

*Identifizierung von Zielgenen des chimären
Transkriptionsfaktors TEL-AML1 (ETV6-RUNX1)*

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Yvonne Linka

aus Moers

Düsseldorf, April 2012

Aus der Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und Klinische Immunologie
des Universitätsklinikums der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Referent:	Prof. Dr. med. Arndt Borkhardt
Korreferenten:	PD Dr. rer. nat. Ursula N. Fleig Prof. Dr. rer. nat. Johannes H. Hegemann
Tag der mündlichen Prüfung:	05. Juni 2012

Vielen Dank...

Arndt Borchardt für die Möglichkeit, dieses Projekt zu bearbeiten, für konstruktive Gespräche und für die Betreuung meiner Dissertation.

Ursula Fleig und **Johannes Hegemann** für produktive Gespräche und die Vertretung meiner Dissertation von Seiten der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät.

kleine **Teresa!** Ohne Dich hätte Deine Mutter wohl meine Unterstützung bei diesem Projekt nicht gebraucht. Aber von mir aus hättest Du sie nicht so quälen müssen... unvergesslich der Tag, an dem Du ganz friedlich auf meinem Arm geschlafen hast.

Astrid: „Das passiert nicht, um uns zu ärgern, sondern dient nur der Übung!“ Mit Deiner stets positiven Einstellung und Deinem fortwährenden Enthusiasmus warst Du weit mehr als eine kompetente Betreuerin. Danke, dass ich mir eine Scheibe von Deiner Energie abschneiden durfte! Du hattest wie so oft recht: „Alles wird gut!“ Liebe Grüße nach Berlin...

Silke! Wir waren wohl mehr als einmal „Stumm vor Glück“, aber man darf sich eben nicht beirren lassen – weder von der Deutschen Bahn noch von wenig gelungener Arbeitseinteilung!

Conny, meine Lieblingsbürogenossin! Mit Dir konnte ich mich immer austauschen, egal ob Laboralltag oder das stinknormale Leben. Schade, dass Du in die HND gewechselt bist, aber Dein „Jetze“ ist geblieben... Hoffentlich verlieren wir uns nicht aus den Augen!

Michael: „... Bis einer weint!“ Zum Glück stand meine Arbeit nur sehr selten unter diesem Motto. Ohne Dich wären meine Aquarien weniger grün und ich hätte nicht diese putzige Garnelenplage... Danke vor allem auch für das Korrekturlesen und die Hilfestellungen am FACS!

Vera B: „Meine Nerven!“ Deine Art, die Dinge zu betrachten und wenig konfliktscheu auf den Punkt zu bringen fehlt hier seit rund einem Jahr. Ich wünsche Dir alles Gute in Boston! Komm' bald zurück...

Sarah und **Vera O (Alias Dr. B)**. Mit euch war's immer nett und lustig, ob im Labor, in der Lüneburger Heide oder in München... Themen wie Fitnesstrainer, Schlangen, Zombies, Haare oder Noras Mitbewohner waren immer eine gelungene Abwechslung und eine willkommene Möglichkeit, die Probleme mit killing curves, zig real-time PCRs, stabil exprimierenden Zell-Linien und Induktionen mal für einen Moment zu vergessen.

Olaf, der Ruhepol schlechthin! Immer wenn es hoch herging und hitzig diskutiert wurde hast Du die Ruhe bewahrt und uns alle wieder auf den Teppich geholt. Ohne Dich hätte ich meine Balkonkästen vielleicht immer noch nicht zurück...

Soenja. Zum Glück hast Du Dich von Pablo nicht unterkriegen lassen, aber wer einen Marathon schafft, den kann nichts aufhalten!

Paola. ¡Hola! ; ¿Cómo estás? Auch wenn Du schon seit langer Zeit wieder in Spanien bist, habe ich doch das Wichtigste von Dir gelernt: „That's why it's called RE-SEARCH!“

...auch an alle anderen Kollegen, die dafür sorgen, dass es bei uns im KMT-Labor so nett ist! (Andrea, Birgit, Cai, Corinna, Daniel, Daniela, Deborah, Erika, Fr. Öllers, Gabi, Heidi, Kati, Kebria, Pablo, Özer, Sanil, Saji, Sven, Zakir)

meinen **Eltern**, die immer fest an mich glauben und ohne die ich nie so weit gekommen wäre!

Christa, Sarah, dem groben und dem kleinen **Peter** für nette (Spiel)-Abende, Urlaube, Grillen und so viel mehr!

Marianne, Alex und dem anderen **Martin** für ihre Unterstützung und ihr Verständnis!

dem einen **Martin**, der es schafft, zugleich mein größter Kritiker, mein engster Vertrauter und mein bester Freund zu sein – kurz gesagt meiner groben und einzigen Liebe! ... Jetzt können wir endlich das Arbeitszimmer aufräumen;-)

*The effort to understand the universe
is one of the very few things
that lifts human life a little above the level of farce,
and gives it some of the grace of tragedy.*

Steven Weinberg (*1933)

Ein Philosoph hat einmal behauptet:

'Naturwissenschaft setzt notwendig voraus,

dass gleiche Umstände immer auch gleiche Auswirkungen haben.'

Nun, dem ist nicht so.

Richard Feynman (1918-1988)

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS		VII
ABBILDUNGSVERZEICHNIS		XI
TABELLENVERZEICHNIS		XIII
ZUSAMMENFASSUNG		1
SUMMARY		3
1 EINLEITUNG		5
1.1 Regulation der Genexpression in Entwicklung und Differenzierung		5
1.1.1 Die Kontrolle der Transkription erfolgt auf verschiedenen Ebenen		5
1.1.2 Wie Transkriptionsfaktoren ihre Zielgene finden		6
1.1.3 Die fehlerhafte Transkriptionskontrolle von Schlüsselgenen in hämatopoetischen Vorläuferzellen gilt als initialer Schritt in der Leukämogenese		7
1.2 Genetische Aberrationen und die Entstehung maligner Erkrankungen		8
1.2.1 Translokationen spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung maligner Erkrankungen		8
1.2.2 Wie Translokationen entstehen		9
1.2.3 Wo Translokationen entstehen		9
1.2.4 Chromosomale Instabilität und Aneuploidie		10
1.3 AML1 (RUNX1)		12
1.3.1 AML1 ist eine Untereinheit des heterodimeren Transkriptionsfaktors CBF		12
1.3.2 AML1 liegt in verschiedenen Isoformen vor		13
1.3.3 Aufbau und Organisation von AML1		14
1.3.4 AML1 bindet sequenzabhängig an DNA		14
1.3.5 AML1 kann die Transkription seiner Zielgene sowohl aktivieren als auch inhibieren		15
1.3.6 AML1 wird durch post-translationale Modifikationen reguliert		15
1.4 TEL (ETV6)		16
1.4.1 TEL ist ein Mitglied der ETS-Proteinfamilie		16
1.4.2 Die zwei Isoformen des TEL		17
1.4.3 Aufbau und Organisation von TEL		17
1.4.4 TEL bindet sequenzspezifisch an DNA		18
1.4.5 TEL ist in erster Linie ein Repressor der Transkription		18
1.4.6 TEL wird durch post-translationale Modifikationen reguliert		19
1.5 Die reziproke Translokation t(12;21)(p13;q22)		20
1.5.1 Wie die Translokation t(12;21) entsteht		21
1.5.2 Die Funktion des chimären Transkriptionsfaktors TEL-AML1		22
1.5.3 Pathogenese der Prä-B-Zell Leukämie (ALL) und die Beteiligung von TEL-AML1		23
1.6 Zielsetzung		24

2	MATERIAL	25
2.1	Feinchemikalien, Detergenzien etc.	25
2.1.1	Allgemeine	25
2.1.2	Spezielle	25
2.2	Puffer und Lösungen	25
2.2.1	Allgemeine	26
2.2.2	Spezielle	26
2.2.3	Gebrauchsfertige Lösungen	27
2.3	Medien und Zusätze	28
2.3.1	Für Bakterienkulturen	28
2.3.2	Für eukaryotische Zellen	28
2.3.3	Für ‚stable isotope labelling by aminoacids in cell culture‘	28
2.4	Zell-Linien	29
2.4.1	Prokaryotische Zellen	29
2.4.2	Eukaryotische Zell-Linien	29
2.5	Nukleinsäuren und Oligonukleotide	29
2.5.1	Plasmide und Vektoren	29
2.5.2	Oligonukleotide für die quantitative PCR	30
2.5.3	Primer für PCR und Sequenzierung	32
2.5.4	Primer für overlap-extension PCR	32
2.5.5	Primer für LM-PCR	32
2.5.6	Größenstandards	32
2.6	Proteine	33
2.6.1	DNA-Polymerasen	33
2.6.2	DNA-Ligasen	33
2.6.3	Restriktionsendonukleasen	33
2.6.4	Proteaseinhibitoren	33
2.6.5	Antikörper	34
2.6.6	Molekulargewichtsstandards	35
2.6.7	Sonstige	35
2.7	ProteinA/G Agarosen und magnetische beads	35
2.8	Materialien und Kits	35
2.8.1	Materialien für die Zellkultur	35
2.8.2	Materialien für die Molekularbiologie	35
2.8.3	Sonstige Verbrauchsmaterialien	36
2.8.4	Kits	36
2.9	Geräte und Software	36
3	METHODEN	39
3.1	Mikrobiologische Arbeitsmethoden	39
3.1.1	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> nach Inoue	39
3.1.2	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	39
3.1.3	Kultivierung von Einzelkolonien für die Plasmidpräparation	40
3.2	Zellkulturtechniken	40
3.2.1	Kultivierung muriner und humaner Zell-Linien	40

3.2.2	Generierung stabil exprimierender Zell-Linien	42
3.2.3	Kryokonservierung muriner und humaner Zell-Linien	43
3.2.4	Induktion der TEL/AML1-Expression	43
3.2.5	Isolierung von CD19-positiven Zellen aus gesunden Probanden	45
3.3	Molekularbiologische Methoden	45
3.3.1	Klonierung der Expressionskonstrukte für AML1 TEL und TEL-AML1	45
3.3.2	Plasmid-Isolierung aus E. coli	46
3.3.3	Nukleinsäure-Isolierung aus murinen und humanen Zellen	46
3.3.4	Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) an murinen Zell-Linien	47
3.3.5	Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) an humanen Zell-Linien	49
3.3.6	PCR-Methoden	50
3.3.7	Sequenzierung	52
3.4	Proteinanalytische Methoden	52
3.4.1	Kontrolle der induzierten TEL/AML1-Expression mittels Durchflusscytometrie	52
3.4.2	Aufreinigung und Charakterisierung des spezifischen TEL-AML1-Antikörpers	53
3.4.3	Herstellung von Proteinextrakten aus murinen und humanen Zellen	54
3.4.4	Diskontinuierliche eindimensionale SDS-PAGE	54
3.4.5	Western Blotting	54
3.4.6	Massenspektrometrische Analyse der SILAC-Proben	55
3.5	Expressionsanalysen	56
3.5.1	Genexpressionsanalyse	56
3.5.2	mikro RNA Expressionsanalyse	56
3.6	Bioinformatische Datenauswertung und -analyse	57
3.6.1	Auswertung der Rohdaten aus ChIP, Genexpressions- und Proteomanalyse	57
3.6.2	Kombinierte Datenanalyse	58
3.6.3	Datenanalyse mit Hilfe von DAVID (database for annotation, visualization and integrated discovery)	58
4	ERGEBNISSE	59
4.1	Das murine Zellsystem	59
4.1.1	Nachweis der TEL-AML1 Expression und Optimierung der Induktion	59
4.2	Der TEL-AML1-spezifische Antikörper	63
4.3	Identifizierung von TEL-AML1 Zielgenen im induzierbaren murinen Zellsystem	65
4.3.1	Etablierung der Chromatin-Immunpräzipitation	65
4.3.2	Chromatin-Immunpräzipitation	71
4.3.3	Genexpressionsanalyse in TEL-AML1 exprimierenden Zellen	74
4.3.4	Auswertung der massenspektrometrischen Analyse	75
4.3.5	Kombinierte Datenanalyse zur Identifizierung TEL-AML1 regulierter Zielgene	76
4.3.6	TEL-AML1 beeinflusst unter anderem die negative Regulation der Genexpression und die RNA-Prozessierung	77
4.3.7	Indirekt durch TEL-AML1 regulierte Gene beeinflussen unter anderem die Hämatopoese und die Translation	79
4.3.8	Vergleichende Darstellung der individuellen funktionellen Annotationen: Die TEL-AML1-Funktionalität ähnelt mehr dem TEL als dem AML1	80
4.3.9	Vergleich mit Patientendaten	81

4.4	Identifizierung von TEL-AML1 Zielgenen in stabil exprimierenden humanen B-Zell-Linien	86
4.4.1	Charakterisierung der stabil exprimierenden Zell-Linien	86
4.4.2	Chromatin-Immunpräzipitation	87
4.4.3	Genexpressionsanalyse	88
4.4.4	Kombinierte Datenanalyse zur Identifizierung direkter Zielgene	89
4.4.5	TEL-AML1 ist unter anderem an der Regulation der Apoptose und der negativen Regulation der Zellproliferation beteiligt	90
4.4.6	Vergleichende Darstellung der funktionellen Annotationen	91
4.4.7	Der Vergleich der ChIP- und Genexpressionsdaten mit Genexpressionsprofilen aus Patientenmaterial lieferte 43 gemeinsame, gleichsinnig regulierte TEL-AML1 Zielgene	92
4.5	Vergleich der TEL-AML1 Zielgene in murinen und humanen Zell-Linien	95
4.5.1	Korrelation TEL-AML1 gebundener Promotorbereiche	95
4.5.2	Der Vergleich der ChIP- und Genexpressionsdaten aus den murinen und humanen Zell-Linien liefert lediglich ein gemeinsames Gen: <i>CENP-P</i>	99
4.5.3	In Gegenwart von TEL-AML1 differentiell exprimierte Gene	100
5	DISKUSSION	103
5.1	Die verschiedenen Zellsysteme	104
5.1.1	Das murine, induzierbare Zellsystem	104
5.1.2	Das humane Zellsystem	110
5.2	Vergleich der TEL-AML1 Zielgene im murinen und humanen Zellsystem	114
5.2.1	Korrelation TEL-AML1 gebundener Promotorbereiche	114
5.2.2	Die Schnittmenge der ChIP- und Genexpressionsdaten aus beiden Zellsystemen und den Genexpressionsprofilen TEL-AML1-positiver Patienten enthält lediglich ein Gen: <i>CENP-P</i>	114
5.2.3	In Gegenwart von TEL-AML1 werden sowohl in den beiden Zellsystemen als auch in TEL-AML1-positiven Patienten 36 Gene differentiell exprimiert	115
5.2.4	Zusammenfassende Schlussfolgerungen	116
6	AUSBLICK	117
7	LITERATURVERZEICHNIS	119
8	ANHANG	139
8.1	pGene/V5-His Vektorkarte	139
8.2	pSwitch Plasmidkarte	140
8.3	Vergleich der in den murinen ChIP-Experimenten angereicherten GO-Termini	141
8.4	Schnittmenge der ChIP-Ergebnisse und der differentiell exprimierten Gene im murinen induzierbaren Zellsystem	142
8.4.1	Hochregulierte TEL-AML1 Zielgene	142
8.4.2	Herunterregulierte TEL-AML1 Zielgene	145
8.5	Vergleich der in den humanen ChIP-Experimenten angereicherten GO-Termini	147

8.6	Schnittmenge der ChIP-Ergebnisse und der differentiell exprimierten Gene im humanen Zellsystem	148
8.6.1	Hochregulierte TEL Zielgene	148
8.6.2	Herunterregulierte TEL Zielgene	150
8.6.3	Hochregulierte AML1 Zielgene	151
8.6.4	Herunterregulierte AML1 Zielgene	152
8.6.5	Hochregulierte TEL-AML1 Zielgene	153
8.6.6	Herunterregulierte TEL-AML1 Zielgene	155
8.7	Funktionelle Annotation der Genexpressionsprofile der murinen und humanen Zellsysteme sowie der TEL-AML1-positiven Patienten	157
8.7.1	Top50 der innerhalb der hochregulierten Gene angereicherten GO-Termini	157
8.7.2	Top50 der innerhalb der herunterregulierten Gene angereicherten GO-Termini	158
LEBENS LAUF		i
VERÖFFENTLICHUNGEN IM RAHMEN DER PROMOTION		iii
SONSTIGE VERÖFFENTLICHUNGEN		iv
EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG		v



ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Ab	<i>antibody</i>
Abb.	Abbildung
ABC	Ammoniumbicarbonat
AK	Antikörper
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
AML	Akute Myeloische Leukämie
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	<i>circa</i>
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
CML	Chromisch Myeloische Leukämie
CMV	Cytomegalievirus
Δ	Deletion
d. h.	das heißt
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagles Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ECFP	<i>enhanced cyan fluorescent protein</i>
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-tetraacetat
<i>et al.</i>	<i>et altera</i>
etc.	<i>et cetera</i>
evt.	eventuell(e)
EYFP	<i>enhanced yellow fluorescent protein</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FBS	<i>foetal bovine serum</i>
g	Gravitationskonstante
G418	Analogon zu Neomycin
ggf.	gegebenenfalls
GVO	gentechnisch veränderte Organismen
h	Stunde(n)
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethylsulfonsäure
HFBA	Heptafluorbuttersäureanhydrid
HOAc	Essigsäure
IAA	Iodacetamid
IgG	Immunglobulin G
IL-3	Interleukin 3
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
inkl.	inklusive
IRES	<i>internal ribosome entry site</i>

Kap.	Kapitel
kb	Kilobasen
l	Liter
LB	Luria Bertani
LM-PCR	<i>ligation-mediated PCR</i>
m	Meter
M	Molar
μ	mikro (10 ⁻⁶)
ml	Milliliter
MeOH	Methanol
Mifepriston	17β-Hydroxy-11β-(4-dimethylamino-phenyl)- 17α-(1-propinyl)estra-4,9-dien-3-on
min	Minute(n)
Mio.	Millionen
mRNA	<i>messenger RNA</i>
Mw	Molekulargewicht
n	nano (10 ⁻⁹)
N	Normal
NaCl	Kochsalz
NaOH	Natriumhydrogenoxid
Nt.	Nukleotide
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
p	piko (10 ⁻¹²)
PA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
Pen/Strep.	Penicillin/Streptomycin
PIPES	Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pos.	Position
PVDF	Polyvinylidendifluorid
qPCR	Quantitative PCR
rpm	<i>rounds per minute</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
s	Sekunde(n)
S.	Seite
s.	siehe
s. o.	siehe oben
s. u.	siehe unten
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SV40	<i>Simian Virus 40</i>

Tab.	Tabelle
TBP	TATA <i>binding protein</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
u. a.	unter anderem
U	<i>Unit</i>
u. ä.	und ähnliche(s)
üN	über Nacht
usw.	und so weiter
vgl.	vergleiche
v/v	<i>volume per volume</i>
wt	Wildtyp
w/v	<i>weight per volume</i>
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galaktopyranosid
z. B.	zum Beispiel



ABBILDUNGSVERZEICHNIS

1.1	Cytogenetik des Philadelphia Chromosoms	8
1.2	Überlagerung der Bruchpunkte in TEL bzw. AML1 mit MARs	10
1.3	Die drei physiologisch wichtigsten AML1 Isoformen	13
1.4	Funktionelle Domänen des AML1-c	14
1.5	Funktionelle Domänen des TEL	18
1.6	Schematische Darstellung der reziproken Translokation t(12;21)	20
1.7	Der chimäre Transkriptionsfaktor TEL-AML1	22
3.1	Konzeption der SILAC Zellkultur-Ansätze	42
3.2	Das Gene/Switch System	44
3.3	<i>Overlap extension</i> PCR nach Ho	50
3.4	Der TEL-AML1 spezifische Antikörper	53
4.1	Optimierung der eingesetzten Mifepriston-Konzentration	60
4.2	Optimierung der Dauer der Mifepriston Behandlung	61
4.3	Optimierung der für die Induktionen eingesetzten Zellzahl	62
4.4	Der TEL-AML1 spezifische Antikörper	63
4.5	Nachweis der Funktionalität und Spezifität im Vergleich zu einem AML1 spezifischen Antikörper (Western Blot)	63
4.6	Nachweis der Funktionalität und Spezifität im Vergleich zu einem V5 spezifischen Antikörper (Western Blot und FACS)	64
4.7	Optimierung des Chromatin-Scherens	65
4.8	Promotorspezifische PCR an unterschiedlich stark geschertem Chromatin	66
4.9	Etablierung der Chromatin-Immünpräzipitation (Proteinebene)	66
4.10	Etablierung der Chromatin-Immünpräzipitation (DNA-Ebene)	67
4.11	Vergleich von ProteinA/G Agarose mit magnetischen <i>beads</i>	68
4.12	Amplifikationseffizienz der Gzmb-promotorspezifischen Primerpaare	69
4.13	Vergleich von LM-PCR und WGA Kit	70
4.14	Anreicherungsfaktoren der CHIP-Experimente mit TEL-AML1-spezifischem Antikörper im murinen Zellsystem	71
4.15	Übereinstimmung der TEL-AML1 gebundenen Promotorbereiche mit vorhergesagten AML1-Bindestellen	72
4.16	Anreicherungsfaktoren der CHIP-Experimente an endogenem AML1 und TEL in murinen BA/F3	73
4.17	Schnittmengen der CHIP-Ergebnisse für AML1, TEL und TEL-AML1	74
4.18	Bestimmung der RNA-Konzentration und der Integrität	74
4.19	FACS-Analyse zur Bestimmung des Mifepristoneffekts	75
4.20	Schnittmengen der Ergebnisse der drei <i>screening</i> Methoden	76
4.21	Überrepräsentierte GO-Termini der Schnittmenge „ChIP+Genexpression“	78
4.22	Überrepräsentierte GO-Termini der Schnittmenge „Genexpression+Protein“	79
4.23	Unterschiede in angereicherten GO-Termini	81

4.24	Validierung einiger im murinen Zellsystem identifizierter TEL-AML1 Zielgene in Patientenmaterial	82
4.25	Schnittmengen der murinen CHIP- und Genexpressionsprofilen mit Genexpressionsdaten TEL-AML1 positiver Patienten	82
4.26	Kolokalisation der gebundenen murinen Promotorbereiche mit Genexpressionsdaten TEL-AML1 positiver Patienten	84
4.27	Schnittmenge hoch- bzw. herunterregulierter Gene und Proteine	85
4.28	Nachweise der TEL-, AML1- und TEL-AML1 Expression in stabil exprimierenden NALM6 Zell-Linien	86
4.29	Anreicherungsfaktoren der CHIP-Experimente in stabil exprimierenden NALM6 Zell-Linien	87
4.30	Schnittmengen der CHIP-Ergebnisse für AML1, TEL und TEL-AML1	88
4.31	Bestimmung der RNA-Konzentration und der Integrität	88
4.32	Schnittmengen der CHIP- und Genexpressionsanalysen für AML1, TEL und TEL-AML1	89
4.33	Überrepräsentierte GO-Termini der Schnittmenge „CHIP+Genexpression“	90
4.34	Unterschiede in angereicherten GO-Termini	91
4.35	Schnittmengen der murinen CHIP- und Genexpressionsprofilen mit Genexpressionsdaten TEL-AML1 positiver Patienten	92
4.36	Kolokalisation der gebundenen murinen Promotorbereiche mit Genexpressionsdaten TEL-AML1 positiver Patienten	94
4.37	Kolokalisation TEL-AML1 gebundener Promotorbereiche in murinen und humanen Zell-Linien	95
4.38	Schnittmengen der CHIP-Ergebnisse für AML1, TEL und TEL-AML1 in murinen und humanen Zell-Linien	96
4.39	Kombinierte Analyse der CHIP- und Genexpressionsdaten der murinen und humanen Zell-Linien	99
4.40	CENP-P Western Blot	99

TABELLENVERZEICHNIS

1.1	Nomenklatur der Runx-Proteine	12
4.1	Direkte TEL-AML1 Zielgene	77
4.2	Überrepräsentierte GO-Termini in der Schnittmenge aller drei <i>screenings</i>	78
4.3	Schnittmenge der im murinen Zellsystem und in TEL-AML1 positiven Patienten gleichsinnig misexprimierten Gene	83
4.4	Überräpräsentierte GO-Termini in der Schnittmenge CHIP+ Genexpression des murinen Zellsystems und Genexpressionsprofil der Patienten	84
4.5	Gegensätzlich regulierte Gene und Proteine	85
4.6	Schnittmenge der im humanen Zellsystem und in TEL-AML1 positiven Patienten gleichsinnig misexprimierten Gene	93
4.7	Überräpräsentierte GO-Termini in der Schnittmenge CHIP+ Genexpression des humanen Zellsystems und Genexpressionsprofil der Patienten	94
4.8	Überräpräsentierte GO-Termini in der Schnittmenge der CHIP-Ergebnisse des murinen und humanen Zellsystems	96
4.9	Schnittmenge der in den beiden Zellsystemen sowie in den Patienten differentiell exprimierten Gene	100
4.10	Überräpräsentierte GO-Termini in der Schnittmenge der Genexpressionsprofile der beiden Zellsysteme sowie der Patienten	101

ZUSAMMENFASSUNG

Chromosomale Aberrationen wie z. B. Translokationen und die daraus resultierenden Gen-Fusionen spielen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung onkologischer Erkrankungen. Die reziproke Translokation t(12;21) (p13;q22) ist mit ca. 25% der pädiatrischen Prä-B-Zell Leukämien assoziiert und damit die häufigste genetische Aberration, die in akuten lymphatischen Leukämien (ALL) des Kindesalters gefunden wird. Sie führt zur Fusion der beiden Transkriptionsfaktoren TEL (ETV6; *ETS variant gene 6*) und AML1 (RUNX1; *runt-related transcription factor 1*), die beide eine wichtige Rolle in der Hämatopoese spielen. Das Fusionsprotein TEL-AML1 enthält neben der zentralen Region auch die sogenannte *pointed* Domäne des TEL und bis auf die ersten 21 Aminosäuren alle wichtigen Domänen und Sequenzbereiche des AML1. Bei TEL-AML1 handelt es sich demnach um einen chimären Transkriptionsfaktor, dessen direkte Wechselwirkung mit der DNA durch den AML1-Anteil vermittelt wird, während Protein-Protein-Interaktionen von beiden Proteinen beigesteuert werden. Die Translokation t(12;21) findet bereits *in utero* statt und erfolgt in einer frühen Vorläuferzelle, welche vermutlich noch nicht auf die B-Zell-Linie festgelegt ist. Interessanterweise lässt sich die Translokation später nur in Prä-B-Zellen nachweisen, was die Vermutung nahe legt, dass sie in den anderen Zell-Linien aus bislang unbekanntem Gründen nicht toleriert wird. In Untersuchungen an *knock-in* Mäusen konnte gezeigt werden, dass TEL-AML1 selbst nicht direkt transformierend wirkt (Fischer *et al.*, 2005), aber Zellen, die diese Translokation tragen, als prä-maligner Klon im Knochenmark persistieren. Die Ansammlung weiterer genetischer Aberrationen, meist u. a. eine Deletion des nicht-translozierten *TEL* Allels, führt dann vermutlich zur Transformation der Zellen und damit zur Leukämogenese. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die spezifisch durch TEL-AML1 regulierten Gene zu identifizieren und somit Hinweise auf eine mögliche Beteiligung an der Leukämogenese bzw. der Generierung eines prä-leukämischen Klons aufzuklären.

Die ersten Untersuchungen fanden in einem induzierbaren murinen Zellsystem statt, welches nach Zugabe von Mifepriston eine starke TEL-AML1 Expression zeigte (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Anthony Ford und Mel Greaves, London). Diese Zellen wurden sowohl für Chromatin-Immünpräzipitationen (ChIP) als auch für Genexpressions- und Proteomanalysen mittels *stable isotope labelling by amino acids in cell culture* (SILAC) eingesetzt. Für die Verifizierung der Ergebnisse wurden außerdem primäre TEL-AML1-positive Leukämieproben untersucht. Die auf diese Weise identifizierten, exklusiven TEL-AML1 Zielgene regulieren Gene, welche u. a. an biologischen Prozessen wie der negativen Transkriptionsregulation, der Lymphocytendifferenzierung, der positiven Regulation der Signaltransduktion, der RNA-Prozessierung, und der Organisation des Chromatins beteiligt sind. Auch wenn keines dieser Gene bereits als Auslöser für die Entstehung einer akuten Prä-B-Zell Leukämie beschrieben wurde, so lässt die Gesamtheit der durch die TEL-AML1 Expression betroffenen Stoffwechselwege doch vermuten, dass ihre veränderte Regulation bzw. Funktionsweise zu einer Transformation der Zellen beiträgt. Der Vergleich der mittels ChIP und Genexpressionsanalyse nachgewiesenen Zielgene mit den in Genexpressionsprofilen TEL-AML1-positiver Patienten differentiell exprimierten Gene lieferte 39 übereinstimmende, gleichsinnig regulierte Gene, von denen mindestens drei (*CDP*, *ORC1* und *SNIP1*) bereits im Zusammenhang mit malignen Transformationen beschrieben wurden. Wie bereits erwähnt erfolgt die Translokation t(12;21) bereits *in utero*, so dass

die betroffenen Zellen über einen Zeitraum von mehreren Jahren TEL-AML1 exprimieren bevor es zur Ausbildung einer Leukämie kommt. Daher wurden zudem stabil exprimierende humane B-Vorläuferzell-Linien für die Expression von AML1, TEL und TEL-AML1 generiert und ebenfalls die exklusiven durch TEL-AML1 regulierten Zielgene mittels CHIP und Genexpressionsanalysen identifiziert. Diese waren hauptsächlich an biologischen Prozessen wie der Regulation der Apoptose, der negativen Regulation der Zellproliferation, dem Vesikel-vermittelten Transport, der Regulation der Proteinlokalisierung und der Regulation der Gen-spezifischen Transkription beteiligt. Ein Vergleich mit Genexpressionsprofilen TEL-AML1-positiver Patienten ergab 43 übereinstimmende, gleichsinnig regulierte Gene, von denen mindestens drei (*EAF2*, *LGR5* und *NUAK1*) bereits mit malignen Transformationen in Verbindung gebracht werden konnten. Insgesamt legen die in dieser Arbeit aufgedeckten TEL-AML1 Zielgene den Schluss nahe, dass die Expression von TEL-AML1 die betroffenen Zellen anfälliger für das Anhäufen weiterer schädlicher Aberrationen macht indem i) die Kontrolle von Proliferation und Differenzierung beeinträchtigt wird, ii) die Transkription und die Proteinlokalisierung fehlreguliert werden und iii) die Organisation des Chromatins verändert wird.

Die Schnittmenge der sowohl im murinen als auch im humanen Zellsystem sowie in den TEL-AML1-positiven Patienten identifizierten, misregulierten Zielgene enthielt lediglich ein Gen, *CENP-P* (*centromere protein p*), welches allerdings im humane Zellsystem eine Herunterregulation zeigte während es im murinen Zellsystem und den Patienten hochreguliert exprimiert war. Dennoch handelt es sich um ein interessantes Zielgen, dessen genauere Bedeutung für die TEL-AML1-induzierte Leukämogenese genauer untersucht werden sollte, da in den Genexpressionsprofilen der TEL-AML1-positiven Patienten insgesamt zehn Centromer-proteine eine signifikante Misregulation zeigten; interessanterweise waren alle hochreguliert.

Ein Vergleich der TEL-AML1 regulierten Zielgene mit denen des Wildtyp-AML1 zeigte kein auffällig hohes Maß an Übereinstimmung, auch wenn durch TEL-AML1 gebundene und angereicherte Promotorbereiche zumeist mit vorhergesagten AML1-Bindestellen auf der DNA kolokalisierten. Daher liegt die Vermutung nahe, dass TEL-AML1 zwar über die noch vorhandene DNA-Bindedomäne des AML1 an die DNA bindet, dabei aber größtenteils Gene reguliert, die zumindest im gegebenen Zellkontext bzw. Differenzierungsstadium nicht oder nicht mehr von AML1 reguliert werden.

SUMMARY

Chromosomal aberrations like translocations leading to fusion of two different genes play an important role in the development of malignant diseases. The reciprocal translocation t(12;21) (p13;q22) is the most common structural chromosomal alteration in pediatric cancer as it occurs in approximately 25% of B-cell precursor acute lymphoblastic leukemias (ALL). It leads to in frame fusion of two transcription factors, namely TEL (ETV6; ETS variant gene 6) and AML1 (RUNX1; runt-related transcription factor 1), both known to be involved in hematopoiesis. The resulting fusion protein TEL-AML1 contains the central and the pointed domain of TEL and, except the first 21 aminoacids, the entire sequence of AML1. Therefore it is expected that DNA-binding of the chimeric transcription factor TEL-AML1 is mediated by the AML1 fraction whereas both portions contribute to protein-protein-interactions. The translocation t(12;21) already occurs *in utero*, presumably in an early progenitor cell which is not committed to the B-cell lineage, yet. Interestingly, it can only be detected in pre-B-cells later on leading to the assumption that it might not be tolerated by other lineages for unknown reason. Experiments with knock-in mice showed no transforming potential for TEL-AML1 itself (Fischer *et al.*, 2005), but cells carrying the translocation persist as premalignant clones in the bone marrow. Accumulation of further genetic aberrations, mainly deletion of the residual wildtype *TEL* allele, results in malignant transformation and development of overt leukemia. The purpose of the present work was to identify direct target genes that are regulated by TEL-AML1 and could help elucidating the putative role of TEL-AML1 for leukemogenesis and the establishment of a preleukemic clone. To address this issue an inducible murine pro-B-cell system developed from the BA/F3 cell line (kindly provided by Anthony Ford and Mel Greaves, London) was used, expressing high levels of TEL-AML1 after mifepriston treatment. Cells were subjected to several state-of-the-art genome-wide screening methods, namely ChIP-on-chip, gene expression arrays and stable isotope labelling by amino acids in cell culture (SILAC). Furthermore, primary material of TEL-AML1-positive patients was analysed for verification of gained results. The correlation of the generated data helped to unveil global biological processes affected by TEL-AML1 expression, e. g. negative regulation of transcription, lymphocyte differentiation, positive regulation of signal transduction, RNA processing and chromatin organisation. As no target gene commonly known for its oncogenic potential was found to be regulated by TEL-AML1, one could assume that the observed alterations on one hand do not promote onset of overt leukemia in affected cells by themselves. But on the other hand, these changes may contribute to the establishment of a latent cell reservoir prone for the accumulation of further mutations required for complete malignant transformation. The comparison of TEL-AML1 regulated target genes found in ChIP-on-chip and gene expression analysis with gene expression profiles obtained from TEL-AML1-positive patients revealed 39 differentially expressed genes showing concordant regulation. From these genes at least three (*CDP*, *ORC1* and *SNIP1*) were previously described in context with malignant transformation. As mentioned above the translocation t(12;21) occurs *in utero* and affected cells express TEL-AML1 several years before emergence of overt leukemia Therefore stable B-precursor cell lines were generated expressing either AML1, TEL or TEL-AML1 and subjected to ChIP-on-chip and gene expression analysis to identify exclusive TEL-AML1 regulated target genes. These were mainly involved in biological processes like regulation of apoptosis, negative regulation of proliferation, vesicle-mediated transport, regulation of protein localisation and regulation of gene-specific transcription.

Again the TEL-AML1 regulated target genes found in ChIP-on-chip and gene expression analysis were compared with gene expression profiles obtained from TEL-AML1-positive patients and identified 43 differentially expressed genes showing concordant regulation. At least three of these genes (*EAF2*, *LGR5* and *NUAK1*) were previously described in context with malignant transformation. Altogether, the TEL-AML1 regulated target genes identified in this work suggest that expression of TEL-AML1 renders the affected cells prone for accumulation of further harmful aberrations by i) impairing control mechanisms of differentiation and proliferation, ii) misregulating biological processes like transcription and protein localisation, and iii) altering chromatin organisation.

The intersection of misregulated genes identified in the murine and human cell-lines as well as in TEL-AML1-positive patients contained only one gene, *CENP-P* (centromere protein p), showing a contrarious regulation in the human cell line compared to the murine cell system and patients. However, *CENP-P* seems to be an interesting target gene whose attendance in TEL-AML1-induced leukemogenesis should be further investigated, especially because ten centromere proteins in total were found to be significantly upregulated in TEL-AML1-positive patients. Surprisingly, the comparison of TEL-AML1 target genes with those of AML1 displayed no striking degree of accordance, although promoterregions bound by TEL-AML1 mostly colocalised with predicted AML1 binding sites. This observation suggests that binding of TEL-AML1 to DNA is carried out by the corresponding domain of the AML1 portion, but largely regulates genes that are no AML1 target genes in the particular cellular context or differentiation stage.

1 EINLEITUNG

1.1 Regulation der Genexpression in Entwicklung und Differenzierung

Während der Embryogenese der Säugetiere werden über 200 verschiedene Zelltypen aus einer einzigen totipotenten Zelle gebildet. Dies geschieht mittels zelltypspezifischer Genexpressionsprogramme, welche durch das Zusammenspiel extrinsischer Signalwege und intrinsischer Netzwerke transkriptioneller Regulation etabliert werden (Arnold *et al.*, 2009). Bei der Kontrolle der Genexpression während der Entwicklung und Differenzierung der einzelnen Zelltypen spielen u. a. Transkriptionsfaktoren und sogenannte Chromatin *remodeller* eine Schlüsselrolle. Beispielsweise sind mindestens 20 Transkriptionsfaktoren an der Spezialisierung und Differenzierung der verschiedenen hämatopoetischen Zelltypen beteiligt (Rosenbauer *et al.*, 2007; Orkin *et al.*, 2008). Desweiteren ist die Organisation der Mikroumgebung im Zellkern für die Möglichkeit der Zelle, auf regulatorische Signale zu reagieren, von großer Bedeutung. Sie gewährleistet abhängig von Zelltyp und Differenzierungsstatus die optimale Anordnung von Nukleinsäuren und regulatorischen Proteinen, die für Protein-Protein- und Protein-DNA-Wechselwirkungen und somit für die Assemblierung regulatorischer Komplexe notwendig ist. Die Organisation innerhalb des Zellkerns sorgt daher für eine optimale zeitliche und räumliche Anordnung von Nukleinsäuren und Proteinen, welche zum einen sehr dynamisch ist, aber zum anderen auch eine charakteristische funktionelle Kompartimentierung darstellt (Young *et al.*, 2004; Zaidi *et al.*, 2005). Mittels biochemischer und zellbiologischer Untersuchungen konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass regulatorische Kernproteine über zielgerichtete Motive zu bestimmten Kompartimenten im Zellkern dirigiert werden. Hierzu gehört die sogenannte Kernmatrix-Zielsequenz (NMTS, *nuclear matrix targeting signal*), welche z. B. in den Transkriptionsfaktoren der RUNX-Familie zu finden ist (Zeng *et al.*, 1997; Zaidi *et al.*, 2001).

1.1.1 Die Kontrolle der Transkription erfolgt auf verschiedenen Ebenen

Die Transkription stellt einen der Schlüsselschritte für die Regulation der Genexpression dar. Diese Regulation hängt von der Kommunikation und der Interaktion zwischen vielen Multiproteinkomplexen ab, welche letztendlich die Weiterleitung regulatorischer Signale an die RNA-Polymerasen gewährleisten. In Eukaryoten sind daran diverse Proteinkomplexe beteiligt. Sie ermöglichen die Regulation der Transkription auf jeder Ebene vom Chromatin *remodelling* über die Methylierung von CpG Dinukleotiden innerhalb der Promotorregion bis hin zur RNA-Prozessierung. Zu diesen Proteinen gehören neben den Histonen auch Enzyme, die den Methylierungsstatus der DNA verändern können, sowie Transkriptionsfaktoren und Ko-Aktivatoren. Während Transkriptionsfaktoren an regulatorische Sequenzbereiche binden und die Bildung des Präinitiationskomplexes ermöglichen, vermitteln Ko-Aktivatoren Signale an die Transkriptionsmaschinerie. Zudem verändert sich das Ausmaß an Kondensation des Chromatins während des Zellzyklus und spielt ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Regulation der Genexpression. Während der Interphase wird die DNA transkribiert und repliziert, daher befindet sich der Großteil des Chromatins in dekondensiertem Zustand (Euchromatin), während ungefähr 10% stark kondensiert (Heterochromatin) und damit transkriptionell inaktiv sind. Allerdings ist

auch im dekondensierten Zustand die Zugänglichkeit der DNA durch die kompakte Verpackung in Chromatin deutlich eingeschränkt. Daher herrscht eine dynamische Balance zwischen effektiver Chromatin-Verpackung einerseits und seiner Zugänglichkeit für Proteine andererseits, welche einen weiteren Aspekt der Regulation der Genexpression darstellt (Narlikar *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2007). Durch die Dichte, die Zusammensetzung und die Position der Nukleosomen kann die Promotorarchitektur so verändert werden, dass unter den gegebenen Bedingungen regulatorische Sequenzbereiche zugänglich sind und so die Genexpression aktiviert wird (Schones *et al.*, 2008). Zwei gegensätzliche Promotorarchitekturen, die als „offen“ bzw. „geschlossen“ bezeichnet werden, kennzeichnen dabei Gene, die konstitutiv bzw. stark reguliert exprimiert werden (Field *et al.*, 2008; Tirosh *et al.*, 2008). Promotoren konstitutiv aktiver Gene besitzen typischerweise größere (150 bp) Regionen, die arm an Nukleosomen sind (*nucleosome-depleted regions*, NDR; Lee *et al.*, 2004a). Diese liegen strangaufwärts vom Transkriptionsstart und enthalten *cis*-regulatorische Sequenzbereiche. Im Gegensatz dazu zeichnen sich Promotoren reguliert exprimierter Gene in ihrem reprimierten Zustand dadurch aus, dass die Nukleosomen häufig sowohl den Transkriptionsstart als auch viele Bindestellen für Ko-Aktivatoren bedecken. Die Methylierung der DNA führt zu einer lokal begrenzten Deacetylierung von Histonen, woraus wiederum eine geschlossene Chromatin-konfiguration und damit eine reprimierte Genexpression resultiert (Bernstein *et al.*, 2007). Im Gegensatz dazu führt eine Hypomethylierung der DNA zu genetischer bzw. chromosomaler Instabilität (Galm *et al.*, 2006). Die Basis aller transkriptionellen Aktivität und ihrer Regulation ist dabei die Rekrutierung von Transkriptionskomplexen zu ihren Zielgenen.

1.1.2 Wie Transkriptionsfaktoren ihre Zielgene finden

Die basale Transkriptionsmaschinerie ist mit definierten Bindestellen in Promotorregionen assoziiert, während regulatorische Faktoren an spezifische Stellen innerhalb von Kontrollelementen in der Nähe oder aber auch in größerer Entfernung zu ihrem Zielgen binden. Allerdings sind in beiden Fällen die spezifischen Bindestellen im Vergleich zu den unspezifischen Bindestellen, mit denen eine Interaktion ebenfalls möglich ist, äußerst selten innerhalb der genomischen Sequenz vertreten. Geht man von einer Kernpromotorgöße von etwa 150 Nt. aus, so machen Promotorregionen nur ungefähr 0,1% des menschlichen Genoms aus (Hager *et al.*, 2009). Der Schlüssel für eine effiziente Rekrutierung der Transkriptionsmaschinerie zu ihrer Zielsequenz sind zwei fundamentale dynamische Eigenschaften der Transkriptionsfaktoren. Zum einen bewegen sie sich durch Diffusion mit Diffusionskoeffizienten zwischen $0,5$ und $5 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ sehr schnell durch den Zellkern (Mistelli, 2001; Gorski *et al.*, 2006), je nach Größe und Form des Moleküls und seiner jeweiligen Wechselwirkung mit dem Chromatin. In zelluläre Verhältnisse gesetzt erlaubt dies die Durchquerung eines typischen Säugetier-Zellkerns innerhalb weniger Sekunden. Zudem benötigt die nicht-gerichtete Diffusion keine Energie. Zum anderen ist die Bindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA, wie die des Großteils der Chromatinproteine, äußerst transient (Sprague *et al.*, 2004; Mueller *et al.*, 2008) und ihre Dauer liegt typischerweise in der Größenordnung von Sekunden (Phair *et al.*, 2004; Gorski *et al.*, 2006). Transkriptionsfaktoren finden ihre spezifischen Bindestellen zum einen nach dem so genannten *3D scanning* Model (Misteli, 2001), indem sie fortwährend von einer unspezifischen Bindestelle zur nächsten „hüpfen“ und hier nur sehr kurz verweilen (*3D hopping*). Erfolgt die Bindung an die entsprechende Zielsequenz, hält diese für einen längeren Zeitraum an und ermöglicht so eine funktionelle Wechselwirkung. Dieses Model wird

durch die Beobachtung gestützt, dass ein Großteil der Moleküle eines jeden Transkriptionsfaktors zu jeder Zeit an die DNA gebunden ist, wenngleich nicht an ihrer Zielsequenz (Phair *et al.*, 2004). Zum anderen besitzen zumindest einige chromatinbindende Proteine die Fähigkeit zur eindimensionalen Diffusion entlang der DNA (Gowers *et al.*, 2005; Gorman & Greene, 2008).

1.1.3 Die fehlerhafte Transkriptionskontrolle von Schlüsselgenen in hämatopoetischen Vorläuferzellen gilt als initialer Schritt in der Leukämogenese

Alle Zelltypen des blutbildenden Systems stammen von hämatopoetischen Stammzellen ab, welche sowohl in der Lage sind, sich selbst zu erneuern, als auch in verschiedene Vorläufer der lymphoiden und myeloiden Reihe zu differenzieren. Diese Vorläufer wiederum differenzieren in weitere Zwischenstufen, aus denen letztendlich die reifen Zellen entstehen (Iwasaki & Akashi, 2007; Orkin & Zon, 2008). Während der Differenzierung hin zu den reifen Blutzellen finden geordnete Veränderungen der Genexpression statt, die durch mehrere linienspezifische Transkriptionsfaktoren reguliert werden (Novershtern *et al.*, 2011).

Bei einer Leukämie handelt es sich um eine maligne Veränderung hämatopoetischer Zellen, durch die die Balance zwischen Proliferation, Differenzierung und Apoptose gestört ist. Eine Veränderung der Expression, das komplette Fehlen oder häufiger noch eine chromosomale Translokation eines der Schlüsselgene der Hämatopoese, die z. B. für Transkriptionsfaktoren oder andere chromatinmodifizierende Enzyme kodieren, ist oftmals der initiale Faktor bei der Entstehung einer Leukämie (Look, 1997). Entstehen bei solchen Translokationen chimären Genprodukte wie z. B. TEL-AML1, haben diese oft einen dominant negativen Effekt auf die Genexpression essentieller Gene, da sie entweder direkt oder indirekt mit Ko-Faktoren der Transkription oder chromatinmodifizierenden Enzymen interagieren und so eine normale Zelldifferenzierung verhindern. Sie verändern unter anderem den Histon-Code (Jenuwein & Allis, 2001) oder die DNA-Methylierung (Bird, 2002; Li, 2002; Villa *et al.*, 2004) an den Promotorbereichen ihrer Zielgene, deren Expression wiederum oft kritisch für die Stammzellentwicklung oder die Linienspezialisierung während der Hämatopoese ist. Als Folge hiervon kommt es zur Akkumulation unreifer Vorläuferzellen im Blut und damit zum Krankheitsbild der Leukämie.

1.2 Genetische Aberrationen und die Entstehung maligner Erkrankungen

1.2.1 Translokationen spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung maligner Erkrankungen

Chromosomale Aberrationen, insbesondere Translokationen und die daraus resultierenden Fusionsgene, spielen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung onkologischer Erkrankungen. Bislang wurden 328 Gen-Fusionen in malignen Erkrankungen identifiziert, bei denen 306 verschiedene Gene rearrangiert oder dereguliert waren (Review: Mitelman *et al.*, 2007).

Erstmals wurden chromosomale Aberrationen 1914 von Theodor Boveri als ursächliche Faktoren für die Krebsentstehung vorgeschlagen (Boveri, 1914). Doch erst ein knappes halbes Jahrhundert später war es mit Hilfe des technischen Fortschritts möglich, menschliche Chromosomen zu färben und somit ihre strukturellen Veränderungen zu visualisieren.

Mit der Entdeckung des so genannten Philadelphia Chromosoms (s. Abb. 1.1) in Blutzellen von Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie (CML) durch Nowell und Hungerford im Jahre 1960, gelang erstmals der Nachweis einer spezifischen Chromosomen-Veränderung bei einer onkologischen Erkrankung (Nowell & Hungerford, 1960). Heute herrscht generelle Übereinkunft, dass es sich bei Krebs um eine genetische Erkrankung auf zellularer Ebene handelt (Aplan, 2006). Dabei spielen hauptsächlich zwei initiale genetische Ereignisse eine Rolle: Entweder die Inaktivierung eines Gens durch Deletion, Mutation oder epigenetische Mechanismen, oder die Aktivierung eines Gens durch Punktmutation, Amplifikation oder balancierte cytogenetische Veränderungen (Review: Rabbits, 1994).

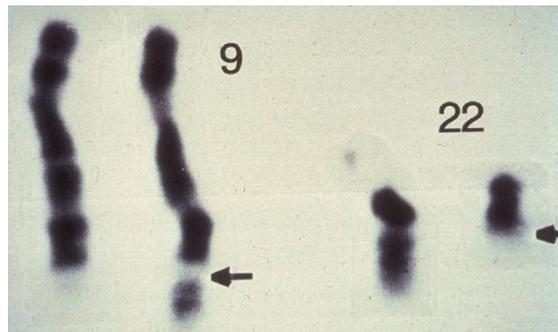


Abbildung 1.1 Die Translokation $t(9;22)(q34;q11)$ wird in fast allen Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie (CML) gefunden. Cytogenetisch ist häufig ein verkürztes Chromosom 22 sichtbar, welches auch als Philadelphia Chromosom bezeichnet wird. (Quelle: http://www.nature.com/scitable/content/25070/2326Ph1Chromosome_EBesa_FULLL.jpg)

Zu den balancierten cytogenetischen Veränderungen gehören Translokationen und Inversionen, die zwei wichtige Konsequenzen für die Entstehung einer malignen Erkrankung haben können. Durch das Rearrangement gelangt entweder ein Proto-Onkogen unter die Kontrolle eines anderen Promotors und wird dadurch aktiviert oder die Bruchpunkte liegen in intronischen Bereichen zweier Gene und es entsteht ein Fusionsgen, welches ein chimäres Protein mit veränderten Eigenschaften kodiert. Hiervon sind häufig Transkriptionsfaktoren, Tyrosinkinasen, Wachstumsfaktoren oder deren Rezeptoren betroffen, so dass es zu einer veränderten Transkription oder Signaltransduktion und als Folge davon zu aberranter Zellproliferation und gestörter Zellzykluskontrolle, sowie blockierter Differenzierung und verminderter Apoptose kommen kann.

Balancierte Rearrangements, zumeist Translokationen, wurden bereits in nahezu allen Arten von Tumoren entdeckt (s. auch Mitelman Database, Mitelman *et al.*, 2006): 267 in akuten myeloischen Leukämien (AML), 155 in akuten lymphatischen Leukämien (ALL) und 75 in malignen soliden Tumoren (Review: Mitelman *et al.*, 2007). Viele dieser genetischen Veränderungen sind von bemerkenswerter Spezifität, dass heißt sie sind zum einen mit bestimmten Tumorarten und klinischen Merkmalen assoziiert (Mitelman *et al.*, 2005), zum anderen zeichnen sie sich durch charakteristische

Genexpressionprofile aus (Fine *et al.*, 2004). Da die Entstehung eines Tumors oft das Ergebnis eines *multistep* Prozesses ist, der in der Anhäufung verschiedener genetischer Aberrationen besteht, sind balancierte Rearrangements meist nicht die einzigen Veränderungen in transformierten Zellen. Man unterscheidet dabei primäre und sekundäre Aberrationen. Zu den ersteren gehören typischerweise balancierte Rearrangements; sie werden als pathogenetisch signifikante, initiale Ereignisse angesehen. Im Gegensatz dazu werden sekundäre Aberrationen während der Tumorprogression erworben und sind typischerweise genetisch unbalanciert wie z. B. Monosomien, Deletionen, Trisomien oder Duplikationen.

1.2.2 *Wie Translokationen entstehen*

Sucht man nach der Ursache für die Entstehung chromosomaler Aberrationen wie z. B. Translokationen, liegt die Vermutung nahe, dass DNA-Doppelstrangbrüche daran beteiligt sind (Aplan, 2006). Es ist zwar bekannt, dass viele äußere Faktoren Brüche in Chromosomen induzieren, aber nur für sehr wenige Agenzien wie DNA Topoisomerase II Inhibitoren (Zhang & Rowley, 2006) und ionisierende Strahlung (Povrik, 2006) konnte gezeigt werden, dass sie bestimmte Translokationen induzieren können. Für die meisten Gen-Fusionen ist es bis heute allerdings nicht gelungen, spezifische Faktoren zu bestimmen, die für ihre Entstehung verantwortlich sind. Auch Patienten mit angeborenen Chromosomenbruch-Syndromen oder Defekten, die eine Instabilität auf DNA-Ebene bewirken, zeigen kein erhöhtes Auftreten maligner Erkrankungen, die auf chromosomalen Fusionen beruhen (Mitelman *et al.*, 2007). Daher wird die Entstehung von Translokationen oder Gen-Fusionen generell als Zufallsereignis angesehen.

1.2.3 *Wo Translokationen entstehen*

Eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Translokationen spielt sicherlich die dreidimensionale Anordnung der Chromosomen im Interphasekern, die die betroffenen Gene in räumliche Nähe zueinander bringt (Misteli, 2005; Cremer *et al.*, 2006). Tatsächlich konnte für einige von Translokationen häufig betroffene *loci* gezeigt werden, dass diese auch in den entsprechenden gesunden Zelltypen in räumlicher Nähe zueinander vorliegen (Kozubek *et al.*, 1999; Neves *et al.*, 1999; Nikiforova *et al.*, 2000; Roix *et al.*, 2003). Ob dies auch für andere wenn nicht sogar alle bekannten Gen-Fusionen zutrifft bedarf jedoch weiterer Untersuchungen. Es ist allerdings unwahrscheinlich, dass die räumliche Anordnung der Chromosomen im Zellkern allein bereits ausreicht, um die Entstehung von Translokationen hinreichend zu erklären. Mit Hilfe von durchgeführten Bruchpunktanalysen bei verschiedenen Translokationen konnten immerhin einige gemeinsame Merkmale identifiziert werden, die daher vermutlich ebenfalls eine Rolle bei der Bildung dieser Umlagerungen spielen. In den meisten Fällen waren die Bruchpunkte nicht über das gesamte Gen verteilt, sondern häuften sich in bestimmten intronischen Bereichen (Review: Zhang & Rowley, 2006). Diese Bereiche enthielten oft strukturelle Chromatin-Elemente wie potentielle *in vivo* DNA Topoisomerase II Bindestellen, DNase I hypersensitive Stellen und sogenannte *matrix* bzw. *scaffold attachment regions* (MAR/SAR; s. Abb. 1.2).

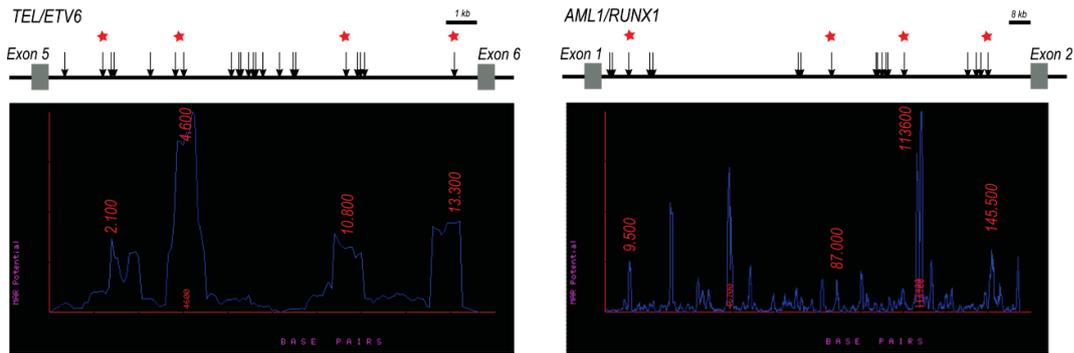


Abbildung 1.2 Einige bekannte Bruchpunkte (aus Zelen *et al.*, 2004; Pfeile) in intronischen Bereichen von TEL (ETV6; Intron 5-6) und AML1 (RUNX1; Intron 1-2) und ihre Überlagerung mit vorhergesagten *matrix attachment regions* (MAR; unten). Übereinstimmungen sind mit rotem Stern bzw. der Position, ebenfalls in rot dargestellt, angegeben. Die Vorhersage erfolgte mit Hilfe von MAR-WIZ (<http://genomecluster.secs.oakland.edu/cgi-bin/uncgi/marwiz.cgi>).

DNA Topoisomerase II ist ein Enzym, welches die Topologie der DNA verändern kann und sowohl für die Kondensation der Chromosomen als auch für die Transkription und die Replikation essentiell ist. Als Baustein der Kernmatrix bzw. des mitotischen Chromosomengerüsts (Lämmli, 1970) bindet es mit hoher Affinität an AT-reiche Sequenzbereiche der Matrixkontaktstellen (MAR) und deren chromosomale Analoga (SAR). Es wird vermutet, dass diese Sequenzbereiche einen Zugang für Proteinfaktoren ermöglichen, damit diese ihre Zielsequenzen für die Chromosomen-Kondensation, Transkription oder Replikation erreichen können. Sie repräsentieren außerdem Regionen mit erhöhter DNA-Instabilität, da hier die DNA entwunden werden kann. Das Fehlen homologer Sequenzbereiche sowie spezifischer Rekombinationsmotive an untersuchten Bruchpunkten zusammen mit dem Auftreten von mikro-Homologien (2-5 bp), kleinen Deletionen oder Duplikationen deutet darauf hin, dass die Religation der DNA-Doppelstrangbrüche in chromosomalen Translokationen durch nicht-homologe End-zu-End-Verknüpfung (*non-homologous-end-joining*, NHEJ) stattfindet (Review: Zhang & Rowley, 2006). Die hier genannten Merkmale treffen jedoch nicht auf alle bis heute identifizierten Translokationen zu, weshalb sicherlich noch andere strukturelle Eigenschaften der Chromosomen an der Lokalisation der Bruchpunkte beteiligt sind (Review: Povrik, 2006).

1.2.4 Chromosomale Instabilität und Aneuploidie

Wie bereits unter 1.2.1 erwähnt stellen balancierte Rearrangements initiale Ereignisse in der Pathogenese maligner Erkrankungen dar. Sie begünstigen das Auftreten sekundärer Aberrationen wie z. B. Monosomien, Deletionen, Trisomien oder Duplikationen während der Tumorphase, welche typischerweise unbalanciert sind. Deletionen und Duplikationen betreffen meist nur begrenzte Bereiche auf einem Chromosomabschnitt und sind das Resultat fehlerhafter Rekombinations- oder Transpositionereignisse und DNA-Reparaturmechanismen. Im Gegensatz dazu kommt es bei Monosomien oder Trisomien zum Verlust oder zum Zugewinn eines kompletten Chromosoms, was letztendlich auf eine nicht ordnungsgemäße Kontrolle des Zellzyklus und auf Fehler in den Mechanismen für die korrekte Verteilung der Chromosomen auf die beiden Tochterzellen während der Mitose zurück zu führen ist. Vor dem Eintritt in die Mitose liegt das Chromatin dekontensiert im Zellkern vor. Nach seiner Kondensation in der Prophase sammeln sich die nun im Lichtmikroskop

sichtbaren Chromosomen im Zentrum der Zelle und die Kernhülle beginnt zu fragmentieren. In der Prometaphase zerfällt die Kernhülle und es bilden sich Kinetochore an den Centromeren der Schwesterchromatiden. Diese sind mit Mikrotubuli der entgegengesetzten Spindelpole verbunden und sorgen dafür, dass sich die Chromosomen im Zentrum der Zelle sammeln. Zu Beginn der Metaphase sind die Chromosomen maximal verkürzt und werden durch die Mikrotubuli des Spindelapparates in der Äquatorialebene, der so genannten Metaphaseplatte der Zelle angeordnet. Daraufhin werden die Schwesterchromatiden im Verlauf der Anaphase zu den gegensätzlichen Spindelpolen gezogen, so dass jede zukünftige Tochterzelle einen vollständigen Chromatidensatz erhält. In der letzten Phase der Mitose, der Telophase, wird die Kernhülle neu gebildet, die Chromosomen decondensieren, die Kinetochor- und Mikrotubulifasern depolymerisieren und es folgt die Zytogenese. Um die gleichmäßige Verteilung des genetischen Materials auf die Tochterzellen zu gewährleisten, gibt es verschiedene Kontrollmechanismen, die das Fortschreiten der Mitose verhindern falls eine der Phasen nicht korrekt durchlaufen wurde. Der wichtigste Kontrollpunkt, der so genannte Spindel-Kontrollpunkt befindet sich am Übergang zwischen Meta- und Anaphase; er soll verhindern, dass es zu Unregelmäßigkeiten bei der Chromosomenverteilung auf die Tochterzellen kommt. Hier wird zum einen sichergestellt, dass alle Chromatiden mit dem Spindelapparat verbunden sind und zum anderen dafür gesorgt, dass die jeweiligen Schwesterchromatiden an Mikrotubuli entgegengesetzter Spindelpole geheftet sind (Bharadwaj & Yu, 2004). Auch wenn die Funktionsweise dieses Kontrollmechanismus noch weitgehend unverständlich ist, sind aus Mutagenese-Untersuchungen an Hefe einige Komponenten mittlerweile bekannt und mehr oder weniger gut charakterisiert (Hoyt *et al.*, 1991; Li & Murray, 1991). Dazu gehören Mad1, Mad2, Mad3 (BubR1), Bub1, Bub3, Mps1 (Cleveland *et al.*, 2003; Yu, 2002) sowie andere Kinetochorproteine (u. a. CENP-A, CENP-E und CENP-F), die vermutlich für die Assemblierung eines funktionsfähigen Kinetochors und die Rekrutierung der Kontrollproteine verantwortlich sind (Cleveland *et al.*, 2003). Mittlerweile wurden Homologe dieser Proteine auch für höhere Organismen sowie Säugetieren entdeckt und ihre funktionelle Homologie experimentell bestätigt. Hierbei zeigte sich, dass eine Störung der Funktion dieser Proteine den Spindel-Kontrollpunkt außer Kraft setzt, was zu einer fehlerhaften Chromosomenverteilung und Aneuploidie führte (Yu, 2002; Stucke *et al.*, 2002; Luo *et al.*, 2002; Abrieu *et al.*, 2000; Gorbsky *et al.*, 1998; Tayler & McKeon, 1997).

1.3 AML1 (RUNX1)

1.3.1 AML1 ist eine Untereinheit des heterodimeren Transkriptionsfaktors CBF

Die drei heterodimeren Transkriptionsfaktoren der CBF-Familie (*core binding factors*) bestehen jeweils aus einer DNA-bindenden α -Untereinheit (CBFA) und einer regulatorischen, nicht DNA-bindenden β -Untereinheit (CBF β auch PEBP2 β genannt). Während die β -Untereinheit von CBF β (Chr 16q22.1) kodiert wird und allen drei Heterodimeren gemeinsam ist, wird die α -Untereinheit von einem der drei beim Menschen bekannten RUNX-Gene kodiert: RUNX1 (auch CBFA2, AML1 (*acute myeloid leukemia*) oder PEBP2 α A2 (*polyomavirus enhancer-binding protein 2*) genannt), RUNX2 (auch CBFA1, AML3 oder PEBP2 α A1 genannt) und RUNX3 (auch CBFA3, AML2 oder PEBP2 α A3 genannt; eine Übersicht der Nomenklatur der RUNX-Proteine und ihrer genomischen Lokalisation zeigt Tab. 1.1). Aufgrund der verschiedenen Bezeichnungen für die α -Untereinheit sind die Transkriptionsfaktoren auch unter den Namen AML oder PEBP2 bekannt, wobei der Einfachheit halber meist nur die α -Untereinheit für die Bezeichnung des betreffenden Transkriptionsfaktors verwendet wird. Sie fungieren als wichtige Regulatoren verschiedenster Entwicklungsvorgänge (Ogawa *et al.*, 1993a; Ogawa *et al.*, 1993b) und wurden erstmals beschrieben bei dem Versuch, die Entwicklung und Differenzierung regulierende Transkriptionsfaktoren zu identifizieren (Ito, 1996; Ito & Bae, 1997).

Tabelle 1.1 Nomenklatur der humanen RUNX-Gene (HGNC), ihre Synonyme und ihre genomische Lokalisation (www.ensembl.org).

RUNX1	CBFA2	AML1	PEBP2A2	21q22
RUNX2	CBFA1	AML3	PEBP2A1	6p21
RUNX3	CBFA3	AML2	PEBP2A3	1p36

Alle drei Heterodimere sind für verschiedene Entwicklungsvorgänge essentiell: AML1/CBF β ist wichtig für die Ausbildung der definitiven Hämatopoese und die Bildung von hämatopoetischen Stammzellen im Embryo, AML3/CBF β ist essentiell für die Osteogenese während AML2/CBF β eine wichtige Rolle bei der Neurogenese sowie der Thymopoese spielt (Levanon *et al.*, 1994; Levanon *et al.*, 2004; De Bruijn & Speck, 2004). Die RUNX-Proteine gehören zur evolutionär stark konservierten Runt-Familie von Transkriptionsfaktoren, die ihren Namen der strukturellen Homologie zum Drosophila Segmentierungsgen *runt* verdankt (Kania *et al.*, 1990; Kagoshima *et al.*, 1993; Canon & Banerjee, 2000). Da AML1 im Fokus der vorliegenden Arbeit steht, wird im Folgenden ausschließlich auf dieses RUNX-Protein eingegangen.

AML1 ist für die Embryonalentwicklung der Maus essentiell. Seine Inaktivierung führt u. a. zu einer Blockade der definitiven Hämatopoese und desweiteren zu schweren Blutungen im zentralen Nervensystem sowie im sich entwickelnden Rückenmark (Okuda *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1996) und ist daher letal. Ein spezifischer *knock-out* in allen adulten hämatopoetischen Zellen zeigte zwar, dass AML1 hier weniger essentiell ist (de Bruijn & Speck, 2004), führte aber zu einigen hämatologischen Auffälligkeiten wie z. B. einer geringeren Anzahl reifer B-Zellen (Growney *et al.*, 2005). Angesichts seiner Schlüsselfunktion bei der Regulation von so entscheidenden Prozessen wie der Proliferation und Differenzierung innerhalb der Hämatopoese ist es nicht verwunderlich, dass AML1 mit einer Vielzahl myeloider und lymphoider, maligner Erkrankungen assoziiert ist (Cameron & Neil, 2004).

Interessanterweise scheint die Menge an AML1-Protein einen Einfluss auf den Leukämie-Phänotyp zu haben: Eine verminderte AML1-Menge, wie bei Haploinsuffizienz oder dominant negativen Mutationen, kann zur Entstehung myeloider Leukämien führen (Osato *et al.*, 1999; Song *et al.*, 1999a; Michaud *et al.*, 2003), eine Amplifikation von AML1 und damit eine erhöhte Proteinmenge wird meist bei lymphoiden Leukämien, speziell bei pädiatrischen ALL (akuten lymphatischen Leukämien), beobachtet (Mikhail *et al.*, 2002).

Sowohl AML1 als auch CBF β sind sehr häufig von chromosomalen Brüchen oder Translokationen betroffen; je nach Zell- bzw. Gewebetyp oder Entwicklungsstatus kann AML1 dabei als Onkogen oder als Tumorsuppressor auftreten (Cameron & Neil, 2004; Review: Blyth *et al.*, 2005).

1.3.2 AML1 liegt in verschiedenen Isoformen vor

AML1 kodiert für verschiedene Isoformen, die von zwei tandem Promotoren transkribiert werden oder durch alternatives Spleißen entstehen und sich daher entweder in ihrer kodierenden Sequenz oder den 5' oder 3' UTRs (*untranslated regions*) unterscheiden (Ghozi *et al.*, 1996; Pozner *et al.*, 2000; Pozner *et al.*, 2007). Die Aktivität der beiden Promotoren hängt dabei vom Zelltyp und der jeweiligen Differenzierungsstufe ab (Pozner *et al.*, 2007).

Obwohl mindestens zwölf verschiedene mRNAs von AML1 transkribiert werden, sind nur drei Protein-Isoformen gut charakterisiert: AML1-a, AML1-b und AML1-c (s. Abb. 1.3). Die beiden letztgenannten machen dabei den Hauptanteil der in Zellen detektierbaren Isoformen aus (Levanon *et al.*, 1996, Lutterbach *et al.*, 2000a). AML1-b wird vom internen Promotor aus transkribiert und hat daher im Vergleich zu AML1-c einen leicht verkürzten N-Terminus (Levanon *et al.*, 1996; De Braekeleer *et al.*, 2009). Zudem gibt es eine stark verkürzte Isoform (AML1-a), der die transaktivierende Domäne fehlt (Tanaka *et al.*, 1995; Levanon *et al.*, 1996).

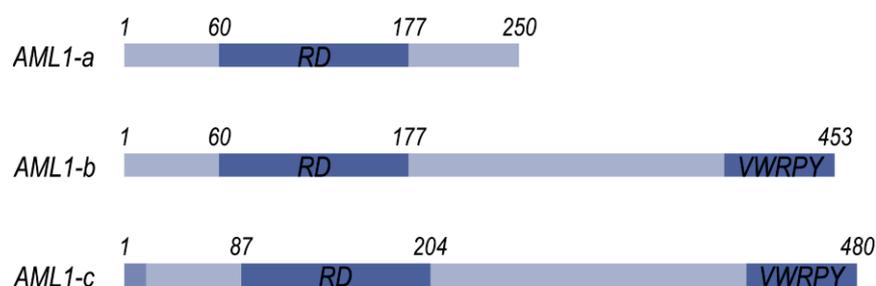


Abbildung 1.3 Die drei physiologisch wichtigsten AML1-Isoformen, von denen AML1-b und AML1-c den Hauptanteil der in Zellen nachweisbaren Proteinisoformen ausmachen. AML1-a inhibiert vermutlich die AML1-b-vermittelte Transkriptionsaktivierung. Korrespondierende Aminosäurepositionen sind angegeben. RD: runt-homologe DNA-Bindedomäne, VWRPY: TLE-Bindemotiv (TLE: *transducin-like enhancer*), (nach Lutterbach *et al.*, 2000a).

Die funktionelle Bedeutung dieser komplexen Organisation und der daraus resultierenden zahlreichen Isoformen ist noch weitgehend unverstanden. Hinweise auf einen Antagonismus zwischen verkürzten und Voll-Längen-Isoformen deuten jedoch auf eine mögliche AML1-a-vermittelte Suppression der Transkriptionsaktivierung durch AML1-b und AML1-c hin (Tanaka *et al.*, 1995; Levanon *et al.*, 1996).

1.3.3 Aufbau und Organisation von AML1

Alle Mitglieder der Runt-Familie besitzen im N-terminalen Bereich eine Region mit hoher Sequenzhomologie, die nach dem Gen, in dem sie zuerst entdeckt wurde, als Runt-homologe Domäne (RD) bezeichnet wird. Diese Domäne, die zudem ein Kernlokalisierungssignal an ihrem C-terminalen Ende enthält, ist für die Heterodimerisierung mit CBF β und die Bindung an die DNA verantwortlich (Ogawa *et al.*, 1993a; Ogawa *et al.*, 1993b; Ito *et al.*, 2008). Außerdem gibt es am C-Terminus aller drei Proteine ein konserviertes TLE-Bindemotiv, eine Sequenz aus fünf Aminosäuren (VWRPY), die eine Interaktion mit den Ko-Repressorproteinen TLE1 und TLE2 (*transducin-like enhancer*; Homolog des Groucho aus *Drosophila*) vermittelt (Aronson *et al.*, 1997; Levanon *et al.*, 2004). Neben diesen beiden Domänen enthält AML1 noch eine Reihe weiterer, regulatorisch wichtiger Sequenzbereiche (s. Abb. 1.4).



Abbildung 1.4 AML1 (hier exemplarisch AML1-c gezeigt) besitzt verschiedene Regionen, die für die Interaktion mit anderen Proteinen oder mit der DNA wichtig sind. Korrespondierende Aminosäurepositionen sind angegeben. TA: transaktivierende Domäne, RD: runt-homologe DNA-Bindedomäne, ID: inhibitorische Domäne, NMTS: Kernmatrixzielsequenz (*nuclear matrix targeting sequence*), VWRPY: TLE-Bindemotif (nach Lutterbach *et al.*, 2000a; Jiang *et al.*, 2005). Am C-terminalen Ende der runt-homologen Domäne befindet sich zudem ein Kernlokalisierungssignal (nicht eingezeichnet).

Am N-Terminus, noch vor der RD befindet sich eine kurze transaktivierende Domäne, während eine weitere große transaktivierende Domäne in der Nähe des Zentrums liegt (Liu *et al.*, 2006). Letztere enthält wiederum eine Kernmatrix-Zielsequenz und wird von zwei kurzen inhibitorischen Sequenzmotiven (ID) flankiert (Zeng *et al.*, 1997; Kanno *et al.*, 1998; Ito, 1999; Lutterbach *et al.*, 2000b; Li *et al.*, 2007).

1.3.4 AML1 bindet sequenzabhängig an DNA

Die Bindung von AML1 an die DNA erfolgt an einem für alle RUNX-Proteine gemeinsamen Motiv (TGYGGTY) und wird, wie bereits erwähnt, durch die Runt-homologe Domäne vermittelt (Nagata *et al.*, 1999). Die Heterodimerisierung mit dem Ko-Faktor CBF β stabilisiert diese Bindung nicht nur (Ogawa *et al.*, 1993b; Tahirov *et al.*, 2001), sondern sie schützt AML1 auch vor Degradation (Huang *et al.*, 2001). Die Strukturaufklärung isolierter und mit DNA komplexierter RD hat gezeigt, dass diese Domäne aus zehn anti-parallelen β -Faltblättern besteht, die sich wie ein β -Fass (ähnlich wie einem Ig-Motiv vom S-Typ) falten und daher den DNA-Bindedomänen von Transkriptionsfaktoren wie NFAT (*nuclear factor of activated t cells*), STAT (*signal transducers and activators of transcription*), p53 und NF κ B (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B cells*) ähneln (Ito, 1999; Nagata *et al.*, 1999; Warren *et al.*, 2000). Die Konformation der frei vorliegenden Domäne ist dabei für die Wechselwirkung mit DNA nicht optimal; die Bindung des Ko-Faktors CBF β löst jedoch einen Strukturwechsel und eine damit einhergehende Stabilisierung der Konformation aus, wodurch eine DNA-Bindung unterstützt wird (Warren *et al.*, 2000; Tahirov *et al.*, 2001; Bäckström *et al.*, 2002). Sowohl die Heterodimerisierung mit CBF β als auch die DNA-Bindung werden dabei durch die N- und

C-terminalen Bereiche des AML1 sterisch behindert (Kanno *et al.*, 1998; Ito, 1999). Dies lässt vermuten, dass AML1 zunächst in einer inaktiven Form vorliegt, die für die DNA-Bindung erst aktiviert werden muss (Ito, 1999). Es wird angenommen, dass zur Zeit noch unbekannte Signale zu Konformationsänderungen in einem der beiden Proteine (oder in beiden) führen, wodurch die Heterodimerisierung als Schlüsselschritt für die Wechselwirkung mit der DNA ermöglicht wird.

1.3.5 AML1 kann die Transkription seiner Zielgene sowohl aktivieren als auch inhibieren

AML1 ist eines der Schlüsselproteine in der Hämatopoese und reguliert hier eine Vielzahl von Genen. Zu diesen Genen gehören beispielsweise Wachstumsfaktoren (u. a. GM-CSF, MPO, IL3), Rezeptoren (wie TCRA, TCRB, M-CSF Rezeptor, FLT3), Signalmoleküle (z. B. CDKN1A, BLK, BCL2) und Transkriptionsaktivatoren (STAT3, MYB u. a.; Libermann *et al.*, 1999; Strom *et al.*, 2000; Michaud *et al.*, 2003; Ito *et al.*, 2004). Abhängig vom Promotorkontext und seiner regulatorischen Organisation kann AML1 die Expression seiner Zielgene entweder aktivieren oder auch reprimieren. Durch die Wechselwirkung mit einer Vielzahl von Transkriptionsfaktoren, Ko-Aktivatoren und Ko-Repressoren wird die Transkription gewebe- und entwicklungspezifisch reguliert (Ito, 1999), wobei das DNA-gebundene AML1 dabei als Plattform für die Bildung entsprechender Proteinkomplexe dient. Die Wechselwirkung mit bestimmten ko-regulatorischen Proteinen entscheidet dabei über die Art und Weise der Transkriptionsregulation: Proteine wie p300/CBP (*creb binding protein*) und andere Histon Acetyltransferasen (HAT) führen zur Aktivierung der Transkription der Zielgene, während Proteine wie TLE, mSin3A und andere Histon Deacetylasen (HDAC) die Transkription der Zielgene reprimieren (Imai *et al.*, 1998; Levanon *et al.*, 1998; Libermann *et al.*, 1999; Katsumoto *et al.*, 2008). Die Interaktion der TLE-Proteine (TLE1 und TLE2) mit dem VWRPY-Motiv findet dabei scheinbar in der Kernmatrix statt, wo diese Proteine mit AML1 kolokalisieren (Javed *et al.*, 2000).

1.3.6 AML1 wird durch post-translationale Modifikationen reguliert

AML1 wird von den Serin-/Threonin-Kinasen ERK1 und ERK2 an verschiedenen Stellen (z. B. S249 und S266) innerhalb seiner transaktivierenden Domäne phosphoryliert (Tanaka *et al.*, 1996). Dies führt zumindest teilweise zu einer Erhöhung der Transkriptionsaktivierung durch AML1-b, da phosphoryliertes AML1 bevorzugt mit dem Ko-Aktivator p300 assoziiert (Kitabayashi *et al.*, 2001). Zudem konnte gezeigt werden, dass AML1 als Folge einer Interaktion mit GATA-1, einem anderen für die Hämatopoese essentiellen Transkriptionsfaktor, phosphoryliert und hierdurch vom Repressor zum Aktivator wird (Elagib & Goldfarb, 2007). Eine Phosphorylierung führt zudem auch zu einer Ablösung des AML1 vom mSin3A-Komplex (Imai *et al.*, 2004), was seine aktivierende Wirkung noch verstärkt (Tanaka *et al.*, 1996). Als negative Rückkopplung wird phosphoryliertes AML1 wiederum dem proteasomalen Abbau zugeführt, da es von der Kernmatrix abgelöst wird (Imai *et al.*, 2004).

Die Kinase HIPK2 (*homeodomain interacting kinase 2*) bildet einen Komplex mit AML1 und p300; sie ist in der Lage, beide Proteine zu phosphorylieren. Hierdurch stimuliert HIPK2 die AML1-vermittelte Transkriptionsaktivierung und regt gleichzeitig die Acetyltransferase-Aktivität von p300 an (Aikawa *et al.*, 2006; Wee *et al.*, 2008). Als Folge davon wird AML1 durch p300 spezifisch acetyliert, was wiederum seine DNA-Bindungsaktivität erhöht (Yamaguchi *et al.*, 2004).

Neben seiner entscheidenden Funktion bei der Regulation der Hämatopoese hat AML1 auch noch Einfluss auf andere, ebenfalls essentielle Vorgänge innerhalb der Zelle. So beschleunigt eine erhöhte AML1-Expression das Durchlaufen der G1-Phase (Strom *et al.*, 2000), was zudem mit einer Erhöhung seiner Proteinmenge einhergeht (Bernardin-Fried *et al.*, 2004). Dies deutet auf eine enge Verknüpfung mit der Zellzyklus-Maschinerie hin (Review: Friedman, 2009). Damit war AML1 einer der ersten Transkriptionsfaktoren für den gezeigt werden konnte, dass eine vermehrte Expression die G1-Phase des Zellzyklus verkürzt. Welcher Mechanismus bzw. welche AML1-regulierten Gene hierfür verantwortlich sind, ist zur Zeit noch unbekannt. AML1 ist zudem Substrat der Cyclin-abhängigen Kinasen CDK 1, 2 und 6, welche verschiedene Serine phosphorylieren (Biggs *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2008), was wiederum zu einer APC-vermittelten (*anaphase promoting complex*) Degradation von AML1 führt (Biggs *et al.*, 2006).

Durch Interaktion mit Lysin- oder Arginin-Methyltransferasen wird AML1 an verschiedenen Positionen innerhalb des Proteins methyliert. Dies hat zur Folge, dass z. B. die DNA-Bindung gestört wird (Chakraborty *et al.*, 2003).

1.4 TEL (ETV6)

1.4.1 TEL ist ein Mitglied der ETS-Proteinfamilie

Das Onkogen *v-ets* des ALV E26 (*avian leukemia virus E26*; Nunn *et al.*, 1983; Leprince *et al.*, 1983) ist der Prototyp der Gene, die für eine ETS-Domäne (*E26 transformation-specific*) kodieren. Innerhalb der letzten zwei Jahrzehnte wurden immer neue dem *v-ets* verwandte Gene identifiziert, so dass die ETS-Proteine heute eine der größten Familien signalabhängiger Transkriptionsregulatoren bilden. Zu ihr gehören neben ETS-1, ETS-2, YAN, FLI-1 und vielen anderen mehr auch das in der vorliegenden Arbeit untersuchte TEL (*transformation ETS leukemia*; auch unter dem Namen ETV6 (*ETS gene variant 6*) bekannt).

Proteine der ETS-Familie findet man in allen mehrzelligen Organismen (Lautenberger *et al.*, 1992; Degnan *et al.*, 1993; Laudet *et al.*, 1999), wo sie entscheidende Gene in einer Vielzahl biologischer Prozesse wie der Proliferation, Differenzierung und auch der Tumorentstehung regulieren (Reviews: Wasylyk *et al.*, 1993; Mavrothalassitis & Ghysdael, 2000). Die meisten Proteine dieser Familie aktivieren die Transkription ihrer Zielgene; in den letzten Jahren wurden aber auch vermehrt Transkriptionsrepressoren identifiziert (Review: Mavrothalassitis & Ghysdael, 2000). Bei einer Reihe von ETS-Proteinen wird zudem angenommen, dass sie die Transkription abhängig vom Promotorkontext, des Zelltyps und des Differenzierungsstatus sowohl aktivieren als auch inhibieren können (Mavrothalassitis & Ghysdael, 2000). Die Spezifität ihrer Funktion wird dabei auf verschiedenen Ebenen reguliert: Zum einen ist die Expression vieler ETS-Gene sehr gewebespezifisch oder wird in Abhängigkeit von extrazellulären Signalen reguliert (Reviews: Ghysdael & Boureux, 1997; Wasylyk & Nordheim, 1997). Zum anderen wird die Aktivität bestimmter ETS-Proteine durch intrazelluläre Signalwege kontrolliert, indem ihre subzelluläre Kompartimentierung (Le Gallic *et al.*, 1999; Ducret *et al.*, 1999), die Aktivität der DNA-Bindung (Rabault & Ghysdael, 1994; Martin *et al.*, 1996; Cowley & Graves, 2000) oder ihr transaktivierendes Potential reguliert werden (Marais *et al.*, 1993; O'Hagan *et al.*, 1996; McCarthy *et al.*, 1997). Außerdem hängt die ETS-

vermittelte Regulation vieler Promotoren oft von der Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren ab (Dalton & Treisman, 1992; Janknecht *et al.*, 1993; Treisman, 1994; Giese *et al.*, 1995; Wolberger, 1998; Goetz *et al.*, 2000).

TEL ist eines der wenigen ETS-Proteine von denen man weiß, dass sie mit malignen Erkrankungen beim Menschen assoziiert sein können. Unter diesen ist es wiederum das einzige, welches eine inhibierende Wirkung auf die Transkription ausübt. Es wurde erstmals aufgrund seiner Beteiligung an der Translokation t(5;12) (q33;p13), die in bestimmten Fällen von chronisch myeloischer Leukämie auftritt, entdeckt (Golub *et al.*, 1994). Heute ist bekannt, dass TEL häufig von chromosomalen Umlagerungen betroffen ist, die in einer Vielzahl von Leukämien und soliden Tumoren entdeckt wurden (Review: Bohlander, 2005).

TEL ist für die Embryonalentwicklung der Maus essentiell (Review: Bartel *et al.*, 2000). Seine Inaktivierung führt zu schwerwiegenden Defekten in der Angiogenese des Dottersacks und zu Apoptose in bestimmten Bereichen des Embryos (Wang *et al.*, 1997) und ist daher letal. Die Analyse hämatopoetischer Vorläufer hat zudem gezeigt, dass TEL für die Etablierung der Hämatopoese aller Blutzell-Linien im adulten Knochenmark essentiell ist, indem es entweder an der Migration oder am sogenannten „Homing“ der Vorläufer von der fötalen Leber ins Knochenmark beteiligt ist (Wang *et al.*, 1998). Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass TEL an vielen verschiedenen Entwicklungsprozessen wie Proliferation, Differenzierung, Apoptose und Transformation innerhalb der Hämatopoese beteiligt ist (Sementchenko & Watson, 2000). Diese Schlüsselrolle bei der Regulation solcher entscheidender Prozesse und die Tatsache, dass TEL häufig von chromosomalen Translokationen betroffen ist, führen dazu, dass TEL-Rearrangements oft mit myeloiden oder lymphoiden Leukämien assoziiert sind.

1.4.2 Die zwei Isoformen des TEL

TEL liegt auf Chromosom 12p13 (Kobayashi *et al.*, 1994; Golub *et al.*, 1994) und kodiert für zwei Isoformen dieses kernlokalisierten Proteins (452 AA und 409 AA). Die Isoformen entstehen durch zwei alternative Translationsstarts auf der TEL-mRNA, wobei die größere der beiden Isoformen deutlich stärker exprimiert wird und in einem Großteil der verschiedenen Zelltypen vorkommt (Poirel *et al.*, 1997). Beide Isoformen binden an ETS-Bindestellen (EBS) in artifiziellen oder auch natürlichen Promotoren und zeigen dann eine stark ausgeprägte reprimierende Aktivität (Lopez *et al.*, 1999).

1.4.3 Aufbau und Organisation von TEL

Die allen Proteinen der ETS-Familie gemeinsame, hoch-konservierte ETS-Domäne vermittelt sowohl die Bindung an DNA als auch Protein-Protein-Wechselwirkungen (Wasylyk *et al.*, 1993; Oikawa & Yamada, 2003). Desweiteren enthält TEL eine ebenfalls evolutionär konservierte so genannte *pointed* Domäne, die auch als SAM-Domäne (*sterile alpha motif*) bezeichnet wird (Klambt, 1993; Kim *et al.*, 2001; Tran *et al.*, 2002). Dieser Bereich ist sowohl für die Homodimerisierung/Oligomerisierung als auch für die Interaktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren oder Signalüberträgern, wie z. B. der Ubiquitin-Ligase UBC9 oder einem anderen ETS-Protein, FLI-1, verantwortlich (Jousset *et al.*, 1997; Kwiatkowski *et al.*, 1998; Chakrabarti *et al.*, 1999; Grimshaw *et al.*, 2004). Hier findet auch die Wechselwirkung mit mSin3A statt, die zur Inhibierung der Transkription führt (Fenrick *et al.*, 1999). Bei

TEL wurde zudem ein inhibitorischer Bereich in der zentralen Region identifiziert (CR, s. Abb. 1.5). Es gibt Hinweise darauf, dass dieser an der Rekrutierung von Histon Deacetylasen beteiligt ist, wodurch die Transkription reprimiert werden kann (Chakrabarti & Nucifora, 1999; Lopez *et al.*, 1999). Die Struktur der *pointed* Domäne des ETS-1 wurde durch NMR-Spektroskopie (*nuclear magnetic resonance*) aufgeklärt und zeigte sich hier als Bündel aus fünf Helices (Slupsky *et al.*, 1998).



Abbildung 1.5 TEL (ETV6) besitzt verschiedene Regionen, die für die Interaktion mit anderen Proteinen oder mit der DNA wichtig sind. Korrespondierende Aminosäurepositionen sind angegeben. Neben der *pointed* Domäne, die an Homo- und Heterodimerisierungen beteiligt ist, und der ETS-Domäne, die Wechselwirkungen mit Proteinen und DNA vermittelt, gibt es noch eine zentrale Region (*central region*; CR), die vermutlich an der HDAC-Rekrutierung beteiligt ist.

1.4.4 TEL bindet sequenzspezifisch an DNA

Die DNA-Bindung der ETS-Domäne erfolgt über ein Helix-Turn-Helix-Motiv (Ghysdael & Boueux, 1997; Graves & Petersen, 1998) an DNA-Sequenzen, in deren Zentrum sich ein GGAA/T Motiv befindet (Karim *et al.*, 1990). Die isolierte ETS-Domäne von TEL bindet *in vitro* an die übliche Bindestelle, wohingegen die DNA-Bindekonstante des Voll-Längen TEL im Vergleich dazu deutlich niedriger ist. Das deutet darauf hin, dass die DNA-Bindungseigenschaften von TEL intramolekular inhibiert werden, ein Phänomen, das bei ETS-Proteinen häufig beobachtet werden kann (Review: Ghysdael & Boueux, 1997; Graves & Petersen, 1998). Dieser Mechanismus der Auto-Inhibierung funktioniert mittels zweier Konformationen, von denen eine die DNA-Bindung ermöglicht und die andere nicht. Durch den für die Interaktion mit der DNA notwendigen Konformationswechsel kann die DNA-Bindung strikt reguliert werden. Für ETS-1 z. B. ist bekannt, dass AML1 dieser Auto-Inhibierung entgegenwirkt, in dem es durch direkte Interaktion mit ETS-1 einen Konformationswechsel auslöst (Goetz *et al.*, 2000).

1.4.5 TEL ist in erster Linie ein Repressor der Transkription

Die meisten Proteine der ETS-Familie aktivieren die Transkription ihrer Zielgene. Von vier Mitgliedern (TEL, YAN, ERF, und NET) ist allerdings bekannt, dass sie als Transkriptionsrepressoren wirken können (Mavrothalassitis & Ghysdael, 2000). Die bisher veröffentlichten Daten deuten alle darauf hin, dass eine TEL-vermittelte Repression von der Anwesenheit anderer Ko-Repressoren wie z. B. mSin3A, N-CoR (nuclear receptor corepressor) und SMRT (*silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor*) abhängt und letztendlich von Histon Deacetylasen (HDAC) vermittelt wird, da sie sich durch Trichostatin A (einem Deacetylaseinhibitor) inhibieren lässt (Chakrabarti & Nucifora, 1999). Allerdings gibt es bis jetzt keine Hinweise darauf, dass die Rekrutierung dieser Ko-Repressoren der einzige Mechanismus ist, über den TEL die Transkription inhibiert. Wie die Interaktion mit spezifischen Ko-Repressoren reguliert wird, ob bestimmte Repressor-Komplexe zelltypspezifisch sind oder ob verschiedene Gene durch spezifische Repressor-Komplexe reguliert werden, ist zur Zeit noch weitgehend unbekannt. Da die Aktivität von TEL durch seine Konformation kontrolliert wird und bekannt ist, dass es am Aufbau von Multiprotein-Komplexen an bestimmten Promotoren bzw. *Enhancern* beteiligt ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass es auch bei der Aktivierung der

Transkription eine Rolle spielt. Allerdings sind bislang nur wenige durch TEL regulierte Zielgene entdeckt bzw. beschrieben worden.

TEL moduliert die Transkription seiner Zielgene nicht nur direkt, sondern kann auch indirekt, durch die Wechselwirkung mit anderen Transkriptionsfaktoren, die Expression bestimmter Gene beeinflussen. So konnte z. B. gezeigt werden, dass FLI-1 (ebenfalls ein Mitglied der ETS-Familie) von TEL gebunden und dadurch dessen aktivierende Wirkung auf die Transkription unterbunden wird (Kwiatkowski *et al.*, 1998).

1.4.6 TEL wird durch post-translationale Modifikationen reguliert

Die Aktivität vieler ETS-Proteine scheint über MAP-Kinasen (*mitogen-activated protein kinases*) reguliert zu werden (Wasylyk *et al.*, 1998). Auch die beiden TEL-Isoformen werden *in vivo* phosphoryliert (Poirel *et al.*, 1997). Die Phosphorylierung kontrolliert dabei nicht nur ihre Aktivität, sondern auch die Interaktionen mit anderen Proteinen, ihre Spezifität den Zielgenen gegenüber, ihre Lokalisation innerhalb der Zelle und ihre transaktivierende Wirkung. ETS-2 wird z. B. von MAP-Kinasen phosphoryliert, was seine DNA-Bindung und damit die Aktivierung der Transkription stimuliert (Yang *et al.*, 1996). Eine Phosphorylierung von TEL durch p38 führt zum Kern-Export und verhindert somit die Repression der Transkription (Arai *et al.*, 2002; Hanson *et al.*, 2008), woraus eine indirekte Transkriptionsaktivierung resultiert.

Für die *pointed* Domäne konnte eine Wechselwirkung mit der SUMO-Ligase (*small ubiquitin like modifier*) UBC9 nachgewiesen werden, die zu einer Sumoylierung an Lys99 führt (Chakrabarti *et al.*, 1999) und sowohl für die Lokalisation von TEL in spezifische *foci* innerhalb des Zellkerns (so genannte *nuclear speckles*) als auch für seinen stressinduzierten, p38-vermittelten Kern-Export benötigt wird (Chakrabarti *et al.*, 2000, Wood *et al.*, 2003).

Im Gegensatz zu anderen ETS-Proteinen, die als Monomere vorliegen (wie z. B. ETS-1), bildet TEL Homodimere bzw. Oligomere, was ausschließlich durch die *pointed* Domäne vermittelt wird (Jousset *et al.*, 1997). Nur in dieser oligomeren Form kann TEL die Transkription EBS-regulierter Gene inhibieren (Lopez *et al.*, 1999). Der Mechanismus dieser Repression ist zur Zeit allerdings noch weitgehend unverstanden.

Das F-Box-Protein FBL6 vermittelt die Ubiquitinierung von TEL innerhalb seiner *pointed* Domäne, was anscheinend zu verstärktem proteasomalen Abbau führt (Roukens *et al.*, 2008). Vermutlich sind davon allerdings fast ausschließlich TEL-Monomere betroffen und nur in sehr geringem Maße die Oligomere. Zusammen mit der Beobachtung, dass phosphorylierte Monomere ebenfalls deutlich instabiler zu sein scheinen und nur in der Gegenwart von Proteasom-Inhibitoren nachweisbar sind, lässt sich vermuten, dass TEL eigentlich ein sehr instabiles Protein ist und erst durch Oligomerisierung vor Degradation geschützt wird (Roukens *et al.*, 2008).

1.5 Die reziproke Translokation t(12;21)(p13;q22)

Die reziproke Translokation t(12;21)(p13;q22) (s. Abb. 1.6) ist mit ca. 25% der Prä-B-Zell ALL im Kindesalter assoziiert und damit die häufigste chromosomale Aberration in pädiatrischen Leukämien (Romana *et al.*, 1995b; Shurtleff *et al.*, 1995; Fears *et al.*, 1996). Die Bruchpunkte liegen bei beiden Chromosomen in intronischen Bereichen, so dass es zur Fusion der ersten fünf Exons des TEL an fast das gesamte AML1 kommt, dem nur das erste, in seltenen Fällen die ersten beiden Exons, fehlen. Das reziproke Fusionsgen besteht aus dem ersten oder den ersten beiden Exons des AML1 fusioniert an die letzten drei Exons des TEL und spielt physiologisch anscheinend keine Rolle.

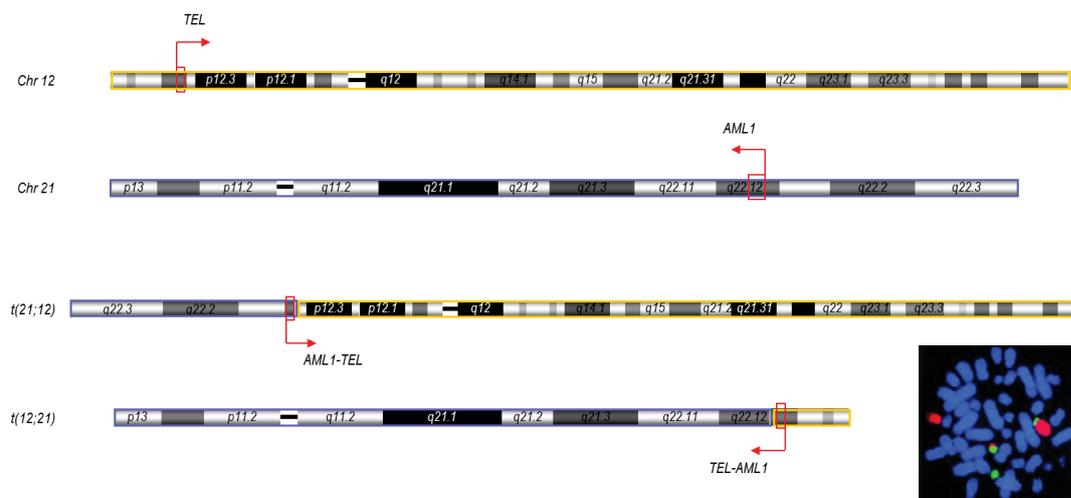


Abbildung 1.6 Schematische Darstellung der humanen Chromosomen (Chr) 12 und 21. Gezeigt sind außerdem die reziproken Translokationen t(21;12) und t(12;21) zwischen diesen beiden Chromosomen, die Lokalisation der Gene AML1 und TEL sowie deren Orientierung. Durch die Translokation entstehen zwei chimäre Fusionsgene; allerdings kann in der Regel nur die mRNA des TEL-AML1 reproduzierbar nachgewiesen werden. Unten rechts: FISH (*fluorescence in situ hybridisation*) an leukämischen Zellen mit Sonden, die spezifisch Chromosom 12 (rot) bzw. 21 (grün) anfärben, lassen eindeutig sowohl die Translokation t(12;21) als auch ihr reziprokes Pendant erkennen (Quelle: <http://www.bmj.com/content/324/7332/283.full.pdf+html>).

Die TEL-AML1-Translokation findet bereits *in utero* statt (Ford *et al.*, 1998; Greaves, 2003) und kann mit einer relativ großen Häufigkeit (ca. 1%) bei Neugeborenen nachgewiesen werden (Mori *et al.*, 2002). Da nicht alle diese Kinder später auch eine Leukämie entwickeln (wiederum nur ca. 1% der Translokationsträger), wird vermutet, dass ergänzende, nachträglich entstehende Mutationen für die Ausbildung des leukämischen Phänotyps erforderlich sind (Mori *et al.*, 2002; Greaves, 2006). Im Fall der TEL-AML1-positiven Leukämien ist das zweite TEL-Allel oft (ca. 70% der Fälle) von Deletionen betroffen (Kobayashi *et al.*, 1994; Stegmaier *et al.*, 1995; Bernard *et al.*, 1996; Raynaud *et al.*, 1996; Romana *et al.*, 1996; Wlodarska *et al.*, 1996; Agape *et al.*, 1997), die erst postnatal auftreten (Wiemels *et al.*, 2008). Die tatsächliche Häufigkeit könnte allerdings noch höher liegen, da die Deletionen durch standardmäßige cytogenetische Methoden nur schwer nachweisbar sind. Von der Deletion ist meist der Bereich p12-13 auf Chromosom 12 betroffen, in dem u. a. TEL und CDKN1B (p27KIP1) kodiert sind (Cavé *et al.*, 1995; Sato *et al.*, 1995). Deletionen in diesem Bereich sind auch oft bei anderen malignen hämatologischen Erkrankungen involviert, so dass die Vermutung nahe liegt, dass sich hier ein Tumorsuppressorgen befindet (Kobayashi *et al.*, 1994; Cavé *et al.*, 1995). Bei diesem Tumorsuppressor handelt es sich sehr wahrscheinlich um TEL, da sein Fehlen zusammen mit der

Translokation TEL-AML1 anscheinend eine wichtige Rolle in der Leukämogenese spielt. Der Mechanismus der Leukämogenese und die Funktion, die TEL-AML1 und die TEL-Deletion hierbei spielen, ist allerdings zur Zeit noch nicht eindeutig aufgeklärt.

1.5.1 Wie die Translokation $t(12;21)$ entsteht

Sowohl der Bereich p13 auf Chromosom 12 (hier liegt *TEL*) als auch q22 auf Chromosom 21 (hier ist *AML1* kodiert) sind schon seit längerer Zeit als strukturell instabile Bereiche bekannt. Diese Bereiche sind sehr häufig von chromosomalen Rearrangements betroffen und wurden daher bereits bei vielen malignen Erkrankungen beschrieben. Sie führen meist zur Bildung chimärer Fusionsgene, seltener treten Punktmutationen, Amplifikationen oder Deletionen auf. Für *AML1* sind zur Zeit 32 Translokationen beschrieben, bis jetzt konnte allerdings nur bei 17 dieser chromosomalen Umlagerungen ein Partnergen identifiziert werden (Review: De Breakeleer *et al.*, 2009). *TEL* ist in mehr als 40 Translokationen involviert und in den weitaus meisten Fällen konnte bereits auch das betroffene Partnergen identifiziert werden (Review: Bohlander, 2005). Die daraus resultierenden Fusionsproteine sind mit einer Vielzahl hämatologischer Erkrankungen assoziiert, die sowohl die myeloide als auch die lymphoide Linie betreffen können. Bei Chromosomenbrüchen, in deren Nähe ein Immunglobulingen oder ein T-Zellrezeptor kodiert ist, welche daher natürlicherweise von Rearrangements betroffen sind, fällt die Erklärung, wie es zu solchen Translokationen kommt, deutlich leichter. Bei den anderen, ebenfalls sehr häufig betroffenen Abschnitten sind die Gründe für die Entstehung einer Translokation genau wie der Mechanismus, der dahinter steckt, noch weitgehend unverstanden.

Die *TEL-AML1*-Translokationen bei Patienten scheinen eher zufällig zu entstehen, da die Bruchpunkte der DNA nicht mit Regionen zusammenfallen, die Erkennungssequenzen für V(D)J Rekombinase oder DNA Topoisomerase II enthalten (Wiemels *et al.*, 2008). *TEL-AML1*-positive Leukämien zeigen jedoch einen Phänotyp ähnlich einer Aktivierung des Rekombinase-aktivierenden Gens (RAG) und dazu passend häufig Umlagerungen in Immunglobulin- oder T-Zellrezeptor *loci* (Pine *et al.*, 2003). In Untersuchungen von *TEL-AML1* und anderen Translokationen wurde nachgewiesen, dass sich die betreffenden Translokationen nicht nur durch Inhibitoren der DNA Topoisomerase II α , sondern auch durch apoptotische Stimuli induzieren ließen (Eguchi-Ishimae *et al.*, 2001). Letzteres deutet darauf hin, dass der dafür verantwortliche Mechanismus eventuell auf die Chromatinfragmentierung als zelluläre Antwort auf apoptotische Signale zurückzuführen sein könnte.

Für die Deletion des zweiten *TEL*-Allels konnte gezeigt werden, dass die Bruchpunkte in Regionen mit mehr oder weniger langen Sequenzwiederholungen, LINEs bzw. SINEs (*long/short interspersed nuclear elements*) liegen (Wiemels *et al.*, 2008). Diese Sequenzwiederholungen leiten sich von Retrotransposons ab und machen etwa 46% des humanen Genoms aus (Lander *et al.*, 2001). Sie sind normalerweise hypermethyliert und daher in normalen Zellen/Geweben reprimiert (Yu *et al.*, 2001), liegen jedoch in malignen Erkrankungen oft hypomethyliert vor (Roman-Gomez *et al.*, 2006). Diese Demethylierung führt zu chromosomaler Instabilität und ist ein oft beobachtetes und vermutlich frühes Ereignis in der Karzinogenese. Die Aktivierung und Reifung der B-Zellen während einer Infektion, die damit einhergehende erhöhte Teilungsrate sowie der vermehrte Bedarf an Methylgruppen könnte zu einer Hypomethylierung der LINEs und SINEs führen und somit DNA-Instabilität und Chromosomenbrüche induzieren (Wiemels *et al.*, 2008). In wie weit eine aberrante Methylierung einen

möglichen Risikofaktor für die Entwicklung einer Leukämie darstellt ist zur Zeit noch unklar und bedarf weiterer populationsbasierter Studien.

1.5.2 Die Funktion des chimären Transkriptionsfaktors TEL-AML1

Bei der TEL-AML1-Translokation bleibt der Leserahmen erhalten, so dass es zur Expression des chimären Transkriptionsfaktors TEL-AML1 unter der Kontrolle des *TEL*-Promotorbereichs kommt. Das resultierende Fusionsprotein enthält die ersten 336 Aminosäuren von TEL gefolgt von den Aminosäuren 21-480 des AML1 (Golub *et al.*, 1995; Koza *et al.*, 1995; Romana *et al.*, 1995a). Wie in Abbildung 1.7 gezeigt enthält dieses Fusionsprotein neben der konservierten *pointed* Domäne auch die zentrale Region des TEL, die die Interaktion mit Ko-Repressoren wie mSin3A, N-CoR und SMRT vermittelt (Golub *et al.*, 1995; Chakrabarti & Nucifora, 1999; Guidez *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2001). AML1 bleibt bis auf die ersten 20 Aminosäuren am N-Terminus vollständig erhalten, weshalb TEL-AML1 sowohl die Runt-homologe DNA-Bindedomäne als auch die transaktivierende Domäne des AML1 enthält. Bei TEL-AML1 handelt es sich demnach um einen chimären Transkriptionsfaktor, dessen AML1-Anteil für die Wechselwirkung mit der DNA verantwortlich ist, während sowohl der TEL- als auch der AML1-Anteil regulatorische Sequenzbereiche und Protein-Protein-Interaktionen vermitteln (Morrow *et al.*, 2007). Wie bei AML1 auch, ist die Heterodimerisierung mit CBF β essentiell für die Aktivität des Fusionsproteins (Roudaia *et al.*, 2009). Daher liegt die Vermutung nahe, dass TEL-AML1 die Transkription AML1-regulierter Gene stört (Hiebert *et al.*, 1996; Fears *et al.*, 1997; Westendorf *et al.*, 1998; Uchida *et al.*, 1999).



Abbildung 1.7 Der chimäre Transkriptionsfaktor TEL-AML1 enthält die ersten 336 Aminosäuren von TEL (grün) gefolgt von den Aminosäuren 21-480 des AML1 (blau). Von TEL bleiben dabei die *pointed* Domäne und die zentrale Region (CR) erhalten, von AML1 hingegen nahezu alle Domänen.

Bislang wurde in mehreren Untersuchungen an Promotorbereichen hämatopoetischer Gene nachgewiesen, dass TEL-AML1 die AML1-abhängige Aktivierung dieser Gene inhibiert und so als Repressor ihrer Transkription fungiert. So konnte z. B. für den *enhancer* des TCR β -Promotors (Hiebert *et al.*, 1996) sowie für den IL-3 Promotor (Uchida *et al.*, 1999) nachgewiesen werden, dass TEL-AML1 die Transkription spezifisch inhibiert, obwohl diese normalerweise von AML1 aktiviert wird. Der Mechanismus, über den diese Repressorfunktion vermittelt wird, ist allerdings bis heute nicht eindeutig geklärt. Es gibt Hinweise darauf, dass TEL-AML1 sowohl mit sich selbst als auch mit AML1 Dimere bildet, was eventuell die Funktion des intakten AML1 stören und damit die Aktivierung bestimmter Gene inhibieren könnte (Lee *et al.*, 2004b). Andere Untersuchungen deuten darauf hin, dass eine Interaktion des TEL-AML1 mit Ko-Repressoren wie mSin3A, N-CoR und HDAC-3 zu einer Veränderung der Chromatinstruktur in bestimmten Promotorbereichen führen könnte (Fenrick *et al.*, 1999; Lopez *et al.*, 1999; Guidez *et al.*, 2000; Starkova *et al.*, 2007). Zu dieser Interaktion tragen sowohl Sequenzbereiche des TEL als auch des AML1 bei und machen so aus TEL-AML1 vermutlich einen konstitutiven Repressor für ansonsten durch AML1 aktivierte Gene (Fenrick *et al.*, 1999). Eine weitere Theorie leitet sich von Untersuchungen ab, bei denen gezeigt werden konnte, dass TEL-AML1

mit Ko-Aktivatoren wie z. B. p300 interagiert und deren Relokalisation vom Zellkern ins Cytoplasma verursacht (Song *et al.*, 1999b; Rho *et al.*, 2002). Hierdurch wird die Transkription AML1-regulierter Gene ebenfalls reprimiert, da p300 nun nicht mehr als Ko-Aktivator für AML1 zur Verfügung steht.

TEL-AML1 wird, wie TEL und AML1 auch, posttranslational modifiziert. So führt die Interaktion mit SUMO-1 wie bei TEL zu einer Sumoylierung an Lys99, die wiederum die zellzyklusabhängige Lokalisation von TEL-AML1 in spezifische *foci* innerhalb des Zellkerns (so genannte *nuclear speckles*) zur Folge hat (Chakrabarti *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu lokalisiert AML1 in ganz anderen Kernkompartimenten als TEL und TEL-AML1, was darauf hindeutet, dass Variationen sowohl der Proteinmodifikationen als auch der Lokalisation zusätzliche Faktoren sein könnten, die zur Leukämogenese beitragen (Chakrabarti *et al.*, 2000).

1.5.3 Pathogenese der Prä-B-Zell Leukämie (ALL) und die Beteiligung von TEL-AML1

Hämatopoetische Stammzellen (*hematopoietic stem cells*, HSC) sind im Knochenmark für die Bildung aller Blutzell-Linien verantwortlich und zudem in der Lage, sich über lange Zeit selbst zu erneuern (*long-term self-renewal*). Daher sind sie ein potentielles Reservoir für genetische Aberrationen, die selbst zwar möglicherweise ihre Zielzellen nicht transformieren können, aber zusammen mit weiteren Veränderungen die Pathogenese maligner Erkrankungen begünstigen.

Es wird vermutet, dass TEL-AML1 die Selbsterneuerung früher hämatopoetischer Vorläuferzellen fördert (Morrow *et al.*, 2004; Hong *et al.*, 2008). Zudem konnte gezeigt werden, dass verschiedene Klone mit der gleichen TEL-AML1 Translokation unterschiedliche B-Zellrezeptor Rearrangements haben können. Das deutet auf eine gemeinsame frühe Vorläuferzelle als Ziel für die Entstehung der Translokation hin, welche vermutlich noch nicht auf die B-Zell-Linie festgelegt ist (Weston *et al.*, 2001; Pine *et al.*, 2003). Interessanterweise lässt sich die Translokation später nur in Prä-B-Zellen nachweisen, was die Vermutung nahe legt, dass sie in den anderen Zell-Linien aus bislang unbekanntem Gründen nicht toleriert wird.

Untersuchungen u. a. in hämatopoetischen Zell-Linien und an *knock-in* Mäusen haben gezeigt, dass TEL-AML1 selbst nicht direkt transformierend wirkt (Andreasson *et al.*, 2001; Fischer *et al.*, 2005), aber Zellen, die diese Translokation tragen, im Knochenmark als prä-maligner Klon persistieren (Schindler *et al.*, 2009). Überraschenderweise besitzen diese prä-malignen hämatopoetischen Vorläufer viele Eigenschaften der normalen HSCs, wie z. B. das Aufrechterhalten der Hämatopoese, Quieszenz und eine kleine Populationsgröße. Dies sorgt für den Erhalt dieser Zellen in ihrer Nische, wo sie vermutlich für die Ansammlung weiterer genetischer Veränderungen anfällig sind (Schindler *et al.*, 2009). Es scheint daher ein Vorteil für „schwache“ Onkogene ohne direktes Transformationspotential wie TEL-AML1 zu sein, die regulatorischen Kontrollmechanismen normaler Stammzellen zu erhalten und diese somit in ihrer Nische vor Abbau zu bewahren. Das Auftreten weiterer chromosomaler Aberrationen, meist u. a. eine Deletion des nicht-translozierten *TEL*-Allels, führt dann zur Transformation der Zellen und damit zur Leukämogenese.

1.6 Zielsetzung

Die reziproke Translokation $t(12;21)$ führt zu einer Fusion zweier Gene, die für die Transkriptionsfaktoren TEL (auf Chromosom 12) und AML1 (auf Chromosom 21) kodieren. Da die Fusionsstelle auf beiden Chromosomen in intronischen Bereichen liegt, kommt es zur Expression eines chimären Gens, welches die ersten fünf Exons von TEL und bis auf Exon 1 das komplette AML1 enthält (vgl. 1.5). Der korrespondierende chimäre Transkriptionsfaktor TEL-AML1 besteht daher aus verschiedenen regulatorischen Domänen, die zum einen von TEL und zum anderen von AML1 kodiert werden. Als Resultat der Translokation fehlt jedoch die DNA-Bindedomäne des TEL, so dass TEL-AML1 lediglich die des AML1 besitzt. Mit einer Häufigkeit von ca. 25% ist TEL-AML1 die häufigste Translokation bei pädiatrischen Prä-B-Zell Leukämien. Allerdings wirkt sie allein nicht transformierend, so dass sich die Frage stellt wie TEL-AML1 zur Leukämogenese beiträgt bzw. die endgültige Transformation der betroffenen primären Zellen begünstigt. Ziel dieser Arbeit war daher die Identifizierung von Zielgenen des chimären Transkriptionsfaktors TEL-AML1 und die Aufklärung ihrer möglichen Beteiligung an der Leukämogenese. Um diese Fragestellung zu untersuchen waren folgende Experimente bzw. Analysen vorgesehen:

- i) Chromatin-Immunpräzipitationen mit Hilfe eines induzierbaren, murinen Zellsystems und unter Verwendung eines eigens hierfür generierten TEL-AML1 spezifischen Antikörpers.
- ii) Korrelation mit den Ergebnissen aus Genexpressions- und Proteomanalysen zum Nachweis TEL-AML1 regulierter Gene.
- iii) Validierung ausgesuchter Zielgene in primärem, TEL-AML1-positiven Patientenmaterial.

Da sowohl die untersuchten Zellsysteme als auch die prä-transformierten TEL-AML1-positiven B-Vorläuferzellen im Patienten endogen TEL und AML1 exprimieren, sollten Zielgene, die bereits einer Regulation durch die Wildtyp-Transkriptionsfaktoren TEL und AML1 unterliegen aus den Ergebnissen ausgeschlossen werden. Hierfür sollten:

- iv) ChIP-on-chip-Experimente an endogenem TEL bzw. AML1 durchgeführt und die Ergebnisse mit den TEL-AML1-Daten verglichen werden.

Die so gewonnenen Erkenntnisse waren zum einen nur in murinen Zellen gültig und zum anderen lediglich mit Genexpressionsdaten primärer TEL-AML1-positiver Leukämieproben abgeglichen. Um TEL-AML1 regulierte Zielgene in humanen Zellen zu identifizieren war daher zudem folgendes geplant:

- v) Generierung stabil exprimierender humaner Zell-Linien für die Expression von TEL, AML1 und TEL-AML1 (jeweils mit cMyc-tag).
- vi) Chromatin-Immunopräzipitationen und Genexpressionsanalysen der neuen Zell-Linien zur Identifizierung TEL-AML1 regulierter Gene.
- vii) Vergleich mit Genexpressionsdaten aus Patientenmaterial und mit den Daten aus dem murinen System.

2 MATERIAL

2.1 Feinchemikalien, Detergenzien etc.

2.1.1 Allgemeine

Wenn nicht anders angegeben wurden Chemikalien der Firmen Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA), Invitrogen/life technologies™ (Carlsbad, USA), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma (St. Louis, USA) mit dem Reinheitsgrad *pro analysis* verwendet.

2.1.2 Spezielle

Acetonitril (<i>hypergrade</i> für LC-MS)	Merck
Ammoniumbicarbonat	Fluka/Sigma Aldrich
Ammoniumperoxodisulfat	Roth
Ampicillin	Sigma Aldrich
Dithiothreitol	Roth
Heptafluorbuttersäure (zur Synthese)	Merck
Iodacetamid	Sigma
Methanol (für LC-MS)	Merck
Mifepristone	Invitrogen
Natriumdeoxycholat	Roth
Natriumdodecylsulfat	Merck
N-Lauroylsarcosin	Sigma
NP-40	Fluka/Sigma Aldrich
Phenylmethylsulfonylfluorid	Roth
TEMED	Merck
Triethanolamin (0,2M)	Sigma
Trifluoressigsäure (~25% v/v in Wasser)	Sigma
Triton X-100	Merck

2.2 Puffer und Lösungen

Alle verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel wurden, wenn nicht anders angegeben, von den üblichen Herstellern für Laborchemikalien bezogen und entsprachen dem Reinheitsgrad *pro analysis*. Lösungen und Puffer wurden mit hochreinem Milli-Q-Wasser (Millipore GmbH, Eschborn) angesetzt. Waren diese für Zellkultivierungen bestimmt, wurden sie entweder steril geöffnet und verwendet oder 20 min bei 121°C und 2-3 bar autoklaviert. Nicht autoklavierbare Lösungen wurden wenn notwendig durch Sterilfilter mit einer Porengröße von 0,22 µm (Corning® Costar, Schiphol-Rijk, Niederlande)

filtriert. Die im Text verwendete Bezeichnung H₂O steht für Milli-Q-Wasser. Für PCR-Ansätze wurde Nuklease-freies Wasser (Ambion, Austin, USA) verwendet, das für Sequenzierungen verwendete Wasser war „Wasser für die Chromatographie“ (Merck, Darmstadt), also frei von fluoreszierenden Stoffen.

2.2.1 Allgemeine

Die Zusammensetzung allgemeingebräuchlicher Puffer und Lösungen entsprach den Angaben im Laborhandbuch „Molecular Cloning“ (Sambrook *et al.*, 1989).

2.2.2 Spezielle

2.2.2.1 Puffer und Lösungen für Chromatin-Immunpräzipitationen nach Lee *et al.*, 2006

Formaldehyd-Lösung	50 mM HEPES-KOH (pH 7,5), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 11% Formaldehyd
Lyse Puffer 1	50 mM HEPES-KOH (pH 7,5), 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% Glycerin, 0,5% NP-40, 0,25% Triton X-100, Proteaseinhibitoren
Lyse Puffer 2	10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5% EGTA, Proteaseinhibitoren
Lyse Puffer 3	10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5% EGTA, 0,1% Na-Deoxycholat, 0,5% N-Lauroylsarcosin, Proteaseinhibitoren
Waschpuffer	50 mM HEPES-KOH (pH 7,5), 500 mM LiCl, 1 mM EDTA, 1,0% NP-40, 0,7% Na-Deoxycholat
Elutionspuffer	50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA, 1,0% SDS

2.2.2.2 Puffer und Lösungen für Chromatin-Immunpräzipitationen mit μ MACS™ beads

SDS Lyse Puffer	1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH 8,0)
ChIP Puffer	0,01% SDS, 1,1% TritonX-100, 1,2 mM EDTA, 167 mM NaCl, 16,7 mM Tris-HCl (pH 8,0)
Waschpuffer 1	0,1% SDS, 1% TritonX-100, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8,0)
Waschpuffer 2	0,1% SDS, 1% TritonX-100, 2 mM EDTA, 500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8,0)
Waschpuffer 3	0,25 M LiCl, 1% NP-40, 1% Natrium-Deoxycholat, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 8,0)
Waschpuffer 4 (TE)	1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 8,0)
Elutionspuffer	1% SDS, 0,1 M NaHCO ₃
Blocking Puffer	1% Milchpulver in 1x PBS

2.2.2.3 Puffer und Lösungen für Proteinextrakte, SDS-PAGE und Western Blotting

RIPA Puffer	150 mM NaCl, 1% NP-40, 0,5% Natrium-Deoxycholat, 0,1% SDS, 50 mM Tris-HCl (pH 8,0)
SDS-Laufpuffer	1 g·l ⁻¹ SDS, 3 g·l ⁻¹ Tris, 14,4 g·l ⁻¹ Glycin
Transferpuffer	0,37 g·l ⁻¹ SDS, 5,8 g·l ⁻¹ Tris, 2,9 g·l ⁻¹ Glycin, 20% Methanol

2.2.2.4 Puffer und Lösungen für Proteinaufreinigungen zur Massenspektrometrie

50 mM ABC	50 mM NH ₄ HCO ₃ , 50% Ethanol
55mM IAA	55 mM Iodacetamid, 50 mM ABC
3% TFA	3% Trifluoressigsäure, 30% Acetonitril
1% TFA	1% Trifluoressigsäure, 5% Acetonitril
Puffer A	0,02% HFBA, 0,5% Essigsäure
Puffer B	0,02% HFBA, 0,5% Essigsäure, 80% Acetonitril

2.2.3 Gebrauchsfertige Lösungen

Acrylamid-/Bis-acrylamidlösung, 30%	Sigma
Amidoschwarz Färbelösung (2x Konzentrat)	Sigma
Coomassie Brilliant Blue	Invitrogen
DMRIE-C	Invitrogen
DMSO	Sigma
Ethidiumbromid 10 mg·ml ⁻¹	Sigma
Ficoll-Paque™	GE Healthcare (Little Chalfont, UK)
Formaldehyd, 37%	Sigma
Hi-Di™ Formamid	Applied Biosystems
Kaliumhydroxid, 8M	Sigma
MOPS SDS Running Buffer	Invitrogen
PBS	PAA, Pasching
POP-7™	Applied Biosystems
RNase Out™	Invitrogen
RNA Storage Solution	Ambion
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Trypanblau (0,4%)	Gibco®
Trypsin/EDTA-Lösung (0,05%, 0,02%)	Gibco®

2.3 Medien und Zusätze

2.3.1 Für Bakterienkulturen

LB-Medium (Angabe pro Liter)	10 g Trypton, 5 g Hefe-Extrakt, 10 gNaCl)
LB-Agar (Angabe pro Liter)	15 g Agar in LB-Medium
SOC Medium (Angabe pro Liter)	2% Trypton, 0,5% Hefe-Extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 20 mM Glukose
SOB-Medium (Angabe pro Liter)	20 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 0,5 g NaCl nach dem Lösen wurde KCl bis zur Endkonzentration von 2,5 mM zugefügt und mit NaOH auf einen pH von 7,0 eingestellt. Nach dem Autoklavieren wurde MgCl ₂ bis zu einer Endkonzentration von 10 mM und MgSO ₄ bis zu einer Endkonzentration von 20 mM hinzugefügt.
Transformationspuffer	10 mM PIPES, 250 mM KCl, 15 mM CaCl ₂ , 55 mM MnCl ₂ , pH 6,7
Ampicillin, Na-Salz	100 mg·ml ⁻¹ , 50% Ethanol

2.3.2 Für eukaryotische Zellen

RPMI 1640 glutaMAX™-I	Gibco®/Invitrogen, Carlsbad, USA
DMEM GlutaMAX™-I	Gibco®
hitzeinaktiviertes FBS	PAA
Gentamicin (50 mg·ml ⁻¹)	Gibco®
murines rekombinantes IL-3	Gibco®
Hygromycin (50 mg·ml ⁻¹)	Invitrogen
Zeocin™ (100 mg·ml ⁻¹)	Invitrogen

2.3.3 Für ‚stable isotope labelling by aminoacids in cell culture‘

SILAC RPMI1640 (ohne L-Lysin und L-Arginin)	Thermo Fisher Scientific
FBS, dialysiert	Thermo Fisher Scientific
FBS, hitzeinaktiviert	PAA, Pasching
Glutamin	Gibco®
L-Lysin-HCl (Lys-0, "light")	Cambridge Isotope laboratories Inc, Andover, MA, USA
L-Lysin-4,5,5-D4 (Lys-D4, "middle")	Cambridge Isotope laboratories Inc
¹³ C ₆ ¹⁵ N ₄ L-Lysin-2HCl (Lys-8, "heavy")	Cambridge Isotope laboratories Inc
L-Arginin-HCl (Arg-0, "light")	Cambridge Isotope laboratories Inc
¹³ C ₆ L-Arginin-HCl (Arg-6, "middle")	Cambridge Isotope laboratories Inc
¹³ C ₆ ¹⁵ N ₄ L-Arginin-HCl (Arg-10, "heavy")	Cambridge Isotope laboratories Inc

2.4 Zell-Linien

2.4.1 Prokaryotische Zellen

Für Transformationen wurden chemisch kompetente *E. coli*-Zellen des folgenden Genotyps verwendet (TOP10; Invitrogen):

F- *mcrA* D(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80/*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *deo*^R *ara* Δ 139 Δ (*ara-leu*) 7697 *galU galK* *rpsL* (Str^R) *endA1* *nupG* λ -

2.4.2 Eukaryotische Zell-Linien

2.4.2.1 Murine Suspensionszellen

BA/F3: IL-3 abhängige murine Prä-B-Zell-Linie (ACC 300; DSMZ, Heidelberg)

BA/F3^{TA+} BA/F3 Zellen, die mit dem pGene/V5-His Konstrukt und dem regulierenden Plasmid pSwitch (beide im GeneSwitch™ System, Invitrogen) kotransfiziert und auf stabil exprimierende Klone selektioniert wurden. Das pGene/V5-His Konstrukt enthält die TEL-AML1 cDNA unter Kontrolle eines induzierbaren Promotors.

BA/F3^{TA-} Kontrollzellen zu BA/F3^{TA+}, die nur mit dem pSwitch Plasmid transfiziert und auf stabil exprimierende Klone selektioniert wurde.

BA/F3^{TA+} und BA/F3^{TA-} wurden freundlicherweise von Anthony M. Ford und Mel Greaves (The Institute of Cancer Research, Sutton, UK) zur Verfügung gestellt (Vektorkarten s. Anhang).

2.4.2.2 Humane Suspensionszellen

NALM6: Humane B-Zell-Vorläufer Leukämie Zell-Linie (ACC 128; DSMZ, Heidelberg)

REH: Humane TEL-AML1-positive B-Zell-Vorläufer Leukämie Zell-Linie (ACC 22; DSMZ)

2.4.2.3 Humane adhärenzte Zellen

293: Humane embryonale Nierenzellen transformiert mit Adenovirus 5 (ACC 305; DSMZ, Heidelberg)

2.5 Nukleinsäuren und Oligonukleotide

2.5.1 Plasmide und Vektoren

pGene/V5-His (GeneSwitch™): induzierbares Konstrukt für die TEL-AML1 Expression (s. Anhang 8.1)

pSwitch Plasmid (GeneSwitch™): Plasmid für die Induktion der Expression durch Mifepriston (s. Anhang 8.2)

pMC-ECFP.H/pMC-EYFP.H:	Bicistronischer Expressionsvektor für ECFP bzw. EYFP mit Hygromycinresistenz
(freundlicherweise von Morten Christensen, Zentralinstitut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik am UKD, zur Verfügung gestellt)	
pMC3-cMyc.H	pMC mit optimierter MCS, cMyc-tag (für C-terminale Fusion) und Hygromycinresistenz
pMC3-HA.H	pMC mit optimierter MCS, HA-tag (für N-terminale Fusion) und Hygromycinresistenz
(freundlicherweise von René Linka, Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und Klinische Immunologie am UKD zur Verfügung gestellt)	
pCMV-Sport6-TEL:	I.M.A.G.E full length cDNA clone IRATp970A0873D; ID 6014394, NCBI Locus BC043399 (imaGenes, Berlin)
pCR4-TOPO-AML1:	I.M.A.G.E full length cDNA clone IRCBp5005A1910Q; ID 9020368, NCBI Locus BC136381 (imaGenes)
pMC3-ECFP-cMyc.H	kloniert aus pMC-ECFP und pMC3-cMyc.H (s. 3.3.1)
pMC3-HA-EYFP.H	kloniert aus pMC-EYFP und pMC3-HA.H (s. 3.3.1)
pMC3-AML1-cMyc.H	kloniert aus pCR4-TOPO-AML1 und pMC3-cMyc.H mittels PCR (s. 3.3.6.1, Primer für Δ Stop s. 2.5.3)
pMC3-TEL-cMyc.H	kloniert aus pCMV-Sport6-TEL und pMC3-cMyc.H mittels PCR (s. 3.3.6.1, Primer für Δ Stop s. 2.5.3)
pMC3-TEL-AML1-cMyc.H	kloniert aus pCMV-Sport6-TEL, pCR4-TOPO-AML1 und pMC3-cMyc.H mittels <i>overlap-extension</i> PCR (s. 3.3.6.2, Primer für Δ Stop s. 2.5.4)
pMC3-HA-AML1.H	kloniert aus pCR4-TOPO-AML1 und pMC3-HA.H mittels PCR (s. 3.3.6.1, Primer s. 2.5.3)
pMC3-HA-TEL.H	kloniert aus pCMV-Sport6-TEL und pMC3-HA.H mittels PCR (s. 3.3.6.1, Primer s. 2.5.3)
pMC3-HA-TEL-AML1.H	kloniert aus pCMV-Sport6-TEL, pCR4-TOPO-AML1 und pMC3-HA.H mittels <i>overlap-extension</i> PCR (s. 3.3.6.2, Primer s. 2.5.4)
pMC3-HA-YFP-AML1.H	kloniert aus pMC3-HA-AML1.H und pMC-EYFP.H
pMC3-HA-YFP-TEL.H	kloniert aus pMC3-HA-TEL.H und pMC-EYFP.H
pMC3-HA-YFP-TEL-AML1.H	kloniert aus pMC3-HA-TEL-AML1.H und pMC-EYFP.H
pMC3-AML1-CFP-cMyc.H	kloniert aus pMC3-AML1-cMyc.H und pMC-ECFP.H
pMC3-TEL-CFP-cMyc.H	kloniert aus pMC3-TEL-cMyc.H und pMC-ECFP.H
pMC3-TEL-AML1-cMyc.H	kloniert aus pMC3-TEL-AML1-cMyc.H und pMC-ECFP.H

2.5.2 Oligonukleotide für die quantitative PCR

Die Primer und Sonden für TaqMan® Assays wurden von Applied Biosystems (Foster City, USA) bezogen. Alle übrigen Oligonukleotide wurden, wenn nicht anders angegeben, bei Eurofins MWG Operon (Ebersberg) oder Sigma bestellt.

2.5.2.1 Primer und Sonden für TaqMan® Assays (Applied Biosystems)

TaqMan® *TEL* (Mensch, FAM™-markiert), Assay ID Hs_00231101_m1*

TaqMan® *AML1* (Mensch, FAM™-markiert), Assay ID Hs_001021966_m1*

TaqMan® *TEL* (Maus, FAM™-markiert), Assay ID Mm_00468390_m1

TaqMan® *AML1* (Maus, FAM™-markiert), Assay ID Mm_01213405_m1

TaqMan® *GAPDH* (endogene Kontrolle, FAM™-markiert), Assay ID 4333764F

TEL-AML1 Sonde FAM™-markiert:

5'-CAT TCC AAG TAT GCA TTC TGC TAT TCT CCC AA-3'

TEL-AML1 Primer:

Forward: 5'-TGT CTC CCC GCC TGA AGA-3'

Reverse: 5'-TCG TGG ACG TCT CTA GAA GGA TT-3'

PDLIM5 (FAM™-markiert), Assay ID Hs_00935062_m1

RSL1D1 (FAM™-markiert), Assay ID Hs_00945633_m1

INTS2 (FAM™-markiert), Assay ID Hs_00394003_m1

KLC4 (FAM™-markiert), Assay ID Hs_00370647_m1

GNB2L1 (FAM™-markiert), Assay ID Hs_00272002_m1

METAP2 (FAM™-markiert), Assay ID Hs_00199152_m1

2.5.2.2 Primer und Sonden für QuantiFast Assays (Qiagen)

CENP-P (Mensch)

GAPDH (Mensch)

PPIA (Mensch)

Cenp-p (Maus)

Ppia (Maus)

2.5.2.3 Primer für SYBR Green Assays

GAPDH Promotor Primer Paar (Maus)

Diagenode (Liège, Belgien)

mm_Gzmb#1

Forward 5'-GGA CTC TGA TAC CAT AGG CTA C-3'

Reverse 5'-GAC TCA GAG AAC CAC CAC TTA C-3'

mm_Gzmb#2

Forward 5'-GTA AGT GGT GGT TCT CTG AGT C-3'

Reverse 5'-CCT GAT GAC GTC TTC TGA GTA C-3'

hs_GZMB#1

Forward 5'-GTG GTC CAC TCT GAG TCA TCA GC-3'

Reverse 5'-CTC TGC CTG ATG ACG TCC TCT G-3'

hs_GZMB#2

Forward 5'-CAG AGG ACG TCA TCA GGC AGA-3'

Reverse 5'-GGA GCA GGC TCA GTG ACT TCA TG-3'

2.5.3 Primer für PCR und Sequenzierung

5'-Mlu-AML1c	5'-GGCGCACGCGT ATGG CTTCAGACAGCATATTTGAG-3'
3'-Spe-AML1c	5'-CCGCGACTAGT TCAGT AGGGCCTCCACACGGCCTC-3'
3'-Spe-AML1c Δ stop	5'-CCGCGACTAGTGTAGGGCCTCCACACGGCCTC-3'
5'-Nru-TEL	5'-GGCGCTCGCGA ATGT CTGAGACTCCTGCTCAG-3'
3'-Apa-TEL	5'-CCGCGGGGCC CTCAG CATTCATCTTCTTGG-3'
3'-Apa-TEL Δ stop	5'-CCGCGGGGCCCGCATTTCATCTTCTTGG-3'
5'-TELseq(1190)	5'-CCTATGAGAAAATGTCCAGAGCC-3'
3'-TELseq(700)	5'-CTCCATGGGAGACACTGACAGAG-3'
5'-AML1seq(536)	5'-GTTCACTCTGACCATCACTGTC-3'
5'-AML1seq(1143)	5'-GCTACCACACCTACCTGC-3'
5'-Seq-pMC (860)	5'-CTCCATAGAAGACACCGGGAC-3'
3'-Seq-Hygro	5'-CACGAGGTGCCGGACTTCGG-3'

2.5.4 Primer für overlap-extension PCR

5'-Mlu-AML1c	5'-GGCGCACGCGT ATGG CTTCAGACAGCATATTTGAG-3'
3'-Apa-TEL	5'-CCGCGGGGCC CTCAG CATTCATCTTCTTGG-3'
5'-TEL(IGRIA)-AML1(ECIL)	5'-CCATGCCATTGGGAGAATAGCAGAATGCATACTTGGAAATGAATCC-3'
3'-(ECIL)AML1-(IGRIA)TEL	5'-GGATTCAATCCAAGTATGCATTCTGCTATTCTCCCAATGGGCATGG-3'

2.5.5 Primer für LM-PCR

JW102	5'-GCG GTG ACC CGG GAG ATC TGA ATT C-3'
JW103	5'-GAA TTC AGA TC-3'

2.5.6 Größenstandards

100 bp DNA Leiter (Invitrogen):	erlaubt die Größenbestimmung von linearer doppelsträngiger DNA im Bereich von 100 bis 2.072 bp.
1 kb plus DNA Leiter (Invitrogen):	erlaubt die Größenbestimmung von linearer doppelsträngiger DNA im Bereich von 100 bis 12.000 bp.

2.6 Proteine

2.6.1 DNA-Polymerasen

2.6.1.1 DNA abhängige DNA-Polymerasen

PCR: peqGOLD Taq-DNA-Polymerase (Peqlab; Erlangen)
peqGOLD Pwo-DNA-Polymerase (Peqlab)
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs; Ipswich, USA)

LM-PCR: T4 DNA Polymerase (New England Biolabs)
Platinum Taq Polymerase (Invitrogen)

qPCR: SYBR Green Mastermix (Applied Biosystems)
Power SYBR Green Mastermix (Applied Biosystems)
TaqMan® Gene expression Mastermix (Applied Biosystems)

Sequenzierung: Big Dye® Terminator v1.1 Ready reaction Mix

2.6.1.2 RNA abhängige DNA-Polymerasen

Quantiscript® Reverse Transkriptase (Qiagen): Mix aus Omniscript® und Sensiscript® Reverse Transkriptasen, der außerdem einen RNase-Inhibitor enthält.
GeneChip® 3' IVT Express Kit (Affymetrix; High Wycombe, UK)

2.6.2 DNA-Ligasen

T4 DNA-Ligase, 400 U·µl⁻¹ (New England Biolabs)
Rapid DNA Ligation Kit (Roche; Basel, Schweiz)

2.6.3 Restriktionsendonukleasen

Alle verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von New England Biolabs oder Fermentas (Thermo Fisher Scientific) bezogen und nach Herstellerangaben verwendet.

2.6.4 Proteaseinhibitoren

Protease Inhibitor Cocktail (Complete, EDTA-free; Roche)

2.6.5 Antikörper

2.6.5.1 Kontroll-IgG für Immunpräzipitationen

Mouse Control IgG, ChIP-grade (abcam; Cambridge, UK)

Rabbit Control IgG, ChIP-grade (abcam)

Rat IgG Isotype Control (abcam)

2.6.5.2 Antikörper für Immunpräzipitationen

Mouse monoclonal to TBP – ChIP Grade (abcam)

AS-Reste 1-20

Rat monoclonal to TEL/AML1

Fusionsstelle (s. Abb. 3.4)

(in Kooperation mit Dr. E. Kremmer aus dem GSF, Institut für Molekulare Immunologie, München)

Anti-AML1 Rabbit pAb (Calbiochem/Merck; Darmstadt)

N-Terminus

Rabbit polyclonal to RUNX1 Ab ChIP-grade (abcam)

AS-Reste 200-300

Rabbit polyclonal to V5 tag – ChIP Grade (abcam)

GKPIPPLLGLDST

Rabbit polyclonal to ETV6 Ab (abcam)

interne Sequenz

TEL (H-214) Rabbit polyclonal Ab (Santa Cruz)

AS-Reste 119-332

2.6.5.3 Primäre Antikörper für Western Blot-Detektion

Mouse monoclonal to TBP – ChIP Grade (abcam)

AS-Reste 1-20

GAPDH (6C5) Mouse monoclonal Ab (Santa Cruz)

Mouse monoclonal to RUNX1 Ab (abcam)

AS-Reste 210-311

Rabbit polyclonal to RUNX1 (abcam)

N-Terminus

Rabbit polyclonal to RUNX1 Ab (abcam)

AS-Reste 231-245

Mouse monoclonal to ETV6 Ab (abcam)

AS-Reste 1-453

TEL (N-19) Goat polyclonal Ab (Santa Cruz)

N-Terminus

TEL (C20) Goat polyclonal Ab (Santa Cruz)

C-Terminus

Myc-tag Mouse monoclonal Ab (Cell Signaling; Danvers, USA)

2.6.5.4 Sekundäre Antikörper für Western Blot Detektion

Goat Anti-Rat IgG, Peroxidase-konjugiert (Jackson ImmunoResearch; West Grove, USA)

Donkey Anti-Rabbit IgG, Peroxidase-konjugiert (Jackson ImmunoResearch)

Goat Anti-Mouse IgG, Peroxydase-konjugiert (Santa Cruz)

Donkey Anti-Goat IgG, Peroxydase-konjugiert (Santa Cruz)

Anti-Mouse IgG, Peroxidase-konjugiert (Cell Signaling)

Anti-Rabbit IgG, Peroxidase-konjugiert (Cell Signaling)

2.6.5.5 Antikörper für FACS Analyse

Goat to V5 tag, FITC-konjugiert (1 µg·µl⁻¹; Biozol; Eching)

GKPIPPLLGLDST

Normal Goat-IgG, FITC-konjugiert (0,4 µg·µl⁻¹; Abcam)

Isotyp Kontrolle

Goat Anti-Rat IgG, FITC-konjugiert (Santa Cruz)

sekundärer Antikörper

2.6.6 Molekulargewichtsstandards

Protein Marker IV, prestained, 10-170 kDa (Peqlab)

Protein Marker II, 10-200 kDa (Peqlab)

2.6.7 Sonstige

RNaseA (100 mg·ml ⁻¹)	Qiagen
ProteinaseK (20 mg·ml ⁻¹)	Invitrogen
Trypsin, Seq-grade	Promega (Fitchburg, USA)
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma
Milchpulver	Roth

2.7 ProteinA/G Agarosen und magnetische beads

ProteinA/G Agarose	Santa Cruz
Dynabeads® ProteinG	Invitrogen
c-myc <i>microbeads</i>	Miltenyi (Bergisch-Gladbach)
ProteinG <i>microbeads</i>	Miltenyi
CD19 <i>microbeads</i>	Miltenyi

2.8 Materialien und Kits

2.8.1 Materialien für die Zellkultur

Die für die Kultivierung und Lagerung von eukaryotischen Zellen verwendeten Artikel wurden, wenn nicht anders angegeben, von Corning (Corning® Costar, Schiphol-Rijk, Niederlande) oder Falcon™ (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, USA) bezogen.

2.8.2 Materialien für die Molekularbiologie

Die für die Isolierung und Lagerung von Nukleinsäuren oder Proteinen verwendeten Artikel wurden, wenn nicht anders angegeben, von Firmen wie der Eppendorf AG (Hamburg), Sarstedt (Nimbrecht), Applied Biosystems (Foster City, USA), oder Falcon™ (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, USA) bezogen. Die Immobilisierung der Dynabeads® erfolgte im Dynal® MPC™ (*Magnetic Particle Concentrator*, Invitrogen), die der *microbeads* in µMACS™ Säulen mit Hilfe eines µMACS™ Separators (Miltenyi).

2.8.3 Sonstige Verbrauchsmaterialien

C18 Empore Filter	3M (St. Paul, USA)
DyeEx 2.0	Qiagen
LS Säulen	Miltenyi
µMACS™ Säulen	Miltenyi
PVDF Blot Membran	GE Healthcare

2.8.4 Kits

Cytofix/Cytoperm™	Becton Dickinson
Gel Extraction Kit	Invitrogen
GeneChip® 3' IVT Express Kit	Affymetrix
Maxi Prep Kit	Macherey-Nagel (Düren)
MinElute PCR Purification Kit	Qiagen
µMACS™ Protein A/G Micro Beads Kit	Miltenyi Biotec
Plasmid Mini Prep Kit	Fermentas
PureLink PCR Purification Kit	Invitrogen
Quantitect Reverse Transcription Kit	Qiagen
Quick Start Bradford Assay	Biorad (Hercules, USA)
Rapid Ligation Kit	Roche
RNA 6000 Nano Kit	Agilent (Santa Clara, USA)
RNeasy Mini Kit	Qiagen
Vivapure MaxiprepG Kit	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Whole Genome Amplification Kit 2	Sigma

2.9 Geräte und Software

Alle verwendeten Geräte wie Zentrifugen, Inkubatoren, Gelsysteme, Kühl- und Gefrierschränke, Wasserbäder, Rollenmischer, Thermomixer, Mikroskope etc. wurden, wenn nicht anders angegeben, von den üblichen Herstellern für Labormaterialien bezogen (Beckman Coulter (Brea, USA), Hettich (Tuttlingen), Eppendorf, Thermo Fisher Scientific Heraeus®, Biorad (Hercules, USA), Liebherr (Bulle, Schweiz), Zeiss (Oberkochen)).

Die Chromatinscherung wurde mit dem Ultraschalldesintegrator UP100H unter Verwendung der Sonotrode MS7 (Dr. Hielscher GmbH; Teltow) oder dem Covaris® S220 *Sample Preparation System* (Covaris®; Woburn, USA) durchgeführt.

Die Dokumentation der Agarosegele erfolgte mit Hilfe des Intas® GDS (Göttingen), die der Western Blots mit Hilfe des LAS 3000 Mini (Fuji; Tokyo, Japan).

Für Sequenzierungen wurde der 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) verwendet, die Auswertung der Sequenzierungen erfolgte mit Hilfe der Sequencher 4.9 Software (Gene Codes Corporation; Ann Arbor, USA).

Die quantitativen PCR-Ansätze wurden mit Hilfe des 7900 HT Fast Real-time PCR Systems (Applied Biosystems) durchgeführt, für alle übrigen PCR wurden GeneAmp® PCR Geräte (Applied Biosystems) verwendet.

Die durchflusscytometrischen Messungen erfolgten am FACScan (Beckton Dickinson) und wurden mit Hilfe der dazugehörigen CellQuest Pro Software ausgewertet.

Für die Quantifizierung von Nukleinsäuren wurde das Nano Drop ND-1000 Spectrophotometer (Peqlab) verwendet, während die Qualitätskontrolle von RNA-Extraktionen im 2100 Bioanalyzer (Agilent) erfolgte.

Die Ergebnisse der CHIP-on-chip Experimente wurden mit Hilfe der SignalMap Software (Nimblegen; Madison, USA) visualisiert. Für die Dokumentation und Darstellung der Ergebnisse wurden Programme des Microsoft Office 2010 Pakets (Microsoft®; Redmont, USA) sowie der *open source* Vektorgraphikeditor Inkscape und das Bildbearbeitungsprogramm Adobe® Photoshop 7.0 (Adobe Systems; San Jose, USA) verwendet.



3 METHODEN

Alle nicht gesondert aufgeführten Standardmethoden wurden nach Protokollen aus „Molecular Cloning“ (Sambrook *et al.*, 1989) durchgeführt. Der Umgang mit Bakterien sowie mit murinen und humanen Zell-Linien erfolgte unter sterilen Bedingungen an dafür vorgesehenen Arbeitsplätzen und unter Beachtung der Vorschriften für das Arbeiten mit GVO der niedrigsten Risikostufe (S1). Sowohl der dabei entstehende Abfall als auch kontaminierte Arbeitsgeräte wurden mittels Dampfdrucksterilisation im Autoklaven sterilisiert.

3.1 Mikrobiologische Arbeitsmethoden

3.1.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* nach Inoue

Die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen zur Transformation von Plasmid-DNA erfolgte nach Inoue (Inoue *et al.*, 1990). Charakteristischerweise werden hierfür die Zellen bei 18°C kultiviert, wodurch es vermutlich zu einer die Transformation begünstigenden Veränderung der Zusammensetzung der Lipidmembran kommt. Zunächst wurde aus einer bei -80°C gelagerten Glycerinkultur des zu verwendenden *E. coli* Stammes (TOP10, s. 2.4.1) ein Vereinzelausstrich auf einer LB-Agarplatte ohne Antibiotikum gemacht und diese über Nacht bei 37°C inkubiert. Von dieser wurde eine Einzelkolonie in jeweils 250 ml SOB-Medium überführt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bei 18°C und 180 rpm kultiviert. Anschließend wurde die Kultur zunächst für 10 min auf Eis abgekühlt und für 20 min bei 2.500 g bei 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 80 ml Transformationspuffer (s. 2.3.1) resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wie oben bereits beschrieben wurde das Pellet in 20 ml Transformationspuffer resuspendiert und vorsichtig mit DMSO bis zum Erreichen der Endkonzentration von 7% versetzt. Nach erneuter zehnmütiger Inkubation auf Eis wurde die Suspension in Aliquots zu je 100 µl in sterile 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Aliquots erfolgte bei -80°C. Alternativ wurden für Transformationen kommerziell erworbene One Shot® TOP10 *E. coli* (Invitrogen) verwendet.

3.1.2 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*

Die hier verwendeten chemisch kompetenten *E. coli* wurden auf Eis aufgetaut und im Fall der kommerziell erworbenen One Shot® TOP10 kurz zentrifugiert und in jeweils ein neues, steriles 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Nach Zugabe der zu transformierenden DNA bzw. des Ligationsansatzes und vorsichtigem Mischen wurden die Transformationsansätze für 20 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock für die Aufnahme der DNA in die Zellen erfolgte für 45 s bei 42°C, woraufhin die Ansätze sofort wieder auf Eis gestellt wurden. Anschließend wurden die Transformationsansätze mit einem geeigneten Volumen SOC-Mediums gemischt und ca. 45 min bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Für die weitere Kultivierung wurden die Ansätze auf vorgewärmten, ampicillinhaltigen (75 µg·ml⁻¹) LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert, bis deutlich sichtbare Einzelkolonien zu

identifizieren waren. Die kurzzeitige Lagerung der auf Agarplatten gewachsenen *E. coli* erfolgte bei 4°C.

3.1.3 Kultivierung von Einzelkolonien für die Plasmidpräparation

Für die Anzucht einzelner Kolonien zur anschließenden Plasmid-Präparation wurden Zellen aus entsprechend selektionierten Einzelkolonien von LB-Agarplatten mit einer sterilen Pipettenspitze in LB-Medium überimpft. Die Kultivierung in kleinem Maßstab („mini“) erfolgte in 3 ml LB-Medium unter Zusatz von 75 µg·ml⁻¹ Ampicillin bei 37°C und 180 rpm über Nacht. Für die Kultivierung in großem Maßstab („maxi“) wurde die Einzelkolonie zunächst in 3 ml LB-Medium unter Zusatz von 75 µg·ml⁻¹ Ampicillin bei 37°C und 180 rpm über Tag vorkultiviert und anschließend in 250 ml LB-Medium mit 75 µg·ml⁻¹ Ampicillin überführt und über Nacht weiter wie beschrieben kultiviert.

3.2 Zellkulturtechniken

Alle verwendeten Zell-Linien wurden in Zellkulturflaschen oder -platten mit Kulturmedium in dafür vorgesehenen Inkubatoren bei 37°C in feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre mit 5% CO₂ kultiviert.

3.2.1 Kultivierung muriner und humaner Zell-Linien

3.2.1.1 Kultivierung von Suspensionszellen

Die Kultivierung muriner und humaner Suspensionszellen erfolgte in RPMI 1640 GlutaMAX™-I mit 10% hitzeinaktiviertem FBS und 50 µg·ml⁻¹ Gentamicin. Für die Kultivierung muriner BA/F3-Zellen wurde dem Medium außerdem 10 ng·ml⁻¹ IL-3 zugesetzt. Die Selektion von BA/F3^{TA-} erfolgte mit 200 µg·ml⁻¹ Hygromycin, die von BA/F3^{TA+} zusätzlich mit 50 µg·ml⁻¹ Zeocin™. Für die Selektion der stabil exprimierenden NALM6 Zell-Linien wurden 400 µg·ml⁻¹ Hygromycin verwendet. Abhängig von der Proliferationsrate wurden die Zellen zwei- bis dreimal pro Woche passagiert. Hierfür wurden die Zellen zunächst gleichmäßig im Medium verteilt und anschließend ein Aliquot (1:5 bis 1:10 bezogen auf die Ausgangszellzahl) in neue Zellkulturflaschen überführt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte falls erforderlich über Auszählung der lebenden Zellen in einer Neubauer-Zählkammer bei gleichzeitiger Ausschlussfärbung mit Trypanblau.

3.2.1.2 Kultivierung von adhärenenten Zellen

Die Kultivierung humaner adhärenenten Zellen erfolgte in DMEM GlutaMAX™-I mit 10% hitzeinaktiviertem FBS und 50 µg·ml⁻¹ Gentamicin. Abhängig von der Proliferationsrate wurden die Zellen zwei- bis dreimal pro Woche passagiert. Hierfür wurde zunächst das Kulturmedium entfernt und die Zellen mit Ca²⁺/Mg²⁺-freier phosphat-gepufferter Saline vorsichtig gewaschen. Anschließend wurden sie mit einer Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst, sorgfältig in Medium resuspendiert und anschließend ein Aliquot (1:6 bis 1:12 bezogen auf die Ausgangszellzahl) in neue Zellkulturflaschen überführt. Die

Bestimmung der Zellzahl erfolgte falls erforderlich über Auszählung der lebenden Zellen in einer Neubauer-Zählkammer bei gleichzeitiger Ausschlussfärbung mit Trypanblau. Für die Fluoreszenzaufnahmen lebender Zellen wurden die Zellen 24 Stunden vorher in für die konfokale Mikroskopie geeigneten, mit Poly-L-Lysin ($10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) beschichteten Kulturkammern ausgesät.

3.2.1.3 Kultivierung für ‚stable isotope labeling by amino acids in cell culture‘ (SILAC)

Neben der bereits seit etwa 35 Jahren bekannten und etablierten Methode der zweidimensionalen Gelelektrophorese zur Trennung und quantitativen Analyse komplexer Proteingemische, gibt es seit einigen Jahren auch in der Massenspektrometrie die Möglichkeit, akkurate Quantifizierungen von Proteinen in solch komplexen Proben durchzuführen. Ermöglicht wurde dies durch den Einsatz stabiler, nichtradioaktiver Isotope wie ^{13}C , ^2H , ^{15}N und ^{18}O , da ein Einbau schwerer Isotope zu einer Erhöhung des Molekulargewichts der markierten Peptide und damit zu einer entsprechenden Verschiebung des Signals im Massenspektrum führt. Die relative Quantifizierung zweier verschiedener Zustände wird dann durch den Vergleich der Signalintensitäten von ansonsten identischen Peptiden erlaubt. Für die SILAC-Methode werden essentielle Aminosäuren wie L-Arginin und L-Lysin durch entsprechend schwerer markierte Analoga im Kulturmedium ersetzt, wobei zudem 95% des verwendeten FBS aus dialysiertem FBS bestehen, welches ebenfalls frei von diesen Aminosäuren ist. Nach etwa fünf Zellteilungen erwartet man einen nahezu kompletten metabolischen Einbau der „schweren“ Aminosäuren, wobei auch Proteine mit sehr geringem „turnover“ zu 97% markiert sind (Krüger & Mann, 2006; Ong & Mann, 2006). Die isolierten Proteine werden dann mit Hilfe der Endopeptidase Trypsin verdaut, welche Peptidbindungen spezifisch nach den Aminosäuren Arginin und Lysin sowie modifiziertem Cystein spaltet. Daher führt die Kombination aus Doppelmarkierung mit Arginin/Lysin und dem anschließenden Trypsin-Verdau zu einer Markierung aller tryptischen Peptide bis auf die Carboxy-terminalen Peptide.

Die für die SILAC Experimente verwendeten BA/F3^{TA-} und BA/F3^{TA+} Zellen wurden wie in Abbildung 3.1 gezeigt zunächst für mindestens fünf Zellteilungen in SILAC RPMI 1640 unter Zusatz von 9,5% dialysiertem FBS, 0,5% hitzeinaktiviertem FBS, 2mM Glutamin, $10 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ IL-3, $28 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ L-Arginin (Arg-0, Arg-6 oder Arg-10) und $73 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ L-Lysin (Lys-0, Lys-D4 oder Lys-8) passagiert. Nach diesem Zeitraum sollten mindestens 97% aller Proteine markiert sein. Anschließend wurden die Zellen in der Mifepriston-Kontrolle sowie die des Ansatzes für die TEL-AML1 Expression mit $32,5 \text{ pM}$ Mifepriston behandelt und für weitere 16 Stunden kultiviert. Der Nachweis der erfolgreichen Induktion der TEL-AML1 Expression erfolgte mittels Durchflusszytometrie (s. 3.4.1). Für die massenspektrometrische Analyse (s. 3.4.6) wurden Duplikate angefertigt und hierfür jeweils $7\cdot 10^6$ Zellen pelletiert, mit phosphat-gepufferter Saline (inkl. Proteaseinhibitor Cocktail) gewaschen, erneut pelletiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

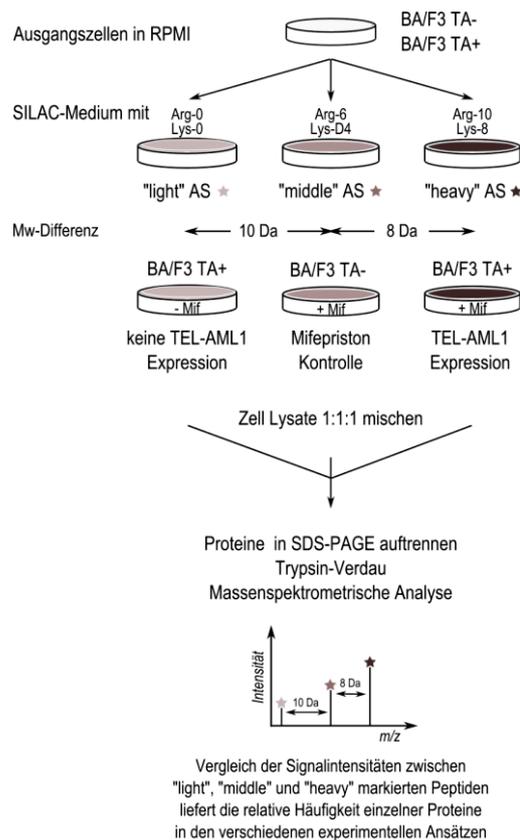


Abbildung 3.1 Schematische Darstellung der SILAC-Zellkultur-Ansätze. Zunächst wurden die Zellen (BA/F3 TA+ bzw. BA/F3 TA-) in SILAC RPMI 1640 unter Zusatz verschiedener Kombinationen markierter essentieller Aminosäuren (Arg-0/Lys-0, Arg-6/Lys-D4 bzw. Arg-10/Lys-8) für fünf Zellteilungen passagiert und anschließend gegebenenfalls mit Mifepriston behandelt. Nach weiteren 16 Stunden wurden die Zellen geerntet und für die anschließende massenspektrometrische Analyse (s. 3.4.6) schockgefroren. Die Kombination der unterschiedlich „schwer“ markierten Aminosäuren bewirkt eine Differenz im Molekulargewicht (Mw) identischer Peptide zwischen den einzelnen Ansätzen von 10 Da bzw. 8 Da. Diese lässt sich im Massenspektrometer messen, wobei ein Vergleich der Signalintensitäten die relative Häufigkeit einzelner Proteine in den verschiedenen Ansätzen liefert.

3.2.2 Generierung stabil exprimierender Zell-Linien

3.2.2.1 Transfektion und Selektion stabil exprimierender Suspensionszell-Linien

Die Transfektion humaner Suspensionszellen zur Generierung stabil TEL-, AML1- und TEL-AML1-exprimierender Zell-Linien erfolgte mit Hilfe des Transfektionsreagenzes DMRIE-C (Invitrogen), einem 1:1 Gemisch aus dem kationischen Lipid DMRIE (1,2-dimyristyloxypropyl-3-dimethyl-hydroxy ethyl ammonium bromid) und Cholesterin in Membran-gefiltertem Wasser. Es wurden jeweils $1 \cdot 10^6$ NALM6 mit 2 μg Plasmid-DNA nach Herstellerangaben transfiziert. Etwa 48 Stunden nach Transfektion wurde mit der Selektion stabil exprimierender Zell-Linien begonnen. Hierfür wurden die Zellen in Kulturmedium mit $400 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ Hygromycin B passagiert bis alle Zellen einer entsprechenden Kontrolle abgestorben waren. Der Nachweis der Expression des Transgens erfolgte mittels Detektion im Western Blot und über quantitative PCR.

3.2.2.2 Transfektion und Selektion stabil exprimierender adhärenter Zell-Linien

Für die Generierung stabil AML1-, TEL- bzw. TEL-AML1-exprimierender adhärenter Zell-Linien wurden HEK 293-Zellen mit Polyethylenimin (PEI; Sigma-Aldrich) transfiziert, welches in wässriger Lösung als Polykation vorliegt und sich vor allem für die Transfektion von Nukleinsäuren in humane oder murine Zellen sehr gut eignet. Hierfür wurden die Zellen am Tag zuvor so ausgesät, dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion etwa 80% konfluent waren. Pro Transfektionsansatz wurden 45 µg PEI und 15 µg Plasmid-DNA in jeweils 1 ml Kulturmedium ohne FBS gegeben. Die beiden Ansätze wurden vereinigt, gründlich gemischt und 20-30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Kulturmedium von den Zellen entfernt und die Transfektionsansätze zugegeben. Für die weitere Kultivierung wurden außerdem 4 ml Kulturmedium mit 15% FBS zugefügt. Etwa 48 Stunden nach Transfektion wurde mit der Selektion stabil exprimierender Zell-Linien begonnen. Hierfür wurden die Zellen in Kulturmedium mit 100 µg·ml⁻¹ Hygromycin B passagiert bis alle Zellen einer entsprechenden Kontrolle abgestorben waren. Der Nachweis der Expression des Transgens erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie und Detektion im Western Blot.

3.2.3 Kryokonservierung muriner und humaner Zell-Linien

Für die Langzeitlagerung wurden die resuspendierten Zellen zunächst gezählt und anschließend bei 300 g für 5 min zentrifugiert. Die Zellpellets wurden in Einfriermedium (FBS, 10% DMSO) aufgenommen, zu jeweils 5·10⁶ bis 7·10⁶ Zellen in Kryoröhrchen überführt und in mit Isopropanol-gefüllten Einfriercontainern (Nalgene Labware, Rochester, USA) zunächst bei -80°C eingefroren. Am nächsten Tag wurden die Röhrchen in Tanks mit flüssigem Stickstoff überführt und hier nach Möglichkeit in der Gasphase gelagert. Zur Reaktivierung wurden die tiefgefrorenen Zellen unmittelbar nach dem Auftauen mit 5 ml Medium versetzt, bei 300 g für 5 min zentrifugiert und anschließend in eine Flasche oder Platte mit Kulturmedium überführt.

3.2.4 Induktion der TEL/AML1-Expression

Die für die Experimente verwendeten murinen Zell-Linien beruhten auf der IL3-abhängigen Zell-Linie BA/F3 und wurden wie bereits unter 2.4.2.1 beschrieben im Labor von Anthony Ford und Mel Greaves hergestellt. Das GeneSwitch™ System (Invitrogen), mit dem diese Zell-Linien generiert wurden, ist eine modifizierte Version des ursprünglich von Wang *et al.* 1994 beschriebenen Systems, und basiert auf einer autoregulatorischen Rückkopplungsschleife. Diese wird durch das regulatorische Plasmid pSwitch (vgl. 8.2) vermittelt, welches einen Ligand-abhängigen Transkriptionsfaktor kodiert, der durch Bindung des synthetischen Steroids Mifepriston aktiviert wird. In dieser aktiven Form induziert er sowohl seine eigene als auch die Transkription des auf dem Expressionsvektor pGene/V5-His kodierten Transgens (vgl. Abb. 3.2). Für die Optimierung der Induktion der TEL-AML1 Expression wurden zunächst verschiedene Mifepriston-Konzentrationen (27,5 bis 37,5 pM) ausgetestet. Anschließend wurde die Dauer der Induktion (2 bis 24 Stunden) und die Anzahl eingesetzter Zellen (1,5 bis 7,5·10⁶) variiert, um möglichst viele induzierte Zellen lebend ernten zu können. Hieraus resultierte, dass letztendlich für die Induktion der TEL-AML1-Expression jeweils 5 bis 7·10⁶ BA/F3^{TA+} in Kulturmedium ausgesät und mit 32,5 pM Mifepriston für 16 Stunden kultiviert wurden. Die

Behandlung der Kontrollzellen (BA/F3^{TA+}) erfolgte dementsprechend. Die erfolgreiche Induktion der TEL-AML1 Expression wurde durchflusszytometrisch nachgewiesen (s. 3.4.1).

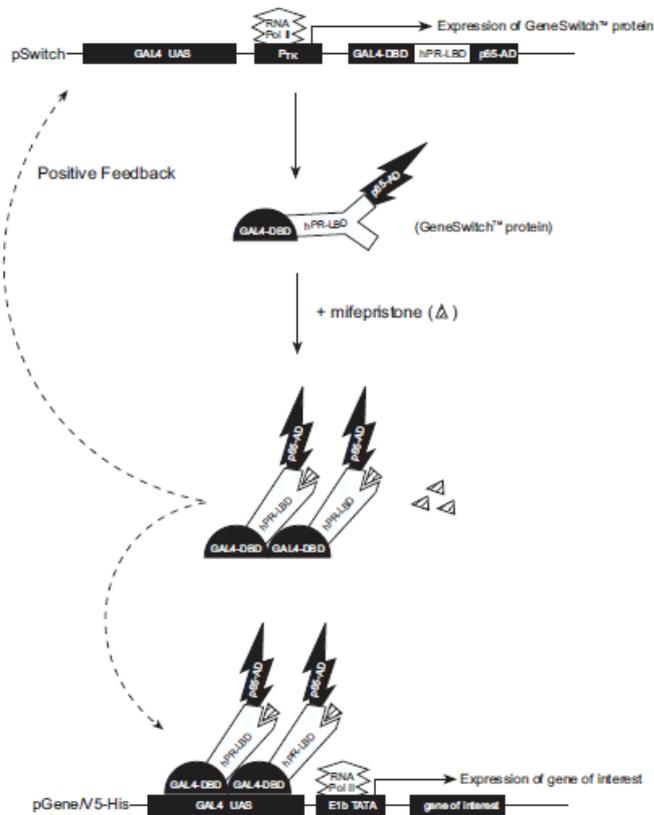


Abbildung 3.2 Das GeneSwitch™ System. Dieses System besteht aus zwei Vektoren und beruht auf einer autoregulatorischen Rückkopplungsschleife. Das regulatorische Plasmid pSwitch kodiert für ein hybrides Fusionsprotein aus der GAL4 DNA Bindedomäne (GAL4-DBD) der Hefe, einer trunkierten Ligand-Bindedomäne des humanen Progesteronrezeptors (hPR-LDB) und der humanen p65 Aktivierungsdomäne (AD) von NFκB. Dieses wird unter der Kontrolle eines Hybrid-Promotors aus GAL4-UAS (upstream activating sequence) und dem minimalen Promotor der Herpes Simplex Virus Thymidin Kinase (TK) auf niedrigem basalen Level exprimiert. Nach Bindung des synthetischen Progesterons Mifespriston kommt es zu einer Änderung der Konformation des Fusionsproteins, welche zu einer Dimerisierung und letztendlich zur Überführung in die aktive Form führt. Die Homodimere des Ligand-gebundenen Proteins aktivieren sowohl die Transkription des regulatorischen Fusionsgens als auch die des Transgens, welches auf dem Expressionsvektor pGene/V5-His kodiert ist.

3.2.5 Isolierung von CD19-positiven Zellen aus gesunden Probanden

Das in dieser Arbeit für die Genexpressionsanalysen eingesetzte primäre Patientenmaterial wurde freundlicherweise von Jochen Harbott (Universitätsklinikum Gießen) zur Verfügung gestellt. Hierbei handelte es sich um peripheres Blut oder Knochenmark TEL-AML1-positiver Patienten, welches zum Zeitpunkt der Diagnose gewonnen und mit Zustimmung der Eltern für Forschungszwecke zur Verfügung gestellt wurde. Aus diesem Material waren mittels Dichtezentrifugation über Ficoll-Paque™ mononukleäre Zellen isoliert und diese bis zur RNA-Isolierung bei -80°C gelagert worden.

Um für dieses Patientenmaterial eine möglichst geeignete Kontrolle zu erhalten wurde peripheres Blut gesunder Probanden ebenfalls über Ficoll-Paque™ in seine Bestandteile aufgetrennt. Hierfür wurde das Blut 1:1 mit phosphatgepufferter Saline gemischt und vorsichtig auf das gleiche Volumen Ficoll-Paque™ geschichtet. Nach Zentrifugation bei 400 g für 20 min (ungebremst) waren die mononukleären Zellen deutlich als separate Schicht sichtbar und wurden in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Nach zweimaligem Waschen mit dreifachem Volumen phosphatgepufferter Saline und Zentrifugation bei 500 g für 10 min wurde das Zellpellet in PBS vorsichtig resuspendiert und die Zellen anschließend gezählt. Im Patientenmaterial waren zum Zeitpunkt der Diagnose der prä-B-Zell Leukämie über 80% der Zellen sogenannte Blasten, d. h. nicht endgültig differenzierte B-Zellen. Daher wurden aus den mononukleären Zellen der gesunden Probanden Zellen isoliert, die das Antigen CD19 (*cluster of differentiation*) auf ihrer Oberfläche exprimierten. Dieses Antigen ist auf allen B-Zellen von der Festlegung auf die B-Zell-Linie bis zu ihrer Reifung, wo es dann verloren geht, nachweisbar. Die Aufreinigung erfolgte durch Positivselektion unter Verwendung von CD19 *microbeads* und LS Säulen (Miltentyi) nach Herstellerangaben. Um die Reinheit der aufgereinigten Zellen zu überprüfen wurde ein Aliquot mit FITC-konjugierten CD20 Antikörper, einem weiteren B-Zellmarker, 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert und nach zweimaligem Waschen mit PBS durchflusscytometrisch analysiert. Aus den restlichen Zellen wurde direkt nach der Aufreinigung die RNA isoliert (s. 3.3.3).

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Klonierung der Expressionskonstrukte für AML1 TEL und TEL-AML1

Die Generierung humaner Zell-Linien, welche stabil AML1, TEL bzw. TEL-AML1 exprimieren erfolgte mit bicistronischen Expressionsvektoren, die auf den unter 2.5.1 erwähnten Vektoren pMC-ECFP.H und pMC-EYFP.H beruhen. Diese erlauben die gleichzeitige Expression des interessierenden Gens und des Selektionsmarkers Hygromycin über eine gemeinsame mRNA mittels einer IRES (*internal ribosome entry site*) des Polio Virus, was die stabile Expression in humanen Zell-Linien erleichtert (Mielke *et al.*, 2000; Linka *et al.*, 2007). Bei pMC3-HA.H und pMC3-cMyc.H handelte es sich um Derivate des pMC-Vektors, welche mittels Oligoklonierung generiert wurden und die N-terminale Fusion mit einem HA-Epitop *tag* bzw. die C-terminale Fusion mit einem cMyc-Epitop *tag* (EQKLISEEDL) verknüpft durch einen drei Aminosäure kurzen *spacer* (PPG) ermöglichten. Für die Klonierung der Ausgangsvektoren pMC3-HA-EYFP.H und pMC3-ECFP-cMyc.H wurde zunächst mit Hilfe geeigneter Restriktionsendonukleasen das EYFP bzw. das ECFP aus pMC-EYFP.H bzw. pMC-ECFP.H in den Vektor pMC3-HA.H bzw. pMC3-cMyc.H eingebaut. Nach Transformation chemisch

kompetenter *E. coli* (s. 3.1.2) und der Kultivierung einzelner Kolonien für die Plasmidpräparation (s. 3.1.3) wurde die Plasmid-DNA isoliert (s. 3.3.2) und durch einen analytischen Restriktionsverdau sowie durch Sequenzierung (s. 3.3.7) überprüft. Von den bei imaGenes kommerziell erworbenen TEL und AML1 cDNA Klonen (s. 2.5.1) wurden zunächst Plasmid Maxi-Präparationen angefertigt und diese anschließend durch Sequenzierung überprüft. Mit Hilfe der unter 2.5.3 aufgelisteten Primer wurde sowohl bei TEL als auch bei AML1 das Stop Codon für die C-terminale Fusion des cMyc-tags mittels PCR entfernt und diese PCR-Produkte über geeignete Restriktionsendonukleasen in den Expressionsvektor pMC3-ECFP-cMyc-H entweder vor oder an Stelle des ECFP eingefügt. Die DNA der daraus resultierenden Plasmide wurde wiederum durch Sequenzierung kontrolliert. Die Klonierung der entsprechenden EYFP-Konstrukte erfolgte vergleichbar, allerdings wurde hier zuvor dem EYFP das Stop-Codon über PCR mutiert. Für die Klonierung von TEL-AML1 musste zunächst mit Hilfe der beiden Vektoren pMC3-TEL-cMyc-H und pMC3-AML1-cMyc-H die entsprechende chimäre cDNA über eine sogenannte *overlap-extension* PCR wie unter 3.3.6.2 beschrieben generiert werden. Diese wurde ebenfalls über geeignete Restriktionsendonukleasen in den Expressionsvektor pMC3-ECFP-cMyc-H vor oder an Stelle des ECFP eingefügt und die Plasmid-DNA mittels Sequenzierung überprüft (s. 3.3.7). Auch hier erfolgte die Klonierung der EYFP-Konstrukte wie bereits oben beschrieben.

3.3.2 Plasmid-Isolierung aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* im kleinen Maßstab für Klonierungen erfolgte mit Hilfe des GeneJet™ Plasmid Miniprep Kits (Fermentas) nach Herstellerangaben. Die Plasmid-DNA wurde mit 50 µl TE Puffer (10 mM Tris, 1mM EDTA, pH 8,0) eluiert und spektralphotometrisch quantifiziert. Aliquots der Plasmid-DNA wurden mittels eines analytischen Restriktionsverdau und anschließender Gelelektrophorese unter Verwendung von TAE-Puffer und 0,75 µg·µl⁻¹ Ethidiumbromid kontrolliert. Die präparative Plasmid-Isolierung aus *E. coli* in großem Maßstab erfolgte mit Hilfe eines Maxiprep Kits (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben. Die DNA-Pellets wurden in 500 µl TE-Puffer resuspendiert, spektralphotometrisch quantifiziert und auf eine Konzentration von 1 µg·µl⁻¹ eingestellt. Ein Aliquot der Plasmid-DNA wurde hinsichtlich der Reinheit bzw. Integrität auf einem 1,5%igen Agarosegel analysiert. Außerdem wurde die DNA mittels eines analytischen Restriktionsverdau und anschließender Gelelektrophorese kontrolliert.

3.3.3 Nukleinsäure-Isolierung aus murinen und humanen Zellen

Die Isolierung von Nukleinsäuren, vornehmlich RNA für *real-time* PCR und mikro RNA Arrays, aus murinen oder humanen Zell-Linien erfolgte zumeist mittels TRIzol® Reagenz (Invitrogen) gemäß den Anweisungen des Herstellers. Hierfür wurden 5 bis 6·10⁶ Zellen in 1 ml TRIzol® Reagenz gründlich resuspendiert und ca. 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Erfolgte die Nukleinsäure-Isolierung am nächsten Tag, wurden die Proben bei 4°C gelagert, die Langzeitlagerung erfolgte bei -80°C. Die aufgereinigten RNA-Pellets wurden in 30-50 µl RNA Storage Solution (Ambion; 1 mM Natriumcitrat, pH 6,4) resuspendiert und nach Zugabe von 1 µl RNaseOUT™ (Invitrogen) 10 min bei 55°C inkubiert. Die Quantifizierung der RNA sowie die Kontrolle ihrer Integrität erfolgte nach Angaben des Herstellers mit Hilfe eines RNA 6000 Nano chip Kits am 2100 Bioanalyzer (Agilent).

Die RNA für die Genexpressions Arrays wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen) gemäß den Angaben des Herstellers isoliert. Die Quantifizierung der RNA sowie die Kontrolle ihrer Integrität erfolgte ebenfalls mit Hilfe eines RNA 6000 Nano chip Kits am Bioanalyzer 2100 (Agilent).

3.3.4 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) an murinen Zell-Linien

3.3.4.1 Optimierung des Chromatin-Scherens

Für die Chromatin-Immunpräzipitationen wurde zunächst das Scheren des Chromatins an fixierten Zellen optimiert. Hierfür wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 300 g für 5 min pelletiert und in 10 ml Medium ohne FBS resuspendiert. Nach Zugabe von 1% Formaldehyd und 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur unter ständiger Durchmischung wurde die Reaktion durch Zugabe von 2,5 M Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 125 mM gestoppt. Daraufhin wurden die Zellen durch Zentrifugation für 5 min bei 700 g und 4°C pelletiert und in 50 ml eiskalter phosphat-gepufferter Saline resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde noch einmal wiederholt. Anschließend wurde das Zellpellet schockgefroren und bei -80°C gelagert. Für das Chromatin-Scheren wurden die Zellpellets zunächst vorsichtig auf Eis aufgetaut, in 10 ml Lysepuffer 1 resuspendiert und 10 min bei 4°C unter ständiger Durchmischung inkubiert. Nach Zentrifugation bei 1.350 g und 4°C für 5 min wurde das Zellpellet in 10 ml Lysepuffer 2 resuspendiert und 10 min bei Raumtemperatur unter ständiger Durchmischung inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 5 ml Lysepuffer 3 resuspendiert und zu jeweils 7,6 bzw. $15,2 \cdot 10^6$ Zellen in neue 2 ml Eppendorfgefäße aliquotiert. Anschließend wurde das Chromatin mit Hilfe des Ultraschall Desintegrators UP100H und der Sonotrode MS7 (Dr. Hielscher GmbH) bei 70% output für 0, 6, 12, 18, 24 und 30 Zyklen bestehend aus 20 s Ultraschallbehandlung gefolgt von mindestens einminütiger Inkubation auf Eis geschert. Ziel hierbei war eine durchschnittliche Größe von 500 bp (200-800 bp.). Nach Zugabe eines Zehntel Volumens 10%igem Triton X-100 wurde der Zellschrott durch Zentrifugation bei 20.000 g und 4°C für 10 min pelletiert. Anschließend wurde die Quervernetzung durch Inkubation der Eluate bei 65°C über Nacht wieder aufgelöst. Nach Abbau der RNA durch $0,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ RNaseA bei 37°C für 2 Stunden gefolgt von einer Inkubation mit $0,2 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ProteinaseK für 2 Stunden bei 55°C wurde die DNA über Phenol-Chloroform-Extraktion und anschließende Ethanol-Fällung in Gegenwart von 30 μg Glykogen aufgereinigt. Die so extrahierte DNA wurde spektralphotometrisch quantifiziert und die Fragmentlängen auf einem 1,5%igen Agarosegel analysiert. Zudem wurde die DNA in promotorspezifischen Standard-PCR-Ansätzen (vgl. 3.3.6.1) für das bereits beschriebene TEL-AML1 Zielgen *GZMB* (Starkova *et al.*, 2007) eingesetzt und das spezifische Produkt wiederum gelelektrophoretisch nachgewiesen.

3.3.4.2 Etablierung und Optimierung der Chromatin-Immunpräzipitationen

Zunächst wurde für die Chromatin-Immunpräzipitationen ProteinA/G Agarose verwendet. Pro Ansatz wurden hierfür 4 μg Antikörper mit geschertem Chromatin aus $7 \cdot 10^6$ Zellen für mindestens 6 Stunden bei 4°C unter ständiger Durchmischung inkubiert. Als Kontrolle für die Spezifität der Immunpräzipitationen diente ein Ansatz ohne Antikörper. Nach Zugabe von 50 μl Agarose wurden die Ansätze über Nacht bei 4°C unter ständiger Durchmischung inkubiert. Anschließend wurde die Agarose durch Zentrifugation sedimentiert, der Überstand verworfen bzw. als Kontrolle für eine

folgende SDS-PAGE verwendet und die Agarose mit 1 ml Waschpuffer gewaschen. Die Elution der gebundenen Protein-DNA-Komplexe erfolgte durch Zugabe von 200 µl Elutionspuffer und Inkubation bei 65°C für 30 min. Nach erneuter Zentrifugation wurde die überstehende Flüssigkeit (das Eluat) in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Der Nachweis der spezifischen Immunpräzipitation der gewünschten Protein-DNA-Komplexe erfolgte mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blotting (vgl. 3.4.4 und 3.4.5). Hierfür wurden nicht nur Aliquots der Eluate, sondern auch des Ausgangsmaterials (input) und der Überstände nach Immunpräzipitation auf die Gegenwart sowohl spezifischer als auch unspezifisch gebundener Proteine hin untersucht. Zudem wurde die aufgereinigte DNA in promotor-spezifischen Standard-PCR-Ansätzen (vgl. 3.3.6.1) eingesetzt und die Produkte anschließend gelelektrophoretisch analysiert.

3.3.4.3 Vergleich der Spezifität von ProteinA/G Agarose und magnetischen beads.

Für den Vergleich von ProteinA/G Agarose und magnetischen *beads* hinsichtlich ihrer Spezifität wurden jeweils 50 µl Agarose bzw. ProteinG *beads*, $10 \cdot 10^6$ fixierte Zellen und 4 µg TBP-Antikörper in verschiedenen Ansätzen eingesetzt. Als Kontrolle dienten entsprechende Ansätze ohne Antikörper. Außerdem wurde der Einfluss zusätzlicher Schritte wie das sogenannte *pre-clearing* und das Blocken der Agarose bzw. der *beads* auf die Spezifität der Immunpräzipitation untersucht. Beim *pre-clearing* werden die Ansätze vor der eigentlichen Immunpräzipitation für kurze Zeit mit einem Aliquot Agarose bzw. *beads* inkubiert, um unspezifisch bindende Proteine von vorn herein zu entfernen. Hierfür wurden 20 µl Agarose bzw. *beads* für 30 min bei 4°C mit den entsprechenden Ansätzen inkubiert und anschließend durch Zentrifugation wieder entfernt. Das Blocken der Agarose bzw. *beads* soll ebenfalls unspezifische Bindungen verhindern, was durch Absättigung entsprechender Stellen mit Salmon Sperm DNA erreicht wird. Hierfür wurden die Agarose bzw. die *beads* mit 1 µg gescherter Salmon Sperm DNA pro 10 µl Agarose bzw. *beads* für 30 min bei 4°C inkubiert und anschließend die überschüssige Flüssigkeit durch Zentrifugation entfernt. Die Durchführung der Immunpräzipitationen erfolgte wie bereits unter 3.3.4.2 beschrieben. Um eventuell noch an der Agarose bzw. den *beads* verbliebende Protein-DNA-Komplexe zu entfernen wurden diese nach erfolgter Elution mit 50 µl SDS-Probenpuffer für 5 min bei 95°C inkubiert. Der Nachweis der Spezifität der Immunpräzipitationen erfolgte wie unter 3.3.4.2 beschrieben mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blotting.

3.3.4.4 Chromatin-Immunpräzipitationen für ChIP-on-chip

Das *crosslinking* der Zellen erfolgte ebenso wie die Chromatin-Immunpräzipitationen im Wesentlichen wie in Lee *et al.*, 2006 bereits beschrieben. Hierfür wurden zunächst etwa $50 \cdot 10^6$ Zellen wie unter 3.3.4.1 bereits beschrieben mit Formaldehyd fixiert, gewaschen und bei -80°C gelagert. Für das Chromatin-Scheren wurden die mit Formaldehyd behandelten Zellpellets zunächst vorsichtig auf Eis aufgetaut, in 10 ml Lysepuffer 1 resuspendiert und 10 min bei 4°C unter ständiger Durchmischung inkubiert. Nach Zentrifugation bei 1.350 g und 4°C für 5 min wurde das Zellpellet in 10 ml Lysepuffer 2 resuspendiert und 10 min bei Raumtemperatur unter ständiger Durchmischung inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 2,5 ml Lysepuffer 3 resuspendiert und zu jeweils $10 \cdot 10^6$ Zellen in neue 2 ml Eppendorfgefäße aliquotiert. Anschließend wurde das Chromatin zu einer durchschnittlichen Größe von 500 bp (200-800 bp.) mit Hilfe des Ultraschall Desintegrators UP100H und der Sonotrode MS7 (Dr. Hielscher GmbH) bei 70% output gescheret. Nach Zugabe eines Zehntel

Volumens Triton X-100 (10%) wurde der Zellschrott durch Zentrifugation bei 20.000 g und 4°C für 10 min pelletiert. Die Überstände wurden vereinigt und ein Aliquot von 100 µl als „input“ abgenommen und bei -20°C gelagert.

Für die Immunpräzipitationen wurden pro Ansatz 100 µl magnetische ProteinG *beads* (Dynabeads, Invitrogen) zweimal mit 1,5 ml Blocking Solution (1x PBS, 0,5% BSA) gewaschen und anschließend mit 250 µl Blocking Solution bei 4°C über Nacht auf einem Rotator inkubiert. Anschließend wurden die *beads* dreimal mit 1 ml Blocking Solution gewaschen und zum Schluss in 100 µl Blocking Solution resuspendiert. Pro Immunpräzipitation wurden 5 µg TEL-AML1 Antikörper bzw. 5 µg einer Ratten-IgG Isotyp-Kontrolle mit den so vorbereiteten magnetischen *beads* auf einem Rotator bei 4°C für mindestens 6 Stunden inkubiert. Nach Zugabe des gescherten Chromatins (pro Ansatz das Pendant zu ca. $10 \cdot 10^6$ Zellen) wurden die Ansätze erneut über Nacht bei 4°C auf einem Rotator inkubiert.

3.3.5 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) an humanen Zell-Linien

Das *crosslinking* der Zellen erfolgte ebenso wie die Chromatin-Immunpräzipitationen im Wesentlichen nach Herstellerempfehlung (Miltenyi ChIP-Protokoll für *micro beads*). Hierfür wurden zunächst etwa $30 \cdot 10^6$ Zellen durch Zentrifugation bei 300 g für 5 min pelletiert und in 10 ml kalter phosphat-gepufferter Saline resuspendiert. Nach Zugabe von Formaldehydlösung bis zu einer Endkonzentration von 0,5% und 5 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur unter ständiger Durchmischung wurde die Reaktion durch Zugabe von 2,5 M Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 125 mM gestoppt. Daraufhin wurden die Zellen durch Zentrifugation für 5 min bei 700 g und 4°C pelletiert und in 20 ml eiskalter phosphat-gepufferter Saline in Gegenwart von Proteaseinhibitoren resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde noch einmal wiederholt. Anschließend wurde das Zellpellet in 50 µl SDS-Lysepuffer pro 10^6 Zellen resuspendiert und nach 10 minütiger Inkubation auf Eis bei -80°C gelagert. Für das Chromatin-Schneiden wurden die Zellpellets zunächst auf Eis aufgetaut und anschließend das Chromatin in Aliquots zu ca. $6 \cdot 10^6$ Zellen mit Hilfe eines Covaris® S220 Sample Preparation Systems in die gewünschte Länge geschert (13 min unter den vom Hersteller empfohlenen Standard-einstellungen). Die optimalen Bedingungen hierfür wurden zuvor mit Hilfe eines Zeitverlaufs über 2, 5, 10, 15 und 20 min bei gleichen Geräteeinstellungen bestimmt. Währenddessen wurde die benötigte Menge cMyc *micro beads* mit 1 µg gescherter Salmon Sperm DNA pro 10 µl *beads* für 30 min bei 4°C geblockt. Das gescherte Chromatin wurde mit dreifachem Volumen kaltem ChIP Puffer gemischt und 10 min bei 13.000 g und 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße überführt und mit 100 µl geblockten c-myc *micro beads* 60 min bei 4°C inkubiert. Nach erfolgter Immunpräzipitation wurden die *micro beads* in µMACS™ Säulen immobilisiert und dort mit jeweils 1 ml Waschpuffer 1, 2, 3 und 4 gewaschen. Die Elution erfolgte durch Inkubation mit 50 µl auf 95°C erhitztem Elutionspuffer für 1 min und wurde noch dreimal wiederholt (200 µl Gesamtvolumen). Nach Zugabe von 0,2 M NaCl und 20 µg Proteinase K wurden die Ansätze über Nacht bei 65°C und 500 rpm inkubiert. Die Aufreinigung der DNA erfolgte wie bereits unter 3.3.4.1 beschrieben.

3.3.6 PCR-Methoden

3.3.6.1 Standard PCR bzw. promotorspezifische PCR

Der Nachweis der Promotorregionen bereits bekannter AML1- oder TEL-AML1-Zielgene diente als Kontrolle für die Effektivität und Spezifität der CHIP-Experimente. Hierfür wurde die aufgereinigte DNA quantifiziert und jeweils 1 µg (PCR für Klonierungen) bzw. 50 ng (promotorspezifische PCR) in 50 µl PCR-Ansätze mit jeweils 10 pmol der entsprechenden Primerpaare, in Gegenwart von 1,25 U Taq-DNA-Polymerase, geeignetem Puffer, 0,2 mM dNTP-Mix, 10 mM Tris-HCl (pH 8,5) und 1,5 mM MgCl₂ eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte nach initialer Denaturierung für 2 min bei 95°C in 23 Zyklen bestehend aus 15 s Denaturierung bei 95°C, 30 s Annealing bei 58°C und 90 s Elongation bei 72°C, gefolgt von einer finalen Elongation bei 72°C für 7 min und dem Herunterkühlen der Proben auf 4°C. Für Klonierungen wurde eine Pwo-DNA-Polymerase verwendet, da diese neben der 5'-3'-Polymeraseaktivität auch eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität, welche Fehler bei der DNA-Synthese minimiert. Anschließend wurde jeweils ein Aliquot von 10 µl auf 1,5%igen Agarosegelen analysiert.

3.3.6.2 Overlap extension PCR nach Ho

Die cDNA des chimären Genprodukts TEL-AML1 wurde mittels *overlap extension* PCR (Ho *et al.*, 1989) aus den beiden cDNAs von TEL und AML1 generiert (s. Abb. 3.3). Hierfür wurden zunächst in zwei separaten Ansätzen PCR-Produkte mit komplementären Enden erzeugt, da in beiden Ansätzen ein Primer verwendet wurde, der mit der Sequenz des jeweiligen Fusionspartners am Austauschlokus überlappte. In einer folgenden PCR wurden die Produkte der ersten beiden Ansätze vereinigt und ermöglichten so eine Hybridisierung an der Fusionsstelle. Die Amplifikation der Chimären erfolgte dabei mit den bereits in den ersten Ansätzen verwendeten äußeren Primern. Für die hier beschriebenen PCR-Ansätze wurde der Phusion® High-Fidelity Mastermix in Gegenwart von jeweils 10 pmol Forward- und Reverse-Primer und 1 µg *template* DNA gemäß Herstellerangaben verwendet.

Das Produkt der zweiten PCR wurde anschließend wie unter 3.3.1 beschrieben mit Hilfe geeigneter Restriktionsendonukleasen in die entsprechenden Expressionsvektoren kloniert und mittels Sequenzierung auf seine Richtigkeit überprüft (vgl. 3.3.7).

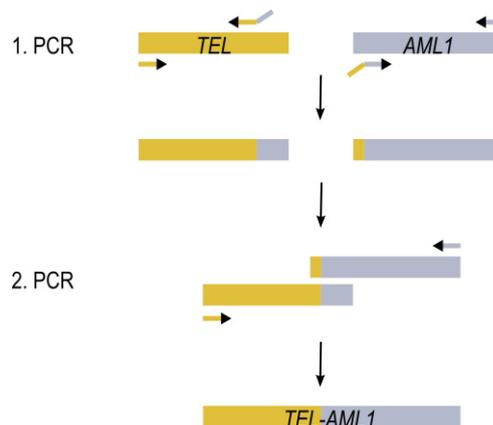


Abb. 3.3 Schematische Darstellung der *overlap extension* PCR nach Ho. In der ersten PCR wurden in zwei separaten Ansätzen PCR-Produkte von TEL (gelb) und AML1 (lila) generiert, denen die gleichen Sequenzbereiche wie in TEL-AML1 fehlten. Durch die überlappende Sequenz am Austauschlokus konnten diese PCR-Produkte in einer zweiten PCR miteinander hybridisieren und ermöglichten so eine Amplifikation der chimären cDNA.

3.3.6.3 LM-PCR und whole genome amplification (WGA)

Die Menge der aus den ChIP-Experimenten aufgereinigten DNA-Fragmente lag zumeist in der Größenordnung von 200-500 ng. Da für eine Hybridisierung auf die entsprechenden murinen bzw. humanen RefSeq Promotor Arrays mindestens 2 µg DNA erforderlich waren, musste diese zuvor amplifiziert werden. Hierfür wurden zunächst zwei Methoden - LM-PCR und *whole genome amplification* - hinsichtlich ihrer Tendenz zu ungleichmäßiger Amplifikation miteinander verglichen. Die Durchführung der Ligationsvermittelten PCR (*ligation-mediated PCR*, LM-PCR) erfolgte im Wesentlichen wie in Lee *et al.*, 2006 beschrieben. Das *Whole Genome Amplification Kit 2* (Sigma) wurde gemäß Herstellerangaben verwendet.

3.3.6.4 RT-PCR

Für die Umschreibung in cDNA wurde von Zell-Linien jeweils 1 µg, im Fall von Patientenmaterial 0,2-0,5 µg Gesamt-RNA eingesetzt und das *QuantiTect Reverse Transcription Kit* (Qiagen) nach Herstellerangaben verwendet. Nach Inaktivierung der Reversen Transkriptase durch Inkubation bei 95°C für 3 min wurde die cDNA entweder direkt in quantitative PCR-Ansätze eingesetzt oder bei -20°C gelagert.

3.3.6.5 Quantitative PCR und Auswertung

Sowohl der Nachweis differentiell exprimierter Gene als auch die Kontrolle der spezifischen Anreicherung bestimmter Promotorbereiche in den Eluatn der ChIP-Experimente erfolgte mit Hilfe der quantitativen PCR. Von jeder Probe wurden in jeder quantitativen PCR Duplikate gemessen. Für die Analyse differentiell exprimierter Gene wurden kommerziell erhältliche TaqMan® Genexpressions-Assays in Kombination mit einem TaqMan® Genexpression Mastermix (Applied Biosystems) gemäß Herstellerangaben verwendet. Die Kontrolle der ChIP-Experimente erfolgte mit eigens entworfenen Primern (MWG) in Kombination mit einem SYBR Green oder Power SYBR Green Mastermix (Applied Biosystems). Die hierfür verwendeten Primer wurden anhand des Promotorbereichs des bereits für TEL-AML1 beschriebenen Zielgens *Gzmb* entworfen, welcher in zwei Regionen unterteilt wurde, um die Amplikongröße für die quantitative PCR zu reduzieren. Bevor die beiden Primerpaare *Gzmb1* und *Gzmb2* für die Kontrolle der ChIP-Experimente eingesetzt werden konnten, wurden sie zunächst hinsichtlich ihrer Amplifikationseffizienz (AE) überprüft. Diese sollte idealerweise bei 1 (entspricht 100%) liegen und wurde mit Hilfe einer logarithmischen Verdünnungsreihe über 3 log-Stufen und der folgenden Gleichung berechnet:

$$AE = 10^{(-1/\text{Steigung})} - 1,$$

wobei mit ‚Steigung‘ die Steigung der Ausgleichsgeraden in der Auftragung der ermittelten Ct-Werte gegen den Logarithmus der eingesetzten DNA-Konzentration gemeint ist.

Die Auswertung der Genexpressions Assays erfolgte durch Normalisierung der gemessenen Ct-Werte mit Hilfe einer endogenen Kontrolle (GAPDH):

$$\Delta Ct = Ct (\text{Probe}) - Ct (\text{endogene Kontrolle}).$$

Die so erhaltenen ΔCt -Werte wurden zudem auf eine gewünschte Vergleichsgröße, den so genannten Kalibrator, bezogen. Im Fall der Patientenproben war dies die Gesundheitskontrolle, bei den murinen oder humanen Zell-Linien die jeweiligen Kontroll- oder Wildtypzellen:

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct} (\text{Probe}) - \Delta\text{Ct} (\text{Kalibrator}).$$

In den graphischen Darstellungen der Ergebnisse der Genexpressionsanalysen ist das Ergebnis dieser Berechnungen, die „relative Expression“, als $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ dargestellt.

Für den Nachweis der spezifischen Anreicherung bestimmter Promotorbereiche in den ChIP-Proben wurde mit Hilfe der in der quantitativen PCR gemessenen Ct-Werte die relative Anreicherung als $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ wie folgt berechnet:

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct} (\text{ChIP}) - \text{Ct} (\text{input})$$

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct} (\text{ChIP-AK}) - \Delta\text{Ct} (\text{neg. ctrl. IgG}).$$

3.3.7 Sequenzierung

Alle verwendeten bzw. klonierten Plasmide wurden mittels Sequenzierung auf die Richtigkeit ihrer Sequenz überprüft. Hierfür wurden 150 ng DNA in Gegenwart von 10 pmol Primer und 8 μl Big Dye[®] Terminator v1.1 Ready Reaction Mix (Applied Biosystems) in einem Gesamtvolumen von 20 μl für 26 Zyklen unter folgenden Bedingungen sequenziert: 10 s 96°C, 5 s 50°C, 4 min 60°C. Anschließend wurden die Ansätze bis zur Aufreinigung auf 4°C gelagert. Um nicht eingebaute Dye-Terminatoren zu entfernen wurden die Sequenzierungsansätze über DyeEx 2.0 Säulen (Qiagen) aufgereinigt und anschließend im Verhältnis 1:1 mit Hi-Di[™] Formamid (Applied Biosystems) gemischt. Die Kapillarelektrophorese erfolgte in einem 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) unter Verwendung eines 36 cm *Capillary Arrays* und des Performance-optimierten Polymers POP-7[™] (Applied Biosystems). Die Auswertung der Sequenzierungen erfolgte mit Hilfe der Sequencer 4.9 Software (Gene Codes Cooperation; Ann Arbor, USA).

3.4 Proteinanalytische Methoden

3.4.1 Kontrolle der induzierten TEL/AML1-Expression mittels Durchflusszytometrie

Die erfolgreiche Induktion der TEL-AML1-Expression wurde anhand der V5-positiven Zellen im Durchflusszytometer nachgewiesen. Hierfür wurden jeweils 500.000 Zellen in Röhrchen pelletiert und mit Cytofix/Cytoperm[™] (Becton Dickinson) nach Herstellerangaben fixiert und permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit BD Perm/Wash Buffer (Becton Dickinson) gewaschen und in 50 μl BD Perm/Wash Buffer resuspendiert. Für die Färbung wurden die Zellen 30 min mit 0,1 μg FITC-konjugiertem anti-V5-Antikörper (abcam) bzw. FITC-konjugierter Isotyp-Kontrolle (Santa Cruz) im Dunkeln bei 4°C inkubiert. Nach erneutem zwei-maligen Waschen wurden die Zellen in 500 μl PBS mit 1% BSA resuspendiert und im Durchflusszytometer hinsichtlich der FITC-positiven Zellen gemessen. Als weitere Negativkontrolle dienten fixierte, permeabilisierte aber nicht gefärbte Zellen.

3.4.2 Aufreinigung und Charakterisierung des spezifischen TEL-AML1-Antikörpers

Der in dieser Arbeit verwendete TEL-AML1 spezifische Antikörper wurde in Kooperation mit Elisabeth Kremmer (Helmholtz Zentrum München) generiert. Dieser Antikörper ist gegen eine Folge von 12 Aminosäuren gerichtet, die zu beiden Seiten die Fusionsstelle von TEL und AML1 flankieren (s. Abb. 3.4).

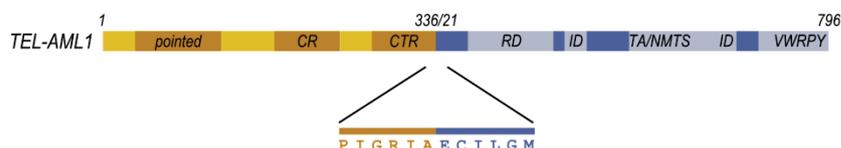


Abbildung 3.4 Der TEL-AML1 spezifische Antikörper wurde gegen die Aminosäuresequenz „PIGR^IAECILGM“ gerichtet generiert, welche die Fusionsstelle des TEL-AML1 flankiert.

Die Herstellung des monoklonalen Antikörpers durch Immunisierung von Ratten und anschließende Hybridomazellgenerierung erfolgte nach Standardmethoden in der „Serviceeinheit Monoklonale Antikörper“ des Helmholtz Zentrums in München. Der in dieser Arbeit verwendete Klon „TEL 6F2“ wurde anhand seiner spezifischen Reaktivität gegenüber dem Peptid ausgewählt und gehörte zur Subklasse IgG2a.

3.4.2.1 Aufreinigung über ProteinG Säulen

Die Aufreinigung des spezifischen TEL-AML1 Antikörpers aus dem Hybridoma-Überstand erfolgte unter Verwendung von Vivapure ProteinG Maxiprep Zentrifugensäulen (Sartorius) und der im Kit enthaltenen Puffer nach Herstellerangaben. Anschließend wurde das Volumen der antikörperhaltigen Eluate zusätzlich durch Ultrafiltration (MWco 10 kDa) verringert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration in diesen Ultrafiltraten erfolgte mittels Bradford Assay (s. 3.4.2.2). Zudem wurde die Funktionalität und Spezifität des aufgereinigten Antikörpers sowohl durchflusscytometrisch als auch im Western Blot durch Tritration und Vergleich mit einem etablierten, kommerziell erhältlichen AML1-spezifischen Antikörpers überprüft (s. 3.4.2.3).

3.4.2.2 Konzentrationsbestimmung nach Bradford

Bei der Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen nach Bradford wird ausgenutzt, dass der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine bindet, wodurch sich in saurer Lösung sein Absorptionsmaximum von 465 nm (ungebunden) zu 595 nm (mit gebundenem Protein) verschiebt. Da dies quantitativ erfolgt, kann durch die Messung mehrerer Lösungen bekannter Proteinkonzentration eine Eichgerade erstellt werden, die wiederum die Konzentrationsbestimmung unbekannter Lösungen erlaubt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration in den Ultrafiltraten des TEL-AML1 Antikörpers erfolgte mit Hilfe des *Quick Start Bradford Protein Assays* (Biorad). Zunächst wurde hierfür eine Eichgerade mit sieben Standard-BSA-Lösungen, gemessen in Duplikaten, von 125 bis 2.000 µg·ml⁻¹ erstellt. Dazu wurden jeweils 20 µl der Eichlösungen mit 1.000 µl Bradfordreagenz vermischt und für 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die anschließende spektralphotometrische Messung erfolgte bei 595 nm und die resultierende Eichgerade hatte einen Korrelationskoeffizienten von 0,98. Die beiden Ultrafiltrate wurden auf die gleiche Weise behandelt und die Konzentrationen anhand der Eichgerade bestimmt.

3.4.2.3 Spezifitätstest mittels Durchflussscytometrie und Western Blotting

Nach der Aufreinigung des TEL-AML1-spezifischen Antikörpers aus dem Kulturüberstand der Rattenhybridomazellen wurde die Funktionalität und Spezifität des Antikörpers zum einen durchflussscytometrisch im Vergleich zu einem V5-spezifischen Antikörper bestimmt. Zum anderen wurde der Antikörper im Western Blot titriert und mit einer etablierten Menge eines kommerziell erhältlichen AML1-spezifischen Antikörpers verglichen. Für den durchflussscytometrischen Nachweis wurden die Zellen wie unter 3.4.1 beschrieben mit V5-spezifischem Antikörper bzw. der Isotypkontrolle gefärbt. Der Nachweis mit Hilfe des TEL-AML1 spezifischen Antikörpers erfolgte auf gleiche Weise, allerdings wurden hierfür 0,5 µg Antikörper eingesetzt und für 30 min bei 4°C mit den fixierten und permeabilisierten Zellen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit Perm/Wash Buffer gewaschen und mit dem sekundären FITC-konjugierten Antikörper erneut 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Mit der entsprechenden Isotyp-Kontrolle wurde auf die gleiche Weise verfahren.

3.4.3 Herstellung von Proteinextrakten aus murinen und humanen Zellen

Für die Herstellung von Zellextrakten zur Proteinanalyse mittels SDS-PAGE wurden die Zellen gezählt und in gewünschter Anzahl durch Zentrifugation bei 300 g und 4°C für 5 min pelletiert. Die Zellpellets wurden mit kalter phosphatgepufferter Saline in Anwesenheit von Proteaseinhibitoren gewaschen und anschließend zu 50.000 Zellen pro µl RIPA-Puffer (enthielt ebenfalls Proteaseinhibitoren) resuspendiert. Nach mindestens 30 minütiger Inkubation auf Eis wurden die Extrakte für 10 min bei 10.000 g und 4°C zentrifugiert und die Überstände in neue Reaktionsgefäße überführt. Die kurzzeitige Lagerung der Proteinextrakte erfolgte bei -20°C, für längere Zeiträume wurden die Proben bei -80°C gelagert.

3.4.4 Diskontinuierliche eindimensionale SDS-PAGE

Die Auftrennung der Proteine in den unter 3.4.3 beschriebenen Zellextrakten erfolgte mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). Die hierfür verwendeten SDS-PAA-Gele bestanden je nach Bedarf aus einem 6 bis 10%igen Trenngel und einem überschichteten 4%igen Sammelgel. Sie wurden am Vortag gegossen und zur vollständigen Polymerisation über Nacht bei 4°C in feuchten Tüchern gelagert. Die gewünschte Menge Extrakt wurde mit SDS-Ladepuffer und DTT in einer Endkonzentration von 50 mM versetzt und die Proteine 5 min bei 95°C denaturiert. Anschließend wurden die Extrakte bis zur Gelbeladung auf Eis gelagert. Die Gelelektrophoresen erfolgten in SDS-Laufpuffer (s. 2.2.2.3) bei 100-150 V, bis der Blaumarker aus dem Gel herausgelaufen war. Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine mittels Western Blotting (s. 3.4.5) auf PVDF-Membranen transferiert.

3.4.5 Western Blotting

Der Nachweis einzelner Proteine in mehr oder weniger komplexen Probengemischen erfolgte mittels immunologischer Detektion mit Hilfe spezifischer Antikörper. Hierfür wurden die mittels SDS-PAGE (s. 3.4.4) aufgetrennten Zellextrakte unter Verwendung einer sogenannten „Tank Blot“ Kammer (Biorad) elektrophoretisch auf zuvor mit Methanol aktivierte PVDF-Membranen übertragen. Der

Transfer erfolgte mittels Elektrophorese in Transferpuffer (s. 2.2.2.3) bei 70 V, bis der gefärbte Größenstandard vollständig aus dem Gel auf die Membran transferiert worden war. Nach dem Blockieren freier Bindestellen mit 5% Milchpulver in phosphatgepufferter Saline und 0,1% Tween-20 (PBST), erfolgte die Immundetektion der Proteine durch Inkubation mit primärem Antikörper (nach Herstellerangaben in PBST verdünnt) für 1 bis 2 Stunden bei Raumtemperatur und gleichmäßiger Durchmischung. War eine Inkubation für längere Zeiträume erforderlich, wurde sie stets bei 4°C durchgeführt. Die einstündige Inkubation mit den entsprechenden sekundären Antikörpern (nach Herstellerangaben in PBST verdünnt) erfolgte ebenfalls bei Raumtemperatur und gleichmäßiger Durchmischung. Zwischen und nach den einzelnen Antikörperinkubationen wurde die Membran jeweils mindestens dreimal für 10 Minuten mit PBST gewaschen. Die Proteinbanden wurden mit Hilfe der an die sekundären Antikörper gekoppelten Meerrettich Peroxidase und durch die Verwendung des *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate* (Thermo Fisher) als Chemiluminiszenzsignale im LAS 3000 Mini (Fuji) detektiert. Falls erforderlich wurde die aufgetragene Proteinmenge, der gleichmäßige Membrantransfer oder der Hintergrund spezifischer Immunpräzipitationen durch Färbung der Membranen mit Amidoschwarz (Sigma) und anschließende Entfärbung nach Herstellerangaben nachgewiesen.

3.4.6 Massenspektrometrische Analyse der SILAC-Proben

Die gefrorenen Zellpellets wurden langsam auf Eis aufgetaut und in 300 µl RIPA-Puffer mit Proteaseinhibitoren (Roche) resuspendiert. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis wurde der Zellschrott durch Zentrifugation bei 17.000 g und 4°C für 15 min sedimentiert und die Überstände in neue Reaktionsgefäße überführt. Die Lysate aller drei experimentellen Ansätze wurden im Verhältnis 1:1:1 gemischt und auf einem eindimensionalen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das Gel wurde mit einem MS-kompatiblen kolloidalen Coomassie Farbstoff (NOVEX® Colloidal Blue Staining Kit, Invitrogen) nach Herstellerangaben gefärbt und anschließend in gleichmäßige Stücke geschnitten, welche ungefähr vergleichbare Proteinmengen enthalten sollten. Die Gelstücke wurden einem Trypsinverdau unterzogen, welcher nach einem für die Massenspektrometrie geeigneten *in-gel digest* Protokoll (Shevchenko *et al.*, 2006) durchgeführt wurde. Hierfür wurden die Gelstücke zunächst zweimal für 20 min mit 50 mM ABC/50% Ethanol gewaschen und anschließend zur Dehydratisierung in absolutem Ethanol für 10 min inkubiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die Proteine durch 45 minütige Inkubation mit 10 mM DTT in 50 mM ABC bei 56°C reduziert. Freie Sulfhydrylgruppen wurden durch 30 minütige Inkubation in 55 mM IAA bei Raumtemperatur blockiert. Die Überstände wurden jeweils verworfen und die Gelstücke einmal mit 50 mM ABC gewaschen. Anschließend wurden die Gelstücke noch dreimal dehydratisiert und dazwischen jeweils mit 50 mM ABC gewaschen. Nach dem letzten Dehydratisierungsschritt wurde der restliche Ethanol durch Vakuumzentrifugation entfernt und die Proteine über Nacht mit 12,5 ng·µl⁻¹ Trypsin in 50 mM ABC/50% Ethanol bei 37°C verdaut. Die Extraktion der verdauten Proteine erfolgte schrittweise (Rappsilber *et al.*, 2003), wobei die von den Gelstücken abgenommenen Überstände jeweils in einem neuen Reaktionsgefäß vereinigt wurden. Zunächst wurden die Gelstücke 30 min mit 100 µl 30% Acetonitril/3% TFA inkubiert, anschließend mit 100 µl 70% Acetonitril und zuletzt mit 100 µl 100% Acetonitril. Die gesammelten Überstände wurden mittels Vakuumzentrifugation auf ca. 80 µl Gesamtvolumen eingengt und währenddessen die C18 empore *extraction disks* (3M) für die

Aufreinigung der Proben wie folgt vorbereitet: die Filter wurden nach Zugabe von je 20 µl Methanol, 20 µl 1% TFA/5% Acetonitril, 20 µl Puffer B und zuletzt 20 µl Puffer A jeweils 2 min bei 2.600 rpm zentrifugiert. Die eingeeengten Proben wurden 1:1 mit 1% TFA/5% Acetonitril gemischt, auf die vorbereiteten Filter pipettiert und 4 min bei 2.600 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden die Filter mit 20 µl Puffer A gewaschen und bis zur Messung bei 4°C gelagert. Die massenspektrometrische Analyse der Peptide erfolgte mit Hilfe eines LTQ Orbitrap (Thermo Fisher Scientific) gekoppelt an eine Agilent 1200 HPLC-Anlage und wurde von Marcus Krüger (MPI für Herz- und Lungenforschung, Bad Nauheim) durchgeführt. Die Aufarbeitung der Daten erfolgte im Wesentlichen wie bereits beschrieben (Krüger & Mann, 2006; Ong & Mann, 2006). Letztendlich wurden die identifizierten und quantifizierten Proteine, die in den einzelnen experimentellen Ansätzen gemessen wurden, in einer Excel-Datei zusammengefasst und zur weiteren Auswertung bereitgestellt. Es wurden lediglich Proteine betrachtet, die in den Kontrollen eine nahezu identische Expression aufwiesen. Nach Rücksprache mit Marcus Krüger wurde ein Protein als differentiell exprimiert angesehen wenn seine Expression in den TEL-AML1 exprimierenden Zellen mindestens 15% von der Expression in den Kontrollen abwich.

3.5 Expressionsanalysen

3.5.1 Genexpressionsanalyse

Die hierfür verwendete RNA der Duplikate wurde entweder aus in TRIzol® (Invitrogen) lysierten Zellen oder mittels RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt und in Nuklease-freiem Wasser mit RNase Out (Invitrogen) resuspendiert bzw. eluiert. Sowohl die Integrität als auch die Konzentration der RNA wurde mittels RNA 6000 Nano Kit in einem 2100 Bioanalyzer (Agilent Biotechnologies Inc) bestimmt. Im Fall der murinen induzierbaren Zell-Linien wurde das Labelling und die Fragmentierung der RNA für die anschließende Genexpressionsanalyse mit Hilfe des GeneChip 3' IVT Express Kits (Affymetrix) gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Die Hybridisierung der Arrays (GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array, Affymetrix) und das Scannen erfolgten im BMFZ (Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum, Heinrich-Heine-University Düsseldorf). Die Genexpressionsanalyse der Triplikate der humanen Zell-Linien und der Patientenzellen erfolgte als Service der Firma Miltenyi (Agilent 8x60K DNA Microarrays).

3.5.2 mikro RNA Expressionsanalyse

Im Rahmen einer Kooperation mit Pablo Landgraf wurden von den Duplikaten der murinen Zellen mikroRNA Expressionsprofile erstellt. Hierfür wurde die gesamte RNA der TEL-AML1 exprimierenden Zellen sowie der Mifepriston-Kontrolle wie unter 3.3.3 beschrieben isoliert und wie in Daschkey *et al.* (2012; *submitted*) beschrieben weiter verwendet.

3.6 Bioinformatische Datenauswertung und -analyse

3.6.1 Auswertung der Rohdaten aus ChIP, Genexpressions- und Proteomanalyse

Die Auswertung der im Rahmen dieser Arbeit generierten Daten erfolgte in Kooperation mit Sebastian Ginzel und Ralf Thiele (Hochschule Bonn-Rhein-Sieg, Sankt Augustin) im Rahmen einer bioinformatischen Masterarbeit mit dem Titel „Integrierte Analyse der Proteinbiosynthese auf heterogenen Experimentplattformen am Beispiel des Transgens TEL/AML1“ (Sebastian Ginzel, 2010).

3.6.1.1 Auswertung der ChIP-Rohdaten

Die ChIP-on-Chip Analyse wurde von NimbleGene (Berlin) durchgeführt. Zur statistischen Auswertung wurde das ebenfalls von NimbleGene zur Verfügung gestellte Softwarewerkzeug NimbleScan benutzt. Dieses berechnet zur Abschätzung der *false discovery rate* (FDR) einen empirischen p-Wert durch Permutation der Daten. Für die endogenen TEL- bzw. AML- und die TEL-AML-ChIP Experimente wurden unterschiedliche Parameter zur Identifikation der signifikanten Bindestellen verwendet. Die Identifikation der TEL-AML Bindestellen erfolgte über den Abgleich zwischen den Ergebnissen der beiden TEL-AML1-ChIP (BA/F3^{TA+} + Mif) mit den entsprechenden Kontrollen (BA/F3^{TA+} + Mif). Für diesen Abgleich wurden nur Gene betrachtet deren Bindestellen eine FDR kleiner oder gleich 0,05 besaßen. Von diesem paarweisen Vergleich wurden zwei Replikate erstellt und ein Gen galt dann als Zielgen von TEL-AML, wenn es in mindestens einem der beiden Replikate als signifikantes TEL-AML Zielgen identifiziert wurde. Zur Ermittlung der endogenen Bindestellen von TEL und AML wurden drei Replikate angefertigt. Für die weitere Analyse wurden hier nur die Bindestellen betrachtet, die mindestens eine FDR kleiner 0,2 besaßen und in 2 von 3 Experimenten dieses Signifikanzmaß zeigten. Die Annotation der Peaks erfolgte auf Basis der von NimbleGene gelieferten Annotation

3.6.1.2 Auswertung der Genexpressions-Rohdaten

Die Genexpressionsanalyse der murinen Zellen erfolgte wie bereits erwähnt mit Hilfe von GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Microarrays (Affymetrix). Zur Analyse wurden die Daten mit Hilfe des GCRMA-Algorithmus (Zhijian & Irizarry, 2004) normalisiert. Signifikante Unterschiede in der Expression wurden mit Bioconductor (Gentleman *et al.*, 2004) und dem darin verfügbaren Limma Paket (<http://bioconductor.org/help/course-materials/2005/BioC2005/labs/lab01/printing/6.appendix.pdf>) ausgewertet. Limma eignete sich in diesem Fall besser als einfache t-Test Statistiken, da die Grundgesamtheit für jede Probe nur sehr klein ist (Jeffery *et al.*, 2006). Die Proben mit einem P-Wert kleiner oder gleich 0,05 und einem absoluten *fold change* größer 1,5 wurden als signifikant reguliert in die weitere Analyse einbezogen. Die Annotation der Daten erfolgt über das Bioconductorpaket mouse4302.db (Version 2.6.3).

Die Genexpressionsanalysen der humanen Zell-Linien, sowie die Expressionsprofile der TEL-AML-positiven Patienten wurden mit Hilfe einfarbiger Agilent Whole Human Genome Oligo Microarrays durchgeführt. Diese Arrays wurden mit ihrem Median normalisiert und die statistische Auswertung mit Hilfe der Rosetta Resolver Software® durchgeführt. Die bioinformatische Analyse und Annotation der Messungen wurden durch Miltenyi Biotech durchgeführt, die Filterung wurde auf die Ergebnisse dieser

Analyse angewendet. Als Basis für die weitere Auswertung dienten nur differentiell exprimierte Gene mit einem P-Wert kleiner oder gleich 0,05 und einem absoluten *fold change* größer 1,5.

3.6.2 Kombinierte Datenanalyse

Um die unterschiedlichen Datensätze miteinander vergleichen zu können, mussten sie in Hinblick auf die verwendeten Genbezeichner normalisiert werden. Für die mit Hilfe der drei verschiedenen *screening* Methoden detektierten Gene/Proteine war die jeweilige Identnummer (*GeneID*) zwar bekannt. Dieser Genbezeichner eignete sich jedoch schlecht für die Untersuchung von Gemeinsamkeiten, da mehrere *GeneIDs* das gleiche Gen beschreiben könnten und zudem nicht persistent über unterschiedliche Annotationszeitpunkte sind. Um eine reproduzierbare Normalisierung zu gewährleisten wurden daher alle *GeneIDs* mit Hilfe von BioMart (<http://www.ebi.ac.uk/biomart>; Durinck *et al.*, 2005) auf gemeinsame Ensembl Genbezeichner abgebildet. Für humane und murine Bezeichner waren außerdem Informationen über paraloge Zusammenhänge zwischen den Genen der unterschiedlichen Spezies in dieser Datenbank vorhanden. Dies erlaubte den Abgleich der Ergebnisse aus den murinen und humanen Zelllinien.

3.6.3 Datenanalyse mit Hilfe von DAVID (*database for annotation, visualization and integrated discovery*)

Die im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Gene kodieren Proteine mit sehr unterschiedlichen Funktionen. Eine Möglichkeit, diese Gene bzw. Proteine hinsichtlich ihrer Beteiligung an bestimmten biologischen Prozessen zu untersuchen, bietet die Betrachtung der assoziierten GO-Termini (GO: *gene ontology*). Dies kann z. B. durch die Verwendung bioinformatischer Hilfsprogramme bzw. Datenbanken wie DAVID (*the database for annotation, visualization and integrated discovery*) erfolgen, welche zum einen Genen aus umfassenden Listen die entsprechenden GO-Annotationen zuordnen und zum anderen in der Lage sind, die statistisch überrepräsentierten GO-Termini zu bestimmen (Huang *et al.*, 2009; <http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>). Hierfür wurden die Gene bzw. Proteine aus den entsprechenden Schnittmengen entweder zunächst nach Regulation getrennt oder gemeinsam mit Hilfe des „*Functional Annotation Tools*“ analysiert und anschließend die angereicherten biologischen Prozesse anhand von *GOTerm_bp_FAT* annotiert. Dieses GO-Term Subset wurde eigens für die DAVID Datenbank generiert und beinhaltet einen Filter, der vermeiden soll, dass GO-Termini mit vielen Unterkategorien spezifischere GO-Termini übervorteilen. Die resultierenden Tabellen wurden in Excel importiert und doppelte Einträge sowie Termini mit einem P-Wert größer 0,05 entfernt.

4 ERGEBNISSE

Die reziproke Translokation t(12;21) führt zur Fusion zweier Transkriptionsfaktoren, TEL und AML1, welche beide u. a. für die Ausbildung und Etablierung der definitiven Hämatopoese im Embryo essentiell sind. Während für AML1 bereits diverse Zielgene beschrieben wurden (vgl. 1.3.5), sind von TEL regulierte Gene bislang nahezu unbekannt. Im chimären Transkriptionsfaktor TEL-AML1 ist lediglich die DNA-Bindedomäne des AML1 und nicht die des TEL enthalten, so dass die Vermutung nahe liegt, dass TEL-AML1 die gleichen Zielgene reguliert wie AML1, wenn auch - bedingt durch den TEL-Anteil - eventuell auf andere Weise. Da die Translokation t(12;21) alleine nicht transformierend wirkt, sind sekundäre Veränderungen in den Zellen für die Leukämogenese erforderlich, die vermutlich durch die Expression von TEL-AML1 in irgendeiner Form begünstigt werden. Daher sollten in der vorliegenden Arbeit Gene identifiziert werden, die spezifisch durch TEL-AML1 reguliert werden und deren veränderte Expression eine Transformation der Zellen begünstigen könnte. Hierfür wurden Chromatin-Immunpräzipitationen mit Hilfe eines eigens für diesen Zweck generierten TEL-AML1 spezifischen Antikörpers in einem induzierbaren murinen Zellsystem durchgeführt. Eine gleichzeitige Genexpressions- und Proteomanalyse sollte die im Vergleich zu den Kontrollen differentiell exprimierten Gene/Proteine liefern, deren funktionelle Annotation wiederum einen Überblick über die betroffenen biologischen Prozesse erlauben sollte. Der TEL-AML1 spezifische Antikörper wurde generiert, um ihn im Anschluss an dieses Projekt außerdem für Untersuchungen in der TEL-AML1-positiven Zell-Linie REH bzw. in Patientenmaterial einzusetzen. Die einzigartigen TEL-AML1 Zielgene wurden durch einen Vergleich mit Chromatin-Immunpräzipitationen mit den endogenen Proteinen TEL und AML1 bestimmt. Um die Relevanz der mit Hilfe des murinen Zellsystems identifizierten TEL-AML1 Zielgene im Menschen einzuschätzen, wurden die Ergebnisse außerdem mit Genexpressionsanalysen TEL-AML1-positiver Patientenproben verglichen. Zudem wurden stabil exprimierende humane Zell-Linien für TEL, AML1 und TEL-AML1 generiert und ebenfalls für Chromatin-Immunpräzipitationen und Genexpressionsanalysen eingesetzt.

4.1 Das murine Zellsystem

4.1.1 Nachweis der TEL-AML1 Expression und Optimierung der Induktion

Das verwendete murine Zellsystem (vgl. 2.4.2.1 und 3.2.4) basierte auf der IL-3-abhängigen Prä-B-Zell-Linie BA/F3 (ACC 300; DSMZ, Heidelberg) und wurde freundlicherweise von Anthony Ford und Mel Greaves zur Verfügung gestellt. Die Zell-Linie mit der Bezeichnung „BA/F3^{TA+}“ wurde mit einem pGene/V5-His Expressionskonstrukt und dem regulierenden Plasmid pSwitch (beide im GeneSwitch™ System, Invitrogen) kotransfiziert und auf stabil exprimierende Klone selektioniert. Das pGene/V5-His Konstrukt enthält die humane TEL-AML1 cDNA unter Kontrolle eines mit Mifepriston-induzierbaren Promotors. Die dazugehörige Kontrollzell-Linie „BA/F3^{TA-}“ wurde mit dem pSwitch Plasmid transfiziert und ebenfalls auf stabil exprimierende Klone selektioniert.

Das ursprünglich in London etablierte Protokoll zur erfolgreichen Induktion der TEL-AML1 Expression in mehr als 80% der Zellen sah eine Behandlung der Zellen mit 20 pM Mifepriston für 72 Stunden vor. Da dies unter den gegebenen Laborbedingungen nicht zu einem vergleichbaren Ergebnis führte, wurden zunächst unterschiedliche Mifepriston-Konzentrationen für die Induktion getestet (s. u. 4.1.1.1). Anschließend wurde zudem die Dauer der Behandlung (s. u. 4.1.1.2) und die Ausgangszellzahl (s. u. 4.1.1.3) hinsichtlich der Anzahl vitaler Zellen optimiert. Als Nachweis für die erfolgreiche Induktion der TEL-AML1 Expression diente die unter Verwendung eines V5-tag spezifischen FITC-konjugierten Antikörpers in fixierten und permeabilisierten Zellen mittels durchflusscytometrischer Analyse gemessene Anzahl V5-positiver Zellen (vgl. 3.4.1).

4.1.1.1 Bestimmung der optimalen Mifepriston-Konzentration

Für die Bestimmung der optimalen Mifepriston-Konzentration wurden zunächst 27,5 bis 37,5 pM in Ansätzen mit jeweils 1 Mio. Zellen getestet. Anschließend wurde sowohl der Anteil V5-positiver Zellen als auch die Anzahl vitaler Zellen bestimmt (s. Abb. 4.1).

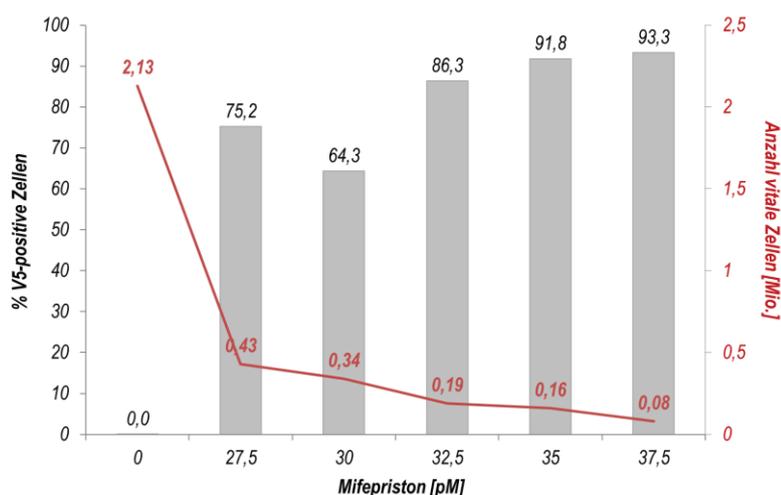


Abbildung 4.1 Für die Ermittlung der optimalen Mifepriston Konzentration zur Induktion der TEL-AML1 Expression wurden jeweils 1 Mio. Zellen mit steigenden Mifepriston Konzentrationen (0 - 27,5 - 30 - 32,5 – 35 und 37,5 pM) für 72 Stunden inkubiert und anschließend der Anteil V5-positiver Zellen (dargestellt als graue Balken; y-Achse links) durchflusscytometrisch bestimmt. Außerdem wurde die Anzahl vitaler Zellen über Auszählung der lebenden Zellen in einer Neubauer-Zählkammer bei gleichzeitiger Ausschlussfärbung mit Trypanblau bestimmt (dargestellt in rot; y-Achse rechts).

Zwar konnte mit 32,5 pM Mifepriston die TEL-AML1 Expression in über 80% der Zellen induziert werden, allerdings konnten nur etwa 20% der eingesetzten Zellen nach 72 Stunden lebend geerntet werden. Dieser Ablauf der Induktion war daher für die geplanten Experimente vollkommen ungeeignet und wurde im Folgenden hinsichtlich Dauer der Induktion und eingesetzter Zellzahl weiter optimiert. Die Konzentration von 32,5 pM wurde für die weitere Optimierung ausgewählt, weil sie die niedrigste Konzentration war, bei der eine Induktion der TEL-AML1 Expression in mehr als 80% der Zellen erreicht wurde.

4.1.1.2 Induktionszeitverlauf und Anzahl überlebender Zellen

Das ursprünglich etablierte Protokoll zur Induktion der TEL-AML1 Expression sah eine Behandlung der Zellen mit Mifepriston über 72 Stunden vor. Unter den gegebenen Laborbedingungen führte dies jedoch reproduzierbar zum Tod über der Hälfte der eingesetzten Zellzahl. Um die Dauer der Behandlung hinsichtlich der Anzahl vitaler Zellen zu optimieren wurden daher jeweils 2 Mio. Zellen mit der unter 4.1.1.1 ermittelten optimalen Mifepriston-Konzentration von 32,5 pM für unterschiedlich lange Zeiträume (2 bis 24 Stunden) behandelt. Anschließend wurde sowohl der Anteil V5-positiver Zellen als auch die Anzahl vitaler Zellen bestimmt.

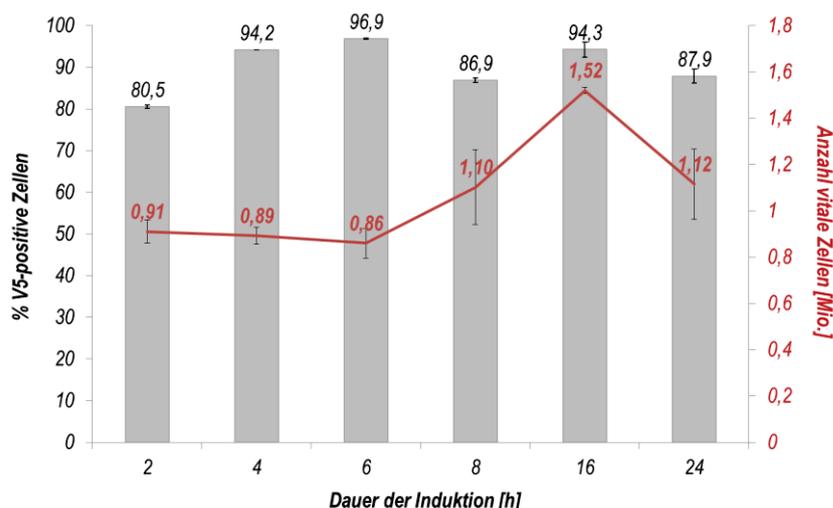


Abbildung 4.2 Die Optimierung Mifepriston-Behandlungsdauer erfolgte, indem die TEL-AML1 Expression mit 32,5 pM Mifepriston in Ansätzen aus jeweils 2 Mio. Zellen induziert und die Zellen nach 2, 4, 6, 8, 16 und 24 Stunden geerntet wurden ($n = 3$; SEM: *standard error from mean*). Anschließend wurde der Anteil V5-positiver Zellen durchflusscytometrisch gemessen (dargestellt als graue Balken; y-Achse links) und die Anzahl vitaler Zellen über Auszählung der lebenden Zellen in einer Neubauer-Zählkammer bei gleichzeitiger Ausschlussfärbung mit Trypanblau bestimmt (dargestellt in rot; y-Achse rechts).

Wie in Abbildung 4.2 dargestellt, waren bereits nach zweistündiger Behandlung mit 32,5 pM Mifepriston ca. 80% der Zellen V5-positiv, d. h. sie exprimierten TEL-AML1. Allerdings war die Zahl der überlebenden Zellen mit etwa 1 Mio. um die Hälfte geringer als die eingesetzte Zellzahl. Ein Optimum aus Anteil an V5-positiven Zellen und Anzahl vitaler Zellen wurde nach 16-stündiger Induktion erreicht. Hier konnten über 90% der Zellen erfolgreich induziert und mit über 1,5 Mio. (entsprechen 75% der eingesetzten Zellen) die meisten lebenden Zellen geerntet werden. Da für die folgenden Experimente allerdings deutlich mehr Zellen benötigt wurden, erfolgte zuletzt die Optimierung der Induktion hinsichtlich der Anzahl vitaler Zellen.

4.1.1.3 Abhängigkeit der Anzahl vitaler Zellen von der Ausgangszellzahl

Für die geplanten Experimente wurde eine möglichst große Anzahl Zellen benötigt, da sowohl die Chromatin-Immünpräzipitationen als auch die Genexpressions- und Proteomicsanalysen jeweils an Zellen eines gemeinsamen Ansatzes durchgeführt werden sollten. Daher war eine weitere Optimierung der Induktion hinsichtlich der Anzahl vitaler Zellen erforderlich. Hierfür wurden unterschiedliche Ausgangszellzahlen (1,5 - 3 - 5 und 7,5 Mio.) mit 32,5 pM Mifepriston für 16 Stunden inkubiert und anschließend sowohl der Anteil V5-positiver Zellen als auch die Anzahl vitaler Zellen bestimmt.

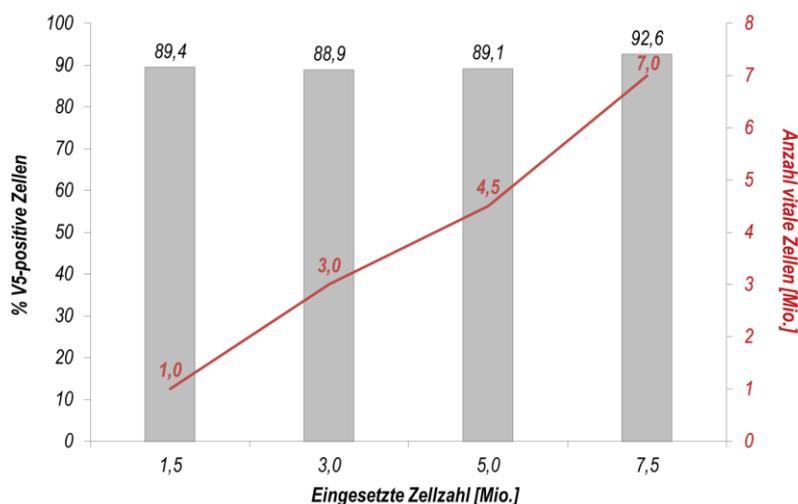


Abbildung 4.3 Für die Ermittlung der Abhängigkeit der Anzahl vitaler Zellen von der Ausgangszellzahl wurde die TEL-AML1 Expression mit 32,5 pM Mifepriston in Ansätzen aus jeweils 1,5 - 3 - 5 und 7,5 Mio. Zellen induziert und die Zellen nach 16 Stunden geerntet. Anschließend wurde der Anteil V5-positiver Zellen durchflusscytometrisch gemessen (dargestellt als graue Balken; y-Achse links) und die Anzahl vitaler Zellen über Auszählung der lebenden Zellen in einer Neubauer-Zählkammer bei gleichzeitiger Ausschlussfärbung mit Trypanblau bestimmt (dargestellt in rot; y-Achse rechts).

Dieser Optimierungsschritt zeigte sehr deutlich, dass eine Erhöhung der Ausgangszellzahl einen positiven Effekt auf die Anzahl vitaler Zellen nach Mifepriston Behandlung hat (s. Abb. 4.3). So konnten Zellzahlen geerntet werden, die annähernd der eingesetzten Zellzahl entsprachen. Außerdem hatte die Erhöhung der Ausgangszellzahl keinen negativen Effekt auf die Induzierbarkeit, da der Anteil V5-positiver Zellen zwischen 88,9 und 92,6% lag und damit als nahezu gleichbleibend angesehen werden konnte. Letztendlich wurden für die eigentlichen Experimente zwischen 5 und 7 Mio. Zellen pro Kulturflasche ausgesät und nach dem optimierten Protokoll für 16 Stunden mit 32,5 pM Mifepriston behandelt. Mit den Kontrollzellen BA/F3^{TA-} wurde auf die gleiche Weise verfahren.

4.2 Der TEL-AML1-spezifische Antikörper

In Kooperation mit Elisabeth Kremmer (Helmholtz-Zentrum München) wurde ein TEL-AML1 Antikörper generiert, der gegen das Epitop der Fusionsstelle zwischen TEL und AML1 gerichtet ist (s. Abb. 4.4, vgl. 3.4.2).

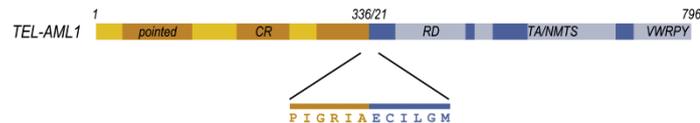


Abbildung 4.4 Der TEL-AML1 Antikörper wurde gegen die Aminosäuresequenz „PIGR I A E C I L G M“ gerichtet generiert, welche die Fusionsstelle des TEL-AML1 flankiert.

Nach Aufreinigung des Hybridomazellüberstands über ProteinG-Säulen und anschließender Ultrafiltration (vgl. 3.4.2.1) wurde die Proteinkonzentration des antikörperhaltigen Filtrats mittels Bradfordassay bestimmt (vgl. 3.4.2.2). Der aufgereinigte Antikörper wurde zunächst im Vergleich zu einem etablierten AML1-spezifischen Antikörper an TEL-AML1 überexprimierenden Zellen (vgl. 3.4.2.3) mittels Western Blot titriert (s. Abb. 4.5). Hierbei zeigte sich, dass vergleichbare Mengen beider Antikörper einen spezifischen Nachweis der entsprechenden Proteine erlaubten. Während der TEL-AML1-spezifische Antikörper lediglich das chimäre Protein, aber keines der endogenen Wildtypproteine detektierte, konnten mit dem AML1-spezifischen Antikörper wie erwartet sowohl endogenes AML1 als auch TEL-AML1 nachgewiesen werden.

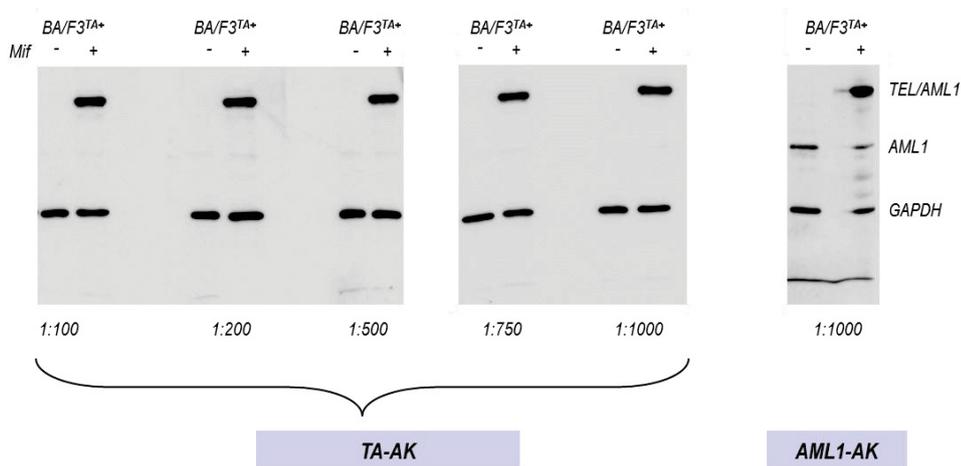


Abbildung 4.5 Für den Nachweis der Spezifität des TEL-AML1 Antikörpers wurden gleiche Mengen Zell-Lysat der murinen Zell-Linie BA/F3^{TA+} nicht-induziert (– Mif) und nach Induktion der TEL-AML1 Expression mit Mifepiston (+ Mif) in SDS-Gelen aufgetrennt und anschließend auf PVDF-Membranen gebロットet. Die Detektion erfolgte mit unterschiedlichen Verdünnungen des TEL-AML1 Antikörpers (TA-AK; 1:100 bis 1:1000) und wurde mit einer etablierten Menge AML1-spezifischen Antikörpers (AML1-AK, 1:1000; rechts) verglichen. Als Kontrolle für die gleichmäßige Beladung des Gels mit Proteinen diente der gleichzeitige Nachweis von GAPDH.

Die Funktionalität und Spezifität des TEL-AML1 Antikörpers für das denaturierte bzw. das native Protein wurden außerdem im Vergleich zu einem V5-tag spezifischen Antikörper sowohl im Western Blot als auch durchflusszytometrisch bestimmt (vgl. 3.4.2.3). Wie in Abbildung 4.6 zu sehen, entspricht der TEL-AML1 Antikörper in beiden Nachweismethoden der Funktionalität und Spezifität des V5-tag Antikörpers, da beide Antikörper spezifisch nur das chimäre Fusionsprotein detektierten.

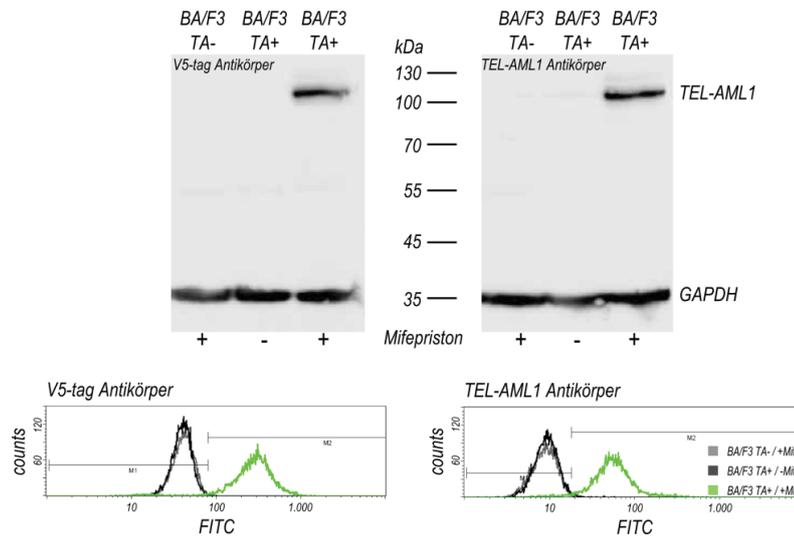


Abbildung 4.6 Der Nachweis von TEL-AML1 mittels TEL-AML1 Antikörper (rechts) im Vergleich zu einem V5-tag Antikörper (links) erfolgte sowohl im Western Blot (oben) als auch im Durchflusszytometer (unten). Hierfür wurden Zell-Lysate bzw. Zellen in nicht-induziertem (BA/F3^{TA+} – Mif) und induziertem Zustand (BA/F3^{TA+} + Mif) verwendet. Als Kontrolle dient weiterhin TEL-AML1 negative Zellen, die mit Mifepriston behandelt wurden (BA/F3^{TA-} + Mif). Die gleichmäßige Beladung der Gele mit Proteinen wurde mittels GAPDH-Nachweis überprüft.

Diese Ergebnisse zeigten, dass der in Kooperation mit Elisabeth Kremmer generierte TEL-AML1 Antikörper hinsichtlich Spezifität und Funktionalität mit kommerziell erhältlichen Antikörpern vergleichbar ist und daher ohne Bedenken für die geplanten Chromatin-Immünpräzipitationen eingesetzt werden konnte.

4.3 Identifizierung von TEL-AML1 Zielgenen im induzierbaren murinen Zellsystem

4.3.1 Etablierung der Chromatin-Immunpräzipitation

4.3.1.1 Optimierung des Chromatin-Scherens

Für die geplanten Chromatin-Immunpräzipitationen (ChIP) wurde zunächst das Scheren des Chromatins an fixierten Zellen optimiert (vgl. 3.3.4.1). Ziel war hierbei, das Chromatin auf eine Größe zwischen 100 und 500 bp zu scheren. Hierfür wurden jeweils 7,6 Mio. bzw. 15,2 Mio. Zellen wie unter 3.3.4.1 beschrieben mit Formaldehyd fixiert und für 0, 6, 12, 18, 24 und 30 Zyklen bestehend aus 20 s Ultraschallbehandlung und mindestens einminütiger Inkubation auf Eis geschert. Die gewünschte Fragmentgröße von etwa 100 bis 500 bp wurde bei 7,6 Mio. Zellen nach 12 Zyklen Ultraschallbehandlung erreicht (s. Abb. 4.7) und für alle folgenden Experimente auf gleiche Weise durchgeführt.

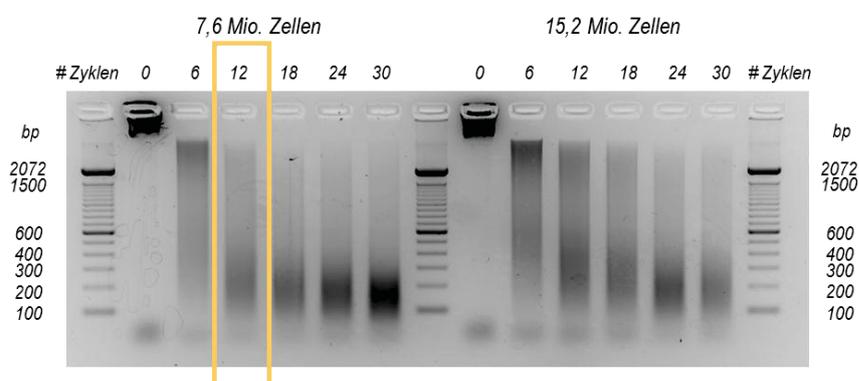


Abbildung 4.7 Die Optimierung der Chromatinscherung für die ChIP erfolgte mit Ansätzen aus 7,6 Mio. bzw. 15,2 Mio. fixierten Zellen und 6 bis 30 Zyklen Ultraschall-Behandlung (20 s Ultraschall, 1 min auf Eis). Die optimale Größe der Chromatin-Fragmente von 100 bis 500 bp wurde bei 7,2 Mio. Zellen nach 12 Zyklen erreicht (gelb umrandet), bei 15,6 Mio. Zellen waren 18 Zyklen nötig.

Die gescherte und anschließend aufgereinigte DNA wurde nachfolgend in promotor-spezifischen PCR-Ansätzen für das murine Gen *Gzmb* eingesetzt (vgl. 3.3.6.1). Dieser Promotorbereich sollte in den folgenden ChIP als Kontrolle für die spezifische Anreicherung dieses bereits bekannten TEL-AML1 Zielgens dienen. Allerdings erwies sich das freundlicherweise von Anthony Ford zur Verfügung gestellten Primerpaar als ungeeignet, da die Größe des entsprechenden Amplikons einen Nachweis der Promotorregion in stärker gescherten DNA-Ansätzen nicht oder nur unzureichend erlaubte (s. Abb. 4.8, oben). Daher wurde ein neues Primerpaar entworfen, welches ein Amplikon geringerer Größe generierte und, wie in Abbildung 4.8 (unten) zu sehen, daher für die weiteren promotor-spezifischen PCR-Ansätze verwendet werden konnte.

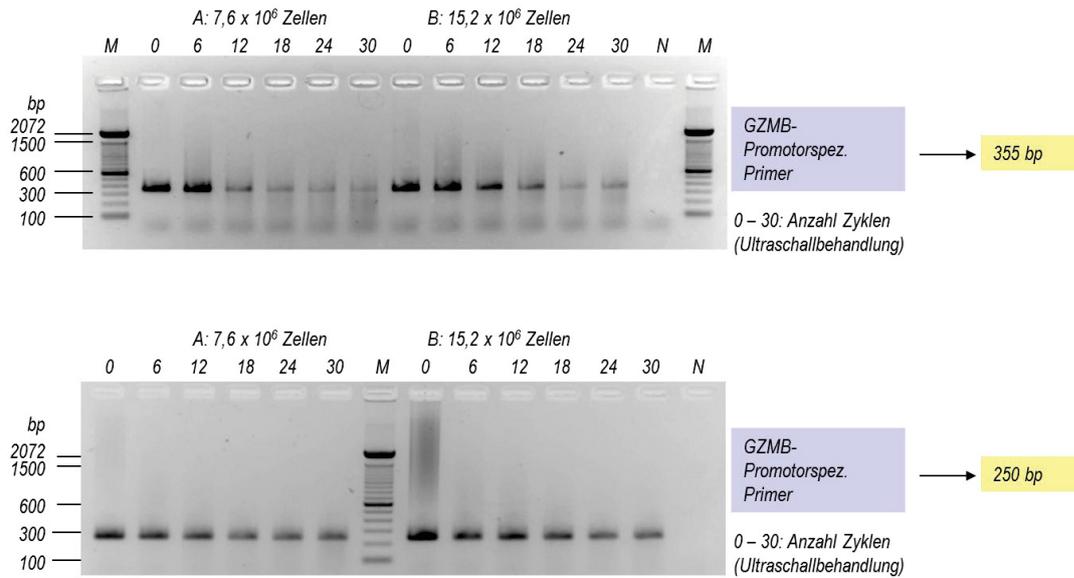


Abbildung 4.8 Detektion der Promotorregionen des murinen Gens *Gzmb* mittels PCR an unterschiedlich stark gescherter DNA (die Anzahl der Ultraschallzyklen zwischen 0 und 30 ist über dem Gel notiert; M: Größenstandard, N: Negativkontrolle der PCR). Oben: Die erwartete Amplikongröße betrug 355 bp (gelbe Box, rechts). Mit zunehmender DNA-Scherung konnten nur noch unzureichende Mengen an PCR-Produkt nachgewiesen werden, so dass diese Primerpaare für die folgenden Experimente nicht geeignet waren. Unten: Die erwartete Amplikongröße betrug 250 bp (gelbe Box, rechts). Die zunehmende DNA-Scherung hatte hierbei keinen Effekt auf die nachgewiesene Menge an PCR-Produkt. Daher wurden diese Primerpaare für die nachfolgenden promotorspezifischen PCR-Ansätze verwendet.

4.3.1.2 Etablierung und Optimierung der Chromatin-Immunpräzipitation

Die Etablierung der ChIP wurde wie in Abschnitt 3.3.4.2 angegeben unter Verwendung von ProteinA/G Agarose und fixierten, induzierten BA/F3^{TA+} Zellen durchgeführt. Nach erfolgter Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen TBP (*TATA-box binding protein*), den V5-tag und TEL-AML1 wurde ein Aliquot der der Eluate auf einem SDS-Gel aufgetragen und anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert. Für die Detektion der Proteine wurden ein TBP- und der TEL-AML1 Antikörper verwendet, der exemplarische Nachweis unspezifisch immunpräzipitierter Proteine erfolgte mittels GAPDH-Antikörper.

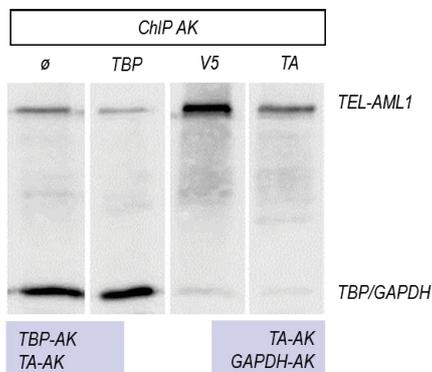


Abbildung 4.9 Etablierung der ChIP mit Antikörpern (AK) gegen TBP, V5-tag und TEL-AML1 (TA) im Vergleich zu einem Ansatz ohne Antikörper (\emptyset). Der Nachweis der immunpräzipitierten Proteine erfolgte in einem Aliquot der Eluate. Die Detektion der Proteine nach SDS-PAGE und Western Blotting erfolgte mit Antikörpern gegen TEL-AML1 und TBP (links) bzw. TEL-AML1 und GAPDH (rechts).

Wie in Abbildung 4.9 zu sehen, konnte zwar in allen Eluaten jeweils das immunpräzipitierte Protein nachgewiesen werden, allerdings zeigte auch der Ansatz ohne Antikörper (Membran links außen) deutliche Banden in entsprechender Höhe von TBP (38 kDa) und TEL-AML1 (110 kDa). Auch in den Eluaten der CHIP-Ansätze mit V5-tag bzw. TEL-AML1 Antikörper (rechte Membran) wurde, wenn auch sehr schwach, GAPDH nachgewiesen.

Die aus diesen CHIP-Experimenten aufgereinigte DNA wurde zudem für eine promotorspezifische PCR eingesetzt (s. Abb. 4.10). Hierbei diente wiederum der Nachweis der *Gzmb*-Promotorregion als Kontrolle für das Gelingen und die Spezifität der CHIP-Experimente. Die DNA aus der CHIP mit dem TEL-AML1 Antikörper lieferte dabei am meisten Produkt, während in den anderen CHIP-Ansätzen der *Gzmb*-Promotorbereich zwar schwächer, aber ebenfalls spezifisch nachgewiesen werden konnte. Allerdings zeigte sich auch hier die bereits im Western Blot detektierte Kontamination der Spezifitätskontrolle (CHIP ohne Antikörper) in diesem Fall als spezifisches PCR-Produkt. Zusammengefasst deuteten die Ergebnisse sowohl des Western Blots als auch der promotorspezifischen PCR auf einen erheblichen Anteil unspezifisch an die Agarose gebundener Proteine hin. Daher wurden im Folgenden magnetische Partikel (*beads*) mit der Agarose hinsichtlich unspezifischer Proteinbindung verglichen.

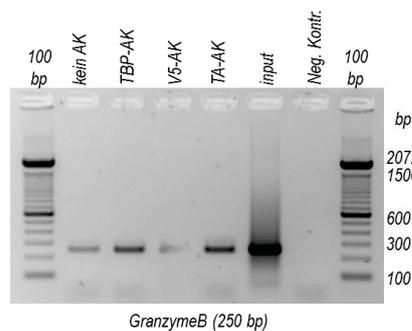


Abbildung 4.10 Promotorspezifische PCR an immunpräzipitierter und aufgereinigter DNA. Es wurden Primer für den murinen Promotorbereich des Gens *Gzmb* verwendet. Die Zahl in Klammern gibt die erwartete Amplikongröße an. Neben den CHIP-Ansätzen mit verschiedenen Antikörpern (AK) wurden auch die Spezifitätskontrolle (kein AK) sowie der Input und die Negativkontrolle der PCR auf einem 1,5%igem Agarosegel analysiert (100 bp: Größenstandard).

4.3.1.3 Vergleich der Spezifität von ProteinA/G Agarose und magnetischen *beads*

Der Vergleich der Spezifität und Effektivität von ProteinA/G Agarose und magnetischen *beads* erfolgte wie unter 3.3.4.3 beschrieben. Hierfür wurden CHIP-Experimente ohne Antikörper bzw. mit jeweils 4 µg TBP-Antikörper an 10 Mio. fixierten, induzierten BA/F3^{TA+} Zellen pro Ansatz durchgeführt. Zum Nachweis der Spezifität der CHIP wurden Aliquots verschiedener Schritte im Western Blot auf die Anwesenheit von TBP hin analysiert. Die Effektivität der CHIP wurde über die nach der Elution an der Agarose bzw. den *beads* verbliebenen Proteine bestimmt. Dazu wurden die Agarose bzw. die *beads* nach erfolgter Elution mit SDS-Probenpuffer aufgekocht und hiervon ebenfalls ein Aliquot aufgetragen (s. Abb. 4.11).

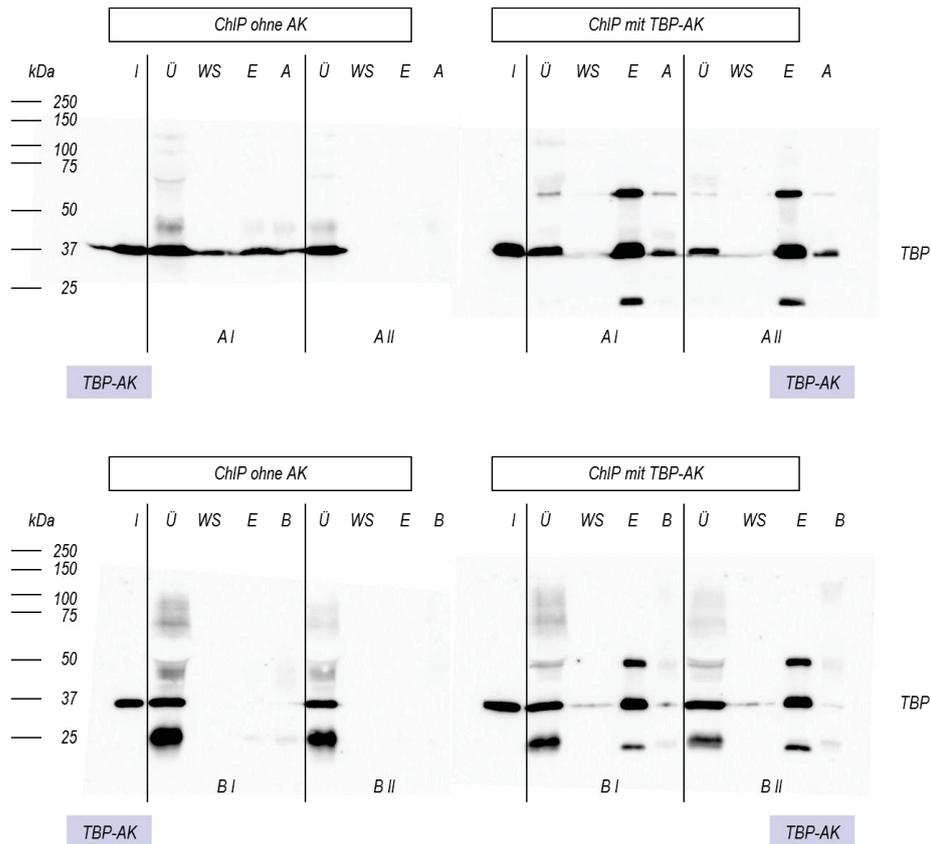


Abbildung 4.11 ChIP-Experimente ohne Antikörper (AK; linke Seite) oder mit TBP-Antikörper (rechte Seite) unter Verwendung von ProteinA/G Agarose (A; oben) oder magnetischen *beads* (B; unten). Die Ansätze wurden zuvor entweder nur einem *preclearing* Schritt unterzogen (I) oder die Agarose bzw. die *beads* zusätzlich noch mit gescherter Salmon Sperm DNA blockiert (II). Aliquots von Input (I), Überstand nach ChIP (Ü), dem ersten Wasch-Schritt (WS) und Eluat (E) wurden über SDS-PAGE aufgetrennt, auf PVDF-Membranen transferiert und im Western Blot mittels TBP-Antikörper detektiert. Zudem wurde die Agarose nach erfolgter Elution mit SDS-Probenpuffer aufgekocht und hiervon ebenfalls ein vergleichbares Aliquot aufgetragen (A bzw. B).

In den ChIP-Ansätzen mit ProteinA/G Agarose ohne Antikörper wurde nach ausschließlichem *preclearing* TBP in allen Spuren nachgewiesen (s. Abb. 4.11, obere linke Membran, A1). Ein *preclearing* der Agarose reichte anscheinend alleine nicht aus, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Lediglich nach zusätzlichem Blockieren der Agarose mit Salmon Sperm DNA konnte keine unspezifische Proteinbindung mehr detektiert werden (s. Abb. 4.11, obere linke Membran, AII). Die ChIP-Experimente mit TBP-Antikörper zeigten keine so deutlichen Unterschiede in ihrer Spezifität, gleichgültig ob *preclearing* alleine oder zusätzliches Blockieren angewandt wurde. Allerdings blieb nach der Elution in beiden Fällen noch relativ viel Protein an der Agarose gebunden (s. Abb. 4.11, obere rechte Membran, Spur A). Die in Höhe von 55 und 25 kDa detektierten Banden entsprachen der schweren und leichten Kette des Antikörpers und wurden daher in den ChIP-Ansätzen ohne Antikörper nicht detektiert.

Im Gegensatz zu den ChIP-Experimenten unter Verwendung von ProteinA/G Agarose konnte in denen, die mit Hilfe magnetischer *beads* aber ohne Antikörper durchgeführt wurden, keine unspezifische Proteinbindung detektiert werden (s. Abb. 4.11, untere linke Membran). Wie erwartet konnte weder in den Ansätzen die nur einem *preclearing* unterzogen worden waren noch in denen, die zusätzlich mit Salmon Sperm DNA blockiert waren, TBP in einer anderen Spur als dem Input oder dem Überstand nachgewiesen werden. Die ChIP-Experimente mit TBP-Antikörper zeigten ebenfalls keine

Unterschiede in ihrer Spezifität, egal ob *preclearing* alleine oder zusätzliches Blockieren angewandt wurde. Außerdem war in beiden Fällen nur noch sehr wenig Protein nach Elution an den *beads* gebunden (s. Abb. 4.11, untere rechte Membran, Spur B).

Die Ergebnisse dieses Vergleichs zeigten, dass magnetische *beads* deutlich besser für die geplanten ChIP-Experimente geeignet waren, da sie unter den gewählten Bedingungen so gut wie keine unspezifischen Proteinbindungen erlaubten und sich die Protein-DNA-Komplexe nahezu vollständig von ihnen eluieren ließen. Daher wurden alle nachfolgenden ChIP-Experimente mit magnetischen *beads* durchgeführt.

4.3.1.4 Bestimmung der Amplifikationseffizienz der *Gzmb*-promotorspezifischen Primer

Als Maß für die Spezifität und Effizienz der geplanten ChIP-Experimente sollte die Anreicherung des Promotorbereichs des bereits für TEL-AML1 identifizierten Zielgens *Granzyme B* (*Gzmb*) durch quantitative PCR (qPCR) nachgewiesen werden. Hierfür wurde zunächst die Promotorregion, welche zwei vorhergesagte AML1-Bindestellen enthält, in zwei Bereiche aufgeteilt (*Gzmb1* und *Gzmb2*), um die Amplikongröße für die qPCR auf 81 bp bzw. 88 bp zu verringern. Anschließend wurde mit Hilfe einer logarithmischen Verdünnungsreihe von geschertem Input-Chromatin über 3 log-Stufen die Amplifikationseffizienz der beiden Primerpaare bestimmt (vgl. 3.3.6.5). Diese sollte idealerweise bei 1 liegen (entspricht 100%).

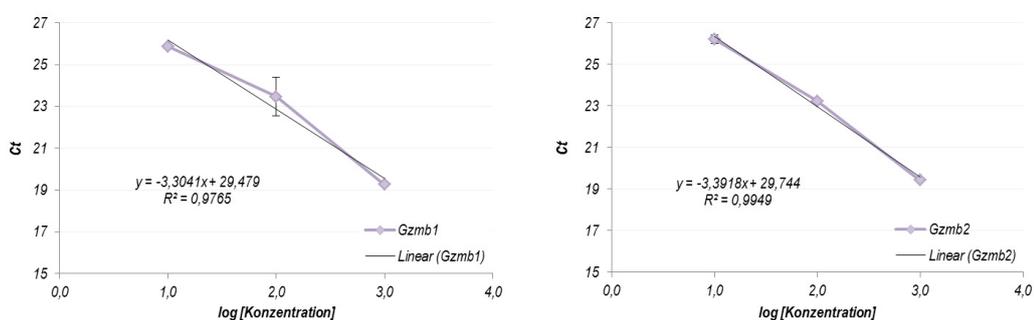


Abbildung 4.12 Bestimmung der Amplifikationseffizienz der Primerpaare *Gzmb1* (links) und *Gzmb2* (rechts). Hierfür wurden diese in quantitativen PCR-Ansätzen mit Verdünnungsreihen von geschertem Input-Chromatin über 3 log-Stufen eingesetzt und die ermittelten Ct-Werte gegen den Logarithmus der Konzentration aufgetragen ($n = 2$; SEM: *standard error from mean*). Mit Hilfe der Steigung der Ausgleichsgeraden (Geradengleichung und Bestimmtheitsmaß sind angegeben) lässt sich die Amplifikationseffizienz (AE) durch die Gleichung $AE = 10^{(-1/\text{Steigung})} - 1$ bestimmen.

Die Berechnung der Amplifikationseffizienz (AE) erfolgte mit Hilfe der Gleichung $AE = 10^{(-1/\text{Steigung})} - 1$, wobei mit ‚Steigung‘ die Steigung der Ausgleichsgeraden in der Auftragung der ermittelten Ct-Werte gegen den Logarithmus der eingesetzten DNA-Konzentration gemeint ist (s. Abb. 4.12). Für das Primerpaar **Gzmb1** wurde eine Amplifikationseffizienz von 1,01 bzw. **101%** ermittelt, für **Gzmb2** betrug sie 0,97 bzw. **97%**.

4.3.1.5 Vergleich der LM-PCR mit dem Whole Genome Amplification Kit

Für die Hybridisierung auf murine RefSeq Promotorarrays waren ca. 2 µg DNA pro Experiment erforderlich, weshalb die Menge der aus den ChIP-Experimenten aufgereinigten DNA erwartungsgemäß hierfür nicht ausreichte. Daher musste zunächst eine Amplifikation erfolgen, die nach Lee *et al.*, 2006 mittels LM-PCR durchgeführt werden sollte. Allerdings war die von der Firma Nimblegen, von der die Array-Hybridisierungen vorgenommen wurden, favorisierte Methode zur Amplifikation die Verwendung des *Whole Genome Amplification Kits* (WGA2, Sigma). Zunächst wurden daher beide Methoden hinsichtlich ihrer Tendenz, die Ergebnisse durch ungleichmäßige Amplifikation zu verfälschen, miteinander verglichen (vgl. 3.3.6.3). Als Kontrolle diente hierbei nicht-amplifizierte DNA. Die eingesetzte DNA stammte aus ChIP-Experimenten, die mit IgG-Negativkontrolle und V5-Antikörper an TEL-AML1 exprimierenden Zellen (BA/F3^{TA+} + Mif) und solchen, die kein TEL-AML1 exprimierten (BA/F3^{TA+} - Mif), durchgeführt wurden. Jeweils gleiche Mengen der aufgereinigten DNA wurden entweder direkt oder nach Amplifikation mittels LM-PCR bzw. WGA2 in eine quantitative PCR mit promotorspezifischen Primern eingesetzt (vgl. 3.3.6.5) und die „relative Expression“ im Vergleich zum jeweiligen Ausgangsmaterial (Input) berechnet.

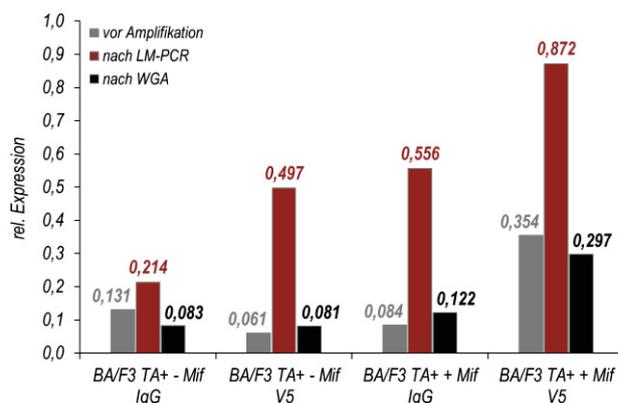


Abbildung 4.13 Detektion des *Gzmb* Promotorbereichs mittels quantitativer PCR. Eingesetzt wurde DNA aufgereinigt nach ChIP mit IgG-Negativkontrolle oder V5-Antikörper an induzierten (BA/F3^{TA+} + Mif) und nicht-induzierten Zellen (BA/F3^{TA+} - Mif). Die DNA wurde entweder mittels LM-PCR (rot) oder mit Hilfe des WGA2 Kits (Sigma; schwarz) amplifiziert. Als Kontrolle diente nicht-amplifizierte DNA (grau). Dargestellt ist die „relative Expression“ im Vergleich zum jeweiligen Ausgangsmaterial (Input).

Wie in Abbildung 4.13 für den *Gzmb* Promotor zu sehen ist, weichen die Werte vor Amplifikation und nach WGA2 nicht besonders stark voneinander ab. Die Negativkontrollen zeigten wie erwartet eine deutlich schwächere Anreicherung des *Gzmb* Promotors als die TEL-AML1 exprimierenden Zellen. Die Ergebnisse der Proben nach LM-PCR deuteten allgemein auf eine deutlich stärkere Amplifikation der DNA hin, diese konnte allerdings auch in den Negativkontrollen beobachtet werden, so dass es schien als hätte die ChIP unter Verwendung des V5-Antikörpers auch in Zellen, die TEL-AML1 nicht exprimierten zu einer Anreicherung des *Gzmb* Promotorbereichs geführt. Durch die Amplifikation mittels LM-PCR wurde hier also ein falsch-positives Ergebnis generiert. Daher war diese Methode vollkommen ungeeignet für die Amplifikation der DNA aus ChIP-Experimenten und wurde für die folgenden Experimente nicht mehr verwendet. Stattdessen erfolgte die Amplifikation fortan ausschließlich mit Hilfe des WGA2 Kits.

4.3.2 Chromatin-Immunpräzipitation

4.3.2.1 ChIP-on-chip: Nachweis TEL-AML1 gebundener Promotorbereiche

Nach erfolgreicher Etablierung der ChIP wurden die folgenden ChIP-Experimente unter Verwendung des spezifischen TEL-AML1 Antikörpers bzw. einer IgG-Negativkontrolle mit fixierten, induzierten Zellen wie unter 3.3.4.4 beschrieben durchgeführt. Als Negativkontrolle wurden nicht-induzierbare Zellen auf die gleiche Weise mit Mifepriston behandelt und fixiert. Die Kontrolle der Effektivität und Spezifität der einzelnen ChIP-Experimente erfolgte wie bereits erwähnt mittels quantitativer PCR (vgl. 3.3.6.5). Als Maß hierfür diente sowohl die Ausbeute der ChIP-Ansätze im Vergleich zum Ausgangsmaterial (Input) als auch der Anreicherungsfaktor des Promotorbereichs des bereits für TEL-AML1 beschriebenen Zielgens *Gzmb* im Verhältnis zur IgG-Negativkontrolle (vgl. 3.3.6.5). Die relativen Anreicherungsfaktoren der beiden ChIP-Experimente, die letztendlich für die Array-Hybridisierung ausgewählt wurden, sind in Abbildung 4.14 gezeigt.



Abbildung 4.14 Anreicherung des *Gzmb* Promotorbereichs bezogen auf die ChIP mit Kontrollzellen als Maß für die Effektivität und Spezifität der ChIP-Experimente. Als Grundlage für die Berechnung diente der Nachweis der Anreicherung dieser Promotorbereiche mittels quantitativer PCR an DNA aus TEL-AML1 exprimierenden Zellen (BA/F3^{TA+} + Mif) und Kontrollzellen (BA/F3^{TA-} + Mif), aufgereinigt nach ChIP mit IgG-Negativkontrolle (grau) bzw. TEL-AML1 Antikörper (rot). Dargestellt sind die beiden unabhängigen ChIP-Experimente, die für die Hybridisierung auf murine RefSeq Promotorarrays ausgewählt wurden.

Wie in Abbildung 4.14 zu sehen lagen die Anreicherungsfaktoren der beiden ChIP-Experimente mit TEL-AML1-Antikörper an TEL-AML1 exprimierenden Zellen (BA/F3^{TA+} + Mif) zwischen 6,5 und 12 und waren damit im Vergleich zu dem mitgeführten Kontrollexperimenten (IgG Negativkontrolle bzw. BA/F3^{TA-} + Mif) um ein Vielfaches höher. Diese ChIP-Proben waren daher gut geeignet für eine Amplifikation und die anschließende Hybridisierung auf murine RefSeq Promotor Arrays.

Die aus den ChIP-Experimenten aufgereinigte DNA sowie das Ausgangsmaterial wurden nach Amplifikation mittels *Whole Genome Amplification* mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und zusammen auf einen murinen 385K RefSeq Promotorarray hybridisiert. Anschließend wurden die Signalintensitäten gemessen und entweder der über TEL-AML1 immunpräzipitierten DNA oder dem Input zugeordnet. Sowohl die Markierung mit Farbstoffen als auch die Array-Hybridisierung

und das Auslesen der Fluoreszenzsignale wurden von der Firma imaGenes (Berlin) durchgeführt. Insgesamt wurden für TEL-AML1 **3118** spezifisch gebundene Promotorbereiche identifiziert. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte wie unter 3.6.1 beschrieben.

4.3.2.2 ChIP-on-chip: Übereinstimmung der angereicherten Promotorbereiche mit AML1-Bindestellen

Die Visualisierung der gemessenen Intensitätsverteilungen an jeder einzelnen Sonde eines Promotorbereichs erfolgte mit Hilfe der Signalmap Software (Nimblegen). Da in TEL-AML1 lediglich die DNA-Bindedomäne des AML1 enthalten ist, stellte sich die Frage, ob die in den TEL-AML1 ChIP-Ansätzen angereicherten Promotorbereiche mit vorhergesagten AML1-Bindestellen übereinstimmen. Um diese Frage zu beantworten, wurden die Promotorbereiche einiger Gene, die als spezifisch von TEL-AML1 gebunden identifiziert wurden, mit Hilfe der Suchmaschine „TF Search“ (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) hinsichtlich potentieller AML1-Bindestellen analysiert. Die kombinierte graphische Darstellung der Intensitätswerte und AML1-Bindestellen erfolgte manuell mit Hilfe von Excel und Inkscape. Abbildung 4.15 zeigt beispielhaft die Intensitätswerte, die an den Sonden der *Ints2* Promotorregion für die ChIPs an TEL-AML1 exprimierenden Zellen bzw. der Negativkontrolle (BA/F3^{TA-} + Mif) gemessen wurden. Ebenfalls dargestellt sind die mittels *TF Search* vorhergesagten AML1-Bindestellen.

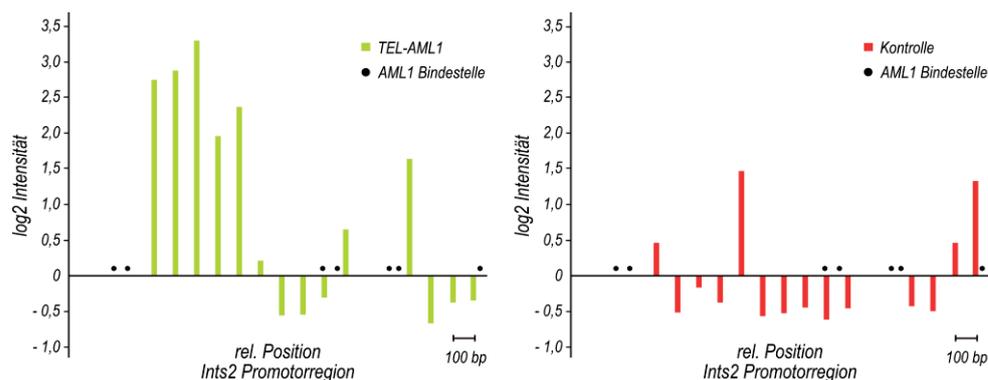


Abbildung 4.15 Übereinstimmung der mittels ChIP detektierten angereicherten Promotorbereiche des *Ints2* Promotors mit vorhergesagten AML1-Bindestellen. Jeder Balken entspricht der Signalintensität (y-Achse) gemessen an einer der 14 Sonden, die den Promotorbereich abdecken. Die Position jeder Sonde sowie der potentiellen AML1-Bindestellen (schwarze Punkte) ist relativ zur gesamten RefSeq Promotorregion angegeben (x-Achse). Dargestellt sind die Ergebnisse der ChIP-Experimente mit TEL-AML1 Antikörper an TEL-AML1 exprimierenden Zellen (BA/F3^{TA+} + Mif; grün) bzw. an Kontrollzellen (BA/F3^{TA-} + Mif; rot).

Das mittels TEL-AML1 Antikörper immunpräzipitierte Chromatin zeigte nicht nur sehr deutliche Signalintensitäten über einen großen Bereich (ca. 500 bp) der Promotorregion, sondern auch eine Übereinstimmung angereicherter Promotorbereiche mit der Position vorhergesagter AML1-Bindestellen (s. Abb. 4.15, linkes Diagramm). Im Gegensatz dazu wurden in der Negativkontrolle wie erwartet nur vereinzelte schwache Signale detektiert (s. Abb. 4.15, rechtes Diagramm), die es trotzdem erlaubten, die *Ints2* Promotorregion als spezifisch von TEL-AML1 gebunden anzusehen.

4.3.2.3 Chromatin-Immunpräzitationen an endogenem AML1 und TEL in BA/F3-Zellen

Wie bereits erwähnt enthält TEL-AML1 lediglich die DNA-Bindedomäne des AML1. Daher stellte sich die Frage, ob TEL-AML1 ebenfalls nur AML1 Zielgene reguliert oder ob es z. B. aufgrund des TEL-Anteils auch an andere Promotorbereiche bindet und hier seine Funktion entfaltet. Daher wurden zusätzlich zu den bereits beschriebenen Experimenten weitere endogene ChIP-Experimente mit AML1- und TEL-Antikörpern an BA/F3 Wildtypzellen durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Experimente sollten dabei helfen, eventuell einzigartige TEL-AML1 Zielgene zu identifizieren. Die Kontrolle der ChIP-Experimente erfolgte ebenfalls (wie bereits für das induzierbare Zellsystem beschrieben) mittels quantitativer PCR unter Verwendung *Gzmb* promotorspezifischer Primer. Die daraus berechneten Anreicherungsfaktoren der drei unabhängigen ChIP-Experimente, die für die Hybridisierung auf murine RefSeq Promotorarrays ausgewählt wurden, lagen zwischen 10 und 17 (s. Abb. 4.16). Da für TEL bislang keine direkten Zielgene beschrieben wurden, konnte diese Kontrolle hierfür nicht verwendet werden. Der für die TEL-ChIP eingesetzte Antikörper wurde allerdings bereits erfolgreich für TEL-AML1 ChIP-Experimente in der TEL-AML1-positiven Zell-Linie REH verwendet (Gefen, Binder, Zaliova, Linka *et al.*, 2010). In dieser Zell-Linie ist das zweite, nicht-translozierte TEL-Allel deletiert, so dass der TEL-Antikörper hier für die spezifische Chromatin-Immunpräzitation des TEL-AML1 geeignet war. Der Nachweis der Spezifität dieser ChIP-Experimente erfolgte ebenfalls über die Anreicherung des GZMB-Promotors. Die entsprechenden endogenen TEL-ChIP-Ansätze wurden daher ebenfalls auf murine RefSeq Promotorarrays hybridisiert.

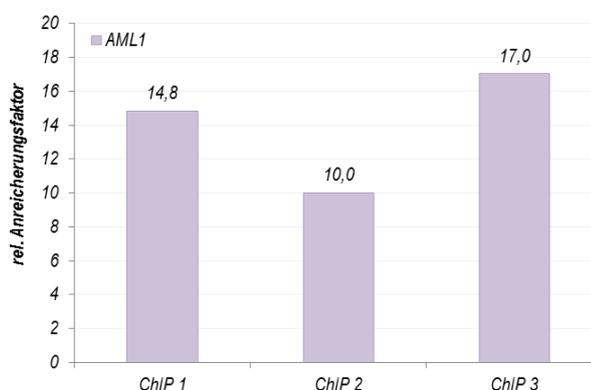


Abbildung 4.16 Anreicherung des *Gzmb* Promotorbereichs bezogen auf die IgG-Negativkontrolle als Maß für die Effektivität und Spezifität der ChIP-Experimente. Als Grundlage für die Berechnung diente der Nachweis der Anreicherung dieser Promotorbereiche mittels quantitativer PCR an DNA aus BA/F3 Wildtypzellen, aufgereinigt nach ChIP mit IgG-Negativkontrolle bzw. AML1 Antikörper. Dargestellt sind die drei unabhängigen ChIP-Experimente, die für die Hybridisierung auf murine RefSeq Promotorarrays ausgewählt wurden.

Das aus den ChIP-Experimenten aufgereinigte Chromatin sowie das Ausgangsmaterial wurden nach Amplifikation ebenfalls mittels *Whole Genome Amplification* mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und zusammen auf einen murinen 385K RefSeq Promotorarray hybridisiert. Anschließend wurden die Signalintensitäten gemessen und entweder der über TEL bzw. AML1 immunpräzipitierten DNA oder dem Input zugeordnet. Sowohl die Markierung mit Farbstoffen als auch die Array-Hybridisierung und das Auslesen der Fluoreszenzsignale wurden von der Firma imaGenes

(Berlin) durchgeführt. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte wie unter 3.6.1 beschrieben. Mit Hilfe der auf diese Weise für AML1 und TEL sowie für TEL-AML1 identifizierten potentiellen Zielgene wurden anschließend die exklusiven Zielgene der einzelnen Proteine durch Subtraktion der nicht-einzigartigen Gene bestimmt. Das Ergebnis der Schnittmengenbildung ist in Abbildung 4.17 dargestellt.

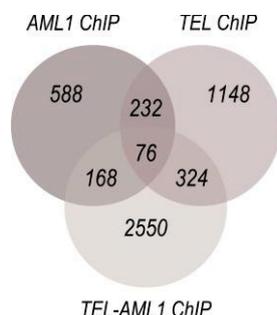


Abbildung 4.17 Kombinierte Auswertung der Ergebnisse aus den ChIP-on-chip-Experimenten für AML1, TEL und TEL-AML1. Die Zahlen geben die in den jeweiligen Experimenten nachgewiesenen Promotorbereiche an. Die farbigen Kreise stellen die Schnittmengen der jeweiligen Ergebnisse dar.

Wie in Abbildung 4.17 zu sehen wurden insgesamt für AML1 **1064** und für TEL **1780** spezifisch gebundene Promotorbereiche identifiziert. Von den AML1-gebundenen Promotorbereichen wurden 244 (23 %) auch in den TEL-AML1 ChIP-Experimenten nachgewiesen, 400 (22,5 %) der durch TEL gebundenen Promotorbereiche wurden ebenfalls in den TEL-AML1 ChIP-Experimenten identifiziert und 76 Promotorbereiche wurden durch alle drei Proteine gebunden nachgewiesen. Insgesamt konnten für AML1 **588**, für TEL **1148** und für TEL-AML1 **2550** exklusive Zielgene identifiziert werden.

4.3.3 Genexpressionsanalyse in TEL-AML1 exprimierenden Zellen

Die Genexpressionsanalysen erfolgten an Zellen aus den gleichen Ansätzen, die auch für die ChIP-Experimente und Proteomanalysen verwendet wurden. Hierfür wurde die Gesamt-RNA aus jeweils 5 Mio. Zellen mittels *RNeasy Kit* (Qiagen) aufgereinigt und anschließend die Integrität und Konzentration der RNA mit Hilfe eines RNA 6000 Nano chips im 2100 Bioanalyzer bestimmt (vgl. 3.5; s. Abb. 4.18). Die Integrität wird dabei als RIN-Wert (*RNA integrity number*) angegeben und lag typischerweise zwischen 9,8 und 10,0.

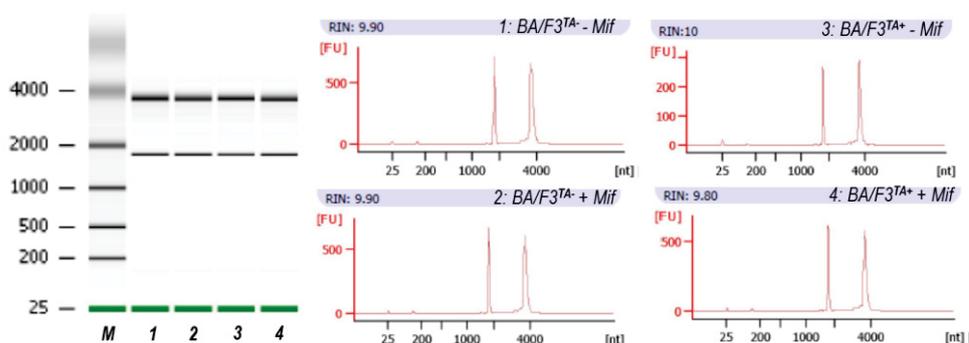


Abbildung 4.18 Exemplarisches Ergebnis einer RNA-Analyse mit Hilfe des 2100 Bioanalyzers unter Verwendung eines RNA 6000 Nano chips. Dargestellt ist das Bild der Gelelektrophorese (links) sowie die dazugehörigen Elektropherogramme (rechts) von RNA, die aus den murinen Zell-Linien BA/F3TA⁻ und BA/F3TA⁺ jeweils ohne (-) und mit (+) Behandlung mit Mifepriston isoliert wurde. Die Integrität der RNA ist als RIN-Wert (*RNA integrity number*) angegeben und lag zwischen 9,8 und 10,0.

Die Probenvorbereitung erfolgte mit Hilfe des *3' IVT Express Kits* (Affymetrix) gemäß Herstellerangaben und wurde ebenfalls mittels Bioanalyzer überprüft. Die Hybridisierung und alle weiteren Schritte wurden am Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte wie unter 3.6.1 beschrieben. Für die Bestimmung der differentiell exprimierten Gene wurden die Genexpressionsprofile TEL-AML1 exprimierender Zellen mit denen der Kontrollzellen (BA/F3^{TA-} + Mif) verglichen. Als Referenz dienten hierbei die entsprechenden Zell-Linien, die jedoch nicht mit Mifepriston behandelt worden waren. Insgesamt konnten 1424 differentiell exprimierte Gene identifiziert werden, 842 davon waren im Vergleich zu den Kontrollzellen hochreguliert und 582 herunterreguliert. Zieht man die in den TEL- und AML1-ChIP-Experimenten detektierten Promotorbereiche bzw. die entsprechenden Gene ab, bleiben **1319** potentielle exklusive TEL-AML1 Zielgene übrig. Von diesen waren 774 hoch- und 545 herunterreguliert.

4.3.4 Auswertung der massenspektrometrischen Analyse

Die Messung und Daten-Aufbereitung der SILAC-Experimente erfolgte am Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung (Bad Nauheim) und wurde freundlicherweise von Marcus Krüger durchgeführt. Letztendlich wurden die identifizierten und quantifizierten Proteine, die in den einzelnen experimentellen Ansätzen gemessen wurden, in einer Excel-Datei zusammengefasst und zur weiteren Auswertung bereitgestellt (vgl. 3.6.1). Es sollten lediglich Proteine betrachtet werden, die in den beiden Kontrollen eine nahezu identische, unveränderte Expression aufwiesen.

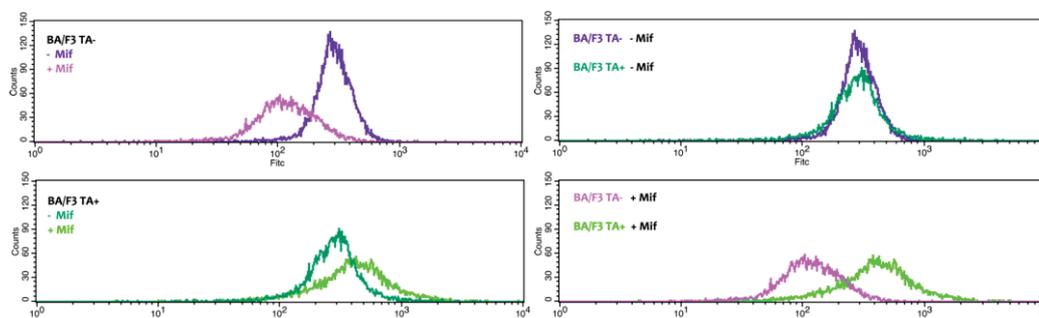


Abbildung 4.19 FACS-Auswertungen (Histogramm Plots) nach Färbung der Mifepriston-behandelten und unbehandelten murinen Zell-Linien BAF3^{TA-} und BAF3^{TA+} mit FITC-konjugiertem CD44-Antikörper. Oben links: Mifepriston (Mif) hatte anscheinend einen negativen Effekt auf die CD44-Expression, da die Zellen vor der Behandlung (violette Linie) deutlich mehr CD44 auf ihrer Oberfläche exprimierten als nach Mif-Zugabe (rosafarbene Linie). Oben rechts: Ein Vergleich der beiden murinen Zell-Linien BAF3^{TA-} (violette Linie) und BAF3^{TA+} (dunkelgrüne Linie) zeigte keinen Unterschied der CD44-Expression in Abwesenheit von Mifepriston. Unten links: Die induzierten Zellen BAF3^{TA+} (hellgrüne Linie) zeigten nur einen schwachen Anstieg in der CD44-Expression nach Mif-Behandlung im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (dunkelgrüne Linie). Unten rechts: Erst der direkte Vergleich der beiden Mif-behandelten Zell-Linien offenbart den deutlichen Anstieg der CD44-Expression als Folge der Induktion der TEL-AML1-Expression.

Wie in Abbildung 4.19 exemplarisch für CD44 gezeigt, war dies allerdings so nicht möglich, da die Zugabe von Mifepriston allein bereits in einigen Fällen zu einer veränderten Proteinexpression führte. Daher wurde für die Bestimmung der Proteinexpression in den TEL-AML1 exprimierenden Zellen (BA/F3^{TA+} + Mif) lediglich die ebenfalls mit Mifepriston behandelte Kontrolle (BA/F3^{TA-} + Mif) berücksichtigt. Nach Rücksprache mit Marcus Krüger wurde ein Protein als differentiell exprimiert angesehen wenn seine Expression in den TEL-AML1 exprimierenden Zellen mindestens 15% von der

Expression in der Kontrolle abwich. Es wurden insgesamt 1482 Proteine gemessen, von denen 462 höher exprimiert und 265 niedriger exprimiert als in der entsprechenden Kontrolle waren (727 differentiell exprimierte Proteine insgesamt). Zieht man die in den TEL- und AML1-ChIPs detektierten Promotorbereiche bzw. die entsprechenden Proteine ab, bleiben **678** potentielle, exklusiv durch TEL-AML1 regulierte Proteine übrig. Von diesen waren 432 hoch- und 246 herunterreguliert.

4.3.5 Kombinierte Datenanalyse zur Identifizierung TEL-AML1 regulierter Zielgene

Ziel der vorliegenden Arbeit war in erster Linie die Identifizierung direkter TEL-AML1 Zielgene. Um nicht nur die TEL-AML1 gebundenen Promotorbereiche, sondern auch die dadurch differentiell regulierten Gene zu identifizieren, wurde eine kombinierte Datenanalyse der Ergebnisse aller drei *screening* Methoden vorgenommen (vgl. 3.6.2). Als direkte von TEL-AML1 regulierte Zielgene wurde die Schnittmenge aus den ChIP-on-chip-Experimenten und den Genexpressionsprofilen angesehen. Diese beinhaltete insgesamt 203 Gene, von denen **178** Gene exklusive TEL-AML1 Zielgene darstellten (107 waren hoch- und 71 herunterreguliert). Eine Auflistung dieser Gene ist in Anhang 8.4 zu finden. Nach zusätzlicher Schnittmengenbildung mit den Ergebnissen der Proteomanalysen blieben von den 203 Zielgenen noch 17 übrig, die in allen drei *screening* Methoden nachgewiesen werden konnten, **16** davon waren exklusive TEL-AML1 Zielgene. Die vollständigen Schnittmengen aller drei Ergebnisgruppen der exklusiven TEL-AML1 Zielgene sind in Abbildung 4.20 gezeigt.

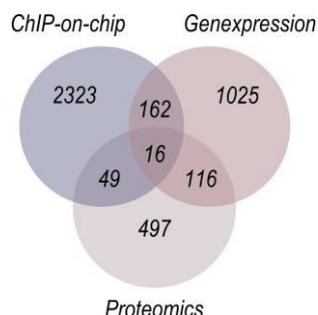


Abbildung 4.20 Kombinierte Auswertung der Ergebnisse aus den ChIP-on-chip-Experimenten sowie der differentiell exprimierten Gene und Proteine. Berücksichtigt wurden lediglich exklusive TEL-AML1 Zielgene. Die Zahlen geben die mit Hilfe der verschiedenen *screening* Methoden nachgewiesenen Promotorbereiche bzw. Gene oder Proteine an. Die farbigen Kreise stellen die Schnittmengen der jeweiligen Ergebnisse dar.

Die 17 sowohl über ChIP-on-chip als auch in den Genexpressions- und Proteomprofilen nachgewiesenen Gene/Proteine sind in Tabelle 4.1 aufgelistet. Hier ist zudem ihre Regulation auf mRNA- und Protein-Ebene angegeben. Mit Ausnahme eines Gens (*Cfl1*) zeigten alle Gene bzw. Proteine eine gleichsinnige Regulation auf mRNA- und Proteinebene, 6 waren hochreguliert und 10 herunterreguliert. Außer *Pdlim5* wurde keines der Gene in den TEL- oder den AML1-ChIP-Experimenten detektiert (vgl. 4.3.2.3) und stellten daher exklusive TEL-AML1 Zielgene dar.

Tabelle 4.1 Direkte TEL-AML1 Zielgene, die sowohl in den CHIP-on-chip Experimenten als auch den Genexpressions- und Proteomanalysen nachgewiesen werden konnten. Angegeben ist die Identnummer (ID) der Gene als MGI (*mouse genome identifier*), das Gensymbol sowie seine Bezeichnung und die Regulation der Expression auf mRNA- und Proteinebene (+: hochreguliert, -: herunterreguliert). Die Expression der fünf fett markierten Gene wurde zudem in Patientenmaterial analysiert (s. 4.3.7.1). Bei *Pdlim5* handelt es sich nicht um ein exklusives Zielgen, *Cfl1* zeigte keine gleichsinnige Regulation auf mRNA- und Proteinebene.

Gen ID	Symbol	Bezeichnung	Regulation	
			mRNA	Protein
MGI:96392	<i>Icam1</i>	intercellular adhesion molecule 1	+	+
MGI:2444813	<i>9030617O03Rik</i>	RIKEN cDNA 9030617O03 gene	+	+
MGI:1933754	<i>Nedd4l</i>	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated gene 4-like	+	+
MGI:1922014	<i>Klc4</i>	kinesin light chain 4	+	+
MGI:1914401	<i>Psmc9</i>	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 9	+	+
MGI:106222	<i>Capza2</i>	capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 2	+	+
MGI:101790	<i>Fabp5</i>	fatty acid binding protein 5, epidermal	-	-
MGI:1289308	<i>Tax1bp1</i>	Tax1 (human T-cell leukemia virus type I) binding protein 1	-	-
MGI:1860295	<i>Ftsj3</i>	FtsJ homolog 3 (E. coli)	-	-
MGI:1913208	<i>Carm1</i>	coactivator-associated arginine methyltransferase 1	-	-
MGI:1913504	<i>Dimt1</i>	DIM1 dimethyladenosine transferase 1-like (S. cerevisiae)	-	-
MGI:1913659	<i>Rsl1d1</i>	ribosomal L1 domain containing 1	-	-
MGI:1917672	<i>Ints2</i>	integrator complex subunit 2	-	-
MGI:1927489	<i>Pdlim5</i>	PDZ and LIM domain 5	-	-
MGI:1929701	<i>Metap2</i>	methionine aminopeptidase 2	-	-
MGI:95303	<i>Eif4a1</i>	eukaryotic translation initiation factor 4A1	-	-
MGI:101757	<i>Cfl1</i>	cofilin 1, non-muscle	-	+

4.3.6 TEL-AML1 beeinflusst unter anderem die negative Regulation der Genexpression und die RNA-Prozessierung

Die Aufdeckung der durch die TEL-AML1 Expression betroffenen biologischen Prozesse sollte eine Einschätzung der Veränderungen im Hinblick auf die TEL-AML1 induzierte Leukämogenese erlauben. Eine Möglichkeit, die detektierten Gene bzw. Proteine hinsichtlich ihrer Beteiligung an bestimmten biologischen Prozessen zu untersuchen, bietet die Betrachtung der assoziierten GO-Termini (GO: *gene ontology*). Dies erfolgte mit Hilfe der bioinformatischen Datenbank DAVID (s. 3.6.3), welche zum einen Genen aus umfassenden Listen die entsprechenden GO-Annotationen zuordnet und zum anderen die statistisch überrepräsentierten GO-Termini bestimmt. Daher wurden die identifizierten, direkt durch TEL-AML1 regulierten 178 exklusiven Zielgene getrennt nach hoch- bzw. herunterregulierten Genen einer solchen Annotation unterzogen. Die innerhalb der Schnittmenge zwischen CHIP-on-chip und den differentiell exprimierten Genen angereicherten 22 GO-Termini sind in Abbildung 4.21 gezeigt. Insgesamt waren zehn GO-Termini mit den hoch- und zwölf GO-Termini mit den herunterregulierten Genen assoziiert. Unter den hochregulierten Genen war die negative Regulation der Genexpression der insgesamt am stärksten überrepräsentierte biologische Prozess. Daneben waren Prozesse wie die Aktivierung von Leukocyten und die positive Regulation der Signaltransduktion angereichert. Unter den herunterregulierten Genen war die Prozessierung von RNA der am stärksten überrepräsentierte biologische Prozess. Dazu gehörte auch die Prozessierung nicht-kodierender RNA (ncRNA). Desweiteren waren Prozesse wie die Biogenese der Ribosomen und die Organisation des Chromatins angereichert.

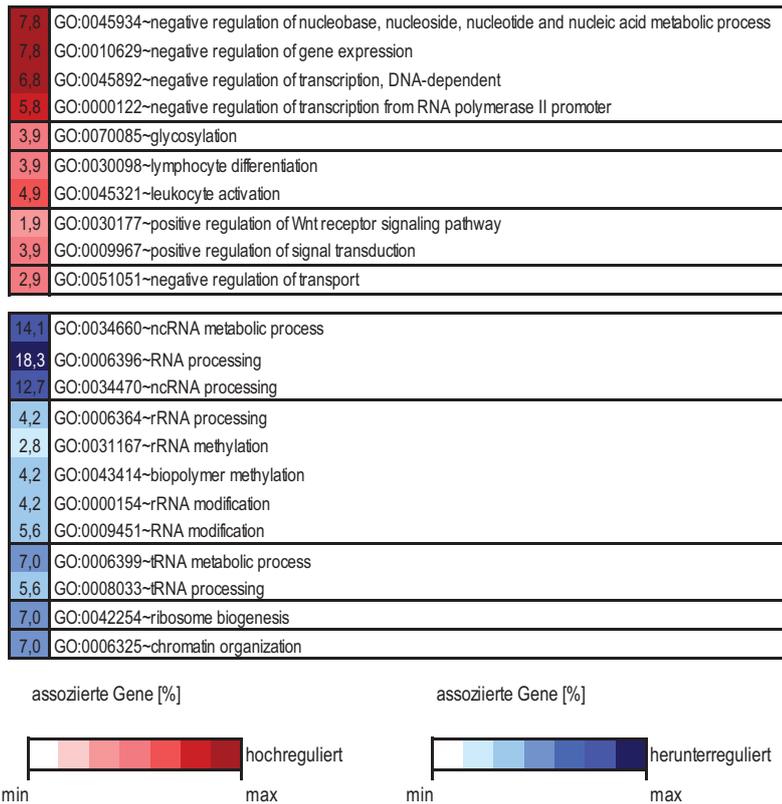


Abbildung 4.21 Überrepräsentierte GO-Termini biologischer Prozesse in der Schnittmenge „ChIP-on-chip + Genexpression“ ($p < 0,05$). Die Datenanalyse erfolgte mit Hilfe der Datenbank DAVID unter Verwendung der 178 exklusiven TEL-AML1 Zielgene, getrennt nach hoch- bzw. herunterregulierten Genen (rot bzw. blau). Die Zahlen geben den prozentualen Anteil Gene an, die mit dem entsprechenden GO-Terminus assoziiert waren.

Auf die gleiche Weise wurden die 17 mit allen drei *screening* Methoden nachgewiesenen Gene funktionell annotiert, allerdings wurden diese hierfür aufgrund der geringen Anzahl an Genen nicht nach Hoch- bzw. Herunterregulation getrennt analysiert. Die angereicherten GO-Termini sowie die Anzahl und Namen der assoziierten Gene und der entsprechende p-Wert sind in Tabelle 4.2 aufgelistet. Auch in dieser Schnittmenge war die Prozessierung von RNA der am stärksten überrepräsentierte Prozess. Daneben waren noch die Regulation der Depolymerisierung von Actinfilamenten, die Methylierung und die negative Transportregulation angereichert, wobei bei den beiden letztgenannten der p-Wert nicht mehr kleiner 0,05 sondern nur noch knapp unter 0,07 lag. Insgesamt waren neun der 17 Gene mit den angereicherten GO-Termini assoziiert.

Tabelle 4.2 Überrepräsentierte GO-Termini biologischer Prozesse in der Schnittmenge „ChIP-on-chip + Genexpression + Proteomics“ des murinen Zellsystems. Angegeben sind neben den GO-Termini die Anzahl der assoziierten Gene (insgesamt und als prozentualer Anteil), sowie der p-Wert und die Gennamen.

GO-Terminus	Anzahl	%	p-Wert	Gene
GO:0006396~RNA processing	4	25,0	0,007	<i>RSL1D1, DIMT1, INTS2, FTSJ3</i>
GO:0000154~rRNA modification	2	12,5	0,008	<i>DIMT1, FTSJ3</i>
GO:0034470~ncRNA processing	3	18,8	0,010	<i>DIMT1, INTS2, FTSJ3</i>
GO:0030834~regulation of actin filament depolymerization	2	12,5	0,023	<i>CAPZA2, CFL1</i>
GO:0043414~biopolymer methylation	2	12,5	0,066	<i>CARM1, FTSJ3</i>
GO:0051051~negative regulation of transport	2	12,5	0,067	<i>NEDD4L, PSMD9</i>

4.3.7 Indirekt durch TEL-AML1 regulierte Gene beeinflussen unter anderem die Hämatopoese und die Translation

Für die Entwicklung einer Leukämie wären vermutlich nicht nur die direkt durch TEL-AML1 regulierten Gene von Bedeutung, sondern auch die indirekt durch die Expression von TEL-AML1 beeinflussten Gene bzw. Proteine könnten hierfür eine entscheidende Rolle spielen. Daher wurden die 109 gleichsinnig exprimierten Gene/Proteine der Schnittmenge aus Genexpressions- und Proteomics-daten, welche nicht in den TEL-AML1-, AML1- oder TEL-ChIP-Experimenten detektiert wurden, ebenfalls wie bereits beschrieben einer funktionellen Annotation unterzogen. Die Ergebnisse dieser Annotation sind in Abbildung 4.22 gezeigt. Von den insgesamt 20 spezifisch angereicherten GO-Termini waren sechs mit den hoch- und 14 mit den herunterregulierten Genen assoziiert. Unter den hochregulierten Genen/Proteinen waren u. a. biologische Prozesse wie die Oxidations-Reduktion, der Metabolismus von Monosacchariden, die Hämatopoese sowie die zelluläre Antwort auf ungefaltete Proteine angereichert. Für die herunterregulierten Gene/Proteine waren die Translation, der Metabolismus nicht-kodierender RNA (ncRNA), die Assemblierung makromolekularer Komplexe und die Aktivierung von Aminosäuren die am stärksten überrepräsentierten Prozesse.

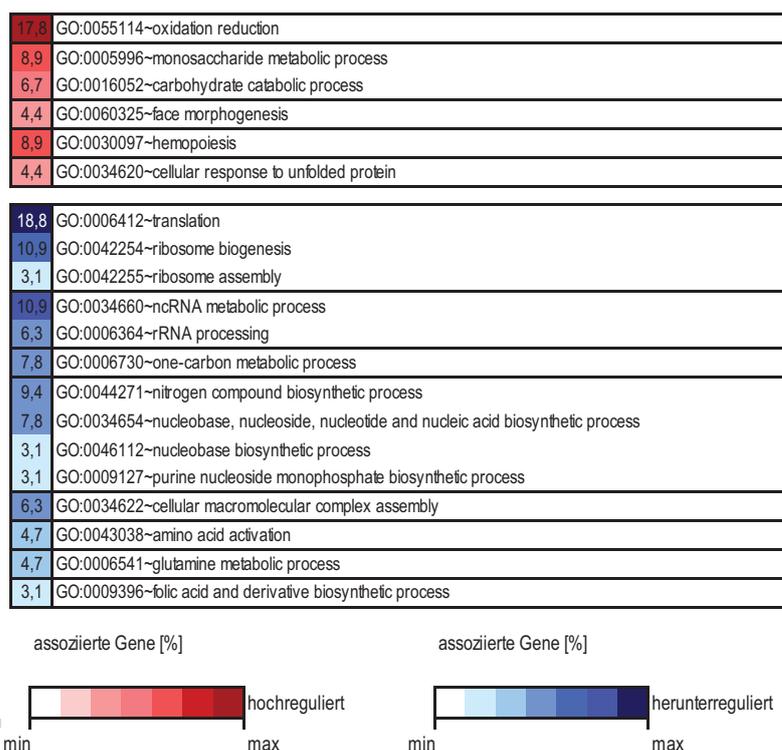


Abbildung 4.22 Überrepräsentierte GO-Termini biologischer Prozesse in der Schnittmenge „Genexpression + Proteinprofil w/o ChIP“ ($p < 0,05$). Die Datenanalyse erfolgte mit Hilfe der Datenbank DAVID an 109 differentiell exprimierten Genen bzw. Proteinen, getrennt nach hoch- bzw. herunterregulierten Genen analysiert. Die Zahlen geben den prozentualen Anteil Gene an, die mit dem entsprechenden GO-Terminus assoziiert waren.

Beim Vergleich der funktionellen Annotation der direkt und der indirekt durch TEL-AML1 regulierten Gene (vgl. Abb. 4.21 und Abb. 4.22) fällt auf, dass sie sich deutlich voneinander unterscheiden. Zum einen waren bei den indirekt regulierten Genen deutlich mehr GO-Termini mit herunterregulierten Genen assoziiert als mit hochregulierten. Bei den direkten TEL-AML1 Zielgenen hingegen waren es in

etwa gleich viele für hoch- bzw. herunterregulierte Gene. Zum anderen waren die angereicherten GO-Termini zum Teil sehr unterschiedlich. Während bei den direkten TEL-AML1 Zielgenen u. a. die negative Regulation der Genexpression, die Aktivierung von Leukocyten und die positive Regulation der Signaltransduktion unter den hochregulierten Genen angereichert waren, wurden für die indirekten Zielgene u. a. Prozesse wie die Oxidations-Reduktion, der Metabolismus von Monosacchariden und die Hämatopoese für die hochregulierten Gene als überrepräsentiert nachgewiesen. Im Gegensatz dazu waren unter den herunterregulierten Genen auch identische GO-Termini angereichert. Sowohl die RNA-Prozessierung als auch die Biogenese der Ribosomen waren bei den direkten wie bei den indirekten Zielgenen unter den herunterregulierten Genen angereichert. Allerdings waren die Methylierung von Biopolymeren und die Organisation des Chromatins ausschließlich bei den direkten Zielgenen überrepräsentiert, während die Biogenese von Nukleotiden und die Aktivierung von Aminosäuren nur bei den indirekten Zielgenen angereichert waren.

4.3.8 Vergleichende Darstellung der individuellen funktionellen Annotationen: Die TEL-AML1-Funktionalität ähnelt mehr dem TEL als dem AML1

Wie bereits erwähnt liegt die Vermutung nahe, dass TEL-AML1 durch die DNA-Bindedomäne des AML1 nicht nur an die gleiche Sequenz bindet wie AML1, sondern hierdurch eventuell vornehmlich AML1-regulierte Gene fehlreguliert werden. Daher sollten die in den endogenen ChIP-Experimenten für TEL und AML1 identifizierten, gebundenen Promotorbereiche helfen, diesen Sachverhalt aufzuklären. Wie bereits unter 4.3.2.3 beschrieben, wurden 22,9% der AML1-Zielgene und 22,5% der TEL-Zielgene auch in den ChIP-Experimenten für TEL-AML1 nachgewiesen. Dies deutete daher nicht auf eine verstärkte Regulation der AML1-Zielgene durch TEL-AML1 hin. Die Tatsache, dass es sich bei 81,8% der TEL-AML1 gebundenen Promotorbereiche um exklusive Zielgene handelte, während für TEL lediglich 64,5% und für AML1 sogar nur 55,3% der gebundenen Regionen als exklusive Zielgene identifiziert wurden, spricht eher dafür, dass die von TEL-AML1 regulierten Gene und damit auch die betroffenen biologischen Prozesse sich deutlich von AML1- und TEL-regulierten Prozessen unterscheiden. Ein Vergleich der in den TEL-AML1 ChIP-Experimenten angereicherten GO-Termini mit denen der endogenen TEL- bzw. AML1-ChIP zeigte, dass viele der betroffenen biologischen Prozesse in allen drei Experimentgruppen nachgewiesen wurden (s. Anhang 8.3). Um einen Eindruck davon zu erhalten, welche unterschiedlichen biologischen Prozesse durch die drei Transkriptionsfaktoren reguliert werden, wurden daraufhin lediglich die GO-Termini miteinander verglichen, die nicht gemeinsam in allen drei ChIP-Ergebnisgruppen auftraten. Dieser Vergleich ist in Abbildung 4.23 dargestellt. Hier ist zu erkennen, dass TEL-AML1 deutlich mehr gemeinsame GO-Termini mit TEL (14) als mit AML1 (4) teilt. Lediglich ein GO-Terminus (*response to organic substance*) war ausschließlich in den TEL-AML1 ChIP-Ergebnissen angereichert. Prozesse wie die RNA-Prozessierung, die Organisation von Chromosomen, der Metabolismus von DNA und ncRNA, die Zellaktivierung, die Regulation der Proteinmodifikation sowie der Protein Kinase Kaskade und der Zellkommunikation konnten sowohl in den Ergebnissen für TEL als auch für TEL-AML1 nachgewiesen werden. Bei den für AML1 und TEL-AML1 detektierten Prozessen handelte es sich um den Zellzyklus, die Regulation des Proteinmetabolismus, die Musterspezifizierung und die Sekretion. Darüber hinaus wurden sechs weitere biologische Prozesse nur für TEL bzw. AML1, nicht aber für TEL-AML1 detektiert.

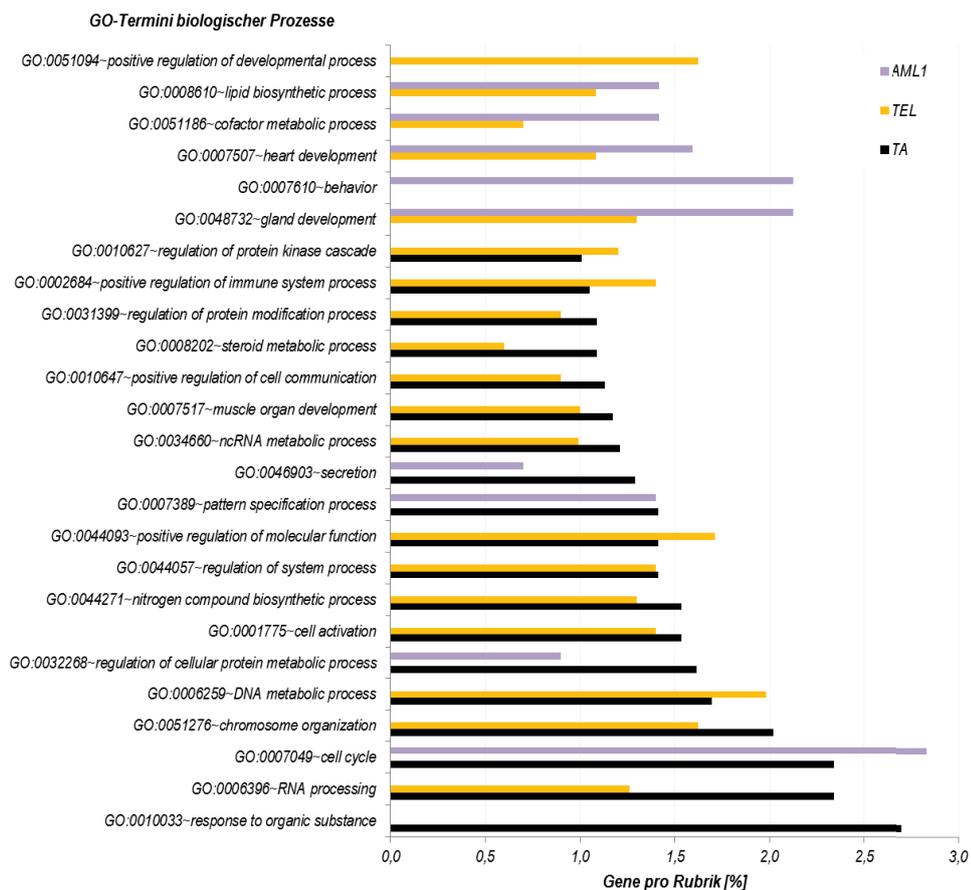


Abbildung 4.23 GO-Termini, die nicht gemeinsam in allen drei Ergebnisgruppen der TEL-, AML1- und TEL-AML1-ChIP gefunden wurden. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Gene bezogen auf die Gesamtzahl der in den einzelnen ChIP-Experimenten nachgewiesenen Zielgene für TEL (gelb), AML1 (lila) und TEL-AML1 (schwarz).

4.3.9 Vergleich mit Patientendaten

Die Ergebnisse der Analysen des murinen Zellsystems sollten hinsichtlich ihrer Gültigkeit bzw. Übertragbarkeit auf den Menschen untersucht werden. Dazu wurde zum einen die Expression einiger der in dieser Arbeit identifizierten TEL-AML1 Zielgene in primärem Patientenmaterial mittels quantitativer PCR bestimmt. Zum anderen wurden die murinen ChIP-Ergebnisse und Genexpressionsprofile mit den Genexpressionsprofilen der Patienten korreliert.

4.3.9.1 Validierung ausgesuchter Zielgene mittels quantitativer PCR an Patientenmaterial

Aus den 17 in allen drei *screening* Methoden nachgewiesenen Genen/Proteinen (vgl. Tab. 4.1) wurden willkürlich fünf ausgewählt, um ihre relative Expression in primärem Material von vier TEL-AML1-positiven Patienten mittels quantitativer PCR zu bestimmen. Als Kontrolle dienten positiv-selektionierte CD19+ Zellen vier gesunder Probanden.

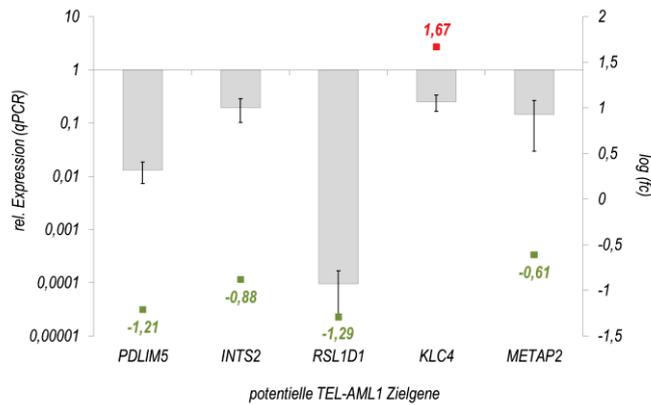


Abbildung 4.24 Validierung ausgesuchter potentieller TEL-AML1 Zielgene in primärem Patientenmaterial mittels quantitativer PCR. Dargestellt ist die relative Expression (graue Balken; y-Achse links) normiert auf die Expression der entsprechenden Gene in CD19+ Zellen vier gesunder Probanden (n=3; SEM: *standard error of mean*). Als endogene Kontrolle diente die Expression von GAPDH. Angegeben sind ebenfalls die Ergebnisse der murinen Genexpressionsarrays als log (fc) (fc: *fold change*; rote bzw. grüne Quadrate und Zahlen; y-Achse rechts).

Die Validierung ausgesuchter Zielgene in Patientenmaterial zeigte ein hohes Maß an Übereinstimmung mit den Ergebnissen der murinen Genexpressionsarrays (s. Abb. 4.24). Vier der fünf ausgesuchten Gene zeigten sowohl im murinen Zellsystem als auch im Patientenmaterial eine deutliche Herunterregulation. Auch die tendenziellen Unterschiede zwischen den einzelnen Genen stimmten relativ gut überein. So wurden *Rsl1d1* und *Pdlim5* in den murinen Zellen im Vergleich zu den anderen Genen deutlich geringer exprimiert. Dies konnte auch in den Patienten bestätigt werden. Die Gene *Ints2* und *Metap2* zeigten im murinen Zellsystem eine ähnlich niedrige Expression, was ebenfalls in den Patientendaten beobachtet wurde. Lediglich die Expression von *Klc4* war im Patientenmaterial herunterreguliert, während sie in den murinen Zellen hochreguliert nachgewiesen wurde.

4.3.9.2 Der Vergleich der ChIP- und Genexpressionsdaten mit Genexpressionsprofilen aus Patientenmaterial lieferte 39 gemeinsame, gleichsinnig regulierte TEL-AML1 Zielgene

Die im murinen induzierbaren Zellsystem identifizierten TEL-AML1-gebundenen Promotorbereiche sowie die mittels Genexpressionsanalyse ermittelten differentiell exprimierten Gene wurden mit den Genexpressionsprofilen der oben bereits erwähnten vier TEL-AML1-positiven Patientenproben korreliert (s. Abb. 4.25).

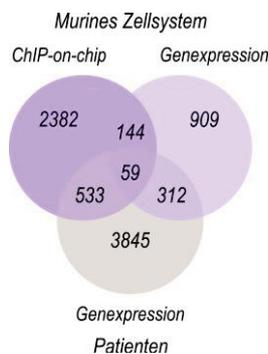


Abbildung 4.25 Schnittmengen der murinen ChIP- und Genexpressionsdaten mit Genexpressionsprofilen TEL-AML1 positiver Patienten. 59 der 203 im murinen induzierbaren Zellsystem durch ChIP und Genexpressionsanalyse identifizierten TEL-AML1 Zielgene zeigten auch im Patientenmaterial eine differentielle Expression (verglichen mit gesunden Probanden).

Wie in Abbildung 4.25 zu sehen konnten 59 Gene, die in der Schnittmenge der murinen ChIP- und Genexpressionsdaten gefunden wurden, auch in den Patientenproben als differentiell exprimiert nachgewiesen werden. Allerdings zeigten nicht alle gemeinsamen Gene eine gleichsinnige Regulation. Eine Auflistung der **39** gleichsinnig regulierten Gene ist in Tabelle 4.3 gezeigt. Hier sind zudem die fünf Gene, die ebenfalls in der Schnittmenge aus allen drei *screening*-Methoden des murinen Zellsystems zu finden sind, fett markiert und außerdem die nicht-exklusiven TEL-AML1 Zielgene farbig hinterlegt.

Tabelle 4.3 Sowohl im murinen Zellsystem als auch im Patientenmaterial identifizierte, gleichsinnig regulierte Gene. Angegeben ist die Identnummer (ID) der Gene als MGI (*mouse genome identifier*), das Gensymbol sowie seine Bezeichnung und seine Regulation auf mRNA-Ebene. Von den insgesamt 39 Genen waren 23 hoch- und 16 herunterreguliert (+ bzw. -). Zusätzlich sind die Gene, die ebenfalls im murinen Zellsystem in allen drei *screening*-Methoden nachgewiesen wurden, fett markiert und solche, bei denen es sich nicht um einzigartiges TEL-AML1 Zielgene handelt, farbig hinterlegt.

Gen ID	Symbol	Bezeichnung	Regulation (mRNA)	
			murines Zellsystem	Patient
MGI:1914381	<i>ACBD4</i>	acyl-Coenzyme A binding domain containing 4	+	+
MGI:1914007	<i>ADAT2</i>	adenosine deaminase, tRNA-specific 2, TAD2 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	-	-
MGI:109620	<i>ARVCF</i>	armadillo repeat gene deleted in velo-cardio-facial syndrome	+	+
MGI:1889505	<i>B3GNT2</i>	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 2	+	+
MGI:1859639	<i>CACNA1F</i>	calcium channel, voltage-dependent, alpha 1F subunit	-	-
MGI:1913586	<i>CENPP</i>	centromere protein P	+	+
MGI:88568	<i>CUX1</i>	cut-like homeobox 1	+	+
MGI:1914963	<i>DNAJC19</i>	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 19	-	-
MGI:95482	<i>FAH</i>	fumarylacetoacetate hydrolase	+	+
MGI:1913520	<i>FAM134B</i>	family with sequence similarity 134, member B	+	+
MGI:1352755	<i>GTSE1</i>	G two S phase expressed protein 1	+	+
MGI:96392	<i>ICAM1</i>	intercellular adhesion molecule 1	+	+
MGI:1917672	<i>INTS2</i>	integrator complex subunit 2	-	-
MGI:2441849	<i>LPP</i>	LIM domain containing preferred translocation partner in lipoma	+	+
MGI:2444818	<i>MICALL2</i>	MICAL-like 2	+	+
MGI:2183149	<i>NADK</i>	NAD kinase	-	-
MGI:1929485	<i>NIF3L1</i>	Ngg1 interacting factor 3-like 1 (<i>S. pombe</i>)	-	-
MGI:94203	<i>NUDT19</i>	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 19	-	-
MGI:1913637	<i>NUDT8</i>	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 8	-	-
MGI:1328337	<i>ORC1</i>	origin recognition complex, subunit 1	+	+
MGI:1927489	<i>PDLIM5</i>	PDZ and LIM domain 5	-	-
MGI:1918615	<i>PDSS2</i>	prenyl (solanesyl) diphosphate synthase, subunit 2	-	-
MGI:1914401	<i>PSMD9</i>	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 9	+	+
MGI:97813	<i>PTPRE</i>	protein tyrosine phosphatase, receptor type, E	+	+
MGI:2385107	<i>RAB7L1</i>	RAB7, member RAS oncogene family-like 1	-	-
MGI:1915727	<i>RMND5A</i>	required for meiotic nuclear division 5 homolog A (<i>S. cerevisiae</i>)	+	+
MGI:1352759	<i>RNF11</i>	ring finger protein 11	+	+
MGI:1913659	<i>RSL1D1</i>	ribosomal L1 domain containing 1	-	-
MGI:2178759	<i>RTN4IP1</i>	reticulon 4 interacting protein 1	-	-
MGI:96825	<i>SELENBP1</i>	selenium binding protein 1	+	+
MGI:1345278	<i>SLC29A2</i>	solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 2	-	-
MGI:1913563	<i>SMURF2</i>	SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2	-	-
MGI:2156003	<i>SNIP1</i>	Smad nuclear interacting protein 1	+	+
MGI:3582695	<i>TOR1AIP2</i>	torsin A interacting protein 2	+	+
MGI:1343458	<i>TRIP6</i>	thyroid hormone receptor interactor 6	+	+
MGI:2444350	<i>TTC39A</i>	tetratricopeptide repeat domain 39A	+	+
MGI:2145316	<i>TXNDC5</i>	thioredoxin domain containing 5	-	-
MGI:1096875	<i>WDFY3</i>	WD repeat and FYVE domain containing 3	+	+
MGI:99948	<i>ZFX3</i>	zinc finger homeobox 3	+	+

Diese 39 gleichsinnig regulierten Gene wurden ebenfalls einer funktionellen Annotation unterzogen, deren Ergebnis in Tabelle 4.4 aufgelistet ist. Insgesamt waren fünf GO-Termini angereichert, darunter auch die Regulation der Transkription, die Proteinlokalisierung und die NFκB Kaskade.

Tabelle 4.4 Überrepräsentierte GO-Termini biologischer Prozesse in der Schnittmenge „ChIP-on-chip + Genexpression“ des murinen Zellsystems und den Genexpressionsdaten TEL-AML1-positiver Patienten. Angegeben sind neben den GO-Termini die Anzahl der assoziierten Gene (insgesamt und als prozentualer Anteil), sowie der p-Wert und die Gennamen.

GO-Terminus	Anzahl	%	p-Wert	Gene
GO:0045449-regulation of transcription	7	18,4	0,421	ICAM1, NIF3L1, SNIP1, SMURF2, CUX1, ZFX3, PSMD9
GO:0006508-proteolysis	3	7,9	0,633	RNF11, SMURF2, PSMD9
GO:0008104-protein localization	3	7,9	0,533	SELENBP1, RAB7L1, DNAJC19
GO:0050877-neurological system process	3	7,9	0,709	B3GNT2, CACNA1F, DNAJC19
GO:0007249-I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade	2	5,3	0,048	SNIP1, TRIP6

Da die Schnittmenge zwischen den ChIP- und Genexpressionsdaten des murinen Zellsystems und den Genexpressionsprofilen TEL-AML1-positiver Patienten nur relativ wenige gleichsinnig regulierte Gene beinhaltete, stellte sich die Frage in wie weit die von TEL-AML1 gebundenen Promotorbereiche mit den im Patienten differenziell exprimierten Genen übereinstimmten. Wie in Abbildung 4.25 zu sehen umfasste diese Schnittmenge insgesamt 592 gemeinsame Gene. Die Kolokalisation der im murinen Zellsystem identifizierten, von TEL-AML1 gebundenen Promotorbereiche mit den im Patienten differenziell exprimierten Genen ist in Abbildung 4.26 gezeigt. Hierfür wurden die humanen Genexpressionsdaten auf homologe Bereiche im murinen Genom übertragen und die Lokalisation der entsprechenden Promotorbereiche bzw. Gene als Häufigkeitsverteilung entlang der murinen Chromosomen dargestellt. Dabei zeigte sich, dass Bereiche, die im murinen Zellsystem vermehrt durch TEL-AML1 gebunden nachgewiesen wurden in den meisten Fällen sehr gut mit Bereichen kolokalisierten, die im Patienten gehäuft differenziell exprimierte Gene beherbergten.

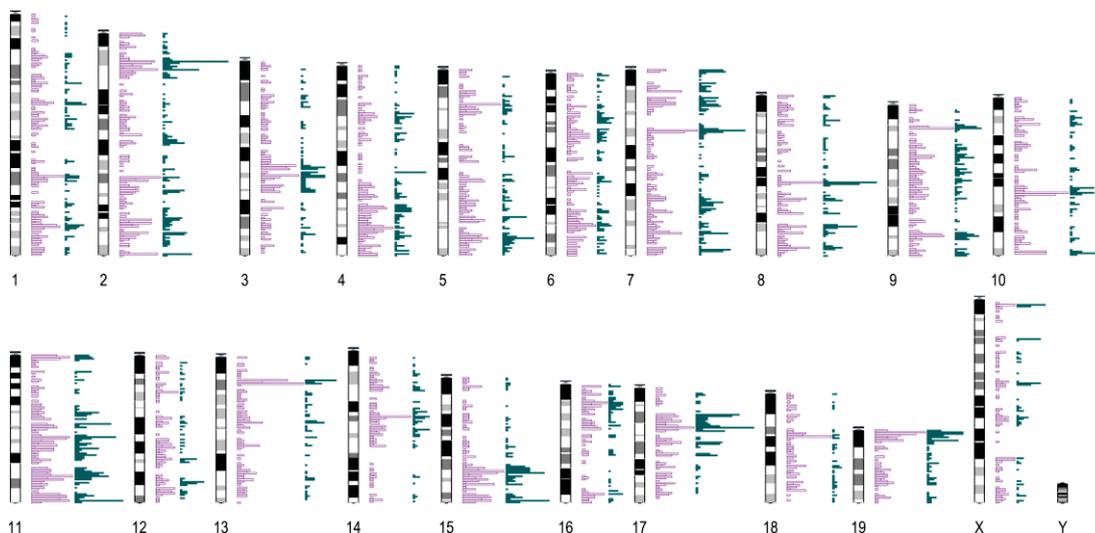


Abbildung 4.26 Kolokalisation der im murinen Zellsystem identifizierten, TEL-AML1 gebundenen Promotorbereiche (grün) und in Patientenmaterial differenziell exprimierten Gene (lila). Gezeigt sind die mittels ChIP-on-chip identifizierten, angereicherten Promotorregionen (ausgefüllte Balken) sowie die in TEL-AML1-positiven Patienten differenziell exprimierten Gene (leere Balken) als Häufigkeitsverteilung entlang der einzelnen murinen Chromosomen. Die Lokalisation der humanen Gene wurde hierfür auf die Lokalisation der homologen murinen Gene übertragen.

4.3.10 Beteiligung von mikro RNAs

Bei der Schnittmengenbildung der Ergebnisse aus den Genexpressions- und Proteomprofilen (vgl. 4.3.7) fielen 9 Gene bzw. Proteine auf, die gegensätzlich zueinander reguliert waren (s. Abb. 4.27). Eine mögliche Erklärung für eine Hochregulation auf mRNA-Ebene, aber eine verringerte Expression des entsprechenden Proteins – oder umgekehrt – könnte die Beteiligung einer ebenfalls misexprimierten mikro RNA (miR) sein.

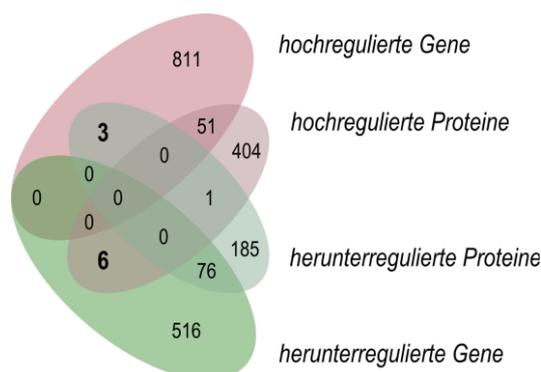


Abbildung 4.27 Kombinierte Analyse der differentiell exprimierten Gene (rot) und Proteine (grün). Die Schnittmengen zwischen gegensätzlich regulierten Genen und Proteinen (fett markiert) deuten auf eine eventuelle Beteiligung von mikro RNAs hin.

Um eventuell beteiligte mikro RNAs zu identifizieren wurden die in Tabelle 4.5 aufgelisteten Gene mit Hilfe von Target Scan und miR Base analysiert und erwartungsgemäß als potentielle Ziele diverser mikroRNAs identifiziert. Unter diesen waren wiederum zwei mikroRNAs, mmu-mir-19a/b und mmu-mir-325, die zudem als misexprimiert in dem verwendeten Zellsystem nachgewiesen werden konnten. Die höhere Expression der mmu-mir-19a/b könnte erklären, warum ihr potentielles Ziel Rab8b auf mRNA-Ebene hoch, aber auf Proteinebene herunterreguliert nachgewiesen wurde. Im Gegensatz dazu wurde Trmt1 auf mRNA-Ebene als herunter-, aber auf Proteinebene hochreguliert detektiert. Trmt1 konnte wiederum als potentielles Ziel der mmu-mir-325 identifiziert werden, welche im verwendeten Zellsystem als niedriger exprimiert nachgewiesen wurde.

Tabelle 4.5 Gegensätzlich regulierte Gene und Proteine lassen eine Beteiligung differentiell exprimierter mikro RNAs vermuten. Zwei der Gene/Proteine (grau unterlegt) wurden als potentielle Ziele zweier muriner mikro RNAs vorhergesagt, die wiederum differentiell im murinen Zellsystem exprimiert waren (durch Pfeile dargestellt).

Gen	Symbol	Regulation mRNA	Regulation Protein	
<i>Rbm16</i>		+	-	
<i>Rab8b</i>		+	-	mmu-mir-19a/b ↑
<i>Fam120a</i>		+	-	
<i>Cfl1</i>		-	+	
<i>Trmt1</i>		-	+	mmu-mir-325 ↓
<i>Parp1</i>		-	+	
<i>Gtpbp4</i>		-	+	
<i>Mlec</i>		-	+	
<i>Heatr1</i>		-	+	

4.4 Identifizierung von TEL-AML1 Zielgenen in stabil exprimierenden humanen B-Zell-Linien

Die Untersuchungen im murinen induzierbaren Zellsystem zeigten leider, dass das für die Induktion der TEL-AML1-Expression verwendete Mifepriston *per se* einen negativen Effekt auf die Proteinexpression hatte. Zudem ist die Übertragbarkeit der hier gewonnenen Erkenntnisse auf den Menschen fragwürdig. Daher sollten TEL-AML1 Zielgene ebenfalls in humanen Zellen identifiziert werden. Die bereits etablierte TEL-AML1-positive Zell-Linie REH kam hierfür leider nicht in Frage, da keine geeignete Kontrolle ohne TEL-AML1-Expression zur Verfügung steht. Da Patientenmaterial nur sehr begrenzt verfügbar ist und sich die Wahl geeigneter Kontrollen ebenfalls schwierig gestaltet, wurden Expressionsvektoren für AML1, TEL und TEL-AML1 kloniert und mit Hilfe dieser Vektoren stabile humane B-Zell-Linien, basierend auf der kommerziell erhältlichen B-Zell-Vorläufer Zell-Linie NALM6, generiert und für die weiteren Experimente verwendet.

4.4.1 Charakterisierung der stabil exprimierenden Zell-Linien

Die Generierung stabil AML1-, TEL- bzw. TEL-AML1 exprimierender humaner B-Zell-Linien (N-AML1, N-TEL bzw. N-TEL-AML1) erfolgte mittels Transfektion der entsprechenden Expressionskonstrukte in NALM6 Zellen und anschließender Selektion (vgl. 3.2.2). Als Kontrolle diente die mit einem entsprechenden CFP-Konstrukt generierte Zell-Linie (N-CFP). Alle Konstrukte trugen einen C-terminalen cMyc-tag. Die Expression der entsprechenden cDNA bzw. Proteine wurde mittels quantitativer PCR und Western Blot (s. Abb. 4.28) nachgewiesen.

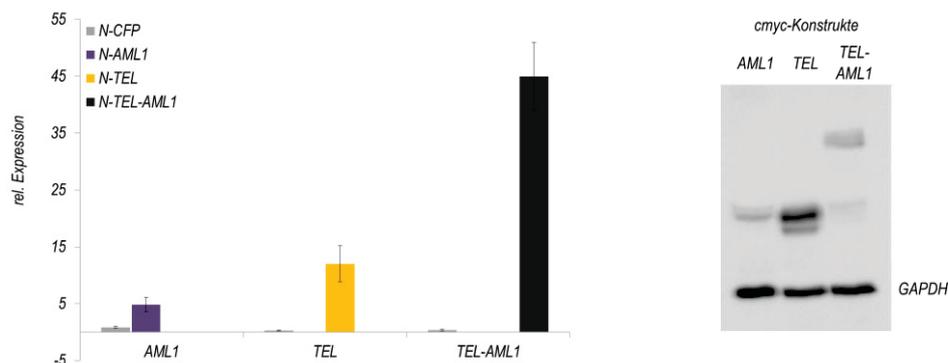


Abbildung 4.28 Nachweis der AML1-, TEL- bzw. TEL-AML1-Expression in den entsprechenden stabil exprimierenden NALM6 Zell-Linien (N-AML1, N-TEL, N-TEL-AML1) bzw. Kontrollzellen (N-CFP) mittels quantitativer PCR (qPCR, links) und Western Blot (rechts). Als endogene Kontrolle für die qPCR diente die Expression von GAPDH, als Kalibrator für die Berechnung der relativen Expression (y-Achse) wurden Wildtyp NALM6 Zellen verwendet. Die Detektion der Proteine in Lysaten der entsprechenden Zell-Linien erfolgte mit Hilfe eines cMyc-Antikörpers. Der gleichzeitige Nachweis von GAPDH diente der Kontrolle der gleichmäßigen Beladung des Gels.

Die stabil exprimierenden humanen Zell-Linien zeigten deutliche Unterschiede in der Expression der entsprechenden cDNA bzw. Proteine. Während auf mRNA-Ebene TEL-AML1 die höchste und AML1 die niedrigste Expression zeigte, wurde für TEL auf Proteinebene das stärkste Signal detektiert. Die Doppelbande, die in der Spur der TEL exprimierenden Zell-Linie zu sehen ist, resultierte vermutlich

aus den unter 1.4.2 beschriebenen beiden Isoformen, welche durch zwei alternative Translationsstarts auf der TEL-mRNA entstehen. Das schwache Signal, das TEL-AML1 auf Proteinebene zeigte, könnte allerdings auch ein Blottingartefakt sein, da größere Proteine sich oft schlechter auf die Membran transferieren lassen. Leider war es nicht möglich, Klone mit höherer AML1-Expression dauerhaft in Kultur zu halten, da dies offensichtlich nicht von den Zellen toleriert wurde.

Da sowohl in den AML1 als auch den TEL und den TEL-AML1 exprimierenden Zell-Linien immerhin eine deutliche Expression der cMyc-Konstrukte nachgewiesen werden konnte, wurden diese Zell-Linien für die folgenden ChIP-Experimente und Genexpressionsanalysen eingesetzt.

4.4.2 Chromatin-Immunpräzipitation

Die ChIP-Experimente mit den stabil exprimierenden humanen B-Zellen erfolgten mit magnetischen cMyc-micro *beads*, was eine spezifische Immunpräzipitation der entsprechenden Konstrukte ermöglichen sollte. Als Negativkontrolle diente hierbei eine CFP-cMyc exprimierende Zell-Linie. Die Kontrolle der Effektivität und Spezifität der einzelnen ChIP-Experimente erfolgte, wie bereits erwähnt, mittels quantitativer PCR (vgl. 3.3.6.5). Als Maß hierfür diente sowohl die Ausbeute der ChIP-Ansätze im Vergleich zum Ausgangsmaterial (Input) als auch der Anreicherungsfaktor des Promotorbereichs des bereits für TEL-AML1 beschriebenen Zielgens *GZMB* im Verhältnis zur IgG-Negativkontrolle (vgl. 3.3.6.5). Die relativen Anreicherungsfaktoren der beiden ChIP-Experimente, die letztendlich für die Array-Hybridisierung ausgewählt wurden, sind in Abbildung 4.14 gezeigt. Da für TEL bislang keine direkten Zielgene beschrieben wurden, konnte diese Kontrolle hierfür nicht verwendet werden. Allerdings wurden alle ChIP-Experimente wie bereits erwähnt mit magnetischen cMyc-*beads* unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Daher war davon auszugehen, dass die entsprechenden ChIP-Experimente mit TEL exprimierenden Zellen vergleichbar effektiv und spezifisch erfolgten wie die der anderen Zell-Linien. Die Anreicherungsfaktoren der drei unabhängigen ChIP-Experimente, die letztendlich für die Array-Hybridisierung ausgewählt wurden, sind in Abbildung 4.28 gezeigt.

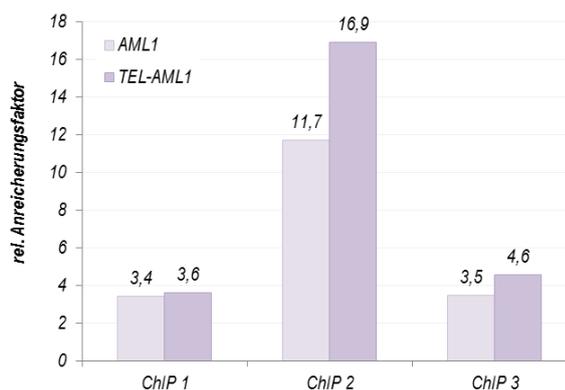


Abbildung 4.29 Anreicherung *GZMB* Promotorbereichs bezogen auf die Negativkontrollzellen (N-CFP) als Maß für die Effektivität und Spezifität der ChIP-Experimente. Als Grundlage für die Berechnung diente der Nachweis der Anreicherung dieses Promotorbereiches mittels quantitativer PCR an DNA aus AML1 (N-AML1) und TEL-AML1 (N-TEL-AML1) exprimierenden Zellen, aufgereinigt nach ChIP mit cMyc-micro *beads*. Dargestellt sind die drei unabhängigen ChIP-Experimente, die für die Hybridisierung auf humane RefSeq Promotorarrays ausgewählt wurden.

Wie in Abbildung 4.29 zu sehen lagen die Anreicherungsfaktoren der drei ChIP-Experimente zwischen 3,4 und 16,9. Dabei waren die ChIP-Experimente 1 und 3 mit Anreicherungsfaktoren von 3,4 bzw. 3,5 (N-AML1) und 3,6 bzw. 4,6 (N-TA) insgesamt nicht so effektiv wie ChIP 2 mit Anreicherungsfaktoren

von 11,7 (N-AML1) und 16,9 (N-TA). Die Auswertung der Rohdaten ihrer Promotorarray-Hybridisierung erfolgte wie unter 3.6.1 beschrieben. Insgesamt wurden für AML1 **1061**, für TEL **2551** und für TEL-AML1 **3562** spezifisch gebundene Promotorbereiche identifiziert. Mit Hilfe der auf diese Weise für AML1 und TEL sowie für TEL-AML1 identifizierten potentiellen Zielgene wurden anschließend die exklusiven Zielgene der einzelnen Proteine durch Subtraktion der nicht-einzigartigen Gene bestimmt. Das Ergebnis der Schnittmengenbildung ist in Abbildung 4.30 dargestellt.

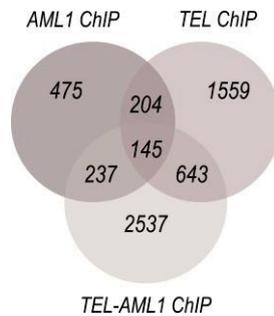


Abbildung 4.30 Kombinierte Auswertung der Ergebnisse aus den ChIP-on-chip-Experimenten für AML1, TEL und TEL-AML1. Die Zahlen geben die in den jeweiligen Experimenten nachgewiesenen Promotorbereiche an. Die farbigen Kreise stellen die Schnittmengen der jeweiligen Ergebnisse dar.

Wie in Abbildung 4.30 zu sehen wurden insgesamt für AML1 **1061**, für TEL **2551** und für TEL-AML1 **3562** spezifisch gebundene Promotorbereiche identifiziert. Von den AML1-gebundenen Promotorbereichen wurden 382 (36%) auch in den TEL-AML1 ChIP-Experimenten nachgewiesen, 788 (30,9%) der durch TEL gebundenen Promotorbereiche wurden ebenfalls in den TEL-AML1 ChIP-Experimenten identifiziert und 145 Promotorbereiche wurden durch alle drei Proteine gebunden nachgewiesen. Insgesamt konnten für AML1 **475**, für TEL **1559** und für TEL-AML1 **2537** exklusive Zielgene identifiziert werden.

4.4.3 Genexpressionsanalyse

Die Genexpressionsanalysen erfolgten an Zellen aus den gleichen Ansätzen, die auch für die ChIP-Experimente verwendet wurden. Hierfür wurde die Gesamt-RNA aus jeweils 5 Mio. Zellen mittels *RNeasy Kit* (Qiagen) aufgereinigt und anschließend die Integrität und Konzentration der RNA mit Hilfe eines RNA 6000 Nano chips im 2100 Bioanalyzer bestimmt (vgl. 3.5). Die RIN-Werte der isolierten RNA lagen dabei zwischen 9,7 und 10,0 (s. Abb. 4.31).

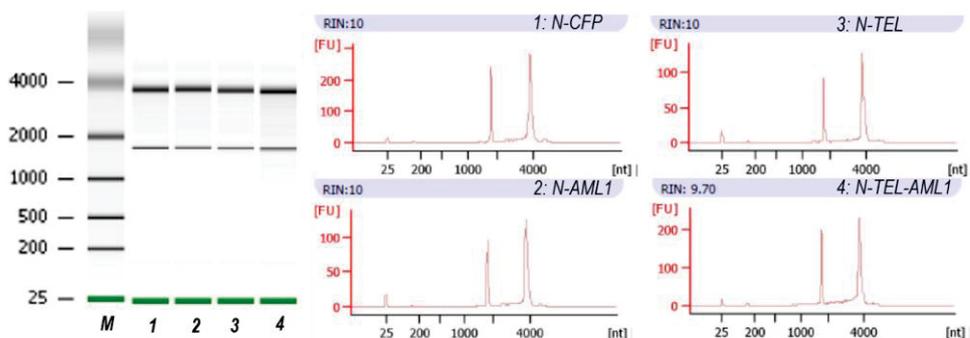


Abbildung 4.31 Exemplarisches Ergebnis einer RNA-Analyse mit Hilfe des 2100 Bioanalyzers unter Verwendung eines RNA 6000 Nano chips. Dargestellt ist das Bild der Gelelektrophorese (links) sowie die dazugehörigen Elektropherogramme (rechts) von RNA, die aus den humanen stabil exprimierenden Zell-Linien N-CFP (1), N-AML1 (2), N-TEL (3) und N-TEL-AML1 (4) isoliert wurde. Die Integrität der RNA ist als RIN-Wert (*RNA integrity number*) angegeben und lag zwischen 9,7 und 10,0.

Die anschließende Probenvorbereitung sowie die Hybridisierung und alle weiteren Schritte wurden von der Firma Miltenyi durchgeführt. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte wie unter 3.6.1 beschrieben. Für die Bestimmung der differentiell exprimierten Gene wurden die Genexpressionsprofile AML1-, TEL- bzw. TEL-AML1-exprimierender Zellen mit denen der Kontrollzellen (CFP) verglichen. Als Referenz diente hierbei die entsprechende Wildtyp Zell-Linie NALM6. Insgesamt konnten für N-AML1 820 differentiell exprimierte Gene detektiert werden. Von diesen waren im Vergleich zu den Kontrollzellen 518 hochreguliert und 302 herunterreguliert. Für N-TEL wurden **1163** differentiell exprimierte Gene identifiziert, 702 davon waren im Vergleich zu den Kontrollzellen hochreguliert und 461 herunterreguliert. Für N-TEL –AML1 konnten **1011** differentiell exprimierte Gene identifiziert werden, 436 davon waren im Vergleich zu den Kontrollzellen hochreguliert und 575 herunterreguliert.

4.4.4 Kombinierte Datenanalyse zur Identifizierung direkter Zielgene

Wie bereits für das murine Zellsystem unter 4.3.5 beschrieben, wurden als direkte von AML1, TEL bzw. TEL-AML1 regulierte Zielgene die Schnittmengen aus den ChIP-on-chip-Experimenten und den Genexpressionsprofilen angesehen. Abbildung 4.32 zeigt das Ergebnis dieser Schnittmengenbildung für die Experimente mit den AML1-, TEL- und TEL-AML1-exprimierenden Zell-Linien.

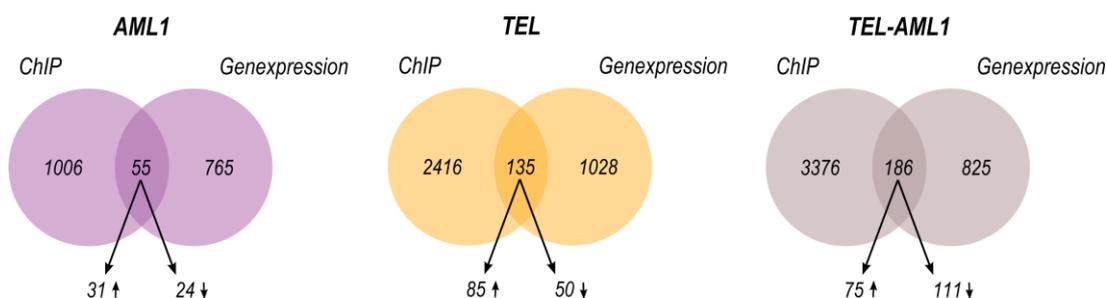


Abbildung 4.32 Schnittmengen der Ergebnisse aus ChIP- und Genexpressionsanalysen für die stabil AML1-, TEL- und TEL-AML1 exprimierenden humanen Zell-Linien. Dargestellt sind die durch ChIP ermittelten, spezifisch gebundenen Promotorbereiche sowie die im Vergleich zu Kontrollzellen differentiell exprimierten Gene. Für die Gene innerhalb der Schnittmengen aus ChIP- und Genexpressionsergebnissen ist zudem die Anzahl hoch- bzw. herunterregulierter Gene angegeben (durch Pfeile entsprechend gekennzeichnet).

Diese beinhaltet im Fall der AML1 exprimierenden Zell-Linie insgesamt **55** Gene, von denen 31 hoch- und 24 herunterreguliert waren. Für die TEL exprimierende Zell-Linie enthielt diese Schnittmenge insgesamt **135** differentiell exprimierte Gene, 85 hoch- und 50 herunterreguliert. Die Experimente der TEL-AML1 exprimierenden Zell-Linie lieferten insgesamt **186** differentiell exprimierte Gene, von denen 75 hoch- und 111 herunterreguliert waren. Eine Auflistung dieser Gene ist in Anhang 8.6 zu finden. In diesen Tabellen sind zudem die Gene markiert, die auch in anderen Zell-Linien als Zielgene identifiziert wurden. Als exklusive Zielgene blieben demnach für AML1 **42**, für TEL **115** und für TEL-AML1 **167** Gene übrig. Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit hauptsächlich TEL-AML1 Zielgene identifiziert werden sollten, erfolgten die weiterführenden Auswertungen und Analysen nur mit den Ergebnissen der Zell-Linie N-TEL-AML1. Die Daten der anderen beiden Zell-Linien dienten lediglich der Aufdeckung exklusiver TEL-AML1 Zielgene.

4.4.5 TEL-AML1 ist unter anderem an der Regulation der Apoptose und der negativen Regulation der Zellproliferation beteiligt

Wie für das murine Zellsystem bereits beschrieben sollte die Aufdeckung der durch die TEL-AML1 Expression betroffenen biologischen Prozesse eine Einschätzung der Veränderungen im Hinblick auf die TEL-AML1 induzierte Leukämogenese erlauben. Daher wurden die 167 direkten exklusiven TEL-AML1 Zielgene, die mittels ChIP-on-chip und Genexpressionsanalyse identifiziert werden konnten, mittels DAVID (s. 3.6.3) wie bereits unter 4.3.6 erwähnt funktionell annotiert. Die innerhalb der Schnittmenge zwischen ChIP-on-chip und den differentiell exprimierten Genen angereicherten 19 GO-Termini sind in Abbildung 4.33 gezeigt.

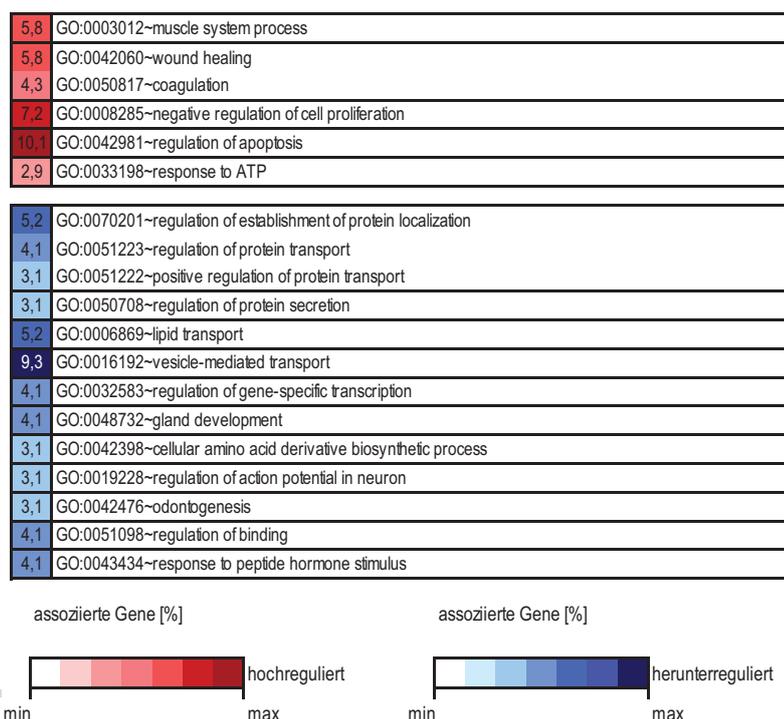


Abbildung 4.33 Überrepräsentierte GO-Termini biologischer Prozesse in der Schnittmenge „ChIP-on-chip + Genexpression“ der TEL-AML1 exprimierenden humanen Zell-Linie ($p < 0,05$). Die Datenanalyse erfolgte mit Hilfe der Datenbank DAVID an 167 exklusiven TEL-AML1 Zielgenen, getrennt nach hoch- bzw. herunterregulierten Genen (rot bzw. blau). Die Zahlen geben den prozentualen Anteil Gene an, die mit dem entsprechenden GO-Terminus (links) assoziiert waren.

Insgesamt waren sechs GO-Termini mit den hoch- und 13 GO-Termini mit den herunterregulierten Genen assoziiert. Unter den hochregulierten Genen war die Regulation der Apoptose der insgesamt am stärksten überrepräsentierte biologische Prozess. Daneben waren Prozesse wie die negative Regulation der Zellproliferation, die Wundheilung und Prozesse des Muskelsystems angereichert. Unter den herunterregulierten Genen war der Vesikel-vermittelte Transport der am stärksten überrepräsentierte biologische Prozess. Desweiteren waren Prozesse wie die Regulation der Proteinlokalisierung, der Lipidtransport und die Regulation der genspezifischen Transkription angereichert.

4.4.6 Vergleichende Darstellung der funktionellen Annotationen

Wie bereits für das murine Zellsystem unter 4.3.8 beschrieben sollten auch im humanen Zellsystem die Gemeinsamkeiten bzw. Unterschiede der durch AML1, TEL bzw. TEL-AML1 regulierten biologischen Prozesse näher untersucht werden. Die Korrelation der für die einzelnen Transkriptionsfaktoren detektierten Zielgene zeigte, dass 36% der von AML1 gebundenen Promotorbereiche und 30,9% der Zielgene von TEL ebenfalls in den TEL-AML1 ChIP-Experimenten nachgewiesen wurden. Dies deutete daher auch im humanen Zellsystem nicht auf eine verstärkte Regulation der AML1-Zielgene durch TEL-AML1 hin. Da es sich bei 71,2% der TEL-AML1 gebundenen Promotorbereiche um exklusive Zielgene handelte, während für TEL lediglich 61,1% und für AML1 sogar nur 44,8% der gebundenen Regionen als exklusive Zielgene identifiziert wurden, spricht eher dafür, dass die von TEL-AML1 regulierten Gene und damit auch die betroffenen biologischen Prozesse sich deutlich von AML1- und TEL-regulierten Prozessen unterscheiden. Wie für das murine Zellsystem zeigte auch hier der Vergleich der in den TEL-AML1 ChIP-Experimenten angereicherten GO-Termini mit denen der AML1- bzw. TEL-ChIP, dass viele der betroffenen biologischen Prozesse in allen drei Experimentgruppen nachgewiesen wurden (s. Anhang 8.5). Daher wurden lediglich die GO-Termini miteinander verglichen, die nicht gleichzeitig in allen drei ChIP-Ergebnisgruppen gefunden wurden. Dieser Vergleich ist in Abbildung 4.34 dargestellt.

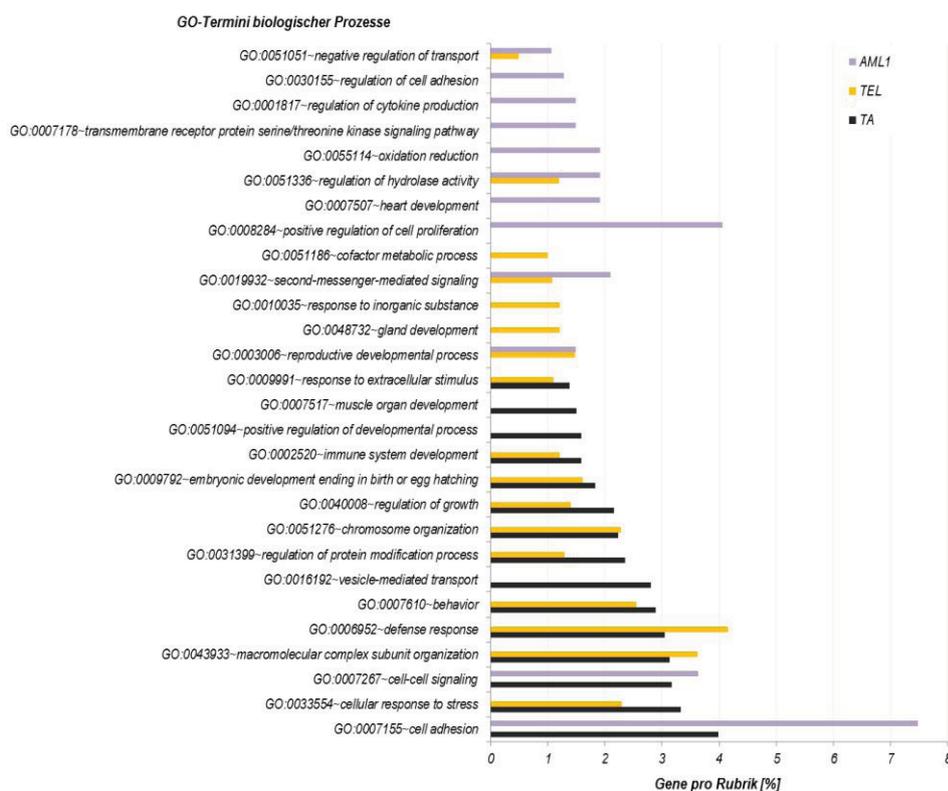


Abbildung 4.34 GO-Termini, die nicht in allen drei Ergebnisgruppen der AML1-, TEL- und TEL-AML1-ChIP gefunden wurden. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der assoziierten Gene bezogen auf die Gesamtzahl der in den einzelnen ChIP-Experimenten nachgewiesenen Zielgene für AML1 (lila), TEL (gelb) und TEL-AML1 (schwarz).

Hier ist zu erkennen, dass TEL-AML1 deutlich mehr gemeinsame GO-Termini mit TEL (10) hat als mit AML1 (2). Lediglich drei GO-Termini waren ausschließlich in den TEL-AML1 ChIP-Ergebnissen angereichert. Prozesse wie die Stressantwort, die Regulation von Proteinmodifikationen und des Zellwachstums, die Organisation von Chromosomen, die Entwicklung des Immunsystems und die Antwort auf extrazelluläre Stimuli konnten sowohl in den Ergebnissen für TEL als auch für TEL-AML1 nachgewiesen werden. Bei den für AML1 und für TEL-AML1 detektierten Prozessen handelte es sich um die Zell-Adhäsion und Zell-Zell-Signalwege. Desweiteren wurden 13 biologische Prozesse nur für AML1 bzw. TEL, nicht aber für TEL-AML1 detektiert. Vergleicht man diese Ergebnisse mit den entsprechenden Resultaten für das murine Zellsystem fällt auf, dass es nur sehr wenige Übereinstimmungen gibt. Lediglich die Organisation von Chromosomen wurde in beiden Zellsystemen mittels ChIP sowohl für TEL als auch TEL-AML1, nicht aber für AML1 als überrepräsentierter biologischer Prozess nachgewiesen.

4.4.7 Der Vergleich der ChIP- und Genexpressionsdaten mit Genexpressionsprofilen aus Patientenmaterial lieferte 43 gemeinsame, gleichsinnig regulierte TEL-AML1 Zielgene

Die Gültigkeit der Ergebnisse der ChIP-on-chip und Genexpressionsanalysen der TEL-AML1-positiven NALM6-Zellen sollte durch einen Vergleich mit Genexpressionsdaten der bereits oben erwähnten Patientenproben bestätigt werden. Wie in Abb. 4.35 zu sehen wurden 75 gemeinsame Gene in allen drei Ergebnisgruppen identifiziert.

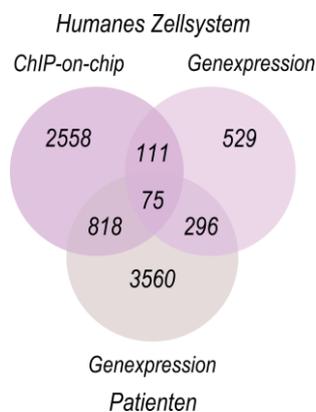


Abbildung 4.35 Schnittmengen der ChIP- und Genexpressionsdaten der stabil exprimierenden humanen TEL-AML1-positiven Zell-Linie mit Genexpressionsprofilen TEL-AML1 positiver Patienten. 75 der 186 im humanen Zellsystem durch ChIP und Genexpressionsanalyse identifizierten TEL-AML1 Zielgene zeigten auch im Patientenmaterial eine differentielle Expression (verglichen mit gesunden Probanden).

Allerdings beinhalten diese Schnittmengen keine Informationen über die Regulation der Expression. Daher sind unter den 75 Genen, die in Zell-Linie und Patienten-Daten gefundenen wurden 32 Gene, die als gegensätzlich reguliert exprimiert nachgewiesen wurden. Von den restlichen **43** Genen waren 21 hochreguliert und 22 herunterreguliert. Eine Auflistung dieser gleichsinnig regulierten Gene ist in Tabelle 4.6 gezeigt. Hier sind zudem die Gene farbig markiert, bei denen es sich nicht um exklusive TEL-AML1 Zielgene handelt.

Tabelle 4.6 Sowohl im humanen Zellsystem als auch im Patientenmaterial identifizierte, gleichsinnig regulierte Gene. Von den insgesamt 43 Genen waren 21 hoch- und 22 herunterreguliert (+ bzw. -). Die Gene, bei denen es sich nicht um exklusive TEL-AML1 Zielgene handelt sind farbig markiert.

Gen ID	Symbol	Bezeichnung	Regulation (mRNA)	
			humane Zell-Linie	Patient
78	<i>ABLIM1</i>	actin binding LIM protein 1	-	-
165	<i>ACTN3</i>	actinin, alpha 3	+	+
17811	<i>AMOTL1</i>	angiomin like 1	+	+
24100	<i>APOBEC3H</i>	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3H	+	+
32403	<i>C17ORF76</i>	chromosome 17 open reading frame 76	+	+
33504	<i>C17ORF87</i>	chromosome 17 open reading frame 87	-	-
21573	<i>C6ORF192</i>	chromosome 6 open reading frame 192	-	-
13937	<i>C6ORF25</i>	chromosome 6 open reading frame 25	+	+
15460	<i>CACNA2D3</i>	calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 3	-	-
1610	<i>CCR9</i>	chemokine (C-C motif) receptor 9	-	-
1704	<i>CD84</i>	CD84 molecule	-	-
26036	<i>COMMD8</i>	COMM domain containing 8	-	-
2359	<i>CRIM1</i>	cysteine rich transmembrane BMP regulator 1 (chordin-like)	+	+
23115	<i>EAF2</i>	ELL associated factor 2	-	-
3157	<i>EDA</i>	ectodysplasin A	-	-
23522	<i>FAM171A1</i>	family with sequence similarity 171, member A1	+	+
26178	<i>FHOD3</i>	formin homology 2 domain containing 3	+	+
4685	<i>GUCY1A3</i>	guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3	+	+
4782	<i>HIST1H4D</i>	histone cluster 1, H4d	+	+
5464	<i>IGF1</i>	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	-	-
5992	<i>IL1B</i>	interleukin 1, beta	+	+
4504	<i>LGR5</i>	leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 5	+	+
6667	<i>LPA</i>	lipoprotein, Lp(a)	-	-
25874	<i>MFSD1</i>	major facilitator superfamily domain containing 1	-	-
7105	<i>MITF</i>	microphthalmia-associated transcription factor	-	-
35422	<i>NEURL1B</i>	neuralized homolog 1B (Drosophila)	+	+
16244	<i>NPEPL1</i>	aminopeptidase-like 1	-	-
14311	<i>NUAK1</i>	NUAK family, SNF1-like kinase, 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:14311]	-	-
15173	<i>OR4D10</i>	olfactory receptor, family 4, subfamily D, member 10	+	+
23719	<i>PGAP3</i>	post-GPI attachment to proteins 3	-	-
17736	<i>RHOQ</i>	ras homolog gene family, member Q	-	-
10740	<i>SEMA6C</i>	sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6C	+	+
8952	<i>SERPINB8</i>	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 8	-	-
10923	<i>SLC16A2</i>	solute carrier family 16, member 2 (monocarboxylic acid transporter 8)	+	+
23097	<i>SLC29A4</i>	solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 4	+	+
11068	<i>SLC8A1</i>	solute carrier family 8 (sodium/calcium exchanger), member 1	+	+
24133	<i>STAP1</i>	signal transducing adaptor family member 1	-	-
11480	<i>SVIL</i>	supervillin	+	+
20474	<i>TMC8</i>	transmembrane channel-like 8	-	-
25913	<i>TMEM87B</i>	transmembrane protein 87B	-	-
29323	<i>WDFY4</i>	WDFY family member 4	-	-
29416	<i>ZNF618</i>	zinc finger protein 618	+	+
25736	<i>ZNF669</i>	zinc finger protein 669	+	+

Die 43 gleichsinnig regulierten Gene wurden ebenfalls einer funktionellen Annotation mittels DAVID unterzogen, deren Ergebnis in Tabelle 4.7 aufgelistet ist. Mit 7 Genen (entsprechen 17,5%) war auch hier die Regulation der Transkription der am stärksten überrepräsentierte biologische Prozess. Neben der Transkriptionsregulation waren GO-Termini biologischer Prozesse wie der Regulation der Proteinlokalisierung und des programmierten Zelltods angereichert.

Tabelle 4.7 Überrepräsentierte GO-Termini biologischer Prozesse in der Schnittmenge „ChIP-on-chip + Genexpression“ des humanen Zellsystems und den Genexpressionsdaten TEL-AML1-positiver Patienten. Angegeben sind neben den GO-Termini die Anzahl der assoziierten Gene (insgesamt und als prozentualer Anteil), sowie der p-Wert und die Gennamen.

GO-Terminus	Anzahl	%	p-Wert	Gene
GO:0045449~regulation of transcription	7	17,5	0,421	<i>RHOQ, IL1B, IGF1, ZNF669, EAF2, EDA, ZNF618</i>
GO:0042592~homeostatic process	4	10,0	0,187	<i>CCR9, SLC8A1, IL1B, IGF1</i>
GO:0032880~regulation of protein localization	3	7,5	0,031	<i>RHOQ, IL1B, EDA</i>
GO:0043067~regulation of programmed cell death	3	7,5	0,488	<i>IL1B, IGF1, ACTN3</i>

Wie im murinen Zellsystem so beinhaltet auch die Schnittmenge zwischen den ChIP- und Genexpressionsdaten der humanen TEL-AML1 exprimierenden Zell-Linie und den Genexpressionsprofilen TEL-AML1-positiver Patienten nur relativ wenige gleichsinnig regulierte Gene. Daher sollte ebenfalls aufgeklärt werden, in wie weit die von TEL-AML1 gebundenen Promotorbereiche mit den im Patienten differenziell exprimierten Genen übereinstimmen. Wie in Abbildung 4.35 zu sehen umfasste diese Schnittmenge insgesamt 893 gemeinsame Gene. Die Kolokalisation der im humanen Zellsystem identifizierten, von TEL-AML1 gebundenen Promotorbereiche mit den im Patienten differenziell exprimierten Genen ist in Abbildung 4.36 gezeigt. Hierfür wurde die Lokalisation der entsprechenden Promotorbereiche bzw. Gene als Häufigkeitsverteilung entlang der humanen Chromosomen dargestellt. Dabei zeigte sich wie im murinen Zellsystem, dass Bereiche, die in der humanen Zell-Linie vermehrt durch TEL-AML1 gebunden nachgewiesen wurden in den meisten Fällen sehr gut mit Bereichen kolokalisierten, die im Patienten gehäuft differenziell exprimierte Gene beherbergten.

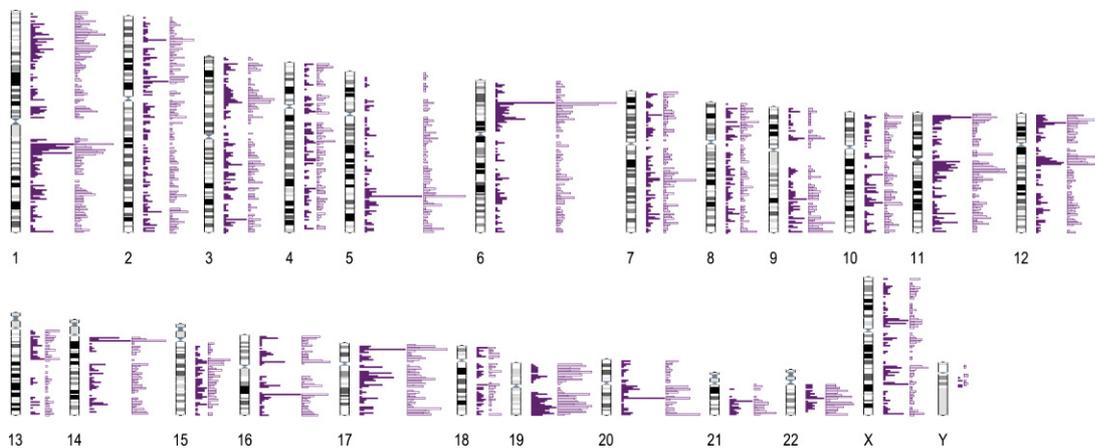


Abbildung 4.36 Kolokalisation der im humanen Zellsystem identifizierten, TEL-AML1 gebundenen Promotorbereiche und in Patientenmaterial differenziell exprimierten Gene. Gezeigt sind die mittels ChIP-on-chip identifizierten, angereicherten Promotorregionen (ausgefüllte Balken) sowie die in TEL-AML1-positiven Patienten differenziell exprimierten Gene (leere Balken) als Häufigkeitsverteilung entlang der einzelnen humanen Chromosomen.

4.5 Vergleich der TEL-AML1 Zielgene in murinen und humanen Zell-Linien

4.5.1 Korrelation TEL-AML1 gebundener Promotorbereiche

Die von TEL-AML1 gebundenen Promotorbereiche potentieller Zielgene sind vermutlich einer der Schlüssel zum Verständnis, wie dieser chimäre Transkriptionsfaktor das Genexpressionsprofil der betroffenen Zellen hin zu einem prätransformierten Stadium verändert. Daher sollte ein Vergleich zwischen den im murinen Zellsystem und in der humanen Zell-Linie nachgewiesenen Promotorbereichen helfen, die generierten Daten hinsichtlich ihrer Übertragbarkeit auf unterschiedliche Spezies zu validieren. Von den in den ChIP-Experimenten identifizierten potentiellen TEL-AML1 Genen konnten 457 sowohl im murinen (entspricht 17,9%) als auch im humanen Zellsystem (entspricht 18%) detektiert werden. Stellt man die insgesamt in den beiden Spezies gefundenen Promotorbereiche einander gegenüber, lässt sich erkennen, dass die Verteilung der angereicherten Regionen gut miteinander korrelierte (s. Abb. 4.37). Hierfür wurde wiederum die Lokalisation der murinen Promotorbereiche auf die homologen Bereiche im humanen Genom übertragen.

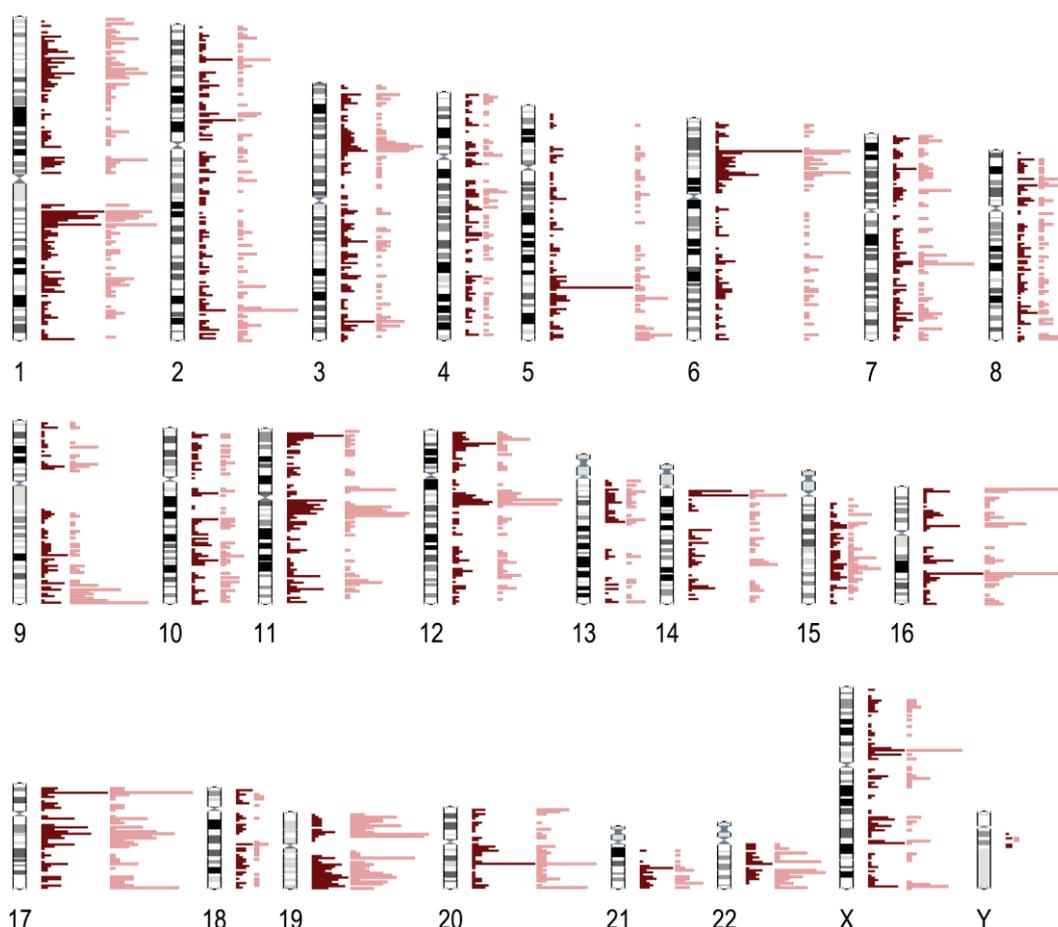


Abbildung 4.37 Lokalisation der TEL-AML1 gebundenen Promotorbereiche innerhalb des humanen Genoms. Gezeigt sind die mittels ChIP-on-chip identifizierten, angereicherten Promotorenregionen als Häufigkeitsverteilung (Balken) entlang der einzelnen Chromosomen. Die dunklen Balken repräsentieren die im humanen Zellsystem identifizierten Promotorbereiche, die im murinen Zellsystem nachgewiesenen Promotorregionen sind durch helle Balken dargestellt. Die Lokalisation der murinen Gene wurde hierfür auf die entsprechenden homologen Bereiche im humanen Genom übertragen.

Um einzuschätzen wie positiv oder negativ die 457 übereinstimmenden Gene zu bewerten waren, wurden auch die Ergebnisse der anderen ChIP-Experimente miteinander verglichen. Die Schnittmengen der ChIP-Ergebnisse des murinen und humanen Zellsystem für alle drei Transkriptionsfaktoren AML1, TEL und TEL-AML1 ist in Abbildung 4.38 dargestellt. Hier ist zu sehen, dass die Schnittmenge für AML1 mit 51 sowohl im murinen als auch im humanen Zellsystem nachgewiesenen Genen mit Abstand am kleinsten war. Allerdings wurden für AML1 auch in beiden Spezies deutlich weniger Promotorbereiche detektiert als in den ChIP-Experimenten mit TEL bzw. TEL-AML1. Für TEL wurden deutlich mehr Promotorbereiche in beiden Spezies nachgewiesen und dementsprechend war die Schnittmenge mit 162 Genen auch deutlich größer als die für AML1. Die ChIP-Experimente mit TEL-AML1 lieferten insgesamt die meisten spezifisch gebundenen Promotorbereiche und daher auch die größte, wie oben bereits erwähnt 457 Gene umfassende Schnittmenge.

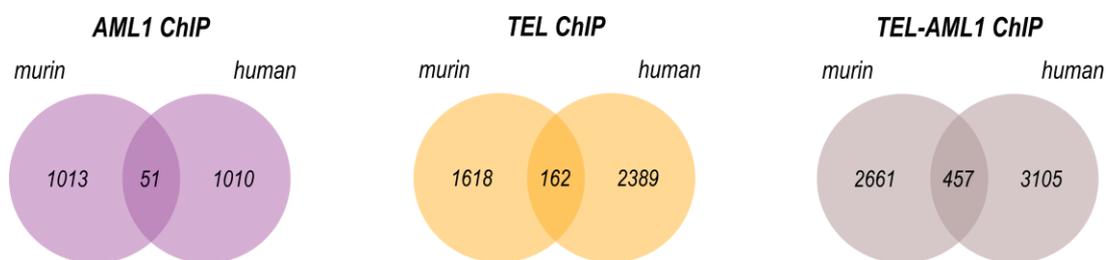


Abbildung 4.38 Schnittmengen der Ergebnisse der ChIP-Experimente für AML1, TEL und TEL-AML1 im murinen und humanen Zellsystem. Dargestellt sind die in den entsprechenden Zell-Linien durch ChIP ermittelten, spezifisch gebundenen Promotorbereiche sowie die jeweils übereinstimmenden Gene.

Die funktionelle Annotation der Gene innerhalb der Schnittmengen für die einzelnen Transkriptionsfaktoren sollte einen Einblick in die jeweils durch die betroffenen Gene regulierten biologischen Prozesse liefern (s. Tab. 4.8). Der Vergleich der angereicherten GO-Termini diente dabei der Ermittlung von Gemeinsamkeiten oder Unterschieden zwischen TEL-AML1 und den beiden Wildtyp Proteinen. Während für AML1 lediglich vier angereicherte GO-Termini gefunden wurden, waren für TEL zwölf GO-Termini und für TEL-AML1 48 GO-Termini überrepräsentiert. Überraschenderweise gab es zwischen den GO-Termini der einzelnen Proteine keine Übereinstimmungen außer der Zellmigration, die sowohl in den ChIP-Ergebnissen für TEL als auch für TEL-AML1 überrepräsentiert war. Dieses Ergebnis deutet ebenfalls darauf hin, dass die von TEL-AML1 regulierten biologischen Prozesse zum größten Teil nicht mit den durch AML1 oder TEL beeinflussten Prozessen übereinstimmen, sondern dass TEL-AML1 im Gegenteil eher eine individuelle Funktion innerhalb der Zelle ausübt.

Tabelle 4.8 Überrepräsentierte GO-Termini biologischer Prozesse in der Schnittmenge der ChIP-Ergebnisse für das murine und das humane Zellsystem und der drei Transkriptionsfaktoren AML1 (lila), TEL (gelb) und TEL-AML1 (grau) Angegeben sind neben den GO-Termini die Anzahl der assoziierten Gene (insgesamt und als prozentualer Anteil), sowie der p-Wert und die Gennamen. Übereinstimmende GO-Termini sind entsprechend farbig markiert. Die Tabelle wird auf den nächsten beiden Seiten fortgesetzt.

AML1-ChIP				
GO-Terminus	Anzahl	%	p-Wert	Gene
GO:0006813-potassium ion transport	5	9,8	0,001	<i>KCNJ16, KCNJ15, KCNC3, KCNAB3, KCNN3</i>
GO:0001974-blood vessel remodeling	2	3,9	0,052	<i>MEF2C, SEMA3C</i>
GO:0012502-induction of programmed cell death	3	5,9	0,062	<i>COL4A3, MAL, SP110</i>
GO:0019226-transmission of nerve impulse	4	7,8	0,094	<i>COL4A4, KCNN3, PCDHB14, MAL</i>

TEL-ChIP				
GO-Terminus	Anzahl	%	p-Wert	Gene
GO:0051960~regulation of nervous system development	6	3,7	0,009	<i>ISL2, ATOH1, EYA1, NTF3, EIF2AK3, NKX6-1</i>
GO:0030595~leukocyte chemotaxis	3	1,9	0,022	<i>IL16, ITGA1, ITGB2</i>
GO:0050767~regulation of neurogenesis	5	3,1	0,027	<i>ISL2, ATOH1, EYA1, NTF3, NKX6-1</i>
GO:0051960~regulation of nervous system development	6	3,7	0,029	<i>ISL2, EYA1, ATOH1, NTF3, EIF2AK3, NKX6-1</i>
GO:0045165~cell fate commitment	5	3,1	0,036	<i>ISL2, EYA1, ATOH1, NTF3, NKX6-1</i>
GO:0060284~regulation of cell development	6	3,7	0,037	<i>ISL2, EYA1, ATOH1, HDAC1, NTF3, NKX6-1</i>
GO:0016477~cell migration	7	4,3	0,038	<i>ATOH1, IL16, DNER, MET, PRSS3, ITGA1, ITGB2</i>
GO:0042490~mechanoreceptor differentiation	3	1,9	0,038	<i>ATOH1, NTF3, CLIC5</i>
GO:0007601~visual perception	6	3,7	0,045	<i>PROM1, GJA8, CRYGD, RPGR, OPN1SW, CNGB3, SLC23A2, SLC17A1, TRPV3, AQP4, SLC25A44, TCMO3, CNGB3, SLC5A10, SLC46A1</i>
GO:0055085~transmembrane transport	9	5,6	0,045	<i>CNGB3, SLC5A10, SLC46A1</i>
GO:0010817~regulation of hormone levels	5	3,1	0,047	<i>KLK6, UGT1A5, CYP11B2, DUOX1, EIF2AK3</i>
GO:0021510~spinal cord development	3	1,9	0,047	<i>ISL2, HOXB8, NKX6-1</i>
TEL-AML1-ChIP				
GO-Terminus	Anzahl	%	p-Wert	Gene
GO:0043413~biopolymer glycosylation	9	2,0	0,001	<i>MGAT2, ST3GAL3, GANAB, B3GALT2, ST3GAL5, B3GALT5, ST8SIA5, OGT, DDOST</i>
GO:0016477~cell migration	16	3,6	0,003	<i>ICAM1, PAX6, PEX5, CD2AP, IL10, LAMA1, ROBO1, PTK2B, ITGB1BP1, AAMP, IL1B, POU4F1, PPAP2B, DCLK1, NKX2-3, FN1</i>
GO:0050869~negative regulation of B cell activation	4	0,9	0,006	<i>BTLA, PAWR, FOXP3, IL10</i>
GO:0050672~negative regulation of lymphocyte proliferation	5	1,1	0,008	<i>BTLA, CD274, PAWR, FOXP3, IL10</i>
GO:0002768~immune response-regulating cell surface receptor signaling pathway	5	1,1	0,017	<i>BTLA, KLHL6, CD3E, CACNB4, FOXP3</i>
GO:0010557~positive regulation of macromolecule biosynthetic process	21	4,7	0,017	<i>BHLHE23, FOXP1, NTF3, RXRB, CD3E, MAML1, PAX6, RXRG, FGF23, PAWR, NR4A3, FOXP3, IL10, HOXD10, MURC, ATF4, HNF4A, NRL, IL1B, NFIA, NKX2-3</i>
GO:0007204~elevation of cytosolic calcium ion concentration	8	1,8	0,017	<i>CCR9, C5AR1, P2RY4, PTK2B, AVPR1B, RYR1, IL1B, CD52</i>
GO:0002237~response to molecule of bacterial origin	7	1,6	0,018	<i>PLA2G4A, CYP1A1, TAP2, IL1B, IL10, THPO, VLDLR</i>
GO:0007517~muscle organ development	10	2,2	0,018	<i>MURC, FOXP1, MEOX2, MYL6B, RXRB, RXRG, EGLN1, CACNB4, UNC45B, HOXD10</i>
GO:0007029~endoplasmic reticulum organization	3	0,7	0,020	<i>BNIP1, PEX5, EIF2AK3</i>
GO:0030889~negative regulation of B cell proliferation	3	0,7	0,020	<i>BTLA, PAWR, IL10</i>
GO:0030003~cellular cation homeostasis	13	2,9	0,020	<i>MAFG, SRI, C5AR1, HFE, HP, CD52, CACNB4, CCR9, P2RY4, PTK2B, AVPR1B, RYR1, IL1B</i>
GO:0006928~cell motion	20	4,5	0,021	<i>ICAM1, NTF3, PAX6, PEX5, CD2AP, IL10, TPM4, LAMA1, FEZF2, SEMA6C, ROBO1, PTK2B, ITGB1BP1, AAMP, IL1B, POU4F1, PPAP2B, DCLK1, NKX2-3, FN1</i>
GO:0055080~cation homeostasis	14	3,1	0,021	<i>MAFG, SRI, C5AR1, HFE, HP, CD52, CACNB4, CCR9, P2RY4, PTK2B, AVPR1B, RYR1, IL1B, ATP6V0A4</i>
GO:0030005~cellular di-, tri-valent inorganic cation homeostasis	12	2,7	0,022	<i>SRI, CCR9, C5AR1, P2RY4, PTK2B, AVPR1B, RYR1, HFE, IL1B, HP, CD52, CACNB4</i>
GO:0051051~negative regulation of transport	6	1,3	0,023	<i>PACSN1, HNF4A, IL1B, FGF23, FOXP3, HTR2A</i>
GO:0050863~regulation of T cell activation	8	1,8	0,023	<i>BTLA, CD3E, CD274, IL1B, IL2RG, PAWR, FOXP3, IL10</i>
GO:0048878~chemical homeostasis	21	4,7	0,023	<i>MAFG, SRI, C5AR1, NTF3, FGF23, HFE, CD52, EGLN1, HP, CACNB4, MBP, CCR9, PLA2G4A, P2RY4, HNF4A, PTK2B, AVPR1B, RYR1, IL1B, CACNA1E, ATP6V0A4</i>
GO:0042130~negative regulation of T cell proliferation	4	0,9	0,024	<i>BTLA, CD274, PAWR, FOXP3</i>
GO:0008202~steroid metabolic process	11	2,5	0,025	<i>DHRS2, CYP17A1, CYP11A1, INSIG2, OSBPL9, SERPINA6, FGF23, SUL2B1, IDI2, TRERF1, VLDLR</i>
GO:0014706~striated muscle tissue development	8	1,8	0,025	<i>MURC, MEOX2, MYL6B, RXRB, RXRG, EGLN1, CACNB4, HOXD10</i>
GO:0045893~positive regulation of transcription, DNA-dependent	17	3,8	0,026	<i>BHLHE23, FOXP1, NTF3, RXRB, MAML1, PAX6, RXRG, FGF23, NR4A3, FOXP3, HOXD10, MURC, ATF4, HNF4A, NRL, NFIA, NKX2-3</i>
GO:0045428~regulation of nitric oxide biosynthetic process	4	0,9	0,026	<i>EGFR, ICAM1, IL1B, IL10</i>
GO:0043069~negative regulation of programmed cell death	16	3,6	0,027	<i>EGFR, CSF2, NOL3, BHLHE23, TAX1BP1, IL10, PROC, NME6, DHRS2, PCGF2, PSMC5, BNIP1, BAG3, IL1B, GLO1, MYO18A</i>

TEL-AML1-ChIP				
GO:0010604~positive regulation of macromolecule metabolic process	23	5,2	0,029	CSF2, BHLHE23, FOXK1, NTF3, RXRB, CD3E, MAML1, PAX6, RXRG, FGF23, PAWR, NR4A3, FOXP3, IL34, IL10, HOXD10, MURC, ATF4, HNF4A, NRL, IL1B, NFIA, NKX2-3
GO:0007422~peripheral nervous system development	4	0,9	0,029	NTF3, ARTN, POU4F1, HOXD10
GO:0007155~cell adhesion	21	4,7	0,029	ICAM1, ICAM4, LPP, ICAM5, SDK1, NLGN1, POSTN, PCDH11, CD2AP, PVRL4, LAMA1, LAMB3, LAMB2, ITGAX, ADAM2, ITGB1BP1, TTYH1, ITGAD, CD226, AOC3, FN1
GO:0045944~positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	15	3,4	0,033	BHLHE23, NTF3, RXRB, MAML1, PAX6, RXRG, NR4A3, FOXP3, HOXD10, MURC, ATF4, HNF4A, NRL, NFIA, NKX2-3
GO:0032944~regulation of mononuclear cell proliferation	6	1,3	0,034	BTLA, CD3E, CD274, PAWR, FOXP3, IL10
GO:0050864~regulation of B cell activation	5	1,1	0,035	BTLA, IL2RG, PAWR, FOXP3, IL10
GO:0006486~protein amino acid glycosylation	8	1,8	0,035	MGAT2, ST3GAL3, B3GALT2, ST3GAL5, B3GALT5, ST8SIA5, OGT, DDOST
GO:0006873~cellular ion homeostasis	16	3,6	0,038	MAFG, SRI, C5AR1, NTF3, FGF23, HFE, HP, CD52, CACNB4, MBP, CCR9, P2RY4, PTK2B, AVPR1B, RYR1, IL1B
GO:0032496~response to lipopolysaccharide	6	1,3	0,038	PLA2G4A, CYP1A1, IL1B, IL10, THPO, VLDLR
GO:0050801~ion homeostasis	17	3,8	0,040	MAFG, SRI, C5AR1, NTF3, FGF23, HFE, HP, CD52, CACNB4, MBP, CCR9, P2RY4, PTK2B, AVPR1B, RYR1, IL1B, ATP6V0A4
GO:0046634~regulation of alpha-beta T cell activation	4	0,9	0,040	BTLA, CD3E, IL2RG, FOXP3
GO:0002706~regulation of lymphocyte mediated immunity	5	1,1	0,041	TAP2, IL1B, FOXP3, CD226, IL10
GO:0007610~behavior	16	3,6	0,041	MAFG, C5AR1, GABRA5, CACNB4, NR4A3, CALB1, HOXD10, CCR9, FEZF2, PENK, ROBO1, ADAM2, ABAT, IL1B, POU4F1, HTR2A
GO:0001666~response to hypoxia	8	1,8	0,043	NOL3, CYP1A1, PTK2B, ALDOC, RYR1, ABAT, EGLN1, VLDLR
GO:0007265~Ras protein signal transduction	5	1,1	0,044	MURC, RSU1, DOK2, RASSF1, BRAP
GO:0042129~regulation of T cell proliferation	5	1,1	0,044	BTLA, CD3E, CD274, PAWR, FOXP3
GO:0031328~positive regulation of cellular biosynthetic process	20	4,5	0,044	BHLHE23, FOXK1, NTF3, RXRB, CD3E, MAML1, PAX6, RXRG, FGF23, PAWR, NR4A3, FOXP3, HOXD10, MURC, ATF4, HNF4A, NRL, IL1B, NFIA, NKX2-3
GO:0032829~regulation of CD4-positive, CD25-positive, alpha-beta regulatory T cell differentiation	2	0,4	0,045	IL2RG, FOXP3
GO:0007185~transmembrane receptor protein tyrosine phosphatase signaling pathway	2	0,4	0,045	PTPRE, PTPRN
GO:0031175~neuron projection development	12	2,7	0,046	EGFR, FEZF2, SEMA6C, LAMB2, NTF3, ROBO1, PTK2B, PAX6, LIFR, POU4F1, IGSF9, DCLK1
GO:0050851~antigen receptor-mediated signaling pathway	4	0,9	0,047	KLHL6, CD3E, CACNB4, FOXP3
GO:0019860~uracil metabolic process	2	0,4	0,048	DPYS, DPYD
GO:0002694~regulation of leukocyte activation	9	2,0	0,048	BTLA, CD3E, CD274, IL1B, IL2RG, PAWR, FOXP3, CD226, IL10
GO:0043067~regulation of programmed cell death	20	4,5	0,049	CSF2, ING4, NOL3, BHLHE23, NTF3, GSDMA, CD3E, DEDD, IL10, TAX1BP1, PROC, BNIPL, UTP11L, PCGF2, BNIP1, BAG3, NAIF1, POU4F1, GLO1, EIF2AK3

4.5.2 Der Vergleich der ChIP- und Genexpressionsdaten aus den murinen und humanen Zell-Linien liefert lediglich ein gemeinsames Gen: CENP-P

Die mit Hilfe des murinen Zellsystems identifizierten TEL-AML1 Zielgene sollten im humanen Zellsystem überprüft bzw. verifiziert werden. Dafür wurden die Ergebnisse der ChIP- und Genexpressionsdaten miteinander korreliert. Das Resultat dieser kombinierten Datenanalyse ist in Abbildung 4.39 dargestellt.

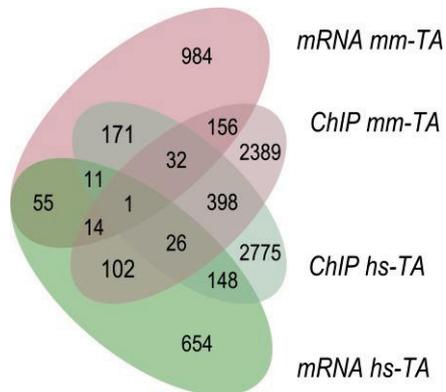


Abbildung 4.39 Kombinierte Analyse der ChIP-Ergebnisse und der differentiell exprimierten Gene aus den murinen (rot) und humanen Zell-Linien (grün). Die Schnittmenge aller Experimente beinhaltet lediglich ein Gen: *CENP-P*.

Die Schnittmengenbildung der ChIP-Experimente und Genexpressionsanalysen der murinen und humanen Zell-Linien lieferte lediglich ein Gen, *CENP-P*, welches in allen vier Ergebnisgruppen zu finden war. Allerdings war *Cenp-p* im murinen Zellsystem hochreguliert, während es in der humanen Zell-Linie herunterreguliert nachgewiesen wurde. Zusätzlich wurde die Expression von *CENP-P* auch in den murinen und humanen Zell-Linien mittels Western Blot überprüft (s. Abb. 4.40). Hier konnte für das murine Zellsystem wenn überhaupt nur eine sehr schwach erhöhte Expression des *CENP-P* auf Protein-Ebene nachgewiesen werden, was zumindest tendenziell mit dem Resultat der Genexpressionsanalyse übereinstimmte.

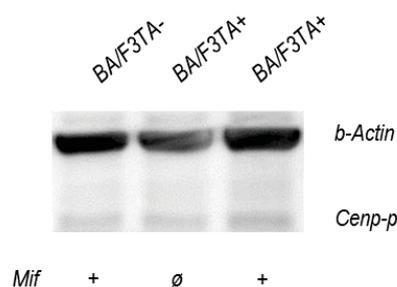


Abbildung 4.40 Nachweis der Expression von *CENP-P* in TEL-AML1-positiven murinen Zellen (BA/F3TA⁺ + Mif) und den entsprechenden Kontrollzellen (BA/F3TA⁻ + Mif, BA/F3TA⁺ ø Mif). Der gleichzeitige Nachweis von b-Actin diente der Kontrolle der gleichmäßigen Beladung des Gels.

4.5.3 In Gegenwart von TEL-AML1 differentiell exprimierte Gene

Die Ergebnisse der murinen und humanen Zell-Linien lieferten beim Vergleich mit den im Patienten differentiell exprimierten Genen Übereinstimmungen von 39 bzw. 43 Genen. Da für die Patientendaten allerdings keine ChIP-on-chip Daten zur Verfügung standen, sollte der Vergleich der Genexpressionsdaten aus der stabil exprimierenden humanen Zell-Linie eine Validierung der auch im Menschen relevanten TEL-AML1 Zielgene ermöglichen. Vergleicht man ausschließlich die Genexpressionsprofile der murinen und humanen Zell-Linien mit denen der Patientenproben, so bleiben 36 Gene übrig, von denen 14 in allen drei Gruppen gleichsinnig reguliert exprimiert waren. Eine Auflistung der 36 in allen drei Gruppen nachgewiesenen Gene ist in Tabelle 4.9 gezeigt. Hier sind zudem die Gene markiert, die auch in ChIP-Experimenten detektiert wurden. Lediglich *CENP-P* wurde sowohl in den ChIP-Experimenten mit den murinen als auch mit den humanen TEL-AML1-positiven Zellen detektiert. Allerdings zeigte es keine gleichsinnige Regulation auf mRNA-Ebene.

Tabelle 4.9 Sowohl im murinen und humanen Zellsystem als auch im Patientenmaterial identifizierte Gene. Von den insgesamt 36 Genen waren 14 gleichsinnig reguliert (+: hoch, -: herunter; farbig markiert). Die Gene, die zudem in ChIP-Experimenten nachgewiesen wurden, sind durch schwarze Rechtecke in der Spalte des entsprechenden Zellsystems gekennzeichnet.

Gen ID (MGI)	Symbol	Bezeichnung	Regulation mRNA		
			human	murin	Patient
1914381	<i>ACBD4</i>	acyl-Coenzyme A binding domain containing 4	-	+	-/+
1919164	<i>ANTXR2</i>	anthrax toxin receptor 2	+	+	-
1891304	<i>AP1S3</i>	adaptor-related protein complex AP-1, sigma 3	-	+	-
109620	<i>ARVCF</i>	armadillo repeat gene deleted in velo-cardio-facial syndrome	+	+	+
1889505	<i>B3GNT2</i>	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 2	+	+	+
1913586	<i>CENPP</i>	centromere protein P	-	+	+
1096867	<i>ETV5</i>	ets variant gene 5	+	+	+
2446270	<i>FAM113B</i>	family with sequence similarity 113, member B	-	+	+
1913520	<i>FAM134B</i>	family with sequence similarity 134, member B	+	+	+
1310004	<i>FMO5</i>	flavin containing monooxygenase 5	-	+	-
95764	<i>GNL1</i>	guanine nucleotide binding protein-like 1	+	+	+
1933113	<i>GPR146</i>	G protein-coupled receptor 146	-	+	+
1924384	<i>HNRNPA0</i>	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0	+	-	+
96243	<i>HSPA2</i>	heat shock protein 2	-	+	+
96397	<i>ID2</i>	inhibitor of DNA binding 2	-	+	+
1098270	<i>JAG2</i>	jagged 2	+	+	+
1915529	<i>MCOLN2</i>	mucolipin 2	+	-	-
1914118	<i>MFSD1</i>	major facilitator superfamily domain containing 1	-	+	-
107711	<i>MYO1F</i>	myosin IF	-	+	-
2448523	<i>NPEPL1</i>	aminopeptidase-like 1	-	-	-
1858233	<i>NPHP1</i>	nephronophthisis 1 (juvenile) homolog (human)	-	+	-
88557	<i>PCYT1A</i>	phosphate cytidyltransferase 1, choline, alpha isoform	-	+	-
1918615	<i>PDSS2</i>	prenyl (solanesyl) diphosphate synthase, subunit 2	-	-	-
1277098	<i>PTP4A3</i>	protein tyrosine phosphatase 4a3	+	+	+
96055	<i>PTPN6</i>	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 6	-	-	-
2385107	<i>RAB7L1</i>	RAB7, member RAS oncogene family-like 1	-	-	-
2659071	<i>RAPGEF2</i>	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 2	-	+	+
1931553	<i>RHOQ</i>	ras homolog gene family, member Q	-	+	-
2151208	<i>SEPN1</i>	selenoprotein N, 1	-	-	+
98352	<i>SOD2</i>	superoxide dismutase 2, mitochondrial	-	-	+
104552	<i>TNS1</i>	tensin 1	+	+	+
107749	<i>TPD52</i>	tumor protein D52	+	+	-
98852	<i>TST</i>	thiosulfate sulfurtransferase, mitochondrial	-	+	+
2145316	<i>TXNDC5</i>	thioredoxin domain containing 5	-	-	-
3772572	<i>XAF1</i>	XIAP associated factor 1	+	+	-
2177308	<i>ZNRF1</i>	zinc and ring finger 1	+	+	+

Die 36 sowohl in den murinen als auch in den humanen TEL-AML1-positiven Zellen differentiell exprimierten Gene wurden ebenfalls einer funktionellen Annotation mittels DAVID unterzogen (s. Tab. 4.10). Mit vier Genen (entsprechen 11,1%) stellte die Hämatopoese den am stärksten überrepräsentierten biologischen Prozess dar. Daneben waren GO-Termini biologischer Prozesse wie der Aktivierung von Leukocyten, die Tetramerisierung von Proteinen, die durch kleine GTPasen vermittelte Signaltransduktion und die zelluläre Antwort auf oxidativen Stress angereichert. Diese Prozesse sind allem Anschein nach entweder direkt oder indirekt durch die Expression von TEL-AML1 betroffen und ihre veränderte Regulation steht vermutlich in engem Zusammenhang mit einer begünstigten Transformation und letztendlich der Leukämogenese.

Tabelle 4.10 Überrepräsentierte GO-Termini biologischer Prozesse in der Schnittmenge der Genexpressionsprofile der murinen und humanen Zell-Linien sowie der Patientenproben. Die Datenanalyse erfolgte mit Hilfe der Datenbank DAVID an 36 in allen drei Gruppen nachgewiesenen Genen. Angegeben sind neben den GO-Termini die Anzahl der assoziierten Gene (insgesamt und als prozentualer Anteil), sowie der p-Wert und die Gennamen.

GO-Terminus	Anzahl	%	p-Wert	Gene
GO:0030097~hemopoiesis	4	11,1	0,011	<i>ID2, JAG2, TPD52, SOD2</i>
GO:0045321~leukocyte activation	3	8,3	0,061	<i>JAG2, MYO1F, TPD52</i>
GO:0051262~protein tetramerization	2	5,6	0,080	<i>PDSS2, SOD2</i>
GO:0007264~small GTPase mediated signal transduction	3	8,3	0,081	<i>RHOQ, RAB7L1, RAPGEF2</i>
GO:0034599~cellular response to oxidative stress	2	5,6	0,088	<i>ETV5, SOD2</i>



5 DISKUSSION

In allen mehrzelligen Organismen ist die Balance zwischen Proliferation, Differenzierung und Apoptose einzelner Zellen lebensnotwendig und unterliegt daher einer strengen Kontrolle durch viele ineinandergreifende Mechanismen. Normalerweise wird die korrekte Funktionsweise eines jeden Stoffwechselweges an bestimmten Kontrollpunkten überprüft und eventuell aufgetretene Fehler entweder korrigiert oder die Zelle durch Apoptose aus dem Organismus entfernt bevor weiterer Schaden angerichtet werden kann. Versagt einer dieser Kontrollmechanismen jedoch, überleben die betroffenen Zellen und persistieren als prä-transformierte Zellen. Die Akkumulation weiterer Fehler führt letztendlich dazu, dass diese prä-transformierten Zellen einen Wachstumsvorteil erlangen und vollständig zu malignen Zellen transformieren können. Die bereits *in utero* entstehende Translokation t(12;21) führt zur Expression des chimären Transkriptionsfaktors TEL-AML1. Sowohl TEL als auch AML1 ist sehr häufig von Translokationen betroffen. Interessanterweise kann dies je nach Fusionspartner zur Entstehung myeloider oder lymphoider Leukämien führen, was die fundamentale Bedeutung beider Transkriptionsfaktoren für die Hämatopoese widerspiegelt. Die Translokation t(12;21) wird zwar als initialer Schritt der Leukämogenese angesehen, allerdings reicht ihr Auftreten allein für eine maligne Transformation der betroffenen Zelle nicht aus wie in hämatopoetischen Zell-Linien und *knock-in* Mäusen gezeigt wurde (Andreasson *et al.*, 2001; Fischer *et al.*, 2005). Daher sollten in der vorliegenden Arbeit Zielgene des TEL-AML1 identifiziert werden, die Hinweise auf eine eventuelle Begünstigung der weiteren Akkumulation von Fehlern und letztendlich der vollständigen Transformation der Zellen liefern könnten. Es gibt verschiedene Möglichkeiten wie TEL-AML1 die Leukämogenese in den prä-transformierten Zellen fördern kann. Als chimärer Transkriptionsfaktor könnte TEL-AML1 zum einen die Expression individueller Zielgene regulieren. Zum anderen könnte TEL-AML1 aber auch die Expression ansonsten durch AML1 regulierter Gene stören, indem es entweder über die AML1 Bindedomäne an die entsprechenden Promotorbereiche bindet und dort eine veränderte Funktion ausübt oder indem es mit regulatorischen Faktoren wechselwirkt, die dann für eine Interaktion mit AML1 nicht mehr zur Verfügung stehen. Außerdem könnte eine Interaktion des TEL- oder AML1-Anteils mit anderen Faktoren dem chimären Protein veränderte Eigenschaften verleihen bzw. eine ansonsten aktivierte Funktion reprimieren oder umgekehrt. Für TEL wurde z. B. im Zusammenhang mit der Translokation t(9;12)(q34;p13) bereits beschrieben, dass seine direkte Bindung von GRB2 zur TEL-ABL-vermittelten Transformation und Leukämogenese beiträgt, indem sie die Aktivität der Tyrosinkinase ABL erhöht (Million *et al.*, 2004). Neben der *TEL-AML1* Translokation ist oft auch das zweite *TEL*-Allel deletiert (Stegmaier *et al.*, 1995), was einem kompletten Funktionsverlust dieses Tumorsuppressors entspricht. So ist z. B. bekannt, dass TEL mit dem Onkoprotein FLI-1 interagiert, ebenfalls einem Mitglied der ETS-Familie, und dadurch dessen transaktivierende Wirkung verhindert (Kwiatkowski *et al.*, 1998). Diese Funktion kann von TEL-AML1 nicht mehr ausgeübt werden, was zusammen mit der Deletion des verbleibenden *TEL*-Allels eventuell zum malignen Phänotyp beitragen könnte.

5.1 Die verschiedenen Zellsysteme

5.1.1 Das murine, induzierbare Zellsystem

Das verwendete murine Zellsystem basierte auf der IL3-abhängigen Prä-B-Zell-Linie BA/F3 und wurde freundlicherweise von Anthony Ford und Mel Greaves zur Verfügung gestellt (Ford *et al.*, 2009). Hierfür wurden zwei Zell-Linien generiert, von denen die eine (BA/F3^{TA+}) nach Induktion mit Mifepriston TEL-AML1 exprimiert und die andere (BA/F3^{TA-}) als Kontrolle für die Mifepriston-Behandlung diente (vgl. 2.4.2.1). Nach erfolgreicher Optimierung der Induktion der TEL-AML1-Expression wurden diese Zell-Linien für ChIP-Experimente, Genexpressions- sowie Proteomanalysen mittels SILAC eingesetzt, um letztendlich Zielgene dieses chimären Transkriptionsfaktors zu identifizieren. Zusätzlich wurden ChIP-Experimente mit endogenem AML1 und TEL in BA/F3 Wildtypzellen durchgeführt, die die Bestimmung einzigartiger TEL-AML1 Zielgene ermöglichen sollten.

5.1.1.1 Mittels ChIP-on-chip und Genexpressionsanalyse wurden 178 direkte durch TEL-AML1 regulierte Zielgene identifiziert, 16 davon auch über Proteomprofiling

Insgesamt wurden in den TEL-AML1-positiven Zellen **2550** exklusive, durch TEL-AML1 gebundene Promotorbereiche, **1319** differentiell exprimierte Gene und **678** differentiell exprimierte Proteine identifiziert. Von den 2550 exklusiven TEL-AML1 Zielgenen waren **178** Gene auf mRNA-Ebene differentiell exprimiert und für **16** Gene konnte diese veränderte Expression auch auf Proteinebene nachgewiesen werden. Bei diesen 16 Genen (s. Tab 4.1, S. 78) handelt es sich also um direkte durch TEL-AML1 regulierte Gene. Die Schnittmenge aller drei *screening* Methoden wäre vermutlich größer gewesen, wenn mehr Proteine detektiert worden wären. Allerdings wurden von den schätzungsweise über 20.000 Proteinen, die in Säugetierzellen exprimiert werden, nur 1482 Proteine in ausreichender Menge nachgewiesen, von denen wiederum 678 differentiell exprimiert waren. Diese Zahl liegt in etwa in der Größenordnung des in humanen Zell-Linien gemessenen sogenannten zentralen Proteoms, welches aus rund 1.100 Proteinen besteht, deren Expression zu jedem Zeitpunkt unabhängig von Zelltyp und Zeitpunkt stattfindet (Burkard *et al.*, 2011). Da sich die Anzahl der proteinkodierenden Gene in Maus und Mensch nicht deutlich voneinander unterscheidet, ist anzunehmen, dass dies auch für die Anzahl unterschiedlicher Proteine zutrifft. Um die Zuordnung zu einem spezifischen Protein mittels massenspektrometrischer Analyse zu ermöglichen, müssen mindestens zwei, besser aber drei entsprechende Peptide gemessen werden. Daraus ergibt sich, dass sich stark exprimierte Proteine deutlich leichter nachweisen lassen als auf geringem Niveau exprimierte. Daher ist es auch nicht verwunderlich, dass von den 678 differentiell exprimierten Proteinen deutlich mehr hoch- (432) als herunterreguliert (246) detektiert wurden. Mit einer Induktionszeit von lediglich 16 Stunden bot das induzierbare murine Zellsystem zwar die Möglichkeit, TEL-AML1 regulierte Zielgene ohne eventuell störende, erst später einsetzende sekundäre Effekte untersuchen zu können, allerdings wurde die Proteinexpression zumindest in einigen Fällen, wie z. B. für CD44 gezeigt, stark durch das für die Induktion verwendete Mifepriston beeinflusst. Dies ließ sich vor allem anhand der verschiedenen Proteinprofile der einzelnen Zell-Linien bzw. Kontrollen sehr gut erkennen (vgl. 4.3.4), so dass letztendlich ausschließlich ebenfalls behandelte Zellen als Negativkontrolle verwendet werden konnten

(BA/F3^{TA-} + Mif) und nicht wie ursprünglich geplant auch die TEL-AML1-positive, unbehandelte Zell-Linie (BA/F3^{TA+} - Mif).

5.1.1.2 Die direkten TEL-AML1 Zielgene regulieren elementare Prozesse wie die Transkription, die Translation und die Differenzierung

Die 178 mittels ChIP-on-chip und Genexpressionsanalyse für TEL-AML1 identifizierten Zielgene wurden mit Hilfe der Datenbank DAVID anhand der mit ihnen assoziierten GO-Termini funktionell annotiert, um die signifikant angereicherten biologischen Prozesse aufzuklären ($p < 0,05$). Hier zeigte sich, dass die meisten hochregulierten Gene mit biologischen Prozessen wie der negativen Transkriptionsregulation, der Leukocytenaktivierung, der positiven Regulation der Signaltransduktion und der Glykosylierung assoziiert waren, während viele der herunterregulierten Gene mit Prozessen wie der RNA-Prozessierung, der Biogenese von Ribosomen und der Chromatinorganisation annotiert waren. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass TEL-AML1 sehr elementare Prozesse wie die Transkription, die Translation aber auch die Differenzierung in den betroffenen Zellen beeinflusst bzw. gemessen an den Kontrollzellen fehlreguliert, was letztendlich eine vollständige Transformation der prä-malignen Zellen begünstigen könnte. Die funktionelle Annotation der 16 Gene/Proteine, die in der Schnittmenge aller drei *screening* Methoden nachgewiesen wurden, lieferte u. a. die Anreicherung biologischer Prozesse wie der RNA-Prozessierung, der Methylierung und der negativen Regulation von Transportvorgängen, wenn auch aufgrund der deutlich geringeren Genzahl mit schlechterer Signifikanz ($p < 0,07$). Bei diesen 16 auch mit Hilfe der Proteomanalyse detektierten Proteinen handelt es sich zwar um valide TEL-AML1 Zielgene, allerdings wurde wie oben bereits erwähnt nur ein Bruchteil (etwa 5%) des Proteoms in der massenspektrometrischen Analyse nachgewiesen. Die Ergebnisse bleiben daher auf Proteinebene unvollständig, so dass letztendlich die Schnittmenge aus ChIP- und Genexpressionsdaten als mutmaßliche, direkte durch TEL-AML1 regulierte Zielgene angesehen wurde.

5.1.1.3 Die indirekten TEL-AML1 Zielgene spielen bei der Hämatopoese eine Rolle

Für die TEL-AML1 induzierte Leukämogenese sind nicht nur direkte Zielgene von Bedeutung, sondern es spielen auch indirekt beeinflusste Prozesse eine Rolle. Um diese zu identifizieren wurden die in den Genexpressions- und Proteinprofilen, jedoch nicht mittels ChIP detektierten, differentiell exprimierten Gene bzw. Proteine miteinander korreliert und die 109 exklusiven, indirekt durch die TEL-AML1-Expression beeinflussten, gleichsinnig regulierten Gene bzw. Proteine anhand der mit ihnen assoziierten GO-Termini funktionell annotiert. Neben den auch für die direkten TEL-AML1 Zielgene angereicherten GO-Termini wie die RNA-Prozessierung und die Biogenese von Ribosomen waren hier vor allem die ausschließlich indirekt durch die TEL-AML1 Expression betroffenen biologischen Prozesse interessant. Hierunter waren z. B. die Hämatopoese, die zelluläre Antwort auf ungefaltete Proteine, der Metabolismus nicht-kodierender RNA und die Aktivierung von Aminosäuren. Auffällig war hierbei vor allem, dass die zwischen den direkten und den indirekten Zielgenen übereinstimmenden GO-Termini allesamt mit herunterregulierten Genen assoziiert waren, während es unter den bei den hochregulierten Genen angereicherten biologischen Prozessen keinerlei Übereinstimmung gab, was möglicherweise auf eine gemeinsame Regulation reprimierender Faktoren hindeutet. Die indirekte TEL-AML1-vermittelte Beeinflussung der Expression von Genen wie z. B. *Tpd52* oder *Rbpj*, die bei

der Hämatopoese eine Rolle spielen, könnte Hinweise auf die Beteiligung der betroffenen Gene an der Leukämogenese liefern. Diese beiden Gene/Proteine wurden in den murinen Zellen als hochreguliert exprimiert nachgewiesen. Für *Tpd52* (*tumor protein D52*) ist bekannt, dass es in verschiedenen malignen Erkrankungen (Shehata *et al.*, 2008) u. a. Ovarialkarzinomen häufig überexprimiert ist (Byrne *et al.*, 2010) und zumindest Prostatakrebszellen vor Apoptose schützt (Zhang *et al.*, 2011). Bei RBPJ (*recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J*) handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der die Genexpressionsprogramme sowohl von T- als auch von B-Zellen kontrolliert (Miele, 2011). Als Vermittler des Notch Signalweges ist RBPJ u. a. an der Festlegung gemeinsamer lymphoider Vorläuferzellen auf die T-Zell-Linie beteiligt ist (Tanigaki & Honjo, 2007). Außerdem konnte gezeigt werden, dass RBPJ eine Rolle bei der Epstein-Barr Virus induzierten Immortalisierung von B-Zellen spielt (Strobl *et al.*, 1997; Hsieh *et al.*, 1996).

Desweiteren wurden neun Gene/Proteine identifiziert, die auf gegensätzliche Weise reguliert waren. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnte die Beteiligung einer misregulierten mikro RNA sein. Zwei der neun Gene konnten jeweils als potentielles Ziel einer in entsprechenden Arrayanalysen differentiell exprimierten mikro RNA identifiziert werden (vgl. 4.3.10). Um genauere Aussagen treffen zu können, fehlen allerdings nähere Untersuchungen wie z. B. Luciferaseassays, um die Regulation der mRNA der entsprechenden Gene durch diese mikro RNAs zu bestätigen. Trotzdem sind die mikro RNA Expressionsprofile zumindest ein erster Anhaltspunkt, um gegensätzlich regulierte Gene und Proteine erklären zu können.

5.1.1.4 TEL-AML1 bindet an die gleiche DNA-Sequenz wie AML1, reguliert aber zum größten Teil vollkommen andere Gene

Der chimäre Transkriptionsfaktor TEL-AML1 enthält wie bereits erwähnt lediglich die DNA-Bindedomäne des AML1, so dass die Vermutung nahe liegt, dass TEL-AML1 auf Sequenzebene die gleichen Bindestellen wie AML1 erkennt. Um diese Vermutung zu bestätigen wurden die spezifisch als von TEL-AML1 gebunden nachgewiesenen Promotorbereiche mit Hilfe der Suchmaschine „*TF Search*“ hinsichtlich potentieller AML1 Bindestellen analysiert und anschließend mit den über den Promotorbereich anhand der ChIP-Proben gemessenen Signalintensitäten zusammen graphisch dargestellt (vgl. 4.3.2.2). Hier zeigte sich in den meisten Fällen eine deutliche Korrelation von vorhergesagten AML1 Bindestellen mit Regionen verstärkter Anreicherung. Zusammenfassend lässt sich daher sagen, dass TEL-AML1 wahrscheinlich meistens die gleiche DNA-Sequenz erkennt und bindet wie AML1, was allerdings nicht bedeutet, dass der Großteil AML1 regulierter Gene ebenfalls einer Regulation durch TEL-AML1 unterliegen. Eine Korrelation der spezifisch durch AML1 bzw. TEL-AML1 gebundenen Promotorbereiche zeigte, dass nur 22,9% der AML1 Zielgene auch in den ChIP-Experimenten für TEL-AML1 nachgewiesen wurden; bei TEL war es mit 22,5% ein etwa gleich großer Anteil der identifizierten Zielgene. Dies deutete daher nicht auf eine verstärkte Regulation der AML1-Zielgene durch TEL-AML1 hin. Die Tatsache, dass es sich bei 81,8% der TEL-AML1 gebundenen Promotorbereiche um exklusive Zielgene handelte legte die Vermutung nahe, dass sich die von TEL-AML1 regulierten Gene und damit auch die betroffenen biologischen Prozesse zumindest teilweise deutlich von AML1- oder TEL- regulierten Prozessen unterscheiden. Es scheint daher eher so zu sein, dass TEL-AML1 - eventuell durch das Zusammenspiel mit anderen regulatorischen Faktoren - eine einzigartige Funktion innerhalb der Zelle ausübt, die sich deutlich von der der beiden Wildtyp-Proteine unterscheidet und nur in geringfügigem Maße mit dieser überlappt. Dies spiegelte sich auch in den

angereicherten GO-Termini wieder, die für AML1, TEL und TEL-AML1 mittels ChIP gefunden wurden. Betrachtet man lediglich die GO-Termini, die nicht in allen drei Experimentgruppen angereichert waren, lässt sich deutlich erkennen, dass TEL-AML1 auf Ebene der regulierten biologischen Prozesse mehr mit TEL (14) als mit AML1 (4) gemeinsam hat. Während GO-Termini wie die RNA-Prozessierung, die Organisation von Chromosomen, der Metabolismus von DNA und ncRNA, die Zellaktivierung, die Regulation der Proteinmodifikation sowie der Proteinkinase Kaskade und der Zellkommunikation bei TEL und TEL-AML1 angereichert waren, handelte es sich bei den von AML1 und TEL-AML1 gemeinsam regulierten Prozessen um den Zellzyklus, die Regulation des Proteinmetabolismus, die Musterspezifizierung und die Sekretion. Dass unter diesen Prozessen der Zellzyklus zu finden ist, passt zu der bereits beschriebenen Beobachtung, wonach eine erhöhte AML1-Expression das Durchlaufen der G1-Phase beschleunigt (Strom *et al.*, 2000; vgl. 1.3.6). Die Beurteilung der Ergebnisse für TEL fällt allerdings deutlich schwerer, da für diesen Transkriptionsfaktor bislang noch keine direkten Zielgene oder durch ihn regulierten Prozesse beschrieben wurden.

5.1.1.5 Die Schnittmenge der murinen ChIP- und Genexpressionsdaten und der Genexpressionsprofile aus TEL-AML1-positiven Patienten enthält 39 Gene

Um die Ergebnisse des murinen induzierbaren Zellsystems hinsichtlich ihrer Gültigkeit für den Menschen zu überprüfen, wurde die differentielle Expression fünf willkürlich aus der Schnittmenge aller drei *screening* Methoden ausgewählter Gene in Patientenmaterial mittels quantitativer PCR untersucht. Lediglich bei einem Gen (*KLC4*) gelang die Verifizierung des murinen Systems nicht, da es in den Patientenproben eine gegensätzlich regulierte Expression zeigte. Eine mögliche Ursache hierfür könnten u. a. die unterschiedlichen Zellen verschiedener Spezies sein. Da von den Patientenproben lediglich Genexpressionsprofile erstellt werden konnten, wurden diese außerdem mit der Schnittmenge aus ChIP-Daten und Genexpressionsprofilen der TEL-AML1 exprimierenden murinen Zell-Linie verglichen. Insgesamt konnten 59 gemeinsame Gene identifiziert werden, von denen 39 gleichsinnig im Patienten und den murinen Zellen reguliert waren. Hierbei zeigte sich, dass vier dieser 39 Gene auch in der Schnittmenge aller drei *screening* Ergebnisse des murinen Zellsystems vorhanden waren (*ICAM1*, *INTS2*, *PSMD9*, *RSL1D1*). Bis auf *ICAM1* konnte jedoch keines dieser Gene bislang mit maligner Transformation oder ähnlichen Prozessen in Verbindung gebracht werden. Bei *ICAM1* (*intercellular adhesion molecule 1*) handelt es sich um ein Adhäsionsprotein, welches u. a. in Pankreaskrebszellen hochreguliert exprimiert wird und dort vermutlich für die peritoneale Adhäsion der betroffenen Zellen verantwortlich ist (Książek *et al.*, 2010). Die funktionelle Annotation der 39 gleichsinnig regulierten Gene ergab fünf angereicherte GO-Termini, darunter die Transkriptionsregulation, die Proteinlokalisierung und die NFκB Kaskade. Da die Schnittmenge aus ChIP- und Genexpressionsdaten des murinen Zellsystems und den Genexpressionsprofilen TEL-AML1-positiver Patienten nur relativ wenige gleichsinnig regulierte Gene enthielt, stellte sich die Frage, wie gut die TEL-AML1 gebundenen Promotorbereiche mit den in den Patientenproben differentiel exprimierten Genen korrelierten. Diese Schnittmenge umfasste insgesamt 592 gemeinsame Gene und die graphische Darstellung der entsprechenden Rohdaten zeigte ein hohes Maß an Übereinstimmung bezüglich der Kolo-kalisation auf genomischer Ebene. Dies könnte bedeuten, dass TEL-AML1 in den murinen Zellen an viele Promotorbereiche bindet, deren Gene nur im Patienten eine veränderte Expression zeigen. Eine mögliche Erklärung hierfür liefert sicherlich die Tatsache, dass es sich bei den

murinen Zellen um eine artifizielle, induzierbare Zell-Linie handelt, die in vielerlei Hinsicht nicht den betroffenen Patientenzellen entspricht.

5.1.1.6 Genauere Betrachtung ausgesuchter TEL-AML1 Zielgene in Maus und Patient

Nicht alle TEL-AML1 Zielgene, die sowohl im murinen Zellsystem als auch in den Patientenproben als misreguliert nachgewiesen wurden, stehen in einem offensichtlichen Zusammenhang mit der Leukämogenese. Dies liegt zum einen daran, dass über einige noch nicht viel bekannt ist und genauere Beschreibungen ihrer zellulären Funktionen noch ausstehen. Zum anderen ist TEL-AML1 allein für die Entwicklung einer Leukämie nicht ausreichend, so dass erst das Auftreten sekundärer Veränderungen die Leukämogenese endgültig vorantreibt. Dennoch sollte die Expression von TEL-AML1 die Zellen auf irgendeine Weise zumindest anfälliger für das Auftreten weiterer schädlicher Aberrationen machen. Dabei könnte es sich u. a. um Veränderungen im Ablauf des Zellzyklus, bei der Zellproliferation bzw. Differenzierung, der Genexpression, der Chromosomenorganisation, der Replikation oder entsprechender Signaltransduktionswege handeln. Hieraus resultiert, dass die betroffenen Zellen nicht weiter differenzieren, aber trotzdem überleben und letztendlich einen Wachstumsvorteil erhalten und proliferieren.

Die Liste der 39 in Maus und Mensch gleichsinnig regulierten Zielgene wurde daher vor allem nach Genen durchsucht, die bereits mit einem oder mehreren der beschriebenen Prozesse in Verbindung gebracht werden konnten. Eines dieser Zielgene gehört zu einer evolutionär konservierten Familie von Transkriptionsfaktoren, die für die Spezialisierung bestimmter Zelltypen von großer Wichtigkeit ist. Sie wurde zuerst in *Drosophila melanogaster* entdeckt und nach ihrer DNA-Bindedomäne ‚Cut‘ benannt (Review: Nepveu, 2001). Hier wurde zudem gezeigt, dass es sich bei Cut Proteinen nicht nur um Ziele, sondern auch um Effektoren des Notch-Signalweges handelt, einem stark konservierten Signalweg für die Entwicklung der meisten Gewebe im tierischen Embryo. Im Menschen wurde das zuvor bereits beschriebene Protein CDP (*CCAAT-displacement protein*) als Cut-homologes Protein identifiziert. Sowohl CDP als auch sein murines Pendant Cux (*Cut homeobox gene*) wechselwirken mit regulatorischen Elementen, darunter auch MARs (*matrix attachment regions*), einer Vielzahl von Genen, wobei sie in der Regel reprimierend wirken. Es gibt allerdings auch Berichte, die eine Beteiligung bei der Aktivierung einzelner Gene vermuten lassen. Die Expression sowie die Aktivität von Cux1 werden abhängig vom Zellzyklus und dem TGFβ-Signalweg reguliert und zeigen eine Hochregulation in der S-Phase des Zellzyklus. Viele Zielgene von Cux1 regulieren Rho GTPasen, welche sowohl eine Rolle beim Fortschreiten des Zellzyklus als auch bei der Zellbeweglichkeit spielen (Kredinger *et al.*, 2010; Harada *et al.*, 2008; Sansregret *et al.*, 2006; Michl *et al.*, 2005). Ein erster Hinweis auf eine mögliche Beteiligung an der Entstehung maligner Erkrankungen wurde zunächst durch die Überexpression von Cux1 in primären Tumoren und Krebszell-Linien geliefert und später im Mausmodell bestätigt. Desweiteren konnte in einem transgenen Mausmodell für Brustkrebs gezeigt werden, dass Cux1 hier das Überleben und die Proliferation polyploider Zellen förderte, welche dadurch die Chance erhielten, sich wiederum zu aneuploiden und damit kanzerogenen Zellen zu entwickeln (Sansregret *et al.*, 2011). Die sowohl im murinen Zellsystem als auch in den Patienten nachgewiesene Hochregulation dieses TEL-AML1 Zielgens könnte daher bedeuten, dass Cux1 auch hier das Überleben polyploider Zellen ermöglicht, welche damit einen weiteren Schritt auf dem Weg zur malignen Transformation vollzogen hätten. Ein weiteres interessantes, ebenfalls hochreguliertes TEL-AML1 Zielgen ist *ORC1* (*origin recognition complex 1*), welches die größte Untereinheit eines für

die Initiation der Replikation essentiellen Komplexes kodiert. Im Gegensatz zu den anderen Untereinheiten (ORC2-5) unterliegt die Expression von ORC1 einer zellzyklusabhängigen Oszillation, die die Initiation der Replikation mit dem Zellzyklus verknüpft und wiederholte Initiationen an ein und demselben Ursprung verhindern soll (Tatsumi *et al.*, 2003; Ohta *et al.*, 2003; DePamphilis, 2003). Die Akkumulation von ORC1 in der G1 Phase sowie seine Lokalisation in sogenannte G1-Nuclei führt zu einer temporären Rekrutierung der anderen Untereinheiten (ORC2-5) in diese Kernstrukturen. Diese dynamische Bewegung ist zudem Voraussetzung für die Beladung des Chromatins mit MCM (*mini chromosome maintenance*) Proteinen, die bei der Initiation und Elongation der DNA-Replikation eine wichtige Rolle spielen. ORC1 besitzt als einziges ORC Protein eine sogenannte BAH (*bromo-adjacent homology*) Domäne, welche die Reassoziierung mit Chromosomen während des Übergangs zwischen M- und G1-Phase ermöglicht und Replikationsursprünge durch die Förderung der ORC2-Bindung an das Chromatin aktiviert (Noguchi *et al.*, 2006). Neuere Untersuchungen konnten zeigen, dass ORC Proteine auch bei der Entwicklung neuronaler und Muskelgewebe eine Rolle spielen, während ihre Beteiligung an genomischer Integrität noch nicht geklärt ist (Duncker *et al.*, 2009). In transformierten Zellen wurde wie in der vorliegenden Arbeit eine Überexpression von ORC1 und anderen Proteinen des Prä-Initiationskomplexes im Vergleich zu normalen Zellen beobachtet, die zudem mit einer erhöhten Aktivität und einer vermehrten Chromatin-Bindung einherging (Di Paola & Zannis-Hadjopoulos, 2011). Interessanterweise waren diese Unterschiede vornehmlich mit spezifischen Replikationsursprüngen wie dem c-Myc Ursprung assoziiert. Während dieser in transformierten Zellen eine zwei- bis dreifach erhöhte Aktivität und eine ebenfalls um den gleichen Faktor vermehrte Assoziation mit Proteinen des Prä-Initiationskomplexes zeigte, blieb sowohl die Aktivität als auch die Beladung mit entsprechenden Proteinen am Ursprung des *housekeepers* Lamin B2 im Vergleich zu normalen Zellen unverändert.

Das induzierbare murine Zellsystem wurde, wie bereits erwähnt, freundlicherweise von Anthony Ford und Mel Greaves (Institute of Cancer Research, Sutton, UK) zur Verfügung gestellt. Ihre Arbeitsgruppe konnte in diesem murinen Zellsystem sowie in einem System für die Expression von TEL-AML1 in menschlichen Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut und in einem transgenen TEL-AML1 Mausmodell zeigen, dass die betroffenen Zellen langsamer proliferieren, dabei aber resistenter gegen den antiproliferativen Effekt von TGF β sind (Ford *et al.*, 2009). Zudem führte die Expression von TEL-AML1 in humanen Progenitorzellen zur Entwicklung einer potentiellen präleukämischen Zellpopulation mit einem frühen B-Zell Phänotyp (CD34⁺ CD38⁻ CD19⁺) und deutlichem Wachstumsvorteil in Gegenwart von TGF β . Als Ursache für diese Beobachtungen wurde dabei die Bindung von TEL-AML1 an ein Zielprotein (SMAD3) des TGF β -Signalweges nachgewiesen, die dessen Fähigkeit zur Aktivierung der Transkription entsprechender Zielgene negativ beeinflusste. Eine weitere Möglichkeit der negativen Beeinflussung dieses für die Proliferation und Differenzierung essentiellen Signalweges ergibt sich aus einem in der vorliegenden Arbeit identifizierten TEL-AML1 Zielgen, welches sowohl im murinen Zellsystem als auch im Patientenmaterial hochreguliert nachgewiesen wurde. Dabei handelt es sich um *SNIP1* (*smad nuclear interacting protein1*), welches neben NF κ B- auch den TGF β -Signalweg inhibiert. Während SNIP1 mit NF κ B um die Bindung an die Koaktivatoren CBP und p300 konkurriert und so die Aktivierung der von diesen Faktoren regulierten Gene blockiert (Kim *et al.*, 2001), entfaltet es seine negative Wirkung auf den TGF β -Signalweg durch Interaktion mit SMAD1, SMAD2 und SMAD4 (Kim *et al.*, 2000). In neueren Untersuchungen konnte zudem gezeigt werden, dass SNIP1 die Stabilität der Cyclin D1 mRNA und somit indirekt die Expression dieses für das Fortschreiten des

Zellzyklus und den Übergang von G1- zu S-Phase wichtigen Proteins reguliert (Bracken *et al.*, 2008). Ein ähnlicher Effekt wurde auch für c-Myc beobachtet, wobei SNIP1 in diesem Fall die Proteinstabilität förderte indem es u. a. die Ubiquitinierung und damit die Degradation verhinderte (Fujii *et al.*, 2006). Die *SNIP1*-Expression wurde in einer Reihe von Tumoren als hochreguliert nachgewiesen (Liang *et al.*, 2011; Fujii *et al.*, 2006), was wiederum die c-Myc-induzierte Transformation der Zellen begünstigt haben könnte. Daher wird vermutet, das *SNIP1* als Onkogen fungieren könnte.

5.1.1.7 Zusammenfassende Schlussfolgerungen aus den Ergebnissen des murinen Zellsystems

Das induzierbare murine Zellsystem wurde mit Hilfe dreier *screening* Methoden auf den Einfluss der Expression des chimären Transkriptionsfaktors TEL-AML1 untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die identifizierten Zielgene an biologischen Prozessen wie u. a. der Transkriptionsregulation, der Leukocytenaktivierung, der Translation, der Signaltransduktion und der Chromatinorganisation beteiligt sind. Die nähere Betrachtung von Zielgenen, die ebenfalls in TEL-AML1-positiven Patienten als differentiell exprimiert nachgewiesen wurden, ergab, dass die Misexpression von mindestens drei der Gene (*CDP/Cux1*, *ORC1* und *SNIP1*) bereits mit malignen Erkrankungen oder transformierten Zell-Linien in Verbindung gebracht werden konnte. Die beobachtete Überexpression dieser Gene könnte die Entwicklung transformierter Zellen fördern, da sie das Überleben polyploider Zellen sowie die Re-Initiation der Replikation an spezifischen Ursprüngen wie z. B. c-Myc erlaubt und zudem die Expression bestimmter Zielgene wie Cyclin D1 oder c-Myc erhöht. Neben den anderen identifizierten TEL-AML1 Zielgenen lassen allein die zu diesen drei Genen bisher veröffentlichten Daten vermuten, dass ihre fehlregulierte Expression in direktem Zusammenhang mit einer Prädisposition der betroffenen Zellen für eine maligne Transformation steht.

5.1.2 Das humane Zellsystem

Um TEL-AML1 Zielgene im humanen Zellsystem untersuchen zu können, wurden AML1-, TEL- bzw. TEL-AML1 stabil exprimierende Zell-Linien generiert. Diese beruhen auf der humanen Prä-B Zell-Linie NALM6, welche immunologisch der kommerziell erhältlichen TEL-AML1-positiven Patienten-Zell-Linie REH (ACC-22) ähnelt. Da die Ergebnisse des murinen Zellsystems einen starken unerwünschten Einfluss des für die Induktion der TEL-AML1 Expression verwendeten Mifepristons zeigten und in Zellen von betroffenen Patienten zudem auch permanent über einen Zeitraum von mehreren Jahren TEL-AML1 exprimiert wird, wurde hier eine stabile, konstitutive Expression unter Kontrolle eines CMV-Promotors gewählt. Die so generierten Zell-Linien wurden für ChIP-Experimente und Genexpressionsanalysen eingesetzt und anhand der Ergebnisse für AML1 und TEL zum einen die exklusiven TEL-AML1 Zielgene bestimmt. Zum anderen wurden ebenfalls die Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen TEL-AML1 und den beiden Wildtyp-Proteinen untersucht.

5.1.2.1 Die TEL-AML1 regulierten Zielgene spielen bei der Apoptose, der Zellproliferation und der genspezifischen Transkription eine Rolle

Insgesamt wurden für TEL-AML1 **2537** exklusive Zielgene und **1011** differentiell exprimierte Gene identifiziert. Von den **2537** Zielgenen waren wiederum **167** exklusive Gene auf mRNA Ebene differentiell reguliert. Die 167 exklusiven TEL-AML1 Zielgene wurden mit Hilfe der Datenbank DAVID

hinsichtlich der mit ihnen assoziierten GO-Termini funktionell annotiert. Unter den für die hochregulierten Gene angereicherten GO-Termini waren biologische Prozesse wie die Regulation der Apoptose und die negative Regulation der Zellproliferation, während bei den herunterregulierten Genen der Vesikel-vermittelte Transport, die Proteinlokalisierung und die Regulation der genspezifischen Transkription überrepräsentiert waren. Leider konnten zwischen den im murinen und den im humanen Zellsystem signifikant ($p < 0,05$) angereicherten GO-Termini keine Übereinstimmungen gefunden werden. Eine mögliche Ursache hierfür könnten die unterschiedlichen Zell-Linien aus zwei verschiedenen Spezies sein, die für die Experimente verwendet wurden. Zudem wurde TEL-AML1 in den murinen Zellen lediglich für 16 Stunden exprimiert während die humanen Zellen über viele Wochen kultiviert und selektioniert wurden.

5.1.2.2 TEL-AML1 bindet an die gleiche DNA-Sequenz wie AML1, reguliert aber zum größten Teil vollkommen andere Gene

Eine Korrelation der spezifisch durch AML1 bzw. TEL-AML1 gebundenen Promotorbereiche zeigte auch hier wie im murinen System, dass 36% der von AML1 gebundenen Promotorbereiche und 30,9% der Zielgene von TEL ebenfalls in den TEL-AML1 ChIP-Experimenten nachgewiesen wurden. Dies deutete auch im humanen Zellsystem nicht auf eine verstärkte Regulation der AML1-Zielgene durch TEL-AML1 hin. Insgesamt handelte es sich bei 71,2% der für TEL-AML1 identifizierten Zielgene um einzigartige Zielgene, die weder von AML1 noch von TEL gebunden nachgewiesen wurden. Für TEL konnten lediglich 61,1% und für AML1 sogar nur 44,8% der gebundenen Regionen als exklusive Zielgene identifiziert werden. Wie bereits für das murine Zellsystem beschrieben scheint es auch in den humanen Zell-Linien so zu sein, dass TEL-AML1 eventuell durch Interaktion mit anderen regulatorischen Faktoren eine einzigartige Funktion innerhalb der Zelle ausübt und größtenteils Gene reguliert, die weder einer Kontrolle durch AML1 noch durch TEL unterliegen. Dieser deutliche Unterschied zu den beiden Wildtyp-Proteinen zeigte sich auch in den angereicherten GO-Termini, besonders bei Betrachtung der nicht in allen drei Ergebnisgruppen gefundenen biologischen Prozesse. Wie im murinen Zellsystem zu beobachten war, hatte TEL-AML1 auch im humanen Zellsystem mehr angereicherte GO-Termini mit TEL (10) als mit AML1 (2) gemeinsam. Während biologische Prozesse wie die Stressantwort, die Abwehr, die Modifikation von Proteinen, die Organisation der Chromosomen, die Regulation des Wachstums und die Entwicklung des Immunsystems bei TEL und TEL-AML1 angereichert waren, handelte es sich bei den von AML1 und TEL-AML1 gemeinsam regulierten Prozessen um die Zelladhäsion und Zell-zu-Zellkommunikation. Diese Beobachtung passt zu den bereits für AML1 beschriebenen Zielgenen, unter denen z. B. Wachstumsfaktoren, Rezeptoren und verschiedene Signalmoleküle zu finden sind (vgl. 1.3.5). Wie bereits für das murine Zellsystem bemerkt fällt auch beim humanen System die Beurteilung bzw. Einordnung der Ergebnisse der durch TEL regulierten Gene schwer, da es bislang keine in der Literatur beschriebenen Zielgene gibt.

5.1.2.3 Die Schnittmenge der humanen ChIP- und Genexpressionsdaten und der Genexpressionsprofile aus TEL-AML1-positiven Patienten enthält 43 Gene

Um die mit Hilfe der humanen Zell-Linien erzielten Ergebnisse auf ihre Gültigkeit in Patienten zu überprüfen, wurden die Daten der ChIP- und Genexpressionsanalysen mit Genexpressionsprofilen TEL-AML1-positiver Patienten verglichen. Diese Korrelation lieferte insgesamt 75 übereinstimmende

Gene, von denen 43 gleichsinnig reguliert exprimiert wurden. Nach funktioneller Annotation dieser 43 Gene zeigten sich vier angereicherte GO-Termini für biologische Prozesse wie die Transkriptionsregulation, die Regulation der Proteinlokalisierung und die Regulation des programmierten Zelltods. Da die Schnittmenge aus CHIP- und Genexpressionsdaten des humanen Zellsystems und den Genexpressionsprofilen TEL-AML1-positiver Patienten nur relativ wenige gleichsinnig regulierte Gene enthielt, stellte sich die Frage, wie gut die TEL-AML1 gebundenen Promotorbereiche mit den in den Patientenproben differentiell exprimierten Genen korrelierten. Diese Schnittmenge umfasste insgesamt 893 gemeinsame Gene und die graphische Darstellung der entsprechenden Rohdaten zeigte wie für das murine Zellsystem ein hohes Maß an Übereinstimmung bezüglich der Kolo-kalisation auf genomischer Ebene.

5.1.2.4 Genauere Betrachtung ausgesuchter TEL-AML1 Zielgene im humanen Zellsystem und in TEL-AML1-positiven Patienten

Wie für das murine Zellsystem bereits beschrieben, wurden aus der Liste der 43 im humanen Zellsystem und in TEL-AML1-positiven Patienten identifizierten Gene ebenfalls solche näher betrachtet, die durch Literaturrecherche mit entsprechenden biologischen Prozessen oder sogar bereits mit maligner Transformation in Verbindung gebracht werden konnten. Bei einem dieser Gene handelt es sich um *EAF2* (*ELL-associated factor*). Die Familie der ELL (*eleven-nineteen lysine-rich in leukemia*) Transkriptionsfaktoren besteht beim Menschen aus mindestens drei Mitgliedern (ELL, ELL2 und ELL3), die alle in der Lage sind, die Elongationsrate der RNA-Polymerase II zu beschleunigen, indem sie das transiente Pausieren des Enzyms unterdrücken (Shilatifard *et al.*, 1997; Shilatifard *et al.*, 1996). Das Gen, welches ELL kodiert, wurde erstmals in akuten myeloischen Leukämien (AML) mit der Translokation t(11;19)(q23;p13.1) als Fusionspartner von MLL (*mixed lineage leukemia*) beschrieben (Thirman *et al.*, 1994). Mittels *two-hybrid screenings* wurden verschiedene ELL-interagierende Proteine entdeckt. Für zwei dieser Proteine, EAF1 und EAF2, konnte eine Kolo-kalisation mit ELL in sogenannte *Cajal bodies* gezeigt werden (Simone *et al.*, 2003; Simone *et al.*, 2001). Innerhalb dieser Strukturen sind Proteine angereichert, die an der Transkription und der RNA-Prozessierung beteiligt sind (Gall *et al.*, 1999). Interessanterweise sind diese *Cajal bodies* in Zellen, die die MLL-ELL Translokation tragen, zerstört (Polak *et al.*, 2003). Sowohl EAF1 als auch EAF2 sind positive Regulatoren der Elongationsaktivität von ELL (Kong *et al.*, 2005). Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass ein homozygoter oder heterozygoter Verlust von EAF2 im Mausmodell zum vermehrten Auftreten maligner Tumoren führte (Xiao *et al.*, 2008), während seine Überexpression Apoptose induzierte und das Wachstum von Tumoren inhibierte (Hahn *et al.*, 2007). Daher wird für EAF2, welches in der vorliegenden Arbeit als direktes TEL-AML1 Zielgen mit herunterregulierter Expression sowohl im humanen Zellsystem als auch in TEL-AML1-positiven Patienten identifiziert werden konnte, eine Funktion als Tumorsuppressor angenommen.

Bei einem weiteren Gen, welches im humanen Zellsystem als hochreguliertes TEL-AML1 Zielgen identifiziert werden konnte und in den Genexpressionsprofilen der Patienten ebenfalls eine Überexpression zeigte, handelt es sich um *LGR5* (*Leucin-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5*). Das von diesem Gen kodierte Protein wurde vor wenigen Jahren als Marker für adulte Stammzellen im Darmepithel identifiziert. Im Mausmodell konnte bereits gezeigt werden, dass LGR5-positive Zellen die Ursprungszellen bei der Entstehung von Darmkrebs darstellen (Barker *et al.*, 2009). Desweiteren ist die *LGR5*-Expression in menschlichen Kolonkarzinomen erhöht (Uchida *et al.*, 2010).

Allerdings wurden auch kontroverse Beobachtungen bezüglich der negativen tumorigenen Funktion von LGR5 gemacht (Walker *et al.*, 2011).

Ein weiteres interessantes TEL-AML1 Zielgen ist NUAK1 (*nua AMPK-related kinase-1; adenosine monophosphate-activated protein kinase*) bzw. ARK5, welches sowohl in der TEL-AML1 exprimierenden Zell-Linie als auch in Patienten herunterreguliert war. Normale humane, diploide Zellen besitzen im Gegensatz zu Stammzellen nur ein endliches replikatives Potential, welches vor allem durch die Verkürzung der Telomere während eines jeden einzelnen Replikationszyklus verursacht wird. Wird ein kritischer Punkt erreicht, bleiben die Zellen zwar metabolisch aktiv, allerdings zeigen sie charakteristische Veränderungen in Morphologie, Physiologie und Genexpression. In diesen Zellen treten u. a. auch Seneszenz-assoziierte Heterochromatinfoci auf, deren Bildung mit der Rekrutierung von Heterochromatinproteinen und dem Retinoblastoma-Tumorsuppressor (Rb) zu E2F-abhängigen Promotorbereichen und letztendlich mit einer stabilen Repression der betroffenen Gene einhergeht (Narita *et al.*, 2003). Diese Beobachtungen führten zu der Vermutung, dass Seneszenz eine stabile Form des Zellzyklusarrests darstellt, die ähnlich wie Apoptose eine intrinsische Funktion als Tumorsuppressor erfüllt (Braig *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2005; Dimri, 2005; Lowe *et al.*, 2004). Wird diese Funktion durch Mutation, Überexpression oder Depletion eines beteiligten Proteins oder durch Überexpression eines Onkogens gestört, wird die Seneszenz umgangen und die replikative Phase der Zelle verlängert. In *loss-of-function* Untersuchungen mit einer shRNA-Bibliothek konnte gezeigt werden, dass NUAK1 das replikative Potential normaler humaner Zellen beeinflusst und eine herunterregulierte Expression die Dauer der replikationsaktiven Phase der Zellen verlängert (Humbert *et al.*, 2010). Im Gegensatz dazu führte die konstitutive Expression von NUAK1 zu einer vorzeitigen Seneszenz und Aneuploidie mit einem DNA-Gehalt von $n = 3-4$. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass eine Herunterregulation der NUAK-Expression nicht nur das replikative Potential der Zellen verstärkt, sondern auch zum Erhalt der genomischen Integrität beiträgt, wobei es sich eventuell um eine Art Sicherheitsmechanismus in replikativ aktiven Zellen handeln könnte.

5.1.2.5 Zusammenfassende Schlussfolgerungen aus den Ergebnissen des humanen Zellsystems

Mit Hilfe des stabil exprimierenden humanen Zellsystems wurden direkte, TEL-AML1-regulierte Zielgene identifiziert, die mit biologischen Prozessen wie z. B. der Regulation der Apoptose, der negativen Regulation der Zellproliferation, der Proteinlokalisierung und der Regulation der genspezifischen Transkription assoziiert waren. Die nähere Betrachtung einzelner auch in TEL-AML1-positiven Patienten differentiell exprimierter Gene lieferte zumindest ein Gen (*EAF2*), dem eine potentielle Funktion als Tumorsuppressor zugeschrieben werden könnte. Die ebenfalls im Zellsystem sowie im Patienten beobachtete Herunterregulation dieses positiven Regulators der Elongationsaktivität von ELL könnte daher einen Schritt in der TEL-AML1-induzierten Leukämogenese darstellen, denn im Mausmodell führte bereits ein heterozygoter Verlust zum vermehrten Auftreten maligner Tumoren. Zwei weitere Gene (*LGR5* und *NUAK1*) könnten eventuell ebenfalls an der Transformation TEL-AML1-positiver Zellen beteiligt sein, da sie bereits als Marker für Karzinomzellen beschrieben wurden oder die replikative Phase der Zelle verlängern und damit die Möglichkeit erhöhen, dass sich schädliche Mutationen anhäufen. Allerdings wird ihre tumorigene Funktion zur Zeit noch kontrovers diskutiert.

5.2 Vergleich der TEL-AML1 Zielgene im murinen und humanen Zellsystem

5.2.1 Korrelation TEL-AML1 gebundener Promotorbereiche

Die Kontrolle der Genexpression erfolgt nicht nur durch die An- oder Abwesenheit bestimmter Faktoren, sondern ist auch abhängig von der Zugänglichkeit der DNA an einer entsprechenden Promotorregion und hängt letztendlich auch von der Chromosomenstruktur und deren Position im Zellkern ab. Um die Übereinstimmung der Lokalisation der in beiden Zellsystemen durch TEL-AML1 gebundenen Promotorbereiche auf genomischer Ebene zu untersuchen, wurden die Ergebnisse der entsprechenden ChIP-Experimente vergleichend als Häufigkeitsverteilung entlang der humanen Chromosomen dargestellt. Dabei zeigte sich, dass diese Verteilung für beide Spezies sehr gut korrelierte, da für den Großteil der Bereiche, die im murinen Zellsystem angereichert waren diese Anreicherung augenscheinlich auch im humanen Zellsystem nachgewiesen werden konnte. Auch wenn mit 457 Promotorregionen nur rund 18% der TEL-AML1 gebundenen Bereiche sowohl im murinen als auch im humanen Zellsystem identifiziert werden konnten, so deutet die graphische Gegenüberstellung der ChIP-Daten insgesamt auf ein größeres Maß an Übereinstimmung hin. Dies könnte zumindest teilweise aus der Tatsache resultieren, dass für die Schnittmengenbildung zwischen murinen und humanen Genen lediglich die Gennamen verwendet werden konnten. Für jedes Gen gibt es zwar in der betreffenden Spezies (Maus bzw. Mensch) eine eindeutige Nummer oder Bezeichnung. Ein Vergleich zwischen verschiedenen Spezies ist allerdings zur Zeit nur mit Hilfe der Gennamen möglich, die zum Teil uneindeutig sind oder eventuell neu annotiert werden. Daher kann es gelegentlich zu Verwechslungen bzw. fehlenden Übereinstimmungen kommen.

5.2.2 Die Schnittmenge der ChIP- und Genexpressionsdaten aus beiden Zellsystemen und den Genexpressionsprofilen TEL-AML1-positiver Patienten enthält ein Gen: CENP-P

Der Vergleich der Ergebnisse aus den Experimenten mit den verschiedenen Zell-Linien und den Patientendaten sollte dazu dienen, ihre Übertragbarkeit auf den Menschen bzw. den Patienten zu überprüfen. Allerdings enthielt die Schnittmenge aus den ChIP- und Genexpressionsdaten beider Zellsysteme und den Genexpressionsprofilen TEL-AML1-positiver Patienten lediglich ein Gen, *CENP-P*, welches allerdings nicht in allen Ergebnisgruppen gleichsinnig misreguliert exprimiert war. So wurde *CENP-P* im murinen Zellsystem und in den Patienten hochreguliert, während seine Expression im humanen Zellsystem herunterreguliert war. Über das Centromerprotein P ist noch nicht viel bekannt. Anscheinend ist es als Untereinheit eines CENPH-CENPI-assoziierten Komplexes an der Rekrutierung von CENPA zu den Centromeren und zudem für eine ordnungsgemäße Funktion der Kinetochore und dem Fortschreiten der Mitose beteiligt (Okada *et al.*, 2006). Für die gegensätzliche Expression können verschiedene Aspekte eine mögliche Erklärung liefern. Zum einen waren die verwendeten Zellsysteme sehr unterschiedlich, da das eine auf einer murinen und das andere auf einer humanen Zell-Linie basierte. Hinzu kommt, dass es sich bei dem murinen Zellsystem um ein induzierbares System handelte, in dem TEL-AML1 nur kurzzeitig (16 Stunden) exprimiert wurde, während das humane Zellsystem eine stabile, konstitutiv exprimierende Zell-Linie war, die über mehrer Wochen TEL-AML1 exprimierte und zudem einem ständigen Selektionsdruck durch Hygromycin unterlag. Da TEL-AML1 auch in den entsprechenden Patientenzellen permanent über Jahre hinweg

exprimiert wird hätte man erwartet, dass die Ergebnisse des stabil exprimierenden humanen Zellsystems mehr den Patientendaten gleichen als die Daten für die induzierbare murine Zell-Linie. Dies war überraschenderweise nicht der Fall, denn mit 39 gleichsinnig regulierten TEL-AML1 Zielgenen wurden im murinen Zell-System beinahe genauso viele mit den Patienten gemeinsame Gene identifiziert wie in der humanen Zell-Linie, wo 43 übereinstimmende Gene gefunden wurden. Dabei ist allerdings zu beachten, dass eine konstitutive Überexpression von TEL-AML1 im Vergleich zur physiologischen Expression unter Kontrolle des endogenen *TEL*-Promotors unerwartete Auswirkungen haben kann, die sich aus Dosis und Zeitpunkt der Expression sowie dem Differenzierungsstatus der betreffenden Zellen ergeben. Dass trotz der relativ gleichen Übereinstimmung mit den Patientendaten nur ein Gen in der gemeinsamen Schnittmenge beider Zellsysteme übrig blieb, war ebenfalls unerwartet. Eventuell spiegeln die Ergebnisse der Zellsysteme jeweils eine unterschiedliche Variante der Verhältnisse im Patienten wider und haben daher mehr Gemeinsamkeiten mit den Patientendaten als miteinander.

5.2.3 *In Gegenwart von TEL-AML1 werden sowohl in den beiden Zellsystemen als auch in TEL-AML1-positiven Patienten 36 Gene differentiell exprimiert*

Der Vergleich der Genexpressionsdaten sowohl aus dem murinen und dem humanen Zellsystem als auch aus Patientenproben ergab insgesamt 36 übereinstimmende, differentiell exprimierte Gene. Von diesen waren wiederum 14 gleichsinnig reguliert. Mit zehn dieser 36 gemeinsamen Gene konnten im murinen Zellsystem doppelt so viele Gene wie für das humane Zellsystem zudem in den CHIP-Experimenten nachgewiesen werden. Die funktionelle Annotation aller 36 Gene ergab eine Anreicherung für biologische Prozesse u. a. wie die Hämatopoese, die Aktivierung von Leukocyten und die durch kleine GTPasen vermittelte Signaltransduktion. Diese Prozesse werden anscheinend entweder direkt oder indirekt durch TEL-AML1 reguliert und stehen daher vermutlich in engem Zusammenhang mit einer Begünstigung der Transformation betroffener Zellen.

Die genauere Betrachtung einzelner Gene, die sowohl in beiden Zellsystemen als auch in TEL-AML1-positiven Patienten differentiell exprimiert waren zeigte, dass mindestens drei der 14 gleichsinnig regulierten Gene bereits in anderen Zusammenhängen mit malignen Transformationen beschrieben wurden. Bei einem dieser Gene handelt es sich um *ETV5* (*ets variant gene 5*), welches wie *TEL* (*ETV6*) ebenfalls zur Ets-Familie der Transkriptionsfaktoren gehört und dessen Expression in den untersuchten Zellen hochreguliert war. Neben seiner wichtigen Funktion für die Regulation von Entwicklungsvorgängen scheint ETV5 eine Rolle als Proto-Onkogen zu spielen und wird durch den Tumorsuppressor COP1 negativ reguliert (Vitari *et al.*, 2011). In ovariellen Krebszellen wurde eine hochregulierte ETV5 Expression beobachtet, die die Zellen vor Apoptose schützte und zugleich ihre Adhäsion an umliegendes Gewebe verstärkte (Llauradó *et al.*, 2012).

Ein weiteres interessantes Gen, welches in den untersuchten Zellen ebenfalls hochreguliert exprimiert war, ist *JAG2* (*jagged 2*). Dieser Notch-Ligand ist für die Festlegung früher hämatopoetischer Zellen auf eine Linie sehr wichtig und induziert normalerweise die Differenzierung von T-Zellen während gleichzeitig die Entwicklung von B-Zellen unterdrückt wird (Van de Walle *et al.*, 2011). Desweiteren konnte für Zellen einer B-ALL gezeigt werden, dass Notch-Liganden wie *JAG2* das Überleben der Zellen durch ihre antiapoptische Funktion gewährleisten (Nwabo Kamdje *et al.*, 2011).

Ein Gen, dessen Expression in allen untersuchten Zellen herunterreguliert war, ist *PDSS2* (*prenyl (solanesyl) diphosphate synthase, subunit 2*), bei dem es sich vermutlich um einen Tumorsuppressor handelt. Untersuchungen haben gezeigt, dass eine erhöhte Expression von *PDSS2* zu verringerter Proliferation und induzierter Apoptose führt, da es zu einer Blockade des Zellzyklus am Übergang G0/G1 kommt (Chen *et al.*, 2009). Zudem wurde eine verringerte Expression von *PDSS2* in Gewebeproben von Magenkrebspatienten nachgewiesen, die ebenfalls in primären Melanomen detektiert wurde (Fung *et al.*, 2009). Im Mausmodell konnte zudem gezeigt werden, dass die Überexpression von *PDSS2* das Tumorwachstum inhibiert und die Tumorigenität aufhebt (Fung *et al.*, 2009).

Alles in allem deuten diese entweder direkt oder indirekt durch TEL-AML1 fehlregulierten Gene darauf hin, dass die betroffenen Zellen einer Eliminierung durch Apoptose entgehen und eventuell durch verstärkte Adhäsion in ihrer Nische verbleiben bis weitere Veränderungen ihnen einen Wachstumsvorteil verschaffen und sie vollständig transformiert sind.

5.2.4 Zusammenfassende Schlussfolgerungen

Während im murinen Zellsystem mehrere TEL-AML1 Zielgene identifiziert werden konnten, deren misregulierte Expression bereits in anderen Zellen mit malignen Transformationen beschrieben wurden, war dies nur bei einem der im humanen Zellsystem detektierten Zielgene der Fall. Ein Grund hierfür könnte sein, dass die murinen Zellen lediglich 16 Stunden TEL-AML1 exprimierten, wohingegen die humanen Zellen über mehrere Wochen selektioniert und kultiviert wurden. Die tumorigene Funktion zweier weiterer Gene wird zur Zeit noch kontrovers diskutiert, könnte aber ebenfalls für die TEL-AML1 induzierte Leukämogenese eine Rolle spielen. Diese Ergebnisse legen die Schlussfolgerung nahe, dass TEL-AML1 zwar für die Entwicklung eines prä-leukämischen Klons essentiell ist, aber für das weitere Überleben der leukämischen Zellen später keine Rolle mehr spielt. Die Ergebnisse dieser Arbeit untermauern daher ähnliche Vermutungen, die bereits durch Ergebnisse von Untersuchungen mit einer RNAi-vermittelten Herunterregulation von TEL-AML1 in der TEL-AML1-positiven Zell-Linie REH angestellt wurden. Hier verursachte der *knockdown* von TEL-AML1 weder eine Verringerung der Zellvitalität noch führte er zur Induktion von Apoptose (Zaliova *et al.*, 2011). Lediglich der Anteil der Zellen, der sich in der S-Phase des Zellzyklus befand, sowie die Proliferationsrate waren geringfügig, aber signifikant erhöht. Desweiteren konnten keine signifikanten Veränderungen im klonogenen Potential oder dem globalen Genexpressionsprofil beobachtet werden. Daher wurde auch hier geschlussfolgert, dass TEL-AML1 lediglich bei der Entstehung prä-transformierter Zellen eine essentielle Rolle spielt, nicht aber für das Überleben der leukämischen Zellen.

6 AUSBLICK

Sowohl für das murine als auch für das humane Zellsystem konnten TEL-AML1 regulierte Zielgene identifiziert werden, die ebenfalls in TEL-AML1-positiven Patienten misexprimiert waren und daher sehr wahrscheinlich zur TEL-AML1-induzierten Leukämogenese beitragen. Auch wenn keines dieser Gene bereits als Auslöser für die Entstehung einer akuten Prä-B-Zell Leukämie beschrieben wurde, so lässt die Gesamtheit der durch die TEL-AML1 Expression betroffenen Stoffwechselwege doch vermuten, dass ihre veränderte Regulation bzw. Funktionsweise zu einer Transformation der Zellen beiträgt.

Um den Einfluss individueller Gene auf die Generierung prä-transformierter Zellen näher bestimmen zu können, bedarf es allerdings weiterführender Experimente. Mit Hilfe von Zellzyklusanalysen könnte z. B. der Anteil Zellen bestimmt werden, der sich in den unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus befindet, so dass letztendlich eine Aussage darüber getroffen werden kann, ob in Folge der TEL-AML1-Expression tatsächlich eine Beeinträchtigung des Zellzyklus stattfindet und wenn ja welche Phase(n) davon betroffen ist/sind. Auf ähnliche Weise ließe sich eine Fehlregulation der Apoptose oder der Zellproliferation untersuchen.

Einzelne Proteine wie CENP-P oder ORC1 und ihre Interaktionspartner könnten mit Hilfe spezifischer Antikörper in den Zellen detektiert und ihre Lokalisation so sichtbar gemacht werden. Dies würde einen Einblick in die zellularen Prozesse, an denen diese Proteine beteiligt sind, ermöglichen. So wäre es z. B. interessant zu sehen, welchen Einfluss die erhöhte CENP-P-Expression auf die Centromerbildung und die gleichmäßige Verteilung der Schwesterchromatiden auf beide Tochterzellen hat. Zudem könnte man so beobachten, ob die erhöhte ORC1-Expression auch in den hier verwendeten Zellen wie bereits in einem anderen Zusammenhang beschrieben (Di Paola & Zannis-Hadjopoulos, 2011) zu einer vermehrten Chromatinbindung führt.

Da es sich bei den verwendeten murinen Zellen um keine Tumorzell-Linie handelt, wird ihr Karyotyp als weitgehend normal angesehen (diploid, 33% polyploid, 40 (36-42) $<2n>$; [http://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-300.html?tx_dsmzresources_pi5\[returnPid\]=192](http://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-300.html?tx_dsmzresources_pi5[returnPid]=192)). Eine Langzeitkultur unter ständiger TEL-AML1-Expression könnte daher darüber Aufschluss geben, ob die Zellen im Laufe der Zeit anfälliger für chromosomale Aberrationen sowie Poly- oder Aneuploidien werden bzw. ob die Zellen diese genetischen Veränderungen vermehrt überleben.

Desweiteren könnte eine spezifische Herunterregulation der durch TEL-AML1 hochregulierten Gene z. B. mittels siRNA die beobachteten Auswirkungen verhindern bzw. umkehren und die Aussage bekräftigen, dass es sich um einen potentiellen prä-transformierenden Faktor handelt, der einer direkten Regulation durch TEL-AML1 unterliegt.

Die Aufklärung einer möglichen Beteiligung misexprimierter mikro RNAs als potentielle Ursache für die gegensätzliche Expression einzelner Gene und Proteine bedarf ebenfalls weiterer Experimente. So lässt sich die Bindung einer speziellen mikro RNA an die nicht-translatierte 3'-Region (3'-UTR) einer vorhergesagten Ziel-mRNA mit Hilfe geeigneter Luciferaseassays nachweisen. Zudem sollte die Misexpression einzelner, näher zu untersuchender mikro RNAs unabhängig von den Expressionsarrays auch noch über speziell entworfene quantitative PCR-Ansätze untersucht und bestätigt werden.

Obwohl *TEL* eines der am häufigsten von Translokationen betroffenen Gene darstellt, sind bis heute keine direkt durch diesen Transkriptionsfaktor regulierten Zielgene bekannt. Die im Rahmen dieser Arbeit in den murinen und humanen Zellsystemen identifizierten *TEL* Zielgene könnten daher bei der Aufklärung *TEL*-regulierter Gene helfen und so zum Verständnis der Tumorsuppressorfunktion, die *TEL* anscheinend ausübt, beitragen. Das selbe gilt auch für die weitere Aufklärung *AML1*-regulierter Gene, auch wenn hier schon deutlich mehr bereits bekannt sind.

Die generierten humanen Zell-Linien exprimieren stabil *AML1*, *TEL* bzw. *TEL-AML1* jeweils mit einem cMyc-tag am C-terminalen Ende. Daher könnten sie auch für Ko-Immünpräzipitationen zur Identifizierung weiterer Interaktionspartner verwendet werden.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Abrieu, A.**, J. A. Kahana, K. W. Wood and D. W. Cleveland (2000). *CENP-E as an essential component of the mitotic checkpoint in vitro*. Cell, **102**, 817-826
- Agape, P. B.**, Gerard, H. Cave, I. Devaux, E. Vilmer, M.-C. Lecomte and B. Grandchamp (1997). *Analysis of ETV6 and ETV6-AML1 proteins in acute lymphoblastic leukaemia*. Brit J Haematol, **98**, 234-239
- Aikawa, Y.**, L. A. Nguyen, K. Isono, N. Takakura, Y. Tagata, M. L. Schmitz, H. Koseki and I. Kitabayashi (2006). *Roles of HIPK1 and HIPK2 in AML1- and p300-dependent transcription, hematopoiesis and blood vessel formation*. EMBO J, **25**, 3955-3965
- Andreasson, P.**, J. Schwaller, E. Anastasiadou, J. Aster and D. G. Gilliland (2001). *The expression of ETV6/CBFA2 (TEL/AML1) is not sufficient for the transformation of hematopoietic cell lines in vitro or the induction of hematologic disease in vivo*. Cancer Genet Cytogenet, **130**, 93-104
- Aplan, P. D.** (2006). *Causes of oncogenic chromosomal translocation*. Trends Genet, **22**, 46-55
- Arnold, S. J.**, E. J. Robertson (2009). *Making a commitment: cell lineage allocation and axis patterning in the early mouse embryo*. Nat Rev Mol Biol, **10**, 91-103
- Aronson, B. D.**, A. L. Fisher, K. Blechman, M. Caudy and J. P. Gergen (1997). *Groucho-dependent and -independent repression activities of runt domain proteins*. Mol Cell Biol, **17**, 5581-5587
- Arai, H.**, K. Maki, K. Waga, K. Sasaki, Y. Nakamura, Y. Imai, M. Kurokawa, H. Hirai and K. Mitani (2002). *Functional regulation of TEL by p38-induced phosphorylation*. Biochem Biophys Res Commun, **299**, 116-125
- Bäckström, S.**, M. Wolf-Watz, C. Grundström, T. Härd, T. Grundström and U. H. Sauer (2002). *The RUNX1 runt domain at 1.25 Å resolution: A structural switch and specifically bound chloride ions modulate DNA binding*. J Mol Biol, **322**, 259-272
- Barker, N.**, R. A. Ridgway, J. H. van Es, M. van de Wetering, H. Begthel, M. van den Born, E. Danenberg, A. R. Clarke, O. J. Sansom and H. Clevers (2009). *Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer*. Nature, **457**, 608-611
- Bartel, F. O.**, T. Higuchi and D. D. Spyropoulos (2000). *Mouse models in the study of the Ets family of transcription factors*. Oncogene, **19**, 6443-6454
- Bernard, O. A.**, S. P. Romana, H. Poirel and R. Berger (1996). *Molecular cytogenetics of t(12;21) (p13;q22)*. Leukemia Lymphoma, **23**, 459-465
- Bernardin-Fried, F.**, T. Kummalue, S. Leijen, M. I. Collector, K. Ravid and A. D. Friedman (2004). *AML1/RUNX1 increases during G1 to S cell cycle progression independent of cytokine-dependent phosphorylation and induces cyclin D3 gene expression*. J Biol Chem, **279**, 15678-15687
- Bernstein, B. E.**, A. Meissner and E. S. Lander (2007). *The mammalian epigenome*. Cell, **128**, 669-681

- Bharadwaj, R. and H. Yu** (2004). *The spindle checkpoint, aneuploidy, and cancer*. *Oncogene*, **23**, 2016-2027
- Biggs, J. R.**, L. F. Peterson, Y. Zhang, A. S. Kraft and D. E. Zhang (2006). *AML1/RUNX1 phosphorylation by cyclin-dependent kinases regulates the degradation of AML1/RUNX1 by the anaphase-promoting complex*. *Mol Cell Biol*, **26**, 7420-7429
- Bird, A.** (2002). *DNA methylation patterns and epigenetic memory*. *Genes Dev*, **16**, 6-21
- Blyth, K.**, E. R. Cameron and J. C. Neil (2005). *The RUNX genes: gain or loss of function in cancer*. *Nat Rev Cancer*, **5**, 376-387
- Bohlander, S. K.** (2005). *ETV6: A versatile player in leukemogenesis*. *Semin Cancer Biol*, **15**, 162-174
- Boveri, T.** (1914). *Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren*. Gustav Fischer Verlag, Jena
- Bracken, C. P.**, S. J. Wall, B. Barré, K. I. Panov, P. M. Ajuh and N. D. Perkins (2008). *Regulation of cyclin D1 RNA stability by SNIP1*. *Cancer Res*, **68**, 7621-7628
- Braig, M.**, S. Lee, C. Loddenkemper, C. Rudolph, A. H. Peters, B. Schlegelberger, H. Stein, B. Dörken, T. Jenuwein and C. A. Schmitt (2005). *Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development*. *Nature*, **436**, 660-665
- Burkard, T. R.**, M. Planyavsky, I. Kaupe, F. P. Breitwieser, T. Bürckstümmer, K. L. Bennett, G. Superti-Furga and J. Colinge (2011). *Initial characterization of the human central proteome*. *BMC Syst Biol*, **5**:17
- Byrne, J. A.**, S. Maleki, J. R. Hardy, B. S. Gloss, R. Murali, J. P. Scurry, S. Fanayan, C. Emmanuel, N. F. Hacker, R. L. Sutherland, A. Defazio and P. M. O'Brien (2010). *MAL2 and tumor protein D52 (TPD52) are frequently overexpressed in ovarian carcinoma, but differentially associated with histological subtype and patient outcome*. *BMC Cancer*, **10**, 497
- Cameron, E. R. and J. C. Neil** (2004). *The RUNX genes: lineage-specific oncogenes and tumor suppressors*. *Oncogene*, **23**, 4308-4314
- Canon, J. and U. Banerjee** (2000). *Runt and Lozenge function in Drosophila Development*. *Semin Cell Dev Biol*, **11**, 327-336
- Cavé, H.**, B. Gerard, E. Martin, C. Guidal, I. Devaux, J. Weissenbach, J. Elion, E. Vilmer and B. Grandchamp (1995). *Loss of heterozygosity in the chromosomal region 12p12-13 is very common in childhood acute lymphoblastic leukemia and permits the precise localization of a tumorsuppressor gene distinct from p27KIP1*. *Blood*, **86**, 3869-3875
- Chakrabarti, S. R.**, R. Sood, S. Nandi and G. Nucifora (2000). *Posttranslational modification of TEL and TEL/AML1 by SUMO-1 and cell-cycle-dependent assembly into nuclear bodies*. *Proc Natl Acad Sci*, **97**, 13281-13285
- Chakrabarti, S. R.**, R. Sood, S. Ganguly, S. Bohlander, Z. Shen and G. Nucifora (1999). *Modulation of TEL transcription activity by interaction with the ubiquitin-conjugating enzyme UBC9*. *Proc Natl Acad Sci*, **96**, 7467-7472

- Chakrabarti, S. R. and G. Nucifora** (1999). *The leukemia-associated gene TEL encodes a transcription repressor which associates with SMRT and mSin3A*. *Biochem Biophys Res Commun*, **264**, 871-877
- Chakraborty, S., K. K. Sinha, V. Senyuk and G. Nucifora** (2003). *SUV39H1 interacts with AML1 and abrogates AML1 transactivity. AML1 is methylated in vivo*. *Oncogene*, **22**, 5229-5237
- Chen, J., O. Odenike and J. D. Rowley** (2010). *Leukaemogenesis: more than mutant genes*. *Nat Rev Cancer*, **10**, 23-36
- Chen, P., S. H. Zhao, Y. L. Chu, K. Xu, L. Zhu, Y. Wu, J. Song, C. X. Cao, X. Xue and Y. Y. Niu** (2009). *Anticancer activity of PDSS2, prenyl diphosphate synthase, subunit 2, in gastric cancer tissue and the SGC7901 cell line*. *Anticancer Drugs*, **20**, 141-148
- Chen, Z., L. C. Trotman, D. Shaffner, H. K. Lin, Z. A. Dotan, M. Niki, J. A. Koutcher, H. I. Scher, T. Ludwig, W. Gerald, C. Cordon-Cardo and P. P. Pandolfi** (2005). *Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis*. *Nature*, **436**, 725-730
- Cleveland, D. W., Y. Mao and K. F. Sullivan** (2003). *Centromeres and kinetochores: from epigenetics to mitotic checkpoint signaling*. *Cell*, **112**, 407-421
- Cowley, D. O. and B. Graves** (2000). *Phosphorylation represses Ets-1 DNA binding by reinforcing autoinhibition*. *Genes Dev*, **14**, 366-376
- Cremer, T., M. Cremer, S. Dietzel, S. Müller, I. Solovei and S. Fakan** (2006). *Chromosome territories - a functional nuclear landscape*. *Curr Opin Cell Biol*, **18**, 307-316
- Dalton, S. and R. Treisman** (1992). *Characterization of SAP-1, a protein recruited by serum response factor to the c-fos serum response element*. *Cell*, **68**, 597-612
- De Braekeleer, E., C. Férec and M. De Braekeleer** (2009). *RUNX1 translocations in malignant hemopathies*. *Anticancer Res*, **29**, 1031-1038
- De Bruijn, M. F. and N. A. Speck** (2004). *Core-binding factors in hematopoiesis and immune function*. *Oncogene*, **23**, 4238-4248
- Degnan, B. M., S. M. Degnan, T. Naganuma and D. E. Morse** (1993). *The ets multigene family is conserved throughout the metazoa*. *Nucleic Acids Res*, **21**, 3479-3484
- DePamphilis, M. L.** (2003). *The 'ORC cycle': a novel pathway for regulating eukaryotic DNA replication*. *Gene*, **310**, 1-15
- Dimri, G. P.** (2005). *What has senescence got to do with cancer?* *Cancer Cell*, **7**, 505-512
- Di Paola, D. and M. Zannis-Hadjopoulos** (2011). *Comparative analysis of pre-replication complex proteins in transformed and normal cells*. *J Cell Biochem*, **113**, 1333-1347
- Ducret, C., S. M. Maira, A. Dierich and B. Wasylyk** (1999). *The net repressor is regulated by nuclear export in response to anisomycin, UV, and heat shock*. *Mol Cell Biol*, **19**, 7076-7087
- Duncker, B. P., I. N. Chesnokov and B. J. McConkey** (2009). *The origin recognition complex protein family*. *Genome Biol*, **10**, 214

- Durinck, S.**, Y. Moreau, A. Kasprzyk, S. Davis, B. de Moor, A. Brazma and W. Huber (2005). *BioMart and Bioconductor: a powerful link between biological databases and microarray data analysis*. *Bioinformatics*, **21**, 3439-3440
- Eguchi-Ishimae, M.**, M. Eguchi, E. Ishii, S. Miyazaki, K. Ueda, N. Kamada and S. Mizutani (2001). *Breakage and fusion of the TEL (ETV6) gene in immature B lymphocytes induced by apoptogenic signals*. *Blood*, **97**, 737-743
- Elagib, K. E. and A. N. Goldfarb** (2007). *Regulation of RUNX1 transcriptional function by GATA-1*. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, **17**, 271-280
- Fears, S.**, M. Gavin, D. E. Zhang, C. Hetherington, Y. Ben-David, J. D. Rowley and G. Nucifora (1997). *Functional characterization of ETV6 and ETV6/CBFA2 in the regulation of the MCSFR proximal promoter*. *Proc Natl Acad Sci*, **94**, 1949-1954
- Fears, S.**, C. Vignon, S. K. Bohlander, S. Smith, J. D. Rowley and G. Nucifora (1996). *Correlation between the ETV6/CBFA2 (TEL/AML1) fusion gene and karyotypic abnormalities in children with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia*. *Genes Chromosomes Cancer*, **17**, 127-135
- Fenrick, R.**, J. M. Amann, B. Lutterbach, L. Wang, J. J. Westendorf, J. R. Downing and S. W. Hiebert (1999). *Both TEL and AML-1 contribute repression domains to the t(12;21) fusion protein*. *Mol Cell Biol*, **19**, 6566-6574
- Field, Y.**, N. Kaplan, Y. Fondufe-Mittendorf, I. K. Moore, E. Sharon, Y. Lubling, J. Widom and E. Segal (2008). *Distinct modes of regulation by chromatin encoded through nucleosome positioning signals*. *PLoS Comput Biol*, **4**, e1000216
- Fine, B. M.**, M. Stanulla, M. Schrappe, M. Ho, S. Viehmann, J. Harbott and L. M. Boxer (2004). *Gene expression patterns associated with recurrent chromosomal translocations in acute lymphoblastic leukemia*. *Blood*, **103**, 1043-1049
- Fischer, M.**, M. Schwieger, S. Horn, B. Niebuhr, A. Ford, S. Roscher, U. Bergholz, M. Greaves, J. Löhler and C. Stocking (2005). *Defining the oncogenic function of TEL/AML1 (ETV6/RUNX1) fusion protein in a mouse model*. *Oncogene*, **24**, 7579-7591
- Ford, A. M.**, C. Palmi, C. Bueno, D. Hong, P. Cardus, D. Knight, G. Cazzaniga, T. Enver and M. Greaves (2009). *The TEL-AML1 leukemia fusion gene dysregulates the TGF- β pathway in early B lineage progenitor cells*. *J Clin Invest*, **119**, 826-836
- Ford, A. M.**, C. A. Bennett, C. M. Price, M. C. Bruin, E. R van Wering and M. Greaves (1998). *Fetal origins of the TEL-AML1 fusion gene in identical twins with leukemia*. *Proc Natl Acad Sci*, **95**, 4584-4588
- Friedman, A. D.** (2009). *Cell cycle and developmental control of hematopoiesis by RUNX1*. *J Cell Physiol*, **219**, 520-524
- Fujii, M.**, L. A. Lyakh, C. P. Bracken, J. Fukuoka, M. Hayakawa, T Tsukiyama, S. J. Soll, M. Harris, S. Rocha, K. C. Roche, S. Tominaga, J. Jen, N. D. Perkins, R. J. Lechleider and A. B. Roberts (2006). *SNIP1 is a candidate modifier of the transcriptional activity of c-Myc on E box-dependent target genes*. *Mol Cell*, **24**, 771-783

- Fung, J. M.**, R. Smith, M. A. Brown, S. H. Lau, D. Xie, G. K. Lau and X. Y. Guan (2009). *Identification and characterization of a novel melanoma tumor suppressor gene on human chromosome 6q21*. Clin Cancer Res, **15**, 797-803
- Gall, J. G.**, M. Bellini, Z. Wu and C. Murphy (1999). *Assembly of the nuclear transcription and processing machinery: Cajal bodies (coiled bodies) and transcriptosomes*. Mol Biol Cell, **10**, 4385-4402
- Galm, O.**, J. G. Herman, and S. B Baylin (2006). *The fundamental role of epigenetics in hematopoietic malignancies*. Blood Rev, **20**, 1-13
- Gefen, N.**, V. Binder, M. Zaliova, Y. Linka, M. Morrow, A. Novosel, L. Edry, L. Hertzberg, N. Shomron, O. Williams, J. Trka, A. Borkhardt and S. Izraeli (2010). *Hsa-mir-125b-2 is highly expressed in childhood ETV6/RUNX1 (TEL/AML1) leukemias and confers survival advantage to growth inhibitory signals independent of p53*. Leukemia, **24**, 89-96
- Gentleman, R. C.**, V. J. Carey, D. M. Bates, B. Bolstad, M. Dettling, S. Dudoit, B. Ellis, L. Gautier, Y. Ge, J. Gentry, K. Hornik, T. Hothorn, W. Huber, S. Iacus, R. Irizarry, F. Leisch, C. Li, M. Maechler, A. J. Rossini, G. Sawitzki, C. Smith, G. Smyth, L. Tierney, J. Y. Yang and J. Zhang (2004). *Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics*. Genome Biol, **5**, R80
- Ghozi, M. C.**, Y. Bernstein, V. Negreanu, D. Levanon and Y. Groner (1996). *Expression of human acute leukemia gene AML1 is regulated by two promoter regions*. Proc Natl Acad Sci, **93**, 1935-1940
- Ghysdael, J. and A. Boureux** (1997). *The ETS family of transcriptional regulators*. In: *Oncogenes as transcriptional regulators*. M. Yaniv and J. Ghysdael (eds). Birkhauser Verlag: Basel, Switzerland, **1**, 29-88
- Giese, K.**, C. Kingsley, J. R. Kirshner and R. Grosschedl (1995). *Assembly and function of a TCR alpha enhancer complex is dependent on LEF-1 induced DNA bending and multiple protein-protein-interactions*. Genes Dev, **9**, 995-1008
- Goetz, T. L.**, T. L. Gu, N. A. Speck and B. J. Graves (2000). *Auto-inhibition of Ets-1 is counteracted by DNA binding cooperativity with core-binding factor alpha2*. Mol Cell Biol, **20**, 81-90
- Golub, T. R.**, G. F. Barker, S. K. Bohlander, S. W. Hiebert, D. C. Ward, P. Bray-Ward, E. Morgan, S. C. Raimondi, J. D. Rowley and D. G. Gilliland (1995). *Fusion of the TEL gene on 12p13 to the AML1 gene on 21q22 in acute lymphoblastic leukemia*. Proc Acad Sci, **92**, 4917-4921
- Golub, T. R.**, G. F. Barker, M. Lovett and D. G. Gilliland (1994). *Fusion of PDGF receptor β to a novel ets-like gene, tel, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12) chromosomal translocation*. Cell, **77**, 307-316
- Gorbsky, G. J.**, R. H. Chen and A. W. Murray (1998). *Microinjection of antibody to Mad2 protein into mammalian cells in mitosis induces premature anaphase*. J Cell Biol, **141**, 1193-1205
- Gorman, J. and E. C. Greene** (2008). *Visualizing one-dimensional diffusion of proteins along DNA*. Nat Struct Mol Biol, **15**, 768-774
- Gorski, S. A.**, M. Dundr and T. Misteli (2006). *The road much travelled: trafficking in the cell nucleus*. Curr Opin Cell Biol, **18**, 284-290

- Gowers, D. M.**, G. G. Wilson and S. E. Halford (2005). *Measurement of the contributions of 1D and 3D pathways to the translocation of a protein along DNA*. Proc Natl Acad Sci, **102**, 15883-15888
- Graves, B. and J. Petersen** (1998). *Specificity within the ets family of transcription factors*. Adv Cancer Res, **75**, 1-55
- Greaves, M.** (2006). *Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukemia*. Nat Rev Cancer, **6**, 193-203
- Greaves, M.** (2003). *Pre-natal origins of childhood leukemia*. Rev Clin Exp Hematol, **7**, 233-245
- Green, S. M.**, H. J. Coyne 3rd, L. P. McIntosh and B. J. Graves (2010). *DNA binding by the ETS protein TEL (ETV6) is regulated by autoinhibition and self-association*. J Biol Chem, **285**, 18496-18504
- Grimshaw, S. J.**, H. R. Mott, K. M. Stott, P. R. Nielson, K. A. Evetts, L. J. Hopkins, D. Nietlispach and D. Owen (2004). *Structure of the sterile alpha motif (SAM) domain of the Saccharomyces cerevisiae mitogen-activated protein kinase pathway-modulating protein STE50 and analysis of its interaction with the STE11 SAM*. J Biol Chem, **279**, 2192-2201
- Growney, J. D.**, H. Shigematsu, Z. Li, B. H. Lee, J. Adelsperger, R. Rowan, D. P. Curley, J. L. Kutok, K. Akashi, I. R. Williams, N. A. Speck and D. G. Gilliland (2005). *Loss of RUNX1 perturbs adult hematopoiesis and is associated with a myeloproliferative phenotype*. Blood, **106**, 494-504
- Guidez, F.**, K. Petrie, A. M. Ford, H. Lu, C. A. Bennett, A. McGregor, J. Hannemann, Y. Ito, J. Ghysdael, M. Greaves, L. M. Wiedemann and A. Zelent (2000). *Recruitment of the nuclear receptor corepressor N-CoR by the TEL moiety of the childhood leukemia-associated TEL-AML1 oncoprotein*. Blood, **96**, 2557-2561
- Hager, G. L.**, J. G. McNally and T. Mistelli (2009). *Transcription Dynamics*. Mol Cell, **35**, 741-753
- Hahn, J.**, W. Xiao, F. Jiang, F. Simone, M. J. Thirman and Z. Wang (2007). *Apoptosis induction and growth suppression by U19/Eaf2 is mediated through its ELL-binding domain*. Prostate, **67**, 146-153
- Hanson, C. A.**, L. D. Wood and S. W. Hiebert (2008). *Cellular stress triggers TEL nuclear export via two genetically separable pathways*. J Cell Biochem, **104**, 488-498
- Harada, R.**, C. Vadnais, L. Sansregret, L. Leduy, G. Bérubé, F. Robert and a. Nepveu (2008). *Genome-wide location analysis and expression studies reveal a role for p110 CUX1 in the activation of DNA replication genes*. Nucleic Acids Res, **36**, 189-202
- Hiebert, S. W.**, W. Sun, J. N. Davis, T. Golub, S. Shurtleff, A. Buijs, J. R. Downing, G. Grosveld, M. F. Roussel, D. G. Gilliland, N. Lenny and S. Meyers (1996). *The t(12;21) translocation converts AML1-B from an activator to a repressor of transcription*. Mol Cell Biol, **16**, 1349-1355
- Ho, S. N.**, H. D. Hunt, R. M. Horton, J. K. Pullen and L. R. Pease (1989). *Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction*. Gene, **77**, 51-59
- Hong, D.**, R. Gupta, P. Ancliff, A. Atzberger, J. Brown, S. Soneji, J. Green, S. Colman, W. Piacibello, V. Buckle, S. Tsuzuki, M. Greaves and T. Enver (2008). *Initiating and cancer-propagating cells in TEL-AML1-associated childhood leukemia*. Science, **319**, 336-339
- Hoyt, M. A.**, L. Totis and B. T. Roberts (1991). *S. cerevisiae genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function*. Cell, **66**, 507-517

- Hsieh, J. J.**, T. Henkel, P. Salmon, E. Robey, M. G. Peterson and S. D. Hayward (1996). *Truncated mammalian Notch1 activates CBF1/RBPJk-repressed genes by a mechanism resembling that of Epstein-Barr virus EBNA2*. Mol Cell Biol, **16**, 952-959
- Huang, D. W.**, B. T. Sherman and R. A. Lempicki (2009). *Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources*. Nat Prot, **4**, 44-57
- Huang, G.**, K. Shigesada, K. Ito, H. J. Wee, T. Yokomizo and Y. Ito (2001). *Dimerization with PEBP2 β protects RUNX1/AML1 from ubiquitin-proteasome-mediated degradation*. EMBO J, **20**, 723-733
- Humbert, N.**, N. Navaratnam, A. Augert, M. Da Costa, S. Martien, J. Wang, D. Martinez, C. Abbadie, D. Carling, Y. de Launoit, J. Gil and D. Bernard (2010). *Regulation of ploidy and senescence by the AMPK-related kinase NUAK1*. EMBO J, **29**, 376-386
- Imai, Y.**, M. Kurokawa, Y. Yamaguchi, K. Izutsu, E. Nitta, K. Mitani, M. Satake, T. Noda, Y. Ito and H. Hirai (2004). *The corepressor mSin3A regulates phosphorylation-induced activation, intranuclear location, and stability of AML1*. Mol Cell Biol, **24**, 1033-1043
- Imai, Y.**, M. Kurokawa, K. Tanaka, A. D. Friedman, S. Ogawa, K. Mitani, Y. Yazaki and H. Hirai (1998). *TLE, the human homolog of Groucho, interacts with AML1 and acts as a repressor of AML1-induced transactivation*. Biochem Biophys Res Commun, **252**, 582-589
- Inoue, H.**, H. Nojima and H. Okayama (1990). *High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids*. Gene, **96**, 23-28
- Ito, Y.** (2008). *RUNX genes in development and cancer: regulation of viral gene expression and the discovery of RUNX family genes*. Adv Cancer Res, **99**, 33-76
- Ito, Y.** (2004). *Oncogenic potential of the RUNX gene family: ,Overview'*. Oncogene, **23**, 4198-4208
- Ito, Y.** (1999). *Molecular basis of tissue-specific gene expression mediated by the runt domain transcription factor PEBP2/CBF*. Genes Cells, **4**, 685-696
- Ito, Y. and S.-C. Bae** (1997). *The runt domain transcription factor, PEBP2/CBF, and its involvement in human leukemia*. In: Progress in Gene Expression (ed. M Karin) 107-132, Cambridge, MA: Birkhauser
- Ito, Y.** (1996). *Structural alterations in the transcription factor PEBP2/CBF linked to four different types of leukemia*. J Cancer Res Clin Oncol, **122**, 266-274
- Iwasaki, H. and K. Akashi** (2007). *Hematopoietic developmental pathways: on cellular basis*. Oncogene, **26**, 6687-6696
- Janknecht, R.**, W. H. Ernst, V. Pingoud and A. Nordheim (1993). *Activation of ternary complex factor Elk-1 by MAP kinases*. EMBO J, **12**, 5097-5104
- Javed, A.**, B. Guo, S. Hiebert, J.-Y. Choi, J. Green, S.-C. Zhao, M. A. Osborne, S. Stifani, J. L. Stein, J. B. Lian, A. J. van Wijnen and G. S. Stein (2000). *Groucho/TLE/R-esp proteins associate with the nuclear matrix and repress RUNX (CBFa/AML/PEBP2 α) dependent activation of tissue-specific gene transcription*. J Cell Sci, **113**, 2221-2231
- Jeffery, I.**, B., D. G. Higgins and A. C. Culhane (2006). *Comparison and evaluation of methods for generating differentially expressed gene lists from microarray data*. BMC Bioinformatics, **7**, 359

- Jenuwein, T. and C. D. Allis** (2001). *Translating the histone code*. Science, **306**, 1074-1080
- Jiang, H.**, F. Zhang, T. Kurosu and B. M. Perterlin (2005). *RUNX1 binds positive elongation factor b and represses transcriptional elongation by RNA polymerase II: possible mechanism of CD4 silencing*. Mol Cell Biol, **25**, 10675-10683
- Jousset, C.**, C. Carron, A. Boueux, C. T. Quang, C. Oury, I. Dusanter-Fourt, M. Charon, J. Levin, O. Bernard and J. Ghysdael (1997). *A domain of TEL conserved in a subset of ETS proteins defines a specific oligomerization interface essential to the mitogenic properties of the TEL-PDGFR beta oncoprotein*. EMBO J, **16**, 69-82
- Kagoshima, H.**, K. Shigesada, M. Satake, Y. Ito, H. Miyoshi, M. Ohki, M. Pepling and P. Gergen (1993). *The runt domain identifies a new family of heteromeric DNA-binding transcriptional regulatory proteins*. Trends Genet, **9**, 338-341
- Kania, M. A.**, A. S. Bonner, J. B. Duffy and J. P. Gergen (1990). *The Drosophila segmentation gene runt encodes a novel nuclear regulatory protein that is also expressed in the developing nervous system*. Genes Dev, **4**, 1701-1713
- Kanno, T.**, Y. Kanno, L. F. Chen, E. Ogawa, W. Y. Kim and Y. Ito (1998). *Intrinsic transcriptional activation-inhibition domains of the polyomavirus enhancer binding protein 2/core binding factor α subunit revealed in the presence of the β subunit*. Mol Cell Biol, **18**, 2444-2454
- Karim, F. D.**, L. D. Urness, C. S. Thummel, M. J. Klemsz, S. R. McKercher, A. Celada, C. Van Beveren, R. A. Maki, C. V. Gunther, J. A. Nye, (1990). *The ETS domain: a new DNA-binding motif that recognizes a purine-rich core DNA sequence*. Genes Dev, **4**, 1451-1453
- Katsumoto, T.**, N. Yoshida and I. Kitabayashi (2008). *Roles of the histone acetyltransferase monocytic leukemia zinc finger protein in normal and malignant hematopoiesis*. Cancer Sci, **99**, 1523-1527
- Kim, C. A.**, M. L. Phillips, W. Kim, M. Gingery, H. H. Tran and M. A. Robinson (2001). *Polymerization of the SAM domain of TEL in leukemogenesis and transcriptional repression*. EMBO J, **20**, 4173-4182
- Kim, R. H.**, K. C. Flanders, S. Birkey Reffey, L. A. Anderson, C. S. Duckett, N. D. Perkins and A. B. Roberts (2001). *SNIP1 inhibits NF-kappa B signaling by competing for its binding to the C/H1 domain of CBP/p300 transcriptional co-activators*. J Biol Chem, **276**, 46297-46304
- Kim, R. H.**, D. Wang, M. Tsang, J. Martin, C. Huff, M. P. de Caestecker, W. T. Parks, X. Meng, R. J. Lechleider, T. Wang and A. B. Roberts (2000). *A novel smad nuclear interacting protein, SNIP1, suppresses p300-dependent TGF-beta signal transduction*. Genes Dev, **14**, 1605-1616
- Kitabayashi, I.**, Y. Aikawa, L. A. Nguyen, A. Yokoyama and M. Ohki (2001). *Activation of AML1-mediated transcription by MOZ and inhibition by the MOZ-CBP fusion protein*. EMBO J, **20**, 7184-7196
- Klambt, C.** (1993). *The Drosophila gene pointed encodes two ETS-like proteins which are involved in the development of the midline glial cells*. Development, **117**, 163-176
- Kobayashi, H.**, K. T. Montgomery, S. K. Bohlander, C. N. Adra, B. L. Lim, R. S. Kucherlapati, H. Donis-Keller, M. S. Holt, M. M. Le Beau and J. D. Rowley (1994). *Fluorescence in situ hybridization mapping of translocations and deletions involving the short arm of human chromosome 12 in malignant hematologic diseases*. Blood, **84**, 3473-3482

- Kong, S. E.**, C. A. S. Banks, A. Shilatifard, J. W. Conaway and R. C. Conaway (2005). *ELL-associated factors 1 and 2 are positive regulators of RNA polymerase II elongation factor ELL*. Proc Natl Acad Sci, **102**, 10094-10098
- Kozu, T.**, H. Miyoshi, K. Shimizu, N. Maseki, Y. Kaneko, H. Asou, N. Kamada and M. Ohki (1995). *The t(12;21) of acute lymphoblastic leukemia results in a TEL-AML1 gene fusion*. Blood, **85**, 3662-3670
- Kozubek, S.**, E. Lukášová, A. Marecková, M. Skalníková, M. Kozubek, E. Bártová, V. Kroha, E. Krahulcová and J. Slotová (1999). *The topological organization of chromosomes 9 and 22 in cell nuclei has a determinative role in the induction of t(9;22) translocations and in the pathogenesis of t(9;22) leukemias*. Chromosoma, **108**, 426-435
- Kredinger, V. and A. Nepveu** (2010). *The roles of CUX1 homeodomain proteins in the establishment of transcriptional program required for cell migration and invasion*. Cell Adh Migr, **4**, 348-352
- Krüger, M. and M. Mann** (2006). *Präzise Methode zur MS-basierten quantitativen Proteomanalyse*. BIOSpektrum, 04.06, 378-380
- Ksiażek, K.**, J. Mikula-Pietrasik, R. Catar, G. Dworacki, M. Winckiewicz, M. Frydrychowicz, D. Dragun, R. Staniszewski, A. Jörres and J. Witowski (2010). *Oxidative stress-dependent increase in ICAM-1 expression promotes adhesion of colorectal and pancreatic cancers to the senescent peritoneal mesothelium*. Int J Cancer, **127**, 293-303
- Kwiatkowski, B. A.**, L. S. Bastian, T. R. Bauer, S. Tsai, A. G. Zielinska-Kwiatkowska and D. D. Hickstein (1998). *The ets family member TEL binds to the Fli-1 oncoprotein and inhibits its transcriptional activity*. J Biol Chem, **273**, 17525-17530
- Lämmli, U. K.** (1970). *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, **227**, 680-685
- Lander, E. S.**, L. M. Linton, B. Birren *et al.* (2001). *Initial sequencing and analysis of the human genome*. Nature, **409**, 860-921
- Laudet, V.**, C. Hanni, D. Stehelin and M. Duterque-Coquillaud (1999). *Molecular phylogeny of the ETS gene family*. Oncogene, **18**, 1351-1359
- Lautenberger, J. A.**, L. A. Burdett, M. A. Gunnell, S. Qi, D. K. Watson, S. J. O'Brien and T. S. Papas (1992). *Genomic dispersal of the ets gene family during metazoan evolution*. Oncogene, **7**, 1713-1719
- Lee, C. K.**, Y. Shibata, B. Rao, B. D. Strahl and J. D. Lieb (2004a). *Evidence for nucleosome depletion at active regulatory regions genome-wide*. Nature Genet, **36**, 900-905
- Lee, Y. J.**, J. H. Kim, S. Bae, S.-K. Rho and S. Y. Choe (2004b). *Mechanism of transcriptional repression by TEL/AML1 fusion protein*. Mol Cells, **17**, 217-222
- Lee, T. I.**, S. E. Johnstone and R. A. Young (2006). *Chromatin immunoprecipitation and microarray-based analysis of protein location*. Nat Protocols, **1**, 729-748
- Le Gallic, L.**, D. Sgouras, G. Beal Jr. and G. Mavrothalassitis (1999). *Transcriptional repressor ERF is a Ras/mitogen-activated protein kinase target that regulates cellular proliferation*. Mol Cell Biol, **19**, 4121-4133

- Leprince, D.**, A. Gegonne, J. Coll, C. de Taisne, C. Schneeberger, C. Lagrou and D. Stehelin (1983). *A putative second cell-derived oncogene of the avian leukaemia retrovirus E26*. Nature, **306**, 395-397
- Levanon, D. and Y. Groner** (2004). *Structure and regulated expression of mammalian RUNX genes*. Oncogene, **23**, 4211-4219
- Levanon, D.**, R. E. Goldstein, Y. Bernstein, H. Tang, D. Goldenberg, S. Stifani, Z. Paroush and Y. Groner (1998). *Transcriptional repression by AML1 and LEF-1 is mediated by the TLE /Groucho repressors*. Proc Natl Acad Sci, **95**, 11590-11595
- Levanon, D.**, Y. Bernstein, V. Negreanu, M. C. Ghazi, I. Bar-Am, R. Aloya, D. Goldenberg, J. Lotem and Y. Groner (1996). *A large variety of alternatively spliced and differentially expressed mRNAs are encoded by the human acute myeloid leukemia gene AML1*. DNA Cell Biol, **15**, 175-185
- Levanon, D.**, V. Negreanu, Y. Bernstein, I. Bar-Am, L. Avivi and Y. Groner (1994). *AML1, AML2 and AML3, the human members of the runt domain gene-family: cDNA structure, expression, and chromosomal location*. Genomics, **23**, 425-432
- Li, B.**, M. Carey and J. L. Workman (2007). *The role of chromatin during transcription*. Cell, **128**, 707-719
- Li, D.**, K. K. Sinha, M. A. Hay, C. R. Rinaldi, Y. Sauntharajah and G. Nucifora (2007). *RUNX1-RUNX1 homodimerization modulates RUNX1 activity and function*. J Biol Chem, **282**, 13542-13551
- Li, E.** (2002). *Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development*. Nat Rev Genet, **3**, 662-673
- Liang, X.**, M. Zheng, J. Jiang, G. Zhu, J. Yang and Y. Tang (2011). *Hypoxia-inducible factor-1 alpha, in association with TWIST2 and SNIP1, is a critical prognostic factor in patients with tongue squamous cell carcinoma*. Oral Oncol, **47**, 92-97
- Libermann, T. A.**, Z. Pan, Y. Akbarali, C. J. Hetherington, J. Boltax, D. A. Yergeau and D.-E. Zhang (1999). *AML1 (CBF α 2) cooperates with B cell-specific activating protein (BSAP/PAX5) in activation of the B cell-specific BLK promoter*. J Biol Chem, **274**, 24671-24676
- Lilljebjörn, H.**, C. Soneson, A. Andersson, J. Heldrup, M. Behrendtz, N. Kawamata, S. Ogawa, H. P. Koeffler, F. Mitelman, B. Johansson, M. Fontes and T. Fioretos (2010). *The correlation pattern of acquired copy number changes in 164 ETV6/RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukemias*. Hum Mol Genet, **19**, 3150-3158
- Linka, R. M.**, A. C. G. Porter, A. Volkov, C. Mielke, F. Boege and M. O. Christensen (2007). *C-terminal regions of topoisomerase IIalpha and IIbeta determine isoform-specific functioning of the enzymes in vivo*. Nucleic Acids Res, **35**, 3810-3822
- Liu, H.**, L. Carlsson and T. Grundström (2006). *Identification of an N-terminal transactivation domain of RUNX1 that separates molecular function from global differentiation function*. J Biol Chem, **281**, 25659-25669
- Llauradó, M.**, M. Abal, J. Castellví, S. Cabrera, A. Gil-Moreno, A. Pérez-Benavente, E. Colás, A. Doll, X. Dolcet, X. Matias-Guiu, M. Vazquez-Levin, J. Reventós and A. Ruiz (2012). *ETV5 transcription factor is overexpressed in ovarian cancer and regulates cell adhesion in ovarian cancer cells*. Int J Cancer, **130**, 1532-1543

- Look, A. T.** (1997). *Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias*. Science, **278**, 1059-1064
- Lopez, R. G.,** C. Carron, C. Oury, P. Gardellin, O. Bernard and J. Ghysdael (1999). *TEL is a sequence-specific transcriptional repressor*. J Biol Chem, **274**, 30132-30138
- Lowe, S. W.,** E. Cepero and G. Evan (2004). *Intrinsic tumor suppression*. Nature, **432**, 307-315
- Luo, X.,** Z. Tang and H. Yu (2002). *The Mad2 spindle checkpoint protein undergoes similar conformational changes upon binding to either Mad1 or Cdc20*. Mol Cell, **9**, 59-71
- Lutterbach, B. and S. W. Hiebert** (2000a). *Role of the transcription factor AML-1 in acute leukemia and hematopoietic differentiation*. Gene, **245**, 223-235
- Lutterbach, B.,** J. J. Westendorf, B. Linggi, S. Isaac, E. Seto and S. W. Hiebert (2000b). *A mechanism of repression by acute myeloid leukemia-1, the target of multiple chromosomal translocations in acute leukemia*. J Biol Chem, **275**, 651-656
- Marais, R.,** J. Wynne and R. Teisman (1993). *The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain*. Cell, **73**, 381-393
- Martin, M. E.,** Y. Chinenov, M. Yu, T. K. Schmidt and X. Y. Yang (1996). *Redox regulation of GA-binding protein- α DNA binding activity*. J Biol Chem, **271**, 25617-25623
- Mavrothalassitis, G. and J. Ghysdael** (2000). *Proteins of the Ets family with transcriptional repressor activity*. Oncogene, **19**, 6524-6532
- McCarthy, S. A.,** D. Chen, B. S. Yang, J. J. Garcia Ramirez, H. Cherwinski, X. R. Chen, M. Klagsbrun, C. A. Hauser, M. C. Ostrowski and M. McMahon (1997). *Rapid phosphorylation of Ets-2 accompanies mitogen-activated protein kinase activation and the induction of heparin-binding epidermal growth factor gene expression by oncogenic Raf-1*. Mol Cell Biol, **17**, 2401-2412
- Michaud, J.,** H. S. Scott and R. Escher (2003). *AML1 interconnected pathways of leukemogenesis*. Cancer Invest, **21**, 105-136
- Michl, P.,** A. R. Ramjaun, O. E. Pardo, P. H. Warne, M. Wagner, R. Poulson, C. D'Arrigo, K. Ryder, A. Menke, T. Gress and J. Downward (2005). *CUTL1 is a target of TGF(β) signaling that enhances cancer cell motility and invasiveness*. Cancer Cell, **7**, 521-532
- Miele, L.** (2011). *Transcription factor RBPJ/CSL: A genome-wide look at transcriptional regulation*. Proc Natl Acad Sci, **108**, 14715-14716
- Mielke, C.,** M. Tümmler, D. Schübeler, I. von Hoegen and H. Hauser (2000). *Stabilized long-term expression of heterodimeric proteins from tricistronic mRNA*. Gene, **254**, 1-8
- Mikhail, F. M.,** K. A. Serry, N. Hatem, Z. I. Mourad, H. M. Farawela, D. M. El Kaffash, L. Coignet and G. Nucifora (2002). *AML1 gene over-expression in childhood acute lymphoblastic leukemia*. Leukemia, **16**, 658-668
- Million, R. P.,** N. Harakawa, S. Roumiantsev, L. Varticovski and R. A. van Etten (2004). *A direct binding site for Grb2 contributes to transformation and leukemogenesis by the Tel-Abl (ETV6-Abl) tyrosine kinase*. Mol Cell Biol, **24**, 4685-4695

- Misteli, T.** (2005). Concepts in nuclear architecture. *BioEssays*, **27**, 477-487
- Misteli, T.** (2001). *Protein dynamics: implications for nuclear architecture and gene expression*. *Science*, **291**, 843-847
- Mitelman, F., B. Johansson and F. Mertens** (2007). The *impact of translocations and gene fusions on cancer causation*. *Nat Rev Cancer*, **7**, 233-245
- Mitelman, F., B. Johansson and F. Mertens** (2006). *Mitelman database of chromosome aberrations in cancer*. [online] <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>
- Mitelman, F., F. Mertens and B. Johansson** (2005). *Prevalence estimates of recurrent balanced cytogenetic aberrations and gene fusions in unselected patients with neoplastic disorders*. *Genes Chromosomes Cancer*, **43**, 350-366
- Mori, H., S. M. Colman, Z. Xiao, A. M. Ford, L. E. Healy, C. Donaldson, J. M. Hows, C. Navarrete and M. Greaves** (2002). *Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development*. *Proc Natl Acad Sci*, **99**, 8242-8247
- Morrow, M., A. Samanta, D. Kioussis, H. J. M. Brady and O. Williams** (2007). *TEL-AML1 preleukemic activity requires the DNA binding domain of AML1 and the dimerization and corepressor binding domains of TEL*. *Oncogene*, **26**, 4404-4414
- Morrow, M., S. Horton, D. Kioussis, H. J. Brady and O. Williams** (2004). *TEL-AML1 promotes development of specific hematopoietic lineages consistent with preleukemic activity*. *Blood*, **103**, 3890-3896
- Mueller, F., P. Wach and J. G. McNally** (2008). *Evidence for a common mode of transcription factor interaction with chromatin as revealed by improved quantitative fluorescence recovery after photobleaching*. *Biophys J*, **94**, 3323-3339
- Mullighan, C. G., S. Goorha, I. Radtke, C. B. Miller, E. Coustan-Smith, J. D. Dalton, K. Girtman, S. Mathew, J. Ma, S. B. Pounds, X. Su, C. H. Pui, M. V. Relling, W. E. Evans, S. A. Shurtleff and J. R. Downing** (2007). *Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia*. *Nature*, **446**, 758-764
- Nagata, T., V. Gupta, D. Sorce, W.-Y. Kim, A. Sali, B. T. Chait, K. Shigesada, Y. Ito and M. H. Werner** (1999). *Immunoglobulin motif DNA recognition and heterodimerization of the PEBP2/CBF runt domain*. *Nature Struct Biol*, **6**, 615-619
- Narita, M., S. Núñez, E. Heard, M. Narita, A. W. Lin, S. A. Hearn, D. L. Spector, G. J. Hannon and S. W. Lowe** (2003). *Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence*. *Cell*, **113**, 703-716
- Narlikar, G. J., H. Y. Fan and R. E. Kingston** (2002). *Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription*. *Cell*, **108**, 475-487
- Neves, H., C. Ramos, M. G. da Silva, A. Parreira and L. Parreira** (1999). *The nuclear topography of ABL, BCR, PML, and RARalpha genes: evidence for gene proximity in specific phases of the cell cycle and stages of hematopoietic differentiation*. *Blood*, **93**, 1197-1207

- Nikiforova, M. N.**, J. R. Stringer, R. Blough, M. Medvedovic, J. A. Fagin and Y. E. Nikiforov (2000). *Proximity of chromosomal loci that participate in radiation-induced rearrangements in human cells*. Science, **290**, 138-141
- Noguchi, K.**, A. Vassilev, S. Ghosh, J. L. Yates and M. L. DePamphilis (2006). *The BAH domain facilitates the ability of human Orc1 protein to activate replication origins in vivo*. EMBO J, **25**, 5372-5382
- Novershtern, N.**, A. Subramanian, L. N. Lawton, R. H. Mak, W. N. Haining, M. E. McConkey, N. Habib, N. Yosef, C. Y. Chang, T. Shay, G. M. Frampton, A. C. B. Drake, I. Leskov, B. Nilsson, F. Pfeffer, D. Dombkowski, J. W. Evans, T. Liefeld, J. S. Smutko, J. Chen, N. Friedman, R. A. Young, T. R. Golub, A. Regev and B. L. Ebert (2011). *Densely interconnected transcriptional circuits control cell states in human hematopoiesis*. Cell, **144**, 296-309
- Nowell, P. C. and D. A. Hungerford** (1960). *A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia*. Science, **132**, 1497
- Nunn, M. F.**, P. H. Seeburg, C. Moscovici and P. H. Duesberg (1983). *Tripartite structure of the avian erythroblastosis virus E26 transforming gene*. Nature, **306**, 391-395
- Nwabo Kamdje, A. H.**, F. Mosna, F. Bifari, V. Lisi, G. Bassi, G. Malpeli, M. Ricciardi, O. Perbellini, M. T. Scupoli, G. Pizzolo and M. Krampera (2011). *Notch-3 and Notch-4 signaling rescue from apoptosis human B-ALL cells in contact with human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells*. Blood, **118**, 380-389
- Ogawa, E.**, M. Inuzuka, M. Maruyama, M. Satake, M. Naito-Fujimoto, Y. Ito and K. Shigesada (1993a). *Molecular cloning and characterization of PEBP2 β , the heterodimeric partner of a novel Drosophila runt-related DNA binding protein PEBP2 α* . Virology, **194**, 314-331
- Ogawa, E.**, M. Maruyama, H. Kagoshima, M. Inuzuka, J. Lu, M. Satake, K. Shigesada and Y. Ito (1993b). *PEBP2/PEA2 represents a family of transcription factors homologous to the products of the Drosophila runt gene and the human AML1 gene*. Proc Natl Acad Sci, **90**, 6859-6863
- O'Hagan, R. C.**, R. G. Tozer, M. Symons, F. McCormick and J. A. Hassell (1996). *The activity of the Ets transcription factor PEA3 is regulated by two distinct MAPK cascades*. Oncogene, **13**, 1323-1333
- Ohta, S.**, Y. Tatsumi, M. Fujita, T. Tsurimoto and C. Obuse (2003). *The ORC1 cycle in human cells: II. Dynamic changes in the human ORC complex during the cell cycle*. J Biol Chem, **278**, 41535-41540
- Oikawa, T. and T. Yamada** (2003). *Molecular biology of the Ets family of transcription factors*. Gene, **303**, 11-34
- Okada, M.**, I. M. Cheeseman, T. Hori, K. Okawa, I. X. McLeod, J. R. 3rd Yates, A. Desai and T. Fukagawa (2006). *The CENP-H-I complex is required for the efficient incorporation of newly synthesized CENP-A into centromeres*. Nat Cell Biol, **8**, 446-457
- Okuda, T.**, J. van Deursen, S. W. Hiebert, G. Grosveld and J. R. Downing (1996). *AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis*. Cell, **84**, 321-330
- Ong, S. E. and M. Mann** (2006). *A practical recipe for stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC)*. Nat Protocols, **1**, 2650-2660

- Ong, S. E.**, B. Blagoev, I. Kratchmarova, D. B. Kristensen, H. Steen, A. Pandey and M. Mann (2002). *Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics*. *Mol. Cell Proteomics*, **1**, 376-386
- Orkin, S. H. and L. I. Zon** (2008). *Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology*. *Cell*, **132**, 631-644
- Osato, M.**, N. Asou, E. Abdalla, K. Hoshino, H. Yamasaki, T. Okubo, H. Suzushima, K. Takatsuki, T. Kanno, K. Shigesada and Y. Ito (1999). *Biallelic and heterozygous point mutations in the runt domain of the AML1/PEBP2alphaB gene associated with myeloblastic leukemias*. *Blood*, **93**, 1817-1824
- Phair, R. D.**, P. Scaffidi, C. Elbi, J. Vecerova, A. Dey, K. Ozato, D. T. Brown, G. Hager, M. Bustin and T. Misteli (2004). *Global nature of dynamic protein-chromatin interactions in vivo: three-dimensional genome scanning and dynamic interaction networks of chromatin proteins*. *Mol Cell Biol*, **24**, 6393-6402
- Pine, S. R.**, J. L. Wiemels, S. Jayabose and C. Sandoval (2003). *TEL-AML1 fusion precedes differentiation to pre-B cells in childhood acute lymphoblastic leukemia*. *Leukemia Res*, **27**, 155-164
- Poirel, H.**, C. Oury, C. Carron, E. Duprez, Y. Laabi, A. Tsapis, S. P. Romana, M. Mauchauffe, M. Le Coniat, R. Berger, J. Ghysdael and O. A. Bernard (1997). *The TEL gene products: nuclear phosphoproteins with DNA binding properties*. *Oncogene*, **14**, 349-357
- Polak, P. E.**, F. Simone, J. J. Kaberlein, R. T. Luo and M. J. Thirman (2003). *ELL and EAF1 are cajal body components that are disrupted in MLL-ELL leukemia*. *Mol Biol Cell*, **14**, 1517-1528
- Povirk, L. F.** (2006). *Biochemical mechanisms of chromosomal translocations resulting from DNA double-strand breaks*. *DNA Repair*, **5**, 1199-1212
- Pozner, A.**, J. Lotem, C. Xiao, D. Goldenberg, O. Brenner, V. Negreanu, D. Levanon and Y. Groner (2007). *Developmentally regulated promoter-switch transcriptionally controls Runx1 function during embryonic hematopoiesis*. *BMC Dev Biol*, **7**, published online
- Pozner, A.**, D. Goldenberg, V. Negreanu, S.-Y. Le, O. Elroy-Stein, D. Levanon and Y. Groner (2000). *Transcription-coupled translation control of AML1/RUNX1 is mediated by cap- and internal ribosome entry site-dependent mechanisms*. *Mol Cell Biol*, **20**, 2297-2304
- Rabault, B. and J. Ghysdael** (1994). *Calcium-induced phosphorylation of ETS1 inhibits its specific DNA binding activity*. *J Biol Chem*, **269**, 28143-28151
- Rabbits, T. H.** (1994). *Chromosomal Translocations in human cancer*. *Nature*, **372**, 143-149
- Rappsilber, J.**, J. S. Andersen, Y. Ishihama, S. E. Ong, L. J. Foster and M. Mann (2003). *A recipe collection for the identification of peptides in complex mixtures*. *Sci STKE*
- Raynaud, S.**, H. Cavé, M. Baens, C. Bastard, V. Cacheux, J. Grosgeorge, C. Guidal-Giroux, C. Guo, E. Vilmer, P. Marynen and B. Grandchamp (1996). *The 12;21 translocation involving TEL and deletion of the other TEL allele: two frequently associated alterations found in childhood acute lymphoblastic leukemia*. *Blood*, **87**, 2891-2899

- Rho, J. K.**, J. H. Kim, J. Yu and S. Y. Choe (2002). *Correlation between cellular localization of TEL/AML1 fusion protein and repression of AML1-mediated transactivation of CR1 gene*. *Biochem Biophys Res Commun*, **297**, 91-95
- Roix, J. J.**, P. G. McQueen, P. J. Munson, L. A. Parada and T. Misteli (2003). *Spatial proximity of translocation-prone gene loci in human lymphomas*. *Nature Genet*, **34**, 287-291
- Romana, S. P.**, M. Le Coniat, H. Poirel, P. Marynen, O. Bernard and R. Berger (1996). *Deletion of the short arm of chromosome 12 is a secondary event in acute lymphoblastic leukemia with t(12;21)*. *Leukemia*, **10**, 167-170
- Romana, S. P.**, M. Mauchauffe, M. Le Coniat, I. Chumakov, D. Le Paslier, R. Berger and O. A. Bernard (1995a). *The t(12;21) of acute lymphoblastic leukemia results in a TEL/AML1 gene fusion*. *Blood*, **85**, 3662-3670
- Romana, S. P.**, H. Poirel, M. Le Coniat, M. A. Flexor, M. Mauchauffe, P. Jonveaux, E. A. MacIntyre, R. Berger and O. A. Bernard (1995b). *High frequency of t(12;21) in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia*. *Blood*, **86**, 4263-4269
- Roman-Gomez, J.**, A. Jimenez-Velasco, X. Agirre, J. A. Castillejo, G. Navarro, M. J. Calasanz, L. Garate, E. S. Jose-Eneriz, L. Cordeu, F. Prosper, A. Heiniger and A. Torres (2006). *CpG island methylator phenotype redefines the prognostic effect of t(12;21) in childhood acute lymphoblastic leukemia*. *Clin Cancer Res*, **12**, 4845-4850
- Roman-Gomez, J.**, A. Jimenez-Velasco, X. Agirre, F. Cervantes, J. Sanchez, L. Garate, M. Barrios, J. A. Castillejo, G. Navarro, D. Colomer, F. Prosper, A. Heiniger and A. Torres (2005). *Promoter hypomethylation of the LINE-1 retrotransposable elements activates sense/antisense transcription and marks the progression of chronic myeloid leukemia*. *Oncogene*, **24**, 7213-7223
- Rosenbauer, F. and D. G. Tenen** (2007). *Transcription factors in myeloid development: balancing differentiation with transformation*. *Nat Rev Immunol*, **7**, 105-117
- Roudaia, L.**, M. D. Cheney, E. Manuylova, W. Chen, M. Morrow, S. Park, C.-T. Lee, P. Kaur, O. Williams, J. H. Bushweller and N. A. Speck (2009). *CBFb is critical for AML1-ETO and TEL-AML1 activity*. *Blood*, **113**, 3070-30790
- Roukens, M. G.**, M. Alloul-Ramdhani, S. Moghadasi, M. Op den Brouw and D. A. Baker (2008). *Downregulation of vertebrate TEL (ETV6) and Drosophila Yan is facilitated by an evolutionary conserved mechanism of F-Box-mediated ubiquitination*. *Mol Cell Biol*, **28**, 4394-4406
- Sambrook, J.**, E. F. Fritsch and T. Maniatis (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sansregret, L.**, C. Vadnais, J. Livingstone, N. Kwiatkowski, A. Awan, C. Cadieux, L. Leduy, M. T. Hallett and A. Nepveu (2011). *Cut homeobox 1 causes chromosomal instability by promoting bipolar division after cytokinesis failure*. *Proc Natl Acad Sci*, **108**, 1949-1954
- Sansregret, L. and A. Nepveu** (2008). *The multiple roles of CUX1: insights from mouse models and cell-based assays*. *Gene*, **412**, 84-94

- Sansregret, L.**, B. Goulet, R. Harada, B. Wilson, L. Leduy, J. Bertoglio and A. Nepveu (2006). *The p110 isoform of the CDP/Cux transcription factor accelerates entry into S phase*. Mol Cell Biol, **26**, 2441-2455
- Sato, Y.**, Y. Suto, J. Pietenpol, T. R. Golub, D. G. Gilliland, E. M. Davis, M. M. Le Beau, J. M. Roberts, B. Vogelstein and J. D. Rowley (1995). *TEL and KIP1 define the smallest region of deletions on 12p13 in hematopoietic malignancies*. Blood, **86**, 1525-1533
- Schindler, J. W.**, D. Van Buren, A. Foudi, O. Krejci, J. Qin, S. H. Orkin and H. Hock (2009). *TEL-AML1 corrupts hematopoietic stem cells to persist in the bone marrow and initiate leukemia*. Cell Stem Cell, **5**, 43-53
- Sementchenko, V. I. and D. K. Watson** (2000). *Ets target genes: past, present and future*. Oncogene, **19**, 6533-6548
- Shehata, M.**, J. Weidenhofer, K. Thamothersampillai, J. R. Hardy and J. A. Byrne (2008). *Tumor protein D52 overexpression and gene amplification in cancers from a mosaic of microarrays*. Crit Rev Oncog, **14**, 33-55
- Shevchenko, A.**, H. Tomas, J. Havli, J. V. Olsen and M. Mann (2006). *In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes*. Nat Protoc, **1**, 2856-2860
- Shilatifard, A.**, D. Haque, R. C. Conaway and J. W. Conaway (1997). *Structure and function of RNA polymerase II elongation factor ELL. Identification of two overlapping ELL functional domains that govern its interaction with polymerase and the ternary elongation complex*. J Biol Chem, **272**, 22355-22363
- Shilatifard, A.**, W. S. Lane, K. W. Jackson, R. C. Conaway and J. W. Conaway (1996). *An RNA polymerase II elongation factor encoded by the human ELL gene*. Science, **271**, 1873-1876
- Shurtleff, S. A.**, A. Buijs, F. G. Behm, J. E. Rubnitz, S. C. Raimondi, M. L. Hancock, G. C. Chan, C. H. Pui, G. Grosveld and J. R. Downing (1995). *TEL/AML1 fusion resulting from a cryptic t(12;21) is the most common genetic lesion in pediatric ALL and defines a subgroup of patients with an excellent prognosis*. Leukemia, **9**, 1985-1989
- Simone, F.**, R. T. Luo, P. E. Polak, J. J. Kaberlein and M. J. Thirman (2003). *ELL-associated factor 2 (EAF2), a functional homolog of EAF1 with alternative ELL binding properties*. Blood, **101**, 2355-2362
- Simone, F.**, P. E. Polak, J. J. Kaberlein, R. T. Luo, D. A. Levitan and M. J. Thirman (2001). *EAF1, a novel ELL-associated factor that delocalizes by expression of the MLL-ELL fusion protein*. Blood, **98**, 201-209
- Slupsky, C. M.**, L. N. Gentile, L. W. Donaldson, C. D. Mackereth, J. J. Seidel, B. J. Graves and L. P. McIntosh (1998). *Structure of the Ets-1 pointed domain and mitogen-activated protein kinase phosphorylation site*. Proc Natl Acad Sci, **95**, 12129-12134
- Song, W. J.**, M. G. Sullivan, R. D. Legare, S. Hutchings, X. Tan, D. Kufrin, J. Ratajczak, I. C. Resende, C. Haworth, R. Hock, M. Loh, C. Felix, D. C. Roy, L. Busque, D. Kurnit, C. Willman, A. M. Gewirtz, N. A. Speck, J. H. Bushweller, F. P. Li, K. Gardiner, M. Poncz, J. M. Maris and D. G. Gilliland (1999a). *Haploinsufficiency of CBFA2 causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia*. Nat Genet, **23**, 166-175

- Song, H.**, J. H. Kim, J. K. Rho, S. Y. Park, C. G. Kim, and S. Y. Choe (1999b). *Functional characterization of TEL/AML1 fusion protein in the regulation of human CR1 gene promoter*. Mol Cells, **9**, 560-563
- Sprague, B. L.**, R. L. Pego, D. A. Stavreva and J. G. McNally (2004). *Analysis of binding reactions by fluorescence recovery after photobleaching*. Biophys J, **86**, 3473-3495
- Starkova, J.**, J. Madzo, G. Cario, T. Kalina, A. Ford, M. Zaliova, O. Hrusak and J. Trka (2007). *The identification of (ETV6)/RUNX1-regulated genes in lymphopoiesis using histone deacetylase inhibitors in ETV6/RUNX1-positive lymphoid leukemic cells*. Clin Cancer Res, **13**, 1726-1735
- Stegmaier, K.**, S. Pendse, G. F. Barker, P. Bray-Ward, D. C. Ward, K. T. Montgomery, K. S. Krauter, C. Reynolds, J. Sklar and M. Donnelly (1995). *Frequent loss of heterozygosity at the TEL gene locus in acute lymphoblastic leukemia of childhood*. Blood, **86**, 38-44
- Strobl, L. J.**, H. Höfelmayr, C. Stein, G. Marschall, M. Brielmeier, G. Laux, G. W. Bornkamm and U. Zimmer-Strobl (1997). *Both Epstein-Barr viral nuclear antigen 2 (EBNA2) and activated Notch1 transactivate genes by interacting with the cellular protein RBP-J kappa*. Immunobiology, **198**, 299-306
- Strom, D. K.**, J. Nip, J. J. Westendorf, B. Linggi, B. Lutterbach, J. R. Downing, N. Lenny and S. W. Hiebert (2000). *Expression of the AML-1 oncogene shortens the G1 Phase of the cell cycle*. J Biol Chem, **275**, 3438-3445
- Stucke, V. M.**, H. H. Silljé, L. Arnaud and E. A. Nigg (2002). *Human Mps1 kinase is required for the spindle assembly checkpoint but not for centrosome duplication*. EMBO J, **21**, 1723-1732
- Tahirov, T.**, T. Inoue-Bungo, H. Morii, A. Fujikawa, M. Sasaki, K. Kimura, M. Shiina, K. Sato, T. Kumasaka, M. Yamamoto, S. Ishii and K. Ogata (2001). *Structural analysis of DNA recognition by the AML1/Runx-1 runt domain and its allosteric control by CBF β* . Cell, **104**, 755-767
- Tanaka, T.**, M. Kurokawa, K. Ueki, K. Tanaka, Y. Imai, K. Mitani, K. Okazaki, N. Sagata, Y. Yazaki, Y. Shibata, T. Kadowaki and H. Hirai (1996). *The extracellular signal-regulated kinase pathway phosphorylates AML1, an acute myeloid leukemia gene product, and potentially regulates its transactivation ability*. Mol Cell Biol, **16**, 3967-3979
- Tanaka, T.**, K. Tanaka, S. Ogawa, M. Kurokawa, K. Mitani, J. Nishida, Y. Shibata, Y. Yazaki and H. Hirai (1995). *An acute myeloid leukemia gene, AML1, regulates hemopoietic myeloid cell differentiation and transcriptional activation antagonistically by two alternative spliced forms*. EMBO J, **14**, 341-350
- Tanigaki, K. and T. Honjo** (2007). *Regulation of lymphocyte development by Notch signaling*. Nat Immunol, **8**, 451-456
- Tatsumi, Y.**, S. Ohta, H. Kimura, T. Tsurimoto and C. Obuse (2003). *The ORC1 cycle in human cells: I. cell cycle-regulated oscillation of human ORC1*. J Biol Chem, **278**, 41528-41534
- Taylor, S. S. and F. McKeon** (1997). *Kinetochores localization of murine Bub1 is required for normal mitotic timing and checkpoint response to spindle damage*. Cell, **89**, 727-735
- Thirman, M. J.**, D. A. Levitan, H. Kobayashi, M. C. Simon and J. D. Rowley (1994). *Cloning of ELL, a gene that fuses to MLL in a t(11;19)(q23;p13.1) in acute myeloid leukemia*. Proc Natl Acad Sci, **91**, 12110-12114

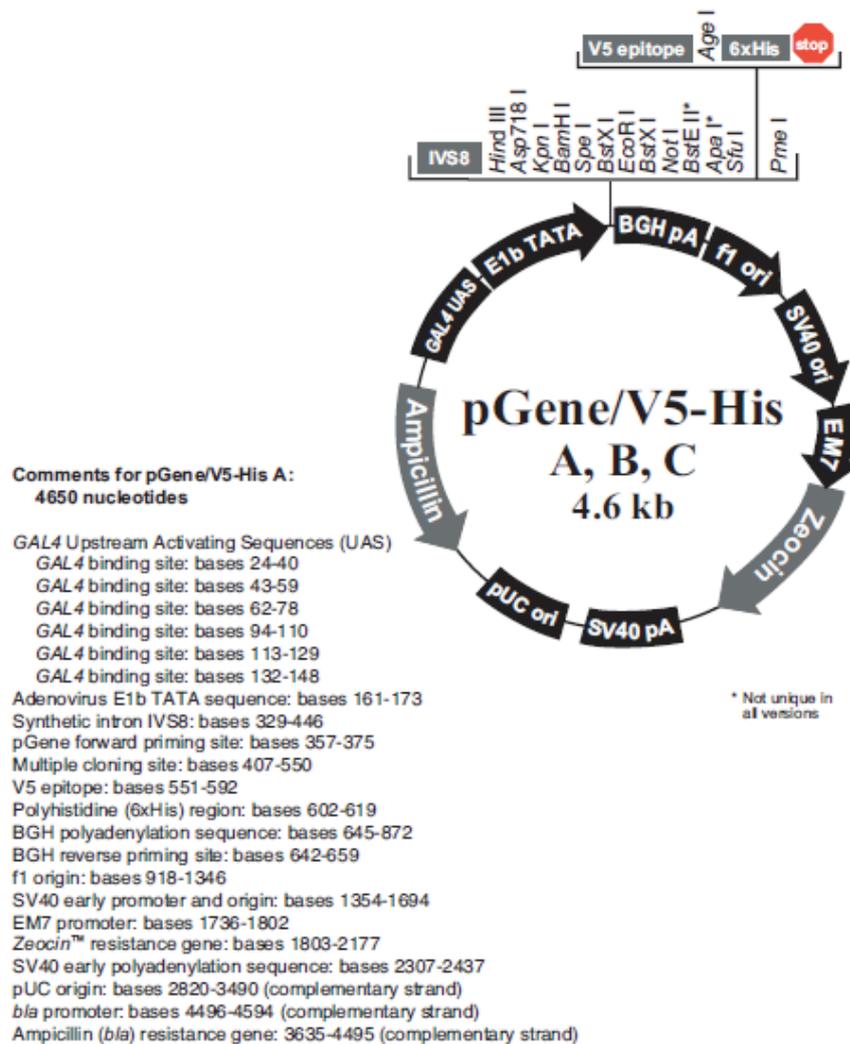
- Tirosh, I. and N. Barkai** (2008). *Two strategies for gene regulation by promoter nucleosomes*. *Genome Res*, **18**, 1084-1091
- Tran, H. H., C. A. Kim, S. Faham, M. C. Siddall and J. U. Bowie** (2001). *Native interface of the SAM domain polymer of TEL*. *BMC Struct Biol*, **2**, published online
- Treisman, R.** (1994). *Ternary complex factors: growth factor regulated transcriptional activators*. *Curr Opin Genet Dev*, **4**, 96-101
- Uchida, H., K. Yamazaki, M. Fukuma, T. Yamada, T. Hayashida, H. Hasegawa, M. Kitajima, Y. Kitagawa and M. Sakamoto** (2010). *Overexpression of leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5 in colorectal cancer*. *Cancer Sci*, **101**, 1731-1737S
- Uchida, H., J. R. Downing, Y. Miyazaki, R. Frank, J. Zhang and S. D. Nimer** (1999). *Three distinct domains in TEL-AML1 are required for transcriptional repression of the IL-3 promoter*. *Oncogene*, **18**, 1015-1022
- van Delft, F. W., S. Horsley, S. Colman, K. Anderson, C. Bateman, H. Kempinski, J. Zuna, C. Eckert, V. Saha, L. Kearney, A. Ford and M. Greaves** (2011). *Clonal origins of relapse in ETV6-RUNX1 acute lymphoblastic leukemia*. *Blood*, **117**, 6247-6254
- Van de Walle, I., G. De Smet, M. Gärtner, M. De Smedt, E. Waegemans, B. Vandekerckhove, G. Leclercg, J. Plum, J. C. Aster, I. D. Bernstein, C. J. Guidos, B. Kyewski and T. Taghon** (2011). *Jagged2 acts as a Delta-like Notch ligand during early hematopoietic cell fate decisions*. *Blood*, **117**, 4449-4459
- Villa, R., F. de Santis, A. Gutierrez, S. Minucci, P. G. Pelicci and L. Di Croce** (2004). *Epigenetic gene silencing in acute promyelocytic leukemia*. *Biochem Pharmacol*, **68**, 1247-1254
- Vitari, A. C., K. G. Leong, K. Newton, C. Yee, K. O'Rourke, J. Liu, L. Phu, R. Vij, R. Ferrando, S. S. Couto, S. Mohan, A. Pandita, J. A. Hongo, D. Arnott, I. E. Wertz, W. Q. Gao, D. M. French and V. M. Dixit** (2011). *COP1 is a tumor suppressor that causes degradation of ETS transcription factors*. *Nature*, **474**, 403-406
- Walker, F., H. H. Zhang, A. Odorizzi and A. W. Burgess** (2011). *LGR5 is a negative regulator of tumorigenicity, antagonizes Wnt signalling and regulates cell adhesion in colorectal cancer cell lines*. *PLoS One*, **6**, e22733
- Wang, L. C., W. Swat, Y. Fujiwara, L. Davidson, J. Visvader, F. Kuo, F. W. Alt, D. G. Gilliland, T. R. Golub and S. H. Orkin** (1998). *The TEL/ETV6 gene is required specifically for hematopoiesis in the bone marrow*. *Genes Dev*, **12**, 2392-2402
- Wang, L. C., F. Kuo, Y. Fujiwara, D. G. Gilliland, T. R. Golub and S. H. Orkin** (1997). *Yolk sac angiogenic defect and intra-embryonic apoptosis in mice lacking the Ets-related factor TEL*. *EMBO J*, **16**, 4374-4383
- Wang, Q., T. Stacy, M. Binder, M. Mari'n-Padilla, A. H. Sharpe and N.A. Speck** (1996). *Disruption of the Cbfa2 gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis*. *Proc Natl Acad Sci*, **93**, 3444-3449
- Wang, Y., B.W. O'Malley Jr., S. Y. Tsai and B. W. O'Malley** (1994). *A Regulatory System for Use in Gene Transfer*. *Proc Natl Acad Sci*, **91**, 8180-8184

- Warren, A. J.**, J. Bravo, R. L. Williams and T. H. Rabbitts (2000). *Structural basis for the heterodimeric interaction between the acute leukemia-associated transcription factors AML1 and CBF β* . EMBO J, **19**, 3004-3015
- Wasylyk, B.**, J. Hagman and A. Gutierrez-Hartmann (1998). *Ets transcription factors: nuclear effectors of the Ras-MAP-kinase signaling pathway*. Trends Biochem Sci, **23**, 213-216
- Wasylyk, B. and A. Nordheim** (1997). *Transcription factors in Eukaryotes*. Molecular Biology Intelligence Unit Book Series, RG Landes Company, 253-286
- Wasylyk, B.**, S. L. Hahn and A. Giovane (1993). *The Ets family of transcription factors*. Eur J Biochem, **211**, 7-18
- Wee, H. J.**, D. C. Voon, S. C. Bae and Y. Ito (2008). *PEBP2-beta/CBF-beta dependent phosphorylation of RUNX1 and p300 by HIPK2: implications for leukemogenesis*. Blood, **112**, 3777-3787
- Waterston, R.H.**, K. Lindblad-Bloh, E. Birney, J. Rogers, J. F. Abril, P. Agarwal et. al. (Mouse Genome Sequencing Consortium; 2002). *Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome*. Nature, **420**, 520-562
- Westendorf, J. J.**, C. M. Yamamoto, N. Lenny, J. R. Downing, M. E. Selsted and S. W. Hiebert (1998). *The t(8;21) fusion product, AML1-ETO, associates with C/EBP-a, inhibits C/EBP-a-dependent transcription, and blocks granulocyte differentiation*. Mol Cell Biol, **18**, 322-333
- Weston, V. J.**, C. M. McConville, J. R. Mann, P. J. Darbyshire, S. Lawson, J. Gordon, P. A. Moss, A. M. Taylor and T. Stankovic (2001). *Molecular analysis of single colonies reveals a diverse origin of initial clonal proliferation in B-precursor acute lymphoblastic leukemia that can precede the t(12;21) translocation*. Cancer Res, **61**, 8547-8553
- Wiemels, J. L.**, J. Hofmann, M. Kang, R. Selzer, R. Green, M. Zhou, S. Zhong, L. Zhang, M. T. Smith, C. Marsit, M. Loh, P. Buffler and R.-F. Yang (2008). *Chromosome 12p deletions in TEL-AML1 childhood acute lymphoblastic leukemia are associated with retrotransposon elements and occur postnatally*. Cancer Res, **68**, 9935-9944
- Wlodarska, I.**, M. Baens, P. Peeters, J. Aerssens, C. Mecucci, P. Brock, P. Marynen and H. Van den Berghe (1996). *Biallelic alterations of both ETV6 and CDKN1B genes in a t(12;21) childhood acute lymphoblastic leukemia case*. Cancer Res, **56**, 2655-2661
- Wolberger, C.** (1998). *Combinatorial transcription factors*. Curr Opin Genet Dev, **8**, 552-559
- Wood, L. D.**, B. J. Irvin, G. Nucifora, K. S. Luce and S. W. Hiebert (2003). *Small ubiquitin-like modifier conjugation regulates nuclear export of TEL, a putative tumor suppressor*. Proc Natl Acad Sci, **100**, 3257-3262
- Xiao, W.**, Q. Zhang, G. Habermacher, X. Yang, A. Y. Zhang, X. Cai, J. Hahn, J. Liu, M. Pins, L. Doglio, R. Dhir, J. Gingrich and Z. Wang (2008). *U19/Eaf2 knockout causes lung adenocarcinoma, B-cell lymphoma, hepatocellular carcinoma and prostatic intraepithelial neoplasia*. Oncogene, **27**, 1536-1544

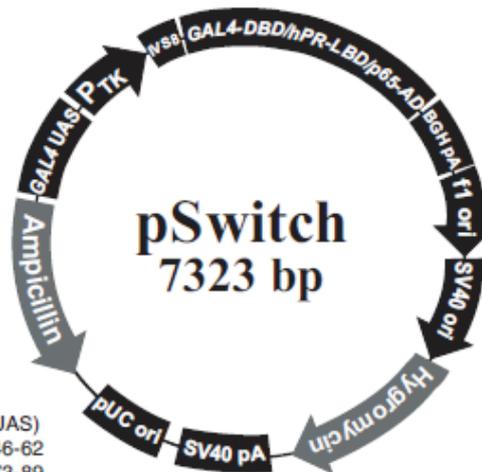
- Yamaguchi, Y.**, M. Kurokawa, Y. Imai, K. Izutsu, T. Asai, M. Ichikawa, G. Yamamoto, E. Nitta, T. Yamagata, K. Sasaki, K. Mitani, S. Ogawa, S. Chiba and H. Hirai (2004). *AML1 is functionally regulated through p300-mediated acetylation on specific lysine residues*. J Biol Chem, **279**, 15630-15638
- Yang, B. S.**, C. A. Hauser, G. Henkel, M.S. Colman, C. van Beveren, K. J. Stacey, D. A. Hume, R. A. Maki and M. C. Ostrowski (1996). *Ras-mediated phosphorylation of a conserved threonine residue enhances the transactivation activities of c-Ets-1 and c-Ets-2*. Mol Cell Biol, **16**, 538-547
- Young, D. W.**, S. K. Zaidi, P. S. Furcinitti, A. Javed, A. J. van Wijnen, J. L. Stein, J. B. Lian and G. S. Stein (2004). *Quantitative signature for architectural organization of regulatory factors using intranuclear informatics*. J Cell Sci, **117**, 4889-4896
- Yu, F.**, N. Zingler, G. Schumann and W. H. Strätling (2001). *Methyl-CpG-binding protein 2 represses LINE-1 expression and retrotransposition but not Alu transcription*. Nucleic Acids Res, **29**, 4493-4501
- Yu, H.** (2002). *Regulation of APC-Cdc20 by the spindle checkpoint*. Curr Opin Cell Biol, **14**, 706-714
- Zaidi, S. K.**, D. W. Young, J.-Y. Choi, J. Pratap, A. Javed, M. Montecino, J. L. Stein, A. J. van Wijnen, J. B. Lian and G. S. Stein (2005). *The dynamic organization of gene-regulatory machinery in nuclear microenvironments*. EMBO Reports, **6**, 128-133
- Zaidi, S. K.**, A. Javed, J.-Y. Choi, A. J. van Wijnen, J. L. Stein, J. B. Lian and G. S. Stein (2001). *A specific targeting signal directs RUNX2/Cbfa1 to subnuclear domains and contributes to transactivation of the osteocalcin gene*. J Cell Sci, **114**, 3093-3102
- Zaliova, M.**, J. Madzo, G. Cario and J. Trka (2011). *Revealing the role of TEL/AML1 for leukemic cell survival by RNAi-mediated silencing*. Leukemia, **25**, 313-320
- Zelent, A.**, M. Geaves and T. Enver (2004). *Role of the TEL-AML1 fusion gene in the molecular pathogenesis of childhood acute lymphoblastic leukemia*. Oncogene, **23**, 4275-4283
- Zeng, C.**, A. J. van Wijnen, J. L. Stein, S. Meyers, W. Sun, L. Shopland, J. B. Lawrence, S. Penman, J. B. Lian, G. S. Stein and S. W. Hiebert (1997). *Identification of a nuclear matrix targeting signal in the leukemia and bone-related AML1/CBF- β transcription factors*. Proc Natl Acad Sci, **94**, 6746-6751
- Zhang, D.**, D. He, Y. Xue, R. Wang, K. Wu, H. Xie, J. Zeng, X. Wang, H. E. Zhou, L. W. Chung, L. S. Chang and L. Li (2011). *PrLZ protects prostate cancer cells from apoptosis induced by androgen deprivation via activation of Stat3/Bcl-2 pathway*. Cancer Res, **71**, 2193-2202
- Zhang, Y. and J. D. Rowley** (2006). *Chromatin structural elements and chromosomal translocations in leukemia*. DNA Repair, **5**, 1282-1297
- Zhang, L.**, F. B. Fried, H. Guo and A. D. Friedman (2008). *Cyclin-dependent kinase phosphorylation of RUNX1/AML1 on 3 sites increases transactivation potency and stimulates cell proliferation*. Blood, **111**, 1193-1200
- Zhijin, W. and R. A. Irizarry** (2004). *Preprocessing of oligonucleotide array data*. Nat Biotechnol, **22**, 656-658

8 ANHANG

8.1 pGene/V5-His Vektorkarte



8.2 pSwitch Plasmidkarte



Comments for pSwitch:
7323 nucleotides

GAL4 Upstream Activating Sequences (UAS)

GAL4 consensus binding site: bases 46-62

GAL4 consensus binding site: bases 73-89

GAL4 consensus binding site: bases 100-116

GAL4 consensus binding site: bases 127-143

Herpes Simplex Virus thymidine kinase (TK) minimal promoter: bases 157-262

Synthetic intron IVS8: bases 379-496

GAL4-DBD/hPR-LBD/p65-AD fusion gene

ATG initiation codon: bases 519-521

GAL4 DNA binding domain (DBD): bases 540-818

Human progesterone receptor ligand binding domain (hPR-LBD): bases 840-1664

Human p65 activation domain (AD): bases 1674-2483

BGH polyadenylation sequence: bases 2747-2975

f1 origin: bases 3021-3449

SV40 early promoter and origin: bases 3457-3797

Hygromycin B resistance gene: bases 3841-4864

SV40 early polyadenylation sequence: bases 4996-5126

pUC origin: bases 5509-6182 (complementary strand)

bla promoter: bases 7188-7286 (complementary strand)

Ampicillin (*bla*) resistance gene: bases 6327-7187 (complementary strand)

8.3 Vergleich der in den murinen CHIP-Experimenten angereicherten GO-Termini

Tabelle 8.1 Vergleich der in den CHIP-Experimenten für TEL-AML1 (linke Spalte) angereicherten GO-Termini mit denen der endogenen TEL- und AML1-ChIP (mittlere bzw. rechte Spalte). Aufgelistet sind jeweils die 30 höchsten GO-Termini absteigend sortiert nach Anzahl der mit ihnen assoziierten Gene (angegeben als prozentualer Anteil). Um die Unterschiede deutlicher herauszustellen, wurden die GO-Termini anhand der Ergebnisse für TEL-AML1 wiederum mit einer einzigartigen Farbe markiert. Bei solchen, die nicht in allen drei Ergebnisgruppen gefunden wurden, ist zudem auch der prozentuale Anteil Gene farblich markiert. Schwarz umrandete GO-Termini waren nur in einer einzigen Ergebnisgruppe angereichert. Einige der GO-Termini wurden zwar in mehreren Ergebnisgruppen gefunden, waren dort aber nicht innerhalb der top30 (beige).

TEL-AML1			TEL			AML1			
Term	%								
GO:0007166-cell surface receptor linked signal transduction	10,5	GO:0007166-cell surface receptor linked signal transduction	20,7	GO:0007166-cell surface receptor linked signal transduction	20,0	GO:0007166-cell surface receptor linked signal transduction	20,0	GO:0007166-cell surface receptor linked signal transduction	20,0
GO:0045449-regulation of transcription	10,4	GO:0045449-regulation of transcription	8,7	GO:0045449-regulation of transcription	6,9	GO:0045449-regulation of transcription	6,9	GO:0045449-regulation of transcription	6,9
GO:0006508-proteolysis	5,6	GO:0006508-proteolysis	4,6	GO:0006508-proteolysis	5,5	GO:0007155-cell adhesion	5,5	GO:0007155-cell adhesion	5,5
GO:0008104-protein localization	4,3	GO:0007155-cell adhesion	4,3	GO:0007155-cell adhesion	4,1	GO:0006508-proteolysis	4,1	GO:0006508-proteolysis	4,1
GO:0006811-ion transport	4,2	GO:0006811-ion transport	4,1	GO:0006811-ion transport	3,2	GO:0006811-ion transport	3,2	GO:0006811-ion transport	3,2
GO:0006796-phosphate metabolic process	4,1	GO:0006796-phosphate metabolic process	4,1	GO:0006796-phosphate metabolic process	3,8	GO:0006796-phosphate metabolic process	3,8	GO:0006796-phosphate metabolic process	3,8
GO:0010604-positive regulation of macromolecule metabolic process	3,6	GO:0008104-protein localization	3,6	GO:0008104-protein localization	3,1	GO:0007049-cell cycle	3,1	GO:0007049-cell cycle	3,1
GO:0042592-homeostatic process	3,1	GO:0006952-defense response	3,1	GO:0006952-defense response	3,0	GO:0043067-regulation of programmed cell death	2,8	GO:0043067-regulation of programmed cell death	2,8
GO:0007155-cell adhesion	3,1	GO:0007155-cell adhesion	3,1	GO:0010604-positive regulation of macromolecule metabolic process	2,8	GO:0006928-cell motility	2,7	GO:0006928-cell motility	2,7
GO:0006952-defense response	2,8	GO:0042592-homeostatic process	2,8	GO:0042592-homeostatic process	2,6	GO:0048598-embryonic morphogenesis	2,7	GO:0048598-embryonic morphogenesis	2,7
GO:0010605-negative regulation of macromolecule metabolic process	2,7	GO:0043067-regulation of programmed cell death	2,7	GO:0043067-regulation of programmed cell death	2,5	GO:0010604-positive regulation of macromolecule metabolic process	2,5	GO:0010604-positive regulation of macromolecule metabolic process	2,5
GO:0010033-response to organic substance	2,7	GO:0030182-neuron differentiation	2,7	GO:0030182-neuron differentiation	2,5	GO:0042592-homeostatic process	2,5	GO:0042592-homeostatic process	2,5
GO:0016192-vesicle-mediated transport	2,6	GO:0010605-negative regulation of macromolecule metabolic process	2,6	GO:0010605-negative regulation of macromolecule metabolic process	2,5	GO:0007010-cytoskeleton organization	2,3	GO:0007010-cytoskeleton organization	2,3
GO:0043067-regulation of programmed cell death	2,4	GO:0048598-embryonic morphogenesis	2,3	GO:0048598-embryonic morphogenesis	2,3	GO:0006952-defense response	2,1	GO:0006952-defense response	2,1
GO:0006396-RNA processing	2,3	GO:0001501-skeletal system development	2,3	GO:0001501-skeletal system development	2,3	GO:0006952-defense response	2,1	GO:0006952-defense response	2,1
GO:0007049-cell cycle	2,3	GO:0006928-cell motility	2,3	GO:0006928-cell motility	2,3	GO:0012501-programmed cell death	2,1	GO:0012501-programmed cell death	2,1
GO:0012501-programmed cell death	2,3	GO:0012501-programmed cell death	2,3	GO:0012501-programmed cell death	2,3	GO:0048609-reproductive process in a multicellular organism	2,0	GO:0048609-reproductive process in a multicellular organism	2,0
GO:0006928-cell motility	2,2	GO:0060429-epithelium development	2,1	GO:0060429-epithelium development	2,1	GO:0060429-epithelium development	2,0	GO:0060429-epithelium development	2,0
GO:0048609-reproductive process in a multicellular organism	2,1	GO:0006259-DNA metabolic process	2,0	GO:0006259-DNA metabolic process	2,0	GO:0008104-protein localization	1,9	GO:0008104-protein localization	1,9
GO:00030182-neuron differentiation	2,1	GO:0016192-vesicle-mediated transport	2,1	GO:0016192-vesicle-mediated transport	1,9	GO:0030182-neuron differentiation	1,8	GO:0030182-neuron differentiation	1,8
GO:0051276-chromosome organization	2,0	GO:0007010-cytoskeleton organization	2,0	GO:0007010-cytoskeleton organization	1,8	GO:0010605-negative regulation of macromolecule metabolic process	1,8	GO:0010605-negative regulation of macromolecule metabolic process	1,8
GO:0001944-vasculature development	1,7	GO:0048609-reproductive process in a multicellular organism	1,8	GO:0048609-reproductive process in a multicellular organism	1,8	GO:0035295-tube development	1,8	GO:0035295-tube development	1,8
GO:0006259-DNA metabolic process	1,7	GO:0044093-positive regulation of molecular function	1,7	GO:0044093-positive regulation of molecular function	1,6	GO:0016192-vesicle-mediated transport	1,6	GO:0016192-vesicle-mediated transport	1,6
GO:0032268-regulation of cellular protein metabolic process	1,6	GO:0043933-macromolecular complex subunit organization	1,7	GO:0043933-macromolecular complex subunit organization	1,6	GO:0001501-skeletal system development	1,6	GO:0001501-skeletal system development	1,6
GO:0007267-cell-cell signaling	1,6	GO:0051276-chromosome organization	1,6	GO:0051276-chromosome organization	1,6	GO:0007267-cell-cell signaling	1,4	GO:0007267-cell-cell signaling	1,4
GO:0048598-embryonic morphogenesis	1,6	GO:0007267-cell-cell signaling	1,6	GO:0007267-cell-cell signaling	1,4	GO:0001944-vasculature development	1,4	GO:0001944-vasculature development	1,4
GO:0001775-cell activation	1,5	GO:0007626-locomotory behavior	1,5	GO:0007626-locomotory behavior	1,5	GO:0007389-pattern specification process	1,4	GO:0007389-pattern specification process	1,4
GO:0044271-nitrogen compound biosynthetic process	1,5	GO:0035295-tube development	1,5	GO:0035295-tube development	1,5	GO:0019637-organophosphate metabolic process	1,2	GO:0019637-organophosphate metabolic process	1,2
GO:0007010-cytoskeleton organization	1,5	GO:0009628-response to abiotic stimulus	1,5	GO:0009628-response to abiotic stimulus	1,5	GO:0007626-locomotory behavior	1,2	GO:0007626-locomotory behavior	1,2
GO:0044057-regulation of system process	1,4	GO:0001775-cell activation	1,4	GO:0001775-cell activation	1,4	GO:0003006-reproductive developmental process	1,2	GO:0003006-reproductive developmental process	1,2
						GO:0009628-response to abiotic stimulus	1,1	GO:0009628-response to abiotic stimulus	1,1

8.4 Schnittmenge der ChIP-Ergebnisse und der differentiell exprimierten Gene im murinen induzierbaren Zellsystem

8.4.1 Hochregulierte TEL-AML1 Zielgene

Tabelle 8.2A Schnittmenge aus ChIP-Experimenten und in den Genexpressionsanalysen hochregulierten Genen des murinen induzierbaren Systems. Angegeben ist die Identnummer der Gene (ID) als MGI (*mouse genome identifier*), das Gensymbol sowie seine Bezeichnung und die differentielle Expression als log (fc) (*fold change*). Gene, die auch in den endogenen ChIP-Experimenten nachgewiesen wurden, sind farblich markiert (gelb: TEL, lila: AML1). Die Fortsetzung der Tabelle befindet sich auf den nächsten beiden Seiten.

Gen ID	Symbol	Bezeichnung	log(fc)
MGI:96010	<i>Hal</i>	histidine ammonia lyase	4,736
MGI:2684845	<i>Amtl2</i>	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like 2	3,869
MGI:1919519	<i>Cda</i>	cytidine deaminase	3,788
MGI:1930036	<i>Piwil2</i>	piwi-like homolog 2 (Drosophila)	3,336
MGI:108470	<i>St6gal1</i>	beta galactoside alpha 2,6 sialyltransferase 1	3,068
MGI:2444350	<i>Ttc39a</i>	tetratricopeptide repeat domain 39A	3,045
MGI:1345181	<i>Paccin1</i>	protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 1	2,787
MGI:1922264	<i>4930503B20Rik</i>	RIKEN cDNA 4930503B20 gene	2,712
MGI:1321385	<i>Entpd5</i>	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 5	2,610
MGI:1096344	<i>Ampd3</i>	adenosine monophosphate deaminase 3	2,254
MGI:107711	<i>Myo1f</i>	myosin IF	2,211
MGI:1930773	<i>Pnkd</i>	paroxysmal nonkinesinogenic dyskinesia	2,177
MGI:1353656	<i>Slc7a9</i>	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 9	2,155
MGI:103190	<i>Muc13</i>	mucin 13, epithelial transmembrane	2,008
MGI:98227	<i>Sag</i>	retinal S-antigen	1,992
MGI:1924183	<i>Ifi2712a</i>	interferon, alpha-inducible protein 27 like 2A	1,982
MGI:109620	<i>Arvcf</i>	armadillo repeat gene deleted in velo-cardio-facial syndrome	1,961
MGI:99948	<i>Zfx3</i>	zinc finger homeobox 3	1,939
MGI:2144613	<i>Pik3r6</i>	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 6	1,930
MGI:1195463	<i>Mr1</i>	major histocompatibility complex, class I-related	1,907
MGI:2444813	<i>9030617003Rik</i>	RIKEN cDNA 9030617003 gene	1,848
MGI:1916978	<i>Card11</i>	caspase recruitment domain family, member 11	1,845
MGI:2144765	<i>Pld4</i>	phospholipase D family, member 4	1,831
MGI:2387100	<i>Dusp7</i>	dual specificity phosphatase 7	1,792
MGI:2444818	<i>Micall2</i>	MICAL-like 2	1,780
MGI:2441849	<i>Lpp</i>	LIM domain containing preferred translocation partner in lipoma	1,696
MGI:1915978	<i>Trp53inp2</i>	transformation related protein 53 inducible nuclear protein 2	1,652
MGI:2138935	<i>Fam102a</i>	family with sequence similarity 102, member A	1,615
MGI:1270855	<i>Il16</i>	interleukin 16	1,613
MGI:109609	<i>Faah</i>	fatty acid amide hydrolase	1,598
MGI:1913491	<i>Tmem9</i>	transmembrane protein 9	1,466
MGI:894675	<i>Tnfrsf18</i>	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 18	1,443
MGI:1932286	<i>Egln1</i>	EGL nine homolog 1 (C. elegans)	1,425
MGI:96825	<i>Selenbp1</i>	selenium binding protein 1	1,411
MGI:1860139	<i>Gabbr1</i>	gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor, 1	1,382
MGI:95924	<i>H2-Oa</i>	histocompatibility 2, O region alpha locus	1,378
MGI:1196419	<i>Ccpg1</i>	cell cycle progression 1	1,348
MGI:95482	<i>Fah</i>	fumarylacetoacetate hydrolase	1,333
MGI:1343458	<i>Trip6</i>	thyroid hormone receptor interactor 6	1,326
MGI:95560	<i>Flt3l</i>	FMS-like tyrosine kinase 3 ligand	1,309
MGI:1349410	<i>Triobp</i>	TRIO and F-actin binding protein	1,308
MGI:1314872	<i>Hipk2</i>	homeodomain interacting protein kinase 2	1,302
MGI:1919985	<i>2810442I21Rik</i>	RIKEN cDNA 2810442I21 gene	1,293
MGI:2442308	<i>Ar15</i>	ADP-ribosylation factor-like 15	1,267
MGI:96392	<i>Icam1</i>	intercellular adhesion molecule 1	1,260
MGI:2443582	<i>Abat</i>	4-aminobutyrate aminotransferase	1,249
MGI:1915994	<i>Zfp740</i>	zinc finger protein 740	1,237
MGI:1889505	<i>B3gnt2</i>	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 2	1,234
MGI:88930	<i>Reep3</i>	receptor accessory protein 3	1,195
MGI:109561	<i>Sp100</i>	nuclear antigen Sp100	1,193
MGI:107341	<i>Ctss</i>	cathepsin S	1,193
MGI:1933754	<i>Nedd4l</i>	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated gene 4-like	1,164

Tabelle 8.2A Fortsetzung

Gen ID	Symbol	Bezeichnung	log(fc)
MGI:2672033	<i>Thsd4</i>	thrombospondin, type I, domain containing 4	1,161
MGI:2158925	<i>Inpp4b</i>	inositol polyphosphate-4-phosphatase, type II	1,155
MGI:2442435	<i>6030446N20Rik</i>	RIKEN cDNA 6030446N20 gene	1,115
MGI:2141917	<i>Prkd2</i>	protein kinase D2	1,113
MGI:1914381	<i>Acbd4</i>	acyl-Coenzyme A binding domain containing 4	1,095
MGI:1923304	<i>Bat2l</i>	HLA-B associated transcript 2-like	1,094
MGI:2686926	<i>Gdpd5</i>	glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 5	1,094
MGI:1916618	<i>Wdfy1</i>	WD repeat and FYVE domain containing 1	1,058
MGI:1339968	<i>Cth</i>	cystathionase (cystathionine gamma-lyase)	1,056
MGI:1920234	<i>Ciz1</i>	CDKN1A interacting zinc finger protein 1	1,032
MGI:106222	<i>Capza2</i>	capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 2	1,026
MGI:104572	<i>Limk1</i>	LIM-domain containing, protein kinase	1,022
MGI:1916466	<i>Ccdc23</i>	coiled-coil domain containing 23	1,021
MGI:1889583	<i>Sh3kbp1</i>	SH3-domain kinase binding protein 1	1,012
MGI:1919563	<i>Fryl</i>	furry homolog-like (Drosophila)	0,990
MGI:106441	<i>Zranb1</i>	zinc finger, RAN-binding domain containing 1	0,982
MGI:105940	<i>Renbp</i>	renin binding protein	0,979
MGI:3512628	<i>Cbx6</i>	chromobox homolog 6	0,979
MGI:1921688	<i>Clvs1</i>	clavesin 1	0,962
MGI:1915727	<i>Rmnd5a</i>	required for meiotic nuclear division 5 homolog A (S. cerevisiae)	0,961
MGI:1096376	<i>Exoc4</i>	exocyst complex component 4	0,957
MGI:1917838	<i>Pnrc1</i>	proline-rich nuclear receptor coactivator 1	0,951
MGI:1923784	<i>Osbpl9</i>	oxysterol binding protein-like 9	0,950
MGI:1298226	<i>Naip2</i>	NLR family, apoptosis inhibitory protein 2	0,941
MGI:1196297	<i>Hgsnat</i>	heparan-alpha-glucosaminide N-acetyltransferase	0,919
MGI:2687005	<i>Leprot</i>	leptin receptor overlapping transcript	0,916
MGI:104908	<i>Ptk2b</i>	PTK2 protein tyrosine kinase 2 beta	0,903
MGI:2685477	<i>Ccdc32</i>	coiled-coil domain containing 32	0,901
MGI:1346049	<i>Hs2st1</i>	heparan sulfate 2-O-sulfotransferase 1	0,901
MGI:108104	<i>Snrk</i>	SNF related kinase	0,886
MGI:1278339	<i>Dgkz</i>	diacylglycerol kinase zeta	0,866
MGI:2443732	<i>Dna2</i>	DNA replication helicase 2 homolog (yeast)	0,856
MGI:1352759	<i>Rnf11</i>	ring finger protein 11	0,841
MGI:1309481	<i>Trip12</i>	thyroid hormone receptor interactor 12	0,835
MGI:1915162	<i>1600012H06Rik</i>	RIKEN cDNA 1600012H06 gene	0,811
MGI:98304	<i>St3gal1</i>	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 1	0,810
MGI:1889850	<i>Dfna5</i>	deafness, autosomal dominant 5 (human)	0,802
MGI:1914184	<i>Dsn1</i>	DSN1, MIND kinetochore complex component, homolog (S. cerevisiae)	0,802
MGI:1920992	<i>Lima1</i>	LIM domain and actin binding 1	0,802
MGI:2444421	<i>Gbp6</i>	guanylate binding protein 6	0,797
MGI:1890373	<i>Tmem2</i>	transmembrane protein 2	0,783
MGI:3582695	<i>Tor1aip2</i>	torsin A interacting protein 2	0,782
MGI:1919387	<i>Wdsub1</i>	WD repeat, SAM and U-box domain containing 1	0,760
MGI:1914401	<i>Psmc9</i>	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 9	0,751
MGI:1919494	<i>1600014C10Rik</i>	RIKEN cDNA 1600014C10 gene	0,746
MGI:1922014	<i>Klc4</i>	kinesin light chain 4	0,737
MGI:1333784	<i>Hdac5</i>	histone deacetylase 5	0,734
MGI:1328337	<i>Orc1l</i>	origin recognition complex, subunit 1-like (S.cerevisiae)	0,730
MGI:1913586	<i>Cenpp</i>	centromere protein P	0,730
MGI:1921879	<i>4930426L09Rik</i>	RIKEN cDNA 4930426L09 gene	0,722
MGI:1925867	<i>Cstad</i>	CSA-conditional, T cell activation-dependent protein	0,721
MGI:1352755	<i>Gtse1</i>	G two S phase expressed protein 1	0,719

Tabelle 8.2A Fortsetzung

Gen ID	Symbol	Bezeichnung	log(fc)
MGI:108025	<i>Prkar2a</i>	protein kinase, cAMP dependent regulatory, type II alpha	0,708
MGI:3033336	<i>Szt2</i>	seizure threshold 2	0,708
MGI:1890574	<i>Spnb4</i>	spectrin beta 4	0,702
MGI:1913520	<i>Fam134b</i>	family with sequence similarity 134, member B	0,689
MGI:1921580	<i>Dnajc14</i>	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 14	0,684
MGI:2153207	<i>Pofut1</i>	protein O-fucosyltransferase 1	0,683
MGI:1096875	<i>Wdfy3</i>	WD repeat and FYVE domain containing 3	0,674
MGI:1333813	<i>Mbd2</i>	methyl-CpG binding domain protein 2	0,672
MGI:1914730	<i>Cwc25</i>	CWC25 spliceosome-associated protein homolog (S. cerevisiae)	0,672
MGI:88568	<i>Cux1</i>	cut-like homeobox 1	0,661
MGI:1914004	<i>Foxp1</i>	forkhead box P1	0,658
MGI:2685277	<i>Zyg11b</i>	zyg-11 homolog B (C. elegans)	0,646
MGI:2442530	<i>Tmt2b</i>	TRM2 tRNA methyltransferase 2 homolog B (S. cerevisiae)	0,635
MGI:2446270	<i>Fam113b</i>	family with sequence similarity 113, member B	0,634
MGI:97813	<i>Ptpre</i>	protein tyrosine phosphatase, receptor type, E	0,632
MGI:1914485	<i>Zkscan14</i>	zinc finger with KRAB and SCAN domains 14	0,630
MGI:894762	<i>Ldb1</i>	LIM domain binding 1	0,624
MGI:2678085	<i>Sfrs14</i>	splicing factor, arginine/serine-rich 14	0,621
MGI:1201408	<i>Srpk2</i>	serine/arginine-rich protein specific kinase 2	0,619
MGI:1926135	<i>Coro7</i>	coronin 7	0,619
MGI:1914693	<i>Map1lc3b</i>	microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta	0,602
MGI:1861232	<i>Clec4e</i>	C-type lectin domain family 4, member e	0,593

8.4.2 Herunterregulierte TEL-AML1 Zielgene

Tabelle 8.2B Schnittmenge aus ChIP-Experimenten und in den Genexpressionsanalysen herunterregulierten Genen des murinen induzierbaren Systems. Angegeben ist die Identnummer der Gene (ID) als MGI (*mouse genome identifier*), das Gensymbol sowie seine Bezeichnung und die differentielle Expression als log (fc) (*fold change*). Gene, die auch in den endogenen ChIP-Experimenten nachgewiesen wurden, sind farbig markiert (gelb: TEL, lila: AML1). Die Fortsetzung der Tabelle befindet sich auf den nächsten beiden Seiten.

Gen ID	Symbol	Bezeichnung	log(fc)
MGI:1859639	<i>Cacna1f</i>	calcium channel, voltage-dependent, alpha 1F subunit	-0,588
MGI:2183149	<i>Nadk</i>	NAD kinase	-0,604
MGI:103291	<i>Rai1</i>	retinoic acid induced 1	-0,605
MGI:108278	<i>Ube2m</i>	ubiquitin-conjugating enzyme E2M (UBC12 homolog, yeast)	-0,606
MGI:1929701	<i>Metap2</i>	methionine aminopeptidase 2	-0,608
MGI:107771	<i>Abr</i>	active BCR-related gene	-0,612
MGI:1926047	<i>Ndor1</i>	NADPH dependent diflavin oxidoreductase 1	-0,624
MGI:1329037	<i>Strap</i>	serine/threonine kinase receptor associated protein	-0,627
MGI:1915894	<i>Abhd14a</i>	abhydrolase domain containing 14A	-0,630
MGI:2158736	<i>Senp3</i>	SUMO/sentrin specific peptidase 3	-0,640
MGI:2384876	<i>Cdc73</i>	cell division cycle 73, Paf1/RNA polymerase II complex component, homolog (S. cerevisiae)	-0,647
MGI:1914299	<i>Pus3</i>	pseudouridine synthase 3	-0,649
MGI:2385884	<i>Ddx27</i>	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 27	-0,658
MGI:2445102	<i>Dhx33</i>	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 33	-0,661
MGI:1915980	<i>Dus1l</i>	dihydrouridine synthase 1-like (S. cerevisiae)	-0,661
MGI:1925554	<i>Lsm1l</i>	LSM domain containing 1	-0,663
MGI:1289308	<i>Tax1bp1</i>	Tax1 (human T-cell leukemia virus type I) binding protein 1	-0,663
MGI:101757	<i>Cfl1</i>	cofilin 1, non-muscle	-0,700
MGI:2385107	<i>Rab71l</i>	RAB7, member RAS oncogene family-like 1	-0,713
MGI:1917475	<i>Ppil3</i>	peptidylprolyl isomerase (cyclophilin)-like 3	-0,727
MGI:1914200	<i>Tmem206</i>	transmembrane protein 206	-0,730
MGI:106908	<i>Srpk1</i>	serine/arginine-rich protein specific kinase 1	-0,745
MGI:1929608	<i>Aatf</i>	apoptosis antagonizing transcription factor	-0,748
MGI:1933185	<i>Ctps2</i>	cytidine 5'-triphosphate synthase 2	-0,749
MGI:1915260	<i>Bambi</i>	BMP and activin membrane-bound inhibitor, homolog (Xenopus laevis)	-0,751
MGI:1913412	<i>Bola2</i>	bolA-like 2 (E. coli)	-0,766
MGI:1917275	<i>Acot7</i>	acyl-CoA thioesterase 7	-0,768
MGI:1926020	<i>2700007P21Rik</i>	RIKEN cDNA 2700007P21 gene	-0,772
MGI:2685139	<i>Setdb2</i>	SET domain, bifurcated 2	-0,783
MGI:2156003	<i>Snip1</i>	Smad nuclear interacting protein 1	-0,795
MGI:1914963	<i>Dnajc19</i>	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 19	-0,838
MGI:1913563	<i>Smurf2</i>	SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2	-0,839
MGI:1915987	<i>Angel1</i>	angel homolog 1 (Drosophila)	-0,867
MGI:1917672	<i>Ints2</i>	integrator complex subunit 2	-0,875
MGI:1915282	<i>Tmem85</i>	transmembrane protein 85	-0,877
MGI:106354	<i>Vps25</i>	vacuolar protein sorting 25 (yeast)	-0,886
MGI:96765	<i>Ldlr</i>	low density lipoprotein receptor	-0,889
MGI:2448427	<i>Hist1h4h</i>	histone cluster 1, H4h	-0,890
MGI:1918615	<i>Pdss2</i>	prenyl (solanosyl) diphosphate synthase, subunit 2	-0,894
MGI:88547	<i>Csnk2a2</i>	casein kinase 2, alpha prime polypeptide	-0,904
MGI:94203	<i>Nudt19</i>	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 19	-0,935
MGI:1919057	<i>Tars2</i>	threonyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial (putative)	-0,943
MGI:1920595	<i>1700034H14Rik</i>	RIKEN cDNA 1700034H14 gene	-0,955
MGI:95303	<i>Eif4a1</i>	eukaryotic translation initiation factor 4A1	-0,969
MGI:1914455	<i>Utp11l</i>	UTP11-like, U3 small nucleolar ribonucleoprotein, (yeast)	-0,974
MGI:107937	<i>Tfb2m</i>	transcription factor B2, mitochondrial	-0,988
MGI:2145304	<i>Gfod1</i>	glucose-fructose oxidoreductase domain containing 1	-0,988
MGI:1923813	<i>Qrs1l</i>	glutaminyl-tRNA synthase (glutamine-hydrolyzing)-like 1	-1,015
MGI:1342299	<i>Ruvb12</i>	RuvB-like protein 2	-1,026
MGI:1890496	<i>Elac2</i>	elaC homolog 2 (E. coli)	-1,051
MGI:96439	<i>Igfbp4</i>	insulin-like growth factor binding protein 4	-1,077
MGI:1860295	<i>Ftsj3</i>	FtsJ homolog 3 (E. coli)	-1,083

Tabelle 8.2B Fortsetzung

Gen ID	Symbol	Bezeichnung	log(fc)
MGI:1913208	<i>Carm1</i>	coactivator-associated arginine methyltransferase 1	-1,107
MGI:1914007	<i>Adat2</i>	adenosine deaminase, tRNA-specific 2, TAD2 homolog (S. cerevisiae)	-1,111
MGI:1913504	<i>Dimt1</i>	DIM1 dimethyladenosine transferase 1-like (S. cerevisiae)	-1,117
MGI:1345278	<i>Slc29a2</i>	solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 2	-1,186
MGI:1261809	<i>Rad51/3</i>	RAD51-like 3 (S. cerevisiae)	-1,203
MGI:1927489	<i>Pdlim5</i>	PDZ and LIM domain 5	-1,212
MGI:107470	<i>Lyar</i>	Ly1 antibody reactive clone	-1,269
MGI:1922566	<i>Taf1d</i>	TATA box binding protein (Tbp)-associated factor, RNA polymerase I, D	-1,275
MGI:2446634	<i>Eif2c3</i>	eukaryotic translation initiation factor 2C, 3	-1,275
MGI:101849	<i>Gnb2/1</i>	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2 like 1	-1,282
MGI:1913659	<i>Rsl1d1</i>	ribosomal L1 domain containing 1	-1,290
MGI:2145316	<i>Txndc5</i>	thioredoxin domain containing 5	-1,296
MGI:2145578	<i>Slain1</i>	SLAIN motif family, member 1	-1,310
MGI:1915290	<i>Zfp593</i>	zinc finger protein 593	-1,318
MGI:1929485	<i>Nif3/1</i>	Ngg1 interacting factor 3-like 1 (S. pombe)	-1,405
MGI:101790	<i>Fabp5</i>	fatty acid binding protein 5, epidermal	-1,418
MGI:1915731	<i>Mpz1/1</i>	myelin protein zero-like 1	-1,438
MGI:1913637	<i>Nudt8</i>	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 8	-1,498
MGI:1915011	<i>Tmem147</i>	transmembrane protein 147	-1,590
MGI:1330262	<i>Zfp259</i>	zinc finger protein 259	-1,732
MGI:1333831	<i>Itln1</i>	intelectin 1 (galactofuranose binding)	-1,808
MGI:1346542	<i>Bace1</i>	beta-site APP cleaving enzyme 1	-1,898
MGI:2178759	<i>Rtn4ip1</i>	reticulon 4 interacting protein 1	-1,971
MGI:104888	<i>Fdps</i>	farnesyl diphosphate synthetase	-2,213
MGI:1338898	<i>Padi4</i>	peptidyl arginine deiminase, type IV	-3,206

8.5 Vergleich der in den humanen ChIP-Experimenten angereicherten GO-Termini

Tabelle 8.3 Vergleich der in den ChIP-Experimenten für TEL-AML1 (linke Spalte) angereicherten GO-Termini mit denen der endogenen TEL- und AML1-ChIP (mittlere bzw. rechte Spalte). Aufgelistet sind jeweils die 30 höchsten GO-Termini absteigend sortiert nach Anzahl der mit ihnen assoziierten Gene (angegeben als prozentualer Anteil). Um die Unterschiede deutlicher herauszustellen, wurden die GO-Termini anhand der Ergebnisse für TEL-AML1 wiederum mit einer einzigartigen Farbe markiert. Bei solchen, die nicht in allen drei Ergebnisgruppen gefunden wurden, ist zudem auch der prozentuale Anteil Gene farbige markiert. Schwarz umrandete GO-Termini waren nur in einer einzigen Ergebnisgruppe angereichert. Einige der GO-Termini wurden zwar in mehreren Ergebnisgruppen gefunden, waren dort aber nicht innerhalb der top30 (beige).

TEL-AML1		TEL		AML1	
Term	%	Term	%	Term	%
GO:0045449~regulation of transcription	12,2	GO:0045449~regulation of transcription	12,9	GO:0045449~regulation of transcription	16,0
GO:0050877~neurological system process	7,6	GO:0050877~neurological system process	9,2	GO:0050877~neurological system process	9,6
GO:0006508~proteolysis	6,5	GO:0006508~proteolysis	6,1	GO:0007155~cell adhesion	7,5
GO:0006796~phosphate metabolic process	5,6	GO:0008104~protein localization	5,2	GO:0008104~protein localization	6,6
GO:0043067~regulation of programmed cell death	5,2	GO:0015031~protein transport	4,8	GO:0010604~positive regulation of macromolecule metabolic process	6,4
GO:0010604~positive regulation of macromolecule metabolic process	4,7	GO:0006811~ion transport	4,4	GO:0006508~proteolysis	5,3
GO:0042592~homeostatic process	4,6	GO:0006796~phosphate metabolic process	4,2	GO:0010033~response to organic substance	5,3
GO:0007049~cell cycle	4,4	GO:0010604~positive regulation of macromolecule metabolic process	4,2	GO:0043067~regulation of programmed cell death	5,1
GO:0010033~response to organic substance	4,2	GO:0006952~defense response	4,2	GO:0015031~protein transport	4,9
GO:0010605~negative regulation of macromolecule metabolic process	4,1	GO:0007049~cell cycle	4,0	GO:0006796~phosphate metabolic process	4,5
GO:0008104~protein localization	4,0	GO:0042592~homeostatic process	3,8	GO:0010605~negative regulation of macromolecule metabolic process	4,3
GO:0007155~cell adhesion	4,0	GO:0010605~negative regulation of macromolecule metabolic process	3,6	GO:0007267~cell-cell signaling	3,6
GO:0006811~ion transport	3,7	GO:0043933~macromolecular complex subunit organization	3,6	GO:0030182~neuron differentiation	3,6
GO:0015031~protein transport	3,4	GO:0032504~multicellular organism reproduction	3,6	GO:0042592~homeostatic process	3,4
GO:0033554~cellular response to stress	3,3	GO:0043067~regulation of programmed cell death	3,2	GO:0007049~cell cycle	3,4
GO:0007267~cell-cell signaling	3,2	GO:0010033~response to organic substance	3,2	GO:0006811~ion transport	3,4
GO:0043933~macromolecular complex subunit organization	3,1	GO:0012501~programmed cell death	3,0	GO:0006928~cell motility	3,2
GO:0012501~programmed cell death	3,1	GO:0007610~behavior	2,6	GO:0032504~multicellular organism reproduction	3,2
GO:0006952~defense response	3,1	GO:0006396~RNA processing	2,6	GO:0009628~response to abiotic stimulus	3,2
GO:0007610~behavior	2,9	GO:0033554~cellular response to stress	2,3	GO:0048598~embryonic morphogenesis	3,2
GO:0016192~vesicle-mediated transport	2,8	GO:0030182~neuron differentiation	2,3	GO:0001501~skeletal system development	2,8
GO:0030182~neuron differentiation	2,8	GO:0051276~chromosome organization	2,3	GO:0012501~programmed cell death	2,6
GO:0006928~cell motility	2,7	GO:0007010~cytoskeleton organization	2,1	GO:0006396~RNA processing	2,6
GO:0007010~cytoskeleton organization	2,4	GO:0006928~cell motility	1,9	GO:0040012~regulation of locomotion	2,6
GO:0032504~multicellular organism reproduction	2,4	GO:0009628~response to abiotic stimulus	1,8	GO:0007010~cytoskeleton organization	2,4
GO:0031399~regulation of protein modification process	2,4	GO:0051726~regulation of cell cycle	1,7	GO:0044271~nitrogen compound biosynthetic process	2,4
GO:0051726~chromosome organization	2,2	GO:0009792~embryonic development ending in birth or egg hatching	1,6	GO:0006034~regulation of cellular localization	2,4
GO:0040008~regulation of growth	2,2	GO:0001501~skeletal system development	1,5	GO:0051726~regulation of cell cycle	2,1
GO:0010647~positive regulation of cell communication	2,1	GO:0006351~transcription, DNA-dependent	1,5	GO:0007423~sensory organ development	2,1
GO:0009628~response to abiotic stimulus	2,1	GO:0035295~tube development	1,5	GO:0060429~epithelium development	2,1

8.6 Schnittmenge der CHIP-Ergebnisse und der differentiell exprimierten Gene im humanen Zellsystem

8.6.1 Hochregulierte TEL Zielgene

Tabelle 8.4A Schnittmenge aus CHIP-Experimenten und in den Genexpressionsanalysen hochregulierten Genen der stabil exprimierenden humanen Zell-Linie. Angegeben ist die Identnummer der Gene (ID), das Gensymbol sowie seine Bezeichnung und die differentielle Expression als fc (*fold change*). Gene, die auch in den anderen CHIP-Experimenten nachgewiesen wurden, sind farblich markiert (grün: TEL-AML1, lila: AML1). Die Fortsetzung der Tabelle befindet sich auf der nächsten Seite.

Gen ID	Symbol	Bezeichnung	fc
605	<i>APOBEC2</i>	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 2	20,506
23432	<i>CNTLN</i>	centlein, centrosomal protein	17,751
16962	<i>CGREF1</i>	cell growth regulator with EF-hand domain 1	17,339
4477	<i>GPR22</i>	G protein-coupled receptor 22	16,011
27638	<i>SYPL2</i>	synaptophysin-like 2	13,211
24588	<i>GKN2</i>	gastrokine 2	12,135
11189	<i>SOX1</i>	SRY (sex determining region Y)-box 1	11,025
13436	<i>RPGRIP1</i>	retinitis pigmentosa GTPase regulator interacting protein 1	10,723
8543	<i>P2RY6</i>	pyrimidinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 6	9,563
17399	<i>ARHGAP32</i>	Rho GTPase activating protein 32	8,917
15352	<i>OR4K14</i>	olfactory receptor, family 4, subfamily K, member 14	8,731
4689	<i>GUCY2D</i>	guanylate cyclase 2D, membrane (retina-specific)	8,507
18335	<i>TIGD4</i>	tigger transposable element derived 4	8,307
2893	<i>DKK3</i>	dickkopf homolog 3 (<i>Xenopus laevis</i>)	7,994
26361	<i>HEPACAM</i>	hepatic and glial cell adhesion molecule	7,518
21897	<i>VWDE</i>	von Willebrand factor D and EGF domains	7,212
8368	<i>OR7A5</i>	olfactory receptor, family 7, subfamily A, member 5	6,587
3443	<i>EREG</i>	epiregulin	6,549
26517	<i>C12ORF66</i>	chromosome 12 open reading frame 66	6,486
25953	<i>ZNF280D</i>	zinc finger protein 280D	6,382
8807	<i>PDHA2</i>	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) alpha 2	6,330
33227	<i>TMEM114</i>	transmembrane protein 114	6,253
13506	<i>FEZF2</i>	FEZ family zinc finger 2	5,640
9206	<i>PON3</i>	paraoxonase 3	5,518
14545	<i>RASGRP3</i>	RAS guanyl releasing protein 3 (calcium and DAG-regulated)	5,391
15388	<i>OR10H4</i>	olfactory receptor, family 10, subfamily H, member 4	5,275
6250	<i>KCNH1</i>	potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 1	5,252
15634	<i>TLR10</i>	tol-like receptor 10	4,617
2521	<i>CTRB1</i>	chymotrypsinogen B1	4,596
14687	<i>LYVE1</i>	lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1	4,384
20511	<i>TMEM121</i>	transmembrane protein 121	4,380
31922	<i>ERC2</i>	ELKS/RAB6-interacting/CAST family member 2	4,348
23822	<i>POTED</i>	POTE ankyrin domain family, member D	4,065
9700	<i>IGDCC3</i>	immunoglobulin superfamily, DCC subclass, member 3	4,033
29302	<i>KIAA1524</i>	<i>KIAA1524</i>	3,968
14357	<i>MMP21</i>	matrix metalloproteinase 21	3,948
19015	<i>TRIM43</i>	tripartite motif containing 43	3,930
1459	<i>CAMK1</i>	calcium/calmodulin-dependent protein kinase I	3,750
200	<i>ADAM21</i>	ADAM metalloproteinase domain 21	3,549
2532	<i>CTSG</i>	cathepsin G	3,487
27168	<i>GPAT2</i>	glycerol-3-phosphate acyltransferase 2, mitochondrial	3,438
30991	<i>LRIG3</i>	leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 3	3,362
18532	<i>MBD3L2</i>	methyl-CpG binding domain protein 3-like 2	3,299
16354	<i>ADHFE1</i>	alcohol dehydrogenase, iron containing, 1	3,296
29364	<i>TANC1</i>	tetratricopeptide repeat, ankyrin repeat and coiled-coil containing 1	3,257
32930	<i>IGFL3</i>	IGF-like family member 3	3,233
30946	<i>ZNF233</i>	zinc finger protein 233	3,062
26543	<i>C15ORF33</i>	chromosome 15 open reading frame 33	2,893
16035	<i>STRC</i>	stereocilin	2,807
25474	<i>ENOX1</i>	ecto-NOX disulfide-thiol exchanger 1	2,793
14686	<i>JAM2</i>	junctional adhesion molecule 2	2,776
18936	<i>KRTAP19-1</i>	keratin associated protein 19-1	2,657

Tabelle 8.4A Fortsetzung

Gen ID	Symbol	Bezeichnung	fc
21537	<i>SYCP2L</i>	synaptonemal complex protein 2-like	2,567
24913	<i>CDNF</i>	cerebral dopamine neurotrophic factor	2,309
2418	<i>GRYM</i>	crystallin, mu	2,300
23527	<i>FANK1</i>	fibronectin type III and ankyrin repeat domains 1	2,244
271	<i>PARP4</i>	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 4	2,220
22036	<i>C7ORF53</i>	chromosome 7 open reading frame 53	2,154
14103	<i>ARHGEF10</i>	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 10	2,142
1621	<i>CCT6B</i>	chaperonin containing TCP1, subunit 6B (zeta 2)	2,089
13253	<i>CKLF</i>	chemokine-like factor	2,077
11630	<i>HNF1B</i>	HNF1 homeobox B	2,050
24762	<i>ZC3H6</i>	zinc finger CCCH-type containing 6	1,950
14466	<i>NDRG4</i>	NDRG family member 4	1,936
16277	<i>TRIM6</i>	tripartite motif containing 6	1,917
5141	<i>HP</i>	haptoglobin	1,909
14927	<i>TSGA10</i>	testis specific, 10	1,892
24290	<i>CSGALNACT1</i>	chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase 1	1,854
25387	<i>KATNAL2</i>	katanin p60 subunit A-like 2	1,833
11920	<i>FAS</i>	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)	1,807
19657	<i>OTOP2</i>	otopetrin 2	1,767
10702	<i>SEC23B</i>	Sec23 homolog B (<i>S. cerevisiae</i>)	1,751
7955	<i>NPY</i>	neuropeptide Y	1,738
24584	<i>CBWD5</i>	COBW domain containing 5	1,737
7818	<i>NHLH2</i>	nescent helix loop helix 2	1,733
8873	<i>PFKFB2</i>	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 2	1,705
11304	<i>SRP9</i>	signal recognition particle 9kDa	1,695
19164	<i>STARD13</i>	StAR-related lipid transfer (START) domain containing 13	1,679
7598	<i>MYO1D</i>	myosin ID	1,595
21014	<i>ANTXR1</i>	anthrax toxin receptor 1	1,587
8378	<i>OR7D2</i>	olfactory receptor, family 7, subfamily D, member 2	1,535
30281	<i>RGL1</i>	ral guanine nucleotide dissociation stimulator-like 1	1,524
21731	<i>PGAM4</i>	phosphoglycerate mutase family member 4	1,509
26423	<i>SNX32</i>	sorting nexin 32	1,501
7436	<i>MTHFR</i>	methylenetetrahydrofolate reductase (NAD(P)H)	1,501

8.6.2 Herunterregulierte TEL Zielgene

Tabelle 8.4B Schnittmenge aus ChIP-Experimenten und in den Genexpressionsanalysen herunterregulierten Genen der stabil exprimierenden humanen Zell-Linie. Angegeben ist die Identnummer der Gene (ID), das Gensymbol sowie seine Bezeichnung und die differentielle Expression als fc (*fold change*). Gene, die auch in den anderen ChIP-Experimenten nachgewiesen wurden, sind farbig markiert (grün: TEL-AML1, lila: AML1).

Gen ID	Symbol	Bezeichnung	fc
51	<i>ABCC1</i>	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 1	-1,511
23703	<i>ERMP1</i>	endoplasmic reticulum metallopeptidase 1	-1,550
25789	<i>EFTUD1</i>	elongation factor Tu GTP binding domain containing 1	-1,582
6155	<i>ITGB2</i>	integrin, beta 2 (complement component 3 receptor 3 and 4 subunit)	-1,614
23724	<i>ARHGAP19</i>	Rho GTPase activating protein 19	-1,618
17680	<i>RBAK</i>	RB-associated KRAB zinc finger	-1,629
11654	<i>TCOF1</i>	Treacher Collins-Franceschetti syndrome 1	-1,629
25916	<i>FAM40A</i>	family with sequence similarity 40, member A	-1,693
1499	<i>CASP1</i>	caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase (interleukin 1, beta, convertase)	-1,761
6491	<i>LAMB4</i>	laminin, beta 4	-1,796
26545	<i>ARHGAP42</i>	Rho GTPase activating protein 42	-1,841
26773	<i>FAM98B</i>	family with sequence similarity 98, member B	-1,972
14374	<i>NLRP1</i>	NLR family, pyrin domain containing 1	-2,070
8860	<i>PEX7</i>	peroxisomal biogenesis factor 7	-2,205
23805	<i>ASXL2</i>	additional sex combs like 2 (Drosophila)	-2,408
9237	<i>PPARGC1A</i>	peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha	-2,864
11242	<i>SPIB</i>	Spi-B transcription factor (Spi-1/PU.1 related)	-3,185
11725	<i>TEKT2</i>	tektin 2 (testicular)	-3,411
9044	<i>PLAC1</i>	placenta-specific 1	-3,767
24663	<i>RABGAP1L</i>	RAB GTPase activating protein 1-like	-3,785
3670	<i>FGF13</i>	fibroblast growth factor 13	-3,811
24198	<i>CTAG1A</i>	cancer/testis antigen 1A	-3,931
4508	<i>GPR52</i>	G protein-coupled receptor 52	-4,267
6066	<i>INHBA</i>	inhibin, beta A	-4,603
18274	<i>CYSLTR2</i>	cysteinyl leukotriene receptor 2	-4,650
2926	<i>DMBT1</i>	deleted in malignant brain tumors 1	-5,379
6759	<i>MARCKS</i>	myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate	-6,372
27266	<i>UGT3A2</i>	UDP glycosyltransferase 3 family, polypeptide A2	-6,378
7655	<i>NCALD</i>	neurocalcin delta	-6,472
6009	<i>IL2RB</i>	interleukin 2 receptor, beta	-6,554
7105	<i>MITF</i>	microphthalmia-associated transcription factor	-6,799
663	<i>ARG1</i>	arginase, liver	-7,308
24352	<i>TNS4</i>	tensin 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:24352]	-7,430
29654	<i>PRR16</i>	proline rich 16	-7,525
22942	<i>TNN</i>	tenascin N	-7,581
3770	<i>FMO2</i>	flavin containing monooxygenase 2 (non-functional)	-7,816
25480	<i>TMEM45A</i>	transmembrane protein 45A	-9,634
15108	<i>OR13J1</i>	olfactory receptor, family 13, subfamily J, member 1	-10,060
6525	<i>LCN1</i>	lipocalin 1 (tear prealbumin)	-11,092
18747	<i>CNTNAP4</i>	contactin associated protein-like 4	-11,565
14268	<i>PCDH18</i>	protocadherin 18	-11,850
24257	<i>TMBIM4</i>	transmembrane BAX inhibitor motif containing 4	-13,942
13826	<i>DMRTA1</i>	DMRT-like family A1	-16,969
6663	<i>LOR</i>	loricrin	-17,559
32224	<i>INCA1</i>	inhibitor of CDK, cyclin A1 interacting protein 1	-20,116
8714	<i>PCDHGB7</i>	protocadherin gamma subfamily B, 7	-27,092
33712	<i>C7ORF66</i>	chromosome 7 open reading frame 66	-27,476
15005	<i>OR2C3</i>	olfactory receptor, family 2, subfamily C, member 3	-28,197
3053	<i>EPYC</i>	epiphycan	-32,456
9666	<i>PTPRC</i>	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	-37,423

8.6.3 Hochregulierte AML1 Zielgene

Tabelle 8.5A Schnittmenge aus ChIP-Experimenten und in den Genexpressionsanalysen hochregulierten Genen der stabil exprimierenden humanen Zell-Linie. Angegeben ist die Identnummer der Gene (ID), das Gensymbol sowie seine Bezeichnung und die differentielle Expression als fc (*fold change*). Gene, die auch in den anderen ChIP-Experimenten nachgewiesen wurden, sind farblich markiert (gelb: TEL, grün: TEL-AML1).

Gen ID	Symbol	Bezeichnung	fc
13841	<i>GPR126</i>	G protein-coupled receptor 126	19,908
6254	<i>KCNH5</i>	potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 5	17,140
11771	<i>TGFB1</i>	transforming growth factor, beta-induced, 68kDa	8,237
10627	<i>CCL3</i>	chemokine (C-C motif) ligand 3	7,579
28139	<i>C12ORF39</i>	chromosome 12 open reading frame 39	7,573
21152	<i>LONRF3</i>	LON peptidase N-terminal domain and ring finger 3	7,132
18335	<i>TIGD4</i>	tigger transposable element derived 4	6,328
2727	<i>DDO</i>	D-aspartate oxidase	6,189
3670	<i>FGF13</i>	fibroblast growth factor 13	5,950
31736	<i>CKMT1A</i>	creatine kinase, mitochondrial 1A	5,783
11219	<i>SPARC</i>	secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)	5,471
8681	<i>PCDHB10</i>	protocadherin beta 10	4,125
10923	<i>SLC16A2</i>	solute carrier family 16, member 2 (monocarboxylic acid transporter 8)	3,423
9683	<i>PTPRU</i>	protein tyrosine phosphatase, receptor type, U	3,146
6075	<i>INPP4B</i>	inositol polyphosphate-4-phosphatase, type II, 105kDa	3,036
7975	<i>NR2F1</i>	nuclear receptor subfamily 2, group F, member 1	2,532
3357	<i>ENPP2</i>	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2	2,388
16487	<i>ADAP2</i>	ArfGAP with dual PH domains 2	2,166
1041	<i>BFSP2</i>	beaded filament structural protein 2, phakinin	2,155
237	<i>ADCY6</i>	adenylate cyclase 6	2,142
18379	<i>SESTD1</i>	SEC14 and spectrin domains 1	2,046
29364	<i>TANC1</i>	tetratricopeptide repeat, ankyrin repeat and coiled-coil containing 1	1,945
29811	<i>NRN1L</i>	neuritin 1-like	1,886
15858	<i>C20ORF12</i>	chromosome 20 open reading frame 12	1,845
26878	<i>FAM115C</i>	family with sequence similarity 115, member C	1,761
16769	<i>GORASP1</i>	golgi reassembly stacking protein 1, 65kDa	1,732
19102	<i>DDX58</i>	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58	1,722
987	<i>BCKDHB</i>	branched chain keto acid dehydrogenase E1, beta polypeptide	1,708
2721	<i>ASAP2</i>	ArfGAP with SH3 domain, ankyrin repeat and PH domain 2	1,688
9113	<i>PML</i>	promyelocytic leukemia	1,581
6125	<i>IRS1</i>	insulin receptor substrate 1	1,533

8.6.4 Herunterregulierte AML1 Zielgene

Tabelle 8.5B Schnittmenge aus ChIP-Experimenten und in den Genexpressionsanalysen herunterregulierten Genen der stabil exprimierenden humanen Zell-Linie. Angegeben ist die Identnummer der Gene (ID), das Gensymbol sowie seine Bezeichnung und die differentielle Expression als fc (*fold change*). Gene, die auch in den anderen ChIP-Experimenten nachgewiesen wurden, sind farblich markiert (gelb: TEL, grün: TEL-AML1).

Gen ID	Symbol	Bezeichnung	fc
10471	<i>RUNX1</i>	runt-related transcription factor 1	-1,509
23719	<i>PGAP3</i>	post-GPI attachment to proteins 3	-1,519
18040	<i>ARID1B</i>	AT rich interactive domain 1B (SWI1-like)	-1,523
24055	<i>TOR1AIP2</i>	torsin A interacting protein 2	-1,547
6204	<i>JUN</i>	jun proto-oncogene	-1,595
12855	<i>YWHAZ</i>	tyrosine 3-/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide	-1,600
18170	<i>CMPK1</i>	cytidine monophosphate (UMP-CMP) kinase 1, cytosolic	-1,678
4791	<i>HIST1H4L</i>	histone cluster 1, H4l	-1,678
18729	<i>HIST1H2AA</i>	histone cluster 1, H2aa	-1,924
1705	<i>CD86</i>	CD86 molecule	-2,229
28524	<i>SLC44A5</i>	solute carrier family 44, member 5	-2,718
11407	<i>STK31</i>	serine/threonine kinase 31	-2,855
8783	<i>PDE4D</i>	phosphodiesterase 4D, cAMP-specific	-2,941
9666	<i>PTPRC</i>	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	-3,985
8126	<i>OGN</i>	osteoglycin	-4,837
33705	<i>TMEM207</i>	transmembrane protein 207	-5,585
8773	<i>PDE11A</i>	phosphodiesterase 11A	-5,716
28716	<i>C10ORF67</i>	chromosome 10 open reading frame 67	-6,085
14268	<i>PCDH18</i>	protocadherin 18	-6,165
9600	<i>PTGFR</i>	prostaglandin F receptor (FP)	-8,879
25480	<i>TMEM45A</i>	transmembrane protein 45A	-9,412
23432	<i>CNTLN</i>	centlein, centrosomal protein	-12,266
9480	<i>PRSS16</i>	protease, serine, 16 (thymus)	-21,833
8714	<i>PCDHGB7</i>	protocadherin gamma subfamily B, 7	-25,406

8.6.5 Hochregulierte TEL-AML1 Zielgene

Tabelle 8.6A Schnittmenge aus CHIP-Experimenten und in den Genexpressionsanalysen hochregulierten Genen der stabil exprimierenden humanen Zell-Linie. Angegeben ist die Identnummer der Gene (ID), das Gensymbol sowie seine Bezeichnung und die differentielle Expression als fc (*fold change*). Gene, die auch in den anderen ChIP-Experimenten nachgewiesen wurden, sind farblich markiert (gelb: TEL, lila: AML1). Die Fortsetzung der Tabelle befindet sich auf der nächsten Seite.

Gen ID	Symbol	Bezeichnung	fc
20122	<i>TDRD9</i>	tudor domain containing 9	27,977
17068	<i>PALLD</i>	palladin, cytoskeletal associated protein	11,084
15042	<i>OR6B3</i>	olfactory receptor, family 6, subfamily B, member 3	10,647
1181	<i>C11ORF9</i>	chromosome 11 open reading frame 9	10,544
25721	<i>IQCH</i>	IQ motif containing H	9,721
28874	<i>CD300E</i>	CD300e molecule	8,547
29411	<i>TMEM132D</i>	transmembrane protein 132D	7,719
31988	<i>NBPF6</i>	neuroblastoma breakpoint family, member 6	7,440
24277	<i>FAM164A</i>	family with sequence similarity 164, member A	6,757
18222	<i>RBFOX1</i>	RNA binding protein, fox-1 homolog (C. elegans) 1	6,755
7190	<i>MOCS1</i>	molybdenum cofactor synthesis 1	6,163
13941	<i>SLC44A4</i>	solute carrier family 44, member 4	5,762
13872	<i>FAM65B</i>	family with sequence similarity 65, member B	5,084
30651	<i>STON1-GTF2A1L</i>	STON1-GTF2A1L readthrough	4,937
26178	<i>FHOD3</i>	fomin homology 2 domain containing 3	4,750
9456	<i>PROS1</i>	protein S (alpha)	4,414
2359	<i>CRIM1</i>	cysteine rich transmembrane BMP regulator 1 (chordin-like)	4,349
10923	<i>SLC16A2</i>	solute carrier family 16, member 2 (monocarboxylic acid transporter 8)	4,338
7515	<i>MUC5AC</i>	mucin 5AC, oligomeric mucus/gel-forming	3,804
34497	<i>C19ORF69</i>	chromosome 19 open reading frame 69	3,764
11267	<i>SPRR2G</i>	small proline-rich protein 2G	3,711
4685	<i>GUCY1A3</i>	guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3	3,530
23097	<i>SLC29A4</i>	solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 4	3,428
29302	<i>KIAA1524</i>	KIAA1524	3,333
17149	<i>VSIG2</i>	V-set and immunoglobulin domain containing 2	3,301
25736	<i>ZNF669</i>	zinc finger protein 669	2,987
5992	<i>IL1B</i>	interleukin 1, beta	2,845
11934	<i>TNFSF4</i>	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 4	2,686
35422	<i>NEURL1B</i>	neuralized homolog 1B (Drosophila)	2,541
11480	<i>SVIL</i>	supervillin	2,456
24100	<i>APOBEC3H</i>	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3H	2,344
10740	<i>SEMA6C</i>	sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6C	2,332
8941	<i>SERPINA1</i>	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antitrypsin), member 1	2,288
2893	<i>DKK3</i>	dickkopf homolog 3 (Xenopus laevis)	2,198
1833	<i>CEBPA</i>	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha	2,196
21732	<i>ANTXR2</i>	anthrax toxin receptor 2	2,180
13937	<i>C6ORF25</i>	chromosome 6 open reading frame 25	2,176
9451	<i>PROC</i>	protein C (inactivator of coagulation factors Va and VIIIa)	2,165
21643	<i>TSPAN13</i>	tetraspanin 13	2,103
31104	<i>MYO18A</i>	myosin XVIIIa	2,067
11374	<i>STC2</i>	stanniocalcin 2	2,056
4782	<i>HIST1H4D</i>	histone cluster 1, H4d	2,023
5269	<i>HSPA6</i>	heat shock 70kDa protein 6 (HSP70B')	2,006
16379	<i>TRIM22</i>	tripartite motif containing 22	1,974
28854	<i>ZNF667</i>	zinc finger protein 667	1,956
23788	<i>PPP4R4</i>	protein phosphatase 4, regulatory subunit 4	1,943
13253	<i>CKLF</i>	chemokine-like factor	1,902
29416	<i>ZNF618</i>	zinc finger protein 618	1,887
15173	<i>OR4D10</i>	olfactory receptor, family 4, subfamily D, member 10	1,858
11068	<i>SLC8A1</i>	solute carrier family 8 (sodium/calcium exchanger), member 1	1,857
30766	<i>TRAF3IP3</i>	TRAF3 interacting protein 3	1,826
29346	<i>LRRC27</i>	leucine rich repeat containing 27	1,753

Tabelle 8.6A Fortsetzung

Gen ID	Symbol	Bezeichnung	fc
4932	<i>HLA-B</i>	major histocompatibility complex, class I, B	1,714
4774	<i>HIST1H3J</i>	histone cluster 1, H3j	1,706
757	<i>ASPH</i>	aspartate beta-hydroxylase	1,696
27139	<i>SHISA4</i>	shisa homolog 4 (<i>Xenopus laevis</i>)	1,690
19657	<i>OTOP2</i>	otopetrin 2	1,672
165	<i>ACTN3</i>	actinin, alpha 3	1,656
28772	<i>C2ORF49</i>	chromosome 2 open reading frame 49	1,651
4504	<i>LGR5</i>	leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 5	1,630
28482	<i>TCTEX1D2</i>	Tctex1 domain containing 2	1,613
17811	<i>AMOTL1</i>	angiominin like 1	1,599
18391	<i>SCGB3A2</i>	secretoglobin, family 3A, member 2	1,595
6774	<i>SMAD9</i>	SMAD family member 9	1,589
32403	<i>C17ORF76</i>	chromosome 17 open reading frame 76	1,589
18752	<i>MAPKAP1</i>	mitogen-activated protein kinase associated protein 1	1,566
11940	<i>TNK1</i>	tyrosine kinase, non-receptor, 1	1,562
4867	<i>HERC1</i>	hect (homologous to the E6-AP (UBE3A) carboxyl terminus) domain and RCC1 (CHC1)-like c	1,560
33827	<i>CARD17</i>	caspase recruitment domain family, member 17	1,533
9438	<i>PRKRA</i>	protein kinase, interferon-inducible double stranded RNA dependent activator	1,527
28949	<i>IQCB1</i>	IQ motif containing B1	1,518
29643	<i>MLPH</i>	melanophilin	1,517
10936	<i>SLC18A3</i>	solute carrier family 18 (vesicular acetylcholine), member 3	1,516
24319	<i>CMIP</i>	c-Maf inducing protein	1,508
23522	<i>FAM171A1</i>	family with sequence similarity 171, member A1	1,501

8.6.6 Herunterregulierte TEL-AML1 Zielgene

Tabelle 8.6B Schnittmenge aus ChIP-Experimenten und in den Genexpressionsanalysen herunterregulierten Genen der stabil exprimierenden humanen Zell-Linie. Angegeben ist die Identnummer der Gene (ID), das Gensymbol sowie seine Bezeichnung und die differentielle Expression als *fc* (*fold change*). Gene, die auch in den anderen ChIP-Experimenten nachgewiesen wurden, sind farbig markiert (gelb: TEL, lila: AML1). Die Fortsetzung der Tabelle befindet sich auf der nächsten Seite.

Gen ID	Symbol	Bezeichnung	fc
3157	EDA	ectodysplasin A	-1,504
23067	TRAPPC5	trafficking protein particle complex 5	-1,521
13531	ATP8A1	ATPase, aminophospholipid transporter (APLT), class I, type 8A, member 1	-1,527
24278	FAM108B1	family with sequence similarity 108, member B1	-1,527
14460	NDRG2	NDRG family member 2	-1,544
12010	TPM1	tropomyosin 1 (alpha)	-1,549
15935	ZHX3	zinc fingers and homeoboxes 3	-1,552
26306	FAM91A1	family with sequence similarity 91, member A1	-1,568
25874	MFSD1	major facilitator superfamily domain containing 1	-1,574
20299	CDADC1	cytidine and dCMP deaminase domain containing 1	-1,574
9118	PMP22	peripheral myelin protein 22	-1,581
16244	NPEPL1	aminopeptidase-like 1	-1,594
7376	MSR1	macrophage scavenger receptor 1	-1,596
32933	CENPP	centromere protein P	-1,599
11872	TMOD2	tropomodulin 2 (neuronal)	-1,599
16627	CHEK2	CHK2 checkpoint homolog (S. pombe)	-1,606
14569	HN1	hematological and neurological expressed 1	-1,608
16608	PYCARD	PYD and CARD domain containing	-1,612
13019	ZNF226	zinc finger protein 226	-1,620
2235	KLF6	Kruppel-like factor 6	-1,620
18451	MCFD2	multiple coagulation factor deficiency 2	-1,621
4200	BLOC1S1	biogenesis of lysosomal organelles complex-1, subunit 1	-1,632
31813	ARHGAP27	Rho GTPase activating protein 27	-1,643
17660	DCLRE1A	DNA cross-link repair 1A	-1,681
12698	VLDLR	very low density lipoprotein receptor	-1,685
23719	PGAP3	post-GPI attachment to proteins 3	-1,716
10866	ST3GAL3	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 3	-1,716
21882	TTC26	tetratricopeptide repeat domain 26	-1,726
2351	CREG1	cellular repressor of E1A-stimulated genes 1	-1,733
29323	WDFY4	WDFY family member 4	-1,747
26036	COMMD8	COMM domain containing 8	-1,747
8777	PDE2A	phosphodiesterase 2A, cGMP-stimulated	-1,837
23115	EAF2	ELL associated factor 2	-1,891
26129	RASAL3	RAS protein activator like 3	-1,906
73	ABCG1	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 1	-1,924
17736	RHOQ	ras homolog gene family, member Q	-1,935
21573	C6ORF192	chromosome 6 open reading frame 192	-1,981
23805	ASXL2	additional sex combs like 2 (Drosophila)	-2,024
20990	PHACTR1	phosphatase and actin regulator 1	-2,100
6486	LAMB1	laminin, beta 1	-2,194
8090	OASL	2'-5'-oligoadenylate synthetase-like	-2,200
24133	STAP1	signal transducing adaptor family member 1	-2,264
20323	SMOC2	SPARC related modular calcium binding 2	-2,338
25913	TMEM87B	transmembrane protein 87B	-2,343
18667	PMPCA	peptidase (mitochondrial processing) alpha	-2,393
15525	LBX2	ladybird homeobox 2	-2,577
1659	CD33	CD33 molecule	-2,659
14539	RNF213	ring finger protein 213	-2,688
21292	RIMS3	regulating synaptic membrane exocytosis 3	-2,818
6667	LPA	lipoprotein, Lp(a)	-3,025
24125	FRMD3	FERM domain containing 3	-3,163
78	ABLIM1	actin binding LIM protein 1	-3,214
1704	CD84	CD84 molecule	-3,224
20474	TMC8	transmembrane channel-like 8	-3,254
14471	SLC26A11	solute carrier family 26, member 11	-3,313
3507	EVX2	even-skipped homeobox 2	-3,339

Tabelle 8.6B Fortsetzung

Gen ID	Symbol	Bezeichnung	fc
1441	<i>CALD1</i>	caldesmon 1	-3,456
5464	<i>IGF1</i>	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	-3,553
33849	<i>CLEC18B</i>	C-type lectin domain family 18, member B	-3,653
1389	<i>CACNA1B</i>	calcium channel, voltage-dependent, N type, alpha 1B subunit	-3,831
6925	<i>MBP</i>	myelin basic protein	-4,106
25607	<i>TMEM100</i>	transmembrane protein 100	-4,366
21918	<i>GIMAP6</i>	GTPase, IMAP family member 6	-4,423
1353	<i>C8B</i>	complement component 8, beta polypeptide	-4,513
30477	<i>HEPHL1</i>	hephaestin-like 1	-4,567
9243	<i>PPEF1</i>	protein phosphatase, EF-hand calcium binding domain 1	-4,604
6287	<i>KCNMB3</i>	potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M beta member 3	-4,730
2719	<i>DDC</i>	dopa decarboxylase (aromatic L-amino acid decarboxylase)	-4,754
18274	<i>CYSLTR2</i>	cysteinyl leukotriene receptor 2	-4,785
6439	<i>KRT2</i>	keratin 2	-4,871
127	<i>ACRV1</i>	acrosomal vesicle protein 1	-5,103
14311	<i>NUAK1</i>	NUAK family, SNF1-like kinase, 1	-5,226
8773	<i>PDE11A</i>	phosphodiesterase 11A	-5,316
9346	<i>PRDM1</i>	PR domain containing 1, with ZNF domain	-5,416
19409	<i>LRRTM2</i>	leucine rich repeat transmembrane neuronal 2	-5,511
27884	<i>TMEM119</i>	transmembrane protein 119	-5,571
4880	<i>HEY1</i>	hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1	-5,593
14295	<i>SHANK2</i>	SH3 and multiple ankyrin repeat domains 2	-5,617
7105	<i>MITF</i>	microphthalmia-associated transcription factor	-5,666
4814	<i>KALRN</i>	kalirin, RhoGEF kinase	-6,080
28105	<i>LRRC3B</i>	leucine rich repeat containing 3B	-6,088
15968	<i>GDAP1</i>	ganglioside-induced differentiation-associated protein 1	-6,305
33705	<i>TMEM207</i>	transmembrane protein 207	-6,386
3182	<i>PHC1</i>	polyhomeotic homolog 1 (Drosophila)	-6,431
15460	<i>CACNA2D3</i>	calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 3	-6,687
9102	<i>PLXNA4</i>	plexin A4	-6,871
33504	<i>C17ORF87</i>	chromosome 17 open reading frame 87	-7,254
8952	<i>SERPINB8</i>	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 8	-7,332
8743	<i>PCSK1</i>	proprotein convertase subtilisin/kexin type 1	-7,530
20749	<i>ZDHHC20</i>	zinc finger, DHHC-type containing 20	-7,707
3770	<i>FMO2</i>	flavin containing monooxygenase 2 (non-functional)	-7,761
26891	<i>GGT6</i>	gamma-glutamyltransferase 6	-7,862
8126	<i>OGN</i>	osteoglycin	-7,904
1610	<i>CCR9</i>	chemokine (C-C motif) receptor 9	-8,773
25480	<i>TMEM45A</i>	transmembrane protein 45A	-9,592
9237	<i>PPARGC1A</i>	peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha	-10,819
964	<i>BBOX1</i>	butyrobetaine (gamma), 2-oxoglutarate dioxygenase (gamma-butyrobetaine hydroxylase) 1	-11,122
1074	<i>BMP7</i>	bone morphogenetic protein 7	-11,732
8860	<i>PEX7</i>	peroxisomal biogenesis factor 7	-11,874
26535	<i>C9ORF84</i>	chromosome 9 open reading frame 84	-12,006
31286	<i>OR5H14</i>	olfactory receptor, family 5, subfamily H, member 14	-12,088
29943	<i>ODZ2</i>	odz, odd Oz/ten-m homolog 2 (Drosophila)	-13,597
6106	<i>FOXP3</i>	forkhead box P3	-13,909
6663	<i>LOR</i>	loricrin	-16,336
21490	<i>DAPL1</i>	death associated protein-like 1	-17,564
23468	<i>DYDC2</i>	DPY30 domain containing 2	-17,960
15218	<i>OR52H1</i>	olfactory receptor, family 52, subfamily H, member 1	-18,093
24759	<i>TPRG1</i>	tumor protein p63 regulated 1	-26,319
8714	<i>PCDHGB7</i>	protocadherin gamma subfamily B, 7	-26,780
3053	<i>EPYC</i>	epiphycan	-32,108
951	<i>NKX3-2</i>	NK3 homeobox 2	-33,556

8.7.2 Top50 der innerhalb der herunterregulierten Gene angereicherten GO-Termini

mRNA		h-TA		TA+PII		
% Term	Value	% Term	Value	% Term	Value	
82	GO:003605-mRNA metabolic process	14	GO:003775-pigmentation	81	GO:000895-immune response	3.9E-08
61	GO:004242-mitochondrion biogenesis	15	GO:000811-response to wounding	82	GO:0001775-cell activation	3.1E-09
60	GO:0006955-cellular component biogenesis	16	GO:000812-response to hypoxia	83	GO:0008103-angiogenesis	3.1E-09
65	GO:003471-mRNA processing	14	GO:001097-regulation of neurogenesis	84	GO:0008103-angiogenesis	3.1E-09
64	GO:0006955-cellular component biogenesis	15	GO:000292-regulation of cell cycle	85	GO:0008103-angiogenesis	3.1E-09
63	GO:0006955-cellular component biogenesis	16	GO:000292-regulation of cell cycle	86	GO:0008103-angiogenesis	3.1E-09
41	GO:0006955-cellular component biogenesis	17	GO:000292-regulation of cell cycle	87	GO:0008103-angiogenesis	3.1E-09
40	GO:0006955-cellular component biogenesis	18	GO:000292-regulation of cell cycle	88	GO:0008103-angiogenesis	3.1E-09
39	GO:0006955-cellular component biogenesis	19	GO:000292-regulation of cell cycle	89	GO:0008103-angiogenesis	3.1E-09
38	GO:0006955-cellular component biogenesis	20	GO:000292-regulation of cell cycle	90	GO:0008103-angiogenesis	3.1E-09
37	GO:0006955-cellular component biogenesis	21	GO:000292-regulation of cell cycle	91	GO:0008103-angiogenesis	3.1E-09
36	GO:0006955-cellular component biogenesis	22	GO:000292-regulation of cell cycle	92	GO:0008103-angiogenesis	3.1E-09
35	GO:0006955-cellular component biogenesis	23	GO:000292-regulation of cell cycle	93	GO:0008103-angiogenesis	3.1E-09
34	GO:0006955-cellular component biogenesis	24	GO:000292-regulation of cell cycle	94	GO:0008103-angiogenesis	3.1E-09
33	GO:0006955-cellular component biogenesis	25	GO:000292-regulation of cell cycle	95	GO:0008103-angiogenesis	3.1E-09
32	GO:0006955-cellular component biogenesis	26	GO:000292-regulation of cell cycle	96	GO:0008103-angiogenesis	3.1E-09
31	GO:0006955-cellular component biogenesis	27	GO:000292-regulation of cell cycle	97	GO:0008103-angiogenesis	3.1E-09
30	GO:0006955-cellular component biogenesis	28	GO:000292-regulation of cell cycle	98	GO:0008103-angiogenesis	3.1E-09
29	GO:0006955-cellular component biogenesis	29	GO:000292-regulation of cell cycle	99	GO:0008103-angiogenesis	3.1E-09
28	GO:0006955-cellular component biogenesis	30	GO:000292-regulation of cell cycle	100	GO:0008103-angiogenesis	3.1E-09
27	GO:0006955-cellular component biogenesis	31	GO:000292-regulation of cell cycle			
26	GO:0006955-cellular component biogenesis	32	GO:000292-regulation of cell cycle			
25	GO:0006955-cellular component biogenesis	33	GO:000292-regulation of cell cycle			
24	GO:0006955-cellular component biogenesis	34	GO:000292-regulation of cell cycle			
23	GO:0006955-cellular component biogenesis	35	GO:000292-regulation of cell cycle			
22	GO:0006955-cellular component biogenesis	36	GO:000292-regulation of cell cycle			
21	GO:0006955-cellular component biogenesis	37	GO:000292-regulation of cell cycle			
20	GO:0006955-cellular component biogenesis	38	GO:000292-regulation of cell cycle			
19	GO:0006955-cellular component biogenesis	39	GO:000292-regulation of cell cycle			
18	GO:0006955-cellular component biogenesis	40	GO:000292-regulation of cell cycle			
17	GO:0006955-cellular component biogenesis	41	GO:000292-regulation of cell cycle			
16	GO:0006955-cellular component biogenesis	42	GO:000292-regulation of cell cycle			
15	GO:0006955-cellular component biogenesis	43	GO:000292-regulation of cell cycle			
14	GO:0006955-cellular component biogenesis	44	GO:000292-regulation of cell cycle			
13	GO:0006955-cellular component biogenesis	45	GO:000292-regulation of cell cycle			
12	GO:0006955-cellular component biogenesis	46	GO:000292-regulation of cell cycle			
11	GO:0006955-cellular component biogenesis	47	GO:000292-regulation of cell cycle			
10	GO:0006955-cellular component biogenesis	48	GO:000292-regulation of cell cycle			
9	GO:0006955-cellular component biogenesis	49	GO:000292-regulation of cell cycle			
8	GO:0006955-cellular component biogenesis	50	GO:000292-regulation of cell cycle			
7	GO:0006955-cellular component biogenesis					
6	GO:0006955-cellular component biogenesis					
5	GO:0006955-cellular component biogenesis					
4	GO:0006955-cellular component biogenesis					
3	GO:0006955-cellular component biogenesis					
2	GO:0006955-cellular component biogenesis					
1	GO:0006955-cellular component biogenesis					

LEBENS LAUF

Zur Person

Yvonne Linka
Diplom-Biologin
geboren am 07. März 1977 in Moers
verheiratet, keine Kinder

Tätigkeiten seit der Diplomarbeit

seit Ende Apr. 2007 Doktorandin in der Arbeitsgruppe Leukämiegenetik II (Labor für Stammzelltransplantation und Experimentelle Hämatologie der Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und – Immunologie, Universitätsklinikum Düsseldorf)

Thema: Identifizierung von Zielgenen des chimären Transkriptionsfaktors TEL-AML1

Jul. 2004 – Jun. 2006 wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Arbeitsgruppe von Prof. Hanenberg (im gleichen Labor)

Hochschulbildung

Okt. 1997 – Jun. 2003 Studium der Biologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Hauptfach: Physikalische Biologie

Nebenfächer: Biologische Chemie

Physikalische Chemie

Mai/Jun. 2003 Diplomprüfung

Jul. 2003 – Jun. 2004 Diplomarbeit im Institut für Virologie

Thema: Identifizierung retroviraler Integrationsstellen mittels Ligationsvermittelter PCR (LM-PCR)

Abschluss mit der Gesamtnote ‚sehr gut‘

Betreuer: Prof. Heiner Schal, Prof. Rolf Wagner

Nebentätigkeiten

Mai – Sep. 1997 Grundpraktikum in der Laborgruppe für Produktentwicklung und Anwendungstechnik Neue Produkte 1, Laboratorium des CONDEA Werkes Meerbeck, Moers

Schulbildung

1983 – 1997 Grundschule und Gymnasium in Moers
Abschluss: Abitur mit der Note ‚befriedigend‘

Sprachkenntnisse

Englisch fließend in Wort und Schrift
Grundkenntnisse in Französisch
Latein

Zusatzqualifikationen

Jun. 2007 *Basic real-time PCR Training Course* (Applied Biosystems)
Dez. 2006 Erfolgreiche Teilnahme an der B1-GMP-Basis-/Einstiegsschulung bei CONCEPT
HEIDELBERG

VERÖFFENTLICHUNGEN IM RAHMEN DER PROMOTION

Linka, Y., S. Ginzl, M. Krüger, S. Daschkey, A. Novosel, E. Kremmer, M. Gombert, J. Harbott, R. Thiele, P. Landgraf and A. Borkhardt (2012). *A global view on the impact of TEL-AML1 (ETV6-RUNX1) expression using three different genome-wide screening methods*. Manuskript in Vorbereitung

Linka, Y., S. Ginzl, M. Krüger, A. Novosel, E. Kremmer, R.Thiele and A. Borkhardt (2011). *Genome-wide screening for TEL-AML1 (ETV6-RUNX1) target genes*. Poster Presentation during the 16th Congress of the European Hematology Association (EHA Abstract No. **782**)

Gefen, N., V. Binder, M. Zaliova, **Y. Linka**, M. Morrow, A. Novosel, L. Edry, L. Hertzberg, N. Shomron, O. Williams, J. Trka, A. Borkhardt and S. Izraeli (2010). *Hsa-mir-125b-2 is highly expressed in childhood ETV6/RUNX1 (TEL/AML1) leukemias and confers survival advantage to growth inhibitory signals independent of p53*. *Leukemia*, **24**, 89-96

SONSTIGE VERÖFFENTLICHUNGEN

Linka, R. M., S. Risse, K. Bienemann, M. Werner, Y. Linka, F. Krux, C. Synaeve, R. Deenen, S. Ginzl, R. Dvorsky, M. Gombert, A. Halenius, R. Hartig, M. Helminen, A. Fischer, P. Stepensky, K. Vetterranta, K. Köhrer, M. Ahmadian, H.-J. Laws, Fleckenstein, H. Jumaa, S. Latour, B. Schraven and A. Borkhardt (2012). *Loss-of-function mutations within the IL2-inducible kinase ITK in patients with EBV-associated lymphoproliferative diseases*. *Leukemia* (doi:10.1038/leu.2011.371; advanced online publication, 06.01.2012)

Si, Y., A. C. Pulliam, Y. Linka, S. Ciccone, C. Leurs, J. Yuan, O. Eckermann, S. Fruehauf, S. Mooney, H. Hanenberg and D. W. Clapp (2008). *Overnight transduction with foamyviral vectors restores the long-term repopulating activity of Fancc^{-/-} stem cells*. *Blood*, **112**, 4458-4465

Cai, S., A. Ernstberger, H. Wang, B. J. Bailey, J. R. Hartwell, A. L. Sinn, O. Eckermann, Y. Linka, W. S. Goebel, H. Hanenberg and K. E. Pollok (2008). *In vivo selection of hematopoietic stem cells transduced at a low multiplicity-of-infection with a foamy viral MGMT(P140K) vector*. *Exp Hematol*, **36**, 283-292

Kalb, R., K. Neveling, H. Hoehn, H. Schneider, Y. Linka, S. D. Batish, C. Hunt, M. Berwick, E. Callen, J. Surralles, J. A. Casado, J. Bueren, A. Dasi, J. Soulier, E. Gluckman, C. M. Zwaan, R. van Spaendonk, G. Pals, J. P. de Winter, H. Joenje, M. Grompe, A. D. Auerbach, H. Hanenberg and D. Schindler (2007). *Hypomorphic mutations in the gene encoding a key Fanconi anemia protein, FANCD2, sustain a significant group of FA-D2 patients with severe phenotype*. *Am J Hum Genet*, **80**, 895-910

Schindler, D., R. Friedl, I. Gavvovidis, R. Kalb, K. Neveling, Y. Linka, H. Hanenberg, M. Kubbies and H. Hoehn (2007). *Applications of Cell Cycle Testing in Fanconi Anemia*. In: *Fanconi Anemia. A Paradigmatic Disease for the Understanding of Cancer and Aging*. Monogr Hum Genet, Basel, Karger, **15**, 110-130

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich diese Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Düsseldorf,

Yvonne Linka