

技术与方法

小鼠急性髓系白血病模型的构建

惠心慧^{1,2} 万晓玲² 於芳芳³ 何巧梅³ 张岩^{2*} 张文举^{1*}(¹上海大学生命科学学院, 上海 200444; ²中国科学院上海巴斯德研究所, 上海 200031;³上海交通大学附属第一人民医院, 上海 200080)

摘要 *MLL*基因的异常重排会引发急性淋巴系(ALL)和急性髓系白血病(AML)。该文详细阐述了利用逆转录病毒载体MLL-AF9构建小鼠AML模型的方法。该研究比较了免疫磁珠法与5-氟尿嘧啶(5-FU)方法富集骨髓细胞的效率, 以及不同时间点收获的病毒对骨髓Lin⁻细胞感染效率的影响。通过流式检测发现, 5-氟尿嘧啶富集的骨髓Lin⁻细胞能够被48 h收获的病毒高效感染。受体鼠在移植了MLL-AF9感染的骨髓Lin⁻细胞60天后, 外周血、骨髓、脾脏组织中均有大量的白血病细胞浸润, RT-qPCR也验证了白血病靶基因的表达上调, 表明小鼠AML模型的成功构建。这项研究为从事白血病研究的科研人员提供了一种有效的小鼠急性髓系白血病模型, 为研究白血病发病机理与研发白血病治疗药物提供有用的工具。

关键词 MLL-AF9; 5-氟尿嘧啶; 逆转录病毒; 骨髓Lin⁻细胞

Construction of Mouse Acute Myeloid Leukemia Model

Hui Xinhui^{1,2}, Wan Xiaoling², Yu Fangfang³, He Qiaomei³, Zhang Yan^{2*}, Zhang Wenju^{1*}(¹School of Life Sciences, Shanghai University, Shanghai 200444, China; ²Institut Pasteur of Shanghai, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China; ³Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200080, China)

Abstract Abnormal rearrangements of *MLL* gene cause acute lymphoid (ALL) and acute myeloid leukemia (AML). Here, we describe a method of construction of a mouse AML model using a MLL-AF9 retroviral system. We compared the efficiencies of Lineage⁻(Lin⁻) bone marrow cells enrichment by using immunomagnetic beads and 5-fluorouracil (5-FU) treatment, and efficiencies of two different infection strategies. We found that 5-FU treatment of mice and 2-round of infection of Lin⁻ bone marrow cells with viral supernatant 48 h post-transfection would lead to a highly efficient infection of MLL-AF9 retroviral vector. Moreover, sixty days after transplantation of MLL-AF9-infected Lin⁻ bone marrow cells, leukemia cells were observed in the peripheral blood, and infiltration of leukemia cells were detected in the bone marrow and spleen of the recipients. In addition, RT-qPCR results verified a significant increase of transcription of MLL-AF9-targeted genes, further indicating an establishment of the AML mouse model. Our study provides a useful tool of studying the molecular mechanisms of leukemia pathogenesis and development of novel therapies.

Keywords MLL-AF9; 5-fluorouracil; retroviral; Lin⁻ bone marrow cells

收稿日期: 2019-01-09

接受日期: 2019-01-28

国家自然科学基金(批准号: 31670906、31471207)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-54923137, E-mail: yan.zhang19510@shgh.cn; Tel: 021-66136236, E-mail: shu-wenjuzhang@163.com

Received: January 9, 2019

Accepted: January 28, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31670906, 31471207)

*Corresponding authors. Tel: +86-21-54923137, E-mail: yan.zhang19510@shgh.cn; Tel: +86-21-66136236, E-mail: shu-wenjuzhang@163.com

网络出版时间: 2019-06-13 18:06:37

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190613.1806.032.html>

MLL(mixed lineage leukemia)基因可以与多种基因进行易位重组, 融合形成具有促癌功能的蛋白, 进而引发白血病。在约7%的急性髓性白血病(acute myeloid leukemia, AML)和10%的急性淋巴性白血病(acute lymphoid leukemia, ALL)病例中发现*MLL*基因重排^[1-2]。*AF9*(ALL1-fused gene from chromosome 9)是与*MLL*基因发生易位重组的常见基因之一, 主要在成人的急性髓系白血病(AML)中发现^[3-6]。通过全基因组测序发现, *MLL*-*AF9*白血病病人样品和*MLL*-*AF9*感染的小鼠造血干/祖细胞的基因表达谱存在很大的相似性。其中, *HOX*基因家族和*HOX*辅助因子*MEIS1*的转录激活最为显著^[7-8]。此外, 白血病细胞依赖于*MLL*融合蛋白的持续表达, 这表明, *MLL*基因融合本身或其调节的基因是潜在的治疗靶标。对*MLL*型白血病进行动物建模, 有助于了解疾病的发生发展和致病机理, 对优化治疗方案, 研发更具疗效的新药提供了有利的工具^[9-11]。由于逆转录病毒载体可以携带目的基因稳定地整合到靶细胞基因组中, 使得导入的基因在所有子细胞中表达, 所以被应用于许多临床及科学实验中。

1996年, Rabbitts实验室构建了第一例*MLL*-*AF9*融合蛋白小鼠白血病模型, 该模型运用同源重组的方法获得表达*MLL*-*AF9*融合蛋白的阳性胚胎干细胞, 再通过显微注射至囊胚获得嵌合鼠, 该基因敲入的嵌合鼠患有急性髓系白血病^[12-13]。2006年, Armstrong实验室^[14]与Cleary实验室^[15]通过逆转录病毒方法, 介导*MLL*-*AF9*分别感染粒细胞/巨噬细胞前体细胞(GMPs)与纯化的骨髓c-kit⁺细胞, 然后将这些细胞尾静脉注射至亚致死剂量照射的小鼠体内, 引发急性髓系白血病。2008年, Kersey实验室^[16]分选了敲入*MLL*-*AF9*基因的白血病小鼠的骨髓LSK、CMPs、GMPs和CLPs细胞, 进行移植, 研究发现, LSK细胞和CLPs诱发AML的能力较强, 而GMPs不能诱发AML。该结论与Armstrong实验室的结果不一致, 可能的原因是*MLL*-*AF9*在不同细胞中的表达量以及内源*MLL*-*AF9*和外源*MLL*-*AF9*在生物学上的表达差异均会影响最终的实验结果^[17-18]。

本文利用Eric So实验室构建的*MLL*-*AF9*逆转录病毒载体, 感染小鼠骨髓Lin⁻细胞, 获得了小鼠AML白血病模型。我们通过比较不同的骨髓细胞分离方法, 不同的病毒感染条件, 优化了构建*MLL*-*AF9*急性髓系白血病小鼠模型的方法, 期冀为广大从事白血病研究的科研工作者提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料 逆转录病毒包装质粒pKat、VSV-G、HEK293T细胞系由实验室保存, 目的质粒MSCV-GFP-*MLL*-*AF9*来源于Eric So实验室。本实验所用小鼠为C57BL/6J背景, 饲养于中国科学院上海巴斯德研究所SPF动物房。所有的动物操作均遵循被中国科学院上海巴斯德研究所动物伦理委员会批准的实验方案(A2018010)。

1.1.2 试剂 5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)购自Sigma公司。Lipo2000(11668-019)购自Invitrogen公司。OPTI-MEMTM(31985062)、IMDM(12440-053)、DMEM(12440-053)购自GIBCO公司。Murine IL-3(213-13-10)、Murine IL-6(213-13-10)、Murine SCF(250-03-50)购自Peprotech公司。Retronectin(T100A)购自TaKaRa公司。EasySepTM Mouse Hematopoietic Progenitor Cell Isolation Kit(19856)购自STEMCELL Technologies公司、Fetal Bovine Serum购自ExCell公司。Polybrene(09735)购自Sigma公司。EDTA、Na₂EDTA、氯化钠、KCl、Na₂HPO₄、KH₂PO₄、KHCO₃、NH₄Cl购自生工生物工程上海有限公司。

1.2 方法

1.2.1 小鼠骨髓细胞的获取 小鼠经断颈处死后, 取其双侧的股骨与胫骨于FACS buffer中, 用剪刀移除骨头边缘, 通过1 mL注射器, 用FACS buffer, 将骨髓细胞冲出到15 mL离心管中; 300 ×g, 4 °C离心5 min, 弃上清, 加入1 mL的红细胞裂解液吹打混匀, 室温裂解5 min; 加入5 mL FACS buffer, 300 ×g, 4 °C离心5 min后弃上清, 再用FACS buffer洗1遍, 随后将细胞重悬在1 mL FACS buffer中; 用40 μm的滤膜过滤获取单细胞悬液, 用于后续实验。以上实验均在超净台中进行, 所使用的剪刀镊子镊子需高压灭菌。

FACS buffer: PBS+2% FBS。10×PBS缓冲液(pH7.2~7.4): 80 g NaCl、2 g KCl、14.4 g Na₂HPO₄、2.4 g KH₂PO₄, 定容至1 L。10×红细胞裂解液(pH值7.2~7.4): 82.9 g NH₄Cl、10 g KHCO₃、0.37 g Na₂EDTA, 定容至1 L。

1.2.2 小鼠骨髓Lin⁻细胞富集 5-FU处理法: 按照200 mg/kg的剂量腹腔注射处理小鼠, 仅处理一次, 处理后第5天收集小鼠的骨髓细胞, 进行后续实验。

免疫磁珠富集法(Kit法): 参考STEMCELL公司的造血干细胞富集试剂盒(19856), 原理: 通过对需

要被去除的细胞进行生物素化抗体和磁珠标记, 然后通过磁铁吸附去除不需要的骨髓Lin⁺细胞, 分离得到的Lin⁻细胞用于后续实验。

1.2.3 逆转录病毒包装 按每皿 1×10^7 /mL接种 HEK 293T细胞, 20 h后, 细胞汇合度达到90%; 将培养皿中的培养液换成4 mL新鲜DMEM(10% FBS); 配制体系 30 μ L Lipo2000+500 μ L OPTI-MEMTM 和 15 μ g质粒(8 μ g MSCV-GFP-MLL-AF9+4 μ g pKat +3 μ g VSVG)+500 μ L OPTI-MEMTM; 将两个体系轻轻混合, 室温静置10 min后逐滴加入皿中, 1 mL/皿, 轻轻混匀, 37 °C、5% CO₂温箱培养; 培养6~8 h后换新鲜的DMEM(10% FBS), 37 °C、5% CO₂温箱培养; 转染48 h后, 收集上清作为48 h收获的病毒, 之后更换新鲜DMEM(10% FBS)培养基, 继续培养24 h后再收集一次上清, 作为72 h收获的病毒; 病毒用0.45 μ m滤器过滤, 用于后续的感染实验。病毒可分装后于-80 °C长期保存, 避免反复冻融。

1.2.4 逆转录病毒感染骨髓Lin⁻细胞 提前用 Retronectin(10 μ g/孔) 4 °C过夜处理24孔板, 第2天用500 μ L PBS洗1遍, 4 °C可保存1周; 接种富集的小鼠骨髓Lin⁻细胞于IMDM培养基中(含细胞因子: 50 ng/mL mSCF、10 ng/mL mIL-3、10 ng/mL mIL-6), 进行预刺激培养。

第一个感染周期: 骨髓Lin⁻细胞经细胞因子预刺激过夜培养后, 收集细胞, 计数, 1 800 r/min、4 °C离心5 min, 用80%的48 h MLL-AF9病毒上清+20%新鲜IMDM培养基(含15% FBS、50 ng/mL mSCF、10 ng/mL mIL-3、10 ng/mL mIL-6、6 μ g/mL polybrene)重悬细胞; 随后将细胞按照每孔 5×10^5 、 1×10^6 、 2×10^6 的数量均匀的铺于Retronectin处理的24孔板中, 每孔2 mL感染体系, 1 800 r/min、33 °C离心感染90 min后, 置于33 °C、5% CO₂培养8 h; 更换新鲜IMDM培养基1 mL/孔; 细胞在37 °C、5% CO₂继续培养8~10 h。

第二个感染周期: 轻轻吸出培养孔中的培养基,

并加入80%的48 h MLL-AF9病毒上清或72 h的病毒上清+20%新鲜IMDM培养基(含15%FBS、50 ng/mL mSCF、10 ng/mL mIL-3、10 ng/mL mIL-6、6 μ g/mL polybrene), 每孔2 mL, 1 800 r/min 33 °C离心感染90 min后, 置于33 °C、5% CO₂培养24~48 h, 收集细胞, 流式细胞仪检测 GFP信号, 计算出骨髓Lin⁻细胞感染率。

1.2.5 骨髓移植 受体鼠移植前24 h经致死剂量X-射线辐照(9.5Gy, RS2000 X-射线辐照仪), 然后将 1×10^4 个GFP⁺细胞重悬在200 μ L FACS buffer中, 通过尾静脉注射到受体小鼠内; 在移植后20天、40天、60天, 采集受体小鼠外周血, 用流式细胞仪检测中白血病细胞的比例。

1.2.6 组织石蜡切片与染色 小鼠新鲜脾脏切成0.5 cm左右大小, 浸泡在4%的多聚甲醛中固定过夜。将固定后的组织转移到包埋盒中, 自来水流水冲洗1 h, 然后进行乙醇逐步脱水、二甲苯透明、浸蜡包埋; 包埋块用石蜡切片机切片, 厚度为6 μ m, 然后进行苏木精伊红(H&E)染色。小鼠股骨与胫骨在固定前需进行脱钙处理, 大腿骨浸泡于pH7.0~pH7.4的10% EDTA溶液中, 2~3天换液一次, 直至大腿骨能弯曲呈松软状。然后再经固定、冲洗、脱水、透明和包埋处理后切片染色。

2 结果

2.1 不同方法富集的Lin⁻细胞对感染效率的影响

我们准备了6只小鼠, 分为两组: 一组腹腔注射5-FU, 注射一次, 5天后取双侧胫骨与股骨的骨髓细胞并计数; 另外一组取双侧股骨胫骨的骨髓细胞, 用Kit富集Lin⁻细胞并计数; 计数结果如表1所示。我们用MLL-AF9逆转录病毒感染相同数量的骨髓Lin⁻细胞, 发现5-FU处理后富集的骨髓Lin⁻细胞感染效率显著高于Kit富集的Lin⁻细胞。上述结果显示, 5-FU处理过的骨髓Lin⁻细胞更容易被MLL-AF9逆转录病毒感染(图1)。

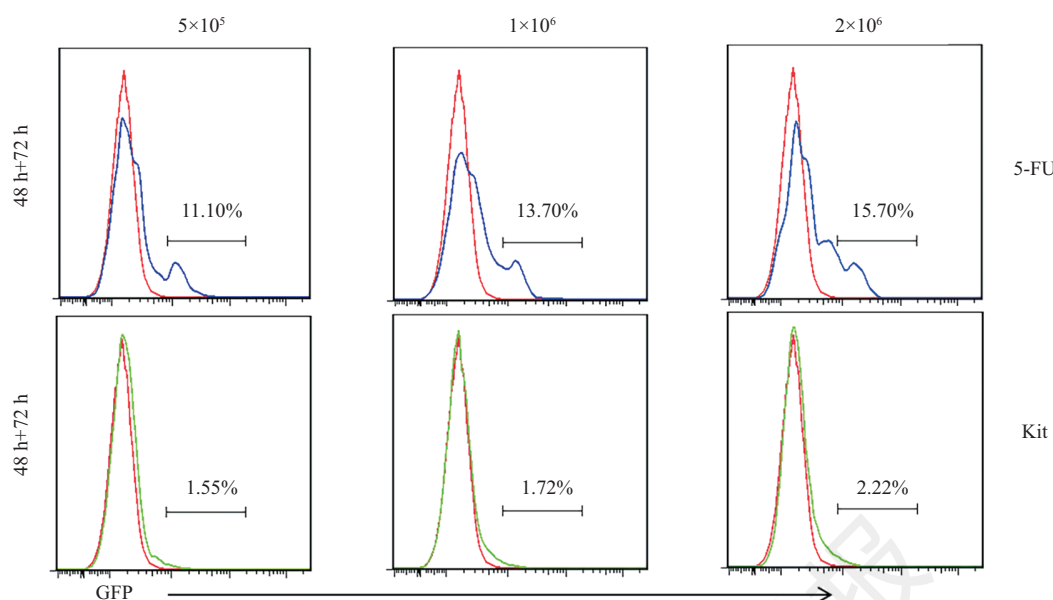
2.2 不同时间收获的病毒对感染效率的影响

然后, 我们对不同时间收获的MLL-AF9病毒的

表1 不同方法富集的Lin⁻细胞数

Table 1 Number of Lin⁻ cells enriched by different methods

小鼠编号 Mouse number	5-FU富集 5-FU enrichment	小鼠编号 Mouse number	Kit富集 Kit enrichment
1	2.0×10^6	4	2.6×10^6
2	2.2×10^6	5	3.0×10^6
3	1.8×10^6	6	2.3×10^6

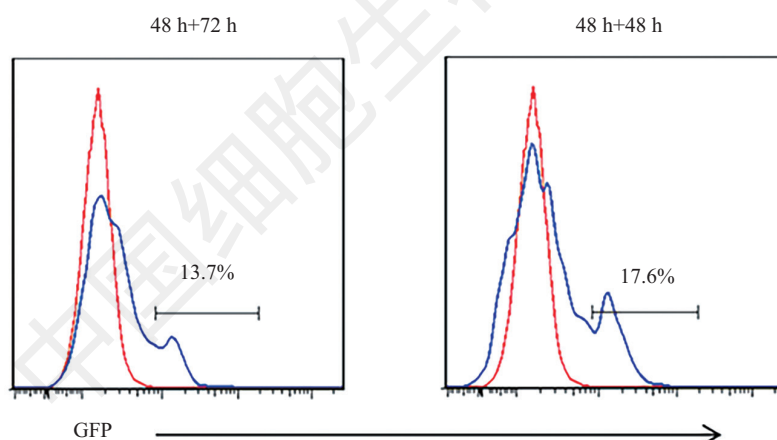


用48 h和72 h收获病毒感染不同方式富集的Lin⁻细胞, 其红色线为未感染的阴性对照。

Use virus harvested at 48 h and 72 h infection of Lin⁻ cells, the red line is an uninfected negative control.

图1 骨髓Lin⁻细胞的不同富集方式对感染效率的影响

Fig.1 Effect of different enrich methods of BM Lin⁻ cells on infection efficiency



红色线为未感染的阴性对照。

The red line is an uninfected negative control.

图2 不同时间收获的病毒对感染效率的影响

Fig.2 Effect of virus harvested at different times on infection efficiency

感染效率进行测试。我们分了两组实验: 第一组实验: 分别利用48 h与72 h收获病毒上清间隔24 h对Lin⁻细胞进行两次感染; 第二组实验: 分别使用48 h收获病毒间隔24 h对骨髓Lin⁻细胞进行两次感染。如图2所示, 我们发现使用48 h收获病毒间隔24 h对骨髓Lin⁻细胞进行两次感染, 其感染效率更高。上述结果显示, 48 h收获的上清中, 病毒的滴度更高, 对骨髓Lin⁻细胞的感染效率更高。

2.3 白血病建模观察

然后, 我们对移植入MLL-AF9感染的骨髓细胞的受体小鼠的白血病发病情况, 进行观察与检测。如图3所示, 第一组小鼠在7日内全部因贫血死亡, 说明致死剂量辐照条件合格; 第二组小鼠在实验周期内正常存活; 第三组小鼠移植后45天开始陆续死亡, 在移植后75天全部死亡。

我们抽取移植后20天、40天、60天的实验组小

鼠外周血(peripheral blood, PB)进行流式检测。实验结果显示: 在移植后60天, 受体小鼠外周血中白血病细胞比例已达到80%(图5)。在移植后70天, 与正常小鼠相比, 移植过感染了MLL-AF9骨髓Lin⁻细胞的受体小鼠的股骨与胫骨显著发白, 脾脏明显肿大(图4), 外周血中未成熟的中性粒细胞(CD11b⁺Gr-1⁺)的比例明显增加(图6)。这些结果表明, 移植过感染了MLL-AF9骨髓Lin⁻细胞的受体小鼠骨髓红系造血受抑制, 脾脏中细胞数量增加, 外周血中白血病细胞数量增加, 呈现出明显的白血病病症, 白血病模型构建成功。

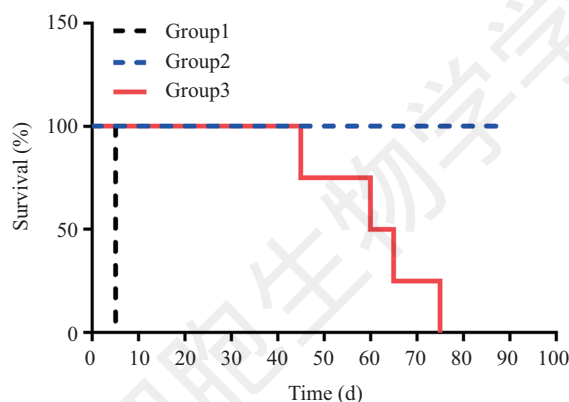
2.4 组织病理检测

为了进一步确认白血病小鼠的发病情况, 我们

获取移植后70天的白血病小鼠的外周血(PB)、脾脏(spleen)以及骨髓(bone marrow)进行H&E染色。与正常小鼠相比, 白血病小鼠的外周血与脾脏中可以观察到大量的未成熟的白血病细胞(图7), 这与之前外周血的流式细胞分析结果, 以及脾脏肿大的结果相一致。同时, 白血病小鼠外周血的红细胞数量显著减少, 表明白血病小鼠的红细胞生成受到抑制。综上所述, 组织病理的检测结果进一步验证了受体小鼠的白血病特征。

2.5 RT-qPCR检测MLL-AF9相关靶基因的表达情况

最后, 我们利用RT-qPCR验证骨髓白血病细胞中, 与白血病发生相关基因的表达。如图8所示, 在

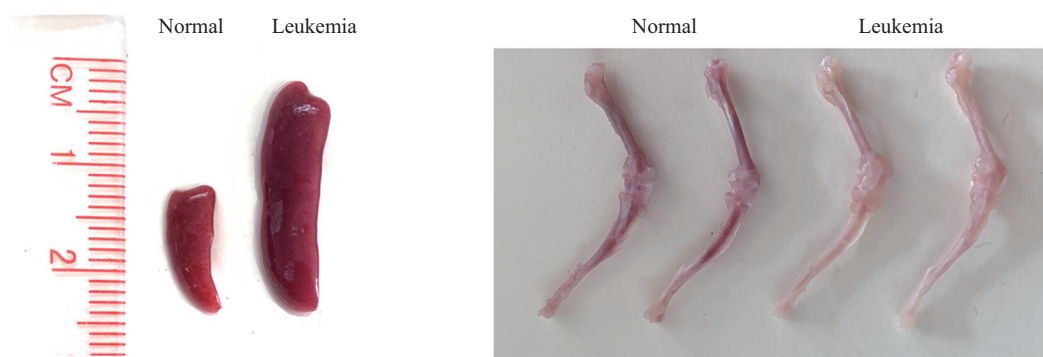


Group1为致死剂量辐照, 未移植MLL-AF9感染骨髓Lin⁻细胞的对照小鼠, 共3只; Group2为未辐照、未移植MLL-AF9感染骨髓Lin⁻细胞的对照小鼠, 共2只; Group3为致死剂量辐照, 移植了MLL-AF9感染骨髓Lin⁻细胞的实验小鼠, 共6只。

Group1 were 3 mice irradiated at lethal dose, but not transplanted with MLL-AF9 infected bone marrow Lin⁻ cells; Group2 were 2 control mice that not irradiated and not transplanted with MLL-AF9 infected bone marrow Lin⁻ cells; Group3 were 6 mice irradiated at lethal dose, and were transplanted with MLL-AF9 infected bone marrow Lin⁻ cells.

图3 移植后白血病小鼠的存活曲线图

Fig.3 Survival curve of leukemia mice after transplantation



A: 正常小鼠与白血病小鼠的脾脏; B: 正常小鼠与白血病小鼠的股骨与胫骨。

A: spleen of normal mice and leukemia mice; B: femur and tibia of normal mice and leukemia mice.

图4 正常小鼠与白血病小鼠的股骨胫骨和脾脏

Fig.4 Femur and spleen of normal mice and leukemia mice

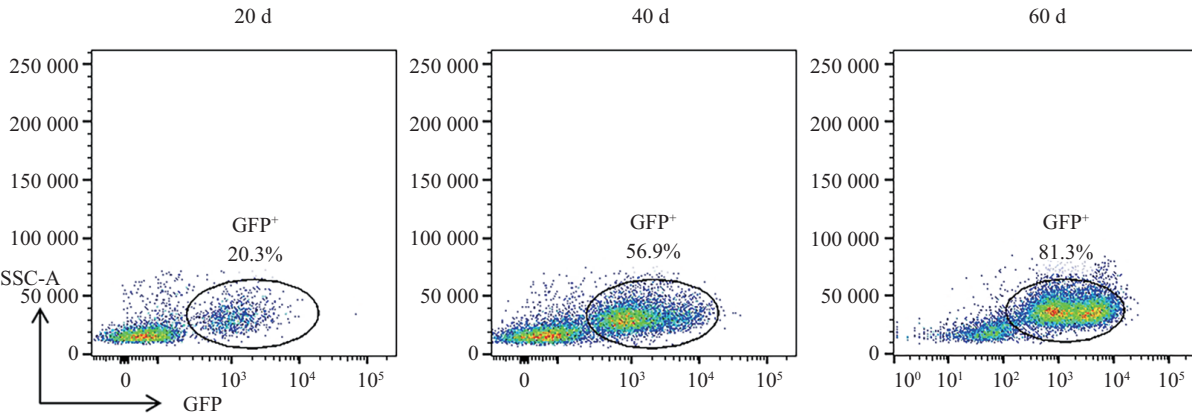


图5 移植后不同天数的外周血中白血病细胞比例

Fig.5 Percentage of leukemia cells in PB of different days after transplantation

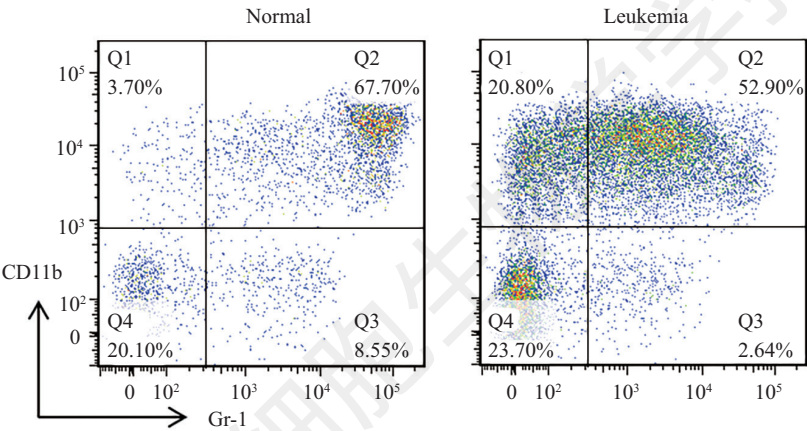


图6 外周血中的髓系细胞比例流式图

Fig.6 Representative FACS profiles of myeloid cells in PB

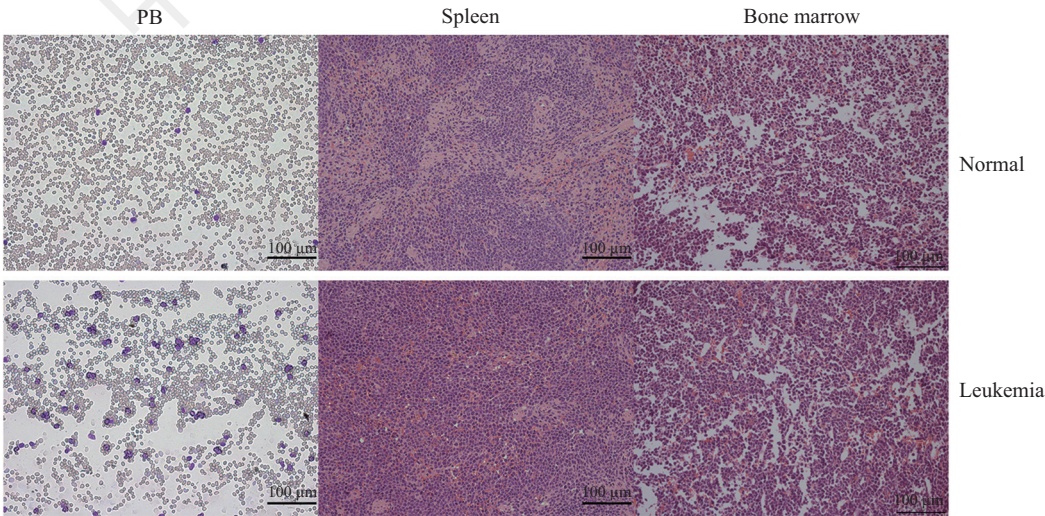
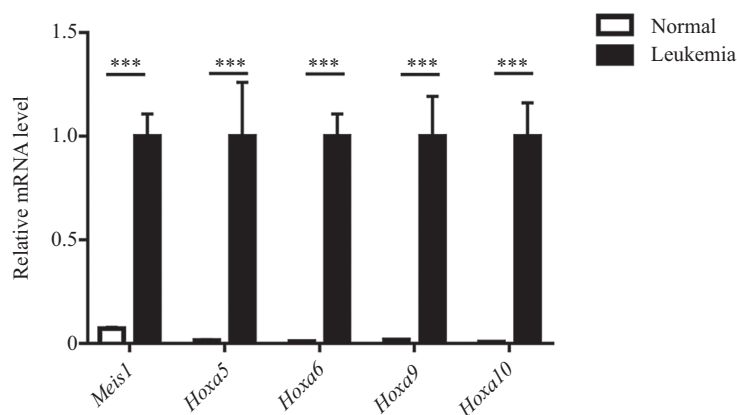


图7 H&E染色结果

Fig.7 H&E staining results



mRNA水平标准化为*Gapdh*的表达, *** $P < 0.001$ 。

mRNA levels were normalized to *Gapdh* expression, *** $P < 0.001$.

图8 RT-qPCR验证

Fig.8 RT-qPCR analysis

移植后70天, 白血病小鼠的骨髓细胞中*Meis1*、*Hox*基因的表达式比正常小鼠骨髓细胞明显上调, 该结果进一步在分子水平验证了白血病建模成功。

3 讨论

本篇文章阐述了MLL-AF9诱导的小鼠急性髓系白血病的建模方法: 通过MLL-AF9逆转录病毒载体感染小鼠的骨髓Lin⁻细胞, 并移植到致死剂量辐照过的受体鼠内, 可成功构建AML模型。在本研究中, 我们首先比较了不同方法分离的Lin⁻细胞对感染效率的影响, 并发现与免疫磁珠富集的骨髓Lin⁻细胞相比, 5-FU法富集的骨髓Lin⁻细胞更容易被MLL-AF9病毒感染。5-FU可以特异性地杀伤处于分裂期的细胞, 当小鼠腹腔注射5-FU后, 处于分裂期的造血干/祖细胞会被杀伤, 从而激发骨髓中处于G₀期的造血干细胞进入细胞周期。逆转录病毒容易感染处于快速分裂期的细胞, 因此5-FU法富集的骨髓Lin⁻细胞更容易被MLL-AF9逆转录病毒感染。尽管两种分离方法都可以成功地建立AML模型, 但相比试剂盒, 5-FU富集法相对比较便宜, 所以可以节省实验成本。

其次, 我们比较了两种感染策略。(1)经典策略: 使用转染后48 h与72 h收获的病毒上清, 间隔24 h两次感染骨髓Lin⁻细胞; (2)改进策略: 使用转染后48 h收获的病毒上清感染骨髓Lin⁻细胞, 剩余病毒储存于4 °C, 间隔24 h后再次感染骨髓Lin⁻细胞。两者的差别在于第二次感染的病毒上清。我们发现, 利用转染后48 h的病毒上清连续感染骨髓Lin⁻细胞的效率要更高。尽管72 h收获的病毒上清更加新鲜, 但其病

毒滴度比48 h时已经显著降低。因此建议利用48 h收获的逆转录病毒, 间隔24 h连续感染骨髓Lin⁻细胞, 以确保获得更高的感染效率。

此外, 领域内的MLL-AF9逆转录病毒载体有许多版本, 本研究使用的是英国伦敦国王学院(King's College of London) Eric So教授实验室的MSCV-GFP-MLL-AF9质粒, 只需要移植 1×10^4 个MLL-AF9感染的骨髓Lin⁻细胞, 就能够稳定快速地诱发白血病。我们之前也使用过其他版本的MLL-AF9逆转录病毒载体, 尽管其MLL-AF9的cDNA是从临床病人中克隆获得, 但却无法成功地诱发白血病。因此, 计划利用MLL-AF9逆转录病毒载体构建白血病模型时, 要注意MLL-AF9载体的来源, 并对其是否能够诱导白血病进行测试。

综上所述, 本文阐述了一种利用MLL-AF9逆转录病毒构建白血病疾病模型的方法, 不仅为科研人员研究白血病的治病机理提供了疾病动物模型工具, 也为研发抗白血病药物与治疗方法提供了一个有用的体内测试平台。

参考文献 (References)

- 1 Meyer C, Hofmann J, Burmeister T, Groger D, Park TS, Emerenciano M, *et al.* The MLL recombinome of acute leukemias in 2013. *Leukemia* 2013; 27(11): 2165-76.
- 2 Balgobind BV, Raimondi SC, Harbott J, Zimmermann M, Alonzo TA, Auvrignon A, *et al.* Novel prognostic subgroups in childhood 11q23/MLL-rearranged acute myeloid leukemia: results of an international retrospective study. *Blood* 2009; 114(12): 2489-96.
- 3 Dou Y, Milne TA, Ruthenburg AJ, Lee S, Lee JW, Verdine GL, *et al.* Regulation of MLL1 H3K4 methyltransferase activity by its

- core components. *Nat struct mol Biol* 2006; 13(8): 713-9.
- 4 Cosgrove MS, Patel A. Mixed lineage leukemia: a structure-function perspective of the MLL1 protein. *FEBS J* 2010; 277(8): 1832-42.
- 5 Ley TJ, Miller C, Ding L, Raphael BJ, Mungall AJ, Robertson A, *et al*. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2013; 368(22): 2059-74.
- 6 Krivtsov AV, Figueroa ME, Sinha AU, Stubbs MC, Feng Z, Valk PJ, *et al*. Cell of origin determines clinically relevant subtypes of MLL-rearranged AML. *Leukemia* 2013; 27(4): 852-60.
- 7 Ropa J, Saha N, Chen Z, Serio J, Chen W, Mellacheruvu D, *et al*. PAF1 complex interactions with SETDB1 mediate promoter H3K9 methylation and transcriptional repression of *Hoxa9* and *Meis1* in acute myeloid leukemia. *Oncotarget* 2018; 9(31): 22123-36.
- 8 Frohling S, Scholl C, Bansal D, Huntly BJ. HOX gene regulation in acute myeloid leukemia: CDX marks the spot? *Cell Cycle* 2007; 6(18): 2241-5.
- 9 Barabe F, Kennedy JA, Hope KJ, Dick JE. Modeling the initiation and progression of human acute leukemia in mice. *Science* 2007; 316(5824): 600-4.
- 10 Wei J, Wunderlich M, Fox C, Alvarez S, Cigudosa JC, Wilhelm JS, *et al*. Microenvironment determines lineage fate in a human model of MLL-AF9 leukemia. *Cancer Cell* 2008; 13(6): 483-95.
- 11 Buechele C, Breese EH, Schneidawind D, Lin CH, Jeong J, Duque-Afonso J, *et al*. MLL leukemia induction by genome editing of human CD34⁺ hematopoietic cells. *Blood* 2015; 126(14): 1683-94.
- 12 Corral J, Lavenir I, Impey H, Warren AJ, Forster A, Larson TA, *et al*. An Mll-AF9 fusion gene made by homologous recombination causes acute leukemia in chimeric mice: a method to create fusion oncogenes. *Cell* 1996; 85(6): 853-61.
- 13 Collins EC, Pannell R, Simpson EM, Forster A, Rabbitts TH. Inter-chromosomal recombination of Mll and Af9 genes mediated by cre-loxP in mouse development. *EMBO Rep* 2000; 1(2): 127-32.
- 14 Krivtsov AV, Twomey D, Feng Z, Stubbs MC, Wang Y, Faber J, *et al*. Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. *Nature* 2006; 442(7104): 818-22.
- 15 Somervaille TC, Cleary ML. Identification and characterization of leukemia stem cells in murine MLL-AF9 acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* 2006; 10(4): 257-68.
- 16 Chen W, Kumar AR, Hudson WA, Li Q, Wu B, Staggs RA, *et al*. Malignant transformation initiated by Mll-AF9: gene dosage and critical target cells. *Cancer Cell* 2008; 13(5): 432-40.
- 17 Chen W, Li Q, Hudson WA, Kumar A, Kirchhof N, Kersey JH. A murine Mll-AF4 knock-in model results in lymphoid and myeloid deregulation and hematologic malignancy. *Blood* 2006; 108(2): 669-77.
- 18 Stavropoulou V, Kaspar S, Brault L, Sanders MA, Juge S, Moretini S, *et al*. MLL-AF9 expression in hematopoietic stem cells drives a highly invasive AML expressing EMT-related genes linked to poor outcome. *Cancer Cell* 2016; 30(1): 43-58.