo* Mausmodells zur Untersuchung der Leukämogenese sind, dass (1.) die Biologie hämatopoetischer Stammzellen in der Maus sehr der humanen Physiologie ähnelt (jedoch nicht gänzlich übereinstimmt) und zu großen Anteilen bereits erforscht ist, (2) es uns erlaubt ist hämatopoetische Differenzierung und die Selbsterneuerungskapazität als grundlegende Eigenschaften der HSZ zu verschiedenen Zeitpunkten zu untersuchen, (3) dass es möglich ist unter Verwendung unterschiedlicher Techniken das Genom der Maus zu modulieren und somit auch schwache onkogene Einflüsse zu testen, (4) dass die Zellen *in vivo* sekundären und tertiären Einflüssen ausgesetzt sind, die bisher unbekannt aber für die Leukämieentstehung von Bedeutung sind und (5.) dass der Reproduktionszyklus der Maus große Studien in einem angemessenen experimentellen Rahmen möglich

macht. Da es äußerst schwierig und ethisch oft nicht vertretbar ist hämatopoetische Vorläuferzellen aus humanem Knochenmark zu gewinnen und zu untersuchen, geschweige denn für Transplantationsexperimente zu gewinnen, kann das Mausmodell als ein vertretbares und geeignetes Modell für die Leukämieforschung fungieren.

Alternative *in vivo* Modelle wie zum Beispiel der Zebrafisch (*Danio rerio*) oder die *Drosophila* stellen durchaus geeignete Modelle für die Untersuchung der Leukämieentstehung dar. Dennoch können sie den Voraussetzungen für ein „ideales Tiermodell“ nicht standhalten, da sie die Komplexität der gesamten molekularen, zellulären, gewebsspezifischen und organischen Eigenschaften der humanen ALL nicht wiedergeben können.

Alternative *ex vivo* Modelle wie der Gebrauch von Zelllinien, welche aus Leukämiezellen generiert werden, sind niemals in der Lage das physiologische Knochenmarksmilieu wiederzuspiegeln. Derartige Zellen sind immortalisiert und repräsentieren daher nicht die physiologischen Zellpopulationen. Somit ist es nicht möglich bezüglich Differenzierung und Leukämieentstehung aus derartigen Experimenten valide Schlüsse zu ziehen. Auch verfügbare *in vitro* Differenzierungsprotokolle geben nur in sehr begrenztem Rahmen die physiologische Zelldifferenzierung wieder, da sie bezüglich Gebrauch von Zytokinen und Stromazelllinien limitiert sind.

Da die Leukämieentstehung oft multifaktoriell ist, erlauben es Mausmodelle, welche im Besonderen technisch an individuelle Anforderungen angepasst werden können, die unterschiedlichen Aspekte der Leukämie-Evolution, - Progression, - Heilung bzw. eines Rückfalls darzustellen und somit die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen zu untersuchen und klinisch prädiktive Modelle zu schaffen.

A.1.2. Möglichkeiten der Modifikation und Modulation des Genotyps.

Die Modifikation des Genotyps im Rahmen von knock-out oder knock-in Techniken, sowie die Möglichkeit in konditionellen Modellen die Expression eines Onkogens oder dessen Mutante auf eine bestimmte Zielzelle sowohl zeitlich als auch in ihrer Stärke zu beschränken, ist ein immenser Vorteil bei der Wahl des Modelles. Die

Fähigkeit das Genom zu modulieren erlaubt es neben der Untersuchung von starken Onkogenen auch die Bedeutung genetischer Mutationen mit niedriger Penetranz zu analysieren. Des Weiteren ist man so in der Lage robuste Modelle zu entwickeln, die in unterschiedlichen Laboratorien verwendet werden können, ohne mit zu großen standortspezifischen Unterschieden rechnen zu müssen.

Die Details der technischen Möglichkeiten sind unter B.2.4.2. diskutiert.

A.1.3. Reproduzierbarkeit experimenteller Bedingungen

Die Sicherstellung der Reproduzierbarkeit bestimmter experimenteller Bedingungen an unterschiedlichen Standorten ist eine entscheidende Voraussetzung für die Entwicklung eines geeigneten Tiermodells. Das Ziel soll die Entwicklung eines „idealen Modells“ sein, welches die unterschiedlichen Aspekte der humanen Erkrankung bestmöglichst wiedergeben soll. Doch um valide präklinische Antworten zu erhalten, die das Verständnis der Erkrankung und schlussendlich die Behandlungsoptionen für die Patienten verbessern, muss das Tiermodell robust genug sein, um an unterschiedlichen Standorten eingesetzt werden zu können.

Um diese Bedingung zu erfüllen ist ein stabiler genetischer Hintergrund notwendig. Experimente und somit auch Ergebnisse, die auf retroviraler Transduktion, oder Xenotransplantationsmodellen beruhen sind aufgrund der standortspezifischen unterschiedlichen experimentellen Bedingungen nur unzureichend vergleichbar (unter B.2.4.2. detailliert ausgeführt). Dahingegen liefern Modelle die auf stabilen knock-in, knock-out oder konditionellen Techniken beruhen, ein genetisch robustes System, welches relativ einfach an unterschiedlichen Standorten eingesetzt werden kann und somit eine valide Reproduzierbarkeit ermöglicht.

A.1.4. Experimentelle Durchführbarkeit.

Die Herausforderung bei der Entwicklung eines „idealen Tiermodells“ ist es einerseits, die humane Erkrankung in allen ihren Stadien widerzuspiegeln, während es andererseits gleichzeitig auch bestimmten technischen, zeitlichen und wirtschaftlichen Rahmenbedingungen unterliegt. Zum Beispiel müssen die Modelle in einem bestimmten zeitlichen Rahmen ihre Pathologie entwickeln, um solide

Ergebnisse zu liefern, die den aktuellen Stand der Forschung bestätigen und voranbringen.

Ebenso sind finanzielle Aspekte zu beachten. Speziell wenn man an Großversuche im Rahmen der Medikamententestung denkt ist die Wahl des geeigneten Tiermodells von Interesse. Ebenso müssen bei der Verwendung des Modells an verschiedenen Standorten (z.B. Forschungsinstituten, Kliniken und Pharmaunternehmen) die unterschiedlichsten finanziellen Ressourcen bedacht werden. In diesem Rahmen sind neben Tierhaltungs-, Bestrahlungs- und Nachbetreuungskosten auch z.B. Protokolle zur Vorselektionierung von Stammzellen bei kostenintensiven Transplantationsexperimenten zu nennen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Maus als Tiermodell viele dieser Voraussetzungen erfüllt. Ihr Genom ist zu einem hohen Prozentsatz dem des Menschen homolog und die Leukämie Modelle ähneln zumindest in Teilaspekten sehr der humanen Erkrankung. Für das Mausmodell existieren verschiedenen Möglichkeiten das murine Genom zu manipulieren und robuste GEMMs zu erschaffen. Zusätzlich ist der Reproduktionszyklus der Maus geeignet um Experimente in einem zeitlich adäquaten Rahmen durchzuführen und in den meisten Tierversuchsanstalten sind Haltungsmöglichkeiten für Mäuse gegeben.

A.2. Bisheriger Beitrag der Forschung im Mausmodell für die Leukämieforschung.

A.2.1. „Proof of concept“ der Bedeutung von Onkogenen in-vivo.

Das Gebiet der Krebsforschung war bisher einer der Bereiche, in denen die Verwendung von gentechnisch veränderten Mäusen wissenschaftlich einen enormen Fortschritt gebracht hat. Die Technologie, genetisch veränderte Mäuse zu entwickeln („transgene Tiere“), die ein fremdes kloniertes Gen tragen, war zu Beginn der 1980er Jahre bereits etabliert (Brinster et al., 1981; Costantini and Lacy, 1981; Gordon et al., 1980; Wagner et al., 1981). Zu diesem Zeitpunkt wurde auch die Entdeckung und Klonierung des ersten viralen Onkogens beschrieben, gefolgt von der Entdeckung weiterer zellulärer Onkogene (Malumbres and Barbacid, 2003). Diesen Genen wurde eine direkte Beteiligung an der humanen Krebserkrankung zugeschrieben, da sie in

der Lage sind kultivierte Zellen zu transformieren und nach Injektion in geeignete Empfängertiere Tumore zu induzieren. Gleichzeitig bestand das bedeutendste experimentelle Modell der Krebsforschung darin Zelllinien, die aus humanen oder murinen Tumoren stammten, entweder in der Zellkultur zu kultivieren oder in immundefiziente Empfängertiere zu transplantieren damit sie dort als solide Tumore anwachsen konnten. Es war jedoch eindeutig, dass das Potential dieser Modelle nicht ausreichte, um die Ursprünge der humanen Krebserkrankungen zu untersuchen und zu erklären. Diese Gegebenheit veranlasste viele Gruppen dazu transgene murine Modelle zu entwickeln, die bekannte Onkogene exprimieren. Die erste Veröffentlichung eines tumorsuszeptiblen transgenen Mausmodells wurde 1984 publiziert, und zeigte, dass transgene Tiere die das SV-40 T-Antigen tragen Tumore entwickeln (Brinster et al., 1984). Kurz darauf folgten weitere Modelle: Em-Myc transgene Modelle zeigten konsistent die Entstehung von pre-B- und reifen B-Zelllymphomen (Adams et al., 1985); *MMTV-Myc* transgene Mäuse entwickelten Tumore der Brustdrüse (Stewart et al., 1984); die ektope Überexpression des c-fos Onkogens induzierte Osteosarkome (Ruther et al., 1989); die Expression des SV-40 Virusonkogens führte zur Entstehung von beta-Zelltumoren des Pankreas, wenn seine Expression von der Insulin-regulatorischen Sequenz kontrolliert wurde (Hanahan, 1985). All diese Ergebnisse unterstützen eindeutig die Hypothese, dass eine deregulierte Expression von Onkogenen zur Tumorentstehung führen kann. Einige Jahre später, im Jahre 1992, untermauerte die Technologie der Knock-out Modelle diesen Ansatz indem sie zeigte, dass der Verlust von Tumorsuppressorgenen in Knock-out Tieren zur Krebsentstehung führen kann, wodurch die Hypothese der Zweitmutation von Knudson bestätigt wurde (diskutiert in (Jacks, 1996)).

Die oben aufgeführten Modelle stellten zu diesem Zeitpunkt technisch und wissenschaftlich gesehen einen Kraftakt dar, und zeigten, dass aus dem Mausmodell gewonnene Erkenntnisse für den Fortschritt der Krebsforschung unabdingbar sind. Auf der einen Seite da nur die Maus ein Modell darstellt, das adäquat die Komplexität wiedergibt die notwendig ist die humane Erkrankung zu reproduzieren. Auf der anderen Seite kamen durch die Trial-and-Error-Methode und im Zuge der Entwicklung dieser Modelle viele neue Erkenntnisse ans Licht, die den molekularen

Wirkmechanismus der Onkogenaktivierung und seine Bedeutung innerhalb der komplexen Biologie der Krebserkrankung zeigten (Hanahan et al., 2007).

A.2.2. Identifizierung und Charakterisierung hämatopoetischer Stammzellen.

Die Identifizierung der Zelle, die den Ursprung der gesamten hämatopoetischen Linien darstellt war nur möglich, da man Mäuse als experimentelle Modelle verwenden konnte. Die klassischen Untersuchungen von Till und McCulloch zeigten zum einen, dass es im Knochenmark von Mäusen eine Population klonaler hämatopoetischer Zellen gibt, die nach Transplantation in der Milz von bestrahlten Empfängern anwachsen und Millionen von Zellen hervorbrachten, die allen Zelllinien im Blut zugeordnet werden konnten. Ebenso waren einige dieser Zellen in der Lage sich selbst zu erneuern und die Hämatopoese aufrechtzuerhalten. Schlussendlich, jedoch ebenso wichtig, zeigten diese Untersuchungen durch das Zählen, der in der Milz gebildeten Kolonien, dass die Hämatopoese quantifiziert werden kann (Becker et al., 1963; Siminovitch et al., 1963; Till and Mc, 1961; Wu et al., 1967, , 1968). Durch diese Ergebnisse konnten die grundlegenden Eigenschaften von HSZ beschrieben werden, deren Gültigkeit damals wie heute unumstritten ist: hohe Selbsterneuerungskapazität, Proliferation und eine multipotente Differenzierungskapazität.

Nach der Entwicklung des *in vivo* „Colony-forming-assays“ war einige Jahre später auch der *in vitro* „Colony-forming-assay“ verfügbar (Bradley and Metcalf, 1966; Metcalf, 2008). Obwohl sich diese *in vitro* Methoden in vielerlei Hinsicht für die Erforschung der hämatopoetischen Entwicklung als enorm nützlich erwiesen, waren sie für die Identifizierung (und Erhaltung) der Zellen mit Selbsterneuerungspotential nicht sehr geeignet. Initial zeigten Separationsmethoden, die auf dem Prinzip der Zentrifugation basierten, dass Zellen, die innerhalb bestimmter Kolonien Selbsterneuerungskapazität besitzen (basierend auf der Ausbildung von spleen colony-forming-units, CFU-s) aus dem zellulären Bulk einer Kolonie selektioniert werden können. Dies zeigte, dass die Separation von hämatopoetischen Zellen, die sich in ihrer Selbsterneuerung unterscheiden mit Hilfe physikalischer Methoden möglich ist (Worton et al., 1969). Die Entwicklung der Durchflusszytometrie (FACS) (Bonner et al., 1972) war ein weiterer technischer Fortschritt, der die Aufreinigung

von Zellen, basierend auf ihren Oberflächenmarkern möglich machte. Die Zellen, die auf diese Weise aufgereinigt wurden, konnten mit Hilfe verschiedener Techniken *in vitro* oder über Injektion in Empfängertiere *in vivo* auf ihre Differenzierungskapazität in die unterschiedlichen hämatopoetischen Zelltypen untersucht werden. Sukzessive Verbesserungen in der Kombination aus Antikörpern und intrazellulären Färbungen sowie ausgeklügelten Separierungsprotokollen erlaubten es desweiteren Populationen, die für bona fide, langzeitrekstituierende murine hämatopoetische Stammzellen hoch angereichert waren zu selektionieren (diskutiert in (Weissman and Shizuru, 2008)).

Durch die kontinuierliche Weiterentwicklung dieser grundlegenden Methoden, war man nur wenige Jahre später in der Lage auch humane HSZ aufzureinigen. Dafür waren allerdings neue Methoden notwendig, die es erlaubten die Langzeitrekstitution in einem experimentellen Modell *in vivo* darzustellen. Mit diesem Ziel wurden SCID-Hu Mäuse, basierend auf SCID oder NOD-SCID Tieren, entwickelt in denen Zellen aus humanen fetalen hämatopoetischen Organen (fetalem Thymus, fetalem Knochen oder Knochenmark, Milz, Leber oder Lymphknoten) anwachsen konnten (McCune et al., 1988). Unter Verwendung dieses Systems konnten humane HSZ, sowie die verschiedenen zellulären Zwischenstufen und Progenitorzellen aufgereinigt werden, was einmal mehr die außerordentliche Bedeutung der Maus für die medizinische Forschung auf dem Gebiet der Hämatopoese zeigte. Dies war nicht nur für das Verständnis der Organisation des hämatopoetischen Systems, sondern auch für die Identifizierung spezifischer humaner Populationen mit einer genau definierten funktionellen Eigenschaft von besonderer Relevanz.

A.2.3. Beitrag der Modelle für die Entwicklung therapeutischer Ansätze.

Eine der bedeutendsten Errungenschaften in der Maus und auf dem Gebiet der klinischen Hämatologie, war die Entwicklung der Knochenmarkstransplantation für die Behandlung von unterschiedlichen hämatopoetischen Erkrankungen, insbesondere von Leukämien. In den 50er Jahren konnte gezeigt werden, dass Zellen aus dem murinen Knochenmark gegenüber letalen Bestrahlungsdosen protektiv wirken und sie darüber hinaus alle Zelllinien des peripheren Blutes in den

Empfängertieren nachbilden können (Ford et al., 1956; Lorenz et al., 1951). Inspiriert von diesen Ergebnissen fand 1956 die erste humane Knochenmarkstransplantation statt (Thomas et al., 1957). Ein Patient, der an einer Leukämie erkrankt war wurde mit einer hohen Dosis Ganzkörperbestrahlung gefolgt von der Infusion von Knochenmarkszellen seines eineiigen Zwillings behandelt. Das Transplantat wuchs zwar an, und von diesem Standpunkt aus gesehen war die Behandlung erfolgreich, jedoch verstarb der Patient wenig später aufgrund eines Rückfalls an der Leukämie (Storb, 2012). Nichtsdestotrotz konnte, dank vieler Bemühungen und Experimente, die sowohl humane, murine und andere Modellsysteme (wie den Hund) einschlossen, der zugrunde liegende Mechanismus der Transplantation, der Spender-gegen-Empfänger Erkrankung sowie der Spender-gegen-Leukämie Effekt erklärt werden. Seither kann humanes Knochenmark dazu verwendet werden Immundefizienzsyndrome und Leukämien durch Transplantate von Knochenmarkspendern zu heilen (Buckner et al., 1970; Gatti et al., 1968; Storb, 2012).

Dies sind gute Beispiele dafür, wie die Information, die bisher aus Mausmodellen gewonnen wurde relativ einfach und mit großer Bedeutung für die Behandlung der Patienten auf die Humanmedizin übertragen werden kann.

A.2.4. Identifizierung und Charakterisierung der leukämischen Stammzelle.

Ohne das Ziel zu haben in diesem Abschnitt den wissenschaftlichen Hintergrund und die Rationale, der Theorie der Krebsstammzelle zu betonen ist es dennoch wichtig zu unterstreichen, dass von einem historischen Standpunkt aus gesehen, die Identifizierung der Krebsstammzelle (für die Leukämie und für viele andere Tumorentitäten) nur möglich war, da Mäuse als Forschungsmodell verwendet wurden. Auf Grund all der theoretischen und technischen Entwicklungen, die bereits kurz in den vorherigen Abschnitten ausgeführt wurden und die sich auf die Identifizierung der HSZ beziehen, ist es allgemein bekannt, dass Tumore heterogene Gewebe sind. Seit 1937 weis man aus Transplantationsexperimenten von murinen Krebszelllinien in Mäuse, dass eine einzelne Zelle ausreichen kann, um das Heranwachsen eines Tumors auszulösen (Furth and Kahn, 1937). Jedoch gab es eine große Variabilität hinsichtlich der Frequenz der Zellen innerhalb des Tumors, die das Wachstum des Tumors anstoßen konnten (Bruce and Van Der Gaag, 1963;

Hewitt, 1958; Makino, 1956). Für Jahrzehnte war das Konzept der zellulären Heterogenität in Tumoren das Thema intensiver Forschung (detailliert diskutiert in (Dick, 2008)) und besonders auf dem Gebiet der Leukämien, wurde klar, dass die Hauptmasse des Tumors hauptsächlich aus postmitotischen Zellen aufgebaut war, die kontinuierlich aus einer kleinen Fraktion sich teilender Zellen genährt wurde. Trotz der zunehmenden Anhäufung von Beweisen (1950s bis fast 1990s) wurde die Theorie der Leukämienstammzelle über viele Jahre hinweg weder von der medizinischen noch der wissenschaftlichen Gemeinschaft akzeptiert. Es brauchte Zeit die Konzepte, die aus den Untersuchungen über physiologische Stammzellbiologie (wie zuvor beschrieben) hervorgingen auf die Onkologie zu übertragen. Nochmals kam hier der entscheidende Fortschritt durch die Durchflusszytometrie in Kombination mit neuen verbesserten Ansätzen für die Transplantation von aufgereinigten humanen leukämischen Subpopulationen in Mäuse, wie es bereits im Rahmen der Identifizierung physiologischer HSZ durchgeführt wurde. Die bahnbrechenden Publikationen aus der Dick Gruppe fassen die Meilensteine der experimentellen Ansätze und teils kontroversen Ergebnisse aus unterschiedlichen Gruppen über viele Jahre zusammen und zeigen unter anderem, dass die akute myeloische Leukämie hierarchisch organisiert ist und aus einer primitiven hämaopoetischen Zelle entspringt (Bonnet and Dick, 1997; Lapidot et al., 1994).

Obwohl immer noch viele Aspekte geklärt werden mussten, war die Validität dieser Ergebnisse unumstritten, und kurz darauf folgten eine große Anzahl an Publikationen, die ähnliche murine transplantations-basierte experimentelle Ansätze verwendeten. Die Existenz der Krebsstammzelle wurde darauffolgend in fast jeder Art der humanen Krebserkrankung untersucht (diskutiert in (Sanchez-Garcia et al., 2007)).

Auch in diesem Fall war die Verwendung von Mausmodellen grundlegend daran beteiligt einen Impuls zu geben, die Forschung auf dem Gebiet der Krebsstammzelle voranzutreiben. Allerdings sind wir noch nicht am Ende angelangt. Die Theorie von der Krebsstammzelle wird aktuell von der breiten Masse akzeptiert und ihre Bedeutung (für beide Bereiche, die Medizin und die Wissenschaft) ernst genommen. Ein bedeutender Aspekt ist, dass die meisten aktuellen Tiermodelle der Krebserkrankung entworfen wurden ohne die Theorie der Krebsstammzelle zu

berücksichtigen. Dies führte in der großen Mehrheit der Modelle dazu, dass viele der Charakteristiken der humanen Tumore in der Maus nicht detailgetreu wiedergegeben wurden (diskutiert in (Vicente-Duenas et al., 2010b)). Daher ist es der nächste Schritt Modelle zu generieren, die auf der Theorie der Krebsstammzelle beruhen. Die neuesten Modelle haben diese Prämisse bereits berücksichtigt und haben gezeigt, dass es in der Tat möglich ist die humane Erkrankung wiederzuspiegeln und darüber hinaus sogar das Ansprechen einer Therapie vorherzusagen (diskutiert in (Vicente-Duenas et al., 2010a)). Die Theorie der Krebsstammzelle kann die Biologie der humanen Tumore, zumindest in der Maus, erklären und begründet, dass die Forschung in der Maus für den Fortschritt in der Medizin und wenn man es etwas weiter fasst für die gesamte Menschheit unheimlich wertvoll ist. Wie bereits Charles Darwin sagte: "I know that physiology cannot possibly progress except by means of experiments on living animals, and I feel with the deepest conviction that he who retards the progress of physiology commits a crime against mankind" (Life and Letters of Charles Darwin, 1959. Francis ed. New York : Basic Books, Inc., 382-383).

B. Hauptteil

B.1. Klinische und biologische Besonderheiten der ALL im Kindesalter.

B.1.1. Haupttypen und besondere Charakteristika der Leukämie im Kindesalter.

Im Kinderkrebsregister werden seit 1980 95% aller Krebserkrankungen im Kindesalter registriert. In der Altersgruppe von ein bis vier Jahren dominieren bei den Krebserkrankungen mit 43% deutlich die Leukämien. In der Altersgruppe der fünf bis neun- jährigen bestimmen die Leukämien zusammen mit Malignomen des zentralen Nervensystems und der Lymphome dreiviertel der Krebserkrankungen. Insgesamt stellen die Leukämien mit 33,8% der malignen Erkrankungen im Kindesalter die bedeutendste Kohorte dar.

Die akute lymphatische Leukämie (ALL) der unter 15 Jährigen umfasst 33,8% der malignen Erkrankungen mit einer Inzidenz von 3,3/100.000. Der Median der Erkrankung liegt bei 4,7 Jahren mit einer Knabenwendigkeit von 1,2/1. Die akute myeloische Leukämie (AML) ist die zweithäufigste akute Leukämie im Kindesalter mit einer Häufigkeit von 15% und einer Inzidenz von 0,7/100.000 in der Altersgruppe der unter 15 Jährigen, während der Median mit 7,9 Jahren zu verzeichnen ist. Dahingegen sind chronische Leukämien im Kindesalter extrem selten. Die chronische myeloische Leukämie (CML) tritt mit einer Häufigkeit von 0,7% auf, die chronische lymphatische Leukämie (CLL) tritt praktisch nicht auf. Das myelodysplastische Syndrom (MDS), kann einer AML vorrausgehen und ist mit einer Inzidenz von 0,1/100.000 ebenfalls eine Rarität.

Zusammenfassend stellt die akute lymphatische Leukämie die größte Gruppe der Krebserkrankungen im Kindesalter dar.

Die aktuelle Datenlage geht davon aus, dass es bei der ALL Entstehung im Kindesalters zu einem prädisponierenden Ereignis kommt und im Verlauf zu weiteren Ereignissen, welche die manifeste Leukämie propagieren. Das prädisponierende Ereignis kann eine spontane somatische Mutation sein, oder eine präexistente

Keimbahnmutation. Spontane somatische Mutationen können entweder als Mosaik oder ausschließlich in der hämatopoetischen Zelle auftreten.

Für die Beschreibung funktionell relevanter Mutationen kam in den letzten Jahren dem Next Generation Sequencing (NGS) ein besonderer Stellenwert zu. Erstmals ist es möglich das gesamte Genom oder das Exom einer Zellpopulation auf strukturelle Veränderungen und Single Nucleotid Polymorphisms (SNPs) hin zu untersuchen. Basierend auf diesen Daten konnten bisher zahlreiche genomische Abberationen mit einer Prädisposition für das spätere Auftreten einer Leukämie in Verbindung gebracht werden. SNPs in dem Transkriptionsfaktor Pax5 treten z.B. in 32% der akuten lymphoblastischen Leukämien auf (Mullighan et al., 2007). Die bekanntesten und am Besten untersuchten strukturellen Aberrationen sind Translokationen. Die häufigste Translokation der ALL ist t(12;21)(p13;q22), welche in einem TEL/AML1 Fusionsprotein resultiert (Wiemels et al., 1999). Ein in utero Geschehen scheint bei dieser Leukämieentität bewiesen (Greaves, 2006; Greaves and Wiemels, 2003; Hong et al., 2008; Maia et al., 2003; Wiemels et al., 2008). Eine Zwillingsstudie konnte zeigen, dass z.B. in einer Familie eineiige Zwillinge mit molekulargenetisch demselben chromosomalen Bruchpunkt zeitversetzt an einer Translokation t(12;21)(p13;q22) positiven ALL erkrankten (Ford et al., 1998). Ähnliche Studien existieren für die MLL/AF4 Translokation. Die in utero Präexistenz präleukämischer Klone wird zusätzlich von Arbeiten von Mori et al unterstützt. Diese Arbeiten zeigen, dass die pränatale Präsenz von Fusionsgenen TEL/AML1 (ALL) oder AML/ETO (AML) um ein vielfaches höher ist als die Wahrscheinlichkeit im späteren Leben an einer manifesten Leukämie zu erkranken (Mori et al., 2002). Diese Daten stützen die Hypothese, dass neben einem prädisponierenden Ereignis weitere Ereignisse notwendig sind, um eine manifeste Leukämie entstehen zu lassen.

Zusätzlich spielen für die Leukämieentstehung im Kindesalter genetisch bedingte Syndrome, vor allem prädisponierende Genominstabilitätssyndrome, eine besondere Rolle. Hier ist die Trisomie 21 als bekannteste Erkrankung mit einem erhöhten Leukämierisiko zu nennen. Weitere Erkrankungen sind z.B. die Neurofibromatose, das Fanconi-Syndrom oder das Bloom Syndrom.

Basierend auf einer präexistenten genetischen Prädisposition kommt es im Laufe des Lebens zu einem oder mehreren weiteren Ereignissen, (Schmiegelow et al.) welche die präformierte Zelle der Kontrolle des Immunsystems entzieht. Mögliche

Folgen davon sind eine unkontrollierten Proliferation und eine manifeste Leukämie. Die Ursachen sind bisher unbekannt und in epidemiologischen Studien zum Teil kontrovers diskutiert. Mögliche modulierende Faktoren sind Infektionen, Strahlung, Chemikalien oder Ernährungsfaktoren (Buffler et al., 2005; Kinlen, 2004).

Bestimmte und gut untersuchte genomische Aberrationen sind klinisch für die Risikostratifizierung und Wahl der geeigneten Therapie von besonderer Bedeutung. Auf diese Weise konnte in den letzten Jahrzehnten die Therapie optimiert und das Gesamtüberleben dramatisch verbessert werden. Zukünftige Ziele sind jedoch nicht nur das Überleben weiterhin zu verbessern, sondern ebenso und dies gilt in besonderem Maße im Kindesalter, die therapieassoziierten Spätschäden durch gezielte Therapiereduktion zu minimieren. Dies hat sowohl für die Lebensqualität der Patienten als auch aus ökonomischer Sicht einen besonders hohen Stellenwert. Die Kenntnis genetischer Aberrationen und ihr Beitrag für die Entstehung einer Leukämie, sowie ihre Auswirkung auf die Stammzellbiologie sind folglich von besonderer Bedeutung.

B.1.2. Abgrenzung der kindlichen von der erwachsenen ALL.

Für die Unterscheidung von kindlichen und adulten Leukämien ist es zunächst wichtig zu berücksichtigen, dass es für Krebserkrankungen im Erwachsenenalter kein überregionales Krebsregister gibt und somit keine flächendeckende Dokumentation existiert. Dies ist vor allem auf Datenschutzgründe zurückzuführen. Verlässliche Zahlen gründen sich auf das „Kompetenznetz Leukämien“. Dieses Projekt stützt seine Zahlen wiederum auf Schätzungen basierend auf dem größten amerikanischen Krebsregister „Surveillance Epidemiology and EndResults“ (SEER), den lokalen deutschen Krebsregistern sowie den Daten des Robert Koch Instituts.

Somit ergeben sich für die Inzidenzen der Leukämien im Erwachsenenalter Hochrechnungen für die CLL mit 3/100.000, die AML 2,5/100.00, die CML mit 2/100.000 und die ALL mit 1,5/100.000. Während die ALL im Erwachsenenalter im Vergleich zum Kindesalter (ALL 3,5/100.000; AML 0,7/100.000, CML Rarität, CLL nicht vorhanden) unterrepräsentiert ist, gehören chronische Leukämien und die AML im Erwachsenenalter zu den führenden Leukämieentitäten.

Ebenso finden sich Unterschiede hinsichtlich molekulargenetischer Charakteristika (Toft et al.). In der Kohorte der B-lymphoblastischen Leukämien ist die Translokation t(9;22) (q34;q11) im Erwachsenenalter mit 20-40% häufig vertreten, im Kindesalter jedoch mit 5% selten (Gleissner et al., 2002; Ribeiro et al., 1987). Die bekannteste und häufigste Translokation t(12;21)(p13;q22) im Kindesalter kommt zu 20% vor, im Erwachsenenalter jedoch nur zu ca. 3% (Greaves and Wiemels, 2003). Ebenso unterscheidet sich das Langzeitüberleben der Patienten mit B-lymphoblastischer Leukämie deutlich mit 95% im Kindesalter und 60-85% im Erwachsenenalter (Teitell and Pandolfi, 2009).

An diesen Daten lässt sich schon erahnen, dass auch die Ätiologie bzw. die Bedeutung ALL prädisponierender Faktoren im Erwachsenen- und im Kindesalter unterschiedlich gewichtet sind. Es ist anzunehmen, dass intrauterine Geschehen wie das Auftreten bestimmter Translokationen ebenso wie bestimmte prädisponierende Syndrome für die Entstehung der kindlichen Leukämien bedeutender sind. Für das Auftreten von Leukämien im Erwachsenenalter und damit einhergehender somatischer Mutationen steht sehr wahrscheinlich die Exposition gegenüber exogenen Noxen im Vordergrund.

Zusammenfassend ist die Bedeutung genetischer Prädispositionen für die Leukämieentstehung im Kindesalter von besonderer Bedeutung. Die Risikostratifizierung und die Wahl der geeigneten Therapie ist besonders von den molekulargenetischen Charakteristika abhängig. Somit ist die Wahl eines geeigneten präklinischen Modells von besonderer Bedeutung. Es muss zum einen die Anforderung der genetischen Modifikation besitzen als auch die humane Pathologie bestmöglich widerspiegeln.

B.2. Verfügbare Tiermodelle.

B.2.1. Verfügbare Tiermodelle für die akute myeloische Leukämie.

Die akute myeloische Leukämie ist im Kindesalter erheblich seltener als im Erwachsenenalter. Ebenfalls unterscheiden sich die Art und die Häufigkeit der

chromosomalen Aberrationen in den unterschiedlichen Altersgruppen. Änderungen in der Anzahl der Chromosomen, wie beispielsweise die Monosomie 7 sind schwer im Tiermodell nachzustellen. Mutationen in einzelnen Genen, welche Onkogene, Zellzyklusregulatoren etc. betreffen sind sehr selektiv und betreffen eine sehr kleine Patientenkohorte. Chromosomale Translokationen erlauben im Gegensatz dazu eine molekulargenetische Einteilung der unterschiedlichen AML Formen mit Auswirkung auf Risikostratifizierung und Therapiewahl. Im Folgenden sind die häufigsten Translokationen wie sie bei der AML vorkommen, mit ihrer unterschiedlichen Verteilung im Kindes- und Erwachsenenalter dargestellt.

Alter	Kinder und Jugendliche	Erwachsene
	< 15	16-93
Anzahl	318	337
Chromosomale Abberation	73%	53%
Trisomie Chr. 8	23,0%	
11q23	22,0%	
t(8;21)	9,0%	3,9%
inv 16	6,2%	2,0%
Monosomie 7/7q	5,2%	
t(15;17)	3,8%	3,3%
Referenz	(Forestier et al., 2003)	(Preis et al., 2003)

Tabelle 1: Häufigkeit der gängigen chromosomalen Translokationen bei der AML im Erwachsenen- und Kindesalter.

Wie zuvor erwähnt ist die AML im Kindesalter eher unterrepräsentiert und somit werden im Folgenden exemplarisch ausgewählte Tiermodelle der häufigsten molekulargenetischen Kohorten dargestellt, welche die MLL – Translokation (11q23), die AML1-ETO - Translokation t(8;21) und die PML-RAR α Translokation t(15;17) positive AML betreffen.

Generell sind zahlreiche Tiermodelle für die Untersuchung der Leukämien und somit auch der AML bekannt. Die Pioniere unter den murinen Tiermodellen waren chemisch induzierbare Modelle, sowie virale Modelle in denen über Insertionsmutagenese oder Integration des MuLV (Murines Leukemia Virus)

erkrankungsrelevante Onkogene identifiziert werden konnten. Die zweite Generation stellten bereits genetisch veränderte Mausmodelle dar (GEMMs), welche einen großen Beitrag zur Beschreibung der Pathologie definierter AML assoziierter genetischer Variationen leisteten und immer noch leisten. Diese Gruppe an Tiermodellen wird kontinuierlich verbessert und gründet auf unterschiedlichen Methoden von Knock-out, Knock-in bis hin zu konditionellen Modellen mit gewebsspezifischer Expression von Transgenen. Parallel und überlappend werden allogene Knochenmarkstransplantationsmodelle entwickelt, welche die virale Transduktion von hämatopoetischen Zellen (HSZs) aus der Maus beinhalten und zu sogenannten Knochenmarkschimären führen.

So existieren für die MLL-, PML/RAR- und AML1/ETO positive AML zahlreiche Modelle, welche je nach Fragestellung nur einen bestimmten Teilaspekt der humanen Erkrankung widerspiegeln.

Modell	Chromosomale Fusion	Fusionsprodukt	Trangener-promoter	Expressionskompartiment	Präleukämische Phase	Erkrankung
Transduktion	t(10;11)	MLL-AF10		Knochenmark	NB	AML (100%) (DiMartino et al., 2002)
Transduktion	t(11;19)	MLL-ENL		HSC, CMP, GMP	NB	AML (100%) Blasten in der Milz, Organinfiltration (Cozzio et al., 2003)
Transduktion		MLL-ENL		Knochenmark Thy-1lo Sca-1+ H-2Kki	NB	AML (47%) unreife myeloische Zellen
Transduktion		AML1-ETO		Stemzellen	Eosinophilie	Nicht beobachtet (de Guzman et al., 2002)
Transduktion	t(8;21)	AML1-ETO		Fetale Leber	Anämie, Leukozytose, Kachexie	AML ohne Ausreifung (100%) (Yan et al., 2006)
Transduktion		AML1-ETO				
Transduktion	t(15;17)	PML-RAR α	Knochenmark lineage negative Zellen	NB	APL (81%) Splenomegalie, Hepatomegalie, Knochenmarksinfiltration, promyelozytäre Lymphadenomegalie (Minucci et al., 2002)	
Transduktion		PML-RAR α	PML-RAR α transgenes Knochenmark	NB	APL (100%) ähnlicher Phänotyp der transgenen Tiere jedoch mit Leukozytose. Positive Antwort auf ATRA (Sohal et al., 2003)	
Transgen	t(15;17)	PML/RAR α	hCG	Promyelozyten	Akkumulation	APL (10-30%) (Grisolano et al., 1997)
Transgen			hMRP8	Frühe myeloische und monozytäre Zellen und während myeloider Differenzierung	Reduzierte neutrophile Granularität und niedrige Gr-1 Antigenexpression	APL (5%) (Brown et al., 1997)
Transgen			CD11b	Granulozyten	Verminderung der myeloischen Progenitoren	0% (Early et al., 1996)

Tabelle 2: Darstellung verfügbarer muriner Modelle für die MLL-ENL, die AML1-ETO und die PML-RAR α induzierte AML, sowie deren Unterschiede hinsichtlich des Phänotyps.

Eindrücklich zeigen die aufgeführten Modelle, dass trotz gleichem Onkogen, je nach verwendetem Promoter, seiner zellspezifischen und zeitlichen Aktivität, die Inzidenz der Erkrankung sowie die Charakteristika der Erkrankung erhebliche Unterschiede aufweisen. Unterschiede bezüglich des Phänotyps sind auch auf die Verwendung unterschiedlicher Techniken zurückzuführen. Dies wird anhand der aufgeführten Beispiele in Tabelle 2 besonders im Vergleich der Knochenmarkstransplantationsmodelle im Gegensatz zu den transgenen

Mausmodellen deutlich. Diese Modelle sind folglich hervorragend geeignet, um definierte Aspekte der Biologie der Erkrankung zu untersuchen, die für die Grundlagenforschung von Bedeutung sind. Die klinische Relevanz bleibt jedoch zu einem großen Teil kontrovers diskutiert, insbesondere inwieweit die Modelle und deren Ergebnisse auf große Populationen übertragbar sind oder in großen Therapieversuchen eingesetzt werden können.

Xenograftmodelle existieren ebenfalls für die AML. Hier wurde aus historischer Sicht der Beginn mit Nude Modellen eingeleitet, gefolgt von stetiger Verbesserung, den SCID - Modellen, bis hin zu den NOG Modellen. Ebenso wurde versucht das Engraftment durch die Verbesserung der Umgebungsfaktoren zu optimieren. Die Expression von Interleukin 3 (IL3), steel factor oder GM-CSF führen z.B. zu besserem Engraftment und einem bis zu sechsfachen Anstieg der Leukämie Stammzellen (LSC) (Feuring-Buske et al., 2003). AML Zellen wachsen in NODSCID Modellen besser an als in SCID Modellen, jedoch schlechter als ALL Proben wobei ein hoher Anteil an CD34+CD38- Zellen von Vorteil zu sein scheint (Lee et al., 2007). Xenograftmodelle zeigen jedoch starke Limitationen, die unter B 2.4.2.4. detailliert diskutiert sind und aus diesem Grunde in diesem Abschnitt nicht ausführlicher dargestellt werden (McCormack et al., 2005, , 2008).

Zusammenfassend adressieren die verfügbaren murinen Modelle, die für die Untersuchung der AML zur Verfügung stehen, nur Teilaspekte hinsichtlich ihrer klinischen Präsentation oder molekulargenetischen Besonderheiten.

B.2.2. Verfügbare Tiermodelle für das Myelodysplastische Syndrom.

Im Gegensatz zur AML, bei der die Myeloproliferation im Vordergrund steht, wird das Myelodysplastische Syndrom (MDS) als eine klonale Erkrankung der HSZ, ineffektiver Hämatopoese, periphere Blutzytopenie, morphologisch dysplastischer Zellularität und einer Suszeptibilität für die Entstehung einer AML verstanden (Malcovati and Nimer, 2008).

Ein weiterer bedeutender Unterschied besteht darin, dass chromosomale Translokationen selten sind. Im Folgenden werden Mausmodelle, welche den Einfluss dreier bedeutender MDS assoziierter Gene adressieren diskutiert. Diese wurden ausgewählt, da sie den Phänotyp der humanen Erkrankung am besten

wiederspiegeln. Verwendet wurden hier unterschiedliche Techniken, die ebenfalls die individuellen technischen Herausforderungen und die Interpretation der Ergebnisse beeinflussen. Es handelt sich um ein *Evi1* Transplantationsmodell, ein Nucleophosmin (*NPM1*) Hetero-Mausmodell und *NUP98/HOXD13* transgenes Modell.

Die häufigste wiederkehrende strukturelle Aberration ist die *inv(3)(q21q26)*, welche zu konstitutiver *EVI1* Aktivierung führt (Haase et al., 2007). *EVI1* per se ist auch in anderen Konstellationen an der Entwicklung des MDS beteiligt, nämlich als strukturelle Variation im Rahmen der Translokation *t(3;21)*. Patienten mit dieser Auffälligkeit zeigen eine aggressive Transformation mit Blastenkrise (Maki et al., 2008). Weiterhin kann eine einfache *EVI1* Überexpression ohne zugrunde liegende strukturelle Aberration bestehen (Russell et al., 1994; Zoccola et al., 2003). Die Bedeutung der *Evi1* Überexpression wurde in einem murinen Transplantationsmodell gezeigt. Die retrovirale Überexpression von *Evi1* in hämatopoetischen Zellen führte klinisch zu den Zeichen eines MDS, jedoch kam es nicht zur Progression in eine AML (Buonamici et al., 2004). Das relativ späte Auftreten des MDS Phänotyps könnte daraufhin deuten, dass eine zweite Mutation notwendig ist den Phänotyp auszubilden. Diese könnte durch die Insertionsmutagenese, welche in diesem Modell durch die viralen Integrationsstellen unvermeidbar ist entstanden sein.

Das auf Chromosom 5 lokalisierte *Npm1* ist ein weiteres relevantes Gen welches den *p53/Arf* tumour suppressor Signalweg reguliert. Deletionen des Chromosom 5 treten in 30% der Patienten mit MDS auf (Haase et al., 2007). *NPM1* ist darüberhinaus an Translokationen beteiligt und es werden *NPM1* Mutationen in 35% der AML beschrieben (Grisendi et al., 2005). *Npm1*^{-/-} Tiere versterben während der Embryonalphase, die heterozygoten Tiere jedoch zeigen einen MDS ähnlichen Phänotyp im Alter von 6-18 Monaten.

NUP98 ist häufiger Translokationspartner von Hox-Genen und somit an AML, MDS und CML beteiligt. Das *Nup98/Hoxa13* transgene Mausmodell zeigt einen Phänotyp, welcher mit der klinischen Präsentation des humanen Phänotyps vereinbar ist, einhergehend mit peripherer Zytopenie, Knochenmarksaplasie, Apoptose und der Progression zur AML (Lin et al., 2005). Ein ebenfalls für die Expression desselben Fusionsproteins entwickeltes Knochenmarkstransplantationsmodell zeigt jedoch einen abweichenden Phänotyp mit Anämie, Lymphopenie und sekundärer

Myeloproliferation in einer kleinen Gruppe der Tiere (Komeno et al., 2009; Pineault et al., 2003).

Zusammenfassend sind mindestens drei murine Modelle, welche den humanen Phänotyp zu relativ großen Teilen widerspiegeln vorhanden. Diese basieren auf unterschiedlichen Techniken und sind damit in ihrem Phänotyp untereinander divergent. Das Problem des Datenvergleichs aus unterschiedlichen Modellen wird hier am Vergleich des *Nup98/Hoxa13* transgenen - und des Knochenmarkstransplantationsmodelles deutlich.

B.2.3. Verfügbare Tiermodelle für die akute lymphatische Leukämie.

B.2.3.1. T-ALL

B.2.3.1.1 T-ALL nicht-murine Modelle

Das hämatopoetische System wurde bereits in vielen gängigen Modellen sehr gut charakterisiert. Die beiden bedeutendsten Modelle sind der Zebrafisch (*Danio rerio*) und *Drosophila* (Jing and Zon, 2011; Jung et al., 2005). Die Lymphdrüse von *Drosophila* kann als ein Modell der hämatopoetischen Entwicklung genutzt werden, jedoch ist seine Ähnlichkeit bezogen auf die humanen Zellpopulationen limitiert. *Drosophila* ist, für sich selbst gesehen, ein unheimlich starkes System, um genetische und molekulare Interaktionen zwischen den an der Leukämie beteiligten Genen zu untersuchen. Die Ergebnisse und Schlussfolgerungen aus diesem System können in vielen Fällen auf die homologen Gene bei Vertebraten übertragen werden (normalerweise existiert mehr als ein homologes Vertebratengen für jedes Gen der Fliege). Diesbezüglich ist es ein sehr potentes System, jedoch sind die Möglichkeiten die humane Leukämie gänzlich darzustellen sehr limitiert, insbesondere da richtige Krebserkrankungen in der Fliege nicht vorkommen.

Der Zebrafisch bietet wichtige Vorteile für die Untersuchung der hämatopoetischen Entwicklung und deren molekularer Mechanismen (Teittinen et al., 2012). Eine der bedeutendsten Eigenschaften dieses Modellorganismus ist es (in diesem Kontext für den hämatopoetischen Phänotyp), dass er für Mutageneseuntersuchungen mittels

„forward genetics“ besonders geeignet scheint. Jedoch ist heutzutage auch die präzise “reverse genetics” im Zebrafisch möglich. Die Proteinexpression kann entweder im Embryo durch Morpholino antisense Oligonukleotide oder konstitutiv durch die Verwendung von Zink-Finger Endonukleasen moduliert werden (Payne and Look, 2009). Das erste Leukämiemodell das im Zebrafisch entwickelt wurde war ein Modell für die T-ALL, induziert durch die transgene Expression von MYC unter der Kontrolle des *rag* Promoters (Langenau et al., 2003). Leukämien, die im Thymus entstehen disseminieren in die Kiemen, das retro-orbitale Gewebe, den Skelettmuskel und die abdominalen Organe. Nach der Injektion in bestrahlte Fische können sich die Leukämiezellen erneut im Thymus ansiedeln. Um jedoch die frühe Letalität, die durch die Erkrankung ausgelöst wird zu umgehen, wurde ein induzierbares Modell entwickelt in dem dem *rag2*-EGFP-mMyc Transgen ein Stop-Kodon vorgeschaltet wurde, welches von Lox-p Sites umgeben war. Im Anschluss wurde Cre RNA in die Embryos injiziert und somit Myc Expression induziert. Der Hitzeschock induzierbare Promoter *hsp70* wurde verwendet, um die Cre Expression zu initiieren und besser kontrollieren zu können (und somit auch das Onkogen) (Feng et al., 2007; Langenau et al., 2005). Die *hsp70*-Cre wurde induziert indem man den Fisch auf 37°C für 45 Minuten erhitzte. Dieses System führte zur Entwicklung einer ALL in > 80% der transgenen Fische. Während Myc Expression in all diesen Beispielen zur Entwicklung von T-Zell Lymphomen/Leukämie im Zebrafisch führte ist sie im Menschen normalerweise mit B-Zell Erkrankungen assoziiert. Ein Modell der Notch-induzierten T-ALL wurde ebenfalls im Zebrafisch generiert indem eine konstitutiv aktive Form von Notch unter der Kontrolle des *rag2* Promoters eingebracht wurde. Die Mosaikgründerfische entwickelten nach 5 Monaten Leukämien, während stabile transgene Linien eine längere Latenz von ungefähr 11 Monaten zeigten.

Generell sind Zebrafischmodelle für die Identifizierung von kooperierenden Zweitmutationen in „forward genetics“ Mutageneseuntersuchungen sehr nützlich. Mit der Einführung von hocheffizienten genomischen Technologien und der Kapazität das vollständige Genom von Krebspatienten zu sequenzieren, wurde die Entdeckung von Mutationen, die zur Erkrankung und präziser noch zu allen ihren unterschiedlichen Stadien beitragen, sehr viel einfacher und hat diese aufwendigen Mutageneseuntersuchungen in den Hintergrund gedrängt. Andererseits, auch wenn

man die vielen Gemeinsamkeiten des hämatopoetischen Systems des Zebrafisches mit dem der Vertebraten in Betracht zieht, machen diese relevanten Unterschiede das Modell ungeeignet alle Aspekte der humanen Erkrankung zu reproduzieren. Als ein Beispiel ist zu nennen, dass der Zebrafisch ein doppeltes Genom besitzt. Diese biologische Tatsache macht den Zebrafisch als Modell für die ALL weniger interessant, da chromosomale Zugewinne und Verluste sehr wichtige Ereignisse im Rahmen der Leukämieentstehung beim Menschen sind.

B.2.3.1.2. T-ALL murine Modelle.

B. 2.3.1.2.1. Gentechnisch modifizierte Mausmodelle

B.2.3.1.2.1.1. Modelle basierend auf Proteinen mit Helix-Loop-Helix Domänen.

Die häufigsten Mutationen, die bei der T-ALL gefunden werden sind Alterationen in Proteinen, die die ursprüngliche Helix-Loop-Helix Domäne (bHLH) beinhalten. Sie können im Rahmen einer Translokation unter der Kontrolle des T-Zell-Rezeptor (TZR) Lokus oder aber auch auf eine andere Art und Weise dereguliert sein. Eines der häufig beteiligten Gene ist TAL1. Es ist in bis zu 25% der T-ALL Fälle konstitutiv aktiviert, obwohl es nur in 3% dieser Fälle unter die Kontrolle des TZR Lokus transloziert ist (Carroll et al., 1990). In den verbleibenden Fällen wird es von dem 5' vorgeschalteten Gen SIL kontrolliert. Viele Anläufe wurden unternommen, um eine führende Rolle von TAL1 für die T-ALL selbst im Mausmodell zu zeigen. Transgene Mäuse, die TAL1 unter der Kontrolle des CD2 Enhancers exprimieren entwickeln trotz hoher Tal1 Expression keine T-ALL (Robb et al., 1995). Ähnliche Ergebnisse gehen aus retroviralen Knochenmarkstransplantationsexperimenten hervor (Elwood and Begley, 1995). Die Expression unter der Kontrolle des Ly6E.1 Lokus beeinträchtigt die T-Zell Differenzierung, jedoch induziert es keine Leukämie (Goardon et al., 2002). Es existieren aber Berichte, die nahe legen, dass wenn Tal1 unter der Kontrolle des Ick regulatorischen Elements exprimiert ist, 80% der Tiere T-Zell Lymphome entwickeln und diese exazerbieren, wenn die Tiere in einen p53-/- Hintergrund gekreuzt werden (Condorelli et al., 1996). Ebenso steigt die Inzidenz der Leukämien in CD2-Tal1 transgenen Tieren, wenn sie mit N-Ras oder p53-/- Mutationen kombiniert werden (Curtis et al., 1997). Diese Ergebnisse legen nahe,

dass in diesen Ansätzen entweder die falsche Zielzelle erreicht wurde oder/und zusätzliche Ereignisse notwendig sind, um die Leukämie auszulösen. So konnte gezeigt werden, dass die ektopen Expression von TAL1 in jungen Tieren zur T-ALL Entstehung führen kann, wenn Sie mit der Expression anderer Gene, wie der Casein Kinase IIa (CKIIa) (Kelliher et al., 1996) oder der Überexpression der bHLH Proteine LMO1 oder LMO2 (Aplan et al., 1997; Herblot et al., 2000; Larson et al., 1996) oder auch durch den Funktionsverlust des *Ink4/arf* Locus (Fasseu et al., 2007; Shank-Calvo et al., 2006) einhergehen. Die Anwesenheit von zwei definierten T-ALL assoziierten Mutationen, wie der ektopen Expression von TAL1 und LMO1 führt zur Entstehung von T-ALLs. Zusätzlich zu der eingefügten Mutation werden in diesen Tumoren Mutationen in den Genen Notch1 oder in Genen, die den pre-T-Zell-Rezeptor Signalweg betreffen gefunden. Dies ist ähnlich dem, was man beim Menschen beobachten kann (Tremblay et al., 2010). Ein konditionelles Modell der genomischen Fusion von SIL-TAL1 wurde entwickelt indem man von einem BAC Klon ausging, der beides, das SIL und SCL Gen enthielt. Im Anschluss wurden loxP Stellen in das Intron 1 beider Gene inseriert und zwar an den Seiten an denen bei T-ALL Patienten die Rekombination stattfindet. Auf diesem Weg wurden SIL-lox-lox-SCL Tiere generiert (Cheng et al., 2007), die danach mit Lck-Cre Tieren gekreuzt wurden. Diese Tiere zeigten eine beeinträchtigte T-Zell Entwicklung jedoch nicht die Entstehung einer T-ALL (Cheng et al., 2007). Eine Leukämie entwickelte sich erst nach der Kreuzung der Tiere mit einem LMO1 Transgen (Chervinsky et al., 1999). Der onkogene Einfluss der ektopen TAL1 Überexpression auf die Entstehung der humanen T-ALL ist von seiner Eigenschaft abhängig als dominant negatives Protein die Transkription anderer bHLH Proteine wie E2A oder HEB zu beeinflussen. Aufgrund dieser Annahme wurden murine Modelle generiert, in denen die Transgene Expression von TAL1 mit dem Verlust dieser Proteine kombiniert wurde. In der Tat führte in diesen Tieren der heterozygote Verlust von *E2a* oder *Heb* zur Akzeleration der Erkrankung (O'Neil et al., 2004).

Ein weiteres bHLH Protein, welches an der T-ALL Entstehung beteiligt ist, ist LYL1. Ein transgenes Modell der ektopen Überexpression, in dem LYL1 unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven *Elongationsfaktor 1 alpha* Promoters steht, führte bei den Mäusen zu Krebserkrankungen mit einem Lymphomanteil von 30% (T und B) (Zhong et al., 2007). Diese Ergebnisse zeigten eine breite tumorigene Kapazität von LYL1

(eventuell auch stimuliert durch den konstitutiven Promoter), was durch die Tatsache unterstützt wird, dass *LYL1* ebenfalls in anderen haematopoetischen Krebserkrankungen exprimiert ist.

B.2.3.1.2.1.2. Modelle basierend auf Proteinen mit LIM Domänen (LMO).

Die aberrante Expression von LMO1 und LMO2 wurde in bis zu 40% der T-ALL Fälle, entweder in der An- oder Abwesenheit von chromosomalen Translokationen, detektiert. Die direkte ursächliche Bedeutung, die diese Proteine für die T-ALL spielen wurde nur zufällig im Menschen bestätigt. Vier von 11 Patienten, die zur Behandlung des X-chromosomal gekoppelten kombinierten Immundefekts mit einem Gentherapieprotokoll behandelt wurden entwickelten durch die Integration des therapeutischen Vektors in den *LMO2* Locus eine T-ALL (Hacein-Bey-Abina et al., 2003).

Findet die Expression des Transgens gezielt im T-Zell Kompartiment statt indem man den *lck* Promoter verwendet entwickeln die Tiere unreife aggressive T-Zell Leukämien/Lymphome. Die Inzidenz der Tumore ist dabei proportional zur Höhe der LMO1 Expression (McGuire et al., 1992). Die Expression unter der Kontrolle der CD2 regulatorischen Sequenz führt in einem kleinen Anteil der transgenen Tiere mit variabler Latenz zur Tumorentstehung (Fisch et al., 1992). In anderen Berichten entwickeln hingegen LMO1 oder LMO2 transgene Mäuse nach einer relativ langen Latenz (>8 Monate) sporadisch T-ALLs (Larson et al., 1994). Weitere Analysen dieser Tiere und der Mäuse aus dem CD2-Lmo2 Modell verdeutlichen, dass die Tiere vor der Entwicklung der Erkrankung eine präleukämische Phase zeigen, die durch die Akkumulation doppelt negativer (DN) Thymozyten charakterisiert ist. Darüberhinaus induziert Lmo2 die Selbsterneuerung von T Zellen in der Maus, begleitet von der Expression verschiedener Gene, die charakteristisch für hämatopoetische Stammzellen (HSZ) sind. Diese Beobachtungen legen nahe, dass Lmo2 ein HSZ-spezifisches Transkriptionsprogramm reaktiviert (Cleveland et al., 2013; McCormack et al., 2010).

Die Expression des *LMO2* Gens unter der Kontrolle des breit exprimierten Metallothionein Promoters führt in ungefähr 15% der transgenen Mäuse zur

Entstehung von Thymustumoren. Die Tumore entstehen mit einer langen Latenz und der Leukämie geht ein LMO2-induzierter Arrest der normalen T-Zell-Differenzierung voraus, der durch die Expansion einer dominant-negativen (DN) Thymozytenpopulation gekennzeichnet ist (Neale et al., 1997). Zusammengefasst, zeigen all diese ektopen Modelle der LMO Proteinexpression einen Synergismus mit der Expression von Tal1 und dies hat im Vergleich zu den bisher erwähnten Modellen eine geringere Latenz der Leukämie/Lymphomentstehung zur Folge (Aplan et al., 1997; Chervinsky et al., 1999; Larson et al., 1996).

B.2.3.1.2.1.3. Modelle basierend auf Proteinen mit Homeodomänen.

Gene, die ein Homeobox-Motiv tragen gehören zu einer großen Gruppe transkriptioneller Regulatoren, die in HOX Genkluster und seltene HOX Gene kategorisiert werden können. Die *HOX11/TLX1* oder *HOX11L2/TLX3* Onkogene sind transloziert und aberrant in 30-35% der kindlichen T-ALLs und in bis zu 35% der erwachsenen T-ALLs exprimiert (De Keersmaecker et al., 2010). Einige retrovirale Transplantations-/Transduktionsmodelle zeigen, dass diese Gene in der Tat eine Leukämie in der Maus auslösen können (Hawley et al., 1994; Hawley et al., 1997; Su et al., 2006). Die Anzahl der GEMMs, die die Funktion dieser Gene adressieren ist limitiert. Das bedeutendste Modell beinhaltet die Expression von HOX11 unter der Kontrolle der LCK regulatorischen Sequenz in Thymozyten (De Keersmaecker and Ferrando, 2011; De Keersmaecker et al., 2010). Diese *LCK-HOX11* transgenen Mäuse entwickeln klonale T-ALL Tumore mit einer mittleren Latenz von 6 Monaten und einer Penetranz von mehr als 90%. Darüberhinaus gehen der Tumorentstehung schwere Veränderungen in der Thymusentwicklung mit reduzierter Thymusgröße, Gewicht und Zellularität auf Grund erhöhter Apoptose und einem Differenzierungsarrest zum frühesten Zeitpunkt der Thymozytendifferenzierung, voraus (De Keersmaecker and Ferrando, 2011; De Keersmaecker et al., 2010). Die lange Latenz und die klonale Expression des TZR in diesen Tieren zeigt die Notwendigkeit sekundärer Mutationen für die Leukämieentstehung. Die Suche nach diesen Alterationen führte zu der Identifizierung von kooperierenden Genen wie *Notch1*, *Pten*, *Trp53*, *Cdkn2a/Cdkn2b* oder *Bcl11b*. Diese Ergebnisse zeigen die Parallelität dieses Modells zur Entstehung und Progression der humanen T-ALL.

Kürzlich wurde ein konditionelles, Doxyzyklin-reguliertes Mausmodell der *Lck-HOX11* getriebenen T-ALL entwickelt (Rakowski et al., 2011). Diese Mäuse zeigen nach 5-7 Monaten T-ALLs mit einer Penetranz von 15-60%. Ähnlich der humanen T-ALLs vom HOX11+ Typ waren die Leukämien im kortikalen Stadium der T-Zellentwicklung arretiert und akquirierten aktivierende NOTCH1 Mutationen. Interessanterweise war der inhibitorische Effekt, wenn NOTCH oder HOX11 supprimiert waren nur transient und die Leukämien konnten sich im Verlauf dieser Inhibition entziehen (Rakowski et al., 2011).

B.2.3.1.2.1.4. Modelle basierend auf anderen repetitiven genetischen Alterationen der humanen T-ALL.

Wie wir im Rahmen der Beschreibung der bisherigen Modelle gesehen haben benötigt man für die Entwicklung von GEMMs für die T-ALL, damit sie möglichst detailgetreu die humane Situation widerspiegeln, die Anwesenheit von mehr als einer genetischen Modifikation (z.B. die Expression von mehr als einem Onkogen, welches mit der humanen T-ALL in Verbindung gebracht wird). Von diesem Standpunkt aus gesehen und ähnlich dem, was für die humane Erkrankung beschrieben ist, kristallisiert sich aus Genexpressionsprofilen die Existenz einer limitierten Anzahl gut beschriebener molekularer Gruppen der T-ALL heraus. Diese einzigartigen molekulargenetischen T-ALL Subtypen werden durch unterschiedliche genetische Läsionen definiert von denen wir in den vorausgegangenen Abschnitten die Wichtigsten beschrieben haben (Aifantis et al., 2008; Van Vlierberghe and Ferrando, 2012; Van Vlierberghe et al., 2008). Dennoch wird dies durch die Überlagerung einer Anzahl von zusätzlich wiederkehrenden genetischen Alterationen, die bei allen Subtypen gleich sind, kompliziert. Diese sind verantwortlich für die Deregulation spezifischer zellulärer Prozesse, wie z.B. die Zell-Zyklus Signalwege, Wachstum und Proliferation, der Umbau von Chromatin, die T-Zelldifferenzierung, die Selbsterneuerung etc. Sie beinhalten eine Plethora von Genen aus verschiedenen Kategorien und in den meisten Fällen haben sie zusätzlich bedeutende Funktionen außerhalb des T-Zellkompartiments. Für die meisten dieser Mutationen gilt, dass es sich um inaktivierende Mutationen handelt (Van Vlierberghe and Ferrando, 2012). Da Knock-out Mäuse für den Großteil dieser Gene bereits verfügbar sind, muss ihr relativer Beitrag zur T-ALL individuell

untersucht werden. Dies muss ebenso in Kombination mit Modellen erfolgen, die auf einem Funktionszugewinn, der mit der T-ALL assoziierten Onkogene beruhen.

Sich wiederholende genetische Alterationen, die im Zusammenhang mit der humanen T-ALL beschrieben sind, betreffen in mehr als 50% aktivierende Mutationen von NOTCH1 (Weng et al., 2004). Die NOTCH Proteine sind essentielle Regulatoren der hämatopoetischen Progenitorzellen, die den schlussendlichen T-Zellphänotyp determinieren. Ihr Funktionsverlust führt zu direkten Veränderungen der zellulären Entwicklung, wie sie bei der T-ALL beobachtet werden. Die Untersuchungen der molekularen Mechanismen der NOTCH Funktion bzgl. lymphatischer Entwicklung und Tumorgenese sind ein Bereich der Wissenschaft, der wahnsinnig viel Literatur hervorgebracht hat, einschließlich vieler Experimente die auf retroviraler Transduktion und anschließender Transplantation von murinen Knochenmarkszellen beruhen. Allerdings sind diese Ergebnisse außerhalb des Fokus dieses Berichtes. Sieht man sich die Ergebnisse aus den GEMMs an, die entwickelt wurden, um die Bedeutung der NOTCH Genen für die T-ALL Entwicklung zu untersuchen, liegt es vor allem an den vielfältigen Charakteristika des NOTCH Signalweges, die es schwierig machen zuverlässige murine Modelle mit ektopter Überexpression zu entwickeln. Und dennoch, transgene Tiere, die eine intrazelluläre Form von NOTCH3 unter der Kontrolle des *lck* Promoters exprimieren entwickeln innerhalb von 6-8 Wochen aggressive und transplantierbare T-Zell Lymphome (Bellavia et al., 2000; Bellavia et al., 2002). Dies steht im Gegensatz zu der ektopten Expression der intrazellulären Form von NOTCH1, die, obwohl sie Veränderungen der normalen T-Zell Entwicklung auslöst, nicht zur Tumorentstehung führt (Robey et al., 1996). Wie wir bereits angeführt haben gibt es unzählbar viele Beispiele an Knochenmarkstransduktions/-transplantationsexperimenten, die die leukämogenen Eigenschaften der NOTCH Proteine im T-Zell Kompartiment zeigen. Diese wurden durch das spontane Auftreten von Notch Mutationen in humanen T-Zell Tumoren bestätigt (O'Neil et al., 2006; Tosello and Ferrando, 2013). Ein wichtiger Aspekt, den man jedoch in Betracht ziehen muss, wenn man in der Maus die Bedeutung von Notch für die humane T-ALL darstellt, ist die Tatsache, dass die humane und murine Erkrankung immer auf der Ligand-unabhängigen Aktivierung von *Notch1* begründet ist. Diese Aktivierung wird durch etliche molekulare Alterationen in zwei verschiedenen Systemen erreicht und zeigt bedeutende Unterschiede auf, wenn man

neue therapeutische Ansätze entwickelt, die auf diesen Signalweg abzielen (Ashworth et al., 2010).

B.2.3.2. B-ALL

Tiermodelle der humanen B-ALL sind essentiell, jedoch noch unzureichend verfügbar. Diese Systeme sollten es uns erlauben die Prozesse, die zur Entstehung der humanen B-ALL führen zu analysieren und sollten neues Licht auf die noch ungelöste Frage werfen inwieweit Umweltfaktoren für die Entwicklung der B-ALL von Bedeutung sind. Tiermodelle stellen ein Werkzeug dar, um die Ursache der Malignität zu bestimmen und neue Behandlungsoptionen zu entwickeln. Sie eröffnen eine immense Quelle mit großem Potential für die medizinische Onkologie. Ziel ist es in der Lage zu sein die kompletten molekularen, zellulären, gewebsspezifischen und organischen Aspekte der humanen B-ALL in der Maus nachzustellen, einschließlich der Initiation, Progression, Evolution, dem Therapieansprechen und eventuell der Heilung oder dem Rückfall. Die Modelle sollten ähnliche histologische Charakteristika wie die, die in der humanen Krebserkrankung beobachtet werden zeigen. Des Weiteren sollten sie dieselben Stadien durchlaufen, dieselben systemischen Effekte hervorrufen, dieselben molekulargenetischen Signalwege betreffen, die für Tumorentstehung und Progression bedeutend sind und dieselbe Antwort auf therapeutische Ansätze zeigen. Dennoch zeigen alle Modelle der B-ALL, die bisher beschrieben sind, verschiedene Einschränkungen in Ihrer Fähigkeit die humane B-ALL Erkrankung widerzuspiegeln.

B.2.3.2.1. Nicht-murine Modelle.

Es existiert ein Modell der B-ALL in dem die TEL-AML1 Translokation in den Zebrafisch eingebracht wurde und seine Expression der Kontrolle der regulatorischen Sequenzen des Xenopus Elingationsfaktors 1 (XEF) und des Zebrafisch β -Aktin (ZBA) unterliegt. Dies sind beides Promotoren die die Genexpression in allen zellulären Kompartimenten steuern können. Ebenso wurde der lymphozyten-spezifische Promoter *rag1* verwendet (Sabaawy et al., 2006). Die Expression, ausgehend von dem ubiquitären Promoter, verursachte mit niedriger

Penetranz und langer Latenz eine prä-B-ALL die im Zebrafisch das homologe CD10 Antigen exprimierte. Dies legt die Notwendigkeit einer zweiten Mutation nahe. Eine Blockierung der lymphatischen Differenzierung zwischen dem pro- und pre-B Zell Stadium wurde in den *xef-TEL-AML1* Tieren gesehen. Fische die TEL-AML1 über den *rag2* Promoter exprimierten entwickelten keine Leukämie, was bereits andeutet, dass sich die ALL nur ausbilden kann, wenn TEL-AML1 zu dem Zeitpunkt der noch undifferenzierten multipotenten Progenitoren exprimiert ist (Sabaawy et al., 2006).

B.2.3.2.2. Murine Modelle.

B.2.3.2.2.1. Xenograft Modelle.

Bis vor Kurzem hat man versucht den Ursprung der Leukämie zu untersuchen, indem man aufgereinigte Subpopulationen (potentielle Leukämie initiiierende Zellen) von humanen B-ALL Zellen in immundefiziente Tiere injizierte. Dieser technologische Ansatz ist für die Darstellung der hierarchischen Struktur der humanen B-ALL Erkrankung sehr nützlich. Xenograft basierte B-ALL Modelle haben viele Daten generiert und gezeigt, dass Zellen, die von humanen B-ALL Proben abstammen verantwortlich für die Erhaltung und Ausbreitung der humanen B-ALL sind (Castor et al., 2005; Cobaleda et al., 2000; Cox et al., 2004; Hong et al., 2008; Hotfilder et al., 2002; Hotfilder et al., 2005).

Ein großes Defizit dieser Modelle ist es jedoch sie zwischen unterschiedlichen Laboratorien zu standardisieren und somit eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sicherzustellen (Cobaleda and Sanchez-Garcia, 2009). Nichtsdestotrotz deuten neueste Ergebnisse aus Xenograftmodellen daraufhin, dass in den B-ALL Populationen leukämie-iniziiierende Zellen existieren (le Viseur et al., 2008; Rehe et al., 2013). Die stetige Verbesserung der experimentellen Bedingungen (Injektionsstelle, Einstellungen für die Selektion der Zellen, Vorbehandlung der Empfänger mit spezifischen Antikörpern etc.) führte zu einer gesteigerten Effizienz der injizierten Zellen und schlussendlich dazu, dass sich der Tumor im Empfänger erneut ausbilden konnte. Die notwendige Bestrahlung der Empfängertiere vor Injektion der transduzierten Zellen mit gamma Strahlung (2-9 Gy) stellt ein weiteres Problem dar. Dies ist besonders für die Untersuchung des Beitrags des Stromas für die Tumorevolution von Relevanz. Ebenso ist es mit dieser Methode schwierig die

den Beitrag verschiedener Umweltfaktoren (besonders elektromagnetische Felder) für die B-ALL im Kindesalter zu untersuchen.

B.2.3.2.2.2. Retrovirale Transduktions/Transplantations Modelle.

Auf Grund der genannten Limitationen der Xenograftmodelle benötigt man weitere Ansätze um die B-ALL in einem geeigneten Modell darzustellen. Eine Möglichkeit ist die Insertion (normalerweise durch retrovirale Transduktion) der humanen Translokationen in entweder humane oder murine Vorläuferzellen (oder in einem weniger optimalen Experiment in Zelllinien), um sie dann in Mäuse zu injizieren und ihre Entwicklung zu untersuchen. Dieses Modell besitzt den eindeutigen Vorteil, dass die Einschränkungen, die Xenograftmodelle auf Grund der Immundefizienz der Empfängertiere besitzen, umgangen werden können. Die virale Transduktion von ALL-assoziierten Onkogenen in murine Progenitorzellen, gefolgt von der Reinjektion in die Empfängertiere ist ein schneller und relativ einfacher Weg die Bedeutung der Onkogene für verschiedene Aspekte der Leukämieentwicklung zu analysieren. Außerdem bietet es einen schnellen „read out“ um z.B. die leukämogenen Eigenschaften unterschiedlicher Onkogene, oder die Unterschiede verschiedener spezifisch mutierter Formen eines bestimmten Onkogens, auf die Ausprägung des Phänotyps hin zu untersuchen. Dieser Ansatz erlaubt es unser Wissen über die Biochemie und die molekulare Wirkungsweise von Onkogenen enorm zu steigern. Es gibt eine große Anzahl an Publikationen, die die unterschiedlichen Aspekte der Biologie der Onkogene beschreiben. Ebenso, von einem etwas anderen Standpunkt aus gesehen kann retroviral basierte Insertionsmutagenese zur Identifikation von Genen führen, die für die Leukämieentstehung bedeutend sind (Kustikova et al., 2007; Modlich et al., 2009). In jedem Falle zeigen sich große Probleme hinsichtlich der Reproduzierbarkeit und Homogenität der Ergebnisse zwischen verschiedenen Laboratorien. Diese sind hauptsächlich auf drei Gründe zurückzuführen: Erstens, wir können die Zielzelle nicht kontrollieren, zweitens ist die virale Integration per se bereits leukämogen, und drittens muss die Empfängermaus vor Injektion der transduzierten Zellen bestrahlt werden. Dies macht diese Modelle wiederum für die Untersuchung verschiedener Umgebungsfaktoren und die Bedeutung des Stromas für die B-ALL unpraktisch. Aus diesem Grunde ist ihr Potential für groß angelegte

Versuche zwischen unterschiedlichen Laboratorien begrenzt, obwohl sie sehr nützlich für die Grundlagenforschung sind.

Am Beispiel der Translokation t(12;21) assoziierten B-ALL, konnte gezeigt werden, dass trotz der Untersuchung in unterschiedlichen experimentellen Modellen (Andreasson et al., 2001) TEL-AML1 selbst nicht in der Lage ist in Zelllinien ein unabhängiges Wachstum zu induzieren. In einer anderen Studie (Bernardin et al., 2002) wurde gezeigt, dass aus Knochenmarkszellen von WT Mäusen die mit TEL-AML1 transduziert waren sich in 2 von 9 Tieren eine Leukämie entwickelte. Wenn die transduzierten Zellen von Mäusen stammten denen zusätzlich andere Tumorsuppressorgene (p16/p19 Locus) fehlten, entwickelten 6 von 8 Tieren eine Leukämie, was einen kooperativen Effekt mit TEL-AML1 wahrscheinlich macht. Morrow et al. (Morrow et al., 2004) transduzierten hämatopetische Progenitorzellen aus der fetalen Leber mit TEL-AML1 und injizierten diese Zellen in mit 9 Gy bestrahlte Mäuse. Die Tiere entwickelten keine Leukämien, jedoch konnte ein Einfluß auf die B-Zelldifferenzierung beobachtet werden. Zusätzlich zeigten die transduzierten Zellen, im Gegensatz zu nicht transduzierten Kontrollzellen, den Vorteil sich im bestrahlten Empfängertier zu repopulieren. Zwei weitere Studien (Fischer et al., 2005; Tsuzuki et al., 2004) beobachteten nach Injektion von TEL-AML1 transduzierten Zellen ebenfalls die Akkumulation des frühen B-Zellkompartiments mit erhöhter Selbsterneuerungskapazität, möglicherweise auf Grund einer arretierten Differenzierung im pro-B-Zell Stadium. Dies führte zu einer proportionalen Zunahme der frühen Progenitoren *in vivo*. Trotzdem konnte in all diesen Fällen keine Leukämieentstehung beobachtet werden.

B.2.3.2.2.3. Gentechnisch veränderte Mausmodelle (GEMMs).

Auch wenn man die technischen Nachteile der oben angesprochenen Methoden beiseite lässt, kann keines dieser Modelle zur vollständigen Darstellung der humanen B-ALL verwendet werden. Konsequenterweise und um detailliert alle Aspekte die mit der B-ALL zusammenhängen darstellen zu können, ist es notwendig Experimente *in vivo* durchzuführen, damit sich die Neoplasie innerhalb ihrer spezifischen Umgebungsfaktoren entfalten kann. Der Grund warum man die Komplexität einer Krebserkrankung in der Maus nachstellen möchte ist, dass man heutzutage den

leukämischen Prozess induzieren, untersuchen und manipulieren kann. Dies ist in der Maus auf eine Art und Weise möglich, wie es im Menschen oder mit Zellen, die aus dem Menschen stammen unmöglich wäre. Es wurde bereits gezeigt, dass die Anzahl und Arten der genetischen Alterationen die mit der Leukämie assoziiert sind variieren, jedoch auch limitiert sind. Mutationen die einen Funktionszugewinn darstellen resultieren meistens aus chromosomalen Translokationen und werden als das erste Leukämie-initiiierende Ereignis angenommen, genauso wie Funktionsverlustmutationen, die typischerweise (jedoch nicht immer) als Zweitmutationen angesehen werden.

Im nächsten Abschnitt werden wir die bedeutendsten (historischen, technischen und biologischen) murinen Modelle der kindlichen B-ALL darstellen. Für jede dieser B-ALL assoziierten genetischen Alterationen werden wir konstitutive Modelle mit einer einzigen genetischen Veränderung, sowie Modelle die zwei genetische Alterationen auf der Basis von konditionellen und/oder induzierbaren Modellen besitzen, beschreiben.

B.2.3.2.2.3.1. BCR-ABL+ Modelle.

Seit der Entdeckung, dass chimäre Fusionsproteine eng mit spezifischen Leukämieformen in Patienten assoziiert sind, wurden Mausmodelle, die auf dem Funktionszugewinn bestimmter Gene basieren entwickelt. Man versuchte die humane Erkrankung nachzustellen, indem man die ektopische Expression des onkogenen Proteins in der Maus induzierte. Am Anfang wurden diese Modelle durch klassische Transgenese etabliert. Im Jahr 1990 zeigten Heisterkamp et al. (Heisterkamp et al., 1990) die onkogene Kapazität des BCR-ABLp190 Fusionsproteins, indem sie es unter der Kontrolle des metallothionein Promoters in der Maus exprimierten. Dabei zeigten sie, dass die generierten Mäuse innerhalb weniger Wochen an akuter Leukämie verstarben (myeloisch oder lymphatisch). Mit diesem Modell war nun gezeigt, dass der Phänotyp, auch wenn man ein Transgen verwendet das in vielen unterschiedlichen Zellarten exprimiert ist, spezifisch auf das hämatopoetische System begrenzt ist (Voncken et al., 1995). Mehrere Arbeiten zeigten Unterschiede im Phänotyp, der aus der transgenen Expression verschiedener BCR-ABL Formen resultierte (Voncken et al., 1995). BCR-ABL Onkogene können demnach, trotz ihrer unterschiedlichen Länge überlappende

Phänotypen hervorrufen und dies abhängig von ihrer Überexpression in unterschiedlichen transgenen Modellen. Zum Beispiel ist BCR-ABLp210, wenn es unter dem *bcr* Locus exprimiert ist embryonal letal (Heisterkamp et al., 1991), während es unter dem metallothionein Promoter T-Zell Leukämien hervorruft (Honda et al., 1995). Das BCR-ALBp190 Onkogen, welches durch homologe Rekombination in den murinen *bcr* Locus integriert ist, bringt in den Chimären akute Leukämien mit dem Immunphänotyp einer B-Vorläuferzelle hervor, der die humane Pathologie widerspiegelt (Castellanos et al., 1997). Ebenso konnte mit diesem Modell gezeigt werden, dass der endogene *bcr* Locus nicht für die Krankheitsentstehung bedeutend ist. Dennoch, die konstitutive Expression von BCR-ABLp190 in allen Zellen der F1 Tiere war embryonal lethal, ähnlich wie zuvor für die p210 Form gezeigt.

In diesem Zusammenhang erlaubte es die zusätzliche Einführung von Zweitmutationen (entweder Funktionszugewinn oder -verlust), die auf Grund ihrer Beteiligung an der humanen ALL oder der normalen B-Zellentwicklung ausgewählt wurden, in vielen Fällen den molekularen Mechanismus der Leukämieentstehung zu bestätigen. Zum Beispiel ist eine der häufigsten Zweitmutationen der humanen BCR-ABL+ B-ALL die Deletion des IKAROS Gens *IKZF1* (Cazzaniga et al., 2011; Iacobucci et al., 2009; Mullighan et al., 2008). Die Rückkreuzung von transgenen BCR-ABL Mäusen (Heisterkamp et al., 1990) mit Mäusen die ein hypomorphes *ikzf1* Allel tragen (Kirstetter et al., 2002) zeigte, dass die beeinträchtigte IKAROS Funktion in der Tat die Progression der Leukämie und die Entstehung des Tumors akzeleriert. Dies geschieht durch die Anwesenheit weiterer Mutationen, die eventuell mit dem BCR-ABL Onkogen in der B-ALL Entstehung synergistisch wirken (Virely et al., 2010).

Ein bestimmter experimenteller Ansatz, der sich zwischen der Verwendung von GEMMs und der viralen Transduktion bewegt, ist die Verwendung von Knochenmark von genetisch veränderten Tieren. Diese Knochenmarkszellen stellen die Zielpopulation für die virale Transduktion dar. Generell entstammen die Zielzellen einer Maus, die eine Zweitmutation trägt (normalerweise ein Funktionsverlustallel, im Vergleich zu Kontrollzellen aus dem Wildtyp) und diese werden mit dem Onkogen, transduziert. Dieser Ansatz wurde verwendet, um zum Beispiel die Bedeutung des Funktionsverlustes des *p19ARF* Locus für den Phänotyp der BCR-ABL+ B-ALLs zu untersuchen (Virely et al., 2010). Aus der retroviralen Transduktion von

Knochenmarkszellen der *Arf*^{-/-} Tiere mit BCR-ABLp185 entwickelten sich schnell polyklonale Populationen mit sich kontinuierlich erneuernden pre-B Zellen, von denen alle leukämisches Potential besaßen (Williams et al., 2007). Ebenso sind HSZs die einzigen Zellen, die durch die BCR-ABL Expression in Anwesenheit von WT *p19ARF* transformiert werden können, während in einem *Arf*^{-/-} Hintergrund auch aus der gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzelle (CLP) und dem frühen B-Zell-Vorläuferlymphozyten Leukämienstammzellen hervorgehen können (Wang et al., 2008). Dieses Mausmodell wurde später verwendet um zu zeigen, dass die Cyclosporin A abhängige Inhibition von NFAT die Eradikation von Leukämiezellen durch den BCR-ABL Inhibitor Dasatinib ermöglicht und das Überleben der Tiere signifikant verbessert (Gregory et al., 2010). Ähnliche experimentelle Ansätze wurden für Activation-induced Cytidine Deaminase (AID) knock-out Zellen verwendet (Gruber et al., 2010). Diese zeigen, dass AID an der klonalen Evolution der BCR-ABL+ B-ALL beteiligt ist. Ebenso wurde in *C/EBPβ*^{-/-} Zellen gezeigt, dass *C/EBPβ* an der BCR-ABL abhängigen myeloischen Expansion beteiligt ist (Hayashi et al., 2013).

Diese auf Transduktion basierten Ansätze sind sehr nützlich für die Grundlagenforschung, da sie darauf abzielen die molekularen Mechanismen kollaborierender Mutationen bezüglich ihres Synergismus für die Entstehung der B-ALL zu beleuchten. Jedoch zeigen sie dieselben Nachteile, die zuvor für die virale Transduktion genannt wurden und somit werden wir diese Modelle nicht detaillierter in den kommenden Abschnitten besprechen.

Eine weitere Methode eine Zweitmutation in die Zielzelle einzufügen ermöglicht die Kombination aus einer transgenen Mauslinien, die die erste Mutation trägt, gekoppelt mit einem experimentellen Ansatz der „forward genetics“. Auf diese Art und Weise werden Mutationen in das Genom der Zelle eingebracht, die direkt mit dem ersten onkogenen Ereignis interagieren. Somit kann man auf experimentellem Wege bestimmte Aspekte der Erkrankung (z.B. Latenz, Inzidenz, Aggressivität oder den Phänotyp) manipulieren. Folglich können diese Alterationen identifiziert und ihre Relevanz für die humane Erkrankung evaluiert werden. In diesem Zusammenhang kreuzten Miyazaki et al. (Miyazaki et al., 2009) die transgenen BCR-ABLp210 Tiere (Honda et al., 1998) auf BXH2 Tiere zurück. BXH2 Tiere sind eine rekombinante Mauslinie die Leukämien hauptsächlich auf Grund von horizontal übertragenen

replikationskompetenten Retroviren entwickelt. Einige Tiere entwickelten akute lymphoblastische Leukämien, was auf eine aberrante Expression des *Zfp423* (*Zinc finger protein 423*, auch bekannt als *Early B-cell factor associated zinc finger protein*, *Ebfaz*) Gens zurückzuführen war. Damit wurde gezeigt, dass *Zfp423 in vivo* zusammen mit p210BCR/ABL ein synergistisches, onkogenes Potential besitzt, indem es den Erkrankungsbeginn akzelleriert, die Aggressivität erhöht und den Tumorphänotyp verändert. *Zfp423* bindet an und interferiert mit der Aktivität von Ebf einem Hauptregulator der B-Zell Differenzierung in frühen Stadien (Miyazaki et al., 2009).

Die Verwendung von induzierbaren Systemen, in denen man die Aktivität des Onkogens kontrollieren kann, hat ein fundiertes Verständnis der Ätiopathogenese der ALL ermöglicht. Zum Beispiel führte die Induktion der BCR-ABLp210 Expression unter der Kontrolle eines tetrazyklin-kontrollierbaren Promoters in 100% der Mäuse zur Entstehung von letalen pre-B Zell Leukämien (Huettner et al., 2000). Die Pathologie war nach Unterbrechung der Onkogenexpression reversibel. Dennoch muss bemerkt werden, dass die p210 Form von BCR-ABL nur mit einem begrenzten Prozentsatz der B-ALLs beim Menschen vergesellschaftet ist. In anderen Untersuchungen, in denen man die B-ALL assoziierte BCR-ABL Isoform p190 in einem tetrazyklin-induzierbaren Modell verwendet hat, wurde gezeigt, dass die Inaktivierung der Onkogenexpression das Tumorstadium nicht stoppen kann sobald es einmal initiiert ist (Perez-Caro et al., 2007). Diese Daten zeigen zusätzlich, dass strikte phänotypische Bedingungen zu definieren sind bevor man schlussfolgern kann, dass das Mausmodell phänotypische Merkmale der humanen Pathologie erfüllt. Ist es zum Beispiel ausreichend zu schlussfolgern, dass ein Mausmodell die humane B-ALL rekapituliert, wenn ein ektop exprimiertes Onkogen *in vivo* die Immortalisierung und Expansion der infiltrierenden Zellen, die zu einem frühen Zeitpunkt der B-Zell-Entwicklung arretiert sind, bewirkt? Ist diese Definition sehr unterschiedlich zu dem was man durch retrovirale Transduktion *in vitro* oder durch die Injektion einer transformierten Zelllinie in immunsupprimierte Tiere erreichen kann? Daher sollten wir sehr viel anspruchsvoller mit der Evaluation und "klinischen" Charakterisierung der murinen Phänotypen sein, um Modelle zu generieren die schlussendlich eine Relevanz für translationale Studien besitzen.

Die Verwendung induzierbarer Modelle erlaubt es uns die Bedingungen nachzustellen, die notwendig sind damit sich die Erkrankung entwickeln und progredient sein kann. Sie bieten ebenfalls die Möglichkeit unterschiedliche Variablen, die für die Pathogenese der Erkrankung bedeutend sind zu untersuchen. Eine dieser Variablen ist zum Beispiel das Altern. Kürzlich wurde für das BCR-ABL p190 Transgen gezeigt, dass Zellen alter Tiere, wenn Sie in gleichaltrige Empfänger (4 Wochen alt) transplantiert werden, sehr viel schneller Leukämien entwickeln. Somit lassen diese Ergebnisse darauf schließen, dass ein höheres Alter des Tieres und damit auch der Zelle, in der die Transformation stattfindet, direkten Einfluss auf das maligne Potential der leukämischen Zellen hat (Vicente-Duenas et al., 2010a)

B.2.3.2.2.3.2. E2A-PBX1+ oder E2A-HLF+ Modelle.

BCR-ABL war als erstbeschriebene Leukämie-assoziierte chromosomale Translokation unter den ersten, die in verschiedenen GEMMs untersucht wurde. Die meisten (jedoch nicht alle) der anderen Translokationen, die mit der B-ALL assoziiert sind betreffen Transkriptionsfaktoren, deren Funktion durch die Entstehung eines chimären Proteins dereguliert wird. Zum Beispiel ist der essentielle Regulator der B-Zell Entwicklung E2A an zwei mit der B-ALL assoziierten Translokationen beteiligt (Aspland et al., 2001; Campos-Sanchez et al., 2011). Eine von ihnen ist die Translokation t(1;19)(q23;p13.3), welche Ursprung des E2A-PBX1 Fusionsgens ist und hauptsächlich in der kindlichen Leukämie vorkommt. In manchen Fällen tritt sie auch in der erwachsenen Leukämie auf, die E2A-PBX1+ B-ALLs im Kindesalter zeigen jedoch eine bessere Prognose als die der Erwachsenen. Viele *in vitro* Experimente zeigten, dass E2A-PBX1 in der Lage ist Zellen zu transformieren, während *in vivo* Experimente in der Maus inkonsistente Ergebnisse lieferten. Die transgene Expression von einem Immunglobulin Promoter/Enhancer führte bei 5 Monate alten Mäusen zur Entstehung von T-lymphoblastischen Lymphomen (Dedera et al., 1993). Dies ist am ehesten auf die heutzutage gut verstandenen Expression dieser regulatorischen Elemente während der T-Zellentwicklung zurückzuführen. Dennoch war die Anzahl der B-Zellen im Knochenmark der Mäuse auf 60-80% reduziert womit ein toxischer Effekt des Onkogens in diesem Kompartiment gezeigt wurde. Dieses Modell war ebenfalls die Grundlage dafür, die Bedeutung der PBX1 Homeodomäne für die Onkogenese zu untersuchen. Eine mutierte Form von E2A-

PBX1, der diese Domäne fehlt zeigte einen ähnlichen Effekt verglichen mit dem wildtyp Onkogen (Dedera et al., 1993).

Trotz dieser Einschränkungen, wurde das oben genannte transgene E2A-PBX1 Mausmodell für „forward genetics“ Analysen verwendet. Ziel ist es damit Gene zu identifizieren die potentiell in der Leukämieentstehung kollaborieren könnten. Die retrovirale Insertionsmutagenese mit M-Muly wurde verwendet, um synergistische Onkogene zu identifizieren. Diese Experimente führten zur Entdeckung von Pim1 - (Feldman et al., 1997) und NOTCH1 Mutationen (Feldman et al., 2000), die an der Entstehung von Thymuslymphomen beteiligt sind, ihre Bedeutung für die B-ALL ist jedoch noch fraglich.

Andere transgene Modelle, die auf ähnlichen spezifisch lymphatischen Promoter/Enhancer regulatorischen Elementen beruhen, entwickelten ebenfalls hauptsächlich T-Zell Neoplasien und mit niedrigerer Frequenz und langer Latenz B-ALLs (Bijl et al., 2005). Um das Auftreten der T-Zellerkrankung zu verhindern und die Inzidenz der B-Zell Leukämien zu erhöhen, wurden diese E2A-PBX1 transgenen Tiere auf einen CD3 ϵ -/- Hintergrund, dem T-Zellen fehlen, zurückgekreuzt. Die daraus hervorgegangenen Tiere wurden mit retroviraler Insertionsmutagenese (MMLV) behandelt, um kollaborierende Gene zu identifizieren. Die Identifizierung relevanter Zielgene zeigte, dass in E2A-PBX1 positiven Tumoren präferentiell Hoxa Genkluster betroffen sind. Somit deutet dies auf einen funktionellen Synergismus dieser Onkogene in der B-ALL hin (Bijl et al., 2005). Weitere Untersuchungen in den E2A-PBX1 transgenen Tieren auf spezifische transgen exprimierte Gene des Hoxa Klusters zeigten den Synergismus mit diesen Genen auch in T-Zell Leukämien (Bijl et al., 2008).

Auch dem E2A beteiligten Fusionsprotein E2A-HLP liegt eine Translokation t(17;19)(q22; p13.3) zu Grunde. ES tritt mit sehr niedriger Frequenz auf, seine Prognose ist aber sehr ungünstig (10% erkrankungsfreies Überleben nach 4 Jahren). Transgene Modelle, in denen die E2A-HLF Expression von dem Immunglobulinenhancer angetrieben wird, beeinflussen die Differenzierung der lymphatischen Zellen und verursachen T-Zell Apoptose, B-Zell Reifung und die Entwicklung von T-ALLs nach langer Latenz. Die Tumore sind monoklonal, was die

Notwendigkeit von Zweitmutationen verdeutlicht. Des Weiteren zeigten sie den Phänotyp blockierter T-Zellen oder sehr selten von B-Vorläuferzellen (Honda et al., 1999; Smith et al., 1999). Diese Ergebnisse, zusammen mit den Erkenntnissen aus der E2A-PBX1 Maus, wurden als das Ergebnis eines dominant negativen Effekts des E2A Fusionsproteins angesehen. Dieser dominant negative Effekt betrifft die Dimerisierung der endogenen E2A Gene und Id Proteine, die für die normale lymphatische Differenzierung benötigt werden (Seidel and Look, 2001).

Da diese, sehr einfache Methode der ektopten Genexpression, die humane Pathologie der E2A-HLF B-ALL nur unzureichend widerspiegelt wurden weiterentwickelte Ansätze aufgegriffen. Es wurde ein konditionelles Knock-in Modell generiert, in dem die E2A-HLF cDNA in den *E2A* Locus integriert wurde (Yamasaki et al., 2010). Die Expression des Onkogens konnte durch die interferon-induzierbare Mx-Cre transgene Linie induziert werden (Kuhn et al., 1995). Dennoch entwickelten die Mäuse über eine lange Beobachtungsperiode hinweg keine Leukämien, was wiederum die Notwendigkeit für Zweitmutationen nahe legt. Um diese in das Genom einzubringen, wurde die Methode der retroviralen Insertionsmutagenese verwendet. In der Folge traten akute Leukämien auf von denen einige vom B-Zell Typ waren. Diese Leukämien zeigten zuvor beschriebene koagulopathische Eigenschaften ähnlich der Translokation t(17;19) positiven leukämischen Zellen (Kuhn et al., 1995). Die Untersuchung der retroviral überexprimierten Gene, die an diesem Prozess beteiligt sind, führten zu der Identifizierung verschiedener Gene, unter Ihnen *Gfi1*, *Ikaros* und dem *zinc-finger protein 521 (Zfp521)*, welche später auch in humanen E2A-HLF+ leukämischen Zelllinien überexprimiert gefunden wurden. *Zfp521* ist zu dem bereits genannten *Zfp423* homolog und kann ebenfalls mit der Aktivität des Hauptregulators der B-Zelldifferenzierung Ebf1 interferieren, was somit einen synergistischen onkogenen Einfluss nahe legt.

B.2.3.2.2.3.3. TEL-AML1+ Modelle.

Die einzige Translokation die für 25% der Fälle der kindlichen B-ALL verantwortlich ist, ist die Translokation t(12;21)(p13;q22) (TEL-AML1). Wir haben gerade die bedeutendsten Erkenntnisse aus den retroviralen Transduktionsansätzen beschrieben. Andreasson et al. exprimierten (Andreasson et al., 2001) das TEL-

AML1 Fusionsgen in GEMMs unter der Kontrolle des Enhancer/Promoters der schweren Kette der Immunglobuline, jedoch entwickelten diese Tiere überhaupt keine hämatologischen Erkrankungen. Während es in der Literatur keinen Hinweis darauf gibt, dass es weiter verwendet wurde, wurde erst kürzlich eine sehr ähnliche transgene Strategie verwendet. Diese zeigt einen sehr milden Phänotyp mit einem geringen Anstieg der frühen B-Zellprogenitoren jedoch ohne malignen Phänotyp (Ford et al., 2009).

In einer der letzten Untersuchungen (Schindler et al., 2009) wurde ein knock-in Modell entworfen in dem eine Kopie des AML1 Gens konditionell in den endogenen *Tei* Locus inseriert wurde. Durch die Verwendung dieses Modells konnten Schindler et al. zeigen, dass TEL-AML1 eine begrenzte Expansion der HSZs induzieren kann. Dennoch entwickelten diese Tiere keine B-ALL, und nur durch zusätzliche Behandlung der Tiere mit dem starken Mutagen ENU, entwickelten sie T-Zell Tumore, jedoch keine B-ALLs (Schindler et al., 2009). Ein ähnlicher knock-in Ansatz wurde kürzlich von van der Weyden et al. angewendet (van der Weyden et al., 2011). Sie führten die AML1 cDNA konstitutiv in den *Tei* Locus der Maus ein, gefolgt von einem IRES Motif und der cDNA einer hyperaktiven Variante des Sleeping Beauty (SB) Transposons (Collier et al., 2005). Diese Tiere sind bisher das einzige TEL-AML1 Modell, von dem bekannt ist, dass es B-Vorläuferzelleukämien mit niedriger Frequenz (13 von 90) hervorbringt (van der Weyden et al., 2011). Viele der Gene oder der chromosomalen Orte die durch die transposale Aktivität in den murinen B-ALLs verändert wurden stimmten mit den Genen überein die an der humanen pre-B-ALL beteiligt sind. Somit zeigt dies die Validität dieses Ansatzes. Dennoch treten bei diesen Tieren auch andere Leukämien mit noch höheren Frequenzen als die der B-ALL auf (AML, 34 von 90 Mäusen; T-ALL, 21 von 90). Erneut zeigt dies unsere Schwäche die humane Erkrankung zu rekapitulieren. Schlussendlich gibt es immer noch bestimmte Aspekte, die weiterhin übersehen werden wenn man die humane Pathologie im Mausmodell darstellen möchte. Für Patienten wurde schon vor mehr als zehn Jahren beschrieben, dass die Frequenz der Neugeborenen, die die TEL-AML1 Translokation tragen, 100 mal höher ist als die Inzidenz der ALL (Mori et al., 2002). Dieses Ergebnis wurde sogar noch übertroffen, jedoch ist die Validität dieser Daten sehr kontrovers diskutiert (Brown, 2011; Greaves et al., 2011; Lausten-Thomsen et al., 2011; Zuna et al., 2011). Wenn dies zuträfe, würde es bedeuten, dass präleukämische Klone sehr häufig sind, jedoch physiologisch kontrolliert und

eliminiert werden und nur ein kleiner Prozentsatz von ihnen Leukämien entstehen lässt. In diesem Zusammenhang würde man erwarten, dass die Penetranz der B-ALL in TEL-AML1 GEMMs sehr niedrig ist, auch wenn wir genau die Zielzelle, onkogene Expression etc, nachstellen könnten, so wie sie beim Menschen auftreten. Von diesem Standpunkt aus gesehen, kann die TEL-AML1 Translokation (und wahrscheinlich auch andere B-Zell assoziierte Gene) schon fast als Suszeptibilitätsallel mit einem schlussendlich moderaten Einfluss auf die Entstehung der Erkrankung gedeutet werden. Wenn man dies akzeptiert, sind die Eigenschaften und die Inzidenz der Zweitmutation das essentielle, die Leukämie auslösende, Ereignis (Little et al., 1996; Nakamura, 2005). Wie wir gesehen haben gibt es viele in Frage kommende Alterationen die eine Rolle spielen könnten, jedoch müssen die Ursachen noch genau bestimmt werden: exogene und endogene Exposition, genetische Suszeptibilität und/oder auch der Zufall (Inaba et al., 2013). Somit ist die Entwicklung eines geeigneten Tiermodells das die Erstmutation darstellt von essentieller Bedeutung, auch um mögliche sekundäre und kooperierenden Ursachen zu untersuchen.

B.2.3.2.2.3.4. MLL+ Modelle.

Unter den pädiatrischen ALLs sind die Säuglingsleukämien, die mit Translokationen des MLL Gens einhergehen, Sonderfälle. Sie treten meistens im ersten Lebensjahr auf und haben eine schlechte Prognose. Mehr als 40 unterschiedliche Translokationen an denen MLL beteiligt ist wurden bereits identifiziert. In der B-ALL (80% der Fälle in denen das MLL beteiligt ist sind B-ALLs) sind Translokationen die die Gene *AF4*, *AF9*, *ENL*, *AF10* und *AF6* betreffen am häufigsten (Meyer et al., 2013). Entgegengesetzt zu dem, was wir bisher beschrieben haben, sind in MLL assoziierten ALLs zusätzliche genetische Alterationen unüblich (obwohl Veränderungen in der FLT3 Expression häufig in MLL-positiven Leukämien vorkommen) (Armstrong et al., 2003). Dies lässt bereits erahnen, dass alle notwendigen Veränderungen, die für die Leukämie bedeutend sind direkt oder indirekt durch das Onkogen gesteuert werden. Dies kann auf den besonderen Charakter von MLL als Methyltransferase zurückzuführen sein, die an der Regulation der Hox Gene beteiligt ist und über die Histondemethylierung die Genexpression regulieren kann (Krivtsov and Armstrong, 2007).

Knock-in Chimären die ES Zellen tragen in denen die *AF9* cDNA in den *MLL* Lokus integriert wurde entwickeln Leukämien (hauptsächlich AML, jedoch auch ALL). Jedoch spricht eine lange Latenz in diesem Modell für die Bedeutung von zusätzlichen genetischen Mutationen (Corral et al., 1996; Dobson et al., 1999). Unter Verwendung dieses Modells, wurden die unterschiedlichen Kinetiken der Leukämieentwicklung aus Zellen der fetalen Leber oder aus Knochenmarkszellen untersucht und zeigten, dass es einen signifikanten Unterschied bzgl. des Beginns der Leukämie gibt. Dies suggeriert wiederum, dass zu dem Zeitpunkt zu dem die Zellen sich bis zu dem Stadium der Knochenmarksstamm/Vorläuferzelle entwickelt haben die Zweitmutation bereits stattgefunden hat (Chen et al., 2011).

Von einem mechanistischen Standpunkt aus gesehen, ist eines der anspruchsvollsten Mausmodelle der chromosomalen Translokationen die bisher generiert wurden, die Translokation zwischen dem endogenen *Mll* und dem *AF9* Lokus der Tiere *in vivo* (Collins et al., 2000). Dieser Ansatz wurde später angewendet, um in der Maus die Translokation $t(11;19)(q23;p13.3)$, die den *Mll* und den *Enl* Lokus involviert, darzustellen (Forster et al., 2003). *LoxP* Seiten wurden in die genannten Loci auf den Chromosomen 9 und 17 (*Mll* und *ENL* Chromosom) eingefügt und die Rekombination wurde durch die Verwendung der pan-hämatopoetischen *Lmo2-Cre* Rekombinase erreicht (Forster et al., 2003). Diese Tiere entwickelten in weniger als 6 Monaten eine den myeloproliferativen-Erkrankungen ähnliche myeloische Leukämie. Somit konnte gezeigt werden, dass *Mll-Enl* direkt an der Leukämieentstehung beteiligt ist. Mäuse, die ein knock-in von *AF4* in den *Mll* Lokus tragen entwickelten eine biphänotypische lymphatisch, myeloische Hyperplasie und nach langer Latenz B-Zelllymphome was eher für die pädiatrischen ALLs relevant ist (Chen et al., 2006). Auch in diesem Artikel wurden *MLL-AF9* knock-in Tiere generiert (dieselben wie oben beschrieben) die myeloische Erkrankungen entwickeln.

Ein anderer experimenteller Ansatz führte zur Generierung von konditionellen *Mll-AF4* Mäusen indem sie die sogenannte "invertor" Technologie, in der die *AF4* Kasette in umgekehrter Richtung und flankiert von *lox-P* Stellen in den *Mll* Lokus eingebracht wurde, verwendeten. Die Aktivierung von *Cre* führte zur Inversion der

Kassette und der daraus resultierenden Entstehung des chimären *Mll-AF4* Onkogens (Metzler et al., 2006). Verwendete man verschiedene und für die lymphatische Reihe spezifische Cre Rekombinasen, so entwickelten diese Tiere B-Zell Neoplasien vom reifen Phänotyp (diffuse großzellige B-Zell Lymphome) anstelle von Vorläufer-B-ALLs. Es wird ebenfalls berichtet, dass die konstitutive Expression des fusionierten Onkogens embryonal letal ist. Dennoch gibt es einen Aspekt, der in all diesen Modellen, auch wenn die knock-in Modelle das Onkogen im gesamten Organismus exprimieren eindeutig erscheint. In den Tieren entstehen ausschließlich hämatopoetische Erkrankungen, woraus man schließen kann, dass die MLL-Fusion nur in diesem Kompartiment tumorigen wirkt. Ebenfalls wurde aus diesen Daten geschlossen (Metzler et al., 2006), dass MLL-AF4 in bereits engagierten Zellen der lymphatischen Linie onkogen wirkt und nicht von der HSZ exprimiert sein muss. Jedoch ist der Phänotyp der entsteht, wenn die Expression von Cre in eher primitiven Kompartimenten stattfinden würde, nicht bekannt. Ein erfolgreicherer Modell der kindlichen MLL-AF4 assoziierten humanen B-ALL wurde von Krivtsov et al. etabliert, in dem sie interessanterweise eine ähnliche Strategie, jedoch eine unterschiedliche Cre Linie verwendeten (Krivtsov et al., 2008). Sie verwendeten ein konditionelles *AF4* knock-in Modell, in dem dem *Mll* Locus eine loxP begleitete STOP Kassette in Kombination mit einer Interferon induzierbaren pan-hämatopoetischen *Mx1-Cre* Linie vorgeschaltet war (Kuhn et al., 1995). 14 von 22 Tieren entwickelten eine Erkrankung, die einer akuten Leukämie entspricht und eine nicht-supervidierte hierarchische Clusteranalyse von Mikroarray Analysen zeigte, dass 14 dieser ALLs ähnlich den pre-B-ALL Zellen waren. Darüberhinaus deuten neuere Studien darauf hin, dass MLL Fusionsgene die Genexpression kontrollieren indem sie die Histin H3 Lysin 79 (H3K79) Methyltransferase DOT1L rekrutieren (Bernt et al., 2011; Okada et al., 2005). Wenn man zusätzlich Leukämiezellen von MLL-AF4 Tieren mit denen des Menschen vergleicht ist die H3K79 Methylierung an verschiedenen Loci vergleichbar gesteigert, und diese Erhöhung korreliert mit einer erhöhten Genexpression. Ebenso führt die Suppression der H3K79 Methylierung zur Inhibition der Genexpression in MLL-AF4+ Zellen, was nahe legt, dass die Inhibition von DOT1L eventuell eine therapeutische Möglichkeit für diese Form der ALL darstellt (Zeisig et al., 2008).

Diese gerade beschriebenen Mausmodelle sind ein gutes Beispiel dafür, wie die Kombination aus genau einer Kopie der genetischen Läsion, so wie sie auch beim

Menschen zu finden ist, zusammen mit seiner Aktivierung im richtigen zellulären Kompartiment, ein sehr viel besseres Modell der humanen Leukämie darstellen kann. Die Frage welches die richtige Zielzelle für die Aktivierung des Onkogens ist, (was wir etwas allgemeingültiger am Ende dieses Berichtes diskutieren möchten) ist sehr schön an verschiedenen Beispielen gezeigt, eingeschlossen der murinen Modelle für die MLL-assoziierten Translokationen. Obwohl einige dieser Modelle auf retroviraler Transduktion basieren, werden wir einige dieser Ergebnisse, die in diesem speziellen Kontext entdeckt wurden, diskutieren. Wenn man die retrovirale Transduktion von *MLL-Enl* auf eine definierte murine hämatopoetische Subpopulation begrenzt, konnte gezeigt werden, dass das Onkogen den Leukämiephänotyp in sich selbst-erneuernden Stammzellen und kurzlebigen myeloischen Progenitorzellen induzieren kann (Cozzio et al., 2003). Ebenso konnte gezeigt werden, dass retroviral transduziertes MLL-AF9 frühe hämatopoetische Progenitoren (Somerville and Cleary, 2006) und myeloische Progenitoren (Krivtsov et al., 2006) transformieren kann. Als man die Bedeutung von MLL-AF9 in knock-in Tieren untersuchte fand man heraus, dass es ein hohes Expressionsniveau des Onkogens und seiner downstream Zielgene in HSZ, verglichen mit engagierten Progenitorzellen, gibt (Chen et al., 2008). Dies hat direkte Konsequenzen für seine leukämogene Kapazität, da es eine direkte Beziehung zwischen dem Expressionsniveau des Onkogens und der zellulären Suszeptibilität für die Transformation von engagierten Vorläuferzellen gibt. Diese können durch retroviral getriebene Onkogenexpression, nicht jedoch durch die endogen kontrollierte Expression, transformiert werden (Chen et al., 2008). Verwendet man ein konditionelles, transgenes Modell von MLL-ENL, zeigten Ono et al. kürzlich, dass MLL-ENL, wenn es ähnlich stark exprimiert ist wie vom endogenen Mll Locus, selektiv die leukämische Transformation einer definierten HSZ-Subpopulation induzieren kann. Dieser Effekt wird durch die verstärkte Expression des *Promyelocytic leukemia zinc finger (Plzf)* Gens (Ono et al., 2013) unterstützt. Etwas ähnliches konnte für Evi1 (Arai et al., 2011) gezeigt werden und ebenfalls im Falle eines MLL Fusionsgenes für Hox Gene wie *Hoxa9* (Kumar et al., 2004). Diese Ergebnisse veranschaulichen wie bedeutend das Expressionsniveau und die zeitliche Aktivierung des Onkogens für die Entwicklung eines verlässlichen Modells ist das zuverlässig die humane Erkrankung rekapituliert.

Ein anderer interessanter Aspekt, den man berücksichtigen muss, ist die Entwicklung des hämatopoetischen Systems parallel zur Entwicklung des Organismus. Wir haben zuvor im Falle der BCR-ABL- assoziierten ALL ein Beispiel gesehen, das das Alter bei Entstehung der Malignität mit der Erkrankungsaktivität in Verbindung bringt (Vicente-Duenas et al., 2010a). Verwendet man *Mll-AF9* Knock-in Mäuse, wurde gezeigt, dass es für die Pathogenese der ALL eine schrittweise Progression von pränatalen zu postnatalen Stadien gibt, sodass es zu signifikanten Unterschieden zwischen pränatalen und postnatalen myeloischen Zellen kommt und man daher annimmt, dass mehrere Schritte der Leukämieentstehung in der adulten Maus vorausgehen (de Guzman et al., 2003).

Ein Aspekt, der für die meisten murinen Modelle der humanen B-Zelltranslokationen noch nicht vollständig berücksichtigt wurde, ist die Bedeutung der reziproken Translokationsprodukte, oder (im Falle der transgenen Modelle) die Bedeutung der Heterozygotie der translozierten Loci für die Entstehung der Erkrankung. In diesem Zusammenhang konnte zum Beispiel in einem retroviralen Transduktionssystem gezeigt werden, dass die Expression des AF4-MLL Fusionsproteins eine ALL, auch bei fehlendem Nachweis des MLL-AF4 Fusionsproteins auslösen kann (Bursen et al., 2010). Ergebnisse wie diese, die aus GEMMs stammen und nicht vollständig die humane Erkrankung widerspiegeln können, müssen aus diesem Grunde sehr vorsichtig interpretiert werden.

B.2.3.2.2.3.5. „Loss-of-function“ basierte B-ALL Modelle.

Wir haben die bedeutendsten genetischen Alterationen behandelt, die klassisch mit der ALL assoziiert sind. Dennoch gibt es einige andere die nur für eine kleine Anzahl der Leukämien relevant sind, jedoch von biologischer Bedeutung sind, da sie wichtige mechanistische Informationen für die Biologie der Leukämie bereitstellen. Andererseits wurden viele von ihnen noch nicht in GEMMs nachgestellt oder wenn, dann nur in retroviralen Transduktionsansätzen.

Der wichtigste B-Zell Regulator PAX5 ist in der B-ALL häufig mutiert und inaktiviert (Mullighan et al., 2007). Er ist ebenfalls an Translokationen, die ihn an *TEL*, *FOXP1*, *ZFP512* oder *ENL* fusionieren beteiligt (Cobaleda et al., 2007b). Obwohl

angenommen wird, dass die chimären Proteine, die aus diesen Translokationen hervorgehen und PAX5 beinhalten, als dominant negative Varianten mit dem normalen Programm der B-Zellentwicklung interferieren (Fazio et al., 2013), sind bis heute keine GEMMs verfügbar die es erlauben seine Bedeutung *in vivo* detailliert zu untersuchen. Ein konditionelles Modell von *Pax5* zeigte, dass sein Verlust in engagierten Vorläuferzellen *in vivo* zur Entstehung von Tumoren führt. Die Leukämien zeigen Rearrangements der schweren und leichten Ketten der Immunglobuline, entsprechen jedoch auf Grund ihres Genexpressionsmuster dem Phänotyp von Vorläuferzelllymphomen der den PAX5^{-/-} pro-B-Zellen ähnlich ist. Dies deutet darauf hin, dass sie aus der Dedifferenzierung von unreifen oder reifen B-Zellen hervorgegangen sind (Cobaleda et al., 2007a). Die Kombination aus heterozygoten und homozygoten (konditionellen) Funktionsverlustallelen von *Pax5* mit Translokationsmodellen, die einen Funktionszugewinn bewirken wird wahrscheinlich zu einer Akzellerierung oder einer verstärkten Penetranz der Erkrankung führen.

Dieser Effekt wurde bereits im Zusammenhang mit Mutationen im *Ikaros (Ikzf1)* Gen, wie wir es bereits im Rahmen der BCR-ABL Translokationsmodelle angemerkt haben, dargestellt (Virely et al., 2010). Die IKAROS Mutationen, die in Patienten gefunden wurden decken den gesamten Bereich von Haploinsuffizienzen bis hin zu Nullmutationen, eingeschlossen der Mutationen mit einem dominant negative Effekt ab (Kastner et al., 2013). Diese Mutationen sind nicht nach dem Zufallsprinzip über die unterschiedlichen Leukämien verteilt. Somit nimmt man an, dass zum Beispiel der starke Selektionsdruck, der für die Selektion von IKAROS Mutationen notwendig ist in BCR-ABL positiven Leukämien höher ist. IKAROS Mutationen sind in der Mehrzahl der Fälle Zweitmutationen (Cazzaniga et al., 2011), jedoch prädisponieren auch spezifische vererbare Polymorphismen in IKZF1 zur B-ALL (diskutiert in (Kastner et al., 2013)). Die Bedeutungen von Ikaros für die lymphatische Entwicklung sind vielfältig. Somit wird die Modulation seiner Aktivität durch Mutationen oder verschiedene allelische Varianten höchstwahrscheinlich unterschiedliche Auswirkungen auf die Leukämieentstehung und ihre Progression haben. Dies macht es ebenfalls schwierig ein spezifisches Ikaros-Funktionsverlustmodell auszuwählen, welches generell für die Untersuchung der Bedeutung von Ikaros für die ALL anwendbar ist.

Beim Menschen gibt es viele verschiedenen Gene ähnlich derer, die wir gerade beschrieben haben, die mit der ALL Entstehung in niedriger Frequenz assoziiert sind und entweder als erste oder als zweite Mutation auftreten. Diese Gene interferieren wiederum mit Genen, die die B-Zell Entwicklung und/oder Funktion steuern und sind somit mit Veränderungen in der B-Zell Differenzierung vergesellschaftet, wahrscheinlich auch an der Leukämieentstehung beteiligt. Beteiligte Gene sind *EBF1*, *RAG1* und *RAG2*, Signaltransduktionsgene wie *JAK/STAT* oder *SLP65/BLNK*, Zytokinrezeptorgene wie *IL7R*, *FLT3*, *TSLP/CRLF2*. Ebenso, wie bei den meisten anderen Krebserkrankungen sind Gene, die für die Proliferation der Zellen, den Zellzyklus wie *CDKN2A/CDKN2B*, *RB1*, *TP53* verantwortlich sind oder Gene wie *BCL2*, oder *BTG1* die Zelltod kontrollieren an der Entstehung vieler Subtypen der humanen B-ALL beteiligt (diskutiert in (Inaba et al., 2013; Loh and Mullighan, 2012; Mullighan, 2012)).

Funktionsverlustmodelle, die diese oder verwandte Gene betreffen, wurden bereits für eine Vielzahl entwickelt. Viele von ihnen präsentieren sich mit Charakteristiken die der humanen ALL ähnlich sind, sich jedoch auch sehr variabel zeigen. Zum Beispiel führt in einem Mausmodell der retroviral induzierten Mutagenese die Funktionseinschränkung von *EBF1* zur Entstehung einer ALL. (Hentges et al., 2005). *Rag1* Defizienz trägt zur Leukämieentstehung in der Maus bei, wenn es mit sekundärer Onkogenaktivierung wie *p53* (Nacht and Jacks, 1998) oder Tumorsuppressorinaktivierung, wie *p19ARF* (Hauer et al., 2011) assoziiert ist. Der kombinierte Verlust von *Rag1* und *p19Arf* führt zur Entstehung von Leukämien, die durch das Auftreten einer neuen Subpopulation von *Sca1+CD19+* B-Zellvorläufern charakterisiert ist. Diese Population enthält die leukämieinitierenden Zellen und exprimiert *NOTCH*. Verwendet man *Stat5fl/fl*, *Mx1Cre* Tiere konnte gezeigt werden, dass der *STAT5* Signalweg für die Erhaltung der *BCR-ABL+* Leukämie notwendig ist (Hoelbl et al., 2010). Ebenso wurde gezeigt, dass die Haploinsuffizienz von entweder *Pax5* oder *Ebf1* mit der konstitutiven Form von *Stat5b* synergistisch wirkt und in 100% der Tiere eine ALL induziert (Heltemes-Harris et al., 2011). In AML Mausmodellen konnte bewiesen werden, dass *Jak* Inhibitoren, den Leukämiephänotyp supprimieren (Lo et al., 2013). *Slp65*^{-/-} Mäuse entwickeln spontan pre-B-Zell Leukämien, deren Proliferation über ein konstitutives *Jak3/Stat5* Signal erfolgt (Flemming et al., 2003).

Chromosomale Rearrangements, die die Zytokinrezeptoren betreffen, insbesondere TSLP/CRLF2, kristallisieren sich als eine Untergruppe heraus, die zu einer Überexpression führen und sehr oft mit aktivierenden Mutationen in JAK1 und JAK2 assoziiert sind. Bisher sind keine geeigneten Mausmodelle verfügbar, die versuchen diese Effekte in der Maus zu reproduzieren. Die Bedeutung der FLT3 Deregulation in MLL-Leukämien ist gut untersucht und es konnte in einem retroviralen Mausmodell gezeigt werden, dass die Flt3 Inhibition bei dieser Art der Leukämie von therapeutischem Interesse ist (Armstrong et al., 2003).

Schlussendlich existieren bereits viele Knock-out/Knock-down und Knock-in GEMMs für Gene, die in die Kontrolle des Zellzyklus, der zellulären Proliferation, der Apoptose etc. eingebunden sind. Somit kann die individuelle Bedeutung eines bestimmten Gens für die Leukämieentstehung entweder alleine oder in Kombination mit anderen GEMM Modellen evaluiert werden. Dafür können die bereits vorhandenen Modelle verwendet werden, wobei die Verwendung des Einen oder des Anderen individuell entschieden werden muss.

B.2.3.3. Allgemeine Anmerkungen zu Modellen der ALL.

In diesem Bericht wurden die bedeutendsten GEMMs, die die häufigsten genetischen Läsionen die bei der humanen ALL gefunden werden darstellen, beschrieben. Wir haben gesehen, dass einige von Ihnen unterschiedliche Aspekte der humanen ALL widerspiegeln, und dass sie für die Untersuchung von Therapeutika oder die Identifizierung von kooperierenden Mutationen etc. verwendet werden können.

Dennoch gibt es einen Aspekt, der auf genetischer Ebene immer noch ungelöst ist auch wenn der Phänotyp sehr detailgetreu viele Aspekte der humanen Leukämie widerspiegelt. Dies bezieht sich auf die Sequenz der initiierenden Mutationen wie sie beim Menschen auftreten und wie bestimmte Zellen in einem präleukämischen Stadium aufrecht erhalten werden können. Als Beispiel sind initiierende Mutationen, die in utero auftreten im peripheren Blut eines nicht an Leukämie erkrankten Trägers schwierig zu finden, da der Beitrag der präleukämischen Zellen zum reifen hämatopoetischen Kompartiment begrenzt ist. Im Gegensatz dazu ist dies in den meisten bekannten Mausmodellen nicht der Fall, da die transgene Läsion, wenn sie

einmal aktiviert ist auf alle Abkömmlinge der Zielzelle übertragen wird (und in der Mehrzahl der Fälle auch exprimiert wird). Deshalb ist es insbesondere notwendig die Onkogenexpression auf das richtige Zellkompartiment zu limitieren und seine Aktivierung in anderen Zellkompartimenten zu vermeiden.

B.2.4. Neue konzeptionelle, wissenschaftliche Struktur zum Verständnis von Leukämien.

B.2.4.1. Neue Konzepte der Leukämieentstehung, - Progression, - Rückfall und Prognose.

Die Beschreibung der molekularen Mechanismen, die der Entstehung einer Leukämie zugrunde liegen, bleibt eine außerordentliche Herausforderung für die Grundlagenforschung und stellt zur selben Zeit einen essentiellen Schritt für die Entwicklung neuer Medikamente dar.

Der Beginn einer Leukämie ist, auf Grund fortgeschrittener Tumorstadien bei Kindern wenn sie in die Klinik kommen, oftmals nicht zu bestimmen. Konsequenterweise basiert unser Wissen über die Leukämieentstehung hauptsächlich auf Tiermodellen, die die Erkrankung beim Menschen rekapitulieren. Jedoch bleibt eine grundlegende Frage offen: Können wir die humane Krebserkrankung in der Maus reproduzieren? Um dieses Ziel zu erreichen müssen wir anspruchsvolle Anforderungen an die Modelle stellen: Ähnliche histologische Charakteristika im Vergleich zu denen die beim Menschen gesehen werden, Progression über die selben Tumorstadien, gleiche systemische Effekte wie sie im Patienten ausgelöst werden, gleiche genetische Signalwege die an Tumorinitiation und Progression beteiligt sind und gleiche Auswirkungen auf aktuelle therapeutische Ansätze.

In den vorausgegangenen Abschnitten haben wir diskutiert in wieweit die neuesten Entdeckungen auf dem Gebiet der Leukämie die komplexe Heterogenität der Tumore, die vielschichtige interne klonale Progression, und die Bedeutung der Onkogene für die Deregulation von zellulärer Proliferation und Überleben widerspiegeln. Alle diese Aspekte müssen, im Rahmen unseres Vorhabens

geeignete Tiermodelle für Leukämien zu entwickeln die wahrheitsgetreu die spezifischen Charakteristika der Erkrankung im Menschen widerspiegeln berücksichtigt werden. Traditionell ist die Definition der Parameter die eine Erkrankung charakterisieren in den publizierten Tiermodellen für Krebserkrankungen sehr heterogen und in vielen Fällen zeigen die Modelle nur eine moderate Parallelität zu einigen der eher herausstechenden Charakteristika der terminalen Stadien der Erkrankung beim Menschen (z.B. aberrante zelluläre Proliferation oder Metastasierung). Dies ist zum einen darauf zurückzuführen, dass wir nur begrenzte Möglichkeiten haben komplexe GEMMs zu etablieren, jedoch auch zu einem großen Anteil auf die fehlende Flexibilität der Mediziner neue Paradigmen, die den Ursprung der Krebserkrankung und die komplexe Struktur des malignen Gewebes betreffen, zu akzeptieren. Diese Situation sollte so nicht länger hingenommen werden. Es werden bessere Tiermodelle benötigt, die in der Lage sind wahrheitsgemäß die Gesamtheit der molekularen, zellulären, gewebsspezifischen und organischen Teilaspekte der humanen Krebserkrankung, einschließlich ihrer Initiierung, Progression, Evolution, Therapieansprechen und eventuell Heilung oder Rezidiv widerzuspiegeln. Dies ist nicht nur essentiell, um das Verständnis der humanen Erkrankung zu verbessern sondern es ist ebenso unabdingbar, wenn wir prädiktive präklinische Modelle entwickeln möchten, die uns helfen die großen Kohorten zu verringern, mit denen wir heutzutage in der Entwicklung von Therapeutika und ihrer finalen Testung im Menschen zurecht kommen müssen.

Somit benötigen wir für beides, für die Grundlagenforschung und die Behandlung unserer Patienten, optimierte Modelle, die unsere neuesten Erkenntnisse über die humane Leukämie widerspiegeln. Glücklicherweise haben wir viele Werkzeuge zur Hand die uns helfen diese Modelle zu entwickeln und natürlich birgt auch jeder experimentelle Ansatz Vor- und Nachteile. Seitdem wir in den vorausgegangenen Beschreibungen der Tiermodelle für die ALL die meisten und gängig verwendeten Methoden bereits gesehen haben, möchten wir uns in diesem Abschnitt nur kurz auf ihr Potential für die Entwicklung neuer verbesserter Modelle, sowie auf ihre Vor- und Nachteile fokussieren.

B.2.4.2. Methoden der fortgeschrittenen Modellentwicklung.

B.2.4.2.1. Knock-in Technik.

Vom heutigen Stand aus gesehen sind gut entwickelte GEMMS die Systeme, die die besten Möglichkeiten bieten die Expression Leukämie-assoziiertes Alteration sowohl zeitlich als auch hinsichtlich ihres Expressionsniveaus zu kontrollieren. Im Allgemeinen bieten GEMMs den Vorteil den Phänotyp (in einem bestimmten Hintergrund) zwischen unterschiedlichen Laboratorien zu reproduzieren, wenn man sie mit Transplantationsexperimenten (Xenograft, retroviraler Transduktion etc.) vergleicht. Unter den unterschiedlichen Möglichkeiten GEMMs zu generieren, sind im Zusammenhang mit der Leukämieentstehung beide Ansätze, nämlich die, die einen Funktionsverlust und die, die einen Funktionszugewinn eines Gens darstellen von Bedeutung.

Der molekulare Ursprung der genetischen Mutationen, so wie sie mit humanen Leukämien assoziiert sind, ist komplex und variabel und nicht alle Mutationen sind für die Entwicklung von Tiermodellen mit der heutigen Technologie (z.B. im Falle von Hyper- oder Hypodiploidien) leicht handzuhaben. Trotzdem stellen im Allgemeinen genomische Mutationen gute Kandidaten dar die Erkrankung nachzustellen. Innerhalb dieser Gruppe von Alterationen, sind Veränderungen die einen Funktionszugewinn bedeuten und die zur Überexpression/Aktivierung endogener Onkogene, oder zur Entstehung neuer chimärer Gene führen meistens die, die spezifisch mit der Initiierung der Leukämie im Zusammenhang stehen. Andererseits sind Mutationen die einen Funktionsverlust darstellen generell eher mit sekundären Alterationen vergesellschaftet, die während der Evolution der Erkrankung entstehen und nicht zwingend innerhalb einer Patientengruppe geteilt werden. Im Falle der kindlichen ALL, beinhaltet diese Gruppe der Funktionsverlustmutationen verschiedene Gene, die in der physiologischen B-Zellentwicklung eine Rolle spielen, wie zum Beispiel die Transkriptionsfaktoren PAX5, EBF1 oder IKZF1(IKAROS) (Mullighan et al., 2007). Eine andere Möglichkeit wie Gene zur Evolution der Leukämie beim Menschen beitragen können und die wir bisher nur unzureichend verstehen, ist die allelische Varianz. In der Tat haben Genom-weite Studien (GWAS)

an großen Kohorten von ALL Patienten bisher nur eine geringe Anzahl an Genvarianten aufgedeckt (z.B. IKZF1, ARIDB5, CEBPE, DDC und CDKN2A) (Papaemmanuil et al., 2009; Prasad et al., ; Sherborne et al., ; Trevino et al., 2009), die die genomische Suszeptibilität beeinflussen, obwohl ihr individueller Beitrag eher als moderat anzusehen ist. Diese Genvarianten sind tendenziell eher an Signalwegen beteiligt, die B-Zell-Entwicklung und B-Zell-Differenzierung kontrollieren, jedoch ist die genaue Art und Weise wie diese Gene das Risiko, eine ALL zu entwickeln, beeinflussen weiterhin unbekannt. Schließlich muss ein weiterer Mechanismus in Betracht gezogen werden und dies sind epigenetische Veränderungen. Hierunter versteht man die Modifikation von Histonen und DNA, die die Genexpression regulieren. Dies geschieht auf eine Art und Weise die klonal und vererbbar ist, jedoch ohne die DNA Sequenz zu verändern.

Die meisten GEMMs die wir zuvor für die ALL beschrieben haben und denen der Funktionszugewinn eines Gens zugrunde liegt, haben zum Ziel humane ALL-assoziierte Onkogene in definierten zellulären Kompartimenten und spezifischen Entwicklungsstadien des murinen hämatopoetischen Systems ektop zu exprimieren. Vom technischen Standpunkt aus gesehen kann die ektope Expression von Onkogenen (im Kontext der GEMMs) durch Transgenese (entweder mit klassischen Vektoren oder mit Vektoren, die von Bacterial Artificial Chromosomes (BAC) abstammen) oder durch gezielte knock-in Insertion des gewünschten Onkogens, an einen bestimmten Ort im Mausgenom erfolgen. Der klassische transgene Ansatz bietet den Vorteil, dass er technisch relativ einfach ist. Jedoch gibt es mehrere Einschränkungen, die von der Insertionsmutagenese und der Anzahl der Genkopien abhängig und unvorhersehbar sind. Darüberhinaus benötigt es die Charakterisierung mehr als einer Linie, um die Reproduzierbarkeit des beobachteten Phänotyps zu bestätigen. BAC Transgenese bietet eine raffinierte Kontrolle über die Expression des ektopen Gens und ist unabhängig von den Effekten der Insertionsmutagenese, jedoch ist es auch die kompliziertere Technik. Aus diesem Grunde bietet die gerichtete knock-in Insertion eines Gens, das ektop exprimiert werden soll, obwohl es der Homologen Rekombination in murinen ES Zellen bedarf, die beste Kontrolle über die Genexpression. Diese Technik erlaubt eine singuläre Insertion in einem spezifischen Locus und sie kann mit Cre, Frt oder Tet Technologie kombiniert werden, um zeitliche und zelluläre Kontrolle über die Genexpression zu erreichen.

B.2.4.2.2. Knock-out Technik.

Wie wir bereits erwähnt haben ist der partielle oder komplette Funktionsverlust mehrerer Gene, die für die Zell-Entwicklung und den Zellzyklus von Bedeutung sind, in humanen ALL Proben gezeigt. Aus diesem Grund sollte es uns die Einführung solcher Funktionsverlustmutationen in die Keimbahn der Maus erlauben, in Kombination mit der Expression des ersten Leukämie-initiiierenden Onkogens, einen tieferen Einblick in die exakte Funktionsweise, über die diese Geninaktivierungen an der Evolution der Erkrankung teilhaben und das Ansprechen auf die Therapie beeinflussen, zu erhalten. In diesem Zusammenhang kann der knock-out spezifischer Gene auf eine Art konstitutiv oder eher kontrolliert (und in diesem Zusammenhang wünschenswert) und induzierbar erfolgen. Dies sollte auf Grund der Tatsache erfolgen, dass der Funktionsverlust eines Gens in den meisten Fällen nach der ersten auslösenden onkogenen Mutation stattfindet.

Diese Diskussion führt uns zu dem nächsten entscheidenden Punkt, der in diesem Kontext zu beachten ist: Auf Grund unseres neuesten Wissensstandes, ist der zelluläre Kontext in dem die Onkogene wirken mindestens genauso bedeutend wie das Onkogen selbst. Wie wir bereits angemerkt haben, ist dies in der Tat einer der wichtigsten Aspekte die kürzlich eine Änderung unseres Verständnisses hinsichtlich der Biologie maligner Erkrankungen im Menschen bewirkt haben. Daher muss, wenn man versucht die humane Krebserkrankung in der Maus nachzustellen, die Aktivierung und biologische Funktion der genetischen Mutation sowohl vom zeitlichen als auch vom zellulären Standpunkt aus gesehen vorsichtig kontrolliert werden. Folglich müssen die verwendeten regulatorischen Abläufe mit Bedacht ausgewählt werden, um ektop exprimierte und mit der humanen ALL assoziierte Onkogene zu kontrollieren. Eine Möglichkeit, die es erlaubt das initiale Onkogen in der richtigen Zellpopulation zu exprimieren, ist die Verwendung der homologen Rekombination in ES Zellen. Mit dieser Technik wird das Gen an derselben Stelle im Genom eingesetzt, an der die Wild-Typ Sequenz des Protoonkogens oder das Fusionsgens lokalisiert sind. Werden durch „gene targeting“ veränderte ES-Zellen in die Blastozyste injiziert, gehen daraus Chimären hervor, in denen nur in einem Prozentsatz der Zellen eine einzige Kopie des Onkogens exprimiert ist. Folglich müssen die Chimären daraufhin getestet werden in wieweit die initiale onkogene

Mutation ausreichend ist die Leukämie auszulösen (Castilla et al., 1996; Castellanos et al., 1997; Yergeau et al., 1997; Okuda et al., 1998; Castilla et al., 1999; Dobson et al., 1999). Dies zeigten Studien für Bcr-ABLp190 oder für MLL-AF9, die die onkogenen Eigenschaften und die Linienspezifität dieser Gene untersuchten. Corral und Castellanos konnten zeigen, dass Bcr-ALBp190 und Mll-AF9 ausreichend sind um eine Leukämie auszulösen, wenn sie von dem richtigen endogenen Promoter exprimiert werden (Castellanos et al., 1997; Corral et al., 1996). Trotz dieser Befunde ist es eine Einschränkung dieses knock-in Modells, dass nur die Chimären lebensfähig sind. Dies zeigt deutlich die Toxizität der Onkogene, wenn Sie im ganzen Organismus exprimiert sind. Außerdem zeigen diese Daten, dass die Leukämogenität einiger dieser Gene sich nur dann durchsetzen kann, wenn sie als sporadische Mutationen auftreten und nicht über die Keimbahn übertragen werden.

B.2.4.2.3. Konditionelle Expressionstechnik.

Keimbahnmutationen scheinen nicht geeignet zu sein, um die sporadische Leukämie darzustellen. Eine Lösung ist die Kontrolle des zeitlichen und zellulären Fensters der Onkogenexpression, entweder durch strenge Kontrolle der Art und/oder der Anzahl der Zellen die es exprimieren, oder indem man die genetische Läsion konditionell einbringt und diese später entweder zellspezifisch und/oder zeitlich aktiviert werden kann. Mit der aktuell modernsten Technologie ist dies möglich, indem man induzierbare und linienspezifische Rekombinasen verwendet, wie die Cre-Rekombinase des P1 Bakteriophagen oder die FLP Rekombinase aus der Hefe. Wenn man diese Systeme verwendet ist es möglich, dass man inter- und intra-spezifische chromosomale Rearrangements generiert, die auf molekulargenetischem Niveau ziemlich genau das widerspiegeln, was beim Menschen geschieht. Trotzdem ist auch in diesen konditionellen knock-in Modellen der resultierende Leukämiephänotyp von der gewebsspezifischen Abfolge der Expression der Rekombinase abhängig (Forster et al., 2003).

B.2.4.2.4. Xenograftmodelle.

Neben den GEMMs existieren für die Untersuchung der Leukämien die Xenograftmodelle, welche Vorteile jedoch auch Nachteile mit sich bringen. Xenograftmodelle bieten den großen Vorteil, dass Blastenpopulationen aus primären Patientenproben oder gesunde hämatopoetische Stammzellen aus Nabelschnurblut, Knochenmark oder periphere Blutstammzellen, transduziert mit dem Transgen von Interesse in diesen Tieren repopulieren können. Zur Verfügung stehen unterschiedliche Xenograftmodelle, die sich im Grad der Immunkompetenz unterscheiden. Es stehen beispielsweise NOD/SCID Modelle mit ausgeprägter Immundefizienz, sowie verbesserte NOD/SCID/IL2Rnull Tiere zur Verfügung die zusätzlich durch einen starken Defekt der angeborenen Immunität, sowie einem Fehlen der natürlichen Killerzellen charakterisiert sind.

Der große Nachteil ist jedoch, dass erstens auf Grund des Fehlens der angeborenen und erworbenen Immunität immunmodulierende Agens nur bedingt getestet werden können. Zweitens ist die Bedeutung des Mikroenvironments in der hämatopoetischen Nische, welches wahrscheinlich besonders für die Pathogenese der Leukämien von Bedeutung ist, nur unzureichend beurteilbar. Die unterschiedliche Metabolisation von z.B. Therapeutika auf Grund der speziesspezifischen Unterschiede muss ebenfalls bedacht werden. Schlussendlich bestehen eindeutige Unterschiede in muriner und humaner Toleranz hinsichtlich der Entwicklung von Therapeutika.

B.2.4.3. Vor- und Nachteile der unterschiedlichen murinen Modelle.

Rekapitulierend sehen wir, dass es trotz aller technischen Möglichkeiten die uns heutzutage für die Kontrolle ektopter Onkogenexpression zur Verfügung stehen, immer noch das wichtigste Kriterium ist von der humanen Erkrankung und aus vorausgegangenen Fehlern zu lernen und zu versuchen dementsprechend die experimentellen Ansätze zu entwickeln. Die genetischen Alterationen, die in der humanen Leukämie gefunden wurden scheinen zu bestimmten Zeitpunkten der zellulären Entwicklung stattzufinden und auf eine kleine Anzahl von Zellen beschränkt zu sein. In einigen Fällen ist die Krebsstammzelle eine Stamm- oder Vorläuferzelle jedoch in vielen Fällen am wahrscheinlichsten eine bereits

differenzierte Zelle. Das Schicksal einer Leukämienstammzelle wird im Endeffekt aus der Kombination aus ihrer Reprogrammierbarkeit durch das Onkogen und der Plastizität der Zielzelle (z.B. ihre Prädisposition für die Reprogrammierung des Tumors) bestimmt. Da unterschiedliche Zellen, unterschiedliche Suszeptibilitäten für das Reprogrammieren darstellen und auch die unterschiedlichen Onkogene unterschiedliche Fähigkeiten besitzen eine Zelle zu reprogrammieren, ist das gezielte Einbringen der leukämischen Alteration in die falsche Zellpopulation die wahrscheinlichste Ursache für das Versagen muriner Modelle die humane Krebserkrankung wiederzuspiegeln.

Über die gerade angesprochenen strikt wissenschaftlichen und technologischen Aspekte hinaus, gibt es weitere Elemente die man berücksichtigen muss, wenn man das „ideale“ Tiermodell der akuten Leukämie entwickeln möchte. In diesem Abschnitt haben wir uns hauptsächlich auf GEMMs fokussiert, da ihre Reproduzierbarkeit zwischen verschiedenen Laboratorien und die Vielseitigkeit des genetischen Entwicklungsmöglichkeiten im Gegensatz zu zielgerichteteren Systemen, wie retroviraler Transduktion und primärer Xenograftmodelle vergleichsweise überlegen ist. Diese Ansätze zeigen sehr viel Potential für die Grundlagenforschung und haben den Weg für grundlegende Entdeckungen hinsichtlich der Biologie der Erkrankung geebnet. Sie zeigen dennoch zahlreiche methodische und wissenschaftliche Fallstricke und sie sind für das Screening von Medikamenten und ihren Einsatz als präklinisches Modell sehr schwierig (fast unmöglich) zu standardisieren.

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse unter Verwendung der GEMMs ist sehr stark von der verwendeten murinen Linie abhängig, da die unterschiedlichen Linien stark in ihren relevanten Parametern variieren. Jedoch kann dieser offensichtliche Schwachpunkt auch als potentes Werkzeug verwendet werden, um die Suszeptibilität bestimmter krankheitsrelevanter Gene zu untersuchen. Sieht man dies als Vorteil an, so können GEMMs mit kontrollierter genetischer Variabilität durch das Rückkreuzen zweier Mauslinien (einer resistenten und einer suszeptiblen) generiert werden. Man macht dies, um mit einem integrativen system-biologischen Ansatz niedrig suszeptible Gene, die die Variabilität zwischen den verschiedenen Patienten mit ALL regulieren, zu identifizieren.

C Diskussion

C.1. Generelle Diskussion verfügbarer muriner Modelle einschließlich sinnvoller Optionen für weitere Verbesserungen.

Aus diesem Bericht wird deutlich, dass eine große Anzahl gentechnisch veränderter Mausmodelle mit dem Ziel entwickelt wurde, die Eigenschaften der humanen ALL in einem experimentellen Modellsystem darzustellen. Diese Tatsache reflektiert zwei unterschiedliche, jedoch komplementäre Aspekte. Auf der einen Seite gibt es viele unterschiedliche Formen der ALL wobei die molekularen und zellulären Mechanismen, die für die Entstehung der Erkrankung verantwortlich sind sehr unterschiedlich sind. Somit ist es sehr schwierig ein universelles Modell zu finden, das für die Untersuchung der ALL im Allgemeinen angewendet werden kann. Der andere Aspekt ist, dass auf Grund unseres Bestrebens die Erkrankung zu reproduzieren eine Vielzahl an Modellen zur Verfügung steht und dies wiederum zeigt, dass wir die Erkrankung einfach noch nicht gut genug verstehen, um sie im Modell darzustellen. Wie Richard Feynmann sagte: "What I cannot create, I do not understand". Der springende Punkt ist, dass wir sehr wahrscheinlich über die Untersuchung von Patientenproben hinaus nur durch die Entwicklung neuer Tiermodelle mehr über die Erkrankung erfahren können.

Das Ziel dieses Berichtes ist es die wichtigsten Leitfäden aufzuzeigen, die man bedenken sollte, wenn man ein „ideales“ Tiermodell entwickeln möchte. Das Modell sollte als Standardmodell für die Erforschung der humanen Leukämie gelten und von unterschiedlichen Forschergruppen und z.B. Pharmafirmen gleichermaßen verwendet werden können. Ziel ist es einheitliche Kriterien für die Testung von Medikamenten zu definieren, umweltbedingte Risikofaktoren zu analysieren oder die Bedeutung von Mutationen mit niedriger Penetranz zu untersuchen. Darüberhinaus dürfen wir nicht vergessen, dass es unser schlussendliches Ziel sein sollte in der Maus, die gesamten molekularen, zellulären, gewebsspezifischen und organischen Eigenschaften der humanen B-ALL nachzustellen. Eingeschlossen sollten hier die Initiierung, die Progression, die Evolution, das Therapieansprechen und eventuell die Heilung oder der Rückfall sein. Diese Modelle sollten zusätzlich ähnliche

histologische Charakteristika zeigen, wie die, die beim Menschen beobachtet werden, sollten die selben Stadien durchlaufen, die selben systemischen Effekte bewirken, die die Leukämie im Patienten auslöst, die selben genetischen Signalwege einbeziehen, die an der Tumorentstehung und Progression beteiligt sind, und das selbe Therapieansprechen auf aktuelle Therapieoptionen zeigen. Aus diesem Grunde möchten wir diese Ziele unter Berücksichtigung der beiden Aspekte, die wir zuvor angesprochen haben diskutieren.

Es ist eindeutig, dass die ALL nicht einfach nur eine Erkrankung ist, sondern vielmehr eine Gruppe von Erkrankungen, an der viele unterschiedliche Gene beteiligt sind und dies resultiert in sehr unterschiedlichen Krankheitsbildern. Aus diesem Grund kann man sich nicht nur auf einen Subtyp beschränken. Dennoch muss man Vereinfachungen definieren, um bestimmte Kriterien vereinheitlichen zu können. Unserer Meinung nach ist es somit angemessen, wenn man versucht die Leukämien in drei Gruppen zu unterteilen: Säuglingsleukämien, kindliche B-ALLs und kindliche T-ALLs.

Säuglingsleukämien können durch eines der am besten charakterisierten Mausmodelle dargestellt werden, nämlich das Modell der MLL positiven Translokation. Eines der erfolgreichsten Modelle der MLL-AF4-assoziierten humanen B-ALL im Säuglingsalter wurde von Krivtsov et al. (Krivtsov et al., 2008) entwickelt. Sie entwickelten ein konditionelles knock-in Modell, in dem *AF4* eine loxP-flankierte STOP Kasette vorgeschaltet wurde und in den *Mll* Locus eingefügt wurde. Dieser Ansatz wurde mit einer interferon-induzierbaren, pan-hämatopoetischen Mx1-Cre Linie kombiniert (Kuhn et al., 1995). Dreiundsechzig Prozent dieser Mäuse entwickelten akute Leukämien, und nicht-supervidierte Microarray Analysen zeigten, dass die Mehrzahl von ihnen einen pre-B-Zell ähnlichen Phänotyp zeigten. Darüberhinaus legen neuere Studien nahe, dass MLL Fusionsproteine Genexpression durch die Rekrutierung der Histon H3 lysine79 (H3K79) Methyltransferase DOT1L (Bernt et al., 2011; Okada et al., 2005) kontrollieren können. Zusätzlich, wenn man Leukämiezellen der konditionellen *Mll-AF4* Mäuse mit den humanen vergleicht, zeigten Krivtsov et al. (Krivtsov et al., 2008) dass H3K79 Methylierung an vielen Loci gleichsam erhöht ist, und dass diese erhöhten Messwerte mit erhöhter Genexpression korrelieren. Aus diesem Grunde könnte

dies ein gutes Modell sein, um einige der Haupteigenschaften der Säuglingsleukämien zusammenzufassen. Darüberhinaus könnte die Kombination mit anderen Cre Linien hilfreich sein, um die Frage der Ursprungszelle zu beantworten und die phänotypischen Charakteristika der Säuglings-ALL in diesen Mäusen zu verbessern.

Soweit es die T-ALLs betrifft sind die Modelle, die am besten und detailgetreuesten analysiert und charakterisiert sind, die in denen die *LMO1* oder *LMO2* Onkogene unter der Kontrolle der regulatorischen Sequenzen der T-Zell spezifischen Gene wie *CD2* exprimiert sind (Larson et al., 1994; Larson et al., 1996; Larson et al., 1995). Die bedeutendste Eigenschaft dieser Modelle ist nicht, dass sie (mit einer gewissen Latenz) T-Zelleukämien entwickeln, sondern dass sie eine präleukämische Phase zeigen die die Selbsterneuerung präleukämischer Thymozyten mehr als acht Monate vor der Entstehung der T-ALL zeigen. Somit werden HSZ ähnliche Eigenschaften in den T-Zellprogenitoren die der Leukämie vorausgehen induziert (Cleveland et al., 2013; McCormack et al., 2010). Aus diesem Grunde können diese Modelle dazu geeignet sein die präleukämische Phase sowie die potentielle Beteiligung von Umweltfaktoren und anderen Mutationen mit niedriger Penetranz zu untersuchen.

Um beispielhaft die kindliche B-ALL darzustellen ist ohne Zweifel die häufigste, am besten repräsentierte und am besten untersuchte Untergruppe die TEL-AML1 positive Leukämie. Wenn man versucht ein geeignetes Mausmodell für diese Erkrankung auszuwählen, sehen wir uns dennoch dem zweiten Problem gegenüber das wir zu Beginn erwähnt haben: Wir kennen die Biologie der Erkrankung immer noch nicht gut genug. Eines der Beispiele das wir bereits im Haupttext angeführt haben zeigt diesen Punkt besonders gut: Wir kennen immernoch nicht mit Sicherheit die Prävalenz der Translokation $t(12;21)$ in der Bevölkerung. Angenommen die Prävalenz ist hoch, jedoch nur einige der Träger entwickeln die Erkrankung, wie es von Mori et al. (Mori et al., 2002) postuliert wurde, dann sollte es keine Überraschung sein dass GEMMs, die die TEL-AML1 Fusion tragen auch nur eine geringe Tendenz zur Entwicklung der B-ALL zeigen. Unter diesen Voraussetzungen, wird die Art und Inzidenz der zweiten Mutation(en) zum zentralen die Leukämie auslösenden Ereignis. Die Translokation $t(12;21)$ kann somit fast als ein Allel mit erhöhter Suszeptibilität, jedoch mit moderatem finalem Einfluss auf die Entstehung der

Erkrankung gedeutet werden. Auch in diesem Falle ist es offensichtlich, dass ein geeignetes Modell, das die Ursprungsmutation trägt von essentieller Bedeutung ist, um alle kooperierenden Zweitmutationen zu untersuchen. Dennoch macht es die Art der Erkrankung schwierig in diesem Zusammenhang mögliche entscheidende Faktoren auf Grund negativer Ergebnisse aus Tiermodellen auszuschließen. Andererseits, wenn die Prävalenz der Translokation t(12;21) gering ist (z.B. wenn die Meisten der Translokation t(12;21) Träger eine B-ALL entwickeln), dann ist es eindeutig, dass die aktuell existierenden TEL-AML1 Mausmodelle unzureichend sind, da sie keine hohe Tendenz zur Leukämieentstehung aufweisen. Aus diesem Grunde und trotz der Tatsache, dass die TEL-AML1+ Leukämie eine der am besten charakterisierte humane Krebserkrankung ist versagen die bestehenden GEMMs darin die Erkrankung zu rekapitulieren. Somit ist es schwierig unter den bestehenden Modellen eines auszuwählen. Generell, wenn man all die Modelle der Leukämie, die wir beschrieben haben in Betracht zieht, gibt es einen Aspekt auf genetischer Ebene, der immer noch ungelöst ist. Auch wenn der Phänotyp ziemlich gut einige Aspekte der humanen Erkrankung widerspiegelt, ist es immer noch unbekannt, auf welche Art und Weise initiierende Mutationen in der humanen Leukämie akquiriert werden, und wie sie von einer Subpopulation von Zellen während der präleukämischen Phase aufrechterhalten werden.

C.2. Diskussion noch nicht verfügbarer Modelle fokussiert auf die akute B-lymphoblastische Leukämie.

Bis vor Kurzem, lag für die experimentelle Darstellung der Krebserkrankung der Hauptfokus auf dem Onkogen und man ging ausschließlich davon aus, dass einzig das Onkogen für die Tumorentstehung benötigt wird. Der zelluläre Kontext in dem das Onkogen seine Wirkungsweise entfaltet wurde als selbstverständlich angesehen. Ebenfalls wurde bisher angenommen, dass die Ursprungszelle der Krebserkrankung mit dem am nächsten gelegenen nicht-pathologischen Zelltyp korreliert und den Hauptanteil des humanen Tumors darstellt. Auch jegliche Auswirkung der Tumorprogression, der intratumoralen klonalen Heterogenität, und die möglicherweise entstehende Bedeutung des Onkogens während der Tumorentwicklung und -expansion wurden weitestgehend ignoriert. Somit ist es

selbstverständlich, dass diese Aspekte in die Entwicklung neuer Mausmodelle aufgenommen werden müssen.

Das bedeutet nicht, dass das Onkogen nicht essentiell ist und Leukämien sind ein eindeutiges Beispiel dafür, dass jede spezifische genetische Veränderung fast immer mit einem einzigartigen Phänotyp des Tumors einhergeht. Unabhängig von der intratumoralen Variabilität gibt es in den meisten Leukämien eine eindeutig initiiierende genetische Läsion, nämlich die, die spezifisch mit dem Phänotyp der Leukämie assoziiert ist. Somit gibt es, über die Existenz von Zweitmutationen und daraus entstehender Klone hinaus, immer eine eindeutige Beziehung zwischen der initiierenden Mutation und dem Tumorphänotyp. Trotzdem kann das Onkogen, nur wenn es in dem richtigen Zelltyp aktiv wird den entscheidenden Phänotyp auslösen. Diese Ursprungszelle muss keine phänotypische Übereinstimmung mit den Zellen zeigen, die später die große Masse des Tumors repräsentieren. Ein gutes Beispiel ist die chronisch myeloische Leukämie die durch die BCR-ABL Translokation gekennzeichnet ist und über die die Erkrankung auch definiert wird. Seine ersten onkogenen Effekte übt BCR-ABL in frühen Progenitor-/Stammzellen aus und trotzdem manifestiert sich die Erkrankung erst durch Veränderungen in der Proliferation und Differenzierung von granulozytären Zellen (Jamieson et al., 2004) .

Ein weitere Punkt ist, dass die erste genetische Mutation, die in der humanen Leukämie gefunden wird, nur zu ganz bestimmten Zeitpunkten stattzufinden scheint, und beschränkt ist auf eine begrenzte Anzahl an Zellen. Dennoch, in diesem begrenzeten Zeitfenster, führt die Kombination aus der Reprogrammierungskapazität des Tumors durch das Onkogens und die intrinsische Plastizität der Zielzelle schlussendlich zur Entstehung der Leukämie (oder präleukämischen Stammzelle). Die Fähigkeit eines Onkogens Zellen zu reprogrammieren suggeriert, dass sie zur Entstehung der Krebserkrankung beitragen indem sie das Epigenom der richtigen Zielzelle reprogrammieren (Krizhanovsky and Lowe, 2009; Perez-Caro et al., 2009; Vicente-Duenas et al., 2013). Dies schließt ein, dass Onkogene, weder über alle tumoralen Populationen hinweg noch zu jedem Zeitpunkt der Krebsentstehung eine homogene Funktionsweise aufweisen.

Auf Grund dieser Ergebnisse können wir schlussfolgern, dass Mausmodelle, in denen die initiierende onkogene Mutation nicht in der richtigen Ursprungszelle

stattfindet (und das ist normalerweise in den meisten verfügbaren Mausmodellen der Fall) die humane Erkrankung wahrscheinlich nicht detailgetreu darstellen können. In der Tat besitzen nicht alle Zellen die selbe Suszeptibilität zur Reprogrammierung und nicht alle Onkogene weisen das selbe Potential auf diese Zellen zu reprogrammieren. Wenn also die Expression des Onkogens im falschen zellulären Kompartiment stattfindet führt dies zu einem unzuverlässigen Modell der Leukämie. Kürzlich publizierte Ergebnisse aus Mausmodellen der Hämatopoese haben gezeigt, dass in der Tat humane Onkogene die zelluläre Bestimmung früher Progenitoren in maligne Zellen reprogrammieren können, während zur selben Zeit die Expression des Onkogens nicht länger in den Tumorzellen benötigt wird (Vicente-Duenas et al., 2013).

Dies ist jedoch immer noch nicht identisch zu dem was wir beim Menschen beobachten, auch wenn die Onkogenexpression gezielt im Stamm-/Progenitorkompartiment stattfindet. Beim Patienten tragen alle Abkömmlinge der initial mutierten Zelle die initiale Mutation (und exprimieren sie wahrscheinlich) auch wenn sie in einem vorübergehenden präleukämischen Zustand verweilen. Im Falle der ALLs sind initiierende Mutationen die in utero auftreten schwer im peripheren Blut von nicht erkrankten Trägern nachzuweisen, da der Beitrag der präleukämischen Zelle zu den reifen hämatopoetischen Kompartimenten begrenzt ist. Dies ist jedoch in den meisten bisher existierenden Modellen, in denen die transgene Läsion, wenn sie aktiviert ist auf alle Abkömmlinge der Zielzelle übertragen wird (und in der Mehrzahl der Fälle auch exprimiert wird) nicht der Fall. Aus diesem Grunde muss die onkogene Expression auf das richtige zelluläre Kompartiment beschränkt werden und "off-target" Expression vor und nach Auslösung des leukämogenen Effekts in der Zielzelle vermieden werden. Um dies mit aktuellen Technologien zu erreichen sollte es der nächste Schritt sein konditionelle Modelle, in denen der onkogene Defekt durch die Verwendung von Stamm- und Progenitor-spezifischen Cre Linien aktiviert werden kann zu entwickeln.

Im Falle der B-ALLs sollten die Cre Linien auf die hämatopoetischen Stamm/Progenitorkompartimente beschränkt sein. Jedoch, soweit uns bekannt ist, gibt es nicht einen in der Literatur beschriebenen Promoter der ausschließlich auf das hämatopoetische Stammzellkompartiment beschränkt ist. Alle von ihnen, (eingeschlossen Tie-2, HoxB4, Tek, Vav, CD41, Thy1, Sca1/Ly6E.1) sind in HSZ aber auch in anderen aus ihnen hervorgehenden Linien exprimiert. Diese "off-target"

Effekte können, wenn man versucht sich präzise auf eine spezifische zelluläre Subpopulation zu konzentrieren in dem aktuellen Kontext unerwünscht sein. Aus diesem Grunde sollten neue Cre Linien mit der gewünschten Spezifität entwickelt werden, indem man besonders genau die regulatorischen Elemente definiert, die HSZ spezifische Cre-Expression bestimmen.

Man kann etwas ähnliches diskutieren, wenn man die Elemente auswählt, die die Expression des Onkogens auslösen (unabhängig von der Tatsache, dass Sie Cre induzierbar sein sollten). Idealerweise, könnte man in einem ersten Schritt an knock-in Ansätze denken, die die beste Möglichkeit bieten das genaue Muster der Onkogenexpression wiederzugeben. Denn, wie wir im Falle der MLL-AF9 Translokation angemerkt haben kann dies auch ungewollte Variabilität bzgl des Expressionsniveaus zwischen den unterschiedlich entwickelten Kompartimenten auslösen. Dies bezieht sich vor allem auf Unterschiede in den leukämogenen Eigenschaften, da die Beziehungen zwischen der Stärke des Onkogens und der zellulären Suszeptibilität zur Transformation zwischen den Progenitorzellen und HSZ sehr unterschiedlich ist (Chen et al., 2008). Auch wenn es nicht offensichtlich erscheint, kann es passieren, dass das richtige Expressionsmuster (wenn man die humane ALL in der Maus darstellen möchte) in bestimmten Fällen durch andere Promotoren besser abgebildet wird, als durch die endogene murine regulatorische Sequenz (auch da Genregulation zwischen der Maus und dem Menschen unterschiedlich sein kann). Einmal mehr muss die Suche nach diesen regulatorischen Elementen hauptsächlich empirisch sein, wird aber ohne jeden Zweifel profitable sein.

Zusammenfassend, sind verbesserte Mausmodelle notwendig, die all unser heutiges Wissen über die Biologie der Erkrankung berücksichtigen (und sehr wichtig, auch alles bemerken was wir bisher ignoriert haben). Die neuen gentechnischen Methoden erlauben eine noch nie dagewesene Möglichkeit die Genexpression in der Maus zu kontrollieren. Ihre Verwendung in Kombination mit unserem Wissen über die Biologie der Leukämie die wir bisher aus Untersuchungen am Menschen und der Maus erhalten haben, sollte es uns erlauben neue verbesserte Modelle zu entwickeln, die uns hoffentlich helfen diese Pathologie zu verstehen und zu behandeln.

Literatur:

- Adams, J. M., A. W. Harris, C. A. Pinkert, L. M. Corcoran, W. S. Alexander, S. Cory, R. D. Palmiter, and R. L. Brinster, 1985, The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice: *Nature*, v. 318, p. 533-8.
- Aifantis, I., E. Raetz, and S. Buonamici, 2008, Molecular pathogenesis of T-cell leukaemia and lymphoma: *Nat Rev Immunol*, v. 8, p. 380-90.
- Andreasson, P., J. Schwaller, E. Anastasiadou, J. Aster, and D. G. Gilliland, 2001, The expression of ETV6/CBFA2 (TEL/AML1) is not sufficient for the transformation of hematopoietic cell lines in vitro or the induction of hematologic disease in vivo: *Cancer Genet Cytogenet*, v. 130, p. 93-104.
- Aplan, P. D., C. A. Jones, D. S. Chervinsky, X. Zhao, M. Ellsworth, C. Wu, E. A. McGuire, and K. W. Gross, 1997, An scl gene product lacking the transactivation domain induces bony abnormalities and cooperates with LMO1 to generate T-cell malignancies in transgenic mice: *EMBO J*, v. 16, p. 2408-19.
- Arai, S., A. Yoshimi, M. Shimabe, M. Ichikawa, M. Nakagawa, Y. Imai, S. Goyama, and M. Kurokawa, 2011, Evi-1 is a transcriptional target of mixed-lineage leukemia oncoproteins in hematopoietic stem cells: *Blood*, v. 117, p. 6304-14.
- Armstrong, S. A., A. L. Kung, M. E. Mabon, L. B. Silverman, R. W. Stam, M. L. Den Boer, R. Pieters, J. H. Kersey, S. E. Sallan, J. A. Fletcher, T. R. Golub, J. D. Griffin, and S. J. Korsmeyer, 2003, Inhibition of FLT3 in MLL. Validation of a therapeutic target identified by gene expression based classification: *Cancer Cell*, v. 3, p. 173-83.
- Ashworth, T. D., W. S. Pear, M. Y. Chiang, S. C. Blacklow, J. Mastio, L. Xu, M. Kelliher, P. Kastner, S. Chan, and J. C. Aster, 2010, Deletion-based mechanisms of Notch1 activation in T-ALL: key roles for RAG recombinase and a conserved internal translational start site in Notch1: *Blood*, v. 116, p. 5455-64.
- Aspland, S. E., H. H. Bendall, and C. Murre, 2001, The role of E2A-PBX1 in leukemogenesis: *Oncogene*, v. 20, p. 5708-17.
- Becker, A. J., C. E. Mc, and J. E. Till, 1963, Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells: *Nature*, v. 197, p. 452-4.
- Bellavia, D., A. F. Campese, E. Alesse, A. Vacca, M. P. Felli, A. Balestri, A. Stoppacciaro, C. Tiveron, L. Tatangelo, M. Giovarelli, C. Gaetano, L. Ruco, E. S. Hoffman, A. C. Hayday, U. Lendahl, L. Frati, A. Gulino, and I. Screpanti, 2000, Constitutive activation of NF-kappaB and T-cell leukemia/lymphoma in Notch3 transgenic mice: *EMBO J*, v. 19, p. 3337-48.
- Bellavia, D., A. F. Campese, S. Checquolo, A. Balestri, A. Biondi, G. Cazzaniga, U. Lendahl, H. J. Fehling, A. C. Hayday, L. Frati, H. von Boehmer, A. Gulino, and I. Screpanti, 2002, Combined expression of pTalpha and Notch3 in T cell leukemia identifies the requirement of preTCR for leukemogenesis: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 99, p. 3788-93.
- Bernardin, F., Y. Yang, R. Cleaves, M. Zahurak, L. Cheng, C. I. Civin, and A. D. Friedman, 2002, TEL-AML1, expressed from t(12;21) in human acute lymphocytic leukemia, induces acute leukemia in mice: *Cancer Res*, v. 62, p. 3904-8.
- Bernt, K. M., N. Zhu, A. U. Sinha, S. Vempati, J. Faber, A. V. Krivtsov, Z. Feng, N. Punt, A. Daigle, L. Bullinger, R. M. Pollock, V. M. Richon, A. L. Kung, and S. A. Armstrong, 2011, MLL-rearranged leukemia is dependent on aberrant H3K79 methylation by DOT1L: *Cancer Cell*, v. 20, p. 66-78.
- Bijl, J., J. Kros, C. E. Lebert-Ghali, J. Vacher, N. Mayotte, and G. Sauvageau, 2008, Evidence for Hox and E2A-PBX1 collaboration in mouse T-cell leukemia: *Oncogene*, v. 27, p. 6356-64.

- Bijl, J., M. Sauvageau, A. Thompson, and G. Sauvageau, 2005, High incidence of proviral integrations in the Hoxa locus in a new model of E2a-PBX1-induced B-cell leukemia: *Genes Dev*, v. 19, p. 224-33.
- Bonnet, D., and J. E. Dick, 1997, Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell: *Nat Med*, v. 3, p. 730-7.
- Bradley, T. R., and D. Metcalf, 1966, The growth of mouse bone marrow cells in vitro: *Aust J Exp Biol Med Sci*, v. 44, p. 287-99.
- Brinster, R. L., H. Y. Chen, A. Messing, T. van Dyke, A. J. Levine, and R. D. Palmiter, 1984, Transgenic mice harboring SV40 T-antigen genes develop characteristic brain tumors: *Cell*, v. 37, p. 367-79.
- Brinster, R. L., H. Y. Chen, M. Trumbauer, A. W. Senear, R. Warren, and R. D. Palmiter, 1981, Somatic expression of herpes thymidine kinase in mice following injection of a fusion gene into eggs: *Cell*, v. 27, p. 223-31.
- Brown, D., S. Kogan, E. Lagasse, I. Weissman, M. Alcalay, P. G. Pelicci, S. Atwater, and J. M. Bishop, 1997, A PMLRARA α transgene initiates murine acute promyelocytic leukemia: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 94, p. 2551-6.
- Brown, P., 2011, TEL-AML1 in cord blood: 1% or 0.01%?: *Blood*, v. 117, p. 2-4.
- Bruce, W. R., and H. Van Der Gaag, 1963, A Quantitative Assay for the Number of Murine Lymphoma Cells Capable of Proliferation in Vivo: *Nature*, v. 199, p. 79-80.
- Buckner, C. D., R. B. Epstein, R. H. Rudolph, R. A. Clift, R. Storb, and E. D. Thomas, 1970, Allogeneic marrow engraftment following whole body irradiation in a patient with leukemia: *Blood*, v. 35, p. 741-50.
- Buffler, P. A., M. L. Kwan, P. Reynolds, and K. Y. Urayama, 2005, Environmental and genetic risk factors for childhood leukemia: appraising the evidence: *Cancer Invest*, v. 23, p. 60-75.
- Buonamici, S., D. Li, Y. Chi, R. Zhao, X. Wang, L. Brace, H. Ni, Y. Sauntharajah, and G. Nucifora, 2004, EVI1 induces myelodysplastic syndrome in mice: *J Clin Invest*, v. 114, p. 713-9.
- Bursen, A., K. Schwabe, B. Ruster, R. Henschler, M. Ruthardt, T. Dingermann, and R. Marschalek, 2010, The AF4.MLL fusion protein is capable of inducing ALL in mice without requirement of MLL.AF4: *Blood*, v. 115, p. 3570-9.
- Campos-Sanchez, E., A. Toboso-Navasa, I. Romero-Camarero, M. Barajas-Diego, I. Sanchez-Garcia, and C. Cobaleda, 2011, Acute lymphoblastic leukemia and developmental biology: a crucial interrelationship: *Cell Cycle*, v. 10, p. 3473-86.
- Carroll, A. J., W. M. Crist, M. P. Link, M. D. Amylon, D. J. Pullen, A. H. Ragab, G. R. Buchanan, R. S. Wimmer, and T. J. Vietti, 1990, The t(1;14)(p34;q11) is nonrandom and restricted to T-cell acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group study: *Blood*, v. 76, p. 1220-4.
- Castellanos, A., B. Pintado, E. Weruaga, R. Arevalo, A. Lopez, A. Orfao, and I. Sanchez-Garcia, 1997, A BCR-ABL(p190) fusion gene made by homologous recombination causes B-cell acute lymphoblastic leukemias in chimeric mice with independence of the endogenous bcr product: *Blood*, v. 90, p. 2168-74.
- Castor, A., L. Nilsson, I. Astrand-Grundstrom, M. Buitenhuis, C. Ramirez, K. Anderson, B. Strombeck, S. Garwicz, A. N. Bekassy, K. Schmiegelow, B. Lausen, P. Hokland, S. Lehmann, G. Juliusson, B. Johansson, and S. E. Jacobsen, 2005, Distinct patterns of hematopoietic stem cell involvement in acute lymphoblastic leukemia: *Nat Med*, v. 11, p. 630-7.
- Cazzaniga, G., F. W. van Delft, L. Lo Nigro, A. M. Ford, J. Score, I. Iacobucci, E. Mirabile, M. Taj, S. M. Colman, A. Biondi, and M. Greaves, 2011, Developmental origins and impact of BCR-

- ABL1 fusion and IKZF1 deletions in monozygotic twins with Ph+ acute lymphoblastic leukemia: *Blood*, v. 118, p. 5559-64.
- Chen, W., A. R. Kumar, W. A. Hudson, Q. Li, B. Wu, R. A. Staggs, E. A. Lund, T. N. Sam, and J. H. Kersey, 2008, Malignant transformation initiated by Mll-AF9: gene dosage and critical target cells: *Cancer Cell*, v. 13, p. 432-40.
- Chen, W., Q. Li, W. A. Hudson, A. Kumar, N. Kirchhof, and J. H. Kersey, 2006, A murine Mll-AF4 knock-in model results in lymphoid and myeloid deregulation and hematologic malignancy: *Blood*, v. 108, p. 669-77.
- Chen, W., M. G. O'Sullivan, W. Hudson, and J. Kersey, 2011, Modeling human infant MLL leukemia in mice: leukemia from fetal liver differs from that originating in postnatal marrow: *Blood*, v. 117, p. 3474-5.
- Cheng, Y., Z. Zhang, C. Slape, and P. D. Aplan, 2007, Cre-loxP-mediated recombination between the SIL and SCL genes leads to a block in T-cell development at the CD4⁻ CD8⁻ to CD4⁺ CD8⁺ transition: *Neoplasia*, v. 9, p. 315-21.
- Chervinsky, D. S., X. F. Zhao, D. H. Lam, M. Ellsworth, K. W. Gross, and P. D. Aplan, 1999, Disordered T-cell development and T-cell malignancies in SCL LMO1 double-transgenic mice: parallels with E2A-deficient mice: *Mol Cell Biol*, v. 19, p. 5025-35.
- Cleveland, S. M., S. Smith, R. Tripathi, E. M. Mathias, C. Goodings, N. Elliott, D. Peng, W. El-Rifai, D. Yi, X. Chen, L. Li, C. Mullighan, J. R. Downing, P. Love, and U. P. Dave, 2013, Lmo2 induces hematopoietic stem cell-like features in T-cell progenitor cells prior to leukemia: *Stem Cells*, v. 31, p. 882-94.
- Cobaleda, C., N. Gutierrez-Cianca, J. Perez-Losada, T. Flores, R. Garcia-Sanz, M. Gonzalez, and I. Sanchez-Garcia, 2000, A primitive hematopoietic cell is the target for the leukemic transformation in human philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia: *Blood*, v. 95, p. 1007-13.
- Cobaleda, C., W. Jochum, and M. Busslinger, 2007a, Conversion of mature B cells into T cells by dedifferentiation to uncommitted progenitors: *Nature*, v. 449, p. 473-7.
- Cobaleda, C., and I. Sanchez-Garcia, 2009, B-cell acute lymphoblastic leukaemia: towards understanding its cellular origin: *Bioessays*, v. 31, p. 600-9.
- Cobaleda, C., A. Schebesta, A. Delogu, and M. Busslinger, 2007b, Pax5: the guardian of B cell identity and function: *Nat Immunol*, v. 8, p. 463-70.
- Collier, L. S., C. M. Carlson, S. Ravimohan, A. J. Dupuy, and D. A. Largaespada, 2005, Cancer gene discovery in solid tumours using transposon-based somatic mutagenesis in the mouse: *Nature*, v. 436, p. 272-6.
- Collins, E. C., R. Pannell, E. M. Simpson, A. Forster, and T. H. Rabbitts, 2000, Inter-chromosomal recombination of Mll and Af9 genes mediated by cre-loxP in mouse development: *EMBO Rep*, v. 1, p. 127-32.
- Condorelli, G. L., F. Facchiano, M. Valtieri, E. Proietti, L. Vitelli, V. Lulli, K. Huebner, C. Peschle, and C. M. Croce, 1996, T-cell-directed TAL-1 expression induces T-cell malignancies in transgenic mice: *Cancer Res*, v. 56, p. 5113-9.
- Corral, J., I. Lavenir, H. Impey, A. J. Warren, A. Forster, T. A. Larson, S. Bell, A. N. McKenzie, G. King, and T. H. Rabbitts, 1996, An Mll-AF9 fusion gene made by homologous recombination causes acute leukemia in chimeric mice: a method to create fusion oncogenes: *Cell*, v. 85, p. 853-61.
- Costantini, F., and E. Lacy, 1981, Introduction of a rabbit beta-globin gene into the mouse germ line: *Nature*, v. 294, p. 92-4.

- Cox, C. V., R. S. Evely, A. Oakhill, D. H. Pamphilon, N. J. Goulden, and A. Blair, 2004, Characterization of acute lymphoblastic leukemia progenitor cells: *Blood*, v. 104, p. 2919-25.
- Cozzio, A., E. Passegue, P. M. Ayton, H. Karsunky, M. L. Cleary, and I. L. Weissman, 2003, Similar MLL-associated leukemias arising from self-renewing stem cells and short-lived myeloid progenitors: *Genes Dev*, v. 17, p. 3029-35.
- Curtis, D. J., L. Robb, A. Strasser, and C. G. Begley, 1997, The CD2-scl transgene alters the phenotype and frequency of T-lymphomas in N-ras transgenic or p53 deficient mice: *Oncogene*, v. 15, p. 2975-83.
- de Guzman, C. G., A. Johnson, and C. A. Klug, 2003, The ETO domain is necessary for the developmental abnormalities associated with AML1-ETO expression in the hematopoietic stem cell compartment in vivo: *Blood Cells Mol Dis*, v. 30, p. 201-6.
- De Keersmaecker, K., and A. A. Ferrando, 2011, TLX1-induced T-cell acute lymphoblastic leukemia: *Clin Cancer Res*, v. 17, p. 6381-6.
- De Keersmaecker, K., P. J. Real, G. D. Gatta, T. Palomero, M. L. Sulis, V. Tosello, P. Van Vlierberghe, K. Barnes, M. Castillo, X. Sole, M. Hadler, J. Lenz, P. D. Aplan, M. Kelliher, B. L. Kee, P. P. Pandolfi, D. Kappes, F. Gounari, H. Petrie, J. Van der Meulen, F. Speleman, E. Paietta, J. Racevskis, P. H. Wiernik, J. M. Rowe, J. Soulier, D. Avran, H. Cave, N. Dastugue, S. Raimondi, J. P. Meijerink, C. Cordon-Cardo, A. Califano, and A. A. Ferrando, 2010, The TLX1 oncogene drives aneuploidy in T cell transformation: *Nat Med*, v. 16, p. 1321-7.
- Dedera, D. A., E. K. Waller, D. P. LeBrun, A. Sen-Majumdar, M. E. Stevens, G. S. Barsh, and M. L. Cleary, 1993, Chimeric homeobox gene E2A-PBX1 induces proliferation, apoptosis, and malignant lymphomas in transgenic mice: *Cell*, v. 74, p. 833-43.
- Dick, J. E., 2008, Stem cell concepts renew cancer research: *Blood*, v. 112, p. 4793-807.
- DiMartino, J. F., P. M. Ayton, E. H. Chen, C. C. Naftzger, B. D. Young, and M. L. Cleary, 2002, The AF10 leucine zipper is required for leukemic transformation of myeloid progenitors by MLL-AF10: *Blood*, v. 99, p. 3780-5.
- Dobson, C. L., A. J. Warren, R. Pannell, A. Forster, I. Lavenir, J. Corral, A. J. Smith, and T. H. Rabbitts, 1999, The mll-AF9 gene fusion in mice controls myeloproliferation and specifies acute myeloid leukaemogenesis: *EMBO J*, v. 18, p. 3564-74.
- Early, E., M. A. Moore, A. Kakizuka, K. Nason-Burchenal, P. Martin, R. M. Evans, and E. Dmitrovsky, 1996, Transgenic expression of PML/RARalpha impairs myelopoiesis: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 93, p. 7900-4.
- Elwood, N. J., and C. G. Begley, 1995, Reconstitution of mice with bone marrow cells expressing the SCL gene is insufficient to cause leukemia: *Cell Growth Differ*, v. 6, p. 19-25.
- Fasseu, M., P. D. Aplan, M. Chopin, N. Boissel, J. C. Bories, J. Soulier, H. von Boehmer, F. Sigaux, and A. Regnault, 2007, p16INK4A tumor suppressor gene expression and CD3epsilon deficiency but not pre-TCR deficiency inhibit TAL1-linked T-lineage leukemogenesis: *Blood*, v. 110, p. 2610-9.
- Fazio, G., V. Cazzaniga, C. Palmi, M. Galbiati, M. Giordan, G. te Kronnie, A. Rolink, A. Biondi, and G. Cazzaniga, 2013, PAX5/ETV6 alters the gene expression profile of precursor B cells with opposite dominant effect on endogenous PAX5: *Leukemia*, v. 27, p. 992-5.
- Feldman, B. J., T. Hampton, and M. L. Cleary, 2000, A carboxy-terminal deletion mutant of Notch1 accelerates lymphoid oncogenesis in E2A-PBX1 transgenic mice: *Blood*, v. 96, p. 1906-13.
- Feldman, B. J., T. R. Reid, and M. L. Cleary, 1997, Pim1 cooperates with E2a-Pbx1 to facilitate the progression of thymic lymphomas in transgenic mice: *Oncogene*, v. 15, p. 2735-42.

- Feng, H., D. M. Langenau, J. A. Madge, A. Quinkertz, A. Gutierrez, D. S. Neuberg, J. P. Kanki, and A. T. Look, 2007, Heat-shock induction of T-cell lymphoma/leukaemia in conditional Cre/lox-regulated transgenic zebrafish: *Br J Haematol*, v. 138, p. 169-75.
- Feuring-Buske, M., B. Gerhard, J. Cashman, R. K. Humphries, C. J. Eaves, and D. E. Hogge, 2003, Improved engraftment of human acute myeloid leukemia progenitor cells in beta 2-microglobulin-deficient NOD/SCID mice and in NOD/SCID mice transgenic for human growth factors: *Leukemia*, v. 17, p. 760-3.
- Fisch, P., T. Boehm, I. Lavenir, T. Larson, J. Arno, A. Forster, and T. H. Rabbitts, 1992, T-cell acute lymphoblastic lymphoma induced in transgenic mice by the RBTN1 and RBTN2 LIM-domain genes: *Oncogene*, v. 7, p. 2389-97.
- Fischer, M., M. Schwieger, S. Horn, B. Niebuhr, A. Ford, S. Roscher, U. Bergholz, M. Greaves, J. Lohler, and C. Stocking, 2005, Defining the oncogenic function of the TEL/AML1 (ETV6/RUNX1) fusion protein in a mouse model: *Oncogene*, v. 24, p. 7579-91.
- Flemming, A., T. Brummer, M. Reth, and H. Jumaa, 2003, The adaptor protein SLP-65 acts as a tumor suppressor that limits pre-B cell expansion: *Nat Immunol*, v. 4, p. 38-43.
- Ford, A. M., C. A. Bennett, C. M. Price, M. C. Bruin, E. R. Van Wering, and M. Greaves, 1998, Fetal origins of the TEL-AML1 fusion gene in identical twins with leukemia: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 95, p. 4584-8.
- Ford, A. M., C. Palmi, C. Bueno, D. Hong, P. Cardus, D. Knight, G. Cazzaniga, T. Enver, and M. Greaves, 2009, The TEL-AML1 leukemia fusion gene dysregulates the TGF-beta pathway in early B lineage progenitor cells: *J Clin Invest*, v. 119, p. 826-36.
- Ford, C. E., J. L. Hamerton, D. W. Barnes, and J. F. Loutit, 1956, Cytological identification of radiation-chimaeras: *Nature*, v. 177, p. 452-4.
- Forster, A., R. Pannell, L. F. Drynan, M. McCormack, E. C. Collins, A. Daser, and T. H. Rabbitts, 2003, Engineering de novo reciprocal chromosomal translocations associated with MII to replicate primary events of human cancer: *Cancer Cell*, v. 3, p. 449-58.
- Furth, J., and M. Kahn, 1937, The transmission of leukemia of mice with a single cell: *Am J Cancer*, v. 31, p. 276-282.
- Gatti, R. A., H. J. Meuwissen, H. D. Allen, R. Hong, and R. A. Good, 1968, Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency: *Lancet*, v. 2, p. 1366-9.
- Gleissner, B., N. Gokbuget, C. R. Bartram, B. Janssen, H. Rieder, J. W. Janssen, C. Fonatsch, A. Heyll, D. Voliotis, J. Beck, T. Lipp, G. Munzert, J. Maurer, D. Hoelzer, and E. Thiel, 2002, Leading prognostic relevance of the BCR-ABL translocation in adult acute B-lineage lymphoblastic leukemia: a prospective study of the German Multicenter Trial Group and confirmed polymerase chain reaction analysis: *Blood*, v. 99, p. 1536-43.
- Goardon, N., A. Schuh, I. Hajar, X. Ma, H. Jouault, E. Dzierzak, P. H. Romeo, and L. Maouche-Chretien, 2002, Ectopic expression of TAL-1 protein in Ly-6E.1-htal-1 transgenic mice induces defects in B- and T-lymphoid differentiation: *Blood*, v. 100, p. 491-500.
- Gordon, J. W., G. A. Scangos, D. J. Plotkin, J. A. Barbosa, and F. H. Ruddle, 1980, Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 77, p. 7380-4.
- Greaves, M., 2006, Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia: *Nat Rev Cancer*, v. 6, p. 193-203.
- Greaves, M., S. M. Colman, L. Kearney, and A. M. Ford, 2011, Fusion genes in cord blood: *Blood*, v. 117, p. 369-70; author reply 370-1.

- Greaves, M. F., and J. Wiemels, 2003, Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia: *Nat Rev Cancer*, v. 3, p. 639-49.
- Gregory, M. A., T. L. Phang, P. Neviani, F. Alvarez-Calderon, C. A. Eide, T. O'Hare, V. Zaberezhnyy, R. T. Williams, B. J. Druker, D. Perrotti, and J. Degregori, 2010, Wnt/Ca²⁺/NFAT signaling maintains survival of Ph⁺ leukemia cells upon inhibition of Bcr-Abl: *Cancer Cell*, v. 18, p. 74-87.
- Grisendi, S., R. Bernardi, M. Rossi, K. Cheng, L. Khandker, K. Manova, and P. P. Pandolfi, 2005, Role of nucleophosmin in embryonic development and tumorigenesis: *Nature*, v. 437, p. 147-53.
- Grisolano, J. L., R. L. Wesselschmidt, P. G. Pelicci, and T. J. Ley, 1997, Altered myeloid development and acute leukemia in transgenic mice expressing PML-RAR alpha under control of cathepsin G regulatory sequences: *Blood*, v. 89, p. 376-87.
- Gruber, T. A., M. S. Chang, R. Sposto, and M. Muschen, 2010, Activation-induced cytidine deaminase accelerates clonal evolution in BCR-ABL1-driven B-cell lineage acute lymphoblastic leukemia: *Cancer Res*, v. 70, p. 7411-20.
- Haase, D., U. Germing, J. Schanz, M. Pfeilstocker, T. Nosslinger, B. Hildebrandt, A. Kundgen, M. Lubbert, R. Kunzmann, A. A. Giagounidis, C. Aul, L. Trumper, O. Krieger, R. Stauder, T. H. Muller, F. Wimazal, P. Valent, C. Fonatsch, and C. Steidl, 2007, New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients: *Blood*, v. 110, p. 4385-95.
- Hacein-Bey-Abina, S., C. Von Kalle, M. Schmidt, M. P. McCormack, N. Wulffraat, P. Leboulch, A. Lim, C. S. Osborne, R. Pawliuk, E. Morillon, R. Sorensen, A. Forster, P. Fraser, J. I. Cohen, G. de Saint Basile, I. Alexander, U. Wintergerst, T. Frebourg, A. Aurias, D. Stoppa-Lyonnet, S. Romana, I. Radford-Weiss, F. Gross, F. Valensi, E. Delabesse, E. Macintyre, F. Sigaux, J. Soulier, L. E. Leiva, M. Wissler, C. Prinz, T. H. Rabbitts, F. Le Deist, A. Fischer, and M. Cavazzana-Calvo, 2003, LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1: *Science*, v. 302, p. 415-9.
- Hanahan, D., 1985, Heritable formation of pancreatic beta-cell tumours in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes: *Nature*, v. 315, p. 115-22.
- Hanahan, D., E. F. Wagner, and R. D. Palmiter, 2007, The origins of oncomice: a history of the first transgenic mice genetically engineered to develop cancer: *Genes Dev*, v. 21, p. 2258-70.
- Hauer, J., C. Mullighan, E. Morillon, G. Wang, J. Bruneau, N. Brousse, M. Lelorc'h, S. Romana, A. Boudil, D. Tiedau, S. Kracker, F. D. Bushmann, A. Borkhardt, A. Fischer, S. Hacein-Bey-Abina, and M. Cavazzana-Calvo, 2011, Loss of p19Arf in a Rag1(-/-) B-cell precursor population initiates acute B-lymphoblastic leukemia: *Blood*, v. 118, p. 544-53.
- Hawley, R. G., A. Z. Fong, M. Lu, and T. S. Hawley, 1994, The HOX11 homeobox-containing gene of human leukemia immortalizes murine hematopoietic precursors: *Oncogene*, v. 9, p. 1-12.
- Hawley, R. G., A. Z. Fong, M. D. Reis, N. Zhang, M. Lu, and T. S. Hawley, 1997, Transforming function of the HOX11/TCL3 homeobox gene: *Cancer Res*, v. 57, p. 337-45.
- Hayashi, Y., H. Hirai, N. Kamio, H. Yao, S. Yoshioka, Y. Miura, E. Ashihara, Y. Fujiyama, D. G. Tenen, and T. Maekawa, 2013, C/EBPbeta promotes BCR-ABL-mediated myeloid expansion and leukemic stem cell exhaustion: *Leukemia*, v. 27, p. 619-28.
- Heisterkamp, N., G. Jenster, J. ten Hoeve, D. Zovich, P. K. Pattengale, and J. Groffen, 1990, Acute leukaemia in bcr/abl transgenic mice: *Nature*, v. 344, p. 251-3.
- Heltemes-Harris, L. M., M. J. Willette, L. B. Ramsey, Y. H. Qiu, E. S. Neeley, N. Zhang, D. A. Thomas, T. Koeuth, E. C. Baechler, S. M. Kornblau, and M. A. Farrar, 2011, Ebf1 or Pax5 haploinsufficiency synergizes with STAT5 activation to initiate acute lymphoblastic leukemia: *J Exp Med*, v. 208, p. 1135-49.

- Hentges, K. E., K. C. Weiser, T. Schountz, L. S. Woodward, H. C. Morse, and M. J. Justice, 2005, Evi3, a zinc-finger protein related to EBFAZ, regulates EBF activity in B-cell leukemia: *Oncogene*, v. 24, p. 1220-30.
- Herblot, S., A. M. Steff, P. Hugo, P. D. Aplan, and T. Hoang, 2000, SCL and LMO1 alter thymocyte differentiation: inhibition of E2A-HEB function and pre-T alpha chain expression: *Nat Immunol*, v. 1, p. 138-44.
- Hewitt, H. B., 1958, Studies of the dissemination and quantitative transplantation of a lymphocytic leukaemia of CBA mice: *Br J Cancer*, v. 12, p. 378-401.
- Hoelbl, A., C. Schuster, B. Kovacic, B. Zhu, M. Wickre, M. A. Hoelzl, S. Fajmann, F. Grebien, W. Warsch, G. Stengl, L. Hennighausen, V. Poli, H. Beug, R. Moriggl, and V. Sexl, 2010, Stat5 is indispensable for the maintenance of bcr/abl-positive leukaemia: *EMBO Mol Med*, v. 2, p. 98-110.
- Honda, H., T. Fujii, M. Takatoku, H. Mano, O. N. Witte, Y. Yazaki, and H. Hirai, 1995, Expression of p210bcr/abl by metallothionein promoter induced T-cell leukemia in transgenic mice: *Blood*, v. 85, p. 2853-61.
- Honda, H., T. Inaba, T. Suzuki, H. Oda, Y. Ebihara, K. Tsuiji, T. Nakahata, T. Ishikawa, Y. Yazaki, and H. Hirai, 1999, Expression of E2A-HLF chimeric protein induced T-cell apoptosis, B-cell maturation arrest, and development of acute lymphoblastic leukemia: *Blood*, v. 93, p. 2780-90.
- Honda, H., H. Oda, T. Suzuki, T. Takahashi, O. N. Witte, K. Ozawa, T. Ishikawa, Y. Yazaki, and H. Hirai, 1998, Development of acute lymphoblastic leukemia and myeloproliferative disorder in transgenic mice expressing p210bcr/abl: a novel transgenic model for human Ph1-positive leukemias: *Blood*, v. 91, p. 2067-75.
- Hong, D., R. Gupta, P. Ancliff, A. Atzberger, J. Brown, S. Soneji, J. Green, S. Colman, W. Piacibello, V. Buckle, S. Tsuzuki, M. Greaves, and T. Enver, 2008, Initiating and cancer-propagating cells in TEL-AML1-associated childhood leukemia: *Science*, v. 319, p. 336-9.
- Hotfilder, M., S. Rottgers, A. Rosemann, H. Jurgens, J. Harbott, and J. Vormoor, 2002, Immature CD34+CD19- progenitor/stem cells in TEL/AML1-positive acute lymphoblastic leukemia are genetically and functionally normal: *Blood*, v. 100, p. 640-6.
- Hotfilder, M., S. Rottgers, A. Rosemann, A. Schrauder, M. Schrappe, R. Pieters, H. Jurgens, J. Harbott, and J. Vormoor, 2005, Leukemic stem cells in childhood high-risk ALL/t(9;22) and t(4;11) are present in primitive lymphoid-restricted CD34+CD19- cells: *Cancer Res*, v. 65, p. 1442-9.
- Huettner, C. S., P. Zhang, R. A. Van Etten, and D. G. Tenen, 2000, Reversibility of acute B-cell leukaemia induced by BCR-ABL1: *Nat Genet*, v. 24, p. 57-60.
- Iacobucci, I., C. T. Storlazzi, D. Cilloni, A. Lonetti, E. Ottaviani, S. Soverini, A. Astolfi, S. Chiaretti, A. Vitale, F. Messa, L. Impera, C. Baldazzi, P. D'Addabbo, C. Papayannidis, A. Lonoce, S. Colarossi, M. Vignetti, P. P. Piccaluga, S. Paolini, D. Russo, F. Pane, G. Saglio, M. Baccarani, R. Foa, and G. Martinelli, 2009, Identification and molecular characterization of recurrent genomic deletions on 7p12 in the IKZF1 gene in a large cohort of BCR-ABL1-positive acute lymphoblastic leukemia patients: on behalf of Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell'Adulto Acute Leukemia Working Party (GIMEMA AL WP): *Blood*, v. 114, p. 2159-67.
- Inaba, H., M. Greaves, and C. G. Mullighan, 2013, Acute lymphoblastic leukaemia: *Lancet*, v. 381, p. 1943-55.
- Jacks, T., 1996, Tumor suppressor gene mutations in mice: *Annu Rev Genet*, v. 30, p. 603-36.
- Jamieson, C. H., L. E. Ailles, S. J. Dylla, M. Muijtjens, C. Jones, J. L. Zehnder, J. Gotlib, K. Li, M. G. Manz, A. Keating, C. L. Sawyers, and I. L. Weissman, 2004, Granulocyte-macrophage

- progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML: *N Engl J Med*, v. 351, p. 657-67.
- Jing, L., and L. I. Zon, 2011, Zebrafish as a model for normal and malignant hematopoiesis: *Dis Model Mech*, v. 4, p. 433-8.
- Jung, S. H., C. J. Evans, C. Uemura, and U. Banerjee, 2005, The *Drosophila* lymph gland as a developmental model of hematopoiesis: *Development*, v. 132, p. 2521-33.
- Kastner, P., A. Dupuis, M. P. Gaub, R. Herbrecht, P. Lutz, and S. Chan, 2013, Function of Ikaros as a tumor suppressor in B cell acute lymphoblastic leukemia: *Am J Blood Res*, v. 3, p. 1-13.
- Kinlen, L., 2004, Infections and immune factors in cancer: the role of epidemiology: *Oncogene*, v. 23, p. 6341-8.
- Kirstetter, P., M. Thomas, A. Dierich, P. Kastner, and S. Chan, 2002, Ikaros is critical for B cell differentiation and function: *Eur J Immunol*, v. 32, p. 720-30.
- Komeno, Y., J. Kitaura, and T. Kitamura, 2009, Molecular bases of myelodysplastic syndromes: lessons from animal models: *J Cell Physiol*, v. 219, p. 529-34.
- Krivtsov, A. V., and S. A. Armstrong, 2007, MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development: *Nat Rev Cancer*, v. 7, p. 823-33.
- Krivtsov, A. V., Z. Feng, M. E. Lemieux, J. Faber, S. Vempati, A. U. Sinha, X. Xia, J. Jesneck, A. P. Bracken, L. B. Silverman, J. L. Kutok, A. L. Kung, and S. A. Armstrong, 2008, H3K79 methylation profiles define murine and human MLL-AF4 leukemias: *Cancer Cell*, v. 14, p. 355-68.
- Krivtsov, A. V., D. Twomey, Z. Feng, M. C. Stubbs, Y. Wang, J. Faber, J. E. Levine, J. Wang, W. C. Hahn, D. G. Gilliland, T. R. Golub, and S. A. Armstrong, 2006, Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9: *Nature*, v. 442, p. 818-22.
- Krizhanovsky, V., and S. W. Lowe, 2009, Stem cells: The promises and perils of p53: *Nature*, v. 460, p. 1085-6.
- Kuhn, R., F. Schwenk, M. Aguet, and K. Rajewsky, 1995, Inducible gene targeting in mice: *Science*, v. 269, p. 1427-9.
- Kumar, A. R., W. A. Hudson, W. Chen, R. Nishiuchi, Q. Yao, and J. H. Kersey, 2004, Hoxa9 influences the phenotype but not the incidence of Mll-AF9 fusion gene leukemia: *Blood*, v. 103, p. 1823-8.
- Kustikova, O. S., H. Geiger, Z. Li, M. H. Brugman, S. M. Chambers, C. A. Shaw, K. Pike-Overzet, D. de Ridder, F. J. Staal, G. von Keudell, K. Cornils, K. J. Nattamai, U. Modlich, G. Wagemaker, M. A. Goodell, B. Fehse, and C. Baum, 2007, Retroviral vector insertion sites associated with dominant hematopoietic clones mark "stemness" pathways: *Blood*, v. 109, p. 1897-907.
- Langenau, D. M., H. Feng, S. Berghmans, J. P. Kanki, J. L. Kutok, and A. T. Look, 2005, Cre/lox-regulated transgenic zebrafish model with conditional myc-induced T cell acute lymphoblastic leukemia: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 102, p. 6068-73.
- Langenau, D. M., D. Traver, A. A. Ferrando, J. L. Kutok, J. C. Aster, J. P. Kanki, S. Lin, E. Prochownik, N. S. Trede, L. I. Zon, and A. T. Look, 2003, Myc-induced T cell leukemia in transgenic zebrafish: *Science*, v. 299, p. 887-90.
- Lapidot, T., C. Sirard, J. Vormoor, B. Murdoch, T. Hoang, J. Caceres-Cortes, M. Minden, B. Paterson, M. A. Caligiuri, and J. E. Dick, 1994, A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice: *Nature*, v. 367, p. 645-8.

- Larson, R. C., P. Fisch, T. A. Larson, I. Lavenir, T. Langford, G. King, and T. H. Rabbitts, 1994, T cell tumours of disparate phenotype in mice transgenic for Rbtn-2: *Oncogene*, v. 9, p. 3675-81.
- Larson, R. C., I. Lavenir, T. A. Larson, R. Baer, A. J. Warren, I. Wadman, K. Nottage, and T. H. Rabbitts, 1996, Protein dimerization between Lmo2 (Rbtn2) and Tal1 alters thymocyte development and potentiates T cell tumorigenesis in transgenic mice: *EMBO J*, v. 15, p. 1021-7.
- Larson, R. C., H. Osada, T. A. Larson, I. Lavenir, and T. H. Rabbitts, 1995, The oncogenic LIM protein Rbtn2 causes thymic developmental aberrations that precede malignancy in transgenic mice: *Oncogene*, v. 11, p. 853-62.
- Lausten-Thomsen, U., H. O. Madsen, T. R. Vestergaard, H. Hjalgrim, J. Nersting, and K. Schmiegelow, 2011, Prevalence of t(12;21)[ETV6-RUNX1]-positive cells in healthy neonates: *Blood*, v. 117, p. 186-9.
- le Viseur, C., M. Hotfilder, S. Bomken, K. Wilson, S. Rottgers, A. Schrauder, A. Rosemann, J. Irving, R. W. Stam, L. D. Shultz, J. Harbott, H. Jurgens, M. Schrappe, R. Pieters, and J. Vormoor, 2008, In childhood acute lymphoblastic leukemia, blasts at different stages of immunophenotypic maturation have stem cell properties: *Cancer Cell*, v. 14, p. 47-58.
- Lee, E. M., P. S. Bachmann, and R. B. Lock, 2007, Xenograft models for the preclinical evaluation of new therapies in acute leukemia: *Leuk Lymphoma*, v. 48, p. 659-68.
- Lin, Y. W., C. Slape, Z. Zhang, and P. D. Aplan, 2005, NUP98-HOXD13 transgenic mice develop a highly penetrant, severe myelodysplastic syndrome that progresses to acute leukemia: *Blood*, v. 106, p. 287-95.
- Little, M. P., C. R. Muirhead, and C. A. Stiller, 1996, Modelling lymphocytic leukaemia incidence in England and Wales using generalizations of the two-mutation model of carcinogenesis of Moolgavkar, Venzon and Knudson: *Stat Med*, v. 15, p. 1003-22.
- Lo, M. C., L. F. Peterson, M. Yan, X. Cong, J. H. Hickman, R. C. Dekelver, D. Niewerth, and D. E. Zhang, 2013, JAK inhibitors suppress t(8;21) fusion protein-induced leukemia: *Leukemia*.
- Loh, M. L., and C. G. Mullighan, 2012, Advances in the genetics of high-risk childhood B-progenitor acute lymphoblastic leukemia and juvenile myelomonocytic leukemia: implications for therapy: *Clin Cancer Res*, v. 18, p. 2754-67.
- Lorenz, E., D. Uphoff, T. R. Reid, and E. Shelton, 1951, Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections: *J Natl Cancer Inst*, v. 12, p. 197-201.
- Maia, A. T., V. H. van der Velden, C. J. Harrison, T. Szczepanski, M. D. Williams, M. J. Griffiths, J. J. van Dongen, and M. F. Greaves, 2003, Prenatal origin of hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia in identical twins: *Leukemia*, v. 17, p. 2202-6.
- Maki, K., T. Yamagata, and K. Mitani, 2008, Role of the RUNX1-EV11 fusion gene in leukemogenesis: *Cancer Sci*, v. 99, p. 1878-83.
- Makino, S., 1956, Further evidence favoring the concept of the stem cell in ascites tumors of rats: *Ann N Y Acad Sci*, v. 63, p. 818-30.
- Malcovati, L., and S. D. Nimer, 2008, Myelodysplastic syndromes: diagnosis and staging: *Cancer Control*, v. 15 Suppl, p. 4-13.
- Malumbres, M., and M. Barbacid, 2003, RAS oncogenes: the first 30 years: *Nat Rev Cancer*, v. 3, p. 459-65.
- McCormack, E., O. Bruserud, and B. T. Gjertsen, 2005, Animal models of acute myelogenous leukaemia - development, application and future perspectives: *Leukemia*, v. 19, p. 687-706.

- McCormack, E., O. Bruserud, and B. T. Gjertsen, 2008, Review: genetic models of acute myeloid leukaemia: *Oncogene*, v. 27, p. 3765-79.
- McCormack, M. P., L. F. Young, S. Vasudevan, C. A. de Graaf, R. Codrington, T. H. Rabbitts, S. M. Jane, and D. J. Curtis, 2010, The Lmo2 oncogene initiates leukemia in mice by inducing thymocyte self-renewal: *Science*, v. 327, p. 879-83.
- McCune, J. M., R. Namikawa, H. Kaneshima, L. D. Shultz, M. Lieberman, and I. L. Weissman, 1988, The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function: *Science*, v. 241, p. 1632-9.
- McGuire, E. A., C. E. Rintoul, G. M. Sclar, and S. J. Korsmeyer, 1992, Thymic overexpression of Ttg-1 in transgenic mice results in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma: *Mol Cell Biol*, v. 12, p. 4186-96.
- Metcalf, D., 2008, Hematopoietic cytokines: *Blood*, v. 111, p. 485-91.
- Metzler, M., A. Forster, R. Pannell, M. J. Arends, A. Daser, M. N. Lobato, and T. H. Rabbitts, 2006, A conditional model of MLL-AF4 B-cell tumorigenesis using invertor technology: *Oncogene*, v. 25, p. 3093-103.
- Meyer, C., J. Hofmann, T. Burmeister, D. Groger, T. S. Park, M. Emerenciano, M. Pombo de Oliveira, A. Renneville, P. Villarese, E. Macintyre, H. Cave, E. Clappier, K. Mass-Malo, J. Zuna, J. Trka, E. De Braekeleer, M. De Braekeleer, S. H. Oh, G. Tsaur, L. Fechina, V. H. van der Velden, J. J. van Dongen, E. Delabesse, R. Binato, M. L. Silva, A. Kustanovich, O. Aleinikova, M. H. Harris, T. Lund-Aho, V. Juvonen, O. Heidenreich, J. Vormoor, W. W. Choi, M. Jarosova, A. Kolenova, C. Bueno, P. Menendez, S. Wehner, C. Eckert, P. Talmant, S. Tondeur, E. Lippert, E. Launay, C. Henry, P. Ballerini, H. Lapillone, M. B. Callanan, J. M. Cayuela, C. Herbaux, G. Cazzaniga, P. M. Kakadiya, S. Bohlander, M. Ahlmann, J. R. Choi, P. Gameiro, D. S. Lee, J. Krauter, P. Cornillet-Lefebvre, G. Te Kronnie, B. W. Schafer, S. Kubetzko, C. N. Alonso, U. Zur Stadt, R. Sutton, N. C. Venn, S. Izraeli, L. Trakhtenbrot, H. O. Madsen, P. Archer, J. Hancock, N. Cerveira, M. R. Teixeira, L. Lo Nigro, A. Moricke, M. Stanulla, M. Schrappe, L. Sedek, T. Szczepanski, C. M. Zwaan, E. A. Coenen, M. M. van den Heuvel-Eibrink, S. Strehl, M. Dworzak, R. Panzer-Grumayer, T. Dingermann, T. Klingebiel, and R. Marschalek, 2013, The MLL recombinome of acute leukemias in 2013: *Leukemia*.
- Minucci, S., S. Monestiroli, S. Giavara, S. Ronzoni, F. Marchesi, A. Insinga, D. Diverio, P. Gasparini, M. Capillo, E. Colombo, C. Matteucci, F. Contegno, F. Lo-Coco, E. Scanziani, A. Gobbi, and P. G. Pelicci, 2002, PML-RAR induces promyelocytic leukemias with high efficiency following retroviral gene transfer into purified murine hematopoietic progenitors: *Blood*, v. 100, p. 2989-95.
- Miyazaki, K., N. Yamasaki, H. Oda, T. Kuwata, Y. Kanno, M. Miyazaki, Y. Komeno, J. Kitaura, Z. Honda, S. Warming, N. A. Jenkins, N. G. Copeland, T. Kitamura, T. Nakamura, and H. Honda, 2009, Enhanced expression of p210BCR/ABL and aberrant expression of Zfp423/ZNF423 induce blast crisis of chronic myelogenous leukemia: *Blood*, v. 113, p. 4702-10.
- Modlich, U., S. Navarro, D. Zychlinski, T. Maetzig, S. Knoess, M. H. Brugman, A. Schambach, S. Charrier, A. Galy, A. J. Thrasher, J. Bueren, and C. Baum, 2009, Insertional transformation of hematopoietic cells by self-inactivating lentiviral and gammaretroviral vectors: *Mol Ther*, v. 17, p. 1919-28.
- Mori, H., S. M. Colman, Z. Xiao, A. M. Ford, L. E. Healy, C. Donaldson, J. M. Hows, C. Navarrete, and M. Greaves, 2002, Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 99, p. 8242-7.
- Morrow, M., S. Horton, D. Kioussis, H. J. Brady, and O. Williams, 2004, TEL-AML1 promotes development of specific hematopoietic lineages consistent with preleukemic activity: *Blood*, v. 103, p. 3890-6.

- Mullighan, C. G., 2012, Molecular genetics of B-precursor acute lymphoblastic leukemia: *J Clin Invest*, v. 122, p. 3407-15.
- Mullighan, C. G., S. Goorha, I. Radtke, C. B. Miller, E. Coustan-Smith, J. D. Dalton, K. Girtman, S. Mathew, J. Ma, S. B. Pounds, X. Su, C. H. Pui, M. V. Relling, W. E. Evans, S. A. Shurtleff, and J. R. Downing, 2007, Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia: *Nature*, v. 446, p. 758-64.
- Mullighan, C. G., C. B. Miller, I. Radtke, L. A. Phillips, J. Dalton, J. Ma, D. White, T. P. Hughes, M. M. Le Beau, C. H. Pui, M. V. Relling, S. A. Shurtleff, and J. R. Downing, 2008, BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros: *Nature*, v. 453, p. 110-4.
- Nacht, M., and T. Jacks, 1998, V(D)J recombination is not required for the development of lymphoma in p53-deficient mice: *Cell Growth Differ*, v. 9, p. 131-8.
- Nakamura, N., 2005, A hypothesis: radiation-related leukemia is mainly attributable to the small number of people who carry pre-existing clonally expanded preleukemic cells: *Radiat Res*, v. 163, p. 258-65.
- Neale, G. A., J. E. Rehg, and R. M. Goorha, 1997, Disruption of T-cell differentiation precedes T-cell tumor formation in LMO-2 (rhombotin-2) transgenic mice: *Leukemia*, v. 11 Suppl 3, p. 289-90.
- O'Neil, J., J. Calvo, K. McKenna, V. Krishnamoorthy, J. C. Aster, C. H. Bassing, F. W. Alt, M. Kelliher, and A. T. Look, 2006, Activating Notch1 mutations in mouse models of T-ALL: *Blood*, v. 107, p. 781-5.
- O'Neil, J., J. Shank, N. Cusson, C. Murre, and M. Kelliher, 2004, TAL1/SCL induces leukemia by inhibiting the transcriptional activity of E47/HEB: *Cancer Cell*, v. 5, p. 587-96.
- Okada, Y., Q. Feng, Y. Lin, Q. Jiang, Y. Li, V. M. Coffield, L. Su, G. Xu, and Y. Zhang, 2005, hDOT1L links histone methylation to leukemogenesis: *Cell*, v. 121, p. 167-78.
- Ono, R., M. Masuya, H. Nakajima, Y. Enomoto, E. Miyata, A. Nakamura, S. Ishii, K. Suzuki, F. Shibata-Minoshima, N. Katayama, T. Kitamura, and T. Nosaka, 2013, Plzf drives MLL-fusion-mediated leukemogenesis specifically in long term hematopoietic stem cells: *Blood*.
- Papaemmanuil, E., F. J. Hosking, J. Vijayakrishnan, A. Price, B. Olver, E. Sheridan, S. E. Kinsey, T. Lightfoot, E. Roman, J. A. Irving, J. M. Allan, I. P. Tomlinson, M. Taylor, M. Greaves, and R. S. Houlston, 2009, Loci on 7p12.2, 10q21.2 and 14q11.2 are associated with risk of childhood acute lymphoblastic leukemia: *Nat Genet*, v. 41, p. 1006-10.
- Payne, E., and T. Look, 2009, Zebrafish modelling of leukaemias: *Br J Haematol*, v. 146, p. 247-56.
- Perez-Caro, M., C. Cobaleda, I. Gonzalez-Herrero, C. Vicente-Duenas, C. Bermejo-Rodriguez, M. Sanchez-Beato, A. Orfao, B. Pintado, T. Flores, M. Sanchez-Martin, R. Jimenez, M. A. Piris, and I. Sanchez-Garcia, 2009, Cancer induction by restriction of oncogene expression to the stem cell compartment: *EMBO J*, v. 28, p. 8-20.
- Perez-Caro, M., N. Gutierrez-Cianca, I. Gonzalez-Herrero, I. Lopez-Hernandez, T. Flores, A. Orfao, M. Sanchez-Martin, A. Gutierrez-Adan, B. Pintado, and I. Sanchez-Garcia, 2007, Sustained leukaemic phenotype after inactivation of BCR-ABLp190 in mice: *Oncogene*, v. 26, p. 1702-13.
- Pineault, N., C. Buske, M. Feuring-Buske, C. Abramovich, P. Rosten, D. E. Hogge, P. D. Aplan, and R. K. Humphries, 2003, Induction of acute myeloid leukemia in mice by the human leukemia-specific fusion gene NUP98-HOXD13 in concert with Meis1: *Blood*, v. 101, p. 4529-38.
- Prasad, R. B., F. J. Hosking, J. Vijayakrishnan, E. Papaemmanuil, R. Koehler, M. Greaves, E. Sheridan, A. Gast, S. E. Kinsey, T. Lightfoot, E. Roman, M. Taylor, K. Pritchard-Jones, M. Stanulla, M. Schrappe, C. R. Bartram, R. S. Houlston, R. Kumar, and K. Hemminki,

- Verification of the susceptibility loci on 7p12.2, 10q21.2, and 14q11.2 in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia of childhood: *Blood*, v. 115, p. 1765-7.
- Rakowski, L. A., E. A. Lehotzky, and M. Y. Chiang, 2011, Transient responses to NOTCH and TLX1/HOX11 inhibition in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma: *PLoS ONE*, v. 6, p. e16761.
- Rehe, K., K. Wilson, S. Bomken, D. Williamson, J. Irving, M. L. den Boer, M. Stanulla, M. Schrappe, A. G. Hall, O. Heidenreich, and J. Vormoor, 2013, Acute B lymphoblastic leukaemia-propagating cells are present at high frequency in diverse lymphoblast populations: *EMBO Mol Med*, v. 5, p. 38-51.
- Ribeiro, R. C., M. Abromowitch, S. C. Raimondi, S. B. Murphy, F. Behm, and D. L. Williams, 1987, Clinical and biologic hallmarks of the Philadelphia chromosome in childhood acute lymphoblastic leukemia: *Blood*, v. 70, p. 948-53.
- Robb, L., J. E. Rasko, M. L. Bath, A. Strasser, and C. G. Begley, 1995, *scl*, a gene frequently activated in human T cell leukaemia, does not induce lymphomas in transgenic mice: *Oncogene*, v. 10, p. 205-9.
- Robey, E., D. Chang, A. Itano, D. Cado, H. Alexander, D. Lans, G. Weinmaster, and P. Salmon, 1996, An activated form of Notch influences the choice between CD4 and CD8 T cell lineages: *Cell*, v. 87, p. 483-92.
- Russell, M., A. List, P. Greenberg, S. Woodward, B. Glinsmann, E. Parganas, J. Ihle, and R. Taetle, 1994, Expression of EVI1 in myelodysplastic syndromes and other hematologic malignancies without 3q26 translocations: *Blood*, v. 84, p. 1243-8.
- Ruther, U., D. Komitowski, F. R. Schubert, and E. F. Wagner, 1989, *c-fos* expression induces bone tumors in transgenic mice: *Oncogene*, v. 4, p. 861-5.
- Sabaawy, H. E., M. Azuma, L. J. Embree, H. J. Tsai, M. F. Starost, and D. D. Hickstein, 2006, TEL-AML1 transgenic zebrafish model of precursor B cell acute lymphoblastic leukemia: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 103, p. 15166-71.
- Sanchez-Garcia, I., C. Vicente-Duenas, and C. Cobaleda, 2007, The theoretical basis of cancer-stem-cell-based therapeutics of cancer: can it be put into practice?: *Bioessays*, v. 29, p. 1269-80.
- Schindler, J. W., D. Van Buren, A. Foudi, O. Krejci, J. Qin, S. H. Orkin, and H. Hock, 2009, TEL-AML1 corrupts hematopoietic stem cells to persist in the bone marrow and initiate leukemia: *Cell Stem Cell*, v. 5, p. 43-53.
- Schmiegelow, K., U. Lausten Thomsen, A. Baruchel, C. E. Pacheco, R. Pieters, M. S. Pombo-de-Oliveira, E. W. Andersen, K. Rostgaard, H. Hjalgrim, and C. H. Pui, High concordance of subtypes of childhood acute lymphoblastic leukemia within families: lessons from sibships with multiple cases of leukemia: *Leukemia*, v. 26, p. 675-81.
- Seidel, M. G., and A. T. Look, 2001, E2A-HLF usurps control of evolutionarily conserved survival pathways: *Oncogene*, v. 20, p. 5718-25.
- Shank-Calvo, J. A., K. Draheim, M. Bhasin, and M. A. Kelliher, 2006, p16Ink4a or p19Arf loss contributes to Tal1-induced leukemogenesis in mice: *Oncogene*, v. 25, p. 3023-31.
- Sherborne, A. L., F. J. Hosking, R. B. Prasad, R. Kumar, R. Koehler, J. Vijaykrishnan, E. Papaemmanuil, C. R. Bartram, M. Stanulla, M. Schrappe, A. Gast, S. E. Dobbins, Y. Ma, E. Sheridan, M. Taylor, S. E. Kinsey, T. Lightfoot, E. Roman, J. A. Irving, J. M. Allan, A. V. Moorman, C. J. Harrison, I. P. Tomlinson, S. Richards, M. Zimmermann, C. Szalai, A. F. Semsei, D. J. Erdelyi, M. Krajcinovic, D. Sinnett, J. Healy, A. Gonzalez Neira, N. Kawamata, S. Ogawa, H. P. Koeffler, K. Hemminki, M. Greaves, and R. S. Houlston, Variation in CDKN2A at 9p21.3 influences childhood acute lymphoblastic leukemia risk: *Nat Genet*, v. 42, p. 492-4.

- Siminovitch, L., E. A. McCulloch, and J. E. Till, 1963, The Distribution of Colony-Forming Cells among Spleen Colonies: *J Cell Physiol*, v. 62, p. 327-36.
- Smith, K. S., J. W. Rhee, L. Naumovski, and M. L. Cleary, 1999, Disrupted differentiation and oncogenic transformation of lymphoid progenitors in E2A-HLF transgenic mice: *Mol Cell Biol*, v. 19, p. 4443-51.
- Sohal, J., V. T. Phan, P. V. Chan, E. M. Davis, B. Patel, L. M. Kelly, T. J. Abrams, A. M. O'Farrell, D. G. Gilliland, M. M. Le Beau, and S. C. Kogan, 2003, A model of APL with FLT3 mutation is responsive to retinoic acid and a receptor tyrosine kinase inhibitor, SU11657: *Blood*, v. 101, p. 3188-97.
- Somervaille, T. C., and M. L. Cleary, 2006, Identification and characterization of leukemia stem cells in murine MLL-AF9 acute myeloid leukemia: *Cancer Cell*, v. 10, p. 257-68.
- Stewart, T. A., P. K. Pattengale, and P. Leder, 1984, Spontaneous mammary adenocarcinomas in transgenic mice that carry and express MTV/myc fusion genes: *Cell*, v. 38, p. 627-37.
- Storb, R., 2012, Edward Donnall Thomas (1920-2012): *Nature*, v. 491, p. 334-334.
- Su, X., H. Drabkin, E. Clappier, E. Morgado, M. Busson, S. Romana, J. Soulier, R. Berger, O. A. Bernard, and C. Lavau, 2006, Transforming potential of the T-cell acute lymphoblastic leukemia-associated homeobox genes HOXA13, TLX1, and TLX3: *Genes Chromosomes Cancer*, v. 45, p. 846-55.
- Teitell, M. A., and P. P. Pandolfi, 2009, Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia: *Annu Rev Pathol*, v. 4, p. 175-98.
- Teittinen, K. J., T. Gronroos, M. Parikka, M. Ramet, and O. Lohi, 2012, The zebrafish as a tool in leukemia research: *Leuk Res*, v. 36, p. 1082-8.
- Thomas, E. D., H. L. Lochte, Jr., W. C. Lu, and J. W. Ferrebee, 1957, Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy: *N Engl J Med*, v. 257, p. 491-6.
- Till, J. E., and C. E. Mc, 1961, A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells: *Radiat Res*, v. 14, p. 213-22.
- Toft, N., H. Birgens, J. Abrahamsson, P. Bernell, L. Griskevicius, H. Hallbook, M. Heyman, M. S. Holm, E. Hulegardh, T. W. Klausen, H. V. Marquart, O. G. Jonsson, O. J. Nielsen, P. Quist-Paulsen, M. Taskinen, G. Vaitkeviciene, K. Vettenranta, A. Asberg, and K. Schmiegelow, Risk group assignment differs for children and adults 1-45 yr with acute lymphoblastic leukemia treated by the NOPHO ALL-2008 protocol: *Eur J Haematol*, v. 90, p. 404-12.
- Tosello, V., and A. A. Ferrando, 2013, The NOTCH signaling pathway: role in the pathogenesis of T-cell acute lymphoblastic leukemia and implication for therapy: *Ther Adv Hematol*, v. 4, p. 199-210.
- Tremblay, M., C. S. Tremblay, S. Herblot, P. D. Aplan, J. Hebert, C. Perreault, and T. Hoang, 2010, Modeling T-cell acute lymphoblastic leukemia induced by the SCL and LMO1 oncogenes: *Genes Dev*, v. 24, p. 1093-105.
- Trevino, L. R., W. Yang, D. French, S. P. Hunger, W. L. Carroll, M. Devidas, C. Willman, G. Neale, J. Downing, S. C. Raimondi, C. H. Pui, W. E. Evans, and M. V. Relling, 2009, Germline genomic variants associated with childhood acute lymphoblastic leukemia: *Nat Genet*, v. 41, p. 1001-5.
- Tsuzuki, S., M. Seto, M. Greaves, and T. Enver, 2004, Modeling first-hit functions of the t(12;21) TEL-AML1 translocation in mice: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 101, p. 8443-8.
- van der Weyden, L., G. Giotopoulos, A. G. Rust, L. S. Matheson, F. W. van Delft, J. Kong, A. E. Corcoran, M. F. Greaves, C. G. Mullighan, B. J. Huntly, and D. J. Adams, 2011, Modeling the

- evolution of ETV6-RUNX1-induced B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia in mice: *Blood*, v. 118, p. 1041-51.
- Van Vlierberghe, P., and A. Ferrando, 2012, The molecular basis of T cell acute lymphoblastic leukemia: *J Clin Invest*, v. 122, p. 3398-406.
- Van Vlierberghe, P., R. Pieters, H. B. Beverloo, and J. P. Meijerink, 2008, Molecular-genetic insights in paediatric T-cell acute lymphoblastic leukaemia: *Br J Haematol*, v. 143, p. 153-68.
- Vicente-Duenas, C., F. Abollo-Jimenez, L. Ruiz-Roca, E. Alonso-Escudero, R. Jimenez, M. B. Cenador, F. J. Criado, C. Cobaleda, and I. Sanchez-Garcia, 2010a, The age of the target cell affects B-cell leukaemia malignancy: *Aging (Albany NY)*, v. 2, p. 908-13.
- Vicente-Duenas, C., C. Cobaleda, J. Perez-Losada, and I. Sanchez-Garcia, 2010b, The evolution of cancer modeling: the shadow of stem cells: *Dis Model Mech*, v. 3, p. 149-55.
- Vicente-Duenas, C., I. Romero-Camarero, C. Cobaleda, and I. Sanchez-Garcia, 2013, Function of oncogenes in cancer development: a changing paradigm: *EMBO J*, v. 32, p. 1502-13.
- Virely, C., S. Moulin, C. Cobaleda, C. Lasgi, A. Alberdi, J. Soulier, F. Sigaux, S. Chan, P. Kastner, and J. Ghysdael, 2010, Haploinsufficiency of the IKZF1 (IKAROS) tumor suppressor gene cooperates with BCR-ABL in a transgenic model of acute lymphoblastic leukemia: *Leukemia*, v. 24, p. 1200-4.
- Voncken, J. W., V. Kaartinen, P. K. Pattengale, W. T. Germeraad, J. Groffen, and N. Heisterkamp, 1995, BCR/ABL P210 and P190 cause distinct leukemia in transgenic mice: *Blood*, v. 86, p. 4603-11.
- Wagner, E. F., T. A. Stewart, and B. Mintz, 1981, The human beta-globin gene and a functional viral thymidine kinase gene in developing mice: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 78, p. 5016-20.
- Wang, P. Y., F. Young, C. Y. Chen, B. M. Stevens, S. J. Neering, R. M. Rossi, T. Bushnell, I. Kuzin, D. Heinrich, A. Bottaro, and C. T. Jordan, 2008, The biologic properties of leukemias arising from BCR/ABL-mediated transformation vary as a function of developmental origin and activity of the p19ARF gene: *Blood*, v. 112, p. 4184-92.
- Weissman, I. L., and J. A. Shizuru, 2008, The origins of the identification and isolation of hematopoietic stem cells, and their capability to induce donor-specific transplantation tolerance and treat autoimmune diseases: *Blood*, v. 112, p. 3543-53.
- Weng, A. P., A. A. Ferrando, W. Lee, J. P. t. Morris, L. B. Silverman, C. Sanchez-Irizarry, S. C. Blacklow, A. T. Look, and J. C. Aster, 2004, Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia: *Science*, v. 306, p. 269-71.
- Wiemels, J. L., G. Cazzaniga, M. Daniotti, O. B. Eden, G. M. Addison, G. Masera, V. Saha, A. Biondi, and M. F. Greaves, 1999, Prenatal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children: *Lancet*, v. 354, p. 1499-503.
- Wiemels, J. L., J. Hofmann, M. Kang, R. Selzer, R. Green, M. Zhou, S. Zhong, L. Zhang, M. T. Smith, C. Marsit, M. Loh, P. Buffler, and R. F. Yeh, 2008, Chromosome 12p deletions in TEL-AML1 childhood acute lymphoblastic leukemia are associated with retrotransposon elements and occur postnatally: *Cancer Res*, v. 68, p. 9935-44.
- Williams, R. T., W. den Besten, and C. J. Sherr, 2007, Cytokine-dependent imatinib resistance in mouse BCR-ABL+, Arf-null lymphoblastic leukemia: *Genes Dev*, v. 21, p. 2283-7.
- Worton, R. G., E. A. McCulloch, and J. E. Till, 1969, Physical separation of hemopoietic stem cells differing in their capacity for self-renewal: *J Exp Med*, v. 130, p. 91-103.
- Wu, A. M., J. E. Till, L. Siminovitch, and E. A. McCulloch, 1967, A cytological study of the capacity for differentiation of normal hemopoietic colony-forming cells: *J Cell Physiol*, v. 69, p. 177-84.

- Wu, A. M., J. E. Till, L. Siminovitch, and E. A. McCulloch, 1968, Cytological evidence for a relationship between normal hemotopoietic colony-forming cells and cells of the lymphoid system: *J Exp Med*, v. 127, p. 455-64.
- Yamasaki, N., K. Miyazaki, A. Nagamachi, R. Koller, H. Oda, M. Miyazaki, T. Sasaki, Z. I. Honda, L. Wolff, T. Inaba, and H. Honda, 2010, Identification of Zfp521/ZNF521 as a cooperative gene for E2A-HLF to develop acute B-lineage leukemia: *Oncogene*, v. 29, p. 1963-75.
- Yan, M., E. Kanbe, L. F. Peterson, A. Boyapati, Y. Miao, Y. Wang, I. M. Chen, Z. Chen, J. D. Rowley, C. L. Willman, and D. E. Zhang, 2006, A previously unidentified alternatively spliced isoform of t(8;21) transcript promotes leukemogenesis: *Nat Med*, v. 12, p. 945-9.
- Zeisig, B. B., N. Cheung, J. Yeung, and C. W. So, 2008, Reconstructing the disease model and epigenetic networks for MLL-AF4 leukemia: *Cancer Cell*, v. 14, p. 345-7.
- Zhong, Y., L. Jiang, H. Hiai, S. Toyokuni, and Y. Yamada, 2007, Overexpression of a transcription factor LYL1 induces T- and B-cell lymphoma in mice: *Oncogene*, v. 26, p. 6937-47.
- Zoccola, D., L. Legros, P. Cassuto, J. G. Fuzibet, G. Nucifora, and S. D. Raynaud, 2003, A discriminating screening is necessary to ascertain EVI1 expression by RT-PCR in malignant cells from the myeloid lineage without 3q26 rearrangement: *Leukemia*, v. 17, p. 643-5.
- Zuna, J., J. Madzo, O. Krejci, Z. Zemanova, M. Kalinova, K. Muzikova, M. Zapotocky, J. Starkova, O. Hrusak, J. Horak, and J. Trka, 2011, ETV6/RUNX1 (TEL/AML1) is a frequent prenatal first hit in childhood leukemia: *Blood*, v. 117, p. 368-9; author reply 370-1.

| Verantwortung für Mensch und Umwelt |

Kontakt:

Bundesamt für Strahlenschutz

Postfach 10 01 49

38201 Salzgitter

Telefon: + 49 30 18333 - 0

Telefax: + 49 30 18333 - 1885

Internet: www.bfs.de

E-Mail: ePost@bfs.de

Gedruckt auf Recyclingpapier aus 100 % Altpapier.



Bundesamt für Strahlenschutz