

**Charakterisierung von Translokation
t(7;12)-HLXB9/TEL positiven akuten myeloischen
Leukämien im Kindesalter und Identifizierung von
Zielstrukturen des Transkriptionsfaktors HLXB9**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Sarah Wildenhain

aus Berlin

Düsseldorf, April 2011

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

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Arndt Borkhardt
Koreferent: Prof. Dr. Martin Lercher

Tag der mündlichen Prüfung

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis:.....	IV
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis:	VI
Zusammenfassung:	VIII
Summary:.....	IX
1. EINLEITUNG.....	1
1.1 Die akute myeloische Leukämie (AML)	1
1.2 Chromosomale Translokationen in der AML.....	3
1.3 <i>HOX</i> -Genexpression und 11q23/ <i>MLL</i> -Translokationen.....	6
1.4 Die Chromosomentranslokation t(7;12)	8
1.4.1 Das Fusionstranskript <i>HLXB9/TEL</i>	8
1.4.2 Der Transkriptionsfaktor TEL	9
1.4.3 <i>HLXB9</i> und die Homöobox-Genfamilie	10
2. ZIELE DER ARBEIT	14
3. METHODEN.....	16
3.1 Mikrobiologische Arbeiten	16
3.1.1 Kultivierung von Bakterienstämmen	16
3.1.2 Transformation von <i>Escherichia coli</i>	16
3.2 Zellkultur Techniken.....	16
3.2.1 Kultivierung von eukaryontischen Zell-Linien.....	17
3.2.2 Kryokonservierung	17
3.2.3 Elektroporation und Puromycin Selektion von HL60 Zellen.....	17
3.2.4 ATRA-induzierte Differenzierung von HL60 Zellen	18
3.2.5 Präparation von Knochenmarkszellen aus murinem Knochenmark	18
3.2.6 Isolierung und Kultivierung von murinen hämatopoetischen Stammzellen	19
3.2.7 Antikörperfärbung und Analytische Durchflusszytometrie (FACS)	20
3.2.8 Transiente Transfektion mittels Polyethylenimin (PEI)	20
3.2.9 Produktion und Konzentration von retroviralen Überständen	21
3.2.10 Transduktion von murinen hämatopoetischen Stammzellen.....	21
3.3 Arbeiten mit Nukleinsäuren.....	22
3.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	22
3.3.1.1 Standard-PCR.....	22
3.3.1.2 Nested-PCR zur Identifizierung des <i>HLXB9/TEL</i> Bruchpunkts.....	23

3.3.1.3	Quantitative RT-PCR	24
3.3.1.4	Overlap extension PCR	25
3.3.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	27
3.3.3	Agarose-Gelelektrophorese	27
3.3.4	Klonierungen und enzymatische Reaktionen.....	27
3.3.5	DNA-Isolierung	28
3.3.5.1	Isolierung von Plasmid-DNA	28
3.3.5.2	Isolierung von genomischer DNA	28
3.3.6	Sequenzierung.....	28
3.3.7	Extraktion von RNA und cDNA Synthese	29
3.3.8	Genexpressions-Analyse mit Affymetrix Mikroarrays.....	29
3.4	Arbeiten mit Proteinen.....	30
3.4.1	Herstellung von Gesamtprotein-Rohextrakten mittels RIPA-Puffer.....	30
3.4.2	Chromatin-Immunpräzipitation und Promotor-Array-Analyse (ChIP-on-Chip)	30
3.4.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und <i>Western Blot</i> Analysen	33
3.5	Daten-Analyse, Software und Statistik.....	35
4.	ERGEBNISSE	37
4.1	Identifizierung und Charakterisierung von t(7;12) positiven AMLs	37
4.1.1	Identifizierung des <i>HLXB9/TEL</i> Fusionstranskripts mittels RT-PCR.....	37
4.1.2	Charakterisierung der t(7;12)- <i>HLXB9/TEL</i> positiven Patienten	39
4.1.3	Genexpression in t(7;12) und 11q23 pos. Säuglings-AMLs Zellen.....	40
4.2.	Identifizierung von Zielstrukturen des Transkriptionsfaktors <i>HLXB9</i>	50
4.2.1	Überexpression von <i>HLXB9</i> in HL60 Zellen.....	50
4.2.2	Identifizierung potentieller Zielstrukturen von <i>HLXB9</i> (ChIP-on-Chip)	56
4.2.3	Auswirkung von <i>HLXB9</i> auf die Genexpression (Affymetrix-Arrays).....	61
4.2.4	Validierung von Ziel-Genen mittels qRT-PCR und <i>Western Blot</i>	66
4.2.4.1	Validierung der differentiellen Genexpression.....	66
4.2.4.2	Validierung der Promotor-Bindung.....	68
4.2.4.3	Validierung von Ziel-Genen in t(7;12) pos. Patientenzellen	69
4.2.5	Bedeutung der <i>HLXB9</i> -Homöobox für die Regulation der Genexpression	69
4.2.6	Auswirkung von <i>HLXB9</i> auf die ATRA-induzierte Expression myeloischer Antigene	72
4.3	Expression von <i>HLXB9</i> in murinen <i>lineage (lin)</i> neg. Stammzellen	76
4.3.1	<i>Lin</i> neg. Selektion von murinen Stammzellen	77
4.3.2	Gamma-Retrovirale Transduktion von <i>lin</i> neg. Zellen	79
4.3.3	Ausblick: Validierung der differentiellen Ziel-Genexpression in <i>HLXB9</i> pos. murinen Stammzellen.....	80

5. DISKUSSION.....	81
5.1 Vergleichende Genexpression von t(7;12) und 11q23/ <i>MLL</i> pos. Säuglingsleukämie-Zellen	81
5.1.1 Differentielle Genexpression von <i>HOX</i> -Genen.....	81
5.1.2 Anreicherung von Zelladhäsions-Signalwegen.....	82
5.2 HLXB9 wirkt durch direkte DNA-Interaktion als transkriptioneller Repressor in hämatopoetischen Zellen	86
5.3 PTGER2 ist ein direktes Ziel-Gen von HLXB9	89
5.4 HLXB9 verstärkt die ATRA induzierte CD11b-Expression	92
6. LITERATUR.....	95
7. ANHANG.....	106
7.1 Materialien	106
7.1.1 Patientenproben, Zell-Linien, Tiere und Bakterien.....	106
7.1.2 Chemikalien und Reagenzien	107
7.1.3 Nährmedien und Zusätze für Bakterien- und Zell-Kultur	108
7.1.4 Kommerziell erhältliche Systeme (Kits).....	108
7.1.5 Geräte und Apparaturen.....	109
7.1.6 Plasmide und Oligonukleotide.....	109
7.1.7 Enzyme und Kits für enzymatische Reaktionen	112
7.1.8 Antikörper, Säulenmaterialien und magn. <i>beads</i>	112
7.1.9 Zytokine und Wachstumsfaktoren	113
7.1.10 Arrays	113
7.2 Sequenzen	114
7.2.1 Nukleotidsequenz <i>HLXB9-flag</i> (GENEART).....	114
7.2.2 Nukleotidsequenz <i>flag-HLXB9/TEL</i> (GENEART).....	115
7.2.3 Promotor-Sequenzen der ChIP-on-Chip Ziel-Gene	116
7.3 Datentabellen	118
Eigene Veröffentlichungen	XI
Lebenslauf.....	XIII
Eidesstattliche Erklärung	XIV
Danksagung	XV

Abkürzungsverzeichnis:

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
APL	Akute Promyelozyten-Leukämie
AS	Aminosäure
ATRA	<i>all-trans-retinoic acid</i> - Retinsäure
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
bp	Basenpaare
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	(<i>cluster of differentiation</i>) Differenzierungsantigen
cDNA	(<i>complementary desoxy ribonucleic acid</i>) komplementäre Desoxyribonukleinsäure
chr.	Chromosom
deion.	deionisiert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	(<i>desoxy ribonucleic acid</i>) Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EFS	<i>event-free-survival</i> – Ereignisfreies Überleben
EGAN	<i>Exploratory Gene Association Networks</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
g	Gravitationskonstante
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GO	<i>gene ontology</i>
GVO	genetisch veränderter Organismus
h	Stunden
HSZ	hämatopoetische Stammzelle
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton

LB	Luria Bertani Medium
MCS	<i>Multiple cloning site</i>
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
min	Minuten
Mio.	Millionen
MLL	<i>mixed-lineage-leukemia</i>
mRNA	(<i>messenger RNA</i>) Boten RNA
ms	Millisekunden
NaCl	Natriumchlorid
neg.	negativ
p.a.	<i>pro analysi</i>
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	<i>polymerase-chain-reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PEI	Polyethylenimin
PIC	Protease-Inhibitor-Cocktail
pos.	positiv
RNA	(<i>ribonucleic acid</i>) Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
qRT-PCR	quantitative reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
S1/2	Sicherheitsstufe 1 / 2
sek	Sekunden
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
U	<i>units</i>
üN	über Nacht
V	Volt
vgl.	Vergleich
vs	versus
WB	<i>Western Blot</i>

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis:

Abb. 1: Einfluss von Transkriptionsfaktoren auf die myeloische Differenzierung.....	2
Abb. 2: Schematische Darstellung von <i>HLXB9</i> , <i>TEL</i> und <i>HLXB9/TEL</i>	9
Abb. 3: Schematische Darstellung der <i>HLXB9</i> Struktur	11
Abb. 4: Grafische Darstellung der Deletion <i>HLXB9</i> (Del1)	26
Abb. 5: Allgemeiner Überblick der ChIP-on-Chip Methode.....	31
Abb. 6: RT-PCR zur Identifizierung des <i>HLXB9/TEL</i> Bruchpunktes.....	37
Abb. 7: Grafische Darstellung des <i>HLXB9/TEL</i> Bruchpunktes	38
Abb. 8: Expression von <i>HLXB9</i> in t(7;12) pos. Patientenzellen	41
Abb. 9: Vergleich der relativen Genexpression von <i>c-MYB</i> , <i>MEIS1</i> und <i>HOXA9</i> in Säuglingsleukämien.	42
Abb. 10: Heatmap Darstellung der Genexpressions-Analyse „t(7;12) vs CD34+“ und „t(9;11) vs CD34+“..	43
Abb. 11: KEGG-Signalweg und GO-Term Analyse differentiell regulierter Gene „t(7;12) vs CD34+“	45
Abb. 12: Differentiell regulierte Gene der Analyse „t(7;12) vs t(9;11)“	47
Abb. 13: Expression von CD117 und CD34 in t(7;12) und t(9;11) pos. Patientenzellen	48
Abb. 14: KEGG-Signalweg Analyse differentiell regulierter Gene „t(7;12) vs t(9;11)“	49
Abb. 15: Relative Expression von <i>HLXB9</i> in vier verschiedenen Zell-Linien.....	51
Abb. 16: Schematische Darstellung der Konstrukte des Überexpressionsvektors pMC.....	52
Abb. 17: Funktionalität der pMC-Konstrukte in HEK 293T Zellen.	53
Abb. 18: Proteinexpression von <i>HLXB9</i> in HL60[<i>HLXB9</i>] Zellen.	54
Abb. 19: Nachweis von <i>HLXB9/TEL</i> in HL60[<i>HLXB9/TEL</i>] Zellen auf genomischer und transkriptioneller Ebene; keine Proteinexpression von <i>HLXB9/TEL</i>	56
Abb. 20: Optimierung der Sonifizierungseffizienz	57
Abb. 21: <i>Western Blot</i> Analyse der ChIP-Protein Lysate.	58
Abb. 22: Visualisierung der <i>peak</i> Detektion im Bereich des <i>PTGER2</i> Promotors.	59
Abb. 23: Auswertung der ChIP-Analysen.	60
Abb. 24: Qualitätskontrollen der für die Affymetrix-Arrays verwendeten Ausgangs-RNA.....	61
Abb. 25: Heatmap der signifikant differentiell regulierten Gene der Analyse „HL60[<i>HLXB9</i>] vs HL60[<i>mock</i>]“	62
Abb. 26: KEGG-Signalweg und GO-Term Analyse differentiell regulierter Gene HL60[<i>HLXB9</i>] vs HL60[<i>mock</i>].....	64
Abb. 27: Venn-Diagramm der drei ChIP-Replikate sowie der Expressions-Analyse.....	65
Abb. 28: Validierung des veränderten Gen- und Protein-Expressionsprofils der Ziel-Gene.	67
Abb. 29: Validierung der Bindung von <i>HLXB9</i> an die Promotoren von <i>PTGER2</i> , <i>IL8</i> , <i>ZYXIN</i> und <i>ETS1</i> mittels SYBR [®] Green qRT-PCR.	68
Abb. 30: Vergleichende Genexpression von Ziel-Genen in t(7;12) und t(9;11) pos. Patientenzellen, sowie CD34+ Kontrollproben	69
Abb. 31: Deletion der potentiellen DNA-bindenden Domäne von <i>HLXB9</i>	70
Abb. 32: Protein-Expression von <i>HLXB9</i> (Del1) in HL60[<i>HLXB9</i> (Del1)] Zellen	71

Abb. 33: Expression ausgewählter Ziel-Gene in HL60[<i>HLXB9</i> (Del1)] Zellen mittels qRT-PCR.....	72
Abb. 34: Optimierung zur CD11b Induktion nach Zugabe von ATRA.....	74
Abb. 35: CD11b Induktion nach Zugabe von ATRA.....	75
Abb. 36: CD38 Induktion nach Zugabe von ATRA.....	76
Abb. 37: <i>Lin</i> neg. Selektion von murinen Knochenmarkszellen.....	78
Abb. 38: Expression von <i>Hlx9</i> in murinen hämatopoetischen Stammzellen.....	79
Abb. 39: Klonierung von <i>HLXB9</i> in den gamma-retroviralen Vektor pMSCV.....	79
Abb. 40: Genexpression von Ziel-Genen in <i>HLXB9</i> pos. murinen hämatopoetischen Stammzellen.....	80
Abb. 41: Model zur Leukämogenese durch gestörte Zell-Interaktionen.....	84
Abb. 42: Model zum Einfluss von <i>HLXB9</i> auf die PTGER2 Expression.....	91
Abb. 43: Übersichtsdarstellung der Ausgangsvektoren pMC und pMSCV.....	110

Tabellenverzeichnis:

Tab. 1: FAB und WHO Klassifikation der Akuten Myeloischen Leukämie.....	3
Tab. 2: Charakterisierung von t(7;12)- <i>HLXB/TEL</i> positiven Patienten.....	39
Tab. 3: Genliste der 81 Gene, welche sich signifikant ($p \leq 0,05$) zwischen HL60[<i>HLXB9</i>] und HL60[mock] Zellen unterscheiden.....	63
Tab. 4: Charakterisierung der 11q23/MLL positiven Patienten.....	106
Tab. 5: Verwendete humane und murine Primer.....	110
Tab. 6: Genliste der Affymetrix Analyse „t(7;12) vs CD34+ Kontrollproben“.....	118
Tab. 7: Genliste der Affymetrix Analyse „t(7;12) vs t(9;11)“.....	119

Zusammenfassung:

Akute Leukämien im Kindesalter sind häufig durch numerische oder strukturelle chromosomale Aberrationen in den leukämischen Blasten gekennzeichnet. Für das Verständnis der Leukämieentstehung, der Ausprägung unterschiedlicher Subtypen, sowie für eine adäquate Risikostratifizierung und Therapieentscheidung ist eine detaillierte molekulargenetische Charakterisierung unerlässlich. Säuglings-AMLs mit einer Translokation t(7;12) sind durch eine äußerst schlechte Prognose charakterisiert. Molekulargenetisch wird die Translokation t(7;12) durch die Bildung eines *HLXB9/TEL* Fusionsgens und eine starke Expression des Wildtyp *HLXB9* Allels begleitet. Der Überexpression von *HLXB9* wird eine entscheidende Rolle in der t(7;12) vermittelten Leukämogenese zugeschrieben.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden Genexpressionsanalysen an primären Knochenmarksproben von t(7;12) und 11q23/*MLL* pos. Patienten durchgeführt und differentiell exprimierte Gene ermittelt. Unterschiede zwischen den beiden AML-Kohorten ergaben sich zum einen in der Expression von *HOX*-Genen, welche ausschließlich in den 11q23 pos. Leukämiezellen verstärkt exprimiert werden. Zum anderen konnte anhand von Signalweg-Analysen gezeigt werden, dass die differentiell exprimierten Gene besonders Signalwege der Zell-Adhäsion beeinflussen. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden direkte und sekundäre Ziel-Gene von *HLXB9* im HL60 Zellsystem beschrieben. Mittels ChIP-on-Chip Analyse wurden Promotoren identifiziert, an die *HLXB9* als potenzieller Transkriptionsfaktor bindet. Mit Hilfe einer vergleichenden Genexpressionsanalyse von *HLXB9* pos. und *HLXB9* neg. HL60 Zellen konnte *HLXB9* als transkriptioneller Repressor beschrieben und differentiell exprimierte Gene identifiziert werden. Anhand der beiden Screening-Methoden wurden vier übereinstimmende Ziel-Gene (*PTGER2*, *IL8*, *ZYXIN* und *ETS1*) identifiziert. Für diese Ziel-Gene konnte in den Array-Analysen und in der qRT-PCR gezeigt werden, dass *HLXB9* an die entsprechenden Promotorregionen bindet, und dass zusätzlich die Genexpression der Ziel-Gene in den *HLXB9* pos. Zellen vermindert wird. Für *PTGER2* konnte zusätzlich mit Hilfe einer *HLXB9* Deletionsmutante gezeigt werden, dass die konservierte Homöodomäne von *HLXB9* für die Regulation von *PTGER2* notwendig ist. Des Weiteren wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass *HLXB9* die ATRA-induzierte Expression des Differenzierungsantigens CD11b verstärkt.

Summary:

Blast cells of acute leukemias are mainly characterized by numerical or structural chromosomal aberrations. A detailed molecular description of the aberrant cytogenetic profile is indispensable for risk stratification and choice of optimal therapy regimen. Infant AMLs with a translocation t(7;12) are clinically characterized by a very poor outcome. The translocation t(7,12) results in a fusion transcript *HLXB9/TEL* and furthermore in an aberrant expression of the un-rearranged *HLXB9* allele. This work is based on the assumption that *HLXB9* plays a crucial role in the transformation process of t(7;12) pos. leukemias.

In the first part of this thesis a comparative gene expression profiling of primary bone marrow samples from t(7;12) and 11q23/*MLL* positive infant AMLs was performed. Both leukemia entities can be clearly distinguished by the expression of a subset of *HOX*-genes, which is exclusive for the 11q23 pos. cohort. Differentially expressed genes can be attributed to pathways which interfere in cell-adhesion or related pathways. In a second part of this work we identified direct and indirect target genes of *HLXB9* in a HL60 cell line system. Promoter regions, which are bound by the potential transcription factor *HLXB9*, were identified by ChIP-on-chip analysis. A comparative gene expression microarray analysis of *HLXB9* pos. and *HLXB9* neg. HL60 cells revealed that *HLXB9* acts as a transcriptional repressor. Both screening methods were used to identify overlapping target genes. We identified four target genes (*PTGER2*, *IL8*, *ZYXIN* and *ETS1*), which show direct binding of *HLXB9* to the corresponding promoter regions and a decreased gene expression in *HLXB9* pos. cells as well. A functional homeodomain of *HLXB9* is essential for the regulation of the target-gene *PTGER2*. Additionally, this study demonstrated that *HLXB9* is able to increase the ATRA-induced expression of the myeloid differentiation antigen CD11b.

1. Einleitung

1.1 Die akute myeloische Leukämie (AML)

Akute Leukämien sind maligne Neoplasien des hämatopoetischen Systems. Sie entstehen im Knochenmark durch die klonale Expansion von genetisch veränderten pluripotenten Stammzellen oder hämatopoetischen Vorläuferzellen (Blasten) (Fialkow *et al.*, 1989).

Ursachen der AML:

Die Ursachen für die Entstehung einer AML sind bislang weitestgehend unbekannt und die Mehrzahl der Patienten weisen keine angeborenen genetischen oder prädisponierenden Faktoren auf, welche die Leukämieentstehung begünstigen. Zu diesen begünstigenden Faktoren gehören u.a. die Exposition gegenüber ionisierenden Strahlen (z.B. Zwischenfälle in Atomreaktoren und Strahlentherapie) und Chemikalien (z.B. Zytostatika, Benzol). Des Weiteren kann eine AML sekundär als Komplikation einer anderen Grunderkrankung (z.B. Myelodysplastisches Syndrom (MDS)) hervorgehen. Ebenfalls besteht ein erhöhtes Risiko für AML bei bestimmten Erkrankungen mit Erbgutveränderungen, wie z.B. Trisomie 21 (Rosner and Lee, 1972) oder kongenitalen Syndromen, welche mit erhöhter Chromosomenbrüchigkeit einhergehen, wie z.B. die Fanconi-Anämie (Auerbach, 1992).

Phänotyp und Prognose:

Als Folge der Expansion von myeloischen Blasten im Knochenmark werden funktionsfähige, hämatopoetische Zellen verdrängt und es kommt zur Knochenmarkinsuffizienz. Sekundär kann es zur Ausschwemmung der malignen Blasten ins periphere Blut und zur Infiltration von extramedullären Organen kommen. Die Patienten leiden unter Müdigkeit, Blässe, verstärkter Blutungsneigung und Anfälligkeit für Infektionen. Als immunphänotypische Charakterisierung der myeloischen Blasten dient die asynchrone Expression der Stammzellantigene CD34 und CD117 zusammen mit den myeloischen Antigenen CD13, CD15, CD33 und CD65. In einigen Fällen kann es zur aberranten Expression der lymphatischen Marker CD2, CD7, CD19 und CD56 auf den myeloischen Blasten kommen.

Bei 15-20% der Leukämien im Kindesalter handelt es sich um AMLs (Downing and Shannon, 2002). In den letzten 20 Jahren konnte mittels intensiver Induktionschemotherapie ein ereignisfreies Überleben (EFS) von bis zu 65% erreicht werden (Kaspers and Creutzig, 2005). Trotz großer Erfolge in der Therapie erleidet dennoch die Hälfte aller Patienten ein Rezidiv. Die Analyse und Beschreibung von prognostischen molekularbiologischen Markern ist daher unerlässlich für eine gezielte Risikostratifizierung und Therapie.

Klassifikation der AML:

Die klonale Expansion der leukämischen Blasten kann in den pluripotenten Stammzellen oder in hämatopoetischen Vorläuferzellen entstehen. Die Abb. 1 zeigt einen Ausschnitt der myeloischen Differenzierung von der hämatopoetischen Stammzelle zu reifen Makrophagen und neutrophilen Zellen. Zusätzlich sind Transkriptionsfaktoren dargestellt, denen eine Schlüsselfunktion in der myeloischen Differenzierung zukommt.

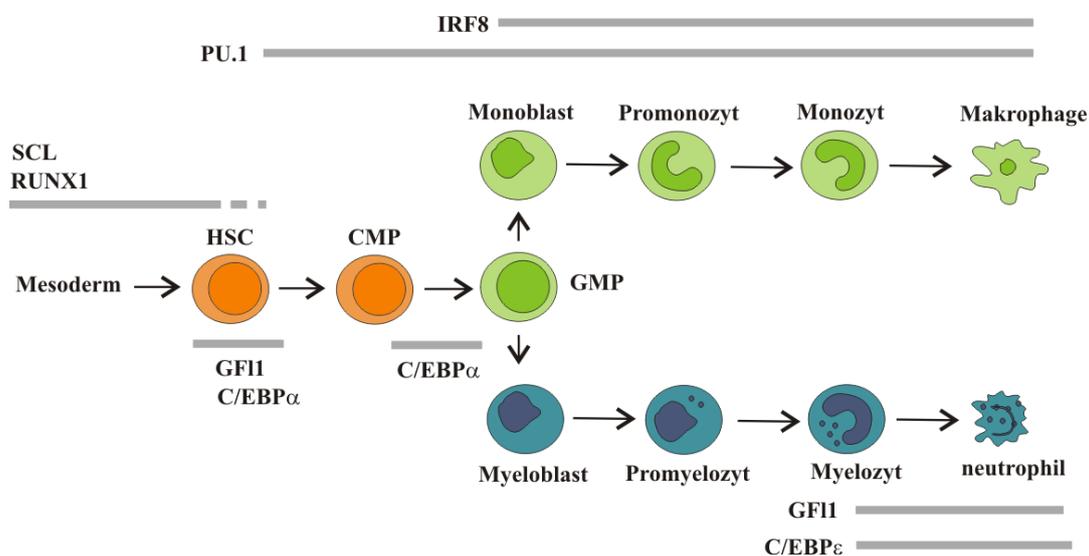


Abb. 1: Einfluss von Transkriptionsfaktoren auf die myeloische Differenzierung. SCL (*stem-cell leukemia factor*), RUNX1 (*Runt-related transcription factor 1*), GF11 (*growth-factor independent 1*), C/EBP α (*CCAAT/enhancer binding protein α*), HSC (*hematopoietic stem cell*), CMP (*common myeloid progenitor*), GMP (*granulocyte/monocyte progenitor*), IRF8 (*interferon-regulatory factor 8*). Abbildung nach (Rosenbauer and Tenen, 2007)

Abhängig von der jeweiligen Reifungsstufe der myeloischen Zelle, in der die maligne Transformation stattfindet, werden unterschiedliche Subtypen der AML beschrieben. Auf dieser morphologischen Einteilung der Blasten beruht die Klassifikation der FAB (French-American-British) Subtypen (Bennett *et al.*, 1985). Im Jahr 2001 wurde die Einteilung durch die Weltgesundheitsorganisation (WHO) erneuert und basiert nun zusätzlich auf zytogenetischen Merkmalen (Vardiman *et al.*, 2002). In der Tab. 1 sind die FAB- und die WHO Klassifikationen zusammengefasst.

Tab. 1: FAB und WHO Klassifikation der Akuten Myeloischen Leukämie nach (Bennett *et al.*, 1985; Vardiman *et al.*, 2009)

Klassifikation der Akuten Myeloischen Leukämie	
WHO Klassifikation	FAB Klassifikation
AML mit wiederkehrenden zytogenetischen Translokationen	M0 AML mit minimaler Differenzierung
AML mit t(8;21)(q22;q22), (AML1/ETO)	unabhängig von der Blastenzahl im Blut oder Knochenmark! bei allen weiteren AML-Subtypen 20% oder mehr Blasten im Blut oder Knochenmark
AML mit inv(16)(p13.1;q22) oder t(16;16)(p13.1;q22), (CBFB/MYH11)	
APL mit t(15;17)(q22;q12), (PML/RAR α)	
AML mit t(9;11)(p22;q23), (MLL3-MLL)	
AML mit t(6;9)(p23;q34), (DEK-NUP214)	
AML mit inv(3)(q21;q26.2) oder t(3;3)(q21;q26.2), (RPN1-EVI1)	
AML (megakaryoblastär) mit t(1;22)(p13;q13), (RBM15-MKL1)	
Provisorische Entitäten: AML mit mutiertem NPM1	
Provisorische Entitäten: AML mit mutiertem CEBPA	
AML mit MDS-bezogenen Veränderungen	
Therapie-bedingte AML	M2 Myeloblasten-Leukämie mit Ausreifung
AML ohne weitere Kategorien	M3 akute promyelozytäre Leukämie (APL)
mit minimaler Differenzierung	M4 akute myelomonozytäre Leukämie
ohne Ausreifung	M5 akute monoblastäre Leukämie
mit Ausreifung	M6 akute erythroblastäre Leukämie
akute myelomonozytäre Leukämie	M7 akute megakaryoblastäre Leukämie
akute monoblastische und monozytäre Leukämie	
akute Erythroleukämie	
akute Megakaryoblasten-Leukämie	
akute Basophilen-Leukämie	
akute Panmyelosis mit Myelofibrose	
Myeloisches Sarkom	
Myeloische Proliferationen bei Down-Syndrom	
Blastische plasmazytoide dendritische Zell-Neoplasien	

1.2 Chromosomale Translokationen in der AML

70-85% der pädiatrischen AMLs weisen chromosomale Anomalien in den leukämischen Blasten auf (Raimondi *et al.*, 1999; Wells *et al.*, 2002). Dazu zählen numerische Veränderungen (Veränderung der Chromosomenanzahl) und/oder strukturelle chromosomale Veränderungen (balancierte Translokationen, Deletionen, Inversionen). In etwa 20% der AML Patienten können balancierte chromosomale Translokationen

nachgewiesen werden. Zu den Translokationen, die in der pädiatrischen AML am häufigsten vorkommen, gehören t(8;21)-*AML/ETO* (7-16%), inv16-*CBF β /MYH11* (3-11%), t(11q23)/*MLL* (14-22%) und t(15;17)-*PML/RAR α* (2-10%) (Manola, 2009).

Bei den leukämischen Zellen von Säuglingen und jungen Kindern mit einer Erstdiagnose vor dem 2. Lebensjahr zeigt sich eine andere Häufigkeitsverteilung der chromosomalen Translokationen. Bei über 60% ist eine Translokation des Gens *MLL* (*mixed-lineage-leukemia*) zu beobachten (in den meisten Fällen *MLL/AF9*, FAB M5) (Pui *et al.*, 1996; Sorensen *et al.*, 1994). Weitere Translokationen, welche ausschließlich bei AML-Patienten unter einem Jahr auftreten, sind die Translokationen t(1;22)-*OTT/MAL* und t(7;12)-*HLXB9/TEL*. Eine weitere äußerst seltene Translokation ist die t(6;17), die in den ersten vier Wochen nach der Geburt diagnostiziert wird (Ferguson *et al.*, 2005).

Chromosomale Translokationen können sich unterschiedlich auf die hämatopoetischen Zellen auswirken. Z.B. kann die Fusion bewirken, dass Onkogene mit einem konstitutiv aktiven regulatorischen Element versehen werden und somit aberrant exprimiert werden, wie es z.B. bei der Translokation *MYC/IGH* in B-Zell Leukämien der Fall ist (Rabbitts, 1994). In anderen Fällen kann es zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen kommen, die durch die Fusion zerstört werden. Häufiger ist jedoch die Bildung eines chimären Fusionstranskripts, welches zur Bildung von *in-frame* Fusionsproteinen führt. Bei diesen Fusionsproteinen handelt es sich in vielen Fällen um neugebildete nukleäre Transkriptionsfaktoren, die die Genregulation in veränderter Weise beeinflussen.

Chromosomale Translokationen können z.B. durch einen Differenzierungsarrest die Leukämogenese initiieren, jedoch sind sie in den meisten Fällen nicht die alleinige Ursache für die Leukämieentstehung (Raimondi *et al.*, 1999). Für die vollständige Transformation sind weitere genetische Veränderungen (*second hits*) notwendig, z.B. Mutationen in Transkriptionsfaktoren. Proliferativ wirken Mutationen in Onkogenen (z.B. *RAS*) sowie Mutationen in Rezeptor-Tyrosin Kinasen (z.B. *KIT*) und Tyrosin Phosphatasen (Goemans *et al.*, 2005). Zusätzlich treten häufig interne Tandem Duplikationen des Gens *FLT3*, sowie *NPM1* Mutationen und partielle Duplikationen des Gens *MLL* auf (Brown *et al.*, 2007; Shimada *et al.*, 2008; Zwaan *et al.*, 2003).

Entstehung von Translokationen:

Translokationen entstehen durch Brüche in der doppelsträngigen DNA zweier nicht-homologer Chromosomen. In den meisten Fällen finden die Brüche in sogenannten *breakpoint cluster regions* statt. Diese liegen zum größten Teil in Regionen des Euchromatins, welche aktiv transkribiert werden (Khanna and Jackson, 2001). Wenn die Doppelstrangbrüche von den zellulären Reparaturmechanismen (homologe Rekombination und *non-homologous end-joining*) nicht behoben werden können und die betroffenen Chromosomen sich in räumlicher Nähe zueinander befinden, kann es zur Ausbildung einer Translokation kommen. In der Leukämie sind häufig balancierte Translokationen zu beobachten, d.h. es kommt zu keiner absoluten Änderung der Anzahl des genetischen Materials. Als natürliches zelluläres Phänomen haben balancierte Translokationen in den meisten Fällen keine negative Auswirkung. Erst wenn sich durch die Fusion z.B. ein aktives Fusionsprotein bildet, welches einen Selektionsvorteil für die Zelle bewirkt, kann es zur Bildung eines präleukämischen Klons kommen (Greaves and Wiemels, 2003; Nickoloff *et al.*, 2008).

Translokationen als zytogenetischer Marker in der AML:

Eine genaue zytogenetische Analyse von AML Zellen ist sowohl für die Risikostratifizierung, als auch für eine optimale Therapie unerlässlich. So weisen z.B. Patienten mit den Translokationen t(8;21) und t(15;17), sowie inv(16) und Patienten mit Down Syndrom eine gute Prognose auf. Im Gegensatz dazu haben Patienten mit den zytogenetischen Besonderheiten -5/del(5q), -7/del(7q) oder einem komplexen Karyotyp mit mehr als drei chromosomalen Veränderungen eine schlechte Prognose (Lange *et al.*, 1998; Meshinchi *et al.*, 2003). Patienten mit einer akuten promyelozytischen Leukämie, welche in fast allen Fällen mit einem Fusionsstranskript *PML/RAR α* einher geht, sprechen gut auf eine Therapie mit *All-trans*-Retinsäure (ATRA) an (Fenaux *et al.*, 2000; Mann *et al.*, 2001). Durch die Therapie mit ATRA wird die myeloische, insbesondere die granulozytäre Differenzierung induziert. In *PML/RAR α* positiven Zellen ist dieser Effekt molekularbiologisch gut beschrieben. In Abwesenheit von ATRA interagiert das Fusionsprotein *PML/RAR α* mit einem Komplex aus Ko-Repressoren und reprimiert in aberranter Weise die Transkription von Genen, welche die Differenzierung regulieren. Durch die Zugabe von ATRA in einer hohen pharmakologischen Dosis von $> 1 \mu\text{M}$ kann

der Repressorkomplex gelöst und die Ausdifferenzierung der Blasten initiiert werden (Barber *et al.*, 2008; Hong *et al.*, 1997).

1.3 *HOX*-Genexpression und 11q23/*MLL*-Translokationen

***HOX*-Genexpression in hämatopoetischen Stammzellen und akuten Leukämien:**

Die Familie der *HOX* Transkriptionsfaktoren gehört zur Klasse 1 der Homöobox-Gene und wurde ursprünglich als Schlüsselregulator der anterior-posterioren Achsenbildung während der embryonalen Entwicklung identifiziert (Krumlauf, 1994). *HOX*-Gene werden verstärkt in primitiven hämatopoetischen Zellen exprimiert und zeigen während der Differenzierung ein niedriges Expressionsniveau (Kawagoe *et al.*, 1999; Moretti *et al.*, 1994). Zusätzlich zu dieser koordinierten Regulation beeinflussen die einzelnen *HOX*-Gene die Ausdifferenzierung der unterschiedlichen Zellen des hämatopoetischen Systems (Sauvageau *et al.*, 1995; Sauvageau *et al.*, 1997).

Für eine spezifische und hoch affine DNA-Interaktion interagieren die *HOX*-Proteine mit spezifischen Ko-Faktoren (Moens and Selleri, 2006). Diese Ko-Faktoren werden von den TALE (*three amino acid loop extension*) Homöo-Familien PBX und MEIS gebildet (Mann, 1995; Shen *et al.*, 1997).

Aufgrund ihrer Schlüsselrolle in der frühen Hämatopoese, kommt den *HOX*-Genen auch in akuten Leukämien eine entscheidende Rolle zu. Zahlreiche Studien belegen, dass *HOX*-Gene und ihre Ko-Faktoren in vielen akuten lymphatischen und myeloischen Leukämien aberrant exprimiert werden (Drabkin *et al.*, 2002; Golub *et al.*, 1999; Lawrence *et al.*, 1999). Eine direkte Rolle in akuten Leukämien spielen einzelne *HOX*-Gene durch die Fusion mit Nucleoporin (*NUP98-HOX*), wobei es zu einer Verstärkung des regulatorischen Effektes auf die Ziel-Gene kommt (Ghannam *et al.*, 2004).

Unabhängige Experimente mit retroviral transduzierten murinen Stammzellen zeigen deutlich, dass die Überexpression verschiedener *HOX*-Gene z.B. *HOXA9* den transduzierten Zellen einen Wachstumsvorteil verschafft und zu einer langen präleukämischen Latenzperiode führt. Die zeitgleiche Expression des Ko-Faktors *MEIS1* verkürzt die Latenzperiode und führt zu einer raschen Progression der Leukämie (Thorsteinsdottir *et al.*, 2001). Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Expression von *HOXA9*

sehr stark mit unzureichenden Behandlungserfolgen von AML Patienten korreliert (Golub *et al.*, 1999).

Expression von *HOX*-Genen in 11q23/*MLL*-positiven AMLs:

Ein wichtiger Regulator der *HOX*-Genexpression während der embryonalen Entwicklung und Hämatopoese ist die Methyltransferase *MLL* (*mixed-lineage-leukemia*). *MLL* kann die Expression von *HOX*-Genen über direkte Interaktion mit dem *HOX*-Promotor (Milne *et al.*, 2005) oder über die Modellierung der Chromatinstruktur und Histon Modifikationen beeinflussen (Krivtsov and Armstrong, 2007). In akuten Leukämien sind derzeit über 50 verschiedene Translokationen beschrieben, an denen das Gen *MLL* beteiligt ist. Innerhalb der AMLs im Kindesalter ist die Translokation t(9;11)-*MLL/AF9* mit 11% am häufigsten vertreten (Manola, 2009). Bei dem Großteil der *MLL*-assoziierten Fusionspartner handelt es sich um Transkriptionsfaktoren, die durch die Translokation in ihrer Aktivität verstärkt werden (Zeisig *et al.*, 2003). Des Weiteren finden sich Histon-Acetyltransferasen und zytoplasmatische Proteine unter den Fusionspartnern (Krivtsov *et al.*, 2007). Die Funktionen der chimären *MLL*-Proteine sind dementsprechend äußerst divers.

Obwohl *MLL*-Fusionsproteine zahlreiche Ziel-Gene besitzen, wird vermutet, dass der verstärkten Expression von *HOX*-Genen eine Schlüsselrolle bei dem Transformationsprozess durch *MLL*-Fusionsproteine zukommt (Slany, 2009). So zeigen z.B. *in vitro* Experimente, dass das Fusionsprotein *MLL-ENL* eine erhöhte Selbsterneuerungskapazität und einen Differenzierungsstopp in murinen hämatopoetischen Stammzellen bewirken kann. Dieser Phänotyp geht mit einer erhöhten Expression von *HOXA9* und *MEIS1* einher (Zeisig *et al.*, 2004). Des Weiteren kann die gezielte Expression von *HOXA9* und *MEIS1* die Funktion des *MLL-ENL* Fusionsproteins ersetzen. Durch die Expression der *HOX*-Gene lassen sich *MLL* positive Leukämien deutlich von AMLs oder ALLs ohne *MLL*-Translokation unterscheiden (Armstrong *et al.*, 2002; Haferlach *et al.*, 2005).

1.4 Die Chromosomentranslokation t(7;12)

Die Translokation t(7;12)(q36;p13) wurde erstmals im Jahr 2000/2001 anhand von Karyotypisierung und Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) in myeloischen Blasten beschrieben. Als zytogenetische Besonderheit ist in fast allen beschriebenen Fällen ein zusätzliches Chromosom 19 in den leukämischen Zellen nachweisbar (Simmons *et al.*, 2002; Slater *et al.*, 2001; Tosi *et al.*, 2000; von Bergh *et al.*, 2006). Der genomische Bruchpunkt wird als heterogen beschrieben (Simmons *et al.*, 2002; Tosi *et al.*, 2003).

Die Translokation beschränkt sich fast ausschließlich auf akute myeloische Leukämien im Säuglingsalter und wird mit einer Inzidenz von 20-30% der Säuglings-AMLs angegeben (Slater *et al.*, 2001; von Bergh *et al.*, 2006). Die Morphologie der Blasten entspricht am ehesten den FAB Subtypen M0 und M1. Vereinzelt sind Patienten mit einer megakaryoblastären Leukämie beschrieben (Taketani *et al.*, 2008; von Bergh *et al.*, 2006). Immunologisch sind die Blasten durch eine hohe Expression von CD34 (65-86%) charakterisiert. Mit einem Ereignisfreiem Überleben von 0% innerhalb von drei Jahren, haben die Patienten eine sehr schlechte Prognose (von Bergh *et al.*, 2006).

1.4.1 Das Fusionstranskript *HLXB9/TEL*

Auf molekularer Ebene führt die Translokation zu einer Fusion der Gene *HLXB9* (*homeobox HB9*) und *TEL* (*translocation-ETS-leukemia*) sowie zu einem Fusionstranskript *HLXB9/TEL*. In der Literatur sind jedoch auch Einzelfälle beschrieben, bei denen trotz einer genomischer Translokation t(7;12) kein Fusionstranskript nachgewiesen werden konnte (Simmons *et al.*, 2002). Ein Fusionsprotein HLXB9/TEL konnte bisher in keiner Studie gezeigt werden. Auf genomischer Ebene führt die Translokation zu einer Fusion des Exons 1 von *HLXB9* mit dem Exon 3 des *TEL*-Gens (Abb. 2). Zusätzlich ist eine Fusion mit dem Exon 2 des *TEL*-Gens beschrieben, in diesem Fall kommt es jedoch zum vorzeitigen Abbruch der Proteinbiosynthese. Ein reziprokes Transkript *TEL/HLXB9* ist bisher nicht beschrieben worden (Ballabio *et al.*, 2009; Beverloo *et al.*, 2001). Sowohl bei *HLXB9* als auch bei *TEL* handelt es sich um Transkriptionsfaktoren. Das potentielle Fusionsprotein HLXB9/TEL enthält die funktionellen Domänen des *TEL*-Proteins (vgl. Abschnitt 1.4.2).

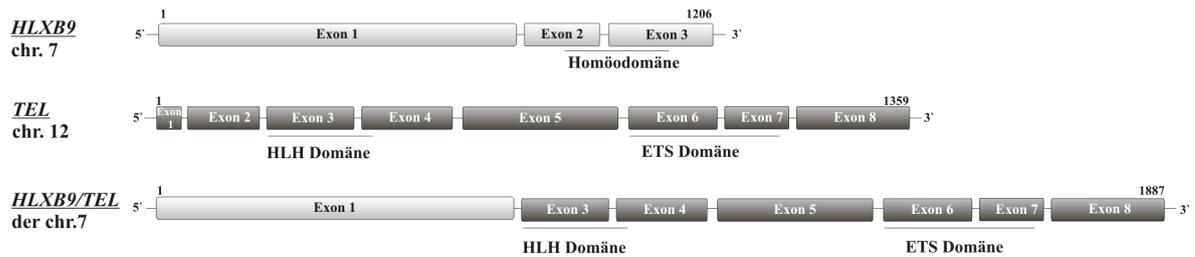


Abb. 2: Schematische Darstellung von *HLXB9*, *TEL* und *HLXB9/TEL*. Die Ziffern oberhalb der schematischen Sequenz geben die Nucleotidanzahl der jeweiligen Transkripte an. Die Domänen beziehen sich auf die jeweilige Proteinstruktur. chr. = Chromosom, der chr. = *derivative* Chromosom. Abbildung nach (Beverloo *et al.*, 2001).

Es ist bekannt, dass das Auftreten der Fusion *HLXB9/TEL* in myeloischen Blasten von einer starken Expression des Wildtyp-Allels *HLXB9* begleitet wird, während *HLXB9* in AMLs mit anderen Translokationen, sowie in CD34-positiven Proben von gesunden Spendern, nicht exprimiert wird. Das Expressionsniveau von Genen, die in unmittelbarer Umgebung von *HLXB9* lokalisiert sind (*NOM1*, *LMBR1*, *RNF32*), wird nicht beeinflusst (von Bergh *et al.*, 2006). Das Wildtyp-Allel *TEL* wird normal exprimiert, das heißt es kommt zu keinem *TEL*-Funktionsverlust, wie es z.B. bei einem Großteil der *TEL/AML1*-positiven Leukämien zu beobachten ist (Cave *et al.*, 1997).

1.4.2 Der Transkriptionsfaktor TEL

Bei *TEL* (auch *ETV6*, *E26 transforming specific*) handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor der *ETS*-Familie. Als funktionelle Domänen besitzen die *ETS*-Proteine die sequenzspezifische DNA-bindende *ETS*-Domäne, sowie eine *HLH*-Domäne (*helix-loop-helix*, auch *pointed* Domäne genannt), welche für die Homo- und Heterodimerisation der Transkriptionsfaktoren verantwortlich ist (Kim *et al.*, 2001; Wasyluk *et al.*, 1993). *TEL* ist in über 41 verschiedenen Translokationen in der AML, ALL und MDS involviert. Bei den Fusionspartnern handelt es sich in den meisten Fällen um Transkriptionsfaktoren und Protein-Tyrosin-Kinasen (Bohlander, 2005). Physiologisch spielt *TEL* in der frühen embryonalen Entwicklung und während der Hämatopoese im Knochenmark eine essentielle Rolle (Wang *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1998). Mehrere funktionelle Studien beschreiben *TEL* als starken transkriptionellen Repressor (Chakrabarti and Nucifora, 1999; Hiebert *et al.*, 1996; Mavrothalassitis and Ghysdael, 2000).

1.4.3 *HLXB9* und die Homöobox-Genfamilie

Klassifizierung der Homöobox-Genfamilie:

Homöobox-Gene werden durch das Vorhandensein einer (oder mehrerer) Homöodomänen charakterisiert. Die hoch konservierte Homöobox besteht aus 180 bp bzw. 60 Aminosäuren und ist für die DNA-Interaktion verantwortlich. Als Transkriptionsfaktoren kommt den Homöo-Proteinen eine bedeutende Rolle in der embryonalen Entwicklung und Zelldifferenzierung, sowie in der Ausprägung zahlreicher Erkrankungen und kongenitaler Abnormalitäten zu (Boncinelli, 1997).

Bislang sind mehrere phylogenetische Klassifikationsansätze beschrieben worden. Die Einteilung erfolgt in zwei Klassen (Galliot *et al.*, 1999). Die erste wird als ANTP Klasse (homolog zum *Drosophila Antennapedia*-Gen) beschrieben und umfasst die wohl bekannteste Familie der *HOX*-Gene (siehe Abschnitt 1.3), sowie weitere Familien (z.B. *CDX*, *MNX*, *EN*, *GBX*). Die zweite Klasse wird als PRD-Klasse (homolog zum *Drosophila paired*-Gen) beschrieben und umfasst u.a. die Familien *PAX* und *OTX*. Weitere Klassen, wie z.B. *TALE*, *POU* und *LIM* werden phylogenetisch getrennt betrachtet.

Homöo-Proteine als Transkriptionsfaktoren:

Viele Homöo-Proteine sind bereits als Transkriptionsfaktoren beschrieben und Ziel-Gene identifiziert worden. Für einige bekannte Homöo-Proteine ist, z.B. durch die Kristallstruktur des *ANTP*-Gens, gezeigt worden, dass die Homöodomäne aus einem aminoterminalen Arm, sowie aus drei voneinander getrennten α -Helices besteht. Die Helix 3 dient der DNA-Erkennung und geht die Interaktion mit der großen Furche der DNA ein. Als DNA-Erkennungsmotiv der Homöodomäne dient die Basenabfolge 5'ATTA'3 (Gehring *et al.*, 1994). Neben der Homöodomäne besitzen vereinzelte Vertreter der Homöo-Proteine noch weitere DNA-bindende Domänen. So verfügen z.B. Vertreter der *PAX*-Familie über die DNA-bindende paired-Domäne (Balczarek *et al.*, 1997).

Die Aufklärung der meisten dieser Protein-DNA Interaktionen stammen aus *in-vitro* Analysen. Für eine hoch-spezifische Interaktion *in-vivo* sind jedoch zusätzliche Faktoren wichtig. Die Spezifität wird zum einen durch die AS-Sequenz bestimmt, welche die Erkennungshelix flankiert. Des Weiteren gehen die Transkriptionsfaktoren Protein-Protein

Bindungen mit Ko-Faktoren ein oder werden post-transkriptionell modifiziert (Mann and Affolter, 1998; Mann and Chan, 1996).

Homöobox-Gene in der AML:

Aufgrund ihrer zentralen Rolle in der embryonalen Entwicklung und Zell-Differenzierung kann eine Fehlregulation von Homöobox-Genen zu z.T. kongenitalen Erkrankungen und Abnormalitäten führen. Eine wichtige Rolle in der Hämatopoese und Leukämieentstehung spielen aberrant exprimierte *HOX*-Gene (siehe Abschnitt 1.3). Aber auch andere Vertreter der Homöobox-Gene, welche normalerweise nicht in hämatopoetischen Zellen exprimiert werden, können die Leukämieentstehung beeinflussen. So ist z.B. das Homöobox-Gen *CDX2* normalerweise ausschließlich an der Differenzierung intestinaler Epithelzellen beteiligt und eine verminderte Expression wird mit Kolorektalem Karzinom assoziiert (Mallo *et al.*, 1997). In der AML ist eine Überexpression von *CDX2* im Zusammenhang mit der Chromosomentranslokation $t(12;13)$ -*ETV6/CDX2* beschrieben worden (Chase *et al.*, 1999). Weitere Beispiele für Homöobox-Gene, welche an leukämischen Translokationen beteiligt sind und verstärkt exprimiert werden, sind *PMX1* und *HOX11* (Dube *et al.*, 1991; Kataoka *et al.*, 2001).

Das Homöo-Protein HLXB9:

HLXB9, auch als *MNX1* (*motor neuron and pancreas homeobox 1*) bekannt, gehört zur Klasse der ANTP-Homöobox-Gene und ist auf dem Chromosom 7q36 codiert. Auf genomischer Ebene besteht *HLXB9* aus 3 Exons und 1206 Basenpaaren (Abb. 3). Exon 2 und 3 codieren für die konservierte Homöodomäne. Das Protein HLXB9 besteht aus 401 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 41 kDa.



Abb. 3: Schematische Darstellung der HLXB9 Struktur. Struktur von *HLXB9* auf (a) Nukleotid-Ebene und (b) Proteinebene. G bzw. Ala steht für eine wiederholte Abfolge von Glycin bzw. Alanin.

HLXB9 besitzt mehrere wiederholte Abfolgen von Poly-Alanin und Poly-Glycin und *in-silico* Vorhersagen ergeben mehrere Phosphorylierungsstellen. Die Homöodomäne umfasst die Aminosäuren 241-300 und zeigt die größte Sequenzidentität zu *HOXB2* (67%) (Harrison *et al.*, 1994). Innerhalb der Homöodomäne sind die Helices zwei und drei, welche maßgeblich an der DNA-Erkennung beteiligt sind, hoch homolog zur Standard Homöodomäne von *Drosophila*. Eine Ausnahme bildet ein Threonin anstelle eines Arginins an Position 283. Die Homöodomäne wird von einer Gruppe stark azidophiler Aminosäuren flankiert, die eventuell an der spezifischen DNA-Interaktion beteiligt sind. Eine Besonderheit der HLXB9 Aminosäuresequenz ist die lange Abfolge von 14 Alaninen. Alanin Wiederholungen sind relativ selten beschrieben und treten bevorzugt im N-terminalen Bereich von Transkriptionsfaktoren auf (Karlin *et al.*, 2002; Lavoie *et al.*, 2003). Wahrscheinlich sind sie als *Spacer* zwischen funktionellen Domänen für die Protein-Konformation erforderlich. Für die *Drosophila* Homöo-Proteine En (*engrailed*) und Krüppel ist anhand von Mutationsanalysen gezeigt worden, dass die lange Abfolge von Alaninen für die Repressorfunktion der Proteine notwendig ist (Han and Manley, 1993; Licht *et al.*, 1990).

Physiologische Expression von *HLXB9*:

Funktionell ist HLXB9 als Homöo-Protein an der embryonalen Entwicklung beteiligt. Anhand von HLXB9 defizienten Mäuse konnte gezeigt werden, dass *HLXB9* an der embryonalen, dorsalen Entwicklung des Pankreas und an der späteren Differenzierung von β -Zellen beteiligt ist (Harrison *et al.*, 1994; Harrison *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1999). Des Weiteren spielt HLXB9 bei der Differenzierung von Motor-Neuronen eine wichtige Rolle (Arber *et al.*, 1999; Saha *et al.*, 1997). *HLXB9* Transkripte wurden ebenfalls im gastrointestinalen Trakt (Dickdarm, Dünndarm) und in B-Lymphozyten von Erwachsenen beschrieben (Hagan *et al.*, 2000; Harrison *et al.*, 1994). Eine Studie beschreibt zusätzlich die Expression von *HLXB9* in CD34-positiven Knochenmarkszellen von gesunden Erwachsenen (Deguchi and Kehrl, 1991). Dieses steht jedoch im Kontrast zu anderen Studien (von Bergh *et al.*, 2006). Direkte Ziel-Gene von HLXB9 sind derzeit nicht bekannt.

***HLXB9* in humanen Erkrankungen:**

Obwohl über die Funktion von *HLXB9* relativ wenig bekannt ist, ist eine Fehlregulation in mehreren Erkrankungen beschrieben.

Heterozygote Mutationen in unterschiedlichen Bereichen des *HLXB9*-Gens verursachen das Currarino-Syndrom, eine seltene, autosomal dominant vererbte Krankheit, die sich durch kongenitale Malformationen und Agenesie des *Os sacrum*s auszeichnet (Cretolle *et al.*, 2008; Hagan *et al.*, 2000; Ross *et al.*, 1998). Ein Funktionsverlust von *HLXB9* wird mit der Progression von Brust- und Darmkrebs in Verbindung gebracht (Hollington *et al.*, 2004; Neufing *et al.*, 2003). Im Gegensatz dazu wird, wie bereits erwähnt, die starke Expression von *HLXB9* in AMLs mit der Translokation t(7;12)-*HLXB9/TEL* beschrieben. Die Zell-Linie GDM1, charakterisiert durch eine Translokation t(6;7), zeigt ebenfalls eine schwache Expression von *HLXB9* (Nagel *et al.*, 2005).

2. Ziele der Arbeit

Die Ziele dieser Arbeit gliedern sich in zwei Themenkomplexe. Der 1. Schwerpunkt liegt auf der Analyse und Charakterisierung primärer Knochenmarksproben von Patienten mit einer Translokation t(7;12). Der 2. Schwerpunkt umfasst die molekulare Charakterisierung des Transkriptionsfaktors HLXB9 im hämatopoetischen Zell-System.

Anhand eines Screenings für das *HLXB9/TEL* Fusionstranskript soll der Anteil an *HLXB9/TEL* pos. Patienten innerhalb der *MLL*-neg. Säuglings-AMLs beschrieben und die als positiv identifizierten Patienten hinsichtlich gemeinsamer Merkmale verglichen werden. Genexpressions-Analysen sollen Aufschluss über folgende Fragen geben:

- 1) Wie unterscheidet sich das Genexpressionsprofil von t(7;12) und 11q23/*MLL* positiven Patientenzellen? Findet sich eine erhöhte Expression von *HOX*-Genen, wie sie für *MLL* positive Patientenzellen beschrieben ist, auch in t(7;12) pos. Patientenzellen? Welche Signalwege werden durch differentiell regulierte Gene beeinflusst?
- 2) Wie unterscheidet sich das Genexpressionsprofil t(7;12) pos. Patientenzellen von gesunden, CD34 pos. hämatopoetischen Stammzellen? Zu welchen Signalwegen lassen sich die differentiell regulierten Gene zuordnen?

Im 2. Teil der Arbeit sollen Expressions- und ChIP-on-Chip Analysen in einem HLXB9 exprimierenden Zell-System durchgeführt werden. Folgende Fragen sollen mit Hilfe des Zell-Linien Systems beantwortet werden:

- 1) Welche direkten Promotor-Regionen können in der ChIP-on-Chip Analyse identifiziert werden? Zu welchen Signalwegen und GO-Terms lassen sich diese zuordnen?
- 2) Welchen Einfluss hat HLXB9 auf das Expressionsprofil myeloischer Zellen? Welche Signalwege werden beeinflusst? Ergeben sich Überschneidungen mit der Analyse der Patientenzellen?
- 3) Welche direkten Ziel-Gene von HLXB9 zeigen sowohl eine Bindung in der ChIP-on-Chip Analyse, als auch eine veränderte mRNA-Expression? Zeigen diese Ziel-Gene auch eine veränderte Protein-Expression?

- 4) Wie wirkt sich die Deletion der DNA-bindenden Homöodomäne auf die Expression der Ziel-Gene aus?
- 5) Zeigt HLXB9 einen Einfluss auf die ATRA-induzierte Zell-Differenzierung von HL60 Zellen?

3. Methoden

3.1 Mikrobiologische Arbeiten

3.1.1 Kultivierung von Bakterienstämmen

Die Anzucht von *Escherichia coli* (*E. coli*) -Kulturen fand in LB-Medium bei 37°C und 250 rpm über Nacht statt. Beimpft wurde von frischen LB-Vereinzelungsplatten bzw. für Plasmidpräparationen im großen Maßstab aus Übernachtskulturen. Als selektives Antibiotikum wurde Ampicillin (Sigma-Aldrich) in einer Endkonzentration von 100 µg/ml dem Medium hinzugefügt. Zur Erhaltung dieser Kultur wurden 600 µl Bakteriensuspension mit 400 µl Glycerin versetzt und bei –80°C gelagert.

3.1.2 Transformation von *Escherichia coli*

Für die Transformationen wurden kommerziell erhältliche chemisch kompetente Zellen verwendet („OneShot[®] Top10“, Invitrogen) und nach Anleitung des Herstellers nach der Hitzeschock-Methode transformiert. Dabei wurden pro Transformation 10 pg -100 ng eines Plasmides oder 5 µl eines Ligationsansatzes verwendet. Nach erfolgter Transformation wurden die Zellen auf LB-Platten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum ausplattiert.

3.2 Zellkultur Techniken

Der Umgang mit humanen und murinen Zell-Linien erfolgte unter sterilen Bedingungen. Die Vorschriften für das Arbeiten mit GVO (S1 und S2) wurden stets eingehalten. Zum waschen bzw. pelletieren von Zellen wurden diese bei 400 g und Raumtemperatur für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen im Folgemedium aufgenommen.

3.2.1 Kultivierung von eukaryontischen Zell-Linien

Die Kultivierung von eukaryontischen Zellen fand in einem feuchtigkeitsgesättigten Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ statt. HL60 Zellen wurden alle 2-3 Tage im Verhältnis 1:5 bis 1:8 mit frischem Medium (RPMI 1640, 10% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin (P/S), 2 mM Glutamin) verdünnt. GDM-1 Zellen wurden zweimal pro Woche 1:3 mit frischem Medium (RPMI 1640, 20% FKS, 1% P/S) verdünnt. Bei den adhärennten Zell-Linien (HEK 293T, EcoPhoenix) wurde alle 2-3 Tage das alte Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend durch die Zugabe von Trypsin/EDTA abgelöst. Zum Abstoppen der Reaktion wurde frisches Medium (DMEM + GlutaMAX™, 10% FKS, 1% P/S) zu den Zellen gegeben und diese zum Vereinzeln gut resuspendiert. HEK 293T und EcoPhoenix Zellen wurden anschließend 1:5-1:8 geteilt und mit frischem Medium weiter kultiviert. Die Bestimmung der Zellzahlen erfolgte mit Trypanblau in einer Neubauer-Zählkammer.

3.2.2 Kryokonservierung

Für die Langzeitlagerung wurden ca. 5 Mio. Zellen pelletiert (400 g, 5 min, RT) und anschließend in 1,5 ml FKS/10% DMSO resuspendiert. Die Zellen wurden in Kryoröhrchen (Corning) überführt und in mit Isopropanol gefüllten Kryo-Einfrierbehältern (Nalgene) zunächst bei -80°C gelagert. Die Langzeitlagerung der Kryoröhrchen fand in der Gasphase von flüssigem Stickstoff statt. Für die Rekultivierung wurden die Zellen im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und schnellstmöglich unter Zugabe von 10 ml Voll-Medium pelletiert (400 g, 5 min, RT). Anschließend wurden die Zellen in 37°C vorgewärmtem Medium weiter kultiviert.

3.2.3 Elektroporation und Puromycin Selektion von HL60 Zellen

Für die Generierung der stabilen Zell-Linien HL60[*HLXB9*], HL60[*HLXB9/TEL*] und HL60[*mock*] wurden HL60 Zellen durch Elektroporation (EPI 2500, Dr.Fischer, Heidelberg) mit der entsprechenden Plasmid-DNA transfiziert. Die verwendeten Parameter der Transfektion (Zellzahlen, Medium, Temperatur, DNA-Gehalt) wurden experimentell bestimmt und für die HL60 Zellen optimiert. Am Tag vor der Transfektion wurden die HL60 Zellen mit frischem Medium versorgt und auf eine ungefähre Zelldichte von 0,5 Mio. Zellen/ml verdünnt. Pro Elektroporationsansatz wurden 10 Mio. Zellen

abzentrifugiert und mit PBS gewaschen. Das Pellet wurde in 500 µl RPMI ohne FKS bei Raumtemperatur resuspendiert. Nach der Zugabe von 10 µg linearisiertem Plasmid (PvuI geschnitten) wurde der Ansatz kurz gemischt und in eine Elektroporationsküvette (4 mm, Peqlab) überführt. Die Elektroporation fand bei 400 V und 10 ms statt. Sofort nach der Elektroporation wurden die Zellen in 10 ml vorgewärmtem Medium aufgenommen. Nach 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel. Nach weiteren 24 Stunden wurde das Voll-Medium durch puromycinhaltiges Medium (0,5 µg/ml) ersetzt. Die optimale Konzentration an Puromycin wurde vorher experimentell bestimmt. Durch die Kultivierung in Anwesenheit von Puromycin sind nur die Zellen überlebensfähig, welche die pMC-Plasmide durch die Transfektion aufgenommen haben und somit das Puromycin-Resistenzgen tragen. Durch die Selektion und Kultivierung über vier Wochen bilden sich oligoklonale Zellen, bei welchen die Plasmid-DNA stabil im Genom integriert vorliegt.

3.2.4 ATRA-induzierte Differenzierung von HL60 Zellen

Für die ATRA-induzierte Differenzierung von HL60 Zellen wurden 0,1 Mio. in der log Phase befindliche Zellen zum Zeitpunkt 0 in 6-well Platten in einem Volumen von 3 ml ausgesät. Die Induktion fand mit 1-20 µM ATRA (max. Differenzierung bei 20 µM) statt. Die ATRA-Stocklösung lag in DMSO gelöst in einer Konzentration von 250 mM vor. Als Negativkontrolle wurden die HL60 Zellen mit der entsprechenden Konzentration an DMSO induziert. Nach 48 h wurden die Zellen in der FACS-Analyse auf die Expression von Differenzierungsmarkern untersucht. Zu den Antigenen, welche nach ATRA Induktion differentiell exprimiert werden, gehören u.a. CD11b und CD38 (Barber *et al.*, 2008).

3.2.5 Präparation von Knochenmarkszellen aus murinem Knochenmark

Primäre Knochenmarkszellen wurden aus 6-8 Wochen alten Mäusen des Stammes C57BL/6 gewonnen. Die Tiere wurden durch zervikale Dislokation euthanisiert und Tibia und Femur präpariert und von Muskelresten gesäubert. Für die Isolierung der Zellen wurden die Knochenmarkshöhlen mit Hilfe einer G26-Kanüle und einer 20 ml Spritze mit MACS-Puffer (Miltenyi Biotech) ausgespült und zum Entfernen von nicht-hämatopoetischen Zellen über ein mit Puffer befeuchtetes 100 µm-Zellsieb filtriert. Anschließend wurden die Zellen zum Vereinzeln durch ein 40 µm-Zellsieb filtriert und mit

MACS-Puffer gewaschen. Zum Abschätzen der Zellzahl wurde eine Erythrozytenlyse durchgeführt und anschließend die mononukleären Zellen gezählt. Für alle weiteren Versuche wurden die Zellzahlen übernommen (30 Mio. Zellen pro Maus) und auf die Erythrozytenlyse verzichtet, da diese einen zusätzlichen Stressfaktor für die Zellen darstellt.

3.2.6 Isolierung und Kultivierung von murinen hämatopoetischen Stammzellen

Alle nachfolgend beschriebenen Mengenangaben beziehen sich auf 10 Mio. mononukleäre Zellen. Für die Markierung der Zellen wurden diese zunächst in 40 µl MACS-Puffer resuspendiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 10 µl Biotin-Antikörper Mix. Dieser Antikörper Mix ist Bestandteil des „Lineage Cell Depletion Kits“ und enthält Biotin-gekoppelte Antikörper gegen die sogenannten *lineage (lin)* Antigene: CD5, CD45R (B220), CD11b, Anti-Gr-1 (Ly-6G/C), 7-4, und Ter-119. Der Ansatz wurde gemischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurden dem Ansatz weitere 30 µl MACS-Puffer, sowie 20 µl Anti-Biotin MicroBeads (ebenfalls Bestandteil des „Lineage Cell Depletion Kits“) zugefügt und gemischt. Es folgte eine weitere Inkubation für 15 min auf Eis. Zum Entfernen sämtlicher nicht-gebundener Antikörper und MicroBeads wurde der Ansatz nach Beenden der Inkubationszeit mit 18 ml MACS-Puffer gewaschen und das Zellpellet in 500 µl MACS-Puffer (bei bis zu 125 Mio. Zellen) aufgenommen. Ein Aliquot von 10 µl wurde für die spätere FACS-Analyse entnommen. Für die Selektion der *lin* negativen Zellen wurde eine MACS LD Säule in einen MACS MidiMagnetenspannt und mit 2 ml MACS-Puffer äquilibriert. Dann wurde der 500 µl Zell-Ansatz auf die Säule pipettiert und der Durchfluss mit den *lin* negativen Zellen aufgefangen. Die Säule wurde anschließend mit 2 x 1 ml MACS-Puffer gewaschen und der Durchfluss ebenfalls aufgefangen. Für die Elution der an die Säule gebundenen *lin* positiven Zellen wurde die Säule vom Magneten genommen, mit 3 ml MACS-Puffer beladen, und der Puffer mit dem Stempel durch die Säule gedrückt.

Die *lin* negativen Zellen wurden gezählt und ein Anteil für die FACS-Analyse entnommen. Die restlichen Zellen wurden in StemSpan Medium (TAKARA) (10% FKS, 1% P/S) in Anwesenheit von 100 ng/ml SCF, 100 ng/ml FLT3L, 100 ng/ml TPO, 25 ng/ml IL6 und 25 ng/ml IL11 kultiviert.

3.2.7 Antikörperfärbung und Analytische Durchflusszytometrie (FACS)

Für den Nachweis zellulärer Oberflächenmarker mittels FACS-Analyse wurden die entsprechenden Oberflächenmarker mit Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC)-, Phycoerythrin (PE), Peridinin-Chlorophyllprotein (PerCP)- und Allophycocyan (APC)-gekoppelten Antikörpern angefärbt. Pro Ansatz wurden zwischen 100.000 und 500.000 Zellen eingesetzt. Die Konzentration der Antikörper entsprach den Herstellerangaben und wurde entsprechend mit PBS verdünnt. Nach Zugabe des Antikörpers wurde der Ansatz gemischt und für 15 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Als Negativkontrolle wurde zu jeder Färbung eine Isotypkontrolle mit gleicher Konzentration und gleichen Inkubationsbedingungen mitgeführt. Nach beendeter Inkubationszeit wurden die Proben mit 4 ml PBS gewaschen und das Zellpellet in 300 µl PBS resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen im FACS-Gerät (FACSCalibur, BD) analysiert. Pro Messung wurden zwischen 20.000 und 50.000 Ereignisse aufgenommen. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der Software FlowJo 7.2.4.

3.2.8 Transiente Transfektion mittels Polyethylenimin (PEI)

Die transiente Transfektion von HEK 293T oder EcoPhoenix Zellen erfolgte mit dem Transfektionsreagenz PEI. Dafür wurden am Abend vor der Transfektion 5×10^6 Zellen auf einer 10 cm-Zellkulturplatte in DMEM+GlutaMAX™ (10% FKS, 1% P/S) ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion. Dafür wurde zunächst 18 µg des Zielplasmides mit DMEM+GlutaMAX™ ohne FKS in einem Gesamtvolumen von 1 ml vermischt. Anschließend wurden 45 µg des PEI-Reagenz mit DMEM+GlutaMAX™ ohne FKS ebenfalls in einem Gesamtvolumen von 1 ml vermischt. Die beiden Ansätze wurden gut vermischt und für 20 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das Medium der am Vortag ausgesäten Zellen abgenommen und mit 4 ml DMEM+GlutaMAX™ (15% FKS, 1% P/S) ersetzt. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die 2 ml des PEI/DNA-Gemisches vorsichtig auf die Zellen getropft und diese bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. 24 h nach der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel. Das PEI-haltige Medium wurde entfernt und mit 10 ml Voll-Medium ersetzt. Zu diesem Zeitpunkt ließ sich die Expression des GFP-Proteins im Fluoreszenz-Mikroskop beobachten.

3.2.9 Produktion und Konzentration von retroviralen Überständen

Für die Herstellung gammaretroviraler Überstände wurde die Zell-Linie EcoPhoenix verwendet. Diese Verpackungszellen leiten sich von HEK 293T-Zellen ab und enthalten bereits die retroviralen *gag*-, *pol*- und *env*-Gene stabil im Genom integriert. Das Verpackungssignal für diese Gene ist deletiert, d.h. erst nach Transfektion eines retroviralen Expressionsvektors (z.B. pMSCV) können infektiöse virale Partikel produziert werden. Retrovirale Expressionsvektoren enthalten neben der Sequenz des Ziel-Genes u.a. das Verpackungssignal Ψ ⁺.

Die Transfektion der EcoPhoenix Zellen fand wie unter 3.2.8 beschrieben statt. 24 h nach dem Mediumwechsel wurde der Überstand abgenommen und filtriert (0,45 μ m Porengröße). Zum Ankonzentrieren der Überstände wurden 40 ml filtrierter Überstand in 40 ml Röhrchen (PAA, PA50040) bei 4°C und 10.000 rpm für zwei Stunden zentrifugiert (Zentrifuge Beckman J2-21, JA-12 Rotor). Anschließend wurden die Überstände abgenommen und die Virus Sedimente in 400 μ l Stemspan Medium (10% FKS, 1% P/S) resuspendiert und bei -80°C gelagert.

3.2.10 Transduktion von murinen hämatopoetischen Stammzellen

Nach der Selektion von murinen *lin* negativen Stammzellen wurden diese für 24 Stunden in Anwesenheit von 100 ng/ml SCF, 100 ng/ml FLT3L, 100 ng/ml TPO, 25 ng/ml IL6 und 25 ng/ml IL11 in StemSpan Medium (10% FKS, 1% P/S) prästimuliert. Für die spätere Transduktion wurden bis zu 500.000 Zellen in ein mit RetroNectin[®] beschichtetes *well* einer 24-*well* Platte gegeben. RetroNectin[®] ist ein humanes rekombinantes Fibronektinfragment mit virus- und zellbindenden Domänen und steigert die Transduktionseffizienz, indem es Zellen und Viruspartikel in räumliche Nähe zueinander bringt (Moritz *et al.*, 1996). Die Beschichtung von Zellkulturplatten mit RetroNectin[®] fand nach Anleitung des Herstellers (TAKARA) statt.

Nach 24 h Prästimulation fand die erste Transduktion statt. Dafür wurde für jedes 24er-*well* der Stammzellen ein 100 μ l Aliquot des bei -80°C gelagerten Virusüberstandes aufgetaut und mit 400 μ l StemSpan Medium (10% FKS, 1% Pen/Strep, Zytokine s.o.) verdünnt.

Das alte Medium wurde von den Stammzellen entfernt und durch den Virusüberstand ersetzt. Zusätzlich wurde den Ansätzen noch 4 µg/ml Protaminsulfat zugefügt.

Anschließend wurde die Zellkulturplatte bei 1000 g und 32°C eine Stunde zentrifugiert. Danach wurde die Platte für 6 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte ein Mediumwechsel. 24 und 48 h nach der ersten Transduktion erfolgten eine zweite und dritte Transduktionsrunde. Der Anteil an GFP-positiven Zellen konnte 24 h nach der dritten Transduktionsrunde in der FACS-Analyse gemessen werden. Die Sortierung der Zellen nach ihrer GFP-Fluoreszenz wurde 72 h nach der dritten Transduktionsrunde extern von der „Core Flow Cytometry Facility“ des Universitätsklinikums Düsseldorf mit einem Hochgeschwindigkeitssorter „MoFlo XDP“ der Firma Beckman-Coulter durchgeführt.

3.3 Arbeiten mit Nukleinsäuren

3.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

3.3.1.1 Standard-PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde mit chromosomaler DNA oder zirkulärer Plasmid-DNA als Matrize durchgeführt. Die verwendeten Oligonukleotide (Primer) sind im entsprechenden Abschnitt des Ergebnisteils beschrieben (Sequenzen vgl. Tab. 5). Für Kontroll-PCRs wurde eine *Taq*-Polymerase verwendet. Ein Ansatz bestand aus 5 µl 10x *Taq*-Puffer, je 2,5 µl Primer (10 µM), 5-500 ng DNA, 1 µl dNTPs (10 µM) und 1 µl *Taq*-Polymerase (5 U µl⁻¹) und deion. H₂O in einem Gesamtvolumen von 50 µl. Für Klonierungen wurde die Phusion-Polymerase verwendet, welche über 3'-5' Exonukleaseaktivität (*proof-reading*) verfügt. Ein Ansatz bestand aus 10 µl 2x Phusion-Master-Mix (enthält die Phusion-Polymerase, Puffer und dNTPs), 5-500 ng Matrizen-DNA und je 1 µl Primer (10 µM).

Ein allgemeines Programm für die Amplifikation sah wie folgt aus:

- 1) 5 min 96°C initiale Denaturierung
- 2) 1 min 96°C Denaturierung
- 3) 45 sek 55-60°C *Annealing*
- 4) 1 min/kb 72°C *Extension* – 30-35 Zyklen Schritt 2-4

- | | | |
|----|-------|-----------------------|
| 5) | 7 min | 72°C <i>Extension</i> |
| 6) | ∞ | 4°C Abkühlen |

Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe des „PCR-Purification-Kits“ von Qiagen aufgereinigt bzw. die Banden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit Hilfe des „Gel-Extraction-Kits“ aufgereinigt.

3.3.1.2 Nested-PCR zur Identifizierung des *HLXB9/TEL* Bruchpunkts

Für die Amplifikation des *HLXB9/TEL* Bruchpunktes wurde der kommerzielle PCR-Master Mix *AccuPrime* (Invitrogen) verwendet. Dieser enthält eine *Taq*-Polymerase, Puffer und dNTPs im entsprechenden Verhältnis. Als Matrize für die PCR diente cDNA aus Patientenmaterial (RT-PCR). Die Amplifikation fand über eine Nested-PCR statt, d.h. 1 µl des PCR-Produktes wurde als Template für eine zweite PCR eingesetzt. Beide PCR-Ansätze bestanden aus 12,5 µl *AccuPrime* Mix, je 1 µl Primer (10 µM), 1 µl cDNA (50 ng) bzw. 1 µl des 1. PCR-Produktes und deion. H₂O in einem Gesamtvolumen von 25 µl. Für die erste PCR wurden die Primer *HLXB9-642F* und *TEL R1*, für die 2. PCR die Primer *HLXB9-651F* und *TEL-R10* verwendet. Beide PCRs durchliefen folgendes Programm:

- | | | |
|----|--------|---|
| 1) | 3 min | 96°C Vorlauf |
| 2) | 15 sek | 96°C Denaturierung |
| 3) | 1 min | 58°C <i>Annealing</i> |
| 4) | 30 sek | 68°C <i>Extension</i> – 35 Zyklen Schritt 2-4 |
| 5) | 2 min | 68°C <i>Extension</i> |
| 6) | ∞ | 4°C Abkühlen |

Die PCR-Banden wurde aus dem Agarosegel extrahiert und TOPO-TA kloniert (vgl. Abschnitt 3.3.4). Positive Klone wurden mittels Sanger-Sequenzierung sequenziert (vgl. Abschnitt 3.3.7).

3.3.1.3 Quantitative RT-PCR

„TaqMan“-PCR:

Die quantitative PCR wurde entweder als TaqMan- oder als SYBR[®]Green-PCR in einem „7900HT real-time“ Gerät der Firma Applied Biosystems in 96-well Platten durchgeführt. Für die TaqMan-PCR wurde ein spezifischer Assay-Mix von ABI verwendet, der sowohl Gen-spezifische Primer, als auch eine spezifische Sonde enthält. Die Sonden sind mit zwei verschiedenen Farbstoffen versehen (z.B. Reporter: FAM, Quencher: TAMRA). Nach der Denaturierung der DNA Stränge lagert sich die Sonde komplementär an die Ziel-Sequenz an. Während der PCR wird die Sonde bei einer spezifischen Wellenlänge zur Fluoreszenz angeregt. Wenn während der Elongationsphase der PCR die Polymerase auf die Sonde stößt, wird diese hydrolytisch gespalten. Der Reporter verliert dabei seine räumliche Nähe zum Quencher und die Fluoreszenz kann somit detektiert werden.

Jeder Ansatz hatte ein Gesamtvolumen von 20 µl und bestand aus 10 µl 2x TaqMan Universal-Mix, 1 µl Assay Mix, 7 µl H₂O und 2 µl (12,5 ng) cDNA. Der TaqMan Universal Mix enthält eine AmpliTaq Gold[®] DNA Polymerase im geeigneten Puffer, eine AmpErase UNG zur Vermeidung von Kontaminationen durch bestehende PCR-Produkte und dNTPs mit dUTPs. Sämtliche TaqMan-PCRs liefen nach folgendem Programm ab:

2 min	50°C Inkubation für die AmpErase UNG
10 min	95°C Aktivierung der AmpliTaq Gold [®] DNA Polymerase
15 sek	95°C Denaturierung
1 min	60°C <i>Annealing/Extension</i>

Der Denaturierungs- und *Annealing/Extension*-Schritt wurde 40-mal wiederholt.

„SYBR[®]Green“-PCR:

Bei der SYBR[®]Green-PCR interkaliert der Fluoreszenz-Farbstoff SYBR[®]Green in die doppelsträngige DNA, und die Fluoreszenz nimmt mit Zunahme der amplifizierten DNA zu. Jeder SYBR[®]Green Ansatz fand in einem Gesamtvolumen von 20 µl statt und bestand aus 10 µl 2x SYBR[®]Green Universal-Mix, 6 µl H₂O, je 1 µl Primer 10 µM und 2 µl (12,5 ng) cDNA. Der Universal-Mix enthält eine AmpliTaq Gold[®] DNA Polymerase im geeigneten Puffer, den SYBR[®]Green Farbstoff und dNTPs mit dUTPs. Sämtliche

verwendeten Primer hatten eine Schmelztemperatur von 60°C, so dass alle Reaktionen nach folgendem Standard Programm ablaufen konnten:

2 min	50°C Inkubation für die AmpErase UNG)
10 min	95°C Aktivierung der AmpliTaq Gold® DNA Polymerase
15 sek	95°C Denaturierung
1 min	60°C <i>Annealing/Extension</i>

Die anfänglichen zwei Minuten bei 50°C dienten der Inkubation mit AmpErase UNG und wurde standardmäßig mitgeführt auch wenn der Ansatz keine AmpErase UNG erforderte. Der Denaturierungs- und *Annealing/Extension*-Schritt wurde 40-mal wiederholt. Zum Erstellen einer Schmelzkurve erfolgten anschließend noch ein Zyklus für 15 sek bei 95°C und ein Zyklus von 15 sek bei 60°C. Anhand der Schmelztemperaturen konnten die Fluoreszenzsignale eindeutig dem PCR-Produkt oder möglichen Primer-Dimeren zugeordnet werden.

Um Qualitätsunterschiede bei der RNA-Präparation bzw. cDNA-Synthese auszugleichen, wurde β -*AKTIN* als *Housekeeping*-Gen in jeder Probe mit amplifiziert. Anschließend konnte die Expression der Ziel-Gene zu der Expression von β -*AKTIN* normalisiert werden. Die gemessenen Werte wurden nach der Formel $\text{Expression} = 2^{-\Delta C_t}$ delogarithmiert. Alle Ansätze fanden in Triplikaten statt.

3.3.1.4 Overlap extension PCR

Für die Generierung der Mutante *HLXB9*(Del1) wurde die *overlap extension* PCR nach Horton mit Modifikationen angewendet (Horton *et al.*, 1989). Dabei sollte der Bereich des *HLXB9*-Gens deletiert werden, welcher für die potenzielle DNA-bindende Domäne codiert (siehe Abb. 4 (a), vgl. Abschnitt 1.4.3).

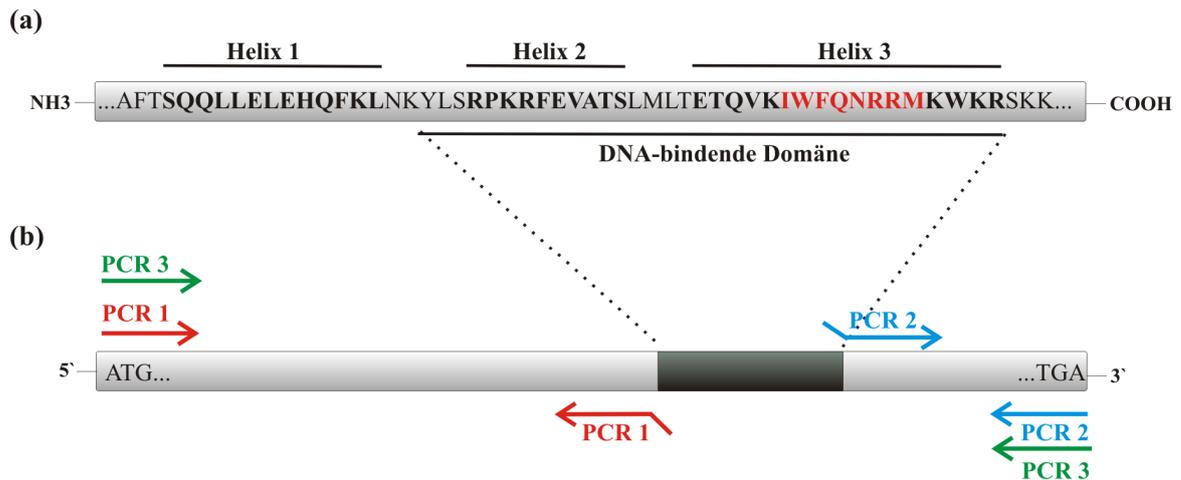


Abb. 4: Grafische Darstellung der Deletion *HLXB9*(Del1). (a) Ausschnitt aus der Homöodomäne von *HLXB9*. Der für die unterstrichenen Aminosäuren codierende Bereich wurde über PCR-Mutagenese deletiert. (b) Ansatzstellen für die Primer der PCR-Mutagenese.

Zunächst wurden in einer jeweils 1. und 2. PCR-Reaktion die Bereiche amplifiziert, welche die DNA-bindende Domäne flankieren (siehe Abb. 4 (b)). Für die PCR 1 wurden die Primer pMC-HB9-fwd und *HB9_del1_2* verwendet. Der Primer *HB9_del1_2* enthält neun Nukleotide, welche komplementär zu dem Fusionspartner sind. Für die PCR 2 wurden die Primer *HB9_del1_3* und pMC-HB9-rev verwendet. Der Primer *HB9_del1_3* enthält ebenfalls neun Nukleotide, welche komplementär zu der zu fusionierenden Sequenz sind. Durch die komplementären Bereiche ist eine spätere Hybridisierung der beiden Flanken möglich. Ein PCR-Ansatz bestand aus 10 µl 2x Phusion-Master-Mix (enthält die *Phusion*-Polymerase, Puffer und dNTPs), 100 ng pMC[*HLXB9*] als Matrize, je 1 µl Primer (10 µM) und deion. H₂O in einem 20 µl Ansatz Gesamtvolumen. Die PCRs liefen nach folgendem Programm:

- 1) 30 sek 98°C Vorlauf
- 2) 7 sek 98°C Denaturierung
- 3) 20 sek 69°C *Annealing*
- 4) 1 min 72°C *Extension* – 40 Zyklen Schritt 2-4
- 5) 7 min 72°C *Extension*
- 6) ∞ 4°C Abkühlen

Die Produkte der PCR 1 und 2 wurden mit Hilfe eines „PCR-Purification Kits“ aufgereinigt und jeweils 0,5 µl des PCR-Produktes dienten anschließend als Ausgangsmaterial für die Hybridisierungs-PCR 3. Für diese PCR wurden die Primer pMC-HB9-fwd und pMC-HB9-rev verwendet und es kommt zu einer Fusion der beiden flankierenden Bereiche. Das entstandene Gen-Produkt *HLXB9*[Del1] wurde anschließend ebenfalls über ein „PCR-Purification Kit“ aufgereinigt und konnte für die nachfolgende Klonierung in den Expressionsvektor pMC verwendet werden.

3.3.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde spektralphotometrisch über ihre Absorption bei 260 nm im NanoDrop[®] ND-1000 bestimmt.

3.3.3 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Größenbestimmung und zur präparativen Auftrennung von Nukleinsäuren wurden 0,6 bis 1,5%ige Agarose-Gele in 1x TAE-Puffer (BioRad, Hercules, USA) verwendet, die mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (Sigma Aldrich) versetzt waren. Der Gellauf erfolgte bei 100-120 V. Zur Abschätzung der Größe von DNA-Fragmenten wurden 1 kb und 100 bp DNA-Leiter (GeneRuler, Fermentas) verwendet. Ethidiumbromid interkaliert in die doppelsträngige DNA und die Fluoreszenz konnte bei 302 nm im UV-Transilluminator (INTAS) detektiert werden. Für die Isolierung und Aufreinigung von elektrophoretisch aufgetrennten DNA-Banden, wurden diese mit sterilen Skalpellens ausge schnitten und anschließend mit Hilfe eines „Gel-Extraction-Kits“ aufgereinigt.

3.3.4 Klonierungen und enzymatische Reaktionen

Gereinigte PCR-Produkte und Vektoren wurden mit Restriktionsenzymen der Firma NEB geschnitten, so dass die entstandenen überhängenden Enden zueinander komplementär waren und eine Ligation des PCR-Fragmentes in den gewünschten Vektor erlaubten. Die enzymatisch geschnittenen PCR-Fragmente wurden mit Hilfe eines „PCR-Purification-Kits“ aufgereinigt. Die geschnittenen Plasmide wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und die gewünschte Bande ausgeschnitten und über ein „Gel-Extraction-Kit“ gereinigt.

Anschließend fand die Ligation des PCR-Produktes in den Vektor mit Hilfe des „Rapid Ligation-Kits“ nach Anleitung des Herstellers (Roche) statt. Der Ligationsansatz konnte direkt für die Transformation in kompetente *E. Coli* Top10 verwendet werden.

TOPO-TA-Klonierung:

Für ungerichtete Klonierungen mit einem 3' A Überhang wurde das „TOPO TA Cloning Kit“ der Firma Invitrogen nach Anleitung des Herstellers verwendet. Für die Sequenzierung wurde der mitgelieferte Primer M13 verwendet.

3.3.5 DNA-Isolierung

3.3.5.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Für die Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren wurden kommerzielle Kits nach Anleitung des Herstellers verwendet. Plasmidpräparationen wurden im kleinen Maßstab mit Hilfe des „FastPlasmid Mini Kits“ (5' Prime) und im großen Maßstab mit Hilfe des „NucleoBond® Kits“ (Macherey Nagel) für Maxipräparationen durchgeführt.

3.3.5.2 Isolierung von genomischer DNA

Genomische DNA aus Zell-Linien wurde mit Hilfe des „DNeasy Blood & Tissue Kits“ nach Anleitung des Herstellers (Qiagen) gewonnen. Die DNA wurde bei 4°C oder für die Langzeit-Lagerung bei -20°C gelagert.

3.3.6 Sequenzierung

Sequenzierungen erfolgten nach der Kettenabbruch-Methode (Sanger *et al.*, 1977). Zunächst fand eine PCR an der Ziel-DNA statt, wobei Fluoreszenz markierte dNTPs in die amplifizierte DNA eingebaut wurden. Ein PCR- Ansatz bestand aus 4 µl „Terminator Mix“ (Applied Biosystems), 100-500 ng DNA, 0,5 µl Primer 10 pmol und deion. H₂O in einem Volumen von 20 µl. Das PCR-Programm bestand aus 26 Zyklen:

30 sek	96°C Denaturierung
30 sek	55°C <i>Annealing</i>
4 min	60°C <i>Extension</i>

Nach erfolgter PCR wurden die Ansätze mit Hilfe des “DyeEX” Kits von Qiagen nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt. Die gereinigten PCR-Produkte wurden in Anwesenheit von 20 µl Formamid in einem DNA-Sequenzier-Gerät (3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems) sequenziert.

3.3.7 Extraktion von RNA und cDNA Synthese

Alle RNA-Arbeiten wurden mit RNase-freien Reagenzien an einem speziellen, möglichst RNase-freien Arbeitsplatz durchgeführt.

RNA aus Patientenmaterial wurde mit Hilfe von TRIZOL der Firma Invitrogen extrahiert. Bei dem verwendeten Patientenmaterial handelte es sich um mononukleäre Zellen, welche in 250 µl PBS bei -80°C gelagert wurden. Die Zellen wurden vorsichtig auf Eis aufgetaut und noch während des Auftauens mit 1 ml TRIZOL vermischt und resuspendiert.

Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an das Protokoll der Hersteller mit folgenden Modifikationen: Die Präzipitation der RNA fand in 100%igem Ethanol statt (3-4 faches Volumen). Die Fällung erfolgte bei -20°C für 2 h. Für das Waschen des RNA-Pellets wurde 85%iges Ethanol verwendet. Das RNA-Pellet wurde in 10-50 µl RNase-freiem H₂O gelöst und die Konzentration spektralphotometrisch im NanoDrop bestimmt. Die RNA wurde entweder direkt für die cDNA-Synthese verwendet oder bei -80°C gelagert.

Für die Gewinnung von RNA aus Zell-Linien wurde das „RNAeasy“ Kit nach Anleitung des Herstellers Qiagen verwendet.

cDNA-Synthese:

Für die cDNA-Synthese wurde 1 µg RNA mit Hilfe des „QuantiTect Kits“ von Qiagen nach Anleitung des Herstellers umgeschrieben.

3.3.8 Genexpressions-Analyse mit Affymetrix Mikroarrays

Für die Affymetrix Genexpressions-Analysen wurden 300 ng RNA verwendet und nach Anleitung des Herstellers (Handbuch: *GeneChip WT Sense Target Labeling Assay*) mit den angegebenen Kits in cDNA umgeschrieben und mit Fluoreszenz-Farbstoffen markiert. Die Array-Analysen fanden in Triplikaten statt, d.h pro Ansatz wurde die RNA von drei

unterschiedlichen Zell-Passagen der HL60[*HLXB9*] bzw. HL60[mock] Zellen verwendet. Die Hybridisierung auf humane „GeneChip® 1.0 ST Arrays“, sowie die Analyse der Rohdaten wurde extern vom Biomedizinischen Forschungszentrum (BMFZ), Düsseldorf durchgeführt. Die weitere statistische Auswertung wurde von Christian Ruckert, Universität Münster, durchgeführt (vgl. Abschnitt 3.5).

3.4 Arbeiten mit Proteinen

3.4.1 Herstellung von Gesamtprotein-Rohextrakten mittels RIPA-Puffer

Für die Herstellung von Gesamtprotein-Rohextrakten wurden zunächst 10 Mio. Zellen mit PBS gewaschen und anschließend als Zellpellet schockgefroren und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Für die Zellyse wurde das Pellet in 200-400 µl RIPA-Puffer (50 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 0,5% Deoxycholate, 1% NP-40, 0,1% SDS; frisch 1x PIC, 50 mM NaF) resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zelltrümmer bei maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert und der Überstand mit den löslichen Proteinen vorsichtig abgenommen. Für die SDS-Gelelektrophorese wurde pro Spur das Äquivalent von 0,1-2 Mio. Zellen aufgetragen.

3.4.2 Chromatin-Immunpräzipitation und Promotor-Array-Analyse (ChIP-on-Chip)

Für die ChIP-on-Chip Experimente wurden HL60 Zellen verwendet, die stabil mit dem Konstrukt pMC[*HLXB9*] transfiziert wurden und das Zielprotein *HLXB9*-flag dauerhaft produzieren. Für die Kontrollexperimente wurden HL60 Zellen stabil mit dem Leervektor transfiziert (HL60[mock]). Die Methode basiert auf der Anleitung und den Produkten des „SimpleChIP Enzymatic Chromatin IP Kits“ (Cell Signaling Technology). Eigene Modifikationen sind nachfolgend detailliert beschrieben, ansonsten fand die Durchführung nach Anleitung des Herstellers statt. Die Abb. 5 gibt eine schematische Darstellung der ChIP-on-Chip Methode wieder.

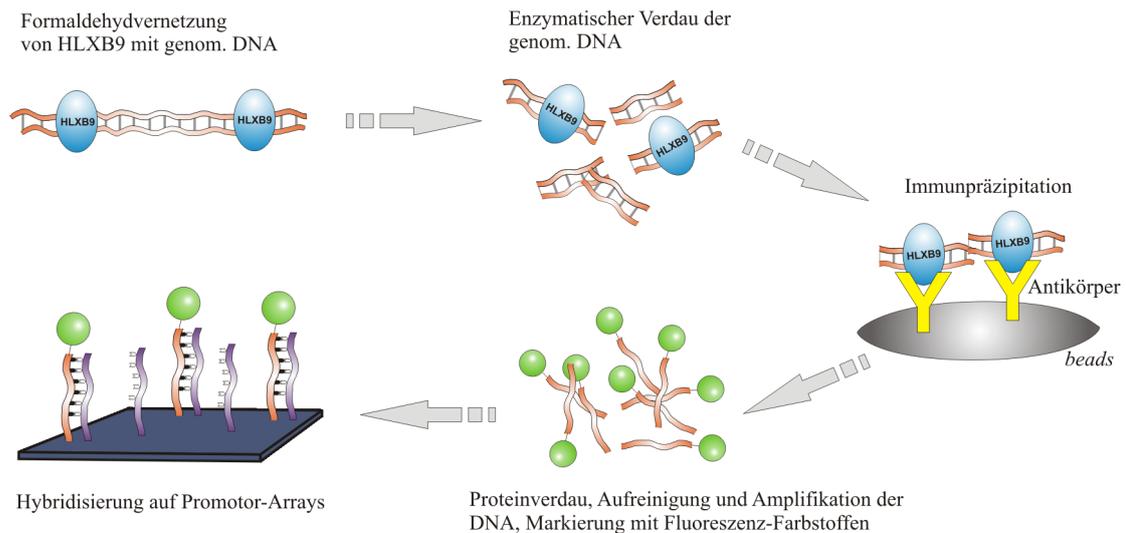


Abb. 5: Allgemeiner Überblick der ChIP-on-Chip Methode.

Crosslinking von Protein und DNA:

Beim *crosslinking* der Zellen erfolgt eine Vernetzung von Proteinen und DNA. Dazu wurden 20 Mio. Zellen in 20 ml Vollmedium mit 37%iger Formaldehyd-Lösung (1% Endkonzentration) versetzt und für exakt 10 Minuten auf einem Rollen-Inkubator bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 250 mM Endkonzentration Glycin und 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur abgestoppt. Die Zellen wurden zweimal mit 20 ml eiskaltem PBS und einmal mit PBS + PIC gewaschen, pelletiert, in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -80° gelagert.

Chromatin-Immunpräzipitation:

Für die Kernpräparation wurden 40 Mio. fixierte Zellen nach Anleitung des „SimpleChIP Enzymatic Chromatin IP Kits“ in je 10 ml Puffer A bzw. Puffer B lysiert. Für den enzymatischen Verdau des Chromatins in 150-900 bp große Stücke wurden 40 Mio. Zellen in 1 ml Puffer B + DTT aufgenommen und mit 2,4 µl *Micrococcal Nuclease* versetzt (entspricht 4,8 units/µl Enzym). Der enzymatische Verdau fand für 20 min bei 37°C statt. Durch Zugabe von 100 µl 0,5 M EDTA wurde der Verdau abgestoppt. Zum Brechen der Zellmembranen erfolgte eine Ultraschall-Behandlung mit einer Stabsonotrode (UP 100H, Hielscher) in einem Volumen von 2 x 500 µl ChIP-Puffer: Energieeinstellung 60%,

dreimal 10 sek. Pulse im Eisbad. Die optimalen Bedingungen für den enzymatischen Verdau und die Ultraschallbehandlung wurden experimentell bestimmt (vgl. Abb. 20).

Das Lysat wurde durch Zentrifugation bei 4°C und 14.000 g geklärt und 100 µl für spätere Analysen des Ausgangsmaterials (Input) entnommen.

Für die Immunpräzipitation wurde ANTI-FLAG[®] M2 Agarose von SIGMA verwendet. Pro Ansatz wurden je 100 µl Agarose zweimal mit je 1 ml eiskaltem PBS, und einmal mit 500 µl eiskaltem ChIP-Puffer für fünf Minuten auf einem Rollen-Inkubator bei 4°C gewaschen. Zwischen den Waschschrritten wurde die Agarose durch Zentrifugation pelletiert (30 sec, 4°C, 8200 g). Für die Immunpräzipitation wurden pro Ansatz 800 µl Zellen (entspricht 32 Mio.) zu der gewaschenen Agarose gegeben und die Ansätze über Nacht bei 4°C auf einem Rollen-Inkubator inkubiert. Nach Zentrifugation (30 sec, 4°C, 8200 g) und 1-2 min Absetzzeit der Agarose wurde der Überstand abgenommen und für weitere Analysen (Kontrolle im *Western Blot*) bei -80°C eingefroren. Die immunpräzipitierten Agarose *beads* sind nun kovalent an HLXB9-FLAG gebunden, welches weiterhin mit der DNA assoziiert vorliegt. Zum Entfernen unspezifischer Proteine wurden die Komplexe viermal mit 800 µl 1 x ChIP-Puffer mit steigenden NaCl-Konzentrationen gewaschen (350, 400, 2 x 500 mM NaCl). Zum Schluss folgte ein letzter Waschschrritt mit 1 x ChIP-Puffer ohne NaCl. Für die Elution der Protein/DNA-Komplexe von den Agarose-*beads* wurden die gewaschenen Komplexe, sowie 10 µl des Ausgangschromatins in jeweils 300 µl Elutionspuffer für 30 min bei 65°C in einem Thermomixer bei 1200 rpm inkubiert. Durch Zentrifugation (30 sec, 4°C, 8200 g) wurde die Agarose pelletiert und der Protein/DNA-haltige Überstand vorsichtig abgenommen. 20 µl von dem Überstand wurde für die Protein-Kontrolle im *Western Blot* abgenommen. Zum Verdau von möglicher RNA und der Proteine wurde das verbleibende Eluat mit 4 µl RNase A (30 min bei 37°C) und anschließend mit Proteinase K (12 µl 5 M NaCl, 4 µl Proteinase K, Inkubation für 2 h bei 65°C) behandelt. Die Aufreinigung der Ziel-DNA erfolgte über die Aufreinigungs-Säulchen des „SimpleChIP Enzymatic Chromatin IP Kits“ nach Anleitung des Herstellers. Die Elution fand in einem Volumen von 25 µl statt. 7 µl des *Input*-Eluates wurden auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen um die Fragmentierung der DNA zu überprüfen. Die gereinigte DNA wurde im Nanodrop quantifiziert. Jeweils 10 µl DNA der immunpräzipitierten Proben sowie 0,5 µl des Input-Materials wurden mit dem „GenomePlex Complete Whole Genome Amplification (WGA) Kit“ von SIGMA

amplifiziert. Die Amplifikation wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt, jedoch ohne weitere Fragmentierung der Proben. Die amplifizierte DNA wurde über das „GenElute PCR DNA Purification Kit“ aufgereinigt. Die Elution fand in einem Volumen von 30 µl Nuklease-freiem Wasser statt.

Jeweils gleiche Volumina an DNA aus der HLXB9-Probe und der Kontroll-Probe wurden mittels quantitativer RT-PCR analysiert. Für die spätere Normalisierung der Werte, wurden die jeweils gleichen Konzentrationen der Input-DNA in die quantitative PCR eingesetzt. Für die Integrität des Proteins wurden gleiche Mengen des Inputs, des Überstandes, der Waschschriffe und des Eluates im *Western Blot* analysiert.

Hybridisierung auf Promotor-Arrays:

Die Markierung der ChIP-DNA, die Hybridisierung auf Promotor-Arrays („385K RefSeq Promoter Arrays hg18“), das Scannen der Arrays, die Extraktion und Auswertung der Rohdaten wurden von der Firma Imagenes in Kooperation mit NimbleGen durchgeführt. Dazu wurden 4 µg ChIP-DNA der HLXB9-Probe, der Kontroll-Probe, sowie von der DNA der jeweiligen Input-Proben benötigt. Die Konzentration der DNA lag zwischen 100-500 ng/µl und hatte ein OD260/280 Verhältnis von mindestens 1.7. Auf einen Array wurde parallel die ChIP-DNA (Cy5) und der jeweilige Input (Cy3) hybridisiert.

3.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und *Western Blot* Analysen

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese:

Denaturierende Proteingele zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurden nach der Methode von Laemmli hergestellt (Laemmli, 1970). Die Gele, bestehend aus Trenngel (7,9 ml H₂O, 6,7 ml 30% Acrylamid Mix, 5 ml 1,5 M Tris pH 8.8, 0,2 ml 10% SDS, 0,2 ml 10% APS, 0,008 ml TEMED -> für 2 Gele) und Sammelgel (5,5 ml H₂O, 1,3 ml 30% Acrylamid mix, 1 ml 1 M Tris pH 6.8, 0,08 ml 10% SDS, 0,08 ml 10% APS, 0,008 ml TEMED -> für 2 Gele), wurden mit einer Dicke von 1,5 mm gegossen. Die Proben wurden mit 5x SDS-Probenpuffer (3,33 ml 1,5 M Tris pH 6.8, 2 ml 20% SDS, 10 ml Glycerin, 3 ml β-Mercaptoethanol, 15 ml H₂O, Bromphenolblau) versetzt und vor dem Auftragen 5 min auf 95°C erhitzt. Die Gelelektrophorese erfolgte in 1x SDS-Laufpuffer (10x Puffer: 10 g SDS, 30,3 g Tris, 144,1 g Glycin ad 800 ml H₂O) bei 120 V in

einer Bio-Rad Mini-PROTEAN Laufkammer, bis der Auftragspuffer aus dem Gel gelaufen war. Ein vorgefärbter Größenstandard wurde mitgeführt.

Western Blot Analysen:

Für den immunologischen Nachweis der gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine, wurden diese mit Hilfe der „Mini Trans-Blot“ Apparatur des Bio-Rad „Mini-PROTEAN“ Systems auf eine PVDF-Transfer-Membran (Amersham Hybond-P) transferiert. Die Membran wurde zunächst für 5 min in 100%igem Methanol aktiviert, in destilliertem H₂O gewaschen und in Transferpuffer (2,9 g Glycin, 5,8 g Tris, 0,37 g SDS in 200 ml Methanol auf 1 l H₂O) äquilibriert. Sämtliche Filterpapiere sowie Faserpads wurden ebenfalls in Transferpuffer äquilibriert. Der Aufbau des Blots sah wie folgt aus: Anodenseite der „Mini-Gel Holder Cassette“ (durchsichtig) – Faserpad – Filterpapier – Membran – Gel – Filterpapier – Faserpad – Kathodenseite (schwarz). Die Elektrophorese fand bei 70 V für 1 h 15 min in der mit Transferpuffer gefüllten Elektrophoresekammer statt. Anschließend wurde die Membran für 1 h in PBS/Tween mit 5% Magermilchpulver inkubiert um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern. Danach wurde der Blot für 5 min mit PBS/Tween gespült und schließlich 1 h mit dem Primärantikörper (1:500-1:1000, verdünnt in PBS/Tween) inkubiert. Danach wurde der Blot dreimal für 5 min mit 10 ml PBS/Tween gewaschen und anschließend für 1 h mit einem Meerrettich Peroxydase (HRP)-konjugiertem Sekundärantikörper (1:10.000-1:100.000, verdünnt in PBS/Tween) inkubiert, gefolgt von sechs fünf-minütigen Waschschritten in PBS/Tween. Alle Wasch- und Inkubationsschritte fanden auf einem Rollen-Inkubator bei Raumtemperatur statt. Schließlich wurde die Chemilumineszenz der Proteinbanden mit Hilfe eines Detektions-Kits („SuperSignal West Pico Luminol/Enhancer Lösung“, Thermo Scientific) im Transilluminator (LAS-3000, Fujifilm) detektiert.

3.5 Daten-Analyse, Software und Statistik

Für die Darstellung und Bearbeitung von DNA-Sequenzen (Vektor-Karten, DNA-Alignments) wurde das frei verfügbare Programm „APE“ verwendet.

Auswertungen der FACS-Messungen wurden mit dem Programm FlowJo 7.2.4 durchgeführt.

Für Boxplot-Darstellungen der qRT-PCRs wurde die Software SPSS Version 19 verwendet. Zur Berechnung des Signifikanzniveaus wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney-U Test angewendet.

Affymetrix Genexpressions-Analyse:

Die statistische Auswertung der Affymetrix-Arrays, sowie deren grafische Darstellung, wurde in Kooperation von Christian Ruckert, Abteilung Prof. Dugas, Universität Münster, durchgeführt. Die Rohdaten (*cel.files*) wurden mit Hilfe des *R-package aroma.affymetrix* eingelesen und über RMA (*robust multiarray average method*) normalisiert (Irizarry *et al.*, 2003). Der RMA Algorithmus besteht aus einer Hintergrundkorrektur, einer quantilen Normalisierung und der Summierung von Probenintensitäten zu Genintensitäten. Für die anschließenden Analysen wurde das *R-limma* Packet verwendet, bei welchem differentiell exprimierte Gene in einem empirischen Bayes-Ansatz berechnet werden (Smyth, 2004). Signifikant differentiell exprimierte Gene wurden mit Hilfe der T-Statistik berechnet und die resultierenden p-Werte nach der Benjamini und Hochberg Methode korrigiert. Signifikant differentiell regulierte Gene wurden mit Hilfe des *heatmap.2* des R-Packets als Heatmap visualisiert.

NimbleGen Promotor-Array Analyse:

Die Auswertung der Promotor-Arrays wurde von der Firma imaGenes/NimbleGen durchgeführt. Die Signalintensitäten der einzelnen Sonden wurden extrahiert und für jede Sonde wurde das skalierte \log_2 -Verhältnis der CHIP-Probe zum jeweiligen Input berechnet. Wenn vier oder mehr Sonden innerhalb von 500 bp ein \log_2 -Verhältnis über einen bestimmten Schwellenwert zeigten, wurde diese Region als potentielle Bindungsregion bezeichnet (*peak score*). Für jeden *peak* wurde eine *false-discovery-rate* (FDR) berechnet.

Bei einem FDR-Wert $\leq 0,05$ wurde die Bindung als signifikant betrachtet. Für die Vergleichsanalysen der einzelnen ChIP-Experimente wurde Microsoft Excel verwendet.

Für die KEGG-Signalweg Analysen, sowie deren grafische Visualisierungen wurde das frei erhältliche Programm EGAN (Paquette and Tokuyasu, 2010) verwendet. Dieses Programm ordnet Gene in die entsprechenden KEGG-Signalwege und GO-Terms ein. Anhand eines einseitigen exakten Fisher-Tests (hypergeometrisch) werden signifikant angereicherte Signalwege berechnet.

4. Ergebnisse

4.1 Identifizierung und Charakterisierung von t(7;12) positiven AMLs

Die Translokation t(7;12) ist eine selten vorkommende, chromosomale Aberration, die fast ausschließlich mit Säuglings-AMLs assoziiert ist (vgl. Abschnitt 1.4). Ziel dieser Arbeit war es u.a. die Häufigkeit der Translokation t(7;12) in Säuglings-AMLs in Deutschland festzustellen, sowie positive Patienten zu charakterisieren und somit von anderen Säuglingsleukämien abzugrenzen.

4.1.1 Identifizierung des *HLXB9/TEL* Fusionstranskripts mittels RT-PCR

Ausgangskriterien für die Analyse von Patientenproben waren die Diagnose einer AML innerhalb der ersten 24 Lebensmonate, Ausschluss einer Trisomie 21, und keine nachweisliche 11q23/*MLL*-Translokation. Säuglingsleukämien mit einer 11q23/*MLL*-Translokation umfassen mit über 60% den Großteil der Säuglingsleukämien und wurden somit im Voraus vom Screening ausgeschlossen. Das Patientenmaterial wurde von den Referenzlaboratorien der deutschen Therapiestudien in Gießen und Hannover zur Verfügung gestellt. Die Proben enthielten Knochenmark oder peripheres Blut mit einem Blastenanteil von mindestens 60% und waren in PBS schockgefroren. Mittels einer Nested-RT-PCR wurden die Proben auf den bereits publizierten Bruchpunkt untersucht (Beverloo *et al.*, 2001). Das repräsentative Ergebnis der RT-PCR von 22 untersuchten Patienten ist in der Abb. 6 dargestellt.

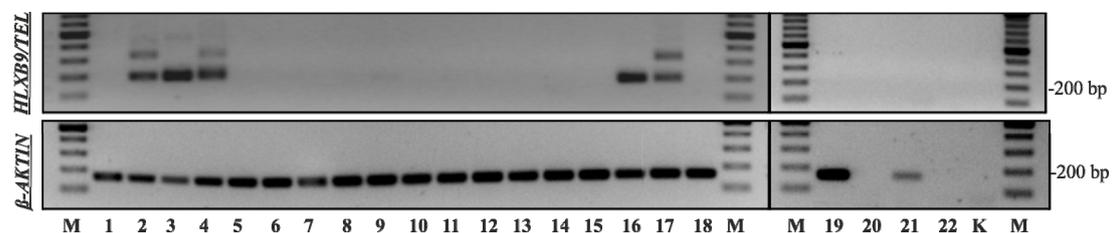


Abb. 6: RT-PCR zur Identifizierung des *HLXB9/TEL* Bruchpunktes. Dargestellt ist das Ergebnis der RT-PCR an 22 untersuchten Patienten. Fünf Patientenproben (Nr. 2,3,4,16 und 17) zeigen spezifische Banden für *HLXB9/TEL* bei den Größen 194 und 330 bp. *β-AKTIN* dient als Ladekontrolle und weist eine entsprechende Bande bei 156 bp auf. M = DNA-Leiter 100 bp, K = H₂O Kontrolle.

Insgesamt konnte von 40 Patienten RNA gewonnen werden und die Patienten in die Analyse mit einbezogen werden. Bei sechs Patienten konnte ein *HLXB9/TEL* Fusionstranskript identifiziert werden, d.h. 15% der Patienten in der untersuchten Kohorte sind *HLXB9/TEL* positiv.

Zur Validierung und Bestimmung des genauen Bruchpunktes wurden die PCR-Banden kloniert und sequenziert. Bei den jeweils unteren Banden von 194 bp handelt es sich um eine Fusion des Exon 1 des *HLXB9* mit dem Exon 3 des *TEL*. Dabei bleibt der Leserahmen des *TEL* erhalten und es entsteht ein 1887 bp (bzw. 629 Aminosäuren) langes Transkript. An der Schnittstelle kommt es zu einem Austausch von Serin zu Cystein (TCC zu TGC, Abb. 7). Bei den jeweils oberen Banden von 330 bp liegt eine Fusion des *HLXB9* Exon 1 mit dem Exon 2 des *TEL* vor. Durch die Fusion wird der Leserahmen des *TEL* unterbrochen und nach 852 bp (284 AS) führt ein Stoppcodon zum Abbruch einer möglichen Proteinbiosynthese.

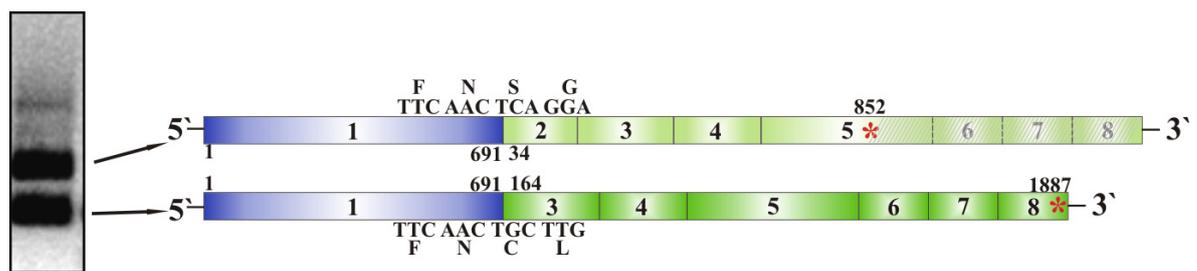


Abb. 7: Grafische Darstellung des *HLXB9/TEL* Bruchpunktes. Links sind exemplarisch die PCR-Banden des Patienten 17 der Abb. 6 dargestellt. Die untere Bande repräsentiert die *in-frame* Fusion des Exon 1 des *HLXB9* (blau) mit dem Exon 3 des *TEL* (grün). Bei der jeweils oberen Bande wird das Exon 1 des *HLXB9* mit dem Exon 2 des *TEL* fusioniert. Der Leserahmen wird unterbrochen und es kommt zum vorzeitigen Abbruch der Proteinbiosynthese (* markiert Stoppcodon). Die Ziffern geben die Position der Nukleotidsequenz wieder. Ober- bzw. unterhalb des Bruchpunktes sind die entsprechenden Nukleotid bzw. AS angegeben.

4.1.2 Charakterisierung der t(7;12)-HLXB9/TEL positiven Patienten

Die sechs unter 4.1.1 als *HLXB9/TEL* positiv beschriebenen Patienten wurden nach ihrem Alter bei der Erstdiagnose, der Morphologie und Immunologie der Blasten, sowie ihres Blasten-Karyotyps charakterisiert und verglichen (Tab. 2). Die Angaben wurden von den jeweiligen betreuenden Kliniken, sowie von der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Tumormimmunologie des HELIOS Klinikums in Berlin-Buch zur Verfügung gestellt.

Tab. 2: Charakterisierung von t(7;12)-HLXB/TEL positiven Patienten. Darstellung des Alters in Jahren, dem entsprechenden Karyotyp, Morphologie, Immunologie, V(D)J Rearrangement und der Expression von CD34 und CD117 in % von sechs *HLXB9/TEL* pos. Patienten. * markiert einen nicht eindeutig zuweisbaren FAB-Subtyp. NA = nicht verfügbar.

Alter in Jahren	Karyotyp	Morphologie	Immunologie	V(D)J	% CD34	% CD117
0,4	47, XX, t(7;16)(q36;q12), + mar	M2	CD4/CD7	negativ	72	68
0,7	48, XY, t(7;12)(q36;p13), +8,+19	AML *	CD4/CD7	negativ	55	36
0,6	47, XX, t(7;12)(q36;p13), +19	M2	CD4/CD56	negativ	NA	NA
0,2	47, XX, t(7;12)(q36;p13), +19	M0	CD4/CD7	negativ	86	86
0,75	47, XX, del(7)(q11,2~21), del(12)(p13), +?	M0	CD4/CD7	negativ	81	73
0,4	47, XY, del(12)(q12), +19	M2	CD4/CD7	negativ	61	59

Bei allen sechs Patienten wurde eine AML innerhalb der ersten 12 Monate diagnostiziert. Der Karyotyp zeigt in allen Fällen Auffälligkeiten der Chromosomen 7 und 12, jedoch ist die Translokation häufig kryptisch und nicht in allen Fällen mittels *G-banding* identifizierbar. Bei vier der sechs Patienten ist eine Trisomie 19 beschrieben worden, zwei Patienten verfügen über ein zusätzliches, nicht weiter definiertes Markerchromosom und ein Patient weist ein zusätzliches Chromosom 8 auf. Die Morphologie der Blasten entspricht in zwei Fällen dem FAB-Subtyp M0 und in drei Fällen dem FAB-Subtyp M2. Bei einem Patienten waren die Angaben der Kliniken widersprüchlich, so dass hier keine Zuordnung vorgenommen wurde. Fünf Patienten zeigen eine Ko-Expression der T-Zell assoziierten Marker CD4 (Durchschnitt 61%) und CD7 (Durchschnitt 71,4%). Zusätzlich zeigen diese Patienten eine hohe Expression der Stammzellmarker CD34 und CD117 (vgl. Abb. 13). Ein Patient weist eine Ko-Expression von CD4 und CD56 auf (Anteil unbekannt). Alle sechs Patienten wurden im hämatologischen Labor des „Hôpital Necker Enfants Malades“ in Paris mittels Immunfluoreszenz und Amplifikation der DH-JH, D β -J β und TCR δ Segmente auf eine mögliche V(D)J Rekombination getestet. Das Ergebnis war

in allen Fällen negativ. Vier Patienten erlitten innerhalb der ersten drei Jahre ein Rezidiv aber befinden sich aktuell in Remission. Ein Patient verstarb nach dem vierten Rezidiv und allogener Stammzelltransplantation. Von einem Patienten ist der klinische Verlauf unbekannt (Wildenhain *et al.*, 2010). Die Eigenschaften der untersuchten Patienten weisen eine hohe Ähnlichkeit hinsichtlich des Alters bei der Erstdiagnose, Prognose, sowie Zytologie und Morphologie der Blasten zu den bereits publizierten Patienten einer niederländischen Kohorte auf (vgl. Abschnitt 1.4.1) (Slater *et al.*, 2001; Tosi *et al.*, 2000; von Bergh *et al.*, 2006).

4.1.3 Genexpression in t(7;12) und 11q23 pos. Säuglings-AMLs Zellen

Zahlreiche Genexpressions-Studien belegen, dass die pädiatrischen AMLs sich anhand ihrer Zytogenetik und balancierten Translokationen unterscheiden (Andersson *et al.*, 2007; Armstrong *et al.*, 2002; Ross *et al.*, 2004; Schoch *et al.*, 2002; Valk *et al.*, 2004). So ist z.B. für AMLs mit 11q23/*MLL*-Translokationen die starke Expression von *HOX*-Genen bekannt (vgl. Abschnitt 1.3) (Thorsteinsdottir *et al.*, 2001). Die folgenden Experimente dienten dazu, t(7;12)-*HLXB9/TEL* pos. Patienten hinsichtlich ihres Expressionsprofils zu charakterisieren und mit der Gruppe der 11q23/*MLL*-positiven Säuglingsleukämien zu vergleichen. Alle Proben stammten von Patienten mit der Erstdiagnose einer AML innerhalb der ersten 18 Lebensmonate. Die CD34 positiven Kontrollproben stammten von gesunden Spendern im Kindesalter (nachfolgend als CD34+ bezeichnet).

t(7;12)-*HLXB9/TEL* positive Patientenzellen (nachfolgend nur noch mit t(7;12) pos. bezeichnet) sind durch eine starke Expression des Wildtyp *HLXB9* Allels charakterisiert (von Bergh *et al.*, 2006). Die Abb. 8 zeigt die *HLXB9* Expression in den in dieser Arbeit charakterisierten t(7;12) pos. Patientenzellen im Vergleich zu t(7;12) neg. Säuglings-AML Zellen und zu CD34+ Kontrollproben. Sowohl in den t(7;12) neg., als auch in den CD34+ Kontrollproben, lässt sich keine *HLXB9* Expression nachweisen, während die t(7;12) pos. Patientenzellen eine äußerst hohe *HLXB9* Expression zeigen.

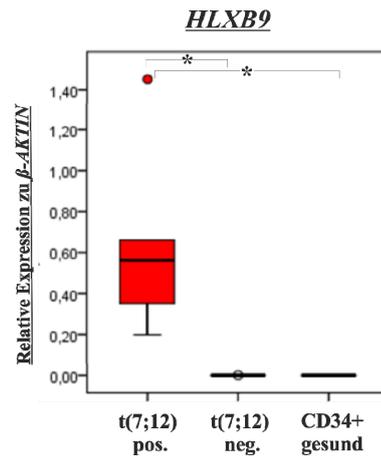


Abb. 8: Expression von *HLXB9* in t(7;12) pos. Patientenzellen. Vergleich der relativen *HLXB9* Expression (TaqMan qRT-PCR) in t(7;12) pos. Patientenzellen (n=5), t(7;12) neg. Patientenzellen (n=14) und CD34+ gesundem Spendermaterial (n=3). Die Werte wurden zu β -*AKTIN* normalisiert. * Mann-Whitney-U-Test zur Signifikanzberechnung: $p \leq 0,05$.

Während die Expression von *HLXB9* fast ausschließlich in t(7;12) pos. Leukämiezellen zu beobachten ist, ist die aberrante Expression weiterer Homöobox-Gene in der AML weit verbreitet. Für Säuglingsleukämien mit 11q23/*MLL*-Translokationen (nachfolgend als 11q23/*MLL* pos. bezeichnet) ist gezeigt worden, dass vor allem die Expression von *HOXA9* und *MEIS1* am Transformationsprozess beteiligt ist (vgl. Abschnitt 1.3) (Thorsteinsdottir *et al.*, 2001). Als ein direktes Ziel-Gen des *HOXA9/MEIS1*-Komplex ist *c-MYB* identifiziert worden (Hess *et al.*, 2006).

t(7;12) pos. Patientenzellen wurden mittels qRT-PCR auf eine erhöhte Expression von *HOXA9*, *MEIS1* und *c-MYB* untersucht und mit 11q23/*MLL* pos. AML-Zellen, sowie mit Zellen einer Patientengruppe der gleichen Altersklasse, die weder t(7;12) noch 11q23/*MLL* Translokationen aufweisen, verglichen (Abb. 9; vgl. Tab. 4 (b) Abschnitt 7.1.1 für den entsprechenden Karyotyp). Die Expressionsdaten zeigen, dass die t(7;12) pos. Kohorte im Vergleich zur 11q23/*MLL* pos. Gruppe keine erhöhte Expression der drei *MLL* Ziel-Gene zeigt. Auch die Kontrollgruppe der t(7;12) und 11q23/*MLL* neg. Patientenzellen weist keine erhöhte Expression der Ziel-Gene auf.

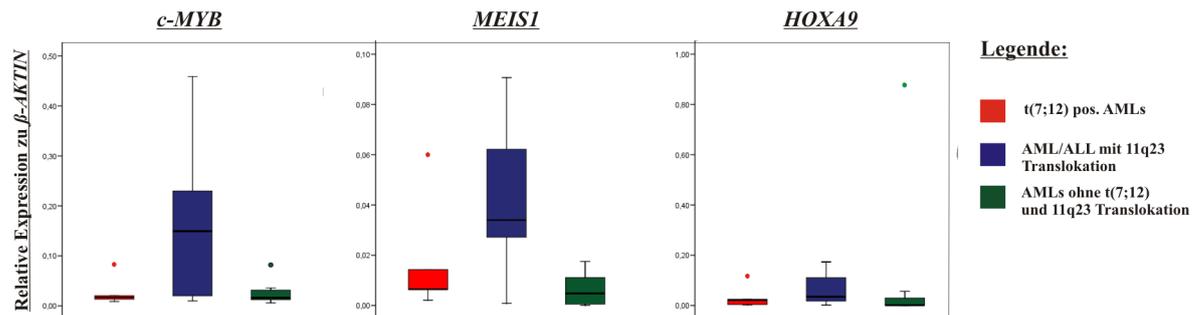


Abb. 9: Vergleich der relativen Genexpression von *c-MYB*, *MEIS1* und *HOXA9* in Säuglingsleukämien. TaqMan qRT-PCR für *c-MYB*, *MEIS1* und *HOXA9* in t(7,12) pos. Patientenmaterial (n=5, AMLs), 11q23 pos. Patientenmaterial (n=9, AML/ALL) und t(7;12) bzw. 11q23/*MLL* neg. Patientenmaterial (n=8, AMLs). Die Werte wurden zu β -*AKTIN* normalisiert.

Um weitere differentiell regulierte Gene zu identifizieren, sowie um einen Einblick in das globale Expressionverhalten t(7;12) pos. Zellen zu erhalten, wurden Genexpressions-Mikroarray Analysen durchgeführt. Folgende Fragen sollten mit Hilfe der Arrayanalysen geklärt werden: 1) Zeigen die t(7;12) pos. Patientenzellen ein homogenes Genexpressionsprofil? 2) Wie unterscheidet sich das Expressionsprofil von t(7;12) pos. Zellen und CD34+-Knochenmarksproben gesunder Spender? 3) Wie unterscheidet sich das Expressionsprofil von t(7;12) und 11q23/*MLL* pos. AML-Zellen, besonders bezüglich weiterer, in Abb. 9 nicht dargestellter *HOX*-Gene? 4) Welche KEGG-Signalwege und GO-Terms werden durch differentiell exprimierte Gene beeinflusst?

Für die Genexpressions-Analysen wurden „GeneChip[®] 1.0 ST Arrays“ der Firma Affymetrix verwendet. Diese Arrays enthalten Sonden für 28.869 humane Gene (im Durchschnitt 26 Sonden pro Gen). Die Patientenkohorte bestand aus den sechs unter 4.1.1 untersuchten t(7;12) pos. Patienten, sowie sechs Säuglings-AMLs mit t(9;11)-*MLL/AF9* Translokation (vgl. Tab. 4 (a) Abschnitt 7.1.1 für den entsprechenden Karyotyp). Die statistische Auswertung der Array-Daten sowie die grafische Darstellung als Heatmap wurden extern in der Abteilung von Prof. Dugas, Universität Münster, durchgeführt (vgl. Abschnitt 3.5). Die Heatmap der Abb. 10 zeigt zwischen t(7;12) pos. Patienten und CD34+ Kontrollproben, sowie zwischen t(9;11) pos. Patienten und CD34+ Kontrollproben differentiell regulierte Gene.

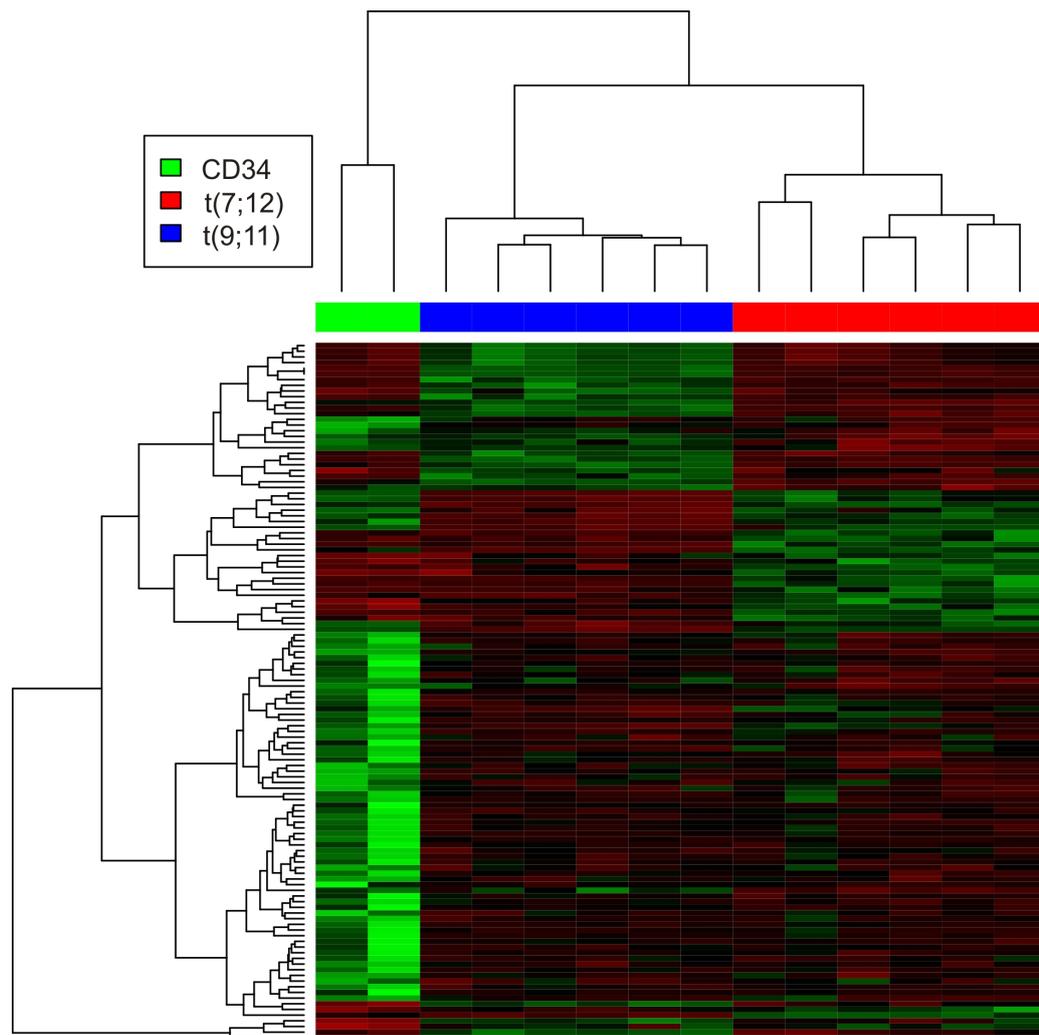


Abb. 10: Heatmap Darstellung der Genexpressions-Analyse „t(7;12) vs CD34+“ und „t(9;11) vs CD34+“. Die Heatmap enthält differentiell regulierte Gene zwischen t(7;12) pos. Patientenmaterial und CD34+ Kontrollproben, sowie zwischen t(9;11) pos. Patientenmaterial und CD34+ Kontrollproben. Die differentiell regulierten Gene unterscheiden sich mit einem Signifikanzwert von $p \leq 0,05$. Grün repräsentiert in den Patientenzellen herunter regulierte Gene, rot entsprechend hoch regulierte Gene.

Anhand der Heatmap ist deutlich erkennbar, dass sich die t(7;12) und die t(9;11) pos. Patienten innerhalb ihrer Gruppe zusammen gruppieren und sich in ihrem jeweiligen Genexpressionsprofil von den CD34+ Kontrollproben unterscheiden. Obwohl t(7;12) und t(9;11) pos. Patienten unterschiedliche Cluster bilden, zeigt die Abb. 10 auch, dass beide Patientengruppen sich im Vergleich zu den CD34+ Kontrollproben zusammen gruppieren.

Eine Auflistung der zwischen t(7;12) pos. Patientenzellen und CD34+ Kontrollproben differentiell regulierten Gene mit einem Signifikanzwert $< 0,05$ findet sich im Anhang 7.3 in der Tab 7.

Die Abb. 11 zeigt eine Visualisierung und Signalweg Analyse der zwischen t(7;12) pos. Patientenzellen und CD34+ Kontrollproben differentiell regulierten Gene. In der Abb. 11 (a) sind eine Auswahl an signifikant angereicherten KEGG-Signalwegen und GO-Terms, sowie ihr Signifikanzwert wiedergegeben. Die Abb. 11 (b) zeigt in einer Netzwerkgrafik eine Auswahl an leukämierelevanten, angereicherten KEGG-Signalwegen und GO-Terms, sowie die jeweiligen involvierten Gene.

(a)

Analyse	Name	Signifikanzwert
KEGG: 4640	Hematopoietic cell lineage	7,04E-06
KEGG: 4060	Cytokine-cytokine receptor interaction	2,02E-05
KEGG: 4062	Chemokine signaling pathway	2,35E-05
KEGG: 5340	Primary immunodeficiency	1,59E-04
KEGG: 4510	Focal adhesion	3,57E-04
KEGG: 4810	Regulation of actin cytoskeleton	4,96E-04
KEGG: 562	Inositol phosphate metabolism	6,76E-04
KEGG: 4070	Phosphatidylinositol signaling system	1,68E-03
KEGG: 4670	Leukocyte transendothelial migration	5,40E-03
KEGG: 5213	Endometrial cancer	1,06E-02
KEGG: 5223	Non-small cell lung cancer	1,14E-02
KEGG: 5214	Glioma	1,63E-02
KEGG: 5212	Pancreatic cancer	1,87E-02
KEGG: 4012	ErbB signaling pathway	2,80E-02
KEGG: 5215	Prostate cancer	2,92E-02
GO-Prozess: GO:0007186	G-protein coupled receptor protein signaling pathway	9,82E-08
GO-Prozess: GO:0007155	cell adhesion	1,82E-07

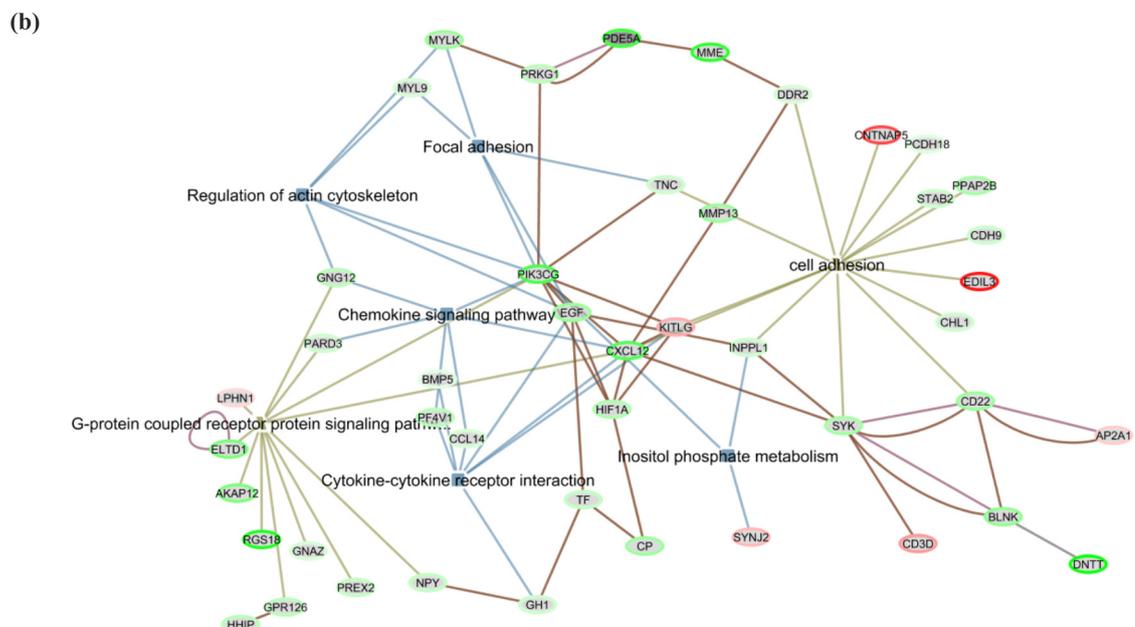


Abb. 11: KEGG-Signalweg und GO-Term Analyse differenziell regulierter Gene „t(7;12) vs CD34+“. Differenziell regulierte Gene ($p \leq 0,05$) wurden mit Hilfe der EGAN Software als Netzwerkgrafik visualisiert und auf angereicherte KEGG-Signalwege und GO-Terms analysiert. (a) Die Tabelle der EGAN-Analyse enthält eine Auswahl an signifikant angereicherten KEGG-Signalwegen und GO-Terms mit einem Signifikanzwert $p \leq 0,005$. (b) EGAN Netzwerk-Visualisierung mit aus (a) ausgewählten Signalwegen. Gene, welche in t(7;12) pos. Zellen herunter reguliert sind, werden grün umrandet dargestellt, herauf regulierte Gene sind rot umrandet. Blaue Linien zeigen die Zugehörigkeit einzelner Gene zu einem entsprechenden KEGG-Signalweg, hellbraune Linien zu einem GO-Term. Dunkelbraune und violette Linien zeigen, dass die entsprechenden Gene durch publizierte Studien in Verbindung gebracht werden können.

Eine Anreicherung ist verstärkt für Signalwege, die im weiteren Sinne die Zelladhäsion und Zell-Interaktion beeinflussen, zu beobachten. Zusätzlich sind die KEGG-Signalwege „*endometrial cancer*“, „*glioma*“, „*pancreatic cancer*“ und „*prostate cancer*“ mit in die Abbildung einbezogen, da es sich bei den betroffenen Geweben um Organe handelt, in denen *HLXB9* in seiner physiologischen Rolle exprimiert wird bzw. in denen eine Missregulation von *HLXB9* mit der Tumorentstehung in Verbindung gebracht wird (vgl. Abschnitt 1.4.3).

Für einen direkten Vergleich des Genexpressionsprofils von t(7;12) pos. Patientenzellen mit t(9;11) pos. Patientenzellen wurden die Expressionsdaten der beiden Patientenkohorten direkt miteinander verglichen und auf differentiell exprimierte Gene untersucht. Die Top 25 der differentiell regulierten Gene mit dem kleinsten Signifikanzwert sind in der Heatmap der Abb. 12 (a) dargestellt. Die bereits in der qRT-PCR untersuchten Gene, *HLXB9* (*MNX1*), *HOXA9*, *MEIS1* und *c-MYB* wurden mit in die Heatmap aufgenommen, zeigen z.T. jedoch keinen signifikanten Expressionsunterschied. Die Abb. 12 (b) zeigt eine Anzahl an *HOX*-Genen, welche in den t(7;12) pos. Patientenzellen im Vergleich zu den t(9;11) pos. Patientenzellen signifikant herunter reguliert vorliegen und ergänzen somit die bereits untersuchten *HOX*-assoziierten Gene der Abb. 9. In der Tab. 8 im Anhang 7.3 sind die differentiell regulierten Gene ($p < 0,001$) aufgelistet.

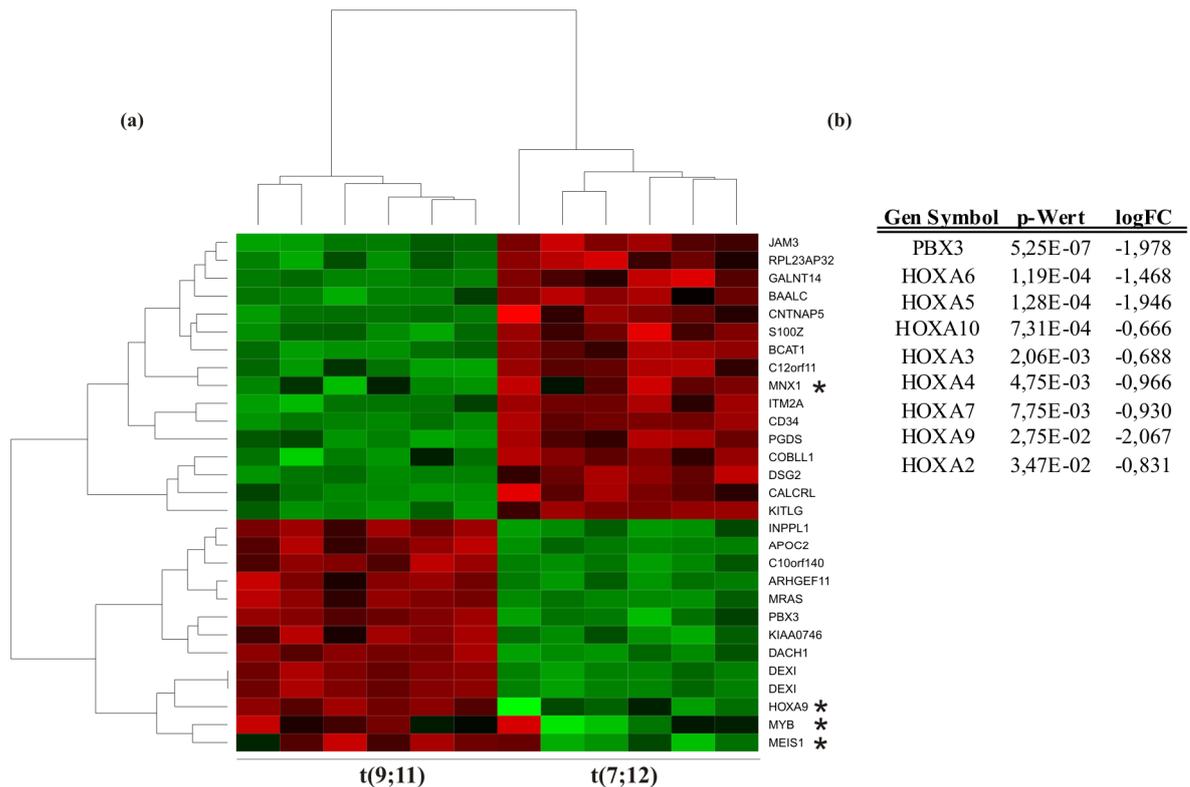


Abb. 12: Differenziell regulierte Gene der Analyse „t(7;12) vs t(9;11)“. (a) Die Heatmap zeigt die 25 differenziell exprimierten Gene mit dem niedrigsten Signifikanzwert. * Zusätzlich wurden der Heatmap die Gene *MNX1* ($p=0,012$), *HOXA9* ($p=0,028$), *MYB* ($p=0,285$) und *MEIS1* ($p=0,142$) zugefügt. Grün repräsentiert in t(7;12) pos. Zellen herunter regulierte Gene, rot entsprechend hoch regulierte Gene. (b) Auswahl von signifikant differenziell regulierten *HOX*-Genen „t(7;12) vs t(9;11)“. Die differenziell regulierten Gene unterscheiden sich mit einem Signifikanz-Wert von $p \leq 0,05$.

Unter den Genen mit dem niedrigsten Signifikanzwert befinden sich die Marker *CD34* und *KITLG*, welche in den t(7;12) pos. Patientenzellen verstärkt hoch reguliert werden. Die Expression dieser frühen Marker bestätigt den frühen Differenzierungsgrad der Blasten (M0, M2). Während sich die Zellen von t(7;12) pos. Patienten in einem relativ unreifen Stadium befinden, handelt es sich bei den Zellen der sechs t(9;11) pos. Patienten um monoblastäre Zellen (FAB M5). Die Abb. 13 zeigt die Proteinexpression der Oberflächenmarker CD117 und CD34. t(7;12) pos. Patientenzellen exprimieren signifikant mehr CD34 als Patienten mit einer Translokation t(9;11). Das Stammzellantigen CD117 zeigt ebenfalls eine höhere Expression.

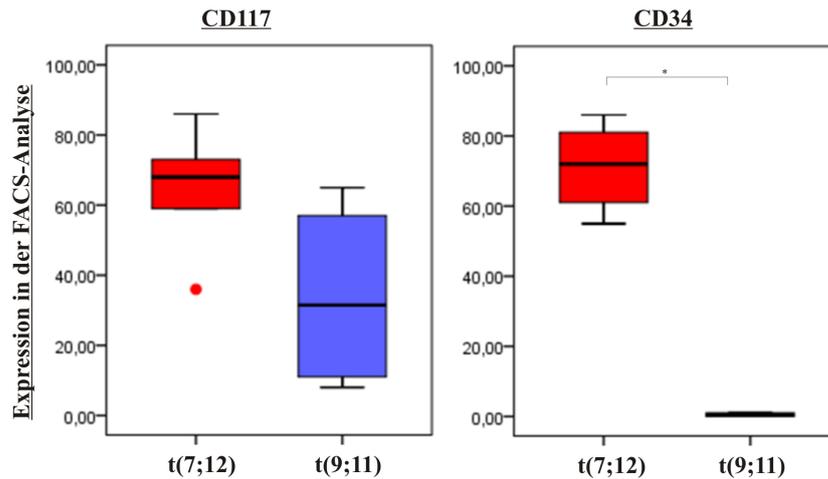


Abb. 13: Expression von CD117 und CD34 in t(7;12) und t(9;11) pos. Patientenzellen. Box-Plot Darstellung der in der FACS-Analyse ermittelten Expression von CD117 und CD34. Die Werte wurden von Prof. Ludwig, HELIOS-Klinik Berlin, zur Verfügung gestellt. t(7;12): n=5, t(9;11): n=4. * Mann-Whitney-U Test zur Signifikanzberechnung: $p \leq 0,05$.

Sämtliche differentiell exprimierte Gene der Analyse „t(7;12) versus t(9;11)“ mit einem Signifikanzwert $p < 0,005$ wurden in eine KEGG-Signalweg Analyse mit einbezogen. Die Abb. 14 stellt eine Auswahl an leukämierlevanten Signalwegen, sowie eine Netzwerkvisualisierung dar.

Auch der Vergleich des Genexpressionsprofils zwischen t(7;12) und t(9;11) pos. Patientenzellen zeigt eine signifikante Anreicherung von Signalwegen der Zelladhäsion und Zell-Interaktion („*cell adhesion molecules*“, „*focal adhesion*“). Zusätzlich sind ebenfalls zahlreiche KEGG-Signalwege stark angereichert, welche Organe mit einer physiologischen *HLXB9* Expression betreffen (*colorectal cancer*“, „*pancreatic cancer*“, „*prostate cancer*“). Diese starke Anreicherung bekräftigt die Vermutung, dass der *HLXB9* Expression eine bedeutende Rolle in t(7;12) pos. Patientenzellen zukommt und zu dem homogenen Expressionsprofil beiträgt. Da das Expressionsprofil von Patientenzellen zusätzlich durch diverse zytogenetische und morphologische Eigenschaften geprägt wird, wurde in den nachfolgenden Experimenten ein myeloisches Zell-System verwendet, in dem die direkte Auswirkung der *HLXB9* Expression analysiert werden konnte.

4.2. Identifizierung von Zielstrukturen des Transkriptionsfaktors *HLXB9*

HLXB9 gehört zu der Gruppe der Homöobox-Gene. Diese weisen als charakteristisches Element die DNA-bindende Homöodomäne auf. Es wird vermutet, dass *HLXB9* ebenfalls über DNA-bindende Eigenschaften verfügt, jedoch sind derzeit keine funktionellen Analysen über mögliche Ziel-Strukturen bekannt. Auch sekundäre Effekte von *HLXB9* auf das Expressionsprofil hämatopoetischer bzw. leukämischer Zellen sind nicht beschrieben. Für die Identifizierung von primären und sekundären Ziel-Genen, wurde das nachfolgend beschriebene HL60 Zell-System verwendet.

4.2.1 Überexpression von *HLXB9* in HL60 Zellen

Als Ziel-Zellen für die stabile Expression von *HLXB9* wurde die humane AML Zell-Linie HL60 verwendet. HL60 Zellen wurden ausgewählt, da diese, trotz eines komplexen Karyotyps, kein bekanntes Fusionstranskript exprimieren. Des Weiteren handelt es sich um Leukämiezellen mit einem geringen Differenzierungsgrad (FAB M2) (Dalton, Jr. *et al.*, 1988) und ähneln somit dem Differenzierungsgrad der Blasten von t(7;12) positiven Patienten (vgl. Abschnitt 4.1.2). HL60 Zellen exprimieren kein endogenes *HLXB9* (Abb. 15).

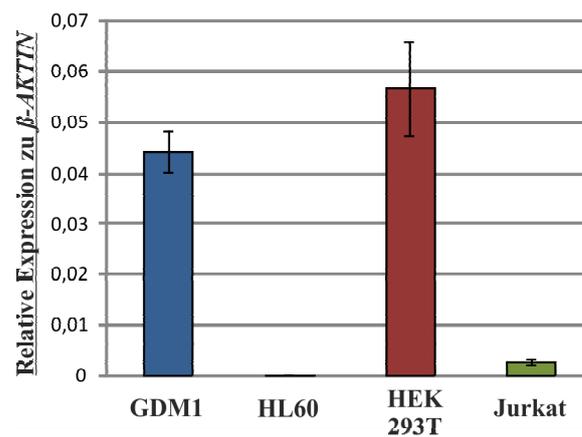


Abb. 15: Relative Expression von *HLXB9* in vier verschiedenen Zell-Linien. TaqMan-RT-PCR für *HLXB9* an cDNA aus den Zell-Linien GDM1, HL60, HEK 293T und Jurkat. Die Werte wurden zu β -*AKTIN* normalisiert. Die Standardabweichung bezieht sich auf drei technische Triplikate.

Als Positivkontrolle für die *HLXB9* Expression wurde die GDM1 Zell-Linie (Translokation von *HLXB9* und *c-MYB*) verwendet, welche als einzige bekannte AML Zell-Linie *HLXB9* exprimiert (Nagel *et al.*, 2005). Die Nierenkarzinom-Zell-Linie HEK 293T exprimiert ebenfalls *HLXB9*, während bei der T-Zell Leukämie Zell-Linie Jurkat nur eine äußerst schwache Expression von *HLXB9* nachweisbar ist.

Für die stabile Expression von *HLXB9* in HL60 Zellen, wurden diese mit dem Überexpressionsvektor pMC transfiziert. Das Grundgerüst dieses Vektors ist im Abschnitt 7.1.6 erläutert. Als elementare Struktur enthält er eine bicistronische mRNA, die die Expression von *HLXB9* an die Expression des Resistenzmarkers Puromycin koppelt. Die Puromycin-Resistenz erlaubte eine spätere Selektion von stabil transfizierten HL60 Zellen. In der Abb. 16 sind schematisch die verwendeten Konstrukte dargestellt. Als Negativkontrolle diente der Leervektor pMC, der ausschließlich die Information der Puromycin-Resistenz enthält. Zusätzlich zu dem Vektor pMC[*HLXB9*] wurde der Vektor pMC[*HLXB9/TEL*] kloniert. Dieser enthält die mRNA-Sequenz des Fusions-Transkripts *HLXB9/TEL*.

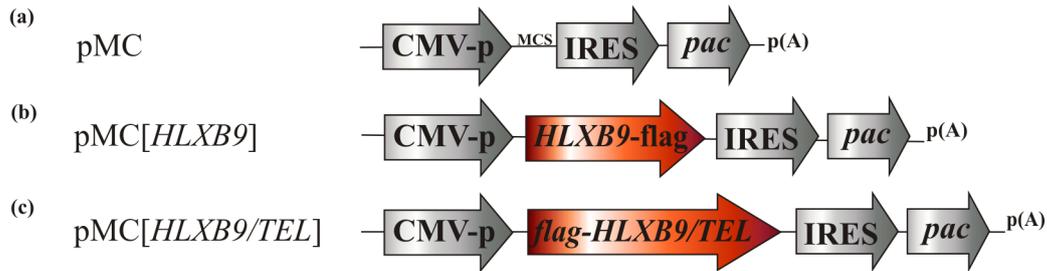


Abb. 16: Schematische Darstellung der Konstrukte des Überexpressionsvektors pMC. (a) Der Ausgangsvektor pMC wurde als Negativkontrolle verwendet. In die MCS wurde die cDNA von (b) *HLXB9-flag* und (c) *flag-HLXB9/TEL* kloniert.

Bei den jeweiligen Sequenzen von *HLXB-flag* und *flag-HLXB9/TEL* handelt es sich um codon-optimierte Sequenzen der Firma GENEART, die eine optimale Proteinexpression ermöglichen. Die Aminosäuresequenz ist zu 100% mit der Referenzsequenz identisch. Die Nukleotid- und Aminosäuresequenz ist im Anhang im Abschnitt 7.2 wiedergegeben.

Die Funktionalität der pMC-Konstrukte wurde in HEK 293T Zellen überprüft. Dazu wurden die Zellen transient mit den entsprechenden Konstrukten transfiziert und die Proteinexpression im *Western Blot* analysiert (Abb. 17).

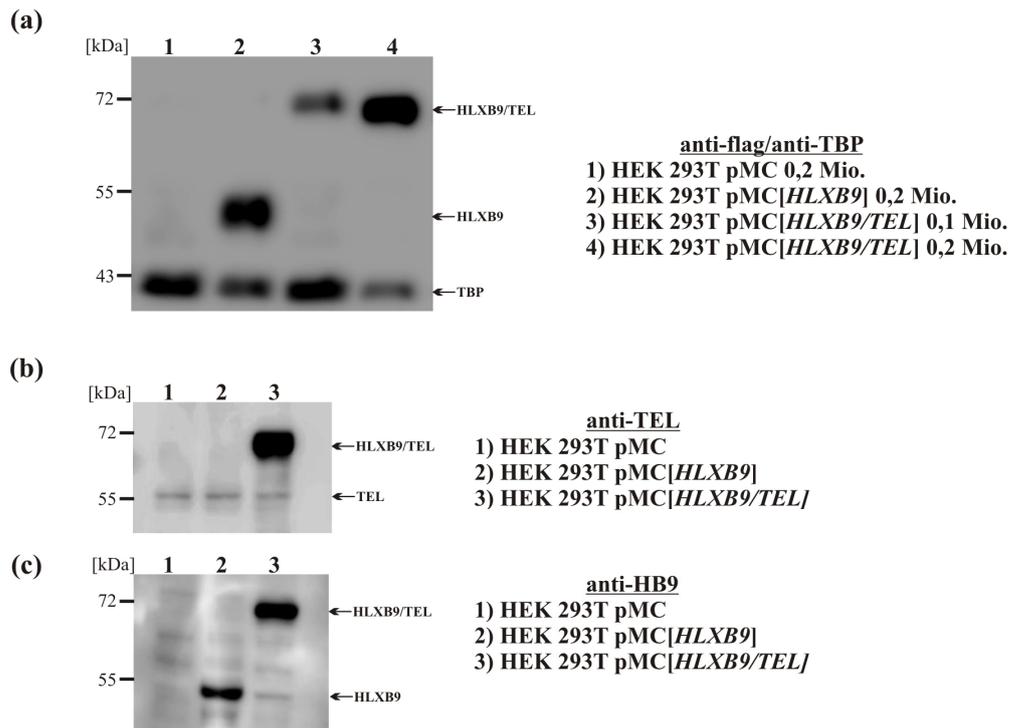


Abb. 17: Funktionalität der pMC-Konstrukte in HEK 293T Zellen. HEK 293T Zellen wurden transient mit den angegebenen Vektoren transfiziert. 24 h nach Transduktion wurden die Zellen lysiert und die Proteine im WB detektiert. (a) Für die Gelelektrophorese wurden Kernextrakte von 0,2 bzw. 0,1 Mio. Zellen pro Spur aufgetragen. Detektion mit anti-FLAG-HRP, sowie anti-TBP//anti-Maus-HRP. (b+c) Pro Spur des SDS-Gels wurde Gesamt-Protein Zell-Lysat von 0,1 Mio. Zellen aufgetragen. Als Antikörper wurden (b) anti-TEL//anti-Kaninchen-HRP und (c) anti-HB9//anti-Schaf-HRP (HB9 = HLXB9) verwendet. Die Größe von HLXB9-FLAG beträgt ~42 kDa, von HLXB9/TEL ~73 kDa, von TEL 53 kDa und von TBP (*TATA-binding-protein*) 43 kDa.

Die Proteinbanden von HLXB9 (Spur 2, ~42 kDa) und HLXB9/TEL (Spur 3 und 4, ~73 kDa) in der Abb. 17 (a) konnten mit einem anti-FLAG Antikörper im Kernextrakt nachgewiesen werden. TBP (*TATA-binding Protein*) dient als Ladekontrolle der verwendeten Kernextrakte. Um die Spezifität des FLAG-Antikörpers zu überprüfen, wurden weitere *Western Blot* Analysen mit gegen HLXB9 und TEL gerichteten Antikörpern durchgeführt. Beide Antikörper sind gegen den in der Fusion HLXB9/TEL enthaltenen Bereich gerichtet. In der Abb. 17 (b) erkennt man in den Spuren 1-3 das endogene TEL (53 kDa), sowie in der Spur 3 das transfizierte HLXB9/TEL Protein (~73 kDa). Die Abb. 17 (c) zeigt in der Spur 2 das transfizierte HLXB9 und in der Spur 3 das transfizierte HLXB9/TEL. Das endogene HLXB9 wird zu schwach exprimiert, um detektiert zu werden und ist auch in der Kontrollspur 1 nicht erkennbar.

Die erwarteten Proteinbanden zeigen bei allen detektierten Proteinen ein vom tatsächlichen Gewicht abweichendes Laufverhalten von ca. 2-3 kDa, was sich auf die Ungenauigkeit des Größenstandards bzw. dessen Zuordnung zurückführen lässt. Ein größerer Unterschied ist bei HLXB9 zu beobachten. Die Größe von HLXB9-FLAG liegt bei 42 kDa. Das tatsächliche Laufverhalten ist bei der Detektion mit allen drei Antikörpern bei ca. 52 kDa zu beobachten. Dieses veränderte Laufverhalten wurde bereits in Publikationen beschrieben (beobachtetes Laufverhalten bei 47 kDa) und wird anhand von posttranskriptionellen Modifizierungen begründet, welche für viele Homöo-Proteine beschrieben und durch *in-silico*-Vorhersagen bekannt sind (Nagel *et al.*, 2005).

Für die stabile Integration der Konstrukte in HL60 Zellen, wurden diese nach der Transfektion für vier Wochen in Puromycin-haltigem Medium kultiviert (vgl. Abschnitt 3.2.3). Während dieser Selektionsphase bilden sich oligoklonale Zellen, bei denen die Konstrukte stabil im Genom integriert vorliegen. Um einen dauerhaften Selektionsdruck zu garantieren, wurden die Zellen über den ganzen experimentellen Zeitraum in Puromycin-haltigem Medium kultiviert. Die Abb. 18 (a) zeigt die Proteinexpression von HLXB9 im *Western Blot* (HL60[HLXB9], Spur 1). Als Negativkontrolle für alle weiteren Experimente dienten HL60 Zellen, welche mit dem Leervektor transfiziert wurden (HL60[mock], Spur 2).

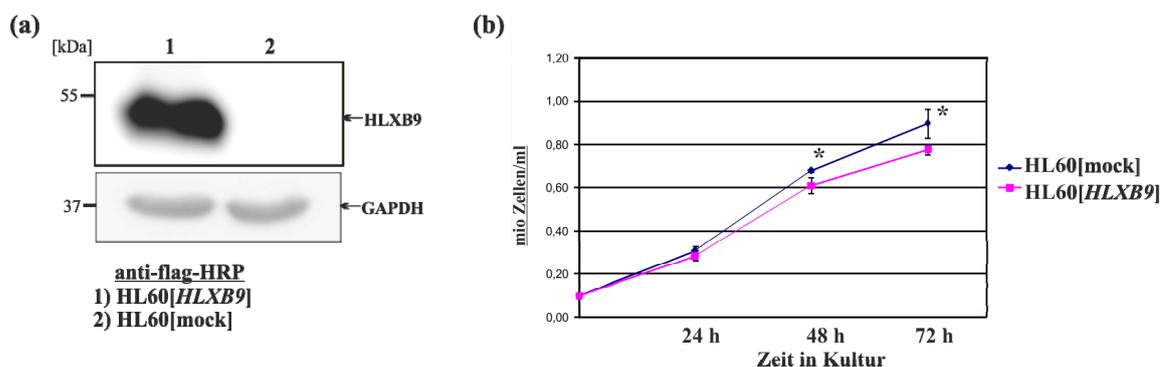


Abb. 18: Proteinexpression von HLXB9 in HL60[HLXB9] Zellen. (a) Nachweis der Protein-Expression von HLXB9 aus Gesamtprotein Zell-Lysaten im *Western Blot*. Für die Detektion wurde ein anti-FLAG-HRP gekoppelter Antikörper verwendet. GAPDH (Antikörper: anti-GAPDH//anti-Maus-HRP) dient als Ladekontrolle. (b) 0,1 Mio. HL60[mock] und HL60[HLXB9] Zellen wurden zum Zeitpunkt 0 in Triplikaten ausgesät und die Zellzahl nach 24 h, 48 h und 72 h in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. * Mann-Whitney-U Test zur Signifikanzberechnung: $p \leq 0,05$.

Eine Wachstumskurve zeigte, dass die HL60[*HLXB9*] Zellen nach 48 und 72 h ein um 10 bzw. 14% langsames Wachstum aufzeigen, als die HL60[*mock*] Zellen (Abb. 18 (b)).

Parallel dazu wurde die stabile Zell-Linie HL60[*HLXB9/TEL*] generiert. Obwohl mit dem entsprechenden Konstrukt pMC[*HLXB9/TEL*] das Protein *HLXB9/TEL* in HEK 293T Zellen im *Western Blot* nachgewiesen werden konnte (vgl. Abb. 17), gelang es nicht, dass Protein in der myeloischen Zell-Linie HL60 zu exprimieren bzw. nachzuweisen. Mittels PCR an genomischer DNA (Abb. 19 (a)) und cDNA (Abb. 19 (b)) konnte gezeigt werden, dass die Vektorsequenz von *HLXB9/TEL* sowohl in den Zellen enthalten ist, als auch transkribiert wird. Die verwendeten Primer flankieren den *HLXB9/TEL* Bruchpunkt (Sequenz Tab. 5, Abschnitt 7.1.6). Obwohl die Fusion *HLXB9/TEL* auf genomischer und mRNA-Ebene nachgewiesen werden konnte, gelang es nicht, dass Fusionsprotein in unterschiedlichen Zell-Fractionen oder im Gesamt-Zell-Lysat im *Western Blot* zu detektieren. Für die Detektion wurden Antikörper verwendet, welche gegen den jeweils in der Fusion enthaltenen Anteil von *HLXB9* und *TEL*, sowie gegen den *FLAG-tag* gerichtet waren. Die Antikörper wurden zunächst in HEK 293T Zellen auf ihre Funktionalität überprüft (vgl. Abb. 17). Durch das Verwenden von Antikörpern, die unterschiedliche Bereiche des Proteins erkennen, konnte ausgeschlossen werden, dass eine Fehlfaltung des Proteins zum Detektionsverlust führt. Eine Immunpräzipitation für *HLXB9/TEL* mit einem anti-*FLAG* Antikörper schloss eine zu geringe Proteinexpression von *HLXB9/TEL* aus (Abb. 19 (c)). Bei 2,5 Mio. Zellen pro Spur ist im *Western Blot* eine deutliche Proteinbande für *HLXB9* erkennbar (Spur 4), während bei bis zu 10 Mio. Zellen keine *HLXB9/TEL* Bande detektierbar ist (Spur 1,2).

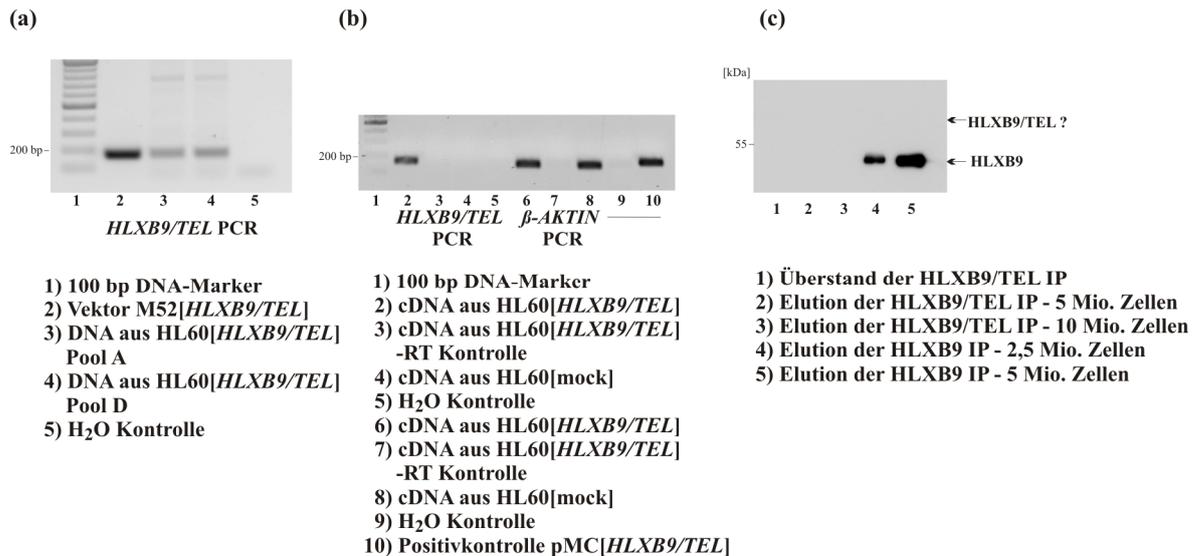


Abb. 19: Nachweis von *HLXB9/TEL* in HL60[*HLXB9/TEL*] Zellen auf genomischer und transkriptioneller Ebene; keine Proteinexpression von *HLXB9/TEL*. (a) PCR für *HLXB9/TEL* an genomischer DNA aus zwei verschiedenen oligoklonalen Klonen der Zellen HL60[*HLXB9/TEL*]. Die Größe des PCR-Produkts beträgt 173 bp. Verwendete Primer: *HB9_syn* 636 fwd und *TEL_syn* 808 rev (b) RT-PCR für *HLXB9/TEL*. Die -RT-Kontrolle (Spur 3) dient zum Ausschluss von genomischer DNA Kontamination. *β-AKTIN* dient zur Kontrolle der cDNA Integrität. (c) IP für *HLXB9/TEL* aus HL60[*HLXB9/TEL*] Zellen (Spur 1-3). Nach der Detektion mit einem anti-FLAG-HRP gekoppelten Antikörper ist keine Proteinbande (73 kDa) sichtbar. Eine IP für *HLXB9* aus HL60[*HLXB9*] Zellen dient als Positivkontrolle.

Ein möglicher Grund für den fehlenden Nachweis des *HLXB9/TEL* Proteins könnte eine rasche Degradation des Proteins durch Proteasen sein. Des Weiteren könnte die Sequenz der *HLXB9/TEL* mRNA mögliche Bindestellen für miRNAs oder ähnliche regulatorische RNAs enthalten, welche die mRNA posttranskriptional abbauen und somit die Proteinbiosynthese verhindern.

4.2.2 Identifizierung potentieller Zielstrukturen von *HLXB9* (ChIP-on-Chip)

Die Chromatin-Immünpräzipitation in Verbindung mit einer Promotor-Array Analyse dient der Identifizierung von Ziel-Strukturen im Promotorbereich potentieller Ziel-Gene. Ein Ablauf der Methode ist im Abschnitt 3.4.2 beschrieben. Für die Quervernetzung von *HLXB9* mit potentiellen DNA-Strukturen erfolgte in einem ersten Schritt eine Formaldehyd-bedingte *crosslinking*-Reaktion. Dieser Schritt fand *in-vivo* im Zellsystem HL60[*HLXB9*] sowie HL60[*mock*] statt. Nach der Kernextraktion wurden die Zellkerne enzymatisch mit einer Nuklease verdaut und mit Ultraschall behandelt um eine optimale

DNA-Fragment Größe von 150-900 bp zu erhalten. Die benötigte Enzymmenge und die optimalen Ultraschallbedingungen wurden experimentell bestimmt. In der Abb. 20 (a) wird exemplarisch eine Testreihe des enzymatischen Verdau von 0 – 20 units/ μ l Enzym und einer Ultraschallbehandlung von 4 x 10 sek. Impuls gezeigt. Die Abb. 20 (b) zeigt die optimale Einstellung, wie sie für die weiteren ChIP-Experimente verwendet wurde (4,8 unit/ μ l Enzym, 3 x 10 sek. Impuls).

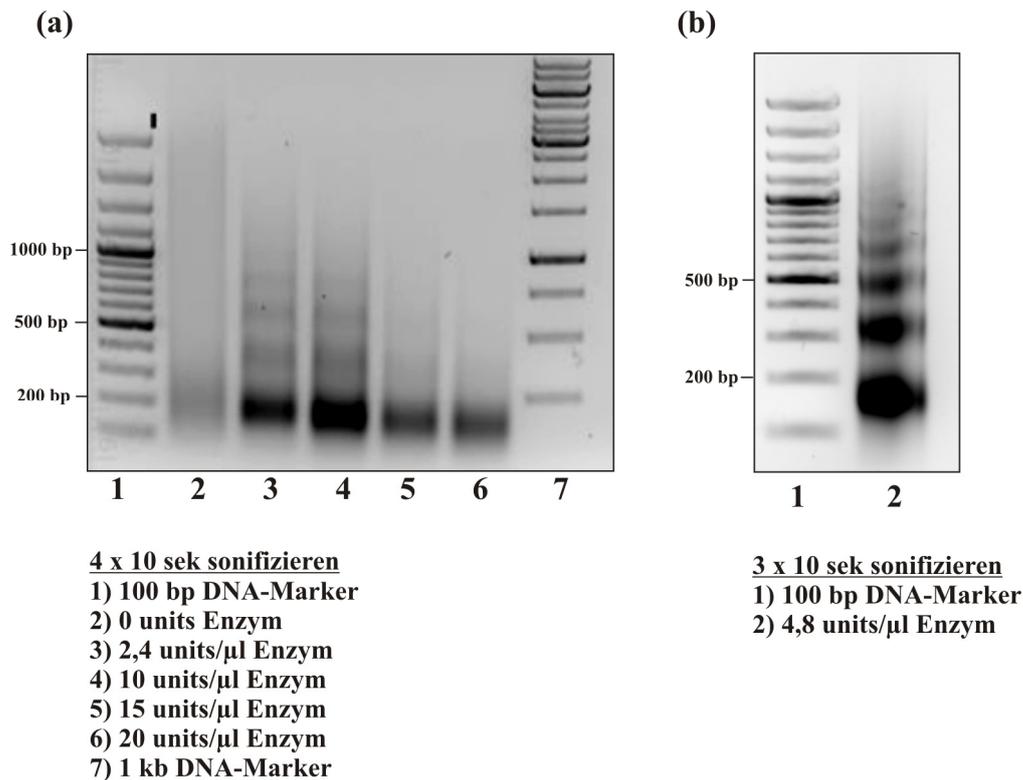


Abb. 20: Optimierung der Sonifizierungseffizienz. (a) Die gelelektrophoretische Auftrennung zeigt DNA Proben, welche mit unterschiedlichen Mengen Nuklease verdaut wurden. Alle Proben wurden nach dem Verdau für 4 x 10 sek. sonifiziert. (b) Optimierte Einstellung mit einer Enzymmenge von 4,8 units/ μ l und einem anschließenden Sonifizierungsintervall von 3 x 10 sek. Impuls.

Nach der DNA-Fragmentierung konnte das geklärte Lysat für die Immunpräzipitation verwendet werden. Diese erfolgte mit Hilfe der „ANTI-FLAG[®] M2 Agarose“ von Sigma-Aldrich. Als Negativkontrolle dienten die HL60[mock] Zellen. Die Spuren 1 - 6 der Abb. 21 (a) zeigen den jeweiligen Input, die Überstände und das Eluat der HL60[HLXB9] und HL60[mock] Zellen im *Western Blot*. Im Überstand (Spur 3) ist kein HLXB9 Protein detektierbar, d.h. durch die Immunpräzipitation konnte HLXB9 vollständig präzipitiert werden. Zum Waschen der Agarosebeads wurde dem Waschpuffer hochmolares NaCl



Abb. 22: Visualisierung der *peak* Detektion im Bereich des *PTGER2* Promotors. Grafik modifiziert nach „Signalmap“. Dargestellt werden die jeweiligen *scaled log₂-ratios* und *peak scores* aus den ChIP Experimenten der HL60[HLXB9] sowie HL60[mock] Zellen. Rote Balken signalisieren einen *peak score* mit einer $FDR \leq 0,05$.

Die von NimbleGen berechneten FDR-Werte galten als Ausgangspunkt für die weiteren Analysen. Für jedes der drei ChIP-Replikate wurden die Promotorregionen ausgewählt, welche in der HLXB9 ChIP-Probe einen signifikanten *peak score* aufwiesen ($FDR \leq 0,05$), jedoch keine signifikante Anreicherung in der entsprechenden mock Kontrolle zeigten.

Anschließend wurden die Datensätze der drei ChIP-Replikate auf Überschneidungen überprüft. Das Venn-Diagramm in der Abb. 23 (a) zeigt die Anzahl der jeweils angereicherten Promotoren der Einzelerperimente, sowie deren Schnittmengen. In dem ChIP-Experiment Nr. 1 wurden 1279 Promotoren signifikant angereichert. In dem ChIP-Experiment Nr. 2 konnten 1648 Promotoren und in dem Experiment Nr. 3 728 Promotoren signifikant angereichert werden ($p \leq 0,05$). 660 Promotorregionen ließen sich in zwei von drei unabhängigen Experimenten detektieren. 114 Promotorregionen wurden in allen drei Experimenten detektiert. In den folgenden Analysen wurden die 660 Promotoren gewertet, welche in mindestens zwei ChIP Experimenten signifikant angereichert wurden.

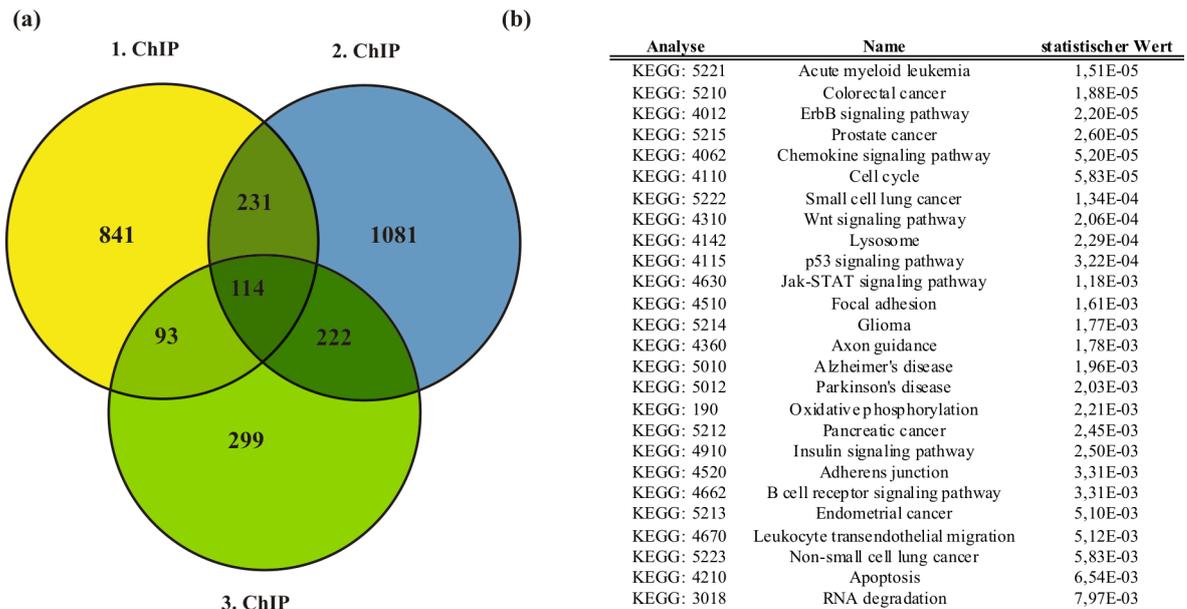


Abb. 23: Auswertung der ChIP-Analysen. (a) Venn-Diagramm der drei ChIP-Replikate. (b) KEGG-Signalweg Analyse von Genen, welche in mind. zwei ChIP-Experimenten eine Bindung von HLXB9 an den entsprechenden Promotor aufweisen. Dargestellt wird eine Auswahl an Signalwegen mit einem Signifikanzwert $p < 0,002$.

Eine Auswahl an signifikant angereicherten KEGG-Signalwegen und ihr Signifikanzwert sind in der Abb. 23 (b) wiedergegeben. Neben leukämierlevanten Signalwegen, wie z.B. *Wnt*-Signalweg und *Jak-Stat*-Signalweg sind Signalwege vertreten, welche Organe mit physiologischer *HLXB9* Expression betreffen. Das Auftreten dieser Signalwege bekräftigt, dass es sich bei den analysierten Promotorregionen um Ziel-Sequenzen von *HLXB9* handelt. Um die Frage zu klären, ob die Interaktion auch eine Veränderung der Genexpression der Ziel-Gene hervorruft, wurden Genexpressions-Analysen mit Hilfe von Affymetrix Arrays durchgeführt. Mit Hilfe der Arrayanalyse war es des Weiteren möglich, sekundäre und tertiäre Effekte der *HLXB9* Expression zu beschreiben und einen Einblick in das durch *HLXB9* veränderte Genexpressionsprofil zu erhalten.

4.2.3 Auswirkung von *HLXB9* auf die Genexpression (Affymetrix-Arrays)

Für die Genexpressions-Arrays wurde das bereits beschriebene HL60 Zellsystem verwendet. Die Integrität der RNA wurde vorher im Agarosegel überprüft (Abb. 24 (a)). Die Abb. 24 (b) zeigt die Expression von *HLXB9* in den transfizierten Zellen. Die Array-Analyse fand in biologischen Triplikaten statt.

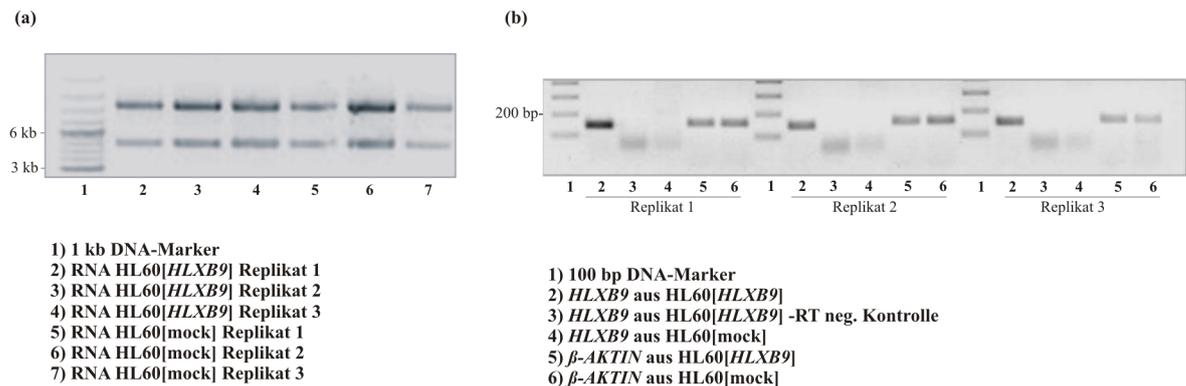


Abb. 24: Qualitätskontrollen der für die Affymetrix-Arrays verwendeten Ausgangs-RNA. (a) Gelelektrophoretische Auftrennung der RNA von drei Replikaten im Agarosegel. Die zwei sichtbaren Banden entsprechen der 18S und 28S rRNA. (b) Nachweis der *HLXB9* Expression in den drei Replikaten. Dargestellt wird die gelelektrophoretische Auftrennung einer PCR für *HLXB9*. Als Negativkontrolle für genomische DNA-Kontamination dient die -RT-PCR. β -*AKTIN* dient zur Kontrolle der cDNA Integrität.

Die Heatmap der Abb. 25 zeigt 61 der differentiell regulierten Gene mit dem kleinsten p-Wert. Gene, welche in den *HLXB9* pos. Zellen im Gegensatz zu den Kontrollzellen geringer exprimiert werden, sind grün dargestellt. Gene, die stärker reguliert werden, sind rot markiert.

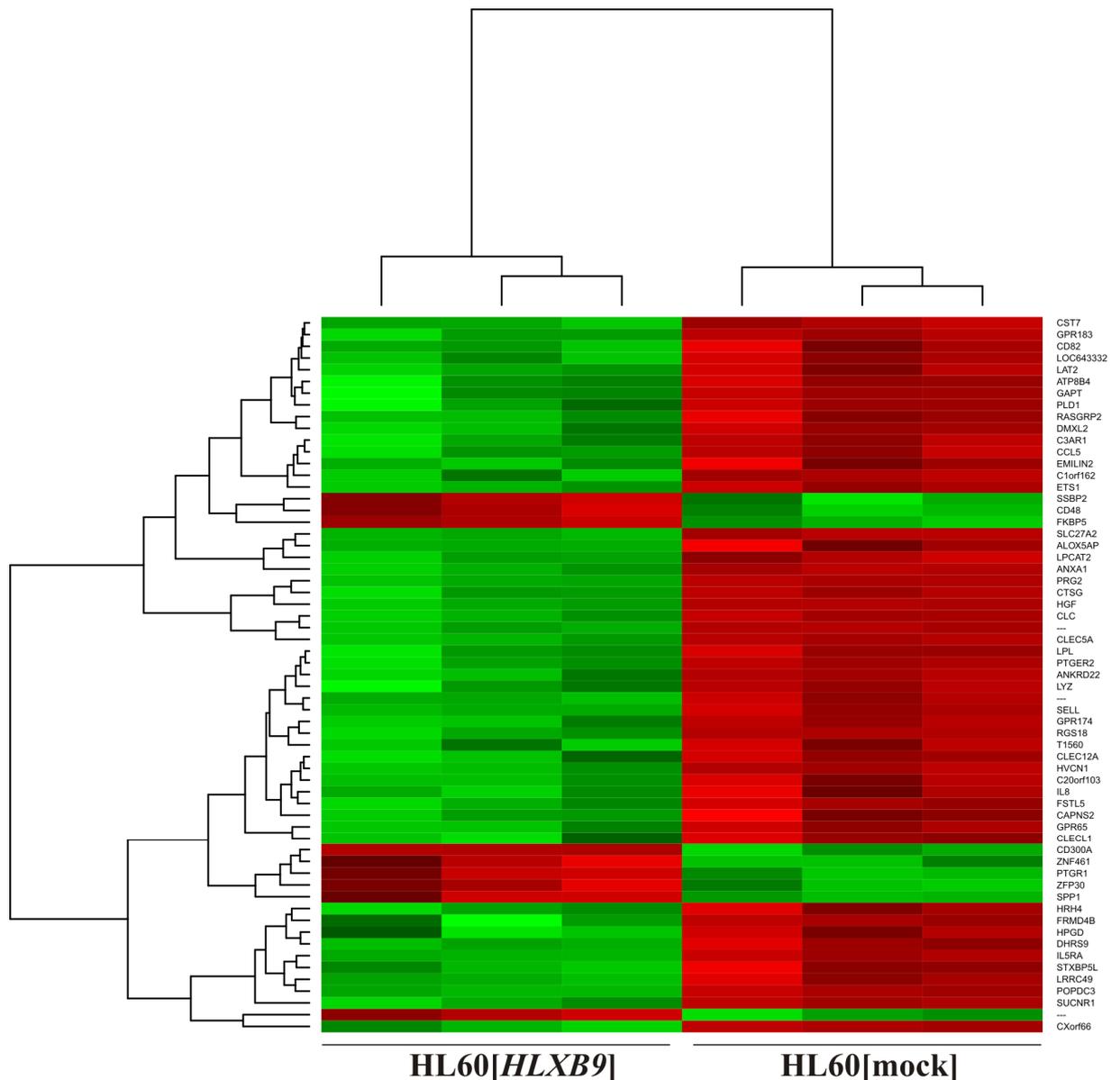


Abb. 25: Heatmap der signifikant differentiell regulierten Gene der Analyse „HL60[HLXB9] vs HL60[mock]“. Die Heatmap umfasst 61 Gene, die sich signifikant ($p \leq 0,05$) zwischen HL60[HLXB9] und HL60[mock] unterscheiden. Grün repräsentiert in HL60[HLXB9] geringere exprimierte Gene, rot entsprechend verstärkt exprimierte Gene.

Insgesamt lassen sich bei der Analyse 81 signifikant differentiell regulierte Gene identifizieren. In der Tab. 3 sind die betroffenen Gene mit ihrem entsprechenden p-Wert und „ $\log_2 \text{foldchange}$ “ aufgelistet.

Tab. 3: Genliste der 81 Gene, welche sich signifikant ($p \leq 0,05$) zwischen HL60[*HLXB9*] und HL60[*mock*] Zellen unterscheiden. In HL60[*HLXB9*] Zellen geringer exprimierte Gene sind in grün dargestellt, verstärkt regulierte Gene in rot.

Signifikanz	"foldchange" (log)	Symbol	Chromosom	Signifikanz	"foldchange" (log)	Symbol	Chromosom
5,70E-05	-3,82	PRG2	chr11	1,10E-02	1,02	CD300A	chr17
5,70E-05	-4,88	CLEC5A	chr7	1,20E-02	-1,18	DMXL2	chr15
5,70E-05	-4,19	HGF	chr7	1,20E-02	-1,19	RASGRP2	chr11
3,40E-04	-2,90	ANXA1	chr9	1,20E-02	-1,45	ATP8B4	chr15
3,40E-04	-3,38	CLC	chr19	1,20E-02	-1,61	PLD1	chr3
3,40E-04	-2,64	SELL	chr1	1,20E-02	-1,25	ALOX5AP	chr13
3,40E-04	-3,41	SUCNR1	chr3	1,30E-02	-1,17	CD82	chr11
3,40E-04	-2,86	RGS18	chr1	1,50E-02	-1,53	CLECL1	chr12
4,50E-04	-3,16	CTSG	chr14	1,50E-02	1,24	ZFP30	chr19
6,40E-04	-1,86	IL5RA	chr3	1,60E-02	-1,22	CLEC12A	chr12
1,30E-03	-2,56	GPR174	chrX	1,80E-02	-1,17	GAPT	chr5
1,30E-03	-2,29	PTGER2	chr14	1,80E-02	1,14	SSBP2	chr5
1,80E-03	-2,36	ANKRD22	chr10	2,10E-02	0,88	FKBP5	chr6
3,20E-03	-1,56	ETS1	chr11	2,10E-02	1,23	ZNF461	chr19
3,70E-03	-1,80	GPR65	chr14	2,70E-02	-0,91	LAT2	chr7
4,10E-03	-1,74	CCL5	chr17	2,80E-02	-1,14	CAPNS2	chr16
4,10E-03	-2,21	LPL	chr8	2,90E-02	-1,22	HPGD	chr4
4,10E-03	-1,44	CXorf66	chrX	3,30E-02	1,00	ZNF83	chr19
4,50E-03	-1,33	HVCN1	chr12	3,30E-02	-0,96	FRY	chr13
4,90E-03	-1,87	C3AR1	chr12	3,50E-02	0,80	IGLL3	chr22
4,90E-03	-1,24	CST7	chr20	3,50E-02	-0,82	C1orf186	chr1
5,10E-03	1,70	CD48	chr1	4,00E-02	-0,82	ZYX	chr7
5,10E-03	1,75	PTGR1	chr9	4,20E-02	-1,08	SEPT1	chr16
5,20E-03	-1,49	FSTL5	chr4	4,20E-02	0,96	ARHGAP5	chr14
5,20E-03	-1,97	HRH4	chr18	4,40E-02	-1,48	LUM	chr12
5,20E-03	-2,08	STXBPL	chr3	4,40E-02	-0,76	RNASE3	chr14
5,40E-03	-1,25	GPR183	chr13	4,50E-02	-1,90	RAB27B	chr18
5,50E-03	-1,31	LRRC49	chr15	4,60E-02	1,16	F13A1	chr6
5,50E-03	-2,07	T1560	chr8	4,60E-02	-1,04	RET	chr10
5,70E-03	1,61	SPPI	chr4	4,60E-02	-0,79	SLC43A3	chr11
5,70E-03	-1,37	LOC643332	chr14	4,70E-02	1,11	DDIT4	chr10
5,70E-03	-1,23	LPCAT2	chr16	4,70E-02	1,04	ZNF558	chr19
5,70E-03	-2,04	LYZ	chr12	4,70E-02	0,94	OAS1	chr12
5,70E-03	-1,09	POPDC3	chr6	4,70E-02	1,21	C3orf59	chr3
5,70E-03	-1,27	DHRS9	chr2	4,70E-02	-0,77	MAGEB2	chrX
6,50E-03	-1,36	C20orf103	chr20	4,80E-02	-0,72	LMAN2	chr5
6,50E-03	-1,28	C1orf162	chr1	4,80E-02	-1,04	TLE4	chr9
6,70E-03	-1,03	SLC27A2	chr15	4,80E-02	1,07	ZNF429	chr19
8,80E-03	-1,76	IL8	chr4	4,80E-02	-1,05	RAB31	chr18
9,40E-03	-1,51	EMILIN2	chr18	4,80E-02	0,92	GJC1	chr17
9,40E-03	-2,02	FRMD4B	chr3				

Die Tab. 3 und die Abb. 25 verdeutlichen, dass der Großteil der differentiell regulierten Gene (78%) durch die Expression von *HLXB9* reprimiert werden, d.h. *HLXB9* wirkt als transkriptioneller Repressor. Die drei Gene *PRG2*, *CLEC5A* und *HGF* weisen sowohl den

niedrigsten p-Wert, als auch den höchsten „*foldchange*“ auf. Um einen Überblick über veränderte Signalwege und GO-Terms zu bekommen, wurde eine EGAN-Analyse durchgeführt. In der Abb. 26 (a) ist eine Netzwerkvisualisierung ausgewählter Signalwege und GO-Terms aus der Abb. 26 (b) dargestellt. Diese zeigt eine Auswahl an KEGG-Signalwegen und GO-Terms mit ihren Signifikanzwerten. Zum Vergleich sind zusätzlich die Signifikanzwerte des Vergleichs der AML-Patienten „t(7;12) vs CD34+“ angegeben. Die Signalwege und GO-Terms, die im weiteren Sinne die Zell-Interaktion und Zelladhäsion betreffen, sind sowohl im Zell-System als auch in den Patientenzellen signifikant angereichert.

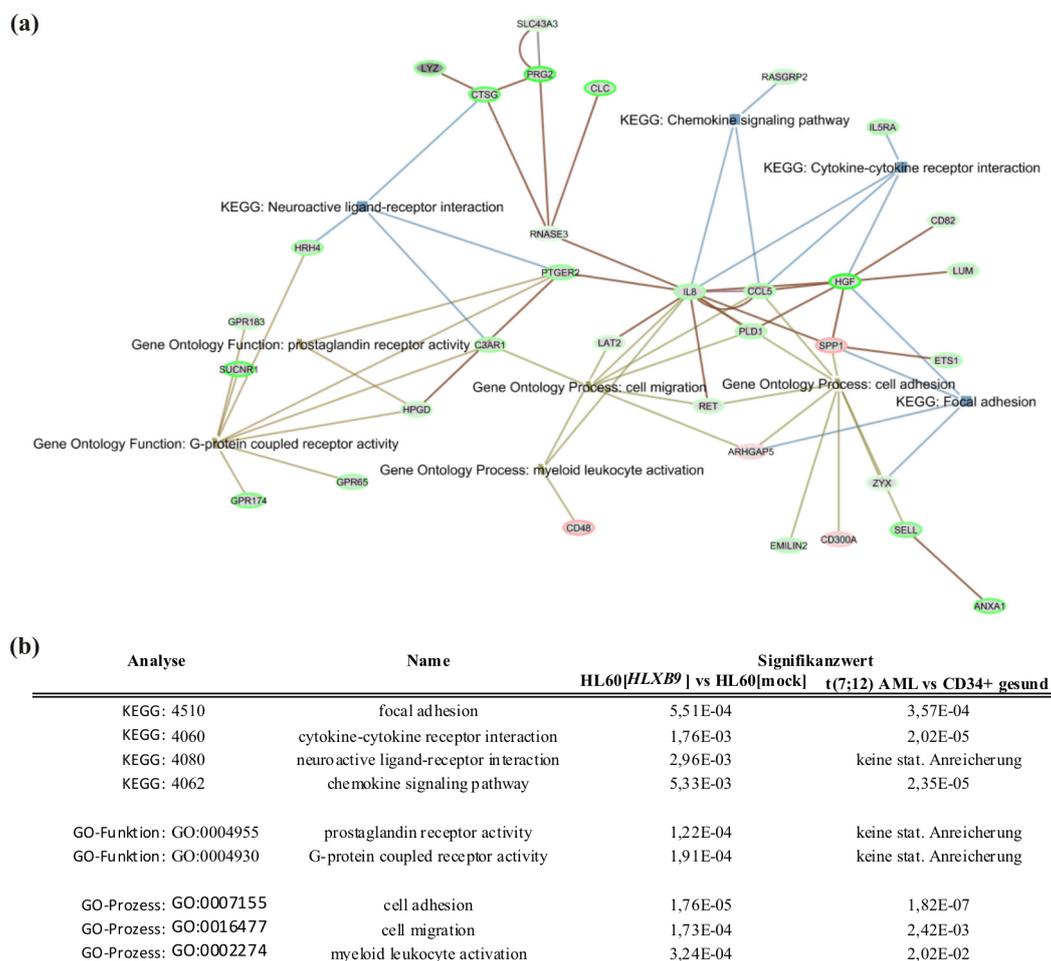


Abb. 26: KEGG-Signalweg und GO-Term Analyse differenziell regulierter Gene HL60[HLXB9] vs HL60[mock]. (a) EGAN Netzwerk-Visualisierung mit aus (b) ausgewählten KEGG-Signalwegen und GO-Terms. In HL60[HLXB9] herunter regulierte Gene sind grün umrandet dargestellt, herauf regulierte Gene in rot. **(b)** Die Tabelle der EGAN Analyse enthält eine Auswahl an signifikant angereicherten KEGG-Signalwegen und GO-Terms mit einem Signifikanzwert $\leq 0,05$. Zusätzlich sind die Signifikanzwerte der Analyse „t(7;12) vs CD34+“ dargestellt.

Neben der Identifizierung von veränderten Signalwegen und GO-Terms in *HLXB9*-exprimierenden Zellen, diente die Expressionsarray-Analyse auch dem Vergleich der 81 signifikant regulierten Gene mit den 660 Ziel-Genen der unter 4.2.2 beschriebenen ChIP-on-Chip Analyse. Es konnten vier Ziel-Gene identifiziert werden, welche sowohl eine signifikante Bindung von *HLXB9* an die entsprechende Promotorregion, als auch ein signifikant verändertes Expressionsverhalten aufweisen. Das Venn-Diagramm der Abb. 27 zeigt die Überschneidung der Ergebnisse der drei ChIP-on-Chip Replikate mit den 81 differentiell regulierten Genen der Expressions-Analyse. Bei den Genen *PTGER2*, *IL8*, *ZYXIN* und *ETS1* wurde in zwei von drei ChIP-on-Chip Experimenten eine Bindung von *HLXB9* an den entsprechenden Promotor detektiert. Zusätzlich zeigen diese vier Gene in den HL60[*HLXB9*] Zellen eine signifikant verminderte Expression. Die in der ChIP-on-Chip Analyse detektierten Promotor-Sequenzen sind im Anhang 7.2.3 wiedergegeben.

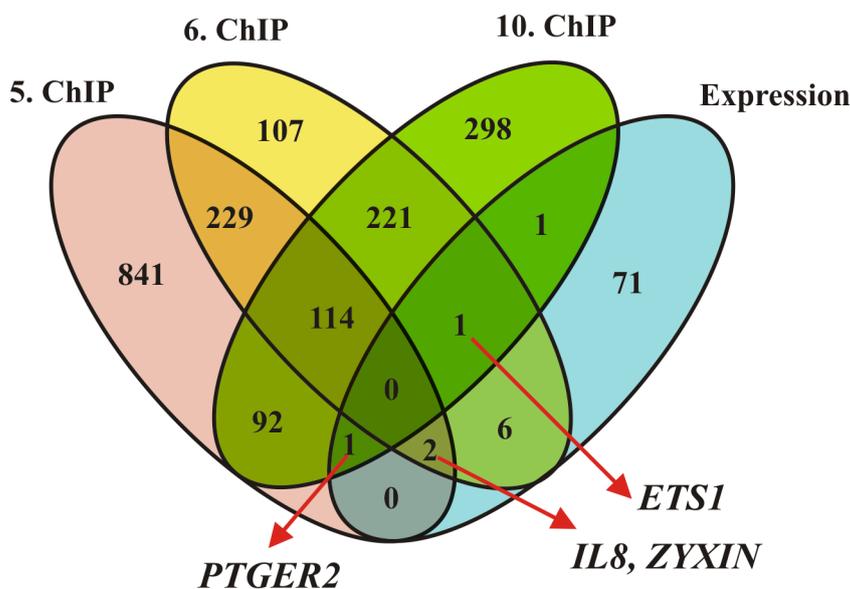


Abb. 27: Venn-Diagramm der drei ChIP-Replikate sowie der Expressions-Analyse. Dargestellt werden vier Ziel-Gene, welche in mind. zwei ChIP-Replikaten eine signifikante Anreicherung, sowie in der Expressions-Analyse ein signifikant verändertes Regulationsverhalten (vgl. Tab. 3) zeigen.

In den folgenden Experimenten wurden diese vier Ziel-Gene mittels qRT-PCR und *Western Blot* Analyse auf ihre Validität überprüft. Des Weiteren wurden ausgesuchte Ziel-Gene mittels qRT-PCR in den t(7;12) pos. Patientenzellen getestet (vgl. Abschnitt 4.2.4.3), sowie in *HLXB9* exprimierenden murinen Stammzellen (vgl. Abschnitt 4.3.3).

4.2.4 Validierung von Ziel-Genen mittels qRT-PCR und *Western Blot*

4.2.4.1 Validierung der differentiellen Genexpression

Die Ziel-Gene wurden mittels qRT-PCR und *Western Blot* Analyse auf ihr verändertes Expressionsverhalten überprüft. Die Primer für die qRT-PCR lagen jeweils über einer Exon-Exon Grenze, um die Detektion von genomischer DNA auszuschließen. Die PCRs wurden an denselben Proben durchgeführt, welche für die Expressionsarray-Analyse verwendet wurden. Für die *Western Blot* Analysen wurde Gesamt-Proteinextrakt verwendet. Die Proteinexpression von HLXB9 in den verwendeten Zellen ist in der Abb. 28 (a) dargestellt. Die Abb. 28 (b) zeigt die Ergebnisse der qRT-PCR und des *Western Blots* für die vier Ziel-Gene *PTGER2*, *IL8*, *ZYXIN* und *ETS1*. Bei allen vier Genen lässt sich eine signifikant verminderte Genexpression in den *HLXB9* exprimierenden Zellen erkennen. Zusätzlich zeigt der *Western Blot* für *PTGER2* und *ZYXIN* eine geringere Proteinexpression. *IL8* konnte im *Western Blot* nicht detektiert werden. Ausschlaggebend ist wahrscheinlich die geringe Größe bzw. die Sekretion des Zytokins ins Medium. Für *ETS1* lässt sich keine Verminderung der Proteinexpression feststellen.

In der Abb. 28 (c) ist das Ergebnis der qRT-PCR für *PIK3CG* und *PROK2* dargestellt. Diese beiden Gene werden unabhängig von den vier vorherigen Ziel-Genen betrachtet, da sie zwar eine signifikante Bindung von *HLXB9* an den entsprechenden Promotorbereich zeigen, jedoch in der Expressions-Array Analyse mit einem p-Wert größer 0,05 detektiert wurden. In der qRT-PCR werden beide Gene signifikant differentiell reguliert. *PIK3CG* wird, wie die vier anderen Ziel-Gene, ebenfalls vermindert exprimiert und zeigt eine geringere Proteinexpression in den *HLXB9*-pos. Zellen. *PIK3CG* ist von besonderem Interesse, da es auch in den Array-Analysen der t(7;12) pos. Patientenzellen signifikant vermindert exprimiert wird (p = 0,03 im Vergleich zu CD34+ Zellen; p = 0,006 im Vergleich zu t(9;11) pos. Zellen).

PROK2 wurde in die Validierung mit aufgenommen, da es sich um eines der wenigen Ziel-Gene handelt, welche in den *HLXB9* pos. Zellen verstärkt exprimiert werden.

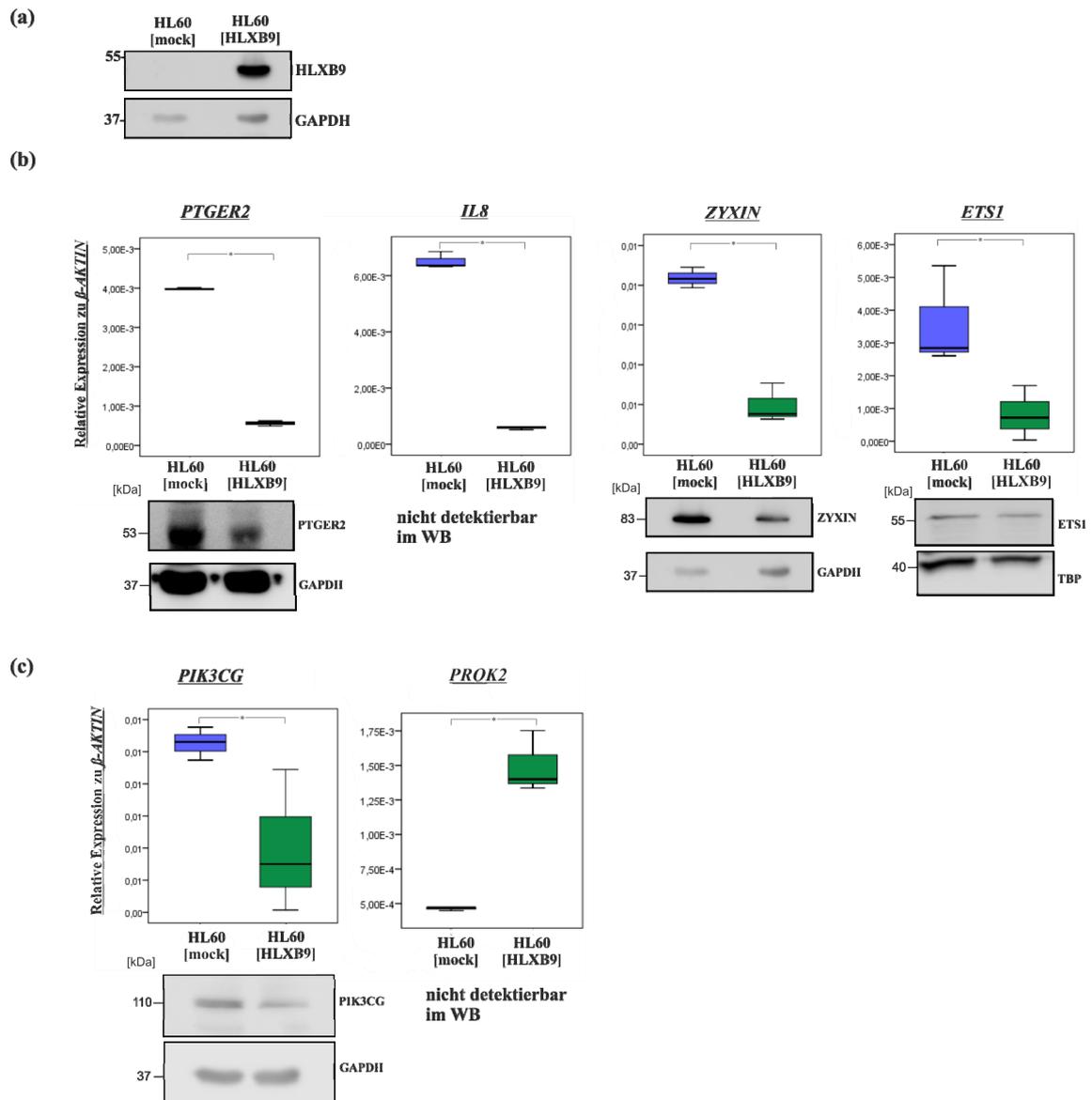


Abb. 28: Validierung des veränderten Gen- und Protein-Expressionsprofils der Ziel-Gene. (a) Protein-Expression von HLXB9 in HL60[HLXB9] Zellen im *Western Blot*. **(b)** SYBR[®]Green RT-PCR für die vier Ziel-Gene *PTGER2*, *IL8*, *ZYXIN* und *ETS1* an cDNA aus HL60[mock] und HL60[HLXB9] Zellen. Die Werte wurden zu β -AKTIN normalisiert. Gesamt-Proteinlysate von HL60[HLXB9] und HL60[mock] Zellen wurden im *Western Blot* mit den für die Ziel-Proteine entsprechenden Antikörpern detektiert (vgl. 7.1.8 für verwendete Antikörper). GAPDH und TBP dienen als Ladekontrollen. **(c)** SYBR[®]Green RT-PCR und *Western Blot* für PIK3CG und PROK2. * Mann-Whitney-U Test zur Signifikanzberechnung: $p \leq 0,05$.

4.2.4.2 Validierung der Promotor-Bindung

Die signifikante Anreicherung der in den Array-Analysen detektierten Promotorregionen der vier Ziel-Gene wurde mittels qRT-PCR überprüft (Abb. 29). Die Chromosomen-Lokalisation der angereicherten Sequenzen ist unter dem jeweiligen Box-Plot der Abb. 29 angegeben. Die für die PCR verwendeten Primer liegen innerhalb dieses Bereiches (Primersequenz siehe Anhang 7.1.6). Als Matrize wurde die DNA der immunpräzipitierten und amplifizierten Proben verwendet, sowie gleiche Konzentrationen des jeweiligen Inputs. In den immunpräzipitierten Proben der HL60[*HLXB9*] Zellen ist eine Anreicherung der Promotorsequenzen der vier Ziel-Gene detektierbar. Für *PTGER2* und *IL8* ist diese Anreicherung signifikant ($p \leq 0,05$), für *ETS1* und *ZYXIN* nur tendenziell zu beobachten. Die PCR für *Myoglobin* (Exon 2) dient als Negativkontrolle. Es ist kein Unterschied in der Anreicherung zu erkennen.

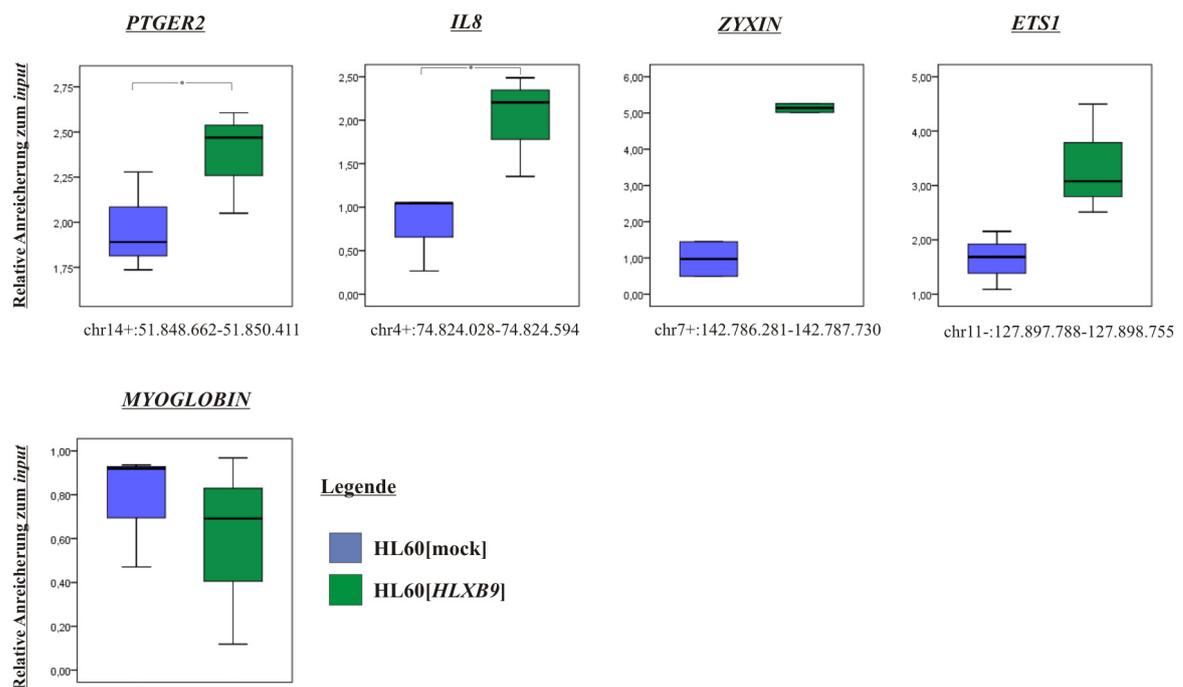


Abb. 29: Validierung der Bindung von HLXB9 an die Promotoren von *PTGER2*, *IL8*, *ZYXIN* und *ETS1* mittels SYBR[®]Green qRT-PCR. Als Matrize wurde die DNA der ChIP-on-Chip Proben verwendet. Die Varianz ergibt sich aus drei biologischen Replikaten (Ausnahme: für *ZYXIN* konnten nur zwei Replikate analysiert werden). Unter den jeweiligen Box-Plots ist die Chromosomenlokalisierung der angereicherten Sequenzen angegeben (hg18). Die Primer von *Myoglobin* binden im Exon 2 und dienen als Negativkontrolle. *Mann-Whitney-U Test zur Signifikanzberechnung: $p \leq 0,05$.

4.2.4.3 Validierung von Ziel-Genen in t(7;12) pos. Patientenzellen

An die Identifizierung und Validierung der Ziel-Gene von HLXB9 im Zell-System schließt sich die Frage an, ob die Ziel-Gene auch in t(7;12) pos. Patientenzellen differentiell reguliert werden. Aufgrund des limitierten Patientenmaterials wurden nur die Gene *PTGER2*, *PIK3CG* und *ZYXIN* überprüft, da diese bereits in der Arrayanalyse eine verminderte Expression in den t(7;12) pos. Patientenzellen zeigten. Für *PTGER2* und *PIK3CG* konnte mittels qRT-PCR die reduzierte Expression bestätigt werden. Für *ZYXIN* ergab sich kein unterschiedliches Expressionsverhalten (Abb. 30).

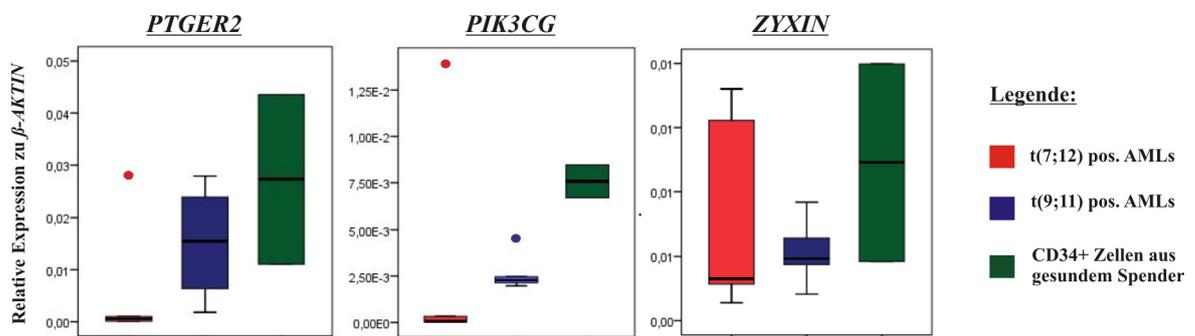


Abb. 30: Vergleichende Genexpression von Ziel-Genen in t(7;12) und t(9;11) pos. Patientenzellen, sowie CD34+ Kontrollproben. SYBR[®]Green qRT-PCR für *PTGER2*, *PIK3CG* und *ZYXIN* in t(7;12) pos. Patientenmaterial (n=5), t(9;11) pos. Patientenmaterial (n=5) und zwei Proben von gesundem CD34+ Spendermaterial. Die Werte wurden zu β -AKTIN normalisiert.

4.2.5 Bedeutung der HLXB9-Homöobox für die Regulation der Genexpression

Für einige bekannte Homöo-Proteine ist gezeigt worden, dass die Homöodomäne drei strukturelle Helices bildet und der DNA-Erkennung dient. Besonders die dritte Helix ist an der Interaktion mit der DNA beteiligt. Für viele Vertreter gilt die Basenabfolge 5'ATTA'3 als DNA-Erkennungsmotiv (Gehring *et al.*, 1994). Da für HLXB9 die Homöodomäne noch nicht als experimentell DNA-bindende Domäne beschrieben ist, wurde eine *HLXB9*-Deletionsmutante generiert, bei der die Homöobox z.T. deletiert vorliegt. Diese Mutante sollte auf ihre Fähigkeit, die vier identifizierten Ziel-Gene zu regulieren, überprüft werden.

Die Abb. 31 (a) zeigt schematisch die Struktur von HLXB9 mit den drei Helices der Homöodomäne. Die betroffene Nukleotidsequenz ist unter der Homöodomäne angegeben.

Die für die Helices 2 und 3 codierenden Nukleotide wurden mit Hilfe einer *overlap extension PCR* deletiert (vgl. Abschnitt 3.3.1.4). Die mutierte cDNA *HLXB9(Del1)* wurde in den Überexpressionsvektor pMC kloniert (Abb. 31 (b)) und dieser stabil in das Genom der HL60 Zellen integriert. Die Abb. 31 (c) zeigt die validierte Sequenz der deletierten Homöobox. Die komplette Sequenz der *HLXB9(Del1)* cDNA findet sich im Anhang unter 7.2.

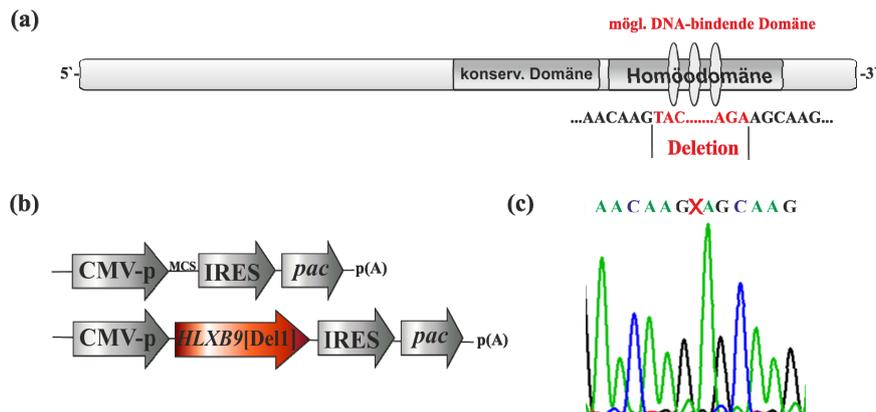


Abb. 31: Deletion der potentiellen DNA-bindenden Domäne von HLXB9. (a) Schematische Darstellung von HLXB9. Die deletierten Nukleotide sind rot markiert. (b) Darstellung des Überexpressionsvektors pMC. In die MCS wurde die cDNA des *HLXB9(Del1)* kloniert. (c) Ausschnitt der Sequenzierung von *HLXB9(Del1)*.

Die Abb. 32 zeigt eine *Western Blot* Analyse von Gesamtprotein Zell-Lysaten der HL60[*HLXB9(Del1)*] und HL60[*HLXB9*] Zellen. Das Protein *HLXB9(Del1)* besteht aus 376 Aminosäuren und ist ~37 kDa schwer und somit ~4 kDa leichter als das Wildtyp *HLXB9*. Wie auch das Wildtyp *HLXB9* läuft die Deletionsmutante im SDS-Gel höher, als es der Massenstandard vermuten lässt. Dieses lässt sich vermutlich, wie auch für das Wildtyp-*HLXB9*, mit posttranskriptionellen Modifikationen begründen.

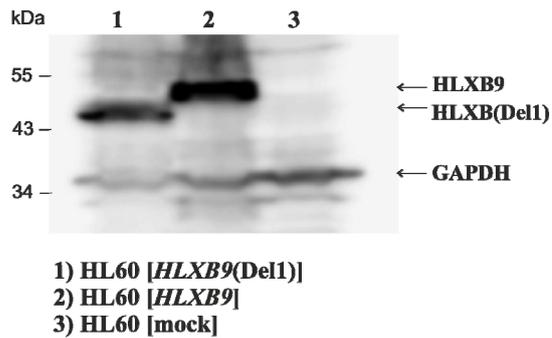


Abb. 32: Protein-Expression von HLXB9(Del1) in HL60[*HLXB9(Del1)*] Zellen. Nachweis der Protein-Expression von HLXB9(Del1) aus Gesamt-Protein Zell-Lysaten im *Western Blot*. Für die Detektion wurde ein anti-FLAG-HRP gekoppelter Antikörper verwendet. GAPDH (Antikörper: anti-GAPDH//anti-Maus-HRP) dient als Ladekontrolle.

Im Folgenden wurden die HL60[*HLXB9(Del1)*] Zellen dazu verwendet, die Genexpression der validierten Ziel-Gene mittels qRT-PCR zu überprüfen. Wenn es sich bei der Homöodomäne um die DNA-bindende Domäne handelt, würde dies zu einem Funktionsverlust der Regulation der Ziel-Gene führen und die Expression der Ziel-Gene wäre ähnlich denen der Kontrollzellen ohne *HLXB9* Expression. Dieses ist für das Ziel-Gen *PTGER2* zu beobachten (Abb. 33). Die Expression von *PTGER2* ist in den Kontrollzellen HL60[mock] und in den Zellen der Deletionsmutante ähnlich und unterscheidet sich in beiden Fällen signifikant von der Expression in den HL60[*HLXB9*] Zellen. Die typische Erkennungssequenz ATTA (bzw. TAAT für den Gegenstrang) ist in der Promotor-Region von *PTGER2* mehrfach enthalten (vgl. Anhang 7.2.3). Für die Ziel-Gene *IL8*, *ETS1*, *ZYXIN* und *PROK2* ist der gegenteilige Effekt zu beobachten. Die Expression der Ziel-Gene ähnelt der Expression der HL60[*HLXB9*] Zellen und unterscheidet sich signifikant zu der Expression der HL60[mock] Zellen. Die Funktionalität von HLXB9 bezüglich der DNA-Interaktion bleibt also trotz der Deletion der Homöobox erhalten und lässt weitere DNA-bindende Domänen vermuten. Zusätzliche DNA-bindende Domänen sind auch für andere Homöobox-Gene beschrieben (vgl. Abschnitt 1.4.3). Für die Expression von *PIK3CG* in den HL60[*HLXB9(Del1)*] ist keine eindeutige Aussage möglich.

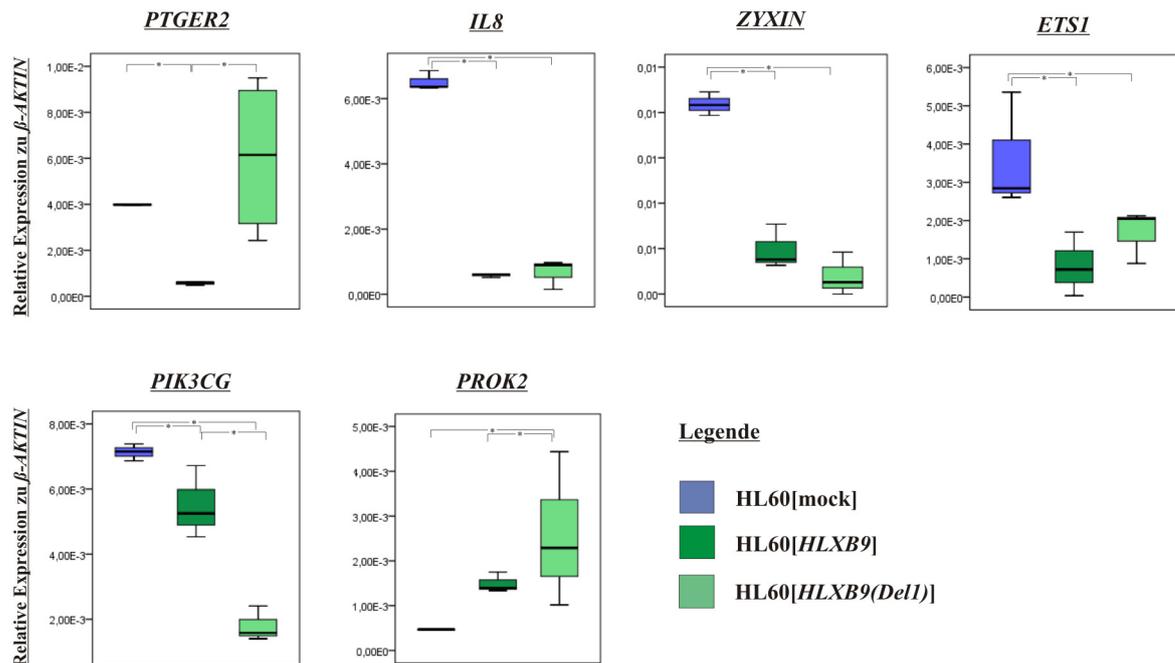


Abb. 33: Expression ausgewählter Ziel-Gene in HL60[HLXB9(Del1)] Zellen mittels qRT-PCR. SYBR[®]Green qRT-PCR für *PTGER2*, *IL8*, *ZYXIN*, *PIK3CG* und *PROK2* an cDNA aus HL60[mock], HL60[HLXB9] und HL60[HLXB9(Del1)] Zellen. Die Werte wurden zu β -AKTIN normalisiert. * Mann-Whitney-U Test zur Signifikanzberechnung: $p \leq 0,05$.

4.2.6 Auswirkung von HLXB9 auf die ATRA-induzierte Expression myeloischer Antigene

Während vielen Vertretern der Homöobox-Genfamilie eine elementare Rolle in der hämatopoetischen Zelldifferenzierung zukommt (z.B. *HOX*-Gene), ist eine Beteiligung von HLXB9 an der adulten Hämatopoese unbekannt. Physiologisch ist HLXB9 an der Differenzierung von β -Zellen während der dorsalen Entwicklung des Pankreas und an der Differenzierung von Motor-Neuronen beteiligt (Arber *et al.*, 1999; Harrison *et al.*, 1999). Um einen möglichen Einfluss von HLXB9 auf die hämatopoetische Differenzierung zu untersuchen, stand das bereits beschriebene HL60 Zellsystem zur Verfügung. Durch die Zugabe von ATRA kann die myeloische Differenzierung von HL60 Zellen induziert werden, wobei die zugrunde liegende Molekularbiologie der induzierten Differenzierung weitestgehend unbekannt ist. Therapeutisch wird die ATRA-induzierte Differenzierung bei Patienten mit APL und einem Fusionstranskript *PML-RAR α* angewandt (vgl. Abschnitt 1.2). Während bei Patienten mit APL eine komplette Differenzierung der Blasten zu

beobachtet ist, kann bei immortalisierten Zell-Linien nur eine Teil-Differenzierung in Richtung myeloischer Differenzierung erreicht werden, welche durch eine veränderte Expression von Oberflächenantigenen charakterisiert ist. Zu den Oberflächenantigenen, welche nach der Induktion von HL60 Zellen mit ATRA verstärkt exprimiert werden, gehören CD36, CD38, CD43, CD45, CD45RO, CD11b, CD11c, CD53, CD54, CD66c, CD64 und CD53. Eine reduzierte Expression findet sich bei den Antigenen CD95, CD117, CD29 und CD44 (Barber *et al.*, 2008).

In dieser Studie wurde zunächst die veränderte Expression von CD11b als typisches Antigen für die myeloische Differenzierung untersucht. Neben der charakteristischen Expression auf Myelozyten und reifen Granulozyten, wird CD11b auch als Adhäsionsmarker beschrieben und war aufgrund der Ergebnisse der bereits beschriebenen Expressionsstudien (Anreicherung von Zelladhäsions Signalwegen) von besonderem Interesse. Zusätzlich wird CD11b auch auf AML-Blasten exprimiert (Graf *et al.*, 2006). Die Abb. 34 zeigt eine Testreihe der ATRA-Induktion über 120 h. HL60[mock] und HL60[HLXB9] Zellen wurden mit 1 μ M ATRA induziert und die CD11b Expression zum entsprechenden Zeitpunkt im FACS analysiert. Die HL60[mock] Zellen erreichten nach 48 h eine CD11b Expression von ~6%, während sich die HL60[HLXB9] Zellen zu ~20% induzieren ließen. Zu späteren Zeitpunkten wurde eine nur minimal höhere, bzw. rückläufige CD11b Expression gemessen.

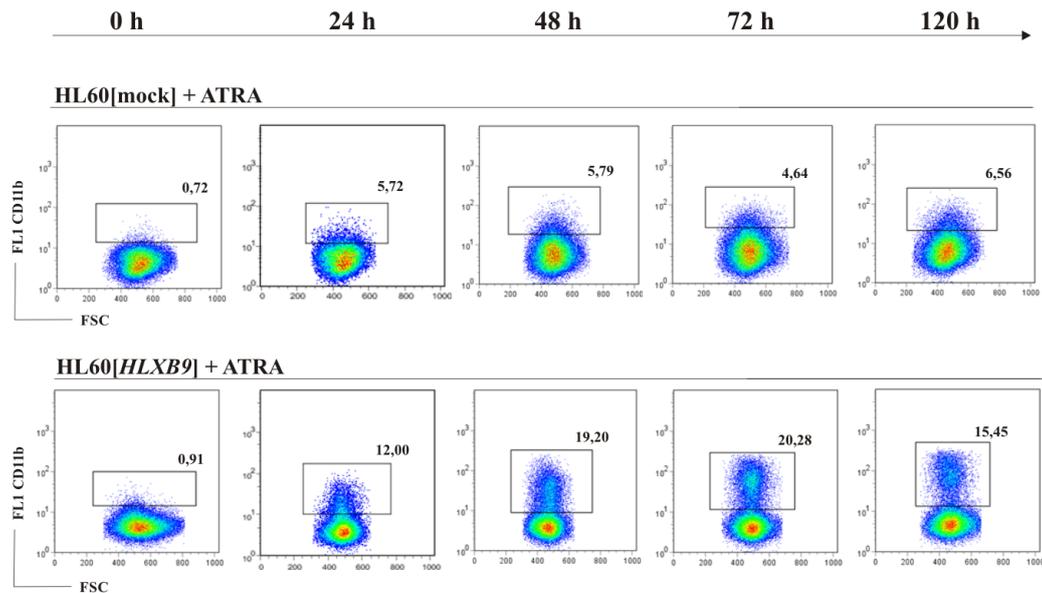
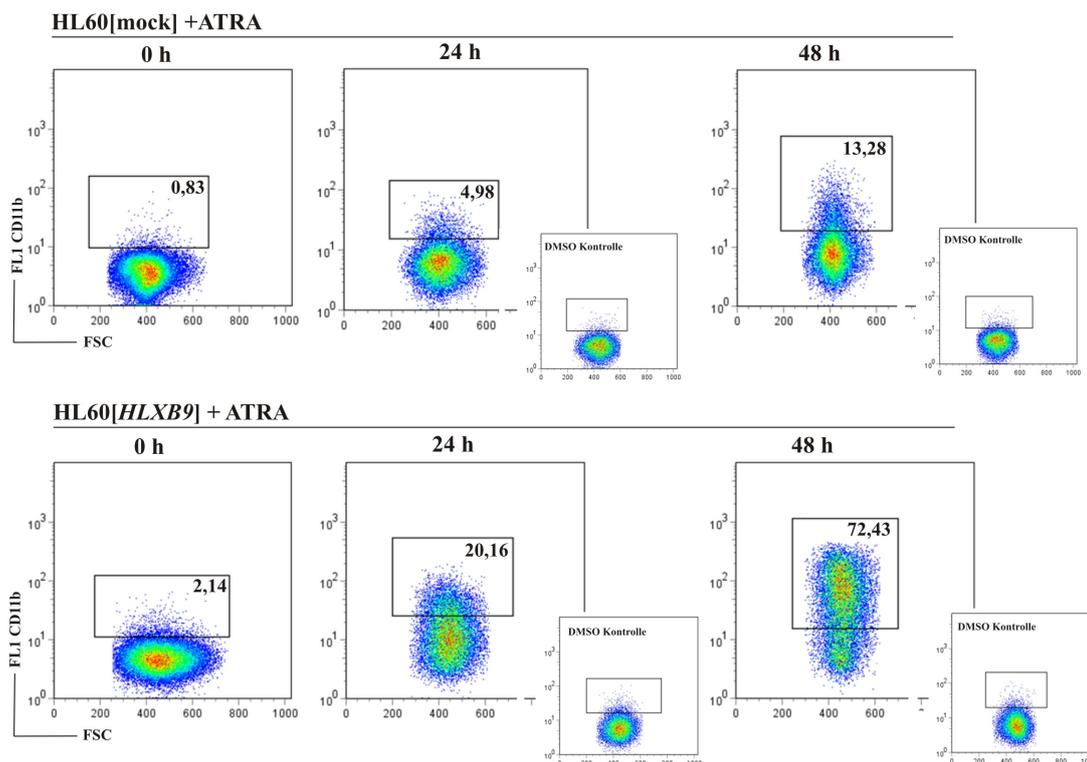


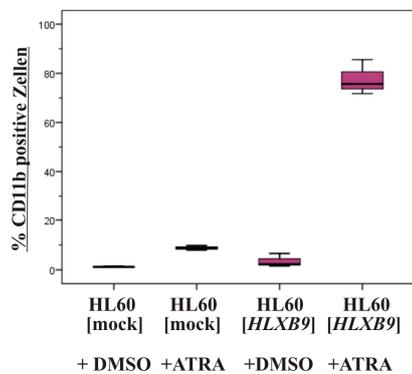
Abb. 34: Optimierung zur CD11b Induktion nach Zugabe von ATRA. HL60[mock] und HL60[HLXB9] Zellen wurden mit 1 μ M ATRA induziert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Induktion im FACS auf die Expression von CD11b (FITC) analysiert. Die jeweiligen Negativkontrollen, d.h. Induktion mit DMSO als Lösungsmittel, zeigten eine nicht messbare Induktion und sind hier nicht dargestellt. Die Grafik zeigt die Dot-Plot Darstellung unter Verwendung der FlowJo Software.

In weiteren Testreihen wurde die optimale ATRA-Konzentration bestimmt. Die höchste Induktion von CD11b konnte mit 20 μ M ATRA erreicht werden. Die Abb. 35 (a) zeigt die Auswertung der CD11b Expression mit 20 μ M ATRA nach 48 h. Die HL60[mock] Zellen zeigten eine Induktion bis auf \sim 13%, während sich die HL60[HLXB9] Zellen zu \sim 72% induzieren ließen. Zusätzlich sind die jeweiligen Negativkontrollen (parallele Induktion mit DMSO) angegeben, welche stets eine Induktion unter 1% zeigten. In der Abb. 35 (c) ist der Prozentsatz an CD11b positiven Zellen von drei unabhängigen Replikaten grafisch dargestellt. Die Abb. 35 (d) gibt die in der qRT-PCR gemessene Expression von *HLXB9* in den entsprechenden Zellen wieder.

(a)



(b)



(c)

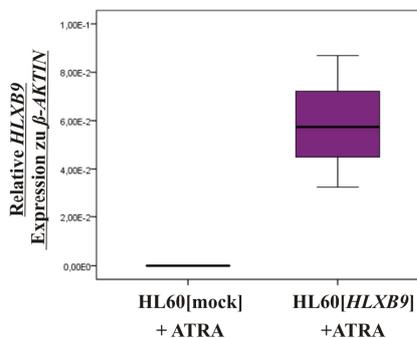


Abb. 35: CD11b Induktion nach Zugabe von ATRA. HL60[mock] und HL60[HLXB9] Zellen wurden mit 20 μ M ATRA induziert und im FACS auf die Expression von CD11b (FITC) analysiert. **(a)** Dot-Plot Darstellung der FlowJo Auswertung. **(b)** Das Box-Plot Diagramm zeigt die CD11b Expression der FACS-Analyse nach ATRA bzw. DMSO Induktion von drei Replikaten. **(c)** Ergebnis der SYBR[®]Green RT-PCR für HLXB9 in den verwendeten Replikaten. Die Werte wurden zu β -AKTIN normalisiert.

Neben CD11b wurde als weiterer Oberflächenmarker CD38 identifiziert, welcher nach ATRA-Induktion einen differentiellen Expressionsunterschied zwischen HL60[mock] und HL60[*HLXB9*] Zellen aufweist (Abb. 36). Die HL60[mock] Zellen werden bis auf 70% CD38 positiv induziert, während die HL60[*HLXB9*] Zellen sich zu ~94% induzieren lassen.

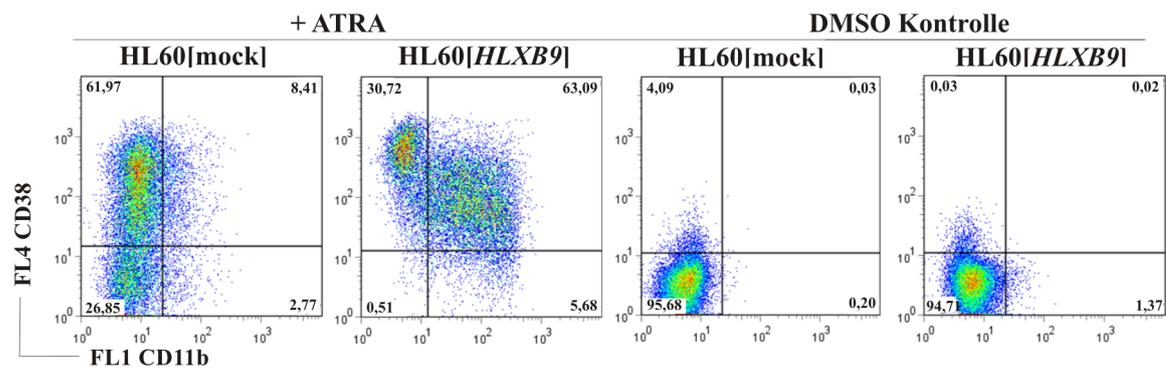


Abb. 36: CD38 Induktion nach Zugabe von ATRA. HL60[mock] und HL60[*HLXB9*] Zellen wurden mit 20 μ M ATRA induziert und im FACS auf die Expression von CD38 analysiert. Die Dot-Plot Darstellung zeigt auf der x-Achse die Expression von CD11b (FITC) und auf der y-Achse die Expression von (CD38-APC).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die HL60 Zellen mit *HLXB9* Expression nach ATRA-Induktion eine stärkere Protein-Expression der Oberflächenmarker CD11b und CD38 aufweisen, als Zellen ohne *HLXB9* Expression.

4.3 Expression von *HLXB9* in murinen *lineage (lin)* neg. Stammzellen

In dieser Arbeit wurden vier potenzielle Ziel-Gene in HL60 Zellen beschrieben, welche durch eine Bindung von *HLXB9* an den entsprechenden Promotor in ihrer Expression reprimiert werden. Zwei dieser Ziel-Gene, *PTGER2* und *ZYXIN* werden ebenfalls in Patientenzellen mit *HLXB9* Expression (t(7;12)-pos.) im Vergleich zu 11q23/*MLL*-pos. Patientenzellen und CD34⁺-gesunden Spenderzellen reprimiert. In den folgenden Experimenten sollten die Ziel-Gene in murinen Stammzellen nach *HLXB9* Transduktion analysiert werden. Neben der weiteren, spezies-übergreifenden Validierung der Ziel-Gene, sollten diese Experimente als Ausgangspunkt für weitere Analysen mit primären murinen Stammzellen dienen, welche nicht mehr Bestandteil dieser Arbeit waren.

4.3.1 *Lin* neg. Selektion von murinen Stammzellen

Als Stammzellpopulation für die Transduktion mit *HLXB9*-haltigem retroviralem Überstand wurden *lin* neg. Zellen verwendet. Die murinen Zellen wurden dafür wie unter 3.2.5 präpariert und mit einem Antikörpermix für *lin*-Marker und Biotin-gekoppelten *microbeads* selektioniert. Der Antikörpermix ist gegen *lin*-positive Antigene gerichtet und nach einer Negativselektion bleibt die unreife *lin* neg. Fraktion übrig. Die Abb. 37 zeigt die repräsentative Auswertung einer FACS-Analyse vor bzw. nach der *lin* neg. Selektion. Als Marker für unreife Stammzellen wurde das Stammzellantigen cKit verwendet. Vor der Selektion waren ~10% der Zellen cKit positiv. Nach erfolgreicher Selektion waren die unreifen Stammzellen angereichert und je nach Experiment konnten zwischen 70% und 85% cKit positive Zellen gemessen werden. Als Marker für reifere Zellen wurden die *lin* pos. Antigene CD11b (für Myelozyten), Gr (für Granulozyten) sowie CD19 (für B-Zell Vorläufer) analysiert. Die Selektion wurde als erfolgreich betrachtet, wenn: 1) mind. 70% der Zellen das Antigen cKit exprimierten und 2) der Anteil an *lin* pos. Markern (CD11b, Gr, CD19) unter 5% lag. Zusätzlich sind in der Abb. 37 die Protein-Expressionen der Marker CD3 und Sca1 dargestellt. CD3 wird als Expressionsmarker von T-Lymphozyten nicht auf den Knochenmarkszellen exprimiert. Das Stammzellantigen Sca1 wurde nach der Selektion auf ~3,5% der Zellen exprimiert. Eine weitere Anreicherung für Sca1 pos. Zellen (LSK-Population: *lin* neg. / Sca1 pos. / cKit pos.) wurde aufgrund der geringen Menge an murinen Zellen nicht vorgenommen.

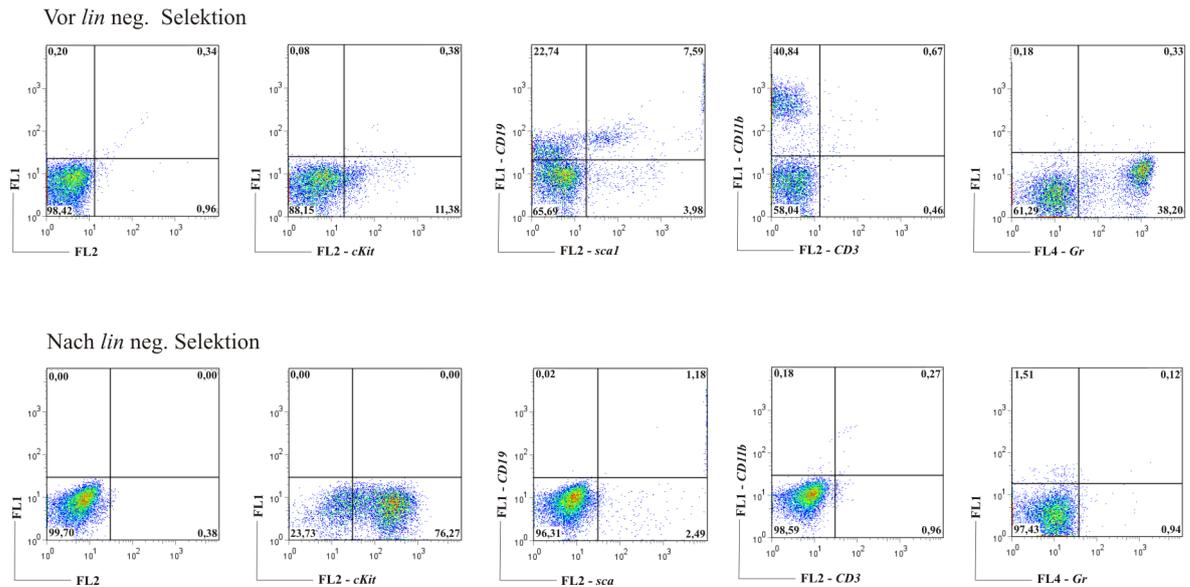


Abb. 37: *Lin* neg. Selektion von murinen Knochenmarkszellen. Dargestellt wird die unterschiedliche Expression von Differenzierungsmarkern vor und nach der *lin* neg. Selektion. Die Abbildung zeigt die FlowJo-Auswertung der FACS-Analyse. Marker: cKit-PE, Sca1-PE, CD19-FITC, CD11b-FITC, CD3-PE, Gr-APC.

Die *lin* neg. Stammzellen wurden im Folgenden mit einem pMSCV[*HLXB9*] Expressionsvektor transduziert. Dafür wurde in einem ersten Schritt die Expression des endogenen *Hlxb9* in murinen Stammzellen überprüft. Die RT-PCR in der Abb. 38 zeigt, dass keine endogene Expression von *Hlxb9* in murinen Stammzellen nachweisbar ist. Als Stammzell-Populationen wurden unreife *lin* neg. Zellen sowie heterogene Sca1 pos. Zellen verwendet. Als Positivkontrolle wurde Material aus dem murinen Gehirn verwendet. Die Beobachtung, dass *Hlxb9* nicht in murinen Stammzellen exprimiert wird, ist mit der fehlenden Expression von *HLXB9* in humanen CD34+ Knochenmarkszellen in Übereinstimmung (vgl. Abb. 8).

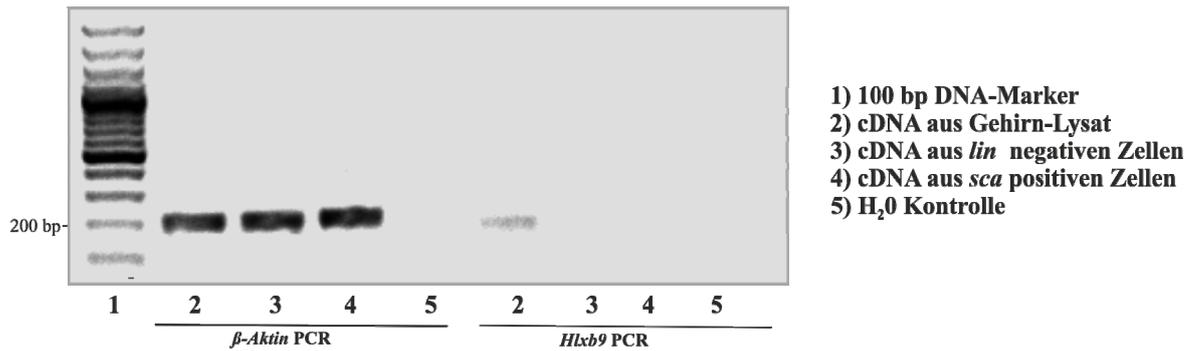


Abb. 38: Expression von *Hlxb9* in murinen hämatopoetischen Stammzellen. Gelelektrophoretische Auftrennung der RT-PCR für *Hlxb9* an cDNA aus *lin*- (Spur 3), sowie *Sca1*+ (Spur 4) selektionierten murinen Stammzellen. Lysat aus murinen neuronalen Zellen dient als Positivkontrolle (Spur 2). β -Aktin dient zur Kontrolle der cDNA Integrität. Die zu erwartenden PCR-Banden haben eine Größe von 203 bp für β -Aktin und 168 bp für *Hlxb9*.

4.3.2 Gamma-Retrovirale Transduktion von *lin* neg. Zellen

Für die Klonierung in den retroviralen Vektor pMSCV wurde die humane HLXB9 (GENEART) Sequenz verwendet. In der Abb. 39 (a) sind schematisch die verwendeten Vektoren dargestellt. Als Selektionsmarker enthalten die Vektoren das grün fluoreszierende GFP, welches unter der Kontrolle eines eigenen CMV-Promotors steht. Der pMSCV-CMV-GFP Leervektor diente als Negativkontrolle. Die Proteinexpression von HLXB9 wurde nach transienter Transfektion in EcoPhoenix Zellen im *Western Blot* überprüft (Abb. 39 (b)).

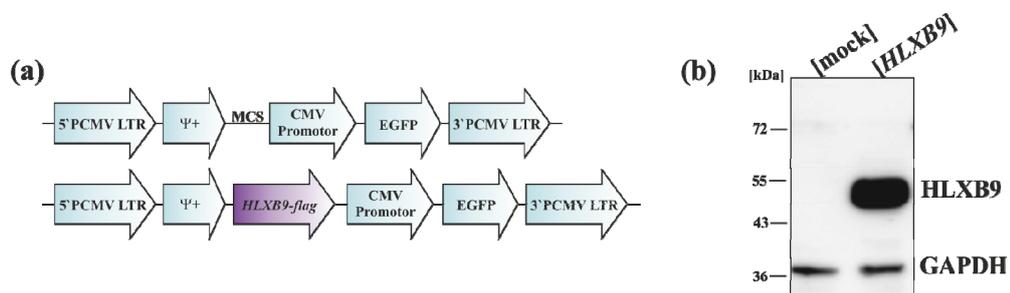


Abb. 39: Klonierung von *HLXB9* in den gamma-retroviralen Vektor pMSCV. (a) Schematische Darstellung der verwendeten pMSCV-Vektoren. (b) *Western Blot* für HLXB9 aus Gesamt-Protein Lysaten von transient transfizierten EcoPhoenix Zellen. Für die Detektion von HLXB9 wurde ein anti-FLAG-HRP gekoppelter Antikörper verwendet. Als Ladekontrolle wurde GAPDH mittels Maus-anti-GAPDH//anti-Maus-HRP Antikörper detektiert.

Vor Transduktion der *lin* neg. Zellen wurden diese 24 h mit stimulierenden Zytokinen präinkubiert (SCF/TPO/FLT3L/IL11/IL6). Die Transduktion erfolgte mit retroviralem Überstand an drei aufeinanderfolgenden Tagen (vgl. Abschnitt 3.2.10). 72 h nach der dritten Transduktion wurden die GFP-pos. Zellen gesortet.

4.3.3 Ausblick: Validierung der differentiellen Ziel-Genexpression in HLXB9 pos. murinen Stammzellen

Das Ziel der *HLXB9* Transduktion in murine Stammzellen war es, die Auswirkung der *HLXB9* Expression auf die beschriebenen Ziel-Gene zu untersuchen. Insgesamt wurde das Experiment einmal durchgeführt und die Ziel-Gene *Ptger2*, *Zyxin*, *Ets1* und *Prok2* in der qRT-PCR analysiert (Abb. 40). Weitere Ziel-Gene konnten aufgrund des limitierten Materials nicht untersucht werden. Die Abb. 40 (a) zeigt die Expression des transduzierten *HLXB9*. In der Abb. 40 (b) ist das Ergebnis der qRT-PCR für die vier Ziel-Gene dargestellt. *Ptger2* zeigt eine verminderte Expression in den mit *HLXB9* transduzierten Zellen und bestätigt die vorherigen Ergebnisse im HL60 Zell-System und in den t(7;12) pos. Patienten. Für *Zyxin* und *Ets1* ist keine Tendenz einer verminderten Genexpression zu erkennen. *Prok2* zeigt eine 7x höhere Genexpression in den *HLXB9* transduzierten Zellen und stimmt somit mit dem Ergebnis des HL60 Zell-Systems überein (vgl. Abb. 28).

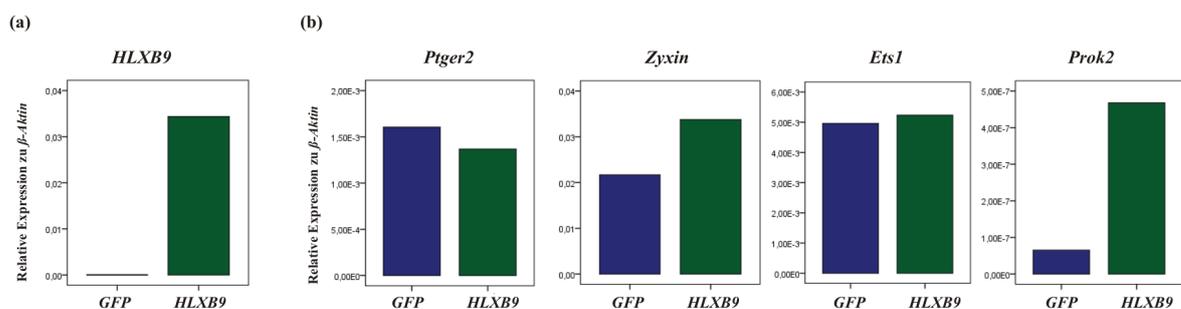


Abb. 40: Genexpression von Ziel-Genen in *HLXB9* pos. murinen hämatopoetischen Stammzellen. Mit pMSCV[*GFP*] und pMSCV[*HLXB9/GFP*] transduzierte *lin* neg. Zellen wurden nach GFP-pos. Zellen gesortet. Die Expression des (a) transduzierten *HLXB9*, sowie (b) der Ziel-Gene *Ptger2*, *Zyxin*, *Ets1* und *Prok2* wurde mittels qRT-PCR bestimmt und die Expression zu β -*Aktin* normalisiert.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nur ein erstes Experiment mit murinen Stammzellen durchgeführt werden. Die Ergebnisse sind somit nur als Tendenz zu betrachten und müssen in weiteren Replikaten validiert werden.

5. Diskussion

HLXB9 ist ein Transkriptionsfaktor, dessen genaue Funktion in hämatopoetischen Zellen derzeit unbekannt ist. Während *HLXB9* physiologisch nicht in myeloischen Zellen exprimiert wird, zeigen Patienten mit einer AML und einer Translokation t(7;12)-*HLXB9/TEL* eine sehr hohe *HLXB9* Expression. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Patientenkohorte mit der Translokation t(7;12) charakterisiert und primäre und sekundäre Ziel-Gene von HLXB9 in myeloischen Zellen identifiziert.

5.1 Vergleichende Genexpression von t(7;12) und 11q23/*MLL* pos. Säuglingsleukämie-Zellen

Säuglings-AMLs sind sehr selten und der Großteil (> 60%) weist eine Translokation des Gens *MLL* auf (Pui *et al.*, 1996; Sorensen *et al.*, 1994). Innerhalb der 11q23/*MLL* neg. Säuglingsleukämien wurden Patienten mit einer Translokation t(7;12) als homogene Gruppe charakterisiert (Trisomie 19 und unreife Morphologie der leukämischen Blasten, sehr schlechte Prognose). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Translokation t(7;12) mit einer Inzidenz von 15% innerhalb der 11q23/*MLL* neg. Säuglings-AMLs beschrieben (vgl. Abschnitt 4.1.1).

5.1.1 Differentielle Genexpression von *HOX*-Genen

Sowohl in t(7;12) als auch in 11q23/*MLL* pos. Leukämie-Entitäten spielt die Fehlregulation von Homöobox-Genen eine bedeutende Rolle. Während für t(7;12) pos. Leukämiezellen lediglich die Überexpression des Homöobox-Gens *HLXB9* beschrieben worden ist, ist für *MLL* pos. Leukämien die starke Expression von *HOX*-Genen und deren Ko-Faktoren nachweislich für die Leukämieentstehung mit verantwortlich (Armstrong *et al.*, 2002; Milne *et al.*, 2005; Slany, 2009; Zeisig *et al.*, 2004) und begründet sich auf der zentralen Rolle von *HOX*-Genen in der frühen Hämatopoese (vgl. Abschnitt 1.3) (Drabkin *et al.*, 2002; Golub *et al.*, 1999; Kawagoe *et al.*, 1999; Lawrence *et al.*, 1999). Durch ein gezieltes Zusammenspiel von *HOX*-Genen und ihren Ko-Faktoren kann es zu einem gesteigerten Selbsterneuerungs-Potential der Stammzellen, zu einem Arrest in der Differenzierung und zur Entstehung von leukämischen Stammzellen kommen. Verantwortlich für die aberrante

HOX-Expression sind übergeordnete Regulatoren, wie z.B. der Transkriptionsfaktor MLL oder Mitglieder der Homöobox-Familie CDX (Bansal *et al.*, 2006; Krivtsov *et al.*, 2007).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Genexpressions-Analysen sollten u.a. Aufschluss darüber geben, ob Patientenzellen mit einer Translokation t(7;12) und Expression von *HLXB9* ebenfalls eine verstärkte Expression von *HOX*-Genen aufweisen.

Von besonderem Interesse war die Expression der Gene *HOXA9*, *MEIS1* und *cMYB*, welche maßgeblich an der Initiierung der MLL-vermittelten Leukämogenese beteiligt sind. Zusätzlich korreliert die Expression von *HOXA9* im Rahmen einer AML mit unzureichenden Behandlungserfolgen (Golub *et al.*, 1999). Anhand von qRT-PCR konnte gezeigt werden, dass die Überexpression dieser drei Gene spezifisch für die 11q23/*MLL*-positive Kohorte ist und weder t(7;12) pos. Patientenzellen, noch Patientenzellen ohne 11q23/*MLL* bzw. t(7;12) Translokation eine verstärkte Expression dieser drei Gene zeigen (vgl. Abb. 4). Zusätzlich zu der Expression von *HOXA9* und *MEIS1* wurden die Daten der Affymetrix Genexpressionsarrays gezielt nach weiteren, differentiell regulierten *HOX*-Genen untersucht. Es konnte eine Anzahl zusätzlicher *HOX*-Gene (PBX3, *HOXA6*, -*A5*, -*A10*, -*A3*, -*A4*, -*A7*, -*A9*, -*A2*) identifiziert werden, welche ebenfalls eine signifikant differentielle Expression zeigen und in 11q23/*MLL*-pos. Patientenzellen im Vergleich zu t(7;12) pos. Patientenzellen überexprimiert werden.

Die Tatsache, dass die Überexpression von *HOX*-Genen nicht in t(7;12) pos. Leukämiezellen gezeigt werden konnte, legt nahe, dass für den Transformationsprozess, initiiert durch die Translokation t(7;12), ein anderer Mechanismus verantwortlich ist.

5.1.2 Anreicherung von Zelladhäsions-Signalwegen

Für eine detaillierte Analyse der differentiell hoch- bzw. niedrig exprimierten Gene wurde eine Gen-Ontologische Untersuchung durchgeführt (vgl. Abb. 14). Bei dem Vergleich von t(7;12) mit t(9;11) pos. Leukämiezellen, zeigte sich eine signifikante Anreicherung von Signalwegen, welche die Zelladhäsion betreffen (z.B. „*cell adhesion molecules*“, „*focal adhesion*“, „*regulation of actin cytoskeleton*“). Sehr ähnliche Ergebnisse zeigte auch ein Vergleich der t(7;12) pos. Patientenzellen zu CD34+ Knochenmarkszellen gesunder Probanden.

Der Signalweg *focal adhesion* beschreibt Zell-Matrix Interaktionen und gilt als Überbegriff für weitere Signalwege, wie z.B. „*cytokine-cytokine receptor interaction*“ und „*regulation of actin cytoskeleton*“. Das Knochenmark, Ort der adulten Hämatopoese, setzt sich aus den hämatopoetischen Zellen, Stromazellen und der extrazellulären Matrix zusammen und bildet die hämatopoetische Nische, also das Mikromilieu der Stammzellen. Sämtliche Prozesse, wie z.B. die Selbsterneuerung der Stammzellen, die Proliferation und Differenzierung in die unterschiedlichen hämatopoetischen Reihen und das „*Homing*“ der im Blut zirkulierenden Stammzellen, werden durch Interaktionen der Zellen der hämatopoetischen Nische gesteuert. An der Regulation sind darüberhinaus vor allem Zytokine (hämatopoetische Wachstumsfaktoren) beteiligt, die sowohl parakrin als auch autokrin wirken. Adhäsionsmoleküle spielen vor allem bei der Interaktion der hämatopoetischen Zellen mit Rezeptoren des Knochenmark-Stromas eine bedeutende Rolle. Eine Fehlregulation innerhalb der fein abgestimmten Interaktion der hämatopoetischen Nische kann zu einer unkontrollierten Hämatopoese und einem veränderten „*Homing*“ führen und bildet somit eine Grundlage der Leukämieentstehung (Renstrom *et al.*, 2010).

Die Abb. 41 zeigt zwei mögliche Szenarien, wie eine veränderte Zelladhäsion zur Leukämogenese beitragen könnte. Unter (a) ist die gesunde hämatopoetische Stammzelle (HSZ) dargestellt. Sie steht im direkten Kontakt mit den Stromazellen der Osteoblastischen Nische und autokrin und parakrin wirkende Faktoren regulieren die Selbsterneuerungskapazität der HSZ. Unter geeigneten Bedingungen migriert die HSZ zur vaskulären Nische und beginnt in die verschiedenen Vorläuferzellen zu differenzieren. Eine gestörte Interaktion oder Kommunikation zwischen der leukämischen Stammzelle mit den Stromazellen kann zur kontinuierlichen Proliferation der Zellen führen und somit zur myeloproliferativen Erkrankung (Abb. 41 (b)). Eine weitere mögliche Auswirkung der gestörten Interaktion innerhalb der hämatopoetischen Nische ist unter (c) dargestellt. Eine anormale Interaktion zwischen der leukämischen Stammzelle und den Stromazellen kann dazu führen, dass die leukämische Stammzelle einem Zellzyklusarrest unterliegt und somit nicht mehr für Chemotherapeutika zugänglich ist.

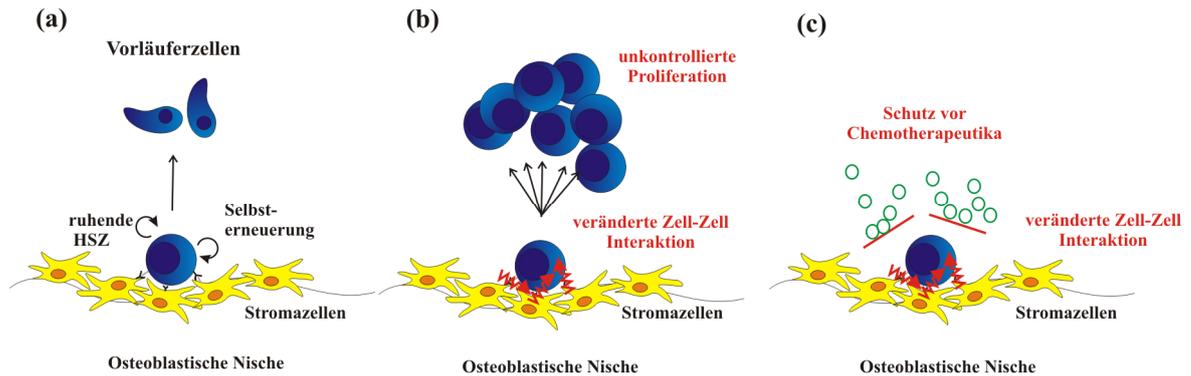


Abb. 41: Model zur Leukämogenese durch gestörte Zell-Interaktionen. (a) Gesunde Hämatopoese. (b) Veränderte Zell-Zell Interaktionen führen zur gesteigerten Proliferation. (c) Durch veränderte Zell-Zell Interaktionen ist die leukämische HSZ nicht mehr für Chemotherapeutika zugänglich. HSZ: hämatopoetische Stammzelle.

Die Daten der Expressionsanalysen zeigen, dass der Veränderung in der Expression von Zelladhäsionsmolekülen eine Schlüsselfunktion in der t(7;12) vermittelten Leukämogenese zukommt. Diese Beobachtung wird dadurch unterstützt, dass die alleinige Expression von *HLXB9* oder *HLXB9/TEL* in einem CFC-Test keine transformierende Wirkung in myeloischen Vorläuferzellen zeigt (Wildenhain *et al.*, 2010). Die Interaktion mit den Zellen der hämatopoetischen Nische könnte also eine wichtige Bedeutung in der t(7;12) verursachten Leukämogenese spielen.

Für die Interpretation der Genexpressionsdaten muss jedoch beachtet werden, dass sich die Blasten der unterschiedlichen Leukämieentitäten in unterschiedlichen Differenzierungsstadien befinden. So werden bei dem direkten Vergleich von t(7;12) mit t(9;11) pos. Patientenzellen unreife Blasten (FAB M0/M2) mit reiferen monoblastären Zellen (FAB M5) verglichen. Ebenso umfassen die CD34+ hämatopoetischen Stammzellen des gesunden Spenders Subpopulationen mit unterschiedlichen Differenzierungsstadien. Es besteht also, unabhängig von der gegebenen Zytogenetik, ein differentielles Genexpressionsprofil. Um auszuschließen, dass die differentiellen Genexpressionsprofile durch den unterschiedlichen Reifegrad der Zellen bedingt werden, sondern es sich um die direkte Auswirkung der unterschiedlichen Zytogenetik der Zellen handelt, müssten zusätzlich gesunde Spenderzellen im gleichen Differenzierungsstadium mit in die Genexpressions-Analyse einbezogen werden. Dafür wäre jedoch eine Knochenmarksspende von gesunden Spendern notwendig.

Es ist vorstellbar, dass ein Teil der differentiellen Genexpression sich auf den unterschiedlichen Reifegrad der Zellen begründet (z.B. die verstärkte Expression von cKIT und CD34 in den t(7;12) pos. Patientenzellen). Demgegenüber wurde jedoch anhand von Cluster-Analysen von AML-Subtypen mit einem ähnlichen Differenzierungsgrad gezeigt, dass sich die Patientenproben anhand ihrer balancierten Translokationen gruppieren (Schoch *et al.*, 2002). Dieses lässt sich z.T. durch den stark leukämischen Effekt vieler Fusionsproteine oder zytogenetischer Besonderheiten begründen (Brown *et al.*, 1997; Castilla *et al.*, 1996; Pabst *et al.*, 2001). Aus diesem Grund wurde davon ausgegangen, dass die zytogenetischen Aberrationen der Zellen für die Anreicherung der beschriebenen Signalwege verantwortlich sind.

Die leukämischen Blasten von t(7;12) pos. Patienten lassen sich durch drei molekular-zytogenetische Auffälligkeiten charakterisieren, nämlich die Expression des Fusionstranskripts *HLXB9/TEL*, eine hohe Expression von *HLXB9* sowie ein zusätzliches Chr. 19. Welches dieser Merkmale oder welche Kombination krankheitsverursachend ist, ist bisher noch nicht bekannt.

Während die *TEL* Expression des Wildtyp Allels durch die Translokation nicht beeinflusst wird, kommt es zu einer starken Expression des Wildtyp *HLXB9* Allels (von Bergh *et al.*, 2006). Ein ähnlicher Effekt ist für die Translokation t(12;13) beschrieben, bei der der N-Terminus des Homöobox-Gens *CDX2 in-frame* mit dem Exon 2 des *TEL* fusioniert vorliegt. Die Fusion geht ebenfalls mit einer erhöhten Expression des Wildtyp-Allels *CDX2* einher, dessen physiologische Expression auf Darm-Epithelzellen und auf die frühe embryonale Entwicklung beschränkt ist. Für die Translokation t(12;13) konnte gezeigt werden, dass Mäuse, die mit *CDX2* transduzierten Zellen transplantiert wurden, eine AML entwickelten. Im Gegensatz dazu, war die Transplantation mit *CDX2/TEL* transduzierten Zellen nicht krankheitsverursachend (Rawat *et al.*, 2004).

HLXB9 wird physiologisch im Pankreas, im Dickdarm, in der Lunge und in den Nervenzellen des Gehirns exprimiert. Interessanterweise waren Signal-Wege, welche Gewebe mit physiologischer *HLXB9* Expression betreffen, in den Expressions-Analysen signifikant angereichert (z.B. „*colorectal cancer*“, „*pancreatic cancer*“, „*prostate cancer*“, „*axon guidance*“), d.h. dass die selektive Auswirkung der *HLXB9* Expression einen starken Einfluss auf das Expressionsprofil *HLXB9/TEL* pos. Patienten ausübt.

Basierend auf diesen Beobachtungen und der Tatsache, dass in der Literatur vereinzelt t(7;12) pos. Patienten beschrieben worden sind, bei denen kein Fusionstranskript in den leukämischen Blasten nachgewiesen werden konnte, wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Überexpression von *HLXB9* eine wesentliche Rolle in der t(7;12) vermittelten Leukämogenese spielt. Um die genaue molekulare Funktionsweise von HLXB9 zu verstehen, ist es wichtig, den Mechanismus, welcher zu einem veränderten Expressionsprofil führt, aufzuklären. In den nachfolgenden Abschnitten wird die Funktion von HLXB9 als Transkriptionsfaktor im *HLXB9* exprimierenden HL60 Zellsystem beschrieben.

5.2 HLXB9 wirkt durch direkte DNA-Interaktion als transkriptioneller Repressor in hämatopoetischen Zellen

Als DNA-bindendes Element vieler Homöo-Proteine gilt die stark konservierte Homöodomäne. Jedoch gibt es auch Vertreter, die über zusätzliche, konservierte DNA-bindende Domänen verfügen (z.B. die PAX Domäne). Vereinzelt sind weitere DNA-bindende Strukturen beschrieben, die keiner bekannten Domäne zugeordnet werden, so ist z.B. aus myeloischen Zellen ein Protein isoliert worden, welches das Motiv CCAAT erkennt (Skalnik *et al.*, 1991). Für HLXB9 sind noch keine publizierten Studien zur DNA-Interaktion durchgeführt worden.

ChIP-on-Chip identifiziert HLXB9 als Transkriptionsfaktor:

Eine geeignete Methode zur Identifizierung von Protein-DNA Interaktionen ist die hier angewandte Chromatin-Immunpräzipitation (vgl. Abschnitt 3.4.2). Für die Identifizierung der immunpräzipitierten Ziel-DNA bieten sich zwei gängige Methoden an. Die in dieser Arbeit angewandte Hybridisierung auf Mikroarrays bietet den Vorteil, dass die Arrays für den individuellen Gebrauch gewählt werden können. So stellen z.B. Promotor-Arrays eine kostengünstige Alternative für erste Screeningverfahren von unbeschriebenen Transkriptionsfaktoren dar.

Für die Hybridisierung ist jedoch eine relativ große Menge an immunpräzipitierter DNA notwendig, welche durch einen finalen Amplifikationsschritt gewonnen wird. Durch die PCR-basierte Amplifikation erhöht sich die experimentell induzierte Fehlerrate und führt

zur verhältnismäßig geringen Überschneidung unabhängiger ChIP-on-Chip Replikate (vgl. Abb. 23). Eine modernere Methode zur Identifizierung der Ziel-DNA ist die Sequenzierung mittels Hochdurchsatz-Sequenziergeräten. Für die Sequenzierung wird weniger Ausgangs-DNA benötigt und der fehlerbehaftete Schritt der Amplifizierung entfällt. Die Sequenzierung mit dem Illumina Genome Analyzer bietet durch eine kurze *read*-Länge eine hohe Abdeckung und Auflösung der Ziel-Sequenzen. Ein zusätzlicher Vorteil der Sequenzierung ist die Abdeckung des gesamten Genoms (Jothi *et al.*, 2008; Valouev *et al.*, 2008). Ein Illumina Sequenziergerät stand jedoch zum Zeitpunkt der Analyse nicht zur Verfügung.

Die Qualität der ChIP, und somit das Minimieren von falsch-positiven Protein-DNA-Bindungen hängt größtenteils von der Wahl des geeigneten, spezifischen Antikörpers für die Immunpräzipitation ab. In dieser Arbeit wurde für die IP kommerziell gekoppelte anti-FLAG Agarose-*beads* verwendet, die spezifisch das FLAG-Epitop der Proteine erkennen. Doch auch trotz der Wahl eines spezifischen Antikörpers, lassen sich in der ChIP oftmals falsch-positive Sequenzen detektieren. Diese resultieren aus der z.T. unspezifischen, Formaldehyd-bedingten Quervernetzung des Ziel-Proteins mit der DNA. Zusätzlich liegt das Protein in den meisten Experimenten in einer überexprimierten Form vor, welches ebenfalls zu falschen Interaktionen führen kann. Dass es sich bei den identifizierten Genen trotzdem um mögliche Bindungsstrukturen von HLXB9 handelt, und nicht um falsch-positive Effekte, zeigte eine KEGG-Signalweg Analyse der identifizierten Ziel-Gene (vgl. Abb. 23). So zeigen u.a Signal-Wege eine signifikante Anreicherung, welche Gewebe mit physiologischer *HLXB9* Expression betreffen, z.B. „*colorectal cancer*“, „*pancreatic cancer*“ und „*glioma*“.

Genexpressionsstudien identifizieren HLXB9 als transkriptionellen Repressor:

Anhand von Genexpressionsanalysen konnte gezeigt werden, dass HLXB9 als transkriptioneller Repressor auf das globale Expressionsprofil von HL60 Zellen wirkt. Von insgesamt 81 signifikant regulierten Genen, werden 63 Gene in Anwesenheit von HLXB9 reprimiert. Ungeklärt ist derzeit noch, welche Protein-Domäne den starken repressorischen Effekt von HLXB9 bewirkt. Innerhalb der Gruppe der Homöo-Proteinen sind sowohl transkriptionelle Aktivatoren, als auch Repressoren bekannt. Für zwei Vertreter der Homöobox-Genfamilie konnte anhand von Mutationsanalysen gezeigt werden, dass eine wiederholte Abfolge von Alaninen für die Repressorfunktion notwendig ist (Han and Manley, 1993). Auch HLXB9 besitzt eine Abfolge von 14 Alaninen. Die funktionelle Untersuchung einer Mutante mit Deletionen im Bereich der Alanin-Wiederholung, ist als Folgeprojekt geplant.

Eine Signalweg und Gen-Ontologische Untersuchung der differentiell regulierten Gene ergab, wie bereits in den Analysen der t(7;12) pos. Patientenzellen beobachtet, eine Anreicherung von Signalwegen, welche Prozesse der Zell-Adhäsion betreffen. Somit konnte die Vermutung unterstützt werden, dass die in den Patienten-Analysen angereicherten Signalwege der Zell-Adhäsion durch die *HLXB9* Expression bedingt, bzw. beeinflusst werden.

Identifizierung von *PTGER2*, *IL8*, *ZYXIN* und *ETS1* als direkte Ziel-Gene:

Die Daten der ChIP-on-Chip Analyse wurden mit den 81 signifikant regulierten Genen der Expressionsanalyse nach Übereinstimmungen verglichen. Dabei wurden *PTGER2*, *IL8*, *ZYXIN* und *ETS1* als direkte Ziel-Gene identifiziert. Diese vier Gene zeigen eine verminderte Expression in den HLXB9 pos. Zellen. Zusätzlich bindet HLXB9 an die Promotor-Region dieser Ziel-Gene. Die geringe Schnittmenge der ChIP-on-Chip Daten mit den Daten der Expressionsarrays ist ein in der Literatur bekanntes Phänomen (Hayakawa *et al.*, 2004; Impey *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005). In der ChIP-on Chip Analyse werden sämtliche Ziel-Sequenzen identifiziert, welche eine strukturelle Bindung von HLXB9 aufweisen. Ob die Bindung von HLXB9 jedoch auch eine veränderte Expression der betroffenen Gene bewirkt, hängt von zahlreichen zusätzlichen Faktoren ab. Zum einen ist die Regulation vieler Gene Zell-Zyklus und Gewebe abhängig, d.h. Gene bzw. Promotoren, die von HLXB9 gebunden worden sind, könnten eine veränderte Regulation

in Geweben aufzeigen, in denen HLXB9 physiologisch exprimiert wird. Zum anderen erfordert der Prozess der transkriptionellen Regulation in vielen Fällen die Anwesenheit von zusätzlichen Ko-Faktoren.

In dieser Arbeit wurden zum ersten Mal direkte Ziel-Gene von HLXB9 identifiziert, welche zum einen eine strukturelle Bindung von HLXB9 an die entsprechende Promotorregion aufweisen und zusätzlich eine verminderte Expression in HLXB9 pos. hämatopoetischen bzw. leukämischen Zellen zeigen. Alle vier Ziel-Gene konnten in der qRT-PCR bestätigt werden.

Unklar ist derzeit noch, welche Domänen an der DNA-Interaktion beteiligt sind. Für die konservierte Homöodomäne ist die Aminosäuresequenz, welche für die DNA-Bindung verantwortlich ist, bekannt (siehe Abschnitt 1.4.3). Um zu testen, ob eine Deletion dieser Aminosäuren die Regulation der direkten Ziel-Gene von HLXB9 beeinflusst, wurde die Mutante *HLXB9(Del1)* kloniert und *HLXB9(Del1)* stabil in HL60 Zellen exprimiert (siehe Abschnitt 3.3.1.4). Die Expression des Ziel-Gens *PTGER2* verhielt sich in den *HLXB9(Del1)* pos. Zellen ähnlich zu den Kontrollzellen ohne HLXB9 Expression, d.h. die Deletion führt zu einem Funktionsverlust von HLXB9 (vgl. Abb. 33). Die Homöodomäne ist also zumindest für einen Teil der reprimierten Ziel-Gene die DNA-bindende Domäne. Die Expression der Ziel-Gene *IL8*, *ETS1* und *ZYXIN* verhielt sich in den *HLXB9(Del1)* pos. Zellen ähnlich wie in den *HLXB9* pos. Zellen. Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass HLXB9 über weitere DNA-bindende Domänen verfügt, wie es auch für andere Vertreter der Homöobox-Genfamilie beschrieben ist. Die nähere Analyse dieser potenziellen Domänen konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr erörtert werden.

5.3 PTGER2 ist ein direktes Ziel-Gen von HLXB9

In dieser Arbeit wurde *PTGER2* als direktes Ziel-Gen von HLXB9 identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass HLXB9 an die Promotor-Region von *PTGER2* bindet und eine verminderte Expression auf Transkript und Protein-Ebene bedingt, wobei die Regulation von *PTGER2* von der funktionellen Homöodomäne von HLXB9 abhängig ist. Der Effekt der verminderten Gen-Expression konnte ebenfalls in t(7;12) pos. Patientenzellen mit *HLXB9* Expression gezeigt werden (siehe Abschnitt 4.2.4.3). Zusätzlich konnte in einem Vorversuch gezeigt werden, dass auch in murinen Stammzellen die *HLXB9* Expression

eine verminderte PTGER2 Expression bewirkt (vorläufige Daten). Es scheint sich somit um einen stark konservierten Effekt zu handeln, der spezieübergreifend zu beobachten ist.

PTGER2 (Prostaglandin Rezeptor 2) ist einer von vier Rezeptoren für PGE₂ (Prostaglandin E₂). Prostaglandine spielen eine wichtige Rolle im Immunsystem und werden von verschiedenen Zellen des Körpers sekretiert. Die Expression der vier unterschiedlichen Rezeptoren ist stark vom jeweiligen Zelltyp abhängig und die Funktionen sind zum Teil divergent. Bei dem Rezeptor EP₂ (PTGER2) führt die Aktivierung zu einer gesteigerten Produktion von zyklischem AMP (cAMP), welches über eine Signalkaskade die Genregulation beeinflusst (Harris *et al.*, 2002).

Die Expression und Funktion von *PTGER2* in malignen Neoplasien scheint stark Gewebe abhängig zu sein und wird sowohl als proliferations-fördernd, als auch als Apoptose-induzierend beschrieben. Über die Funktion in Leukämien ist relativ wenig bekannt, jedoch ist gezeigt worden, dass von den vier PGE₂ Rezeptoren ausschließlich PTGER2 auf AML Blasten exprimiert wird und zu einer gesteigerten Produktion von cAMP führt (Malissein *et al.*, 2006).

Eine zellwachstum-fördernde Funktion wird PTGER2 z.B. in Kolonkarzinomen zugeschrieben (Castellone *et al.*, 2005). Der gegenteilige Effekt ist in Neuroblastomen beschrieben. Dort konnte u.a gezeigt werden, dass die Promotorregion von *PTGER2* methyliert und somit inaktiv vorliegt. Die Überexpression von *PTGER2* in Neuroblastom-Zelllinien führt zu einem reduzierten Zellwachstum und zum Teil zur Apoptose der Zellen. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Behandlung der Zellen mit einem PTGER2 Agonisten zu einer gesteigerten Produktion von cAMP führt (Sugino *et al.*, 2007). Der Zusammenhang zwischen einer erhöhten cAMP Produktion und vermindertem Zellwachstum und Induktion der Zell-Differenzierung ist auch in anderen Zell-Typen, z.B. in Makrophagen, Glioblastomzellen und Zellen des Hippokampus, gezeigt worden (Chen *et al.*, 1998; Takadera *et al.*, 2004; Vairo *et al.*, 1990). Von den vier PGE₂ Rezeptoren besitzt PTGER2 das stärkste Potential zur cAMP Produktion (Regan, 2003; Sugino *et al.*, 2007).

Die Abb. 42 zeigt ein mögliches Model zum Einfluss von HLXB9 auf PTGER2. Nachweislich konnte in dieser Arbeit die Bindung von HLXB9 an die Promotorregion von *PTGER2* gezeigt werden. Zusätzlich nimmt sowohl die Gen-, als auch die Proteinexpression von PTGER2 in Anwesenheit von HLXB9 ab. Der Effekt der verminderten Genexpression ist von einer funktionellen Homöodomäne von HLXB9 abhängig. Die reprimierte Expression des Rezeptors könnte dazu führen, dass weniger cAMP gebildet wird. Über eine Phosphorylierungskaskade reguliert cAMP als *second messenger* die Regulation cAMP abhängiger Elemente. Zu diesen gehören zahlreiche Gene, die die myeloische Zell-Proliferation und Differenzierung beeinflussen. Die verminderte Bildung von cAMP wird mit einer erhöhten Proliferationsrate der Zellen in Verbindung gebracht (Mayr and Montminy, 2001; Shankar *et al.*, 2005; Shaywitz and Greenberg, 1999).

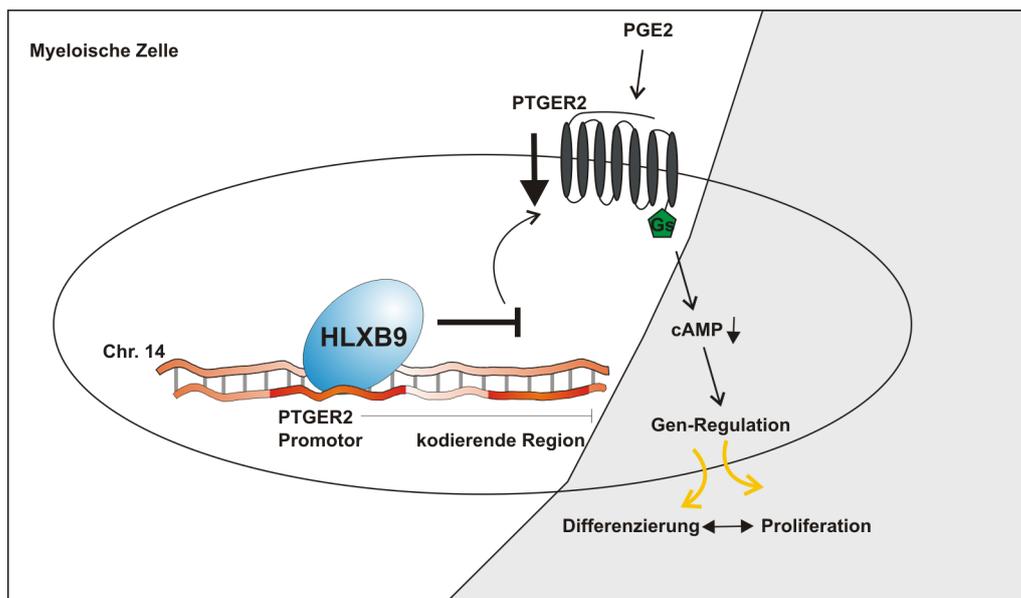


Abb. 42: Model zum Einfluss von HLXB9 auf die PTGER2 Expression. Der weiß hinterlegte Bereich basiert auf den Ergebnissen dieser Arbeit. Der grau hinterlegte Bereich zeigt auf der Literatur beruhende Schlussfolgerungen.

5.4 HLXB9 verstärkt die ATRA induzierte CD11b-Expression

Knock-out Studien mit HLXB9 defizienten Mäusen ergaben, dass HLXB9 eine essentielle Rolle während der dorsalen Entwicklung des Pankreas und bei der Differenzierung der β -Zellen spielt (Harrison *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1999). Während der murinen embryonalen Entwicklung wird *HLXB9* sowohl im dorsalen als auch ventralen Anteil des Pankreas am Tag E9 exprimiert. In Embryonen mit einer Dysfunktion des Retinsäure-Signalwegs ist die Anzahl der HLXB9 exprimierenden Zellen reduziert und diese sind nicht mehr zur Expansion und Knospung fähig (Martin *et al.*, 2005). Auch in Zebrafisch-Modellen konnte gezeigt werden, dass die embryonale Pankreasentwicklung Retinsäure abhängig ist (Stafford and Prince, 2002). Da eine Rolle von HLXB9 an der embryonalen oder adulten Hämatopoese weitestgehend unbekannt ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein möglicher Effekt von HLXB9 auf die hämatopoetische Differenzierung von HL60 Zellen untersucht. HL60 Zellen lassen sich durch die Zugabe von ATRA in myeloische Zellen ausdifferenzieren. Zellen, welche stabil *HLXB9* exprimieren (HL60[*HLXB9*]) zeigten nach Induktion mit ATRA eine vielfach stärkere Expression der Oberflächenmarker CD11b und CD38 als HL60 Kontrollzellen (vgl. Abschnitt 4.2.6).

CD11b (MAC-1) gehört zu der Familie der β_2 -Integrine und ist für die Interaktion von hämatopoetischen Zellen mit den Zellen des Knochenmark-Endothels verantwortlich. Als Regulatoren der Zell-Zell Interaktion spielen β -Integrine eine maßgebliche Rolle bei der Regulation der Zell-Differenzierung, Zell-Mobilität, des Zell-Wachstums und des Zelltodes (Howe *et al.*, 1998). In gesunden, hämatopoetischen Zellen wird CD11b auf CD34+-Vorläuferzellen, auf reifen Monozyten und Granulozyten, sowie auf NK-Zellen und lymphatischen Subpopulationen exprimiert (Carlos and Harlan, 1994; Paietta *et al.*, 1996). In den AML-Zellen findet sich eine CD11b Expression vermehrt auf den Blasten der reiferen Subtypen FAB M4/M5, ist jedoch auch auf unreifen Blasten der FAB-Subtypen M0 und M1 beschrieben worden. Zusätzlich korreliert die Expression mit einer schlechten Prognose (Graf *et al.*, 2006). CD11b gilt, im Gegensatz zu CD38, als myeloischer Differenzierungsmarker.

CD38 wird in gesunden, hämatopoetischen Zellen, auf frühen lymphatischen Vorläuferzellen und auf aktivierten T- und B-Zellen exprimiert (Reinherz *et al.*, 1980; Stashenko *et al.*, 1981). Während der myeloischen Differenzierung wird die CD38 Expression herunter reguliert (Sieff *et al.*, 1982).

Für die ATRA-induzierte Expression von CD38 in HL60 Zellen ist gezeigt worden, dass diese von dem funktionellen Rezeptor RAR α abhängig ist (Di *et al.*, 1996). Es ist somit fragwürdig, ob CD38 in den HL60 Zellen als Differenzierungsmarker angesehen werden kann. Vielmehr scheint die Expression an die Induktion von ATRA gebunden zu sein, da eine Induktion mit anderen differenzierungs-stimulierenden Agenzien (z.B. TPA, IFN- γ) keine CD38 Expression bewirkt (Drach *et al.*, 1994). Die Stimulation der Zelladhäsionsmoleküle CD11b und CD38 unterstützt die vorherig beschriebene Aussage, dass HLXB9 die Expression von Zelladhäsionsmolekülen beeinflusst (siehe Abschnitt 5.2). Die Ergebnisse des ATRA-induzierbaren HL60 Systems zeigen erstmalig, dass der *HLXB9* Expression eine funktionelle Bedeutung in der hämatopoetischen Differenzierung zukommt. Da sich immortalisierte Zell-Linien nur bedingt für Differenzierungs-Experimente eignen, wurde parallel zu dieser Arbeit damit begonnen, Differenzierungsexperimente in murinen *HLXB9* pos. Stammzellen durchzuführen.

Pharmakologisch wird die ATRA-induzierte Differenzierung in Kombination mit einer Standardchemotherapie bei Patienten mit APL und einer Translokation t(15;17)-*PML/RAR α* angewandt (vgl. Abschnitt 1.2). Durch die Therapie mit ATRA gelang es, dass Risiko innerhalb von zwei Jahren an einem Folgerezidiv zu erkranken, um 50% zu reduzieren (Fenaux *et al.*, 2000). Die Überlegung liegt nahe, ob eventuell auch t(7;12) positive Patienten auf eine Therapie mit ATRA ansprechen könnten. Kongruent zu dieser Hypothese sind aktuell veröffentlichte Daten einer Genexpressionsstudie, die zeigen, dass sich t(7;12) und t(15;17) pos. Patientenzellen hinsichtlich ihres Genexpressionsprofils gruppieren und somit eventuell über gleiche molekulare und funktionelle Eigenschaften verfügen (Balgobind *et al.*, 2011).

Es ist zu vermuten, dass *HLXB9* nicht ausschließlich über einen einzigen Wirkungsmechanismus verfügt, da durch das veränderte Genexpressionsprofil sekundäre und tertiäre Signalkaskaden verändert werden, die die Leukämogenese initiieren oder beeinflussen können.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit die ersten molekularbiologischen Untersuchungen von HLXB9 in hämatopoetischen Zellen. Die Ergebnisse führen zu drei Hypothesen, die versuchen, die Wirkungsweise von HLXB9 im Hinblick auf die Leukämieentstehung zu erklären.

- 1) Veränderte Zell-Zell Interaktionen führen zu einer gestörten hämatopoetischen Nische und beeinflussen somit die normale Hämatopoese.
- 2) HLXB9 verstärkt die ATRA-induzierte Expression von CD11b und beeinflusst die myeloische Differenzierung. Eventuell ist HLXB9 für die Ausprägung des myeloischen Immunphänotyps der Leukämie mitverantwortlich.
- 3) PTGER2 wird durch direkte Protein-DNA Interaktion reprimiert. PTGER2 wird in einigen Zell-Typen als Tumor-Suppressor beschrieben.

6. Literatur

- Andersson A, Ritz C, Lindgren D, Eden P, Lassen C, Heldrup J, Olofsson T, Rade J, Fontes M, Porwit-Macdonald A, Behrendtz M, Hoglund M, Johansson B, and Fioretos T (2007) Microarray-based classification of a consecutive series of 121 childhood acute leukemias: prediction of leukemic and genetic subtype as well as of minimal residual disease status. *Leukemia*, **21**, 1198-1203.
- Arber S, Han B, Mendelsohn M, Smith M, Jessell TM, and Sockanathan S (1999) Requirement for the homeobox gene Hb9 in the consolidation of motor neuron identity. *Neuron*, **23**, 659-674.
- Armstrong SA, Staunton JE, Silverman LB, Pieters R, Den Boer ML, Minden MD, Sallan SE, Lander ES, Golub TR, and Korsmeyer SJ (2002) MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nat Genet*, **30**, 41-47.
- Auerbach AD (1992) Fanconi anemia and leukemia: tracking the genes. *Leukemia*, **6 Suppl 1**, 1-4.
- Balczarek KA, Lai ZC, and Kumar S (1997) Evolution of functional diversification of the paired box (Pax) DNA-binding domains. *Mol Biol Evol*, **14**, 829-842.
- Balgobind BV, van den Heuvel-Eibrink MM, De Menezes RX, Reinhardt D, Hollink IH, rentsen-Peters ST, van Wering ER, Kaspers GJ, Cloos J, de Bont ES, Cayuela JM, Baruchel A, Meyer C, Marschalek R, Trka J, Stary J, Beverloo HB, Pieters R, Zwaan CM, and den Boer ML (2011) Evaluation of gene expression signatures predictive of cytogenetic and molecular subtypes of pediatric acute myeloid leukemia. *Haematologica*, **96**, 221-230.
- Ballabio E, Cantarella CD, Federico C, Di MP, Hall G, Harbott J, Hughes J, Saccone S, and Tosi S (2009) Ectopic expression of the HLXB9 gene is associated with an altered nuclear position in t(7;12) leukaemias. *Leukemia*, **23**, 1179-1182.
- Bansal D, Scholl C, Frohling S, McDowell E, Lee BH, Dohner K, Ernst P, Davidson AJ, Daley GQ, Zon LI, Gilliland DG, and Huntly BJ (2006) Cdx4 dysregulates Hox gene expression and generates acute myeloid leukemia alone and in cooperation with Meis1a in a murine model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 16924-16929.
- Barber N, Belov L, and Christopherson RI (2008) All-trans retinoic acid induces different immunophenotypic changes on human HL60 and NB4 myeloid leukaemias. *Leuk Res*, **32**, 315-322.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, and Sultan C (1985) Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med*, **103**, 620-625.
- Beverloo HB, Panagopoulos I, Isaksson M, van WE, van DE, de KA, Johansson B, and Slater R (2001) Fusion of the homeobox gene HLXB9 and the ETV6 gene in infant acute myeloid leukemias with the t(7;12)(q36;p13). *Cancer Res*, **61**, 5374-5377.
- Bohlander SK (2005) ETV6: a versatile player in leukemogenesis. *Semin Cancer Biol*, **15**, 162-174.
- Boncinelli E (1997) Homeobox genes and disease. *Curr Opin Genet Dev*, **7**, 331-337.

- Brown D, Kogan S, Lagasse E, Weissman I, Alcalay M, Pelicci PG, Atwater S, and Bishop JM (1997) A PMLRARalpha transgene initiates murine acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 2551-2556.
- Brown P, McIntyre E, Rau R, Meshinchi S, Lacayo N, Dahl G, Alonzo TA, Chang M, Arceci RJ, and Small D (2007) The incidence and clinical significance of nucleophosmin mutations in childhood AML. *Blood*, **110**, 979-985.
- Carlos TM and Harlan JM (1994) Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood*, **84**, 2068-2101.
- Castellone MD, Teramoto H, Williams BO, Druey KM, and Gutkind JS (2005) Prostaglandin E2 promotes colon cancer cell growth through a Gs-axin-beta-catenin signaling axis. *Science*, **310**, 1504-1510.
- Castilla LH, Wijmenga C, Wang Q, Stacy T, Speck NA, Eckhaus M, Marin-Padilla M, Collins FS, Wynshaw-Boris A, and Liu PP (1996) Failure of embryonic hematopoiesis and lethal hemorrhages in mouse embryos heterozygous for a knocked-in leukemia gene CFBF-MYH11. *Cell*, **87**, 687-696.
- Cave H, Cacheux V, Raynaud S, Brunie G, Bakkus M, Cochaux P, Preudhomme C, Lai JL, Vilmer E, and Grandchamp B (1997) ETV6 is the target of chromosome 12p deletions in t(12;21) childhood acute lymphocytic leukemia. *Leukemia*, **11**, 1459-1464.
- Chakrabarti SR and Nucifora G (1999) The leukemia-associated gene TEL encodes a transcription repressor which associates with SMRT and mSin3A. *Biochem Biophys Res Commun*, **264**, 871-877.
- Chase A, Reiter A, Burci L, Cazzaniga G, Biondi A, Pickard J, Roberts IA, Goldman JM, and Cross NC (1999) Fusion of ETV6 to the caudal-related homeobox gene CDX2 in acute myeloid leukemia with the t(12;13)(p13;q12). *Blood*, **93**, 1025-1031.
- Chen TC, Hinton DR, Zidovetzki R, and Hofman FM (1998) Up-regulation of the cAMP/PKA pathway inhibits proliferation, induces differentiation, and leads to apoptosis in malignant gliomas. *Lab Invest*, **78**, 165-174.
- Cretolle C, Pelet A, Sanlaville D, Zerah M, Amiel J, Jaubert F, Revillon Y, Baala L, Munnich A, Nihoul-Fekete C, and Lyonnet S (2008) Spectrum of HLXB9 gene mutations in Currarino syndrome and genotype-phenotype correlation. *Hum Mutat*, **29**, 903-910.
- Dalton WT, Jr., Ahearn MJ, McCredie KB, Freireich EJ, Stass SA, and Trujillo JM (1988) HL-60 cell line was derived from a patient with FAB-M2 and not FAB-M3. *Blood*, **71**, 242-247.
- Deguchi Y and Kehrl JH (1991) Selective expression of two homeobox genes in CD34-positive cells from human bone marrow. *Blood*, **78**, 323-328.
- Di NR, Lo PC, Schiavone EM, Ferrara F, Manzo C, Vacca C, and Del VL (1996) All-trans retinoic acid (ATRA) and the regulation of adhesion molecules in acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*, **21**, 201-209.
- Downing JR and Shannon KM (2002) Acute leukemia: a pediatric perspective. *Cancer Cell*, **2**, 437-445.

- Drabkin HA, Parsy C, Ferguson K, Guilhot F, Lacotte L, Roy L, Zeng C, Baron A, Hunger SP, Varella-Garcia M, Gemmill R, Brizard F, Brizard A, and Roche J (2002) Quantitative HOX expression in chromosomally defined subsets of acute myelogenous leukemia. *Leukemia*, **16**, 186-195.
- Drach J, McQueen T, Engel H, Andreeff M, Robertson KA, Collins SJ, Malavasi F, and Mehta K (1994) Retinoic acid-induced expression of CD38 antigen in myeloid cells is mediated through retinoic acid receptor-alpha. *Cancer Res*, **54**, 1746-1752.
- Dube ID, Kamel-Reid S, Yuan CC, Lu M, Wu X, Corpus G, Raimondi SC, Crist WM, Carroll AJ, Minowada J, and . (1991) A novel human homeobox gene lies at the chromosome 10 breakpoint in lymphoid neoplasias with chromosomal translocation t(10;14). *Blood*, **78**, 2996-3003.
- Fenaux P, Chevret S, Guerci A, Fegueux N, Dombret H, Thomas X, Sanz M, Link H, Maloisel F, Gardin C, Bordessoule D, Stoppa AM, Sadoun A, Muus P, Wandt H, Mineur P, Whittaker JA, Fey M, Daniel MT, Castaigne S, and Degos L (2000) Long-term follow-up confirms the benefit of all-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. European APL group. *Leukemia*, **14**, 1371-1377.
- Ferguson EC, Talley P, and Vora A (2005) Translocation (6;17)(q23;q11.2): a novel cytogenetic abnormality in congenital acute myeloid leukemia? *Cancer Genet Cytogenet*, **163**, 71-73.
- Fialkow PJ, Raskind WR, Singer JW, Dow LW, Najfeld V, and Veith R (1989) Clonal development of the acute leukemias. *Bone Marrow Transplant*, **4 Suppl 1**, 76-78.
- Galliot B, de VC, and Miller D (1999) Evolution of homeobox genes: Q50 Paired-like genes founded the Paired class. *Dev Genes Evol*, **209**, 186-197.
- Gehring WJ, Qian YQ, Billeter M, Furukubo-Tokunaga K, Schier AF, Resendez-Perez D, Affolter M, Otting G, and Wuthrich K (1994) Homeodomain-DNA recognition. *Cell*, **78**, 211-223.
- Ghannam G, Takeda A, Camarata T, Moore MA, Viale A, and Yaseen NR (2004) The oncogene Nup98-HOXA9 induces gene transcription in myeloid cells. *J Biol Chem*, **279**, 866-875.
- Goemans BF, Zwaan CM, Miller M, Zimmermann M, Harlow A, Meshinchi S, Loonen AH, Hahlen K, Reinhardt D, Creutzig U, Kaspers GJ, and Heinrich MC (2005) Mutations in KIT and RAS are frequent events in pediatric core-binding factor acute myeloid leukemia. *Leukemia*, **19**, 1536-1542.
- Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, Coller H, Loh ML, Downing JR, Caligiuri MA, Bloomfield CD, and Lander ES (1999) Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science*, **286**, 531-537.
- Graf M, Reif S, Kroll T, Hecht K, Nuessler V, and Schmetzer H (2006b) Expression of MAC-1 (CD11) in acute myeloid leukemia (AML) is associated with an unfavorable prognosis. *Am J Hematol*, **81**, 227-235.
- Greaves MF and Wiemels J (2003) Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer*, **3**, 639-649.

- Haferlach T, Kohlmann A, Schnittger S, Dugas M, Hiddemann W, Kern W, and Schoch C (2005) Global approach to the diagnosis of leukemia using gene expression profiling. *Blood*, **106**, 1189-1198.
- Hagan DM, Ross AJ, Strachan T, Lynch SA, Ruiz-Perez V, Wang YM, Scambler P, Custard E, Reardon W, Hassan S, Nixon P, Papapetrou C, Winter RM, Edwards Y, Morrison K, Barrow M, Cordier-Alex MP, Correia P, Galvin-Parton PA, Gaskill S, Gaskin KJ, Garcia-Minaur S, Gereige R, Hayward R, and Homfray T (2000) Mutation analysis and embryonic expression of the HLXB9 Currarino syndrome gene. *Am J Hum Genet*, **66**, 1504-1515.
- Han K and Manley JL (1993) Functional domains of the Drosophila Engrailed protein. *EMBO J*, **12**, 2723-2733.
- Harris SG, Padilla J, Koumas L, Ray D, and Phipps RP (2002) Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol*, **23**, 144-150.
- Harrison KA, Druey KM, Deguchi Y, Tuscano JM, and Kehrl JH (1994) A novel human homeobox gene distantly related to proboscipedia is expressed in lymphoid and pancreatic tissues. *J Biol Chem*, **269**, 19968-19975.
- Harrison KA, Thaler J, Pfaff SL, Gu H, and Kehrl JH (1999) Pancreas dorsal lobe agenesis and abnormal islets of Langerhans in Hlxb9-deficient mice. *Nat Genet*, **23**, 71-75.
- Hayakawa J, Mittal S, Wang Y, Korkmaz KS, Adamson E, English C, Ohmichi M, McClelland M, and Mercola D (2004) Identification of promoters bound by c-Jun/ATF2 during rapid large-scale gene activation following genotoxic stress. *Mol Cell*, **16**, 521-535.
- Hess JL, Bittner CB, Zeisig DT, Bach C, Fuchs U, Borkhardt A, Frampton J, and Slany RK (2006) c-Myb is an essential downstream target for homeobox-mediated transformation of hematopoietic cells. *Blood*, **108**, 297-304.
- Hiebert SW, Sun W, Davis JN, Golub T, Shurtleff S, Buijs A, Downing JR, Grosveld G, Roussel MF, Gilliland DG, Lenny N, and Meyers S (1996) The t(12;21) translocation converts AML-1B from an activator to a repressor of transcription. *Mol Cell Biol*, **16**, 1349-1355.
- Hollington P, Neufing P, Kalionis B, Waring P, Bentel J, Wattchow D, and Tilley WD (2004) Expression and localization of homeodomain proteins DLX4, HB9 and HB24 in malignant and benign human colorectal tissues. *Anticancer Res*, **24**, 955-962.
- Hong SH, David G, Wong CW, Dejean A, and Privalsky ML (1997) SMRT corepressor interacts with PLZF and with the PML-retinoic acid receptor alpha (RARalpha) and PLZF-RARalpha oncoproteins associated with acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 9028-9033.
- Horton RM, Hunt HD, Ho SN, Pullen JK, and Pease LR (1989) Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene*, **77**, 61-68.
- Howe A, Aplin AE, Alahari SK, and Juliano RL (1998) Integrin signaling and cell growth control. *Curr Opin Cell Biol*, **10**, 220-231.
- Impey S, McCorkle SR, Cha-Molstad H, Dwyer JM, Yochum GS, Boss JM, McWeeney S, Dunn JJ, Mandel G, and Goodman RH (2004) Defining the CREB regulon: a genome-wide analysis of transcription factor regulatory regions. *Cell*, **119**, 1041-1054.

- Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, and Speed TP (2003) Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics*, **4**, 249-264.
- Jothi R, Cuddapah S, Barski A, Cui K, and Zhao K (2008) Genome-wide identification of in vivo protein-DNA binding sites from CHIP-Seq data. *Nucleic Acids Res*, **36**, 5221-5231.
- Karlin S, Chen C, Gentles AJ, and Cleary M (2002) Associations between human disease genes and overlapping gene groups and multiple amino acid runs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 17008-17013.
- Kaspers GJ and Creutzig U (2005) Pediatric acute myeloid leukemia: international progress and future directions. *Leukemia*, **19**, 2025-2029.
- Kataoka K, Yoshitomo-Nakagawa K, Shioda S, and Nishizawa M (2001) A set of Hox proteins interact with the Maf oncoprotein to inhibit its DNA binding, transactivation, and transforming activities. *J Biol Chem*, **276**, 819-826.
- Kawagoe H, Humphries RK, Blair A, Sutherland HJ, and Hogge DE (1999) Expression of HOX genes, HOX cofactors, and MLL in phenotypically and functionally defined subpopulations of leukemic and normal human hematopoietic cells. *Leukemia*, **13**, 687-698.
- Khanna KK and Jackson SP (2001) DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet*, **27**, 247-254.
- Kim CA, Phillips ML, Kim W, Gingery M, Tran HH, Robinson MA, Faham S, and Bowie JU (2001) Polymerization of the SAM domain of TEL in leukemogenesis and transcriptional repression. *EMBO J*, **20**, 4173-4182.
- Krivtsov AV and Armstrong SA (2007) MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. *Nat Rev Cancer*, **7**, 823-833.
- Krumlauf R (1994) Hox genes in vertebrate development. *Cell*, **78**, 191-201.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lange BJ, Kobrinsky N, Barnard DR, Arthur DC, Buckley JD, Howells WB, Gold S, Sanders J, Neudorf S, Smith FO, and Woods WG (1998) Distinctive demography, biology, and outcome of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome in children with Down syndrome: Children's Cancer Group Studies 2861 and 2891. *Blood*, **91**, 608-615.
- Lavoie H, Debeane F, Trinh QD, Turcotte JF, Corbeil-Girard LP, Dicaire MJ, Saint-Denis A, Page M, Rouleau GA, and Brais B (2003) Polymorphism, shared functions and convergent evolution of genes with sequences coding for polyalanine domains. *Hum Mol Genet*, **12**, 2967-2979.
- Lawrence HJ, Rozenfeld S, Cruz C, Matsukuma K, Kwong A, Komuves L, Buchberg AM, and Largman C (1999) Frequent co-expression of the HOXA9 and MEIS1 homeobox genes in human myeloid leukemias. *Leukemia*, **13**, 1993-1999.
- Li H, Arber S, Jessell TM, and Edlund H (1999) Selective agenesis of the dorsal pancreas in mice lacking homeobox gene Hlxb9. *Nat Genet*, **23**, 67-70.

- Licht JD, Grossel MJ, Figge J, and Hansen UM (1990) Drosophila Kruppel protein is a transcriptional repressor. *Nature*, **346**, 76-79.
- Malissein E, Reynaud S, Bordessoule D, Faucher JL, Turlure P, Trimoreau F, and Denizot Y (2006) PGE(2) receptor subtype functionality on immature forms of human leukemic blasts. *Leuk Res*, **30**, 1309-1313.
- Mallo GV, Rechreche H, Frigerio JM, Rocha D, Zweibaum A, Lacasa M, Jordan BR, Dusetti NJ, Dagorn JC, and Iovanna JL (1997) Molecular cloning, sequencing and expression of the mRNA encoding human Cdx1 and Cdx2 homeobox. Down-regulation of Cdx1 and Cdx2 mRNA expression during colorectal carcinogenesis. *Int J Cancer*, **74**, 35-44.
- Mann G, Reinhardt D, Ritter J, Hermann J, Schmitt K, Gadner H, and Creutzig U (2001) Treatment with all-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia reduces early deaths in children. *Ann Hematol*, **80**, 417-422.
- Mann RS (1995) The specificity of homeotic gene function. *Bioessays*, **17**, 855-863.
- Mann RS and Affolter M (1998) Hox proteins meet more partners. *Curr Opin Genet Dev*, **8**, 423-429.
- Mann RS and Chan SK (1996) Extra specificity from extradenticle: the partnership between HOX and PBX/EXD homeodomain proteins. *Trends Genet*, **12**, 258-262.
- Martin M, Gallego-Llamas J, Ribes V, Kedinger M, Niederreither K, Chambon P, Dolle P, and Gradwohl G (2005) Dorsal pancreas agenesis in retinoic acid-deficient Raldh2 mutant mice. *Dev Biol*, **284**, 399-411.
- Mavrothalassitis G and Ghysdael J (2000) Proteins of the ETS family with transcriptional repressor activity. *Oncogene*, **19**, 6524-6532.
- Mayr B and Montminy M (2001) Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 599-609.
- Meshinchi S, Smith FO, and Arceci RJ (2003) Prognostic factors and risk-based therapy in pediatric acute myeloid leukemia. *Curr Oncol Rep*, **5**, 489-497.
- Mielke C, Tummler M, Schubeler D, von H, I, and Hauser H (2000) Stabilized, long-term expression of heterodimeric proteins from tricistronic mRNA. *Gene*, **254**, 1-8.
- Milne TA, Martin ME, Brock HW, Slany RK, and Hess JL (2005) Leukemogenic MLL fusion proteins bind across a broad region of the Hox a9 locus, promoting transcription and multiple histone modifications. *Cancer Res*, **65**, 11367-11374.
- Moens CB and Selleri L (2006) Hox cofactors in vertebrate development. *Dev Biol*, **291**, 193-206.
- Moretti P, Simmons P, Thomas P, Haylock D, Rathjen P, Vadas M, and D'Andrea R (1994) Identification of homeobox genes expressed in human haemopoietic progenitor cells. *Gene*, **144**, 213-219.
- Moritz T, Dutt P, Xiao X, Carstanjen D, Vik T, Hanenberg H, and Williams DA (1996) Fibronectin improves transduction of reconstituting hematopoietic stem cells by retroviral vectors: evidence of direct viral binding to chymotryptic carboxy-terminal fragments. *Blood*, **88**, 855-862.

- Nagel S, Kaufmann M, Scherr M, Drexler HG, and MacLeod RA (2005) Activation of HLXB9 by juxtaposition with MYB via formation of t(6;7)(q23;q36) in an AML-M4 cell line (GDM-1). *Genes Chromosomes Cancer*, **42**, 170-178.
- Neufing PJ, Kalionis B, Horsfall DJ, Ricciardelli C, Stahl J, Vivekanandan S, Raymond W, and Tilley WD (2003) Expression and localization of homeodomain proteins DLX4/HLXB9 in normal and malignant human breast tissues. *Anticancer Res*, **23**, 1479-1488.
- Nickoloff JA, De Haro LP, Wray J, and Hromas R (2008) Mechanisms of leukemia translocations. *Curr Opin Hematol*, **15**, 338-345.
- Pabst T, Mueller BU, Harakawa N, Schoch C, Haferlach T, Behre G, Hiddemann W, Zhang DE, and Tenen DG (2001) AML1-ETO downregulates the granulocytic differentiation factor C/EBPalpha in t(8;21) myeloid leukemia. *Nat Med*, **7**, 444-451.
- Paietta E, Andersen J, and Wiernik PH (1996) A new approach to analyzing the utility of immunophenotyping for predicting clinical outcome in acute leukemia. Eastern Cooperative Oncology Group. *Leukemia*, **10**, 1-4.
- Paquette J and Tokuyasu T (2010) EGAN: exploratory gene association networks. *Bioinformatics*, **26**, 285-286.
- Pui CH, Ribeiro RC, Campana D, Raimondi SC, Hancock ML, Behm FG, Sandlund JT, Rivera GK, Evans WE, Crist WM, and Krance R (1996) Prognostic factors in the acute lymphoid and myeloid leukemias of infants. *Leukemia*, **10**, 952-956.
- Rabbitts TH (1994) Chromosomal translocations in human cancer. *Nature*, **372**, 143-149.
- Raimondi SC, Chang MN, Ravindranath Y, Behm FG, Gresik MV, Steuber CP, Weinstein HJ, and Carroll AJ (1999) Chromosomal abnormalities in 478 children with acute myeloid leukemia: clinical characteristics and treatment outcome in a cooperative pediatric oncology group study-POG 8821. *Blood*, **94**, 3707-3716.
- Rawat VP, Cusan M, Deshpande A, Hiddemann W, Quintanilla-Martinez L, Humphries RK, Bohlander SK, Feuring-Buske M, and Buske C (2004) Ectopic expression of the homeobox gene Cdx2 is the transforming event in a mouse model of t(12;13)(p13;q12) acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 817-822.
- Regan JW (2003) EP2 and EP4 prostanoid receptor signaling. *Life Sci*, **74**, 143-153.
- Reinherz EL, Kung PC, Goldstein G, Levey RH, and Schlossman SF (1980) Discrete stages of human intrathymic differentiation: analysis of normal thymocytes and leukemic lymphoblasts of T-cell lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**, 1588-1592.
- Renstrom J, Kroger M, Peschel C, and Oostendorp RA (2010) How the niche regulates hematopoietic stem cells. *Chem Biol Interact*, **184**, 7-15.
- Rosenbauer F and Tenen DG (2007) Transcription factors in myeloid development: balancing differentiation with transformation. *Nat Rev Immunol*, **7**, 105-117.
- Rosner F and Lee SL (1972) Down's syndrome and acute leukemia: myeloblastic or lymphoblastic? Report of forty-three cases and review of the literature. *Am J Med*, **53**, 203-218.

- Ross AJ, Ruiz-Perez V, Wang Y, Hagan DM, Scherer S, Lynch SA, Lindsay S, Custard E, Belloni E, Wilson DI, Wadey R, Goodman F, Orstavik KH, Monclair T, Robson S, Reardon W, Burn J, Scambler P, and Strachan T (1998) A homeobox gene, HLXB9, is the major locus for dominantly inherited sacral agenesis. *Nat Genet*, **20**, 358-361.
- Ross ME, Mahfouz R, Onciu M, Liu HC, Zhou X, Song G, Shurtleff SA, Pounds S, Cheng C, Ma J, Ribeiro RC, Rubnitz JE, Girtman K, Williams WK, Raimondi SC, Liang DC, Shih LY, Pui CH, and Downing JR (2004) Gene expression profiling of pediatric acute myelogenous leukemia. *Blood*, **104**, 3679-3687.
- Saha MS, Miles RR, and Grainger RM (1997) Dorsal-ventral patterning during neural induction in *Xenopus*: assessment of spinal cord regionalization with xHB9, a marker for the motor neuron region. *Dev Biol*, **187**, 209-223.
- Sanger F, Nicklen S, and Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-5467.
- Sauvageau G, Thorsteinsdottir U, Eaves CJ, Lawrence HJ, Largman C, Lansdorp PM, and Humphries RK (1995) Overexpression of HOXB4 in hematopoietic cells causes the selective expansion of more primitive populations in vitro and in vivo. *Genes Dev*, **9**, 1753-1765.
- Sauvageau G, Thorsteinsdottir U, Hough MR, Hugo P, Lawrence HJ, Largman C, and Humphries RK (1997) Overexpression of HOXB3 in hematopoietic cells causes defective lymphoid development and progressive myeloproliferation. *Immunity*, **6**, 13-22.
- Schoch C, Kohlmann A, Schnittger S, Brors B, Dugas M, Mergenthaler S, Kern W, Hiddemann W, Eils R, and Haferlach T (2002) Acute myeloid leukemias with reciprocal rearrangements can be distinguished by specific gene expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 10008-10013.
- Shankar DB, Cheng JC, and Sakamoto KM (2005) Role of cyclic AMP response element binding protein in human leukemias. *Cancer*, **104**, 1819-1824.
- Shaywitz AJ and Greenberg ME (1999) CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem*, **68**, 821-861.
- Shen WF, Montgomery JC, Rozenfeld S, Moskow JJ, Lawrence HJ, Buchberg AM, and Largman C (1997) AbdB-like Hox proteins stabilize DNA binding by the Meis1 homeodomain proteins. *Mol Cell Biol*, **17**, 6448-6458.
- Shimada A, Taki T, Tabuchi K, Taketani T, Hanada R, Tawa A, Tsuchida M, Horibe K, Tsukimoto I, and Hayashi Y (2008) Tandem duplications of MLL and FLT3 are correlated with poor prognoses in pediatric acute myeloid leukemia: a study of the Japanese childhood AML Cooperative Study Group. *Pediatr Blood Cancer*, **50**, 264-269.
- Sieff C, Bicknell D, Caine G, Robinson J, Lam G, and Greaves MF (1982) Changes in cell surface antigen expression during hemopoietic differentiation. *Blood*, **60**, 703-713.
- Simmons HM, Oseth L, Nguyen P, O'Leary M, Conklin KF, and Hirsch B (2002) Cytogenetic and molecular heterogeneity of 7q36/12p13 rearrangements in childhood AML. *Leukemia*, **16**, 2408-2416.
- Skalnik DG, Strauss EC, and Orkin SH (1991) CCAAT displacement protein as a repressor of the myelomonocytic-specific gp91-phox gene promoter. *J Biol Chem*, **266**, 16736-16744.

- Slany RK (2009) The molecular biology of mixed lineage leukemia. *Haematologica*, **94**, 984-993.
- Slater RM, von DE, Kroes WG, Weghuis DO, van den BE, Smit EM, van der Does-van den Berg, van WE, Hahlen K, Carroll AJ, Raimondi SC, and Beverloo HB (2001) t(7;12)(q36;p13) and t(7;12)(q32;p13)--translocations involving ETV6 in children 18 months of age or younger with myeloid disorders. *Leukemia*, **15**, 915-920.
- Smyth GK (2004) Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol*, **3**, Article3.
- Sorensen PH, Chen CS, Smith FO, Arthur DC, Domer PH, Bernstein ID, Korsmeyer SJ, Hammond GD, and Kersey JH (1994) Molecular rearrangements of the MLL gene are present in most cases of infant acute myeloid leukemia and are strongly correlated with monocytic or myelomonocytic phenotypes. *J Clin Invest*, **93**, 429-437.
- Stafford D and Prince VE (2002) Retinoic acid signaling is required for a critical early step in zebrafish pancreatic development. *Curr Biol*, **12**, 1215-1220.
- Stashenko P, Nadler LM, Hardy R, and Schlossman SF (1981) Expression of cell surface markers after human B lymphocyte activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **78**, 3848-3852.
- Sugino Y, Misawa A, Inoue J, Kitagawa M, Hosoi H, Sugimoto T, Imoto I, and Inazawa J (2007) Epigenetic silencing of prostaglandin E receptor 2 (PTGER2) is associated with progression of neuroblastomas. *Oncogene*, **26**, 7401-7413.
- Takadera T, Shiraishi Y, and Ohyashiki T (2004) Prostaglandin E2 induced caspase-dependent apoptosis possibly through activation of EP2 receptors in cultured hippocampal neurons. *Neurochem Int*, **45**, 713-719.
- Taketani T, Taki T, Sako M, Ishii T, Yamaguchi S, and Hayashi Y (2008) MNX1-ETV6 fusion gene in an acute megakaryoblastic leukemia and expression of the MNX1 gene in leukemia and normal B cell lines. *Cancer Genet Cytogenet*, **186**, 115-119.
- Thorsteinsdottir U, Kroon E, Jerome L, Blasi F, and Sauvageau G (2001) Defining roles for HOX and MEIS1 genes in induction of acute myeloid leukemia. *Mol Cell Biol*, **21**, 224-234.
- Tosi S, Harbott J, Teigler-Schlegel A, Haas OA, Pirc-Danoewinata H, Harrison CJ, Biondi A, Cazzaniga G, Kempfski H, Scherer SW, and Kearney L (2000) t(7;12)(q36;p13), a new recurrent translocation involving ETV6 in infant leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*, **29**, 325-332.
- Tosi S, Hughes J, Scherer SW, Nakabayashi K, Harbott J, Haas OA, Cazzaniga G, Biondi A, Kempfski H, and Kearney L (2003) Heterogeneity of the 7q36 breakpoints in the t(7;12) involving ETV6 in infant leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*, **38**, 191-200.
- Vairo G, Argyriou S, Bordun AM, Whitty G, and Hamilton JA (1990) Inhibition of the signaling pathways for macrophage proliferation by cyclic AMP. Lack of effect on early responses to colony stimulating factor-1. *J Biol Chem*, **265**, 2692-2701.
- Valk PJ, Verhaak RG, Beijnen MA, Erpelinck CA, Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani, Boer JM, Beverloo HB, Moorhouse MJ, van der Spek PJ, Lowenberg B, and Delwel R (2004) Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*, **350**, 1617-1628.

- Valouev A, Johnson DS, Sundquist A, Medina C, Anton E, Batzoglou S, Myers RM, and Sidow A (2008) Genome-wide analysis of transcription factor binding sites based on ChIP-Seq data. *Nat Methods*, **5**, 829-834.
- Vardiman JW, Harris NL, and Brunning RD (2002) The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*, **100**, 2292-2302.
- Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellstrom-Lindberg E, Tefferi A, and Bloomfield CD (2009) The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*, **114**, 937-951.
- von Bergh AR, van DE, van Wering ER, Van Zutven LJ, Hainmann I, Lonnerholm G, Meijerink JP, Pieters R, and Beverloo HB (2006) High incidence of t(7;12)(q36;p13) in infant AML but not in infant ALL, with a dismal outcome and ectopic expression of HLXB9. *Genes Chromosomes Cancer*, **45**, 731-739.
- Wang LC, Kuo F, Fujiwara Y, Gilliland DG, Golub TR, and Orkin SH (1997) Yolk sac angiogenic defect and intra-embryonic apoptosis in mice lacking the Ets-related factor TEL. *EMBO J*, **16**, 4374-4383.
- Wang LC, Swat W, Fujiwara Y, Davidson L, Visvader J, Kuo F, Alt FW, Gilliland DG, Golub TR, and Orkin SH (1998) The TEL/ETV6 gene is required specifically for hematopoiesis in the bone marrow. *Genes Dev*, **12**, 2392-2402.
- Wasylyk B, Hahn SL, and Giovane A (1993) The Ets family of transcription factors. *Eur J Biochem*, **211**, 7-18.
- Wells RJ, Arthur DC, Srivastava A, Heerema NA, Le BM, Alonzo TA, Buxton AB, Woods WG, Howells WB, Benjamin DR, Betcher DL, Buckley JD, Feig SA, Kim T, Odom LF, Ruymann FB, Smithson WA, Tannous R, Whitt JK, Wolff L, Tjoa T, and Lampkin BC (2002) Prognostic variables in newly diagnosed children and adolescents with acute myeloid leukemia: Children's Cancer Group Study 213. *Leukemia*, **16**, 601-607.
- Wildenhain S, Ruckert C, Rottgers S, Harbott J, Ludwig WD, Schuster FR, Beldjord K, Binder V, Slany R, Hauer J, and Borkhardt A (2010) Expression of cell-cell interacting genes distinguishes HLXB9/TEL from MLL-positive childhood acute myeloid leukemia. *Leukemia*, **24**, 1657-1660.
- Zeisig BB, Milne T, Garcia-Cuellar MP, Schreiner S, Martin ME, Fuchs U, Borkhardt A, Chanda SK, Walker J, Soden R, Hess JL, and Slany RK (2004) Hoxa9 and Meis1 are key targets for MLL-ENL-mediated cellular immortalization. *Mol Cell Biol*, **24**, 617-628.
- Zeisig BB, Schreiner S, Garcia-Cuellar MP, and Slany RK (2003) Transcriptional activation is a key function encoded by MLL fusion partners. *Leukemia*, **17**, 359-365.
- Zhang X, Odom DT, Koo SH, Conkright MD, Canettieri G, Best J, Chen H, Jenner R, Herbolsheimer E, Jacobsen E, Kadam S, Ecker JR, Emerson B, Hogenesch JB, Unterman T, Young RA, and Montminy M (2005) Genome-wide analysis of cAMP-response element binding protein occupancy, phosphorylation, and target gene activation in human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 4459-4464.
- Zwaan CM, Meshinchi S, Radich JP, Veerman AJ, Huismans DR, Munske L, Podleschny M, Hahlen K, Pieters R, Zimmermann M, Reinhardt D, Harbott J, Creutzig U, Kaspers GJ, and

Griesinger F (2003) FLT3 internal tandem duplication in 234 children with acute myeloid leukemia: prognostic significance and relation to cellular drug resistance. *Blood*, **102**, 2387-2394.

7. Anhang

7.1 Materialien

7.1.1 Patientenproben, Zell-Linien, Tiere und Bakterien

Patientenproben:

Das verwendete Patientenmaterial wurde von den Referenzlaboratorien Gießen und Hannover zur Verfügung gestellt. Die Zustimmung zur molekularbiologischen Charakterisierung wurde im Rahmen der Therapieprotokolle eingeholt. Die zytogenetischen Befunde der t(7;12) pos. Patienten sind im Abschnitt 4.1.2, Tab. 2 dargestellt. In der Tab. 4 sind die 11q23/*MLL* pos. Patienten charakterisiert. Unter (a) sind die zytogenetischen Merkmale der t(9;11)-*MLL/AF9* pos. AML Patienten, welche für die Affymetrix Expressions-Analysen verwendet wurden, dargestellt. Unter (b) sind die 11q23/*MLL* pos. AML/ALL Patienten aufgelistet, welche für die qRT-PCR Analysen (*HOXA9*, *MEIS1*, *c-MYB*) verwendet wurden.

Tab. 4: Charakterisierung der 11q23/*MLL* pos. Patienten. (a) t(9;11) pos. Patienten: Darstellung des Alters in Jahren, dem entsprechenden Karyotyp, Morphologie, Immunologie, V(D)J Rearrangement und der Expression von CD34 und CD117 in %. Die *MLL/AF9* Fusion wurde mittels FISH-Analyse und PCR im entsprechenden zytogenetischen Labor bestimmt. **(b)** 11q23/*MLL* pos. Patienten: Darstellung des Alters in Jahren, dem entsprechenden Karyotyp, Diagnose und Translokation (FISH). nv=nicht verfügbar

(a)							
Alter in Jahren	Karyotyp	Diagnose/ Morphologie	Immunologie	V(D)J	CD34 %	CD117 %	
0,65	46,XX,add(1)(p22),-10,der(17)?i(17)(p10),+mar	AML M5	CD4/CD56	nv	1	8	
0,84	kein Ergebnis	AML M5	CD4/CD56	nv	0	49	
0,76	46,XY,t(9;11)(p22;q23)	AML M5	nv	nv	nv	nv	
1,4	46,XX,t(2;15)(p25;q13)[5]/46,iden,t(9;11)(p22;q23)[6]	AML	CD4/CD7	nv	0	65	
0,32	kein Ergebnis	AML M5	nv	neg	nv.	nv	
1,54	46,XY,ins(9;11)(p22;q12q23.3)[8]/46,XY[7]	AML M5	CD4/CD7	nv	1	14	

(b)			
Alter in Jahren	Karyotyp	Diagnose/ Morphologie	FISH
0,52	46,XX,der(11)t(11;19)(q23;p13),inc[cp6]	ALL	MLL/ENL
0,22	kein Ergebnis	ALL	MLL/AF4
0,13	46,XX,t(4;11)(q21;q23),inc/46,XX,inc	ALL	MLL/AF5
0,12	46,XY,del(6)(q2?4),add(11)(q21),?add(6)(p24)	AML	nv
1,3	kein Ergebnis	AML	MLL/AF10
0,55	kein Ergebnis	ALL	MLL/ENL
0,01	kein Ergebnis	ALL	MLL/ENL
0,09	kein Ergebnis	ALL	MLL/ENL
0,32	kein Ergebnis	AML	MLL/AF9

Zell-Linien:

Verwendete Zell-Linien wurden vom DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig) erworben und sind mit der entsprechenden ACC Nummer gekennzeichnet. Zell-Linien ohne ACC-Nummer waren bereits im Labor vorhanden.

HL60	Humane AML Zellen, FAB M2 (Collins <i>et al.</i> , 1977), # ACC 3
HEK 293T	Humane, embryonale Nierenzellen, (Pear <i>et al.</i> , 1993)
GDM1	Humane akute myelomonozytäre Leukämie Zellen (Ben-Bassat <i>et al.</i> , 1982), # ACC 87
Jurkat	Humane T-Zell-Leukämie-Linie (Schneider <i>et al.</i> , 1977), # ACC 282
EcoPhoenix	Humane, embryonale Nierenzellen, retrovirale Verpackungszell-Linie

Tiere:

Bei den tierexperimentellen Untersuchungen handelte es sich ausschließlich um einen Finalversuch. Für die Gewinnung von murinen Stammzellen wurden Wildtyp Mäuse des Stammes C57BL/6 im Alter von 4-8 Wochen verwendet. Die Tiere wurden in der Tierversuchsanstalt der Heinrich-Heine-Universität gezüchtet.

Bakterien:

Für die Gewinnung von Plasmid-DNA wurden *E. coli* „OneShot[®] Top10“ kompetente Zellen (Invitrogen) verwendet.

7.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Alle verwendeten allgemeinen Chemikalien sowie kommerzielle Lösungen wurden von Merck, Sigma oder Roth in p.a. Qualität bezogen. Die Herkunft ist unter dem jeweiligen Versuchsprotokoll angegeben. Die Zusammensetzung von verwendeten Puffern und Lösungen ist ebenfalls in dem entsprechenden Absatz des Methodenteiles angegeben.

7.1.3 Nährmedien und Zusätze für Bakterien- und Zell-Kultur

Alle Plastikmaterialien für die Bakterien- und Zell-Kultur wurden von Corning Costar, Bodenheim, BD Falcon, Bedford, MA, U.S.A, Nalgene Labware, Rochester, NY, USA oder Peqlab, Erlangen bezogen.

Für die Bakterienkultur wurde LB-Agar und LB-Broth-base der Firma Sigma-Aldrich, München verwendet.

Nährmedien und Zusätze für die Zell-Kultur:

DMEM + GlutaMAX™	GIBCO® Invitrogen, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München
Dulbecco's PBS 1x	PAA, Pasching, Österreich
FKS (fötale Kälberserum)	PAA, Pasching, Österreich
Formaldehyd, 37%ig	Sigma-Adrich, München
L-Glutamin 200 mM	GIBCO® Invitrogen, Darmstadt
MACS-Puffer	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Polyethylenimine Transfektionsreagenz (PEI)	Sigma-Aldrich, München
Penicillin/Streptomycin 100x (P/S)	PAA, Pasching, Österreich
Protaminsulfat	Sigma-Adrich, München
Puromycin	Sigma-Aldrich, München
Retronektin	TaKaRa, Otsu, Japan
RPMI 1640 + stabilem Glutamin	PAA, Pasching, Österreich
StemSpan SFEM	Stemcell Technologies, Köln
Trypanblau	Sigma-Aldrich, München
Trypsin/EDTA 1x	PAA, Pasching, Österreich

7.1.4 Kommerziell erhältliche Systeme (Kits)

ChIP-on-Chip:

SimpleChIP Enzymatic Chromatin IP Kit	Cell Signaling Technology, Danvers MA, USA
---------------------------------------	--

DNA-Aufreinigung:

PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Gelextraction Kit	Qiagen, Hilden

Plasmid-Isolierung:

FastPlasmid Mini Prep	5 Prime, Hamburg
NucleoBond®	Macherey-Nagel, Düren

Isolierung von genomischer DNA:

DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen, Hilden
---------------------------	----------------

RNA-Isolierung:

RNAeasy Kit	Qiagen, Hilden
-------------	----------------

7.1.5 Geräte und Apparaturen

3130 Genetic Analyzer, Sequenzier-Gerät	Applied Biosystems, Darmstadt
ABI PRISM® 7900HT, <i>real-time</i> Gerät	Applied Biosystems, Darmstadt
Elektroporator EPI 2500	Dr. Fischer, Heidelberg
FACSCalibur	BD Biosciences, Heidelberg
Fluoreszenz Mikroskop Axiovert-200	Zeiss, Göttingen
Midi MACS, MACS Magnetständer	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Mini-PROTEAN Elektrophorese und Trans-Blot System	Bio-Rad, Herkules, USA
NanoDrop® ND-1000	NanoDrop Technologies, Wilmington, USA
Stabsonotrode UP 100H	Hielscher, Teltow
Transilluminator LAS-3000	Fujifilm, Düsseldorf
UV-Transilluminator für Agaosegele	INTAS, Göttingen

Weitere gängige Laborgeräte wie z.B. Zentrifugen sind im entsprechenden Abschnitt des Methodenteils aufgeführt.

7.1.6 Plasmide und Oligonukleotide**Plasmide**

Für die Expression von *HLXB9* und *HLXB9/TEL* in HL60 Zellen, wurde die entsprechende cDNA in den Überexpressionsvektor pMC kloniert (Mielke *et al.*, 2000). In diesem Vektor wird die Expression des entsprechenden Gens an die Expression eines *pac*-Resistenzgens gekoppelt. Die Bildung dieser polycistronischen mRNA wird durch einen CMV-Promoter kontrolliert. Als Translations-Initiation der *pac*-mRNA dient eine interne Ribosomenbindungsstelle (IRES). Eine schematische Darstellung des Ausgangsvektors pMC ist in der Abb. 43 (a) dargestellt.

Für die Herstellung gammaretroviraler Überstände wurde der retrovirale Expressionsvektor pMSCV (Clontech, Mountain View, CA, USA) verwendet. Die Abb. 43 (b) zeigt eine

grafische Übersicht des Vektors. Als elementare Bestandteile sind u.a. das Verpackungssignal Ψ_{+} , sowie eine spezielle 5' LTR (*long terminal repeat*) enthalten, welche eine hohe Expression in hämatopoetischen Stammzellen erlaubt. Für die weitere Verwendung wurde die Sequenz des PKG (*phosphoglycerat kinase*) Promotors und der Puromycin-Resistenz durch einen CMV-Promoter und anschließender GFP-Sequenz ersetzt.

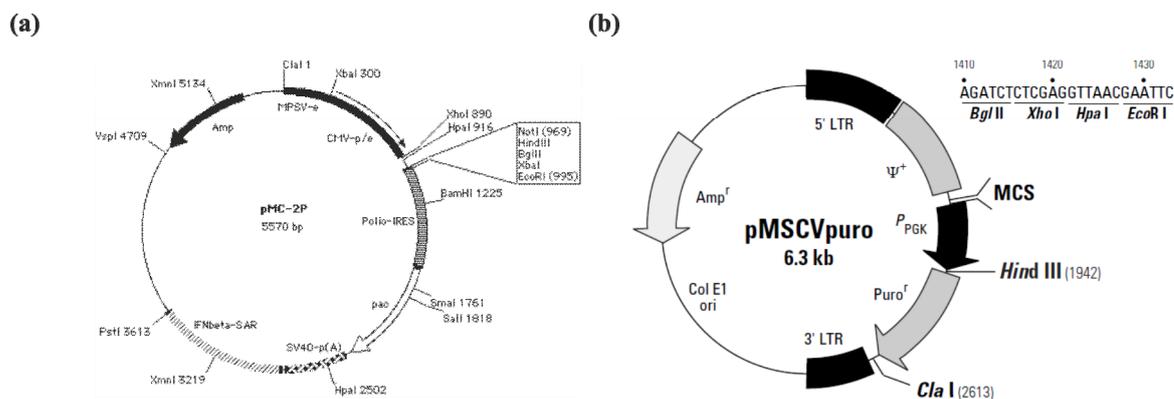


Abb. 43: Übersichtsdarstellung der Ausgangsvektoren pMC und pMSCV.

Oligonukleotide (Primer)

Sämtliche in der Tab. 5 angegebenen Primer wurden von der Firma Eurofins MWG Operon, Ebersberg bezogen.

Tab. 5: Verwendete humane und murine Primer.

humane Primer		
Name	Sequenz 5' → 3'	Verwendung
HLXB9-642F	CTTCCAGCTGGACCAGTGGCTG	HLXB9/TEL Bruchpunkt
TEL R1	CTGAAGGAGTTCATAGAGCACATCAC	HLXB9/TEL Bruchpunkt
HLXB9-651F	CACCGCGGGCATGATCCTGC	HLXB9/TEL Bruchpunkt
TEL-R10	ATCGATAGCGAAAGTCCTCTT	HLXB9/TEL Bruchpunkt
Act-b fwd	TCATGAAGTGTGACGTGGACATC	RT-PCR für β -AKTIN
Act-b rev	CAGGAGGAGCAATGATCTTGATCT	RT-PCR für β -AKTIN
pMC-HB9-fwd	GTACCAAG TTGCCACCATGG	Klonierung von <i>HLXB9</i> in pMC(M52)
pMC-HB9-rev	GATGAATTCTCAGCCCTTGTCG	Klonierung von <i>HLXB9</i> in pMC(M52)
pMC-seq-fwd	GATCCAGCCTCGAGGAACTG	Sequenzierung von pMC(M52) (5' der MCS)
pMC-seq-revII	GTTTTGTGCGTCTAAGTTACG	Sequenzierung von pMC(M52)

(3' der MCS)

<i>HB9_syn</i> 636 fwd	CATCAAGCTGGGAGCCGGA	<i>HLXB9/TEL</i> Bruchpunkt (GENEART Sequenz)
<i>TEL_syn</i> 808 rev	TGGGCCTCAGGCTGAACTCGTT	<i>HLXB9/TEL</i> Bruchpunkt (GENEART Sequenz)
<i>HB9-syn-fwd-RT</i>	CCAAGATGCCCGACTTCAACAG	RT-PCR für <i>HLXB9</i> (GENEART Sequenz)
<i>HB9-syn-rev-RT</i>	CGAATCTCTTGGGCCTGCTC	RT-PCR für <i>HLXB9</i> (GENEART Sequenz)
<i>IL8_transk-fwd</i>	CTGATTTCTGCAGCTCTGTGTG	RT-PCR für <i>IL8</i>
<i>IL8_transk_rev</i>	GGTCCACTCTCAATCACTCTCAG	RT-PCR für <i>IL8</i>
<i>ETS1_trans_fwd</i>	CTTTTATCAGCTGGACAGGAGATG	RT-PCR für <i>ETS1</i>
<i>ETS1_transk_rev</i>	CGTAATAGTAGCGTAGGCCACG	RT-PCR für <i>ETS1</i>
<i>PTGER2 fwd</i>	CATCACCTTCGCCGTCTG	RT-PCR für <i>PTGER2</i>
<i>PTGER2 rev</i>	CTAAGGATGGCAAAGACCCAAG	RT-PCR für <i>PTGER2</i>
<i>PROK2 fwd</i>	CAAGGACTCCCAATGTGGTG	RT-PCR für <i>PROK2</i>
<i>PROK2 rev</i>	CTGGCAGACATGGGCAAG	RT-PCR für <i>PROK2</i>
<i>ZYX fwd</i>	GATCGAGGAATCATTTCCCC	RT-PCR für <i>ZYX</i>
<i>ZYX rev</i>	CATCCAGCAGTGAGGACAGAG	RT-PCR für <i>ZYX</i>
<i>PIK3CG fwd</i>	CTTCGGGCACATTCTTGG	RT-PCR für <i>PIK3CG</i>
<i>PIK3CG rev</i>	AGATAAGCCTTAACACAGATGTCCTG	RT-PCR für <i>PIK3CG</i>
<i>ZYX_prom-fwd</i>	CTAGAAGAATTACCCAGGTCTGGC	<i>ZYX</i> Promotor
<i>ZYX_prom-rev</i>	CTCTTGGGCATTCTGAGACTG	<i>ZYX</i> Promoter
<i>PTGER2_prom_fwd</i>	CCTTGATGGACACACTTGC	<i>PTGER2</i> Promoter
<i>PTGER2_prom_rev</i>	CCAATCCCGTGAAATGAGC	<i>PTGER2</i> Promoter
<i>IL8_Prom_fwd</i>	CAACTTGAGTGGCCTTGAATACTG	<i>IL8</i> Promoter
<i>IL8_Prom_rev</i>	GAGGCATAAGAGCAGAATCTTCC	<i>IL8</i> Promoter
<i>ETS1_Prom_fwd</i>	CGTGGGAGGGTTGTTAGTTTTATC	<i>ETS1</i> Promoter
<i>ETS1_Prom_rev</i>	CTTCCAATTTACCTCCAGCAGTG	<i>ETS1</i> Promoter
<i>HB9_del1_2</i>	CACCAGTTCAAGCTGAACAAGAGCAAGAAG	Klonierung von <i>HLXB9</i> Deletion 1
<i>HB9_del1_3</i>	CTGAACAAGAGCAAGAAGGCCAAGGAG	Klonierung von <i>HLXB9</i> Deletion 1
<i>HB9_syn_600 fwd</i>	TCAAGCTGGGAGCCGGAAC	RT-PCR für <i>HLXB9</i> , erkennt Del1-Mutante
<i>HB9_syn_768 rev</i>	CAGTTCGAGCAGCTGCTGG	RT-PCR für <i>HLXB9</i> , erkennt Del1-Mutante
<i>HB9_Xho1_fwd</i>	GCGGCTCGAGGCCACCATGGAAAAGAGCAAGAAC	Klonierung <i>HLXB9</i> in pMSCV
<i>HB9_EcoR1_rev</i>	CGCGGAATTCTCAGCCCTTGTCGTCGTC	Klonierung <i>HLXB9</i> in pMSCV
pMSCV fwd	GCCCTTTGTACACCCTAAG	Sequenzierungsprimer pMSCV

murine Primer

Name	Sequenz 5' → 3'	Verwendung
mm_5	GTTCCACATCACCTGCTTCACTTG	RT-PCR für murines <i>Zyxin</i>
mm_6	GAAGCACTGTGGGTGGTAGG	RT-PCR für murines <i>Zyxin</i>

mm_7	CTCCTTGCCTTTCACAATCTTTG	RT-PCR für murines <i>Ptger2</i>
mm_8	GACAACAGAGGACTGAGCGC	RT-PCR für murines <i>Ptger2</i>
mm- <i>HB9</i> -RT-fwd	CATGATCCTGCCCAAGATG	RT-PCR für murines <i>Hlx9</i>
mm- <i>HB9</i> -RT-fwd	GTAGCCACCTCAAAACGCTTG	RT-PCR für murines <i>Hlx9</i>
mActin_for	AGGCATTGCTGACAGGATGCAG	RT-PCR für murines β -Actin
mActin_rev	AGCACTTGCGGTGCACGATG	RT-PCR für murines β -Actin

Für die „TaqMan“ quantitative PCR wurden die kommerziellen „Primer/Probe“-Assays der Firma Applied Biosystems verwendet: [HS00907365_m1](#) für *HLXB9*, [HS00365956_m1](#) für *HOXA9*, [Hs00180020_m1](#) für *MEIS1*, [Hs00193527](#) für *c-MYB*.

7.1.7 Enzyme und Kits für enzymatische Reaktionen

AccuPrime™	Invitrogen, Darmstadt
BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
GenomePlex Complete Whole Genome Amplification (WGA) Kit	Sigma-Aldrich, München
Lineage Cell Depletion Kit	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix	Finnzymes, Woburn, Massachusetts, USA
QuantiTect Kit	Qiagen, Hilden
Rapid DNA Ligation Kit	Roche, Penzberg
Restriktionsendonukleasen	NEB Biolabs, Frankfurt am Main
SuperSignal West Pico	ThermoScientific, Rockford, USA
SYBR Green PCR Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt
Taq-DNA Polymerase	Qiagen, Hilden
TaqMan PCR Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt

7.1.8 Antikörper, Säulenmaterialien und magn. beads

Primäre Antikörper für die *Western Blot* Analyse:

anti-HB9:	„H-20“, Ziege polyklonal	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
anti-TEL:	„H-214“, Kaninchen polyklonal	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
anti-FLAG:	M2 Maus-IgG ₁ monoklonal, HRP-konjugiert	Sigma-Aldrich, München anti-TBP
anti-TBP:	„1TBP18“, Maus-IgG ₁ monoklonal	Abcam, Cambridge, UK

anti-GAPDH: „6C5“, Maus -IgG ₁ monoklonal	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
anti-PIK3CG „PI 3-kinase p110 γ (D12)“, Maus monoklonal	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
anti-ETS1: „1G11“, Maus-IgG ₁ monoklonal	Abcam, Cambridge, UK
anti-ZYX: „C-19“, Ziege polyklonal	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
anti-PTGER2: „3E6“, Maus monoklonal	Abcam, Cambridge, UK

Sekundäre HRP-konjugierte Antikörper für die *Western Blot* Analyse:

Esel anti-Kaninchen	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
Esel anti-Ziege	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
Ziege anti-Maus	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland

Antikörper für die FACS-Analyse:

Anti human CD11b-FITC „Klon BEAR1“ Maus-IgG ₁	Beckman Coulter, Krefeld
Anti human CD38-APC „Klon LS198-4-3“ Maus-IgG1K	Beckman Coulter, Krefeld
Maus IgG1-FITC Isotypkontrolle	Beckman Coulter, Krefeld
Maus IgG1K-APC Isotypkontrolle	Beckman Coulter, Krefeld
PerCP Streptavidin	BD Pharmingen, Heidelberg
PE anti-Maus CD117 (c-Kit) 2B8	BD Pharmingen, Heidelberg
FITC anti-Maus CD11b (M1/70)	BD Pharmingen, Heidelberg
PE anti-Maus CD3 Klon 1D3	BD Pharmingen, Heidelberg
PE anti-Maus ly-6A/C (sca) Klon D7	BD Pharmingen, Heidelberg
FITC anti-Maus CD19 1D3	BD Pharmingen, Heidelberg
APC anti-maus Ly-6G/Ly-6c (Gr)	BD Pharmingen, Heidelberg

Säulenmaterialien und magnetische *beads*

Flag-gekoppelte Agarose „ANTI-FLAG [®] M2“	Sigma-Aldrich, München
MACS LD-Säulen	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach

7.1.9 Cytokine und Wachstumsfaktoren

Cytokine wurden von PeproTech, Hamburg bezogen und in sterilem PBS mit 1% BSA gelöst. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf die Stamm-Lösungen:

FLT3L, TPO, SCF: 50 ng/ μ l; IL6, IL11: 10 ng/ μ l

Die verwendeten Gebrauchskonzentrationen sind im entsprechenden Abschnitt 3.2.6 angegeben.

7.1.10 Arrays

Promotor-Arrays: 385K RefSeq Promoter Arrays hg18 NimbleGen, Waldkraiburg

Expressions-Arrays: GeneChip® 1.0 ST Arrays, human Affymetrix, Santa Clara, CA, USA

7.2 Sequenzen

7.2.1 Nukleotidsequenz *HLXB9-flag* (GENEART)

Die grau markierten Nukleotide sind in der Mutante *HLXB9*(Del1) deletiert.

```

1 ATGGAAGAGCAAGAAGCTTCAGGATCGACGCGCTGCTGGCCGTGGACCCCCCTAGAGCCGCCAGCGCCAGTCTGCCCCCTGGCCCTG
1 M E K S K N F R I D A L L A V D P P R A A S A Q S A P L A L

91 GTGACAAGCCTGGCCGCTGCGCCTCTGGCACCGGCGGAGGGGGAGGGGGCGGAGGGGGCCAGCGGAGGAACCAGCGGCTCTGCGAGCCCC
31 V T S L A A A A S G T G G G G G G G A S G G T S G S C S P

181 GCCAGCAGCGAGCCCCCTGCCGCCAGCGACAGGCTGAGGGCCGAGAGCCCCAGCCCCCAGACTGCTGGCCGCCACTGGCCCTG
61 A S S E P P A A P A D R L R A E S P S P P R L L A A H C A L

271 CTGCCCCAAGCCCGCTTCTCGGAGCCGAGGAGGCGGCGGAGGAACAGGCGGCGACCGGCGGACCTCACCACCAGCCACCCCGGT
91 L P K P G F L G A G G G G G G T G G G H G G P H H H A H P G

361 GCGCTGCTGCCCGCTGCGAGCTGCAGCCGAGCTGCCGCTGGCGGACTGGCCCTGGGCTGCACCCTGGCGGAGCCAGGGCGGAGCT
121 A A A A A A A A A A A A A G G L A L G L H P G G A Q G G A

451 GGACTGCCCGCCAGGCCCGCTGTACGGCCACCCCGTGTACGGCTACTCTGCCGAGCAGCCCGCAGCCCTCGCCGGCCAGCACCC
151 G L P A Q A A L Y G H P V Y G Y S A A A A A A L A G Q H P

541 GCCTGAGCTACAGCTACCCCGAGGTGCAGGGCGCCACCCCTGCCACCCCGCCGACCCCATCAAGCTGGGAGCCGGAACCTTCCAGCTG
181 A L S Y S Y P Q V Q G A H P A H P A D P I K L G A G T F Q L

631 GACCAGTGGCTGAGAGCCAGCACCGCCGATGATCTGCCAAGATGCCGACTTCAACAGCCAGGCCAGAGCAACCTGCTGGGCAAG
211 D Q W L R A S T A G M I L P K M P D F N S Q A Q S N L L G K

721 TGCAGAAGGCCAGGACCGCCTTACCAGCCAGCAGCTGCTCGAAGTGAACACCAGTTCAAGCTGAACAAGTACCTGAGCAGGCCAAG
241 C R R P R T A F T S Q Q L L E L E H Q F K L N K Y L S R P K

811 AGATTCGAGGTCGCCACCTCCCTGATGCTGACCGAGACCCAGGTCAAGATCTGGTCCAGAACAGGCCGATGAAGTGAAGAGAAGCAAG
271 R F E V A T S L M L T E T Q V K I W F Q N R R M K W K R S K

901 AAGGCCAAGGAGCAGGCCGCCAGGAAGCCGAGAAGCAGAAGGGCGGAGGGGGGAGCCGGCAAGGGCGGAGCCAGGAACCTGGCGCC
301 K A K E Q A A Q E A E K Q K G G G G G A G K G G A E E P G A

991 GAGGAAGTCTGGCCCTCCTGCCCTGGCGATAAGGGCAGCGGAGGCTGAGAGACCTGAGGGACAGCGACCCCGAGGAAGATGAG
331 E E L L G P P A P G D K G S G R R L R D L R D S D P E E D E

1081 GATGAGGACGACGAGGACCACTTCCCTACAGCAACGGCGCCAGCGTGCACGCCCGAGCTCCGACTGCAGCAGCGAGGACGACAGCCCC
361 D E D D E D H F P Y S N G A S V H A A S S D C S S E D D S P

1171 CCTCCAGGCCCTCTCACCAGCCTGCCCCCAGGACTACAAGGACGACGACGACAAGGGCTGA
391 P P R P S H Q P A P Q D Y K D D D D K G *

```

7.2.2 Nukleotidsequenz flag-*HLXB9/TEL* (GENEART)

Der grau markierte Bereich stellt den *HLXB9* Anteil der Fusion dar.

```

1 ATGGACTACAAGGACGACGACGACAAGGGCATGGAAAAGAGCAAGAACTTCAGGATCGACGCOCTGCTGGCCGTGGACCCCTAGAGCCGCCAGC
1 M D Y K D D D D K G M E K S K N F R I D A L L A V D P P R A A S
97 GCCCAGTCTGCCCCCTGGCCCTGGTGACAAGCCTGGCCGCTGCCGCTCTGGCACAGGAGGCGGAGGGGGAGGGGGCGGAGCCAGCGCGGCACC
33 A Q S A P L A L V T S L A A A A S G T G G G G G G G G A S G G T
193 AGCGGAAGCTGCAGCCCGCCAGCAGCGAGCCCGCTGCCCGCCAGCCGACAGGCTGAGGGCCGAGAGCCCGACCCCGCCAGACTGCTGGCCGCC
65 S G S C S P A S S E P P A A P A D R L R A E S P S P P R L L A A
289 CACTGCGCCCTGCTGCCAAGCCCGCTTCCTGGGAGCTGGCGGAGGCGGGAGGAACAGGCGGGACACGGCGGACCTCACCACCACGCCCCAC
97 H C A L L P K P G F L G A G G G G G G T G G G H G G P H H H A H
385 CCTGGCGCCAGAGCTGCCCGCCTGCTGCTGCCGCTGCAGCCGAGCTGCGCTGGCGGACTGGCCCTGGGCTGCACCCCTGGCGGAGCCAGGGC
129 P G A R A A A A A A A A A A A A A A A G G L A L G L H P G G A Q G
481 GGAGCCGACTGCCCGCCAGGCCCGCTGTACGGCCACCCCGTGTACGGCTACTCTGCAGCTGCTGCAGCAGCCCGCTGCCCGCCAGCACCOC
161 G A G L P A Q A A L Y G H P V Y G Y S A A A A A A A L A G Q H P
577 GCCCTGAGCTACAGCTACCCCGAGGTGCAGGGCGCCACCCAGCCACCCCGCCGACCCCATCAAGCTGGGAGCCGGAACCTTCCAGCTGGACCAC
193 A L S Y S Y P Q V Q G A H P A H P A D P I K L G A G T F Q L D Q
673 TGGCTGAGAGCCAGCACCGCCGCATGATCCTGCCAAGATGCCCGACTTCAACTGCCCTGCAGCCATCTACTGGTCCAGGGACGACGTGGCCAC
225 W L R A S T A G M I L P K M P D F N C L Q P I Y W S R D D V A Q
769 TGGCTGAAGTGGGCGGAGAACGAGTTCAGCCTGAGGCCATCGACAGCAACACCTTCGAGATGAACGGCAAGCCCTGCTGCTGCTGACCAAGGAG
257 W L K W A E N E F S L R P I D S N T F E M N G K A L L L L T K E
865 GACTTCAGGTACAGAAGCCCCACAGCGCGGACGTGCTGTACGAACCTCTGCAGCACATCTGAAGCAGAGGAAGCCCGAGGATCCTGTTACGCCCC
289 D F R Y R S P H S G D V L Y E L L Q H I L K Q R K P R I L F S P
961 TTCTTCCACCCCGCAACAGCATCCACACCCAGCCGAGGTGATCCTGCACCAGAACCACGAGGAAGATAACTGCGTGCAGAGGACCCCGAGCCCC
321 F F H P G N S I H T Q P E V I L H Q N H E E D N C V Q R T P R P
1057 AGCGTGGACAACGTGCACCACAACCCCGCCACCTCGAGTGTGTCACAGAAGCAGAGCCCATCACCACCAACCCAGGCCAGCCCGACCCOC
353 S V D N V H H N P P T I E L L H R S R S P I T T N H R P S P D P
1153 GAGCAGAGGCCCTGAGAAGCCCGCTGGACAACATGATCAGCGCCTCAGCCCTGCCGAGAGGGCCAGGGCCCGAGCCTCACCAGGAAAACAAC
385 E Q R P L R S P L D N M I R R L S P A E R A Q G P R P H Q E N N
1249 CACCAGGAAAGCTACCCCTGAGCGTGCAGCCCATGGAAAACAATCACTGCCCGCCTCCAGCGAGAGCCACCCCAAGCCCGAGCCCGAGCCAGG
417 H Q E S Y P L S V S P M E N N H C P A S S E S H P K P S S P R Q
1345 GAAAGCACAGGGTTCATCCAGCTGATGCCAGCCCATCATGCACCCCTGATCCTGAACCCAGGCACTCCGTGGACTTCAAGCAGAGCAGACTG
449 E S T R V I Q L M P S P I M H P L I L N P R H S V D F K Q S R L
1441 AGCGAGGACGGCCTGCACAGAGGGCAAGCCCATCAACCTGAGCCACAGAGAGGACCTGGCCTACATGAACACATCATGGTGTCCGTGAGCCOC
481 S E D G L H R E G K P I N L S H R E D L A Y M N H I M V S V S P
1537 CCTGAGGAACAGCCATGCCCTCGGCAGGATCGCCGACTGCAGGCTGCTGTGGGACTACGTGTACCAGCTGCTGTCTGACTCTAGATACGAGAAC
513 P E E H A M P I G R I A D C R L L W D Y V Y Q L L S D S R Y E N
1633 TTCATCCGCTGGGAGGACAAGGAGAGCAAGATTTTCGCGATCGTGGACCCCAACCGCCTCGCCAGGCTGTGGGGCAACCACAAGAACAGGACCAAC
545 F I R W E D K E S K I F R I V D P N G L A R L W G N H K N R T N
1729 ATGACCTACGAGAAGATGAGCAGGGCCCTGAGGCACTACTACAAGCTGAACATCATCAGGAAGGAGCCCGGCCAGAGGCTGCTGTTACGATTTCATG
577 M T Y E K M S R A L R H Y Y K L N I I R K E P G Q R L L F R F M
1825 AAAACCCCGCAGGATCATGAGCGGCAGGACCCAGCAGACTGGAACACCTGGAAGCCAGGAACCTGGACGAGCAGATTACCAGGAGGACGAGTGC
609 K T P D E I M S G R T D R L E H L E S Q E L D E Q I Y Q E D E C
1921 TGA
641 *

```

7.2.3 Promotor-Sequenzen der ChIP-on-Chip Ziel-Gene

Nachfolgend sind die Sequenzabschnitte (hg18) der vier Ziel-Gene *PTGER2*, *IL8*, *ZYXIN* und *ETS1* dargestellt, welche in der ChIP-on-Chip Analyse als Bindungsstruktur von HLXB9 identifiziert wurden.

PTGER2: Chr. 14+:51.848.662-51.850.411

Die grau markierten Bereiche kennzeichnen die Erkennungssequenz ATTA (TAAT für den Gegenstrang) der Homöodomäne.

```

AACTCGTTCACAGGGCTTGATCAGGCATCTTCCCTAGGTCCATCCAATCAAGGGTCATTTGCATGTTTGAGATGCATATCCCAGGACCAAGGTGGCTTT
GGGGAGAGAGCTTGGTTATCAACAACCTATAGTGTCCACATATTGAACTATACTGTCCACATATTGAACTATACTCTCCACATATTTCTGTGCAAGACTCC
TTGTGGTGCAGACTGAGTCAGGGGTTAGGAAGACAAGGGGGCAGGGGCTGGGGGAGGATCTTCAACTGCACCTTTGCTCTCGTATTACAAAAACCAG
GGCCCGCCTGCCACCAGGTACCCATCCAAAGAAAAGCTAGAGACAAATATATAGGAAAGGTTAAATAGTAGGTTTTTGTGTGAGGGGCTTATGAAA
TTAAAAAGGTATAAAAAATATTCGGAAAATAAGCACTGTGCAAATTCAGTGAATCTAAAAATCCCTTATTTAATAGTAAAACTGCAGTGCAGAAATTAIGCTA
TAAATCATAGTGTITTCCTATTAAGAAATACTTCTGATTAAGTTTGTATGTTTCCCATGTCTGGGGTGAGATGGGGAATGTTGGAGTAGGGGAATAG
TCAGAGATGGATGGCAAAGATTGGTAATAAGTTGTTACTGACCTGCAGAGTTTACAGCTTGAAAGAAAACTGTAGGAGTTAAGATCCTCTTTCCTAGGA
ATCCATGCCATGAGAAGTTTAGGGATTGAAGTAGTGCCTGTGACATGTGAAAACCGGCTGTAAACTTTGCAAGCGATCCAGTAAATTAATGCTTTGTTCT
AGTGGGAACCAACCCCCCAACTCCGCATTCCAATCCCCAGGCCAGAATCAAAAGTTGGCAAAAAATATTCATGGAGAGTAAGCAGGCTGTAGCAAGA
TAGGCTCTTCAGCAGGCAATCTTGTCTCCCTCCACGTTATGACTGTCTTCTTGCCAGTTCCTTAGGCAGATCAGACCCCTTCACTTCCCAGTTGSCCTC
CCTTCCCCAAGTGAATGTGACTTCTTACAGAACAACAATTACCTATGTTGTCTGCCAAACTGGATTTTGTTTTGTTTTGTGTTTAAATATCAGCCCA
TTTTACGACTCTGCAATTAATGCAATATGTGGTAGGAAACCAATTAATGTCAGCTCCAGTCTGAAACTGGCCACTTACCAATACACTTTGCCAGGAACA
GTCTTCTGGATGGATACTACGTGGTTAACAACATGTAAAGATAAACCGCTAAACAAAATATCAACATTTTCTTACAAGGCTCAGCTTAAGGACAGAACA
GTGATGTGCAATGGTTTTTCATGTTGTATCCACAAACACAATCTGTATAAGACACTCTCTTTTTTAAATGGTGTCTTAAACAAGTGGTTATCCGTTA
TGCTTTGACATAGGAAACGGTGAATGCTAGTAACCGAATCAAAGCGCAGTGCAACAGGCGCTCGTGGTGCGCATTGTGTGGTTTGGTTCCTTGGGA
TGGACACACTTGCTTTACGCTTATCCCAATTTTTGTCCAACTCTTAGTGTATCTTCTGGGAATAGTAAAAACAAAGCAAAACATTCTGGTCTTACT
TCAAGCTGCCTTTGACTGTIATTCCTTGTTCGCTCATTTCACGGGATTGGGTTCTCTAACTTCATGTTGGTGAGTTGCTTTGCTTTGCTCGTTG
CCCCGATCTTCTGTGATTCTGGCAGACCCCCGAAGTGCTCCTGCACCTC

```

IL8: Chr. 4+:74.824.028-74.824.594

```

TTGAAATTTCTCACTCCATCCCTTTTGCTAGTGATCATGGGTCTCAGAGGTCAGACTTGGTGTCTTGGATAAAGAGCATGAAGCAACAGTGGCTGAAC
CAGAGTTGGAACCCAGATGCTCTTTCCACTAAGCATAACAATTTCCATTAGATAAACACCTCCCTCCCAACCCCAAGCAGCTCCAGTGCACCACTTTC
TGGAGCATAAACATACCTTAACTTTACAACCTGAGTGGCCTTGAATACTGTTCCTATCTGGAATGTGCTGTTCTTTTCATCTTCTCTATTGAAGCCCT
CCTATTCTCAATGCCTTGCTCCAACCTGCCTTTGGAAGATTCTGCTCTTATGCCTCCACTGGAATTAATGTCTTAGTACCCTTGTCTATTCTGCTATAT
AGTCAGTCCCTTACATTGCTTTCTTCTTCTGATAGACAAACTCTTTAAGGACAAGTACCTAGTCTTATCTATTCTAGATCCCCACATTACTCAGAAAG
TTACTCCATAAATGTTTGTGGAAGTATTCTATGTGAAGCACATGTGCCCTTCACTCTGTTAAACA

```

ETS1: Chr. 11-:127.897.788-127.898.744

GAAATCTGCAAACTACTAAGGCTTCAAGGGCACAAAACCTGGGATTAGATGAAGGTAAGCCTGTGTGTCAAAACCTACCAGAGGCAGAGGTTACAGTTACA
 GTCAAATGCTGGGAGTTCAAATGTCTTAGAAATCAGGAAACATTAAAAATAGCTTTCTCTGAGATTGCTCAGGAAGATTATGTTTAACTTTCTGTTA
 ATCAAAGATGGAGCTCAGTGCCTGGTTCTAGCTATGTATTTAGATATATACATGTACTGGTTGATTGTTAATTAGGACAAAACATCTCTATTACAACCA
 ATGTATTAGTGGCAAACCATGAATTATTCGGGTTCAATTTGTTTTATCTCTAGTGTGGGGTTCCCAAATGGAACAGAAAACCTGTCATTGTGATTCTGT
 CATGGCTGCCAATGATGTACTCCAGAAATTCAAAACCACAGAGCCTCTGCATCACTTTTTTGGTGGCGGTCTGGGAGGTTGTTAGTTTTATCTAAAAAG
 AGGAGAGTCTGTGAAAGGAAAGACAAAGCTTTGGCCAATGGTGACATAATTAGAGGAACAGAATAATTAGAAATAAATCATAACTTCCCCTTCAACCCAA
 CCACTGCTGGAGGTAAATTTGGAAGCTTACGGAAGCTCATGGCTGGGTTCTAGTTTGGGGTCCCGTCTGGACTCCCTGCCAACGCAGGAGCATTACATG
 GGTGGGCTCTGAAAACTGAAGCCTCCTTCAGAAACACAGCCCTGACTCAAGATCCGGCTGGAGTCCAATACTCCTAAAGCCCTTTGAGGACACGGGCT
 CACGAATCCCTCGCCCTGCCTGCACGCTCGCCTTACCCACATGCCTCACGTCTGTGTGTCAGTCTTTGTAATGAATGATGTACACGCACCTTGAA
 ACTATGCTGCTACTGGGAGGGGGGAGAGCGGGTGACCAAGCCCTCAAGAATGCGTG

ZYXIN: Chr 7+:142.786.281-142.787.730

CTTCTATTCTGATTTAAAAATAGGTTACGCTGCTAACAATTACACATACTCTATTTTGACGCGCACATTACTTAAGGAGACATTTAGAGGGTAGATA
 GCTTTTATCTATGAGTTATCTTGAAATCATCTTCTTAACACTCTTTTTTCCCAAAGGGGCCATATTTGAAGGATTTGTGATGAGACTTTTGGTCT
 GTGAAGCCCAAGACACAATCTCCAACATGCACAGGAAATCCAGTATCAAATTTCTAACATGTCTTCAGAGACAGGCCAGGGCTGGCTTGAGCGTGTGAG
 AGAGGTGTGACTGCGTACTACCCATCATAACATGCCCACACATGCGTGTGGCTGTGAGAAATACTGGTGGTGACAAAGACAATGAGATGCCAGAGAAAA
 GATCAGTGGGGTTTGAAAAGTGATTAAGATGTGCTCCTAGGTATAATTAAGACTTAATAAGGTTGAAGGAAAGAGAGGACATTGCACATACCGAGGCC
 CCTGAGAGATCTGCCTGGCAACCAGAAAGGACATATGGGGGAAAAAGCCTTAGTGTAAOCAGGTCAGAAATTTTCACTTGGGCGAAGCTGGAATTTGA
 ATAATAACTAGTGCATATAGCGCATACAGCTATGACATTTCAATTTATTTCTCTATATAATGCAATAAAGTAGATGGATTAACCGTGACGTTTACAGAT
 GGAGCAGGGGAGAATGAAGAGGCGTCAGTTTGGGCATCAGGCTGGATCTTACACTCTGAOCTCACTCTGCTCTATCTGCCCAGTGTGCTTCACTGA
 TATCAGGGGTGCAAGGCAACCAGATCTGACACCAGTTTCAGTTTAGATCCTGCTTTACCTGGGTGTGACCCGGGTCCATCTCTCAGCTCGGCCCTCTGC
 TTTCTTTCATAAACTTTTGGGGTTAGTCTCGGATGATCTCTAAAAACATGGCCAGGTGCTCCTTGCCAGTAGAGTGTAGCCGGATTGGAGGGACTGG
 ACACTCAGTGTGAACAAGACGAAGGCTCAGGAGGCAGTAAAAGCTGACAAGAGGAGAGAAAAATGAAGCGCTACGGGTGCATACTGGACTAGCGGGCGA
 AAGGCCATGACTCCTTAGTTTGGAGAAAGAACTGGGGCCGAGATTGGGGAAGTTTCCAGTGCATTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAACTAGAAGAATTAC
 CCAGTCTGGCTTCTTTCTGTGAGCCTGGGGCTGAGTCGACAGGCTGAGAAATCCAGTCTGGCCAGTAGGGGGCTCCACCAAGCGCAGTCTCAGAATGCC
 AAGAGCTCCACCGTCCCGGGGTCTCCACCAAGCGCAGTCTCAGAATGCCAAGAGCCCAACCGTCCCGGGGTCTCCAAGAGGAGTGGGTCGTGGTG
 GCGGTTGAAGGCCGTAAAAGACGAGCAGCCCGCTCCGCTCCGCTCTCT

7.3 Datentabellen

Tab. 6: Genliste der Affymetrix Analyse „t(7;12) vs CD34+ Kontrollproben“. Dargestellt werden sämtliche differentiell regulierten Gene mit einem p-Wert $\leq 0,05$. Zusätzlich werden die Affymetrix Proben-ID, sowie der Wert der Anreicherung (\log_2 foldchange) angegeben.

ID	Gen	p-Wert	logFC	ID	Gen	p-Wert	logFC
8147891	PKHD1L1	4,79E-04	-1,708	8111271	CDH9	2,90E-02	-0,676
8131919	NPY	6,79E-04	-0,887	8146794	PREX2	2,90E-02	-0,912
8151532	FABP4	6,79E-04	-2,790	8088371	DNASE1L3	2,90E-02	-1,338
8089448	DPPA4	6,79E-04	-1,887	8096845	EGF	2,90E-02	-1,443
8142554	AASS	6,79E-04	-1,427	8035177	SLC35E1	2,94E-02	0,629
8105084	C7	7,55E-04	-1,436	7929574	DNTT	3,04E-02	-3,378
7916493	PPAP2B	7,55E-04	-1,328	8035156	CHERP	3,04E-02	0,473
7951309	MMP13	1,04E-03	-1,405	7936856	GALNAC4S-6ST	3,05E-02	-1,125
8091385	CP	1,08E-03	-1,397	8085393	TMEM40	3,05E-02	-1,008
8102877	CLGN	2,78E-03	-1,348	7953924	CLEC9A	3,17E-02	1,323
8044976	CNTNAP5	3,20E-03	2,535	8074934	VPREB3	3,20E-02	-1,010
8042038	RPL23AP32	4,26E-03	1,145	7948213	PRG3	3,30E-02	-1,194
7965322	KITLG	4,26E-03	1,110	8171545	BEND2	3,30E-02	-1,095
8008723	EPX	7,40E-03	-1,697	7980958	LGMN	3,30E-02	-2,237
7965112	PAWR	7,77E-03	-1,433	8111524	UGT3A2	3,30E-02	-0,899
8112045	ESM1	8,62E-03	-0,892	8030796	SIGLECP3	3,30E-02	1,449
8126269	TREML1	8,62E-03	-1,098	8147019	FAM164A	3,30E-02	-1,172
7964631	FAM19A2	8,62E-03	-1,125	8089835	FSTL1	3,30E-02	-1,097
7917182	ELTD1	8,62E-03	-1,870	8173414	SLC7A3	3,30E-02	-0,785
8096808	CCDC109B	8,62E-03	-1,844	8078497	ARPP-21	3,30E-02	-1,545
7982593	CI 5orf54	1,03E-02	-0,938	8105481	GAPT	3,30E-02	-1,861
8112980	EDIL3	1,05E-02	3,173	7981970	SNRPN	3,30E-02	0,583
8138381	AGR2	1,05E-02	3,192	8150036	KIF13B	3,37E-02	-1,201
8077270	CHL1	1,32E-02	-0,745	8115543	EBF1	3,40E-02	-1,996
8085914	SLC4A7	1,85E-02	-2,302	8135363	PIK3CG	3,40E-02	-2,478
8144112	MNX1	1,94E-02	0,598	7906878	DDR2	3,50E-02	-0,594
8071646	VPREB1	2,09E-02	-1,486	8102532	PDE5A	3,50E-02	-2,602
7916843	GNG12	2,11E-02	-1,053	8138504	RAPGEF5	3,90E-02	-0,984
8160088	MPDZ	2,13E-02	-0,783	8095694	PF4V1	3,92E-02	-1,006
8082797	TF	2,13E-02	-0,899	8083494	MME	3,92E-02	-2,873
8101780	PGDS	2,13E-02	2,721	7974533	PELI2	4,00E-02	-1,034
8097628	HHIP	2,13E-02	-1,008	7969596	GPC5	4,08E-02	-0,600
7952056	CD3D	2,13E-02	1,419	7895415	---	4,13E-02	1,241
7978376	STXBP6	2,13E-02	0,886	8094789	LIMCH1	4,23E-02	-0,495
7961546	EPS8	2,13E-02	2,284	8099982	APBB2	4,23E-02	-0,953
8078450	CRTAP	2,16E-02	-0,886	8030470	AP2A1	4,23E-02	0,732
8103166	SH3D19	2,21E-02	-0,660	8129254	MAN1A1	4,23E-02	-1,019
8071671	GNAZ	2,21E-02	-0,644	7933437	PTPN20A	4,23E-02	-0,898
8122807	AKAP12	2,21E-02	-1,887	8102792	PCDH18	4,34E-02	-0,517
8128843	DDO	2,21E-02	-0,615	8064939	TMX4	4,34E-02	-1,335
7947548	RAG2	2,21E-02	-2,665	8062312	MYL9	4,41E-02	-0,563
8034783	LPHN1	2,22E-02	0,615	8173755	ITM2A	4,41E-02	1,482
8027837	CD22	2,29E-02	-1,381	8010271	PGS1	4,41E-02	-0,789
8034512	SNORD41	2,42E-02	1,286	7896689	---	4,41E-02	-1,296
8127193	BMP5	2,42E-02	-0,540	8057506	FRZB	4,41E-02	-0,584
8101957	EMCN	2,81E-02	-1,175	7979982	---	4,43E-02	0,447
8041447	CRIM1	2,81E-02	-1,121	7908376	RGS18	4,53E-02	-3,012
7971486	C13orf18	2,81E-02	-1,756	8162610	CDC14B	4,65E-02	-0,750
8122365	GPR126	2,85E-02	-1,014	8063716	TUBB1	4,67E-02	-2,300
7953166	TSPAN9	2,90E-02	-0,615	8039139	LENG1	4,76E-02	0,449
7942342	INPL1	2,90E-02	-0,810	8156321	SYK	4,87E-02	-1,247
8163637	TNC	2,90E-02	-0,698	7933010	PARD3	4,87E-02	-0,680
8098379	WDR17	2,90E-02	-1,286	8118235	LY6G6F	4,87E-02	-0,932
7893494	---	2,90E-02	0,706	8178063	LY6G6F	4,87E-02	-0,932

Tab. 7: Genliste der Affymetrix Analyse „t(7;12) vs t(9;11)“. Dargestellt werden sämtliche differentiell regulierten Gene mit einem p-Wert < 0,001. Zusätzlich werden die Affymetrix Proben-ID, sowie der Wert der Anreicherung ($\log_2 \text{foldchange}$) angegeben.

ID	Gen Name	p-Wert	logFC	ID	Gen Name	p-Wert	logFC
7982185	DEXI	2,39E-09	-2,265	7981494	AKT1	3,00E-04	-0,711
7986685	DEXI	2,39E-09	-2,265	8045889	TANC1	3,49E-04	1,172
7965322	KITLG	9,33E-08	1,762	7932495	C10orf114	3,52E-04	-0,707
7971950	DACH1	4,34E-07	-2,909	7897803	PLOD1	3,70E-04	-0,963
7932498	C10orf140	5,25E-07	-1,266	7982206	GOLGA9P	3,71E-04	-1,400
8157890	PBX3	5,25E-07	-1,978	7899043	SEPN1	3,72E-04	-0,810
8082965	MRAS	8,82E-07	-1,374	8138381	AGR2	3,91E-04	2,715
7942342	INPPL1	2,82E-06	-1,291	8046895	FAM171B	4,18E-04	2,035
8020779	DSG2	2,87E-06	2,204	7923662	PIK3C2B	4,19E-04	1,228
8029551	APOC2	5,70E-06	-1,492	7896722	---	4,19E-04	2,176
8099721	KIAA0746	7,28E-06	-2,466	8041031	BRE	4,30E-04	-1,686
8101780	PGDS	1,03E-05	3,621	8106403	F2RL1	4,30E-04	1,214
7923978	CD34	1,05E-05	2,887	8034783	LPHN1	4,31E-04	0,578
7961829	BCAT1	2,28E-05	2,282	8054611	NCRNA00152	4,64E-04	1,302
8147756	BAALC	2,28E-05	1,409	8117630	ZNF165	4,67E-04	0,821
8044976	CNTNAP5	3,62E-05	2,394	8090162	ITGB5	4,78E-04	1,068
8173755	ITM2A	3,62E-05	2,096	7982299	LOC390561	5,09E-04	-1,063
7945262	JAM3	3,62E-05	1,163	8142136	FLJ36031	5,15E-04	-0,693
7961964	C12orf11	3,62E-05	1,236	8166705	PRRG1	5,15E-04	1,191
8042038	RPL23AP32	3,62E-05	1,098	7978376	STXBP6	5,28E-04	0,798
8057578	CALCRL	3,73E-05	2,772	8101648	HSD17B11	5,59E-04	1,058
7921179	ARHGEF11	4,50E-05	-1,162	8081758	GRAMD1C	5,59E-04	1,013
8056343	COBLL1	4,73E-05	1,450	8154416	C9orf93	5,60E-04	1,456
8106411	S100Z	5,12E-05	2,285	8118324	C2	5,78E-04	-1,972
8051298	GALNT14	6,90E-05	1,068	8178095	C2	6,26E-04	-1,972
7953924	CLEC9A	7,68E-05	1,609	8179331	C2	6,26E-04	-1,972
7927784	JMJD1C	7,73E-05	-1,051	7987027	GOLGA9P	6,26E-04	-1,342
8170009	FAM127A	8,33E-05	-1,746	8083260	CPA3	6,26E-04	2,751
8112980	EDIL3	8,33E-05	3,156	7982284	GOLGA9P	6,54E-04	-1,308
7894974	---	9,01E-05	1,210	8034512	SNORD41	6,98E-04	1,158
7893827	---	9,56E-05	1,014	8127051	TRAM2	6,98E-04	-0,744
7986947	GOLGA9P	1,13E-04	-1,566	8097657	SMAD1	6,98E-04	1,454
8104758	C5orf23	1,19E-04	2,988	8133122	ASL	6,98E-04	-0,486
8104746	NPR3	1,19E-04	3,097	7896561	---	6,98E-04	0,958
8138741	HOXA6	1,19E-04	-1,468	8050507	WDR35	7,28E-04	-1,481
8103769	HPGD	1,19E-04	3,045	7894732	---	7,31E-04	0,968
7981859	GOLGA9P	1,19E-04	-1,450	8138757	HOXA10	7,31E-04	-0,666
8138735	HOXA5	1,28E-04	-1,946	7981895	GOLGA8E	7,31E-04	-1,179
8069644	APP	1,76E-04	2,220	7896689	---	7,34E-04	-1,315
8083749	PPM1L	1,89E-04	-1,339	7986394	LRRC28	8,00E-04	1,232
7893058	---	2,17E-04	1,197	8156321	SYK	8,35E-04	-1,272
7903119	ABCD3	2,26E-04	1,260	8067932	C21orf34	9,45E-04	1,196
8113873	HINT1	2,26E-04	0,601	8043363	NCRNA00152	9,45E-04	1,183
7982271	GOLGA9P	2,44E-04	-1,673	8102912	TBC1D9	9,54E-04	-1,273
7893001	---	2,44E-04	1,149	7972369	UGCGL2	9,60E-04	-1,864
8078619	ITGA9	2,52E-04	1,884	8003089	MBTPS1	9,60E-04	-0,516
8175302	FAM127B	2,55E-04	-0,815	7912646	CASP9	9,72E-04	-0,622
7925089	PCNXL2	2,65E-04	0,812	8115327	SPARC	9,72E-04	1,668
8105481	GAPT	2,80E-04	-2,012	7895415	---	9,72E-04	1,200
8040278	PQLC3	2,97E-04	-1,007				

Eigene Veröffentlichungen

⇒ Publikationen:

Wildenhain S, Ruckert C, Rottgers S, Harbott J, Ludwig WD, Schuster FR, Beldjord K, Binder V, Slany R, Hauer J, and Borkhardt A. (2010) Expression of cell-cell interacting genes distinguishes HLXB9/TEL from MLL-positive childhood acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 24, 1657-1660.

⇒ Poster und Vorträge

Sarah Wildenhain, Christian Ruckert, Svenja Daschkey, Martin Dugas, Julia Hauer, Arndt Borkhardt. ChIP-on-chip Analysis Identified HLXB9 as a Transcription Factor in Hematopoietic Cells and Alters the Expression of Genes Involved in Cell-adhesion. American Society of Hematology, 52nd Ash Annual Meeting, Orlando, Fl 04.-07.12.2010
Posterpräsentation

Sarah Wildenhain, Julia Hauer, Christian Ruckert, Silja Röttgers, Vera Binder, Robert Slany, W.-D. Ludwig, Jochen Harbott, Arndt Borkhardt. Expression profiling discriminates t(7;12) HLXB9/TEL and 11q23 MLL positive infant acute myeloid leukemia.
IBFM 2010, 7th Bi-Annual Childhood Leukemia Symposium, Antalya, 04.-06.10.2010
Posterpräsentation

Sarah Wildenhain, Julia Hauer, Silja Röttgers, Hartmut Engelmann, Vera Binder, Robert Slany, W.-D. Ludwig, Jochen Harbott, Arndt Borkhardt. Characterization of the t(7;12) chromosomal translocation in infant AMLs: coexpression of T-cell markers, distinct expression of homeobox genes and inhibition of the non-canonical Nf-kappaB pathway.
XXII. Jahrestagung der Kind-Philipp-Stiftung für Leukämieforschung, Wilsede, 10.-13.06.2009
Vortrag

Sarah Wildenhain, Julia Hauer, Silja Röttgers, Hartmut Engelmann, Astrid Novosel, Vera Binder, Robert Slany, W.-D. Ludwig, Jochen Harbott, Arndt Borkhardt. HOX-Gene Expression and Inhibition of The Non-Canonical NF-kappaB Pathway in t(7;12) Leukemias.

American Society of Hematology, 50th Ash Annual Meeting, San Francisco, CA 06.-09.12.2008

Posterpräsentation

Julia Hauer, Sarah Wildenhain, Silja Röttgers, Hartmut Engelmann, Astrid Novosel, Vera Binder, Robert Slany, W.-D. Ludwig, Jochen Harbott, Arndt Borkhardt. Coexpression of T-cell markers and inhibition of the non-canonical NF-kappaB pathway in childhood AML with translocation t(7;12) i.e. HLXB9/ETV6- Fusion.

British Society for Haematology, 48th Annual Scientific Meeting, Glasgow, 07.-09.04.2008

Posterpräsentation

⇒ **Anträge**

Die Ergebnisse dieser Arbeit waren u.a Grundlage des Forschungsantrages „ The role of the haematopoietic niche in the development of t(7;12) infant acute myeloid leukemia“ bei der Forschungskommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Antragsteller: Fr. Dr. med. Julia Hauer.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Vorname	Sarah
Name	Wildenhain
Geburtsdatum	22.02.1981 in Berlin
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig

Hochschulstudium

Juni 2007 – Juni 2011	Promotionsstudium in der Klinik für Kinder-Onkologie, - Hämatologie und Klinische Immunologie der Heinrich- Heine-Universität Düsseldorf, Prof. Dr. med. A. Borkhardt
Aug. 2006 – März 2007	Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie und Genetik, Universität Göttingen, Abteilung Allgemeine Mikrobiologie, Prof. Dr. J. Stülke
Sept. 2001 - März 2007	Diplomstudiengang an der Georg-August-Universität Göttingen

Schulbildung

Juni 2000	Abitur an der Paul-Natorp-Oberschule Berlin
-----------	---

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und alle in Anspruch genommenen Quellen und Hilfsmittel angegeben habe. Diese Dissertation wurde in der vorgelegten oder ähnlichen Form in keiner anderen Institution als Prüfungsarbeit vorgelegt.

Düsseldorf, den

Sarah Wildenhain

Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei Herrn Prof. Borkhardt für die Ermöglichung meiner Promotion in der Kinderklinik der Universität Düsseldorf und für seine fachliche Unterstützung, sowie seine fachliche Motivation während der gesamten Promotionszeit bedanken. Herrn Prof. Lercher danke ich vielmals für die Übernahme des Zweitgutachtens. Ein ganz liebes Dankeschön geht an Julia, die das HLXB9 Projekt vor meiner Düsseldorfer Zeit ins Leben gerufen hat und Ihre stetige Begeisterung und Motivation für das Projekt auf mich übertragen hat. Ganz besonders möchte ich mich bei Ihr auch für die 100%ige Unterstützung bei den Endkorrekturen dieser Arbeit, sowie beim Schreiben der Paper bedanken. Auf der fachlichen Seite möchte ich mich des Weiteren ganz herzlich bei Christian Ruckert für die statistische Auswertung meiner Daten bedanken. Silja Röttgers und Prof. Jochen Harbott danke ich vielmals für ihre Unterstützung hinsichtlich des zur Verfügung gestellten Patientenmaterials. In diesem Rahmen geht meine Dank auch an Herrn Prof. Ludwig aus Berlin für die Bereitstellung der immunologischen Daten. Prof. Robert Slany danke ich vielmals für das Durchführen der Replating-Assays.

Ebenfalls ein großes Dankeschön, geht an die ganzen „alten Hasen“ des KMT-Labors Svenja, Vera O., Vera B, Conny, Olaf, Susi, Yvonne und Michael, mit denen ich die letzten vier Jahre fast tagtäglich verbracht habe. Natürlich auch Danke an alle anderen und neu dazu gekommenen Kollegen des KMT-Labors für die meist lustige und familiäre Stimmung im Labor. Im Rückblick auf die letzten Monate möchte ich mich noch bei Dani, Silke und besonders Deborah für ihre Unterstützung in unserer kleinen Arbeitsgruppe danken.

Zu guter letzt noch ein liebes Dankeschön an meine Eltern und Tobi, die mich in jeder Hinsicht voll und ganz unterstützt haben.